

# ИАСМ БИОФИЗИКА

## НАСТАВНА ЈЕДИНИЦА 6: **МЕТОДЕ ЗА ИСПИТИВАЊЕ БИОЛОШКИХ МОЛЕКУЛА**

Доц. др Весна Игњатовић

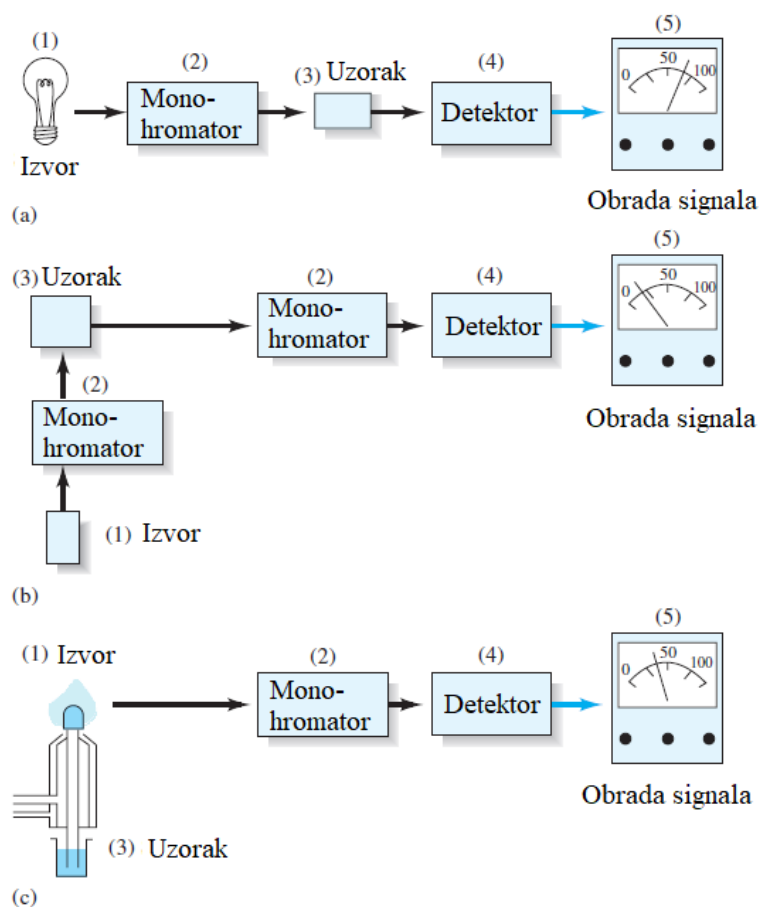
## Основне компоненте оптичких инструмената

---

- ▶ Први уређаји за оптичку спектроскопију развијени су за анализу интеракције електромагнетног (ЕМ) зрачења и супстанци у видљивом делу спектра – отуда и назив оптички инструменти.
- ▶ Данас оптички инструменти укључују инструменте који користе зрачење ултраљубичастог (УВ) и инфрацрвеног (ИР) дела спектра. Уређаји који се користе у ове три области ЕМ зрачења имају сличне делове, док се уређаји који користе зрачење чија је енергија већа од енергије УВ зрачења или мања од енергије ИР зрачења значајно разликују.

- 
- ▶ Уобичајени делови оптичких инструмената који се користе у УВ, видљивом и ИР региону су:
  - ▶ 1) стабилан извор зрачења,
  - ▶ 2) монохроматор,
  - ▶ 3) носач (држач) узорка (један или више),
  - ▶ 4) детектор ЕМ зрачења (у већини случајева енергија ЕМ зрачења се претвара у електричну енергију) и
  - ▶ 5) део за обраду и читавање сигнала (углавном је то рачунар).

# Шематски приказ заједничких делова инструмената који се користе у оптичкој спектроскопији



## Извори зрачења

---

- ▶ Извори зрачења су саставни део сваког апарата који се користи у оптичким методама.
- ▶ Према врсти емитованог спектра, извори зрачења се деле на:
  - ✓ извори који емитују континуалан;
  - ✓ извори који емитују дисконтинуалан спектар.

---

Континуални спектар је окарактерисан непрекидном расподелом енергије у широком интервалу таласних дужина без оштрих линија и трака.

Дисконтинуални спектар се састоји од низа одвојених, мање или више оштрих линија и трака.

Оштра граница између ове две врсте извора не постоји јер има извора који у једној области таласних дужина емитују континуални спектар а у другој дисконтинуални (водонична лампа).

---

Код апсорпционих метода се углавном користе извори **са континуалним зрачењем**, а код **емисионих извори** са **дисконтинуалним зрачењем**.

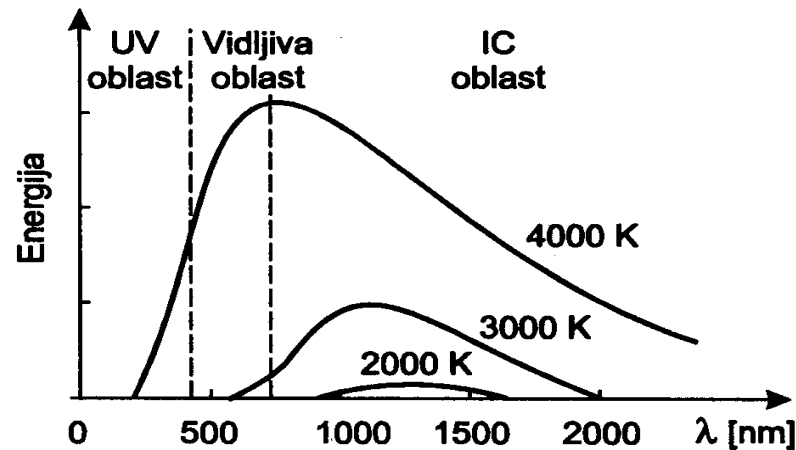
**Сви извори зрачења** карактеришу се **спектралном расподелом енергије зрачења** и **карактером њене временске зависности**.

Максимум емисије зрачења се **помера ка нижим** таласним дужинама када температура у усијаном телу расте.

Wien-ов закон померања:

$$\lambda_{\max} = \frac{\text{const.}}{T}$$

Spektralna raspodela zračenja **crnog tela** po Planck-ovoj formuli





# Спектроскопија

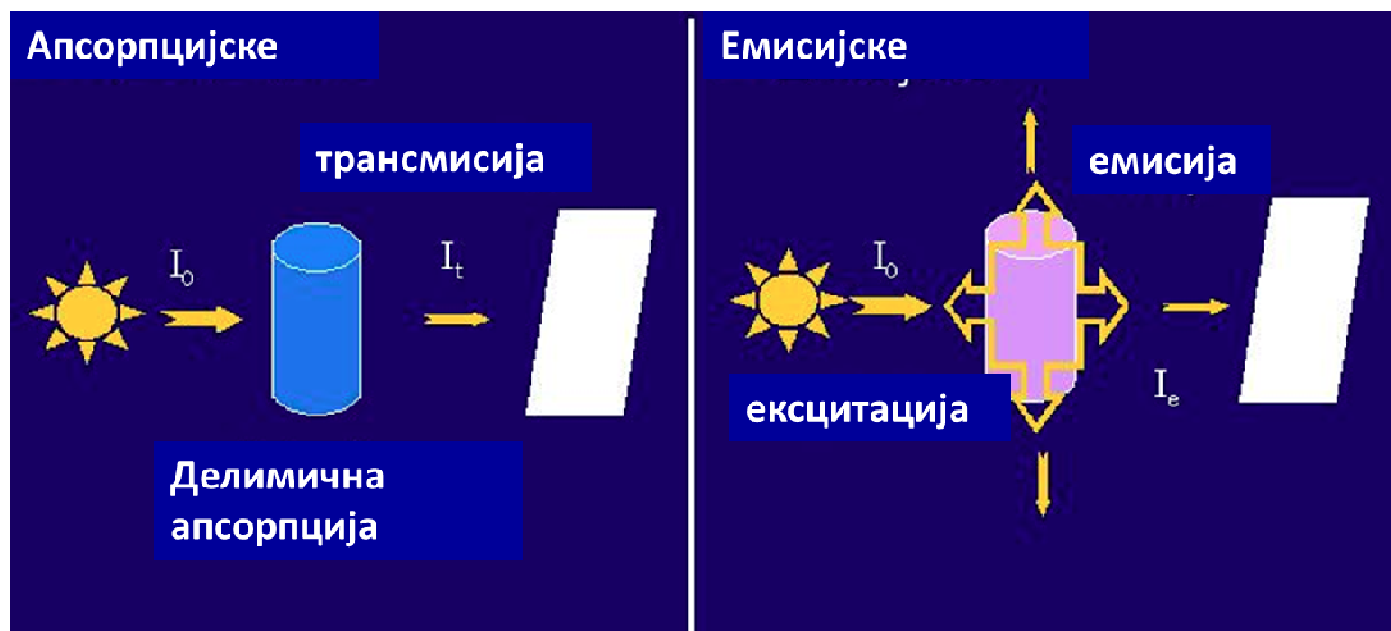
---

- ▶ Заснива се на интеракцији електромагнетног зрачења и супстанци
- ▶ Молекул ће апсорбовати фотон ако је његова енергија једнака разлици два енергетска стања у молекули, након тог догађаја мења се стање молекула, расподела електрона, електрични диполни момент, магнетни момент језгра или електрона
- ▶ У свакој методи спектроскопије могуће су интеракције фотона оних енергија које су одржане структуром и својствима молекуларног система узорка



# Спектроскопске технике

---



- 
- ▶ 1. оптичка или електронска спектроскопија-прелази електрона између молекуларних орбитала, промена структуре електронског омотача; спектри у видљивом и ултраљубичастом подручју (100-700 nm)
  - ▶ 2. инфрацрвена спинска резонанција-прелази између вибрацијских стања; промена износа електричног диполног момента; спектри у инфрацрвеном подручју (800-10000 nm)
  - ▶ 3. електронска спинска резонанција-прелази између спинских стања електрона у магнетском пољу; промена магнетског спинског момента електрона; спектри у подручју микровалова (1-10 cm)
  - ▶ 4. нуклеарна магнетна резонанција-прелази између спинских стања језгра у магнетском пољу; промена магнетског спинског момента језгра, спектри у подручју радиоталаса (1-10nm)




- 
- ▶ Емисиона спектроскопија
  - ▶ Флуоресценција-молекули се побуђују ултравиолетним или ласерским зрачењем, релаксацијом у основно стање емитују зрачење у видљивом подручју. Молекули или веће структуре које немају флуорофоре обележавају се ковалнетним везивањем флуоресцентних проба.



- 
- ▶ Колориметрија: Представља мерење концентрације неког елемента у биолошкм материјалу на основу апсорпције светла (екстинкција). Постоје визуелни колориметри (људско око) и фотоелектрични колориметри (са фотоћелијом)
  - ▶ Спектрофотометрија: Савршенија форма колориметрије, где светлост пролази кроз решетку или призму, па је могуће разликовати материје које имају изузетно уску границу таласних дужина. Метода је толико осетљива и специфична да су измерени јединствени апсорпциони спектри за поједина једињења, што омогућује да лако идентификујемо једињење и одредимо његову количину у смеши.
  - ▶ Флуориметрија: Извесна једињења имају способност да апсорбују светлосну енергију, а затим да емитују извесну количину апсорбоване и побуђене енергије у форми видљиве светлости (флуоресценција и фосфоресценција - луминисценција). Флуориметар изгледа слично као и колориметар, али поред извора светлости и сочива поседује примарни и секундарни филтер између којих се налази узорак и фотопојачивач.





# МЕТОДЕ ОДРЕЂИВАЊА КОНЦЕНТРАЦИЈА БИОЛОШКИ АКТИВНИХ СУПСТАНЦИ У БИОЛОШКОМ МАТЕРИЈАЛУ

## БИОЛОШКИ АКТИВНЕ СУПСТАНЦЕ

---

- ▶ хормони
- ▶ ензими
- ▶ продукти метаболизма
- ▶ лекови
- ▶ ...

## БИОЛОШКИ МАТЕРИЈАЛ

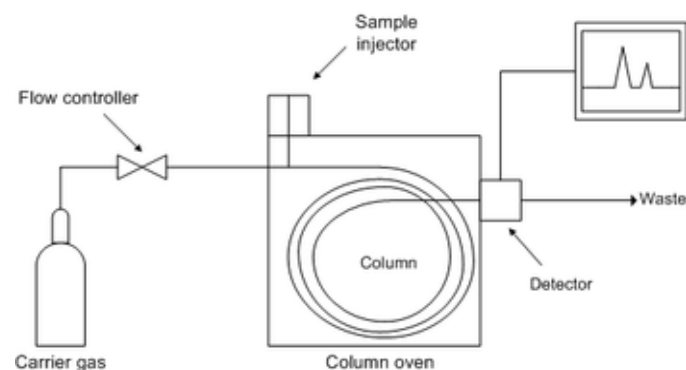
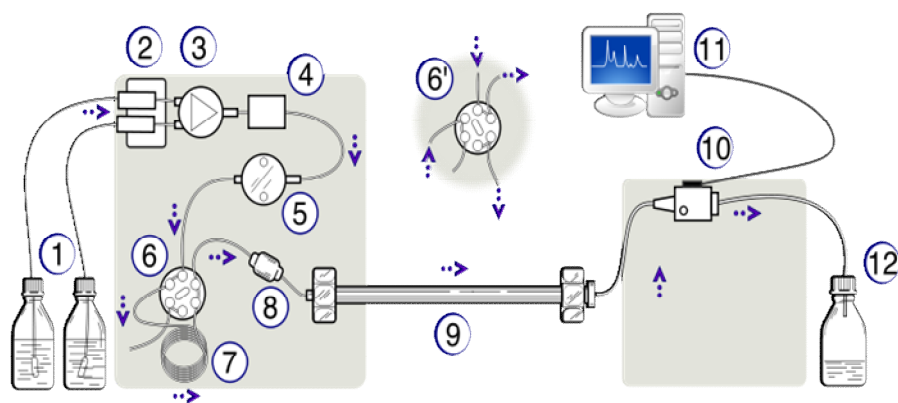
---

- ▶ крв
- ▶ плазма
- ▶ серум
- ▶ ликвор
- ▶ секрети и екскрети
- ▶ ексудати
- ▶ трансудати
- ▶ ...



# МЕТОДЕ

- ▶ Неимунолошке Анализе (методе сепарације)
  - High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)
  - Gass Chromatography (GH)





# Хроматографија

---

- ▶ Представља методу раздвајања којом се издвајају супстанце које су заступљене у биолошкој смеши од нивоа пикограма до неколико грама, а на основу различите брзине проласка кроз неки медијум.
- ▶ При томе на молекул делују две силе са супротном тенденцијом: једно је склоност молекула ка адсорпцији на површини непокретног медијума (стационарне фазе), а друго је тежња молекула ка растварању у растварачу који протиче кроз медијум.
- Постоје две фазе:
  - ▶ НЕПОКРЕТНА- чврста, течна или мешовита
  - ▶ ПОКРЕТНА- течна или гасовита која се пропушта кроз непокретну или иде преко ње.
- Фазе се бирају тако да се између њих ствара добар коефицијент расподеле.
- Разликујемо апсорпциону, јоноизмењивачку, дистрибуциону (хроматографија на папиру), гасну и гел хроматографију
- Хроматографски поступак не мења нативна својства биолошких молекула!!!



# МЕТОДЕ

**Имунолошке Анализе (IA методе)**

**компетитивне**

**некомпетитивне (директне IA)**

**Висока сензитивност (до  $10^{-12}$  mol/L!!!)**

**Висока специфичност (МоAb)**



# МЕТОДЕ ПРЕМА ОБЕЛЕЖИВАЧУ

	<b>★ A<sub>g</sub></b>	<b>★ A<sub>b</sub></b>
<b>★ <sup>125</sup>I, <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C</b>	<b>RIA</b>	<b>IRMA</b>
<b>★ хелати лантанида (Eu, Tb, Sm, Dy)</b>	<b>FIA</b>	<b>IFMA</b>
<b>★ луминол, естри акридина</b>	<b>LIA</b>	<b>...</b>
<b>★ ензим/супстрат</b>	<b>EIA</b>	



# The Beginning .....

Late 1950's



Rosalyn Yalow  
1977 Nobel Prize  
Physiology and Medicine

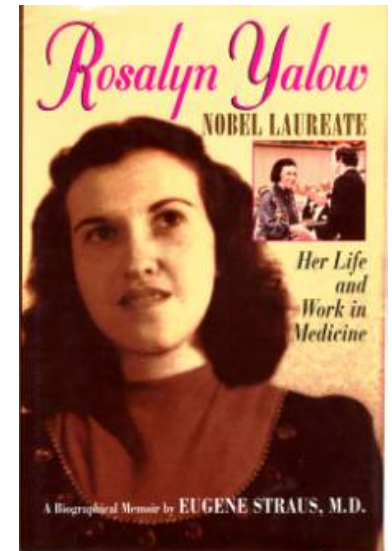
- *Competitive Binding Assays for ...*

- ☐ Insulin - 'RIA'

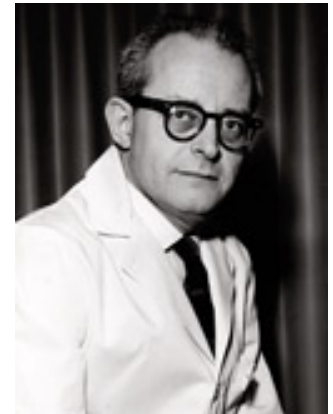
Solomon Berson & Rosalyn Yalow

- ☐ T4 - Saturation Assay

Roger Ekins



**Nobel prize 1977**



**Solomon Berson**

- 
- узимање и припрема узорка
    - инхибитори ензимске активности, концентровање, дилуција....
  - додавање реактаната \*
  - инкубација
  - сепарација везане и неvezане фазе\*
  - мерење
  - израчунавање

*•Критична фаза због веће могућности  
настанка манипулативне грешке*



## ИМУНОМЕТРИЈСКЕ МЕТОДЕ

---

- ▶ Радиоимунолошке и радиосатурационе анализе:
- ▶ су микроаналитичке технике, базиране на принципу реакције између биолошки активних супстанција у телесним течностима и специфичних везујућих протеина уз примену радиоактивних изотопа.
- ▶ Везивни протеини могу бити: АНТИТЕЛА, СПЕЦИФИЧНИ ТРАНСПОРТНИ ПРОТЕИНИ, РЕЦЕПТОРИ
- ▶ СУШТИНА: Одређивање концентрације одређене материје према радиоактивности узорка у епрувети после одливања вишка обележене материје



# Радиообележивач RIA

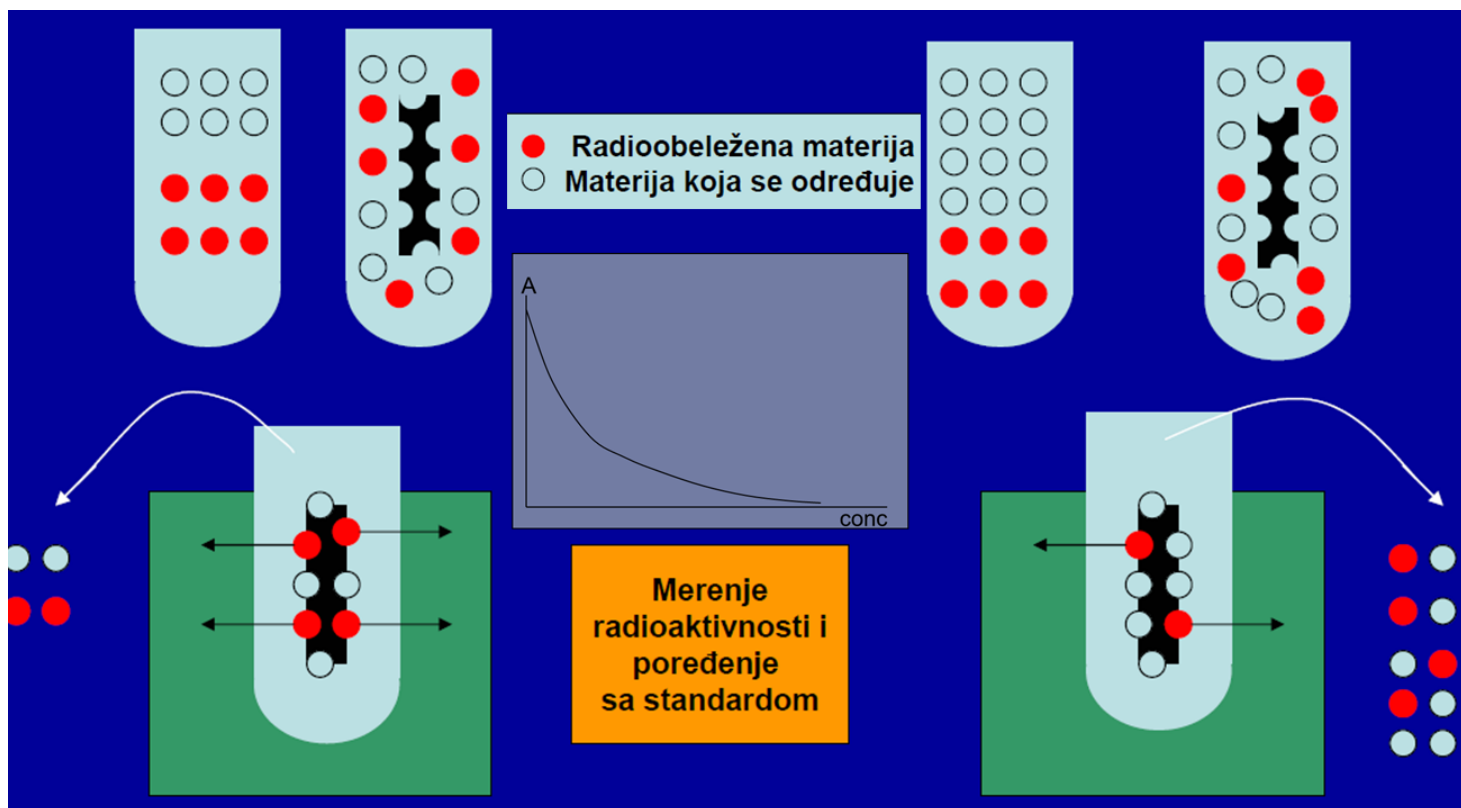
---

## Iodine-125:

- Емисија нискоенергетских  $\gamma$ -фотона: 35.4 keV
- високо специфична активност
- време полураспада: 60 дана
- ▶ Јод је природни састојак тироксина и тријодтиронина. Може се лако увести у молекуле пептида, стероида.

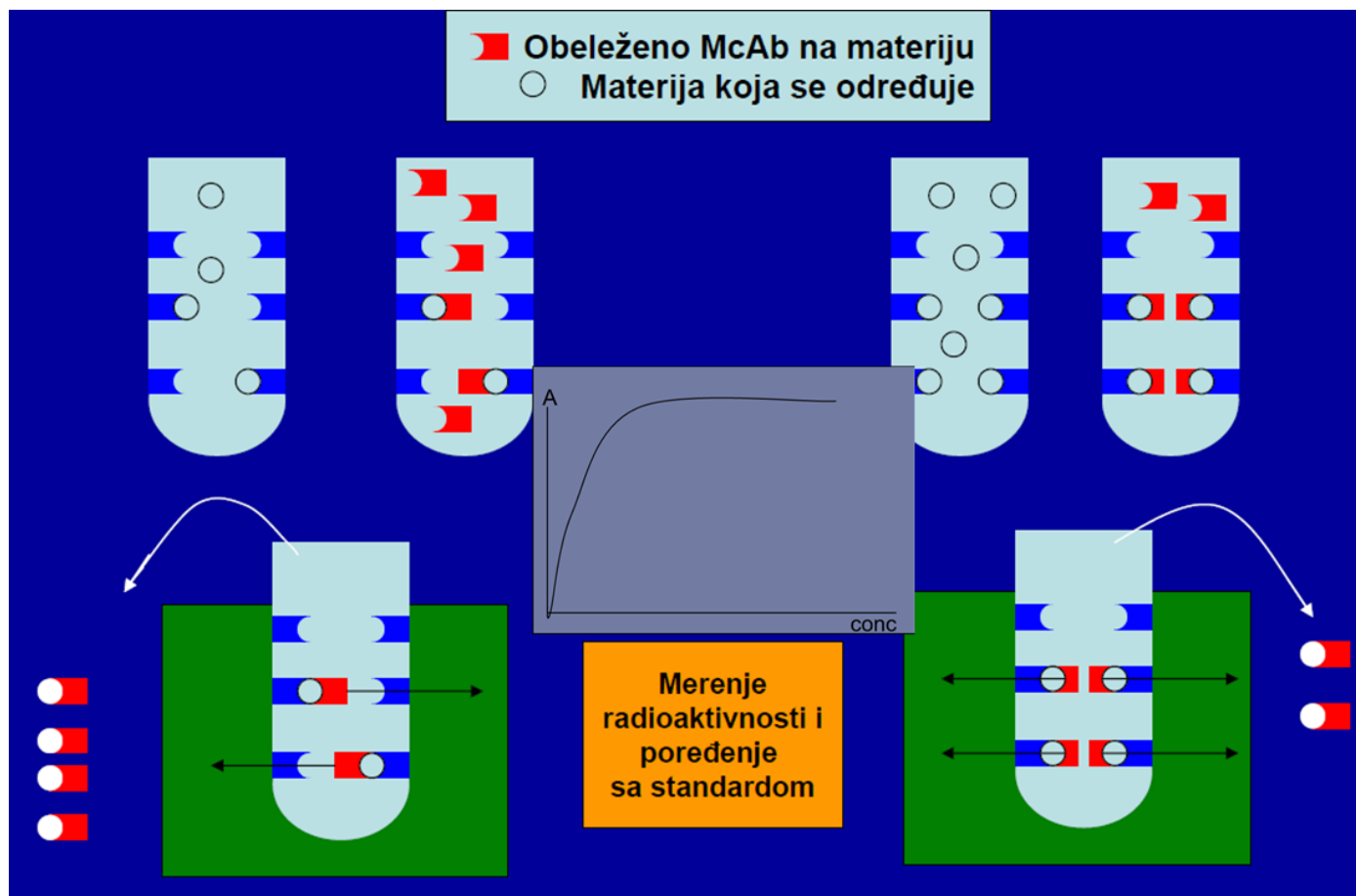
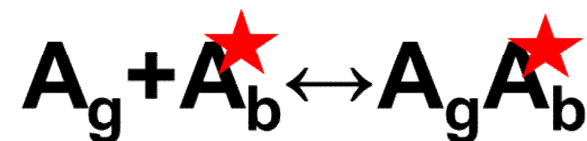


# Радиоимунолошка метода

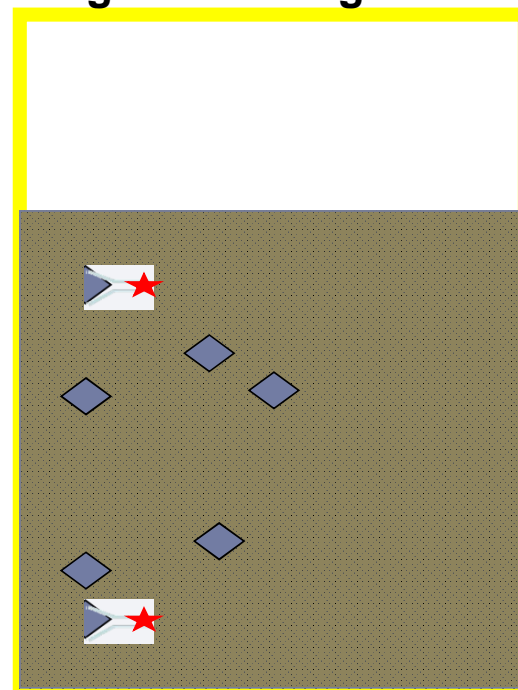
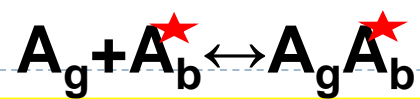
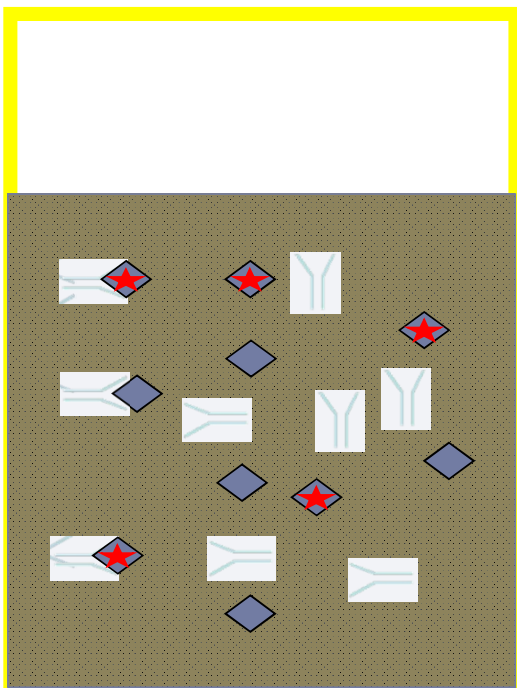
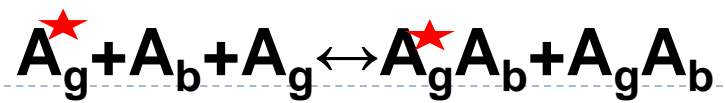


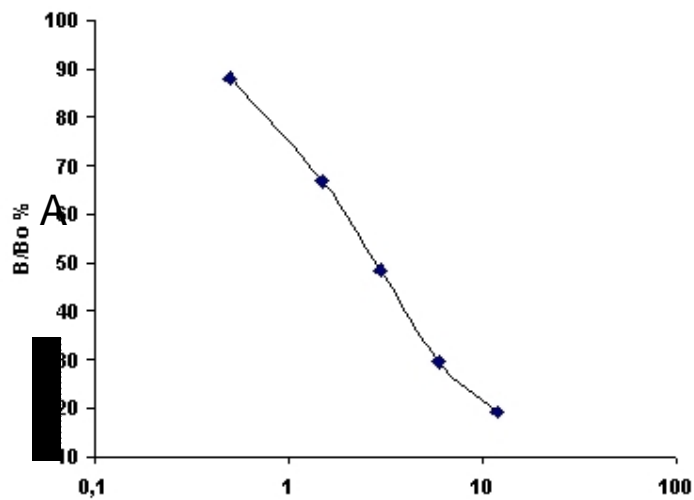


# Имунорадиометријска метода

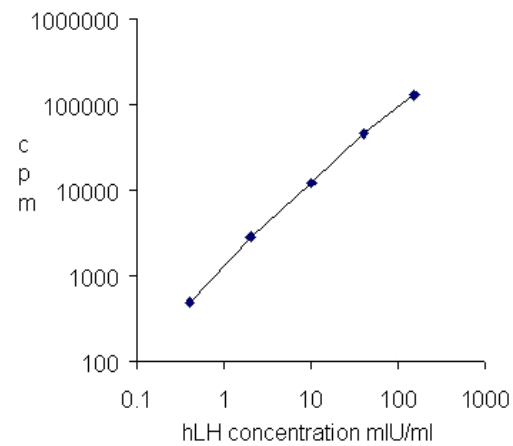
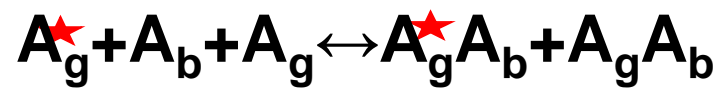


мерење обележеног  
аналита, обично  
антитела, је директно  
пропорционално  
количини антигена  
присутног у узорку- што  
је више антигена  
присутно, више  
обележеног антитела ће  
се везати.

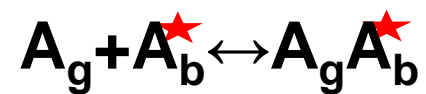




концентрација

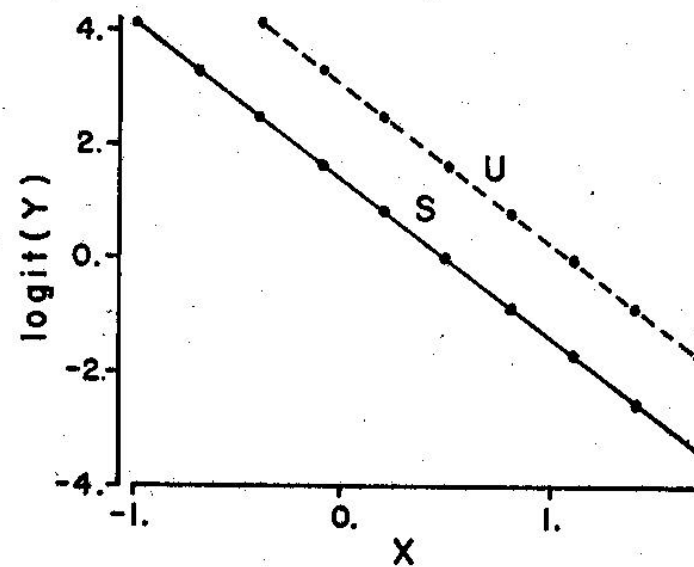
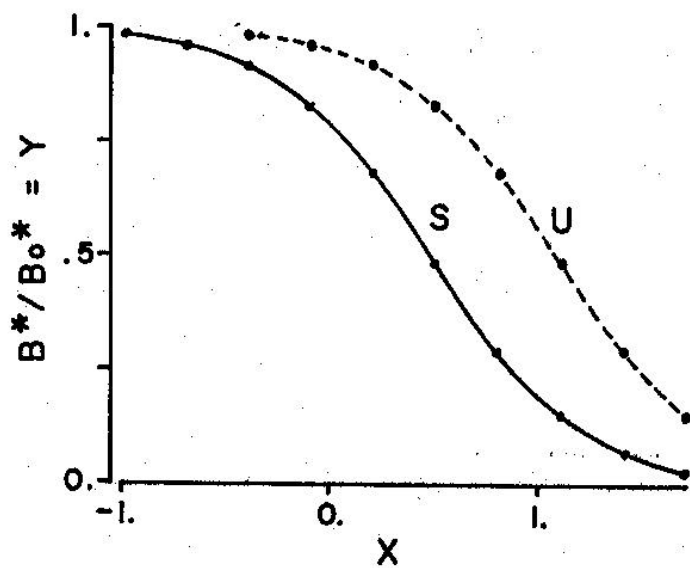
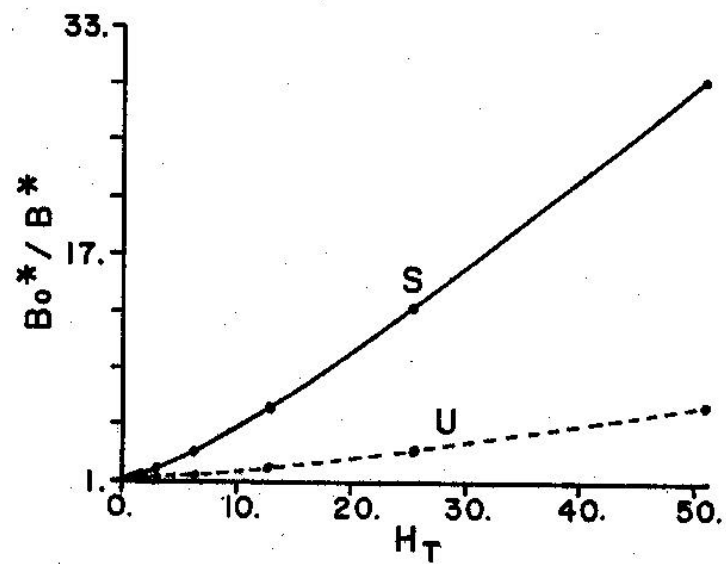
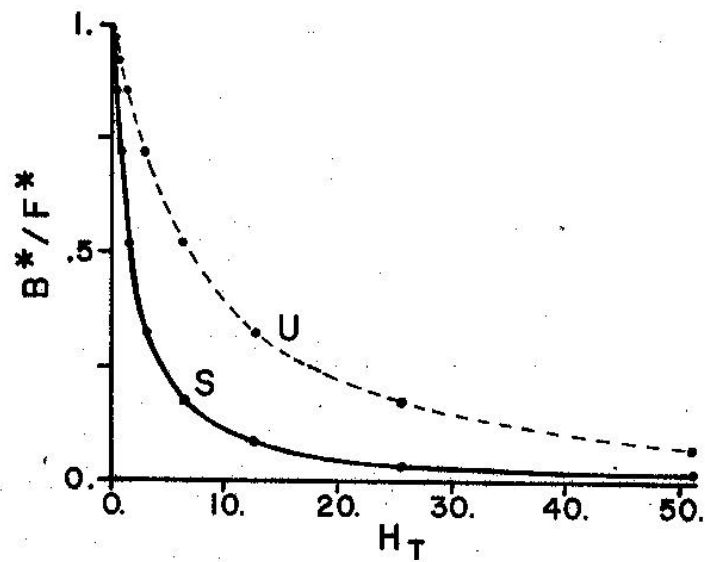


концентрација



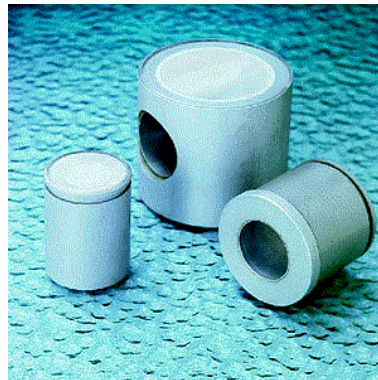
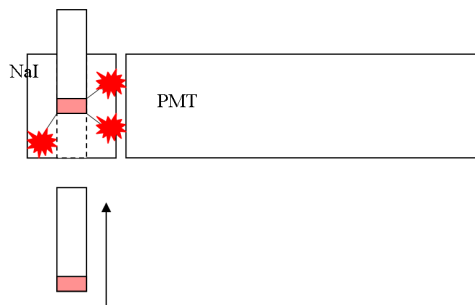
$A_g$  = стандарт





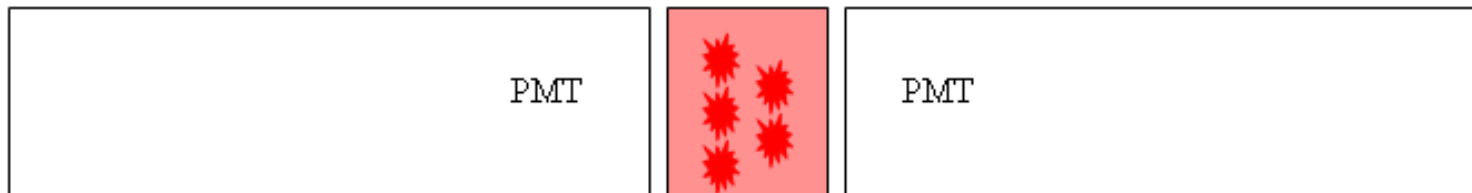
# Гама бројач

- инструмент који мери радиоактивност у узорцима, другим речима, овај уређај мери број гама фотона који се емитују из узорка
- Гама (јамасти) бројач је сцинтилациони бројач који садржи удубљење «јаму» у које се постављају епрувете са узорцима за ин витро мерења. Основна предност овакве конструкције је повећана геометријска ефикасност бројања, зато што кристал окружује већи део узорка



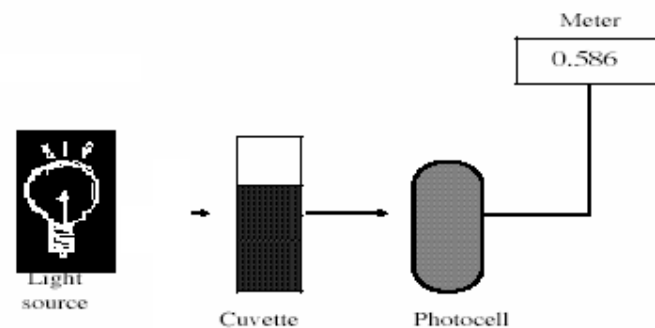
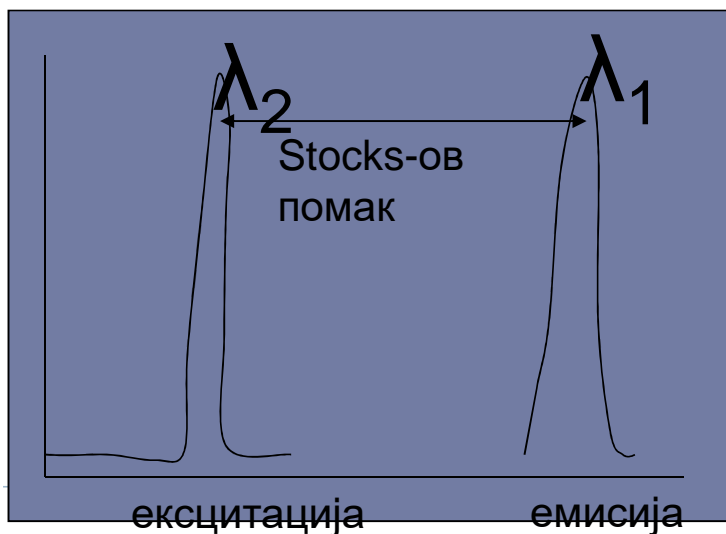
# БЕТА БРОЈАЧ

инструмент који мери радиоактивност у узорцима,  
другим речима, овај уређај мери број бета честица  
који се емитују у узорку



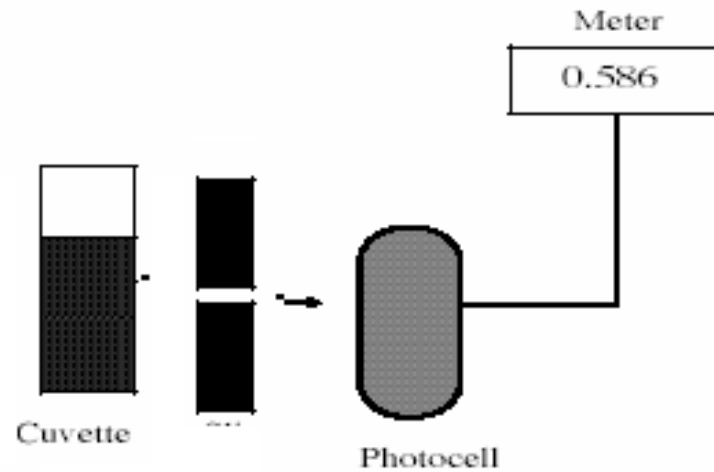
# ФЛУОРОМЕТАР

инструмент који мери количину светлости која настаје ексцитацијом другим речима, овај уређај мери количину светлости која је настала приликом деексцитације неке материје која показује феномен флуоресценције



# ФОТОМЕТАР

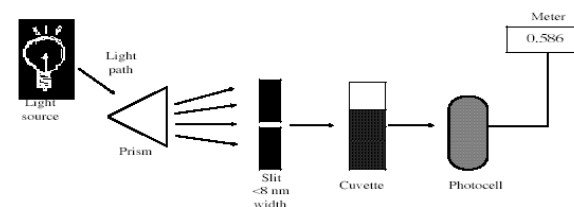
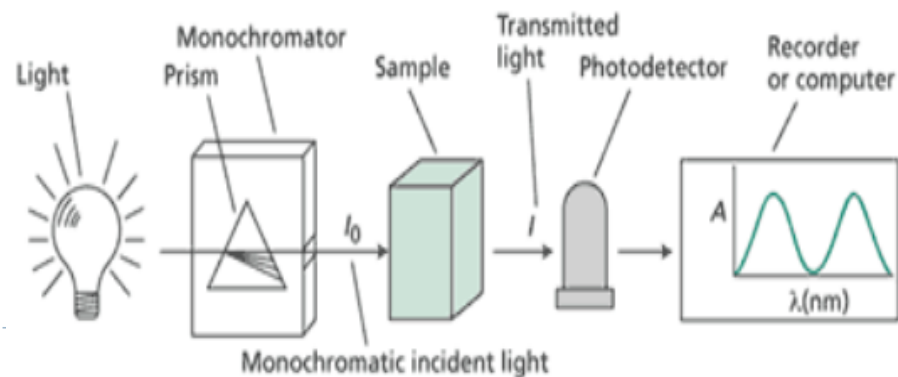
инструмент који мери количину  
светлости која настаје из неке хемијске реакције





# СПЕКТРОФОТОМЕТАР

инструмент који мери фракцију светлости која пролази кроз неки раствор, другим речима, овај уређај мери количину светлости која је прошла кроз, односно индиректно мери количину апсорбоване светлости у узорку



# Грешка мерења

---

$$\frac{\sqrt{N}}{N}$$

N=100, грешка 0.1(10%)

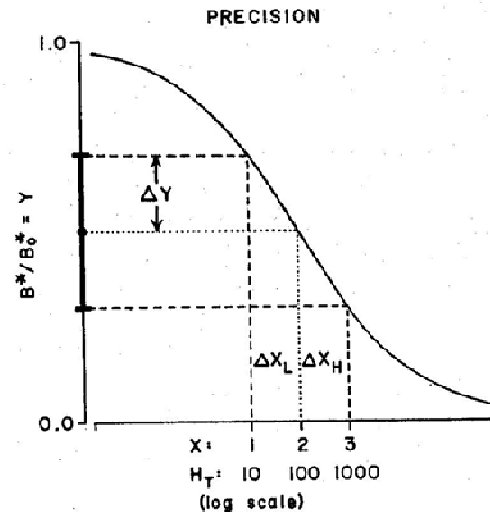
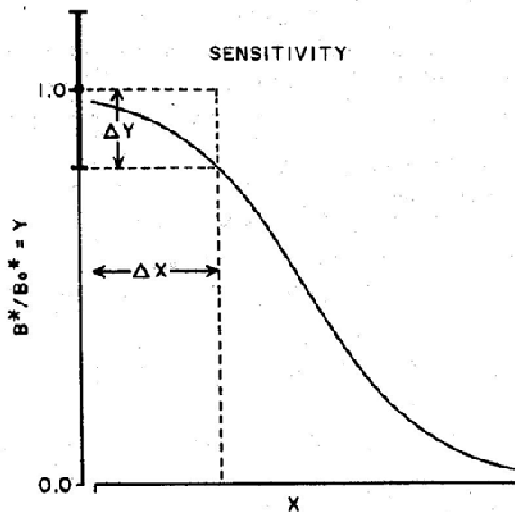
N =10000, грешка 0.01 (1%)

Мерење треба да траје довољно дуго да грешка мерења буде у прихватљивом опсегу

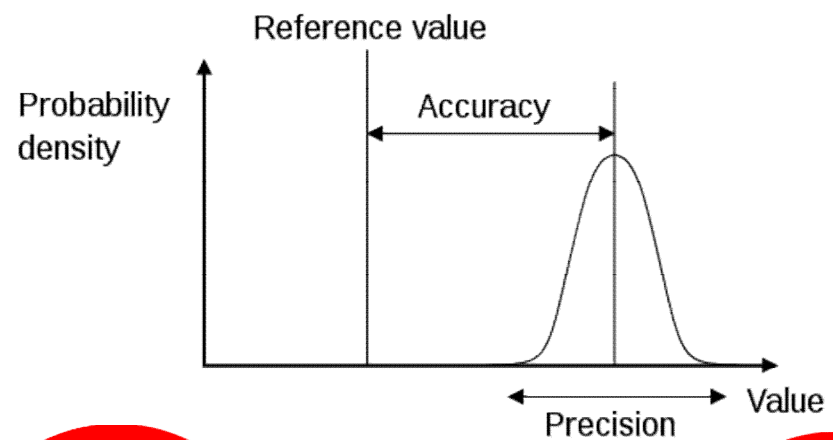


# КОНТРОЛ КВАЛИТЕТА (QC, Quality Control)

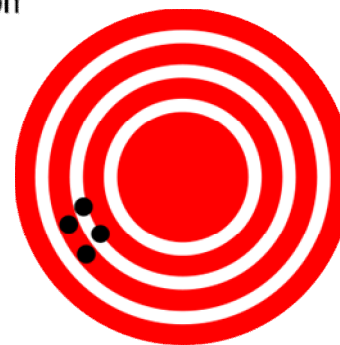
- ▶ ТАЧНОСТ : колико је измерена концентрација блиска реалној
- ▶ СПЕЦИФИЧНОСТ : има ли интерференције са сличним супстанцама
- ▶ СЕНЗИТИВНОСТ: колика је најмања детектабилна концентрација
- ▶ ПРЕЦИЗНОСТ :  $\approx$  репродуцибилност; ниска inter-assay и intra-assay варијабилност ( $< 10\%$ )



## ТАЧНОСТ И ПРЕЦИЗНОСТ



ТАЧАН али НЕПРЕЦИЗАН

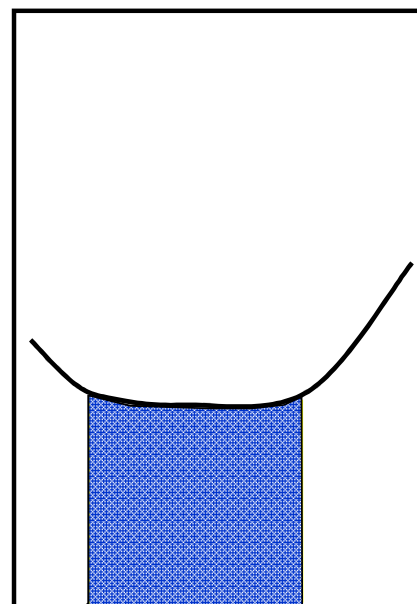


НЕТАЧАН али ПРЕЦИЗАН



## Профил прецизности

CV %



доња гр.

горња гр.

концентрација

GLP, Good Laboratory Practice



# FAKTORI KOJI UTIČU NA LABORATORIJSKE NALAZE

FAKTORI PO VREMENU DEJSTVA	PREANALITIČKI	GENSKI- rasa, pol, nasledne bolesti STAROST-novorođ- adult-starija jedinka CIKLIČNE PROMENE- godišnje doba, reproduktivni ciklus EKOLOŠKI- ishrana, ekofaktori
	ANALITIČKI	Poreklom od bolesnika Poreklom od uzetih lekova Postupak i greške u toku rada
	POSTANALITIČKI	Upisivanje laboratorijskih nalaza od aparata do protokola
FAKTORI PO SVOJOJ PRIRODI	FIZIOLOŠKI	METABOLIČKI: gladovanje, stres, fizički napor HEMODINAMSKI: Dnevni ritmovi
	METODOLOŠKI	UZIMANJE I VRSTA KRV POSTUPAK UZIMANJA DODACI EPRUVETE DUŽINA I NAČIN ČUVANJA UZORKA

---

		KONAČNA DIJAGNOZA	
		BOLEST POSTOJI	BOLEST NE POSTOJI
REZULTAT TESTA	TEST POZITIVAN TEST NEGATIVAN	Stvarno pozitivan (SP) Lažno negativan (LN)	Lažno pozitivan (LP) Stvarno negativan (SN)

$$\text{Senzitivnost} = \text{SP} / (\text{SP} + \text{LN})$$

$$\text{Specifičnost} = \text{SN} / (\text{SN} + \text{LP})$$

$$\text{Tačnost} = (\text{SP} + \text{SN}) / (\text{SP} + \text{SN} + \text{LP} + \text{LN})$$



**ХВАЛА НА ПАЖЊИ**

