

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

Katedra biologických a biochemických věd

Ultracentrifugace lidské plazmy a její využití v klinické biochemii
Petra Zemanová

Bakalářská práce
2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Petra Zemanová**
Osobní číslo: **C15303**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Název tématu: **Ultracentrifugace lidské plazmy a její využití v klinické biochemii**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Seznamte se s literárními údaji o ultracentrifugaci biologických vzorků se zaměřením na lidskou plazmu. Popište principy analytické a preparativní ultracentrifugace a popište jejich význam pro analýzu substrátů lidské plazmy.
2. Vypracujte přehled přístrojové techniky ultracentrifugace, popište typy rotorů a analytické metody využívané k charakteristice rozdělení stanovovaných substrátů.
3. Popište využití ultracentrifugace při analýze lipoproteinů lidské plazmy. Uveďte základní charakteristiku lipoproteinů a popište jaké typy a podtypy lipoproteinů lze rozdělit pomocí ultracentrifugace. Popište využívané metodiky ultracentrifugace lipoproteinů v klinické biochemii a jejich diagnostické využití.
4. Informace přehledně zpracujte, použijte obrázky, schémata a grafy a ze získaných literárních údajů vyvoďte závěry o využití ultracentrifugace v klinické praxi a výzkumu.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce

Vedoucí bakalářské práce: **prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.**
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Radim Janeček**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **27. listopadu 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 29. 6. 2018

.....
Petra Zemanová

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce prof. Ing. Alexanderovi Čeganovi, CSc. za umožnění mít bakalářskou práci právě u něj a konzultantovi Mgr. Radimu Janečkovi za veškerou pomoc, věcné rady a trpělivost, kterou se mnou během psaní této práce měl. V neposlední řadě patří velké díky i mé rodině za podporu.

ANOTACE

Tématem této práce je Ultracentrifugace lidské plazmy a její využití v klinické biochemii. Popisuje jednotlivé typy ultracentrifugace, analytickou a preparativní, jejich instrumentaci, dále jednotlivé lipoproteiny a jejich analýzu pomocí této metody. Na konci se práce věnuje onemocněním týkající se ukládání lipidů do arteriálního endotelu, ateroskleróze.

KLÍČOVÁ SLOVA

Analytická ultracentrifugace, preparativní ultracentrifugace, lipoproteiny, ateroskleróza

TITLE

Ultracentrifugation of human plasma and its use in clinical biochemistry

ANNOTATION

The topic of this thesis is Ultracentrifugation of human plasma and its use in clinical biochemistry. This thesis is describing individual types of ultracentrifugation, analytical and preparative, their instrumentation, also individual lipoproteins and their analysis using this method. The end of the thesis is describing disease relating to the deposition of lipids into the arterial endothelium, atherosclerosis.

KEYWORDS

Analytical ultracentrifugation, preparative ultracentrifugation, lipoproteins, atherosclerosis

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK	9
SEZNAM ZKRATEK.....	11
ÚVOD	12
1 TYPY ULTRACENTRIFUGACE.....	14
1.1 Preparativní ultracentrifugace	14
1.1.1 Diferenciální (frakční) centrifugace	14
1.1.2 Centrifugace s hustotním gradientem.....	15
1.2 Analytická ultracentrifugace	18
1.2.1 Rychlost sedimentace	19
1.2.2 Sedimentační rovnováha	20
2 INSTRUMENTACE	22
2.1 Rotory.....	23
2.1.1 Rotory dle materiálu	24
2.1.2 Rotory dle pozice zkumavky.....	25
2.2 Kyvety	29
2.3 Optické systémy	32
2.3.1 Refraktometrické metody	33
2.3.2 Absorpční optika	36
2.3.3 Turbidimetrická detekce.....	37
2.3.4 Fluorescenční detekce	37
3 LIPOPROTEINY	39
3.1 Dělení lipoproteinů.....	39
3.1.1 Chylomikrony.....	39
3.1.2 VLDL	40
3.1.3 IDL	41
3.1.4 LDL	41

3.1.5	HDL.....	43
3.2	Metabolismus lipidů.....	45
3.2.1	Exogenní cesta.....	45
3.2.2	Endogenní cesta.....	46
4	Stanovení lipoproteinů pomocí ultracentrifugace	47
4.1	Ultracentrifugace s hustotním gradientem	47
4.2	Flotace	48
4.3	Analytická ultracentrifugace	49
5	ATEROSKLERÓZA.....	51
5.1	Stádia aterosklerózy	51
5.2	Rizika vzniku aterosklerózy	53
5.3	Ochranné procesy.....	54
5.4	Další poruchy metabolismu lipoproteinů	55
6	ZÁVĚR.....	57
7	POUŽITÁ LITERATURA.....	58

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

OBRÁZKY

OBRÁZEK 1 SCHÉMA PRŮBĚHU DIFERENCIÁLNÍ CENTRIFUGACE (1).....	14
OBRÁZEK 2 SCHÉMA POSTUPU DIFERENCIÁLNÍ CENTRIFUGACE U EXOSOMŮ (16).....	15
OBRÁZEK 3 SCHÉMA PRŮBĚHU ZÓNOVÉ CENTRIFUGACE (19).....	16
OBRÁZEK 4 SCHÉMA PRŮBĚHU ISOPYKNICKÉ CENTRIFUGACE (19).	18
OBRÁZEK 5 MĚŘENÍ SEDIMENTAČNÍ RYCHLOSTI (4).	19
OBRÁZEK 6 MĚŘENÍ SEDIMENTAČNÍ ROVNOVÁHY (36).....	20
OBRÁZEK 7 USPOŘÁDÁNÍ ULTRACENTRIFUGY (39).	23
OBRÁZEK 8 ORIENTACE VZORKŮ U BĚŽNÝCH TYPŮ ROTORŮ (37).....	26
OBRÁZEK 9 PRŮŘEZ VÝKYVNÝM ROTOREM (1).	26
OBRÁZEK 10 PRŮŘEZ ROTOREM S PEVNÝM ÚHLEM (1).....	27
OBRÁZEK 11 PRŮŘEZ VERTIKÁLNÍM ROTOREM (1).	28
OBRÁZEK 12 SCHÉMA KYVETY SE DVĚMA SEKTORY (4; 38).....	30
OBRÁZEK 13 STŘEDOVÉ DÍLY (39).	31
OBRÁZEK 14 SCHÉMA RAYLEIGHOVA INTERFERENCEČNÍHO OPTICKÉHO SYSTÉMU (39).	34
OBRÁZEK 15 SCHÉMA USPOŘÁDÁNÍ SCHLIERENOVA OPTICKÉHO SYSTÉMU (39).....	35
OBRÁZEK 16 SCHÉMA PŘÍSTROJE ABSORPČNÍHO OPTICKÉHO SYSTÉMU (14). ...	37
OBRÁZEK 17 STRUKTURA CHYLOMIKRONU A JEHO ZBYTKU (55).....	40
OBRÁZEK 18 STRUKTURA VLDL ČÁSTICE (49).....	41
OBRÁZEK 19 STRUKTURA ČÁSTICE LDL (49).	42
OBRÁZEK 20 STRUKTURA LIPOPROTEINU (A) (59).....	42
OBRÁZEK 21 STRUKTURA ČÁSTICE HDL (49).	43
OBRÁZEK 22 STRUKTURA PODTŘÍD HDL (61; 62).	44
OBRÁZEK 23 STÁDIA ATERO SKLERÓZY (86).....	52
OBRÁZEK 24 PRŮŘEZ TEPNOU V RŮZNÝCH STÁDIÍCH ATERO SKLERÓZY (79)....	53

TABULKY

TABULKA 1 POUŽITÍ MÉDIÍ U RŮZNÝCH ISOPYKNICKÝCH SEPARACÍCH (17)....	17
---	----

TABULKA 2 SHRNU TÍ APLIKACE A VYUŽITELNOSTI ROTORŮ U URČITÝCH METOD (17).....	29
TABULKA 3 SPECIFIKA ZÁKLADNÍCH OPTICKÝCH SYSTÉMŮ (25).....	33
TABULKA 4 PŘEHLED A SPECIFIKACE RŮZNÝCH LIPOPROTEINŮ (43).	45

SEZNAM ZKRATEK

AUC	Analytická ultracentrifugace
BODIPY	Borondipyrrromethene
CE	Estery cholesterolu
CETP	Protein uplatňující se při reverzním transportu cholesterolu
CM	Chylomikron
CVD	Kardiovaskulární onemocnění
DMSO	Dimethylsulfoxid
ER	Endoplazmatické retikulum
g	Tíhové zrychlení
GFP	Zelený fluorescenční protein
HDL	Lipoprotein s vysokou hustotou
HL	Jaterní lipáza
ICHS	Ischemická choroba srdeční
IDL	Lipoprotein střední hustoty
LCAT	Lecitin cholesterol acyltransferáza
LDL	Lipoprotein s nízkou hustotou
Lp (a)	Lipoprotein (a)
LPL	Lipoproteinová lipáza
MF	Makrofág
NBD	Nitrobenzoxadiazol
NCEP	Národní cholesterolový edukační program v USA
RCF	Relativní centrifugační síla
TAG	Triacylglyceroly
VLDL	Lipoprotein s velmi nízkou hustotou

ÚVOD

Sedimentace rozptýlených částic je proces vyvolaný silovým polem. Pokud na částice působí jen gravitační síla, sedimentace je pomalá nebo k ní prakticky nedochází. Pokud se k urychlení procesu sedimentace připojí rotace vzorku kolem osy rotace rotoru, působí na komponenty vzorku o několik řádů větší setrvačná odstředivá síla a v tomto případě mluvíme o centrifugaci. V průběhu tohoto procesu dochází k separaci složek vzorku zpravidla na dvě frakce, na sediment nacházející se na dně květy a na supernatant umístěný nad sedimentem (1; 2). Běžně dostupná zařízení určená k tomuto procesu, centrifugy, pracují při relativní centrifugační síle (RCF) do 20 000, nicméně k sedimentaci menších částic se využívají zařízení s mnohonásobně vyšší RCF nazývané ultracentrifugy (1).

Historie analytické ultracentrifugace sahá do minulého století, kdy jako první měřili distribuci velikostí částic na koloidech pomocí zvýšení otáček rotace a tím i centrifugační síly roku 1924 Rinde a Svedberg. Svedberg ultracentrifugaci vynalezl a o dva roky později za svoji práci získal Nobelovu cenu za chemii (3; 4; 5). Nichols, Kraemer a Bailey později vylepšili počáteční nastavení distribuce velikostí částic. Cantow byl naopak první, který změřil rozptyly polymerů turbidimetrickým detektorem uvnitř přístroje analytické ultracentrifugy (AUC). Použil Mieovu teorii rozptylu světla koloidních částic sférického tvaru k výpočtu správných hmotnostních procent různých frakcí částic.

Poté Scholtan a Lange vyvinuli další velmi jednoduché uspořádání pro měření distribuce velikostí částic, které využívalo malý turbidimetrický detektor s jedním paprskem. Toto uspořádání dále rozvíjel Machtle, který zavedl nové prvky. Změnil paprsek z jednoho na dvojí, sedminásobně zvýšil měřící kapacitu zavedením osmičlankového rotoru a multiplexoru, což umožňuje souběžné měření sedmi vzorků a standardu. A v neposlední řadě změnil modifikaci z obvyklého provozního režimu za použití konstantní rychlosti rotoru N na nový na čas závislý provozní režim N_t , ve kterém se rychlost rotoru zvyšuje exponenciálně během jedné analýzy z $N = 0$ na maximální rychlost $N = 40\,000$ otáček/min během hodiny vždy se stejným zrychlením. To umožňuje, aby byly vzorky obsahující velmi malé částice okolo 10 nm a velmi velké částice okolo 3 000 nm změřeny během jedné analýzy. Zavedením uspořádání paralelního dvojlaserového svazku se zvýšilo rozlišení a přesnost měření distribuce velikostí částic. Na počátku tohoto století se staly novým tématem extrémně malé anorganické koloidy v rozmezí 1-20 nm. Jejich rozptyl světla je tak slabý, že turbidimetrický detektor uvnitř ultracentrifugy se nemůže použít. Místo toho se

používají moderní UV skenery nebo detektory refrakčního indexu a rotory s konstantní vysokou rychlostí, stejně jako u rozpuštěných makromolekul (3).

Co se týče preparativní centrifugace, tak ta v minulosti dosáhla svého technického zdokonalení Claudem a kol. ve 40. letech minulého století, kdy se Claude zpočátku zajímal o izolaci viru, který způsoboval Rausův sarkom. Od toho ale opustil, jelikož byl zaujat myšlenkou, že ultracentrifugace umožní studovat normální buňky. To vedlo k vývoji diferenciální ultracentrifugace, díky níž za použití elektronového mikroskopu objevil mikrosomy, částice vznikající z endoplazmatického retikula při homogenizaci tkáně (6; 7; 8). V polovině 40. let odhalil, jak vypadají složky uvnitř buňky, nejvíce však endoplazmatické retikulum (ER). Palade, který v Claudově laboratoři pracoval, vylepšil centrifugační techniku a objevil a popsal ribozomy. Navíc dále zdokonalil skutečný obraz struktury mitochondrií a ER. De Duve po setkání s Claudem začal využívat centrifugaci a mikroskopii ke studiu subbuněčné úrovně. Objevil další část buňky, která obsahovala několik trávicích enzymů. Dostala jméno lysozym a je zodpovědná za destrukci proteinů v buňce. Všichni tři získali roku 1974 Nobelovu cenu za objev týkající se strukturální a funkční organizace buňky, kdy jejich práce je považována za počátek buněčné biologie (9; 10).

I když ultracentrifugace v 70. a 80. letech ztratila na popularitě, v 90. letech opět nabyla popularity díky nové instrumentaci a numerické analýze, hlavně co se týče studia proteinových interakcí (11).

1 TYPY ULTRACENTRIFUGACE

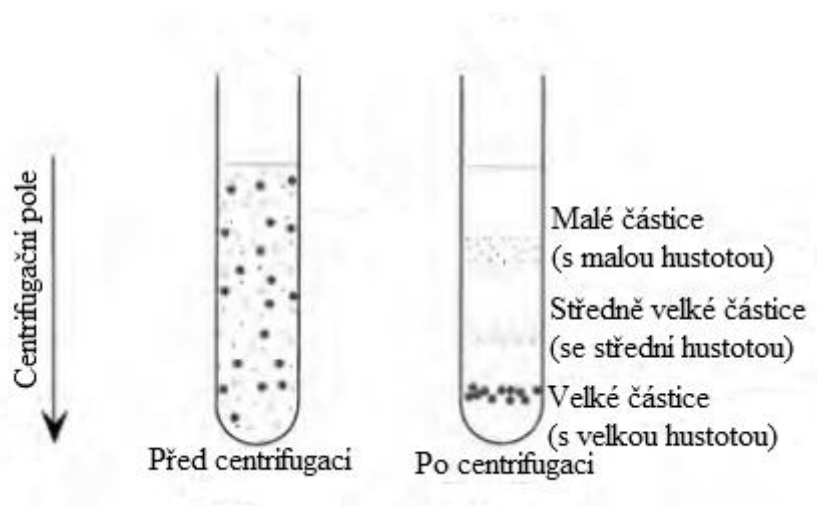
1.1 Preparativní ultracentrifugace

Tento typ centrifugace slouží k izolaci buněk z biologického materiálu, kdy vzorek je centrifugován a sediment buněk se nanáší na mikroskopické sklíčko k další analýze. Metoda se využívá např. pro diagnostiku nádorových onemocnění (1).

Preparativní ultracentrifugy lze použít k izolaci membránových frakcí a ribozomů nebo k přípravě vzorků virů a k izolaci makromolekul (12).

1.1.1 Diferenciální (frakční) centrifugace

Jedná se o nejjednodušší formu separace centrifugací, kdy se částice o různé hustotě či velikosti usazují v suspenzi při různých rychlostech, přičemž větší a hustší se usazují rychleji. Během tohoto procesu je suspenze buněk podrobena sérii cyklů se stoupajícími centrifugačními poli, kdy se buňky nejprve rozdělí mechanickou homogenizací a při odstředění výsledného homogenátu se získá supernatant a sediment. Sediment se vyjme a supernatant se odstředí vyšší rychlostí. Tento proces se několikrát opakuje (2; 7). Obecně se tato metoda zaměřuje na izolaci menších částic od větších. Poskytuje dobré výsledky za předpokladu, že sedimentační koeficienty částic se významně liší (o několik řádů), naopak je mnohem méně účinná, když jsou jen malé rozdíly v sedimentačních rychlostech částic (13). Schéma diferenciální centrifugace popisuje obrázek 1.

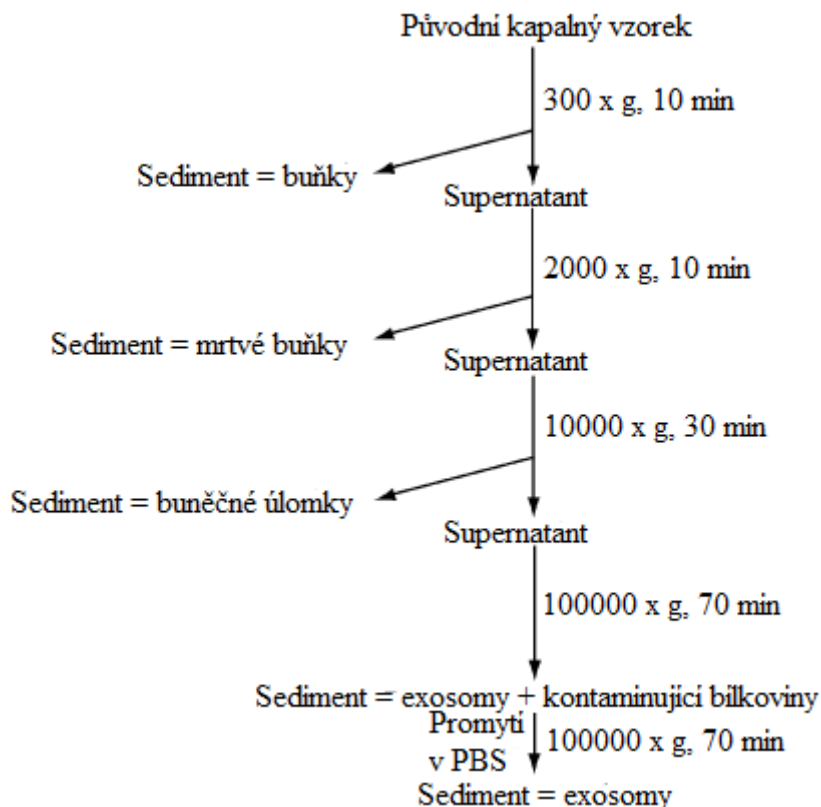


Obrázek 1 Schéma průběhu diferenciální centrifugace (1).

Ke zvýšení výtěžku membránových struktur a uvolněných proteinových agregátů se často sedimenty buněčných úlomků několikrát rehomogenizují a znovu odstředují (6; 14).

Účinnost této metody klesá, pokud se k analýze používají viskózní biologické tekutiny jako plazma a sérum (15).

Využívá se k izolaci makromolekul, buněk, organel či k odstředování sraženin (1). Příkladem použití může být i diferenciální centrifugace exosomů, jejíž postup popisuje obrázek 2.



Obrázek 2 Schéma postupu diferenciální centrifugace u exosomů (16).

1.1.2 Centrifugace s hustotním gradientem

Tento typ centrifugace je preferovaný způsob k čištění subcelulárních organel a makromolekul, kdy se hustotní gradienty tvoří vrstvením vrstvy po vrstvě gradientního média, jako je například sacharóza, do kyvety, kdy hustota klesá od dna k hladině kyvety (1; 2; 17). Frakce buněk, které se mají separovat, se umístí navrch a odstředí se (2; 18).

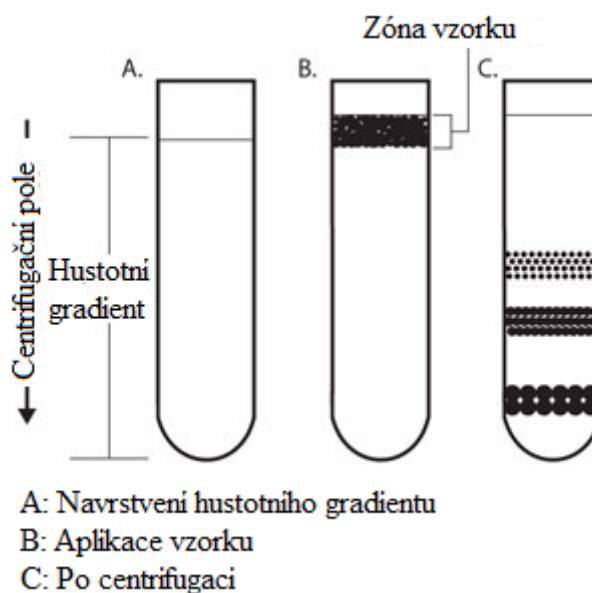
Hustotní gradient může být spojitý (kontinuální) nebo nespojitý (diskontinuální). Spojitý gradient vzniká působením odstředivé síly nebo postupným mísením dvou roztoků o rozdílné hustotě, přičemž jejich poměr se plynule mění. Přípravuje se jako lineární, konvexní či konkávní gradient. Nespojitý gradient se naopak připravuje postupným nanášením roztoků o klesající hustotě do zkumavek (1). Spojité gradienty jsou vhodné pro separaci celých buněk nebo subcelulárních organel a pro izolaci některých typů virů.

Naopak nespojité gradienty se užívají více, jelikož částice prochází skrze rozhraní mezi vrstvami gradientu a jejich sběr je snazší. Používají se např. při izolaci buněčných organel a některých virů, a také hormonů, enzymů a dalších proteinů, stejně jako nukleových kyselin (12; 19).

Separace na základě hustotního gradientu lze dělit do dvou kategorií, zónovou a isopyknickou separaci (2).

1.1.2.1 Zónová (rychlostní) centrifugace

Vzorek se vrství v úzké zóně navrch hustotního gradientu, kde se částice při odstředivé síle pohybují v různých rychlostech v závislosti na jejich velikosti a hmotnosti (2; 17). Jak se částice pohybují směrem dolů, tvoří se zóny obsahující částice o podobné velikosti. Postup je vyobrazen na obrázku 3.



Obrázek 3 Schéma průběhu zónové centrifugace (19).

Hustota částic je větší než hustotní gradient, z toho důvodu částice nakonec vytvoří sediment, pokud se bude dostatečně dlouho odstřeďovat (19). Příklady běžných aplikací jsou separace buněčných organel, jako jsou endosomy, nebo separace proteinů, jako jsou protilátky, které mají velmi podobnou hustotu, ale různou hmotnost, na jejímž základě se dělí do tříd (12; 17).

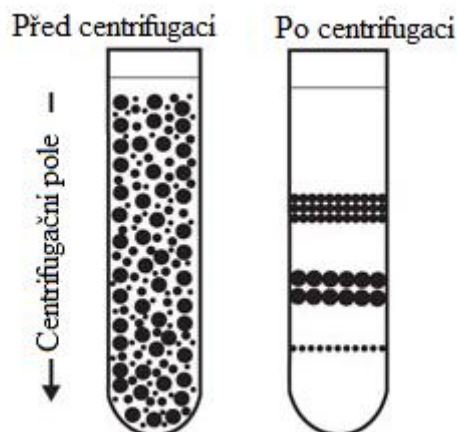
1.1.2.2 Isopyknická centrifugace

Počátky této techniky sahají do roku 1957, kdy při jejím zrodu stáli Meselson, Stahl a Vinograd (20). Částice se dělí jen na základě hustoty, kdy velikost částic ovlivňuje pouze rychlost pohybu částic, dokud není jejich hustota stejná jako u okolního gradientního média. Příklady použití znázorňuje tabulka 1.

Tabulka 1 Použití médií v různých isopyknických separacích (17).

Médium	Buňky	Viry	Organely	Nukleoproteiny	Makromolekuly
Cukry (např. sacharóza)	limitované	dobré	dobré	limitované	nevyhovující
Polysacharidy (např. Ficoll)	pro určité aplikace	pro určité aplikace	pro určité aplikace	nevyhovující	nevyhovující
Koloidní oxid křemičitý (např. Percoll)	dobré	limitované	dobré	nevyhovující	nevyhovující
Jodové médium (např. Nycodenz)	výborné	pro určité aplikace	výborné	dobré	limitované
Soli alkalických kovů (např. CsCl)	nevyhovující	pro určité aplikace	nevyhovující	pro určité aplikace	výborné

Podmínkou je, aby hustota média byla větší než hustota částic, které se mají separovat, díky čemuž částice nebudou nikdy na dno kyvety sedimentovat. Po centrifugaci se částice o specifické hustotě usazují, dokud nedosáhnou místa, kde je jejich hustota stejná jako gradientního média, tedy do rovnovážné polohy (2; 12; 18; 19). Schéma průběhu centrifugace popisuje obrázek 4. Obvyklým příkladem této metody je separace nukleových kyselin v gradientu CsCl (17).



Obrázek 4 Schéma průběhu isopyknické centrifugace (19).

1.2 Analytická ultracentrifugace

Jedná se v podstatě o preparativní ultracentrifugaci, která zahrnuje jistou formu optického systému pro pozorování sedimentace částic (makromolekuly či makromolekulární agregáty) v reálném čase a v odstředivém poli, což umožňuje velmi přesné stanovení hydrodynamických a termodynamických parametrů. Pomocí této metody se získávají sedimentační a difúzní koeficienty.

Rychlost sedimentace poskytuje hydrodynamickou informaci o velikosti a tvaru molekuly, zatímco sedimentační rovnováha poskytuje termodynamickou informaci o molární hmotnosti roztoku, asociačních konstantách a stechiometriích. Navíc účelem je charakterizovat klíčové vlastnosti vzorku než příprava či čištění vzorku pro následné použití (12; 21; 22; 23; 24).

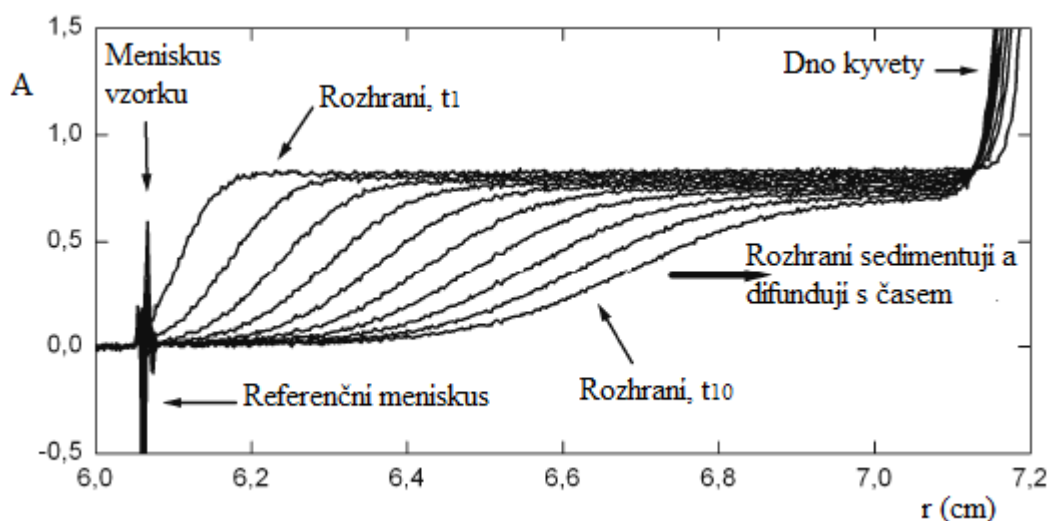
Na rozdíl od spousty běžně užívaných metod jsou vzorky při použití AUC charakterizovány v jejich přirozeném stavu. Analýzy se provádějí ve volném roztoku, takže nedochází k žádným komplikacím v důsledku interakce s matricemi či povrchy, což může zatlačit do pozadí některé typy běžně používaných metod jako je gelová filtrace. Další výhodou je, že analytická ultracentrifugace je nedestruktivní, proto mohou být vzorky po AUC dále využity pro další analýzy (21; 25; 26).

Využívá se v biologických vědách ke studiu fyzikálních a chemických vlastností proteinů, nukleových kyselin, polysacharidů a supramolekulárních struktur, jako jsou ribozomy, viry a enzymy o více podskupinách (27).

Analytická ultracentrifuga pracuje ve dvou základních režimech: sedimentační rychlosti a sedimentační rovnováze (28).

1.2.1 Rychlost sedimentace

Rychlost sedimentace je hydrodynamickou technikou (29). Při použití dostatečně velké odstředivé síly za vysokých otáček se začnou všechny makromolekuly stejnoměrně pohybovat ke dnu kyvety. Dochází tak k vytvoření pohybujícího se rozhraní mezi sedimentujícími makromolekulami a místem roztoku, ve kterém se již nenacházejí. Toto rozhraní se pohybuje od menisku směrem ke dnu kyvety a rychlost pohybu rozhraní se sleduje sérií snímků. Vlivem difuze však zároveň dochází k rozmývání tohoto rozhraní, což se na snímcích projeví změnou jeho tvaru, jak popisuje obrázek 5 (4; 29). U homogenních vzorků se tvoří jedno rozhraní, u směsí buď jedno či více rozhraní (29).



Obrázek 5 Měření sedimentační rychlosti (4).

Rychlost sedimentace se využívá kvalitativně k charakterizaci homogenity vzorku a kvantitativně k určení hmotnosti a tvaru molekul přítomných ve vzorku (29; 30). Z rychlosti pohybu a tvaru rozhraní lze určit sedimentační a difúzní koeficient dané makromolekuly (4).

1.2.1.1 Difúzní koeficient

Difúzní koeficient je definován prvním Fickovým zákonem:

$$J = -D\nabla C,$$

kde J je tok látky (celkový počet částic dopravených za jednotku času napříč jednotku povrchu), D difúzní koeficient a ∇C koncentrační gradient (31).

1.2.1.2 Sedimentační koeficient

Sedimentační koeficient charakterizuje pohyb částic v odstředivém poli a vyjadřuje sedimentační rychlost na jednotku odstředivé síly:

$$s = \frac{dr}{dt} \times \frac{1}{\omega^2 r},$$

kde s je sedimentační koeficient, r poloměr od středu rotace, t čas a ω je úhlová rychlost (31; 32; 33). Má rozměry v sekundách a vyjadřuje se ve Svedbergových jednotkách rovnajících se 10^{-13} s (29). Experimentálně lze stanovit sedimentační koeficient jen pomocí ultracentrifugy (31).

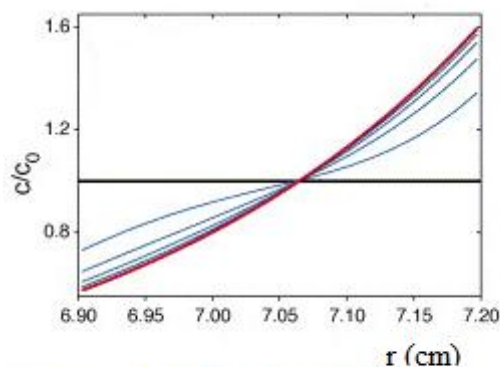
Pomocí sedimentačního koeficientu lze vypočítat k -faktor, který ustanovuje minimální dobu analýzy potřebnou k sedimentaci částic. Za předpokladu, že známe sedimentační koeficient, lze k -faktor vypočítat ze vztahu:

$$k = T \times S,$$

kde T je čas v hodinách potřebný k sedimentaci a S sedimentační koeficient ve Svedbergových jednotkách (29).

1.2.2 Sedimentační rovnováha

Při této analýze je vzorek centrifugován při nižších otáčkách, kdy rozpuštěné látky sedimentují ke dnu kyvety. U dna se zvyšuje jejich koncentrace, v blízkosti menisku naopak klesá a difúze začíná působit proti sedimentaci. Po určitém čase se tyto dva protikladné procesy dostanou do vzájemné rovnováhy a koncentrační profil se dále nemění. Nevytvoří se žádné pravé rozhraní, jak znázorňuje obrázek 6 (4; 34; 35).



c/c_0 = poměr koncentrace v dané radiální poloze a času ku koncentraci před centrifugací

Obrázek 6 Měření sedimentační rovnováhy (36).

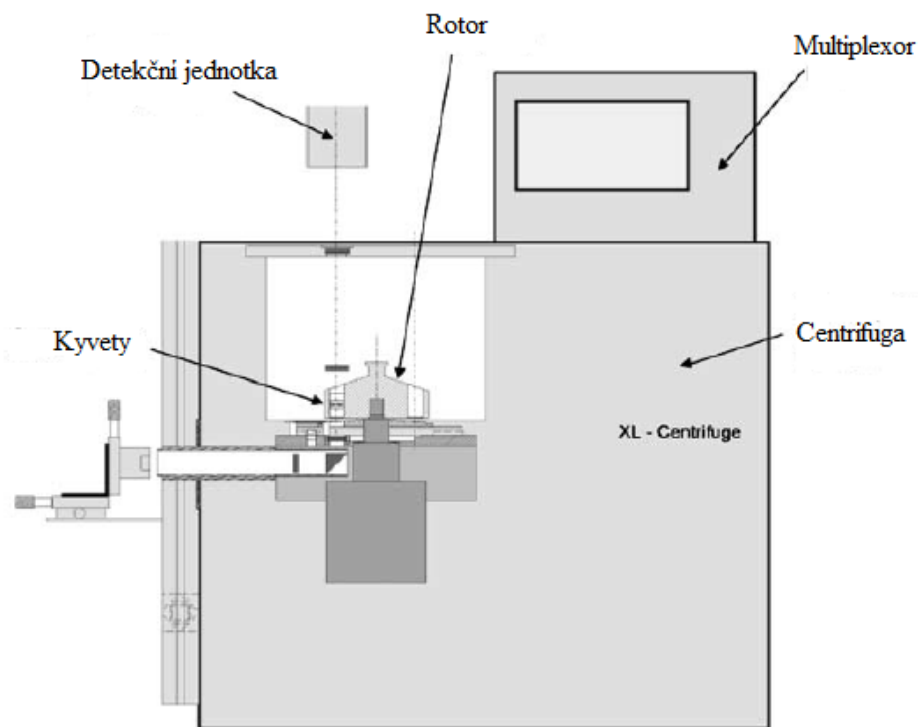
Sedimentační rovnováha je jedna z nejlepších metod určování molekulové hmotnosti makromolekul, od sacharidů ($M_r = 360$) až po viry ($M_r =$ mnoho milionů). Pomocí využití fyziologických pufrů lze určit molekulové hmotnosti proteinových komplexů či stabilních nativních oligomerů proteinů, zatímco pomocí denaturujících roztoků chaotropních činidel, např. močoviny, lze určit hmotnost podjednotek (4). Je i nejvhodnější metodou ke stanovení stechiometrie mezi různými proteiny nebo pro charakterizaci pevnosti reverzibilních vazebných interakcí (30; 35).

2 INSTRUMENTACE

Centrifuga je zařízení vytvářející odstředivé pole rychlou rotací rotoru. Speciální konstrukce centrifug nám dovoluje nechat působit tato pole na vzorky uvnitř rotoru, což vede k sedimentaci nebo flotaci rozpuštěných nebo dispergovaných makromolekul či částic a také k jejich frakcionaci, pokud mají makromolekuly či částice různé velikosti či hustoty. Částice v centrifuze sedimentuje rychlostí, která je úměrná odstředivé síle na ni působící. Při stálé odstředivé síle a viskozitě kapaliny je rychlost sedimentace částice úměrná její velikosti (molekulovou hmotností) a rozdílem mezi hustotou částice a hustotou roztoku.

Ultracentrifugy vytvářejí pole vyšší než 5000 násobek zrychlení způsobené zemským gravitačním polem. Jsou nejen chlazeny, ale rotor je též uložen ve vakuové komoře, aby se zabránilo tření mezi molekulami vzduchu a rotorem, což by zvyšovalo teplotu rotoru a samotného vzorku během centrifugace. Dále je důležité, aby rotující rotor byl stabilní a prostý otřesů. Nestabilita totiž může způsobit proudění a mísení obsahu zkumavky, obzvláště pokud jsou koncentrace a koncentrační gradient rozpuštěné látky nízké a mohou vést ke komplikacím v koncentrační distribuci v oblastech s vysokým koncentračním gradientem (12; 21; 37; 38; 39).

Ultracentrifugy jsou schopny dosáhnout rychlosti okolo 100 000 - 150 000 otáček/min s odpovídajícím maximem RCF přibližně 800 000 tíhového zrychlení (g) (12). RCF je poměr odstředivého zrychlení při určeném poloměru a rychlosti k standardnímu gravitačnímu zrychlení, tedy udává, kolikrát je odstředivé zrychlení vyvinuté centrifugou větší, než je tíhové zrychlení (1; 32). Základní uspořádání ultracentrifugy znázorňuje obrázek 7.



Obrázek 7 Uspořádání ultracentrifugy (39).

2.1 Rotory

Rotor je část centrifugy, která slouží k umístění kyvet či zkumavek se vzorky (1). Základní analytická centrifuga je vybavena rotorem se čtyřmi otvory. Jeden z otvorů se obvykle používá jako referenční (říká se mu protiváha) k provádění kalibrace při dané centrifugační rychlosti, tři místa poté zbývají na vzorky. Provoz s několika kyvetami zvyšuje počet vzorků, které lze měřit během jediné analýzy (38; 39).

Ultracentrifugační rotory, které jsou vyráběny v oválném tvaru z důvodu zvýšení rychlosti, musí být schopné odolat obrovskému gravitačnímu stresu. Například při 60 000 otáček za minutu generuje typický rotor ultracentrifugy odstředivé pole ve zkumavce okolo 250 000 g. Za těchto podmínek má 1 g zjevnou hmotnost 250 kg, tj. ¼ tuny. Rotor také musí umožňovat průchod světla skrze rotující vzorek v případě AUC díky průhlednému krytu a také musí být přítomen jistý mechanismus pro měření teploty (38; 40; 41). Ohřívání rotoru je minimalizováno jeho provozem ve vakuové komoře.

Mimo jiné jsou v zařízení obsaženy četné bezpečnostní prvky a možné úchyty rotoru i při vysokých rychlostech, aby se možné poškození izolovalo jen na ultracentrifugu a nedošlo k poranění obsluhy či poškození jiného vybavení laboratoře (40).

2.1.1 Rotory dle materiálu

V minulosti se používaly rotory z ocele a hliníku, v dnešní době převládají rotory z titanu (39).

2.1.1.1 Rotory z hliníkové slitiny

K dosažení vysokého výkonu požadovaného pro velmi vysoké rychlosti centrifugačních rotorů lze použít slitiny titanu a hliníku. I když jsou levnější, o rotory vyrobené z hliníkové slitiny je nutné se pečlivě starat, protože materiál je obzvláště náchylný ke korozi. Větší koroze hliníkových rotorů je způsobena kyselinami, zásadami a vysokými koncentracemi solných roztoků (např. NaCl a KBr používaných při frakcionacích lipoproteinů, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ použitého při srážení bílkovin a soli cesia nebo rubidia používané při přípravě hustotních gradientů) z důvodu mechanického poškození, potřísnění rotoru a neošetření neutrálním roztokem (6; 37; 42). Nicméně i zředěné roztoky solí v pufrech mohou být koncentrované z důvodu odpařování rozpouštědla a to opět vede ke korozi rotorů (37).

Hliníkové rotory jsou obvykle anodizovány neboli eloxovány, kdy se na jejich povrchu vytvoří ochranná vrstva oxidu hlinitého. Takto se zamezí korozi a opotřebení, ale to není vždy nejúčinnější metoda ochrany kovu, protože je tato vrstva tenká a snadno se poškrábe. Pokud je anodická fólie během centrifugace nějakým způsobem poškozena, kapalina přítomná v dutině zkumavky rotoru je zatlačena do krystalické struktury kovu. To nakonec vede ke stresové korozi, která je hlavní příčinou poruchy těchto rotorů (12; 37; 43).

2.1.1.2 Titanové rotory

Titanové rotory jsou na rozdíl od hliníkových odolnější vůči korozi, protože na slitinu z titanu nepůsobí většina kyselin, zásad a roztoků solí, ale má tu nevýhodu, že je mnohem dražší. Vysoce výkonné rotory z titanu vydrží více cyklů při plné rychlosti než rotory hliníkové. Nicméně opakované cykly zrychlení a zpomalení z maximální rychlosti nakonec rotor oslabují, což si vyžádá snížení maximální rychlosti nebo výměnu rotoru.

2.1.1.3 Rotory z uhlíkových vláken

Jednou z hlavních patentovaných inovací centrifugace 90. let bylo zavedení rotorů z uhlíkových vláken, které skýtají mnoho výhod. Tyto rotory jsou až o 60 % lehčí

než srovnatelné rotory z titanu a o 50 % lehčí než srovnatelné rotory z hliníkové slitiny, což usnadňuje jejich zvedání, přenášení a čištění. Kromě toho jsou schopny dosáhnout maximální rychlosti rychleji než srovnatelné rotory z kovu (12; 37).

Vzhledem k pevnosti kompozitního materiálu dalece převyšuje jejich životnost životnost kovových rotorů. Z důvodu zabránění poruše rotoru zveřejňuje většina výrobců doporučené instrukce pro demontáž a výměnu kovových rotorů založené na určitém počtu chodů nebo hodin, což u tohoto typu rotorů není nutné.

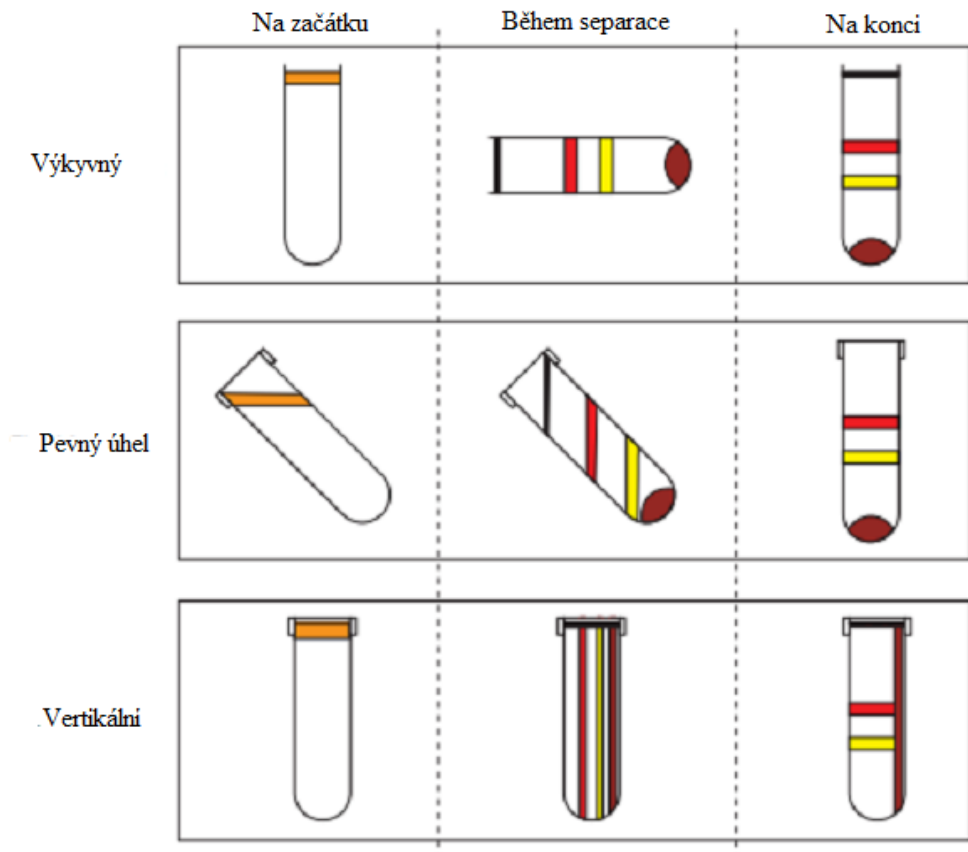
Co se týče koroze, tak uhlíkové vlákno je proti ní odolné na rozdíl od hliníku a titanu. Výsledkem je, že tyto rotory jsou odolnější k expozici pravidelně se vyskytujících laboratorních žiravin a neskýtají riziko v použití s většinou zásaditých laboratorních detergentů.

Materiály z uhlíkových vláken jsou tepelnými izolátory, ne tepelnými vodiči, proto zůstávají biologické vzorky při konstantní teplotě během centrifugace mnohem déle než u kovových rotorů. Výsledkem je, že chladicí systém centrifugy může pracovat méně a trvat déle, čímž poskytne konečnému uživateli zvýšenou ochranu vzorku i úsporu energie (37).

2.1.2 Rotory dle pozice zkumavky

Výběr rotoru, který použijeme, závisí na objemu vzorku, počtu částic ve vzorku, které se mají odseparovat, velikosti částic a/nebo hustotě, požadovaném času chodu a požadované kvalitě separace.

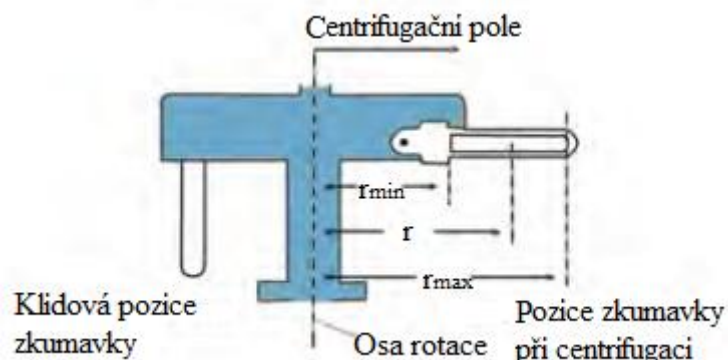
Typy běžných rotorů jsou výkyvné, s pevným úhlem, vertikální a téměř vertikální. Orientaci vzorku popisuje obrázek 8.



Obrázek 8 Orientace vzorků u běžných typů rotorů (37).

2.1.2.1 Výkyvné rotory

U výkyvných rotorů dochází během centrifugace k plynulé změně úhlu, jenž zkumavky svírají s osou rotace rotoru. Na začátku analýzy jsou ve vertikální poloze. Po zahájení centrifugace se změni poloha téměř na horizontální, tj. o cca 87° (1; 17), jak popisuje obrázek 9.



Obrázek 9 Průřez výkyvným rotorem (1).

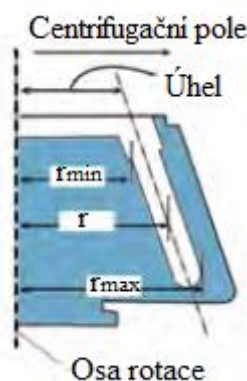
Tyto rotory se používají k usazování částic v roztoku, rychlostním zónovým studiím (separaci v závislosti na velikosti a hustotě částic) a isopyknickým studiím s hustotním

gradientem (separace jen v závislosti na hustotě). Nejčastěji se však využívají při zónové metodě s hustotním gradientem, ve které je zapotřebí maximální rozlišení komponent ve vzorku. Nicméně vzhledem k délce zkumavek ve vodorovné poloze jsou časy analýzy u této metody k separaci vzorku velmi dlouhé a to v důsledku zvýšené vzdálenosti, kterou musí částice ujít pro účinnou separaci.

Rychlostní zónová metoda odděluje částice na základě velikosti a sedimentačního koeficientu. Během centrifugace se celková hmotnost vzorku ve zkumavkách soustřeďuje na dno v tomto typu rotorů. Tato váha kyvet způsobuje při procesu centrifugace jejich nadměrné namáhání a může vést až k jejich selhání (37; 44).

2.1.2.2 Rotory s pevným úhlem

U rotorů s pevným úhlem se úhel, který svírají zkumavky s osou otáčení rotoru, pohybuje v rozmezí od 17° po 34° ve vysokoobjemových centrifugách, zatímco úhel může být až 45° ve stolních modelech či mikroobjemových rotorech. Tyto úhly umožňují bezpečně dosáhnout nejvyšší možnou rychlost s nejkratší dobou dráhy či radiální vzdálenosti s kratší dobou analýzy. Rotory s pevným úhlem se nejlépe využívají pro usazování částic v roztoku, ale také pro centrifugaci v hustotním gradientu. Jsou to nejuniverzálnější rotory centrifugy (1; 37). Průřez tímto rotorem zobrazuje obrázek 10.

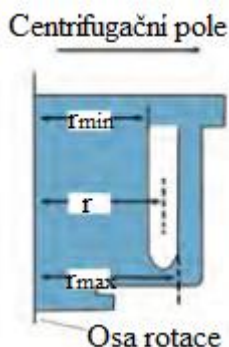


Obrázek 10 Průřez rotorem s pevným úhlem (1).

Částice u těchto rotorů se pohybují spirálovitě směrem dolů (Coriolisův efekt), jak migrují směrem ke stěně během centrifugace, dokud počáteční sediment nenaplní polokulovité dno zkumavky. Další sedimentující částice se shromažďují na povrchu sedimentu pod úhlem, který je shodný s osou otáčení. Usazování materiálu na stěně zkumavky se pozoruje pouze tehdy, je-li počáteční koncentrace sedimentujících částic v roztoku extrémně vysoká (37).

2.1.2.3 Vertikální a téměř vertikální rotory

Vertikální rotory udržují centrifugační zkumavky 0° od osy otáčení rotoru a téměř vertikální rotory mají úhly menší než 9° . Z toho důvodu mají tyto rotory nejkratší délku dráhy či radiální vzdálenost. Průřez rotorem popisuje obrázek 11.



Obrázek 11 Průřez vertikálním rotorem (1).

Během centrifugace se komponenty vzorku rozdělí do vertikálních zón, které po proběhnutí centrifugace vytvoří vrstvy horizontální (1; 37). Kratší délka dráhy vertikálního rotoru snižuje dobu chodu u isopyknických studií s hustotním gradientem. Nicméně rozdíl se vytrácí, když separace zahrnuje vzorek s více složkami, protože sediment nashromážděný na stěně zkumavky zůstane, dokud se neukončí centrifugace. Poté, co rotor zpomalí, aby zastavil, veškerý sediment, který se usadil během centrifugace, odpadne ze stěny zkumavky a znovu kontaminuje separované zóny vzorku v roztoku (37).

Vertikální rotory se používají zejména k separaci vzorků o malých objemech. S krátkou délkou dráhy umožňují rychlou separaci (44).

2.1.2.4 Zonální a průtokové rotory

Tyto dva typy rotorů se využívají pro preparativní izolaci částic z velkých objemů. První z nich, zonální rotor, se používá pro objemy 300 - 1700 ml a umožňuje centrifugaci v hustotním gradientu, kdy k plnění a vyprazdňování rotoru dochází během jeho otáčení, díky čemuž se zabraňuje promíchání gradientu. Používá se například pro přípravu vakcín a u rychlostní zónové centrifugace (1; 14). Výhodou je krátké trvání analýzy a dobrá kvalita dělení. Největší nevýhodou je však zředění vzorků, ke kterému dochází, což vyžaduje po analýze zakoncentrování (44).

Druhý z nich, průtokový rotor, je možné využít k zakoncentrování částic z roztoku. Kapalina oprostěná sedimentovaných částic nebo obsahující lehčí částice odtéká během centrifugace ven z rotoru speciálním kanálkem a těžší částice se zakoncentrovávají v rotoru.

Některé rotory jsou uzpůsobeny k tomu, aby bylo možné odvádět z rotoru i usazené částice k dalšímu zpracování (1).

Využitelnost vybraných typů rotorů u daných metod popisuje tabulka 2.

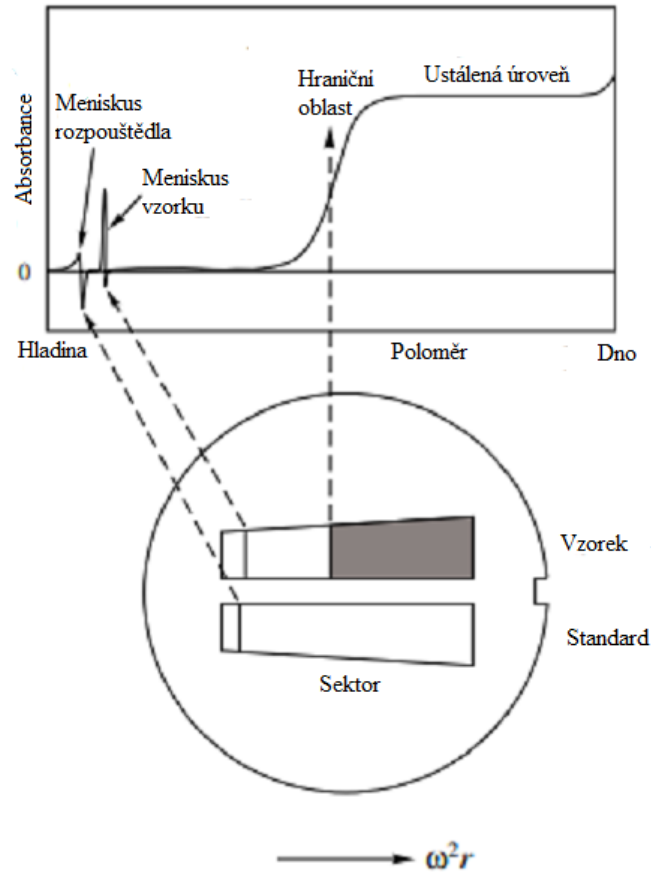
Tabulka 2 Shrnutí aplikace a využitelnosti rotorů u určitých metod (17)

Typ rotoru	Sedimentace	Rychlostní zónová metoda	Isopyknické studie
S pevným úhlem	Výborný	S určitým omezením	Variabilní
Výkyvný	Neefektivní	Dobry	Dobry
Vertikální	Nevhodný	Dobry	Výborný
Zonální	Nevhodný	Výborný	Dobry

2.2 Kyvety

Vzorky určené k analýze jsou umístěny v kyvetách či zkumavkách, které se vyznačují různým tvarem i velikostí. Na základě velikosti jsou schopny pojmout různý objem, od desetin mililitrů po několik litrů. Plní se obvykle do 2/3 objemu, výjimkou jsou však uzavíratelné kyvety, které se plní úplně (1).

Analytické ultracentrifugační kyvety musí odolávat tlakům způsobenými extrémně vysokými gravitačními poli, nesmí téct ani se deformovat, a přesto musí umožňovat průchod světla skrze vzorek, aby bylo možné měřit distribuci koncentrace v případě AUC (38; 39). K dosažení těchto cílů je vzorek uložen obvykle uvnitř dutiny ve tvaru sektoru (viz obrázek 12) mezi dvěma tlustými okénky křemene či safíru (38).



Obrázek 12 Schéma kyvety se dvěma sektory (4; 38).

Křemen se využívá obvykle pro absorpční detekci, zatímco safír pro interferenční optický systém, jelikož má vyšší odolnost vůči mechanickému namáhání, které by mohlo zkreslovat výsledky (45; 46). Výhodou křemene je nižší cena a také širší spektrum světla, které jím může procházet při použití UV detektorů (39). Kyvety se dvěma sektory jsou pro AUC k dispozici s optickými délkami 3 a 12 mm. Kombinace různých délek optické dráhy a volitelných vlnových délek umožňuje měření širokého rozsahu koncentrací vzorku (38).

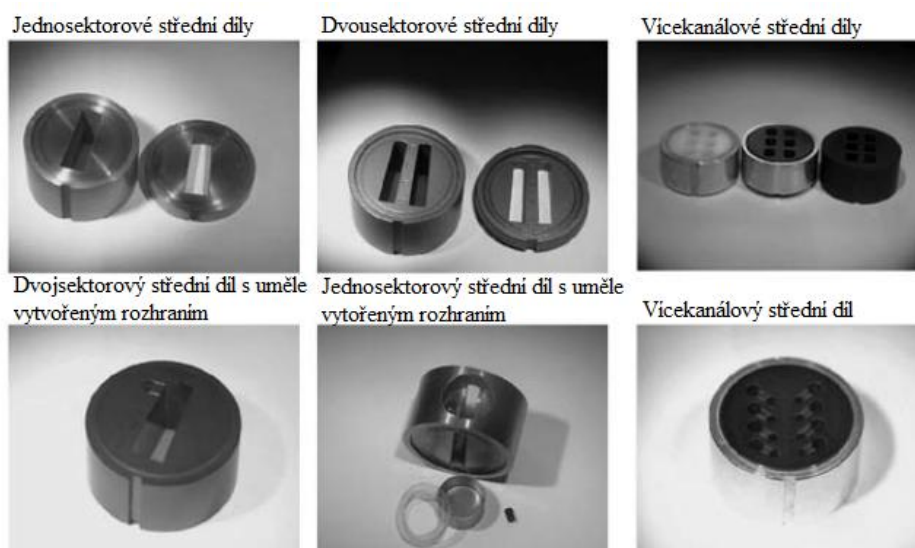
Kyvety ve tvaru sektoru jsou nepostradatelné pro rychlostní práci, protože sedimentující částice se pohybují po radiálních liniích. Pokud by byly prostory rovnoběžně, sedimentující molekuly by na okraji narazily do stěn a způsobovaly by chyby způsobené prouděním (38; 39).

Vzorek roztoku se umístí do jednoho sektoru a vzorek rozpouštědla, zpravidla pufru, do něhož je vzorek převeden dialýzou, do sektoru druhého. Referenční sektor je obvykle plněn o něco více než sektor vzorku z toho důvodu, aby referenční meniskus nezakrýval meniskus vzorku. Optický systém měří rozdíl v absorbanci mezi vzorkem a referenčním

sektorem. Kyvety se dvěma sektory také usnadňují měření rozdílů v sedimentačním a difuzním koeficientu (4; 38).

Srdcem kyvety je středový díl, který si často tvoří nebo upravují sami uživatelé za účelem přizpůsobit jej pro své speciální potřeby. Je vyroben z hliníkové slitiny zesílené epoxidem nebo polymerem známým jako Kel-F (38; 39). V zásadě existují čtyři typy (viz obrázek 13):

- a) jednosektorový – obsahuje jen roztok vzorku; používá se hlavně u Schlierenova optického systému a turbidimetrické detekce,
- b) dvousektorový – vyznačuje se dvěma oddělenými komorami, jedna slouží pro roztok vzorku, druhý pro rozpouštědlo; používá se u základních detekčních systémů (Ryleighově interferenční optice, UV/VIS absorpci a Schlierenově optickém systému),
- c) vícekanálový – je určen pro tři až pět vzorků; používá se výhradně v sedimentačních rovnovážných analýzách,
- d) středový díl s uměle vytvořeným rozhraním – existuje ve dvou podobách, kapilární a záklopkové; umožňuje vrstvení rozpouštědla nebo roztoku na roztok vzorku nebo rozpouštědla, zatímco se otáčí rotor (39); mohou se použít např. pro pozorování nukleace a růstu anorganických koloidů (11).



Obrázek 13 Středové díly (39).

Co se týče kyvet využívaných u preparativní ultracentrifugace, tak ty se využívají následující:

- a) polypropylenové – průsvitné či průhledné v závislosti na tloušťce stěny; obvykle nesmáčitelné; opakovaně použitelné; využívající se u mnoho kyselin, zásad, alkoholů, dimethylsulfoxidu (DMSO) a některých organických rozpouštědel; mohou se používat s i bez víčka v rotoru s pevným úhlem (32),
- b) polypropylen tereftalátové - nevhodné pro organická rozpouštědla (47),
- c) polykarbonátové – pevné, neohebné, nesmáčivé; skleněný vzhled; používané v rotoru s pevným úhlem a v polovině rotorů výkyvných; vlivem stresu může docházet k tvorbě jemných trhlin, které postupně nabývají na velikosti a způsobují únik kapaliny; materiál se vyznačuje odolností vůči všem gradientním médiím kromě alkalických látek; využívají se pro některé slabé kyseliny, nevhodné jsou pro všechny báze, alkohol, alkalické detergenty a další organická rozpouštědla (32; 47),
- d) polyethylenové – průsvitné či průhledné; odolné vůči silným kyselinám a zásadám; opakovaně použitelné; u výkyvného rotoru se používají bez víčka a s nebo bez víčka v rotoru s pevným úhlem,
- e) ultra-průzračné – vyrobené z tvrdého termoplastu; tenkostěnné a nesmáčivé; průhledné; nutné plnit celé a uzavřené pro použití v rotoru s pevným úhlem,
- f) ultra-čisté – jednorázové použití; odolné vůči většině slabých kyselin a některých slabých bází; nevhodné pro DMSO a většinu organických rozpouštědel včetně všech alkoholů,
- g) propionát celulózy - používané v rotoru s pevným úhlem; kuželové, průhledné, používané jednorázově; používající se bez víček, naplněné celé; odolné ke všem gradientním médiím včetně těch zásaditých; nevhodné pro většinu kyselin a alkoholů (32).

2.3 Optické systémy

Optické systémy se výhradně používají v AUC, konkrétně ke stanovení koncentrace vzorku v závislosti na poloze v kyvetě. Jsou izolovány od vibrací způsobených mechanickými částmi uvnitř přístroje a dalšími zařízeními v budově. Optické systémy jsou oproštěny od vibrací nadnášející optickou lavicí uvnitř vnějšího rámu ultracentrifugy. Možnosti jsou dostupné k automatickému sekvenčnímu fotografování v předvolených časových intervalech a časech expozice. Tradičně se využívá UV/VIS absorpce a index lomu, kdy UV/VIS optický

system je historicky první detekční metodou aplikovanou v AUC (23; 40). Specifikace vybraných optických systémů popisuje tabulka 3.

Tabulka 3 Specifika základních optických systémů (25).

	Absorbance	Interference	Fluorescence
Citlivost	0,1 optické hustoty	0,1 mg/cm ³	100 pM
Rozsah	2 – 3 řády	3 – 4 řády	6 – 8 řádů
Přesnost	Dobrá	Výborná	Dobrá
Radiální rozlišení v mikronech	20 – 50	10	20 – 50
Doba skenování (s) na pořizení jednoho radiálního snímku	60 – 300	1 – 10	60 – 90

2.3.1 Refraktometrické metody

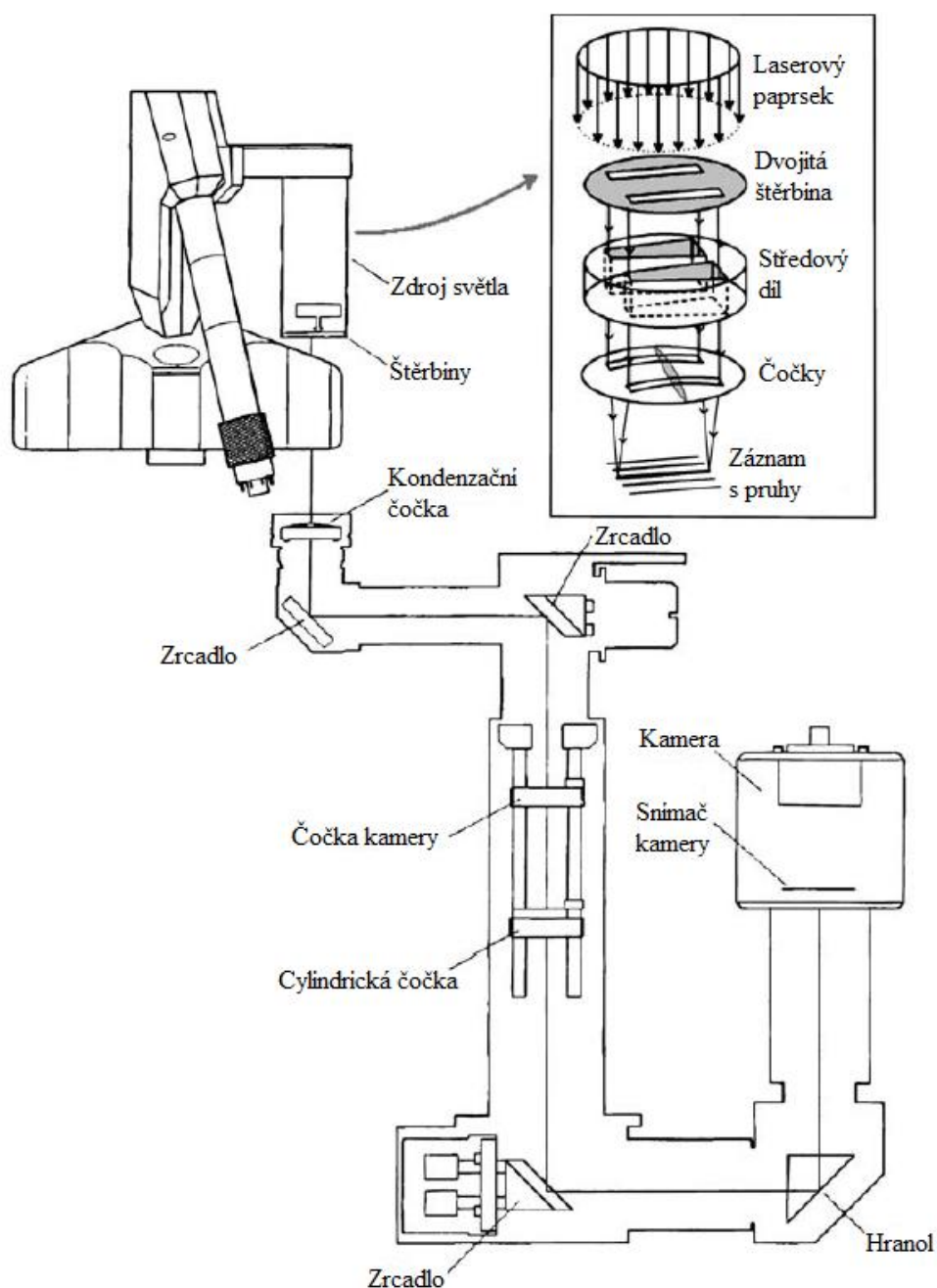
Prvotní centrifugy se o tyto metody opírají k získání distribucí koncentrace, kdy roztok má obvykle větší index lomu než čisté rozpouštědlo. Tento princip se využívá ve dvou různých optických systémech, Rayleighově interferenčním a Schlierenově. Nevýhodou obou metod je použití referenčního sektoru, kdy určují rozdíl koncentrace vzhledem ke koncentraci v referenčním bodě. Výhodou je naopak to, že se dají použít pro materiály s malou optickou absorpencí.

Co se týče citlivosti, tak Schlierenův optický systém je méně citlivý než interferenční. Lze ho využít pro proteiny v koncentracích 1 – 50 g/l. Interferenční optický systém se vyznačuje vynikající přesností, ale je omezen na rozsah koncentrace 0,5 – 1 g/l (38).

2.3.1.1 Rayleighův interferenční optický systém

Tato metoda se opírá o skutečnost, že rychlost světla se sníží při průchodu oblastí s vyšším indexem lomu. Když je index lomu ve vzorku vyšší než u standardu, vlna vzorku se zpomalí vzhledem k referenční vlně. To způsobí, že pozice horizontálně umístěných pruhů se posunou vertikálně v poměru k rozdílu koncentrace vzhledem k referenčnímu bodu (25; 38). Pokud je koncentrace referenčního bodu známá, koncentraci v jakémkoli bodě lze spočítat (38).

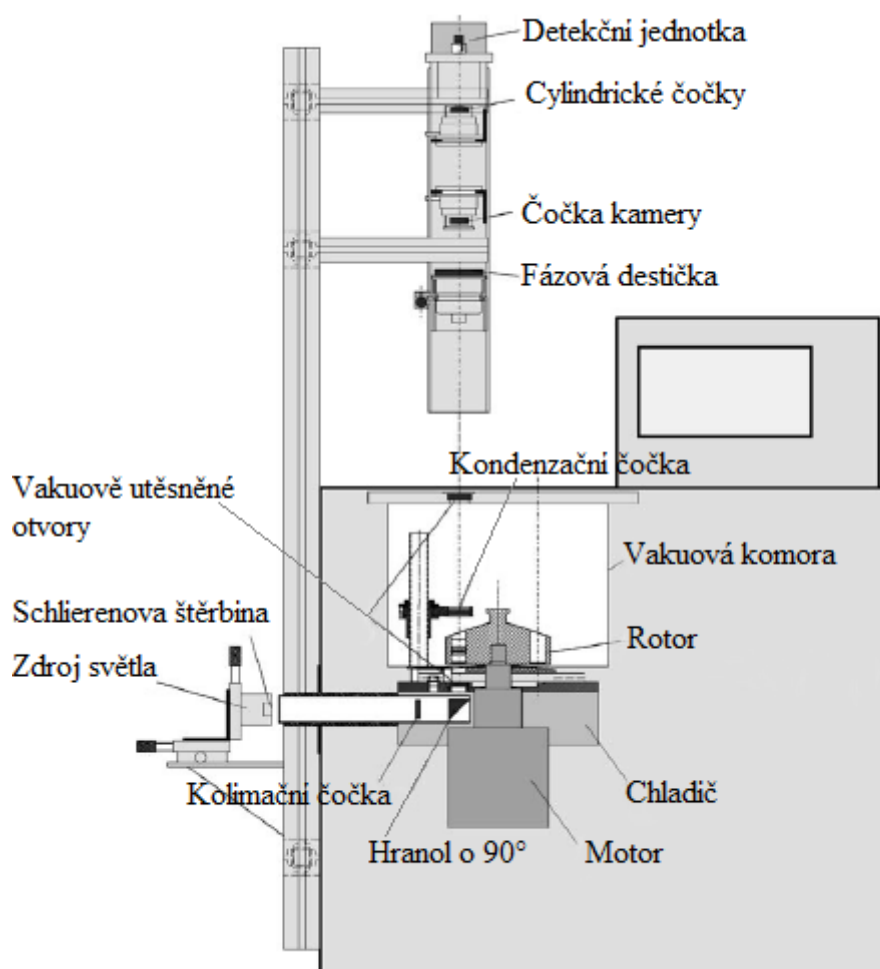
Jako zdroj světla se používá laserová dioda ($\lambda = 675 \text{ nm}$) nad rotorem. Monochromatické paralelní světlo ze zdroje prochází dvěma paralelními štěrbinami nad měřicí kyvetou a umožňuje současně osvětlovat standard a sektor vzorku měřicí kyvety. Světlo z obou štěrbin vytvoří interferenční obraz paralelních osvětlených a tmavých pruhů za kyvetou v rovině kondenzační čočky (rovině snímáče kamery), jak popisuje obrázek 14 (39).



Obrázek 14 Schéma Rayleighova interferenčního optického systému (39).

2.3.1.2 Schlierenův optický systém

Výbojka bílého světla osvětluje štěrbinu, kdy světlo pak prochází kolimační čočkou, skleněným hranolem o 90° a následně vstupuje do vakuové komory skrze okno utěsněné vakuem. Po průchodu kyvetou obsahující vzorek uvnitř rotoru je světlo zaostřeno kondenzační čočkou skrze druhé okno utěsněné vakuem na rovinu fázové destičky. Světlo pak dopadne na kameru, kde je obraz viditelný ve formě schlierenova píku či linie na monitoru, kdy kamera je připojena k počítači pro další zpracování. Schéma metody popisuje obrázek 15. Jako zdroj světla se může využít xenonová lampička (39).



Obrázek 15 Schéma uspořádání Schlierenova optického systému (39).

Schlierenův obraz je mírou koncentračního gradientu. Změna koncentrace vztahovaná k určitému bodu v kyvetě (např. menisku) může být v jakémkoli bodě určena integrací schlierenova profilu, nicméně pouze tehdy, je-li koncentrace v referenčním bodě známá, může být stanovena absolutní koncentrace v jakémkoli jiném bodě (38). Tato metoda je podobná Rayleighova interferometru, nicméně má navíc fázovou destičku v ohnisku kondenzační čočky. Citlivost je srovnatelná s Rayleighovou optikou (23; 39).

2.3.2 Absorpční optika

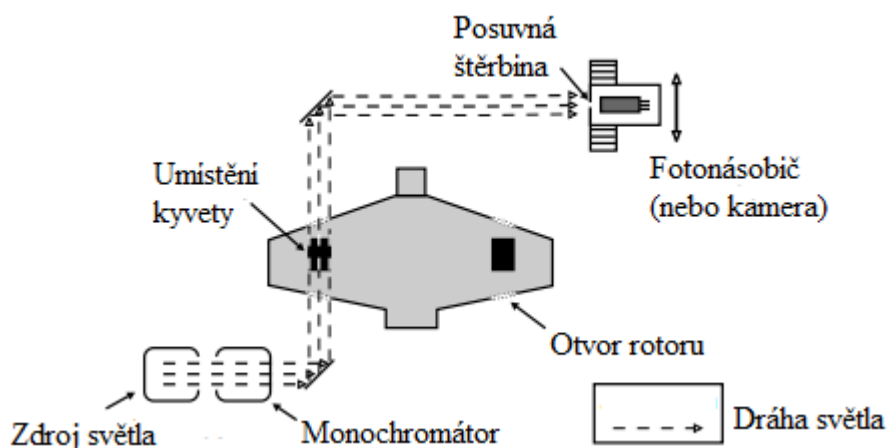
Jedná se o nejčastěji používaný optický systém, je nejjednodušší na obsluhu a pracuje jako standardní dvojpaprskový spektrofotometr, kdy lze analyzovat tři až sedm vzorků společně se standardem. Světlo procházející roztokem obsahujícím molekuly, které absorbují světlo, ztrácí na intenzitě, což kvantitativně popisuje Lambert-Beerův zákon:

$$A = \varepsilon \times c \times l,$$

kde A je absorbance, ε molární absorpční koeficient, c koncentrace vzorku a l délka absorpční vrstvy (23; 25; 39).

V této metodě se využívá vysokofrekvenční xenonová výbojka, která umožňuje použití vlnových délek 190 – 800 nm, nicméně limitující intenzita světla může omezit použitelný rozsah vlnových délek. Mnoho standardních složek biologického vzorku silně absorbují při krátkých vlnových délkách (např. disulfidy, dusíkaté sloučeniny, některé detergenty), takže se musí s opatrností volit složky rozpouštědla, pokud je požadováno analyzovat při krátkých vlnových délkách (25; 38).

Světlo z výbojky prochází clonou o průměru 1 mm, aby narazilo na difrakční mřížku monochromátoru na horní straně optického ramena. Monochromatické světlo poté opouští optické rameno a prochází jedním ze dvou sektorů kyvety obsahující buď vzorek, nebo rozpouštědlo. Během průchodu měřicí kyvetou se intenzita světla snižuje interakcí se vzorkem nebo rozpouštědlem dle Lambert-Beerova zákona. Pod rotorem dochází zbývající světlo k pohyblivé štěrbinové sestavě, která umožňuje snímat sektor kyvety radiálně. Objektiv zaostří světlo na fotonásobič. Další otvor ve spodní části sestavy ještě jednou snižuje intenzitu světla. Světlo opouštějící sestavu dosáhne fotonásobiče, který měří intenzitu světla procházející kyvetou (39). Schéma uspořádání přístroje popisuje obrázek 16.



Obrázek 16 Schéma přístroje absorpčního optického systému (14).

Absorpční optický systém se vyznačuje zvýšenou citlivostí, kdy mohou být zkoumány vzorky v příliš zředěných koncentracích pro dvě předcházející refraktometrické metody. Přístup k nižším koncentracím znamená, že je možné prověřit silnější interakce (38). Nevýhodou ale je, že vyžaduje nejvíce času na dokončení skenování (25; 39). Také se nedoporučuje studovat látky s vysokou absorbancí, protože množství světla dosažené na detektor se sníží, napětí fotonásobiče se zvýší a linearita absorbance vůči koncentraci poklesne (45).

2.3.3 Turbidimetrická detekce

Princip měření zákalu je srovnatelný s absorpčním detektorem, ale je mnohem jednodušší, jelikož se absorpce měří v jedné pevné radiální poloze (25).

Zákal se vypočítá z intenzity detekovaného světelného paprsku po průchodu vzorkem, kdy dochází ke snížení intenzity rozptylem světla (23). Používá se hlavně k určení distribuce velikosti částic (39).

2.3.4 Fluorescenční detekce

K dosažení dostatečného radiálního rozlišení (2-50 mikronů) se využívá jako světelný zdroj laser, kdy se tento systém používá k měření sloučenin značených fluorescenčně (25; 39). Vhodnými značkami jsou fluorescein, borondipyromethene (BODIPY) nebo-li 4,4-difluoro-3a,4a-diasa-s-indacen, nitrobenzoxadiazol (NBD), zelený fluorescenční protein (GFP) a nespočet derivátů těchto značek.

Intenzita fluorescence je úměrná koncentraci:

$$F = I_0 \times Q \times \varepsilon \times c,$$

kde I_0 je intenzita dopadu excitačního svazku, Q je kvantový výtěžek (frakce absorbovaných fotonů, které vedou k fluorescenčním signálům), ε je extinkční koeficient (buď molární nebo hmotnostní, v závislosti na jednotkách koncentrace) a c koncentrace.

Pokud je signál přímo úměrný koncentraci, lze určit koeficient sedimentace, difúzní koeficient a molekulovou hmotnost, aniž by bylo zapotřebí invertovat data. V případě získání údajů závislých na koncentraci jako je například asociační konstanta, představuje fluorescenční detekce určité obtíže.

Tento detekční systém lze využít v širokém rozmezí koncentrací, nicméně je třeba věnovat pozornost při použití vzorků o velmi nízkých koncentracích (< 10 nM) a vysokých (> 5 μ M) značeného materiálu. Při nízkých koncentracích může nastat problém se ztrátou materiálu na povrchu, kdy například proteiny, lipidy, nukleové kyseliny či polysacharidy mohou na povrchu, který je v kontaktu s roztokem, tvořit jednu vrstvu. Při nízkých koncentracích může být ulpělý materiál významnou částí celkového materiálu vloženého do kyvety se vzorkem. K minimalizaci tohoto problému lze použít některé neoznačené nosné proteiny do vzorku pufru, například nízké koncentrace (0,1 mg/cm³) ovalbuminu, sérového albuminu a kappa kaseinu. Je vhodné však vyzkoušet více než jeden typ tohoto proteinu, abychom měli jistotu, že protein interaguje s označeným materiálem (25).

Fluorescenční detekce se vyznačuje dvěma výhodami: vykazuje citlivost, která stále přesahuje UV systém, a dokáže selektivně detekovat jednotlivé složky vzorku a to i v případě, že koncentrace dané složky je ve srovnání s ostatními ve vzorku velmi nízká (39; 45).

3 LIPOPROTEINY

Triacylglyceroly (TAG) a estery cholesterolu (CE) se nemohou sami pohybovat v krvi, takže se transportují krví pomocí lipoproteinů (48). Lipoproteiny jsou submikroskopické částice složené z lipidů (TAG, cholesterol, fosfolipidy) a bílkovin (apoproteiny) spojených nekovalentními silami, které cirkulují v plazmě a lymfě. Zapojují se do přepravy živin nerozpustných ve vodě v celém krevním oběhu z místa jejich absorpce nebo syntézy do periferní tkáně nebo jater.

Játra a střevo jsou primárními místy syntézy lipoproteinů a dvě hlavní transportované lipidové složky, TAG a cholesterol, mají dva různé osudy. TAG se převádí primárně do tukové tkáně ke skladování a do svalu, kde se mastné kyseliny oxidují na energii. Cholesterol se naopak kontinuálně převádí mezi játry, střevem a extrahepatální tkání pomocí lipoproteinu s vysokou hustotou (HDL) (49; 50).

3.1 Dělení lipoproteinů

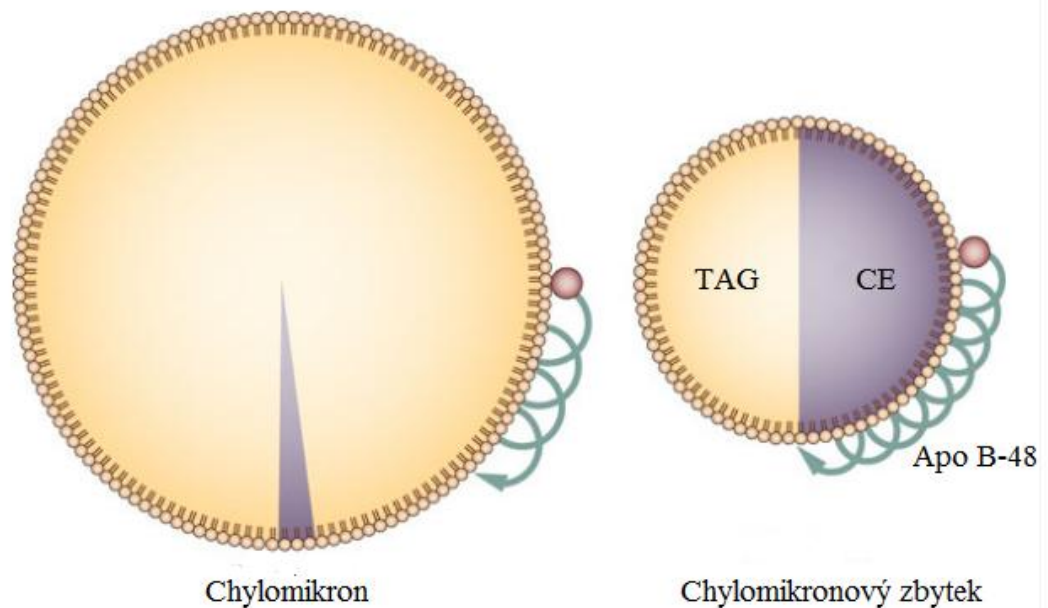
Lidské lipoproteiny jsou rozděleny do pěti hlavních tříd podle jejich hustoty, kdy se vzrůstající hustotou ubývá molekulová hmotnost a obsah lipidů, především obsah TAG, a vzrůstá obsah proteinů. Existuje několik tříd lipoproteinů: HDL, lipoprotein s nízkou hustotou (LDL), lipoprotein střední hustoty (IDL), lipoprotein s velmi nízkou hustotou (VLDL) a chylomikrony. Každý lipoprotein je klasifikován na základě své hustoty nebo velikosti (49; 51; 52).

Obecná struktura lipoproteinů spočívá ve sféroidní mikroemulzi sestávající z vnější vrstvy fosfolipidů, neesterifikovaného (volného) cholesterolu a bílkovin a jádra neutrálních lipidů, převážně CE a TAG (49).

3.1.1 Chylomikrony

Chylomikron (CM) je jeden z největších lipoproteinů obsahující hlavně TAG ve svém jádru mající průměr do 1000 nm. Jedná se o lipidovou kapénku nesoucí na svém povrchu uložené apoproteiny, které tvoří 1 % hmotnosti tohoto lipoproteinu. Je vylučován enterocyty, buňkami tenkého střeva, a transportuje se do portálního oběhu nebo do lymfy. Poločas těchto částic je velmi krátký (asi 8 minut) (50; 52; 53). Po 12 hodinách není v oběhu prokazatelný.

Je tvořen především tukem živočišného původu (54). Strukturu chylomikronu a jeho zbytku popisuje obrázek 17.

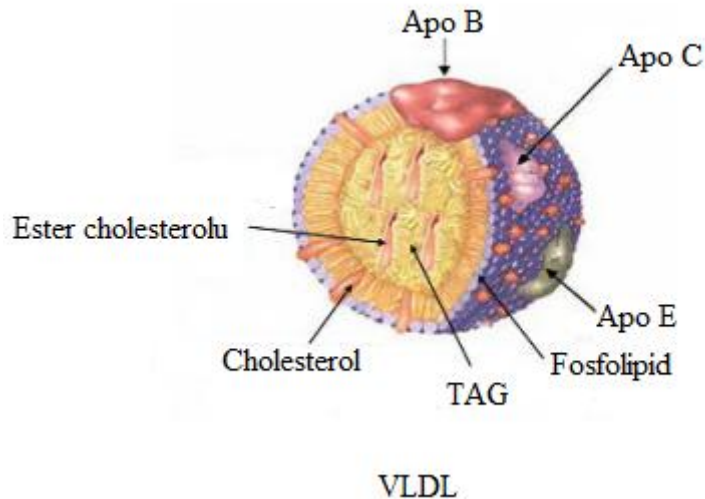


Obrázek 17 Struktura chylomikronu a jeho zbytku (55).

Velmi vysoké koncentrace chylomikronů v důsledku defektů lipolýzy mohou vést k pankreatitidě, zatímco zvýšení zbytků chylomikronu vyplývající z deficitu Apo E zvyšuje riziko ischemické choroby srdeční (ICHS) (56).

3.1.2 VLDL

Sférická VLDL částice je hlavním plazmatickým vehikulem pro TAG sekretovaná hepatocyty a je prekurzorem LDL částic. Každá VLDL částice obsahuje jednu molekulu hydrofobního proteinu známého jako apolipoprotein B-100 (Apo B), stejně jako několik kopií apolipoproteinu E a apolipoproteinu C, jak vypořádá obrázek 18 (49; 50). Dělí se na dvě podtřídy: VLDL₁, velký lipoprotein bohatý na TAG, a VLDL₂, menší a hustší částici.



Obrázek 18 Struktura VLDL částice (49).

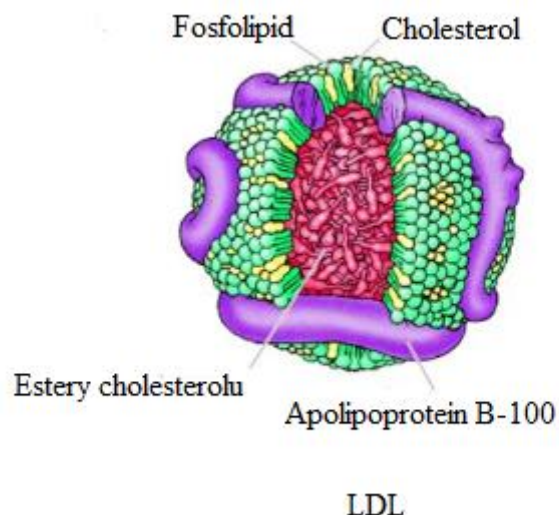
TAG ve VLDL částici pochází především ze zevního prostředí, ale část se syntetizuje v játrech.

3.1.3 IDL

IDL částice vznikají působením LPL na VLDL částici, kdy dochází k uvolnění volných mastných kyselin (50; 54).

3.1.4 LDL

LDL je hlavní transportní protein pro cholesterol v lidské plazmě. Transportuje CE a TAG z jater do periferních tkání (48; 49). LDL, stejně jako VLDL, je také sférická částice. Každá část LDL obsahuje ve svém jádru estery cholesterolu, které jsou obklopeny hydrofilním obalem složeným z fosfolipidů, cholesterolu a jedné molekuly apolipoproteinu B-100, což popisuje obrázek 19 (49).

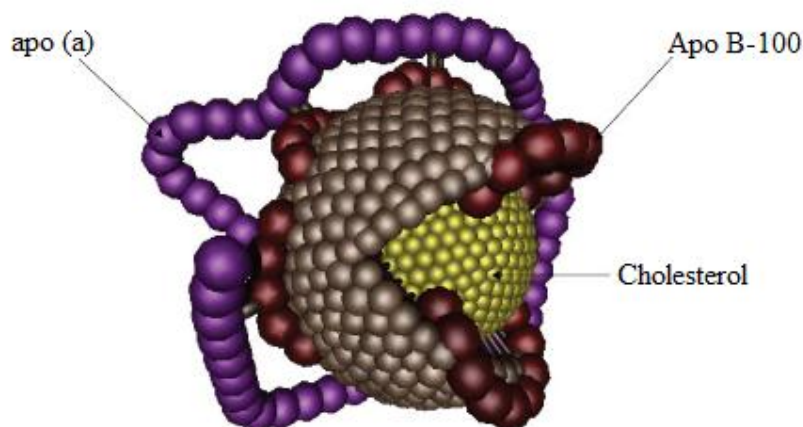


Obrázek 19 Struktura částice LDL (49).

LDL částice lidské plazmy zahrnují několik odlišných podtříd o různých velikostech, které lze rozdělit na polyakrylamidových gradientních gelech. Bylo identifikováno sedm podtříd LDL: LDL-I (27,2 – 28,5 nm), LDL-IIa (26,5 – 27,2 nm), LDL-IIb (25,6 – 26,5 nm), LDL-IIIa (24,7 – 25,6 nm), LDL-IIIb (24,2 – 24,7 nm), LDL-IVa (23,3 – 24,2 nm) a LDL-IVb (22 – 23,3 nm) (57).

3.1.4.1 Lipoprotein (a)

Lipoprotein (a) [Lp (a)] je vysoce heterogenní molekula sestávající z částice LDL s vysoce glykosylovaným apolipoproteinem (a) [apo (a)] kovalentně spojeným s částí apolipoproteinu B-100 na LDL jedinou disulfidickou vazbou. V klinické laboratoři se proteinová hmotnost Lp (a) nejčastěji kvantifikuje za použití imunochemických metod (56; 58).

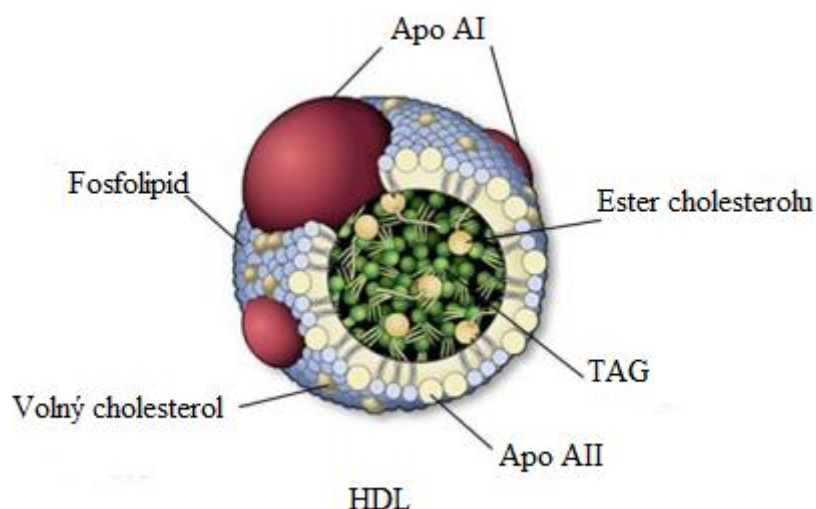


Obrázek 20 Struktura lipoprotein (a) (59).

Jeden z rizikových faktorů vzniku kardiovaskulárního onemocnění je lipoprotein (a), který byl objeven v roce 1963 Bergem. Existuje až 34 izoform tohoto apolipoproteinu. Menší formy izoform jsou více aterogenní (60).

3.1.5 HDL

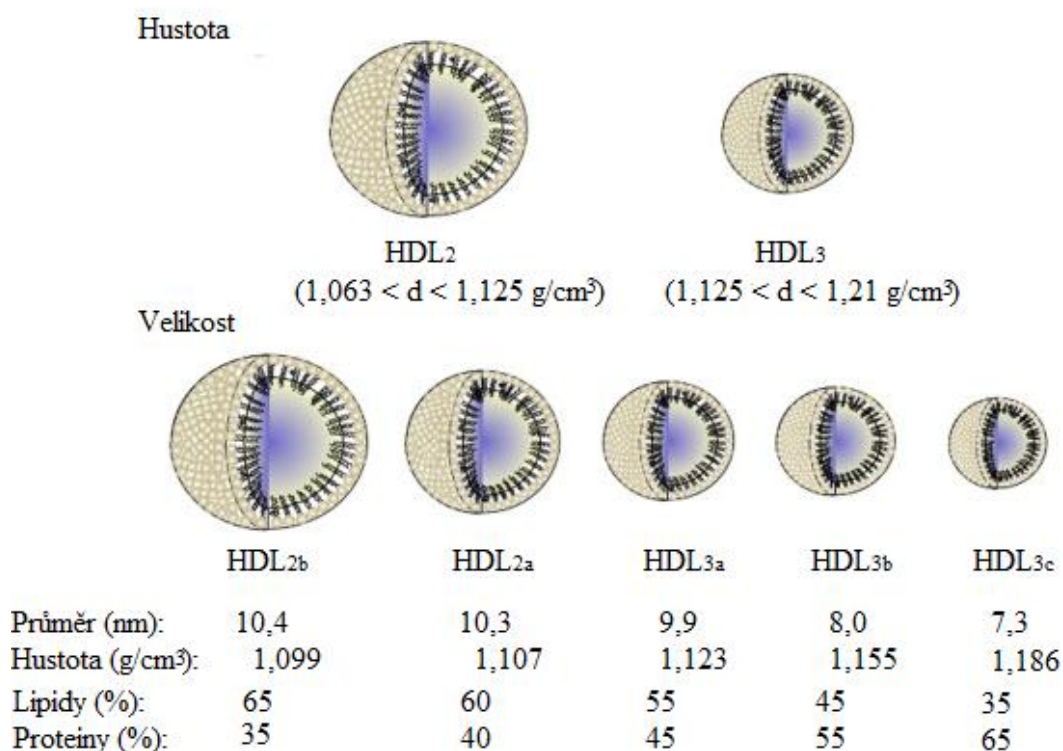
HDL částice je také sférickým lipoproteinem mající nejvyšší proteinový podíl. HDL obsahuje molekuly Apo AI a Apo AII, jak znázorňuje obrázek 21 (49; 52).



Obrázek 21 Struktura částice HDL (49).

HDL částice je schopna vázat cholesterol uvolněný z celulárních membrán a transportovat ho do jater, odkud se vylučuje žlučí (53).

Rozdíly v podtřídách HDL částic poprvé popsali DeLalla a Gofman roku 1954, kdy rozdělili HDL dle své velikosti a obsahu cholesterolu na HDL₂, částici méně hustou a relativně bohatou na cholesterol, a HDL₃ částici, která je na cholesterol relativně chudá. Později byly rozděleny podtřídy pomocí elektroforetické pohyblivosti do tří podtříd HDL₃ (HDL_{3a}, HDL_{3b} a HDL_{3c}) a dvou podtříd HDL₂ (HDL_{2a} a HDL_{2b}). Ekvivalentní rozdělení do podtříd lze dosáhnout i pomocí isopyknické ultracentrifugace. Jednotlivé podtřídy a jejich specifikace znázorňuje obrázek 22.



Obrázek 22 Struktura podtříd HDL (61; 62).

HDL částice pocházejí jak z intestinálních, tak z jaterních zdrojů. Jaterní HDL se ve své nascentní formě objevuje v diskové podobě, zatímco střevní HDL částice je více sférická a liší se ve složení bílkovin. Obě tyto částice jsou poměrně malé a chudé na cholesterol, klasifikují se jako HDL₃. Po interakci s LCAT a lipoproteinovou lipázou se zvyšuje obsah cholesterolu a částice se stávají méně husté, větší a lze je klasifikovat jako HDL₂. Průměr jádra HDL₂ je přibližně o 50 % větší než HDL₃, zatímco HDL₂ se vyznačuje až čtyřnásobným obsahem esterů cholesterolu a TAG než HDL₃. (63; 64; 65). Z HDL₂ částice následně vzniká HDL₁ částice. S touto podtřídou je spojený Apo E, který je zvýrazňuje pro buňky exprimující LDL receptory. Tímto způsobem může být cholesterol redistribuován z buněk, které mají nadbytek cholesterolu, do buněk, které ho vyžadují. HDL₁ částice je hlavní cestou přenosu esteru cholesterolu do jater u některých druhů jako jsou myši, krysy a psy, ne však u lidí (66). Hydratovaná hustota této podtřídy je 1,055 - 1,085 g/cm³. Tento rozsah hustoty zahrnuje lipoproteiny obsahující Apo B a Lp(a) (1,051-1,082 g/cm³) (67).

Hladiny HDL a LDL cholesterolu v krvi jsou důležitými ukazateli mnoha chorobných stavů. Vysoké hladiny LDL v krvi jsou spojeny se zdravotními problémy a kardiovaskulárními chorobami. Z tohoto důvodu se LDL často označuje jako "špatný

cholesterol". Částice LDL, které se hromadí v tepnách, mohou v průběhu času vytvářet plaky, což může zvýšit pravděpodobnost mrtvice, infarktu nebo cévního onemocnění. Částice HDL dokážou odstranit cholesterol z tepen a dopravit ho zpět do jater pro opětovné použití nebo vylučování, což je hlavní důvod, proč cholesterol nesený v částech HDL se někdy nazývá "dobrý cholesterol". Monitorování hladin cirkulace různých lipoproteinů je rozhodující pro diagnostiku poruch přenosu lipidů, jako je ateroskleróza (49).

Souhrn specifikací jednotlivých tříd lipoproteinů popisuje tabulka 4.

Tabulka 4 Přehled a specifikace různých lipoproteinů (44; 68).

Název na základě hustoty	Hustota (g/cm ³)	Průměr (nm)	Rozsah flotace (Sr)	Složení		
				Protein (%)	Lipid (%)	Hlavní lipid
Chylomikrony	< 0,95	> 80	> 400	0,5–2	98–99,5	TAG
VLDL	0,95–1,006	30–80	20–400	7,7	90,1	TAG
IDL	1,006–1,019	20–30	12–20	19	81,0	TAG
LDL	1,019–1,063	19–25	0–12	22,3	78,3	Cholesterol
HDL	1,063–1,21	6–11	0–9	51,9	48,6	Cholesterol, fosfolipidy

3.2 Metabolismus lipidů

Metabolismus lipidů lze rozdělit na exogenní a endogenní cesty, které jsou zodpovědné za transport lipidů pocházejících z potravy a jater.

3.2.1 Exogenní cesta

Po trávení tuku v tenkém střevě jsou mastné kyseliny s dlouhým řetězcem absorbovány enterocytem. Vznikající CM částice se skládá z jádra: TAG (84–89 % hmotnosti), estery cholesterolu (3–5 %) a na povrchu má fosfolipidy (7–9 %), apoproteiny (1,5–2,5 %) a volný cholesterol (1–2 %). Po sekreci do oběhu cestou ductus thoracicus je CM částice hydrolyzována lipoproteinovou lipázou (LPL) vázanou na lumenální povrch endotelových buněk v tukové tkáni a svalu, která jako aktivátor potřebuje Apoprotein C-II obsažený v chylomikronech. Přibližně se odstraní 70-90% TAG a vytvoří se lipoproteinová částice bohatá na estery cholesterolu nazvaná chylomikronový remnant neboli zbytek. Jádro

chylomikronových zbytků se zmenší a povrchové části jako fosfolipidy, cholesterol a apolipoproteiny se přenáší na HDL, aby se udržela stabilita částice.

Příjem remnantů pravděpodobně vyžaduje interakci s jaterní lipázou (HL), která se nachází na povrchu jater. HL dále hydrolyzuje TAG a fosfolipidové složky remnantů před přijetím cestou Apo E-receptoru v játrech. Zbytky jsou endocytovány a katabolizovány v lysozomech, z nichž cholesterol může vstoupit do metabolických cest v hepatocytech, včetně vyloučení do žluči (50; 52; 54).

3.2.2 Endogenní cesta

Endogenní cestou dochází k transportu cholesterolu a TAG z jater do periferie a přenosu cholesterolu z tkání zpět do jater pomocí HDL (54).

VLDL částice vznikající v játrech umožňuje transport TAG z jater do periferní cirkulace. LPL v kapilárách extrahuje TAG z cirkulujícího VLDL₁, ale méně účinně ve srovnání s chylomikrony. LDL receptory na povrchu jater rozpoznávají částice VLDL₂ a zprostředkovávají jejich endocytózu. Dlouhodobé setrvání některých částic VLDL v plazmě vede k dalšímu metabolismu pomocí LPL a do určité míry také k tvorbě IDL částic, které jsou částečně metabolizovány játry díky Apo E-receptoru a částečně přechází pomocí HL na povrchu hepatocytů na LDL částice. LDL částice jsou vychytávány LDL receptory přítomnými na povrchu hepatocytů a extrahepatálních buněk.

Reverzním transportem cholesterolu se označuje transport cholesterolu zpět z tkání a to zejména do jater. Předpokládá se, že tento proces přispívá ke kardioprotektivní úloze HDL částic. Proces zpětného transportu cholesterolu je zprostředkován enzymem lecitin-cholesterolacyltransferáza (LCAT) navázaným na HDL částice. Působí tak, že zachytí cholesterol do jádra nascentního HDL, cholesterol se následně přenesse do HDL₃, který se převádí na HDL₂. Tato částice může podléhat dvěma cestám, přímé nebo nepřímé, které přivádí cholesterol do jater. V přímé cestě se HDL₂ odstraní endocytózou-zprostředkovanou-LDL-receptorem nebo selektivním vychytáváním esteru cholesterolu z HDL částice játry. Protein uplatňující se při reverzním transportu cholesterolu (CETP) je zapojen do nepřímé dráhy a transportuje ester cholesterolu lipoproteinům o nižší hustotě (CM, VLDL), výměnou za TAG, a následuje vstřebání HDL částic do jater (neutrální lipidové výměně) (50; 54; 69).

Rovnováha mezi kupředu směřujícími (exogenními a endogenními cestami) a zpětnou cestou, která je úzce regulována rychlostí sekrece lipoproteinů, určuje koncentraci cholesterolu v plazmě (50).

4 Stanovení lipoproteinů pomocí ultracentrifugace

Lipoproteiny se pokládají za děti ultracentrifugace, kdy vývoj této metody umožnil jejich identifikaci (70). Historie těchto komplexů sahá až do počátku minulého století, kdy Nerking roku 1901 zjistil, že se lipidy váží na proteiny. Poté roku 1924 Gage a Fish označili velké částice přítomné v krvi po tučném jídle jako chylomikrony. O pět let později Macheboeuf vysrážel α -globulin obsahující lipid z koňského séra, který je nyní známý jako HDL a ve třicátých letech McFarlane objevil X-protein, který je v dnešní době známý jako LDL částice. Zvrat nastal v polovině minulého století, kdy Gofman izoloval lipoproteiny pomocí ultracentrifugace s hustotním gradientem. Významný průlom nastal i tehdy, kdy Havel a kol. dokázali, že zvýšení hustoty lidského séra koncentrovanými silnými roztoky umožnilo flotaci lipoproteinových frakcí VLDL, LDL a HDL (49; 69; 71).

Základním požadavkem moderního lipoproteinového výzkumu je dělení lipoproteinů do klasických frakcí VLDL, LDL a HDL. Obvykle jsou chylomikrony přítomny v krvi pouze po tučném jídle. Protože je obtížné provádět čistou separaci chylomikronů od VLDL, je pro rutinní lipoproteinové testy výhodná plazma nebo sérum odebíraná nalačno (44). Plazma se získá centrifugací z krve odebrané do lahvíček obsahujících antikoagulantia (48).

4.1 Ultracentrifugace s hustotním gradientem

Ultracentrifugace s hustotním gradientem je zlatým standardem pro separaci lipoproteinů, která je obecně založena na solných roztocích. Zahrnuje separaci lipoproteinů dle jejich hustoty a závisí na poměru lipidů/bílkovin. Chylomikrony jsou například téměř úplně složeny z lipidů a jsou velmi lehké, mají hustotu menší než voda. Naproti tomu menší lipoproteiny, jako je HDL, sestávají asi z 50% z lipidů a druhá polovina je tvořena hustšími bílkovinami, což dává HDL rozmezí hustoty mezi 1,063 až 1,25 g/cm³.

Tento druh separace tvoří nejen základ pro hlavní nomenklaturu lipoproteinů, ale slouží také jako referenční metoda pro měření lipoproteinů. Přesto většina klinických laboratoří tuto metodu nedokáže snadno provést, jelikož je namáhavá a vyžaduje speciální zařízení. Vytvoření komplexního gradientu hustoty potřebného pro separaci je zdlouhavé a skýtá obtíže při manipulaci, které mohou potenciálně rušit gradientní vrstvy (49; 72; 73). Technika je též časově náročná a vyžaduje poměrně velké množství plazmy, obvykle mezi 5 a 10 ml. Vzorky jsou navíc vystaveny vysokým odstředivým silám a koncentracím solí během separačního procesu. Tyto stavy vedou ke značné změně lipoproteinových částic, což vede ke ztrátě několika apolipoproteinů, zejména Apo C a E z příslušných frakcí (51; 74).

Pomocí hustotního gradientu lze rozdělit HDL částice na podtřídy HDL₂ a HDL₃ s hustotami 1,063–1,125 g/cm³ a 1,125–1,210 g/cm³. Podobně lze rozdělit LDL částice na velký buňkový LDL (LDL_a, 1,006–1,044 g/cm³) a malý, hustý LDL (LDL_b, 1,044–1,063 g/cm³).

Co se týče lipoproteinu (a), ten se nachází v rozmezí hustoty 1,050 - 1,100 g/cm³, což se překrývá s HDL₂a a LDL_b, proto se Lp (a) tradičně měří pomocí imunoanalýz namířených proti apo (a) (75).

Výhody separace na základě hustotního gradientu spočívají v tom, že lze v jednom kroku získat vysoce čisté frakce a rozsah hustoty gradientu se může vzít v úvahu k zohlednění změn distribuce lipoproteinu, které se často vyskytují v chorobných stavech, kdy může dojít k posunu hustoty a subfrakce se dostanou do neočekávaných oblastí (44).

Použití samotných solných gradientů má řadu nevýhod. Jsou technicky obtížně připravitelné, relativně nestabilní a je obtížné dosáhnout reprodukovatelnosti. Kromě toho je často nutné prodloužené odstředění, aby lipoproteiny mohly vplout do gradientů, a vysoké koncentrace soli mohou modifikovat proteinovou strukturu a vést ke ztrátě apolipoproteinů z lipoproteinových frakcí. Pro další analýzu lipoproteinových frakcí je obvykle nezbytné odstranit sůl (dialýza je jedním ze způsobů odstraňování soli). Výsledkem je ztráta materiálu a špatná výtěžnost. Iodixanol je neiontové izoosmotické médium, které vytváří samočinné gradienty při odstředění, které překonávají mnoho nevýhod slaných gradientů. Metoda je technicky jednoduchá, zahrnuje krátké centrifugační kroky (1–3 hodiny), produkované gradienty jsou extrémně stabilní a reprodukovatelné a výtěžky lipoproteinových frakcí z plazmy jsou téměř 100% (73).

4.2 Flotace

Diferenciální ultracentrifugace je preparativní metoda pro separaci lipoproteinů na základě jejich hydratované hustoty. Třídy lipoproteinů se izolují postupným zvyšováním hustoty rozpouštědla přidáváním solí, jako je NaCl, KBr a NaBr, nebo jejich kombinací. NaCl se běžně používá pro práci s nízkou hustotou a NaBr nebo KBr (nebo kombinace těchto solí s NaCl) k izolaci o vysoké hustotě. Při hustotě rozpouštědla vyšší než je hustota lipoproteinu, lipoproteinové částice se nadnáší rychlostí závislou na jejich hustotách, velikostech a tvarech. Pro tyto ultracentrifugační kroky se nejčastěji používají rotory s pevným úhlem (44; 76).

Plazma se upraví na hustotu nad hustší lipoproteiny za použití soli (NaBr nebo KBr) a odstředí, aby se umožnila flotace a separace na povrchu (72). Na konci každé analýzy se

lipoproteiny koncentrované v horní čtvrtině zkumavky (supernatant) odebírají aspirací injekční stříkačkou. Hustota infranatantu se pak nastaví na požadovanou vyšší hodnotu a přenesení se do další zkumavky a opět se vystaví ultracentrifugaci. Odebraná lipoproteinová frakce je dále analyzována pro obsah lipidů a apolipoproteinů. Centrifugace k izolaci VLDL částic obvykle trvá přibližně 18-24 hodin, izolace LDL částic 36 hodin a u HDL částic to je 48 hodin při 50 000 otáčkách/min (67).

Aby se zabránilo problémům zkřížené kontaminace částic o různých sedimentačních rychlostech, které se vyskytují při diferenciálním odstředění, použije se centrifugace rychlostní zónová. To zahrnuje vrstvení hustotního gradientu nad vzorky, což umožňuje částicím plavat plazmou a gradientem a to rychlostí závislou na jejich hustotě a aplikované odstředivé síle. Rychlost flotace lipoproteinů, Svedbergova flotační rychlost (Sf), s použitím centrifugace rychlostní zónové byla již stanovena: VLDL₁ (Sf 60–400), VLDL₂ (Sf 20–60), IDL (Sf 12–20), LDL (Sf 0–12), HDL₂ (Sf 3,5–9) a HDL₃ (Sf 0–3,5) (68; 72).

K dosažení nespojitého gradientu hustoty potřebného pro oddělení lipoproteinů od plazmy se vzorky pečlivě převrství roztoky solí s neměnnou hustotou. Vrstvení je dosaženo v ultracentrifugační zkumavce potažené polyvinylalkoholem. To minimalizuje narušení tvorby gradientu (72).

4.3 Analytická ultracentrifugace

Zatímco se dá spousta věcí dozvědět o lipoproteinech během preparativních separací, jiným přístupem ke studiu lipoproteinové struktury je analytická ultracentrifugace, buď s analytickou ultracentrifugou, nebo pomocí centrifugace s analytickým hustotním gradientem ve výkyvných rotorech.

Lipoproteiny se zde obvykle zkoumají v solných roztocích, které jsou hustší než požadovaný lipoprotein.

Centrifugace analytického hustotního gradientu je užitečným nástrojem pro stanovení takových lipoproteinových charakteristik, jako je hustota vztlaku, distribuce hustoty a distribuce velikosti částic. Tato technika se také používá pro studium vazby apolipoproteinů na různé lipidy (44).

Plazmatické frakce, obvykle připravené při hustotě 1,063 g/cm³, se centrifugují při vysokých rychlostech a pohybující se lipoproteiny se sériově fotografují a později se fotografie používají k určení koncentrací, které se vztahují k určitým standardním

podmínkám. Chylomikrony se obvykle v analytické ultracentrifuze nezměří jako takové, ale nejprve se musí oddělit a analyzovat odděleně (77).

5 ATEROSKLERÓZA

Ateroskleróza je progresivní onemocnění vyvolané průnikem částic LDL do subendoteliálního prostoru z důvodu akumulace LDL v plazmě. Aterosklerotické změny jsou nejdříve patrné v oblasti břišní nebo hrudní aorty, posléze v periferních nebo koronárních tepnách (50; 78; 79). Nejčastěji však dochází k chorobným změnám ve větvení tepen, které je krevním tokem nejvíce namáháno (80).

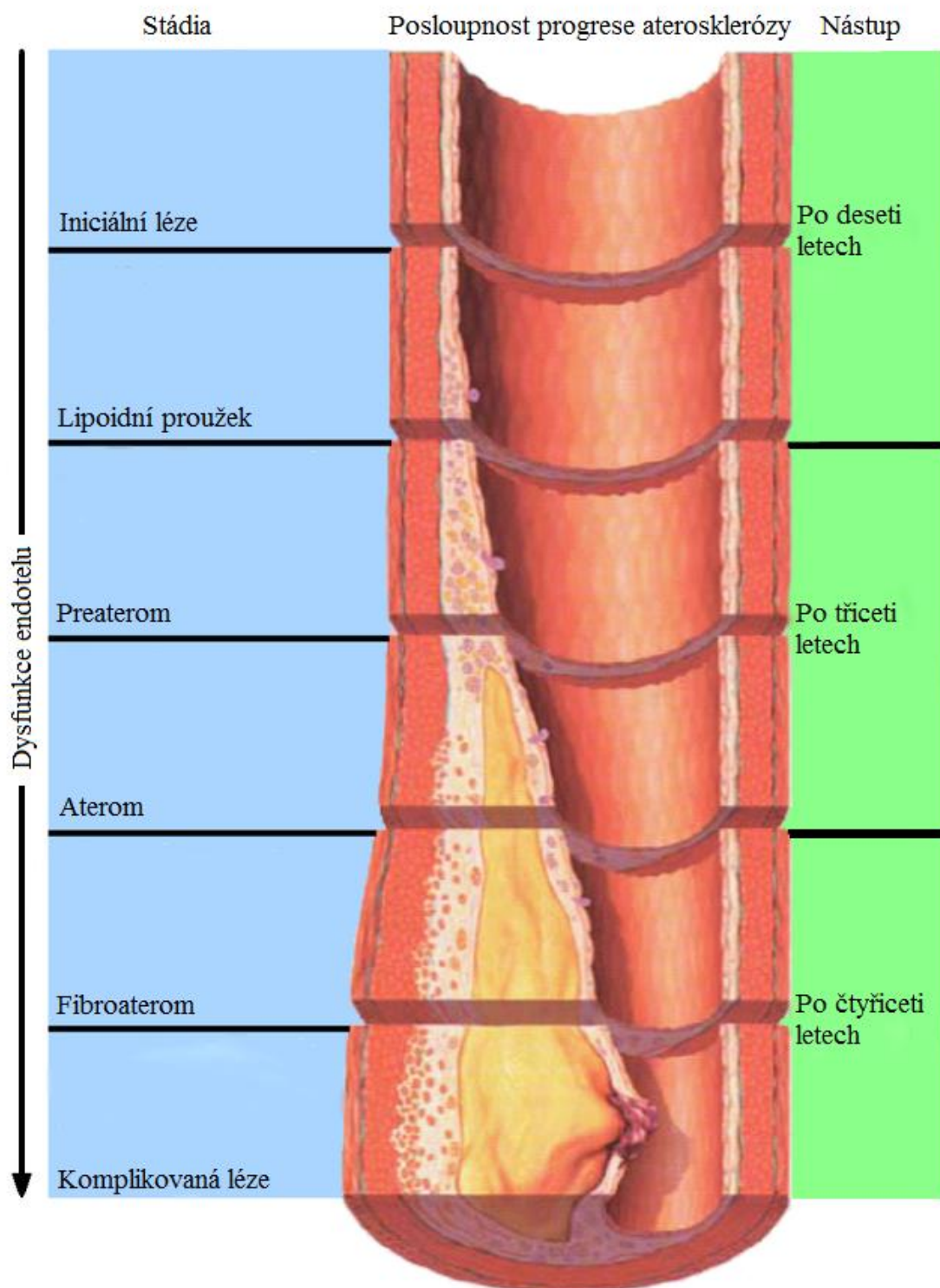
K průniku LDL částice do subendoteliálního prostoru je nutná porucha funkce endotelu a modifikace LDL částice, zejména její oxidace a glykace. Dysfunkci endotelu způsobují rizikové faktory, mezi něž hlavně patří arteriální hypertenze, kouření, hypercholesterolemie, diabetes mellitus a zvýšené koncentrace homocysteinu (56; 76; 79; 81).

5.1 Stádia aterosklerózy

Aterosklerotický plát má svůj vývoj. Za počáteční stádium se považuje porucha funkce endotelu, vnitřní výstelky cév. Při této poruše dochází k uchycování trombocytů na endotel, k pronikání a ukládání cholesterolu pod endotel, proliferaci buněk hladké svaloviny a dalším pochodům. To vše vede ke ztlušťování a poruše poddajnosti cév, zužování průměru cév a nakonec k poruše zásobení životně důležitých orgánů kyslíkem a dalšími látkami a ke klinické manifestaci aterosklerózy (78). Rozlišujeme několik stádií aterosklerózy:

- a) časná neboli iniciální léze - dochází k průniku LDL částic do prostoru pod endotelem, kde je organismus identifikuje jako cizí a jsou modifikovány monocyty, které se mění na makrofágy (MF); MF fagocytují LDL částice za vzniku tukem nasycených buněk, tzv. pěnových buněk,
- b) lipidní neboli tukový proužek - nahromadění pěnových buněk,
- c) preaterom - malé množství extracelulárně deponovaných lipidů - z odumřelých pěnových buněk,
- d) aterom - lipidové jádro lokalizované v bázi léze, které sestává pouze z extracelulárně akumulovaných lipidů,
- e) fibroaterom - mobilizace svalových buněk z cévní intimy do místa tvořícího časnou fázi, které vytvářejí z kolagenu fibrózní čepičku na aterosklerotickém plátu oddělující nahromaděné buňky a tukové částice od cirkulující krve,
- f) komplikované léze (kalcifikace, ulcerace, ruptury) - posléze dochází k zapojení T a B lymfocytů, které atakují pěnové buňky a vytvářejí v jádru plátu

na cholesterol bohatou kašovitou hmotu, produkované metaloproteinázy odbourávají kolagen ve fibrózním krytu plátu a tím vyvolávají jeho rupturu (78; 79; 82; 83; 84). Jednotlivá stádia tohoto onemocnění znázorňuje obrázek 23.



Obrázek 23 Stádia aterosklerózy (85).

Rupturou plátu se vytváří smáčivá plocha, na níž se shlukují trombocyty a vytvářejí bílý trombus, do něhož se na fibrinová vlákna zachytávají erytrocyty za vzniku červeného trombu (79). Ruptura fibrózní kryty plátu je často spouštěcím momentem pro rozvoj mozkové příhody či akutního infarktu myokardu. Vznik trombu je naopak příčinou akutní ischemie (82; 84). V mozku ateroskleróza usnadňuje vývoj trombóz a ruptur, díky čemuž může dojít k vývoji mozkové mrtvice. Naopak v ledvinách může toto onemocnění vyvolat selhání ledvin (86). To, jak vypadá průřez tepnou při tomto onemocnění, znázorňuje obrázek 24.



Obrázek 24 Průřez tepnou v různých stádiích aterosklerózy (78).

Díky ateroskleróze dochází k zúžování lumen tepen, nicméně tento proces může urychlit intrakoronární trombóza, která nasedne na plát, který se stává nestabilním. Takto nestabilní plát velmi rychle uzavírá lumen postižené tepny (48; 87).

5.2 Rizika vzniku aterosklerózy

Bylo prokázáno, že zvýšená koncentrace LDL cholesterolu v plazmě (LDL-C) je významným rizikovým faktorem pro ICHS a též se zjistilo, že užívání léků, které snižují koncentrace LDL cholesterolu, snižuje riziko srdečních onemocnění (88). Několik případů naznačuje, že převaha menších LDL částic, konkrétně LDL-III nebo LDL-IV, je spojena se zvýšeným rizikem ICHS (50; 57).

ICHS je méně častá u lidí s průměrnou koncentrací celkového cholesterolu v séru (méně jak 4,6 mmol/l). Dalšími důležitými rizikovými faktory pro ICHS jsou zvýšené koncentrace lipoproteinu (a), zbytků lipoproteinových částic a snížení hladin HDL. Dalším

klíčovým faktorem je krevní tlak, kdy se toto onemocnění nevyvíjí na žilní straně oběhu (56; 76).

Zpožděné vychytávání malých chylomikronových zbytků je spojeno s progresí aterosklerózy, kdy se vyskytují dva mechanismy poskytující stavební bloky arteriálních lézí. Za prvé se mohou zbytky spojovat a pronikat do arteriálního endotelu (stejným způsobem jako plazmatická částice LDL), proto by měla být rychlost aterogeneze úměrná koncentrací zbytků v plazmě. Za druhé mohou být chylomikronové zbytky absorbovány a následně degradovány na zbytky na arteriálním endotelu.

Poruchy v kterémkoli z těchto procesů způsobují akumulaci CM a jejich zbytků, které mohou opět ovlivnit endogenní lipoproteiny, o kterých je známo, že jsou aterogenní. Zvláště přenos TAG z CM na LDL a HDL a vzájemný přenos esterů cholesterolu do CM pomocí CETP může zvýšit aterogenní lipidový profil. Přenos esteru cholesterolu na CM a VLDL je činí rezistentními na lipázový účinek, který brání normálnímu metabolismu těchto lipoproteinů bohatých na TAG. Zbytky CM obohacené esterem cholesterolu mohou být pohlceny makrofágy v arteriální lézi. LDL a HDL, na druhé straně, se stávají vhodnými substráty pro LPL a HL, což způsobuje snížení velikosti těchto částic. Výsledkem je vývoj aterogenního lipoproteinového profilu, ve kterém se lipoproteiny bohaté na TAG stanou obohacenými o ester cholesterolu, sníží se velikost LDL a sníží se hladiny HDL cholesterolu. Malá hustá povaha LDL způsobuje, že je nerozpoznatelná LDL receptory v játrech, a proto je příznivým kandidátem na vychytávání pomocí receptorů přítomných na makrofázích v arteriální lézi (50).

5.3 Ochranné procesy

Bylo navrženo několik ochranných funkcí HDL. Například HDL částice mají schopnost inhibovat oxidaci LDL. Toho je dosaženo jak antioxidanty, jako je paraoxonáza, které jsou transportovány pomocí HDL, a apolipoproteiny, včetně Apo AI a Apo AII, které mají vlastní antioxidační vlastnosti. Jiné předpokládané ochranné role HDL spočívají v rozpadu zánětlivého cyklu iniciovaného LDL, v inhibici exprese adhezních molekul endotelovými buňkami, zlepšení endoteliální vazomotorické funkce a v antitrombotických účincích (73).

Podtřída HDL₂ je méně hustá a kardioprotektivní, zatímco HDL₃ je menší, hustší a méně kardioprotektivní subfrakcí (89).

Další protektivní látkou je vitamín E, který je považován za účinný antioxidant, jenž brání oxidaci LDL částic urychlujících tvorbu aterosklerózy. Na celulární úrovni působí protektivně inhibicí proliferace hladkých svalových buněk, inhibicí agregace trombocytů nebo adheze monocytů. Dále vitamín A brání vychytávání oxidovaných LDL částic a potlačuje produkci protizánětlivých cytokinů, což jsou další mechanismy ovlivňující aterosklerózu (90). Mezi další protektivní mechanismy patří enzymatické děje, stopové prvky, strava obsahující dostatek zeleniny a ovoce a řadu dalších antioxidantů (91).

5.4 Další poruchy metabolismu lipoproteinů

Kardiovaskulární onemocnění (KVO), sekundární v důsledku aterosklerózy, je hlavní příčinou úmrtí na světě (76; 92). Do roku 2030 se předpokládá, že zhruba 23 milionů lidí zemře celosvětově na KVO, především kvůli srdečnímu onemocnění a mrtvici. Vzhledem k tomu, že částice lipoproteinů hrají klíčovou roli při aterogenezi, jsou užitečnými biomarkery pro posouzení rizika KVO, stejně jako ke sledování terapie snižující hladinu lipidů (93). Epidemiologické studie naznačují, že vývoj koronárních onemocnění srdce je důsledkem zvýšené plazmatické koncentrace LDL částic a snížené plazmatické koncentrace HDL částic. To potvrdil i Gofman (49; 76).

Národní cholesterolový edukační program v USA (NCEP) odhaduje, že každé zvýšení HDL cholesterolu o 1 % může být spojeno se snížením rizika ICHS o 2 až 4 % (69; 94). Co se týče LDL cholesterolu, tak u něj se odhaduje, že každé zvýšení hladiny LDL cholesterolu o 1 % vede ke zvýšení rizika ICHS o 2 %. V průměru jsou hladiny HDL cholesterolu vyšší u žen než u mužů (50).

Mezi další poruchy metabolismu lipoproteinů patří hyperlipidémie, která je nejčastější. Týká se zvýšení lipidů, celkového cholesterolu nebo TAG, popřípadě obou. Protože jsou oba lipidy transportovány ve formě lipoproteinů, každá hyperlipidémie je též spojena se vzestupem jedné nebo více tříd lipoproteinů. Při vzestupu celkového cholesterolu se jedná o hypercholesterolemii, při vzestupu TAG o hypertriacylglycerolémii a v případě zvýšení obou o smíšenou hyperlipidémii.

Opakem je dyslipidémie. Jedná se o stav charakterizovaný snížením koncentrace cholesterolu transportovaného na HDL buď samostatně nebo v kombinaci se zvýšením koncentrace jedné či více aterogenních lipoproteinových tříd. Oba tyto stavy se dělí na primární a sekundární. Primární onemocnění má základ v genetické poruše, zatímco sekundární se může objevit i jako následek získaného onemocnění nebo jsou spojovány

s podáváním určitých léků, jaké jsou např. estrogeny nebo β -blokátory, které významně ovlivňují metabolismus lipidů a lipoproteinů.

Další onemocnění se mohou týkat poruchy receptoru, v tomto případě se jedná o familiární hypercholesterolemii, chybění nebo funkční poruchu LDL receptoru. Dochází tak ke zpomalení katabolismu LDL a IDL (41; 52).

6 ZÁVĚR

Ultracentrifugace je analytickou metodou s dlouhou historií, která se používá v mnoha oborech chemie a biologie. Existují dva základní typy, analytická a preparativní. Preparativní ultracentrifugace zahrnuje centrifugaci za účelem získání buněk ze vzorku a až poté jsou získané buňky analyzovány, zatímco analytická centrifugace zahrnuje již určitý optický systém a k analýze dochází při ultracentrifugaci.

Metoda ultracentrifugace se využívá k analýze mnoha buněk a částic, i lipoproteinů, což jsou částice složené z lipidů a bílkovin spojených nekovalentními vazbami, které transportují živiny nerozpustné ve vodě do jater a periferní tkáně. Dělí se do několika tříd i podtříd, které ultracentrifugace dokáže oddělit, což lze využít při studiu aterosklerózy, která s lipoproteiny silně souvisí.

Ateroskleróza je onemocnění vyvolané akumulací LDL částic do endotelu v namáhaných tepnách, kde na stěny působí vysoký tlak krve. Vlivem ukládání LDL do endotelu dochází k snížení průtoku krve postiženou tepnou a poruše zásobení orgánů. U konečného stádia tohoto onemocnění může dojít až k infarktu myokardu či centrální mozkové příhodě. Je to nejčastější příčina úmrtí ve vyspělých zemích, proto bychom se měli zaměřit na její včasnou diagnózu a léčbu. LDL a HDL částice i jejich podtřídy lze pomocí ultracentrifugace analyzovat, nicméně se jedná o drahou metodu, kterou si nemohou běžné laboratoře dovolit a je tak výhodnější se uchýlit ke stanovování pomocí imunoanalytických metod.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- (1) CIBIČEK, Norbert a Jan VACEK. *Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně*. Univerzita Palackého v Olomouci, 2014, s. 81–91. ISBN 9788024439518.
- (2) MAJEKODUNMI, Stephen O. *A review on centrifugation in the pharmaceutical industry*. American Journal of Biomedical Engineering, 2015, 5(2), s. 67–78. ISSN 2163-1077.
- (3) MÄCHTLE, Walter. *Centrifugation in particle size analysis*. MEYERS, Robert A., ed. Encyclopedia of Analytical Chemistry. 2006. ISBN 0471976709.
- (4) VANĚK, Ondřej a Karel BEZOUŠKA. *Analytická ultracentrifugace a její využití v biochemické laboratoři*. Chemické Listy 2010, 104, s. 1155–1162. ISSN 1213-7103.
- (5) BECHTEL, William. *Discovering cell mechanisms: the creation of modern cell biology*. Cambridge University Press, 2006, s. 129. ISBN 9780521812474.
- (6) WILSON, Keith a John M. WALKER. *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. Cambridge University Press, 2009, 7, s. 73. ISBN 978-0521731676.
- (7) WEBER, Marcel. *Philosophy of experimental biology*. Cambridge University Press, 2005, s. 137–138. ISBN 9780511498596.
- (8) DE CHADAREVIAN, Soraya a Harmke KAMMINGA. *Molecularizing biology and medicine new practices and alliances, 1920s to 1970s*. Taylor & Francis, 2003, s. 133–134. ISBN 9789057022937.
- (9) The structural and functional organisation of cells [online]. [cit. 2018-03-20]. Dostupné z: <http://www.animalresearch.info/en/medical-advances/nobel-prizes/the-structural-and-functional-organisation-of-cells/>
- (10) George Palade, 1912-2008 [online]. [cit. 2018-03-21]. Dostupné z: <https://www.microscopy.org/images/posters/Palade.pdf>
- (11) SCOTT, David J., Stephen E. HARDING a Arthur J. ROWE. *Analytical ultracentrifugation: techniques and methods*. RSC Pub., 2005, s. 162–164. ISBN 0854045473.
- (12) NESSAR, Ahmed, Hedley GLENCROSS a Qiuyu WANG. *Biomedical science practice*. Oxford University Press, 2016, 2, s. 219–224. ISBN 9780198717317.
- (13) LIVSHITS, Mikhail A., Elena KHOMYAKOVA, Evgeniy G. EVTUSHENKO, Vassili N. LAZAREV, Nikolay A. KULEMIN, Svetlana E. SEMINA, Edward V. GENEROZOV a Vadim M. GOVORUN. *Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol*. Scientific Reports. 2015, 5. ISSN 2045-2322.

- (14) MIKKELSEN, Susan R. a Eduardo CORTÓN. *Bioanalytical Chemistry*. John Wiley & Sons, 2004, s. 247–267. ISBN 0471544477.
- (15) YAKIMCHUK, Konstantin. *Exosomes: isolation methods and specific markers*. Materials and Methods. 2015, 5. ISSN 2329-5139.
- (16) THÉRY, Clotilde, Sebastian AMIGORENA, Graça RAPOSO a Aled CLAYTON. *Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids*. Current Protocols in Cell Biology. 2006, 30(1), s. 3.22.1–3.22.29. ISSN 1934–2616.
- (17) Basics of Centrifugation [online]. 2017 [cit. 2018-03-20]. Dostupné z: <https://www.coleparmer.com/tech-article/basics-of-centrifugation>
- (18) WILSON, Keith, John M. WALKER, Andreas HOFMANN a Samuel CLOKIE. *Wilson and Walker's principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. Cambridge University Press, 2018, s. 432–451. ISBN 9781107162273.
- (19) FREI, Mark. Centrifugation. Biofiles [online]. 6(5) [cit. 2018-04-01]. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/articles/biofiles/biofiles-pdf/biofiles_v6_n5.pdf
- (20) CLAY, Oliver, Christophe J. DOUADY, Nicolas CARELS, Sandrine HUGHES, Giuseppe BUCCIARELLI a Giorgio BERNARDI. *Using analytical ultracentrifugation to study compositional variation in vertebrate genomes*. European Biophysics Journal. 2003, 32(5), s. 418–426. ISSN 0175-7571.
- (21) COLE, James L. a Jeffrey C. HANSEN. *Analytical ultracentrifugation as a contemporary biomolecular research tool*. Journal of Biomolecular Techniques. 1999, 10, s. 163–176. ISSN 1943-4731.
- (22) Beckman XL-I Analytical Ultracentrifuge [online]. [cit. 2018-06-06]. Dostupné z: <http://csbi.mit.edu/instrumentation/auc.html>
- (23) GUGLIOTTA, Luis M. a Jorge R. VEGA. *Measurement of particle size distribution of polymer latexes*. Research Signpost, 2010, s. 183–222. ISBN 9788130804132.
- (24) PLANKEN, Karel L. a Helmut CÖLFEN. *Analytical ultracentrifugation of colloids*. Nanoscale. 2010, 2(10), s. 1849–1853. ISSN 2040-3364.
- (25) COLE, James L., Jeffrey W. LARY, Thomas P. MOODY a Thomas M. LAUE. *Analytical ultracentrifugation: Sedimentation velocity and sedimentation equilibrium*. Methods in Cell Biology, 2008, s. 143–179. ISBN 9780123725219.
- (26) BAALOUSHA, Mohammed a Jamie LEAD. *Characterization of nanomaterials in complex environmental and biological media*. Elsevier, 2015, 8, s. 60–61. ISBN 9780080999487.

- (27) HOUDE, Damian J. a Steven A. BERKOWITZ. *Biophysical characterization of proteins in developing biopharmaceuticals*. Elsevier, 2014, s. 211. ISBN 9780444595737.
- (28) LIU, Jun, James D. ANDYA a Steven J. SHIRE. *A critical review of analytical ultracentrifugation and field flow fractionation methods for measuring protein aggregation*. The AAPS Journal. 2006, 8(3), s. E580–E589. ISSN 1550-7416.
- (29) WILSON, Ian D. a Colin POOLE. *Handbook of methods and instrumentation in separation science*. Academic Press, 2009, s. 49-58. ISBN 9780123750952.
- (30) BALTZ, Richard H., Julian E. DAVIES a Arnold L. DEMAIN. *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. ASM Press, 2010, 3, s. 738–739. ISBN 9781555815127.
- (31) BRANDRUP, Johannes, Edmund H. IMMERGUT, Eric A. ABE, Akihiro BLOCH, Daniel R. BLOCH a Eric A. GRULKE. *Polymer handbook*. Wiley, 2005, 4, s. VII/87–VII/88. ISBN 9780471812449.
- (32) Rotors and Tubes For Beckman Coulter Tabletop Preparative Ultracentrifuges [online]. USA: Beckman Coulter, 2014. Dostupné z: https://physiology.case.edu/media/eq_manuals/eq_manual_rotors_and_tubes_for_tabletop_ultracentrifuges.pdf
- (33) JONES, Richard G. *Compendium of polymer terminology and nomenclature: IUPAC recommendations, 2008*. IUPAC, 2009, s. 57–58. ISBN 9780854044917.
- (34) CREIGHTON, Thomas E. *The physical and chemical basis of molecular biology: fundamentals*. Helvetian Press, 2011, s. 458–464. ISBN 9780956478139.
- (35) ARAKAWA, Tsutomu, John S. PHILO, Daisuke EJIMA, Kouhei TSUMOTO a Fumio ARISAKA. *Aggregation analysis of therapeutic proteins, part 2: Analytical ultracentrifugation and dynamic light scattering*. BioProcess International, 2007, s. 36–47. ISSN 1945-7065.
- (36) HOWLETT, Geoffrey J., Allen P. MINTON a German RIVAS. *Analytical ultracentrifugation for the study of protein association and assembly*. Current Opinion in Chemical Biology. 2006, 10(5), s. 430–436. ISSN 1367-5931.
- (37) GRIFFITH, Owen Mitch. *Practical Techniques for Centrifugal Separations* [online]. 2010 [cit. 2018-02-21]. Dostupné z: <https://thermofisher.co.nz/Uploads/file/Scientific/Applications/Equipment-Furniture/Practical-Techniques-for-Centrifugal-Separations.pdf>
- (38) RALSTON, Greg. *Introduction to Analytical Ultracentrifugation* [online]. 1993 [cit. 2018-02-26]. Dostupné z: http://ctrstbio.org.uic.edu/manuals/IntroAUC_beckmanbook.pdf

- (39) MAECHTLE, Walter a Lars BÖRGER. *Analytical ultracentrifugation of polymers and nanoparticles*. New York: Springer, 2006, s. 2–17. ISBN 9783540234326.
- (40) SCHACHMAN, Howard K. *Ultracentrifugation in biochemistry*. Elsevier Science & Technology, 2013, s. 13–20, 32–34. ISBN 9781483270944.
- (41) ZIMA, Tomáš. *Laboratorní diagnostika*. Galén, 2013, 3, s. 131–135, 144, 146, 634. ISBN 9788074920622.
- (42) Centrifuga Eppendorf 5702 / R /RH: Stručná uživatelská příručka [online]. Lab Mark. [cit. 2018-03-15] Dostupné z: <https://www.labmark.cz/data/system/attachments/eppendorf-navod-5702.pdf>
- (43) GROVES, Goeff. Anodising of aluminium [online]. Ellesmere College [cit. 2018-03-15]. Dostupné z: <https://nzic.org.nz/ChemProcesses/metals/8E.pdf>
- (44) Ultracentrifuge methods for lipoprotein research. [online]. BECKMAN, 1989. [cit. 2018-03-16] Dostupné z: https://ls.beckmancoulter.co.jp/files/appli_note/DS514B.pdf
- (45) UCHIYAMA, Susumu, Fumio ARISAKA, Walter F. STAFFORD a Thomas M. LAUE. *Analytical ultracentrifugation: instrumentation, software, and applications*. Springer, 2016, s. 15–24. ISBN 9784431559856.
- (46) BALBO, Andrea a Peter SCHUCK. *Analytical ultracentrifugation in the study of protein selfassociation and heterogeneous protein-protein interactions*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2005, s. 253–277. ISSN 1559-6095.
- (47) Rotors, Tubes, Bottles And Caps For Hitachi Preparative Ultracentrifuge [online]. Hitachi Koki Co., 2013. Dostupné z: <http://centrifuges.hitachikoki.com/rotor/ultra/s99920413.pdf>
- (48) REZA, Javad Z., Abdolrahim NIKZAMIR, Mahmoud DOOSTI a M. S. POUR. *A modification method for isolation and acetylation of low density lipoprotein of human plasma by density discontinuous gradient ultracentrifugation*. Journal of Biological Sciences. 2010, 10(8), s. 785–789. ISSN 1727-3048.
- (49) LDL/VLDL and HDL Purification Kit (Ultracentrifugation Free). [online] CELL BIOLABS, 2014. [cit. 2018-03-21] Dostupné z: http://www.hoelzel-biotech.com/media/import/pdf_manual/Cell_Biolabs//STA-608__Manual.pdf
- (50) MATTILA-SANDHOLM, Tiina a Maria SAARELA. *Functional dairy products*. Woodhead Pub, 2003, s. 63–67. ISBN 9781855736917.
- (51) TAN, Bee Koon, Hooi Ling FOO, Teck Chwen LOH, Norhani ABDULLAH a Idrus ZULKIFLI. *Purification and characterization of very low density lipoprotein in commercial*

- broiler and crossbred village chickens by fast protein liquid chromatography*. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2005, 18(12), s. 1780–1785. ISSN 1976-5517.
- (52) KARLSON, Peter, Wolfgang GEROK a Werner GROSS. *Pathobiochemie*. Academia, 1987, s. 79–83. ISBN 21-041-87.
- (53) TROJAN, Stanislav. *Lékařská fyziologie*. Grada, 2003, 4, s. 410. ISBN 8024705125.
- (54) SVACINA, Štěpán, Alena ŠMAHELOVÁ a Alena BRETŠJNADROVÁ. *Dieta při dyslipoproteinémiích*. Grada, 2008, s. 174. ISBN 9788024722566.
- (55) SNIDERMAN, Allan, Patrick COUTURE a Jacqueline DE GRAAF. *Diagnosis and treatment of apolipoprotein B dyslipoproteinemias*. Nature Reviews Endocrinology. 2010, 6(6), s. 335–346. ISSN 1759-5029.
- (56) SCHAEFER, Ernst J. *Lipoproteins, nutrition, and heart disease*. The American Journal of Clinical Nutrition. 2002, 75(2), s. 191–212. ISSN 0002-9165.
- (57) WILLIAMS, Paul T., H. Robert SUPERKO, William L. HASKELL, Edwin L. ALDERMAN, Patricia J. BLANCHE, Laura G. HOLL a Ronald M. KRAUSS. *Smallest LDL particles are most strongly related to coronary disease progression in men*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2003, 23(2), s. 314–321. ISSN 1524-4636.
- (58) BAUDHUIN, Linnea M., Stacy J. HARTMAN, John F. O'BRIEN, Irene MEISSNER, Robert S. GALEN, Jennie N. WARD, Scott M. HOGEN, Earl. L. BRAUNUM a Joseph P. MCONNELL. *Electrophoretic measurement of lipoprotein(a) cholesterol in plasma with and without ultracentrifugation: comparison with an immunoturbidimetric lipoprotein(a) method*. Clinical Biochemistry. 2004, 37(6), s. 481–488. ISSN 0009-9120.
- (59) Lipoprotein (a) [online]. USA [cit. 2018-05-21]. Dostupné z: <http://www.drrathresearch.org/research/93-research/468-lipoprotein-a>
- (60) ESPINOSA, I. Leticia, Catherine J. MCNEAL a Ronald D. MACFARLANE. *Method for lipoprotein(a) density profiling by BiEDTA differential density lipoprotein ultracentrifugation*. Analytical Chemistry. 2006, 78(2), s. 438–444. ISSN 0003-2700.
- (61) KONTUSH, Anatol. *Functionally defective high-density lipoprotein: A new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis*. Pharmacological Reviews. 2006, 58(3), s. 342–374. ISSN 0031-6997.
- (62) RYE, Kerry-Anne a Philip J. BARTER. *Predictive value of different HDL particles for the protection against or risk of coronary heart disease*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids. 2012, 1821(3), s. 473–480. ISSN 1388-1981.
- (63) SUPERKO, H. Robert, Lakshmana PENDYALA, Paul T. WILLIAMS, Katherine M. MOMARY, Spencer B. KING a Brenda C. GARRETT. *High-density lipoprotein subclasses*

and their relationship to cardiovascular disease. Journal of Clinical Lipidology. 2012, 6(6), s. 496–523. ISSN 1933-2874.

(64) WARNICK, G. Russell, Matthias NAUCK a Nader RIFAI. *Evolution of methods for measurement of HDL-cholesterol: From ultracentrifugation to homogeneous assays.* Clinical Chemistry. 2001, 47(9), s. 1579–1596. ISSN 1530-8561.

(65) BRITES, Fernando, Maximiliano MARTIN, Isabelle GUILLAS a Anatol KONTUSH. *Antioxidative activity of high-density lipoprotein (HDL): Mechanistic insights into potential clinical benefit.* BBA Clinical. 2017, 8, s. 66–77. ISSN 2214-6474.

(66) KRONENBERG, Henry a Robert H. WILLIAMS. *Williams textbook of endocrinology.* Elsevier, 2007, 11, s. 1609. ISBN 9781437721812.

(67) LANZER, Peter a Martin LIPTON. *Diagnostics of vascular diseases: Principles and technology.* Springer Science & Business Media, 2012, s. 193, 196. ISBN 9783642644375.

(68) ZADÁK, Zdeněk. *Výživa v intenzivní péči.* Grada, 2008, 2, s. 64. ISBN 9788024728445.

(69) LANGLOIS, Michel R. a Victor H. BLATON. *Historical milestones in measurement of HDL-cholesterol: Impact on clinical and laboratory practice.* Clinica Chimica Acta. 2006, 369(2), s. 168–178. ISSN 0009-8981.

(70) MUNROE, William H., Martin L. PHILLIPS a Verne N. SCHUMAKER. *Excessive centrifugal fields damage high density lipoprotein.* Journal of Lipid Research. 2015, 56(6), s. 1172–1181. ISSN 0022-2275.

(71) MCNAMARA, Judith R., G. Russell WARNICK a Gerald R. COOPER. *A brief history of lipid and lipoprotein measurements and their contribution to clinical chemistry.* Clinica Chimica Acta. 2006, 369(2), s. 158–167. ISSN 0009-8981.

(72) PETERS, Carl N. a Iain E. J. EVANS. *Automated processing of plasma samples for lipoprotein separation by rate-zonal ultracentrifugation.* Journal of Laboratory Automation. 2016, 21(6), s. 756–764. ISSN 2211-0682.

(73) SAWLE, Alex, Matthew K. HIGGINS, Marcus P. OLIVANT a Joan A. HIGGINS. *A rapid single-step centrifugation method for determination of HDL, LDL, and VLDL cholesterol, and TG, and identification of predominant LDL subclass.* The Journal of Lipid Research. 2002, 43, s. 335–343. ISSN 1539-7262.

(74) KAHNOLN, Talwinder S., Ruping XU a Faye I. CHOW. *Comparison of lipoprotein fractionation by sequential density gradient ultracentrifugation with precipitation or fast phase liquid chromatography.* Food Chemistry. 2001, 75(1), s. 115–122. ISSN 0308-8146.

- (75) DONG, Jun, Hanbang GUO, Ruiyue YANG, Hongxia LI, Shu WANG, Jiangtao ZHANG, Weiyang ZHOU a Wenxiang CHEN. *A novel and precise method for simultaneous measurement of serum HDL and LDL subfractions and lipoprotein (a) cholesterol by ultracentrifugation and high-performance liquid chromatography*. Clinica Chimica Acta. 2012, 413(13-14), s. 1071–1076. ISSN 0009-8981.
- (76) BOZÓKY, Zoltán, Lajos FÜLÖP a Győző JÁNOKI. *Combination of preparative and analytical ultracentrifugation methods for the investigation of low-density lipoprotein aliquots to prepare radioactive-labelled lipoproteins*. Analytical Ultracentrifugation VI, 2002, 119, s. 43–49. ISBN 9783540446729.
- (77) COOPER, Gerald R. *Standard methods of clinical chemistry: By the american association of clinical chemists*. Elsevier, 2013, s. 95-96. ISBN 9781483282213
- (78) MANDOVEC, Antonín. *Kardiovaskulární choroby u žen*. Grada, 2008, s. 18–19. ISBN 9788024728070.
- (79) NAVRÁTIL, Leoš. *Vnitřní lékařství pro nelékařské zdravotnické obory*. Grada Publishing, 2017, 2, s. 113. ISBN 9788027102105.
- (80) ČELEDOVÁ, Libuše a Rostislav ČEVELA. *Člověk ve zdraví i v nemoci: podpora zdraví a prevence nemocí ve stáří*. Karolinum, 2017, s. 2018. ISBN 9788024638287.
- (81) YADAV, Rahul, Yifen LIU, See KWOK, et al. *Effect of extended-release niacin on high-density lipoprotein (HDL) functionality, lipoprotein metabolism, and mediators of vascular inflammation in statin-treated patients*. Journal of the American Heart Association. 2015, 4(9). ISSN 2047-9980.
- (82) LUKÁŠ, Karel a Aleš ŽÁK. *Chorobné znaky a příznaky: diferenciální diagnostika*. Grada, 2014, s. 376. ISBN 9788024750675.
- (83) KALOUSOVÁ, Marta. *Patobiochemie ve schématech*. Grada, 2006, s. 118. ISBN 9788024715223.
- (84) RUCKI, Štěpán a Pavel VÍT. *Kardiologické minimum pro praktické dětské lékaře*. Grada, 2006, s. 119–120. ISBN 9788024711201.
- (85) COSTA, María Isabel. *Colesterol Bueno y Colesterol Malo* [online]. [cit. 2018-05-08]. Dostupné z: http://www.diabetesaldia.info/dad/index.php?option=com_content&view=article&id=394:colesterol-bueno-y-colesterol-malo&catid=84:edicion-48
- (86) LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Lutz HEIN. *Barevný atlas farmakologie*. Grada, 2007, 3, s. 316. ISBN 9788024716725.

- (87) KÖLBEL, František. *Praktická kardiologie*. Karolinum, 2011, s. 79. ISBN 9788024619620.
- (88) AI, Masumi, Seiko OTOKOZAWA, Bela F. ASZTALOS, Yasuki ITO, Katsuyuki NAKAJIMA, Charles C. WHITE, L. Adrienne CUPPLES, Peter W. WILSON a Ernst J. SCHAEFER. *Small dense LDL cholesterol and coronary heart disease: Results from the framingham offspring study*. *Clinical Chemistry*. 2010, 56(6), s. 967–976. ISSN 0009-9147.
- (89) HARPER, Charles R., Megan C. EDWARDS a Terry A. JACOBSON. *Flaxseed oil supplementation does not affect plasma lipoprotein concentration or particle size in human subjects*. *The Journal of Nutrition*. 2006, 136(11), s. 2844–2848. ISSN 0022-3166.
- (90) MASOPUST, Jaroslav. *Dědičné smrtelné onemocnění přenášené pohlavními buňkami: Oxidační a antioxidační mechanismy, nádorová proliferace, výjimečnost lidského mozku - 4. část*. Labor Aktuell. Praha, 2009, s. 4–8. ISSN 1214-7672.
- (91) LUŽNÁ, Dagmar a Dagmar VRÁNOVÁ. *Makrobiotický léčebný talíř aneb Nemoc není nepřítel II*. ANAG, 2007, s. 130. ISBN 9788072634217.
- (92) KATSANOS, Christos S. *Clinical considerations and mechanistic determinants of postprandial lipemia in older adults*. *Advances in Nutrition*. 2014, 5(3), 226–234. ISSN 2156-5376.
- (93) WOLSKA, Anna a Alan REMALEY. *Lipoprotein subfractionation analysis: The continuing quest for improving cardiovascular risk prediction*. *Clinical Laboratory News*. 2017. ISSN 0161-9640.
- (94) NAKAMURA, Masakazu, Shinji YOKOYAMA, Yuzo KAYAMORI, Hiroyasu ISO, Akihiko KITAMURA, Tomonori OKAMURA, Masahiko KIYAMA, Hiroyuki NODA, Kunihiro NISHIMURA, Michikazu NAKAI, Isao KOYAMA, Mahnaz DASTI, Hubert W. VESPER, Tamio TERAMOTO a Yoshihiro MIYAMOTO. *HDL cholesterol performance using an ultracentrifugation reference measurement procedure and the designated comparison method*. *Clinica Chimica Acta*. 2015, s. 185–190. ISSN 0009-8981.