



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

# NEPŘÍMÁ ANALÝZA RAKOVINNÝCH MARKERŮ POMOCÍ TAG-LIBS S VYUŽITÍM MAGNETICKÝCH MIKROČÁSTIC

INDIRECT ANALYSIS OF TUMOR MARKERS VIA TAG-LIBS WITH THE USE OF MAGNETIC  
MICROBEADS

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

TEREZA BAČOVÁ

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. EVA ZIKMUNDOVÁ, Ph.D.

BRNO 2024



# Zadání bakalářské práce

Ústav: Ústav fyzikálního inženýrství  
Studentka: **Tereza Bačová**  
Studijní program: Fyzikální inženýrství a nanotechnologie  
Studijní obor: bez specializace  
Vedoucí práce: **Mgr. Eva Zikmundová, Ph.D.**  
Akademický rok: 2023/24

Ředitel ústavu Vám v souladu se zákonem č.111/1998 o vysokých školách a se Studijním a zkušebním řádem VUT v Brně určuje následující téma bakalářské práce:

## **Nepřímá analýza rakovinných markerů pomocí Tag–LIBS s využitím magnetických mikročástic**

### **Stručná charakteristika problematiky úkolu:**

Technika Tag–LIBS se používá k vyhodnocení imunochemických metod pro nepřímé stanovení rakovinných markerů pomocí nanočásticových značek. Navázání sledovaného imunokomplexu na magnetickou mikročástici přináší výhody, např. použití jako alternativní pevná fáze nebo separace cílových molekul pomocí vnějšího magnetického pole. Tématem bakalářské práce je ověřit možnost souběžného sledování spektrálních čar charakteristických pro nanočásticové značky vedle charakteristických čar magnetických částic a optimalizace techniky.

### **Cíle bakalářské práce:**

- Optimalizace techniky Tag–LIBS z hlediska citlivosti porovnáním single–pulse a double–pulse uspořádání.
- Nalezení vhodného postupu standardizace naměřených dat.
- Aplikace na vzorky markeru rakoviny prostaty.

### **Seznam doporučené literatury:**

POŘÍZKA, Pavel; MODLITBOVÁ, Pavlína; MELIKECHI, Nouredine; KAISER, Jozef a MELIKECHI, Nouredine. Laser-ablation spectroscopy for imaging of tumor markers and nanoparticle labels. In: Optical Spectroscopy and Imaging for Cancer Diagnostics. WORLD SCIENTIFIC, 2023, s. 181-206. ISBN 978-981-12-5895-4. Dostupné z: [https://doi.org/10.1142/9789811258961\\_0007](https://doi.org/10.1142/9789811258961_0007).

POŘÍZKA, Pavel; VYTISKOVÁ, Karolína; OBOŘILOVÁ, Radka; PASTUCHA, Matěj; GÁBRIŠ, Ivo et al. Laser-induced breakdown spectroscopy as a readout method for immunocytochemistry with upconversion nanoparticles. Microchimica Acta. 2021, roč. 188, č. 5, 147. ISSN 0026-3672. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00604-021-04816-y>.

Termín odevzdání bakalářské práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2023/24

V Brně, dne

L. S.

---

prof. RNDr. Tomáš Šíkola, CSc.  
ředitel ústavu

---

doc. Ing. Jiří Hlinka, Ph.D.  
děkan fakulty

## Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá nepřímou detekcí biomarkeru rakoviny prostaty metodou Tag-LIBS. Stanovení biomarkeru bylo provedeno prostřednictvím foton-upkonverzních nanočástic, které jsou spolu s biomarkerem součástí upkonverzní imunoeseje s magnetickými mikročásticemi jako pevnou fází. Použití magnetických mikročástic jako podkladové pevné fáze nabízí velké množství výhod, jako je separace analytu pomocí vnějšího magnetického pole, nebo jejich využití pro vnitřní standardizaci. Metoda Tag-LIBS byla optimalizována vhodně zvoleným dvoupulzním uspořádáním, které v porovnání s jednopulzním vykazovalo vyšší intenzitu signálu a nižší limit detekce biomarkeru. Dále bylo provedeno srovnání upkonverzní imunoeseje, kde byla jako podkladová fáze použita magnetická mikročástice, a upkonverzní imunoeseje na mikrotitrační destičce. K optimalizaci metody Tag-LIBS také přispěla možnost provedení vnitřní standardizace. Byly také analyzovány klinické vzorky, přičemž získané výsledky byly porovnány s výsledky z upkonverzního skenování, které se k detekci upkonverzní imunoeseje běžně používá.

## Summary

This bachelor's thesis is focused on the indirect detection of the prostate cancer biomarker using the Tag-LIBS method. The determination of the biomarker was carried out using photon-upconversion nanoparticles, which, along with the biomarker, are part of the upconversion-linked immunosorbent assay, with magnetic microparticles as the solid phase. The use of magnetic microparticles as the solid phase offers numerous advantages, such as the separation of analyte using an external magnetic field and their use for internal standardization. The Tag-LIBS method was optimized using a suitably chosen double-pulse arrangement, which exhibited higher signal intensity and a lower limit of detection for the biomarker compared to the single-pulse setup. Furthermore, a comparison was made between the upconversion-linked immunosorbent assay using magnetic microparticles as the solid phase and upconversion-linked immunosorbent assay on a microtiter plate. The optimization of the Tag-LIBS method was also aided by the possibility of performing internal standardization. Clinical samples were also analyzed, and the obtained results were compared with the results from upconversion scanning, which is commonly used for detecting the upconversion-linked immunosorbent assay.

## Klíčová slova

Tag-LIBS, dvoupulzní technika, imunoesej, foton-upkonverzní nanočástice, magnetické mikročástice, prostatický specifický antigen

## Keywords

Tag-LIBS, double-pulse, immunoassay, photon-upconversion nanoparticle, magnetic microbeads, prostate-specific antigen

BAČOVÁ, T. *Nepřímá analýza rakovinných markerů pomocí Tag-LIBS s využitím magnetických mikročástic*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2024. 46 s. Vedoucí Mgr. Eva Zikmundová, Ph.D.



Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Nepřímá analýza rakovinných markerů pomocí Tag-LIBS s využitím magnetických mikročastic“ vypracovala samostatně a s použitím uvedené literatury a pramenů.

Tereza Bačová





Chtěla bych poděkovat své vedoucí bakalářské práce, Mgr. Evě Zikmundové, Ph.D., za cenné rady a konzultace. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Danielu Holubovi a doc. Ing. Pavlu Pořízkovi, Ph.D., za jejich pomoc s mými případnými dotazy. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za podporu, kterou mi poskytovala během mého studia.

Tereza Bačová



# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Teoretická část</b>	<b>3</b>
2.1	Spektroskopie laserem buzeného plazmatu . . . . .	3
2.1.1	Princip LIBS . . . . .	4
2.1.2	Optická sestava . . . . .	5
2.1.3	Dvoupulzní technika . . . . .	7
2.1.4	Parametry měření . . . . .	8
2.2	Aplikace . . . . .	9
2.2.1	Detekce biomarkerů . . . . .	10
2.3	Druhy imunoesejí pro detekci biomarkerů . . . . .	11
2.3.1	Fluorescenční imunoesej . . . . .	12
2.3.2	Enzymová imunoesej . . . . .	14
2.3.3	Upkonverzní imunoesej . . . . .	15
2.3.4	MB-ULISA . . . . .	17
2.4	Tag-LIBS . . . . .	18
<b>3</b>	<b>Experimentální část</b>	<b>22</b>
3.1	Příprava vzorků . . . . .	22
3.1.1	Seznam použitých chemikálií a materiálů . . . . .	22
3.1.2	Postup přípravy vzorků . . . . .	23
3.2	Parametry měření . . . . .	24
3.3	Vyhodnocení dat . . . . .	26
3.3.1	Kritéria výběru spektrální čáry . . . . .	26
3.3.2	Parametry vyhodnocení . . . . .	28
3.3.3	Porovnání SP a DP . . . . .	29
3.3.4	Porovnání ULISA a MB-ULISA . . . . .	30
3.3.5	Prekoncentrace PSA . . . . .	32
3.3.6	Klinické vzorky . . . . .	33
3.3.7	Srovnání limitů detekce . . . . .	34
<b>4</b>	<b>Závěr</b>	<b>36</b>
<b>5</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů</b>	<b>45</b>

# 1. Úvod

Podle Světové zdravotnické organizace je rakovina aktuálně příčinou smrti pro téměř každého šestého člověka na planetě a rakovina prostaty patří mezi jednu z nejčastěji diagnostikovaných [1]. Na základě odhadů se tempo nárůstu pacientů s tímto onemocněním má během následujících let nadále zvyšovat. I když je úmrtnost na rakovinu prostaty poměrně nízká (cca méně než 10%), je důležitá včasná diagnóza, neboť pacientovi výrazně zvyšuje šance na přežití. Ke studiu rakoviny se používají imunochemické metody, např. imunocytochemie, imunohistochemie nebo imunoeseje. Citlivost těchto metod není mnohdy dostatečná, anebo jsou metody jiným způsobem limitovány (fotodegradace značek, vysoká cena, časová náročnost aj.). Je tedy nezbytné vyvíjet další způsoby brzké identifikace příznaků nemoci.

Využití spektroskopie laserem buzeného plazmatu (LIBS) jako detekční metody pro imunoeseje je označováno pojmem Tag-LIBS. Tato metoda již byla v minulosti několikrát použita, a v této bakalářské práci byl prostřednictvím Tag-LIBS nepřímo detekován biomarker rakoviny prostaty, konkrétně prostatický specifický antigen PSA. Stanovení biomarkeru bylo uskutečněno detekcí foton-upkonverzních nanočástic, které jsou spolu s biomarkerem součástí imunoeseje s magnetickými mikročásticemi. Vedle emisních čar yttria, které zastupují foton-upkonverzní značky, byly zároveň sledovány i čáry železa. Ty reprezentují magnetické mikročástice, které slouží jako pevný základ celé imunoeseje s navázaným biomarkerem. Magnetické mikročástice nabízí velké množství výhod, jako je separace analytu pomocí vnějšího magnetického pole, nebo jejich využití pro vnitřní standardizaci.

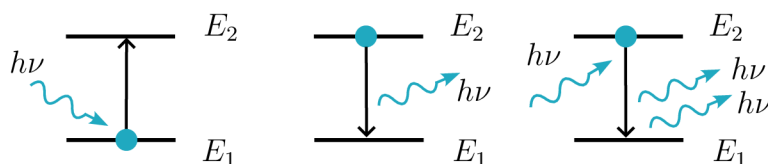
Cílem práce bylo použití Tag-LIBS jako detekční metody biomarkeru PSA v porovnání s ostatními imunochemickými metodami. Bylo využito upkonverzní imunoeseje s magnetickými mikročásticemi jako pevnou fází. Dalším cílem byla optimalizace Tag-LIBS vhodným zvolením jednopulzního nebo dvoupulzního uspořádání a možností provedení vnitřní standardizace. Získané výsledky byly porovnány s výsledky z upkonverzního skenování, které se k detekci upkonverzní imunoeseje běžně používá.

## 2. Teoretická část

### 2.1. Spektroskopie laserem buzeného plazmatu

Spektroskopie laserem buzeného plazmatu z anglického názvu „Laser-Induced Breakdown Spectroscopy“ (LIBS) je metoda emisní atomové spektroskopie. Je to analytická technika poskytující rychlou a současně jak kvalitativní, tak i kvantitativní prvkovou analýzu vzorku, nehledě na jeho skupenství nebo homogenitu. Kvalitativní analýza se zaměřuje na detekci prvků přítomných ve vzorku, které jsou rozpoznány na základě jejich charakteristických emisních spekter. Identifikace charakteristických čar je většinou provedena porovnáním naměřeného spektra s referenčními spektry známých prvků. Naopak kvantitativní analýza se zaměřuje na stanovení koncentrace zastoupených prvků ve zkoumaném materiálu. Využívá detekovaných intenzit emisních čar sledovaného prvku a kalibrační křivky, která se získává ze změřených spekter standardů s přesně definovaným chemickým složením. Tato kalibrace umožňuje převést naměřené intenzity na koncentrace neznámých prvků ve vzorku.

Atomová spektroskopie je založena na interakci fotonů dopadajícího záření s atomy zkoumaného vzorku. Základem tohoto vzájemného působení je elektrický náboj přítomný ve hmotě. Vlivem elektrického pole světla nastává působení sil na náboje a dipóly uvnitř materiálu. Dochází k jejich zrychlení nebo vibrování. Naopak v opačném případě vibrující elektrické náboje emitují elektromagnetické záření. V souladu s postuláty kvantové mechaniky a dualismu vlna-částice má světlo pouze diskrétní hladiny energie, tj. jeho energie je kvantována. Mezi základní situace znázorněné na Obr. 2.1, které mohou nastat při interakci fotonu s atomem, patří absorpce, spontánní emise a stimulovaná emise fotonu [2].



Obrázek 2.1: Absorpce, spontánní emise a stimulovaná emise fotonu, převzato a upraveno [2].

Při absorpci světla musí být splněna podmínka, která udává, že energie fotonu dopadajícího záření odpovídá rozdílu energií hladin atomu:

$$h\nu = E_2 - E_1, \quad (2.1)$$

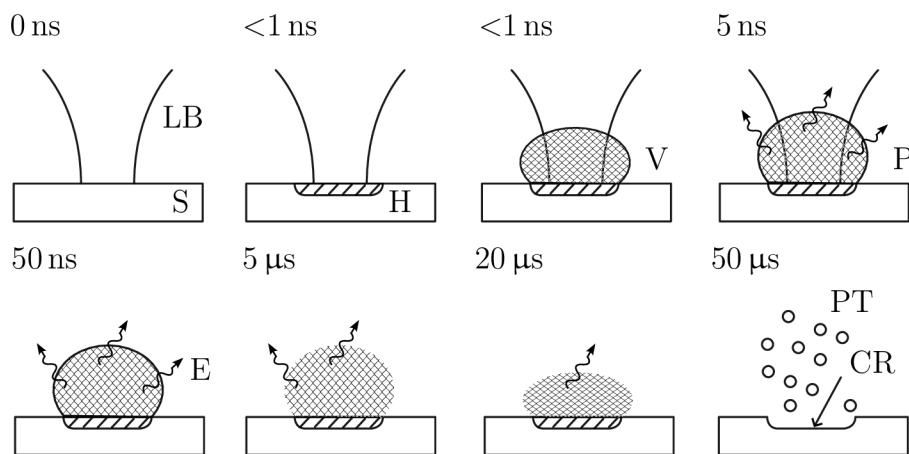
přičemž  $h$  je Planckova konstanta,  $\nu$  frekvence fotonu a energetická hladina  $E_2 > E_1$ . Poté může nastat pohlcení energie fotonu, jeho zánik a následná excitace (nabuzení) atomu na vyšší hladinu  $E_2$ .

Spontánní emise probíhá nezávisle na vnějším stimulu. Pokud se atom nachází na vyšší hladině, může samovolně deexcitovat na nižší hladinu energie  $E_1$ . Tento přechod je doprovázen vyzářením fotonu o energii  $h\nu$ , která je opět rovna rozdílu hladin energie.

Posledním jevem je děj opačný k absorpci. Při stimulované emisi dochází k interakci fotonu s určitou frekvencí, polarizací a definovaným směrem šíření s excitovaným atomem. Při přechodu na nižší hladinu dochází tedy navíc k vyzáření dalšího fotonu kopírujícího veškeré vlastnosti původního.

## 2.1.1. Princip LIBS

Nejčastěji je spektroskopie laserem buzeného plazmatu používána při zkoumání emisních spekter pevných látek. V tomto případě je potřeba dodat laserovému pulzu dostatečnou energii k překročení prahové hodnoty zlomu materiálu, při které nastává přetržení chemických vazeb mezi atomy za vzniku plazmatu s velmi krátkou životností. Tato doba záleží na mnoha faktorech, např. na parametrech zvoleného laserového pulzu, analyzovaném materiálu, okolní atmosféře atd. Běžně se ovšem pohybuje okolo 0,5–10  $\mu\text{s}$ . Plazma je ionizovaný plyn s nabitými částicemi dosahující teplot okolo 10 000–20 000 K, což je více (2–4krát) než na povrchu Slunce. Tento proces, kdy nastává excitace atomů a odpaření části vyznačeného povrchu vzorku, je znám pod termínem ablace. S postupně chladnoucím plazmatem nastává deexcitace ionizovaných částic a emise záření s charakteristickými vlnovými délkami odpovídajícím přechodům mezi energiovými hladinami prvků přítomných ve vzorku. Světlo je zachytáváno sběrnou optikou a pomocí optického vlákna vedeno do spektrometru k analýze prvků [3–5]. Časový průběh ablace materiálu pro nanosekundový pulz je přiblížen na Obr. 2.2.



Obrázek 2.2: Časový průběh ablace vzorku. LB – příchozí laserový pulz, S – vzorek, H – oblast depozice energie, V – pára ze vzorku, P – plazma, E – specifická emise pro daný atom, CR – kráter, PT – částice, převzato a upraveno [6].

V závislosti na délce trvání laserových pulzů dochází ke změnám ablačního procesu. Při použití femtosekundových pulzů (délka pulzu  $10^{-15}$  s) nastává přímá přeměna pevné látky na plyn a plazma bez větších tepelných ztrát. Ablace materiálu femtosekundovými laserovými pulzy funguje převážně na principu Coulombovské exploze. Jedná se o netermální proces, při kterém jsou vyraženy valenční elektrony ze vzorku a vytvořeny kladné ionty v materiálu. Vazby mezi jednotlivými atomy jsou tímto procesem oslabeny a překonány odpudivou Coulombovskou silou působící mezi ionty. Dochází tak k porušení materiálu a ke vzniku plazmatu. V případě pikosekundových pulzů (délka pulzu  $10^{-12}$  s) vzniká při přeměně skupenství v menší míře také kapalná fáze, která ovlivňuje přesnost ablace. Při použití nanosekundových laserů, s délkou pulzů řádově v jednotkách  $10^{-9}$  s, převládají termální procesy ve vzorku, během kterých dochází k roztavení značné vrstvy materiálu. Materiál je tak odpařen jak z pevné, tak i kapalně formy, a jeho stlačením dochází k vytvoření rázových vln. Ty mají za následek vytlačení taveniny, což přispívá k modifikaci tvaru ablatovaného kráteru. Při trvání pulzu několik ns může nastat částečná absorpce energie pulzu už vzniklým plazmatem. Tento jev je nazýván stínění plazmatem (z ang. „plasma shielding“) a udává, kolik hmoty bude přeměno na páru [7, 8].

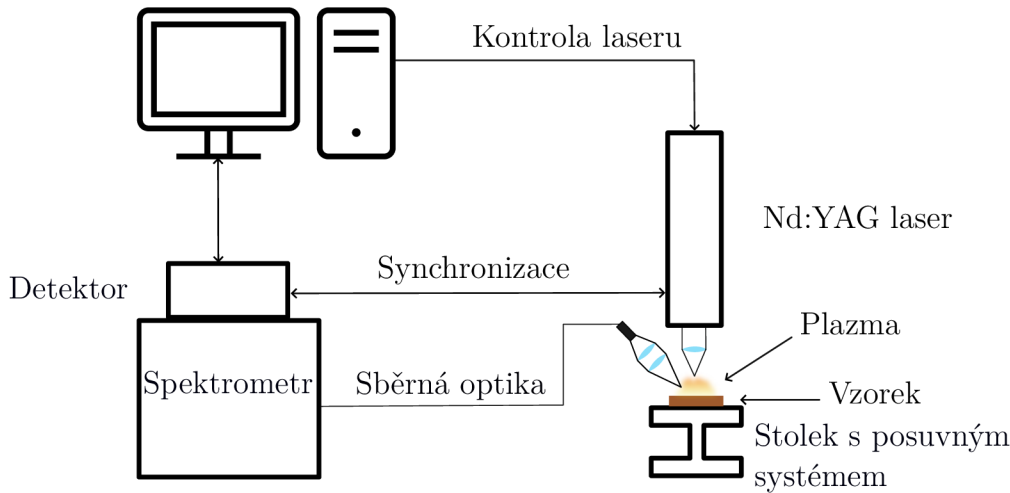
LIBS je semi-destruktivní metoda. Kráter způsobený laserovým pulzem nicméně vzniká na předem vyznačené ploše vzorku (průměr kráteru jednotky až stovky  $\mu\text{m}$ ) a sahá pouze do vrchních vrstev materiálu (jednotky až desítky  $\mu\text{m}$ ). V omezené míře je možné i hloubkové profilování vzorku (stovky  $\mu\text{m}$ ). Laserový svazek může být díky své nerovnoměrně rozložené intenzitě zaměřen na velmi malé oblasti zkoumání (často jeho profil nabývá tvaru Gaussovy křivky s nejvyšší intenzitou ve středu), ovšem dochází k odpařování materiálu nejen ze dna, ale i ze stěn kráteru. Navíc při průchodu optickou sestavou, než je laserový svazek přiveden ke vzorku, mohou nastat jeho další deformace a je tak zhoršeno celkové hloubkové rozlišení [2, 9].

LIBS analýza nevyžaduje v podstatě žádný postup přípravy vzorku (výjimkou jsou biologické vzorky) a vzorky mohou být zkoumány *in vitro*, *in vivo* a *ex vivo* [5]. Emisní spektra jsou navíc získávána ve velmi krátkém čase (jednotky  $\mu\text{s}$ /spektrum) [10]. Naopak může být pro LIBS metodu limitující překryv různých emisních čar na stejných vlnových délkách. Při zkoumání heterogenního materiálu, kde složení jeho jednotlivých vrstev není známo, může dojít k obtížné interpretaci spektrálního signálu a k nepřesnému stanovení, které prvky jsou přítomny ve vzorku a v jakých koncentracích. Intenzita signálu by v tomto případě byla složena z příspěvků více prvků [2, 11]. Se spektrální analýzou nehomogenního vzorku se částečně pojí i matriční efekt. Jedná se o soubor chemických a fyzikálních vlastností zkoumaného materiálu, který ovlivňuje kvalitu získaných dat z měření [12]. Může se jednat o majoritní prvky, ze kterých je materiál složen, o jeho tvrdost, odrazivost, absorpci atd. Pro potlačení tohoto jevu, popř. šumu, může být využita intenzita spektrální čáry majoritního prvku o stabilní koncentraci, kterou by se intenzita emisního spektra podělila.

### 2.1.2. Optická sestava

Mezi nejčastěji používané lasery ve spektroskopii laserem buzeného plazmatu patří komerční Nd:YAG laser s pevnolátkovým aktivním prostředím operující na základní vlnové délce 1064 nm. Jedná se o yttrito-hlinitý granát ( $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$ ) dopovaný ionty neodymu ( $\text{Nd}^{3+}$ ). Pomocí generátoru vyšších harmonických frekvencí se může jeho vlnová délka konvertovat například na 532 nm nebo 266 nm [13]. V případě Nd:YAG laseru má Q-switch pulz trvání několika ns. Pomocí optických prvků sloužících ke kolimaci či zaostření svazku a děliče svazku, propouštějícího pouze určitý interval vlnových délek, je přiveden laserový pulz nad vzorek uchycený zpravidla na pohyblivém stolku?—ještě se k tomu vrátit [2, 13]. Emise záření z chladnoucího plazmatu je zachytávána sběrnou optikou spolu s optickým vláknem, které vede světlo až ke štěrbině spektrometru, nejčastěji typu Czerny-Turner nebo Echelle. Jedná se o typy spektrometru, které rozkládají světlo difrakční mřížkou. Každá vlnová délka světla je odražena od mřížky pod jiným úhlem, který určuje polohu dopadu na detektor, např. typu ICCD (z ang. „Intensified Charge-Coupled Device“) nebo sCMOS (z ang. „scientific Complementary Metal-Oxide-Semiconductor“) [14]. Vlnové délky jsou následně převedeny na elektrický signál. Uspořádání jednotlivých komponent sestavy je znázorněno na Obr. 2.3.

## 2.1. SPEKTROSKOPIE LASEREM BUZENÉHO PLAZMATU



Obrázek 2.3: LIBS optická sestava, převzato a upraveno [15].

### Princip laseru

Slovo laser je složené z počátečních písmen svého anglického názvu „Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation“, které lze přeložit jako „Světlo zesílené stimulovanou emisí záření“. Tímto procesem je dosaženo koherentního monochromatického svazku, přičemž se záření pohybuje jedním směrem se stejnou časově invariantní fází [16].

Nicméně světlo, které za tepelné rovnováhy projde materiálem, je částečně absorbováno převažujícím počtem atomů na nižší energetické hladině. Tato skutečnost je dána uvažováním atomů, kdy je za teplotní rovnováhy dána pravděpodobnost obsazení jejich energetických hladin Boltzmannovým rozdělením:

$$P(E_m) \propto \exp\left(-\frac{E_m}{k_B T}\right), \quad (2.2)$$

kde  $E_m$  je hladina energie a  $k_B$  je Boltzmannova konstanta. Ze závislosti lze pozorovat, že pravděpodobnost obsazení hladin je ovlivněna teplotou. Všechny atomy se při teoretickém dosažení  $T = 0\text{ K}$  nachází v základním stavu, s rostoucí teplotou se ale začínají zaplňovat i ostatní hladiny. Inverzní populace nastává při podmínkách porušujících teplotní rovnováhu, tedy, kdy obsazenost vyšších energetických hladin převyšuje tu na nižších. K navození stavu inverzní populace je potřeba budícího zdroje energie, který by zajistil excitaci elektronů v atomech. Oblast, kde k tomuto jevu dochází, se nazývá aktivní prostředí. Nejčastěji se jako aktivní prostředí laseru volí krystaly dopované vhodnými ionty pro svou vysokou krystalografickou uspořádanost [13]. Proces buzení může být proveden několika způsoby, ať už přes elektronový nebo iontový svazek, elektrickou výbojku, pomocí elektronů a děr v polovodičových zdrojích, či dokonce chemickou reakcí [2].

Hlavní komponenty tvořící laserový systém jsou tedy optický rezonátor a zdroj budící energie. Rezonátor se obvykle skládá ze dvou zrcadel, přičemž jedno je odrazné, druhé polopropustné, a jsou situovány proti sobě s aktivním prostředím umístěným mezi nimi. Po navození excitovaného stavu převážné většiny atomů může dojít při interakci s fotony ke stimulované emisi. Dochází tím k navýšení počtu fotonů v aktivním prostředí, které dále interagují s excitovanými atomy. Při opakování tohoto procesu vzniká mnoho fotonů se stejným směrem a fází, což vede k vytvoření laserového paprsku. Než laserový svazek opustí sestavu, mnohokrát se mezi zrcadly odrazí. Při odrazech v optickém rezonátoru



se část záření vrací do aktivního prostředí, kde dochází k opětovným interakcím, což udržuje stabilní stav excitace. K zesílení laserového paprsku je nutné, aby fázový posun mezi fotony odraženými od zrcadel a těmi, které opouští aktivní prostředí, byl násobkem  $2\pi$ , a nastala tak konstruktivní interference. Tento proces se opakuje při každém cyklu odrazu mezi zrcadly, dokud není intenzita laseru dostatečně silná, aby mohl paprsek projít polopropustným zrcadlem [2, 16].

### Q-switch

Pro účely LIBS se používají vysokoenergetické laserové pulzy. K vytvoření mikroplazmatu na velmi malé oblasti musí laser disponovat výkonem řádově v jednotkách MW. Dosáhnout pulzů o vysoké energii lze např. použitím tzv. „Q-switch“ režimu, fungujícím na principu záklopky. Může se jednat např. o rotační prvek (zrcadlo, hranol) nebo optoelektrický modulátor s polarizačními filtry, který zabraňuje fotonům s požadovanou vlnovou délkou opustit optický rezonátor a vyvolat stimulovanou emisi. Neustálým buzením se hromadí energie v systému, která je přepnutím Q-switch vypuštěna v podobě vysokoenergetického laserového pulzu. Ten má krátkého trvání, neboť je inverzní populace v aktivním prostředí rychle vyčerpána. Q-switch je krátce po průchodu laseru polopropustným zrcadlem vypnut, aby se zabránilo generování dalších pulzů [2, 16, 17].

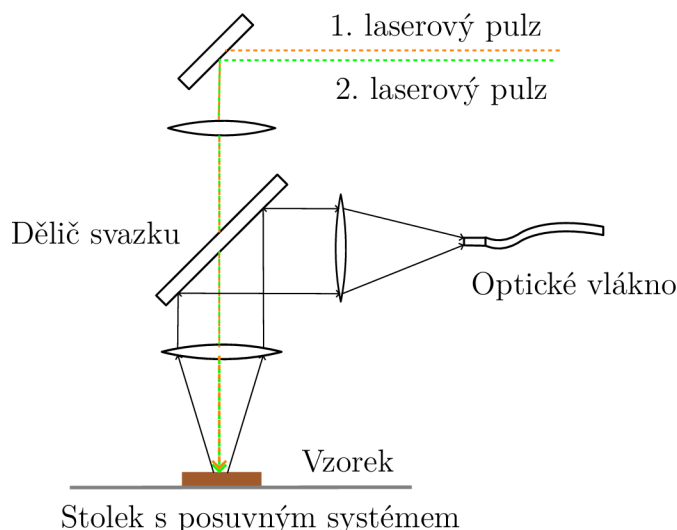
### 2.1.3. Dvoupulzní technika

Ke zvýšení citlivosti spektrálních čar se často volí místo použití jednoho laserového pulzu dva a výjimečně více [18]. Dvoupulzní technika bývá označována i pojmem z ang. „double-pulse“ nebo jen zkratkou DP. To stejné platí i pro jednopulzní techniku („single-pulse“, SP). Mohou být použity lasery stejné vlnové délky, nebo i kombinace různých. Existuje několik možností jak dvoupulzní metody dosáhnout. Buď jsou zaměřeny dva pulzy do jednoho místa vygenerované stejným laserovým svazkem, nebo jsou dva lasery geometricky uspořádány pomocí optické sestavy. Geometrické uspořádání může být kolineární (oba pulzy jsou kolmo k povrchu vzorku a míří do stejného místa), nebo ortogonální (obvykle je jeden pulz nastaven kolmo a druhý rovnoběžně se vzorkem) [17]. Příklad kolineárního dvoupulzního uspořádání je znázorněn na Obr. 2.4.

Ortogonální uspořádání se ovšem může ještě dělit na vytvoření tzv. pre-ablační jiskry nebo běžného použití druhého pulzu na ohřátí plazmatu. Při realizaci metody s pre-ablační jiskrou je rovnoběžný laser přiveden pár milimetrů nad vzorek, aby zformoval plazma nebo jiskru z okolního vzduchu, které zajistí zahřátí vzorku, ale nejsou dostatečné na samotnou ablaci. Ta je zajištěna až druhým laserovým pulzem, který dopadá kolmo na vzorek a vzniká plazma typické pro LIBS [19].

V ostatních případech je zpravidla první pulz použit k ablaci materiálu následované vznikem mikroplazmatu. Při zavedení druhého pulzu přímo do plazmatu nastává několik událostí současně. Jednak je zajištěno opětovné ohřátí plazmatu, čímž je zaručeno prodloužení doby excitace částic, jednak dochází k mohutnější energetické expanzi, po níž je při chladnutí emitováno více záření [9]. V případě použití dvoupulzní techniky je načasování jednotlivých pulzů klíčové k dosažení co nejsilnějšího signálu. Optimalizaci lze provádět úpravou parametrů, které jsou diskutovány v následující sekci.

## 2.1. SPEKTROSKOPIE LASEREM BUZENÉHO PLAZMATU

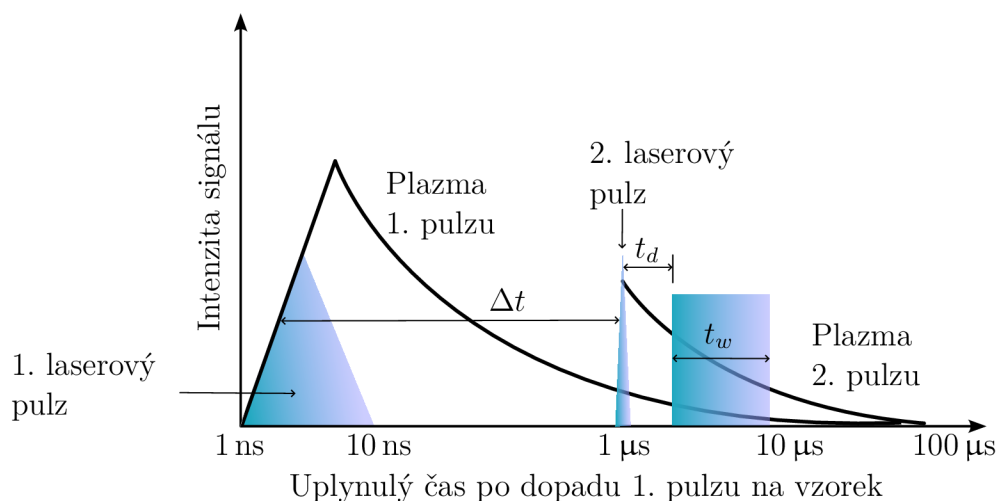


Obrázek 2.4: Dvoupulzní kolineární uspořádání laserových pulzů, převzato a upraveno [27].

### 2.1.4. Parametry měření

Sledování a optimalizace parametrů měření jsou klíčové pro dosažení přesných a spolehlivých výsledků LIBS analýzy. Snahou je dosáhnout co největšího poměru signálu k šumu, aby byla zajištěna maximální spolehlivost a citlivost metody. Mechanismy, které probíhají v materiálu při jeho ablací, a také rozsah plazmatu, jsou ovlivněny dobou trvání laserového pulzu (2.1.1) a jeho energií, resp. hustotou zářivého výkonu. Energie laserového pulzu je volena tak, aby nastala excitace požadovaného vzorku. Pro nanosekundový pulz by se měla hustota zářivého výkonu pohybovat kolem  $1 \text{ GW/cm}^2$ . V případě LIBS mohou být použity krátké nebo dlouhé pulzy. Krátké pulzy jsou typické pro femtosekundové, nebo pikosekundové lasery, dlouhé pulzy jsou zajištěny nanosekundovými lasery [7].

Kontrolu nad časovými intervaly, ve kterých se měření provádí, určují tzv. gate delay a gate width. Gate delay označuje dobu, která uplyne mezi výstřelem laserového pulzu a přivedením signálu do optického systému spektrometru, neboť emisní spektrum plazmatu je rovněž funkcí času. Obvykle je toto zpoždění nastaveno řádově na stovky ns. Gate width je znám také pod pojmem integrační čas. Jedná se tedy o dobu, po kterou spektrometr sbírá signál z emitovaného záření a zpravidla bývá nastaven řádově v jednotkách až desítkách  $\mu\text{s}$ . V rané části excitace je sice zvýšena pravděpodobnost detekce obtížněji detekovatelných prvků, nicméně je zvýšen i signál pozadí. V případě použití více pulzů je důležité nastavit zpoždění mezi jednotlivými pulzy (z ang. „interpulse delay“). Na Obr. 2.5 je znázorněn ilustrativní průběh sbírání signálu při použití dvou laserových pulzů, včetně důležitých časových intervalů [17].



Obrázek 2.5: Ilustrativní průběh sbírání signálu při použití dvou nanosekundových laserových pulzů, přičemž  $\Delta t$  je zpoždění mezi pulzy,  $t_d$  je gate delay a  $t_w$  je gate width, převzato a upraveno [17].

## 2.2. Aplikace

První použití spektroskopie laserem buzeného plazmatu je datováno do 60. let 20. století, po zkonstruování prvního funkčního laseru v roce 1960 [20]. V minulém století našel LIBS převážně komerční uplatnění v průmyslu jako spektrální analýza kovů, slitin, oceli a uhlí. V 90. letech byla vyvinuta analýza signálu na dálku pomocí optického vlákna, a začalo se diskutovat o analýze měsíčního povrchu. S postupem času přibyl nespočet publikací z oblastí, do kterých LIBS expandoval. Jednalo se např. o povrchovou analýzu přírodních či syntetických materiálů jako je dřevo, keramika, sklo, polymery i vesmírná tělesa [17]. V roce 2013 představil Giacomo a kol. novou techniku laserové spektroskopie, a to NELIBS [21]. Metoda NELIBS, z ang. „Nanoparticle-Enhanced Laser-Induced Breakdown Spectroscopy“, spočívá v depozici koloidního roztoku vzácných kovů, nejčastěji stříbrných a zlatých nanočástic, na povrch kovového vzorku před ozáření laserem. Po deponování nanočástic je zvýšena intenzita detekovaného signálu v důsledku poklesu prahu ablace, tj. minimální intenzita laserového pulzu potřebná k ablaci materiálu. Kromě toho nedochází k významné změně složení vzorku, neboť tenká vrstva nanočástic je odstraněna po několika laserových pulsech.

Příkladem použití techniky LIBS v terénu mohou být přístroje ChemCam na vozítku Curiosity a novější model druhé generace SuperCam na sondě Perseverance jako součást mise NASA na Marsu. Úkolem ChemCam je provádět prvkovou analýzu povrchu planety i hloubkové profilování (řádově stovky  $\mu\text{m}$  – za pomoci více pulzů namířených do stejného místa). Vzorkování probíhá přímo v průběhu laserové ablace a není nutné odebírat vzorky před provedením analýzy. SuperCam má obdobné poslání, nýbrž je navíc schopen

## 2.2. APLIKACE

provádět Ramanovu spektroskopii (RS)<sup>1</sup> a časově rozlišenou fluorescenci (TRF)<sup>2</sup> pro ještě podrobnější charakterizaci chemického složení vzorku [22–24].

Metoda LIBS našla uplatnění i v nejrůznějších bioaplikacích [5, 10, 15, 27, 28]. Začaly se zkoumat organické materiály, tkáně zvířat, pletiva rostlin, složení potravin atd. V této oblasti vyniká tzv. „bioimaging“, který využívá mapování distribuce signálu prvků ve 2D prostoru [29]. V posledních letech se LIBS začal používat i na mapování distribuce signálu ze vzorků lidských tkání, DNA a na detekci různých nemocí, mezi které patří i rakovina [17]. LIBS má také potenciál doplnit ostatní detekční metody v oblasti imunochemie svými dosavadními limity detekce koncentrace sledovaných analytů (zkoumaných látek) [27, 30] (viz 2.3). Jeho aplikace odpovídají široké škále forem, kterých biologické vzorky mohou nabývat, přes vápenaté tvrdé tkáně jako jsou kosti, po měkké tkáně obsahující vyšší procentuální zastoupení vody a tělní tekutiny.

### 2.2.1. Detekce biomarkerů

První známky onemocnění vážnějšího charakteru mohou být většinou odhaleny již screeningovým testem, který by měl být přesný z hlediska poskytnutých výsledků, minimálně invazivní, rychlý a jednoduše proveditelný. Nicméně pouze na základě screeningu nelze danou nemoc s určitostí diagnostikovat. Slouží pouze k odhalení známek nemoci (např. neobvyklá hladina proteinů v krvi, úbytek bílých krvinek) před projevením dalších symptomů. Stanovení rakoviny může být provedeno přímo a nepřímě. Přímá detekce nemoci je realizována prostřednictvím charakteristických prvků, jejichž hladiny jsou v nezdravé tkáni mimo standardní hodnoty. Přímá detekce je ovšem méně využívanou metodou v medicíně kvůli své invazivitě. Nepřímá detekce se zaměřuje na sledování biomarkerů nemocí prostřednictvím značek, které jsou na ně navázané pomocí specifických protilátek. Biomarker je obvykle označení pro molekulu proteinu přítomnou v tělních tekutinách, jehož koncentrace se u nezdravých jedinců liší [5, 31, 32].

### PSA

Prostatický specifický antigen (PSA z ang. „prostate-specific antigen“) je lidský glykoprotein produkováný buňkami prostaty, která je součástí mužské pohlavní soustavy. Termín antigen je označení pro molekulární strukturu, která může být imunitním systémem vnímána jako cizorodé těleso, a vyvolává reakci imunitního systému produkcí protilátek aktivovanými lymfocyty. V případě PSA se sice nejedná o látku, která není produkována lidským organismem, nicméně pojmenování antigen se používá spíše v kontextu jeho schopnosti specifické vazby s imunoglobulinem (protilátka mající tvar Y). Jako biomarker rakoviny prostaty se PSA využívá při imunochemických testech a následné diagnostice tohoto onemocnění. Jeho koncentrace v krvi je velmi nízká, zdravá hladina se uvádí v rozmezí 0–2,5 nanogramů na mililitr (ng/mL). Zvýšení jeho hladiny v krvi může být spojeno s několika faktory, nejenom s karcinomem. PSA musí totiž proniknout několika buněčnými

<sup>1</sup>RS je založena na Ramanově rozptylu, kdy dochází k nepružného rozptylu interagujících fotonů na molekulách látky. Při tomto procesu nastává absorpce energie fotonu molekulou, což může vést k excitaci jejích vibračních a rotačních stavů. Poté nastává emise fotonu s frekvencí odlišnou od frekvence původního fotonu, což poskytuje informace o chemické struktuře vzorku. Tento fenomén je pojmenovaném po svém objeviteli a nositeli Nobelovy ceny za fyziku v roce 1930 C. V. Ramanovi [25].

<sup>2</sup>TRF je technika využívaná k analýze časového průběhu fluorescence vzorků. Princip spočívá v excitaci fluorescenčních značek externím zdrojem světla, obvykle krátkými pulzy laseru. [26].

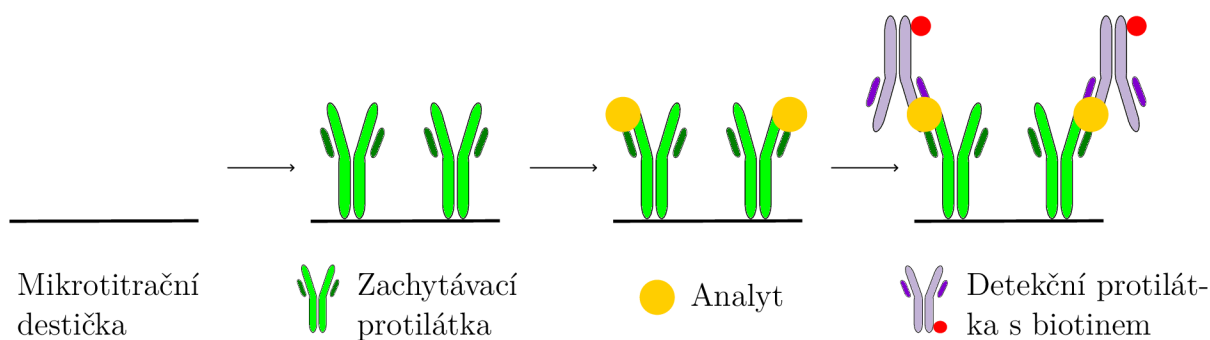
organelami a tkáněmi, aby se dostal do krevního oběhu člověka. Patologickým procesem může být narušena tato bariéra, a dochází k výskytu vyšší koncentrace PSA v krvi. Nejčastějším důvodem je zánět močových cest a benigní hyperplazie prostaty (nenádorové zvětšení). Jedná se o běžné onemocnění postihující mužskou populaci převážně od věku 50+ [33–36].

### 2.3. Druhy imunoesejí pro detekci biomarkerů

V této kapitole budou diskutovány hlavně ty imunochemické metody, se kterými byla v minulosti imunoesej s LIBS detekcí porovnávána. Podstatou imunochemických metod je vazba protilátka-antigen in vitro (tzv. imunokomplex) za účelem dokázání přítomnosti antigenu a jeho koncentrace, popř. množství protilátek. Proces navázání protilátky a antigenu ovšem nebyl v roztoku viditelný, a tak byly vyvinuty reaktanty pro generování různých typů signálů a způsoby jejich měření. Výsledkem je právě imunoesej, v níž je ve většině případů biomarker z obou stran obklopen svými protilátkami (tzv. sendvičový imunokomplex) se značkou navázanou na jedné z nich. Existuje několik typů značek. Povrch značek je chemicky upraven tak, aby se byly schopné navázat na protilátky reagující s konkrétními biomarkery. Biochemická analýza, která tato navázání speciálních protilátek na své antigeny měří, se nazývá imunoesej, popř. imunostanovení. Imunostanovení bývají zpravidla pojmenována podle použité značky, nebo dle použitého detekčního principu. Může se jednat např. o protilátky s nakonjugovanými fluorescenčními (FIA), enzymatickými (ELISA), foton-upkonverzními (ULISA) nebo elektrochemiluminiscenčními značkami (ECLIA) [37].

Imunoeseje FIA, ELISA i ULISA, mají v případě sendvičových imunokomplexů stejný protokol přípravy, liší se pouze v posledním kroku různým typem navázaných značek [39]. Základem těchto metod je imunoadsorpce, při které dochází k navázání specifických protilátek na povrch pevné fáze (dno mikrotitrační destičky, magnetické nebo plastové částice atd.). Navázání může probíhat pomocí vícero mechanismů, např. pomocí Van der Waalsových sil nebo kovalentních vazeb. V první řadě je na povrchu pevné fáze imobilizována zachytávací protilátka daného biomarkeru. Na protilátku je navázán specifický antigen (biomarker) a k doplnění sendvičového imunokomplexu je poté na biomarker navázána detekční protilátka modifikovaná biotinem. Biotin je známý jako vitamín B7 nebo také H. Využívá se jeho schopnost vázat se na avidin, popř. streptavidin (protein) s vysokou afinitou. Je to jedna z nejsilnějších nekovalentních vazeb, která se v přírodě vyskytuje. Streptavidin je navázán na nanočásticové značky [38]. Průběh konjugování jednotlivých částí imunokomplexu, které jsou totožné pro všechna tři imunostanovení, je znázorněn na Obr. 2.6 [39]. V případě elektrochemiluminiscenční imunoeseje (ECLIA) dochází k měření luminiscenčního záření vzniklého v důsledku chemické reakce, která se odehrává na elektrodách, jako pevných fázích, po přivedení elektrického proudu. Oproti ostatním detekčním metodám, které pracují s luminiscenčním signálem a vyžadují excitační zdroj záření, elektrochemiluminiscence (ECL) nabízí výhodu v absenci tohoto zdroje, což představuje možnost snížení signálu pozadí [40, 41].

### 2.3. DRUHY IMUNOESEJÍ PRO DETEKCI BIOMARKERŮ



Obrázek 2.6: Průběh konjugování sendvičového imunokomplexu pro fluorescenční imunoesej (FIA), enzymovou imunoesej (ELISA) i upkonverzní imunoesej (ULISA) bez posledního značkovacího kroku, převzato a upraveno [39].

#### 2.3.1. Fluorescenční imunoesej

Značení protilátek nebo cílových antigenů bývá ve fluorescenční imunoeseji (FIA z ang. „Fluorescence Immunoassay“) prováděno různými fluorescenčními barvivy (fluorofory). Každé z nich má svou charakteristickou vlnovou délku pro excitaci a emisi fluorescence, při kterých dochází k maximální absorpci a emisi záření [37]. Detekci fluorescenčního záření se zabývá fluorescenční spektroskopie. Signál měřených spekter může být sbírán fluorimetrem nebo fotonovým detektorem. Výsledný imunokomplex pro FIA je znázorněn na Obr. 2.7. První zmínka o použití fluorescenčních molekul pro imunoeseje se objevila již v roce 1961 v článku vědců Dandlikera a Faigena, kteří se zabývali polarizací fluorescenčního záření a jeho vlivu na reakci antigen-protilátka [42]. V roce 2018 byl publikován článek zkoumající detekci biomarkeru jaterních onemocnění, např. hepatitida a cirhóza, pomocí fluorescenční polarizační imunoeseje (FPPIA z ang. „Fluorescence Polarization Immunoassay“) [43]. Základní princip FPPIA je měření změn v polarizaci fluorescenčního světla, které je emitováno značenými molekulami.

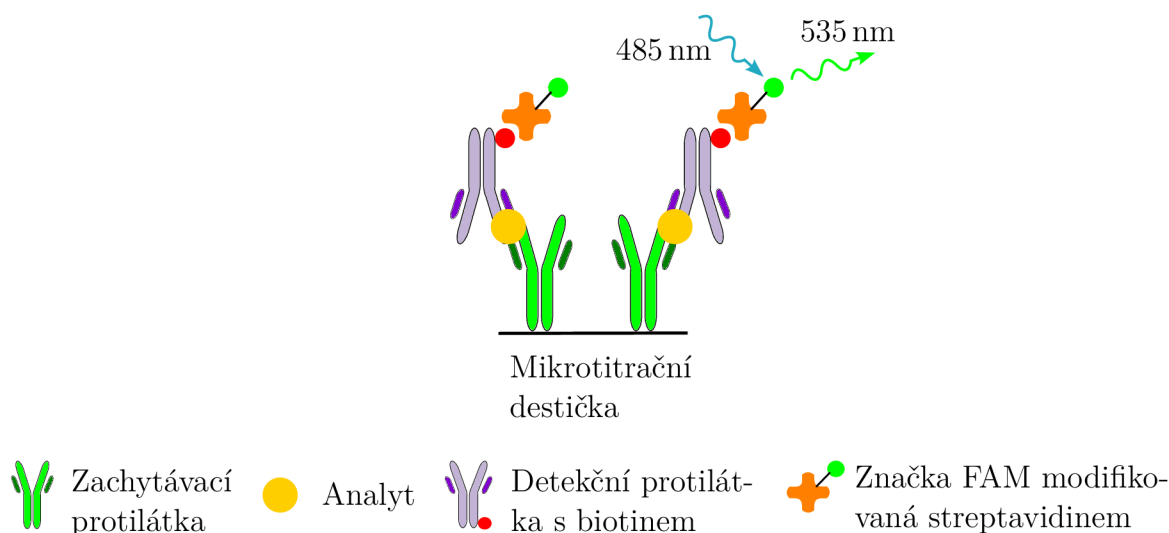
Podle konkrétních požadavků na experiment se používají specifická barviva [44]. Pravděpodobně nejvíce používané barvivo v imunocytochemii je fluorescein-5-isothiokyanát (FITC). Jedná se o derivát fluoresceinu, který se používá ke značení proteinů díky vysokovazné isothiokyanátové skupině. Jeho excitační a emisní vrchol je na vlnových délkách 495 a 517 nm. Alexa Fluor je ze stejné skupiny kyanátů, oproti FITC ale vykazuje vyšší stabilitu, jas a pH citlivost. Barvivo FAM (fluorescein), s největší absorpcí na vlnové délce 492 nm a maximální emisí na 517 nm, je vhodné zejména pro značkování oligonukleotidů (DNA, RNA), proteinů a dalších biomolekul [45]. Pro dosažení optimálních výsledků analýzy musí barviva splňovat následující kritéria [38]:

1. efektivně přeměňovat absorbovanou energii z excitačního světla na emitované (projev lze pozorovat v síle intenzity záření),
2. emise fluorescenčního světla by měla být delší než 500 nm (oblast zelené barvy viditelného světla),
3. Stokesův posun by měl být větší než 50 nm.

Tato kritéria byla stanovena z několika důvodů. U biologických vzorků často nastává autofluorescence, což výrazně ovlivňuje citlivost této metody. Jedná se o jev, při kterém

materiál vykazuje fluorescenci, aniž by byl vystaven externímu zdroji světla. Autofluorescence biologických tkání je většinou výraznější na kratších vlnových délkách (excitační spektra obvykle 300–500 nm a emisní spektra 350–550 nm), proto zvolením delších vlnových délek může dojít k potlačení signálu pozadí [46]. Kritérium týkající se Stokesova posunu označuje rozdíl frekvencí, popř. vlnových délek excitačního a emitovaného záření vlivem Stokesova nepružného rozptylu světla na molekulách látky. Posun je charakteristický tím, že emitované fotony mají nižší energii (a tedy větší vlnovou délku) než fotony, které byly absorbovány během excitace [25].

Další faktor limitující FIA je nestabilita částic. Opakovaným používáním intenzivního světla k excitaci fluorescentních molekul, obzvláště UV záření a modrého světla na konci viditelného spektra, nastává poškození buněk vzorku. Každá excitace způsobuje degradaci molekul, což vede ke ztrátě fluorescence a postupnému vymizení signálu. Tento jev je znám jako fotozeslabení (tzv. „photobleaching“) [47]. Na míru degradace má také vliv délka expozice, tj. vystavení vzorku záření.



Obrázek 2.7: Schéma imunostanovení FIA s fluorescenčním barvivem FAM, převzato a upraveno [39].

## Fluorescence

Luminiscence je nadřazeným pojmem pro procesy, při kterých nastává emise záření z materiálu. Dle původu dodané energie do systému jsou rozlišovány různé třídy luminiscence, přičemž jednou z tříd je fluorescence. Fluorescence je fyzikální jev, při kterém je elektron excitován ze základního stavu na vyšší energiový singletový stav S1, S2 atd. V tomto singletovém stavu má elektron opačný spin vůči elektronu nacházejícím se v základním stavu. Elektron se postupně relaxačními procesy dostane na nejnižší vibrační hladinu excitovaného singletového stavu. Z nejnižší hladiny může deexcitovat do základního singletového stavu za vyzáření fotonu. Tento děj probíhá v desítkách pikosekund až jednotkách nanosekund. Energiové hladiny molekuly se popisují Jablonského diagramem [48].

### 2.3.2. Enzymová imunoesej

První zmínky o použití enzymů ke značkování antigenů a protilátek se objevily již v publikacích na přelomu 60.–70. let [49, 50]. Samotné enzymové imunoanalýzy následně expandovaly do biomedicínského průmyslu v průběhu 70. a 80. let v důsledku hledání náhrad za metody využívající radioaktivní izotopy. Ačkoliv tyto radioaktivní imunoanalýzy (RIA) byly velmi přesné, nesly s sebou bezpečnostní rizika spojená s radiací. Další omezení byla způsobena nestabilitou izotopů (rychlý poločas rozpadu) a jejich vysokou cenou, včetně dalších nákladů pro zajištění ochrany před ozářením [37].

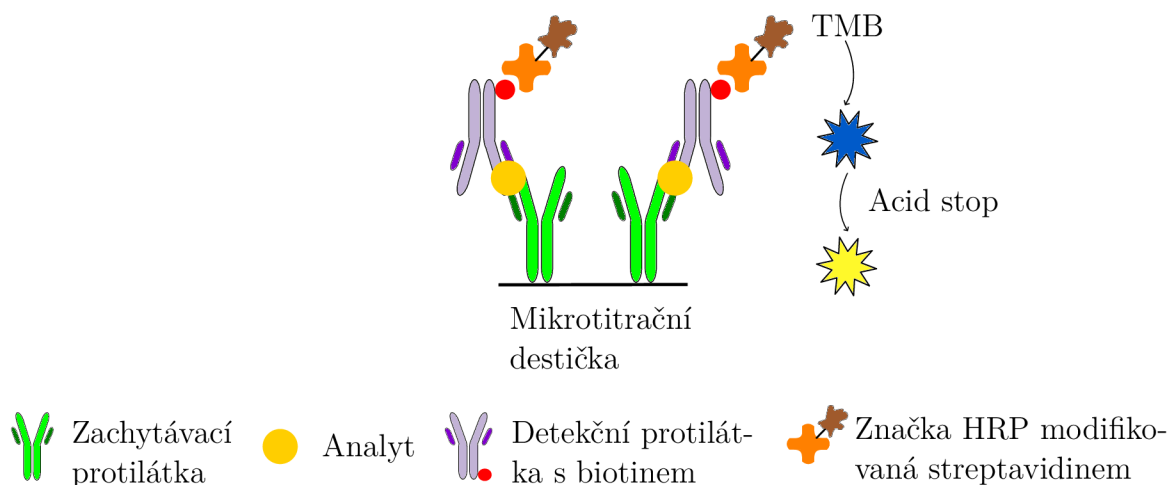
Metoda ELISA (z ang. „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“) je imunostanovení používané k detekci a kvantifikaci různých typů molekul s vysokou citlivostí. Princip ELISA spočívá v kombinaci enzymové značky a substrátu, jejichž interakce vede ke změně barvy roztoku. Enzym je bílkovina, která se v imunokomplexu chová jako reakční katalyzátor, a jeho aktivita je v průběhu měření monitorována. Nejčastěji používané enzymy musí disponovat vysokou stabilitou a enzymatickou aktivitou a nízkou relativní molekulovou hmotností. Nejvíce rozšířené enzymy jsou peroxidáza křenu selského (HRP) modifikovaná avidinem, popř. streptavidinem (HRP-SA), a alkalická fosfatáza (ALP). Substrát je látka, která je enzymem rozpoznána a specificky na něho navázána. Během enzymatické reakce je substrát enzymem konvertován na produkt, který může být detekován například změnou barvy nebo fluorescencí. Intenzita měřeného signálu je přímo úměrná množství vázaného analytu. Díky této relaci mezi enzymatickou aktivitou a množstvím analytu je možné stanovit koncentraci antigenu ve vzorku. Často používaný substrát pro HRP je chemická sloučenina TMB (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidin). Jedná se o bezbarvou karcinogenní látku, která se při enzymatické reakci s peroxidázou přeměňuje na modrý produkt. Pro ALP se používají fosfátové substráty. Konečný produkt vzniklý z reakce enzymu a substrátu je detekován speciálním spektrofotometrem navrženým pro ELISA metody, tzv. „ELISA-reader“ [37, 51]. Toto multifunkční zařízení měří intenzitu fluorescence nebo také absorbanci, tj. veličinu udávající kolik světla bylo vzorkem pohlceno. Každý substrát absorbuje záření na jiné vlnové délce. Základní princip výpočtu koncentrace analytu objasňuje Lambertův-Beerův zákon, který udává přímou úměru mezi absorbancí zkoumané látky  $A$  a její koncentrací  $c$  [52]:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l = \log_{10} \frac{I_0}{I}, \quad (2.3)$$

kde  $\epsilon$  je molární absorpční koeficient,  $l$  je tloušťka vrstvy roztoku,  $I_0$  je původní intenzita světla před průchodem vrstvou vzorku a  $I$  je intenzita po průchodu vrstvou  $l$ .

Detekce signálu je prováděna po určité době. K ukončení enzymatické reakce se nejčastěji používá změna pH roztoku. V metodě „acid stop“ je reakce zastavena přidáním kyseliny (obvykle  $H_2SO_4$ ,  $HCl$ ) do vzorku, což vede k neutralizaci pH, změně barvy roztoku (v případě TMB se modrý roztok změní na žlutý) a zastavení enzymatické aktivity. Tím je zabráněno dalšímu vývoji signálu a nastává vyhodnocení výsledků. Změna pH může být provedena i přidáním zásady ( $NaOH$ ) [51]. Ukázka imunokomplexu pro ELISA je zobrazena na Obr. 2.8.





Obrázek 2.8: Schéma imunostanovení ELISA s enzymem HRP a substrátem TMB, převzato a upraveno [39].

V porovnání s fluorescenční imunoesejí je imunostanovení ELISA více preferováno, neboť amplifikace signálu založená na enzýmech vykazuje nižší intenzitu pozadí [53]. ELISA je považována za nejrozšířenější imunoesej, která byla využita k detekci nespočtu biomarkerů, např. rakoviny prsu, močového měchýře, vaječníku i prostaty [39, 54, 55, 61]. I když ELISA poskytuje citlivou a spolehlivou analýzu, testování vzorků je časově náročné. Samotný proces může trvat i několik hodin, což může být nevhodné pro aplikace vyžadující rychlou analýzu [37, 51].

### 2.3.3. Upkonverzní imunoesej

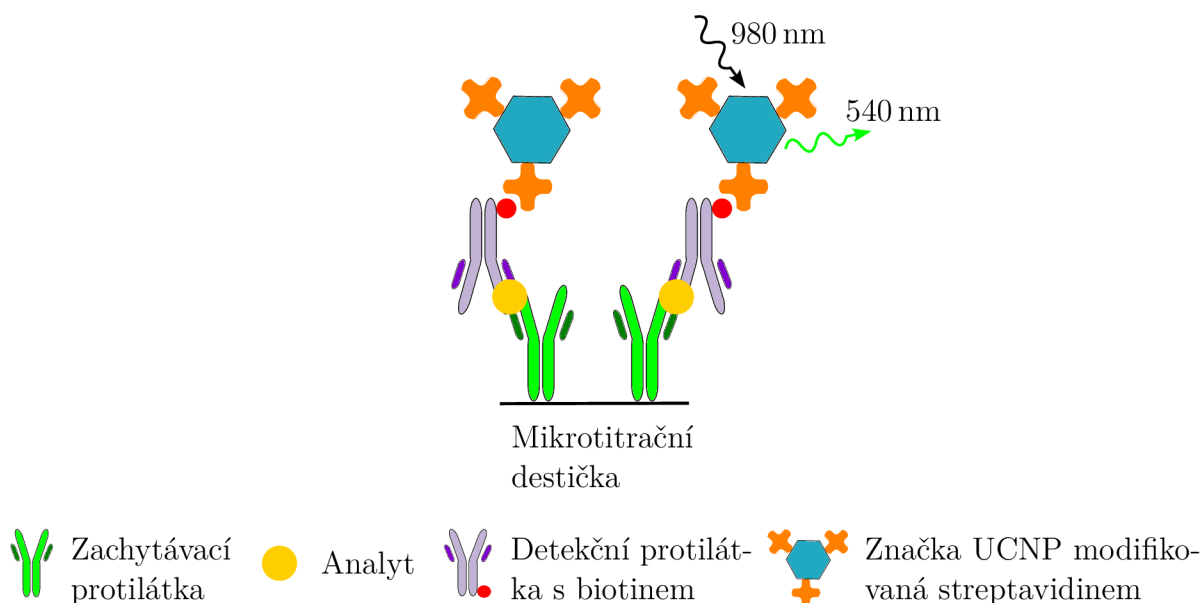
Upkonverzní imunoesej (ULISA z ang. „Upconversion-Linked Immunosorbent Assay“) používá ke zjištění koncentrace analytu foton-upkonverzní nanočástice („UCNPs“). Jedná se o poměrně novou metodu, která byla představena Hlaváčkem a kolektivem v roce 2016 [53]. Svou citlivostí dosahuje i 10–100krát nižšího limitu detekce koncentrace analytu než ELISA. K detekci emitovaného záření je použita speciálně upravená čtečka mikrotitračních destiček pro měření upkonverze, tzv. upkonverzní skener. Upkonverzní skener funguje na principu ozáření vzorku laserovým paprskem s vlnovou délkou blízkou infračervenému spektru, kdy je upkonverzní emitované záření zachyceno optickou sestavou a přivedeno do fotonásobiče [56]. Schéma imunokomplexu pro ULISA je znázorněno na Obr. 2.9.

UCNPs jsou zpravidla nanokrystaly  $\text{NaYF}_4$  dopované lanthanoidy (nejčastěji používané ionty jsou  $\text{Yb}^{3+}$ ,  $\text{Er}^{3+}$  a  $\text{Tm}^{3+}$ ) v různých poměrech. Výhoda foton-upkonverzních nanočástic spočívá v tom, že vykazují anti-Stokesův posun popisující rozdíl frekvencí excitačního a emitovaného záření při nepružném rozptylu fotonů na molekulách látky. Dochází tak k vybuzení jejich vibračních stavů. Anti-Stokesův posun je charakteristický tím, že emitované fotony mají vyšší energii (a tedy kratší vlnovou délku) než fotony, které byly absorbovány během excitace. Tento jev je způsobený tím, že se molekula původně nacházela v excitovaném stavu a po absorpci energie dopadajících fotonů byla dále excitována na ještě vyšší virtuální hladinu. Při deexcitaci se molekula dostala na svou základní hladinu, ztratila část energie, a nastala tak emise fotonů o vyšší energii, resp. frekvenci [25]. V imunochemických metodách se používají právě výše zmíněné dopanty ytterbia, erbia a thulia, neboť dokáží absorbovat světlo z blízkého infračerveného spektra. Emitované fotony při následné deexcitaci mají vyšší energii a jsou součástí viditelného spektra. Anti-Stoke-

### 2.3. DRUHY IMUNOESEJÍ PRO DETEKCI BIOMARKERŮ

sovo spektrum je tak mnohem lépe rozlišitelné od vlivu autofluorescence biologických tkání a značně redukuje vliv interference pozadí a samotného signálu. Foton-upkonverzní značky také nepodléhají fotodegradaci [53, 57, 58].

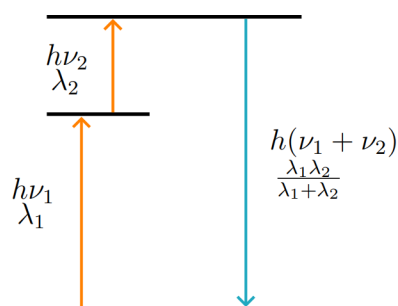
V roce 2021 Zhou a kol. vyvinul nový typ foton-upkonverzních nanočástic pro imunostanovení ULISA [59]. Jednalo se o typické krystaly  $\text{NaYF}_4$  dopované lanthanoidy, nicméně byl na povrch těchto značek nanesen také povlak oxidu křemičitého ( $\text{SiO}_2$ ) a následně byla navázána i aminoskupina  $\text{NH}_2$ . Tímto způsobem vznikly značky  $\text{UCNPs-SiO}_2\text{-NH}_2$ , které umožňovaly lepší navázání detekční protilátky, zvýšení intenzity signálu a byly použity pro detekci biomarkeru rakoviny slinivky břišní.



Obrázek 2.9: Schéma imunostanovení ULISA s foton-upkonverzními značkami, převzato a upraveno [39].

#### Frekvenční upkonverze

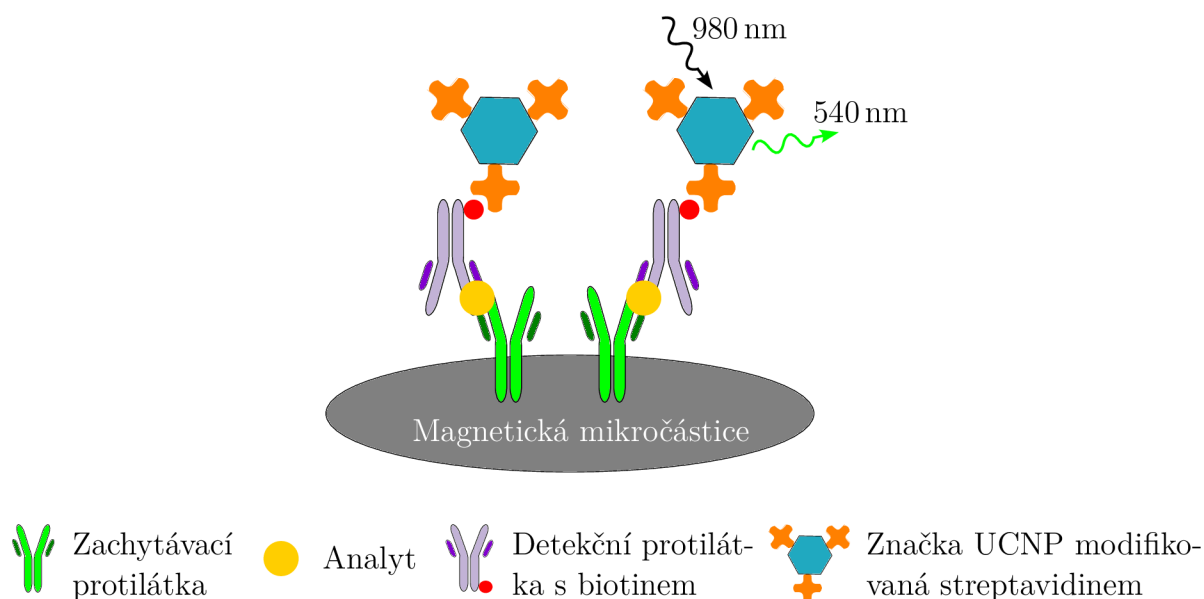
Uskutečnění frekvenční upkonverze uvnitř krystalu je nejvíce pravděpodobné pro materiál obsahující tzv. pasti, které dokáží zachytit elektron (krystaly dopované lanthanoidovými ionty). Tyto pasti jsou v energiovém spektru reprezentovány stabilní mezihladinou mezi původním a konečným stavem. Hlavní podstatou fyzikálního jevu upkonverze je dvoufotonová absorpce. Při absorpci prvního fotonu o energii  $h\nu_1$  dojde k excitaci atomu na stabilní mezihladinu. Pokud je elektron uvězněn v pasti dostatečně dlouho na to, aby nastala absorpce druhého fotonu o energii  $h\nu_2$ , tak může elektron past opustit a atom je excitován na ještě vyšší energiovou hladinu. Na této hladině dochází ke spontánní emisi fotonu s energií odpovídající  $h(\nu_1 + \nu_2)$  nebo se jí blížíci a vlnovou délkou  $\frac{\lambda_1\lambda_2}{\lambda_1+\lambda_2}$  (Obr. 2.10). Tímto způsobem má upkonverze vyšší pravděpodobnost uskutečnění, než kdyby absorpce obou fotonů probíhala současně. Frekvenční upkonverze může být také uskutečněna mnohem komplexnějšími procesy. V praxi se tento jev používá hlavně ke generování anti-Stokesovy luminiscence [2, 58].



Obrázek 2.10: Schéma frekvenční upkonverze, převzato a upraveno [58].

### 2.3.4. MB-ULISA

Zmínky o použití magnetických mikročásteček (MBs z ang. „magnetic microbeads“) jako pevné fáze imunostanovení se objevily již v 90. letech minulého století, ovšem největší uplatnění zažívají až v posledních letech. Ve většině případů jsou složeny ze železného jádra a povrchu, který je potažen polymery nebo organickými ligandy. Magnetické mikročástečky slouží k efektivní immobilizaci celého imunokomplexu, poskytují zvýšení intenzity signálu a dochází k lepšímu navázání jednotlivých organických částí [39]. V případě jejich použití v imunokomplexu v kombinaci s LIBS detekcí mohou sloužit k potlačení matričních efektů. Na Obr. 2.11 je uvedeno schéma ULISA imunoeseje s magnetickými mikročástečkami jako podkladovou fází imunokomplexu.

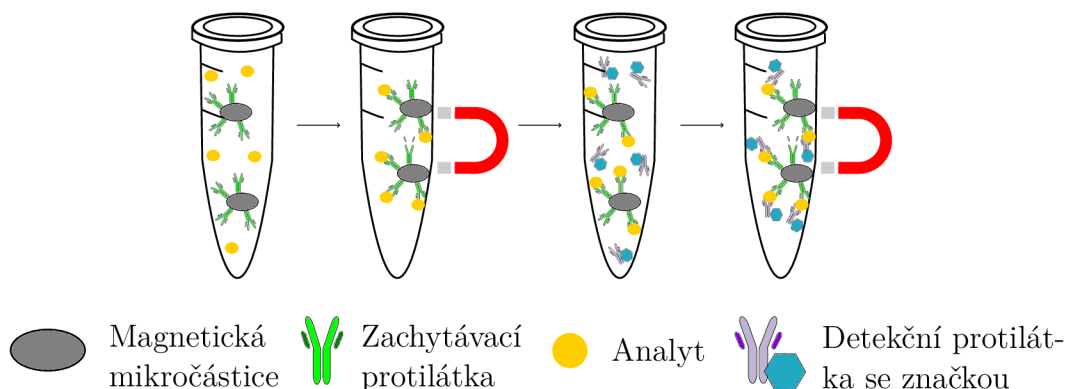


Obrázek 2.11: Schéma imunoeseje MB-ULISA, převzato a upraveno [39].

Magnetická mikročástečka je zároveň jedinou magnetickou složkou celého imunostanovení a působením vnějšího magnetického pole může být separována. Princip magnetické separace je znázorněn na Obr. 2.12, ale mnohem podrobněji je popsán v Experimentální části (3.1.2). V průběhu přípravy imunokomplexů jsou postupně jednotlivé komponenty přidávány do zkumavek a mezi jednotlivými kroky je aplikováno vnější magnetické pole, aby nastal zvýšený výskyt částí imunokomplexů v místě jeho působení. Tato separace magnetických mikročásteček pomocí vnějšího magnetického pole je velmi užitečná, neboť

## 2.4. TAG-LIBS

může být provedena redukce objemu roztoku bez ztráty analytu. Tomuto umělému navýšení koncentrace analytu v roztoku se říká prekoncentrace analytu, a její změna je udávána hodnotou prekoncentračního faktoru [39].

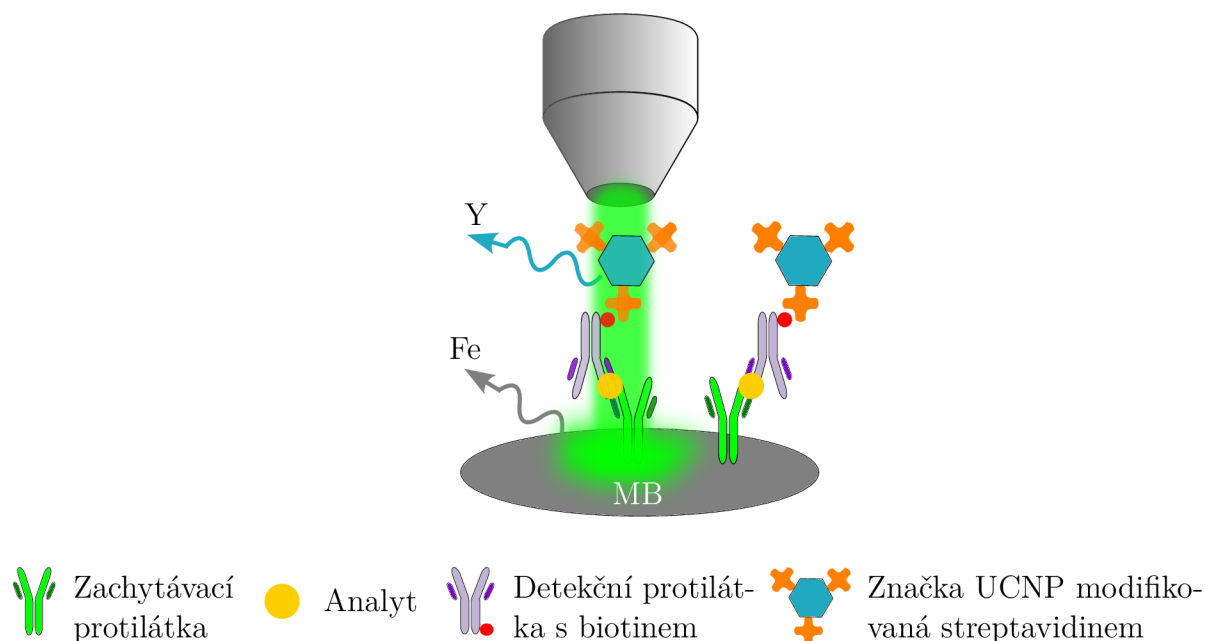


Obrázek 2.12: Princip magnetické separace a prekoncentrace analytu, převzato a upraveno [60].

## 2.4. Tag-LIBS

Diagnostika rakoviny pomocí metody LIBS je možná dvěma způsoby. Jeden z přístupů je analýza emisních čar prvků z lehce přístupných vzorků (moč, krev, vlasy, nehty...) [31]. Nicméně převažující koncept spočívá v nepřímé detekci samotných biomarkerů pomocí značek (z ang. „tags“). Tag-LIBS je využití spektroskopie laserem buzeného plazmatu jako detekční metody pro imunoeseje. Tato nepřímá detekční metoda využívá mikro nebo nanočásticových značek složených ze sloučenin i z prvků, jejichž spektrum lze metodou LIBS snadno detekovat. Mohou to být kovové nanočástice (zlaté, stříbrné, platinové, oxidy železa, titanu atd.) nebo foton-upkonverzní nanočástice. Po ablaci povrchu vzorku laserovým pulzem jsou z imunoeseje získána emisní spektra prvků obsažených ve značkách a k nim přiřazeny jednotlivé biomarkery [61, 62].

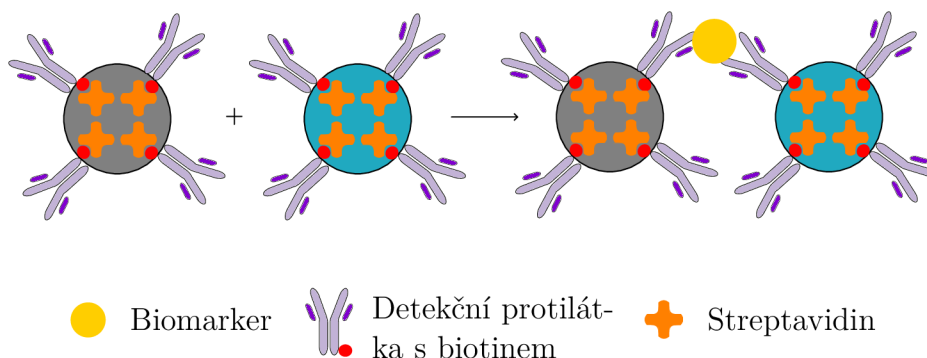
V článku (Makhneva a kol.) publikovaném v roce 2022 bylo diskutováno použití magnetických mikročástic jako pevné fáze různých imunostanovení, konkrétně FIA, ELISA i ULISA k detekci biomarkeru PSA [39]. Výsledky imunoesejí ukázaly, že použití foton-upkonverzních nanočástic v ULISA vedlo k dosažení největšího poměru signálu k šumu a nejnižšího limitu detekce PSA. Ukázka imunoeseje MB-ULISA s LIBS detekcí je znázorněna na Obr. 2.13.



Obrázek 2.13: Schéma imunoeseje MB-ULISA. Schéma je doplněno o sledované emisní čáry foton-upkonverzních značek (Y) a magnetických mikročástiček (Fe) po přivedení laserového pulzu pro LIBS analýzu, převzato a upraveno [39].

U metody Tag-LIBS, vzhledem k možné simultánní detekci spektrálních čar více prvků, může být biomarker detekován pomocí dvou a více nanočásticových značek (Obr. 2.14). Tyto značky nemají stejné chemické složení a jejich současná detekce nabízí výhodu v přesnější detekci biomarkeru a stanovení jeho koncentrace, a lepším potlačení šumu. Záměrem do budoucna je také uskutečnit paralelní detekci více biomarkerů, což by přineslo výraznou úsporu času a nákladů [30]. Díky této schopnosti metody LIBS by bylo potenciálně možné diagnostikovat najednou dva a více biomarkerů v jednom klinickém testu, popř. zvýšit účinnost testu. Velkou výhodou, kterou LIBS může konkurovat ostatním immunochemickým detekčním metodám, je nezávislost nanočástic na luminiscenci. U značek vykazující luminiscenční vlastnosti, na kterých jsou některé imunoeseje založené, je zaznamenáno horší rozlišení signálu kvůli vlivu autofluorescence biologických vzorků a také dochází u těchto značek k postupnému blednutí [62]. Tato omezení také komplikují provádění multiplexingu. Multiplexová analýza je odborné označení pro simultánní detekci a identifikaci více analytů v jednom vzorku [63, 64]. Příkladem použití multiplexové analýzy s LIBS detekcí je článek (Gondhalekar a kol.) z roku 2019, jehož hlavním cílem bylo vyšetření různých způsobů analýzy dat získaných metodou Tag-LIBS [65]. Konkrétně byla data obdržena z emisních spekter z multiplexingu lanthanoidových značek (Dy, Eu, Gd, Nd, Pr), které měly zastupovat jednotlivé kontaminanty v potravinách. Roztoky s kovy byly usušeny na nitrocelulóзовém papíře a bylo navrženo použití Tag-LIBS jako detekční metody pro imunoeseje na bázi papíru. Další výhodou metody LIBS je nezávislost na luminiscenci, se kterou se neodlučitelně pojí stabilita používaných značek (nepodléhají fotodegradaci), pokud jsou skladovány v chladicím zařízení při teplotě 4 °C. Díky těmto výhodám, společně s rychlostí a nízkou cenou analýzy, stále se zlepšující instrumentací a citlivostí, má LIBS potenciál stát se běžně používanou detekční metodou pro imunoeseje, viz Experimentální část.

## 2.4. TAG-LIBS



Obrázek 2.14: Navázání biomarkeru na dvě odlišné značky (šedá a tyrkysová) pro metodu Tag-LIBS, převzato a upraveno [61].

### Historie Tag-LIBS

Poprvé byl princip Tag-LIBS metody zmíněn v práci profesora Melikechiho v roce 2009 [4]. Byla provedena úspěšná detekce biomarkeru rakoviny vaječníku Ca 125 pomocí LIBS s využitím mikročásticových značek na bázi křemíku. Tento fenomén byl roku 2011 Melikechimu a Markushinovi patentován jako „Mono- and multi-element coded LIBS assays and methods“ [3]. V roce 2015 publikoval prof. Melikechi a kol. článek zaměřený na detekci biomarkeru rakoviny vaječníku Ca 125 pomocí dvou značek  $\text{TiO}_2$  a  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  [61]. Koncentrace značky oxidu železa nebyla závislá na koncentraci biomarkeru, nýbrž sloužila jako substrát k oddělení imunokomplexu s molekulou Ca 125 od krevní plazmy. Při pozorování spekter obou značek byla zvýšena pravděpodobnost detekce biomarkeru a sníženo riziko nepravdivých výsledků v důsledku kontaminace vzorku nebo špatného navázání značek na biomarker.

V roce 2014 Konečná a kol. detekovala kvantové tečky na bázi kadmia, tj. CdS a CdTe, metodou LIBS [66]. Kvantové tečky byly buď deponované na polystyrenové mikrotitrační destičce, nebo byly součástí konjugátu s molekulou metalothioneinu sloužící jako biomarker značného počtu nádorových onemocnění. Bylo také provedeno 2D mapování distribuce intenzity kadmia. V roce 2024 byl publikován článek (Safi a kol.) realizující zvýšení detekce biomarkeru kombinací metod Tag-LIBS a NELIBS, tzv. NETag-LIBS [67]. Metoda NELIBS byla již představena v kapitole Aplikace, viz 2.2. Safi a kol. deponoval stříbrné nanočástice na polymery s lanthanoidovými příměsmi (Eu a Yb), které byly konjugované s protilátkami. Díky tomuto kroku byli schopni metodou LIBS detekovat přítomnost protilátek. Dále byl sledován vliv různých koncentrací stříbrných nanočástic na emisní čáry Eu a Yb, ve snaze najít optimální koncentraci pro dosažení co nejvyššího signálu lanthanoidů.

V roce 2019 Motlitbová a kol. demonstrovala použití Tag-LIBS jako detekční metody imunoesejí s lidským sérovým albuminem (HSA z ang. „human serum albumin“) v mikrotitrační destičce prostřednictvím zlatých a stříbrných nanočástic [30]. HSA je jeden z hlavních proteinů obsažených v krvi, přesněji řečeno v krevní plazmě. Jeho úlohou je udržení osmotického tlaku krve v normě, a tím zaručení správné distribuce tekutin mezi tkáněmi a cévami. HSA se také používá jako biomarker pro albuminurii, nemoc, při které bývají nalezeny stopy albuminu v moči. Tato nemoc způsobuje nefunkčnost filtračního systému ledvin. Albuminurie bývá symptomem dalších onemocnění, zejména diabetes mellitus 2. typu [68]. Navazující práce, ve které byly nahrazeny stříbrné a zlaté nanočástice foton-up-

konverzními a bylo dosaženo vyšších detekčních limitů, byla publikována v roce 2024 [27]. Bylo zde provedeno porovnání signálu metodou single- a double-pulse LIBS. V případě použití druhého laserového pulzu ukazovaly poskytnuté výsledky až 30ti-násobné zvýšení citlivosti signálu oproti SP metodě. V roce 2021 Pořízka a kol. popsal Tag-LIBS jako alternativní metodu k imunocytochemii a imunohistochemii pro detekci biomarkeru HER2 [10]. Tento biomarker se používá jako indikátor rakoviny prsu. Jedná se transmembránový receptor tvořící páry s ostatními receptory, což umožňuje přenos signálu dále do buňky. U pacientů s rakovinou prsu je zvýšená koncentrace těchto párových receptorů, což bývá ukazatelem výskytu rostoucích nádorových buněk [69]. K nepřímé detekci buněk HER2 ve formě pelet byly využity foton-upkonverzní nanočástice. Pro porovnání výsledků s imunocytochemií a imunohistochemií byly použity pelety pozitivních buněk HER2 (BT-474) a negativních buněk HER2 (MDA-MB-231), kolem kterých byl vytvořen imunokomplex. BT-474 buňky obsahují HER2 receptory, zatímco u MDA-MB-231 se tyto receptory vyskytují velmi zřídka nebo vůbec.

# 3. Experimentální část

## 3.1. Příprava vzorků

Převážná většina vzorků byla připravena v laboratoři Nanobiotechnologie, CEITEC, MU. Jednalo se o mikrotitrační destičky s roztoky obsahující PSA standard a fosfátový pufr nebo hovězí sérum. Klinické krevní vzorky obsahující PSA skutečných pacientů poskytla Fakultní nemocnice Brno, kde byly referenční koncentrace PSA změřeny pomocí elektrochemiluminiscenčního (ECL) skeneru. Následný seznam chemikálií a materiálů a také postupy příprav jednotlivých vzorků v mikrotitračních destičkách byl poskytnut vědeckou skupinou pracující v laboratoři Nanobiotechnologie, CEITEC, MU.

### 3.1.1. Seznam použitých chemikálií a materiálů

- fetální hovězí sérum (FBS)
- 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidin (TMB)
- PSA standard (ab78528)
- anti-PSA monoklonální protilátka (ab403)
- streptavidin v komplexu s křenuvou peroxidázou (HRP-SA)
- biotinylovaná polyklonální anti-PSA protilátka kozy (BAF1344)
- magnetické částice s navázanými tosylovými skupinami, Tosyl-activated Dynabeads MyOne (průměr 1  $\mu\text{m}$ )
- průhledné polystyrenové mikrotitrační destičky s 96 jamkami, vysoce vazné i ne vazné (96-well MTP, Greiner Bio-One)
- fosfátový pufr (PB; 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; pH 7,4)
- fosfátový pufr s chloridem sodným (PBS; 150 mM NaCl, 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; pH 7,4)
- promývací pufr (WB; 150 mM NaCl, 50 mM Tris, 0,05% Tween 20, 0,05%  $\text{NaN}_3$ ; pH 7,5)
- potahovací pufr (CB; 50 mM  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,05%  $\text{NaN}_3$ ; pH 9,6)
- blokovací pufr (BB; 20% SuperBlock v WB)
- esej pufr (AB; 150 mM NaCl, 50 mM Tris, 1 mM KF, 10% SuperBlock, 0,5% PEG, 0,05%  $\text{NaN}_3$ , 0,05% Tween 20; pH 7,5)
- borátový pufr (100 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; pH 9,5)



### 3.1.2. Postup přípravy vzorků

#### ULISA pro detekci PSA

Pro imunostanovení ULISA byla použita vysoce vazná mikrotitrační destička potažená monoklonální anti-PSA protilátkou (ab403, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  byl obsažen v potahovacím pufru a v každé jamce bylo celkově 100  $\mu\text{L}$  roztoku). Poté byla destička inkubována přes noc v chladícím zařízení při teplotě 4  $^{\circ}\text{C}$ . Následující den byl přidán blokovací pufr (200  $\mu\text{L}/\text{jamka}$ ), aby se zamezilo vytvoření nespecifických vazeb mezi jednotlivými částmi budoucího imunokomplexu. Dále bylo v 50% fetálním hovězím séru v assay pufru provedeno ředění PSA. Byla vytvořena koncentrační řada  $10^{-4}$ – $10^2$   $\text{ng}/\text{mL}$ , kdy z každé koncentrace bylo napipetováno 100  $\mu\text{L}$  do jednotlivých jamek. K roztoku byly doplněny biotinem nakonjugované protilátky v AB (BAF1344, 0,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  v AB, 100  $\mu\text{L}/\text{jamka}$ ). V dalším kroce následovaly streptavidinem nakonjugované foton-upkonverzní nanočástice (6,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  v AB, 100  $\mu\text{L}/\text{jamka}$ ). V neposlední řadě byla destička ponechána k uschnutí při pokojové teplotě. Po každém kroku byla destička čtyřikrát promyta pomocí promývacího pufru, kterého bylo použito 250  $\mu\text{L}/\text{jamka}$ . Obecná inkubační doba mezi jednotlivými kroky, pokud nebylo uvedeno jinak, byla 1 hodina za pokojové teploty a při třepání 300 ot./min.

#### ULISA s magnetickými mikročásticemi (MB-ULISA) pro detekci PSA

Pro immunoesej ULISA s magnetickými mikročásticemi jako pevnou fází byly použity ne vazné mikrotitrační destičky. V první řadě byly připraveny koncentrační řady PSA stejným způsobem jako u immunoeseje ULISA. Dále byly do jednotlivých PSA roztoků o různé koncentraci (450  $\mu\text{L}$ ) přidány anti-PSA monoklonální protilátkou nakonjugované magnetické mikročástice (50  $\mu\text{L}$  MBs a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  celkového roztoku s konjugátem MBs-ab403). Optimální koncentrace magnetických částic byla stanovena jako 10  $\mu\text{L}/\text{jamka}$ . Bylo dosaženo konečného objemu roztoku pro jednotlivou koncentraci analytu, a to 500  $\mu\text{L}$ . Následně bylo z tohoto objemu s konjugátem 100  $\mu\text{L}$  odebráno a napipetováno do 3 jamek mikrotitrační destičky.

Pro MB-ULISA s prekoncentrací vzorku byla opět připravena stejná koncentrační řada PSA (4  $\text{mL}$ ), se kterou bylo smícháno 50  $\mu\text{L}$  konjugátu MBs-ab403 (15  $\mu\text{g}/\text{jamka}$ ). Výsledné roztoky byly napipetovány do 5  $\text{mL}$  zkumavek Eppendorf. Zkumavky byly dále inkubovány v třepačce po dobu 2 hodin (50 ot./min za pokojové teploty). Následně byly zkumavky umístěny do magnetického držáku s magnety na obou stranách po dobu 10 minut. Ve chvíli, kdy se vytvořily shluky magnetických částic na stěnách zkumavek v místě výskytu magnetů, byly objemy roztoků redukovány na 500  $\mu\text{L}$ , a 100  $\mu\text{L}/\text{jamka}$  bylo z každého roztoku dodáno na dna ne vazné mikrotitrační destičky. Při tomto procesu byla destička zároveň pětkrát promyta. Během promývacích cyklů byla destička umístěna na magnetický držák, kde všechny promývací cykly zahrnovaly 3 minuty nečinného stavu, aby se magnetické částice v magnetickém poli ustálily. Následovalo přidání 250  $\mu\text{L}$  promývacího pufru, 2 minuty třepání destičky, 3 minuty opět nečinného stavu. U každé naředěné koncentrace PSA proběhla prekoncentrace ze 4  $\text{mL}$  na 0,5  $\text{mL}$  (prekoncentrační faktor 8).

K roztokům byly doplněny biotinem nakonjugované protilátky v AB (BAF1344, 0,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  v AB, 100  $\mu\text{L}/\text{jamka}$ ). V dalším kroce následovaly streptavidinem nakonjugované upkonverzní nanočástice (6,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  v AB, 100  $\mu\text{L}/\text{jamka}$ ). Aby nastala opětovná suspenze magnetických částic, tak bylo k roztokům na dně jamek napipetováno 50  $\mu\text{L}$  AB. Následovalo zaschnutí roztoků na dně jednotlivých jamek za pokojové teploty při

### 3.2. PARAMETRY MĚŘENÍ

současném třepání 1050 ot./min. Po každém kroku byla destička čtyřikrát promyta pomocí promývacího pufru, kterého bylo použito 250  $\mu\text{L}$ /jamka. Obecná inkubační doba mezi jednotlivými kroky, pokud nebylo uvedeno jinak, byla 1 hodina za pokojové teploty a při třepání 1000 ot./min [39].

#### Upkonverzní skenování

Upkonverzní skenování imunoeseje ULISA bylo provedeno v laboratoři Nanobiotechnologie, CEITEC, MU. Pro měření frekvenční upkonverze byly použity následující parametry: excitační laser o vlnové délce 976 nm, excitační filtr propouštějící vlnovou délku  $976 \pm 60$  nm, emisní filtr  $540 \pm 30$  nm a dichroické zrcadlo (excitace 950–1000 nm, emise 500–720 nm). Průměr svazku excitačního zdroje byl 4 mm. V případě ULISA imunostanovení byl na dně jamek mikrotitrační destičky skenován rastr (matice) o velikosti  $8 \times 8$  (64 bodů). Byly vyloučeny hodnoty z I. a IV. kvartilu, což znamená, že 25 % nejnižších a 25 % nejvyšších hodnot bylo odstraněno. Průměrná hodnota signálu z každé jamky byla tedy stanovena ze 32 naměřených hodnot (50 % původních dat). Pro MB-ULISA imunostanovení byl skenován rastr  $6 \times 6$  (36 bodů). Opět byly vyloučeny hodnoty z I. a IV. kvartilu a průměrná hodnota signálu z každé jamky byla stanovena z 18 naměřených hodnot (50 % původních dat). Celkový průměrný signál pro každou koncentraci byl určen ze 3 jamek mikrotitrační destičky, přičemž byla z těchto tří průměrných hodnot stanovena i směrodatná odchylka.

### 3.2. Parametry měření

LIBS měření probíhalo na experimentální sestavě LIBS Lab-Trace 2 (skupina Laserové Spektroskopie, RG1-6 Charakterizace materiálů a pokročilé povlaky, CEITEC VUT) skládající se ze dvou nanosekundových laserů, a to Nd:YAG 532 nm s opakovací frekvencí 20 Hz, délkou pulzu 8 ns, maximální energií pulzu 175 mJ (Solar Laser Systems, Bělorusko) a Nd:YAG 1064 nm s opakovací frekvencí 10 Hz, délkou pulzu 4,8 ns, maximální energií pulzu 550 mJ (Quantel laser, Francie). Lasery byly uspořádány kolineárně, přičemž 1. laserový pulz s vlnovou délkou 532 nm ablatoval materiál a 2. laserový pulz o vlnové délce 1064 nm prodloužil excitační stav mikroplazmatu. Kolineární uspořádání laserů bylo zvoleno kvůli umístění vzorku na dně jamky mikrotitrační destičky. V případě ortogonálního uspořádání by totiž laserový pulz nemohl proniknout ke vzorku. K detekci emise záření byl využit spektrometr Avantes s velikostí štěrbiny 25  $\mu\text{m}$  a rozsahem 245–407 nm. Použité parametry měření jsou uvedeny v následující tabulce 3.1:

Tabulka 3.1: Parametry měření.

	DP-LIBS	SP-LIBS
Gate delay ( $\mu\text{s}$ )	0,5	
Integrační čas (gate width) ( $\mu\text{s}$ )	50	
Zpoždění mezi pulzy ( $\mu\text{s}$ )	1,0	
Energie pulzu laseru 532 nm (mJ)	30	30
Energie pulzu laseru 1064 nm (mJ)	60	
Rastr	10×10	
Krok mapování ( $\mu\text{m}$ )	400×400	

Parametry měření byly nastaveny v softwaru LIBS Navigator (CEITEC VUT, Česká republika). V každé jamce destičky byl vytvořen rastr o velikosti 10×10, kde do každého bodu byl veden pouze jeden pulz. Celkově bylo tedy z každé jamky získáno 100 spekter. U experimentu s vnitřní standardizací byly koncentrace po šesti opakováních a u kalibrační křivky MB-ULISA měla nulová koncentrace PSA devět opakování. Koncentrace v ostatních experimentech byly změřeny ve třech opakováních. Měření probíhalo za normálních podmínek okolní teploty a tlaku vzduchu.

V Tab. 3.2 je znázorněno rozvržení mikrotitrační destičky, která byla použita pro sestavení kalibrační křivky koncentrací PSA imunoeseje MB-ULISA, a byla změřena metodou LIBS. Veškeré údaje v tabulce jsou koncentrace PSA (ng/mL), nulovou koncentraci PSA představuje symbol blanku  $\emptyset$ . Toto schéma slouží jako ukázka mikrotitrační destičky s napipetovanými vzorky. Pro každé měření se uspořádání i rozsah koncentrací na destičce mírně lišily.

Tabulka 3.2: Rozvržení koncentrační řady PSA v mikrotitrační destičce pro metodu LIBS.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
<b>B</b>				$10^1$	$10^1$	$10^1$						
<b>C</b>				$10^0$	$10^0$	$10^0$						
<b>D</b>				$10^{-1}$	$10^{-1}$	$10^{-1}$						
<b>E</b>				$10^{-2}$	$10^{-2}$	$10^{-2}$						
<b>F</b>				$10^{-3}$	$10^{-3}$	$10^{-3}$						
<b>G</b>				$10^{-4}$	$10^{-4}$	$10^{-4}$						
<b>H</b>												

### 3.3. Vyhodnocení dat

#### 3.3.1. Kritéria výběru spektrální čáry

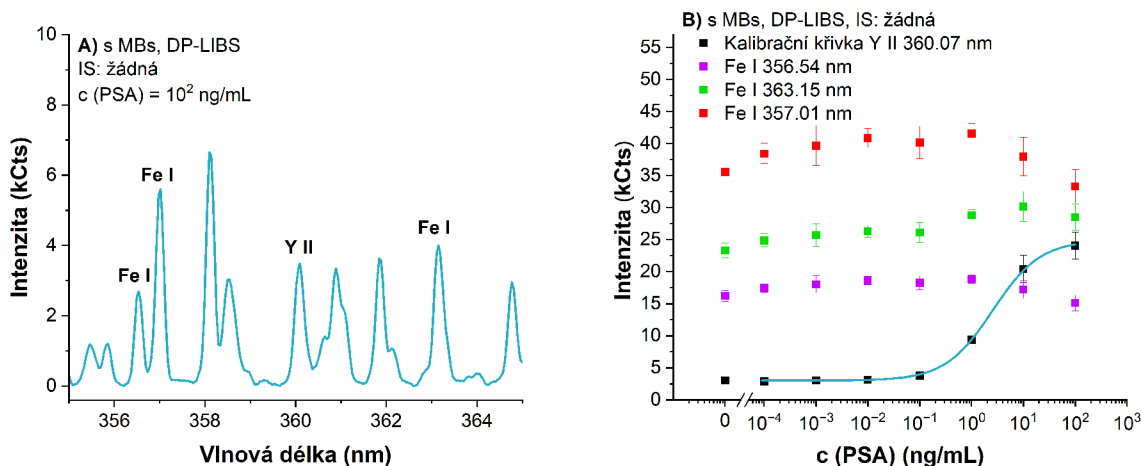
Získaná data byla zpracována v programu LIBSAnalyzer (CEITEC VUT, Česká republika) a OriginPro 2023 (OriginLab, USA). Pro sledování nanočásticových značek byla vybrána spektrální čára yttria a pro magnetické mikročástice spektrální čára železa. Některé z potenciálně vhodných čar jsou uvedeny v Tabulce 3.3. Římské číslice u názvu čar odkazují na stupeň ionizace, kde I znamená neutrální atom, zatímco II značí první ionizovaný stav. Spektrální čáry byly vyhledány v NIST Atomic Spectra Database [70]. U čar byly posuzovány dva hlavní parametry:  $A_{ki}$  Einsteinův koeficient, který udává pravděpodobnost spontánní emise fotonu při přechodu atomu z horní energetické hladiny  $E_k$  na dolní hladinu  $E_i$ , a hodnoty těchto diskretních hladin energií  $E_i$ ,  $E_k$ . Předpokladem pro to, aby emisní čára dosahovala silné intenzity, je vysoká hodnota  $A_{ki}$ , a také co nejmenší rozdíl mezi hladinami  $E_i$  a  $E_k$ .

Tabulka 3.3: Posuzované spektrální čáry yttria a železa.

Spektrální čára	$\lambda$ (nm)	$A_{ki}$ (1/s)	$E_i$ (eV)	$E_k$ (eV)
Y II	360,07	$1,38 \cdot 10^8$	0,18	3,62
Y II	371,03	$1,54 \cdot 10^8$	0,18	3,52
Y II	377,43	$1,10 \cdot 10^8$	0,13	3,41
Fe I	356,54	$4,29 \cdot 10^7$	0,96	4,43
Fe I	357,01	$6,76 \cdot 10^7$	0,91	4,39
Fe I	363,15	$5,17 \cdot 10^7$	0,96	4,37

Jako první byla vyloučena emisní čára Y II 377,43 nm pro svou nejnižší intenzitu ve všech naměřených spektrech a Einsteinův koeficient. Dále bylo v NIST databázi vyhledáno, že u Y II 371,03 nm může docházet k překryvu s Fe I 370,92 nm, která se v blízkosti vlnové délky této yttriové čáry nachází. U Y II 360,07 nm nedochází k překryvu se železnými čarami, a tak byla vybrána jako optimální zástupce sledování intenzit foton-upkonverzních značek pro různé koncentrace PSA. Interval vlnové délky spektrální čáry Y II 360,07 nm byl zvolen 359,90–360,38 nm s pozadím v rozsahu 359,25–359,83 nm.

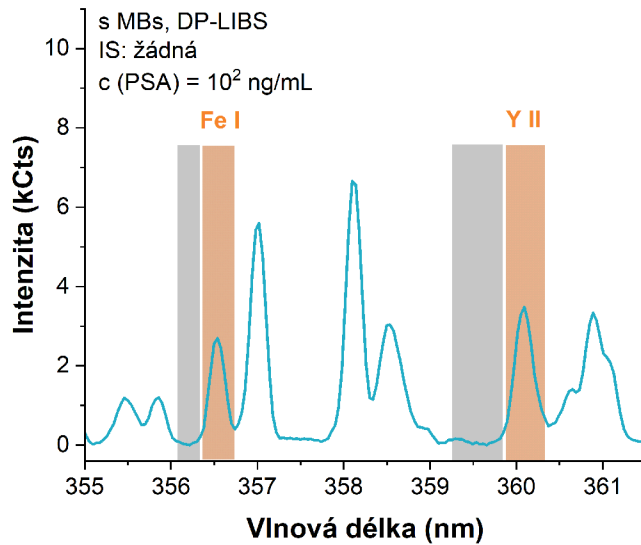
Železné čáry byly vybírány tak, aby se svými parametry, uvedenými v Tab. 3.3, blížily co nejvíce parametrům Y II 360,07 nm. Pouze na základě údajů z Tab. 3.3 ovšem nebylo možné posoudit, která železná čára je nejvhodnější. Bylo provedeno obdobné porovnání, jestli dochází k překryvu více čar. Intenzity vybraných železných čar jsou znázorněny ve spektru na Obr. 3.1A). Do grafu 3.1B) byla vynesena závislost změřeného signálu železných čar na koncentraci PSA. Na pozadí grafu je také kalibrační křivka pro porovnání intenzity jednotlivých Fe čar s intenzitou Y II 360,07 nm. Ve všech imunokomplexech by měla být přibližně stejná koncentrace magnetických částic a měla by se měnit pouze koncentrace analytu. Závislost intenzity železných čar tedy nezávisí na koncentraci PSA a měla by být konstantní.



Obrázek 3.1: **A)** Emisní spektrum pro kalibrační křivku s magnetickými mikročasticemi a s vyznačenými spektrálními čarami: Y II 360,07 nm, Fe I 356,54 nm, Fe I 357,01 nm a Fe I 363,15 nm. **B)** Kalibrační křivka Y II 360,07 nm se závislostí intenzity železných čar Fe I 356,54 nm, Fe I 357,01 nm a Fe I 363,15 nm na koncentraci PSA. V obou případech byla spektra s MBs vyhodnocena pro koncentraci PSA =  $10^2$  ng/mL, metodou DP, bez vnitřní standardizace.

Z grafu 3.1B) lze usoudit, že u Fe I 363,15 nm dochází pro vyšší koncentrace PSA k nárůstu intenzity. O tento jev se s největší pravděpodobností zasloužil překryv s dalšími spektrálními čarami. Konstantní závislost byla nejvíce patrná u Fe I 356,54 nm. Obecně lze říci, že u Fe I 357,01 nm dochází k větším fluktuacím intenzity, neboť je zde daleko vyšší měřitelný signál. Navíc u její intenzity ani nejde vyloučit možný příspěvek od jiných spektrálních čar. Nachází se v její blízkosti např. spektrální čára Y I 357,14 nm. Jako optimální čára byla zvolena Fe I 356,54 nm, neboť se v okolí této vlnové délky nenachází žádná yttriová čára (ověřeno v NIST Atomic Spectra Database, [70]). Na základě těchto výsledků byla pro detekci magnetických mikročastic určena emisní čára železa Fe I 356,54 nm (356,40–356,75 nm) s pozadím v rozsahu 356,05–356,35 nm. Tato železná čára společně s Y II 360,07 nm byla sledována ve všech následujících experimentech (Obr. 3.2).

### 3.3. VYHODNOCENÍ DAT



Obrázek 3.2: Vybrané emisní čáry Fe I 356,54 nm a Y II 360,07 nm (oranžová) s jejich pozadím (šedá).

#### 3.3.2. Parametry vyhodnocení

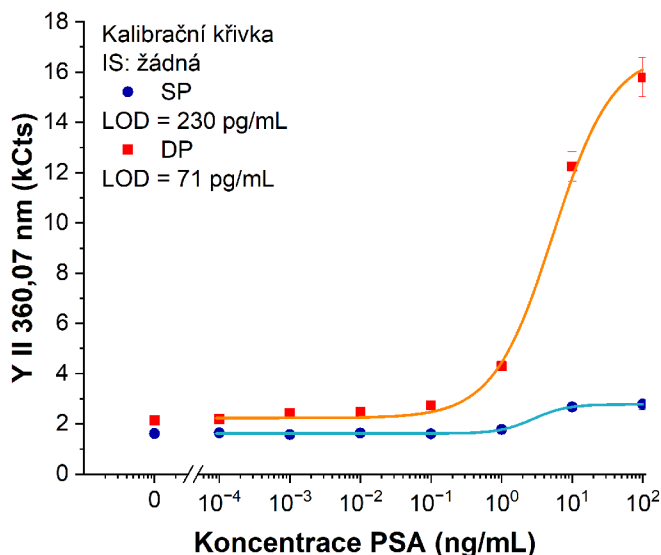
Nejprve byl proveden odečet pozadí naměřených dat s použitím algoritmu pohyblivého minima [71]. Hodnoty minimálního a vyhlazovacího okna byly nastaveny na 40 a 80. Intenzita emisní čáry byla stanovena jako suma jednotlivých příspěvků intenzit přes stanovený interval vlnových délek, na kterém se spektrální čára vyskytovala [10]. V následující fázi vyhodnocení byla vyloučena data z prvního a čtvrtého kvartilu, tzn. 25 % minimálních i maximálních hodnot. Z původně 100 naměřených spekter z každé jamky tak bylo získáno po filtraci 50 hodnot, ze kterých byla stanovena průměrná hodnota intenzity pro konkrétní sledované spektrální čáry. Pro vyloučení odlehlých hodnot u stejných koncentrací byl následně proveden Dean-Dixonův test na hladině spolehlivosti 90 % [72]. V případě vnitřní standardizace byl test odlehlých hodnot proveden až pro výsledné hodnoty po dělení Y čáry Fe čarou pro každou jamku zvlášť. Po uskutečnění testu odlehlých hodnot byl v programu OriginPro 2023 (OriginLab, USA) z hodnot intenzit pro každou koncentraci spočítán průměr a směrodatná odchylka. Dále byl proveden fit upravených dat k sestavení kalibrační křivky. K tomu bylo potřeba převést koncentrace PSA do logaritmického měřítká se základem 10. K fitování byla použita logistická funkce se 4 parametry [27]:

$$Y = \frac{Y_{bgr} - Y_{max}}{1 + \left(\frac{C_{PSA}}{EC_{50}}\right)^s} + Y_{max}, \quad (3.1)$$

kde  $Y$  je změřený LIBS signál,  $Y_{max}$  je maximum sigmoidní křivky,  $Y_{bgr}$  je naopak minimum sigmoidní křivky odpovídající šumu,  $C_{PSA}$  je koncentrace biomarkeru PSA,  $EC_{50}$  je polovina maximální účinné koncentrace a  $s$  je směrnice přímky procházející inflexním bodem. Limit detekce (LOD) byl dopočítán z logistické funkce jako podíl trojnásobné hodnoty směrodatné odchylky blanku a směrnice lineární části logistické funkce.

### 3.3.3. Porovnání SP a DP

Prvním experimentem bylo porovnání signálu spektrální čáry Y II 360,07 nm získané jednopulzní (SP) a dvoupulzní (DP) metodou. Toto srovnání sloužilo především k zjištění, která metoda maximalizuje intenzitu signálu a sníží LOD PSA. Výsledkem měření byly kalibrační křivky.



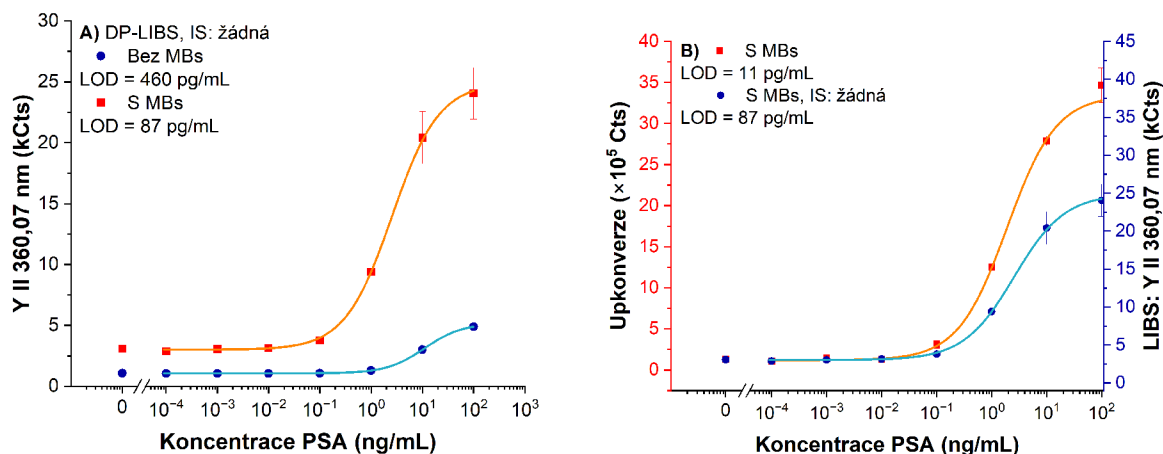
Obrázek 3.3: Kalibrační křivky single-pulse měření (SP) a double-pulse (DP) bez vnitřní standardizace.

Z grafu 3.3 jednoznačně vyplývá skutečnost, že díky použití DP nastalo více než pětinašobné zvýšení intenzity spektrální čáry. Také došlo k trojnásobnému poklesu limitu detekce PSA analytu (LOD-DP = 71 pg/mL) oproti SP metodě (LOD-SP = 230 pg/mL). Na základě splnění požadovaných kritérií, jako je výrazné zvýšení signálu a nízký LOD, byla všechna následující měření provedena dvoupulzní metodou.

### 3.3. VYHODNOCENÍ DAT

#### 3.3.4. Porovnání ULISA a MB-ULISA

Při použití MB-ULISA s detekcí upkonverzním skenováním bylo pozorováno zvýšení intenzity signálu a snížení limitu detekce. Pro potvrzení u imunoeseje s LIBS detekcí byly sestrojeny kalibrační křivky MB-ULISA, kde byla jako podkladová pevná fáze použita magnetická mikročástice, a ULISA, kde byl imunokomplex vázán na mikrotitrační destičce. Kalibrační křivky byly konkrétně sestrojeny z naměřených intenzit koncentrační řady PSA standardu v 50% hovězím séru. Nejdříve byly změřeny destičky upkonverzním skenerem a poté DP-LIBS metodou (Obr. 3.4).



Obrázek 3.4: **A)** Porovnání kalibračních křivek pro MB-ULISA a ULISA, změřeno metodu DP-LIBS, bez vnitřní standardizace. **B)** Porovnání kalibračních křivek pro MB-ULISA, měřené metodu DP-LIBS a upkonverzním skenováním.

Obr. 3.4A) potvrzuje tvrzení publikované ve článku z roku 2022 (Makhneva, [39]), že magnetické mikročástice zesilují detekovaný signál. V případě DP-LIBS detekce došlo až téměř k pětinasobnému nárůstu intenzity emisních spekter a také bylo pozorováno, že nastalo více než pětinasobné snížení limitu detekce, tj.  $\text{LOD-MB-ULISA} = 87 \text{ pg/mL}$  a  $\text{LOD-ULISA} = 460 \text{ pg/mL}$ . Výsledky získané dvoupulzní metodou u MB-ULISA byly také porovnány s výsledky z upkonverzního skenování, kde bylo dosaženo limitu detekce PSA 11 pg/mL (Obr. 3.4B)).

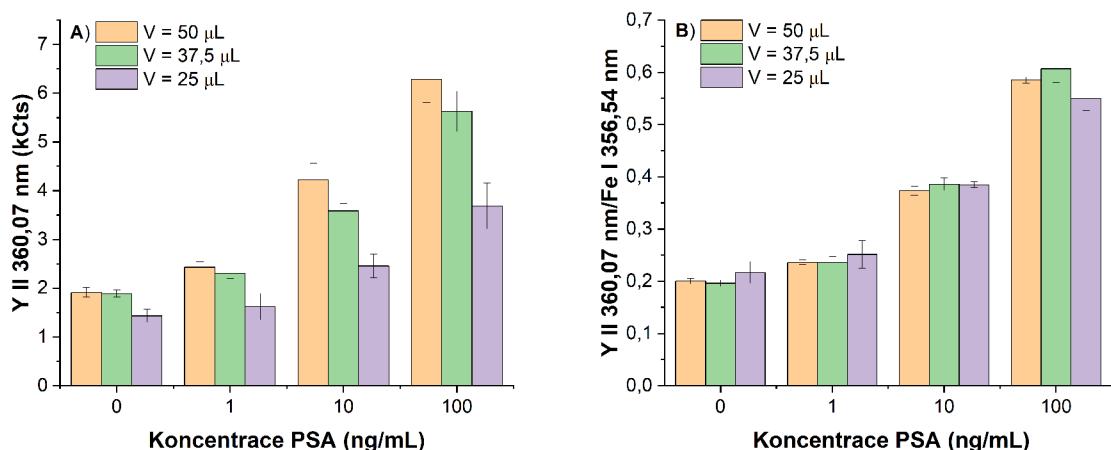
#### Vnitřní standardizace

Princip vnitřní standardizace byl nastíněn již v předchozích kapitolách. Při laserové ablaci je signál získáván z celé oblasti kráteru, nejenom z nanočásticové značky. Největší komponentou celého imunokomplexu je magnetická mikročástice (průměr 1  $\mu\text{m}$ ), tudíž majordním prvkem ve spektrálním obrazu je železo. Vystává tak předpoklad využití simultánní detekce železné čáry zastupující magnetické mikročástice a čáry značky pro vnitřní standardizaci dat a potlačení tak signálu pozadí. Zjednodušeně se jedná o podělení intenzity yttriové značky intenzitou železné mikročástice. Jak bylo dokázáno dříve, u železné čáry Fe I 356,54 nm je její intenzita nezávislá na koncentraci analytu (3.1B)). Podělením intenzit yttriové značky a železné mikročástice se zachová skutečná koncentrace PSA a nedochází k mylné interpretaci výsledků měření. Za účelem potvrzení této domněnky byl proveden experiment, který simuloval titrační chybu. Konkrétně byla v mikrotitrační destičce provedena změna při posledním kroku přidání AB pro resuspenzi magnetických



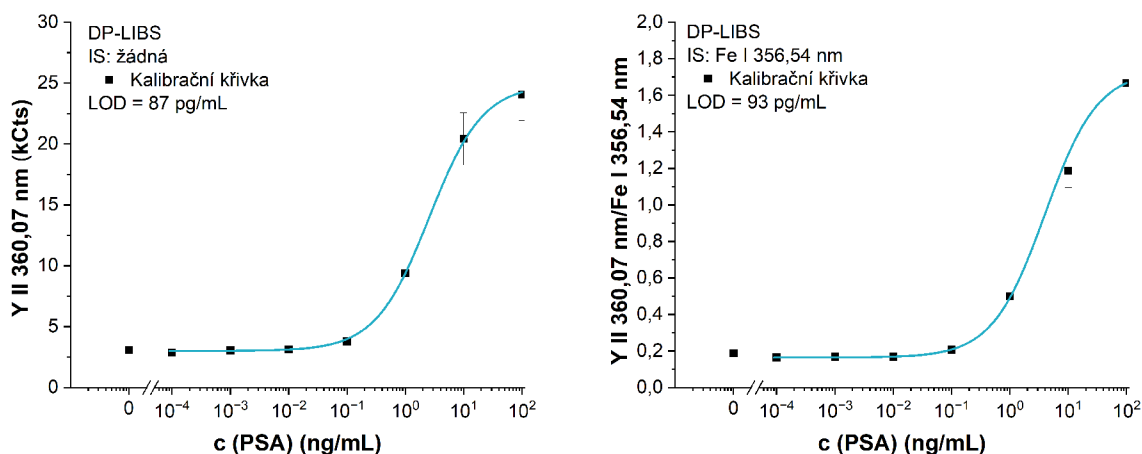
### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

částic. Po resuspenzi byl ponechán jeden správný vzorek, u kterého bylo použito 50  $\mu\text{L}$  AB, u druhého vzorku byla odebrána 1/4 objemu, a u třetího 1/2 objemu z jamek mikrotitrační destičky (výsledné objemy činily 50, 37,5 a 25  $\mu\text{L}$ ). Poté byla opět destička ponechána k zaschnutí. S redukcujícím se objemem se v roztoku nacházelo také menší množství foton-upkonverzních značek, a byl detekován nižší signál, jak lze vidět na Obr. 3.5A). V případě snížení signálu v důsledku fluktuací, např. vlivem titrační chyby, dochází nejen k poklesu detekovaného signálu ze značky, ale i k poklesu signálu magnetické částice, neboť obojí je součástí imunokomplexu. Při podělení intenzit yttriové čáry železnou čarou dochází tedy k vyrovnání hodnot u jednotlivých vzorků (Obr. 3.5B)).



Obrázek 3.5: Postupné odebírání objemu roztoku za účelem simulace titrační chyby. **A)** Naměřená intenzita Y II 360,07 nm v závislosti na vybraných koncentracích PSA, pro objemy AB: 50, 37,5 a 25  $\mu\text{L}$ . **B)** Závislost intenzity Y II 360,07 nm s vnitřní standardizací na Fe I 356,54 nm na koncentraci PSA.

Stejný postup s vnitřní standardizací byl uplatněn i u kalibrační křivky pro imunostanovení MB-ULISA. Výsledek porovnání s křivkou bez vnitřní standardizace je zobrazen na Obr. 3.6, který lze interpretovat tak, že bylo dosaženo srovnatelného limitu detekce PSA s kalibrační křivkou bez vnitřní standardizace (LOD = 93  $\text{pg/mL}$ ).

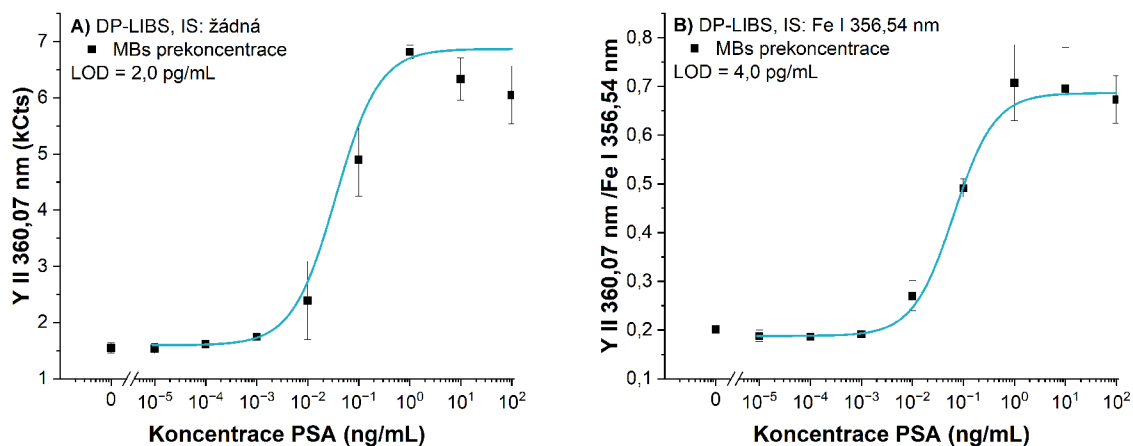


Obrázek 3.6: **A)** Kalibrační křivka MB-ULISA s DP-LIBS detekcí, bez vnitřní standardizace. **B)** Kalibrační křivka MB-ULISA s DP-LIBS detekcí s vnitřní standardizací: Fe I 356,54 nm.

### 3.3. VYHODNOCENÍ DAT

#### 3.3.5. Prekoncentrace PSA

Magnetické částice umožňují také prekoncentraci analytu. V průběhu přípravy vzorku, popsané v kapitole 3.1.2, byla provedena redukce objemu roztoku bez ztráty imunokomplexu vnějším magnetickým polem. V tomto případě byl použit jiný rozsah koncentrační řady biomarkeru PSA ( $10^{-5}$ – $10^2$  ng/mL, včetně blanku). Výsledkem měření byly opět kalibrační křivky, které jsou znázorněny na Obr. 3.7.

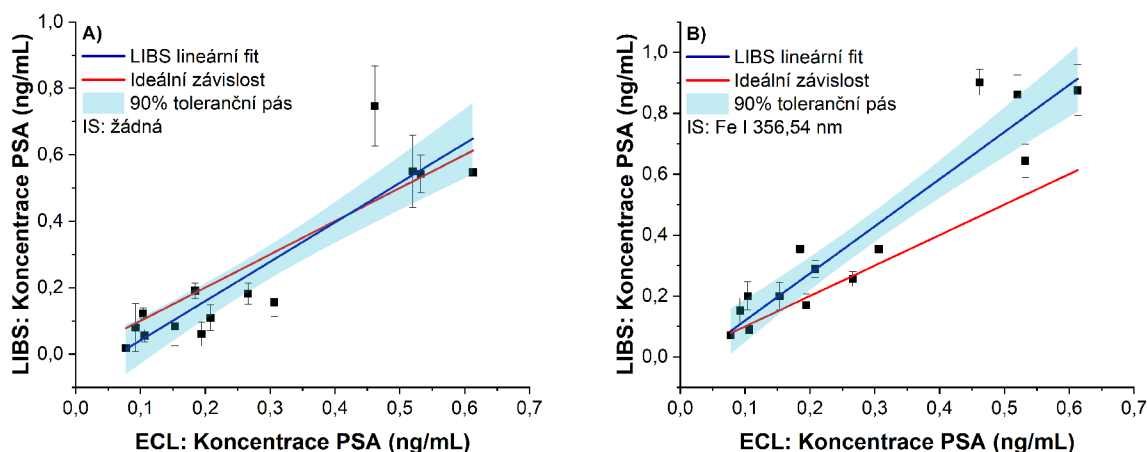


Obrázek 3.7: **A)** Prekoncentrace analytu PSA, MB-ULISA s DP-LIBS detekcí bez vnitřní standardizace. **B)** Prekoncentrace analytu PSA, MB-ULISA s DP-LIBS detekcí s vnitřní standardizací: Fe I 356,54 nm.

Ze všech provedených experimentů bylo dosaženo nejnižšího limitu detekce PSA u experimentu s prekoncentrací bez použití vnitřní standardizace, a to 2,0 pg/mL (Obr. 3.7A)). Nicméně lze na této kalibrační křivce u koncentrací  $10^0$  ng/mL pozorovat výkyv intenzity, který je pomocí vnitřní standardizace kompenzován (Obr. 3.7B)). Také hodnota limitu detekce zůstala řádově zachována (4,0 pg/mL).

### 3.3.6. Klinické vzorky

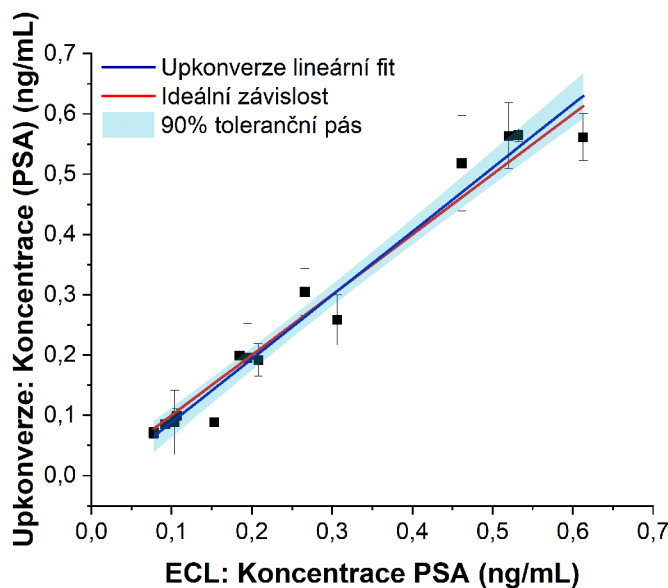
Pro výpočet koncentrace biomarkeru PSA obsaženého v klinických vzorcích byly využity kalibrační křivky (Obr. 3.6). Získaná intenzita ze změřených vzorků byla dosazena do kalibrační křivky, ke které byla podle y-ové hodnoty, představující intenzitu, přiřazena odpovídající koncentrace na x-ové ose. Data byla vyhodnocena jak bez vnitřní standardizace (Obr. 3.6A)), tak s vnitřní standardizací (Obr. 3.6B)). Koncentrace získané metodou DP-LIBS byly porovnány s referenčními koncentracemi získanými metodou ECL (Obr. 3.8).



Obrázek 3.8: Lineární závislosti mezi koncentracemi získanými metodami ECL a: **A)** DP-LIBS za využití kalibrační křivky bez vnitřní standardizace,  $R^2 = 0,83$ , **B)** DP-LIBS za využití kalibrační křivky s vnitřní standardizací,  $R^2 = 0,89$ . Vyznačené lineární regrese jsou ohraničeny 90% tolerančním pásem Gaussova rozdělení (tyrkysová). Grafy jsou také doplněny o ideální závislost, tzn. shodující se koncentrace s ECL (červená).

U grafu 3.8A), kde nebyla použita úprava dat ve formě vnitřní standardizace, se lineární křivka proložená dopočítanými koncentracemi více blíží ideální závislosti pro referenční koncentrace. Nicméně v rámci 90% tolerančního pásu má tato lineární regrese nižší koeficient determinace  $R^2 = 0,83$ , a také byly pozorovány větší směrodatné odchylky. V případě grafu 3.8B), s použitou vnitřní standardizací, byly velikosti směrodatných odchylek redukovány, a také nastalo zvýšení koeficientu determinace ( $R^2 = 0,89$ ). Toto zlepšení bylo ovšem na úkor většího odklonu LIBS koncentrací od ideální závislosti. Pro úplné srovnání detekčních metod byly referenční ECL koncentrace porovnány také s koncentracemi získanými upkonverzním skenováním (Obr. 3.9). V tomto případě bylo dosaženo největší shody s ideální závislosti, s koeficientem determinace  $R^2 = 0,97$ .

### 3.3. VYHODNOCENÍ DAT

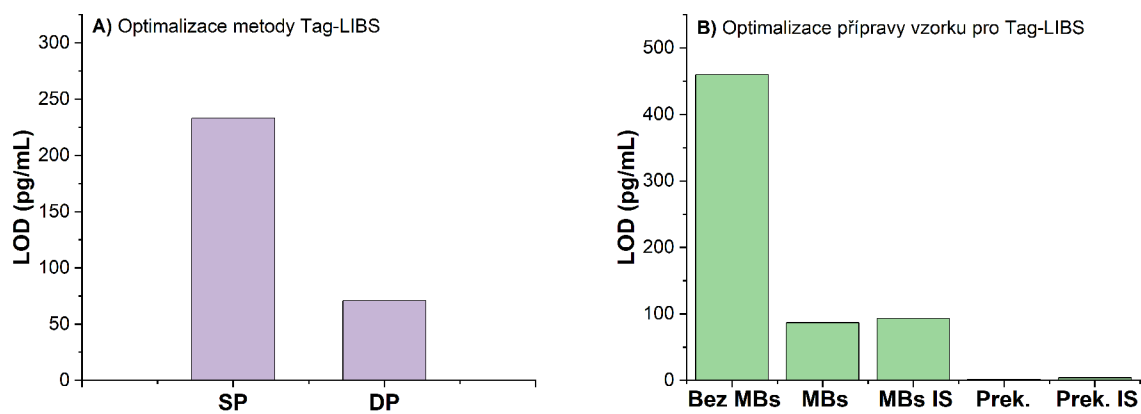


Obrázek 3.9: Lineární závislost mezi koncentracemi získanými metodami ECL a upkonverzním skenováním,  $R^2 = 0,97$ . Vyznačené lineární regrese jsou ohraničeny 90% tolerančním pásem Gaussova rozdělení (tyrkysová). Grafy jsou také doplněny o ideální závislost, tzn. shodující se koncentrace s ECL (červená).

#### 3.3.7. Srovnání limitů detekce

Při posuzování experimentálních dat byl klíčovým faktorem limit detekce PSA, který spolu s naměřenou intenzitou sloužil pro porovnání DP-LIBS detekce s jinými detekčními technikami. V této části jsou uvedena srovnání jednotlivých limitů detekce za účelem demonstrace optimalizačních procesů metody Tag-LIBS, které byly v průběhu bakalářské práce provedeny. Výsledky z porovnání jednopulzního a dvoupulzního uspořádání jsou zobrazeny na Obr. 3.10A), kde je patrné, že použitím DP pro detekci biomarkeru byla výrazně zvýšena citlivost metody Tag-LIBS. Porovnání na Obr. 3.10B) představuje optimalizaci přípravy vzorku, který je následně snadno detekován metodou Tag-LIBS. Je zde ukázáno, že použitím imunoeseje MB-ULISA bylo možné detekovat biomarker PSA při daleko nižších koncentracích, než při použití standardního imunostanovení ULISA. Také při využití železných čar, reprezentující magnetické mikročástice, pro vnitřní standardizaci nedochází ke snížení citlivosti metody. Nejnižšího limitu detekce PSA bylo dosaženo jeho prekoncentrací, konkrétně bez uplatnění vnitřní standardizace.

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST



Obrázek 3.10: **A)** Optimalizace metody Tag-LIBS v závislosti na limitu detekce PSA. **B)** Optimalizace přípravy vzorku pro metodu Tag-LIBS.

## 4. Závěr

Cílem této bakalářské práce byla detekce biomarkeru rakoviny prostaty PSA, která byla provedena prostřednictvím foton-upkonverzních nanočástic metodou Tag-LIBS. Jedná se o využití spektroskopie laserem buzeného plazmatu jako detekční metody pro imunoeseje. V této práci byl Tag-LIBS použit jako detekční metoda imunoeseje ULISA s podkladovou fází ve formě magnetických mikročástic.

Nejprve bylo provedeno porovnání jednopulzního a dvoupulzního kolineárního uspořádání metody Tag-LIBS. Pro jednopulzní techniku byl použit laser o vlnové délce 532 nm. U dvoupulzní techniky byl první použit 532nm laser a se zpožděním 1  $\mu$ s byl vystřelen druhý laserový pulz o vlnové délce 1064 nm. Jako nejcitlivější se ukázalo dvoupulzní uspořádání s přibližně pětinasobně vyšší intenzitou a trojnásobně nižším limitem detekce PSA. Všechny další experimenty byly následně měřeny pouze dvoupulzním uspořádáním.

Dále bylo provedeno srovnání imunoeseje MB-ULISA, kde byla jako podkladová fáze použita magnetická mikročástice, a ULISA na mikrotitrační destičce. Bylo potvrzeno, že magnetické mikročástice zesilují detekovaný signál. V případě MB-ULISA došlo až téměř k pětinasobnému nárůstu intenzity emisních spekter. Také se ukázalo, že nastalo více než pětinasobné snížení limitu detekce PSA (87 pg/mL) vůči standardní imunoeseji ULISA (460 pg/mL). Výsledky získané dvoupulzní metodou u MB-ULISA byly také porovnány s výsledky z upkonverzního skenování, které poskytla laboratoř Nanobiotechnologie, CE-ITEC, MU, kde bylo dosaženo limitu detekce 11 pg/mL.

Bylo uskutečněno současné sledování emisních čar yttria Y II 360,07 nm, zastupující foton-upkonverzní značky, a železa Fe I 356,54 nm, reprezentující magnetické mikročástice. Jejich simultánní detekce byla využita pro vnitřní standardizaci dat a potlačení signálu pozadí. Zjednodušeně se jednalo o podělení intenzity spektrálních čar Y II 360,07 nm a Fe I 356,54 nm. Úspěšnost vnitřní standardizace byla potvrzena experimentem, který simuloval titrační chybu.

Součástí práce byl také experiment s prekoncentrací analytu. Díky magnetickým mikročásticím byla umožněna redukce objemu roztoku bez ztráty analytu vnějším magnetickým polem. Docházelo tak k umělému navýšení koncentrace PSA ve vzorku. Tento vzorek byl pro LIBS nejsnadněji detekovatelný, a bylo dosaženo nejnižšího limitu detekce, a to 2,0 pg/mL. Na experimentální data byla také aplikována vnitřní standardizace a bylo dosaženo srovnatelného výsledku 4,0 pg/mL.

Získané poznatky byly aplikovány na klinické vzorky pacientů, které, spolu s referenčními koncentracemi PSA získané elektrochemiluminiscencí, poskytla Fakultní nemocnice Brno. Koncentrace PSA byly dopočítány z kalibračních křivek změřené metodou Tag-LIBS a byly porovnány s referenčními hodnotami. Porovnání s referenčními hodnotami bylo provedeno také pro výsledky z upkonverzního skenování. Metoda Tag-LIBS s dvoupulzním uspořádáním, s vnitřní standardizací i bez ní, se ukázala být dostatečně citlivá v porovnání s jinými imunochemickými metodami, které se k detekci PSA běžně používají.

Byla ověřena možnost souběžné detekce foton-upkonverzních značek a magnetických mikročástic, což může být základem pro budoucí simultánní analýzy. Záměrem do budoucna je prostřednictvím Tag-LIBS provádět současné detekci více různých značek pro stanovení biomarkeru.

# Literatura

- [1] Cancer, 2022. Online. WHO. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. [cit. 2024-02-18].
- [2] Fundamentals of Photonics, Part II, 2019. Online. 3rd edition. Wiley. ISBN 978-1-119-50687-4. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/332447798\\_Fundamentals\\_of\\_Photonics\\_3rd\\_Edition/citation/download](https://www.researchgate.net/publication/332447798_Fundamentals_of_Photonics_3rd_Edition/citation/download). [cit. 2024-02-24].
- [3] US Patent Application for MONO- AND MULTI-ELEMENT CODED LIBS ASSAYS AND METHODS Patent Application (Application #20110171636), 2011. Online. JUSTIA Patents. Dostupné z: <https://patents.justia.com/patent/20110171636>. [cit. 2024-02-18].
- [4] MARKUSHIN, Y.; ACHILEFU, Samuel; RAGHAVACHARI, Ramesh; MELIKECHI, N.; MARCANO O., A. et al., 2009. LIBS-based multi-element coded assay for ovarian cancer application. Online. S. 1-6. Dostupné z: <https://doi.org/10.1117/12.810247>. [cit. 2024-02-24].
- [5] GAUDIUSO, Rosalba; MELIKECHI, Nouredine; ABDEL-SALAM, Zienab A.; HARITH, Mohamed A.; PALLESCI, Vincenzo et al., 2019. Laser-induced breakdown spectroscopy for human and animal health: A review. Online. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. Roč. 152, s. 123-148. ISSN 05848547. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.sab.2018.11.006>. [cit. 2024-02-24].
- [6] NOLL, Reinhard, 2012. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy Fundamentals and Applications. Online. Springer. ISBN 978-3-642-20668-9. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-20668-9>. [cit. 2024-02-24].
- [7] CHICHKOV, B. N.; MOMMA, C.; NOLTE, S.; ALVENSLEBEN, F. a TÜNNERMANN, A., 1996. Femtosecond, picosecond and nanosecond laser ablation of solids. Online. Applied Physics A. Roč. 63, č. 2, s. 109-115. ISSN 0947-8396. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF01567637>. [cit. 2024-04-26].
- [8] RUSSO, Richard E.; MAO, X.L.; YOO, J. a GONZALEZ, J.J., 2007. Laser ablation. Online. In: Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. 2. dopl. vyd. Elsevier, s. 41-70. ISBN 9780128188293. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818829-3.00003-4>. [cit. 2024-04-27].
- [9] ČTVRTNÍČKOVÁ, T.; FORTES, F. J.; CABALÍN, L. M.; KANICKÝ, V. a LASERNA, J. J., 2009. Depth profiles of ceramic tiles by using orthogonal double-pulse laser induced breakdown spectrometry. Online. Surface and Interface Analysis. Roč. 41, č. 9, s. 714-719. ISSN 0142-2421. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/sia.3077>. [cit. 2024-03-23].
- [10] POŘÍZKA, Pavel; VYTISKOVÁ, Karolína; OBOŘILOVÁ, Radka; PASTUCHA, Matěj; GÁBRIŠ, Ivo et al., 2021. Laser-induced breakdown spectroscopy as a readout method for immunocytochemistry with upconversion nanoparticles. Online. Microchimica Acta. Roč. 188, č. 5, s. 1-10. ISSN 0026-3672. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00604-021-04816-y>. [cit. 2024-03-29].

## LITERATURA

- [11] MATEO, M. P.; VADILLO, J. M. a LASERNA, J. J., 2001. Irradiance-dependent depth profiling of layered materials using laser-induced plasma spectrometry. Online. Journal of Analytical Atomic Spectrometry. Roč. 16, č. 11, s. 1317-1321. ISSN 02679477. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/b104440k>. [cit. 2024-03-24].
- [12] GILON, N.; EL-HADDAD, J.; STANKOVA, A.; LEI, W.; MA, Q. et al., 2011. A matrix effect and accuracy evaluation for the determination of elements in milk powder LIBS and laser ablation/ICP-OES spectrometry. Online. Analytical and Bioanalytical Chemistry. Roč. 401, č. 9, s. 2681-2689. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5079-z>. [cit. 2024-05-19].
- [13] Generování harmonických frekvencí laserů, c2018. Online. Czechlasers.cz. Dostupné z: <https://czechlasers.cz/studovna/generovani-harmonickych-frekvenci-laseru/>. [cit. 2024-03-16].
- [14] MOHAMMADI, H. a ESLAMI, E., 2010. Investigation of spectral resolution in a Czerny Turner spectrograph. Online. Instruments and Experimental Techniques. Roč. 53, č. 4, s. 549-552. ISSN 0020-4412. Dostupné z: <https://doi.org/10.1134/S0020441210040147>. [cit. 2024-03-21].
- [15] MARKIEWICZ-KESZYCKA, Maria; CAMA-MONCUNILL, Xavier; CASADO-GAVALDA, Maria P.; DIXIT, Yash; CAMA-MONCUNILL, Raquel et al., 2017. Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) for food analysis: A review. Online. Roč. 65, s. 80-93. ISSN 09242244. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.05.005>. [cit. 2024-02-24].
- [16] GRAHAM-SMITH, Francis; KING, Terry A. a WILKINS, Dan, c2007. Optics and photonics: an introduction. 2nd ed. Chichester: John Wiley. ISBN 978-0-470-01784-5.
- [17] CREMERS, David a RADZIEMSKI, Leon, 2006. Handbook of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. Chichester: John Wiley. ISBN 0-470-09299-8.
- [18] GUIRADO, Salvador; FORTES, Francisco J.; CABALÍN, Luisa M. a LASERNA, Javier J., 2014. Effect of Pulse Duration in Multi-Pulse Excitation of Silicon in Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS). Online. Applied Spectroscopy. Roč. 68, č. 9, s. 1060-1066. ISSN 0003-7028. Dostupné z: <https://doi.org/10.1366/13-07438>. [cit. 2024-04-20].
- [19] STRATIS, Dimitra N.; ELAND, Kristine L. a ANGEL, S. Michael, 2000. Dual-Pulse LIBS Using a Pre-Ablation Spark for Enhanced Ablation and Emission. Online. Applied Spectroscopy. Roč. 54, č. 9, s. 1270-1274. ISSN 0003-7028. Dostupné z: <https://doi.org/10.1366/0003702001951174>. [cit. 2024-03-09].
- [20] Historie laserů ve světě, c2018. Online. Czechlasers.cz. Dostupné z: <https://czechlasers.cz/studovna/historie-laseru-ve-svete/>. [cit. 2024-03-30].
- [21] DE GIACOMO, A.; GAUDIUSO, R.; KORAL, C.; DELL'AGLIO, M. a DE PASCALE, O., 2013. Nanoparticle-Enhanced Laser-Induced Breakdown Spectroscopy of Metallic Samples. Online. Analytical Chemistry. Roč. 85, č. 21, s. 10180-10187. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ac4016165>. [cit. 2024-04-22].



- [22] ChemCam, 2011. Online. NASA Science Mars Exploration. Dostupné z: <https://mars.nasa.gov/msl/spacecraft/instruments/chemcam/>. [cit. 2024-03-01].
- [23] Na Marsu přistane vozítko s technologií využívanou na CEITEC VUT, 2021. Online. Vysoké učení technické v Brně. Dostupné z: <https://www.vut.cz/vut/aktuality-f19528/na-marsu-pristane-vozik-s-technologie-vyuzivanou-na-ceitec-vut-d209128>. [cit. 2024-03-01].
- [24] WIENS, Roger C.; MAURICE, Sylvestre; BARRACLOUGH, Bruce; SACCOCCIO, Muriel; BARKLEY, Walter C. et al., 2012. The ChemCam Instrument Suite on the Mars Science Laboratory (MSL) Rover: Body Unit and Combined System Tests. Online. Space Science Reviews. Roč. 170, č. 1-4, s. 167-227. ISSN 0038-6308. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11214-012-9902-4>. [cit. 2024-03-23].
- [25] Raman Spectroscopy, Microscopy and Imaging, 2023. Online. Thermo Fisher Scientific. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/global/forms/industrial/raman-essential-knowledge-briefing-booklet.html>. [cit. 2024-03-09].
- [26] MILLAR, David P, 1996. Time-resolved fluorescence spectroscopy. Online. Current Opinion in Structural Biology. Roč. 6, č. 5, s. 637-642. ISSN 0959440X. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(96\)80030-3](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(96)80030-3). [cit. 2024-03-23].
- [27] FARKA, Zdeněk; VYTISKOVÁ, Karolína; MAKHNEVA, Ekaterina; ZIKMUNDOVÁ, Eva; HOLUB, Daniel et al., 2024. Comparison of single and double pulse laser-induced breakdown spectroscopy for the detection of biomolecules tagged with photon-upconversion nanoparticles. Online. Analytica Chimica Acta. Roč. 1299. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2024.342418>. [cit. 2024-03-24].
- [28] SINGH, Vivek K., 2021. Review: Application Of LIBS To Elemental Analysis And Mapping Of Plant Samples. Online. Atomic Spectroscopy. Roč. 42, č. 1, s. 99-110. ISSN 01955373. Dostupné z: <https://doi.org/10.46770/AS.2020.201>. [cit. 2024-04-27].
- [29] KONZ, Ioana; FERNÁNDEZ, Beatriz; FERNÁNDEZ, M. Luisa; PEREIRO, Rosario a SANZ-MEDEL, Alfredo, 2012. Laser ablation ICP-MS for quantitative biomedical applications. Online. Analytical and Bioanalytical Chemistry. Roč. 403, č. 8, s. 2113-2125. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6023-6>. [cit. 2024-03-30].
- [30] MODLITBOVÁ, Pavlína; FARKA, Zdeněk; PASTUCHA, Matěj; POŘÍZKA, Pavel; NOVOTNÝ, Karel et al., 2019. Laser-induced breakdown spectroscopy as a novel readout method for nanoparticle-based immunoassays. Online. Microchimica Acta. Roč. 186, č. 9. ISSN 0026-3672. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3742-9>. [cit. 2024-03-24].
- [31] POŘÍZKA, Pavel; MODLITBOVÁ, Pavlína; MELIKECHI, Nouredine a KAISER, Jozef, 2023. Laser-ablation spectroscopy for imaging of tumor markers and nanoparticle labels. Online. Optical Spectroscopy and Imaging for Cancer Diagnostics. 2023-02-29, s. 181-206. ISBN 978-981-12-5895-4. Dostupné z: [https://doi.org/10.1142/9789811258961\\_0007](https://doi.org/10.1142/9789811258961_0007). [cit. 2024-02-25].

## LITERATURA

- [32] Prostate-Specific Antigen (PSA) Test, 1999. Online. MedlinePlus Trusted Health Information for You. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/lab-tests/prostate-specific-antigen-psa-test/>. [cit. 2024-03-27].
- [33] Urologie pro praxi, 2015. Online. Roč. 16, č. 3. Dostupné z: <https://www.urologie-propraxi.cz/pdfs/uro/2015/03/04.pdf>. [cit. 2024-03-26].
- [34] SYNLABIANER odborný magazín pro lékaře, 2017. Online. Roč. 18, č. 1. Dostupné z: <https://synlabianer.cz/wp-content/uploads/2017/01/16285-synlabianer-012017-01.pdf>. [cit. 2024-03-26].
- [35] Zvětšená prostata: co to je?, 2020. Online. Národní zdravotnický informační portál: NZIP. Dostupné z: [https://www.nzip.cz/clanek/410-zvetsena-prostata-zakladni-informace#:~:text=Prostata%20\(předstojná%20žláza\)%20je%20mužská,trubice%20a%20zajišťuje%20](https://www.nzip.cz/clanek/410-zvetsena-prostata-zakladni-informace#:~:text=Prostata%20(předstojná%20žláza)%20je%20mužská,trubice%20a%20zajišťuje%20) [cit. 2024-03-26].
- [36] Léčba obtíží souvisejících se zvětšenou prostatou, c2023-2024. Online. Česká urologická společnost ČLS JEP. Dostupné z: <https://www.cus.cz/pro-pacienty/diagnozy/lecba-obtizi-souvisejicich-se-zvetsenou-prostatou/>. [cit. 2024-03-26].
- [37] MEULENBERG, Eline P., 2012. Immunochemical Methods for Ochratoxin A Detection: A Review. Online. Toxins. Roč. 4, č. 4, s. 244-266. ISSN 2072-6651. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/toxins4040244>. [cit. 2024-04-27].
- [38] GÜBITZ, G. a SCHMID, M. G., 2005. IMMUNOASSAYS, TECHNIQUES | Luminescence Immunoassays. Online. In: Encyclopedia of Analytical Science. Second edition. Elsevier, s. 352-360. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/fluoroimmunoassay>. [cit. 2024-04-01].
- [39] MAKHNEVA, Ekaterina; SKLENÁROVÁ, Dorota; BRANDMEIER, Julian C.; HLAVÁČEK, Antonín; GORRIS, Hans H. et al., 2022. Influence of Label and Solid Support on the Performance of Heterogeneous Immunoassays. Online. Analytical Chemistry. 2022-11-29, roč. 94, č. 47, s. 16376-16383. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c03543>. [cit. 2024-02-13].
- [40] LI, Lingling; CHEN, Ying a ZHU, Jun-Jie, 2017. Recent Advances in Electrochemiluminescence Analysis. Online. Analytical Chemistry. Roč. 89, č. 1, s. 358-371. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04675>. [cit. 2024-05-03].
- [41] DU, Fangxin; CHEN, Yequan; MENG, Chengda; LOU, Baohua; ZHANG, Wei et al., 2021. Recent advances in electrochemiluminescence immunoassay based on multiple-signal strategy. Online. Current Opinion in Electrochemistry. Roč. 28, s. 1-9. ISSN 24519103. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2021.100725>. [cit. 2024-05-19].
- [42] DANDLIKER, W.B. a FEIGEN, G.A., 1961. Quantification of the antigen-antibody reaction by the polarization of fluorescence. Online. Biochemical and Biophysical Research Communications. Roč. 5, č. 4, s. 299-304. ISSN 0006291X. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(61\)90167-X](https://doi.org/10.1016/0006-291X(61)90167-X). [cit. 2024-04-03].

- [43] SHEN, Ding; ZHENG, Jie; CUI, Xiping; CHEN, Yingshan; HE, Qiyi et al., 2018. Analysis of cholyglycine acid as a biomarker for the early diagnosis of liver disease by fluorescence polarization immunoassay. Online. *Sensors and Actuators B: Chemical*. Roč. 256, s. 846-852. ISSN 09254005. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.10.013>. [cit. 2024-05-19].
- [44] Fluorescent Dyes, c2024. Online. Leica Microsystems. Dostupné z: <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/life-science/fluorescent-dyes/>. [cit. 2024-04-03].
- [45] Fluorescein (FAM), c2018-2022. Online. AxisPharm. Dostupné z: <https://axispharm.com/product-category/fluorescent-dyes/fluorescein-fam/>. [cit. 2024-04-03].
- [46] CROCE, A.C. a BOTTIROLI, G., 2014. Autofluorescence spectroscopy and imaging: a tool for biomedical research and diagnosis. Online. *European Journal of Histochemistry*. Roč. vol 58, s. 320-337. ISSN 2038-8306. Dostupné z: <https://doi.org/10.4081/ejh.2014.2461>. [cit. 2024-05-22].
- [47] Biological imaging: Beyond fluorescence, 2010. Online. Roč. 467. *Nature*. [cit. 2024-04-03].
- [48] Fluorescence and Phosphorescence, 2008. Online. LibreTexts Chemistry. Dostupné z: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Map%3A\\_Physical\\_Chemistry\\_for\\_the\\_Biosciences\\_\(Chang\)/14%3A\\_Spectroscopy/14.07%3A\\_Fluorescence\\_and\\_Phosphorescence](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_Physical_Chemistry_for_the_Biosciences_(Chang)/14%3A_Spectroscopy/14.07%3A_Fluorescence_and_Phosphorescence). [cit. 2024-05-22].
- [49] ENGVALL, Eva a PERLMANN, Peter, 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. Online. *Immunochemistry*. Roč. 8, č. 9, s. 871-874. ISSN 00192791. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0019-2791\(71\)90454-X](https://doi.org/10.1016/0019-2791(71)90454-X). [cit. 2024-04-06].
- [50] NAKANE, Paul K. a PIERCE, G. Barry, 1967. ENZYME-LABELED ANTIBODIES FOR THE LIGHT AND ELECTRON MICROSCOPIC LOCALIZATION OF TISSUE ANTIGENS. Online. *The Journal of Cell Biology*. Roč. 33, č. 2, s. 307-318. ISSN 1540-8140. Dostupné z: <https://doi.org/10.1083/jcb.33.2.307>. [cit. 2024-04-06].
- [51] AYDIN, Suleyman, 2015. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. Online. *Peptides*. Roč. 72, s. 4-15. ISSN 01969781. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>. [cit. 2024-04-28].
- [52] MAYERHÖFER, Thomas G.; PAHLOW, Susanne a POPP, Jürgen, 2020. The Bouguer-Beer-Lambert Law: Shining Light on the Obscure. Online. *Chem-PhysChem*. Roč. 21, č. 18, s. 2029-2046. ISSN 1439-4235. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/cphc.202000464>. [cit. 2024-04-06].

## LITERATURA

- [53] HLAVÁČEK, Antonín; FARKA, Zdeněk; HÜBNER, Maria; HORŇÁKOVÁ, Veronika; NĚMEČEK, Daniel et al., 2016. Competitive Upconversion-Linked Immunosorbent Assay for the Sensitive Detection of Diclofenac. Online. Analytical Chemistry. Roč. 88, č. 11, s. 6011-6017. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b01083>. [cit. 2024-04-06].
- [54] AMBROSI, Adriano; AIRÒ, Federico a MERKOČI, Arben, 2010. Enhanced Gold Nanoparticle Based ELISA for a Breast Cancer Biomarker. Online. Analytical Chemistry. Roč. 82, č. 3, s. 1151-1156. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ac902492c>. [cit. 2024-05-24].
- [55] FURUYA, Hideki; PAGANO, Ian; CHEE, Keanu; KOBAYASHI, Takashi; WONG, Regan S. et al., 2019. Comparison of Commercial ELISA Kits, a Prototype Multiplex Electrochemoluminescent Assay, and a Multiplex Bead-Based Immunoassay for Detecting a Urine-Based Bladder-Cancer-Associated Diagnostic Signature. Online. Diagnostics. Roč. 9, č. 4, s. 1-9. ISSN 2075-4418. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/diagnostics9040166>. [cit. 2024-05-20].
- [56] SEDLMEIER, Andreas; HLAVÁČEK, Antonín; BIRNER, Lucia; MICKERT, Matthias J.; MUHR, Verena et al., 2016. Highly Sensitive Laser Scanning of Photon-Upconverting Nanoparticles on a Macroscopic Scale. Online. Analytical Chemistry. Roč. 88, č. 3, s. 1835-1841. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04147>. [cit. 2024-04-28].
- [57] MICKERT, Matthias J.; FARKA, Zdeněk; KOSTIV, Uliana; HLAVÁČEK, Antonín; HORÁK, Daniel et al., 2019. Measurement of Sub-femtomolar Concentrations of Prostate-Specific Antigen through Single-Molecule Counting with an Upconversion-Linked Immunosorbent Assay. Online. Analytical Chemistry. Roč. 91, č. 15, s. 9435-9441. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02872>. [cit. 2024-04-06].
- [58] ZHU, Xingjun; SU, Qianqian; FENG, Wei a LI, Fuyou, 2017. Anti-Stokes shift luminescent materials for bio-applications. Online. Chemical Society Reviews. Roč. 46, č. 4, s. 1025-1039. ISSN 0306-0012. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C6CS00415F>. [cit. 2024-04-08].
- [59] ZHOU, Chaohui; CHU, Zhongyun; HOU, Wenyue a WANG, Xiuying, 2021. Lanthanide-Doped Upconversion-Linked Immunosorbent Assay for the Sensitive Detection of Carbohydrate Antigen 19-9. Online. Frontiers in Chemistry. Roč. 8, s. 1-7. ISSN 2296-2646. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.592445>. [cit. 2024-05-20].
- [60] SKLENÁROVÁ, Dorota, 2023. Detekce rakovinných biomarkerů pomocí imunochemických stanovení s magnetickou prekoncentrací. Online, Diplomová práce. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Dostupné z: [https://is.muni.cz/th/ykvwc/Sklenarova\\_DP\\_final.pdf](https://is.muni.cz/th/ykvwc/Sklenarova_DP_final.pdf). [cit. 2024-04-16].
- [61] MARKUSHIN, Yuri; SIVAKUMAR, Poopalasingam; CONNOLLY, Denise a MELI-KECHI, Nouredine, 2015. Tag-femtosecond laser-induced breakdown spectroscopy for the sensitive detection of cancer antigen 125 in blood plasma. Online. Analytical

- and Bioanalytical Chemistry. Roč. 407, č. 7, s. 1849-1855. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8433-0>. [cit. 2024-03-02].
- [62] MELIKECHI, Nouredine a MARKUSHIN, Yuriy, 2022. Tag-laser-induced breakdown spectroscopy with Si, Ti, and Fe micro-particles and analysis of leptin in a phosphate buffer solution. Online. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. Roč. 188. ISSN 05848547. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.sab.2022.106357>. [cit. 2024-02-25].
- [63] KARLÍKOVÁ, Marie; TOPOLČAN, Ondřej; VRZALOVÁ, Jindra a HOLUBEC (JR.), Luboš, c2024. Princip multiplexové analýzy a její využití v onkologické praxi. Online. Linkos. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinarni-tym/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/princip-multiplexove-analyzy-a-jeji-vyuziti-v-onkologicke-praxi/>. [cit. 2024-03-27].
- [64] LEE, Hawon; GAO, Xiaohu a KIM, Young-Pil, 2018. Immuno-Nanoparticles for Multiplex Protein Imaging in Cells and Tissues. Online. BioChip Journal. Roč. 12, č. 2, s. 83-92. ISSN 1976-0280. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13206-018-2201-8>. [cit. 2024-03-27].
- [65] GONDHALEKAR, Carmen; RAJWA, Bartek P.; BAE, Euiwon; PATSEKIN, Valery; STURGIS, Jennifer et al., 2019. Multiplexed detection of lanthanides using laser-induced breakdown spectroscopy: a survey of data analysis techniques. Online. Sensing for Agriculture and Food Quality and Safety XI. Roč. 11016, s. 1-8. ISBN 9781510626973. Dostupné z: <https://doi.org/10.1117/12.2521453>. [cit. 2024-04-21].
- [66] KONECNA, Marie; NOVOTNY, Karel; KRIZKOVA, Sona; BLAZKOVA, Iva; KOPPEL, Pavel et al., 2014. Identification of quantum dots labeled metallothionein by fast scanning laser-induced breakdown spectroscopy. Online. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. Roč. 101, s. 220-225. ISSN 05848547. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.sab.2014.08.037>. [cit. 2024-04-22].
- [67] SAFI, Ali; LANDIS, Joshua E.; ADLER, Helmar G.; KHADEM, Hossein; ESELLER, Kemal Efe et al., 2024. Enhancing biomarker detection sensitivity through tag-laser induced breakdown spectroscopy with NELIBS. Online. Talanta. Roč. 271, s. 1-7. ISSN 00399140. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2024.125723>. [cit. 2024-04-22].
- [68] Albuminuria (proteinuria), c2024. Online. National Kidney Foundation. Dostupné z: <https://www.kidney.org/atoz/content/albuminuria>. [cit. 2024-03-30].
- [69] HER2, c2024. Online. Linkos. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/slovnicek/her2/>. [cit. 2024-03-29].
- [70] NIST: Atomic Spectra Database Lines Form, 1995. Online. NIST. Dostupné z: [https://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/lines\\_form.html](https://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/lines_form.html). [cit. 2024-05-22].
- [71] YAROSHCHYK, Pavel a EBERHARDT, John E., 2014. Automatic correction of continuum background in Laser-induced Breakdown Spectroscopy using a model-free algorithm. Online. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. Roč. 99,

## LITERATURA

s. 138-149. ISSN 05848547. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.sab.2014.06.020>. [cit. 2024-02-13].

- [72] RORABACHER, David B., 1991. Statistical treatment for rejection of deviant values: critical values of Dixon's "Q" parameter and related subrange ratios at the 95% confidence level. Online. Analytical Chemistry. Roč. 63, č. 2, s. 139-146. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ac00002a010>. [cit. 2024-04-13].

## 5. Seznam použitých zkratek a symbolů

∅	Nulová koncentrace analytu
AB	Esej pufr
ALP	Alkalická fosfatáza
BB	Blokovací pufr
BT-474	Pelet pozitivních buněk HER2
Ca 125	Biomarker rakoviny vaječníku
CB	Potahovací pufr
CEITEC	Středoevropský technologický institut
DP	Dvoupulzní uspořádání laserových pulzů
ECL	Elektrochemiluminiscence
ECLIA	Elektrochemiluminiscenční imunoesej
ELISA	Enzymová imunoesej
FAM	Fluorescenční barvivo fluorescein
FBS	Fetální hovězí sérum
FIA	Fluorescenční imunoesej
FITC	Fluorescein-5-isothiokyanát
FPIA	Fluorescenční polarizační imunoesej
ICCD	Intenzifikovaný CCD detektor
HER2	Biomarker rakoviny prsu
HRP	Peroxidáza křenu selského
HRP-SA	Streptavidin v komplexu s křenovou peroxidázou
HSA	Lidský sérový albumin
LIBS	Spektroskopie laserem buzeného plazmatu
MBs	Magnetické mikročástice
MB-ULISA	Imunoesej ULISA s magnetickými mikročásticemi jako podkladovou fází

MDA-MB-231	Pelet negativních buněk HER2
MU	Masarykova univerzita
Nd:YAG	Yttrito-hlinitý granát dopovaný ionty neodymu
NELIBS	„Nanoparticle-Enhanced Laser-Induced Breakdown Spectroscopy“ (bez českého ekvivalentu)
NETag-LIBS	Spojení NELIBS a Tag-LIBS (bez českého ekvivalentu)
PB	Fosfátový pufr
PBS	Fosfátový pufr s chloridem sodným
PSA	prostatický specifický antigen
RIA	Radioaktivní imunoesej
RS	Ramanova spektroskopie
sCMOS	„scientific Complementary Metal–Oxide–Semiconductor“ (bez českého ekvivalentu)
SP	Jednopulzní uspořádání laserových pulzů
Tag-LIBS	Spojení Tag a LIBS (bez českého ekvivalentu)
TMB	Substrát 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidin
TRF	Časově rozlišená fluorescence
ULISA	Upkonverzní imunoesej
VUT	Vysoké učení technické v Brně
UCNPs	Foton-upkonverzní nanočástice
UV	Ultrafialové záření
WB	Promývací pufr