



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

STUDIUM VLIVU MYOKARDIÁLNÍ FIBRÓZY NA PRVKOVOU DISTRIBUCI V MĚKKÝCH TKÁNÍCH POTKANA POMOCÍ LASEROVÉ ABLACE VE SPOJENÍ S ICP-MS

STUDY OF THE EFFECT OF MYOCARDIAL FIBROSIS ON ELEMENTAL DISTRIBUTION IN RAT SOFT TISSUES USING
LASER ABLATION ICP-MS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Martina Machalová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Mgr. Michaela Vašinová Galiová, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1681/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany
životního prostředí
Studentka: **Bc. Martina Machalová**
Studijní program: Chemie a technologie ochrany
životního prostředí
Studijní obor: Chemie a technologie ochrany
životního prostředí
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Michaela Vašinová
Galiová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Studium vlivu myokardiální fibrózy na prvkovou distribuci v měkkých tkáních potkana pomocí laserové ablace ve spojení s ICP–MS

Zadání diplomové práce:

1. Zpracování literární rešerše na téma myokardiální fibrózy, její vznik, klasifikace a histopatologický obraz, a dále obsahující analytické techniky používané ke vzorkování pevného materiálu měkkých tkání se zaměřením na využití LA–ICP–MS a její vývoj v této oblasti.
2. Vývoj metodiky pro 2D imaging vybraných prvků pomocí LA–ICP–MS v měkkých tkáních.
3. Analýza vybraných vzorků orgánů a zhodnocení výsledků.

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. Martina Machalová
studentka

doc. Mgr. Michaela Vašinová
Galiová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Jiří Kučerík, Ph.D.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Kardiovaskulární onemocnění jsou stále nejčastější příčinou smrti v České republice, navzdory tomu, že se terapie v oblasti srdečního selhání stále dále posouvá. Přesto je myokardiální fibróza jedním z následků i příčin srdečního selhání, na které účinná léčba neexistuje. Řešením by mohla predikce rozvinutí fibrózy či časná diagnostika fibrózy a preventivní terapie. V tomto ohledu se rozvíjí mnohé lékařské metody. Analýza distribuce prvků v zasažených tkáních by k tomu mohla dopomoci. Proto byla v této práci zkoumána distribuce prvků v srdcích potkanů, u kterých byla vyvolána myokardiální fibróza. V průběhu analýzy byl zjištěn i vliv barvení vzorků na výsledek analýzy. Zvláštní pozornost je pak věnována distribuci železa ve tkáních postižených fibrózou a její korelace s histologickým nálezem. Zdá se, že právě distribuce železa by mohla být nápomocná pro včasné rozpoznání poškození myokardu.

ABSTRACT

The most common cause of death in the Czech Republic continue to be cardiovascular diseases. The field of heart failure therapy still keeps moving forward. Yet myocardial fibrosis is one of the consequences and causes of heart failure for which there exists no effective medical care. The solution would be predicting the advancement of fibrosis and a preventive therapy. Many medical methods are being developed now in this regard, and the element distribution in affected tissue could help them. That is the reason why this work centers on the research of the element distribution in rat hearts with an induced myocardial fibrosis. An influence of sample coloration on the analysis was observed during its course. Special attention was paid to the distribution of iron in the fibrotic tissue as well as to the comparison of the images of myocardial fibrosis. It seems that the iron distribution specifically could be helpful in recognising a damaged myocardium.

KLÍČOVÁ SLOVA

Myokardiální fibróza, srdeční selhání, potkaní model, analýza měkkých tkání, železo, měď, zinek, mangan, LA-ICP-MS, prvková distribuce

KEYWORDS

Myocardial fibrosis, heart failure, rat model, soft tissue analysis, iron, copper, manganese, zinc, LA-ICP-MS, element distribution

MACHALOVÁ, Martina. *Studium vlivu myokardiální fibrózy na prvkovou distribuci v měkkých tkáních potkana pomocí laserové ablace ve spojení s ICP-MS*. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/138978>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí. Vedoucí práce Michaela Vašinová Galiová.

PROHLÁŠENÍ

PROHLÁŠENÍ Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité 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 bakalářské práce a děkana FCH VUT.

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych velmi poděkovat své vedoucí doc. Mgr. Michaela Vašinové Galiové, Ph.D. za možnost pracovat na této práci, za čas, který mi věnovala, cenné rady a připomínky, které mi poskytla a za obrovskou trpělivost. Také bych chtěla velice poděkovat mému konzultantovi MUDr. Tiborovi Stračinovi, Ph.D. za odborné rady a konzultace spojené s problematikou myokardiální fibrózy a pracovníkům Fakultní nemocnice u Sv. Anny za zpracování vzorků. Na závěr bych chtěla poděkovat své rodině a příteli za to, jak velkou oporou mi byli v průběhu celého mého studia.

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1 Srdce.....	8
2.2 Myokardiální fibróza.....	10
2.2.2 Důvody vzniku myokardiální fibrózy	11
2.3 Metody využívané v souvislosti s myokardiální fibrózou	12
2.4 Analytické metody	13
2.4.1 Metody rentgenové analýzy	13
2.4.2 „Laser assisted“ metody	15
2.4.3 LA-ICP-MS	19
2.4.4 Hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů	22
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	24
3.1 Použité chemikálie a certifikované referenční materiály	24
3.2 Použité přístroje a pomůcky	24
3.2.1 Laserový ablační systém	24
3.2.2 Hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem.....	24
3.3 Vzorky	25
3.3.1 Vyvolání myokardiální fibrózy	25
3.3.2 Odebrání vzorků.....	26
3.3.3 Příprava řezů pro analýzu.....	27
3.4 Analýza pomocí metody LA-ICP-MS.....	28
3.4.1 Nastavení ICP-MS.....	28
3.4.2 Nastavení laseru pro analýzu.....	29
3.4.3 Postup měření	29
3.4.4 Vyhodnocení signálu.....	31
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	33

4.1 Stanovení metodiky měření.....	33
4.2 Normalizace na uhlík	36
4.3 Porovnání distribuce v závislosti na zpracování vzorku	37
4.4 Porovnání fibrotických tkání v závislosti na stupni fibrózy	40
5. ZÁVĚR.....	47
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	48
7. BIBLIOGRAFIE	49

1. ÚVOD

Kardiovaskulární onemocnění jsou nejčastější příčinou smrti v České republice. U žen způsobují 50 % všech úmrtí a u mužů 42 %. V České republice byla k roku 2017 úmrtnost s nimi spojená o dvakrát vyšší oproti průměru Evropské unie [1].

Myokardiální fibróza je jedním z faktorů pro vznik a vývoj srdečního selhání. V medicínské praxi je jí věnována pozornost, protože na ni neexistuje účinná terapie a její prevence je velmi obtížná [2]. Důvodů vzniku fibrózy je několik. Může například vzniknout po infarktu myokardu, v souvislosti se stárnutím nebo v důsledku neléčeného vysokého tlaku. Ale může vzniknout i po účinku cizorodých látek v životním prostředí. Existuje mnoho studií zabývajících se vlivem PCB na vznik a vývoj kardiovaskulární onemocnění a myokardiální fibrózy. Také byly publikovány studie zabývající se expozicí pevných částic PM_{2,5} nebo přímo výfukových plynů a jejich vliv na vznik fibrózy myokardu.

Snahou je zdokonalit zobrazovací metody v lékařském prostředí, jako je například magnetická rezonance, a díky tomu včas odhalit poškození myokardu ještě před rozvojem fibrózy. V tom případě by totiž mohla pomoci včasná terapie, sloužící ke zpomalení rozvoje fibrózy myokardu. Pro zlepšení medicínských metod užívaných v lékařské praxi může být podstatná informace o distribuci prvků v postižené tkáni. K tomuto účelu je vhodné použít analytické metody, jako je například hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS), která je ve spojení s laserovou ablací (LA-ICP-MS) schopná analyzovat přímo pevný materiál.

Tato diplomová práce se zaměřuje na distribuci prvků v potkaních srdcích, u kterých byla vyvolána fibrotická reakce, pomocí metody LA-ICP-MS. Vzorky do této práce byly poskytnuty ve spolupráci s MUDr. Tiborem Stračinou, Ph.D. z Lékařské fakulty Masarykovy univerzity. Ačkoliv je metoda LA-ICP-MS běžně využívanou technikou pro analýzu měkkých tkání, nebyla nalezena podobná studie zabývající se analýzou myokardiální fibrózy pomocí této metody. Proto bylo jedním z cílů práce nastavení vhodné metodiky, pro sledování distribuce určených prvků ve vzorku a zhodnocení vhodnosti jednotlivých prvků k této analýze. Dále mapování a vyhodnocování získaných dat a následné srovnání výsledků s kvantifikací fibrózy.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Srdce

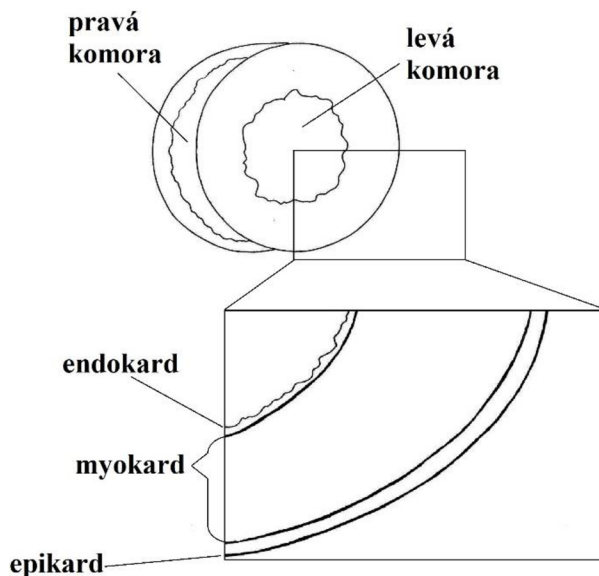
Srdce je nepárový dutý orgán. Nachází se v dutině hrudní uložený za hrudní kostí mezi pravou a levou plicí. Má za úkol čerpat krev v cévní soustavě. Tvoří ho srdeční svalová tkáň (myokard), což je zvláštní druh příčně pruhované svaloviny [3; 4; 5].

Srdce člověka je rozděleno na 4 oddíly – pravou předsíň, pravou komoru, levou předsíň a levou komoru. Komory srdce pracují jako dvě navzájem závislá čerpadla. Pravá komora pohání plicní oběh. Levá komora čerpá okysličenou krev do tělního oběhu. Předsíně fungují jako sběrnice krve. Do levé předsíně přitéká krev z plicních žil, do pravé předsíně z horní a dolní duté žíly [3; 4; 6].

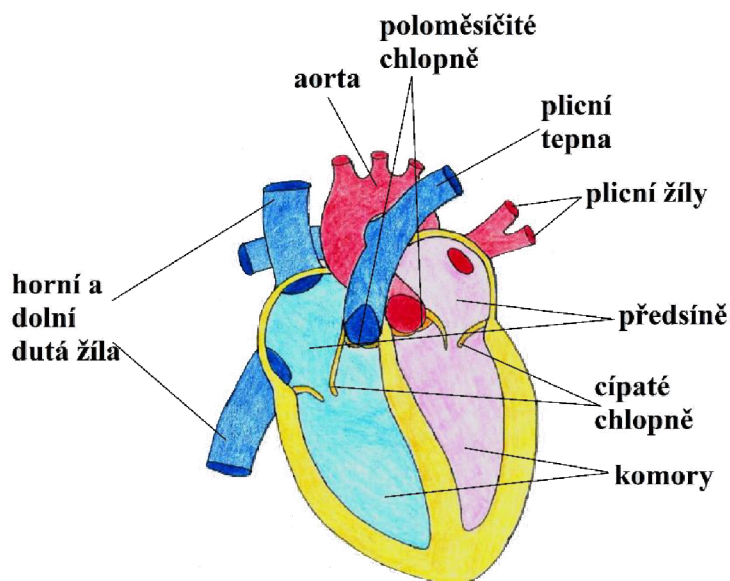
Mezi komorou a předsíní na obou stranách je uložena cípatá chlopeň, díky těm proudí krev z předsíní do komor, ale zároveň zamezuje jejich zpětnému toku. Z každé komory vycházejí velké tepny – aorta, vycházející z levé komory a plicnice vycházející z pravé komory. Obě jsou opatřeny poloměsíčitou chlopní. Chlopně fungují jako regulátory směru toku krve. Zajišťují tak jednosměrný tok krve z předsíní do komor a odtud do velkých tepen [6].

Srdeční svalovina je tvořena 3 vrstvami:

1. endokard – tenká vnitřní vrstva srdeční svaloviny,
2. myokard – střední vrstva, tvořena svalovými buňkami a opěrnými tkáněmi, je nejsilnější vrstvou,
3. epikard – vnější vrstva, která obsahuje mnoho cév, nervů a buňky tukové tkáně [4].



Obrázek 1: Schéma řezu srdce



Obrázek 2: Schéma srdce

Čerpací činnost srdce se děje díky rytmickému střídání stahu (systoly) a relaxace (diastoly) srdečního svalu. Cyklické střídání těchto fází se nazývá srdeční cyklus [4]. Při zahájení diastoly krev proudí z žil do předsiní. Jakmile klesne tlak krve v komorách, otevřou se cípaté chlopně a krví se začnou plnit i komory. Plnění komor je dovršeno stahem předsiní. Poté nastává systola komor, kdy tlak v komorách stoupne, a tím se uzavřou cípaté chlopně. Otevřou se ale poloměsíčitě chlopně, takže je krev vypuzena do tepen, které se tlakem krve napnou. Díky elasticitě tepen, se v nich udržuje tlak, který uzavře poloměsíčitě chlopně ve chvíli, kdy tlak v komorách klesne, a navíc žene krev dál do oběhového řečiště. Uzavření cípatých chlopní, tedy počátek systoly a uzavření poloměsíčitých chlopní, tedy počátek diastoly, vyvolává srdeční ozvy [6].

Část srdečních vláken postrádá schopnost stažlivosti a tvoří převodní soustavou srdeční. Je pro ně ale typické odpovídat na elektrický podnět vzruchem a vést ho, nebo jej samovolně tvořit. Na registrování a hodnocení akčních potenciálů, které vznikají při činnosti srdce je založena elektrokardiografie (EKG). EKG hraje velmi důležitou roli v diagnostice řady srdečních nemocí a poruch, zejména při srdečním selhání [4; 7].

Srdeční selhání má různé definice. Z klinického hlediska jde o stav způsobený poruchou funkce nebo struktury srdce, kdy srdce není schopno čerpat dostatečné množství krve navzdory normálnímu plnění komor. Pacienti trpící srdečním selháním mají typické příznaky onemocnění, jako například dušnost, únavu, zhoršenou toleranci zátěže, otoky dolních končetin nebo zvýšenou náplň krčních žil. Selhání srdce může zapříčinit mnoho faktorů. Jedním z nich je fibróza myokardu, která vede ke snížené poddajnosti srdeční svaloviny, a tím vede

k diastolické dysfunkci. Také snižuje kontraktilitu, což vede k systolické dysfunkci. Myokardiální fibróza též zvyšuje pravděpodobnost výskytu arytmií [8].

2.2 Myokardiální fibróza

Myokardiální fibróza je procesem remodelace srdečního svalu. Má důležitý vliv na vznik a rozvoj srdečního selhání. Jedná se o velmi dynamický proces, který je rezistentní vůči terapii. Navíc prevence a potlačení procesu je velmi obtížné. Proto je myokardiální fibróza v klinické praxi intenzivně zkoumána [2; 9].

Fibróza je proces, který se může vyskytnout v mnoha orgánových systémech. Vzniká nadměrným ukládáním proteinů mezibuněčné hmoty. V podstatě se jedná o přehnanou reakci na poškození (hojení). Tím ovlivňuje tkáňovou architekturu a narušuje funkci orgánů. Proces, který opravuje tkáň je velmi složitý. Normální tkáňovou architekturu zajišťuje syntéza a degradace mezibuněčné hmoty. Přesto, že je tento postup nezbytný, může vést právě k fibróze [10].

Mezibuněčná hmota je dvojího typu – vláknitá a amorfni. Podle vlastností amorfni mezibuněčné hmoty a podle zastoupení jednotlivých složek rozlišujeme různé typy pojiv. Jedním z nich je vazivo, které je pojivovou tkání především z vazivových buněk (fibroblastů), kolagenních a elastických vláken a amorfni mezibuněčné hmoty. Fibroblasty produkují amorfni hmotu a tropokolagen, z kterého se dále formulují kolagenní vlákna. Fibroblasty mají navíc dobrou regenerační kapacitu, proto slouží jako hlavní zdroj vyplňující defekty tkáně – tvoří jizvy. Obnova vazivových struktur tedy hlavně závisí na přítomnosti a funkčnosti fibroblastů [3].

Při poškození tkáně jsou fibroblasty aktivovány a podléhají změně fenotypu z klidových buněk tvořících mezibuněčnou hmotu na myofibroblasty. Ty kombinují vlastnosti fibroblastů s buňkami hladkého svalstva (myoblastů) a tím regulují remodelaci pojivové tkáně. Při standardních reparačních procesech jsou po vytvoření jizvy myofibroblasty sníženy apoptózou nebo reverzí zpět na klidnější fibroblasty. Pokud myofibroblasty přetrvávají ve tkáni dochází k patologické fibróze a narušování normální funkce orgánů [10].

Ačkoliv existuje značné množství výzkumů zaměřující se na mechanismy, které jsou základem patogeneze tohoto onemocnění, je potřeba lépe a specificky definovat procesy, které vedou k tvorbě fibrózy za různých podmínek. Protože přesné molekulární mechanismy, které jsou základem špatného hojení a fibrózy zůstávají stále nedostatečně popsány. Na rozdíl od mechanismu, jsou primární cesty vedoucí k poškození tkáně a rozvoji fibrózy dobře prostudované [9; 10].

2.2.2 Důvody vzniku myokardiální fibrózy

Podle cesty vzniku můžeme myokardiální fibrózu rozdělit na reparativní fibrózu a reaktivní fibrózu. Reparativní fibróza je organizovaný vývoj jizvy, třeba po infarktu myokardu, kdy je potřeba mechanicky stabilizovat porušenou tkáň. Reaktivní fibróza je následek patologických procesů, například při tlakovém přetížení srdce [2].

Jedním z důvodů vzniku fibrózy myokardu je také stárnutí. S pokročilým věkem se zvyšuje i obsah kolagenu v srdci. Spouštěče jsou velmi rozmanité. Může se jednat o reakci na dlouhodobou zátěž srdečních stěn nebo na nárustu oxidačního stresu a v souvislosti s tím vznik reaktivní fibrózy. Pozorovat lze i reparativní fibrózu v reakci na poranění nebo ztrátu buněk. Ve stárnoucím srdci se fibróza obvykle rozvíjí spolu s dalšími procesy [2].

2.2.2.1 Myokardiální fibróza a životní prostředí

Myokardiální fibróza může vzniknout i jako následek expozice cizorodým látkám. V životním prostředí se setkáváme s celou řadou látek, působících na lidské zdraví. Proto je působení těchto látek neustále zkoumáno.

Za zmínku stojí dlouhodobá expozice polychlorovaným bifenylům (PCB). Jejich rezidua se nachází v celém životním prostředí. A to navzdory tomu, že většina zemí jejich výrobu zakazuje. Diskutovány jsou hlavně pro jejich environmentální a zdravotní rizika [11].

Studie zabývající se poškozením srdce vyvolaném PCB126 na myších ukázala, že již vystavení nízkým dávkám PCB126 vyvolalo poškození srdce. Hmotnost srdce byla po expozici vyšší oproti kontrole a díky histologickému barvení bylo patrné, že uspořádání myokardiálních vláken bylo chaotické. Mimo jiné vykazovaly testované myši zvýšenou expresi enzymů syntézy kolagenu a proteinů mezibuněčné hmoty. Tyto výsledky poukazují právě na srdeční fibrózu [11].

Zkoumány byly i metabolické změny v srdci. Díky kterým bylo dokázáno, že nízké dávky PCB126 narušují metabolické pochody. Srdeční metabolismus totiž hraje důležitou roli ve většině srdečních onemocnění. Byla odebrána srdce myši a ke tkáni byl přidán methanol s kyselinou tridekanovou. Vzniklý roztok se poté vysušil a derivatizoval. Analýza proběhla pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). Ve výsledku celkem 59 metabolitů vykazovalo významné rozdíly oproti kontrole. Jednalo se o lipidy, aminokyseliny, sacharidy, polyoly, nukleosidy a další. Kromě toho dřívější studie dokázaly, že PCB126 narušuje i metabolismus glukózy a lipidů v játrech [11].

Značným problémem je i znečištění ovzduší. Ukazuje se, že na poškození srdce, mají velký vliv pevné částice (PM). Rozhodujícím faktorem je například velikost částic. Nejhorší

poškození vzniká při expozici jemnými a ultrajemnými částicemi (PM_{2,5} a PM_{0,1}). Tyto částice mohou proniknout do dýchacího traktu a dostat se do plicních alveol. Určité množství prachového materiálu se poté může dostat až do oběhového systému. Takto může docházet k extrakci těžkých kovů, které jsou na částicích nasorbované nebo způsobovat zánět a oxidační stres, které dál mohou vést remodelaci srdečního svalu [12].

Existuje mnoho experimentů zkoumající vztah expozice PM_{2,5} a kardiovaskulárních onemocnění [13; 14]. Jsou studovány například i dieslové výfukové plyny, které jsou zdrojem pevných částic. Studie testují účinek expozice těchto plynů na plod v období těhotenství (in utero) a na jedince v raném věku. U myši bylo vyvoláno tlakové přetížení a jedinci exponovaní in utero a v raném věku měli horší odpověď na srdeční selhání, než jedinci exponovaní v dospělosti. Studie tak naznačuje, že expozice již v raném věku nebo in utero podporuje pozdější rozvoj srdečního selhání v dospělosti. Kromě toho expozice také napomáhá rozvoji myokardiální fibrózy [13].

Dále je vhodné zmínit studii, která si dala za cíl určit, zda je dysfunkce srdce vyvolaná PM_{2,5} závislá na věku. Byly použity čtyřtýdenní, čtyřměsíční a desetměsíční myši. Při růstu hlodavců dochází k rozšiřování síní, zvětšování tloušťky stěny komor, nebo k některým buněčným změnám, například větší množení fibroblastů a akumulace kolagenu. Dá se tedy předpokládat, že vliv na různě staré jedince bude odlišný. U myši ve věku 4 týdnů a 10 měsíců docházelo k většímu rozvinutí fibrózy. Díky měření srdeční frekvence, krevního tlaku, srdečních funkcí a strukturálním změnám se ukázalo, že nejcitlivější skupinou na PM_{2,5} jsou starší myši. V porovnání čtyřměsíčních myši a čtyřtýdenních myši byly čtyřtýdenní mnohem vnímavější na znečištění PM_{2,5}. Důvodem může být rozdílná hladina estrogenu, který chrání kardiomyocyty [14].

2.3 Metody využívané v souvislosti s myokardiální fibrózou

Nejrozšířenější zobrazovací technikou, která se v klinické praxi využívá pro diagnostiku srdečního selhání, je echokardiografie [2]. Jedná se o neinvazivní zobrazovací metodu. Poskytuje informace o tvaru a velikosti srdečních dutin, funkci chlopní, stažlivosti jednotlivých segmentů a diastolické a systolické funkci komor. Důležitá je zejména systolická funkce levé komory (LK). Jejím hlavním ukazatelem je ejekční frakce (EF). Fibróza srdečního svalu vede ke snížení poddajnosti srdečního svalu a tím k rozvoji diastolické a systolické dysfunkci [8].

Echokardiografie využívá pro zobrazování srdce ultrazvuk, tedy zvuk o frekvenci 20 kHz–10 GHz. Využívá se vlastnosti zvuku procházet různými tkáněmi, odrazet se a získávat tak informaci o struktuře prostředí. Diagnostickou informaci tedy dává zpětně odražené

vlnění [15]. Echokardiografie, ale poskytuje jen málo informací o přítomnosti případně rozsahu fibrózy [2].

Pro detekci a kvantifikaci myokardiální fibrózy se standardně využívá magnetická rezonance srdce (CMR) [9]. Také se řadí mezi neinvazivní zobrazovací metody. Umožňuje přesně vyhodnotit tloušťku stěn, objem levé komory, přítomnost trombu a systolickou funkci komor. Při použití kontrastní látky, lze pozorovat fibrózní tkáň [8].

V průběhu vyšetření se generují radiofrekvenční pulzy, díky tomu se mění energie jader atomu. Při návratu do nízkoenergetického stavu dochází k emisi vysokofrekvenčního vlnění. Emitovaná energie je zachycena a převedena do obrazu. Chování vodíkového iontu se liší dle okolních chemických struktur, navíc různé tkáně mají různý obsah tohoto iontu. Právě proto CMR skvěle zobrazuje charakteristiku tkáně. Je to jedinečná technika v detekci jizvy myokardu s vysokou přesností [8; 16].

Pro validaci metod magnetické rezonance srdce pro detekci myokardiální fibrózy se využívá experiment v potkaním modelu. Pro tento experiment se využívají samci potkana kmene Sparague-Dawley ve stáří 6 týdnů. Zvířata jsou rozdělena do dvou skupin, z nichž jedna je kontrolní a u druhé se vyvolá fibróza srdečního svalu. Vyvolání spočívá v odebrání jedné ledviny, podávání deoxykortikosteronu acetátu a přístupu k pitné vodě pouze s přídavkem NaCl a KCl. Všechna zvířata jsou podrobena magnetické rezonanci den před operací a poté 14. a 28. den po operaci [9].

2.4 Analytické metody

Zobrazovací techniky používané v medicíně sloužící pouze k lékařským účelům, nepodávají informaci o složení tkání nebo prvkové distribuci. Pro tyto účely jsou vhodné instrumentální analytické techniky. Navíc při analýze přímo pevných vzorků, odpadá rozpouštění v kyselinách, které představuje určité riziko kontaminace a šetří čas [17]. Pro analýzu pevných materiálů můžeme využít například rentgenovou fluorescenční spektrometrii (XRF), částicemi indukovanou rentgenovou emisi (PIXE), analýzu elektronovou mikrosondou (EMPA), hmotnostní spektrometrii sekundárních iontů (SIMS), spektrometrii laserem buzeného plazmatu (LIBS), laserovou ablaci ve spojení s optickou emisní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) nebo hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS).

2.4.1 Metody rentgenové analýzy

Jedná se o soubor metod zahrnující například metody jako je rentgenová fluorescenční spektrometrie (XRF), protonem indukovanou rentgenovou emisi (PIXE) a analýza

elektronovou mikrosondou (EMPA). Představují multielementární analytické metody jejichž výhodou je, nedestruktivnost. Díky tomu lze vzorek použít pro analýzu dalšími metodami.

Princip těchto metod je velmi podobný. Zahrnují excitaci atomů ve vzorku pomocí zdroje, který má dostatečnou energii na to, aby vybudil elektrony vnitřního obalu. Atomy jsou vnitřně nestabilní, protože mají prázdné místo v elektronovém orbitalu a dojde k přechodu elektronu do stabilnější elektronové hladiny. Postupně elektron ztrácí energii o emitující rentgenový foton, který je zaznamenáván v podobě charakteristických rentgenových čar [18]. To je právě podstatou kvantitativní analýzy, protože každý prvek má svou vlastní sadu charakteristických rentgenových paprsků. Kvantitativní analýza se uskutečňuje měřením poměru mezi charakteristickou intenzitou rentgenového záření, které je emitováno daným prvkem ve vzorku a tím, které emituje stejný prvek v referenčním materiálu [19].

Rentgenová fluorescenční spektrometrie (XFR) využívá jako zdroj rentgenové fotony. Detekční limity metody se pohybují v jednotkách mg/kg až desítkách procent. V dnešní době jsou na trhu kompaktní micro-XRF, které mají lepší detekční limity [20]. Díky možnosti využití také mobilních zařízení, mohou najít uplatnění v monitoringu životního prostředí. Technika byla například využita při sledování expozice manganu a rtuti v nehtech. Díky měření *in vivo* odpadlo skladování nehtů, a vedlo ke spolehlivější analýze Hg, která je extrémně těžká [21].

Naproti tomu technika částicemi indukované rentgenové emise (PIXE) má nižší detekční limity v rozmezí 0,1–10 mg/kg. Jedná se o metodu vhodnou pro analýzu hlavních i stopových prvků s vysokou precizností. Je schopná stanovit obsahy téměř všech prvků v periodické soustavě, a navíc je využívána pro standardizaci referenčních materiálů. Zde se jako zdroj obvykle využívá protonový paprsek [22; 23]. Analýza probíhá ve vakuu, vzorek je umístěn do ozařovací komory, která je spojena s paprskem. Velkou výhodou metody je, že pokud je vzorek příliš velký a nelze umístit do ozařovací komory, může se použít technika externího paprsku, který je veden tenkým okénkem do okolního prostředí. Takto se dají analyzovat i knihy, obrazy nebo archeologické artefakty [23]. Metoda našla uplatnění také ve studii, která se zabývala vlivem kovových iontů z implantátů na okolní měkké tkáně. Analyzovány byly i orgány, do kterých se kovové prvky mohly přenést. Byla prokázána například kontaminace jater manganem nebo lymfatické uzliny chromem [24].

Excitační mechanismus je shodný i u elektronové mikrosondy (EMPA), ale využívá se zde elektronový paprsek. EMPA je v podstatě sestavená z elektronového sloupce, který je vybaven elektronovým dělem a systémem elektromagnetických čoček a z několika detektorů. Elektromagnetické čočky se využívají k zaostření elektronového paprsku na vzorek. Elektronový sloupec je ve vysokém vakuu, díky tomu se zabrání oxidaci vlákna a rozptylu

paprsku elektronů. K pozorování vzorků je sloupec vybaven optickým mikroskopem s elektronovým paprskem a detektory [19]. Při buzení elektrony ale musí být vzorek vodivý a je zde vyžadováno lepší vakuum než při předchozích metodách. To může být problém při výměně vzorku [25]. Hlavní signály v elektronové mikrosondové analýze jsou kromě charakteristických rentgenových paprsků i zpětně odražené elektrony (BSE), Augerovy elektrony, sekundární elektrony (SE) nebo katodoluminiscence, což poskytuje informace o kvantitativní a kvalitativní informace včetně fázového rozložení [23; 25; 26].

EMPA má širokou škálu aplikací na materiály přírodního i syntetického původu. Je rozsáhle používána v geologii [26]. Byla využita například ve studii, kde byl analyzován titan v měkkých tkáních pocházející z úlomků páteřních implantátů [27]. Limity detekce této metody se pohybují v jednotkách až stovkách mg/kg [28].

Obecně mají tyto techniky horší limity detekce a v porovnání s ICP-MS, ICP-OES, LIBS neměří dobře lehké prvky. Proto se hodí jako doplňkové metody.

2.4.2 „Laser assisted“ metody

Do této skupiny technik se řadí LIBS, LA-ICP-MS nebo LA-ICP-OES. Společným jmenovatelem metod je využití laserové ablace (LA) pro vzorkování, což umožňuje analýzu pevných vzorků. Laserová ablace je technika, založená na interakci paprsku pulsního laseru s povrchem materiálu. Na vzorek dopadají fotony, které jsou absorbovány a dojde k prudkému nárůstu teploty. Při prudkém ohřátí vzorku do určité hloubky vzroste tlak, který vyvolá explozi povrchové vrstvy [29].

V případě, že je energie laseru dostatečně vysoká, dochází k vytvoření mikroplazmatu s krátkou dobou životnosti, kde může být odpařená matrice excitována a ionizována. Takto vzniklé mikroplazma se nazývá laserem indukované plazma (LIP). Měření optické emise z LIP je principem spektrometrie laserem buzeného plazmatu [30].

Druhou možností je zavedení aerosolu ze vzorku do stabilního ionizačního a excitačního zdroje, kterým může být například ICP. Emitované fotony poté mohou být detekovány, jako je tomu u ICP-OES nebo se může měřit intenzita iontového toku, což je principem ICP-MS.

Metody umožňují analýzu jednotlivých bodů nebo 2D či 3D prostorovou analýzu. Délka pulsu, vlnové délka záření, hustota zářivé energie, frekvence a průměr laserového svazku jsou stěžejní parametry, které ovlivňují prostorové rozlišení distribuce velikosti částic uvolněného materiálem a tím i účinnost odpaření a ionizace [17].

Primární nevýhodou metod založených na laserové ablaci je jejich destruktivnost. Navíc během laserové ablace může docházet k elementární frakcionaci, která je spojena s fázovými

změnami, například s vypařováním, kondenzací nebo táním a s nestechiometrickým složením vzorku [29]. Díky tomu může mít vzniklý analyzovaný aerosol odlišné relativní složení ve srovnání se vzorkem [31]. Frakcionace může nastat i při použití nanosekundového laserového zdroje (5–10 ns) díky tepelnému efektu. V takovém případě dochází k redistribuci materiálu, kvůli tepelné difúzi. Výsledkem je přednostní odpařování některých prvků. Tento problém se dá vyřešit, když fázový přechod bude proveden dříve, než začne tepelná energie difundovat z materiálu, proto se musí zkrátit doba pulsu. Pro dosažení optimálního výkonu analýzy by měl materiál, který je uvolněný pomocí LA, přesně odpovídat celkovému složení. Poté by měl být přeměněn na aerosol, který je zcela ionizován uvnitř ICP [32]. Situaci ztěžuje i nedostatek vhodných referenčních materiálů [31].

2.4.2.1 Spektrometrie laserem buzeného plazmatu

Spektrometrie laserem buzeného plazmatu je analytická technika založená na měření optické emise s laserem indukovaného mikroplazmatu.

Kromě laboratorních zařízení mohou být přístroje přenosné nebo přístroje umožňující analýzu vzdálených objektů. Analýza na místě snižuje náklady spojené se vzorkováním, sběrem, přepravou a přípravou v laboratoři. Proto může být, stejně jako metoda XRF, využita pro analýzu životního prostředí. Vedle životního prostředí nachází další uplatnění v energetice, biomedicině nebo i průzkumu vesmíru. K výraznému pokroku došlo v oblasti solárních článků a baterií, kdy byla metoda LIBS úspěšně využita pro detekci a mapování nečistot v křemíku, který se využívá pro výrobu fotovoltaického článku. Dalším příkladem je také analýza absorpčních vrstev sloučenin v polovodičových solárních buňkách [33].

Využití metody v biomedicině ukazuje práce, která shrnuje aplikace LIBS při klasifikaci a identifikaci měkkých tkání. Metoda byla použita k rozlišení maligních a normálních tkání jater a byly zjištěny rozdíly v intenzitách signálu vybraných prvků. Intenzity mědi a železa byly v maligní tkáni slabší, zatímco vápníku a hliníku byly mnohem silnější. Poměry vápníku s draslíkem a sodíku s draslíkem byly v maligní tkáni mnohem vyšší. Analyzována byla například i rakovinová tkáň z prsu, tlustého střeva a konečníku. Sledován byl především vápník a hořčík. Jejich intenzity byly v maligních tkáních opět značně vyšší. Mimo maligní tkáň byla metoda LIBS použita i ke kvalitativnímu studiu jaterních tkání potkana v různých fázích onemocnění jaterní fibrózou. Předmětem studia byla intenzita emisí hořčíku, fosforu, draslíku, železa, vápníku a mědi. Zejména intenzita vápníku vykazovala rostoucí trend [34].

Konkurentem pro analýzu pomocí LIBS je XRF. Limity detekce LIBS se pohybují v rozmezí jednotek až stovek mg/kg [35; 36]. Jak již bylo zmíněno vznikající mikroplazma je

nestabilní. Naproti tomu indukčně vázané plazma je mnohem stabilnější zdroj, je spolehlivější a preciznější. Proto je v některých případech vhodnější využití například LA-ICP-OES nebo LA-ICP-MS, které zlepši preciznost a přesnost měření.

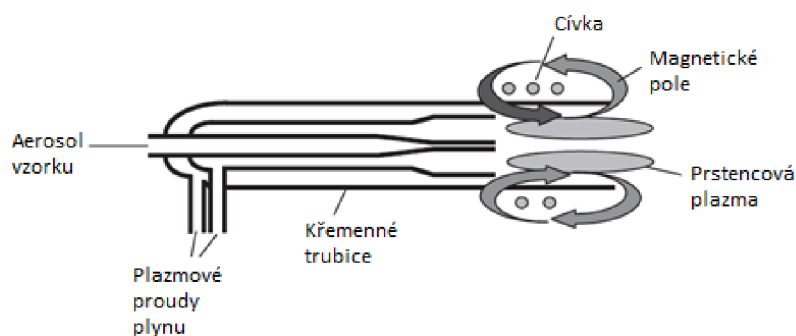
2.4.2.2 LA-ICP-OES

Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem je technika, která se zakládá na měření emise excitovaných iontů a atomů. Poté, co je vzorek odprášen pomocí laserové ablace, je dále veden do indukčně vázaného plazmatu (ICP) [30]. ICP se využívá jako budící zdroj a má dvě úlohy. První krok spočívá v atomizaci vzorku a druhý krok v částečné ionizaci analytu a excitaci atomů a iontů do vyšších energetických stavů [37].

Plazma je považováno čtvrtým skupenstvím hmoty, protože má odlišné vlastnosti od kapalin i plynů. Definuje se jako kvazineutrální plyn. To znamená, že kladné a záporné částice jsou vzájemně vyrovnány a navenek se plazma jeví jako elektricky neutrální. Vykazuje kolektivní chování, jedná se o pohyby částic, které nezávisí jen na lokálních podmínkách, ale i na tom, v jakém stavu je plazma ve vzdálenějších oblastech. Chování plazmatu je hlavně ovlivněno magnetickými a elektrickými poli [30].

Indukčně vázané plazma (ICP) je v současné době nejčastěji používané, díky svým jedinečným vlastnostem. Plyn, který se využívá k tvorbě plazmatu, je nejčastěji argon. Jedná se o monoatomový prvek s vysokou ionizační energií, který je chemicky inertní. Poskytuje tedy jednoduché spektrum a navíc je argon schopen excitovat a ionizovat většinu prvků v periodické soustavě. Další výhodou je i jeho cena v porovnání s vzácnými plyny. Jediným omezením je špatná tepelná vodivost tohoto plynu, která omezuje účinnost atomizačních procesů. Tuto nevýhodu lze vyřešit přidávkem vodíku, který je lépe tepelně vodivý nebo kyslíku, který nám umožní dokonalé spálení uhlíku organických matric [30; 37].

K vytvoření plazmatu je využívána křemenná plazmová hlavice, kam se zavede argon. Jedná se o tři trubice různého průměru. Schéma plazmové hlavice je vidět na obrázku 3 [37].



Obrázek 3: Plazmová hlavice [37]

Vnitřní trubicí proudí nosný plyn, který transportuje vzorek. Střední plazmový plyn izoluje plazma od indukční cívky a vnější plazmový plyn vytváří výboj. Všechny tři trubice mohou tvořit jeden pevný celek a pak se jedná o kompaktní plazmové hlavice. Nebo se může jednat o rozebíratelné plazmové hlavice, kdy jsou jednotlivé trubice samostatně upevněny v plastovém nebo keramickém bloku a kombinované plazmové hlavice, kdy je samostatně jen injektor a prostřední a vnější trubice tvoří jeden celek [30].

Teplota ICP je 5000–10000 K, což vede k tepelné atomizaci analytů, které jsou do centrální oblasti plazmatu zavedeny. Následná ionizace může probíhat řadou procesů. Hlavním mechanismem ionizace v ICP je tepelná ionizace, která je vyvolána srážkami iontů, atomů a volných elektronů v plazmatu. Stupeň ionizace závisí na teplotě, hustotě elektronů a ionizační energii samotného prvku [37].

V indukčně vázaném plazmatu rozlišujeme 2 oblasti. Indukční zónu, kde dochází k přenosu energie z elektromagnetického pole cívky do plazmatu a analytický kanál, kde je koncentrován vzorek, který je transportován nosným plynem [30].

Je složité plazmatu přiřadit jedinou teplotu. Velké teplotní odchylky jsou pozorovány především na rozhraní plazmového prstence s teplotou 10000 K a analytického kanálu, kde je tok chladného argonu s teplotou 3500 K. Podle toho, jaké procesy probíhají v analytickém kanálu a podle prostorového rozdělení intenzity emise čar, se rozděluje na předehřívací zónu, počáteční zářivou zónu, analytickou zónu a chvost výboje [30].

Na trhu existují přístroje, které využívají dvou směrů měření záření vzhledem k výboji ICP:

- a) *side-on view*, neboli *radiální*, kolmo k ose výboje;
- b) *end-on view*, neboli *axiální*, podél osy výboje [30].

Případně existují spektrometry, které nabízejí obě možnosti, označované jako *dual view* [30].

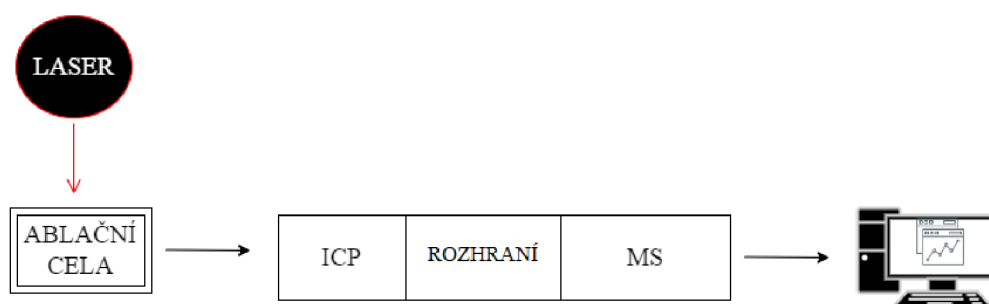
Technika ICP-OES je bohužel běžně zatížena spektrálními interferencemi. Ty můžeme popsat jako překryv čar, rozptýlené záření, může se jednat o interference vyvolané pozadím. Při stanovení hlavních složek, například v silikátových surovinách, při použití spektrometrů s axiálním pozorováním, některé citlivé čáry vykazují samoabsorpci. Řešením může být měření na méně citlivých čárách nebo radiální pozorování výboje. Limity detekce této metody se pohybují v rozmezí 0,1–10 mg/l [30].

Příkladem konkrétní aplikace metody v analýze měkkých tkání může být studie, která využila řasy a přílipky za účelem biomonitoringu těžkých kovů v mořském prostředí. Byly odebrány tkáně vybraných druhů přílipek a řas na 4 různých místech jihovýchodního pobřeží v Jižní Africe. V práci mimo jiné zjistili, že koncentrace kovů v měkkých tkáních byla 10krát vyšší než v ulitách [38].

2.4.3 LA-ICP-MS

Metoda ICP-OES stanovuje jen prvky samotné, oproti tomu ICP-MS umožňuje stanovení i izotopů prvků a izotopových poměrů. Navíc je pozadí tvořeno pouze šumem detektoru, na rozdíl od ICP-OES, kde je pozadí nedílnou součástí spektra. Limity detekce ICP-MS jsou nižší (v řádech g/l). Princip je ale velmi podobný jako u předchozí metody [30]. Hmotnostní spektrometrie je jednou z nejdůležitějších analytických technik používaných ve stopové a ultrastopové analýze. Důvodem je vysoká citlivost, nízké detekční limity a možnost analýzy velmi malých objemů vzorků [39]. V závislosti na použitém MS mohou být limity detekce dokonce na úrovni pg [40]. Mezi další výhody metody LA-ICP-MS patří rychlé zpracování vzorku, vysoká přesnost a získávání dat v širokém hmotnostním rozsahu [29]. Technika LA-ICP-MS je považována za univerzální metodu pro analýzu pevných materiálů [32].

Povrch vzorku je odprášen laserem v ablační cele, následně je proudem plynu vnášen do indukčně vázaného plazmatu, které zde slouží jako zdroj iontů pro hmotnostní spektrometrii. ICP má jako ionizační zdroj mnoho výhod. Ionizuje skoro veškeré prvky PSP z více než 99 %. Vzorek je v ICP desolvatován, vypařen, atomizován a ionizován. Ionty z analytického kanálu vstupují do předvakua a od tam část prochází malým otvorem do vakua hmotnostního spektrometru. Fokuseovaný svazek iontů je z iontové optiky převeden do analyzátoru, kde se ionty rozdělí podle m/z v čase nebo prostoru. Poté, co ionty proletí analyzátozem, dopadají na detektor, který převádí proud iontů na elektrický signál [30]. Schéma LA-ICP-MS je zobrazené na obrázku 4.

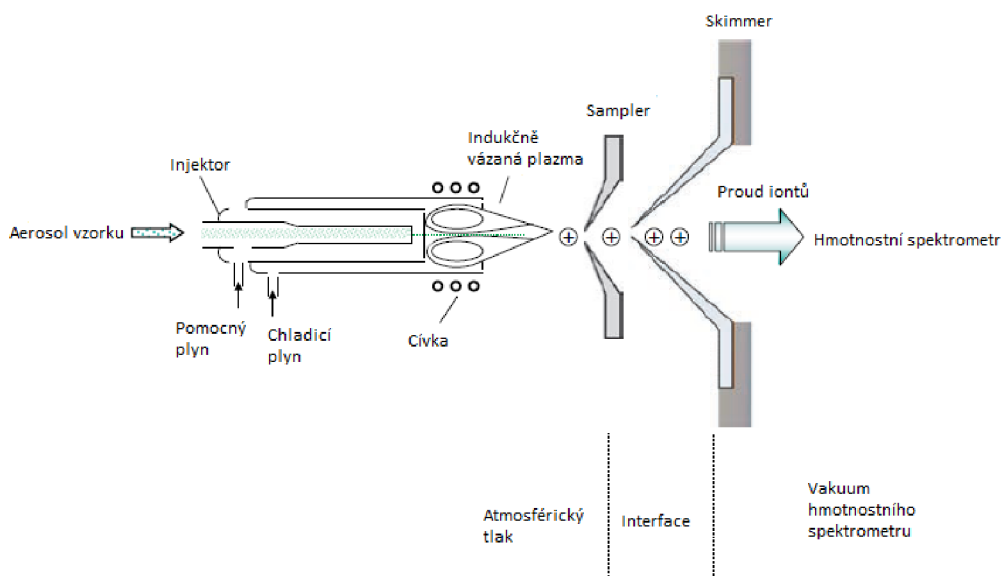


Obrázek 4: Schéma LA-ICP-MS

2.4.3.1 Rozhraní

Nejvíce namáhanou součástí ICP-MS je rozhraní (interface) mezi iontovým zdrojem a hmotnostním spektrometrem. Dvoustupňový interface je tvořen dvěma kužely – sampler a skimmer, které jsou tvořeny tepelně vodivými materiály a ve vrcholech mají malé otvory

o průměru kolem 1 mm (Obrázek 5). Mezi samplerem a skimmerem je udržován tlak cca 500 Pa [30].



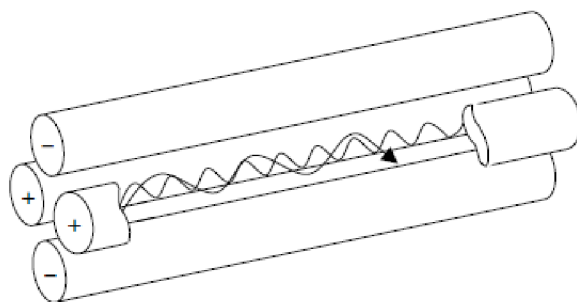
Obrázek 5: Schéma plazmového hořáku a interface [39]

Proud iontů je po opuštění skimmeru silně divergentní, obsahuje i elektricky nenabité atomy a fotony. Před tím, než vstoupí do analyzátoru je tedy potřeba separovat fotony a elektroneutrální částice od iontů, aby bylo minimalizováno riziko zvyšování pozadí. Do dráhy proudění se umístí například mechanická přepážka a fotony a nenabité částice se na ní zastaví. Tok iontů se poté usměrňuje přesně tvarovaným elektrickým polem [30]. Z iontové optiky pokračuje svazek iontů do analyzátoru iontů, kde se rozdělí podle m/z .

2.4.3.1 Hmotnostní spektrometr

Pomocí hmotnostní spektrometrie lze určit hmotnost atomů a molekul prostřednictvím hmotnostně separovaných iontů a jejich náboje (m/z). Hmotnostní spektrum je pak reprezentací naměřených intenzit iontů v závislosti na poměru hmotnosti k náboji (m/z). Ve spektru je demonstrováno izotopické složení prvků. Každý prvek je charakterizován svým izotopickým poměrem [39]. Pro ICP-MS se využívá kvadrupólový analyzátor (Q-MS), analyzátor doby letu (TOF-MS) nebo analyzátor s dvojitou fokusací (SF-MS, HR-MS) [30].

Kvadrupólový analyzátor funguje na principu filtru, kdy podél jeho osy mohou projít pouze ionty s určitým poměrem m/z (Obrázek 6). Ionty se v něm rozkmitají, při určitém napětí a frekvenci radiových vln na elektrodách a projdou tak pouze ionty o vybraném m/z . Většinou je tvořen čtyřmi tyčovými elektrodami, na které je vloženo napětí [39].



Obrázek 6: Kvadrupólový analyzátor [39]

Analyzátor doby letu pracuje s principem, že urychlené ionty o různé hmotnosti mají stejnou kinetickou energii, ale dosahují rozdílných rychlostí. Ionty jsou přiváděny do akcelérátoru, kde jsou urychleny v elektrostatickém poli. Následně v letové trubici dojde k oddělení lehčích iontů od těžších podle různých časů letu. To lze převést na m/z [39].

Analyzátor s dvojitou fokusací je sektorový analyzátor, který využívá kombinace elektrického a magnetického pole. V magnetickém sektoru je iont pohybující se v magnetickém poli dispergován vzhledem ke své hybnosti, ionty se stejnou kinetickou energií jsou tedy rozdělené podle své hmotnosti. V elektrickém poli dochází k rozptylu iontů a zakřivení dráhy v závislosti na jejich kinetické energii. Spojení obou sektorů zvyšuje rozlišení díky tomu, že netrpí rozšířením obrazu v důsledku šíření kinetické energie iontů [41].

Jako detektory se v hmotnostních spektrometrech využívají Faradayův kelímek, který je konstrukčně jednoduchý, ale má nízkou citlivost. Elektronový násobič s diskretní dynodou, který má vysokou citlivost, ale krátkou životnost. Nebo tzv. multikolektory, kde se využívá kombinace několika detektorů nebo plošné multikanálové detektory, jsou využívány pro zvýšení preciznosti stanovení přesných izotopových poměrů [30].

2.4.3.3 Využití LA-ICP-MS

Využití nalezneme v různých oborech, v životním prostředí, geologii ale i v biomedicíně. Jedním z příkladů je aplikace ve studii, kdy byly porovnávány postupy stabilizace vzorků měkkých tkání a jejich vliv na obsah prvků. Byla použita kuřecí játra sušená v sušárně, po krátké lyofilizaci a po dlouhé lyofilizaci. Sledovanými prvky byly Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn a Sr. Bylo zjištěno, že lyofilizace snižuje obsah některých prvků (Mg, Ca, Mn, Cu, Zn, P, S a Sr). Ve stejných vzorcích, ale došlo ke zvýšení intenzity Na a K. Naproti tomu sušení v sušárně má na obsah prvků zanedbatelný vliv [42].

Dalším příkladem analýzy měkkých tkání je sledování vlivu zubních implantátů na tkáň ústní sliznice. Byl odhalen zvýšený obsah Ti, Al a V, což jsou prvky, které jsou součástí

použitých implantátů. Celkem 30 vzorků bylo odebráno 3–5 měsíců po implantaci. K dispozici bylo i 10 kontrolních vzorků sliznice odebrané před implantací [43].

Orgánové řezy byly předmětem zobrazovací analýzy po expozici CeO_2 a Ce. Biodistribuce Ce ve slezině a játrech byla použita k posouzení možné toxicity CeO_2 . Byly použity části sleziny a jater zalité do parafínu. Nejdříve byla aplikována rychlá screeningová analýza, následně byla vybrána oblast zájmu, na které byla provedena analýza jemného skenování. Při krátkodobé expozici byl Ce distribuován hlavně v okrajové zóně sleziny, která je důležitá pro buňky opouštějící krevní řečiště. Při delší expozici byl Ce kromě okrajové zóny obsažen i v bílé dřeni, což prokazuje toxicitu pro imunitní systém. V játrech Ce sedimentoval v Kupfferových buňkách [44].

Metoda LA-ICP-MS byla použita i k analýze řezů myších mozků, ledvin, jater a sleziny poté, co byly myši vystaveny anorganické rtuti, methylrtuti, selenu a kombinaci anorganické rtuti se selenem a methylrtuti se selenem. Poté byla zkoumána distribuce rtuti v orgánech. Po kyselém rozkladu orgánu byla pomocí ICP-MS získána kvantitativní informace. Zjistilo se, že expozice rtuti po 24 hodin nemusí stačit pro překonání hematoencefalitické bariéry v mozku. Distribuční mapy ale dokazují, že ve spojení se selenem anorganická rtuť i methylrtuť bariérou prochází a dochází ke zvýšení koncentrace rtuti v mozku. Podobně tomu bylo i u ostatních orgánů, kdy při expozici rtuti a methylrtuti společně se selenem byly detekovány mnohem vyšší signály, což naznačuje, že selen podporuje vstup rtuti do orgánů [45].

Z hlediska této práce je důležité zmínit i studii, která se zabývá molekulárním zobrazením infarktu myokardu. Existují totiž molekulární kontrastní látky, které se vážou na specifické proteiny mezibuněčné hmoty. Takto je zobrazení remodelace srdce lépe proveditelné. Laserová ablace ve spojení s ICP-MS v této studii slouží ke kvantitativní analýze gadolinia ve tkáni srdce a ověření tak mapování z magnetické rezonance [46].

2.4.4 Hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů

V hmotnostní spektrometrii sekundárních iontů (SIMS) jsou emitovány ionizované (sekundární) částice po nárazu primárních iontů na povrch vzorku. Většina sekundárních částic jsou neutrální, ale najdeme zde i elektrony nebo ionty. Ionty můžeme detekovat podle jejich poměru hmotnosti k náboji (m/z), díky tomu získáme hmotnostní spektrum a chemickou analýzu povrchu vzorku. Technikou také dokážeme určit chemickou distribuci a pomocí odprášení vzorku vrstvu po vrstvě analyzovat podpovrchovou distribuci [47]. Dopadající iontový paprsek může být zaostřen na 10–200 nm. Podle velikosti dávky iontů se určí, zda bude proveden dynamický nebo statický experiment [48].

Statický SIMS používá extrémně nízké dávky primárních iontů. Počet primárních iontů dopadajících na povrch je nejméně o 2 řády menší, než počet povrchových atomů. Vzorek je tedy jen jemně ionizován, a to umožňuje desorbovat neporušené molekulární ionty [48].

Naproti tomu v dynamickém SIMS počet primárních atomů převyšuje počet povrchových atomů. To způsobuje rozprašování a chemické poškození a v důsledku toho rozrušení vzorku. Takto lze získat profil elementární a molekulární hloubky [48].

Využití metody je široké od životního prostředí přes archeologické nálezy, po medicínské studie. Zajímavým příkladem je práce, využívající tuto metodu k analýze vzorků kostí dinosaurů. Jeden z 8 vzorků obsahoval struktury kolagenových vláken, které vykazovaly pruhování. Pomocí TOF-SIMS byly identifikovány fragmenty aminokyselin, které jsou typické pro kolagenové fibrily. Uchování měkkých tkání již vyhynulých zvířat bylo totiž dříve pro paleontology nedostupné [49]. Limity detekce této metody jsou v rozmezí 0,001–1 mg/kg. Ovšem nevýhodou této metody je její vysoká cena.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie a certifikované referenční materiály

- Argon ($\geq 99,996$ %, SIAD, Česká republika)
- Dusík ($\geq 99,9$ %, SIAD, Česká republika)
- Helium ($\geq 99,998$ %, SIAD, Česká republika)
- Premix ArF (Linde, Spolková republika Německo)
- Standardní referenční materiál NIST 610 (National Institute of Standards and Technology, Spojené státy americké)
- Standardní referenční materiál NIST 612 (National Institute of Standards and Technology, Spojené státy americké)

3.2 Použité přístroje a pomůcky

3.2.1 Laserový ablační systém

Laserový ablační systém Analyte Excite+ (Teledyne CETAC Technologies, Spojené státy americké) obsahuje ArF excimerový laser, který emituje záření o vlnové délce 193 nm s délkou pulzu < 4 ns. Systém je řízen počítačem (pomocí softwaru Chromium 2.4) a díky kameře umožňuje sledování vzorku v reálném čase. V programu se také dají nastavit parametry jako hustota zářivé energie ($1\text{--}15$ J/cm²), průměr laserového svazku ($1,0\text{--}245$ μm) a frekvence ($1\text{--}300$ Hz). Laserový svazek se dá kromě kruhového tvaru nastavit i na obdélník nebo pro vybrané průměry i čtverec. Lze zvolit liniový sken, bodovou analýzu a různé vzorce. Laserový ablační systém je vybaven ablační celou HelEx II, která je dvouobjemová umožňující rychlý výplach a je plně kompatibilní s Agilent 7900 ICP-MS, se kterým je propojen polyuretanovými hadičkami.

3.2.2 Hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem

Vzorek je po laserové ablaci vnášen do ICP hmotnostního spektrometru Agilent 7900 ICP-MS (Agilent Technologies, Inn., Spojené státy americké). Plazma se tvoří v plazmové křemenné hlavici s průměrem injektoru 2,5 mm a pomocí generátoru, který má výkon v rozsahu 500–1600 W. Interface má vnější kužel (sampler) o průměru 1 mm a vnitřní kužel (skimmer) o průměru 0,45 mm. Iontová optika, nacházející se za rozhraním se skládá z extrakční a mimoosé čočky. Poté následuje oktapólová kolizně-reakční cela s tokem helia ($1\text{--}12$ ml/min) pro minimalizaci interferencí. Analyzátozem je hyperbolický kvadrupól, který separuje ionty podle m/z a má vysokou citlivost. Rozsah tohoto analyzátoru je v rozmezí 2–260 atomových hmotnostních jednotek. Iontový tok je detekován elektronásobičem, který pracuje

v analogovém a pulzním režimu. Vakuum v hmotnostním spektrometru zajišťuje turbomolekulární čerpadlo s děleným průtokem a externím rotačním čerpadlem.



Obrázek 7: Ablací systém Analyte Excite+ (vlevo) a Agilent 7900 ICP-MS (vpravo).

3.3 Vzorky

Veškeré vzorky, které byly zpracovány v rámci této diplomové práce, byly připraveny ve spolupráci s Lékařskou fakultou Masarykovy univerzity (LF MU), panem MUDr. Tiborem Stračinou, Ph.D. Vzorky byly dále zpracovány ve Fakultní nemocnici u sv. Anny v Brně. Jedná se o vzorky srdeční tkáně potkanů, u kterých byla vyvolána srdeční fibróza (FIB) a srdeční tkáně kontrolní skupiny (CON).

3.3.1 Vyvolání myokardiální fibrózy

Myokardiální fibróza byla u potkanů vyvolána v experimentu pana MUDr. Tibora Stračiny Ph.D. na Fyziologickém ústavu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity. Zvířata byla nejdříve rozdělena do skupiny s myokardiální fibrózou a do kontrolní skupiny [9].

Aby se u jedinců nacházející se ve skupině FIB vyvolala srdeční fibróza, byla jim nejdříve v celkové anestezii odebrána jedna ledvina a následně jim bylo v týdenních intervalech podáváno 20 mg deoxykortikosteron acetátu týdně. Zvířatům se umožnil přístup pouze k pitné vodě s obsahem NaCl a KCl (0,9 % a 0,3 %) [9].

Kontrolní skupina podstoupila pro dodržení stejných podmínek sham operaci – placebo operaci bez vyjmutí ledviny. Místo deoxykortikosteronu byl zvířatům podáván arašídový olej v dávce 0,2 ml týdně a měla přístup k pitné vodě bez solí [9].

3.3.2 Odebrání vzorků

Třetí týden po operaci jsou zvířata vyšetřena magnetickou rezonancí na ústavu přístrojové techniky na akademii věd. Další den jsou zvážena a poté sedativem uspana. Nejdříve inhalačně izofuranem, poté injekčně směsí ketaminu a xylazinu a vyšetřena pomocí EKG a je jim změřen tlak. Vyšetření probíhá na vyhřívané podložce, protože tělesná teplota ovlivňuje srdeční funkci.

Po usmrčení v celkové anestezii jsou zvířatům odebrány orgány: srdce, játra a ledviny. Srdce se odebírá bez předsíní, z jater se odebere pouze část, jedná se o homogenní orgán, není ho potřeba velké množství. Orgány jsou propláchnuty fyziologickým roztokem od zbytků krve, který musí být vychlazený. Vzorky se poté stabilizují ve formaldehydu až na 48 hodin. Seznam všech použitých vzorků srdce je v tabulce 1.

Tabulka 1: Seznam analyzovaných vzorků srdce

Série	Skupina	Označení
1	CON	P1
	FIB	P3
2	CON	11-S
	FIB	21-S
		21-S*
3*	CON	V-11-S
		V-13-S
		V-14-S
		V-16-S
	FIB	V-21-S
		V-22-S
		V-23-S
		V-24-S
		V-26-S

* Vzorky obarvené pomocí Mayerova hematoxynu a Eosinu Y.

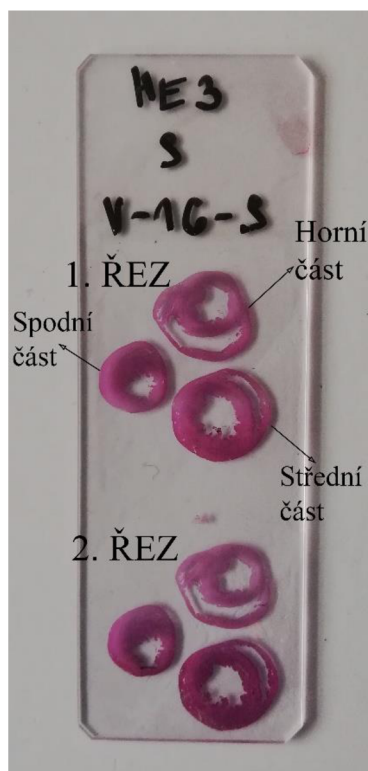
Na obrázku 8 je makroskopický snímek odebraných srdcí potkana. Srdce postižené fibrózou (vpravo) je zřetelně větší než zdravé srdce. To je způsobeno nadměrným ukládáním proteinů mezibuněčné hmoty. Odlišná barva je způsobena časovou prodlevou mezi jednotlivým vyjmutím orgánů.



Obrázek 8: Snímek vyjmutého srdce zvířete s fibrózou (vpravo) a kontrolního zvířete (vlevo)

3.3.3 Příprava řezů pro analýzu

Stabilizované orgány v 10% formaldehydu byly dále zpracovávány na pracovišti I. Ústavu patologie LF MU a Fakultní nemocnice u sv. Anny, kde se vzorky dehydratují v autotechnikonu pomocí 90% ethanolu, 10% isopropanolu (Bamed, ref: 9010X05) a xylenu (VWR CHEMICALS, ref: 28975.325). Takto připravený orgán se zalije do parafinu (Dr. Kulich Pharma). Řezy se krájí na tloušťku 1–1,5 μm , v horní, střední a spodní části srdce, vždy 2 řezy těsně pod sebou, které jsou umístěny na sklíčko. Následně dochází k vybarvení řezů pomocí Mayerova hematoxynu (Bamed, ref: C0306) a Eosinu Y (MERCK, ref: 1.15935.0025). Připravené a obarvené řezy na sklíčku jsou vidět na obrázku 9.



Obrázek 9: Připravené skličko s obarvenými řezy srdce

3.4 Analýza pomocí metody LA-ICP-MS

Obarvené vzorky byly uchovány v mrazáku při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do samotného měření. Vzorky z prvních dvou sérií, které byly bez obarvení, byly uchovány při laboratorní teplotě. Výběr prvků za účelem sledování jejich distribuce byl proveden na základě literární rešerše cílené na analýzu biologických měkkých tkání, protože studie přímo zaměřené na myokardiální fibrózu nejsou k dispozici. Pro analýzu v této diplomové práci bylo vybráno 9 izotopů prvků. Jednalo se o $^{12}\text{C}^+$, $^{28}\text{Si}^+$, $^{34}\text{S}^+$, $^{43}\text{Ca}^+$, $^{55}\text{Mn}^+$, $^{56}\text{Fe}^+$, $^{57}\text{Fe}^+$, $^{63}\text{Cu}^+$ a $^{66}\text{Zn}^+$. Izotop železa $^{57}\text{Fe}^+$ později byl z metody odebrán, protože distribuce izotopů $^{56}\text{Fe}^+$ a $^{57}\text{Fe}^+$ byly shodné a obsah Fe v tkáni byl dostatečně vysoký pro překonání interference $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ mající vliv na výšku pozadí. Naopak byl přidán $^{78}\text{Se}^+$, později se ale ukázalo, že za zvolených podmínek není možné prvek detekovat.

3.4.1 Nastavení ICP-MS

Před zahájením měření vzorku bylo vždy provedeno kontrolní ladění ICP hmotnostního spektrometru s využitím standardního referenčního materiálu (SRM) NIST 612, aby bylo dosaženo minimální tvorby oxidů ($^{232}\text{Th}^+ / ^{248}\text{ThO} < 1\%$), dvakrát nabitých iontů ($^{70}\text{Ce}^{2+} / ^{140}\text{Ce}^+ < 5\%$) a poměr $^{232}\text{Th} / ^{238}\text{U}$ jako faktor minimalizace frakcionace dosahovat přibližně 1. Součástí ladícího procesu bylo také kontrolní měření s vybranými izotopy metody pro dosažení maximální odezvy.

3.4.2 Nastavení laseru pro analýzu

Parametry pro laserovou ablací byly voleny podle dřívějších zkušeností doc. Mgr. Michaely Vašinové Galiové, Ph.D. a zkušebním měřením vzorků první série. Vzorek byl odprašován laserovým svazkem v módu liniového skenu, který zajišťuje menší hloubku ablatované stopy. Při liniovém skenu dochází ke kontinuálnímu posunu vzorku společně s laserovou ablací. Parametry analýzy jsou v tabulce 2 spolu s parametry pro měření standardního referenčního materiálu NIST 610.

Tabulka 2: Parametry laseru pro měření vzorků a NISTu 610

Parametry	Vzorky srdce	NIST 610
Hustota zářivé energie [J/cm^2]	1,41	2
Rychlost posunu [$\mu\text{m}/\text{s}$]	435	10
Průměr svazku [μm]	35	110
Frekvence [Hz]	50	10
Ablační mód	Liniový sken	Liniový sken
Průtok ablačního plynu – He	0,5+0,3 l/min	

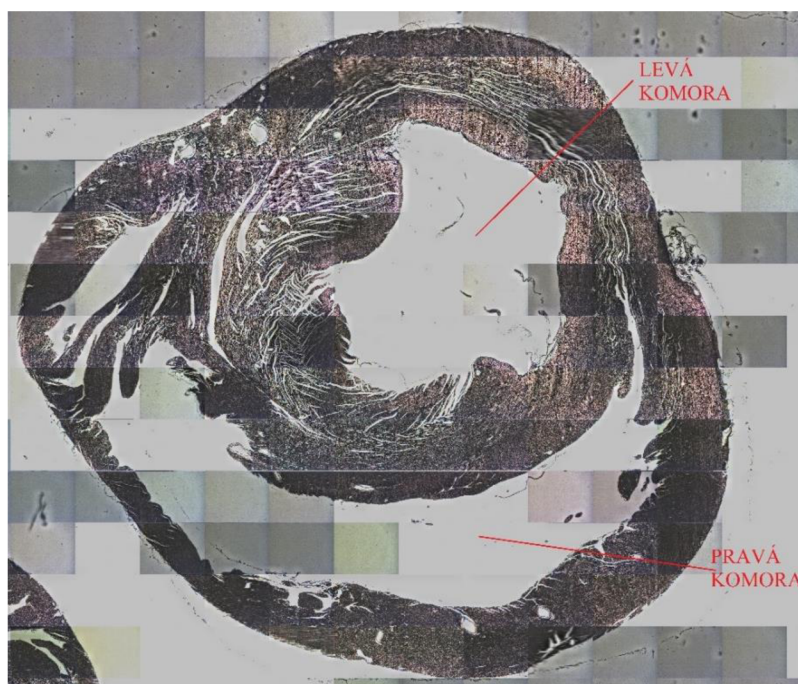
Vzhledem k tloušťce řezů a snaze o minimalizaci ablace podložního skla, a tím i minimalizaci výskytu interferencí pocházejících z podložního skla, byla hustota zářivé energie nastavena na nejnižší možnou hodnotu. Průměr svazku se volil jako kompromis mezi dostatečným prostorovým rozlišením a dobou analýzy jednoho vzorku. Rychlost posunu a frekvence byly vypočtené ze studie zabývající se zobrazováním s vysokým rozlišením a jednobuněčnou analýzou pomocí LA-ICP-MS [50].

3.4.3 Postup měření

Sklička se vzorky byla umístěna do držáku společně s SRM NIST 610 a NIST 612 (Obrázek 10) a držák byl poté vložen do ablační komory laseru. Pro každý vzorek byl vybrán jeden řez ze sklička. Řez srdce musel mít dostatečně viditelnou pravou i levou srdeční komoru (Obrázek 11). Následně byl vytvořen rastr linií liniovým svazkem kruhového průměru přes celý vybraný řez. Vzájemná vzdálenost linií byla 35 μm , aby linie naléhaly na sebe a nedocházelo ke ztrátě rozlišení v ose y. Délka linie a jejich celkový počet se lišil podle velikosti řezu.



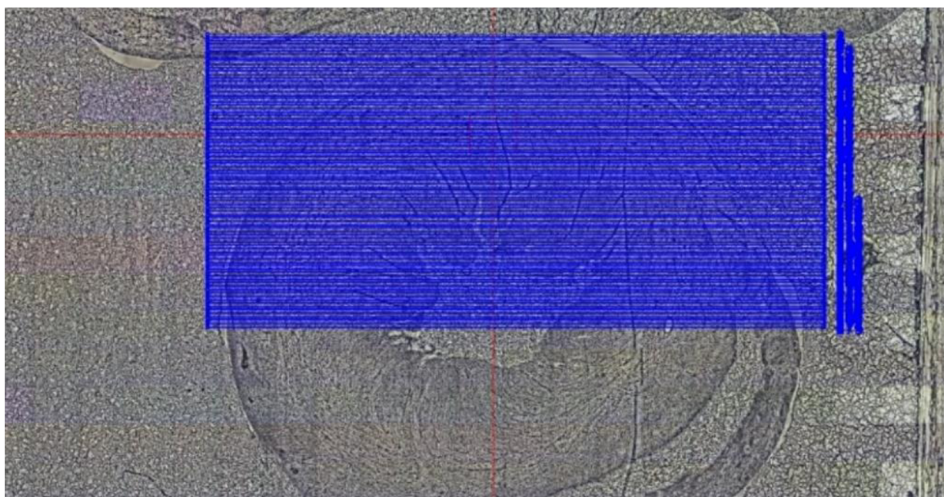
Obrázek 10: Držák laserové ablační komory se vzorky a standardními referenčními materiály



Obrázek 11: Sken povrchu vzorku pořízený kamerou laserového ablačního systému s vyznačenou pravou a levou komorou (vzorek V-16-S)

Původní vize byla analyzovat celý vzorek ve vysokém rozlišení, ale kvůli velkým rozměrům srdečních řezů, a tím i časové náročnosti, byla vybrána pouze $\frac{1}{4}$ vzorku. Experimentálně bylo zjištěno, že distribuce je v každém kvadrantu jiná a liší se i podle jednotlivých vzorků. Proto bylo nutné analyzovat celý vzorek na úkor rozlišení. Kvůli velkému

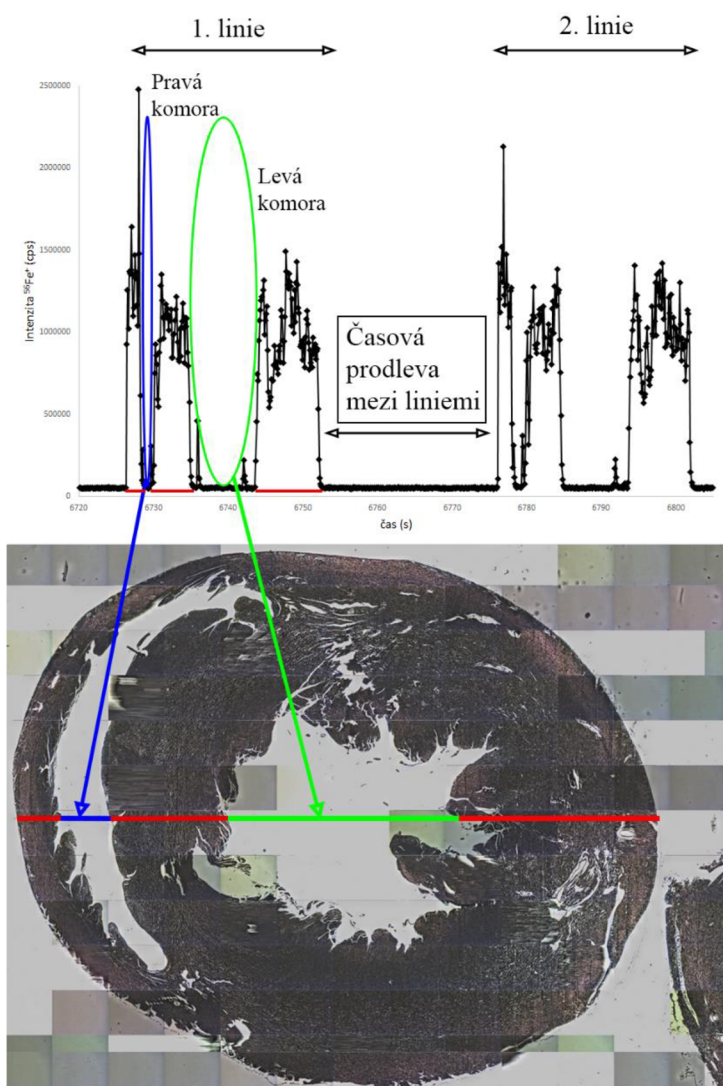
množství dat, které by při měření celého vzorku najednou bylo sbíráno, musela analýza proběhnout v několika segmentech (Obrázek 12). Společně s analýzou vzorku byl ablatován standardní referenční materiál NIST 610 pro kontrolu změny citlivosti v průběhu analýzy a možné korelace driftu přístroje.



Obrázek 12: Ukázka liniových skenů první části vzorku P3

3.4.4 Vyhodnocení signálu

Výsledkem měření je časově rozlišený signál představující závislost intenzity signálu na čase (Obrázek 13). Pro zpracování dat a vizualizaci distribuce prvků byl použit software HDIP (Teledyne CETAC Technologies, Spojené státy americké), který odečítá pozadí, separuje signál pro jednotlivé linie, vytváří výslednou matici dat a vykresluje distribuce izotopů prvků. Navíc umožňuje změnu rozsahu intenzit, změnu barevné škály a automatické dělení vybraných izotopů.



Obrázek 13: Závislost intenzity signálu $^{56}\text{Fe}^+$ na čase vzorku V-11-S a sken povrchu vzorku pořízená laserovým ablačním systémem a ablatovanou linií

V grafické závislosti intenzity signálu izotopu železa na čase (Obrázek 13) jsou zobrazeny 2 poslední linie první poloviny řezu. Linie prochází vzorkem přes srdeční svalovinu, která je značena červeně. Modře je vyznačena oblast pravé komory a zeleně levé komory, korespondující s poklesem intenzity. Po dokončení linie následuje časová prodleva mezi liniemi po dobu 20 s.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Analýza měkkých tkání pomocí metody LA-ICP-MS je náročná, chceme-li ablatovat pouze tkáň a zamezit odebrání i podložního skla. V této diplomové práci je to o to náročnější, že se jedná o velmi tenké řezy. Proto musela být stanovena vhodná metodika pro sledování distribuce vybraných prvků a zhodnocení jejich vhodnosti k analýze.

4.1 Stanovení metodiky, 2D imaginig a výběr prvků

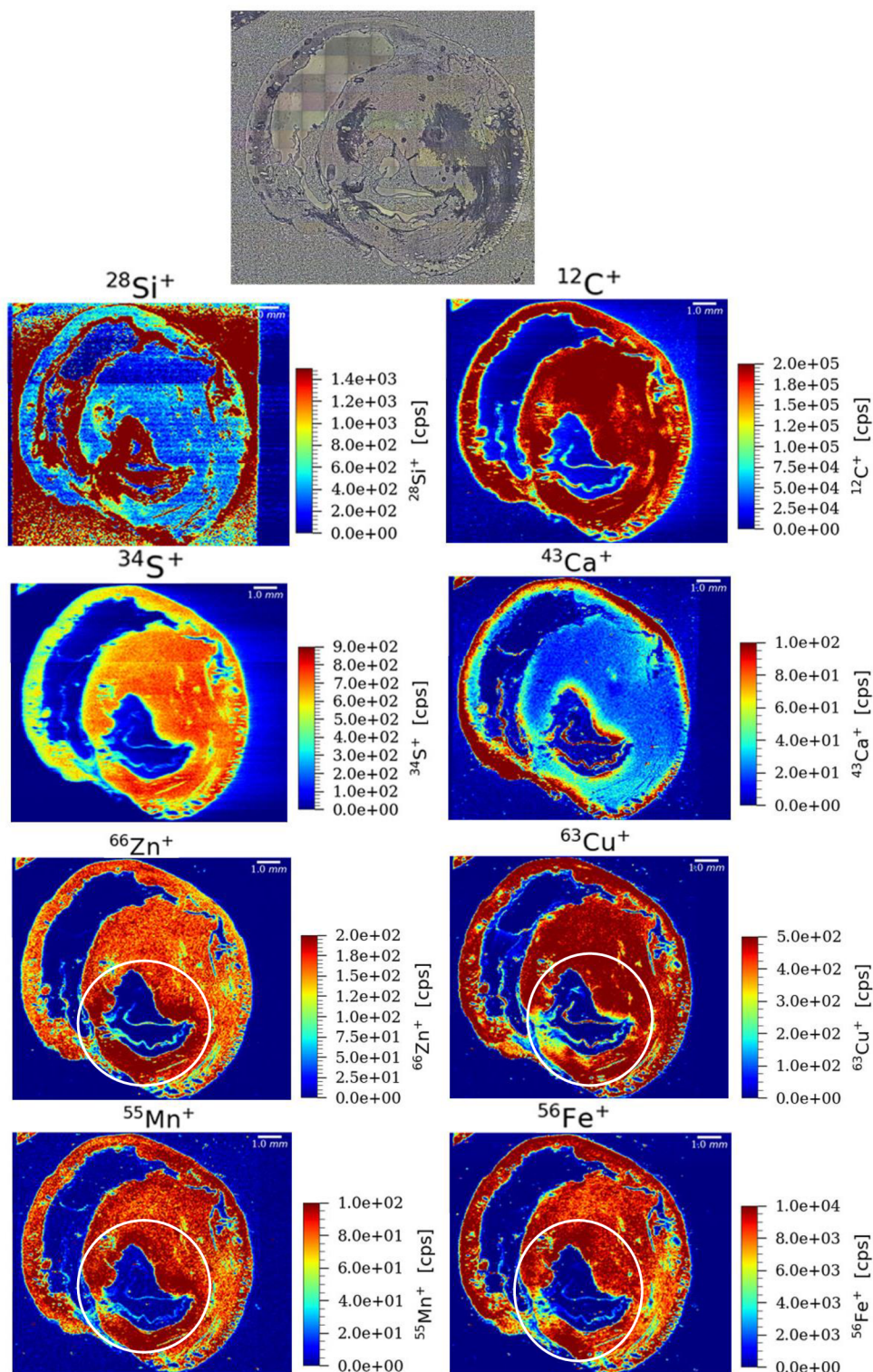
Jak již bylo zmíněno v experimentální části, na základě rešerše zabývající se vysokorozlišovacím zobrazením a jednobuněčnou analýzou byl proveden výběr prvků. Z hlediska distribuce prvků v tkáni myokardiální fibrózy ale žádná studie neexistuje, proto veškeré změřené hodnoty nejsou plně využitelné.

Na obrázku 14 jsou distribuční mapy prvků vzorku 21-S srdeční tkáně analyzované za účelem sledování prvků křemíku, uhlíku, síry, vápníku, zinku, mědi, železa a manganu. Křemík není typicky analyzovaným prvkem v biologických materiálech, byl analyzován jako kontrolní prvek pro sledování míry ablace skla laserovým svazkem. V okolí vzorku je vidět zvýšená intenzita až na $\approx 1,4 \cdot 10^3$ cps, která je asi sedmkrát vyšší než ve vzorku. Spolu se vzorkem se tedy ablatuje i podložní sklo, tudíž je měřen smíšený signál. Pro kontrolu je analyzován i uhlík, který je základním matričním prvkem organické tkáně a je měřen, aby bylo jasné, kde se nachází měkká tkáň a také k vizualizaci stavu tkáně vzhledem k její hustotě.

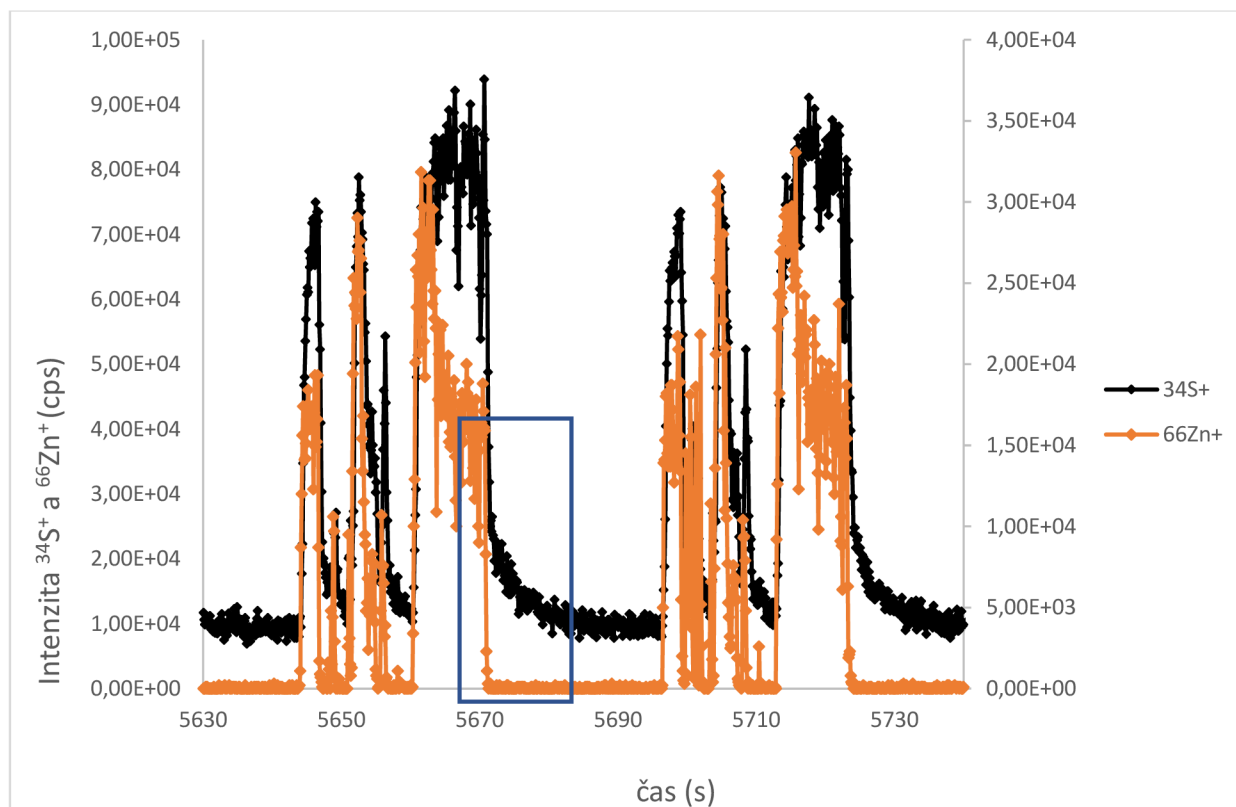
Dalším sledovaným prvkem je vápník, jeho distribuce je silně spjata s okrají vzorku. Nejedná se ovšem o artefakt měření, jelikož tloušťka oblasti se zesílenou intenzitou je v různých místech odlišná. Navíc dle názoru MUDr. Tibora Stračiny by měl být vápník vymytý v rámci přípravy vzorku a přítomen jen v ultrastopovém množství. To dokazuje fakt, že extrémně citlivá metoda ICP-MS, může detekovat zbytkové množství prvku v myokardu.

Při analýze biologických tkáních metodami, které se zabývají distribucí proteinů je měřena i síra. Není ale typickým prvkem, který je předmětem studia ICP-MS analýzy, protože měřený izotop $^{34}\text{S}^+$ je interferován částicí $^{17}\text{O}^{17}\text{O}^+$, kterou není možné pomocí kvadrupólového ICP-MS rozeznat a odstranit. Díky tomu, že ICP je provozováno za laboratorních podmínek projeví se hlavně na zvýšení hodnoty pozadí. Pokud je však kyslík vázán ve vzorku způsobuje komplikace. Jak již bylo zmíněno, síra je prvek přítomný v proteinech. Dá se tedy předpokládat jeho výskyt ve vzorku. Z obrázku 15 je navíc viditelná nedostatečná rychlost transportu částic z ablační cely do ICP, což je jednoznačně patrné z průběhu signálu na konci samotné ablační linie (zaznačené v obrázku 15 modře). Na distribuční mapě je tento jev patrný stínem, který je tvořen za vzorkem. Proto byla síra pro další interpretaci vyloučena.

Signály zbylých prvků jako je zinek, měď, mangan a železo dosahují poměrně vysokých hodnot signálů. Hlavně $^{56}\text{Fe}^+$, který je vázán na myoglobin a tvoří zásobárnu kyslíku. V těsné blízkosti okrajů levé komory je zřejmá zvýšená intenzita signálů (vyznačeno na obrázku 14).



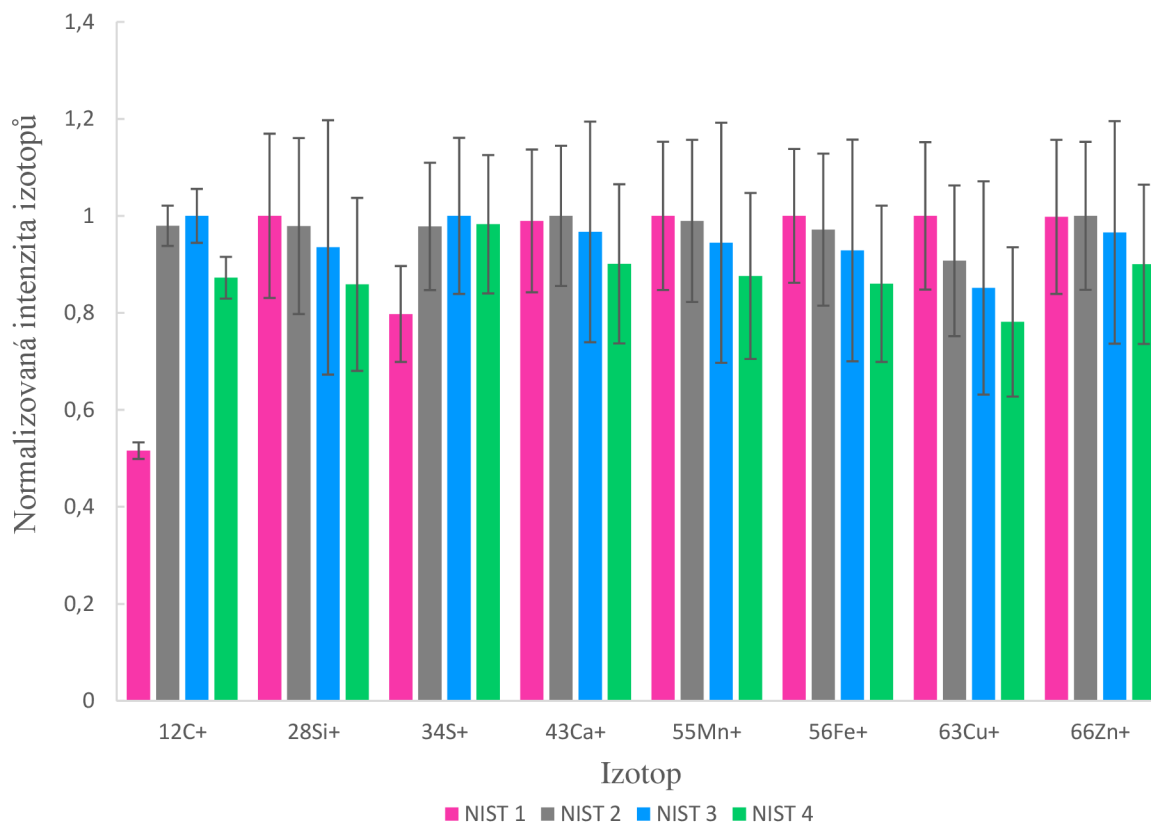
Obrázek 14: Distribuční mapy prvků vzorku 21-S ze série 2 bez obarvení a snímek pořízený kamerou laserového ablačního systému.



Obrázek 15: Závislost intenzity signálu síry na čase v porovnání s intenzitou signálu zinku

Další faktor, který musíme zvažovat je drift přístroje v průběhu měření vzorku. Ke zhodnocení efektu se využívá signál z měření SRM NIST 610, který byl ablatován na počátku měření a po ukončení každé části měření vzorku. Na obrázku 16 je graf z kontroly citlivosti vzorku 21-S, který se měřil na 3 části, to znamená, že NIST 610 se měřil celkem čtyři krát. Pokud budeme uvažovat směrodatnou odchylku, pak drift není nijak významný.

Vzhledem k vysokým intenzitám u železa, mědi, zinku a manganu bude pozornost dále věnována spíše těmto prvkům. Navíc lze na obrázku 14 v rámci srdce pozorovat rozdílnou intenzitu těchto prvků v určitých oblastech, to poukazuje na citlivost metody. Ostatní prvky byly pro další interpretace eliminovány.

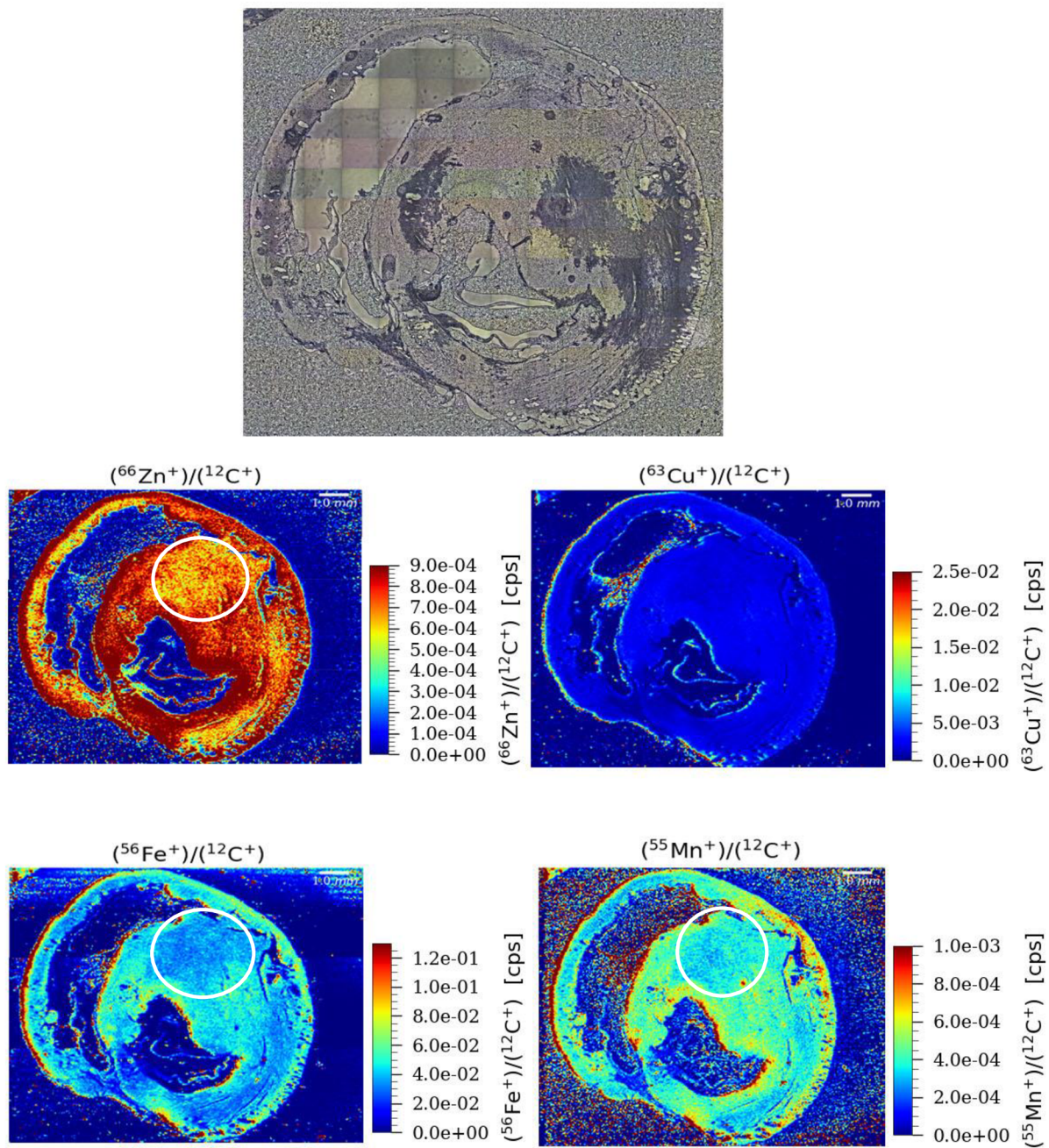


Obrázek 16: Kontrola citlivosti jednotlivých prvků v průběhu měření vzorku 21-S

4.2 Normalizace na uhlík

Distribuční mapy prvků byly generovány softwarem, který kromě prvku umožňuje i aplikaci výpočetních procesů jako je normalizace na uhlík. Na snímku vzorku z kamery laserového ablačního systému z obrázku 17 je patrné, že tloušťka tkáně se liší, a tím se liší i množství ablatovaného materiálu. Když je tkáň řidší, nastane pokles intenzity signálu, nikoliv však z důvodu poklesu obsahu daného prvku v daném místě, ale právě poklesem ablatovaného množství. Metoda LA-ICP-MS je ale natolik citlivá, že tento pokles dokáže zaznamenat. A proto je vhodné normalizovat jednotlivé distribuční mapy prvků distribucí matričního prvku, v případě měkkých tkání uhlíku.

Na distribučních mapách prvků je uprostřed myokardu viditelná oblast s nižší intenzitou (zaznačené na obrázku 17). Což koreluje s distribuční mapou uhlíku na obrázku 14 (zaznačené bílým kruhem), kde je ve stejné oblasti intenzita vyšší v porovnání s okolní tkání. Mapy prvků nenormalizované na uhlík na obrázku 13, ale tak jednoznačně tuto informaci neposkytují. Pro lepší přehled je proto lepší pracovat s distribučními mapami po normalizaci.

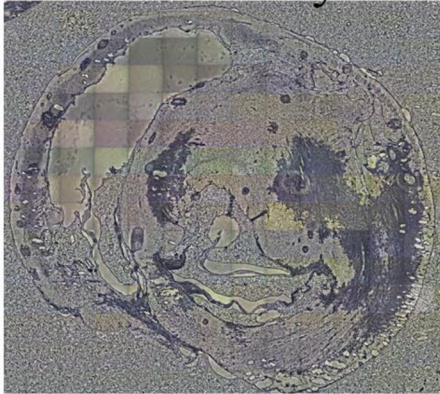


Obrázek 17: Snímek vzorku pořízený kamerou laserového ablačního systému a distribuční mapy vzorku 21-S bez obarvení po normalizaci uhlíkem

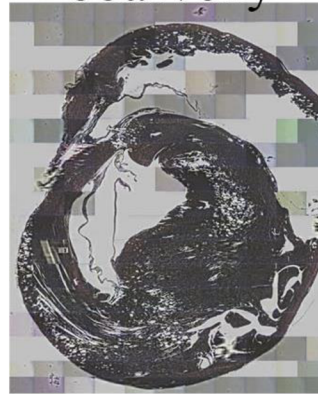
4.3 Porovnání distribuce v závislosti na zpracování vzorku

Ze série vzorků 2 byly k dispozici histologické řezy a řezy histologicky barvené. Proto bylo provedeno měření stejného vzorku 21-S v oboru variantách a bylo uskutečněno porovnání, které je patrné na obrázku 18. Podle snímků z laserové ablační komory je zřejmé, že levá a pravá komora mají velmi podobný tvar a je tedy jasné, že se jedná o blízké řezy.

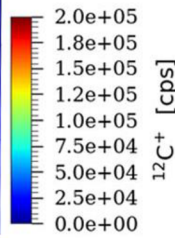
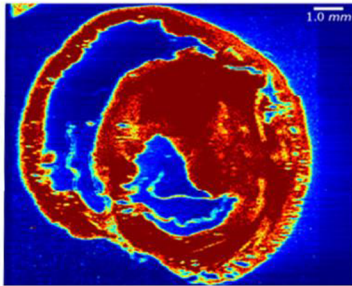
neobarvený



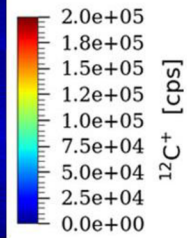
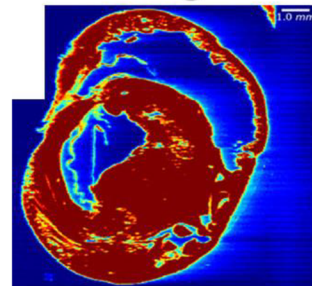
obarvený



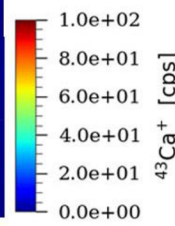
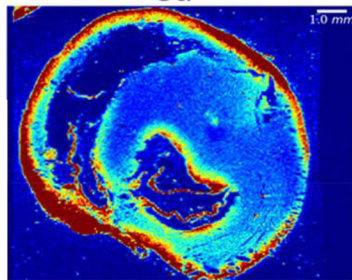
$^{12}\text{C}^+$



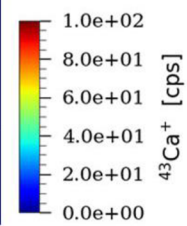
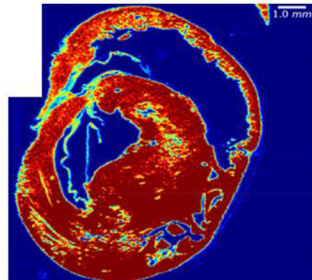
$^{12}\text{C}^+$



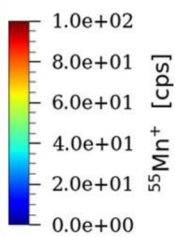
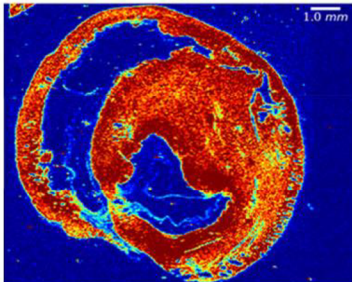
$^{43}\text{Ca}^+$



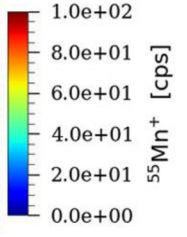
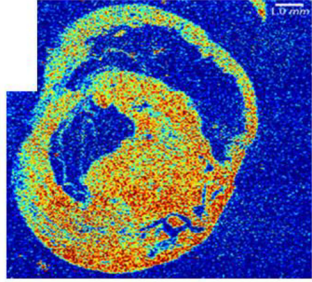
$^{43}\text{Ca}^+$



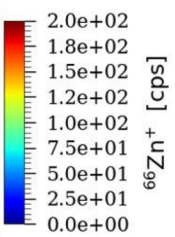
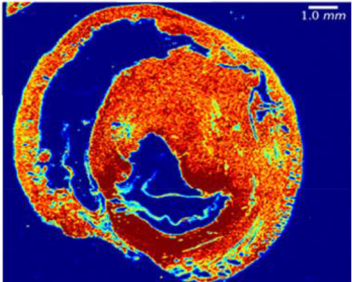
$^{55}\text{Mn}^+$



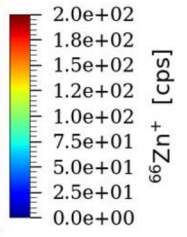
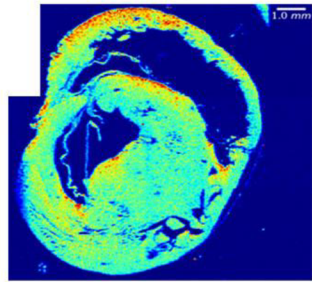
$^{55}\text{Mn}^+$

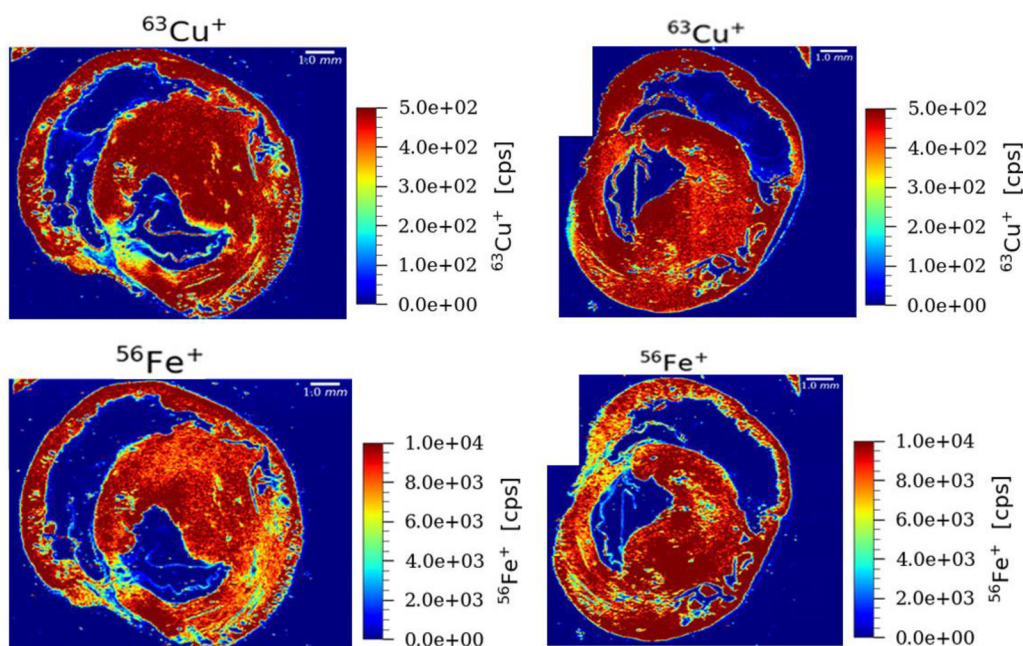


$^{66}\text{Zn}^+$



$^{66}\text{Zn}^+$





Obrázek 18: Porovnání distribuční mapy vzorku 21-S ze série 2 neobarveného (vlevo) a histologicky obarveného (vpravo) a snímky vzorku pořízené kamerou laserového ablačního systému.

Na první pohled je patrné, že obarvení mohlo mít vliv na distribuci a intenzitu některých prvků. Výsledky jsou vizualizované na obrázku 18, kde na levé straně jsou vzorky neobarvené a na pravé straně vzorky obarvené. Zatímco distribuce uhlíku si je v obou případech velmi podobná, distribuční mapa vápníku už je značně odlišná. Intenzita izotopu po ablaci vzorku histologicky obarveného vzrostla až 50krát. Navíc není kumulován pouze v okrajových částech, ale i uvnitř myokardu. Nabízejí se proto otázky, zda v použitém barvicím roztoku není vápník přítomen. Certifikát látky ovšem neudává informace o tom, že by měl být vápník součástí barvicího roztoku. Nicméně jsou součástí látky obsahující sodík, draslík, hliník a je tedy velká pravděpodobnost i přítomnosti vápníku.

V případě manganu došlo ke snížení intenzity, a to 3krát v porovnání s neobarveným vzorkem. Z tohoto důvodu byla provedena kontrola citlivosti na mangan prostřednictvím SRM NIST 610 v době měření obarvených a neobarvených vzorků. Na základě zjištěné téměř identické citlivosti měření pro oba vzorky byl důvod změny citlivosti přístroje vyloučen. Vzhledem k postupu barvení je možné, že došlo k opačnému efektu jako u vápníku tudíž vymytí prvku ze vzorku. Pokud ale nebude vysvětlený důvod poklesu intenzity nebude mangan pro další interpretace uvažován. Porovnáním map je vidět, že distribuce odlišná není, ale intenzita je příliš snížená a velmi vystupuje pozadí v okolí vzorku.

Pokles intenzity je znatelný i u zinku, který byl dvounásobný. Naopak intenzita mědi narostla až 36krát oproti neobarvené formě. Distribuční chování těchto 3 prvků je téměř shodné.

Rozdíly by se daly připsat tomu, že řezy nejsou identické. Naproti tomu u železa nedochází k odlišnostem ani v intenzitě ani v distribuci.

Běžně jsou vybarvené řezy k analýze využívány, ovšem žádná studie zabývající se vlivem barvení na distribuci prvků ve vzorku pomocí metody LA-ICP-MS nebyla pro porovnání nalezena. Proto prvky, jako je vápník a mangan, které díky obarvení vykazovaly signifikantní odlišnosti nebyly dále hodnoceny.

4.4 Porovnání fibrózou postihnutých tkání v závislosti na stupni fibrózy

Pro interpretaci myokardiální fibrózy potencionálně detekovatelnou pomocí LA-ICP-MS byly vybrány pouze zinek, měď a železo. Abychom mohli interpretaci provést, musíme si být jistí, ve které oblasti se fibróza přesně nachází.

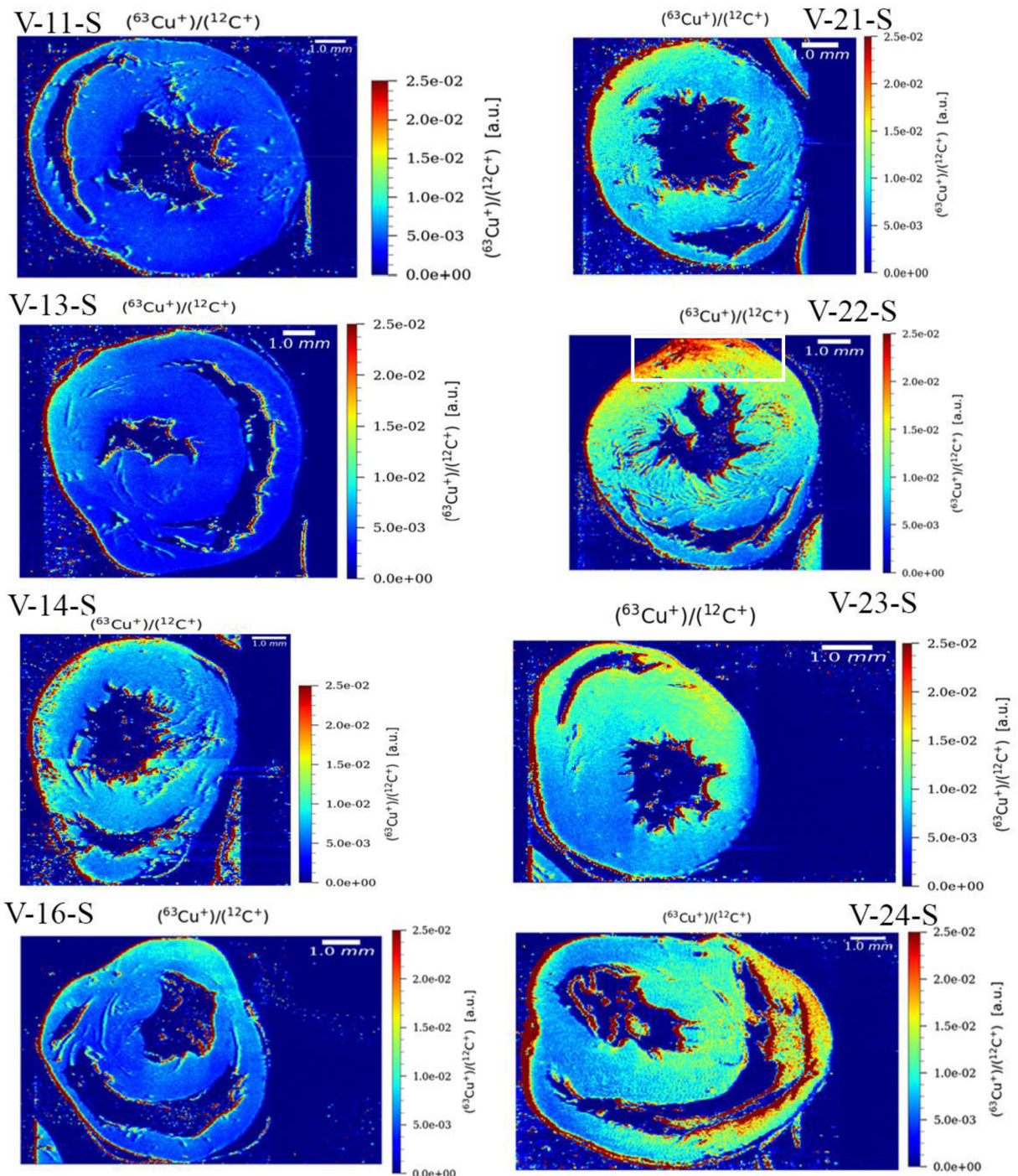
Kvantifikace srdeční fibrózy byla provedena lékařem I. Ústavu patologie LF MU a Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně, panem MUDr. Michalem Hendrychem. V řezech byla provedena manuální anotací mikroskopických snímků preparátu v prostředí softwaru QuPath a je vyjádřena jako poměr plochy postižené fibrózou k celkové ploše preparátu (Tabulka 3). Tyto snímky byly porovnány s výsledky distribuce prvků ve vzorcích. Řezy použité na kvantifikaci nejsou identické s řezy použitými k LA-ICP-MS analýze.

Tabulka 3: Kvantifikace myokardiální fibrózy ve vzorcích

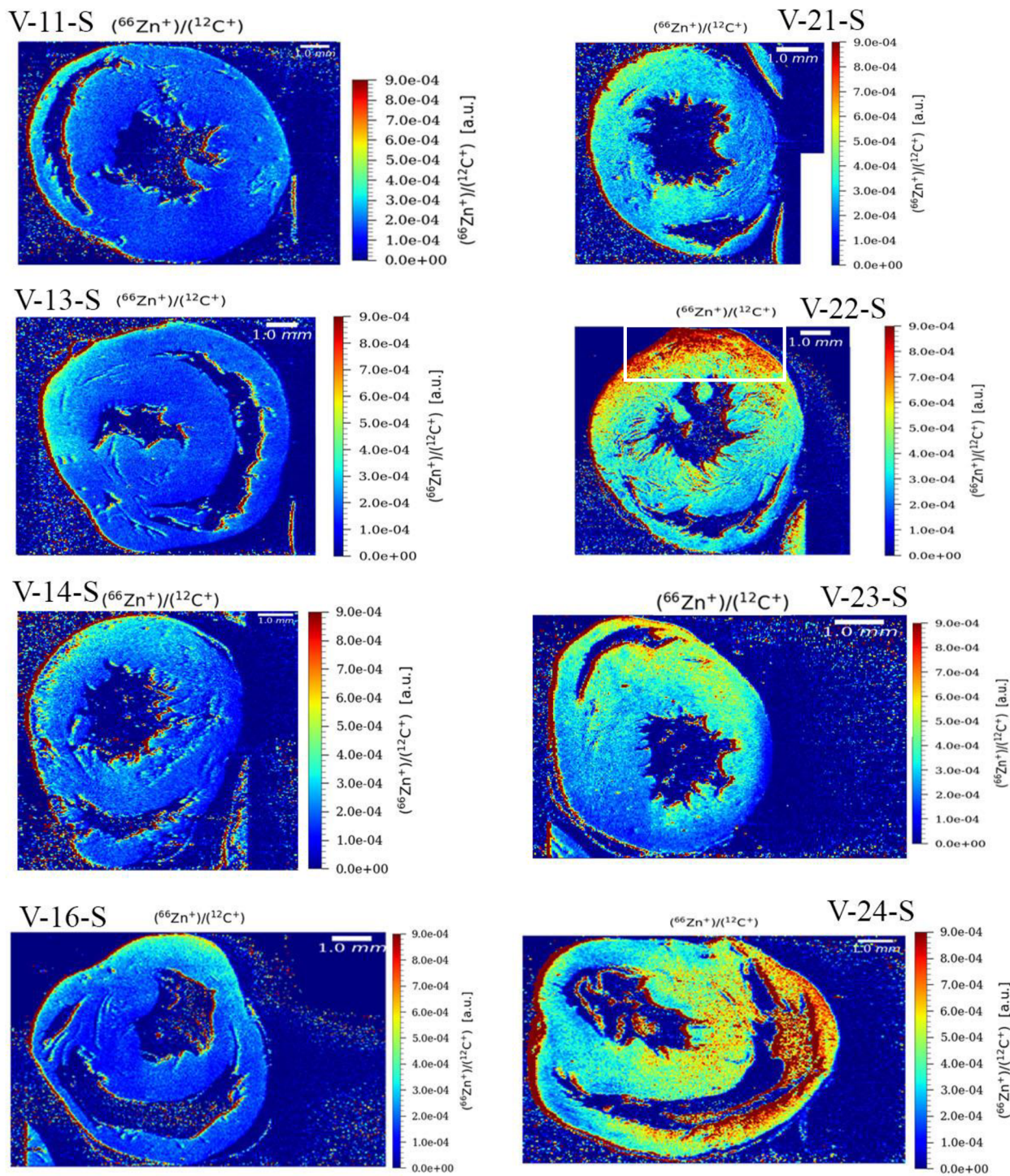
Vzorek	Kvantifikace [%]
V-21-S	0,708
V-22-S	1,891
V-23-S	1,853
V-24-S	1,206

V případě zinku a mědi jsou vidět rozdíly intenzit mezi vzorky s fibrózou a kontrolními vzorky. Porovnání distribuce zinku a mědi mezi kontrolou a fibrózou je na obrázcích 19 a 20, kde jsou intenzity normalizované na stejnou hodnotu. Mezi prvky nacházíme pozitivní korelaci, ovšem mezi distribucí prvků a výskytem fibrózy ve vzorku už nikoliv. Distribuce zinku a mědi může souviset s extracelulárními enzymy, které tvoří součást extracelulární matrix (ECM) a pomáhají organizovat a zpevňovat nebo degradovat kolagen. Takovými enzymy jsou například matrix metaloproteinázy, které obsahují ve své struktuře nejčastěji právě zinek. Mohlo by se jednat i o artefakt ovlivněním histologickým zbarvením ulpěním kapek při stékání barvicího roztoku na konci vzorku, což mohlo zapříčinit nahromadění prvků v okrajové zóně řezu. Natočení řezu na podložním skle ovšem neodpovídá místu, kde by k nahromadění barviva

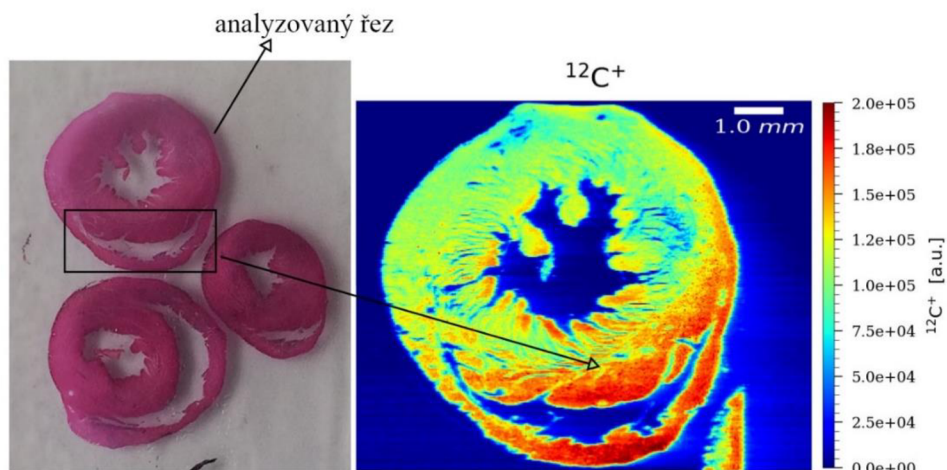
potencionálně docházelo. V případě, že by se ale potvrdilo ovlivnění barvením, nesmělo by se využívat barvených řezů. Další možností je, že zvýšení intenzity signálu zinku a mědi v určitých oblastech vzorku je závislá na tloušťce tkáně v dané oblasti. Na obrázku 21 je fotografie vzorku V-22-S, kde je vyznačena nejtmaší oblast. Podle distribuční mapy uhlíku daného řezu je patrné, že místo odpovídá nejvyšší tloušťce vzorku. Zinek a měď se naopak vyskytují v oblasti tenké části řezu (vyznačeno na obrázku 19 a 20).



Obrázek 19: Porovnání distribuce mědi ve vzorcích (vpravo) a v kontrole (vlevo)

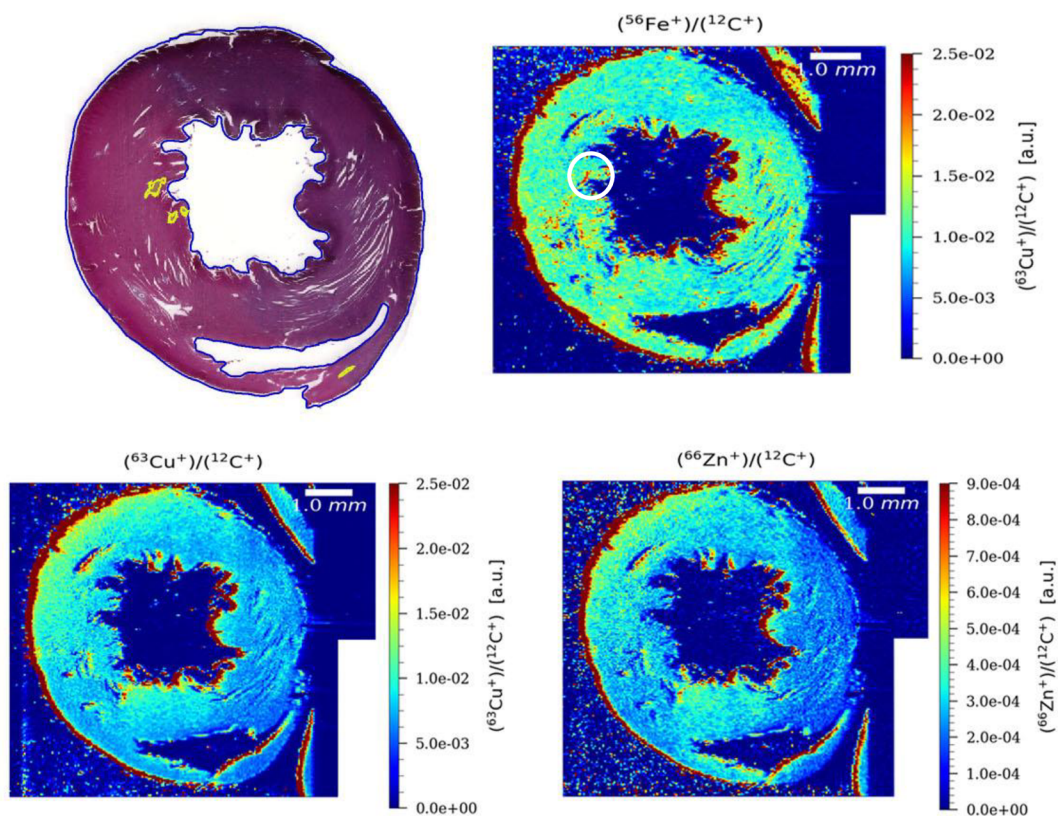


Obrázek 20: Porovnání distribuce zinku ve vzorcích (vpravo) a v kontrole (vlevo)



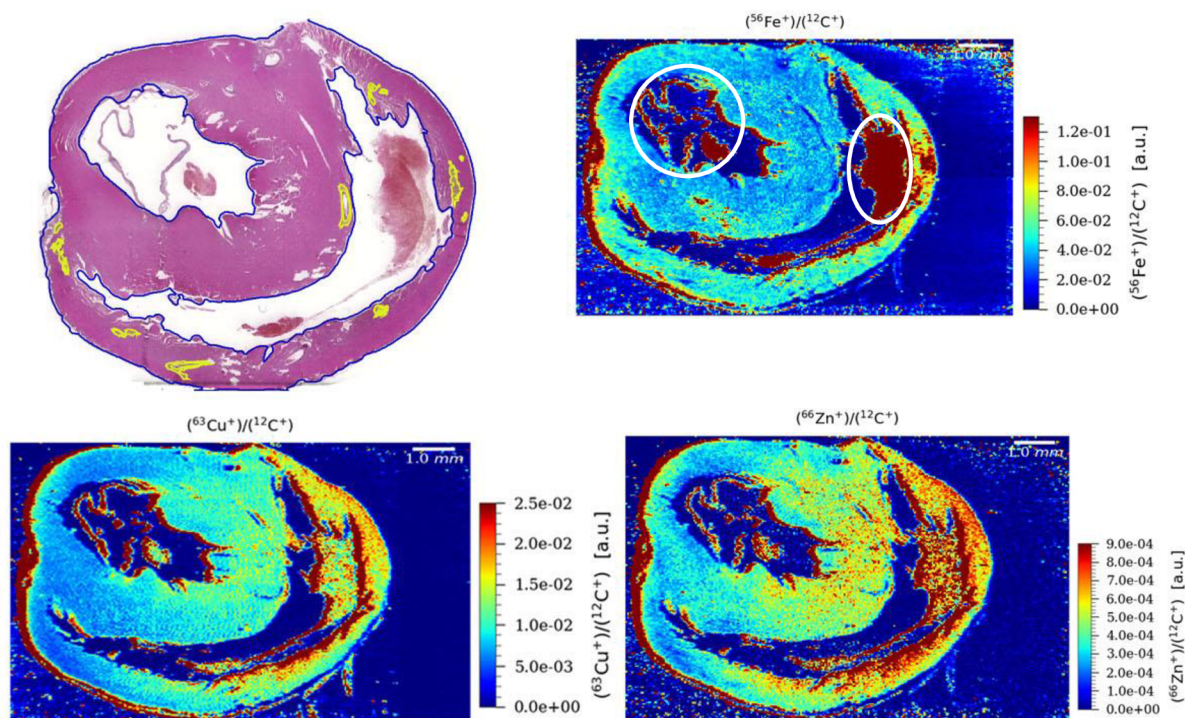
Obrázek 21: Fotografie vzorku V-22-S a distribuční mapa uhlíku pro tento vzorek s vyznačenou oblastí tlustší části řezu

Byla ale zjištěna korelace mezi místy výskytu fibrózy (na snímcích vyznačeno žlutě) a místy s významnou distribucí železa. Depozity železa vznikají díky prokrvenosti tkáně. Srdeční buňky při přetížení rychle zanikají a v postižené části srdce může docházet k mikrokrvácení. Erytrocyty, které se dostanou do tkáně, jsou fagocytovány makrofágy, které se ukládají v tkáni. Erytrocyty samotné tedy nevidíme, ale vidíme železo, které v nich bylo obsaženo.



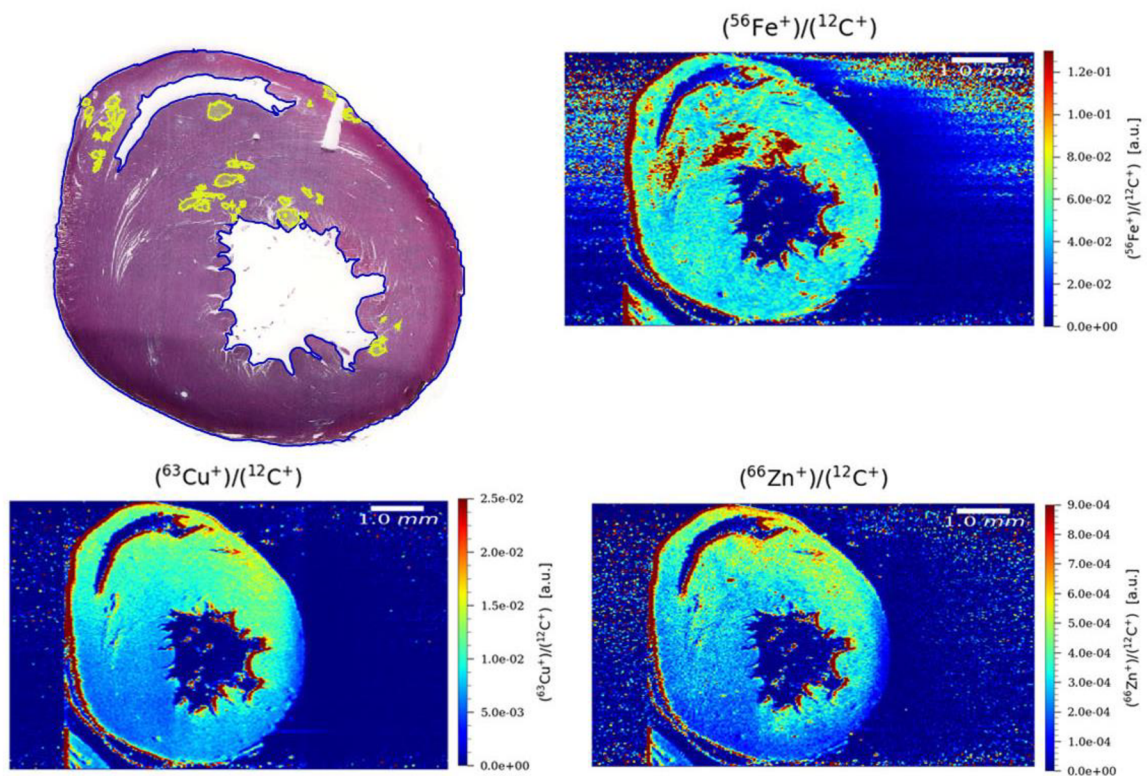
Obrázek 22: Snímek s vyznačenou fibrózou (žlutě) a distribuční mapy $^{56}\text{Fe}^+$, $^{63}\text{Cu}^+$, $^{66}\text{Zn}^+$ pro vzorek V-21-S

Na obrázku 22 jsou patrná mírná ložiska železa v oblasti myokardiální fibrózy (zaznačené bílým kruhem). Vzorek V-21-S byl ale zasažen fibrózou pouze z 0,708 %, proto ani intenzity prvků nejsou vysoké a ložiska železa nejsou rozsáhlá. A vzhledem k tomu, že se nejedná o identické řezy, je možné že řez použitý při analýze metodou LA-ICP-MS byl zasažen fibrózou ještě méně.

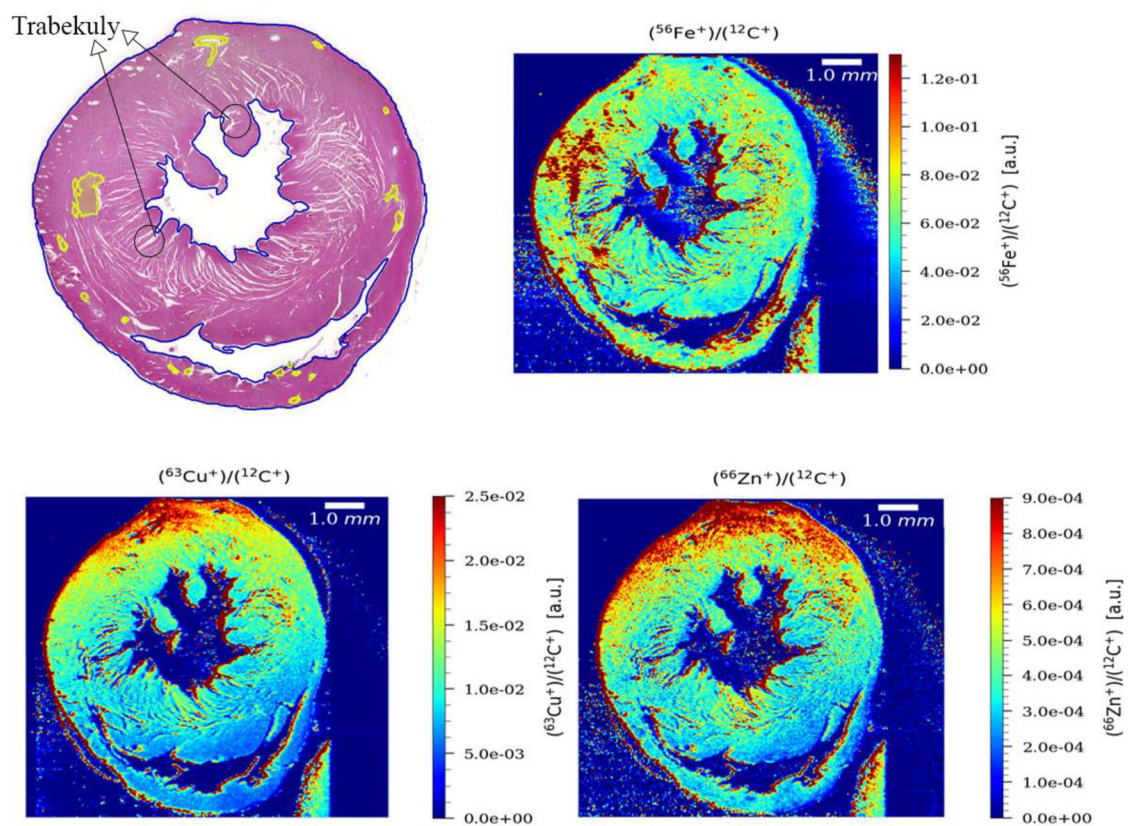


Obrázek 23: Snímek s vyznačenou fibrózou (žlutě) a distribuční mapy $^{66}\text{Fe}^+$, $^{63}\text{Cu}^+$, $^{66}\text{Zn}^+$ pro vzorek V-24-S

Vzorek V-24-S můžeme vidět na obrázku 23. V pravé a levé komoře se nacházejí nevymyté krevní sraženiny, které jsou patrné i na distribuční mapě železa (zaznačeno bílým kruhem). Rozsah fibrózy v tomto vzorku byl 1,206 %. Dle snímku, kde je fibróza zaznačena žlutě je patrné, že je zasažena hlavně pravá komora.



Obrázek 24: Snímek vzorku V-23-S s vyznačenou fibrózou (žlutě) a distribuční mapy $^{56}\text{Fe}^+$, $^{63}\text{Cu}^+$, $^{66}\text{Zn}^+$



Obrázek 25: Snímek vzorku V-22-S s vyznačenou fibrózou (žlutě) a distribuční mapy $^{56}\text{Fe}^+$, $^{63}\text{Cu}^+$, $^{66}\text{Zn}^+$

Na obrázcích 24 a 25 se nacházejí vzorky V-23-S a V-22.S, obě srdce byla značně zasažena fibrózou. Na vzorku V-22-S jsou dobře patrné trabekuly, které mohou vytvářet papilární sval, který je vázán k chlopním. Navíc zde byla fibróza nejvíce zastoupena a to v 1,891 %. Ve vzorku V-23-S byla kvantifikace fibrózy 1,853 %. Se vzrůstajícím výskytem fibrózy se zvyšuje i intenzita mědi a zinku. Distribuce železa zcela očividně koreluje s místy výskytu fibrózy. Místa s vyšším obsahem železa jsou na větší ploše než samotná myokardiální fibróza, protože dochází k „rozlití“ do ECM. Přesto, jsou podle map patrná místa s ložisky železa i v jiných místech, než jsou ložiska fibrózy. To poukazuje na poškození myokardu, což může být místo, kde se později myokardiální fibróza rozvine. Informace o tom, že srdce začíná být poškozené, je velmi důležitá z hlediska terapeutické metody, která má za úkol zpomalit vývoj fibrózy. Takto bychom díky distribuci železa mohli predikovat, že dochází k poškození srdeční svaloviny. To by mohlo pomoci při zdokonalování metod v medicínské oblasti a včasné diagnostice a terapeutickému zásahu. Lékařské studie se navíc věnují buď onemocnění spjatém s pravou komorou anebo s levou komorou. Komplexní postižení obou komor není často zkoumáno. Je možné, že pravá komora je kvůli své malé tloušťce k tlakovému přetížení a následné tvorbě fibrózy náchylnější. Konkrétní místo výskytu je důležité z hlediska srdečního selhání a rozvoje dalších zdravotních komplikací.

5. ZÁVĚR

V této diplomové práci byly analyzovány řezy srdcí potkana po vyvolání myokardiální fibrózy a kontrolních vzorků pomocí metody LA-ICP-MS. Nejdříve byly nastaveny parametry metody při zkušebním měření a byl vybrán vhodný postup a rozsah analýzy.

Byly měřeny vzorky histologicky obarvené pomocí Mayerova hematoxynu a eosinu Y a vzorky neobarvené. Díky možnosti měřit stejný vzorek v obarvené i neobarvené formě mohlo dojít k porovnání výsledků. Bylo zjištěno, že barvení může mít vliv na distribuci a intenzity některých prvků. Ke snížení intenzity signálu došlo především u manganu, naopak u vápníku došlo ke zvýšení intenzity.

Prvky vykazující rozdíl v distribuci a intenzitách ve fibrózu postižených srdcích oproti kontrole byly měď, zinek a železo. Proto byly distribuční mapy srovnány se snímky s kvantifikací myokardiální fibrózy v příslušných vzorcích. V případě zinku a mědi nedošlo k významné korelaci distribuce prvků s rozvojem fibrózy. Ve výsledcích jsou rozebrány možnosti, proč ke zvýšené intenzitě došlo. Důvody mohou být ovlivnění obarvením vzorku, výskyt enzymů, které jsou součástí ECM či tloušťka vzorku. Oproti tomu ložiska železa, nacházející se ve vzorcích, odpovídala místům poškozeným fibrózou. Navíc se železo nacházelo i v dalších oblastech, což by mohlo predikovat poškození myokardu a následný vznik fibrózy. To by mohlo v budoucnu pomoci k vývoji medicínských technik v lékařském prostředí a díky tomu ke včasné diagnostice poškození myokardu a nasazení účinné léčby.

V další práci by bylo vhodné zaměřit se přímo na místa s ložisky železa ve vyšším rozlišení a využití komplementární, avšak rychlejší techniky pro celoplošné mapování. Navíc by analýza měla, pokud možno, proběhnout přímo se vzorky, u kterých budeme předem znát kvantifikaci a přesné umístění fibrózy. Další limitací je použití obarvených vzorků. V budoucnu by se mělo optimalizovat barvení vzorku, vyzkoušet odlišnou techniku barvení, anebo použití přímo vzorku bez obarvení tak, aby nedocházelo k ovlivnění prvkové distribuce. Zajímavým rozšířením práce by bylo těsnější propojení tématu myokardiální fibrózy s problematikou životního prostředí. Nabízí se indukce fibrózy pomocí toxických látek.

V rámci pilotní studie byla vyvinuta metodika pro analýzu distribuce prvků v srdeční tkáni pomocí LA-ICP-MS. Po zdokonalení metody budeme schopni prvky lépe detekovat a potvrdit, zda lze pomocí distribuce prvků opravdu identifikovat poškození myokardu dříve, než se myokardiální fibróza rozvine. Taková možnost by byla významným přínosem, neboť aktuálně používané lékařské metody identifikují fibrózu teprve ve chvíli, kdy je již alespoň částečně rozvinutá.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

PCB	Polychlorované bifenyly
PM	Pevné částice
XRF	Rentgenová fluorescenční spektrometrie
ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
LA-ICP-MS	Laserová ablace ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem
ICP-OES	Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
LIP	Laserem indukované plazma
LIBS	Spektrometrie laserem buzeného plazmatu
PIXE	Protonem indukovaná rentgenová emise
EMPA	Elektronová mikrosonda
BSE	Zpětně odražené elektrony
PSP	Periodická soustava prvků
SIMS	Hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů
Q-MS	Kvadrupólový hmotnostní analyzátor
TOF-MS	Analyzátor doby letu
SF-MS	Analyzátor s dvojitou fokusací
HR-MS	Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
ECM	Extracelulární matrix
LK	Levá komora
EF	Ejekční frakce
CMR	Magnetická rezonance srdce
CON	Kontrolní skupina pokusných zvířat
FIB	Skupina pokusných zvířat s indukovanou myokardiální fibrózou
SE	Sekundární elektrony
LF MU	Lékařská fakulta Masarykovy univerzity
SRM	Standardní referenční materiál

7. BIBLIOGRAFIE

- [1] *Česká republika: zdravotní profil země 2017* [online]. Paris: OECD Publishing, 2017 [cit. 2022-05-05]. ISBN 9789264285125. Dostupné z: doi:10.1787/9789264285125-cs
- [2] PETŘKOVÁ, Jana a Miloš TÁBORSKÝ. (Towards better definition, quantification and treatment of fibrosis in heart failure. *Cor et Vasa* [online]. 2019, **61**(3), 341-347 [cit. 2022-01-21]. ISSN 00108650. Dostupné z: doi:10.33678/cor.2019.022
- [3] NAVRÁTIL, Leoš a Jozef ROSINA. *Medicínská biofyzika. 2., zcela přepracované a doplněné vydání.* Praha: Grada Publishing, 2019. ISBN 978-80-271-0209-9.
- [4] ŠIMEK, Vladimír a Richard PETRÁSEK. *Fyziologie živočichů a člověka.* 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 1996. ISBN 80-210-1453-9.
- [5] MACHOVÁ, Jitka. *Biologie člověka pro speciální pedagogii: celostátní vysokoškolská učebnice pro studující oboru učitelství pro školy pro mládež vyžadující zvláštní péči a studující oboru vychovatelství pro osoby vyžadující zvl. péči.* 1. vyd. Praha: SPN, 1993. Učebnice pro vysoké školy (Státní pedagogické nakladatelství). ISBN 80-04-23795-9.
- [6] ROMANOVSKÝ, Alexej. *Obecná biologie.* Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1985, 695 s. : il.
- [7] KÖLBEL, František, Ivan JAKUBEC, ed. *Praktická kardiologie.* Vyd. první. Praha: Univerzita Karlova - Nakladatelství Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-1962-0.
- [8] KAUTZNER, Josef a Vojtěch MELENOVSKÝ. *Srdeční selhání: aktuality pro klinickou praxi.* První vydání. Praha: Mladá fronta, 2015. Edice postgraduální medicíny. ISBN 978-80-204-3573-6.
- [9] STRAČINA, Tibor. *T1 Relaxační čas v detekci myokardiální fibrózy v potkaním modelu.* Brno: Masarykova univerzita, 2020.
- [10] NEARY, Roisin, Chris J. WATSON a John A. BAUGH. Epigenetics and the overhealing wound: the role of DNA methylation in fibrosis. *Fibrogenesis & Tissue Repair* [online].

- 2015, **8**(1) [cit. 2022-01-24]. ISSN 1755-1536. Dostupné z: doi:10.1186/s13069-015-0035-8
- [11] WANG, Can, Ruina CUI, Congying NIU et al. Low-dose PCB126 exposure disrupts cardiac metabolism and causes hypertrophy and fibrosis in mice. *Environmental Pollution* [online]. 2021, **290** [cit. 2021-12-04]. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2021.118079
- [12] DE OLIVEIRA-FONOFF, A. M., C. MADY, F. G. PESSOA et al. The role of air pollution in myocardial remodeling. *PLOS ONE* [online]. 2017, **12**(4) [cit. 2022-02-19]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0176084
- [13] WELDY, Chad S, Yonggang LIU, Yu-Chi CHANG, Ivan O MEDVEDEV, Julie R FOX, Timothy V LARSON, Wei-Ming CHIEN a Michael T CHIN. In utero and early life exposure to diesel exhaust air pollution increases adult susceptibility to heart failure in mice. *Particle and Fibre Toxicology* [online]. 2013, **10**(1) [cit. 2021-12-04]. ISSN 1743-8977. Dostupné z: doi:10.1186/1743-8977-10-59
- [14] QIN, Guohua, Jin XIA, Yingying ZHANG, Lianghong GUO, Rui CHEN a Nan SANG. Ambient fine particulate matter exposure induces reversible cardiac dysfunction and fibrosis in juvenile and older female mice. *Particle and Fibre Toxicology* [online]. 2018, **15**(1) [cit. 2021-12-04]. ISSN 1743-8977. Dostupné z: doi:10.1186/s12989-018-0264-2
- [15] NIEDERLE, Petr. *Echokardiografie*. Vyd. 1. Praha: Triton, 2002. ISBN 80-7254-281-8.
- [16] PLEVA, Martin a Petr OUŘEDNÍČEK. *MRI srdce: Praktické využití z pohledu kardiologa*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2012. ISBN 978-80-247-3931-1.
- [17] HAVLÍČEK, Vladimír a Jaroslav SPIŽEK, ed. *Natural Products Analysis* [online]. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc, 2014 [cit. 2021-07-07]. ISBN 9781118876015. Dostupné z: doi:10.1002/9781118876015
- [18] TSUJI, Kouichi. X-ray Fluorescence and Emission: X-ray Fluorescence Theory. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* [online]. Elsevier, 2018 [cit. 2022-05-04]. ISBN 9780124095472. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.14474-9

- [19] LLOVET, Xavier. Electron Probe Microanalysis. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* [online]. Elsevier, 2018 [cit. 2022-05-04]. ISBN 9780124095472. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.14369-0
- [20] FITTSCHEN, Ursula Elisabeth Adriane a Gerald FALKENBERG. Trends in environmental science using microscopic X-ray fluorescence. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2011, **66**(8), 567-580 [cit. 2022-05-04]. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2011.06.006
- [21] ZHANG, Xinxin, Aaron J. SPECHT, Marc G. WEISSKOPF, Jennifer WEUVE a Linda H. NIE. Quantification of manganese and mercury in toenail in vivo using portable X-ray fluorescence (XRF). *Biomarkers* [online]. 2018, **23**(2), 154-160 [cit. 2022-04-18]. ISSN 1354-750X. Dostupné z: doi:10.1080/1354750X.2017.1380082
- [22] RIHAWY, M.S., I.M. ISMAIL a D. HALLOUM. Setting up of in-vacuum PIXE system for direct elemental analysis of thick solid environmental samples. *Applied Radiation and Isotopes* [online]. 2016, **110**, 164-173 [cit. 2022-05-04]. ISSN 09698043. Dostupné z: doi:10.1016/j.apradiso.2016.01.020
- [23] MAENHAUT, W. a F. ADAMS. X-RAY FLUORESCENCE AND EMISSION | Particle-Induced X-Ray Emission. *Encyclopedia of Analytical Science* [online]. Elsevier, 2005, s. 448-458 [cit. 2022-05-04]. ISBN 9780123693976. Dostupné z: doi:10.1016/B0-12-369397-7/00677-4
- [24] OUDADESSE, H., G. GUIBERT, E. CHASSOT et al. Study by PIXE method of trace elements transferred from prostheses to soft tissues and organs. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* [online]. 2002, **190**(1-4), 445-448 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0168583X. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-583X(01)01251-4
- [25] TOMÁŠEK, Vladimír a Viktor KANICKÝ. *Zásady a možnosti analýzy anorganických látek: učební text projektu "Příprava kurzů a učebních textů v oboru vzorkování a chemické analýzy" : modul K01-2014*. 1. vyd. Český Těšín: 2 THETA, 2014. Analytical standards and equipment. ISBN isbn978-80-260-7238-6.

- [26] SCHIFFMAN, P., S. ROESKE a N. BOTTO. Electron Microprobe Analysis of Minerals. *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences* [online]. Elsevier, 2013 [cit. 2022-05-04]. ISBN 9780124095489. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409548-9.05439-7
- [27] KIM, Hee-Dong, Ki-Soo KIM, Sung-Chan KI a Yong-Soo CHOI. Electron Microprobe Analysis and Tissue Reaction around Titanium Alloy Spinal Implants. *Asian Spine Journal* [online]. 2007, **1**(1) [cit. 2022-04-18]. ISSN 1976-1902. Dostupné z: doi:10.4184/asj.2007.1.1.1
- [28] VERMA, Surendra P., Kailasa PANDARINATH, Fernando VELASCO-TAPIA a Rodolfo RODRÍGUEZ-RÍOS. Evaluation of the odd–even effect in limits of detection for electron microprobe analysis of natural minerals. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2009, **638**(2), 126-132 [cit. 2022-04-29]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2009.02.022
- [29] AREVALO, R. Laser Ablation ICP-MS and Laser Fluorination GS-MS. *Treatise on Geochemistry* [online]. Elsevier, 2014, s. 425-441 [cit. 2022-05-04]. ISBN 9780080983004. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-095975-7.01432-7
- [30] *Kurz ICP spektrometrie*. Brno: Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, 2009. ISBN isbn978-80-903732-8-0.
- [31] TODOLÍ, José-Luis. Atomic Mass Spectrometry—Inductively Coupled Plasma. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* [online]. Elsevier, 2018 [cit. 2022-05-04]. ISBN 9780124095472. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.14473-7
- [32] KOCH, Joachim a Detlef GÜNTHER. Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* [online]. Elsevier, 2017, s. 526-532 [cit. 2022-05-04]. ISBN 9780128032244. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-803224-4.00024-8
- [33] ZORBA, V., J.J. GONZALEZ, G.C.-Y. CHAN, X. MAO a R.E. RUSSO. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS), Applications of. *Encyclopedia of Spectroscopy and*

- Spectrometry* [online]. Elsevier, 2017, s. 571-578 [cit. 2022-05-04]. ISBN 9780128032244. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.12084-0
- [34] WANG, Qianqian, Wenting XIANGLI, Geer TENG, Xutai CUI a Kai WEI. A brief review of laser-induced breakdown spectroscopy for human and animal soft tissues: pathological diagnosis and physiological detection. *Applied Spectroscopy Reviews* [online]. 2021, **56**(3), 221-241 [cit. 2022-04-21]. ISSN 0570-4928. Dostupné z: doi:10.1080/05704928.2020.1791151
- [35] ZHANG, Ying, Tianlong ZHANG a Hua LI. Application of laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) in environmental monitoring. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2021, **181** [cit. 2022-05-04]. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2021.106218
- [36] FU, Xinglan, Guanglin LI a Daming DONG. Improving the Detection Sensitivity for Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: A Review. *Frontiers in Physics* [online]. 2020, **8** [cit. 2022-04-29]. ISSN 2296-424X. Dostupné z: doi:10.3389/fphy.2020.00068
- [37] *Inductively coupled plasma spectrometry and its applications*. 2. ed. Editor Steve J. HILL. Oxford: Blackwell, 2007. Analytical chemistry. ISBN isbn978-1-4051-3594-8.
- [38] MBANDZI, N, MDV NAKIN, GM SAIBU a AO OYEDEJI. Heavy metal profiles in limpets and algae on the Eastern Cape coast of South Africa. *African Journal of Marine Science* [online]. 2021, **43**(3), 293-308 [cit. 2022-04-21]. ISSN 1814-232X. Dostupné z: doi:10.2989/1814232X.2021.1948918
- [39] BECKER, Johanna Sabine. *Inorganic Mass Spectrometry* [online]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2007 [cit. 2021-07-07]. ISBN 9780470517222. Dostupné z: doi:10.1002/9780470517222
- [40] FERNÁNDEZ, Beatriz a Rosario PEREIRO. Atomic Mass Spectrometry/LA-ICP-MS. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* [online]. Elsevier, 2018 [cit. 2022-05-04]. ISBN 9780124095472. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.14095-8

- [41] BATEMAN, R. Sector Mass Spectrometers. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* [online]. Elsevier, 2017, s. 50-55 [cit. 2022-05-04]. ISBN 9780128032244. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-803224-4.00279-X
- [42] JAGIELSKA, Agata, Anna RUSZCZYŃSKA, Ewa BULSKA a Barbara WAGNER. The impact of sample preparation on the elemental composition of soft tissues assessed by laser ablation ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* [online]. 2020, **35**(7), 1340-1350 [cit. 2022-04-21]. ISSN 0267-9477. Dostupné z: doi:10.1039/D0JA00115E
- [43] SAJNÓG, Adam, Anetta HANÉ, Ryszard KOCZOROWSKI, Krzysztof MAKUCH a Danuta BARAKIEWICZ. Usefulness of laser ablation ICP-MS for analysis of metallic particles released to oral mucosa after insertion of dental implants. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* [online]. 2018, **46**, 46-54 [cit. 2022-04-21]. ISSN 0946672X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jtemb.2017.11.007
- [44] CHEN, Beibei, Judy Tsz-Shan LUM, Yingyan HUANG, Bin HU a Kelvin Sze-Yin LEUNG. Integration of sub-organ quantitative imaging LA-ICP-MS and fractionation reveals differences in translocation and transformation of CeO₂ and Ce³⁺ in mice. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2019, **1082**, 18-29 [cit. 2022-04-29]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2019.07.044
- [45] LIU, Jinhui, Jiasen CUI, Xing WEI et al. Investigation on selenium and mercury interactions and the distribution patterns in mice organs with LA-ICP-MS imaging. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2021, **1182** [cit. 2022-04-28]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2021.338941
- [46] LOHÖFER, Fabian, Laura HOFFMANN, Rebecca BUCHHOLZ et al. Molecular imaging of myocardial infarction with Gadofluorine P – A combined magnetic resonance and mass spectrometry imaging approach. *Heliyon* [online]. 2018, **4**(4) [cit. 2022-04-22]. ISSN 24058440. Dostupné z: doi:10.1016/j.heliyon.2018.e00606
- [47] LOCKYER, N.P. a J.C. VICKERMAN. SIMS, Time-of-Flight, and Surface Analysis. *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering* [online]. Elsevier, 2016 [cit. 2022-05-04]. ISBN 9780128035818. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-803581-8.03310-5

- [48] WALKER, Amy V. Secondary Ion Mass Spectrometry. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* [online]. Elsevier, 2017, s. 44-49 [cit. 2022-05-04]. ISBN 9780128032244. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-803224-4.00022-4
- [49] BERTAZZO, Sergio, Susannah C. R. MAIDMENT, Charalambos KALLEPITIS, Sarah FEARN, Molly M. STEVENS a Hai-nan XIE. Fibres and cellular structures preserved in 75-million-year-old dinosaur specimens. *Nature Communications* [online]. 2015, **6**(1) [cit. 2022-04-22]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms8352
- [50] VAN ACKER, Thibaut, Tessa BUCKLE, Stijn J.M. VAN MALDEREN, Danny M. VAN WILLIGEN, Vincent VAN UNEN, Fijs W.B. VAN LEEUWEN a Frank VANHAECKE. High-resolution imaging and single-cell analysis via laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry for the determination of membranous receptor expression levels in breast cancer cell lines using receptor-specific hybrid tracers. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2019, **1074**, 43-53 [cit. 2022-05-07]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2019.04.064