Obsah

Předmluva XV

I. INFORMAČNÍ ZDROJE PRO UPŘESŇOVÁNÍ VÝZKUMNÉ HYPOTÉZY A VÝZKUMNÉHO PROJEKTU

1. Knihovnické služby a informační zdroje 2
Eva Čečková, Olga Bukačová, Soňa Janáčková

1.1. Služby knihoven 2
1.2. Informační zdroje 3
1.2.1. Informační prameny primární 3
1.2.2. Informační prameny sekundární – bibliografie, rejstříky, katalogy, databáze 3
1.2.2.1. Elektronické informační zdroje 4
1.2.2.2. E-knihy 4
1.2.2.3. Databáze 5
1.3. Impakt faktor, citační index a Hirschův index 6
1.3.1. Impakt faktor 6
1.3.1.1. Kde a jak hledat impakt faktor 6
1.3.2. Citační index 7
1.3.2.1. Kde a jak hledat citovanost 8
1.3.3. Hirschův index 8
1.3.3.1. Kde a jak hledat Hirschův index 9
1.4. Jak citovat 9
1.5. Tvorba rešerší 10
1.6. Přehled nejužívanějších databází v lékařství 12

II. ETICKO-MORÁLNÍ ZÁSADY V BIOMEDICÍNSKÝCH VÝZKUMECH

2. Principy vědeckosti a vědecké etiky v biomedicínském výzkumu 16
Jaroslav Květina

3. Etické aspekty klinického výzkumu 20
Petr Žďánský

4. Legislativní předpoklady provádění klinických hodnocení léčiv 30
Roman Trubač

5. Podmínky experimentů využívajících animální modely 39
Stanislav Špelda

5.1. Experimentální modely 40
5.2. Animální modely 41
5.3. Právní normy ve vztahu k ochraně pokusných a laboratorních zvířat 45
5.4. Realizační podmínky pro použití zvířat v experimentální práci 48
5.5. Kontrolní instituce 51

III. VYBRANÉ METODOLOGIE PRO PŘEDKLINICKÉ VÝZKUMNÉ FÁZE A JEJICH KLINICKO-VÝZKUMNÉ APLIKACE

6. Molekulární biologie v biomedicínském výzkumu 54
Martin Beránek

6.1. Analytické přístupy používané k izolaci nukleových kyselin 55
6.2. Amplifikační metody pro DNA analýzu *in vitro* 57
6.3. Elektroforéza nukleových kyselin 62
6.4. Hybridizace nukleových kyselin se specifickou sondou 63
6.5. Analýza polymorfismu délky restrikčních fragmentů 64
6.6. Klonování DNA 65
6.7. Sekvenování DNA 66
6.8. Projekt Lidský genom 68
6.9. Studium exprese genů 68
6.10. Studium interakcí mezi DNA a proteiny 70
6.11. Geneticky modifikované organismy 70
6.12. Klonování organismů 71
6.13. Genová terapie 72
6.14. Význam molekulární biologie pro současný biomedicínský výzkum a zdravotnictví 73
6.15. Specifické rysy biomedicínského výzkumu v oblasti molekulární biologie ... 74
6.16. Etické problémy molekulární biologie v biomedicínském výzkumu 75

7. Využití izotopů biogenních prvků v metabolickém výzkumu 77
Radomír Hyšpler

7.1. Izotopy vodíku 78
7.2. Izotopy uhlíku 79
7.3. Izotopy kyslíku, dusíku, fosforu a síry 79
7.4. Rozdíly, výhody a nevýhody využití stabilních a radioaktivních izotopů 80
7.5. Analytika stabilních a radioaktivních izotopů 81
7.6. Bezpečnost stabilních izotopů 83
7.7. Výpočty v tracerových studiích 84
7.8. Základní metodologické dělení tracerových studií 84
7.9. Vyšetřovací metody založené na poměru $^{13}CO_2/^{12}CO_2$ ve vydechovaném vzduchu 85

8. Metody měření buněčného dýchání, hodnocení funkce mitochondrií 89
Zuzana Červinková, Zdeněk Drahota

8.1. Struktura a funkce mitochondrií 89
8.2. Oxygrafické hodnocení mitochondriálního systému oxidativní fosforylace 91
8.3. Měření spotřeby kyslíku oxygrafem OROBOROS 93
8.4. Respirace izolovaných buněk inkubovaných v extracelulárním a intracelulárním médiu 94
8.5. Respirace izolovaných hepatocytů permeabilizovaných digitoninem 97

9. Mikrodialýza a její využití v experimentálním a klinickém výzkumu 100
Norbert Cibiček, Pavel Živný

9.1. Historie mikrodialýzy 100
9.2. Princip mikrodialyzační techniky 101
9.3. Složky mikrodialyzačního systému 103
9.4. Výhody a omezení mikrodialýzy 105
9.5. Metodologické aspekty mikrodialýzy 107
9.5.1. Sonda (geometrie, materiály, povrch) 107
9.5.2. Perfúzní médium (složení, teplota, rychlost průtoku) 107
9.5.3. Trubicový systém (interakce s analyty, průsvit, délka, hydrostatický tlak) 108
9.5.4. Tkáňové poškození 108
9.5.5. Analytické podmínky 109
9.5.6. Výtěžek sondy 109
9.5.6.1. Definice (absolutní, relativní, *in vitro, in vivo*) 109
9.5.6.2. Faktory ovlivňující výtěžek 110
9.5.6.3. Metody kalkulace výtěžku (a intersticiálních koncentrací látek) *in vivo* 112
9.5.7. Statistická analýza dat 114
9.6. Využití mikrodialýzy v základním a klinickém výzkumu 115
9.6.1. Obecné aplikace 115
9.6.1.1. Transmembránové procesy 115
9.6.1.2. Metabolismus (a účinek látek) ve tkáni 115
9.6.1.3. Krevní průtok ve tkáni (mikrocirkulace) 116
9.6.2. Orgánové aplikace 116
9.6.2.1. Mozek 116
9.6.2.2. Kosterní sval a myokard 117
9.6.2.3. Gastrointestinální trakt 118
9.6.2.4. Tuková tkáň 119
9.6.2.5. Plíce 119
9.6.2.6. Krev 119
9.6.2.7. Ledvina 120
9.6.2.8. Kůže 120
9.6.2.9. Kost 120
9.6.2.10. Oko 121
9.6.2.11. Nádory 121
9.6.2.12. Mléčná žláza a další tkáně 121
9.7. Závěr 121

10. Analýza dechu v experimentálním a klinickém výzkumu 123
Alena Tichá, Petr Kocna

10.1. Přehled metod využívajících analýzu vydechovaného vzduchu 123
10.2. Problematika odběru vzorku vydechovaného vzduchu 124
10.2.1. Vzorkování vydechovaných plynů 124
10.2.2. Odběr a uchování vzorku 125
10.2.3. Odběr vydechovaného vzduchu za použití odběrových vaků 126
10.3. Analytické přístroje užívané při dechových testech obecně 126
10.4. Jednotlivé metody a jejich vlastnosti a analytická instrumentace 129
10.4.1. Stanovení vodíku ve vydechovaném vzduchu 129
10.4.2. Stanovení methanu ve vydechovaném vzduchu 130
10.4.3. Stanovení isoprenu ve vydechovaném vzduchu 134
10.4.4. Dechové testy se substrátem značeným ^{13}C 138
10.5. Obecná úskalí při interpretaci výsledků dechových testů 141

11. Hodnocení kvality rostlinných bílkovin v experimentálním zvířecím modelu 142
Alena Tichá, Radomír Hyšpler

11.1. Význam biologické hodnoty proteinů 142
11.2. Dusíková bilance 145
11.3. Stanovení nutriční kvality proteinů experimentálně 145
11.3.1. Příklad protokolu experimentu 146
11.3.2. Popis experimentu 146
11.3.3. Časový rozvrh experimentu a odběry biologického materiálu 146
11.3.4. Vyhodnocení experimentu a závěr 148

12. Předklinické fáze lékových výzkumů 152
Jaroslav Květina

12.1. Principy a zdroje farmakoterapeutických inovací 152
12.2. Farmakologické předklinické testy 156
12.2.1. Výzkum léčiva v léčebné praxi dosud zcela nepoužitého 157
12.2.2. Výzkum lékové kopie (lékového generika) 157

IV. VYBRANÉ METODOLOGIE PRO KLINICKÉ STUDIE

13. Přehled základních metod a metodických přístupů používaných v klinicko-farmakologickém výzkumu 184
Jiřina Martínková

13.1. Metody a metodické přístupy používané v etapách předregistračních a poregistračních 184
13.1.1. Charakteristika etap 184
13.1.2. Metody a metodické přístupy klinicko-farmakologických etap předregistračních a poregistračních 190
13.1.2.1. Volba dávky a dávkovacího režimu k navození žádoucího terapeutického účinku a bezpečnosti využití léčivého přípravku 190
13.1.2.2. Metody hodnocení odpovědi na podání léčiva 192
13.1.2.3. Interindividuální variabilita v odpovědi 194

13.1.2.4. Biomarkery, jejich vývoj a využití ... 197
13.1.2.5. Nežádoucí účinek. Metody hodnocení a evidence ... 199
13.1.2.6. Genetický polymorfismus. Genotyp, fenotyp ... 200
13.2. Metody k individualizaci farmakoterapie ... 204
13.2.1. Metoda nomogramů ... 204
13.2.2. Terapeutické monitorování ... 204
13.3. Metody k vyhodnocení celospolečenského významu léčiva ... 206
13.4. Specifické metody klinického hodnocení ... 207
13.5. Informace o léčivu (viz též kap. 4) ... 208
13.6. Nové směry interdisciplinárního vývoje farmakologických metod v klinice ... 208

14. Imunologické metody v klinickém výzkumu ... 211
Ctirad Andrýs, Jan Krejsek

14.1. Buňkami zprostředkovaná imunita ... 211
14.1.1. Buněčný substrát imunitní odpovědi ... 211
14.1.2. Izolace buněčných populací ... 212
14.1.2.1. Gradientové izolace ... 212
14.1.2.2. Imunomagnetická separace buněk ... 213
14.1.2.3. Separace buněk pomocí průtokové cytometrie ... 213
14.1.3. Identifikace buněčných populací – cytoimunofluorometrie ... 214
14.1.3.1. Monoklonální protilátky, CD klasifikace a imunofluorescenční techniky ... 214
14.1.3.2. Průtoková cytometrie – principy fungování ... 214
14.1.3.3. Průtoková cytometrie – aplikace ... 216
14.2. Kultivace buněk imunitního systému ... 218
14.2.1. Základní charakteristika kultivačních metod *in vitro* ... 218
14.3. Stanovení solubilních markerů souvisejících s imunitním systémem ... 219
14.3.1. Metoda ELISA ... 219
14.3.2. Multiplexové analýzy ... 220
14.3.2.1. Metoda proteinových (antibody) arrays ... 221
14.3.2.2. Metoda založená na luminex technologii ... 222
14.3.3. ELISPOT analýza ... 223
14.4. Proteomika ... 223

V. VÝBĚR VÝZKUMNÝCH METOD V METABOLISMU A VÝŽIVĚ

15. Obecné přístupy k výzkumu v metabolismu a výživě ... 228
Zdeněk Zadák

15.1. Studie *in vitro* a animální *in vivo* v metabolismu a výživě ... 228
15.2. Studie *in vitro* v metabolismu a výživě ... 228
15.3. Modely v metabolismu a výživě *in vivo* ... 229
15.4. Použití experimentálních diet v metabolismu a výživě *in vivo* ... 230
15.5. Výživové studie u člověka ... 230
15.6. Epidemiologické nutriční studie ... 231

16. Metody měření složení těla v nutričním výzkumu 235
Zdeněk Zadák

16.1. Složení lidského těla na úrovni molekul a makromolekul 236
16.2. Metody měření skladby těla 237
16.3. Měření netukové a tukové hmoty těla pomocí stanovení celotělového draslíku 239
16.4. Využití zobrazovacích metod a bioimpedance ke stanovení skladby těla 240
16.4.1. Duální rentgenová absorpce 240
16.4.2. Výpočetní tomografie a magnetická rezonance 241
16.5. Stanovení skladby těla pomocí bioelektrické impedance 241
16.6. Biochemické a metabolické metody měření svalové hmoty 243
16.6.1. Stanovení svalové hmoty pomocí exkrece kreatininu 243
16.6.2. Určení množství svalové hmoty stanovením methylhistidinu v moči 243

17. Antropometrické metody a jejich využití ke stanovení složení těla 244
Miloslav Hronek

17.1. Tělesná výška 244
17.2. Tělesná hmotnost 245
17.3. Hmotnostně-výškové indexy 245
17.3.1. Body mass index – index tělesné hmotnosti 245
17.3.2. Brockův index 246
17.3.3. Rohrerův index 247
17.3.4. Verdocův index 247
17.3.5. Pignetův-Varvaekův index 247
17.3.6. Ponderální index 247
17.4. Množství tělesného tuku 248
17.4.1. Stanovení množství tuku měřením tloušťky kožních řas – kaliperací 248
17.4.2. Stanovení množství tuku kaliperací na více místech na těle 249
17.4.3. Stanovení množství tuku kaliperací na třech místech na těle 250
17.5. Zhodnocení stupně malnutrice měřením tloušťky kožní řasy *m. triceps brachii* 251
17.6. Hodnocení rozložení tělesného tuku 251
17.7. Typ obezity 252
17.8. Poměr pas/boky 252
17.9. Poměr pas/stehno 252
17.10. Střední obvod svalstva paže 253
17.11. Stanovení vrstvy podkožního tuku na principu infračervené detekce 253
17.12. Stanovení vrstvy podkožního tuku ultrazvukem 253

18. Stanovení potřeby energie 255
Miloslav Hronek, Zdeněk Zadák

18.1. Metody měření energetické potřeby 256
18.1.1. Přímá kalorimetrie 256
18.1.2. Nepřímá kalorimetrie 256
18.1.3. Výpočet klidového energetického výdeje 262
18.1.4. Výpočet utilizace nutričních substrátů 263
18.1.5. Zásady měření bazálního energetického výdeje nepřímou kalorimetrií 264

18.1.6. Základní zásady měření klidového energetického výdeje ... 265
18.1.7. Izotopové metody měření energetické potřeby ... 268

19. Stanovení potřeby aminokyselin a bílkovin ... 270
Zdeněk Zadák

19.1. Stanovení bílkovinné (dusíkové) bilance ... 270
19.2. Kreatinin-výškový index a stanovení 3-methylhistidinu ... 271
19.3. Hodnocení biologické hodnoty proteinů ... 273
19.4. Definice a stanovení potřeby esenciálních aminokyselin ... 273
19.4.1. Metody stanovení množství esenciálních aminokyselin ... 273
19.4.2. Izotopové techniky ... 274

20. Metody měření příjmu potravy v klinickém experimentu ... 275
Miloslav Hronek

20.1. Přímé měření příjmu potravy ... 275
20.2. Záznamové metody ... 276
20.3. Metoda dvojitých porcí ... 276
20.4. Metoda definované stravy ... 276
20.5. Záznam příjmu potravy vážením ... 277
20.6. Metoda semikvantativního odhadu nutričního příjmu ... 277
20.7. Anamnestické metody ... 279
20.8. 24hodinový záznam ... 280
20.9. Frekvenční nutriční anamnéza ... 280
20.10. Výživová anamnéza ... 281
20.11. Hodnocení chuťové preference ... 281

21. Metabolické funkční testy ... 283
Terezie Pelikánová, Zdeněk Zadák

21.1. Glykemický CLAMP ... 283
Terezie Pelikánová
21.1.1. Hyperinzulinový euglykemický clamp a hyperinzulinový izoglykemický clamp ... 284
21.1.1.1. Princip a provedení obecně ... 284
21.1.1.2. Technický postup ... 284
21.1.1.3. Hodnocení ... 289
21.1.1.4. Interpretace výsledků a zdroje chyb ... 290
21.1.2. Modifikovaný inzulinový eu/IZOglykemický clamp ... 291
21.1.3. Hyperglykemický clamp ... 292
21.1.3.1. Princip a provedení obecně ... 292
21.1.3.2. Technický postup ... 292
21.1.3.3. Hodnocení ... 293
21.1.4. Hypoglykemický clamp ... 293
21.1.4.1. Princip a provedení obecně ... 293
21.1.4.2. Technický postup ... 294
21.1.4.3. Praktický postup ... 294
21.1.4.4. Hodnocení ... 295
21.1.5. Nevýhody a rizika clampových technik ... 295

21.1.6. Využití clampových technik ... 296
21.2. Metody stanovení inzulinové senzitivity/rezistence ... 297
21.2.1. Inzulinová senzitivita/rezistence ... 297
21.2.2. Metody měření inzulinové senzitivity/rezistence ... 299
21.2.2.1. Hyperinzulinový eu/IZOglykemický clamp ... 299
21.2.2.2. Minimální model FSIGT a modifikovaný FSIGT ... 299
21.2.2.3. Index podle Matsudy ... 301
21.2.2.4. Homeostasis model assessment ... 302
21.2.2.5. Index Quicki ... 303
21.2.2.6. Continuous Infusion of Glucose with Model Assessment ... 304
21.2.2.7. Inzulin senzitivní test ... 304
21.2.2.8. Zkrácený inzulinový toleranční test ... 305
21.2.2.9. Další způsoby testování ... 305
21.3. Technika triglyceridemického clampu ... 307
Zdeněk Zadák
21.3.1. Mechanismus začlenění tuků a partikulí tukové emulze bohatých na triglyceridy do metabolických procesů ... 307
21.3.2. Metoda provedení triglyceridemického clampu ... 309
21.3.3. Praktické provedení triglyceridemického clampu ... 310

22. Nové směry ve výzkumu metabolismu a výživy ... 312
Zdeněk Zadák
22.1. Transkriptomika ve výživě ... 312
22.2. Proteomika v nutričním výzkumu ... 314
22.3. Metabolom v nutričním výzkumu ... 315
22.4. Lipidom ve výzkumu výživy ... 315

Zkratky ... 317
Rejstřík ... 325