



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

PRVKOVÁ ANALÝZA MĚKKÝCH TKÁNÍ V PARAFÍNU METODOU SPEKTROSKOPIE LASEREM BUZENÉHO PLAZMATU

MULTI-ELEMENT ANALYSIS OF SOFT TISSUES IN PARAFFIN BY LASER INDUCED BREAKDOWN SPECTROSCOPY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Hana Kopřivová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Pavel Pořízka, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1626/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Hana Kopřivová**
Studijní program: Spotřební chemie
Studijní obor: Spotřební chemie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Pavel Pořízka, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Prvková analýza měkkých tkání v parafínu metodou spektroskopie laserem buzeného plazmatu

Zadání diplomové práce:

1. Prostudovat problematiku daného tématu a sepsat literární rešerši.
2. Srovnání metod analytické chemie s důrazem na LIBS.
3. Optimalizovat parametry měření vzorků měkkých tkání v parafínu s cílem dosáhnout co nejlepší citlivosti a intenzity.
4. Detekovat relativní zastoupení makrobiogenních prvků.
5. Analýza distribuce prvků v matrici.

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Hana Kopřivová
studentka

doc. Ing. Pavel Pořízka, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá analýzou měkkých tkání zalitých v parafínu pomocí metody spektroskopie laserem buzeného plazmatu (LIBS) a pomocí doplňkové techniky hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem s laserovou ablací (LA-ICP-MS). Konkrétně se práce zaměřuje na optimalizaci parametrů měření měkkých tkání pro femtosekundový a nanosekundový pulzní laser s různými vlnovými délkami na myších ledvinách, jakožto modelové matrice měkké tkáně. Následovala prvková analýza několika vzorků nejčastěji se vyskytujících typů rakoviny lidské kůže (maligní melanom, bazocelulární karcinom a spinocelulární karcinom) pomocí výše zmíněných analytických metod. Analýzou vzorků byly získány mapy prostorových distribucí biogenních prvků. Cílem práce je ukázat možnost využití nových analytických metod, které by neměly nahradit klasické histologické vyšetření, ale být například využívány pro předběžné vyšetření napadené tkáně nebo čistě jako pomocné techniky pro histology při diagnostice nádorů. Obě tyto metody by mohly do budoucna nabídnout kompletně nový pohled na diagnostiku rakoviny u měkkých tkání.

Abstract

This thesis deals with the analysis of paraffin-embedded soft tissues using laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) and the complementary technique of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). Specifically, the work focuses on optimizing soft tissue LIBS measurement parameters for femtosecond and nanosecond pulsed laser ablation at different wavelengths on mouse kidneys as a soft tissue model matrix. In addition, elemental analyses were performed on several samples of the most commonly occurring human skin cancers (malignant melanoma, basal cell carcinoma, and squamous cell carcinoma) using the above-mentioned analytical methods. Maps of the spatial distributions of biogenic elements were obtained. Aim of this work is to show a potential of new analytical methods that are not intended to replace the classical histological examination completely. However, these techniques could be used for preliminary screening of tumor tissue or purely as a complementary technique for histologists to diagnose cancers. Both methods could offer a completely new perspective on soft tissue cancer diagnosis in the future.

Klíčová slova

spektroskopie laserem buzeného plazmatu (LIBS), měkké tkáně, nádorové onemocnění lidské kůže, biozobrazování, hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem s laserovou ablací (LA-ICP-MS)

Key words

laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS), soft tissues, human skin cancer, bioimaging, laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS)

Citace

KOPŘIVOVÁ, Hana. *Prvková analýza měkkých tkání v parafínu metodou spektroskopie laserem buzeného plazmatu* [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-05-11]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139807>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Pavel Pořízka

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

Bc. Hana Kopřivová

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce doc. Ing. Pavlu Pořízkovi Ph.D. za jeho čas, odborné vedení a cenné rady, které mi poskytoval pro vypracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat všem členům ze skupiny Laserové spektroskopie z CEITEC, VUT (RG1-6) a MUDr. Kateřině Kiss za poskytnutí konzultací, pomoci při práci v laboratoři a při zpracování výsledků. Také bych chtěla poděkovat prof. Andreasi Limbeckovi a Dr. Lukasi Brunnbauerovi za pomoc při LA-ICP-MS analýzách a za poskytnutí prostor pro měření na Technické univerzitě ve Vídni. Moje poděkování také patří doc. RNDr. Marcele Buchtové, PhD. a jejímu týmu z Akademie věd České republiky za poskytnutí vzorků pro analýzy a za konzultace. V neposlední řadě děkuji své rodině za nesmírnou podporu po celou dobu studia.

OBSAH

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | ÚVOD..... | 7 |
| 2 | TEORETICKÁ ČÁST | 8 |
| 2.1 | Lidská kůže..... | 8 |
| 2.1.1 | Epidermis | 8 |
| 2.1.2 | Dermis..... | 9 |
| 2.1.3 | Hypodermis..... | 10 |
| 2.1.4 | Nádorové onemocnění kůže..... | 10 |
| 2.1.5 | Prvkové změny v nádorové tkáni..... | 12 |
| 2.1.6 | Diagnostika nádorového onemocnění kůže | 12 |
| 2.2 | Úvod do spektroskopie | 13 |
| 2.3 | Spektroskopie laserem buzeného plazmatu..... | 14 |
| 2.3.1 | Historie..... | 14 |
| 2.3.2 | Princip metody LIBS | 14 |
| 2.3.3 | Laserem buzené plazma..... | 15 |
| 2.3.4 | Instrumentace..... | 15 |
| 2.3.5 | Výhody a nevýhody techniky LIBS | 17 |
| 2.3.6 | Využití v praxi | 18 |
| 2.4 | Biozobrazování..... | 19 |
| 2.5 | LA-ICP-MS | 20 |
| 2.5.1 | Princip metody LA-ICP-MS..... | 20 |
| 2.5.2 | Výhody a nevýhody techniky | 21 |
| 3 | SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY | 22 |
| 3.1 | Analýza nádorů kůže metodou spektroskopie laserem buzeného plazmatu | 22 |
| 3.2 | Analýza kožních nádorů pomocí dalších analytických metod | 26 |
| 4 | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 29 |
| 4.1 | Použité chemikálie..... | 29 |
| 4.2 | Příprava vzorků | 29 |
| 4.2.1 | Vzorky zalité v parafínu | 29 |
| 4.2.2 | Řezy na laboratorním skle | 31 |
| 4.3 | Použité přístroje a software | 31 |
| 4.4 | Analýza pomocí metody LIBS | 31 |
| 4.4.1 | Popis aparatury | 31 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.4.2 | Metodika měření | 33 |
| 4.4.3 | Nastavení optimálních podmínek měření pro LIBS analýzu..... | 33 |
| 4.4.4 | Zpracování LIBS dat..... | 35 |
| 4.5 | Analýza pomocí LA-ICP-MS..... | 36 |
| 4.5.1 | Nastavení optimálních podmínek měření pro LA-ICP-MS analýzu | 37 |
| 4.5.2 | Zpracování LA-ICP-MS dat | 37 |
| 5 | VÝSLEDKY A DISKUZE..... | 38 |
| 5.1 | Nastavení optimálních podmínek měření pro prostorově rozlišenou analýzu | 38 |
| 5.2 | Femtosekundový laser | 38 |
| 5.3 | Nanosekundový laser..... | 42 |
| 5.4 | Prostorově rozlišená analýza zdravé kůže s využitím LIBS | 47 |
| 5.5 | Prostorově rozlišená LIBS analýza nádorových tkání..... | 51 |
| 5.5.1 | Maligní melanom..... | 52 |
| 5.5.2 | Spinocelulární karcinom | 54 |
| 5.5.3 | Bazocelulární karcinom | 54 |
| 5.6 | Prostorově rozlišená LA-ICP-MS analýza nádorových tkání | 56 |
| 5.6.1 | Spinocelulární karcinom | 56 |
| 5.6.2 | Maligní melanom..... | 58 |
| 5.6.3 | Bazocelulární karcinom | 60 |
| 6 | ZÁVĚR..... | 62 |
| 7 | SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ | 64 |
| 8 | SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK..... | 72 |

1 ÚVOD

Kůže je největší orgán lidského těla, který slouží jako ochrana před vnějšími vlivy. Tyto nepříznivé vlivy prostředí mohou být příčinou vzniku různých onemocnění kůže, například rakoviny. Existují dva typy nádorového onemocnění kůže. Prvním z nich je nezhoubný nádor, který většinou není pro člověka nebezpečný. Druhým typem je nádor zhoubný, který může v určitých případech metastázovat a velmi ohrožovat život jedince. Rakovina kůže je jedním z nejčastěji se vyskytujících nádorových onemocnění obecně, proto je extrémně důležitá častá prevence.

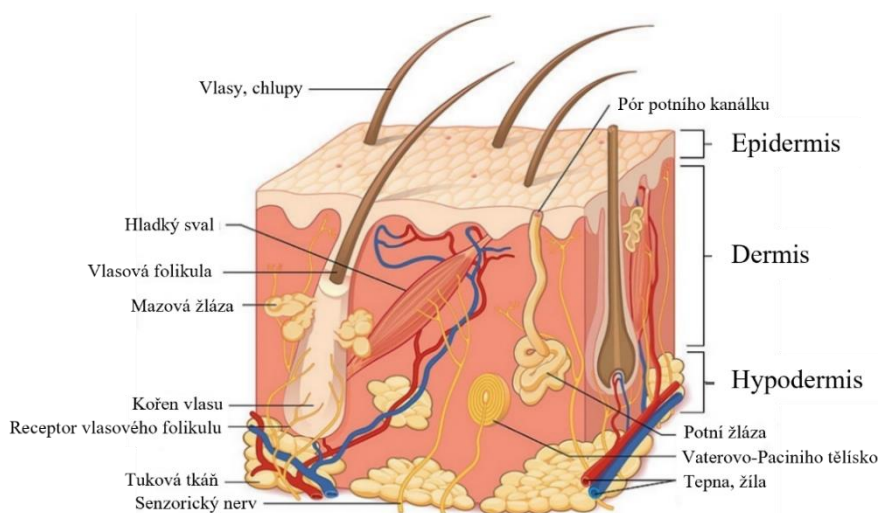
Stále se hledají nové metody, které by pomohly histologům při diagnostice a analýze rakovinových tkání. V dnešní době je nejčastěji využívána k diagnostice standartní excize nebo Mohsova mikrografická chirurgie, tedy chirurgické odstranění rakovinné tkáně včetně bezpečnostního lemu zdravé kůže a následné mikroskopické vyšetření vzorku. Problémem tohoto postupu je prodloužená doba operace kvůli opakovanému histologickému vyšetření během zákroku, což zvyšuje riziko komplikací, jako je například infekce rány. Dalším problémem je správné odhadnutí bezpečnostního lemu při odstraňování nádorů, a to zejména u starších pacientů, pro které je každý chirurgický zákrok navíc nebezpečný. Proto je velmi žádoucí alternativní nebo podpůrná technika, která by přesně a rychle určila oblast rakoviny a odpovídající bezpečnostní rozpětí zdravé kůže, aby nebylo nutné provádět operace opakovaně.

Z tohoto důvodu se diplomová práce zabývá přiblížením dvou biozobrazovacích analytických technik, jelikož stanovení koncentrace chemických prvků a jejich distribuce je nesmírně důležité v různých oblastech biologického a lékařského výzkumu. Chemické změny v tkáni lze pozorovat pomocí těchto analytických technik, které by bylo možné v budoucnosti používat právě k diagnostice nádorů, jelikož jejich výstupy mohou poskytnout jedinečné informace o různých fyziologických a patofyziologických procesech ve zkoumaných tkáních. Jednou z těchto metod je spektroskopie laserem buzeného plazmatu (LIBS), jakožto kvazidestruktivní analytická metoda, která je schopná poskytnout rozsáhlé informace o rozložení biogenních chemických prvků v měkké tkáni zalité v parafínovém bloku, například vápníku (Ca) a hořčíku (Mg), kdy zvýšená koncentrace právě hořčíku má podle stávajících výzkumů spojitost s malignitou tkáně. Druhou metodou je hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem s laserovou ablací (LA-ICP-MS). V této práci byl kladen důraz především na stanovení zinku (Zn) v měkké tkáni na laboratorním skle, jakožto možného biomarkeru rakoviny. Obě tyto metody lze využít pro kontinuální mapování biologických tkání s možností vizualizace tkáně a sestavení mapy prostorové distribuce chemických prvků.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Lidská kůže

Kůže je největší orgán lidského těla tvořící přibližně 15 % celkové hmotnosti dospělého člověka s plošným rozsahem asi 1,5–2 m² [1]. Slouží primárně k ochraně organismu před vnějšími fyzickými, chemickými a biologickými vlivy nebo například k ochraně proti účinkům ultrafialového záření. Dále potom k přijímání smyslových podnětů z vnějšího okolí díky nespočtu nervů, k udržování homeostázy nebo k termoregulaci. Nesmí se ani zapomenout na funkci kůže, jakožto místa, kde dochází k syntéze vitamínu D nebo jako zásobárny vody [2]. Skládá se ze tří vrstev: epidermis, dermis a hypodermis (Obrázek 1). Tyto vrstvy jsou orientované tak, aby se jednotlivé vrstvy strukturálně a funkčně doplňovaly. Specializované funkce a tloušťka jednotlivých vrstev (1–4 mm) se liší podle umístění na lidském těle [3].



Obrázek 1: Anatomie kůže [4].

2.1.1 Epidermis

Pokožka (latinsky *Epidermis*) je nejsvrchnější vrstva kůže tvořená vrstevnatým dlaždicovým epitelem [5]. Jedná se o neustále se obnovující strukturu, která je složená zejména z keranocytů (syntéza keratinu) a z dendritických buněk, mezi které patří melanocyty, Langerhansovy buňky nebo mechanoreceptory (Merkelovy buňky, Meissnerova tělíska a Vaterovo-Paciniho tělíska) [3,6]. Dělí se na další vrstvy (Obrázek 2) podle morfologie a polohy keranocytů, které se diferencují v rohovité buňky. Spodní vrstvy jsou tvořeny živými buňkami a vrstva nejsvrchnější jsou buňky převážně zrohovatělé [5].

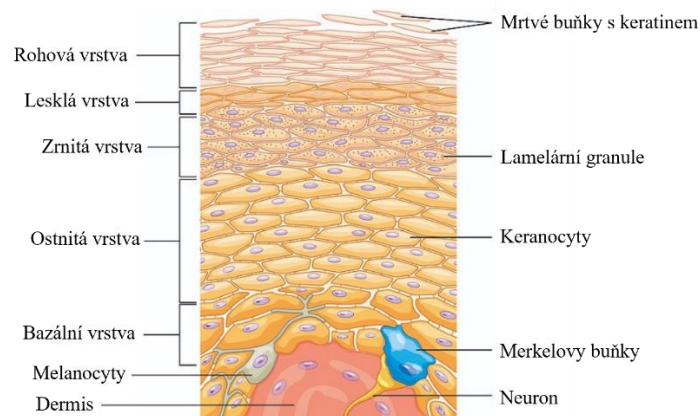
Rohová vrstva (latinsky *stratum corneum*) neboli povrchová vrstva lidské kůže slouží především k mechanické ochraně. Dvěma hlavními složkami jsou lipidy (ceramidy, cholesterol, mastné kyseliny) a korneocyty. Jedná se o velké a ploché rohovité buňky polyedrického tvaru, které již ztratily svá jádra v důsledku terminální diferenciace, a tudíž se považují za buňky mrtvé. Tyto mrtvé buňky jsou velmi bohaté na bílkoviny. Postupně se odlupují z povrchu kůže a nahrazují je buňky ze spodnějších vrstev (deskvamace) [1,6].

Lesklá vrstva (latinsky *stratum lucidum*) se skládá ze zploštělých a na sebe navazujících buněk obsahujících *eleidin* (prekurzor keratinu) Tato vrstva se nachází pouze na dlaních a chodidlech, tedy v nejtlustších oblastech kůže [2,7].

Zrnitá vrstva (latinsky *stratum granulosum*) se skládá z jedné až čtyř řad zploštělých buněk obsahujících ve své cytoplazmě nepravidelné granule keratohyalinu, které se vyskytují v náhodných řadách nebo mřížkách. Jsou zodpovědné za další syntézu a modifikaci proteinů podílejících se na keratinizaci [1,3,7].

Ostnitá vrstva (latinsky *stratum spinosum*) je nejtlustší ze všech (5–10 vrstev buněk). Někdy se tato vrstva také může nazývat Malpighova vrstva nebo dlaždicová vrstva, protože při migraci do této vrstvy ztrácejí sloupcovité keranocyty vodu a získávají polyedrický tvar, ale zachovávají si svůj mezibuněčný kontakt [1,7].

Bazální vrstva (latinsky *stratum basale*) je nejhlubší a základní vrstva epidermis složená ze sloupcovitých keranocytů, které se připojují svojí delší stranou k dermis. Keranocyty tvoří jednu vrstvu a přiléhají k sobě i k ostnitě vrstvě pomocí desmosomálních spojů. Mezi další typický znak této vrstvy patří tmavě zbarvená oválná jádra buněk a přítomnost melanocytů. Dochází zde k dozrávání buněk [1]. Melanocyty jsou dendritické buňky vycházející z nervového hřebene, které obsahují pigment melanin, jenž chrání před UV zářením. Melanocyty jsou uspořádány vodorovně nad dermis [2].



Obrázek 2: Stavba epidermis [4].

2.1.2 Dermis

Škára (latinsky *dermis* nebo *corium*) tvoří většinu tloušťky kůže (1–3 mm) a zajišťuje její pružnost, odolnost a pevnost. Obsahuje smyslové receptory. Jedná se o systém tuhé, vazivové, vláknité a pojivové tkáně, který ve své struktuře obsahuje krevní cévy, nervy, folikuly vlasů a chlupů, mazové žlázy, potní žlázy nebo lymfatické cévy [1,6]. Úzce spolupracuje s epidermis zejména při opravě a přestavbě kůže při hojení ran. Hlavní složkou dermis je vláknitý protein kolagen typu I. Jedná se o hlavní strukturální bílkovinu těla, která se nachází ve vazech, šlachách, ve výstelce kostí a v neposlední řadě v dermis. Kolagen představuje 70 % suché hmotnosti kůže [1]. Mezi další složku dermis patří například kyselina hyaluronová nebo glykosaminoglykany, které slouží k zadržování vody v těle [3]. Dermis

se dělí se na dvě vrstvy. Povrchová vrstva bradavková (*stratum papillare*) se skládá z volné pojivové tkáně, volných elastických vláken a kolagenu. Druhou vrstvou je hluboká vrstva síťová (*stratum reticulare*), která je hustší a obsahuje především kolagenová a elastinová vlákna, nervová zakončení, lymfatické cévy a svaly (např. napřimovače chlupů) [2,7].

2.1.3 Hypodermis

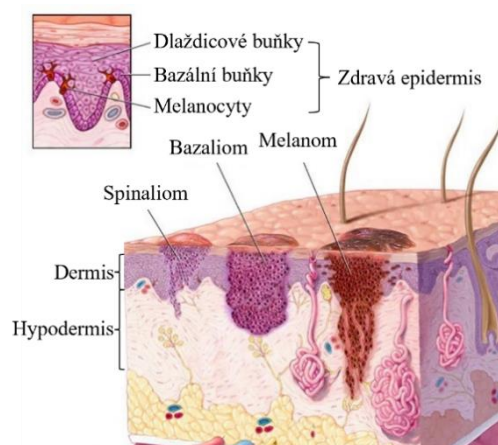
Podkoží (latinsky *Hypodermis*) se skládá z různého množství podkožního tuku, který slouží k termoregulaci, jako zásobárna energie, k tlumení nárazů nebo k ukládání vody v těle [6]. Je to vysoce prokrvená vrstva protkaná velkým množstvím cév tvořená řídkým kolagenním vazivem. Rozložení podkožního tuku je ovlivněno řadou faktorů, mezi které patří například výživa, věk, činnost žláz a v neposlední řadě pohlaví jedince, kdy u mužů se pohybuje kolem 10–15 % a u žen kolem 20 % z celkové hmotnosti jedince [2,7].

2.1.4 Nádorové onemocnění kůže

Kůže pokrývá celé lidské tělo a chrání ji před vnějšími vlivy. Tyto nepříznivé vlivy okolí mohou způsobovat jak lehké onemocnění kůže, tak i například nádorové onemocnění. Nádor se dá obecně označit jako onemocnění, při kterém dochází k nekontrolovatelnému dělení a růstu tělesných buněk a jejich šíření do dalších částí těla. Rakovina je onemocnění, které je způsobeno změnami v genech, jež řídí naše buňky [8]. Na vzniku kožního nádoru se nejčastěji podílí UV záření, ale i genetická predispozice. Dalším parametrem je i stáří člověka, kdy se výskyt rakoviny kůže výrazně zvyšuje s věkem. Existují dva základní typy nádorů, zhoubné a nezhooubné [9].

Nezhoubné (benigní) nádory jsou shluky buněk, které nemají schopnost napadat okolní tkáň nebo se šířit dále po těle (metastázovat). Nejčastěji neohrožují život člověka. Jedná se například o dysplastický névus, mateřské znaménko, lipom nebo hemangiom [8].

Zhoubné (maligní) nádory kůže mají v některých případech schopnost metastázovat, jsou invazivní a rostou mnohem rychleji než nádory benigní. Jsou velmi nebezpečné a poměrně velmi časté. Každý rok přibývá několik milionů případů tohoto typu onemocnění především u bělošské populace. Jedná se o nejrozšířenější lidský typ nádorů obecně [8].



Obrázek 3: Typy nádorového onemocnění kůže [10].

Kožní nádory se pojmenovávají a dělí podle typu buňky, ze které vychází (výchozí tkáň) nebo podle svého chování. Mezi nejznámější typy patří bazocelulární karcinom (bazaliom, BCC), spinocelulární karcinom (dlaždicobuněčný karcinom, spinaliom, SCC) a maligní melanom [9].

Nemelanomové kožní nádory

Mezi tyto nádory patří bazocelulární karcinom a dlaždicobuněčný karcinom. Tyto dva druhy tumorů jsou zapříčiněny především dopadem UV záření na místa, jež jsou často vystavovaná Slunci (obličej, záda, končetiny). Jedná se o nádory, které se objevují velmi často, ovšem pouze s 1 % úmrtností [11].

Bazaliom (z anglického *Basal Cell Carcinoma*, BCC) je typ kožního nádoru, který pomalu roste, je lokální a u kterého se vyskytují metastázy pouze výjimečně. Může ovšem způsobit velmi vážné problémy, pokud dojde k lokální destrukci tkáně a k infiltraci do dalších orgánů [12]. Vzniká v bazální vrstvě epidermis při kumulativní mutaci DNA (nejčastěji gen PTCH1) kvůli expozici kůže slunečnímu záření a následnému vzniku thyminových dimerů. Bazální buňky produkují nové buňky, které vytlačují do vyšších vrstev starší buňky. Tento proces tvorby nových buněk je řízen DNA bazálních buněk. Při mutaci DNA buňky dochází k rychlému množení, růstu a tvorbě rakovinného útvaru na povrchu kůže [10]. Další možností vzniku bazaliomů jsou syndrom bazocelulárního névu (Gorlinův syndrom) nebo onemocnění *Xeroderma pigmentosa* a *Albinismus*. Tento tumor se obecně projevuje růžovými výrůstky, červenými skvrnami nebo otevřenými rankami. Existuje několik podtypů bazaliomů. Léčí se lokálně nebo chirurgickým odstraněním [11–14].

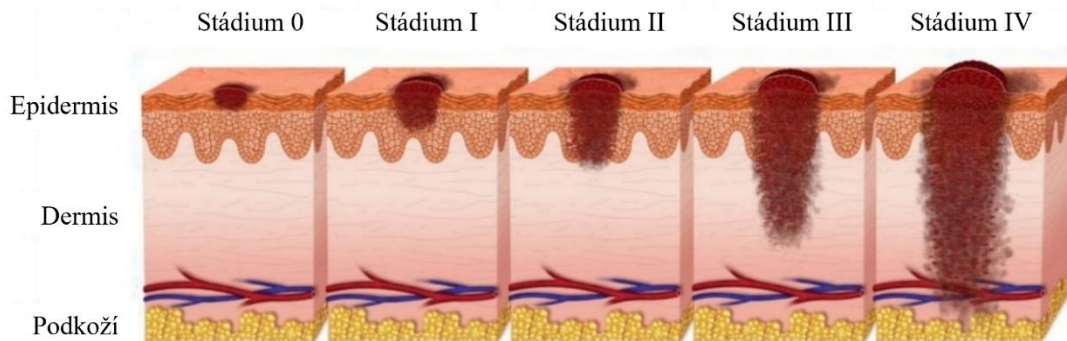
Spinaliom (z anglického *Squamous Cell Carcinoma*, SCC) je maligní epitelový typ lokálního kožního nádoru vznikající abnormálně rychlým růstem dlaždicových buněk v epidermis, který v 5–10 % případech metastázuje do blízkých uzlin. Opět zde hraje významnou roli při vzniku nádoru UV záření, kdy dochází k poškození DNA (mutace genu p53), které vyvolá změny v chování dlaždicových buněk. Dochází k expanzi mutovaných buněk na úkor buněk normálních [15]. Tento nádor se vyskytuje při dlouhodobém až chronickém vystavování Slunci. Další možností vzniku spinaliomu je vystavování kůži průmyslovým karcinogenům (např. dehet, arsen), infekce HIV nebo při poruchách imunity. Riziko vzniku nádoru zvyšují faktory jako nízké množství melaninu v kůži nebo věk [11,16]. Projevuje se vznikem šupin na povrchu kůže, mírným zčervenáním nebo otevřenými rankami, kdy může docházet ke krvácení. Existují dvě dědičná onemocnění, které rapidně zvyšují riziko spjaté s onemocněním nádoru spinaliomu. Jedná se o onemocnění *Xeroderma pigmentosa* a *Albinismus* [15].

Kožní maligní melanom

Jedná se o nejproblémovější a nejagresivnější kožní nádor. Tvoří pouze 4 % všech případů rakoviny kůže, ale je příčinou až 75 % všech úmrtí obecně na nádorové onemocnění kůže [17]. Vysoká úmrtnost je spojená s tím, že melanomy postihují lymfatické uzliny nebo metastázuje a dostávají se i k jiným orgánům, které napadají [18]. Nejčastěji vzniká z epidermálních melanocytů jako nové klasické znaménko nebo popřípadě z již existujícího

znaménka, které mění svoji strukturu. Mezi příznaky maligního melanomu patří změna velikosti a tvaru znaménka, výtok nebo krvácení, popřípadě tvrdost či oteklost znaménka [13].

Podle stádia melanomu (Obrázek 4) se rozdělují melanomy do pěti stádií. Obecně platí, že čím větší číslo, tím je nádor agresivnější a onemocnění je vážnější. U stádia 0 je nádor na vrchní vrstvě epidermis. V prvním stádiu dochází k prostupu nádoru do dermis podobně jako ve stádiu II. Tyto dvě stádia se liší pouze tloušťkou nádoru. Ve stádiu III již dochází k napadení lymfatických uzlin. V posledním stádiu se rakovina rozšiřuje i do okolních tkání lidského těla (např. plíce, játra, střeva) [19].



Obrázek 4: Stádia maligního melanomu [19].

U maligního melanomu je nesmírně důležitá včasná diagnóza. Při podezření na maligní melanom se nejčastěji provádí kožní biopsie, kdy dochází k histologickému vyšetření odebraného vzorku tkáně. Tato metoda se v dnešní době považuje za klasickou a standartní metodu, ovšem je poměrně časově náročná a v některých případech i neprůkazná [17].

2.1.5 Prvkové změny v nádorové tkáni

Uspořádání a koncentrace chemických prvků v buněčném prostředí jsou určujícím faktorem morfologie tkáně. Ta se mění v závislosti na tom, jak se buňky dělí a vyvíjejí. Při přeměně buňky ze zdravé na tumorovou dochází ke kvantitativní i prostorové změně uspořádání prvků v tkáni. Tyto procesy se odehrávají před všemi morfologickými změnami nebo před imunoaktivitou. Tzv. Warburgův efekt je společný pro všechny typy rakoviny. Spočívá ve zvýšené produkci ATP, biosyntéze čtyř hlavních tříd makromolekul (proteiny, lipidy, sacharidy a nukleové kyseliny) a zpřísnění redoxní kontroly. Toto slouží jako předstupeň nádorového růstu a diferenciaci, kdy následuje buněčné dělení, angiogeneze, autoimunitní reakce a případné metastázování. Dochází ke změnám v metabolismu, které jsou spojeny s jemnými rozdíly mezi chemickým složením zdravých a zhoubných buněk. Tyto změny v distribuci chemických prvků by se mohly využít k diagnostice nádorových tkání s využitím zobrazovacích analytických technik s dostatečným prostorovým rozlišením [20,21].

2.1.6 Diagnostika nádorového onemocnění kůže

V dnešní době existuje mnoho možností, jak rakovinu kůže diagnostikovat a posléze léčit, pokud se zachytí v počátečním stádiu. Z tohoto důvodu je proto velmi důležitá častá prevence u kožního lékaře a v případě pozitivního nálezu včasné a pečlivé odstranění nádoru [9,13].

Existuje několik možností, jak diagnostikovat kožní nádory. Nejčastěji dochází k diagnostice všech druhů nádorů pomocí klasického histologického vyšetření s využitím barvení hematoxylinem a eozinem (Mohsova mikroskopická chirurgie). Rozšířením klasické histologie je imunohistochemie. Jedná se o histologickou techniku barvení, která pracuje na principu detekce jednotlivých tkáňových antigenů pomocí specifických primárních protilátek. Další možností diagnostiky je dermatoskopie s využitím dermatoskopu. Tato metoda umožňuje vizualizovat určité morfologické znaky kožních lézí, které jsou pro pouhé oko velmi špatně viditelné. Pro diagnostiku je možné využít i vysokofrekvenční ultrazvuk, který je schopen určit i tloušťku nádoru. Ve výzkumu se používá technika elektronové mikroskopie, která dokáže odhalit subcelulární strukturu indikující diferenciaci. Mezi další konvenční metody patří i počítačová tomografie, magnetická rezonance nebo fluorodeoxyglukózová pozitronová emisní tomografie. Každá z těchto výše zmíněných metod má své plusy i minusy. Proto je cílem tyto metody zkombinovat nebo objevit metody nové [22,23].

V posledních letech se začínají objevovat nové techniky, které by pomohly zpřesnit diagnostiku kožních nádorů. Mezi tyto metody patří například komparativní genomová hybridizace (z anglického *Comparative Genome Hybridization*, CGH), technika PCR (z anglického *Polymerase Chain Reaction*), Ramanova spektroskopie nebo vyšetření konfokálním skenovacím laserovým mikroskopem (SCLM). Poměrně populární a již velmi dobře prozkoumaná je v dnešní době technika LA-ICP-MS v oblasti diagnostiky malignity tkáně. V neposlední řadě mezi tyto nové a slibné techniky patří metoda spektroskopie laserem buzeného plazmatu (LIBS) [22,24].

Mezi možnosti léčby nádorového onemocnění kůže patří chirurgické odstranění nádoru, chemoterapie, kryochirurgie, radioterapie, imunoterapie a cílená nebo podpůrná léčba [24].

2.2 Úvod do spektroskopie

Spektroskopie je obecně charakterizována jako metoda, při které dochází k interakci mezi zářením a hmotou. Základy spektroskopie položil fyzik G. R. Kirchhoff, podle kterého má každá čistá látka své charakteristické spektrum [25].

Spektroskopické techniky jsou hojně využívány v technických oblastech vědy a techniky, jako jsou například chemie, fyzika, mechanika či biologie. Využívají se pro studium struktur atomů a molekul. Tyto techniky se dají použít jak pro kvalitativní, tak pro kvantitativní analýzu. Vyznačují se velmi vysokou citlivostí [26].

Hlavní dělení spektroskopických metod je na metody absorpční a emisní. Mezi základní metody spektroskopie patří atomová spektroskopie, rentgenová spektroskopie, molekulová spektroskopie a mnoho dalších. Tyto metody se od sebe odlišují nejčastěji podle způsobu interakce záření s hmotou [25].

Jednou z nejzákladnějších analytických metod pro prvkovou analýzu je optická emisní spektroskopie – OES nebo jinak atomová emisní spektroskopie – AES (z anglického *Optical Emission Spectrometry* a *Atomic Emission Spectrometry*). Tato metoda je založená na pozorování záření emitovaného excitovanými atomy a ionty prvků v plynném stavu. Při

dodání energie do systému (tepelná energie, elektrická energie) dochází k atomizaci vzorku a následné excitaci valenčních elektronů atomu. V excitovaném stavu setrvává elektron velmi krátkou dobu. Při deexcitaci, přechodu na základní energetickou hladinu, dochází k emisi elektromagnetického polychromatického záření. Toto záření charakterizuje zkoumaný systém. Pro kvalitativní analýzu se využívá poloha čar ve spektru (vlnová délka emitovaného záření) a pro kvantitativní analýzu se využívá intenzita emitovaného záření. Výsledkem měření je čárové spektrum. Spektrální oblast pro OES se pohybuje v rozmezí 165 až 900 nm [26].

2.3 Spektroskopie laserem buzeného plazmatu

Spektroskopie laserem buzeného plazmatu LIBS, z anglického *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*, je metodou optické emisní spektroskopie. Je to všestranná analytická mikro-destruktivní technika, která při interakci vzorku s laserovým paprskem tvoří plazmatický útvar. Laserem buzené plazma emituje elektromagnetické záření, které charakterizuje vlastnosti daného materiálu a umožňuje kvalitativní a kvantitativní analýzu prvků s citlivostí v řádech ppm (z anglického *Parts per Milion*) [27].

2.3.1 Historie

Tato metoda je vyvíjena od počátku 80. let 20. století, ačkoliv první práce zabývající se metodou LIBS jsou již z roku 1960 [28]. Až v 80. letech minulého století se začala metoda LIBS více rozvíjet společně s rozvojem instrumentace, především laserových zdrojů, které byly kompaktnější, odolnější a levnější. Dalším impulzem pro rozvoj této metody bylo vyvinutí spektrometrů s lepšími detekčními limity nebo možností zpracovávat větší objemy dat a efektivně je vyhodnocovat [29]. V posledních letech dochází k vývoji dalších typů LIBS pro specifické aplikace. Pravděpodobně nejznámějším příkladem je LIBS pro dálkovou analýzu objektů [30] nebo analýza biologických tkání v medicínských aplikacích [20].

2.3.2 Princip metody LIBS

Při dopadu zaostřeného laserového pulzu o vysokém špičkovém výkonu na povrch analyzovaného materiálu dochází k řadě reakcí, při kterých se tvoří laserem buzené plazma. Dochází k odpaření malého množství materiálu, kde následně vzniká kráter. Ablatovaný materiál stlačuje atmosféru v okolí vzorku a dochází ke vzniku rázové vlny. V tomto okamžiku dochází k řadě dalších jevů, jako například velmi rychlý lokální ohřev, tavení, odpařování materiálu, atomizace, excitace a ionizace vzorku [31]. Při přechodu zpět do základního elektronového stavu částice vyzařují charakteristické elektromagnetické záření pro daný materiál, díky kterému jsme schopni určit jednotlivé prvky obsažené v matrici [27].



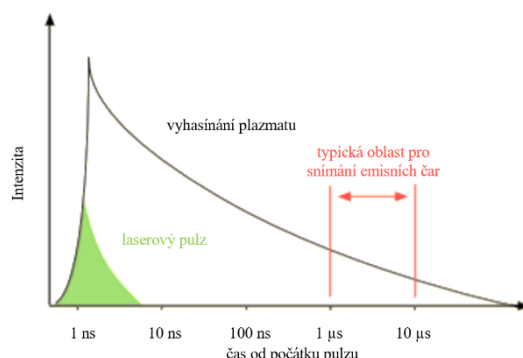
Obrázek 5: Princip metody LIBS [32].

2.3.3 Laserem buzené plazma

Plazma je čtvrté skupenství hmoty neboli kvazineutrální ionizovaný plyn, jehož částice vykazují kolektivní chování [33].

Laserem buzené plazma je zdrojem analytické informace pro techniku LIBS. Vzniká po dopadu vysokoenergetického laserového pulzu na povrch materiálu. Skládá se z neutrálních částic, kladně nabitých částic (kationty) a záporně nabitých částic (elektrony, anionty). Vzniká dodáním dostatečného množství energie molekulárnímu plynu, které je vyšší než vazebné energie jednotlivých stavů hmoty. Dochází ke změně skupenství (fázovému přechodu) [34]. Hustota výkonu potřebná pro iniciaci plazmatu je přibližně 1 GW/cm^2 pro pevné látky. Vzniklé plazma se vyznačuje rychlým časovým vývojem a nehomogenitou [31].

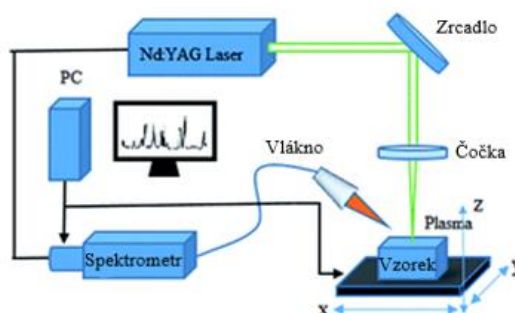
Důležitým parametrem techniky LIBS je doba života plazmatu. Po skončení laserového pulzu se plazma rozptýlí do atmosféry. Toto plazma se nazývá přechodné. V momentě, kdy přestane dopadat energie z laseru na materiál, nastává ochlazení plazmatu [35]. Při ochlazování plazmatu začne být emitováno několik druhů záření. Na začátku je brzdné záření tvořící analyticky bezvýznamné kontinuum. Následuje čárová emise iontů, která je již využitelná pro spektroskopii (okolo 100 ns po ablaci vzorku). Dále pak dochází k vyzařování atomových čar a později při nižší teplotě k emisi signálů pocházejících z molekulových pásů [27].



Obrázek 6: Časový průběh doby života plazmatu [27].

2.3.4 Instrumentace

LIBS aparatura se skládá ze čtyř základních částí. Z pulzního laseru, zaostřovací optiky, sběrné optiky a spektroskopu s detektorem synchronizovaným s laserovým pulzem (Obrázek 7). Mohou být přidávány další prvky soustavy ke speciálním účelům [27].



Obrázek 7: Instrumentace LIBS [36].

Laser

Lasery (z anglického *Light Amplification by the Stimulated Emission of Radiation*) produkují stimulovanou emisi fotonů. Skládají ze tří základních součástí (zdroj energie, laserové médium, optický rezonátor) [37]. Lasery se dělí podle aktivního prostředí (pevnolátkové, kapalinové nebo plynné), podle pracovního režimu (kontinuálně pracující a pulzní) a podle spektra vyzařování neboli vlnové délky (UV, VIS, IČ). Při používání je nutné dbát na ochranu zraku kvůli možnému rozsáhlému poškození zraku [38].

Pulzní laser

Jedná se o laser s krátkými světelnými pulzy s vysokým výkonem, který pracuje s navolenou frekvencí buzení. K ablaci jsou nejčastěji používány Nd:YAG nebo excimerové lasery [39]. Existují lasery s nanosekundovými, pikosekundovými až femtosekundovými pulzy [27,28].

Pevnolátkový Nd:YAG laser je na bázi yttrito-hlinitého granátu dopovaného ionty neodymu. U tohoto typu laseru je základní emitovaná vlnová délka 1 064 nm. Používají se ovšem i kratší vlnové délky při použití generátoru vyšších harmonických frekvencí, jako například druhá harmonická frekvence 532 nm, třetí harmonická frekvence 355 nm nebo čtvrtá harmonická frekvence 266 nm. Jsou oblíbené z důvodu poměrně nízké ceny, jednoduché údržby nebo možnosti snadno je zabudovat do přenosných systémů [27,39].

Zaostřovací a snímací optika

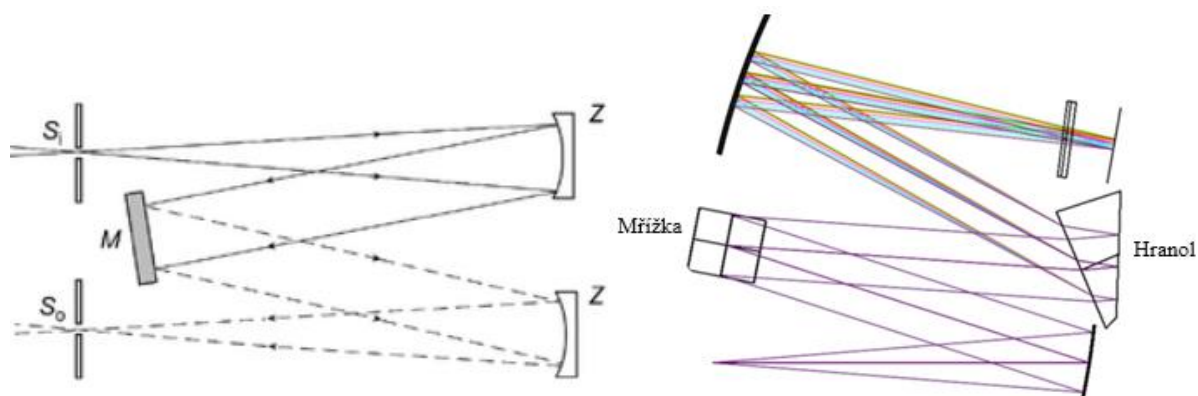
Zaostřování u nejjednodušších LIBS aparatur bývá zajištěno pouze jednou čočkou s pevnou ohniskovou vzdáleností, kdy je dopadající paprsek kolmý na povrch vzorku. Ve vyspělejších soustavách bývá zaostřování zprostředkováno pomocí systémů čoček nebo různými objektivy, které umožní homogenizaci distribuce energie v profilu svazku či možnost volby průměru laserového spotu [27,40,41].

Elektromagnetické záření emitované z plazmatu je přiváděno pomocí optické fokusační soustavy na optické vlákno, které toto světlo vede na úzkou vstupní štěrbinu do spektrometru. Existují dvě geometrie sběru světla. Jednou z nich je koaxiální s dopadajícím laserovým paprskem. Toto snímání emise je kompaktnější, ale náchylnější k samoabsorpci. Druhým je sběr pod úhlem 45 °, kdy použití sběru pod úhlem zvyšuje citlivost, ale trpí větším rozptylem signálu [40]. Další možností může být sběr pomocí svazku optických vláken, které je na svém konci opatřeno objektivem pro snímání emise. Nejčastěji bývá používána sběrná optika s jednou nebo dvěma čočkami z oxidu křemičitého [27].

Spektrometry

Spektrometry slouží obecně k rozložení emisního záření pomocí disperzních prvků (optický hranol nebo mřížka) na jednotlivé vlnové délky. V aparatuře LIBS se využívají klasické spektrometry typu Czerny–Turner nebo Echelle (Obrázek 8). Méně již bývá využívány polychromátory typu Paschen–Runge. Každý z těchto spektrometrů má svoje výhody

i nevýhody, které je nutné vyhodnotit před samotnou analýzou a vybrat nejvhodnější spektrometr [42,43].



Obrázek 8: Uspořádání monochromátoru typu Czerny – Turner [42] a spektrometru typu Echelle [43].

Detektory

Detektory zaznamenávají intenzitu záření v závislosti na vlnové délce. Jsou umístěny na výstupní štěrbině spektrometru. Dříve byly používány pro detekci fotografické desky, fotonásobiče nebo fotodiody [27].

V dnešní době jsou často používanými detektory na laboratorních soustavách LIBS polovodičové CCD detektory (z anglického *Charge Coupled Devices*). Tyto fotonové detektory jsou vysoce citlivé na energii dopadajícího záření v UV, VIS a blízké IR oblasti, kterou přeměňují na elektrický signál ve formě elektronů. Také jsou velmi dobré při korekci pozadí. Dosahují mnohem větší citlivosti než dříve využívané detektory. Jedním z hlavních požadavků pro detektory spektroskopie laserem buzeného plazmatu je synchronizace s laserovými pulzy a velmi vysoká opakovací frekvence [27,40,44]. Speciálním případem CCD detektoru je ICCD detektor (z anglického *Imaging Charge Couple Device*) nebo EMCCD detektor (z anglického *Electron Multiplying Charge-Coupled Device*). Tyto verze jsou často využívány u metody LIBS z důvodu jejich lepší citlivosti [45].

Dalším typem jsou CMOS senzory (z anglického *Complementary Metal Oxide Semiconductor*). Jejich výhoda spočívá v nižší pořizovací ceně, nižší spotřebě energie, jednodušším použití elektroniky a menšími rozměry [44].

2.3.5 Výhody a nevýhody techniky LIBS

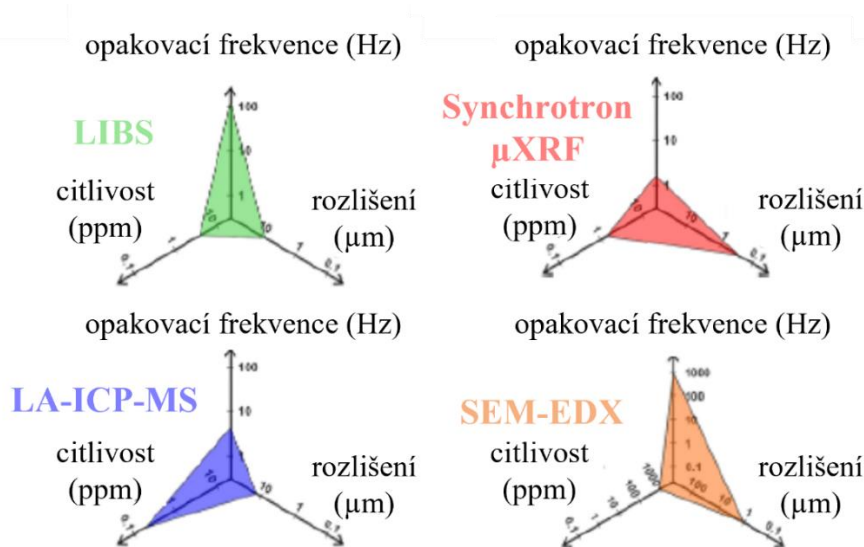
Velkou výhodou této metody je, že ji lze použít pro prvkovou charakterizaci obrovského množství vzorků ve všech skupenstvích. Ať už se jedná o nerosty, rostliny, biologické materiály či polymery umístěné v atmosférických podmínkách, ve vakuu nebo i pod mořskou hladinou [27,28]. Výhodou je také minimální destruktivita, mapování vzorku na krátkou či velkou vzdálenost, určitá možnost hloubkové analýzy díky možnosti opakované generace plazmatu na jednom místě a velmi rychlá analýza, která je omezená frekvencí detektoru a frekvencí laseru [31]. Další výhodou je instrumentální jednoduchost samotné experimentální

sestavy a také nízké pořizovací náklady. Zapotřebí je pouze pulzní laser, optické prvky a spektrometr s detektorem. Proto je tato metoda čím dál více oblíbená, protože si ji dokáže vědecké pracoviště sestavit samo. V neposlední řadě patří mezi výhody i možnost zlepšení kvality LIBS signálu, pokud to dovolí analyzovaná matrice. To lze například přidáním druhého laseru do sestavy neboli dvoupulzní LIBS (z anglického *Double Pulse LIBS*) nebo dokonce trojpulzní LIBS (z anglického *Triple Pulse LIBS*) [27].

Mezi nevýhody může patřit například poměrně náročná kvantitativní analýza, především u biologických vzorků nebo při nízkých koncentracích analyzovaného prvku.

Většina odborných článků uvádí, že není potřeba předem připravovat měřené vzorky pro LIBS. Tyto informace jsou ovšem zavádějící. Pro pokročilou analýzu pomocí metody LIBS je potřeba důkladná příprava analyzovaných vzorků, zejména u těch biologických [45].

Oproti dalším metodám využívajících plazmatu, jako například LA-ICP-MS (hmotnostní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem) dosahuje LIBS horší citlivosti, ale na druhou stranu v porovnání s těmito metodami dosahuje vyšší opakovací frekvence (Hz) a podobného rozlišení (μm). Srovnání s dalšími analytickými metodami, jako jsou μXRF nebo SEM-EDX, s technikou LIBS je možné vidět na Obrázku 9.



Obrázek 9: Srovnání metody LIBS s dalšími analytickými technikami [47].

2.3.6 Využití v praxi

Jedním z důležitých využití této metody je analýza archeologických nálezů. Nejčastěji jsou analyzovány nálezy jako nerosty, cenné kovy, keramika nebo i umělecká díla. Příkladem může být využití LIBS při zkoumání maleb na zdech v Pompejích. Využívá se též pro rozpoznávání pravých a padělaných archeologických nálezů. V dnešní době se začínají objevovat i vědecké práce, které se zaměřují na analýzu bio archeologických materiálů, jako jsou zuby, kosti nebo dokonce kalcifikované tkáně [48]. Mezi další zajímavé využití techniky LIBS je Sonda SuperCam (NASA) využívající dálkové optické techniky včetně Ramanovy spektroskopie a spektroskopie laserem buzeného plazmatu [30,49].

Technika LIBS je již hojně využívána i v biologických aplikacích. Příkladem může být vícerozměrná klasifikace bakterií [50], detekce zubních kazů [51], rakoviny psích jater [52], prsní tkáně [53] nebo při analýze rostlin [54]. Velmi populární je i využití této techniky při analýzách zvířecích tkání [55].

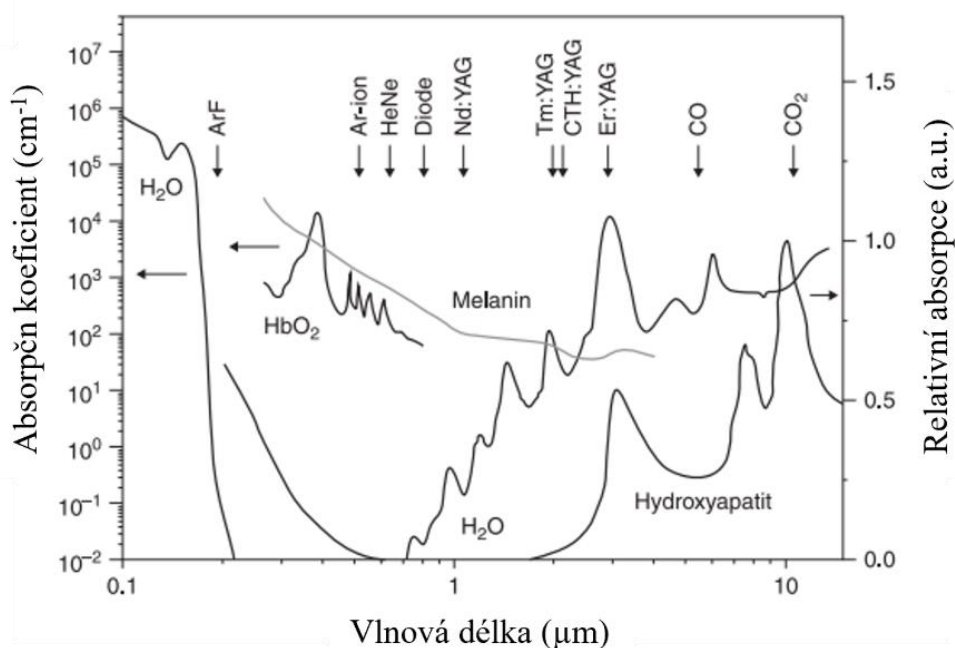
2.4 Biozobrazování

Rozsáhlé využití metody LIBS je v kontinuálním mapování biologických tvrdých a měkkých tkání. Snímky LIBS umožňují vizualizovat strukturu tkáně z chemického hlediska individuálních prvků (např. Ca, Fe, Mg, Na, P a Zn) a sestavovat mapy prostorové distribuce chemických prvků [20]. Tohoto lze využít například pro použití jako doplňkové metody k histologii při diagnostice nádorových měkkých tkání, kdy prostorová analýza může přinést důležité a nové informace o tkáni. Prvková analýza u tumorů kůže, například melanomu, je možná i z důvodu rozdílného chemického složení napadené a zdravé tkáně, a tudíž výsledné spektrum s emisními signály jednotlivých prvků budou odlišné u zdravé a tumorové tkáně. Existuje celá řada metod, které jsou schopné tyto prvky, například kovy, analyzovat (histochemické barvení na kovy, rentgenové mikrosondy, zobrazovací techniky hmotnostní spektroskopie), ale každá z těchto technik má určité problémy (nízká citlivost nebo specifická, které brání při rutinních analýzách [56]. Cílem je pochopit roli těchto prvků v biologických mechanismech (jejich transport, distribuci apod.), identifikovat je a ideálně je kvantifikovat [57].

Biologické tkáně obsahují řadu stopových prvků, které jsou nezbytné pro fungování celého organismu a které hrají velmi důležitou roli v metabolických procesech. Je obecně známo, že změny v zastoupení u těchto prvků vedou k řadě patologickým procesů, včetně nádorového onemocnění kůže [58]. Jedním z těchto kovů je například zinek, který je absolutně nezbytný pro fungování biologických procesů lidského těla. Hraje důležitou roli v iniciaci, progresi nebo zániku rakoviny. Interakce mezi zinkem, expresí zinkových transportérů a funkcí imunitního systému se úzce prolínají s buněčnými signálními drahami. Proto se při biozobrazování nádorových tkání klade na zinek pravděpodobně největší důraz. Dalším důležitým kovem spojeným s karcinogenezí je železo, jakožto základní prvek živých organismů nebo měď. Tento kov je klíčovou součástí enzymů, které se podílejí na primární tvorbě nádorového mikroprostředí [59]. Všechny tyto kovy jsou ve tkáni ve velmi malém zastoupení, proto je nutné pro analýzu volit techniky, které dosahují opravdu nízkých limitů detekce. Mezi tyto metody můžeme například zařadit metodu LA-ICP-MS. Existují ovšem i studie, které se zaměřují na analýzu spektrálních čar vápníku, hořčíku a fosforu, jakožto možné biomarkery pro diagnostiku nádorové tkáně. Tyto spektrální čáry jsme schopni analyzovat pomocí metody LIBS [60].

Mezi jeden z nejdůležitějších parametrů při mapování biologických tkání je výběr vhodné vlnové délky pulzního laseru k ablacii měkké tkáně. Schopnost tkáně dostatečně absorbovat elektromagnetické záření je zásadní. Tato schopnost závisí hlavně na elektronové struktuře atomů a molekul, vlnové délce záření, tloušťce biologické tkáně a dalších parametrech (teplota, koncentrace absorbujících prvků apod.). V biologické tkáni je absorpce okrajově způsobena makromolekulami (protein, pigment). Bílkoviny mají absorpční maxima kolem

280 nm a melanin s hemoglobinem v UV a blízké viditelné oblasti spektra. Absorpce je ale v lidské tkáni způsobena hlavně molekulami vody, které tvoří hlavní složku lidské tkáně. Absorpce záření ve vodním prostředí tak hraje významnou roli při přenosu záření do tkáně. Nejvyšší absorpce je dosažena v UV oblasti a vzdálené IČ oblasti (např. 2 640 nm). Pro viditelnou oblast záření je voda průhledná. Proto tyto vlnové délky nejsou doporučovány na analýzu měkkých tkání [61]. Závislost absorpce jednotlivých složek biologické tkáně na vlnové délce laseru je zobrazena na Obrázku 10.



Obrázek 10: Závislost absorpce složek biologické tkáně na vlnové délce [61].

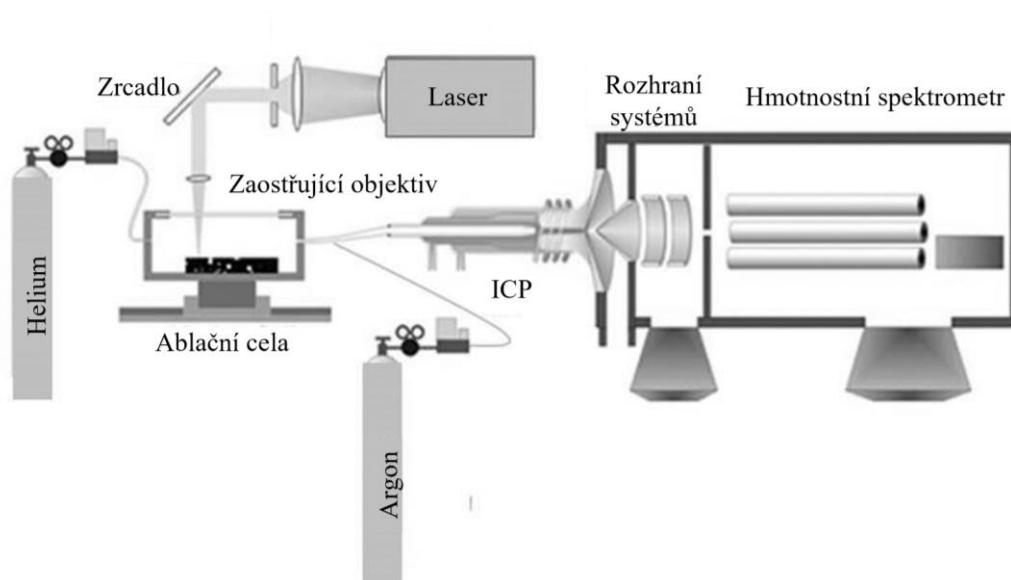
2.5 LA-ICP-MS

LA-ICP-MS neboli laserová ablace (z anglického *Laser Ablation*, LA) v kombinaci s hmotnostní spektroskopií indukčně vázaného plazmatu (z anglického *Inductively Coupled Plasma*, ICP a *Mass Spectrometry*, MS) je výkonná analytická technika, která umožňuje provádět vysoce citlivou prvkovou a izotopovou analýzu pevných vzorků. Považuje se za jednu z nejvíce univerzálních analytických metod. Pomocí této metody je možné provádět jak kvalitativní, tak i kvantitativní analýzu, mikroanalýzu, hloubkovou profilovou analýzu nebo dvourozměrné mapování chemických prvků [39,62].

2.5.1 Princip metody LA-ICP-MS

Analýza touto technikou začíná zaměřením laserového paprsku na povrch vzorku ve vzduchotěsné ablační komoře, s možností využití např. helia (He), kde dochází po výstřelu laseru k laserové ablaci. Ablatované částice ve formě suchého aerosolu se vymývají během milisekund proudem nosného plynu, například argonem (Ar) a jsou přiváděny transportní trubicí k plazmovému zdroji, kde dochází k atomizaci a ionizaci částic. Tyto ionty jsou přenášeny do hmotnostního analyzátoru přes kužely rozhraní a optiku, kde dochází k dělení

podle poměru m/z (hmotnost/náboj iontu). Jako hmotnostní analyzátor může být použit například kvadrupól, průletový analyzátor nebo iontová past [39,63,64]. Při správné synchronizaci laserového ablačního systému a analyzátoru lze zaznamenávat signály jednotlivých chemických prvků na přesně daných místech a vytvářet tak mapy prostorové distribuce prvků.



Obrázek 11: Schéma techniky LA-ICP-MS [65].

2.5.2 Výhody a nevýhody techniky

Mezi největší výhodu této metody bezesporu patří velmi nízké limity detekce, až ppb (z anglického *Parts Per Billion*). Je možné přesně analyzovat vzorky bez větší přípravy, vzorky vodivé i nevodivé nebo velmi malé. Analýza je realizovatelná i na vzduchu za atmosférického tlaku, kdy jsou výsledky z analýzy dostupné do několika vteřin [39,63].

Nevýhodou při použití této techniky je poměrně dlouhý čas analýzy, která se u větších vzorků může pohybovat v řádech hodin. Existuje ovšem i několik omezení, které jsou spojené s touto metodou při použití. Jedním z těchto omezení je například spektrální interference. Je způsobena ionty, které mají podobnou nebo stejnou hmotnost jako analyt. Dalším problémem je nespektrální interference, která ovlivňuje signál například vlivem zmlžování a transportem vzorku, ionizace v plazmatu apod. [63].

V praxi je tato metoda často využívána v geologii, archeologii, v oblastech životního prostředí, botanice [66], v biologických aplikacích [67] nebo v lékařských aplikacích. Již bylo publikováno několik výzkumů, které se zabývaly analýzami lidských biopsií, například prsního nádoru [68].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Spektroskopické metody se v posledních letech staly jedním z nástrojů biomedicínských aplikací a zaznamenaly velký rozvoj v oblasti klinického výzkumu. A to zejména v oblastech diagnostiky nádorových tkání u sledování vlivu mikrobiogenních a makrobiogenních při pohledu na zdravotní stránku biologické tkáně. Následující odstavce představují nejzásadnější vědecké práce, které se touto problematikou zabývají.

Mezi vědecké skupiny, které se zabývají analýzou měkkých tkání v parafínu metodou LIBS, patří i tým ze Středoevropského technologického institutu VUT (CEITEC BUT) pod vedením profesora J. Kaisera. Mezi vědecké výstupy tohoto týmu z posledních let patří i práce od A. Šindelářové a kol. [58]. Tento výzkum se soustředil na metodiku při analýze měkkých tkání, konkrétně myších ledvin, metodou spektroskopie laserem buzeného plazmatu (LIBS). Práce popisuje poměrně náročnou optimalizaci systému LIBS pro měření měkkých tkání. Využitím metody standartního přídatku (roztok Zn, 10 μ l; 1,53 mmol/l), jakožto vnitřního standardu na povrchu měkkých tkání. Následné zpracování dat umožnilo srovnávat jednotlivé změny v experimentálním nastavení jako změnu SNR (signál/šum) pro zvolenou zinkovou spektrální čáru. Zinek byl vybrán z toho důvodu, protože je v těle důležitým faktorem správného fungování organismu a slouží jako biomarker při diagnostice rakoviny. Bylo prokázáno, že koncentrace zinku ve zdravé tkáni se liší od koncentrace v nemocné tkáni [58].

Tabulka 1: Koncentrace vybraných prvků v myších ledvinách měřených pomocí ICP-OES [58].

| Prvek | Δc (mg/kg) | Standartní odchylka | Relativní standartní odchylka (RSD) |
|-------|--------------------|---------------------|-------------------------------------|
| P | 3346 | 378 | 11 % |
| K | 3013 | 213 | 7 % |
| S | 2621 | 267 | 10 % |
| Na | 1644 | 161 | 10 % |
| Mg | 229 | 25 | 11 % |
| Fe | 135 | 32 | 24 % |
| Ca | 75 | 9 | 11 % |
| Zn | 19 | 2 | 11 % |

Experimentální sestava se skládala z Nd:YAG laseru s vlnovou délkou 532 nm, 10 ns pulzem, frekvencí 20 Hz, s prostorovým rozlišením 100 μ m, proudem argonu a velikostí kráteru 50 μ m. Mezi proměnné parametry při optimalizaci patřilo rozostření, tedy míra fokusace laseru (-300 μ m až 300 μ m, krok 150 μ m), energie laseru (10 mJ až 30 mJ), doba zpoždění sběru signálu (0,25 μ s až 3 μ s), proplach plynem nebo atmosféra. Detekce probíhala spektrometrem typu Czerny-Turner (317–343 nm) pomocí sCMOS detektoru. Pro analýzu byla použita metoda SNR (z anglického *signal to noise ratio*) neboli poměr signál/šum [58].

3.1 Analýza nádorů kůže metodou spektroskopie laserem buzeného plazmatu

Využití spektroskopie laserem buzeného plazmatu v biologických aplikacích se v posledních 20 letech dostává do popředí výzkumné činnosti v LIBS komunitě. Jedná se o velmi populární odvětví, které by do budoucna mohlo přinést nové poznatky ve světě biomedicínských aplikací. Vědecké týmy se snaží především představit tuto techniku jako metodu pro rutinní

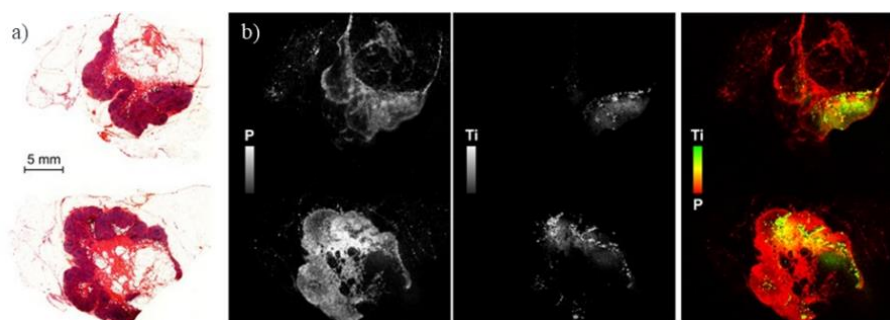
diagnostiku nádorových tkání, která by byla využívána přímo na operačním sále pro možné předběžné vyšetření napadené tkáně.

Mezi pravděpodobně nejznámější vědce v oblasti LIBS biozobrazování patří francouzský profesor Vincent Motto-Ros z univerzity Claude Bernard, Lyon. Se svým týmem vydal v posledních letech již několik článků na toto téma. Například práce pod vedením B. Bussera z týmu V. Motto-Rose [56], která se zabývá chemickou analýzou exogenních kovů, jež se nacházejí v tkáních s histologickými nálezy. Vědci hodnotili novou a dostupnou metodu LIBS pro multiprvkovou analýzu *in situ* v patologických tkáních lymfatických uzlin, kůže, kožních granulomů a pseudolymfomů, které obsahují pigmenty nebo cizorodé látky.

Pro studii byly vybrány vzorky nádorových tkání, u kterých bylo možné sledovat chemické složení. Pro standartní histologickou analýzu byly připraveny řezy s tloušťkou 5 μm , které byly obarveny hematoxylinem a eosinem. Pro pokročilejší multiprvkovou analýzu byla použita metoda LIBS jako komplementární rozšíření standartní histologické analýzy. V kožním granulomu a pseudolymfomu byl nalezen hliník. V lymfatických uzlinách a v kůži byl identifikován titan, měď, chrom a wolfram. Všechny vzorky na analýzu LIBS byly zalité v parafínových blocích. Byl použit laser typu Nd:YAG s vlnovou délkou 1 064 nm s frekvencí 10 Hz a energií 4 mJ. Rozlišení bylo nastaveno na 66 μm . Analýza probíhala při laboratorní teplotě za atmosférickém tlaku. Pro zachycení signálu byl použit spektrometr typu Czerny-Turner (Andor) se spektrálním rozsahem 247–330 nm s ICCD kamerou [56].

Konkrétním případem zmíněným v práci je analýza lymfatické uzliny u pacienta s anamnézou maligního melanomu. Histologické vyšetření odhalilo přítomnost černých granulovaných pigmentů, ve kterých se neprokázala přítomnost melanomových buněk. Pravděpodobně se jednalo o důsledek migrace tetovacích pigmentů simulující regionální šíření metastatických buněk melanomu. Analýza LIBS v tomto případě odhalila zvýšenou koncentraci titanu v tkáni na místech, u kterých histologická analýza prokázala černý pigment. Dalším zobrazeným prvkem byl fosfor, který sloužil pro zobrazení architektury lymfatických uzlin [56].

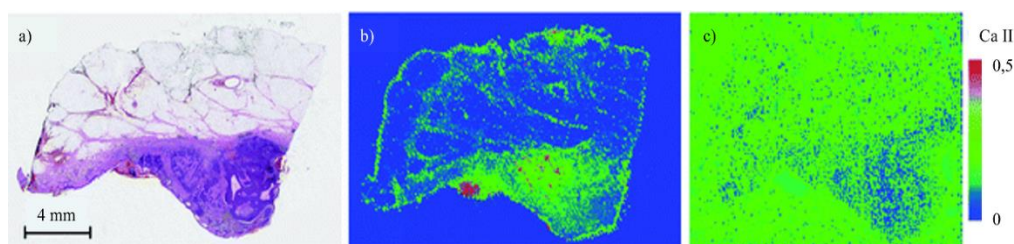
Pomocí této metody byli vědci schopni sestavit vizualizaci přítomnosti prvků, které byly obsaženy ve vzorcích. Tyto mapy prvků byly následně porovnávány s histologickými analýzami. Prokázalo se, že LIBS analýza je univerzálním nástrojem pro identifikaci cizorodých látek v měkkých tkáních, která by mohla být používána při rutinních diagnostikách nádorových onemocnění [56].



Obrázek 12: a) zobrazení histologické morfolgie lymfatické uzliny b) mapy prostorové akumulace titanu (Ti) a fosforu (P) v lymfatické uzlině pomocí analýzy LIBS [56].

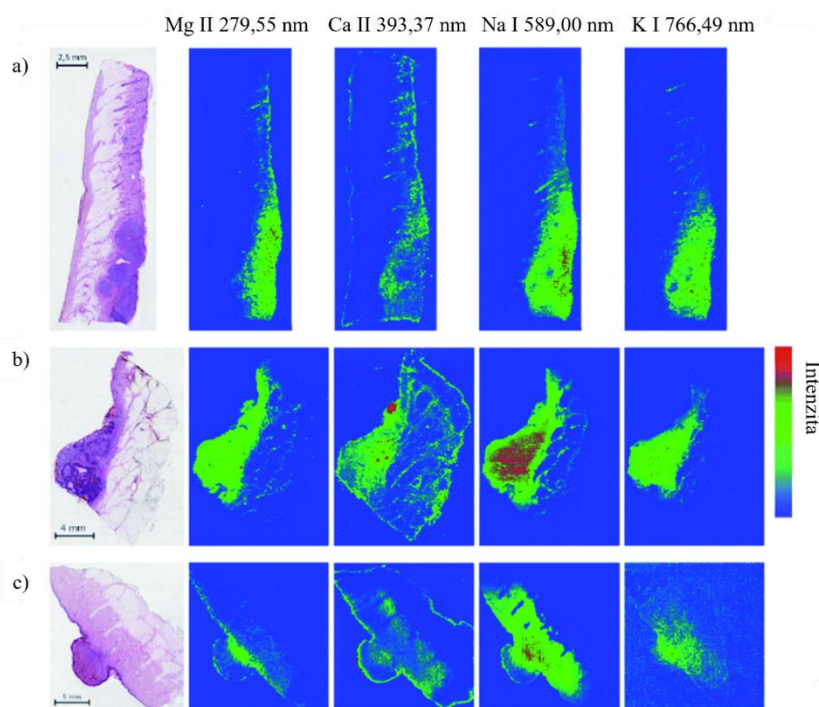
Další prací [57] z výzkumné skupiny profesora Motto-Rose je výzkum pod vedením S. Moncaya na téma multiprvkové analýzy kožních nenádorových i nádorových tkání (melanom, karcinom, dlaždicobuněčný karcinom) v parafínovém bloku, kde byly prozkoumávány rozdíly v distribuci chemických prvků. Metoda spektroskopie laserem buzeného plazmatu byla využita pro analýzu kožní biopsie, která byla doplněna o klasické mikroskopické histologické vyšetření. Byly detekovány nejvýznamnější kovové (Cu, Zn, Fe a Al) i nekovové prvky (P, Mg, Na a Si) v průtoku argonu. Při LIBS analýze nemaligní tkáň byla pozorována silná heterogenita obsažených chemických prvků. Komplexnější analýza rozložení prvků odlišila jednotlivé vrstvy tkáň (epidermis, dermis a hypodermis). Cílem LIBS analýzy kožních biopsií bylo zjistit rozdíly v rozložení prvků v napadených tkáních. Bylo prokázáno, že prvkové složení se liší u zdravé a nádorové tkáně. Instrumentace se skládala z laseru Nd:YAG (pulz 5 ns), s vlnovou délkou 1 064 nm, energií 2 mJ, frekvencí 10 Hz a prostorovým rozlišením 50 μm . Detekce probíhala pomocí dvou spektrometrů typu Czerny-Turner (oblast 270–340 nm a 190–230 nm) [57].

Tým ze Středoevropského technologického institutu VUT (CEITEC BUT) se nezabýval jen analýzou měkkých tkání pomocí metody LIBS. Ve spolupráci s FN v Hradci Králové a s 3. lékařskou fakultou Univerzity Karlovy byla publikována práce od doktorky K. Kiss [20]. Výzkum se zabýval komplementaritou spektroskopie laserem buzeného plazmatu s histologií, který zahrnuje i poznatky o přípravě vzorků. Pro výzkum byly vybrány nejvíce zastoupené kožní nádory vyskytující se v populaci, a to maligní melanom, spinaliom, bazaliom a benigní hemangiom. Při LIBS analýze byly zobrazovány makrobiogenní a mikrobiogenní chemické prvky (Ca, Mg, Na, K), které mohou poskytnout informace o strukturálních změnách nádorových vzorků z pohledu prvkového složení. Zobrazení těchto prvků bylo porovnáváno s progresí nádoru, s okraji nádoru, se zdravou tkání a s nádorovou tkání. Při optimalizaci nastavení bylo zjištěno, že vzorky nádorů, které byly připraveny na laboratorních sklech v tloušťce do 10 μm , nebyly vhodné pro LIBS analýzu z důvodu nedostatečného množství materiálu pro ablacii. U řezů nad 10 μm byl problém s fixací, zdlouhavou přípravou, zkreslenými výsledky analýzy, a hlavně s nežádoucími spektrálními interferencemi z podložního skla. Proto byla vybrána metoda zalití vzorků do parafínu [20].



Obrázek 13: a) histologický snímek (H&E); mapy distribuce prvků pro vápník (Ca II 393 nm), b) v parafínovém bloku, c) na laboratorním skle [20].

Velkým přínosem této práce bylo, že u vzorků maligního melanomu a bazaliomu se prokázal gradientní nárůst nádorové hmoty pro hořčík, sodík a draslík ve srovnání s okolní zdravou tkání, která vykazovala pouze slabý signál těchto prvků. Naopak u benigního hemangiomu k tomuto jevu nedocházelo. Dalším zjištěním bylo, že vápník vykazoval silnější signál v okolí nádoru, což může znamenat kalcifikaci dermis [20].



Obrázek 14: Histologické snímky a mapy distribuce chemických prvků pro a) maligní melanom, b) bazaliom, c) hemangiom [20].

Přístrojové vybavení se skládalo z Nd:YAG laseru (532 nm, pulz 10 ns, frekvence 20 Hz), spektrometr Czerny-Turner, detektoru sCMOS. Vzorky byly analyzovány přímo v parafínových blocích a při vystavení ablatované části proudu argonu, s rozlišením 100 μm v obou směrech. Druhá část práce se zabývala použitím strojového učení pro zpracování LIBS dat, kde výsledkem shlukové analýzy bylo rozlišení nádorové a zdravé tkáně [20].

Použitím metody spektroskopie laserem buzeného plazmatu pro biologické aplikace se momentálně zabývá několik týmů po celém světě. Mohlo by se zdát, že výzkum v tomto odvětví zaznamenal velký progres. Nutno ale podotknout, že i když výsledky vypadají do budoucna velmi slibně, je nutné se posunout ve výzkumu o několik úrovní dále (vyšší citlivost, vyšší rychlost, lepší prostorové rozlišení), aby bylo možné tuto metodu používat reálně na každodenní bázi například při diagnostice nádorových tkání. I proto se tato diplomová práce zabývá hlouběji analýzou nádorových i nenádorových lidských tkání a přináší tím další a podrobnější pohled na danou problematiku.

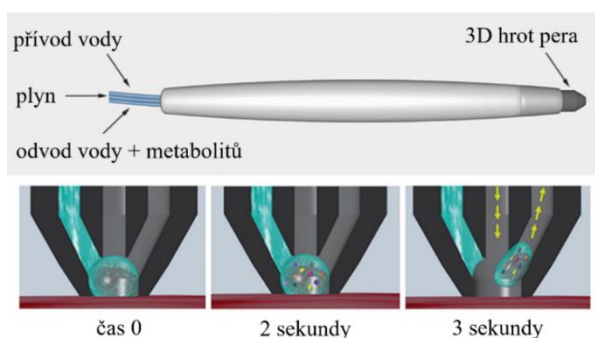
Tabulka 2: Shrnutí nejdůležitějších vědeckých prací zabývajících se prostorovou distribucí chemických prvků v nádorových měkkých tkání zalitých v parafínu pomocí metody LIBS.

| Vzorek nádorové měkké tkáně | Typ laseru (nm) | Prostorové rozlišení (μm) | Sledované prvky | Ref. |
|-----------------------------|-----------------|--|-----------------------------------|------|
| Lidská kůže | ns, 532 | 100×100 | Ca, K, Na, Mg | [20] |
| Myší tkáň | ns, 1 064 | 100×100 | Ca, Cu, Mg, Na | [94] |
| Lidské plíce | ns, 1 064 | 100×100 | Ca, Mg, Na, C, CN, Al, Fe, Cu, Si | [95] |
| Gliom (plicní tumor) | ns, 1 064 | - | Ca, Mg, Na, C, N, H, K, O | [96] |
| Lidská kůže | ns, 1 064 | 50×50 | Ca, Mg, Na, Fe, Al, Cu, Si | [57] |
| Lidská kůže | ns, 1 064 | 66×66 | Ti, Cu, P, W, Cr | [56] |

3.2 Analýza kožních nádorů pomocí dalších analytických metod

Diagnostikou nádorových tkání se zabývají i výzkumné týmy z jiných oblastí analytické chemie, převážně z oblasti spektrometrie. Mezi tyto diagnostické metody patří především hmotnostní spektrometrie [69], Ramanova spektrometrie [74] nebo hmotnostní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem s laserovou ablací [59,83,93].

Jednou z oblastí je využití hmotnostní spektrometrie při diagnostice nádorů kůže. Tento výzkum J. Zhanga z univerzity v Texasu (USA) se zabývá nedestruktivní *in vivo* a *ex vivo* analýzou pomocí tzv. MasSpec pera [69]. Jedná se o automatizované a biokompatibilní ruční zařízení hmotnostní spektrometrie pro velmi rychlou analýzu nádorových tkání, která by mohla být provedena přímo na operačním sále bez nutnosti vyjmutí nádoru. Pro molekulární analýzu bylo použito 20 tenkých řezů lidské nádorové kůže (16 μm) a 253 vzorků nádorové tkáně plic, prsu, štítné žlázy a vaječníků. Získaná hmotnostní spektra poskytovala molekulární profily, které byly charakteristické pro řadu potenciálních rakovinových biomarkerů (metabolity, lipidy, proteiny). Statistická analýza (Lasso) byla použita pro předpovězení oblasti s nádorem [69].



Obrázek 15: Princip analýzy pomocí MaSpec pera [69].

V principu se jedná o molekulární analýzu nádorových tkání v reálném čase, kdy se analyzují biomarkery, které jsou specifické pro nádorové onemocnění. Jedná se o ruční sondu ve velikosti pera, která vypouští kapičky vody (10 μl) na povrch tkáně. Tato kapička přitahuje a extrahuje biomolekuly z tkáně (po dobu 3 s) a vrací se zpět do pera (Obrázek 15). Metabolity jsou vedeny teflonovou hadičkou do hmotnostního spektrometru (ESI, orbitrap), kde je provedena rychlá molekulární analýza těchto metabolitů. Dochází k vyhodnocení, jestli se jedná o rakovinnou část či nikoli. Celý tento proces trvá pouze pár sekund. U některých přístrojů je dokonce možné odhalit i typ nádorového onemocnění [69].

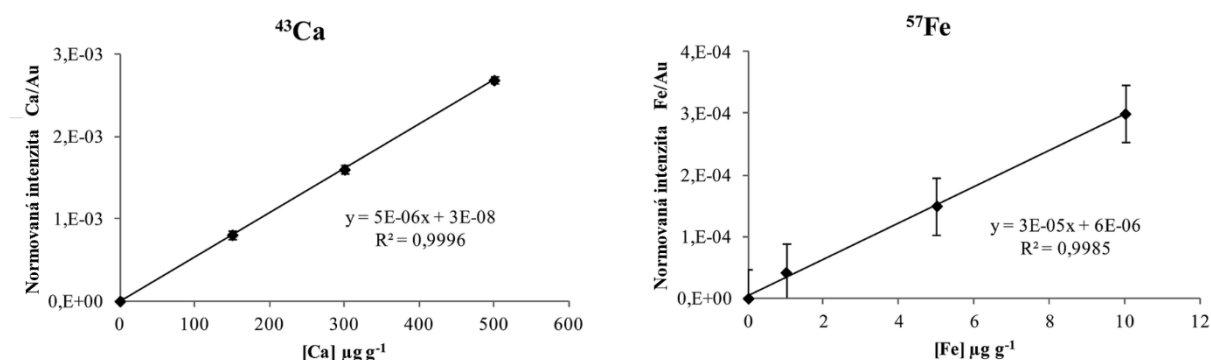
Výsledky ukázaly, že MasSpec pero je vhodné pro *in vivo* analýzu rakovinových tkání během chirurgického zákroku (prováděných na myších), aniž by došlo k většímu poškození tkáně. Detekce rakoviny pomocí této metody se ukázala jako velice vysoká, a to s 96,3% úspěšností. Dalším velkým přínosem je poměrně přesná diagnostika rakoviny v okrajových oblastech nádorů, kde může být histologická analýza nepřesná. Doposud byl tento přístroj testován především v laboratoři. K testování na operačních sálech ve větším měřítku ještě nedošlo [69].

MasSpec pero není jediný přístroj v oblasti hmotnostní spektroskopie, který se zabývá diagnostikou nádorových tkání. Existují i další techniky, jako například desorpční

elektrosprejová ionizační hmotnostní spektroskopie (DESI-MS) [70] nebo rychlá odpařovací ionizační hmotnostní spektroskopie (iKnife), která ovšem vede k poškození analyzované tkáně [71]. Všechny tyto techniky pracují na principu analýzy molekulárních iontů.

Další možnou metodou pro diagnostiku nádorů měkkých tkání je i hmotnostní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem s laserovou ablací (LA-ICP-MS) pro analýzu stopových prvků. Velkou výhodou této techniky je možnost provádět analýzu tenkých řezů, stejně jako při histologii, přímo na laboratorním skle.

Jednou z výzkumných skupin zabývajících se touto problematikou je i skupina z Univerzity Oviedo, Španělsko. Autorka článku [59], R. González de Vega, se zabývá kvantitativním zobrazováním biogenních prvků v prsních nádorech metodou LA-ICP-MS. Ve své práci uvádí, že koncentrace základních stopových prvků přirozeně se vyskytujících v prsní tkáni je při rakovině prsu výrazně vyšší než u zdravé tkáně (Fe, Ca, Cu, Zn), protože jsou tyto prvky zodpovědné za množství biologických a metabolických procesů. Metoda LA-ICP-MS zde byla využita pro zkoumání distribuce základních biogenních prvků a kovů v prsní tkáni. Všechny tenké řezy nádorových tkání byly pokryty zlatem v tloušťce přibližně 9 nm, jakožto vnitřním standardem. Jakožto standardy pro kalibrační křivky (Obrázek 16) byly použity vzorky homogenních hovězích prsních tkání se známou koncentrací sledovaných prvků (1, 5 a 10 $\mu\text{g/g}$ pro Fe a Cu; 5, 10 a 15 $\mu\text{g/g}$ pro Zn; 150, 300 a 500 $\mu\text{g/g}$ pro Ca).



Obrázek 16: Kalibrační křivky pro izotopy ^{43}Ca a ^{57}Fe získané pomocí metody LA-ICP-MS [59].

V práci se autoři zabývají také rozdílem při měření vzorků tkání zalitých v parafínových blocích nebo vzorků kryorezů. Zde se prokázalo, že výsledky měření z obou příprav byly podobné. Dále byly zkoumány různé tloušťky kryorezů (5, 8 a 10 μm) pro optimální ablací. Pro analýzu LA-ICP-MS byly nakonec vybrány kryorezy v tloušťce 5 μm z důvodu zachování morfologie nádoru. Instrumentace přístroje se skládala z laseru s vlnovou délkou 193 nm, energií 1,4 mJ a frekvencí 20 Hz. Velikost kráterů byla 10 μm . Jako nosný plyn bylo vybráno hélium, před vstupem do ICP byl přidáván argon. Sledovaly se izotopy ^{43}Ca , ^{57}Fe , ^{65}Cu , ^{66}Zn [59].

Výsledkem výzkumu bylo, že koncentrace vápníku byla vyšší u nádorových tkání než u tkání zdravých. Podobných výsledků bylo dosaženo i pro zinek, měď a železo. Prokázalo se, že u těchto 3 kovů se koncentrace zvýšila až čtyřikrát. Přesné výsledky jsou popsány v Tabulce 3 [59].

Tabulka 3: Průměrná koncentrace jednotlivých prvků v nádorové a nenádorové prsní tkáni [59].

| Prvek | Nenádorová oblast ($\mu\text{g/g}$) | Nádorová oblast ($\mu\text{g/g}$) |
|------------------|--|--|
| ^{43}Ca | $95,1 \pm 12,8$ | $169,1 \pm 27,1$ |
| ^{57}Fe | $3,6 \pm 1,4$ | $16,3 \pm 2,7$ |
| ^{65}Cu | $3,8 \pm 1,8$ | $15,9 \pm 2,9$ |
| ^{66}Zn | $4,7 \pm 1,2$ | $17,8 \pm 3,4$ |

Další z týmů, které se zabývají touto problematikou, je skupina pod vedením A. Limbecka z Technické univerzity ve Vídni. Ve své práci [72] popisovali tandemovou techniku hmotnostní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem s laserovou ablací a spektroskopie laserem buzeného plazmatu pro prvkové mapování biologických tkání. V práci byl použit přístroj, který je schopný provádět obě analýzy zároveň. Měření probíhalo na tenkém kryorezu lidského nádoru od jedince (20 μm), který byl dříve léčen protinádorovým léčivem (cisplatina). Vzorky byly měřeny na křemíkových podložkách. Metoda LA-ICP-MS je vhodná pro analýzu stopových prvků (Fe, Cu, Zn, Pt) a metoda LIBS pro další prvky (Na, K, Ca a Mg). Instrumentace LIBS se skládala z laseru Nd:YAG s vlnovou délkou 266 nm (energie 21,5 mJ, frekvence 2 Hz, rozlišení 40 μm), spektrometrem Czerny-Turner (rozsah vlnových délek 190–1 040 nm) a detektorem CCD.

Ramanova spektroskopie je jednou z dalších metod, která má velký potenciál nejen při diagnostice rakovinových tkání, ale i v pochopení progresu tohoto onemocnění. Ramanova spektroskopie je nedestruktivní analytická technika založená na rozptylu světla, která poskytuje informace o vibračních stavech molekuly (informace na molekulární úrovni). Tato technika je schopná zaznamenat nepatrné biochemické změny, které mohou být spojené s maligní transformací, což může být velmi nápomocné při diagnostice těchto tkání. Obecně jsou ramanovské vibrační techniky poměrně jednoduché, reprodukovatelné, neinvazivní a pro analýzu je potřeba jen malé množství tkáně [73,74].

Detekci rakoviny kůže pomocí Ramanovy spektroskopie *in vitro* se zabýval i výzkum Ch. A. Liebera a kol. z USA [74]. Zabývali se obecně možným přínosem Ramanovy mikrospektroskopie v blízké infračervené oblasti při diagnostice nádorů kůže. Celkem bylo analyzováno 39 vzorků nádorové (bazaliom, spinaliom, maligní melanom) i zdravé kůže. Charakteristická spektra byla zaznamenávána na různých místech z povrchu vzorků a v krocích po 20 μm pod povrch do hloubky 100 μm . Byl použit diodový laser s externí dutinou (ECDL) s vlnovou délkou 825 nm, třicetisekundová integrační doba, budící výkon 40 mW a detektor CCD. Při tomto výzkumu bylo dosaženo axiálního rozlišení 22 μm a laterálního rozlišení 2,4 a 6,6 μm v ose x a y. Pro každý vzorek byla zprůměrovaná daná spektra ze všech míst. Pro každou hloubku bylo vypočteno průměrné spektrum. Na klasifikaci Ramanovských spekter vzhledem k histologii byly použity algoritmy redukce dat. Výsledky prokázaly, že je rozdíl mezi spektry melanomu a ostatních nádorů kůže. To je způsobeno pravděpodobně rozdíly v buněčném původu nádorů. Také se ukázalo, že tato technika je citlivější na odchylky týkající se pigmentu nádorového onemocnění než na biochemické rozdíly v tkáni.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

- Argon, EC 231-174-0, SIAD, Praha, Česká republika
- Isopropanol Kontakt IPA, KONTAKT CHEMIE, Německo

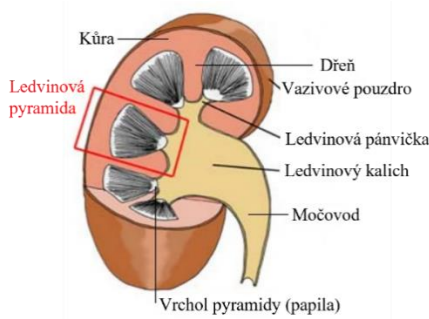
4.2 Příprava vzorků

Mnoho vědeckých článků uvádí, že příprava vzorků pro LIBS analýzu není důležitá. Pokud se ovšem jedná o analýzu biologických tkání, precizní příprava vzorků je nezbytná, jelikož při LIBS analýze je zásadní optická emise plazmatu vzniklého interakcí laseru právě s povrchem vzorku. Pro biologické vzorky je velmi důležitá fixace vzorku, jednak pro snadnější manipulaci, přepravu, skladování, ale i pro nutnost rovného povrchu vzorku. Důležitá je také homogenizace biologického preparátu. Nejčastěji se biologické vzorky fixují (zalévají) do epoxidové pryskyřice nebo do parafínu. Obrovskou výhodou zalití vzorků do parafínu je ten, že pokud je vzorek v dostatečné šířce, je možné po LIBS analýze a odkrojení poškozené části vzorku pomocí mikrotomu vzorek opakovaně analyzovat [46].

4.2.1 Vzorky zalité v parafínu

Pro optimalizaci parametrů měření pro měkké tkáně byly vybrány jako modelové matrice myší ledviny z toho důvodu, protože se jedná o biologickou tkáň, která má strukturně podobný charakter jako lidská kůže. Další velkou výhodou je, že myší ledviny jsou poměrně jednoduše dostupné i ve větším množství.

Ledviny patří do vylučovací soustavy spolu s dalšími orgány jako močovod, močový měchýř a močová trubice. Tento systém zodpovídá za osmoregulaci, udržení acidobazické rovnováhy, regulaci krevního tlaku a objemu tekutin, tvorby červených krvinek, za odpadní produkty metabolismu a vylučování těchto zplodin (např. moč, hormony). Ledviny u savců jsou fazolovitý párový orgán. Jsou uloženy v horní části břicha po stranách páteře. Jsou obaleny vazivovým pouzdem a tukovou tkání, která je udržuje na místě [75–77].



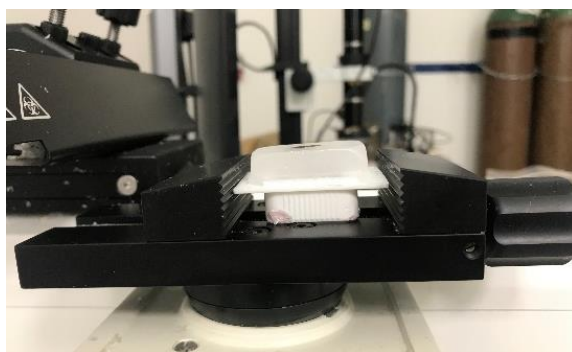
Obrázek 17: Anatomie myší ledviny [78].

Myší ledvina je složená z kůry (*cortex*), která se nachází na povrchu ledviny a dřeně (*medulla*), která vyplňuje vnitřní prostor. Dřeň má pruhovitý vzhled a dělí se na vnější a vnitřní zónu. V průřezu ledviny jsou patrné dřeňové pyramidy, které ústí do pánvičky

ledviny. Tato ledvinová pánvička je vystlaná buněčným epitelem a je napojená na močovod [79,80]. Ledvina se skládá z nefronů (funkční jednotky ledvin), které jsou spojeny vazivovými vlákny a uzavřeny v tenkém vazivovém pouzdře [76,80].

Vzorky myších ledvin byly připravovány ve spolupráci s Akademií věd České republiky. Laboratorní myši byly usmrceny krční dislokací a byly jim následně odebrány ledviny spolu s dalšími orgány, které se využily pro další analýzy. Všechny úkony byly provedeny podle protokolů a pravidel stanovených Společností pro vědu o laboratorních zvířatech a Ústavu živočišné fyziologie a genetiky (ÚŽFG).

Po odebrání se tkáň fixují ve 4% formaldehydu po dobu minimálně 24 hodin. Následně se tkáň promývá destilovanou vodou (přibližně 12 hodin) kvůli vymytí formaldehydu. Využívá se principu zalévání prosycením odvodněné tkáň rozehřátým parafínem při 56 °C až 58 °C, který se skládá ze 4 kroků. Nejprve se tkáň odvodňuje etanolovou řadou (30% etanol 3 hod., 50% etanol 3 hod., 70% etanol 12 hod., 80% etanol 1 hod., 95% etanol 1 hod., 100% etanol 1 hod.). Druhým krokem je prosycení tkáň tekutinou rozpouštějící parafín (xylen I 1 hod., xylen II 1 hod., xylen III 1 hod.). Lázeň xylenu III je nejčistší. Třetím krokem je prosycení tkáň parafínem (parafín I 1 hod., parafín II 12 hod., parafín III 1 hod., parafín IV 1 hod.). Posledním krokem je vlastní zalití a orientace tkáň do parafínu (HISTOWAX) a následné zatuhnutí. Další den se parafínový blok již se vzorkem umístí do ledničky a odstraní se z nerezové formy, ve které docházelo k zalití. Posledním krokem je nakrájení vzorku pomocí posuvného mikrotomu (HM 430, Thermo Scientific, UK) do požadované roviny pro samostatnou analýzu LIBS (Obrázek 18).



Obrázek 18: Ledvina zalitá v parafínovém bloku připravená na finální skrajování.

Vzorky lidských nádorů jsou připravovány ve spolupráci s Fakultní nemocnicí v Hradci Králové. Všechny vzorky jsou odebírány pacientům chirurgickým zákrokem (biopsií) na základě doporučení kožního lékaře. Byla prováděna široká lokální excize s bezpečnostním lemlem zdravé kůže. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas s výzkumem. Studie byla schválena etickou komisí Fakultní nemocnice v Hradci Králové (ref. číslo 201805 S08P).

Kožní nádory byly po vyjmutí ponořeny po formaldehydu a předány na histologické oddělení, kde byla klasickým způsobem stanovena diagnóza. Dalším krokem bylo zalití tkáň do roztaveného parafínu (FFPE, z anglického *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*). Posledním krokem bylo sřezávání bloků do požadované roviny pomocí mikrotomu (SM2010 R, Leica, Německo) pro analýzu LIBS.

4.2.2 Řezy na laboratorním skle

Z parafinových bloků kožních nádorů byly nařezány pomocí mikrotomu (SM2010 R, Leica, Německo) řezy 1 mm pro histologické vyšetření. Tyto řezy byly obarveny hematoxylinem a eozinem (H&E) pro vizualizaci struktury buněk. Řezy 10 µm bez obarvení byly připraveny pro analýzu LA-ICP-MS. Řezy byly připevněny na laboratorní sklička (adhezivní povrch TOM-14, Matsunami, Japonsko).



Obrázek 19: Ukázka tenkého řezu (10 µm) nádoru na laboratorním skle pro analýzu LA-ICP-MS.

4.3 Použité přístroje a software

- FireFly LIBS systém, Lightigo Brno, Česká republika
- LabTrace 2, CEITEC VUT, Česká republika
- Laser Ablation System NWR193, New Wave Research, Inc., USA
- ICP-MS systém iCAP Q, ThermoFisher Scientific, USA
- Posuvný mikrotom HM 430, Thermo Scientific, UK
- Posuvný mikrotom SM2010 R, Leica, Německo
- Digitální mikroskop OLYMPUS DSX110, Olympus, Japonsko
- Mikroskop VM12x Video, Image Optics, UK
- Mikroskop MZ 16, Leica Microsystems, Německo
- LIBS Analyzer, CEITEC VUT, Brno, Česká republika
- Iolite 4 program, University of Melbourne, Australia
- Epina ImageLab, Lightigo Brno, Česká republika
- MS OFFICE

4.4 Analýza pomocí metody LIBS

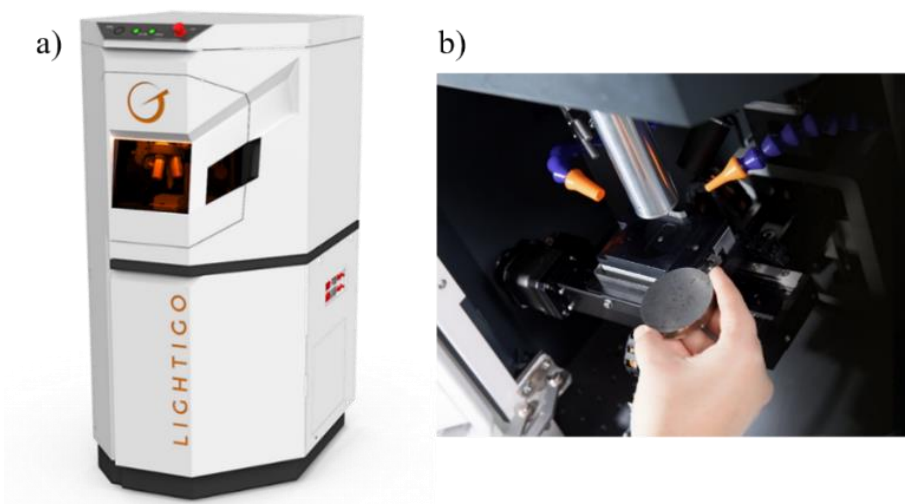
4.4.1 Popis aparatury

Všechny LIBS analýzy byly prováděny v laboratořích Středoevropského technologického institutu (CEITEC BUT) a v laboratořích Fakulty strojního inženýrství VUT. Byly využity následující měřící sestavy:

FireFly

Pro analýzy byl použit přístroj FireFly LIBS systém (Lightigo, Brno, Česká republika). Jedná se o soustavu s motorizovaným pohyblivým stolcem (3 osy) s úchyty na vzorky (Obrázek 20) s možností ofuku plynem (např. Ar, He, vzduch) a odtahem vzniklých nečistot z průběhu analýzy. Pro ablaci je využíván diodově čerpaný pulzní nanosekundový Nd:YAG laser

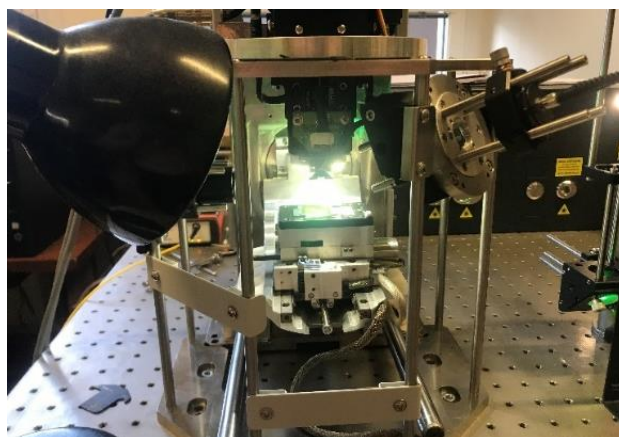
(5 ns pulzy, rychlost 50 Hz) s možností výběru tří vlnových délek laseru (1 064 nm s maximální energií 60 mJ, 532 nm s max. energií 30 mJ, 266 nm s max. energií 12 mJ). Obsahuje také objektiv s velkou hloubkou ostrosti ($f=75$ mm) nebo asférický objektiv s mikroohniskem ($f=20$ mm). Dále je součástí přístroje sběrná optika (pro sběr charakteristického záření plazmatu), spektrometr typu Czerny-Turner nebo spektrometr Echelle s oblastí sběru od 180 do 1 100 nm (rozlišení $<0,05$ nm) a detektor typu CCD/CMOS. U tohoto přístroje se uvádí limity detekce od 1 do 100 ppm, možné rozlišení 10 až 150 μm , velikost skenovací oblasti až 100×100 mm [81].



Obrázek 20: a) měřicí sestava FireFly, b) ablační komora se stolem pro upevnění vzorků [81].

LabTrace 2

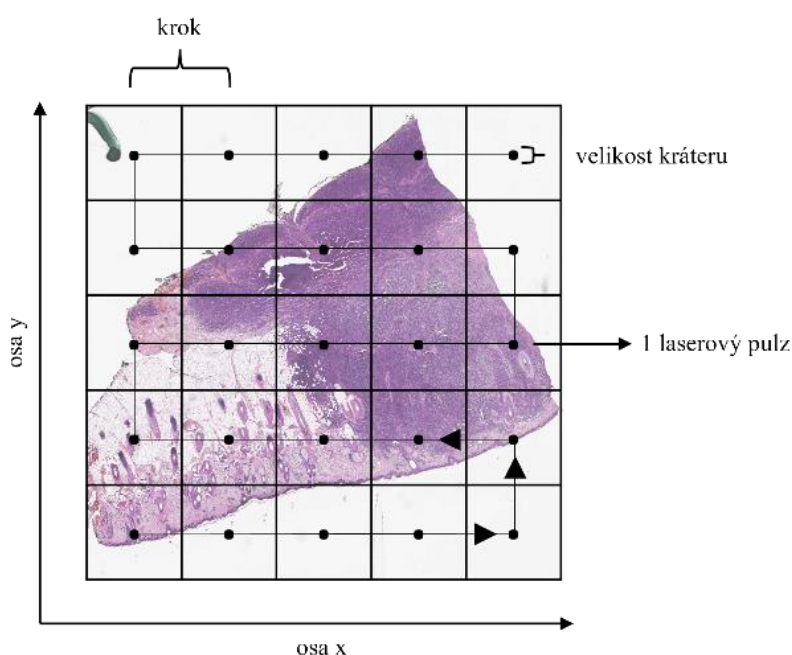
Sestava LabTrace 2 (Obrázek 21) byla využívána pro experimenty s diodově čerpaným Nd:YAG femtosekundovým laserem (PHAROS, LIGHT CONVERSION, Litva) s délkou trvání pulzu okolo 150 fs, opakovací frekvencí 10 kHz, energií pulzu až 1 mJ a průměrným výkonem až 20 W [82]. Jedná se o otevřenou ablační celu s motorizovaným stolem pro uchycení vzorků, bez možnosti ofuku plynem či odtahu. Dále je součástí sestavy sběrná optika, spektrometr typu Czerny-Turner (AvaSpec ULS2048CL-EVO, Avantes, Nizozemsko) s rozsahem 240 až 407 nm a detektor CCD/CMOS.



Obrázek 21: Otevřená sestava LabTrace 2.

4.4.2 Metodika měření

Analýza metodou LIBS lze dvěma způsoby. Prvním z nich je bodová analýza. Jedná se o mód, kdy se analyzuje konkrétní bod na povrchu vzorku, následně dochází k posunutí vzorku a k opětovné analýze dalšího přesně určeného bodu. Jedná se o poměrně časově náročný typ analýzy, který se hodí pro akumulaci signálu nebo například pro hloubkové profilování. Druhým typem je kontinuální typ analýzy (Obrázek 22), tzv. rychlé mapování, který pracuje na principu plynulého pohybu vzorku na motorizovaném stolku v obou osách, kdy je tento pohyb synchronizovaný s laserovými pulzy. Přesná vzdálenost jednotlivých pulzů (krok) nám určuje prostorové rozlišení, kdy se každému pulzu (kroku) přiřazují charakteristické souřadnice pro tvorbu prvkových map. Parametr prvkového rozlišení je limitován poškozením vzorku vlivem ablace. V obou případech dochází k pohybu vzorku díky motorizovanému posuvnému stolku [83].



Obrázek 22: Schéma principu kontinuálního (rychlého) mapování na rakovinové tkáni.

4.4.3 Nastavení optimálních podmínek měření pro LIBS analýzu

Vlastnosti měření jsou silně závislé na charakteristice a typu pulzního laseru. Těmito velmi časově krátkými pulzy je zajištěn vysoký výkon. Díky vysokému příkonu a plošné hustotě výkonu (iradiance) je možné ablatovat téměř všechny druhy materiálů, včetně měkkých tkání. Dochází k roztrhnutí vazeb mezi atomy kvůli multifotonovým procesům absorpce a lavinovým ionizacím. Jev roztrhnutí vazeb je pojmenován jako optický průraz (breakdown) [27,28].

Charakter a vlastnosti laserem indukovaného plazmatu jsou ovlivněny několika provozními podmínkami laseru. Jednou z nich je vlnová délka laseru (λ). Mezi další ovlivňující podmínky patří délka pulzu (τ) a energie (E), která je nutná pro samotné vytvoření a udržení plazmatu nebo pro vyrovnávání ztrát tepla vyzařováním a vedením [27]. Další důležitou roli hraje

okolní atmosféra kolem laseru při vzniku plazmatu. A to jak atmosférický tlak (p), tak i složení atmosféry [48,84]. Mezi další parametry patří nastavení detekčního okna neboli čas zpoždění sběru signálu (z anglického *gate delay* – GD) nebo akumulace laserových pulzů v jednom výstřelu. Dalším parametrem je fokusační rozostření (z anglického *defocus*), kdy záporné rozostření znamená zaostření fokusační optiky nad povrch vzorku a kladné rozostření znamená zaostření optiky pod povrch vzorku, rozostření 0 mm znamená zaostření na povrchu vzorku [58]. Posledním důležitým parametrem je velikost kráterů (z anglického *spot size*). Velikost kráterů je velmi důležitý parametr, protože čím jsou menší ablační krátery, tím je možnost dosažení menšího rozlišení neboli většího počtu pixelů. Jelikož je cílem v biologických aplikacích dostat se s rozlišením na buněčnou úroveň (průměrná velikost buňky je přibližně od 5 μm do 30 μm [85]), je tento parametr opravdu signifikantní. Ovšem intenzita spektrální čáry je závislá na množství ablatovaného materiálu, který je závislý na energii laserového svazku. Proto je důležité najít odpovídající rovnováhu mezi prostorovým rozlišením a citlivostí detekce [86].

Všechny tyto parametry mohou ovlivnit pozitivně analytický signál nebo výslednou intenzitu emisních signálů. Pokud se ovšem zvolí výše zmíněné parametry nevhodně, může dojít ke znehodnocení analýzy. Cílem optimalizace měření je obecně minimalizovat šum (pozadí), maximalizovat signál ve spektru, vyhnout se samoabsorbci spektrálních čar a pokusit se maximálně potlačit matriční efekt.

Femtosekundový laser

Všechny experimenty pro dosažení optimálního nastavení byly prováděny pomocí bodové analýzy ve velikostech map 3×3 (9 výstřelů bez akumulace) v ose x a y s rozlišením 0,2 mm v obou osách. Pro femtosekundový laser byly optimalizovány parametry rozostření (od -0,5 mm do 0,5 mm s krokem 0,1 mm). V závislosti na předchozím parametru byly studovány i velikosti kráterů, které byly následně studovány pomocí mikroskopu v systému LIBS FireFly. Ostatní parametry jako energie, doba zpoždění sběru signálu (GD) a šířka laserového pulzu byly konstantní. Energie byla nastavována na maximum, tedy 1 mJ. Nižší energie nebyly v případě měkkých tkání dostatečné pro získání kvalitního signálu (ověřeno pomocí SNR analýzy). Doba zpoždění sběru signálu (GD) byla pevně nastavena na 0 s díky provázanosti s akumulací, která byla nastavena na 10 pulzů. Tyto experimenty byly prvně prováděny femtosekundovým laserem o vlnové délce 1 030 nm a následně byly prováděny totožné experimenty s jeho druhou harmonickou frekvencí 515 nm. Výsledky byly porovnávány. Pro tuto soustavu (LabTrace 2) nebylo možné používat ofuk plynem nebo napuštění komory plynem za určitého tlaku. Proto nebyl na tento parametr brán zřetel.

Pro rychlé mapování bylo převzato optimální nastavení z výše popsáných experimentů pro klasické mapování. Jediným rozdílem byla změna v akumulaci signálu, kde byl každý výstřel laseru reprezentovaný jedním laserovým pulzem. Tato změna nastala z toho důvodu, že pulzní lasery jsou stavěné pro použití ve své nativní frekvenci pulzů a při klasickém mapování nedosahují takového výkonu jako při rychlém (kontinuálním) mapování. Jinak řečeno, profil a výkon laserového svazku nedosahuje při bodovém mapování optimálních parametrů.

Jelikož nebylo možné analyzovat vzorky s využitím femtosekundového laseru s kratšími vlnovými délkami, které jsou pro biologické tkáně vhodnější [61] byla provedena důkladnější optimalizace parametrů pro laser nanosekundový.

Nanosekundový laser

Pro tento typ laseru byla prováděna podrobnější analýza pro stanovení ideálních parametrů měření. Nejprve byla prováděna optimalizace pro laser s vlnovou délkou 266 nm. Tato vlnová délka byla vybrána z důvodu publikace od H. Jelínkové, která se soustředí na využití laserů pro medicínské aplikace. Ve své práci uvádí, že biologické tkáně absorbují vlnové délky hlavně v blízké UV oblasti, kdy absorpční efekt monotónně klesá napříč spektrem přes viditelnou oblast až k IR oblasti [61].

Optimalizace probíhala pomocí bodové analýzy při velikostech map 3×3 (9 výstřelů bez akumulace) v ose x a y s rozlišením 0,2 mm v obou osách. Parametr rozostření byl konstantní, protože předchozí studie uvádějí fakt, že tento parametr je optimální při 0 mm. Mezi proměnné parametry patřila energie a doba zpoždění sběru signálu (GD). Parametr energie se pohyboval od 10 mJ do 5 mJ s krokem 1 mJ. Nižší energie nebyly dostatečné pro dosažení požadované odezvy, tedy použitelného LIBS spektra. Doba zpoždění sběru signálu (GD) se měnila od 0 μs do 1 μs s krokem 0,1 μs. Opět byl studován i vliv těchto parametrů na velikosti kráterů. Pro vlnové délky 532 nm a 1 064 nm nebyly tyto optimalizační experimenty prováděny z toho důvodu, jelikož se podobnými experimenty zabývali již dříve na jiných pracovištích. Tudíž jsou známá optimální nastavení pro tyto vlnové délky pulzního laseru [58,86].

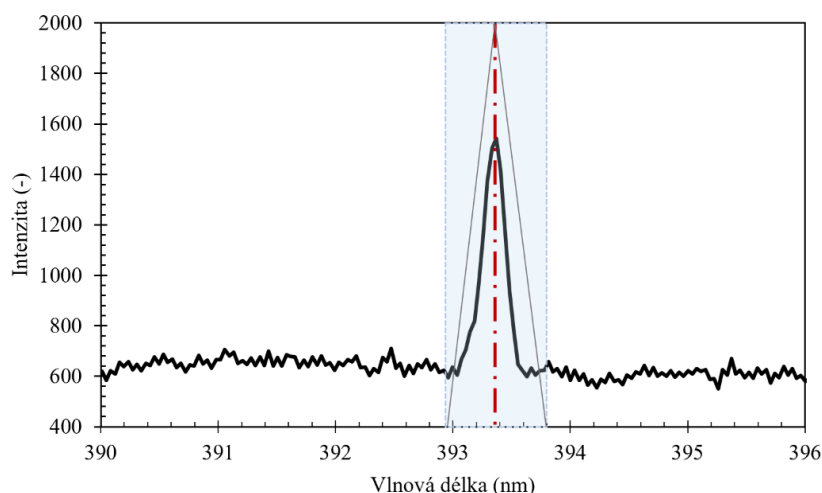
Pro rychlé mapování byl zvolen parametr frekvence 50 Hz, odtah nečistot z analýzy a průtok argonu, který zvyšuje intenzitu sbíraného signálu. Ostatní parametry vycházely z výsledků pro bodové mapování.

4.4.4 Zpracování LIBS dat

Všechna naměřená LIBS spektra byla nejprve nahrána do programu LIBS Analyzer, kde byly přiřazeny každému jednotlivému spektru souřadnice na ose x a y pro další pokročilejší zpracování a v hlavním případě pro možnost sestavení prvkové mapy. Tyto mapy odpovídaly analyzovanému povrchu vzorku, kdy pro každou spektrální čáru byla zobrazena její intenzita a následně byla vytvořena mapa intenzity signálu v závislosti na přidělených souřadnicích pro každý výstřel laseru. Dále byly vykresleny i podíly jednotlivých spektrálních čar, aby došlo k potlačení matričního efektu nebo i kvůli tomu, že předchozí výzkumy ukázaly, že poměr iontových a atomových spektrálních čar u jednoho prvku např. vápníku (Ca II/Ca I) nebo hořčíku (Mg II/Mg I) může indikovat tvrdost biologické matrice [87]. V programu LIBS Analyzer byly také zpracovávány všechny analýzy poměru šumu k signálu (SNR).

Prvkové mapy pro jednotlivé prvky byly vykresleny v programu Lightigo ImageLab [88]. Při zpracování spekter v tomto programu byly testovány různé typy zpracování, ovšem nejvhodnějším vyhodnocením se stala korelace trojúhelníkové funkce se spektrální čarou váhovaná intenzitou bez nutnosti odečtení pozadí (Obrázek 23). Proložení spektrálních čar

například Voigtovou nebo Lorenzovou funkcí se nejevilo jako vhodné z důvodu malého počtu jednotlivých bodů ve spektrálních čarách a také z toho důvodu, že pro spektra s nižším SNR by mohlo dojít k razantnímu zkreslení výsledků.



Obrázek 23: Ukázka korelace trojúhelníkové funkce se spektrální čarou váhovaná intenzitou v programu Epina ImageLab.

Pro rozpoznávání jednotlivých spektrálních emisních čar ve spektru byla využita webová databáze spektrálních čar NIST. Přehled spektrálních emisních čar i s dalšími parametry jsou zobrazeny v Tabulce 4 [89].

Tabulka 4: Přehled sledovaných spektrálních čar (λ – vlnová délka, A_{ki} – Einsteinův koeficient, E_i a E_k - spodní a horní hranice ionizační energie) [89].

| Prvek | λ (nm) | A_{ki} (s^{-1}) | E_i (eV) | E_k (eV) |
|-------|----------------|-----------------------|------------|------------|
| C I | 247,86 | $2,80 \cdot 10^8$ | 2,68 | 7,68 |
| P I | 255,33 | $7,10 \cdot 10^7$ | 2,32 | 7,18 |
| Mg II | 279,55 | $2,60 \cdot 10^8$ | 0,00 | 4,43 |
| Ca I | 364,44 | $3,55 \cdot 10^7$ | 1,90 | 5,30 |
| Mg I | 285,21 | $4,91 \cdot 10^8$ | 0,00 | 4,35 |
| Ca II | 393,37 | $1,41 \cdot 10^8$ | 0,00 | 3,15 |
| Na I | 589,00 | $6,16 \cdot 10^7$ | 0,00 | 2,10 |

4.5 Analýza pomocí LA-ICP-MS

Všechny vzorky myších ledvin a rakovin kůže (10 μ m tlusté řezy na skle) byly analyzovány pomocí metody LA-ICP-MS na Institutu chemických technologií a analytické chemie na Technické univerzitě ve Vídni.

Přístroj se skládal ze vzduchotěsné ablační komory (Laser Ablation System NWR193, USA) napuštěné heliem (He) s vysokoenergetickým UV excimerovým pulzním laserem o vlnové délce 193 nm, s délkou trvání pulzu < 20 ns, možnou frekvencí 1–20 Hz, hustota energie (fluence) > 50 J/cm² na povrchu vzorku, možnou velikostí kráterů od 1 do 300 μ m a možností pohybu laseru do osy x i y (standartně 100×100 mm). Velkou výhodou tohoto systému byla

možnost zvolit si čtvercový profil laserového svazku dopadajícího na povrch vzorku [90]. Další částí je přístroje je kvadrupólový ICP-MS systém (ThermoFisher Scientific, USA).



Obrázek 24: Měřicí sestava LA-ICP-MS na Technické univerzitě ve Vídni.

4.5.1 Nastavení optimálních podmínek měření pro LA-ICP-MS analýzu

U této techniky byly optimalizovány následující parametry na 10 μm tlustých řezech myších ledvin: energie pulzního excimerového laseru, frekvence, tvar laserového svazku, hustota energie laseru (fluence), parametr překrytí signálů (z anglického *Overlap*), velikost kráterů a prostorové rozlišení. Všechny tyto parametry mohou opět ovlivnit analytický signál nebo výslednou intenzitu signálů.

Všechny experimenty byly prováděny v ablační komoře napuštěné heliem, s laserem s vlnovou délkou 193 nm při kontinuálním mapování při velikosti map 1×40 v ose x a y. Byly studovány různé energie čtvercového laserového svazku od 100 % do 0,1 %, kdy maximum bylo 2,6 mJ. Optimální energie byla stanovena na 1 % z maximální energie 2,6 mJ z toho důvodu, že při vyšších energiích docházelo k výraznému poškození vzorku a ablaci podložního skla a při nižších energiích nebyl dostatečný signál. Opakovací frekvence byla nastavena na maximální hodnotu 100 Hz z důvodu úspory času a rychlost skenování na 1000 $\mu\text{m}/\text{s}$. Po zkoušení různých prostorových rozlišení bylo vybráno jako optimální rozlišení $20 \times 20 \mu\text{m}$, kdy se průměrná velikost kráterů pohybovala mezi 22–24 μm . Parametr překrytí byl nastaven na 16,36 %. Byly analyzovány následující izotopy (doby zpoždění): ^{13}C (0,0049 s), ^{24}Mg (0,005 s), ^{31}P (0,002 s), ^{34}S (0,0235 s), ^{56}Fe (0,001 s), ^{63}Cu (0,0032 s) a ^{66}Zn (0,0131 s). Tyto izotopy byly vybrány na základě již vydaných publikací, kde se tyto izotopy vyskytovaly ve spojitosti s malignitou tkáně [59,63,91].

4.5.2 Zpracování LA-ICP-MS dat

Nejprve byla data zpracována v programu Eolite 4, kde byla provedena korekce pozadí. Z tohoto programu byla data vyexportována do programu Lightigo ImageLab, kde byly vytvořeny prostorové mapy distribuce prvků z hmotnostního spektra.

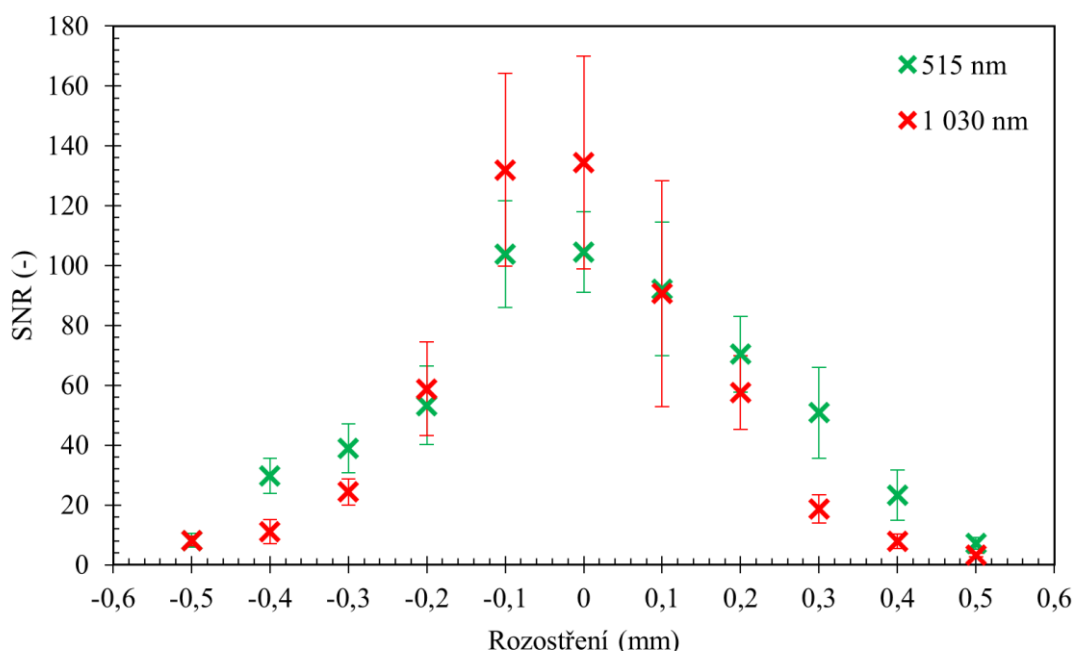
5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Nastavení optimálních podmínek měření pro prostorově rozlišenou analýzu

Pro optimalizaci parametrů měření byly vybrány vzorky myších ledvin (Akademie věd České republiky), jakožto modelové vzorky měkkých tkání. Ve většině případů byly prováděny SNR (z anglického *signal to noise ratio*) analýzy neboli podíl signál k šumu.

5.2 Femtosekundový laser

Pro stanovení nejvhodnějšího nastavení byly nejprve měřeny vzorky měkkých tkání v parafínu pomocí laseru se základní vlnovou délkou 1 030 nm a poté byly stejné experimenty prováděny s druhou harmonickou vlnovou délkou 515 nm.



Obrázek 25: Zobrazení analýzy SNR (podíl signál/šum) v závislosti na parametru rozostření (mm) pro laser s vlnovou délkou 515 nm a pro laser s vlnovou délkou 1 030 nm včetně směrodatných odchylek (pro spektrální čáru Ca II 393 nm).

Na Obrázku 25 je znázorněná SNR analýza (podíl signál/šum) v závislosti na parametru rozostření, který se měnil od hodnoty -0,5 mm do hodnoty 0,5 mm s krokem 0,1 mm. SNR analýza pro femtosekundový laser byla prováděna ze spektrální čáry vápníku (Ca II 393 nm) z toho důvodu, protože se jednalo ve spektru o nejintenzivnější čáru a z ostatních spektrálních čar pro jiné prvky (např. hořčíku Mg II 279 nm) by nebylo možné tuto analýzu provést z důvodu nízkých intenzit.

Zeleně jsou zobrazeny hodnoty pro laser s vlnovou délkou 515 nm. Tyto hodnoty mají poměrně lineární závislost při klesajících a zvyšujících se hodnotách rozostření. Prokazují, že nejvyšší hodnoty SNR mají hodnoty kolem rozostření od -0,1 mm, 0 mm (tedy zaostření

na povrch vzorku) a 0,1 mm. Směrodatné odchylky se se zvyšujícím a klesajícím rozostřením zmenšují, ovšem v tomto druhu analýzy jsou nejdůležitější co nejvyšší hodnoty SNR analýzy.

Dalším důležitým parametrem jsou velikosti kráterů u měření s rozdílným rozostřením (Tabulka 5, Obrázek 26). Krátery s nejmenším průměrem byly zaznamenány u rozostření 0 mm (0,09 mm). Tudíž mohlo být usouzeno ze všech optimalizačních parametrů, že rozostření 0 mm je pro zelený laser nejlepší. Vypočítaným parametrem je plošná hustota výkonu laseru (z anglického *irradiance*) neboli intenzita ozařování, která je uváděna v jednotkách GW/cm². Opět lze pozorovat (Tabulka 5), že i u tohoto parametru vyšly hodnoty nejlépe pro nulové rozostření. Tento parametr byl získán z následujících výpočtů:

Zářivý tok (výkon přenášený zářením, které prochází v určitém místě danou plochou):

$$\theta_e = \frac{E}{t} \tag{1}$$

θ_e ...žářivý tok (W, J/s)

E ...energie pulzního laseru (J)

t ...délka pulzu laseru (s)

Intenzita ozařování (plošná hustota výkonu, irradiance):

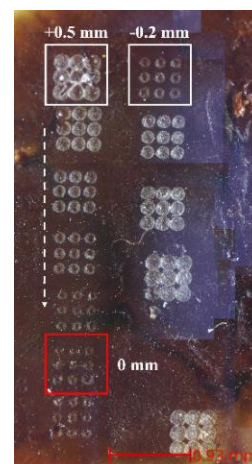
$$I_e = \frac{\theta_e}{S} \tag{2}$$

I_e ...intenzita ozařování (W/cm²)

S ...plocha kráteru (cm²)

Tabulka 5: Velikosti kráterů a intenzity ozařování pro laser s vlnovou délkou 515 nm.

| Rozostření (mm) | Velikost kráteru (mm) laser 515 nm | Intenzita ozařování (GW/cm ²) |
|-----------------|------------------------------------|---|
| -0,5 | 0,22 | 17 538 |
| -0,4 | 0,19 | 23 513 |
| -0,3 | 0,17 | 29 371 |
| -0,2 | 0,13 | 50 226 |
| -0,1 | 0,1 | 84 883 |
| 0 | 0,09 | 104 793 |
| 0,1 | 0,11 | 70 151 |
| 0,2 | 0,14 | 43 307 |
| 0,3 | 0,16 | 33 157 |
| 0,4 | 0,18 | 26 198 |
| 0,5 | 0,21 | 19 248 |

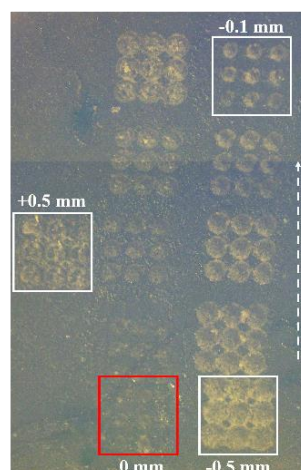


Obrázek 26: Ukázka tvaru a velikosti kráterů pro hodnoty rozostření na měkké tkáni (myší ledvina) s využitím laseru s vlnovou délkou 515 nm. Krátery vyfoceny na mikroskopu (systém FireFly).

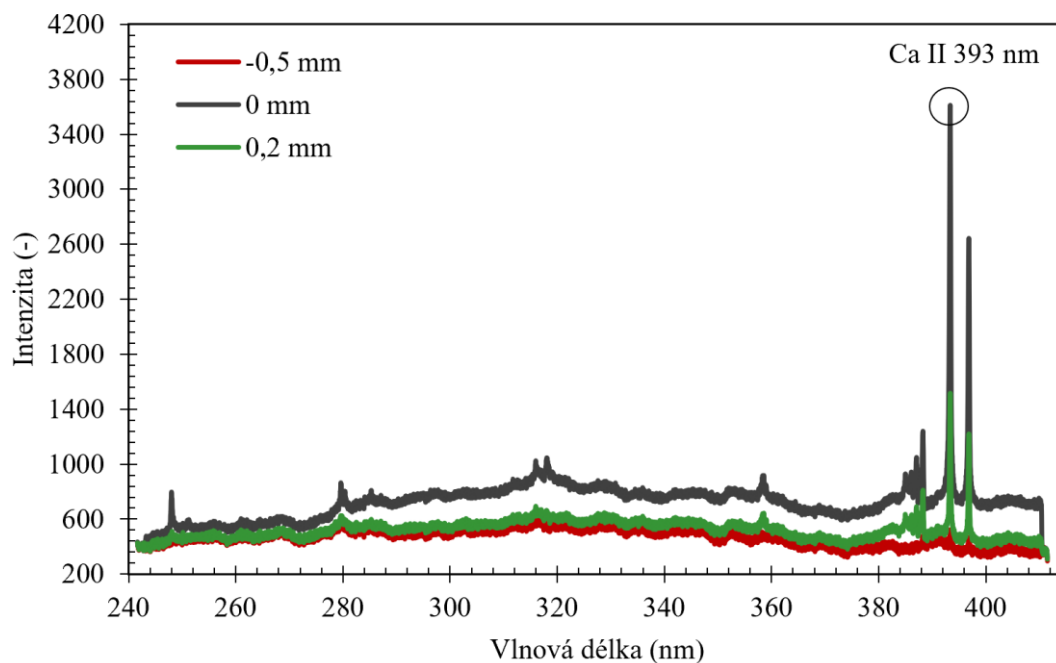
Červeně jsou v grafu (Obrázek 25) znázorněny hodnoty SNR pro laser s vlnovou délkou 1 030 nm. Hodnoty mají opět poměrně lineární závislost při klesajících a zvyšujících se hodnotách rozostření. Nejvyšší hodnoty SNR mají hodnoty pro rozostření -0,1 mm a 0 mm, ovšem se značnými směrodatnými odchylkami. Jak ale již bylo uvedeno, důležité jsou výsledky SNR spolu s velikostmi kráterů (Tabulka 6), které byly opět nejnižší u rozostření 0 mm (0,12 mm). Platí, že čím menší velikosti kráterů, tím lepší je rozlišení při mapování tkání. Výsledky tedy prokázaly, že optimální nastavení pro červený laser je rozostření 0 mm. I vypočítané hodnoty intenzity ozařování ukazují, že nulové rozostření je ideální.

Tabulka 6: Velikost kráterů a intenzity ozařování pro laser s vlnovou délkou 1 030 nm.

| Rozostření (mm) | Velikost kráteru (mm) laser 1 030 nm | Intenzita ozařování (GW/cm ²) |
|-----------------|--------------------------------------|---|
| -0,5 | 0,21 | 19 248 |
| -0,4 | 0,21 | 19 248 |
| -0,3 | 0,18 | 26 198 |
| -0,2 | 0,16 | 33 157 |
| -0,1 | 0,14 | 43 307 |
| 0 | 0,12 | 58 946 |
| 0,1 | 0,14 | 43 307 |
| 0,2 | 0,17 | 29 371 |
| 0,3 | 0,18 | 26 198 |
| 0,4 | 0,21 | 19 248 |
| 0,5 | 0,21 | 19 248 |



Obrázek 27: Ukázka tvaru a velikosti kráterů pro hodnoty rozostření na měkké tkáni (myši ledvina) s využitím laseru s vlnovou délkou 1 030 nm. Krátery vyfoceny na mikroskopu (systém FireFly).



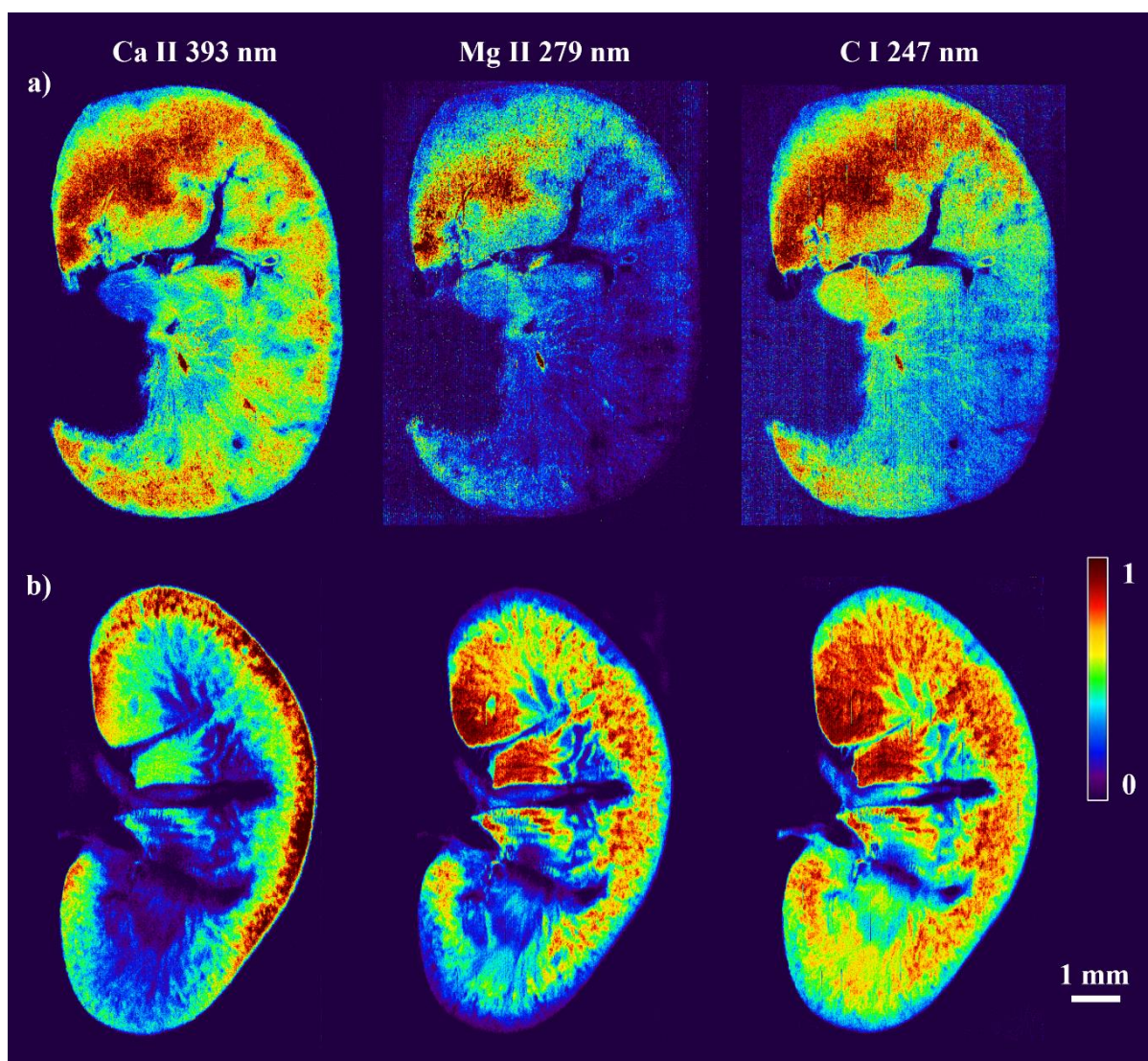
Obrázek 28: Ukázka rozdílných intenzit spektrálních čar na vlnových délkách v závislosti změny parametrů rozostření (-0,5 mm; 0 mm; 0,2 mm) pro laser s vlnovou délkou 1 030 nm.

Ostatní parametry, jako doba zpoždění sběru signálu detektoru (GD), energie pulzního laseru, frekvence kontinuálního mapování nebo šířka laserového pulzu, byly u obou vlnových délek (515 nm, 1 030 nm) laserů konstantní. Energie byla nastavena na maximální hodnotu z toho důvodu, jelikož při nižších energiích by nebyla dostatečná energie pro ablaci a detekci záření. V následující Tabulce 7 jsou shrnuty optimální parametry pro analýzu měkkých tkání zalitých v parafínu metodou kontinuálního mapování.

Tabulka 7: Souhrn optimálního nastavení pro analýzu měkkých tkání (systém LabTrace 2) pro femtosekundový laser s vlnovými délkami 515 a 1 030 nm.

| Parametry měření | Femtosekundový laser (LIBS) |
|-----------------------------|---------------------------------------|
| Laser | 515 + 1 030 nm |
| Energie laseru | 1 mJ (max) |
| Doba zpoždění sběru signálu | 0 μ s |
| Rozostření | 0 mm |
| Rozlišení | 15 \times 15 μ m |
| Rychlé mapování | ✓ |
| Frekvence | 100 Hz |
| Spektrometr | Czerny-Turner Avantes (240–407 nm) |

Po optimalizování parametrů měření byly analyzovány myší ledviny technikou LIBS pomocí rychlého (kontinuálního) mapování. Výsledky mapování jsou zobrazeny na Obrázku 29. Byly sestaveny mapy prostorové distribuce makrobiogenních a mikrobiogenních chemických prvků zastoupených v měkké tkáni. Mezi tyto prvky patří například vápník (Ca II 393,37 nm), hořčík (Mg II 279,55 nm) nebo uhlík (C I 247,86 nm). Tyto zobrazené spektrální čáry nebylo nutné normovat jinými spektrálními čarami. Na mapách je vždy napravo zobrazena barevná škála. Červená barva symbolizuje nejvyšší zastoupení prvku v mapě (nejvyšší koncentrace) a barva tmavě modrá zobrazuje nulové zastoupení prvku (nulová koncentrace). Na Obrázku 29 a) jsou zobrazeny výsledky pro mapování s použitím laseru s vlnovou délkou 515 nm, s rozlišením 15 \times 15 μ m v obou osách, velikostí map 621 \times 438 = 271 998 pixelů (měřítko 1 mm). Jak lze vidět na mapách, intenzita signálu z měření není kontinuální. K tomuto problému došlo pravděpodobně nerovným seříznutím vzorku v parafínu. Ovšem i na těchto výsledcích je patrný náznak anatomie myších ledvin. Intenzity signálu pro všechny zobrazené prvky pro ledvinovou dřeň jsou vyšší než u ledvinových pyramid. To znamená vyšší koncentraci zobrazených prvků. Na Obrázku 29 b) jsou prvkové mapy s využitím laseru s vlnovou délkou 1 030 nm, s rozlišením 15 \times 15 μ m v osách x a y, velikostí map 655 \times 361 = 236 455 pixelů (měřítko 1 mm). Na mapě vápníku je zřejmé, že nejvyšší koncentrace tohoto prvku je v ledvinové kůře. Naopak pro hořčík a uhlík je v oblasti kůry znatelný pokles v signálu. Na mapách pro všechny prvky jsou patrné dřeňové pyramidy, které ústí do ledvinové pánvičky, kde je koncentrace pro uvedené chemické prvky téměř nulová. I u těchto výsledků je ovšem patrný neúplně rovný povrch vzorku, který je konkrétně u femtosekundového laseru extrémně důležitý. Jak lze vidět na mapách distribuce prvků, rozdíly mezi vlnovými délkami laseru jsou téměř nulové.



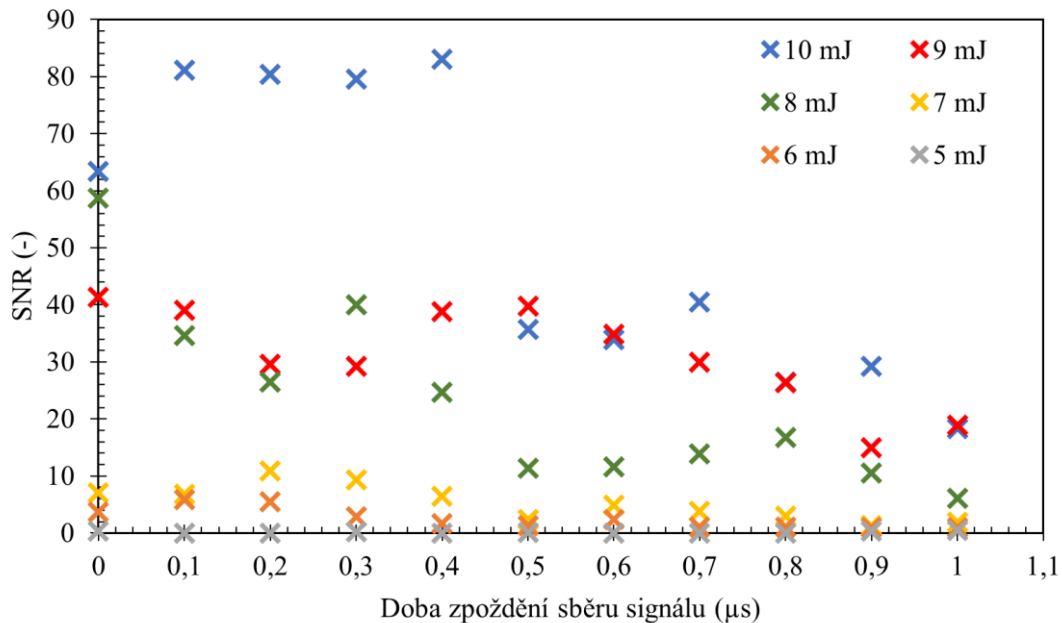
Obrázek 29: Mapy prvkové distribuce prvků, které jsou charakteristické pro myší ledviny, vápník (Ca II 393,37 nm), hořčík (Mg II 279,55 nm) a uhlík (C I 247,86 nm). Ledviny jsou použity jako modelové matrice měkké tkáně. Vlnová délka laseru a) 515 nm, b) 1 030 nm.

I když výsledky z mapování měkkých tkání (myších ledvin v parafínu) femtosekundovým laserem vypadají velice slibně, především kvůli velmi nízkému rozlišení téměř na buněčné úrovni a menší velikosti kráterů než u jiných typů laserů, pro další analýzy byl zvolen laser nanosekundový. Důvodem bylo i to, že nebylo možné vyzkoušet femtosekundový laser nižší vlnové délky, který by měl být pro měkké tkáně vhodnější. Velkou výhodou u nanosekundového laseru je možnost analýzy v naší laboratoři se třemi vlnovými délkami (1 064 nm, 532 nm a 266 nm).

5.3 Nanosekundový laser

Pro optimalizaci parametrů na sestavě FireFly s nanosekundovým laserem byly opět použity myší ledviny, jakožto modelové matrice měkké tkáně. Optimalizační experimenty byly sestaveny odlišným způsobem než u předchozího typu laseru. Klád se důraz především na parametry doby zpoždění sběru signálu (μs), energii laserového svazku a velikosti kráterů.

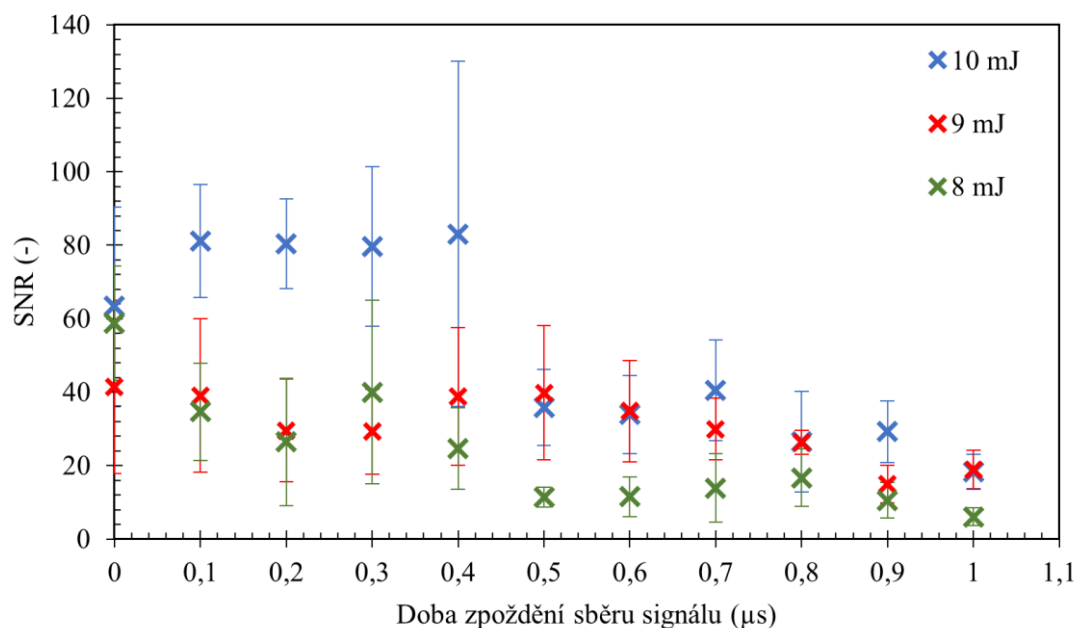
Při hledání ideálního nastavení pro analýzu měkkých tkání byl kladen důraz zejména na Nd:YAG laser čtvrté harmonické frekvence s vlnovou délkou 266 nm z toho důvodu, protože tato vlnová délka by měla být nejvhodnější pro laserovou ablaci biologických tkání obecně, protože by mělo docházet k nejvyšší absorpci laserové energie analyzovaným materiálem [61]. Jelikož optimalizací parametrů LIBS měření s dalšími vlnovými délkami (1 064 nm a 532 nm) nanosekundového laseru se zabývaly další výzkumné týmy, které tyto práce i publikovali [58,86], bylo z těchto prací převzato optimální nastavení systému a využito pro porovnání s naší optimalizací pro laser s vlnovou délkou 266 nm.



Obrázek 30: Zobrazení SNR analýzy (podíl signál/šum) v závislosti na parametru doby zpoždění sběru signálu (μs) se změnou energie pro laser s vlnovou délkou 266 nm (pro spektrální čáru Ca II 393 nm).

Pro nanosekundový laser bylo nejprve nutné optimalizovat jak dobu zpoždění sběru signálu laseru (μs), tak i energii laserového pulzu. Naměřené výsledky byly vyhodnocovány pomocí SNR analýzy (podíl signál/šum) opět z vápníkové spektrální čáry (Ca II 393 nm) z toho důvodu, protože se jednalo ve spektru o nejintenzivnější čáru a z ostatních spektrálních čar pro jiné prvky (např. hořčíku Mg II 279 nm) by nebylo možné tuto analýzu kvalitně provést z důvodu nízkých intenzit (např. u nižších energií). Pro tyto experimenty byly vybrány hodnoty doby zpoždění sběru signálu od 0 μs do 1 μs s krokem 0,1 μs a pro energii byly vybrány hodnoty od 10 mJ do 5 mJ s krokem 1 mJ. Vyšší hodnoty doby zpoždění sběru signálu nebyly brány v úvahu, jelikož podle experimentu dochází se zvyšujícím se časem sběru k poklesu SNR. Jak lze vidět v grafu výše (Obrázek 30), hodnoty ze SNR analýzy pro energie 5 mJ, 6 mJ a 7 mJ jsou velmi nízké nebo i nulové, tudíž pro laserovou ablaci měkkých tkání zcela nedostatečné. I díky tomuto výsledku nebyly testovány nižší energie, protože by to bylo bezpředmětné. U tohoto případu nebyly počítány hodnoty pro intenzitu ozařování, jelikož pro jednotlivé energie laseru nebyly proměřovány průměrné velikosti vzniklých ablačních kráterů.

Graf níže (Obrázek 31) se zaměřuje na vyšší energie emitované laserem, tedy na energie 8 mJ, 9 mJ a 10 mJ včetně směrodatných odchylek. Jak lze vidět, nižší energie (8 a 9 mJ) vykazují velmi podobné chování, tedy že se pohybují mezi podobnými hodnotami SNR a mají i podobné směrodatné odchylky. Co ale platí pro všechny energie je to, že dochází k poklesu SNR se zvyšující se dobou zpoždění sběru signálu. Nižší hodnoty doby zpoždění sběru signálu vycházejí z SNR analýzy lépe pravděpodobně i kvůli faktu, protože při ablací materiálu dochází ke vzniku pouze malého a rychle vyhasínajícího plazmatu. Nejvyšších a téměř totožných hodnot SNR bylo dosaženo pro energii 10 mJ s krátkou dobou zpoždění sběru signálu, tedy od 0,1 μs do 0,4 μs . Od času 0,5 μs docházelo ke skokovému poklesu SNR.



Obrázek 31: Zobrazení SNR analýzy (podíl signál/šum) v závislosti na parametru doby zpoždění sběru signálu (μs) pro energii 10 mJ, 9 mJ a 8 mJ včetně směrodatný odchylek pro laser s vlnovou délkou 266 nm (pro spektrální čáru Ca II 393 nm).

Je nutné ovšem brát zřetel i na fakt, že energie laseru má přímý vliv na intenzitu signálu a velikost vzniklých ablačních kráterů. Platí, že čím vyšší je energie laseru, tím je vyšší ablatované množství materiálu a následně i vyšší intenzita signálu, ale je menší prostorové rozlišení (nižší počet pixelů v chemické prvkové mapě) z důvodu větší velikosti kráterů. Proto je velmi důležité najít kompromis mezi citlivostí detekce a prostorovým rozlišením [58]. Nakonec byla jako optimální energie vybrána právě energie 10 mJ (protože intenzita signálu je silně závislá na množství ablatovaného materiálu) s dobou zpoždění sběru signálu 0,3 μs i přes poměrně velkou odchylku z toho důvodu, protože s vyšší dobou zpoždění sběru signálu dochází k vystoupení atomových čar a klesá intenzita čar iontových. Iontové čáry potřebují obecně vyšší teplotu plazmatu, proto vyhasínají se zvyšující se dobou zpoždění.

Optimalizované podmínky pro LIBS analýzu kontinuálním mapováním s využitím nanosekundového pulzního laseru s vlnovou délkou 266 nm jsou uvedeny v Tabulce 8. Rozostření bylo nastaveno na konstantní hodnotu (0 mm), kvůli větší velikosti ablačních

kráterů bylo rozlišení $30 \times 30 \mu\text{m}$ a frekvence byla na maximu, tudíž na 50 Hz. Dále byl zvolen odtah vzniklých nečistot z měření a ofuk vzácným plynem (argonem). Ofuk argonu se při LIBS analýze přidává z důvodu vyšší účinnosti ablace měkké tkáně a ke zvýšení výsledné intenzity signálu. V neposlední řadě byl využit spektrometr typu Czerny-Turner s detekčním oknem od 240 nm do 407 nm.

Tabulka 8: Souhrn optimálního nastavení pro analýzu měkkých tkání (systém FireFly) pro nanosekundový laser s vlnovou délkou 266 nm.

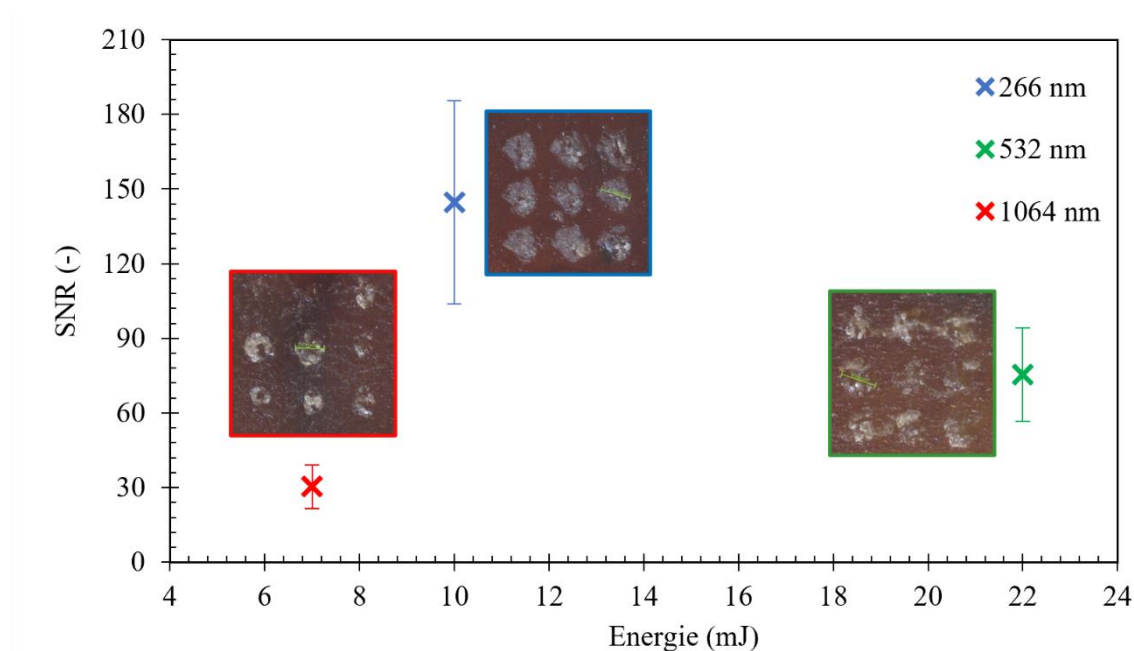
| Parametry | Nanosekundový laser (LIBS) |
|-----------------------------|----------------------------|
| Laser | 266 nm |
| Energie laseru | 10 mJ |
| Doba zpoždění sběru signálu | 0,3 μs |
| Rozostření | 0 mm |
| Rozlišení | $30 \times 30 \mu\text{m}$ |
| Rychlé mapování | ✓ |
| Ofuk argonem | ✓ |
| Odtah zplodin | ✓ |
| Frekvence | 50 Hz |
| Spektrometr | Czerny-Turner (240–407 nm) |

Pro srovnání optimálních parametrů mezi jednotlivými nanosekundovými lasery s vlnovou délkou 266 nm, 532 nm a 1 064 nm byla opět provedena SNR analýza. Parametry pro laser s vlnovou délkou 266 nm jsou uvedeny výše (Tabulka 8), parametry pro laser s vlnovou délkou 532 nm byly převzaty ze studie od A. Šindelářové a kol. [58] a parametry pro laser s vlnovou délkou 1 064 nm byly převzaty ze studie od Q. Lina a kol. [86].

Hodnoty parametrů pro laser s vlnovou délkou 532 nm jsou následující. Energie laserového pulzu 22 mJ, doba zpoždění sběru signálu 0,5 μs , rozlišení $100 \times 100 \mu\text{m}$, ofuk argonem a odtah vzniklých nečistot z měření. Optimalizované hodnoty pro laser s vlnovou délkou 1 064 nm byly sestaveny následovně. Energie laseru 7 mJ, doba zpoždění sběru signálu 2,0 μs , rozlišení $100 \times 100 \mu\text{m}$ a ofuk argonem. Doba zpoždění sběru signálu detektorem byla podle studie 2,0 μs , ale po zvážení všech okolností byla hodnota nastavena na 0,5 μs , tedy totožně jako pro laser s kratší vlnovou délkou.

Na grafu (Obrázek 32) lze pozorovat SNR analýzu pro tři vlnové délky nanosekundového laseru. Experimenty byly sestaveny a zopakovány podle již publikovaných vědeckých prací (pro laser s vlnovou délkou 532 nm a 1 064 nm) pro možnost porovnání s optimalizací z naší laboratoře. Podle provedených měření a podle SNR analýzy bylo prokázáno, že laser s vlnovou délkou 266 je opravdu pro měkké tkáně nejvhodnější (dochází k nejvyšší absorpci laserové energie analyzovaným materiálem). I když u SNR analýzy je patrná poměrně velká odchylka, i přesto je výsledek výrazně lepší než pro delší vlnové délky. Tomuto faktu nasvědčují i velikosti kráterů, které jsou sice s vlnovou délkou 1 064 nm velmi podobné, ale červený laser má značně vyšší odchylku (Tabulka 9). Dalším neméně důležitým parametrem je i tvar kráterů a důsledky na okolní tkáň po výstřelu, který je u vlnové délky 266 nm

nejpříznivější a také fakt, že u nejkratšího laseru máme možnost analýzy s nejvyšším rozlišením.



Obrázek 32: Srovnání optimálního nastavení pro jednotlivé vlnové délky u nanosekundového pulzního laseru v závislosti SNR analýzy na energii. V grafu jsou zobrazeny i fotografie vzniklých kráterů.

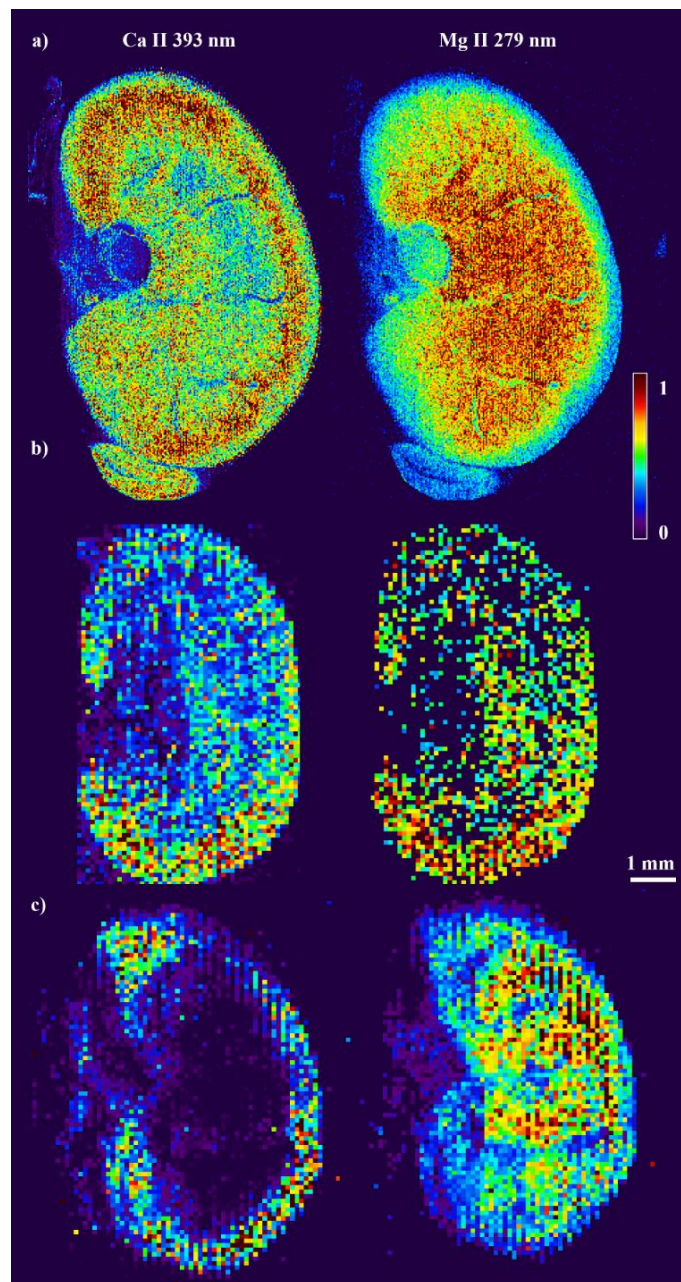
Velikosti kráterů byly naměřeny pomocí systému LIBS FireFly s použitím mikroskopického objektivu s pětinasobným přiblížením (EO5x). Všechny krátery byly proměřovány opakovaně (vždy minimálně 5x).

Tabulka 9: Průměrné velikosti ablačních kráterů pro optimální nastavení různých vlnových délek nanosekundového laseru.

| Vlnová délka laseru (nm) | Průměrná velikost kráterů (mm) | Směrodatná odchylka (mm) |
|--------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| 266 | 0,115 | 0,006 |
| 532 | 0,125 | 0,006 |
| 1 064 | 0,110 | 0,010 |

Pro všechny tři vlnové délky laseru (266 nm, 532 nm a 1 064 nm) byly mapovány myší ledviny, jakožto modelové matrice měkkých tkání, podle výše zmíněných parametrů měření. Výsledky analýzy jsou zobrazeny na prvkových mapách (Obrázek 33). Byly opět vybrány nejvíce zastoupené biogenní chemické prvky (Ca II 393 nm a Mg II 279 nm) v tkáni. Pro modrý laser (Obrázek 33 a)) byla velikost mapy $333 \times 247 = 82\,251$ pixelů s prostorovým rozlišením $30 \times 30 \mu\text{m}$ v osách x a y. Pro zelený laser (Obrázek 33 b)) je zobrazena mapa o velikosti $82 \times 50 = 4\,100$ pixelů, ale s odlišným prostorovým rozlišením. Ten byl na systému nastaven na nejvyšší možné rozlišení, tedy na $100 \times 100 \mu\text{m}$ v obou osách. Opět lze pozorovat, že nejvyšší koncentrace vápníku je v kůře ledviny a s postupem do dřene a do ledvinových pyramid tato koncentrace rapidně klesá. Hořčík je nejvíce zastoupen ve vnitřních částech ledviny, především ve dřeni. Pro červený laser lze vidět níže mapu (Obrázek 33 c)) o velikosti $86 \times 70 = 6\,020$ pixelů s prostorovým rozlišením opět $100 \times 100 \mu\text{m}$ v obou osách.

Všechny prvkové mapy jsou zobrazeny s měřítkem 1 mm. I přes menší rozlišení mapy jsou viditelné podobné výsledky jako pro modrý laser. Rozložení chemických prvků v ledvině odpovídá i s vlivem na rozmístění nefronů v ledvině, kde dochází k tvorbě moči.

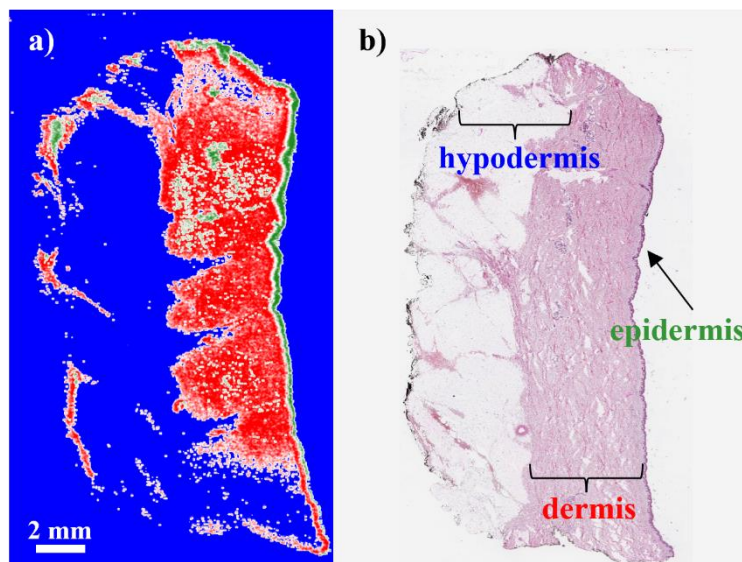


Obrázek 33: Prvkové mapy distribuce vápníku (Ca II 393 nm) a hořčíku (Mg II 279 nm) po lasery s vlnovou délkou a) 266 nm, b) 532 nm a c) 1 064 nm.

5.4 Prostorově rozlišená analýza zdravé kůže s využitím LIBS

Nejprve byla studována lidská kůže zalitá v parafínu bez nádorového onemocnění z důvodů možného porovnání analýz s napadenou rakovinovou tkání. U zdravé kůže bylo hlavním úkolem zjistit, jestli se liší signály z LIBS analýzy u třech základních částí lidské kůže (*epidermis*, *dermis* a *hypodermis*), jelikož mají odlišnou strukturu a poměrně odlišné chemické zastoupení prvků.

Všechny oblasti s procentuálním rozvrstvením vápníku (Ca II 393 nm) jsou znázorněny na námi měřeném vzorku lidské kůže pomocí techniky LIBS na Obrázku 34 a). Jednotlivé oblasti byly získány po klastrování dat v programu Epina ImageLab. Na Obrázku 34 b) je rozdělení kůže na histologickém snímku, který byl pořízen ve FNHK a popsán histology.

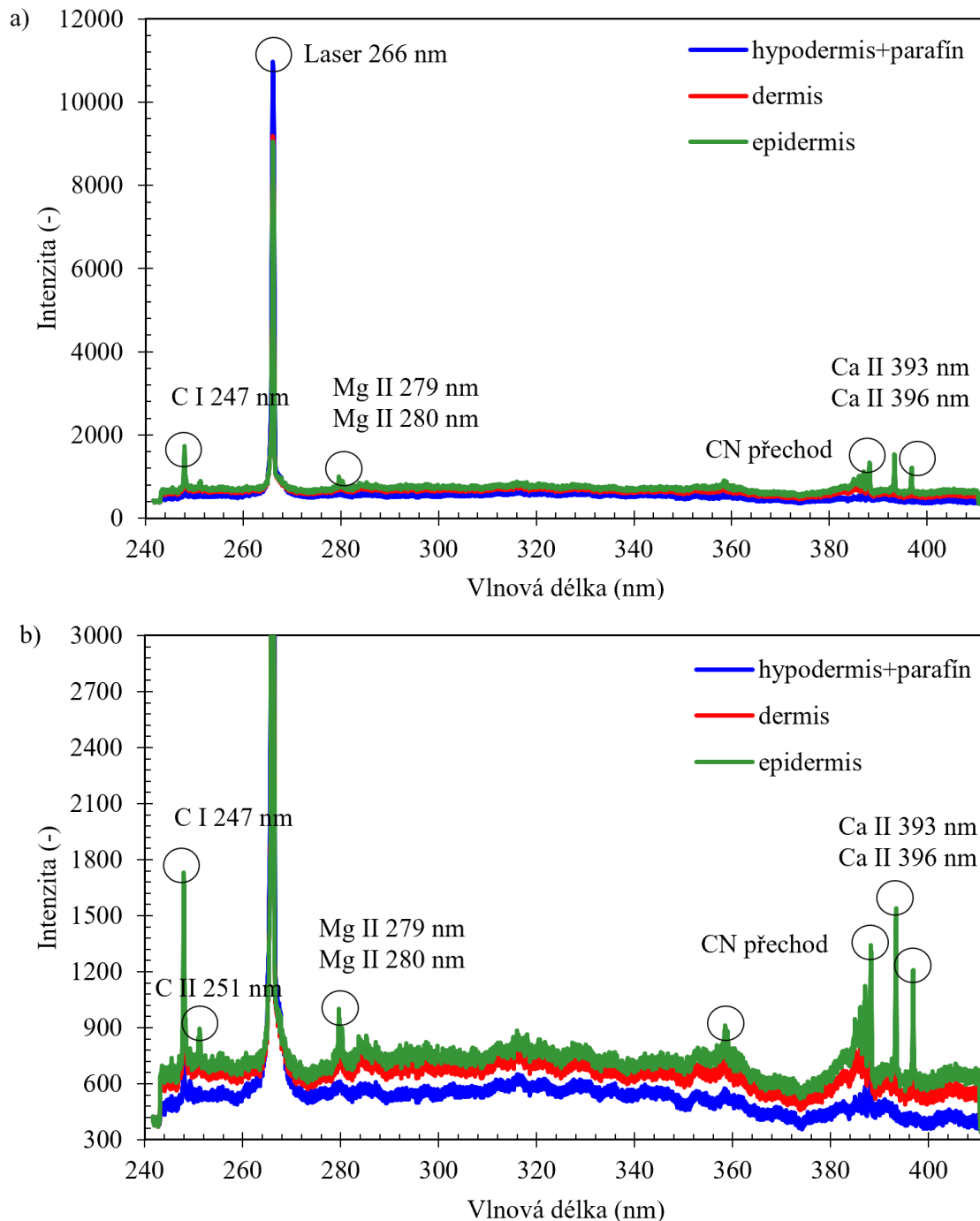


Obrázek 34: a) Ukázka jednotlivých vrstev kůže s klastrovanými oblastmi vápníku (Ca II 393 nm), který byl analyzován metodou LIBS a sestaven v programu Epina ImageLab. b) histologický snímek z FNHK. Epidermis znázorněna zeleně, dermis červeně a hypodermis s parafínem modře.

Bylo prokázáno, že jednotlivé vrstvy kůže se od sebe chemickým zastoupením patrně liší. To lze vidět v grafu (Obrázek 35), který zobrazuje spektra pro jednotlivé části kůže. V první části (Obrázek 35 a)) lze vidět celá spektra i s velmi intenzivní spektrální čarou laseru (266 nm). Tuto čaru vidíme z důvodu nedokonalého ukončení laserového pulzu - po skončení pulzu se špičkovým výkonem nedojde k poklesu intenzity laseru na 0, ale na nezanedbatelnou nenulovou hodnotu, kterou je detektor schopný takto výrazně zachytit. Proto byl sestaven druhý graf (Obrázek 35 b)), u kterého byla vybrána oblast intenzit pouze do 3 000 (-), aby bylo možné lépe pozorovat spektrální čáry pro makrobiogenní a mikrobiogenní chemické prvky zastoupené v tkáni, jelikož tyto spektrální čáry nejsou obecně moc intenzivní. Na tomto grafu jsou znázorněny průměrná spektra pro jednotlivé oblasti - *epidermis* (zeleně), *dermis* (červeně) a *hypodermis* spolu s parafínem (modře).

Ve spektru (Obrázek 35 b)) jsou vyznačeny všechny detekovatelné spektrální čáry, které jsou v biologické měkké tkáni široce zastoupené. Lze pozorovat, že nejintenzivnějších signálů bylo dosaženo při analýze *epidermis* (zobrazenou zeleně), zejména u vápníkových spektrálních čar (Ca II 393 nm a Ca II 396 nm), uhlíkových čar (C I 247 nm) a hořčíkových čar (Mg II 279 nm a Mg II 280 nm). Tyto velmi vysoké intenzity ve spektru jsou způsobeny tím, že *epidermis* je nejsvrchnější vrstva kůže tvořená dlaždicovými buňkami, které jsou složeny zejména z velkého množství keratinu a keranocytů, tudíž jsou velmi bohaté na bílkoviny a další biogenní prvky (např. vápník). Zároveň je *epidermis* i nejtvrďší (záleží také na umístění na těle), tudíž pro laserovou ablaci nejvhodnější. Je ale také nejtenčí z jednotlivých vrstev kůže. *Dermis* (druhá vrstva kůže, škára) je tvořena především

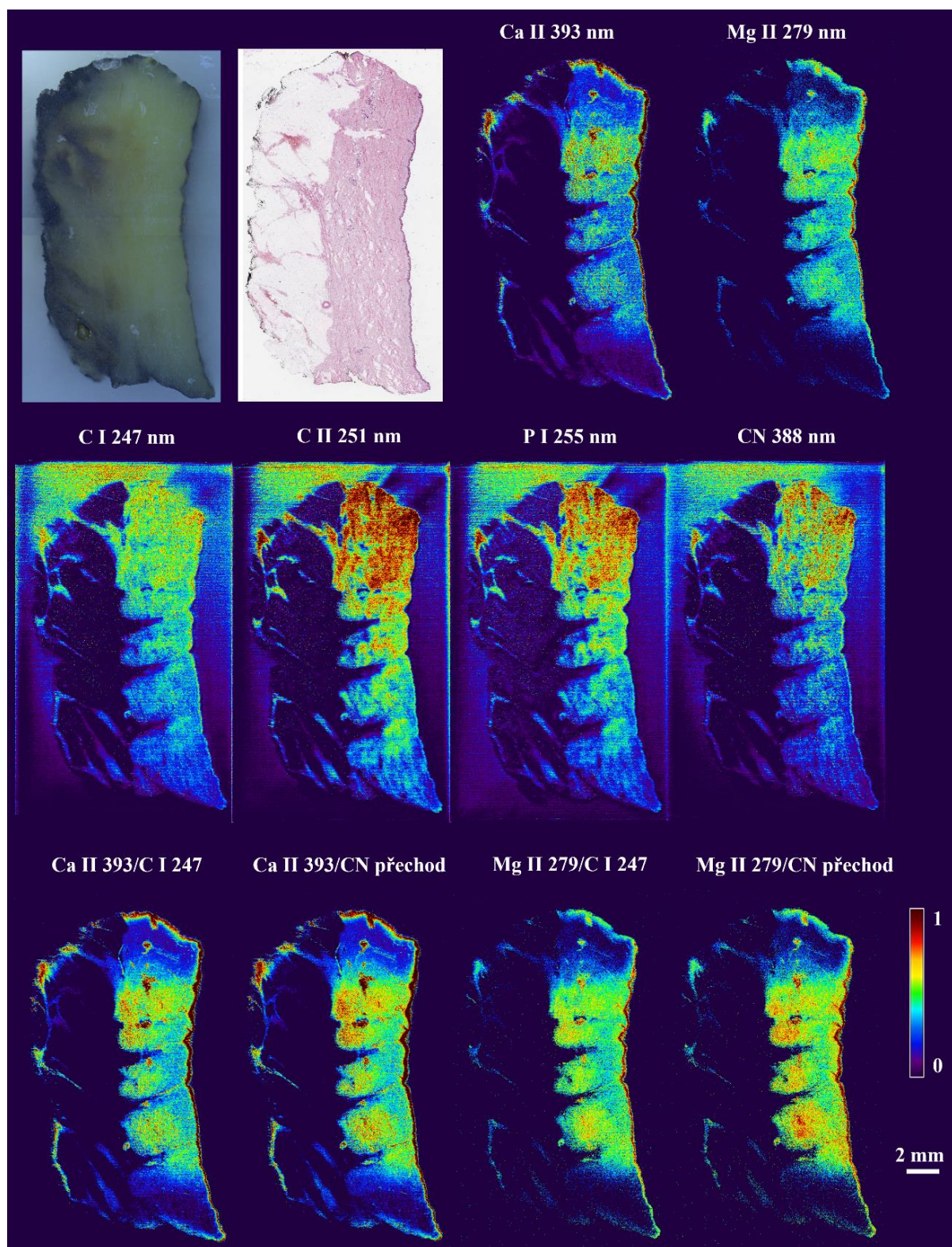
kolagenem typu I., proto i zde je viditelná nemalá koncentrace vápníku (zobrazena červeně). Ovšem ne v takovém množství jako na povrchu kůže. Z analýzy *hypodermis* neboli kožního vaziva (zobrazena modře) je odezva velmi malá, téměř nulová. To je způsobeno tím, že tato vrstva je tvořena velmi řídkým kolagenním vazivem



Obrázek 35: Průměrná spektra pro jednotlivé oblasti lidské kůže bez tumoru – epidermis (zeleně), dermis (červeně) a hypodermis s parafínem (modře) s vyznačenými makrobiogenními a mikrobiogenními chemickými prvky, které jsou charakteristické pro lidskou kůži.

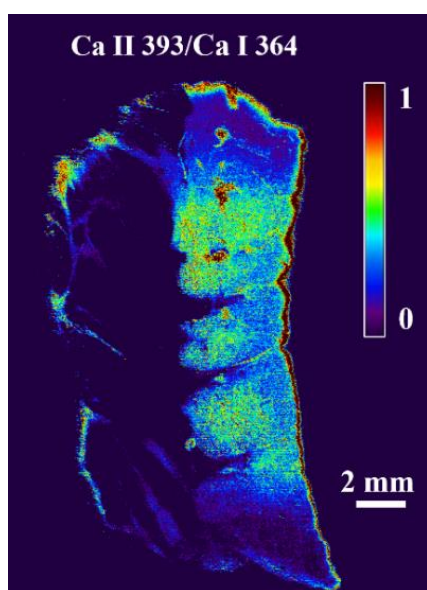
Po LIBS analýze s použitím optimálních parametrů (laser 266 nm) byly výsledky zpracovány v programu Epina ImageLab a byly vytvořeny mapy prostorové distribuce prvků (Obrázek

36) pro vápník (Ca II 393 nm), hořčík (Mg II 279 nm), atomové a iontové čáry uhlíku (C I 247 nm a C II 251 nm), fosfor (P I 255 nm) a CN přechod (388 nm). Velikost mapy byla $448 \times 747 = 334\,656$ pixelů s prostorovým rozlišením $30 \times 30 \mu\text{m}$ a měřítkem 2 mm.



Obrázek 36: Fotografie vzorku lidské kůže z mikroskopu, histologický snímek pořízený ve FNK a mapy prostorové distribuce prvků pro vybrané spektrální čáry spolu s podíly těchto čar.

Na Obrázku 36 lze vidět fotografii vzorku z mikroskopu s jednonásobným přiblížením a histologický snímek vzorku obarvený hematoxylinem a eozinem. Z map prostorových distribucí prvků je patrná silná heterogenita prvků s tím, že vápník i hořčík je nejvíce zastoupený v *epidermis*, nižší koncentrace je v *dermis* a téměř nulová koncentrace těchto prvků je v *hypodermis*. Tyto výsledky přesně odpovídají morfologii a chemickému složení lidské kůže. Dále byly sestaveny prvkové mapy pro atomovou a iontovou spektrální čáru uhlíku (C I 247 nm; C II 251 nm), fosforu (P I 255 nm) a CN přechodu (388 nm). Tyto výsledky nám ukázaly, že rozdíl v zastoupení těchto prvků ve dvou vrchních vrstvách kůže není nijak zásadní. Ovšem v tukové tkáni se tyto chemické prvky téměř nevyskytují. Pro zkoumání rozdílů relativních intenzit mezi jednotlivými vrstvami kůže byly spektrální čáry vápníku a hořčíku normovány spektrálními čarami uhlíku (C I 247 nm) a CN přechodu (388 nm) i z toho důvodu, aby došlo k potlačení matričního jevu.



Obrázek 37: Prostorová distribuce prvků pro indikaci tvrdosti lidské kůže.

Pro tento vzorek lidské kůže byla od sebe podělena iontová a atomová čára vápníku z důvodu indikace tvrdosti biologické matrice. Potvrzuje se tvrzení, že nejsvrchnější vrstva kůže *epidermis* (pravá část prvkové mapy) je opravdu nejtvrďší a nejspodnější vrstva kůže je velice měkká, jelikož je tvořena tukovými buňkami.

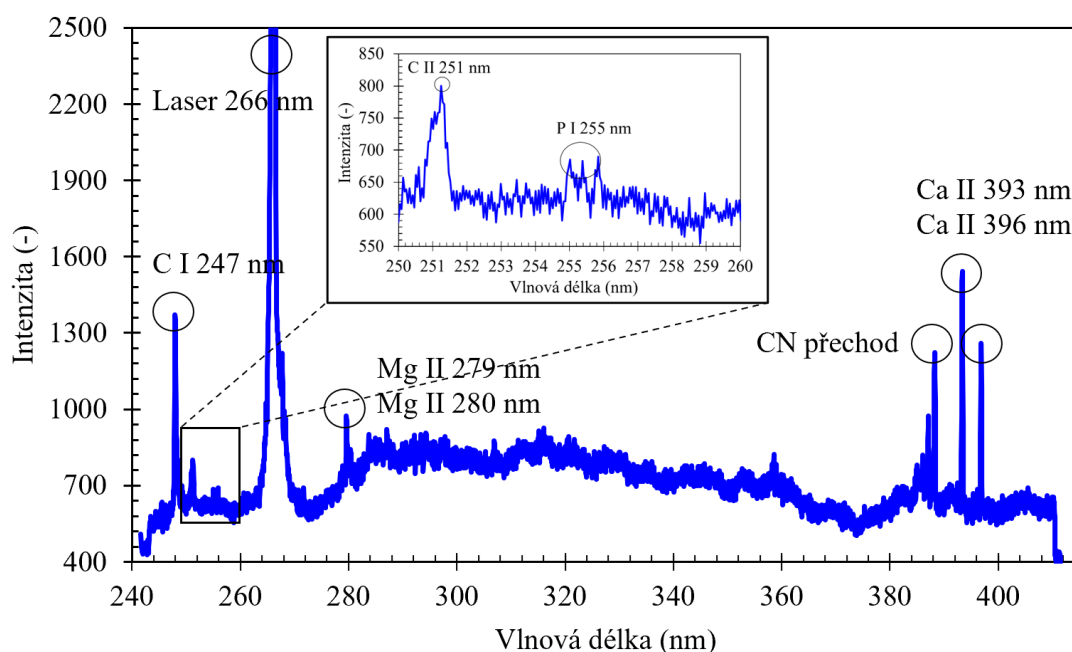
5.5 Prostorově rozlišená LIBS analýza nádorových tkání

Byly analyzovány tři nejčastěji se vyskytující typy rakoviny kůže (maligní melanom, spinaliom a bazaliom) zalité v parafínu. Proběhlo měření pěti vzorků maligního melanomu, pěti vzorků spinaliomu a šest vzorků bazaliomu. Každému vzorku bylo přidáno číselné označení pro lepší orientaci. U všech analýz bylo provedeno totožné vyhodnocení. Všechny vzorky byly měřeny za stejných podmínek, které byly optimalizovány výše (Tabulka 8). Výsledky byly diskutovány s MUDr. Kateřinou Kiss z Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

Snímky LIBS umožňují vizualizovat strukturu tkáně z chemického hlediska (např. Ca, Fe, Mg, Na, P a Zn) a zkoumat rozdíly mezi nenádorovou a nádorovou lidskou tkání.

5.5.1 Maligní melanom

Prvková analýza u tumorů kůže, například melanomu, je možná i z důvodu, protože melanomové léze mají oproti dermis vyšší suchost, rozdíl v obsahu vody, v primárních složkách tkáni a v tuhosti. Také bylo potvrzeno, že melanomy mají hustší strukturu obsahující pigment melanin ve srovnání s dermis, která je složená především z kolagenu a dalších složek extracelulární matrice (glykosaminoglykany, fibroblasty) [87]. Možností pro určení patologického stavu tkáně pomocí LIBS obrazu prvkového mapování je analýza vápníkové (Ca) a hořčíkové (Mg) spektrální emisní čáry. Bylo prokázáno, že především hořčík, oproti jiným detekovatelným prvkům z měkké tkáně (Na, H, K, O a Cl), vykazuje výrazně vyšší intenzity spektrálních čar u napadené tkáně než u tkáně zdravé [87].



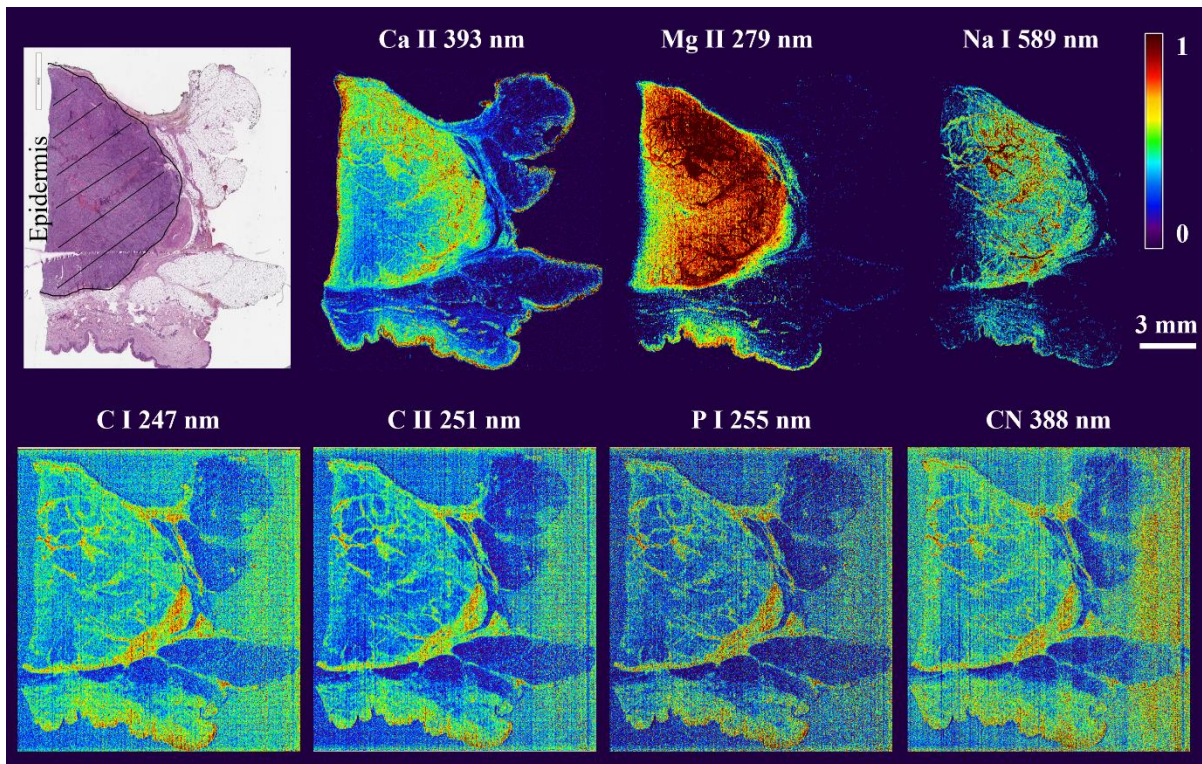
Obrázek 38: Maximální intenzity v závislosti na vlnových délkách pro nádorovou tkáň.

Ve spektru (Obrázek 38) jsou zobrazeny nejvýraznější detekovatelné spektrální čáry pro vzorky měkkých tkání zalitých v parafínu s nádorovým onemocněním, mezi které patří především vápník (Ca II 393 nm, Ca II 396 nm), hořčík (Mg II 279 nm, Mg II 280 nm), uhlík (C I 247 nm, C II 251 nm) a fosfor (P I 255 nm). Tyto chemické prvky jsou vykresleny v mapách distribuce chemických prvků pro maligní melanom s označení P57B. Velikost mapy byla $548 \times 541 = 296\,468$ pixelů, s prostorovým rozlišením $30 \times 30 \mu\text{m}$ a měřítkem 3 mm.

Z map distribuce prvků (Obrázek 39) pro vápník (Ca II 393 nm) a hořčík (Mg II 279 nm) je patrné, že se shodují s oblastí nádoru vyznačeném na histologickém snímku (levá strana vzorku značí *epidermis*). Zejména výsledky pro hořčíkovou spektrální čáru jsou vynikající a velmi slibné do budoucna. Hodnoty intenzit této spektrální čáry jsou v oblasti nádoru velmi vysoké. Pro sodík (Na I 589 nm) nejsou viditelné zřejmé závislosti na malignitě tkáně.

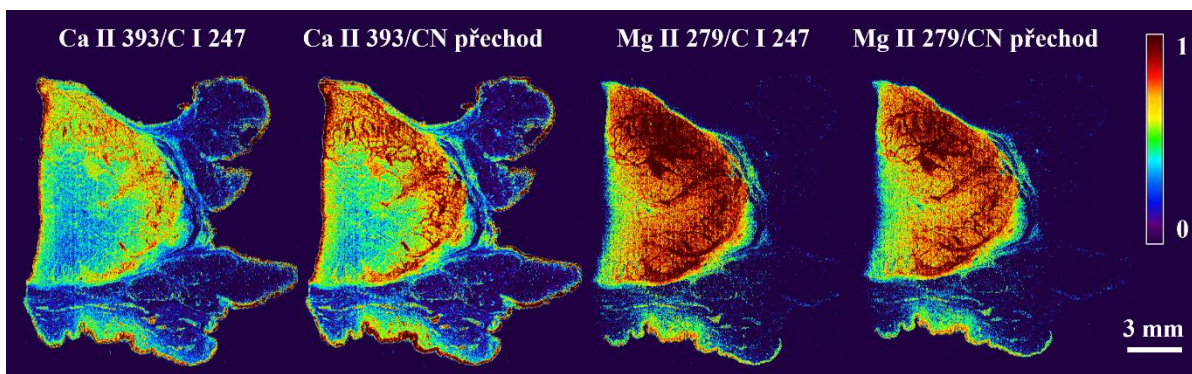
Mezi další detekované biogenní prvky patří atomová (C I 247 nm) a iontová (C II 251 nm) spektrální čára uhlíku, fosfor (P I 255 nm) a CN přechod (388 nm). Z map distribuce prvků

zobrazených na Obrázku 39 není patrný žádný výraznější trend pro tyto prvky. Mapy ani nedosahují tak vysoké kvality jako pro vápník a hořčík. Toto je způsobeno pravděpodobně tím, že se u těchto prvků dostáváme velmi blízko k limitům detekce.



Obrázek 39: Histologický snímek maligního melanomu P57B a mapy prostorových distribucí pro vápník, hořčík, sodík, atomovou a iontovou spektrální čáru uhlíku, fosfor a CN přechod.

Pro zkoumání rozdílů v relativních intenzitách mezi chemickými prvky v maligním melanomu a dermis byly spektrální čáry hořčíku a vápníku normovány hodnotami atomové spektrální čáry uhlíku (C I 247 nm) a spektrální čarou CN přechodu (CN 388 nm). Na těchto mapách (Obrázek 40) prostorové distribuce prvků je viditelná i struktura biologické tkáně spolu s vysokou intenzitou vápníku na povrchu vzorku, tedy v *epidermis*. Dále je viditelná velmi vysoká intenzita u spektrální čáry hořčíku. Toto je další důkaz, který by mohl brát na zřetel hořčík jakožto další indikátor nádorového onemocnění.



Obrázek 40: Mapy prostorové distribuce prvků maligního melanomu P57B pro vápník a hořčík normované atomovou spektrální čarou uhlíku.

Bylo měřeno několik vzorků maligního melanomu. Na Obrázku 41 jsou zobrazeny další dva vybrané melanomy s označením P7B (velikost mapy $257 \times 689 = 177\,073$ pixelů, měřítko 2 mm) a P42B (velikost mapy $513 \times 632 = 324\,216$ pixelů, měřítko 3 mm). První vzorek se původně nacházel na temeni hlavy pacienta. Na mapě jsou viditelné analyzované vlasové folikuly a z nich rostoucí vlasy. Druhý vzorek se původně nacházel na palci nohy pacienta. Tyto mapy prostorové distribuce prvků pro vápník (Ca II 393 nm), hořčík (Mg II 279 nm) a jejich podíly s uhlíkem (C I 247 nm) nám ukazují velmi podobné výsledky jako pro první zmíněný případ maligního melanomu (P57B). Opět jsou zřetelně viditelné maligní oblasti nádoru, které se téměř shodují s oblastmi vysokých intenzit pro hořčíkovou spektrální čáru, především pro podíl Mg II/C I.

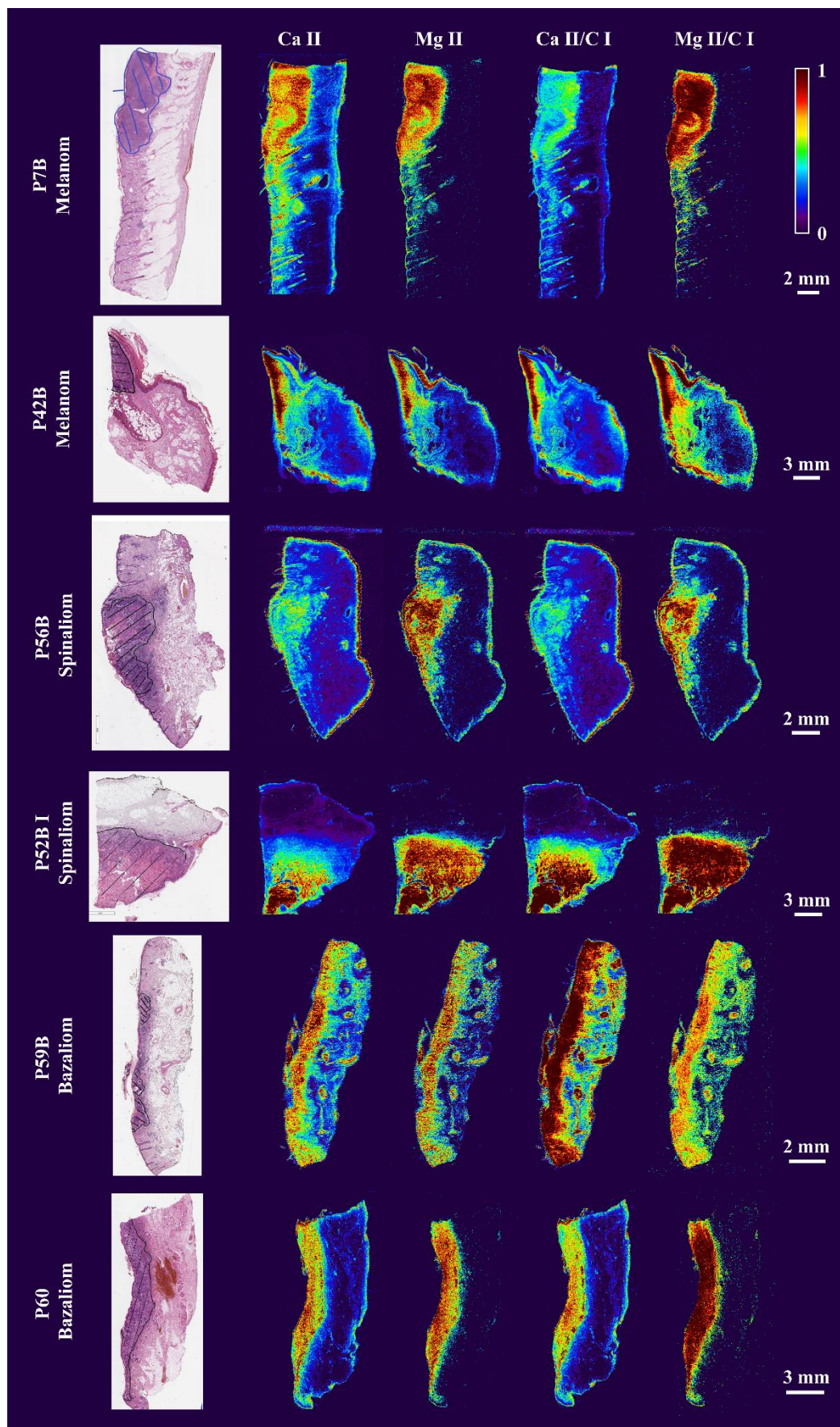
5.5.2 Spinocelulární karcinom

Výsledky LIBS analýzy několika měřených bazaliomů vypadají velice slibně. Pro ukázkou byly do této práce vybrány dva vzorky z celkově pěti doposud analyzovaných. Vzorek P56B (velikost mapy $307 \times 532 = 163\,224$ pixelů, měřítko 2 mm), který se nacházel na obličeji pod nosem pacientky a vzorek P52B I (velikost mapy $468 \times 521 = 243\,828$ pixelů, měřítko 3 mm) nacházejícího se původně na paži pacienta. Z prvkových map (Obrázek 41) jsou jasně viditelné závislosti malignity tkáně na vysokých koncentracích zobrazených prvků. Opět si potvrzujeme, že zejména hořčík by mohl být pro diagnostiku kůže používán. Tento fakt podporují i mnohé dřívější publikace [87,92]. Spinaliomy se tvoří z dlaždicových buněk, které se nacházejí ve vnější vrstvě kůže. Proto jsou oblasti tumoru viditelné jak z histologických snímků, tak i z map distribuce prvků v oblastech *epidermis*, částečně může zasahovat i do *dermis*.

5.5.3 Bazocelulární karcinom

Tento typ rakoviny kůže je zastoupen v této práci dvěma vzorky (Obrázek 41). Prvním z nich je vzorek s označením P59B (velikost mapy $235 \times 471 = 118\,221$ pixelů, měřítko 2 mm) ze špičky nosu pacientky. V mapě prostorové distribuce chemických prvků pro tento vzorek je zobrazená poměrně podrobná struktura lidské tkáně. Jsou zde jasně viditelné cévy v podkožním vazivu. Tento vzorek zcela nekoreluje s histologickým označením maligní oblasti u vápníku, ani u hořčíku. Tento jev může být způsoben například možnou zánětlivou reakcí v okolí nádoru. Proto tyto výsledky nejsou přesné. Druhým vzorkem je P60 (velikost mapy $621 \times 266 = 165\,186$ pixelů, měřítko 3 mm). U tohoto vzorku je možné vidět značnou spojitost mezi distribucí hořčíku a vápníku s nádorovou oblastí, zejména u podílu Mg II/C I. Jelikož je bazaliom typ nádoru, který nejčastěji lemuje nejhlubší vrstvu *epidermis* (lehce i *dermis*), tedy nejsvrchnější vrstvu kůže, a nešíří se obvykle do dalších částí těla, jsou oblasti tumorů u vzorků jen v této oblasti (levá část). Tento trend lze pozorovat i z LIBS výsledků.

Následující mapy prostorové distribuce prvků ukazují pro všechny tři typy rakoviny kůže dva zástupce (Obrázek 41). Nádorová oblast se vyskytuje na povrchu kůže, vždy je zobrazená na levé straně snímků. Byla použita stejná intenzitní škála pro podíly Ca II/C I u všech uvedených vzorků, stejně jako bylo použito stejné škálování u podílů Mg II/C I pro všechny zobrazené vzorky.



Obrázek 41: Mapy prostorové distribuce prvkového složení pro 2 vzorky maligního melanomu, 2 vzorky spinaliomu a 2 vzorky bazaliomu.

5.6 Prostorově rozlišená LA-ICP-MS analýza nádorových tkání

Tato metoda byla vybrána pro porovnání výsledků s LIBS analýzou díky vyšší citlivosti, možnosti lepšího rozlišení výsledné mapy prostorové distribuce prvků a také kvůli tomu, že je tato metoda v oblasti diagnostiky kůže více zaběhlá než technika LIBS. Ovšem i u této metody nejsou dosavadní výsledky natolik stoprocentní, aby byla využívána v běžné praxi při diagnostice nádorů.

Pomocí metody LA-ICP-MS byly studovány celkově tři vzorky tumorů kůže, které měly tloušťku 10 μm a byly analyzované přímo na laboratorním sklíčku. Mezi tyto vzorky patřil jeden vzorek maligního melanomu (P42B), jeden vzorek spinaliomu (P56B) a jeden vzorek bazaliomu (P59B). Všechny tři vzorky byly předem analyzované metodou LIBS pro možné porovnávání výsledků. Neprobíhalo mapování celých vzorků jako u techniky LIBS, ale pouze mapování oblastí s nádory z důvodu velmi vysoké časové náročnosti měření. Všechna měření byla provedena na Technické univerzitě ve Vídni v laboratoři profesora Andream Limbecka.

Pro analýzu byly vybrány následující izotopy: ^{13}C , ^{24}Mg , ^{31}P , ^{34}S , ^{56}Fe , ^{63}Cu a ^{66}Zn . Mezi tyto izotopy patří především ty, které je nemožné nebo velice problematické analyzovat pomocí metody spektroskopie laserem buzeného plazmatu z důvodu stopového množství těchto prvků v lidské tkáni. Proto byla využita jiná technika s vyšší citlivostí. Izotopy byly vybrány na základě již vydaných publikací na téma diagnostiky nádorových onemocnění v lidských tkání metodou LA-ICP-MS [59,72,91].

Bylo prokázáno, že koncentrace stopových prvků v nádorových tkáních, jako například zinek, měď a železo, může být zvýšená oproti zdravé tkáni. Tyto prvky jsou nezbytné pro fungování organismu a zodpovědné za biologické a metabolické procesy [59]. Změny v zastoupení těchto stopových prvků v nádorových tkáních oproti zdravým tkáním by se daly použít u biozobrazovacích analytických technik k diagnostice nádorů. Izotop uhlíku byl vybrán s úmyslem pro využití jako vnitřního standardu prvku pro zobrazení distribuce prvků. Nekovy, jakožto fosfor a síra, byly vybrány na základě již publikovaných vědeckých prací [67,91,93]. Hořčík a fosfor byly vybrány za účelem porovnání těchto chemických prvků mezi metodami LIBS a LA-ICP-MS a také z důvodu možných biomarkerů pro diagnostiku nádorové tkáně [87].

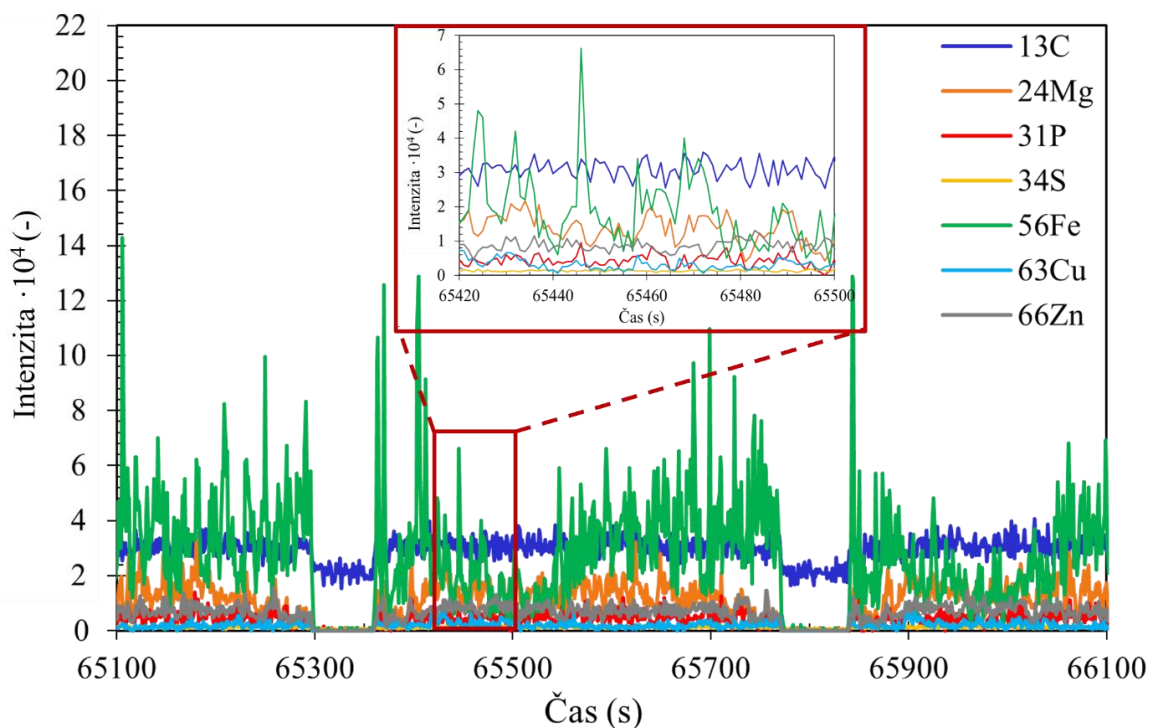
Všechny tři vzorky byly měřeny s následujícími optimalizovanými parametry systému: 1 % z maximální energie laseru 2,6 mJ (0,026 mJ), opakovací frekvence na maximální hodnotě 100 Hz, rychlost skenování 1000 $\mu\text{m}/\text{s}$. Po zkoušení různých prostorových rozlišení bylo vybráno jako optimální rozlišení 20 \times 20 μm , kdy se průměrná velikost kráterů pohybovala mezi 22–24 μm . Parametr překrytí byl nastaven na 16,36 %

5.6.1 Spinoocelulární karcinom

Analýza byla provedena pouze v oblasti nádoru vyznačeného histology (červeně označená oblast), tedy ve svrchních vrstvách kůže (*epidermis* a *dermis*). Tento konkrétní typ nádoru byl umístěn na povrchu obličeje pacienta (s označením P56B). Jedná se o spinaliom, tedy o nádor, který může metastázovat a dostávat se i do hlubších vrstev kůže, popřípadě může napadat

i okolní uzliny. U tohoto konkrétního případu se jednalo o dobře diferencovaný spinaliom neboli ne tolik agresivní typ nádoru.

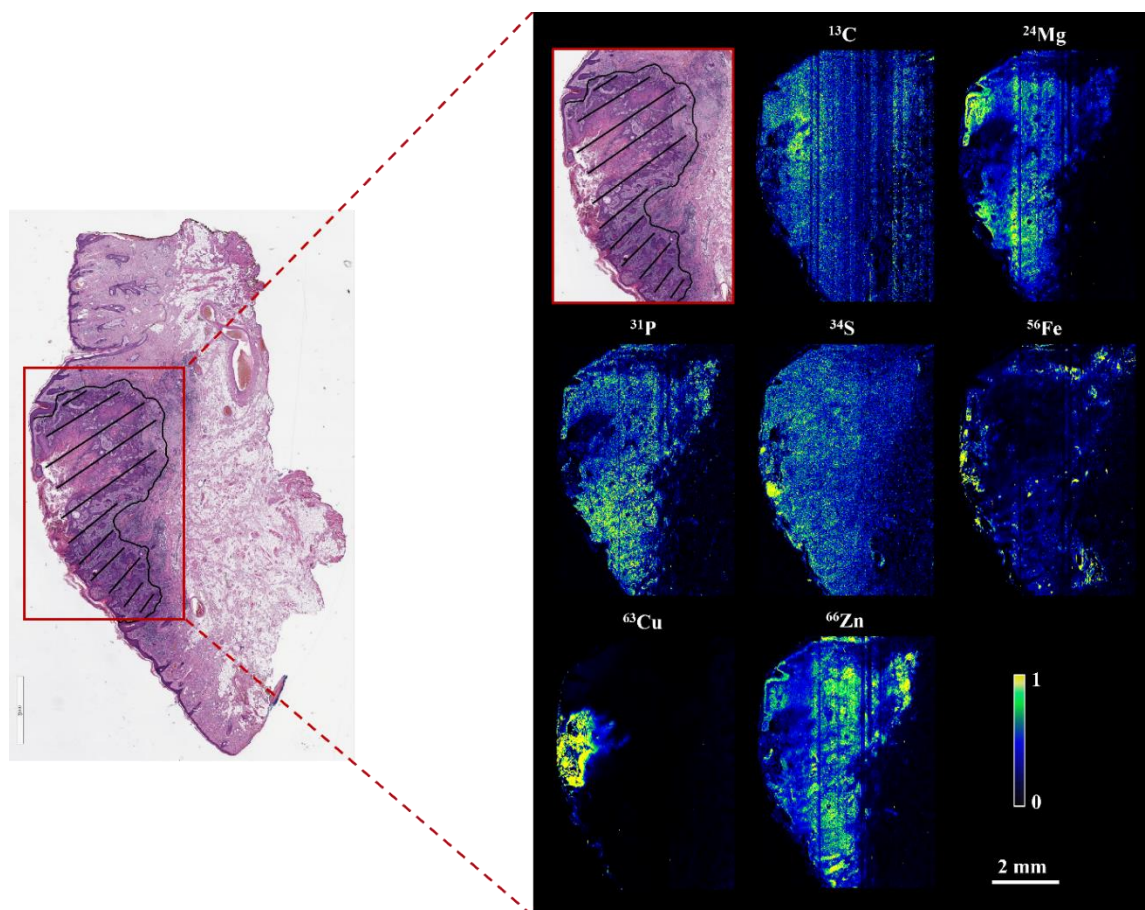
V grafu (Obrázek 42) je viditelný úsek z analýzy v závislosti intenzity na časovém průběhu měření pro izotopy, které byly vybrány k analýze měkkých tkání s nádorovým onemocněním, konkrétně pro případ spinaliomu. Celkový čas analýzy byl přibližně 144 minut (8 669 s). Úseky se signifikantním poklesem intenzity nebo s nulovou intenzitou ukazují dobu, kdy byl laser v OFF módu. Lze pozorovat, že uhlík (^{13}C) vykazuje poměrně konstantní signál po celou dobu analýzy, tedy že je pravděpodobně homogenně rozložen v celém vzorku. I díky tomuto výsledku se potvrdilo, že uhlík je ideální pro využití jako vnitřního standardu. Ovšem v této práci takto využit nebyl, jelikož to nebylo nutné pro naši aplikaci. Dalším izotopem se souvislým a také velmi nízkým signálem je síra (^{34}S). Železo (^{56}Fe) zde vykazuje velice nerovnoměrný signál s mnoha píky, jelikož se nevyskytuje homogenně v celém vzorku (cévy). Ostatní izotopy vykazují také poměrně konstantní signály, to je ale pravděpodobně způsobeno tím, že pro ukázkou byl vybrán pouze velmi krátký časový úsek analýzy (od 65 100 s do 66 100 s), kde tyto izotopy byly s největší pravděpodobností konstantně rozloženy. I z tohoto důvodu byly sestaveny prvkové mapy pro možné pozorování jednotlivých izotopů v celé oblasti analyzovaného vzorku.



Obrázek 42: Reprezentativně časově rozlišená LA-ICP-MS spektra získaná během analýzy spinocelulárního karcinomu (P56B) pro následující izotopy: uhlík, hořčík, fosfor, síra, železo, měď a zinek.

Na Obrázku 43 je zobrazená prostorová distribuce prvků pro spinaliom (mapovaná oblast velikosti $8,2 \times 5,82 \text{ mm} = 47,72 \text{ mm}^2$, celkový čas analýzy 144 minut, velikost prvkové mapy $410 \times 291 = 119\,310$ pixelů, měřítko 2 mm, rozlišení $20 \times 20 \mu\text{m}$). Pro tuto techniku byly vybrány barvy zobrazovací škály od černé pro nulovou intenzitu do žluté pro maximální intenzitu.

Z prvkových map pro jednotlivé prvky je možné si potvrdit tvrzení zmíněné výše, že uhlík (^{13}C) a síra (^{34}S) jsou na tenkém řezu rozloženy poměrně homogenně. Přesto se u těchto prvků vyskytují oblasti se zvýšeným signálem. To je způsobeno asi rozdílnou hustotou tkáně nebo odlišnou tloušťkou řezu na laboratorním skle. Naproti tomu železo (^{56}Fe) a měď (^{63}Cu) vykazují heterogenní rozložení v celé biologické matici. Měď se podílí na tvorbě elastinu a kolagenu [1], proto možná vyšší koncentrace mědi ve vrchní části *epidermis* poukazuje na to, že tento těžký kov je nahromaděný v již odumřelé a zcela zkeratinizované oblasti nádoru. Vyšší koncentrace železa ve vrchních vrstvách kůže svědčí o malých oděrkách, kde zůstala krev. Ovšem prvková mapa železa poukazuje poměrně přesně na oblast nádoru. To může být způsobeno tím, že oblast nádoru by mohla být více prokrvená a také z důvodu přítomnosti cév v řezu, které jsou vyplněné krví (erytrocyty neboli červenými krvinkami). Další prvky, jako hořčík (^{24}Mg), fosfor (^{31}P) a zinek (^{66}Zn), zcela vykreslují oblast vyznačenou od histologů. Opět se potvrzují již publikovaná tvrzení [20,59,72,91], že tyto chemické prvky jsou zastoupeny ve vyšších koncentracích v maligních tkáních, a že hrají zásadní roli při diagnostice nádorů u měkkých tkání.

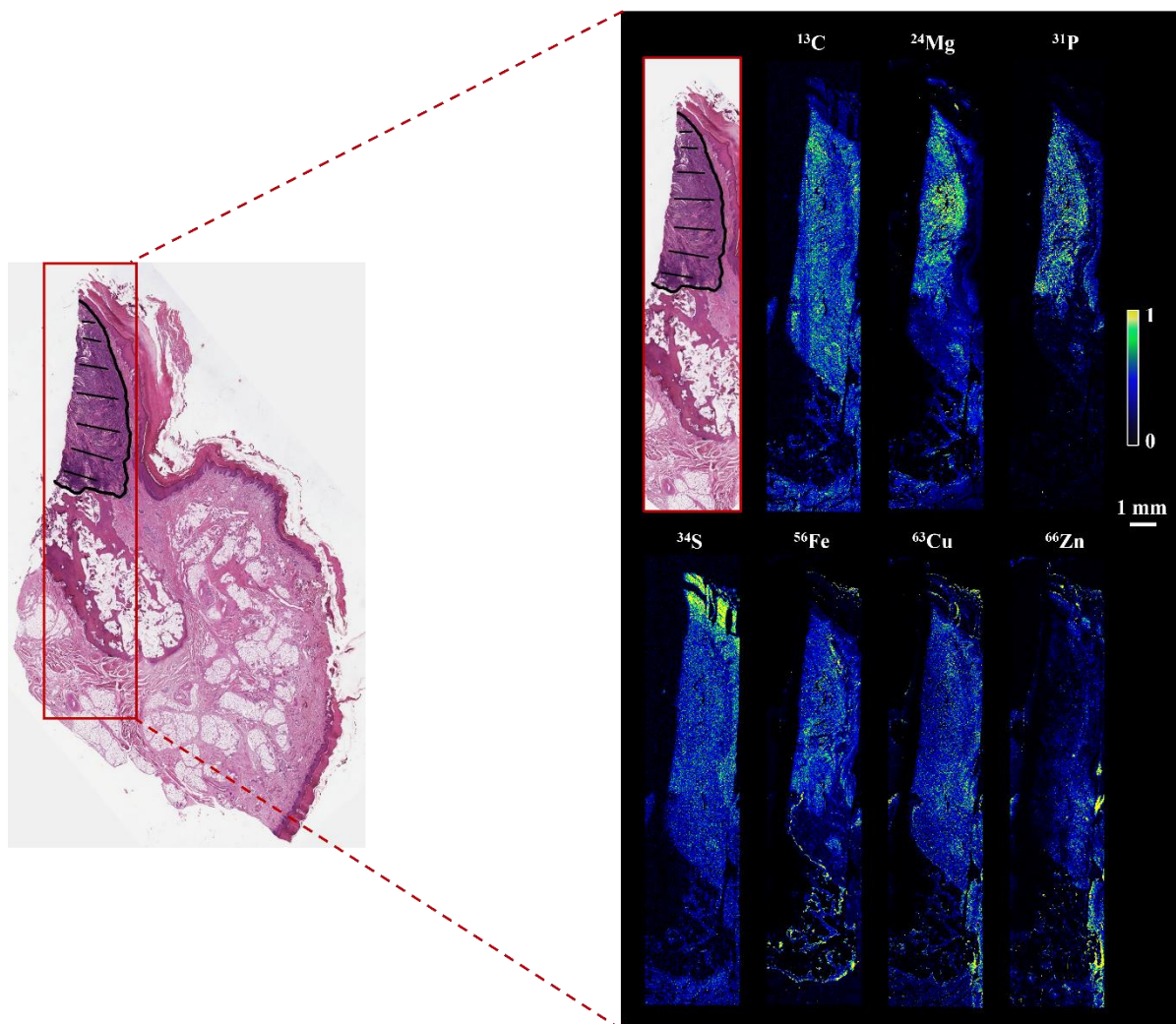


Obrázek 43: Prvkové mapy pro vyznačenou oblast spinaliomu (P56B) s využitím metody LA-ICP-MS.

5.6.2 Maligní melanom

Pro LA-ICP-MS analýzu akrolentignózního maligního melanomu (s označením P42B), tedy nejčastěji se vyskytujícího se melanomu na periferních částech lidského těla, byla vybrána pouze oblast nádoru a jeho blízkého okolí z důvodu velmi vysoké časové náročnosti

experimentu. Tato oblast se nacházela opět ve vrchních vrstvách kůže. Je znázorněna na Obrázku 44 maligního melanomu pomocí červeně ohraničeného výřezu z histologického snímku pořízeného ve FNHK (mapovaná oblast velikosti $13,42 \times 2,78 \text{ mm} = 37,3 \text{ mm}^2$, celkový čas analýzy 113 minut, velikost prvkové mapy $235 \times 471 = 118\,221$ pixelů, měřítko 1 mm, rozlišení $20 \times 20 \text{ }\mu\text{m}$).



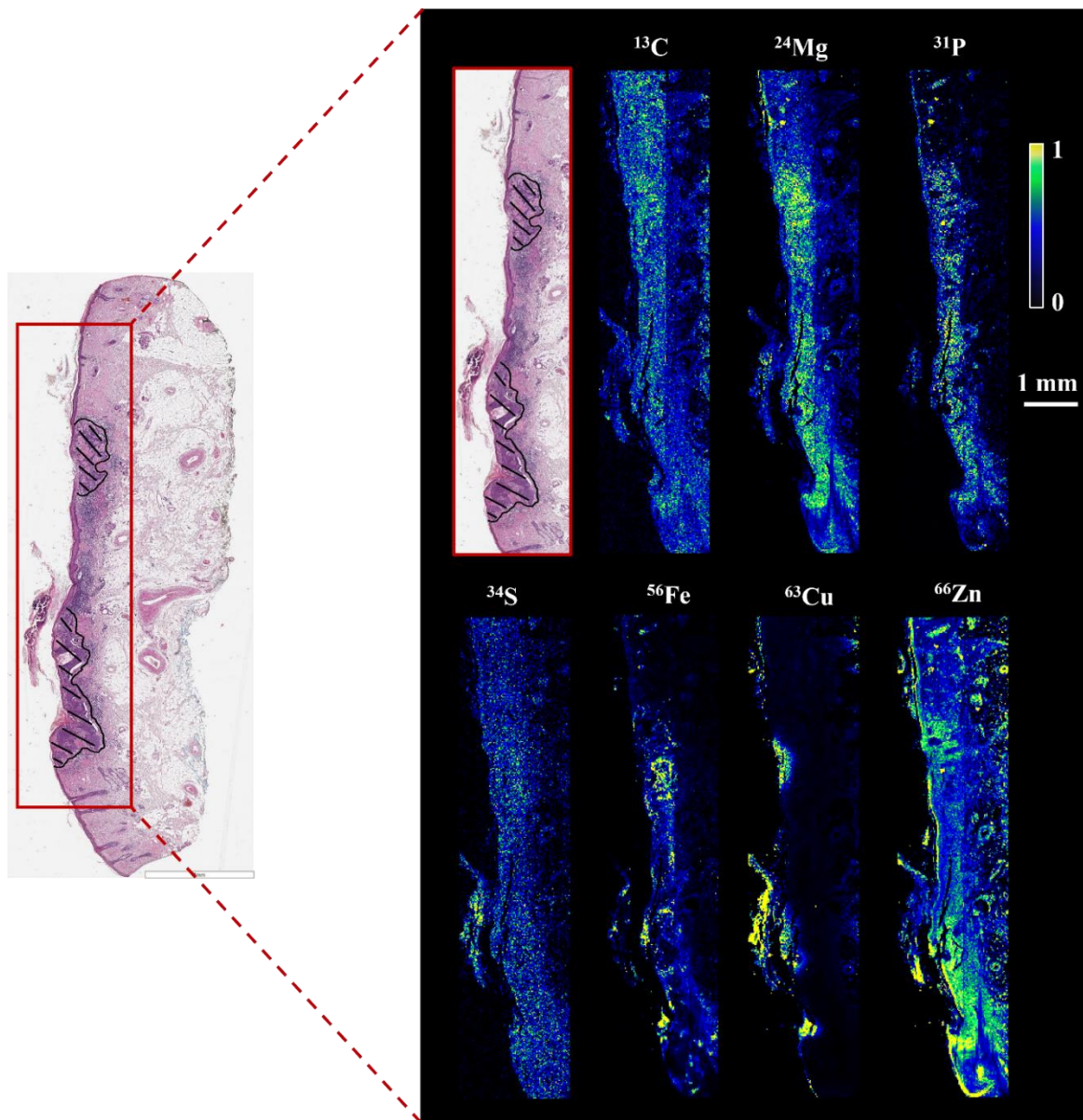
Obrázek 44: Prvkové mapy pro vyznačenou oblast maligního melanomu (P42B) s využitím metody LA-ICP-MS.

U prvkové distribuce uhlíku (Obrázek 44) je možné pozorovat poměrně homogenní rozložení tohoto prvku. Ovšem i přesto některé oblasti vykazují vyšší intenzitu. To je způsobené pravděpodobně vyšší nebo nižší hustotou tkáně nebo ne zcela rovnoměrnou tloušťkou analyzovaného řezu na skle. Síra (^{34}S) vykazuje opět homogenní rozprostření v biologické matici, ale na vrcholu vzorku je značně zvýšený signál. Tuto skutečnost lze okomentovat stejným způsobem jako u uhlíku. Měď (^{63}Cu) neprokazuje u tohoto vzorku souvislost s malignitou tkáně. Distribuce železa (^{56}Fe) opět poukazuje na možné vyšší prokrvení tumorů a na přítomnost cév ve vzorku, které obsahují krev. Nádorové oblasti však byly poměrně přesvědčivě detekovány na prvkových mapách hořčíku (^{24}Mg) a fosforu (^{31}P). Opět bylo u těchto prvků dokázáno, že se mapy prostorové distribuce shodují s histologickým snímkem. Zinek (^{66}Zn) zcela nekoreluje s nádorovou oblastí.

Nutno podotknout, že výsledky z LA-ICP-MS analýzy nejsou pro tento typ nádoru tak průkazné, jako pro výše zmíněný spinaliom. Za těmito nepřesvědčivými výsledky mohlo stát to, že analyzovaný řez tkáně na skle nebyl v ideálním stavu. Proto nebylo možné analyzovat větší plochu vzorku, kde by byla zahrnuta širší oblast okolní tkáně kolem nádoru pro porovnání a možnosti zobrazení přechodu mezi těmito tkáněmi. Poškození vzorku mohlo být způsobeno stářím vzorku, nevhodnou manipulací se vzorkem nebo převozem vzorku.

5.6.3 Bazocelulární karcinom

Jako poslední byla provedena LA-ICP-MS analýza bazaliomu (P59 I), který byl odebrán ze špičky nosu pacientky. Jednalo se o nemetastazující, místní typ nádoru. Bylo provedeno měření pouze nejvrchnější oblasti vzorku s vyskytující se malignitou pro sedm vybraných izotopů (mapovaná oblast velikosti $2,1 \times 8,72 \text{ mm} = 18,3 \text{ mm}^2$, celkový čas analýzy 54 minut, velikost prvkové mapy $105 \times 436 = 45\,780$ pixelů, měřítko 1 mm, rozlišení $20 \times 20 \mu\text{m}$).



Obrázek 45: Prvkové mapy pro vyznačenou oblast bazaliomu (P59 I) s využitím metody LA-ICP-MS.

Velkou výhodou u tohoto vzorku byla možnost mapování větší plochy z důvodu velmi malé velikosti vzorku. Analýzou byly pokryty částečně všechny vrstvy kůže (*epidermis*, *dermis* i *hypodermis*). Rozdíly v prvkovém složení jednotlivých vrstev je možné vidět na Obrázku 45. Zde jsou zobrazeny snímky vytvořené pomocí metody LA-ICP-MS. Pokud se obecně zaměříme na rozvrstvení prvků v jednotlivých vrstvách kůže, tak je možné říct, že ani jeden z vybraných prvků se ve větším množství nevyskytuje v tukové tkáni. Tyto prvky se vyskytují především ve dvou vrchních vrstvách kůže.

U prvkových map síry (^{34}S) a uhlíku (^{13}C) je tentokrát možné vidět silnější zastoupení ve vnějších vrstvách kůže. U mědi (^{63}Cu) jsou viditelné velmi vysoké signály ve vrchní *epidermis*. To by nám mohlo potvrdit předchozí tvrzení, že tento těžký kov se hromadí na povrchu lidského těla v již odumřelých a zkeratinizovaných částech kůže. Železo (^{56}Fe) je viditelné jak v oblastech nádoru, tak i u cév, kde docházelo k analýze krve, která je bohatá na tento kov. Mapa prostorové distribuce fosforu (^{31}P) tentokrát nenasvědčuje na spojitost s malignitou tkáně. U hořčíku (^{24}Mg) a zinku (^{66}Zn) je patrná korelace s nádorovou oblastí, která je vyznačená na histologickém snímku.

6 ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývala prvkovou analýzou měkkých biologických tkání zalitých v parafínu pomocí metody spektroskopie laserem buzeného plazmatu (LIBS). Pomocí této metody byly sestavovány mapy prostorových distribucí vybraných biogenních prvků pro zdravou kůži a pro tumory lidské kůže. Jako doplňující metoda byla vybrána hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem s laserovou ablací (LA-ICP-MS). Hlavním cílem této závěrečné práce bylo představit metody, které by mohly v budoucnu zásadně pomoci histologům při diagnostice nádorových tkání.

První část práce se zabývala důkladnou optimalizací měření zejména u LIBS systému, jakožto zvolené hlavní techniky v této práci. Pro optimalizaci byly vybrány myší ledviny zalité v parafínu jako modelové matrice měkkých tkání. Myší ledviny byly vybrány kvůli podobnosti struktury a tvrdosti jako lidská kůže, ale hlavně díky jejich poměrně snadné dostupnosti. Byly stanoveny ideální parametry pro měření s využitím femtosekundového laseru, kde byly zkoumány vlnové délky laseru 515 nm a 1 030 nm. V obou případech byly optimalizovány parametry rozostření a velikosti kráterů. Výsledky byly zpracovány SNR analýzou (podíl signál/šum) a porovnány mezi sebou. Nejvhodnější parametry byly využity pro analýzu (kontinuální mapování) myších ledvin s rozlišením $15 \times 15 \mu\text{m}$ a pro následné sestavení map prostorových distribucí vápníku a hořčíku. Následně proběhla podrobná optimalizace parametrů u nanosekundového laseru pro vlnovou délku 266 nm, jelikož tato vlnová délka by měla být nejvhodnější pro měkké biologické tkáně [61]. Klád se důraz především na parametr energie laserového svazku a doby zpoždění sběru signálu detektorem (GD). Analýza probíhala s nejvyšším možným rozlišením ($30 \times 30 \mu\text{m}$). Výsledky byly opět zpracovány s využitím SNR analýzy. Dále bylo porovnáváno optimální nastavení pro nanosekundový laser u jednotlivých vlnových délek (1 064 nm, 532 nm a 266 nm), kdy byly u delších vlnových délek optimální parametry převzaty z již publikovaných vědeckých prací zabývajících se podobným tématem. V neposlední řadě byly optimalizovány parametry měření pro LA-ICP-MS analýzu na $10 \mu\text{m}$ tlustých řezech myších ledvin. Byly sledovány parametry energie laseru, frekvence, překrytí signálů, velikost kráterů a prostorové rozlišení, které bylo nakonec nastaveno na $20 \times 20 \mu\text{m}$.

Druhá část práce se zabývala kontinuálním mapováním vzorků lidské kůže a sestavováním map prostorových distribucí biogenních chemických prvků. Nejprve byla důkladně rozebrána struktura zdravé kůže podle výsledků z LIBS analýzy. Hlavním cílem bylo rozlišit tři základní vrstvy lidské kůže (*epidermis*, *dermis* a *hypodermis*) od sebe podle prvkového složení. Následně byly technikou LIBS mapovány vzorky tří typů nejvíce zastoupených tumorů lidské kůže v populaci (pět vzorků maligního melanomu, pět vzorků spinaliomu a šest vzorků bazaliomu). Pro tyto prvky byly sestaveny LIBS snímky, které umožňují vizualizovat strukturu lidské tkáně z chemického hlediska a zkoumat rozdíly v prvkovém složení mezi nenádorovou a nádorovou tkání. Měření probíhalo s velmi vysokým prostorovým rozlišením $30 \times 30 \mu\text{m}$, které je doposud jedno z nejvyšších z celosvětově publikovaných prací v oblasti LIBS. Byl kladen důraz především na hořčík, který v maligních oblastech vykazoval výrazně vyšší intenzity spektrálních čar než v oblastech zdravých.

Nakonec byla provedena doplňková LA-ICP-MS analýza pro tři vzorky rakoviny kůže (maligní melanom, bazaliom a spinaliom). Analýzy byly prováděny na Technické univerzitě ve Vídni v laboratoři profesora Andrease Limbecka. Vzorky (tloušťka 10 μm) byly analyzovány přímo na laboratorním skle. Bylo sledováno zastoupení především stopových prvků (Zn, S, Cu, Fe, P, Mg a C) v nádorových tkáních z důvodu vyšší citlivosti oproti metodě LIBS. Kladl se důraz především na hořčík pro porovnání výsledků s LIBS analýzou a také na zinek, u kterého je již známo, že se v nádorových oblastech vyskytuje ve vyšších koncentracích. Z dosažených výsledků v diplomové práci bylo toto tvrzení potvrzeno.

Po porovnání výsledků se prokázalo, že i když metoda LA-ICP-MS má vyšší citlivost (ale je pomalejší), tak výsledky právě pro hořčík jsou mezi oběma metodami téměř totožné. Jelikož cílem této práce je představit novou techniku, která by mohla být používána při diagnostice nádorů během chirurgického zákroku, tak rychlost je signifikantní výhodou, kterou může metoda LIBS nabídnout oproti jiným metodám. Výsledky ukázaly, že techniky LIBS a LA-ICP-MS by v klinické praxi mohly mít svoje pevné zastoupení.

V diplomové práci bylo dosaženo všech vytyčených cílů. Další výzkum se zaměří velmi podrobně na jeden druh nádoru lidské kůže (maligní melanom) s cílem potvrdit korelaci mezi distribucemi zvolených biomarkerů (makroprvků) a histologickými nálezy. Tato korelace bude podpořena analýzou na statisticky významném souboru vzorků v rámci kohortové studie.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] KOLARSICK, P. A. J., M. A. KOLARSICK a C. GOODWIN. Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*. [online]. 2011, **3**(4), 203-213. ISSN 1945-760X. Dostupné z: doi:10.1097/JDN.0b013e3182274a98
- [2] MOHAMED, S. A. a R. HARGEST. Surgical anatomy of the skin. *Surgery (Oxford)*. 2022, **40**(1), 1-7. ISSN 02639319. Dostupné z: doi:10.1016/j.mpsur.2021.11.021
- [3] MONTAGNA, W. a EBLING, F. J. G. human skin. *Encyclopedia Britannica* [online]. 2021. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/human-skin>.
- [4] MAYHEW, J. a B. PANDYA. Ultrastructure of Skin. *TeachMe Anatomy* [online]. 2020. Dostupné z: <https://teachmeanatomy.info/the-basics/ultrastructure/skin/>
- [5] GILABERTE, Y., L. PRIETO-TORRES, I. PASTUSHENKO a Á. JUARRANZ. Anatomy and Function of the Skin. *Nanoscience in Dermatology* [online]. Elsevier, 2016, 2016, s. 1-14. ISBN 9780128029268. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-802926-8.00001-X
- [6] MURPHY, G. F. (1997). Histology of the skin. In D. Elder, R. Elenitsas, C. Jaworsky, & B. Johnson Jr. (Eds.), *Lever's histopathology of the skin* (8th ed., pp. 5-45). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins
- [7] HANZLOVÁ, J. aj. HEMZA. *Základy anatomie pohybového ústrojí*. Brno: Masarykova univerzita, 2004. ISBN 80-210-3580-3
- [8] What Is Cancer?. *NATIONAL CANCER INSTITUTE* [online]. 2021. Dostupné z: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- [9] SIMÕES, M.C.F., J.J.S. SOUSA a A.A.C.C. PAIS. Skin cancer and new treatment perspectives: A review. *Cancer Letters* [online]. 2015, **357**(1), 8-42. ISSN 03043835. Dostupné z: doi:10.1016/j.canlet.2014.11.001
- [10] Basal Cell carcinoma. *MAYO CLINIC* [online]. 2011. Dostupné z: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/basal-cell-carcinoma/symptoms-causes/syc-20354187>
- [11] WALKER, H. S. aj. HARDWICKE. Non-melanoma skin cancer. *Surgery (Oxford)* [online]. 2022, **40**(1), 39-45. ISSN 02639319. Dostupné z: doi:10.1016/j.mpsur.2021.11.004
- [12] DAVIS, K. E. Skin Cancer. *Journal of the Dermatology Nurses' Association* [online]. 2020, **12**(2), 78-84. ISSN 1945-7618. Dostupné z: doi:10.1097/JDN.0000000000000523
- [13] SILPA, S R. a CH. V. A REVIEW ON SKIN CANCER. *INTERNATIONAL RESEARCH JOURNAL OF PHARMACY* [online]. 2013, **4**(8), 83-88. ISSN 22308407. Dostupné z: doi:10.7897/2230-8407.04814
- [14] CABOT, R. C., N. L HARRIS, J.-A. O. SHEPARD, et al. Case 3-2008. *New England Journal of Medicine* [online]. 2008, **358**(4), 393-401. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMcp0707893
- [15] SHULSTAD, R. M. a S. PROPER. Squamous Cell Carcinoma. *Journal of the Dermatology Nurses' Association* [online]. 2010, **2**(1), 12-16. ISSN 1945-760X. Dostupné z: doi:10.1097/JDN.0b013e3181cb5165

- [16] HALE, E. K. a C. W. HANKE. Squamous Cell Carcinoma Overview: The Second Most Common Skin Cancer. *SKIN CANCER Foundation* [online]. 2022. Dostupné z: <https://www.skincancer.org/skin-cancer-information/squamous-cell-carcinoma/>
- [17] HAGGENMÜLLER, S., R. C. MARON, A. HEKLER, et al. Skin cancer classification via convolutional neural networks: systematic review of studies involving human experts. *European Journal of Cancer* [online]. 2021, **156**, 202-216. ISSN 09598049. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejca.2021.06.049
- [18] RUBIN, K. M. Melanoma Staging. *Journal of the Dermatology Nurses' Association* [online]. 2010, **2**(6), 254-259. ISSN 1945-760X. Dostupné z: doi:10.1097/JDN.0b013e3181ffa393
- [19] What Are The Stages of Melanoma?. *AIM MELANOMA FOUNDATION* [online]. Dostupné z: <https://www.aimatmelanoma.org/stages-of-melanoma/>
- [20] KISS, K., A. ŠINDELÁŘOVÁ, L. KRBAL, et al. Imaging margins of skin tumors using laser-induced breakdown spectroscopy and machine learning. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* [online]. 2021, **36**(5), 909-916. ISSN 0267-9477. Dostupné z: doi:10.1039/D0JA00469C
- [21] PAUL, B., K. KYSENIUS, J. B. HILTON, et al. An integrated mass spectrometry imaging and digital pathology workflow for objective detection of colorectal tumours by unique atomic signatures. *Chemical Science* [online]. 2021, **12**(30), 10321-10333. ISSN 2041-6520. Dostupné z: doi:10.1039/D1SC02237G
- [22] KHANDPUR, S. a M RAMAM. Skin tumours. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery* [online]. 2012, **5**(3). ISSN 0974-2077. Dostupné z: doi:10.4103/0974-2077.101368
- [23] BARENTSZ, J., S. TAKAHASHI, W. OYEN, R. MUS, P. DE MULDER, R. REZNEK, M. OUDKERK a W. MALI. Commonly Used Imaging Techniques for Diagnosis and Staging. *Journal of Clinical Oncology* [online]. 2006, **24**(20), 3234-3244. ISSN 0732-183X. Dostupné z: doi:10.1200/JCO.2006.06.5946
- [24] Nádory kůže. *Masarykův onkologický ústav: Vše o zhoubných nádorech* [online]. Brno. Dostupné z: <https://www.mou.cz/nadory-kuze/t1267>
- [25] HURST, G. S., J. D. GRAYBEAL, J. O. STONE a S. CHU. Spectroscopy. *Encyclopedia Britannica*. Edinburgh, VB: Encyclopedia Britannica [online], 2020 Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/spectroscopy>
- [26] ZÁRUBA, K. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016. ISBN 978-80-7080-951-8
- [27] NOVOTNÝ, K.; KAISER, J.; HRDLIČKA, A.; MALINA, R.; VÉMOLA, T.; PROHAZKA, D.; NOVOTNÝ, J.; KANICKÝ, V. Spektroskopie laserem buzeného plazmatu (LIBS). *Československý časopis pro fyziku*, 2010, roč. 60, č. 4-5, s. 280-285. ISSN: 0009- 0700
- [28] MIZIOLEK, A. W., V. PALLESCHI a I. SCHECHTER. *Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS): fundamentals and applications*. Cambridge: Cambridge University Press, 2006. ISBN 978-0-521-85274-6
- [29] COSTA, V., A. AUGUSTO, J. CASTRO, et al. LASER INDUCED-BREAKDOWN SPECTROSCOPY (LIBS): HISTÓRICO, FUNDAMENTOS, APLICAÇÕES E

- POTENCIALIDADES. *Química Nova* [online]. 2019. ISSN 01004042. Dostupné z: doi:10.21577/0100-4042.20170325
- [30] SuperCam for Scientists - NASA Mars. NASA's Mars Exploration Program [online]. Dostupné z: <https://mars.nasa.gov/mars2020/spacecraft/instruments/supercam/for-scientists/>
- [31] CREMERS, D. A. a R. C. CHINNI. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy-Capabilities and Limitations. *Applied Spectroscopy Reviews* [online]. 2009, 44(6), 457-506. ISSN 0570-4928. DOI:10.1080/05704920903058755
- [32] REHSE, S. What is LIBS? *University of Windsor* [online]. Dostupné z: <https://www.uwindsor.ca/people/rehse/299/libs>
- [33] CHEN, F. F.: Úvod do fyziky plazmatu, 3. vydání, Academia, Praha 1984, ISBN 509-21-857
- [34] KULHÁNEK, P.. *Úvod do teorie plazmatu*. Praha: AGA, 2011. ISBN 978-80904582-2-2
- [35] THE EDITORS OF ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA. Bremsstrahlung. Encyclopaedia Britannica [online]. 2018. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/bremsstrahlung>
- [36] HU, Y., Z. LI a T. LÜ. Determination of elemental concentration in geological samples using nanosecond laser-induced breakdown spectroscopy. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* [online]. 2017, 32(11), 2263-2270. ISSN 0267-9477. Dostupné z: doi:10.1039/C7JA00239D
- [37] WILLIAMS, D. Laser basics. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* [online]. 2008, 9(12), 550-552. ISSN 14720299. Dostupné z: doi:10.1016/j.mpaic.2008.09.008
- [38] SALEH, B. The Laser. AL-AMRI, M. D., M. EL-GOMATI a M. S. ZUBAIRY, ed. *Optics in Our Time* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2016, 2016-12-14, s. 71-85. ISBN 978-3-319-31902-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-31903-2_4
- [39] RUSSO, R. Laser ablation in analytical chemistry—a review. *Talanta* [online]. 57(3), 425-451. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/S0039-9140(02)00053-X
- [40] GALBÁCS, G. A critical review of recent progress in analytical laser-induced breakdown spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2015, 407(25), 7537-7562. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-015-8855-3
- [41] MARKIEWICZ-KESZYCKA, M., X. CAMA-MONCUNILL, M. P. CASADO-GAVALDA, Y. DIXIT, R. CAMA-MONCUNILL, P. J. CULLEN a C. SULLIVAN. Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) for food analysis: A review. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2017, 65, 80-93. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2017.05.005
- [42] WÜNSCH, G., A. WENNEMER a J.W. MCLAREN. On the design and performance of the Czerny-Turner monochromator in ICP-AES. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 1991, 46(11), 1517-1531. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/0584-8547(91)80202-E

- [43] FU, X., F. DUAN, J. JIANG, T. HUANG, L. MA a CH. LV. Astigmatism-corrected echelle spectrometer using an off-the-shelf cylindrical lens. *Applied Optics* [online]. 2017, **56**(28). ISSN 1559-128X. Dostupné z: doi:10.1364/AO.56.007861
- [44] CCD vs. CMOS-srovnání senzorů. *W-TECHNIKA* [online]. Dostupné z: <https://www.w-technika.cz/ccd-vs-cmos-srovnani-senzoru/>
- [45] ICCD and emICCD Cameras: The Basic Educational Notes: ICCD Sensors. *TELEDYNE: Teledyne Princeton Instruments* [online]. Dostupné z: <https://www.princetoninstruments.com/learn/camera-fundamentals/iccd-and-emiccd-basics>
- [46] JANTZI S. C., V. MOTTO-ROS, F. TRICHARD, Y. MARKUSHIN, N. MELIKECHI a A. DE GIACOMO. Sample treatment and preparation for laser-induced breakdown spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2016, **115**, 52-63. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2015.11.002
- [47] MOTTO-ROS V. a PELASCINI F. Imagerie élémentaire par spectroscopie laser: vers de nouvelles perspectives en biologie et minéralogie [online]. Dostupné z: <https://www.chimie-experts.org/var/secf/storage/original/application>
- [48] FORTES, F. J., J. MOROS, P. LUCENA, L. M. CABALÍN a J. J. LASERNA. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *Analytical Chemistry* [online]. 2013, **85**(2), 640-669. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac303220r
- [49] DAVID, G., P.-Y. MESLIN, E. DEHOUCK, et al. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) characterization of granular soils: Implications for ChemCam analyses at Gale crater, Mars. *Icarus* [online]. 2021, **365**. ISSN 00191035. Dostupné z: doi:10.1016/j.icarus.2021.114481
- [50] PROCHAZKA, D., M. MAZURA, O. SAMEK, et al. Combination of laser-induced breakdown spectroscopy and Raman spectroscopy for multivariate classification of bacteria. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2018, **139**, 6-12. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2017.11.004
- [51] SASAZAWA, S., S. KAKINO a Y. MATSUURA. Optical-fiber-based laser-induced breakdown spectroscopy for detection of early caries. *Journal of Biomedical Optics* [online]. 2015, **20**(6). ISSN 1083-3668. Dostupné z: doi:10.1117/1.JBO.20.6.065002
- [52] KUMAR A., F. YUEH, J. P. SINGH a S. BURGESS. Characterization of malignant tissue cells by laser-induced breakdown spectroscopy. *Applied Optics* [online]. 2004, **43**(28). ISSN 0003-6935. Dostupné z: doi:10.1364/AO.43.005399
- [53] EL-HUSSEIN, A., A.K. KASSEM, H. ISMAIL a M.A. HARITH. Exploiting LIBS as a spectrochemical analytical technique in diagnosis of some types of human malignancies. *Talanta* [online]. 2010, **82**(2), 495-501. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2010.04.064
- [54] MODLITBOVÁ P., P. POŘÍZKA aj. KAISER. Laser-induced breakdown spectroscopy as a promising tool in the elemental bioimaging of plant tissues. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2020, **122**. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2019.115729

- [55] SANTOS, D., R. E. SAMAD, L. C. TREVIZAN, A. Z. DE FREITAS, N. D. VIEIRA a F. J. KRUG. Evaluation of Femtosecond Laser-Induced Breakdown Spectroscopy for Analysis of Animal Tissues. *Applied Spectroscopy* [online]. 2008, **62**(10), 1137-1143. ISSN 0003-7028. Dostupné z: doi:10.1366/000370208786049105
- [56] BUSSER, B., S. MONCAYO, F. TRICHARD, et al. Characterization of foreign materials in paraffin-embedded pathological specimens using in situ multi-elemental imaging with laser spectroscopy. *Modern Pathology* [online]. 2018, **31**(3), 378-384. ISSN 0893-3952. Dostupné z: doi:10.1038/modpathol.2017.152
- [57] MONCAYO, S., F. TRICHARD, B. BUSSER, et al. Multi-elemental imaging of paraffin-embedded human samples by laser-induced breakdown spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2017, **133**, 40-44. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2017.04.013
- [58] ŠINDELÁŘOVÁ A., P. POŘÍZKA, P. MODLITBOVÁ, et al. Methodology for the Implementation of Internal Standard to Laser-Induced Breakdown Spectroscopy Analysis of Soft Tissues. *Sensors* [online]. 2021, **21**(3). ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s21030900
- [59] GONZÁLEZ DE VEGA, R., M. L. FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, J. PISONERO, N. EIRÓ, F. J. VIZOSO a A. SANZ-MEDEL. Quantitative bioimaging of Ca, Fe, Cu and Zn in breast cancer tissues by LA-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* [online]. 2017, **32**(3), 671-677. ISSN 0267-9477. Dostupné z: doi:10.1039/C6JA00390G
- [60] HAN, J. H., Y. MOON, J. J. LEE, S. CHOI, Y. KIM a S. JEONG. Differentiation of cutaneous melanoma from surrounding skin using laser-induced breakdown spectroscopy. *Biomedical Optics Express* [online]. 2016, **7**(1). ISSN 2156-7085. Dostupné z: doi:10.1364/BOE.7.000057
- [61] JELÍNKOVÁ, H.. *Lasers for medical applications: Diagnostics, therapy and surgery*. UK: Woodhead Publishing, 2013. ISBN 978-0-85709-237-3
- [62] LIMBECK, A. P. GALLER, M. BONTA, G. BAUER, W. NISCHKAUER a F. VANHAECKE. Recent advances in quantitative LA-ICP-MS analysis: challenges and solutions in the life sciences and environmental chemistry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2015, **407**(22), 6593-6617. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-015-8858-0
- [63] BECKER, J. S., H. SELA, J. DOBROWOLSKA, M. ZORIY a J. S. BECKER. Recent applications on isotope ratio measurements by ICP-MS and LA-ICP-MS on biological samples and single particles. *International Journal of Mass Spectrometry* [online]. 2008, **270**(1-2), 1-7. ISSN 13873806. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijms.2007.10.008
- [64] GÜNTHER, D., I. HORN a B. HATTENDORF. Recent trends and developments in laser ablation-ICP-mass spectrometry. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2000, **368**(1), 4-14. ISSN 0937-0633. Dostupné z: doi:10.1007/s002160000495
- [65] KLOTZBACH, U., K. WASHIO, C. B. ARNOLD, W. PFLEGING, P. SMYREK, J. HUND, T. BERGFELDT a J. PRÖLL. *Surface micro-structuring of intercalation*

- cathode materials for lithium-ion batteries: a study of laser-assisted cone formation* [online]. In: . 2015-3-12, 93511E. Dostupné z: doi:10.1117/12.2077763
- [66] BECKER, J.S., R.C. DIETRICH, A. MATUSCH, D. POZEBON a V.L. DRESSLER. Quantitative images of metals in plant tissues measured by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2008, **63**(11), 1248-1252. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2008.08.001
- [67] BECKER, J. S., M. ZORIY, B. WU, A. MATUSCH a J. S. BECKER. Imaging of essential and toxic elements in biological tissues by LA-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* [online]. 2008, **23**(9). ISSN 0267-9477. Dostupné z: doi:10.1039/b805228j
- [68] SEUMA, J., J. BUNCH, A. COX, C. MCLEOD, J. BELL a C. MURRAY. Combination of immunohistochemistry and laser ablation ICP mass spectrometry for imaging of cancer biomarkers. *PROTEOMICS* [online]. 2008, **8**(18), 3775-3784. ISSN 16159853. Dostupné z: doi:10.1002/pmic.200800167
- [69] ZHANG, J., J. RECTOR, J. Q. LIN, et al. Nondestructive tissue analysis for ex vivo and in vivo cancer diagnosis using a handheld mass spectrometry system. *Science Translational Medicine* [online]. 2017, **9**(406). ISSN 1946-6234. Dostupné z: doi:10.1126/scitranslmed.aan3968
- [70] JARMUSCH, A. K., V. PIRRO, Z. BAIRD, E. M. HATTAB, A. A. COHEN-GADOL a R. G. COOKS. Lipid and metabolite profiles of human brain tumors by desorption electrospray ionization-MS. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2016, **113**(6), 1486-1491. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1523306113
- [71] SCHÄFER, K. CH., J. DÉNES, K. ALBRECHT, et al. In Vivo, In Situ Tissue Analysis Using Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 2009, **48**(44), 8240-8242. ISSN 14337851. Dostupné z: doi:10.1002/anie.200902546
- [72] BONTA, M., J. J. GONZALEZ, C. D. QUARLES, R. E. RUSSO, B. HEGEDUS a A. LIMBECK. Elemental mapping of biological samples by the combined use of LIBS and LA-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* [online]. 2016, **31**(1), 252-258. ISSN 0267-9477. Dostupné z: doi:10.1039/C5JA00287G
- [73] TALARI, A. CH. S., Z. MOVASAGHI, S. REHMAN a I. REHMAN. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews* [online]. 2014, **50**(1), 46-111. ISSN 0570-4928. Dostupné z: doi:10.1080/05704928.2014.923902
- [74] LIEBER, CH. A., S. K. MAJUMDER, D. BILLHEIMER, D. L. ELLIS a A. MAHADEVAN-JANSEN. Raman microspectroscopy for skin cancer detection in vitro. *Journal of Biomedical Optics* [online]. 2008, **13**(2). ISSN 10833668. Dostupné z: doi:10.1117/1.2899155
- [75] *Comparative Anatomy and Histology* [online]. Elsevier, 2012. ISBN 9780123813619. Dostupné z: doi:10.1016/C2009-0-61166-1

- [76] GRÜNEBERG, H.. Biology of the Laboratory Mouse. *Nature* [online]. 1942, **150**(3795), 101-102. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/150101a0
- [77] DELANEY, M. A., J. KOWALEWSKA a P. M. TREUTING. Urinary System. *Comparative Anatomy and Histology* [online]. Elsevier, 2018, 2018, s. 275-301. ISBN 9780128029008. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-802900-8.00016-6
- [78] DAVIDSON, A. J. Mouse kidney development. *StemBook* [online]. Centre for Regenerative Medicine, Massachusetts General Hospital, Boston, 2008. Dostupné z: <https://www.stembook.org/node/532>
- [79] LÜLLMANN-RAUCH, R. *Histologie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 9788024737294.
- [80] KRINKE, G. J. Normative Histology of Organs. *The Laboratory Mouse* [online]. Elsevier, 2004, 2004, s. 133-166. ISBN 9780123364258. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012336425-8/50062-5
- [81] FireFly: Rapid Multi-Elemental Analysis and Chemical Imaging. *LIGHTIGO* [online]. Dostupné z: <https://lightigo.com/firefly/>
- [82] PHAROS: Modular-Design Femtosecond Laser for Industry and Science. *LIGHT CONVERSION* [online]. Dostupné z: <https://lightcon.com/product/pharos-femtosecond-lasers/>
- [83] LIMBECK, A., L. BRUNNBAUER, H. LOHNINGER, et al. Methodology and applications of elemental mapping by laser induced breakdown spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2021, **1147**, 72-98. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2020.12.054
- [84] ARAGÓN, C. a J.A. AGUILERA. Characterization of laser induced plasmas by optical emission spectroscopy: A review of experiments and methods. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2008, **63**(9), 893-916. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2008.05.010
- [85] RUDAJEV, Vladimír. *Příběh buňky: od molekul ke vzniku života a prvním organismům*. Praha: Academia, 2021. Živá příroda. ISBN 978-80-200-3238-6.
- [86] LIN, Q., S. WANG, Y. DUAN a V. V. TUCHIN. Ex vivo three-dimensional elemental imaging of mouse brain tissue block by laser-induced breakdown spectroscopy. *Journal of Biophotonics* [online]. 2021, **14**(5). ISSN 1864-063X. Dostupné z: doi:10.1002/jbio.202000479
- [87] HAN, J. H., Y. MOON, J. J. LEE, S. CHOI, Y. KIM a S. JEONG. Differentiation of cutaneous melanoma from surrounding skin using laser-induced breakdown spectroscopy. *Biomedical Optics Express* [online]. 2016, **7**(1). ISSN 2156-7085. Dostupné z: doi:10.1364/BOE.7.000057
- [88] *Epina ImageLab* [online]. Dostupné z: <http://www.imagelab.at/>
- [89] *NIST: National Institute of Standards and Technology* [online]. Dostupné z: <https://www.nist.gov/>
- [90] ESL193: Laser Ablation System. *Elemental Scientific Lasers* [online]. 2022. Dostupné z: <http://www.icpmslasers.com/laserablation/nwr193/>
- [91] ZORIY, M. V., M. DEHNHARDT, A. MATUSCH a J. S. BECKER. Comparative imaging of P, S, Fe, Cu, Zn and C in thin sections of rat brain tumor as well as control tissues by laser ablation inductively coupled plasma mass

- spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2008, **63**(3), 375-382. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2007.11.030
- [92] RINALDI, L., G. BARABINO, J. F. KLEIN, et al. Metals distribution in colorectal biopsies: New insight on the elemental fingerprint of tumour tissue. *Digestive and Liver Disease* [online]. 2015, **47**(7), 602-607. ISSN 15908658. Dostupné z: doi:10.1016/j.dld.2015.03.016
- [93] BECKER, J. S., M. V. ZORIY, C. PICKHARDT, N. PALOMERO-GALLAGHER a K. ZILLES. Imaging of Copper, Zinc, and Other Elements in Thin Section of Human Brain Samples (Hippocampus) by Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* [online]. 2005, **77**(10), 3208-3216. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac040184q
- [94] WEI, H., Z. ZHAO, Q. LIN a Y. DUAN. Study on the Molecular Mechanisms Against Human Breast Cancer from Insight of Elemental Distribution in Tissue Based on Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS). *Biological Trace Element Research* [online]. 2021, **199**(5), 1686-1692. ISSN 0163-4984. Dostupné z: doi:10.1007/s12011-020-02292-8
- [95] YIN, P., B. HU, Q. LI, Y. DUAN a Q. LIN. Imaging of Tumor Boundary Based on Multielements and Molecular Fragments Heterogeneity in Lung Cancer. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement* [online]. 2021, **70**, 1-7. ISSN 0018-9456. Dostupné z: doi:10.1109/TIM.2021.3102755
- [96] TENG, G., Q. WANG, H. ZHANG, et al. Discrimination of infiltrative glioma boundary based on laser-induced breakdown spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2020, **165**. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2020.105787

8 SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

| | |
|-----------|--|
| AAS | Atomová absorpční spektrometrie, <i>Atomic Absorption Spectroscopy</i> |
| ATP | Adenosintrifosfát, <i>Adenosine Triphosphate</i> |
| AVČR | Akademie věd České republiky, <i>Czech Academy of Sciences</i> |
| BBC | Bazocelulární karcinom, <i>Basal Cell Carcinoma</i> |
| CCD | Zařízení s vázanými náboji, <i>Charged Coupled Device</i> |
| CGH | Komparativní genomová hybridizace, <i>Comparative Genome Hybridization</i> |
| CMOS | Komplementární polovodič na bázi oxidu kovů, <i>Complementary Metal Oxide Semiconductor</i> |
| DESI-MS | Desorpční elektrosprejová ionizační hmotnostní spektroskopie, <i>Desorption electrospray ionization Mass Spectrometry</i> |
| DNA | Deoxyribonukleová kyselina |
| ECDL | Diodový laser s externí dutinou, <i>External-cavity Diode Laser</i> |
| FFPE | Zalití tkáně do parafínu, <i>Formalin-Fixed Paraffin-Embedded</i> |
| FNHK | Fakultní nemocnice v Hradci Králové, <i>University Hospital in Hradec Kralove</i> |
| H&E | Hematoxylin a eozin |
| GD | Čas zpoždění detektoru, <i>Gate Delay</i> |
| HIV | Virus lidské imunitní nedostatečnosti, <i>Human Immunodeficiency Virus</i> |
| ICCD | Intenzifikované zařízení s nábojovou vazbou, <i>Intensified Charged Coupled Device</i> |
| ICP-OES | Emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem, <i>Inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i> |
| IČ | Infračervené, <i>Infrared</i> |
| LA-ICP-MS | Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem s laserovou ablací, <i>Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> |
| LIBS | Spektroskopie laserem buzeného plazmatu, <i>Laser-induced Breakdown Spectroscopy</i> |
| NIST | Národní institut pro standardy a technologie, <i>National Institute of Standards</i> |

and Technology

| | |
|---------|--|
| ns | Nanosekundový laser |
| OES | Optická emisní spektroskopie, <i>Optical Emission Spectrometry</i> |
| PCR | Polymerázová řetězová reakce, <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| ppb | Části na bilion, <i>Parts Per Billion</i> |
| ppm | Části na milion, <i>Parts Per Million</i> |
| SCC | Spinocelulární karcinom, <i>Squamous Cell Carcinoma</i> |
| SCLM | Konfokálním skenovacím laserový mikroskop, <i>Smart Computational Light Microscope</i> |
| SEM-EDX | Skenovací elektronová mikroskopie s energiově disperzní rentgenovou spektroskopií, <i>Scanning Electron Microscopy with Energy Dispersive X-Ray Emission</i> |
| SNR | Poměr signálu ku šumu, <i>Signal to Noise Ratio</i> |
| UV | Ultrafialové, <i>Ultraviolet</i> |
| VIS | Viditelné, <i>Visible</i> |
| XRF | Rentgenová fluorescenční mikroskopie, <i>X-ray fluorescence</i> |