

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



**Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
v metabolomice a forenzní analýze**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Jméno autora:	RNDr. Tomáš Pluháček
Studijní program:	P1407 Chemie
Studijní obor:	Analytická chemie
Vedoucí disertační práce:	prof. Ing. Vladimír Havlíček, Dr.
Konzultant:	doc. Ing. David Milde, Ph.D.

Olomouc 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracoval samostatně na základě originálních vědeckých výsledků. Veškeré literární prameny a informace, které jsem při psaní práce využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce bude prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Vlastnoruční podpis

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat především svému školiteli, prof. Ing. Vladimíru Havlíčkovi, Dr., za odborné vedení, cenné rady, informace, ochotu a vstřícnost během celého mého postgraduálního studia.

Rovně bych rád poděkoval všem svým kolegům z Laboratoře charakterizace molekulární struktury, Mikrobiologického ústavu AV ČR, v. v. i. a katedry analytické chemie PřF UP za spolupráci a pomoc při realizaci experimentů.

Disertační práce vznikla za finanční podpory projektů GA ČR GAČR 16-20229S, GA MŠMT LO1509, IGA UP IGA_PrF_2016016 a IGA_PrF_2017020.

Souhrn

Disertační práce se zabývá studiem nových možností aplikací laserové ablace ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem v klinické a forenzní analýze. Teoretická část disertační práce je věnována hmotnostní spektrometrii s indukčně vázaným plazmatem se zaměřením na analýzu prvků v biologických vzorcích. Jsou zde popsány základní principy hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem, rozklady biologických tkání, princip komerčně dostupných technik hmotnostně spektrometrického zobrazování se zaměřením na laserovou ablaci ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem.

První část práce je zaměřena na multimodální zobrazování invazivní plicní aspergilózy (IPA) v kontrolních a infikovaných potkaních plicích. K zobrazování IPA infekce bylo využito PET/CT, LA-ICP-MSI, SEM-EDS, ale i standardního histologického vyšetření založeného na využití barvení dle Grocotta. Multimodální zobrazování umožnilo detailní studium masivně se rozšiřující infekce s následnou jednoznačnou lokalizací oblastí postižených IPA infekcí. LA-ICP-MS mapování distribuce stříbra a zlata specificky navázaného na mukopolysacharidové složky buněčné stěny *Aspergillus fumigatus* s velikostí laserového svazku 3-5 μm poskytlo spolehlivý obraz rozšiřující se IPA infekce v plicní tkáni infikované houbou *Aspergillus fumigatus*. Masivní rozšíření IPA infekce bylo dále potvrzeno SEM-EDS jenž vzhledem ke svému submikrometrickému rozlišení umožnil získat morfologické detaily rozšíření hyf *Aspergillus fumigatus* napříč celou infikovanou plicní tkání.

Druhá část práce se zabývá vývojem a následnou aplikací prostorových značek pro správný a přesný překryv molekulárních/prvkových map pro účely multimodálního a 3D zobrazování biologických tkání. Prostorové značky obsahující Rhodamin B, iontové stříbro a nanočástice zlata připravené v roztoku pHPMA polymeru se osvědčily pro vzájemné uspořádání molekulárních/prvkových map získaných prostřednictvím pětice doplňujících se zobrazovacích technik, a to MALDI-MSI, DESI-MSI, LA-ICP-MSI optické a fluorescenční mikroskopie.

Třetí část se věnuje detailní analýze povýstřelových zplodin ulpělých na rukou střelce po použití střelné zbraně s následnou přímou identifikací osoby. LA-ICP-MS mapování Cu, Zn, Sb, Ba, Hg a Pb na povrchu latentních otisků poskytuje nejen obraz distribuce částic povýstřelových zplodin na povrchu otisku prstu, ale i možnost jejich klasifikace do příslušných tříd na základě prvkového profilu. Mimo to LA-ICP-MS zobrazování umožňuje i spolehlivou

a přesnou rekonstrukci otisku prstu střelce, který tak může být přímo identifikován na základě vizuálního porovnání shody rozmístění papilárních linií a rozmanitých daktyloskopických markantů na 2D mapách distribuce Cu, Zn, Sb, Ba, Hg, Pb a kontrolním (referenčním) otisku.

Poslední část disertační práce je zaměřena na studium vlivu obsahu celkového železa a mědi v myokardu na funkci srdečních mitochondrií během chronického srdečního selhání (ChSS). V rámci studie byla vyvinuta a validována ICP-MS metoda pro stanovení železa a mědi v biologických tkáních, která byla dále použita ke kvantitativnímu stanovení obou kovů ve vzorcích biopsií srdečních svalů odebraných pacientům s chronickým srdečním selháním během transplantace srdce prováděné v Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze. Kvantitativní ICP-MS stanovení odhalilo, že v případě pacientů s pokročilým ChSS došlo k výraznému snížení (~22 %) obsahu železa a mědi, které je spojeno se současným snížením aktivit enzymů citrátového cyklu, mitochondriální respirací a snížením exprese proteinů dýchacího řetězce. Kromě toho přítomnost myokardiálního deficitu železa přispívá k prohloubení mitochondriální dysfunkce spojené se sníženou substrátovou flexibilitou a odolností vůči oxidativnímu poškození reaktivními formami kyslíku.

Summary

This dissertation thesis is focused on new applications of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry in clinical and forensic analyses. The theoretical part of the thesis is devoted to the theoretical aspects of inductively coupled plasma mass spectrometry with focus to elemental analysis in various biological samples. In the next part, the principles of commonly used MSI techniques, especially laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry are discussed.

The first part reports on multimodal imaging of an invasive pulmonary aspergillosis in control and infected rat lung tissue. PET/CT, LA-ICP-MSI, SEM-EDS and the standard histological evaluation employing Grocott's methenamine silver staining were used for the multimodal imaging of IPA infection. Multimodal imaging described the fungal burden in rats with a subsequent localization of the regions affected by the IPA infection. LA-ICP-MS imaging of silver and gold with 3-5 μm laser foci combined with GMS staining provided a reliable image of fungal hyphae deposition in *Aspergillus* infected lung tissue. SEM-EDS with its submicrometric lateral resolution confirmed the presence of the massive aspergillosis and provided morphological details on hyphae spreading within the *Aspergillus* infected lung tissue.

The second part of the thesis was focused on the development and application of fiducial markers for accurate alignment of individual molecular or elemental images in multimodal and 3D imaging of biological samples. Fiducial markers consisting of Rhodamine B, ionic silver and gold nanoparticles in a pHPMA solution were suitable for a correct fusion of molecular/elemental images obtained by five complementary imaging techniques, namely MALDI-MSI, DESI-MSI, LA-ICP-MSI, optical and fluorescence microscopy.

The consecutive part of the thesis was aimed at analysing gunshot residues adhered onto the shooter's hands after firing followed by a subsequent identification of the shooter based on the dactyloscopic principle. LA-ICP-MS imaging of Cu, Zn, Sb, Ba, Hg and Pb on the latent fingerprints provided not only a detailed image of the gunshot residues distribution, but also the possibility of the gunshot residue classification based on a specific elemental profile. Moreover, the LA-ICP-MS imaging offered a reliable and correct reconstruction of shooter fingerprint, which could be directly identified based on the visual comparison of the consistency in the distribution of papillary lines and various dactyloscopic markers on the 2D images of Cu, Zn, Sb, Ba, Hg, Pb and the control (reference) fingerprint.

The last part of the dissertation thesis studied the relationship between the myocardial iron content and mitochondrial function in human heart failure. The ICP-MS method for the determination of iron and copper in biological samples was developed and validated. The validated ICP-MS method was used for the determination of both metals in samples of failing LV myocardium that were obtained from patients undergoing transplantation at the Institute for Clinical and Experimental Medicine in Prague. The ICP-MS analysis revealed that myocardial iron and copper contents were systematically diminished (~22 %) in patients with heart failure. Moreover, decreased myocardial iron content was associated with a mitochondrial dysfunction, particularly with a reduced activity of citric acid cycle enzymes, reduced mitochondrial oxygen respiration, and reduced expression of mitochondrial respiratory chain enzymes. In addition, the presence of myocardial iron deficit contributed to worsening the mitochondrial dysfunction by altering substrate metabolism (i.e. by reducing substrate flexibility) and handling of reactive oxygen species.

Obsah

1. Úvod	1
2. Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem	3
2.1 Princip a instrumentace ICP-MS	3
2.2 Rozklad biologických vzorků	10
3. Zobrazovací hmotnostní spektrometrie	10
3.1 LA-ICP-MS	14
3.1.1 Princip a instrumentace LA-ICP-MS	15
3.1.2 Příprava vzorků tkáni pro LA-ICP-MS zobrazování	17
3.1.3 Režimy laserové ablace	18
3.1.4 Kvantitativní analýza a postupy kalibrace	19
4. Cíle disertační práce	23
5. Multimodální zobrazování invazivní plicní aspergilózy	24
5.1 <i>Aspergillus fumigatus</i>	24
5.2 Invazivní plicní aspergilóza	27
5.3 Experimentální část	29
5.3.1 Použité chemikálie a materiál	29
5.3.2 Instrumentace	30
5.3.3 Kultivace houby <i>Aspergillus fumigatus</i> a IPA infekční model	31
5.3.4 Příprava vzorků a histologické barvení	32
5.3.5 Příprava kalibračních standardů s přizpůsobenou maticí	33
5.4 Výsledky a diskuze	35
5.4.1 Monitorování invazivní plicní aspergilózy v potkaních plicích	35
5.4.2 Vliv optimalizace průtoku helia kolizní celou na LOD, LOQ a SNR	37
5.4.3 LA-ICP-MS zobrazování železa v plicní tkáni	39
5.4.4 Mapování stříbra a zlata jako specifických markerů IPA infekce v plicní tkáni	43
5.5 Závěr	48
6. Prostorové značky	49
6.1 Multimodální zobrazování a prostorové značky	49
6.2 Experimentální část	51
6.2.1 Použité chemikálie a materiál	51
6.2.2 Instrumentace	51
6.2.3 Analyzované vzorky, složení prostorových značek a jejich aplikace	52
6.3 Výsledky a diskuze	53
6.3.1 Prostorové značky, multimodální a 3D zobrazování myší ledviny	53

6.4 Závěr.....	56
7. LA-ICP-MSI ve forenzní analýze – analýza povýstřelových zplodin přímo na latentních otiscích prstu.....	57
7.1 Otisk prstu a kriminalistická daktyloskopie	57
7.2 Povýstřelové zplodiny	59
7.3 Experimentální část	60
7.3.1 Použité chemikálie, materiál, pistole a munice.....	60
7.3.2 Instrumentace.....	61
7.3.3 Střelba a odběr otisků prstu	62
7.3.4 Zviditelnění otisku prstu	62
7.3.5 Analýza povýstřelových zplodin	63
7.3.6 Statistická analýza.....	63
7.4 Výsledky a diskuze	64
7.4.1 Roztoková analýza povýstřelových zplodin	64
7.4.2 LA-ICP-MS zobrazování povýstřelových zplodin	68
7.5 Závěr.....	76
8. Studium vztahu mezi obsahem železa a mědi v myokardu a funkcí srdečních mitochondrií v kontextu srdečního selhání	77
8.1 Chronické srdeční selhání.....	77
8.2 Experimentální část	78
8.2.1 Použité chemikálie a materiál	78
8.2.2 Instrumentace.....	78
8.2.3 Analyzované vzorky srdeční tkáně	79
8.2.4 Stanovení železa a mědi.....	79
8.2.5 Statistická analýza.....	80
8.3 Výsledky a diskuse	80
8.3.1 Validace ICP-MS metody	80
8.3.2 Obsah železa a mědi v srdeční svalové tkáni.....	82
8.4 Závěr.....	85
9. Literatura	86
10. Seznam zkratk.....	93
11. Přílohy	96

1. Úvod

Spojení laserové ablace (LA) s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) patří mezi nejrozšířenější mikroanalytické techniky zaměřené na multielementární analýzu kovů, polokovů a nekovů obsažených v tenkých řezech různých biologických tkání. Pro komplexní studium různých biologických vzorků umožňuje technika LA-ICP-MS provedení povrchové mikroanalýzy, hloubkového profilování anebo 2D zobrazování distribuce prvků na povrchu tenkých řezů. Především 2D zobrazování esenciálních (Fe, Zn, Cu, Mn, Mo, Ca, Mg, K, aj.) ale i toxických kovů (Cd, As, Cr, Pb, Tl, Hg, U, Th, aj.) pomocí LA-ICP-MS přispívá nejen k objasnění funkce jednotlivých životně důležitých biologických procesů, ale zároveň umožňuje studium biologické dostupnosti a bioakumulace prvků pro hodnocení ekologických a toxikologických rizik u lidí, zvířat a rostlin.

Disertační práce se zabývá zejména spojením laserové ablace s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (LA-ICP-MS) pro účely hmotnostně spektrometrického zobrazování kovů a polokovů v různých biologických a forenzních vzorcích. Disertační práce je rozdělena do čtyř samostatných částí. První část je zaměřena na multimodální zobrazování invazivní plicní aspergilózy s následnou jednoznačnou lokalizací oblastí postižených IPA infekcí v potkaních plicích pocházejících ze zvířecího modelu experimentální IPA infekce. K zobrazování IPA infekce bylo využito PET/CT, LA-ICP-MSI, SEM-EDS, ale i standardního histologického vyšetření založeného na využití barvení dle Grocotta. Druhá část se zabývá vývojem a aplikací prostorových značek pro přesný a správný překryv multimodálně nasbíraných molekulárních/prvkových map získaných technikami hmotnostně spektrometrického zobrazování, a to laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice (MALDI-MSI), desorpčním elektrosprejovou ionizací (DESI-MSI), LA-ICP-MSI s optickými snímky z histologického barvení a fluorescenční mikroskopie pro účely multimodálního a 3D zobrazování biologických tkání. Ve třetí části práce je prezentováno LA-ICP-MS zobrazování Cu, Zn, Sb, Ba, Hg a Pb na povrchu latentních otisků prstů pro účely detekce a identifikace jednotlivých typů povýstřelových zplodin s následnou přímou identifikací střelce na základě vizuálního porovnání charakteristicky rozmístěných papilárních linií a rozmanitých daktyloskopických markantů nacházejících se na 2D mapách

plošné distribuce Cu, Zn, Sb, Ba, Hg a Pb s referenčním otiskem. Poslední část disertační práce je zaměřena na studium vlivu celkového obsahu železa a mědi v myokardu na funkci srdečních mitochondrií a aktivity mitochondriálních enzymů při chronickém srdečním selhání. V rámci studie byla vyvinuta a validována ICP-MS metoda pro stanovení železa a mědi v biologických tkáních. Následné kvantitativní ICP-MS stanovení obsahu železa a mědi bylo provedeno přímo ve vzorcích biopsií srdečního svalu odebraných pacientům s chronickým srdečním selháním během transplantace srdce prováděné v Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM) v Praze.

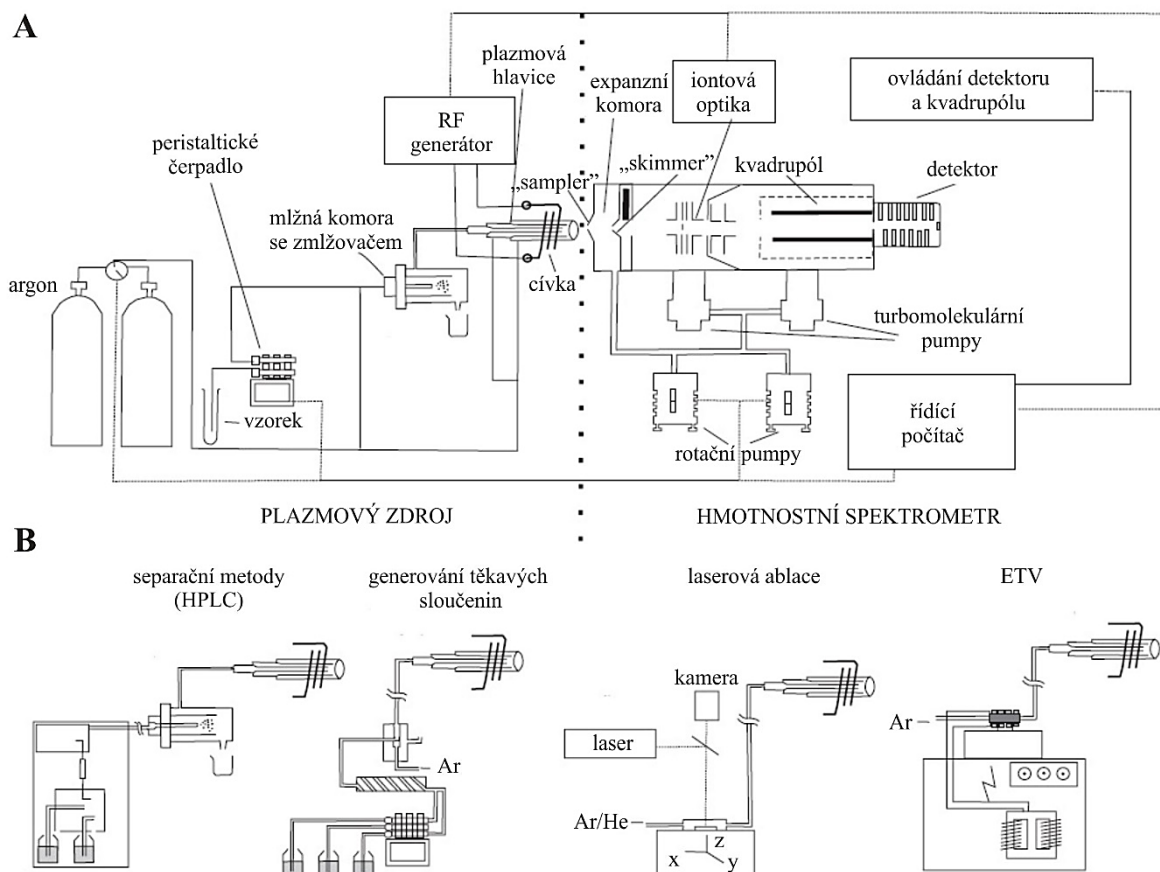
2. Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem je nejrychleji se rozvíjející technika multielementární analýzy kovů, polokovů a některých nekovů poskytující nízké meze detekce na koncentrační úrovni pg.l^{-1} až $\mu\text{g.l}^{-1}$. ICP-MS mimo jiné nabízí široký lineární dynamický rozsah až 10 řádů, informaci o izotopovém složení, vysokou selektivitu, ale především možnost analýzy plyných, kapalných a pevných vzorků¹⁻⁴. První komerční ICP-MS spektrometr s kvadrupólovým analyzátozem byl uveden na trh v roce 1983 (cit. ⁴) a od té doby se tato technika stala široce využívanou pro multielementárního stanovení stopových až ultrastopových koncentrací prvků v oblastech životního prostředí⁵⁻⁷, průmyslu (potravinářský, farmaceutický, polovodičový, jaderný atd.)^{6,8}, biologického a medicínského výzkumu⁸⁻¹⁰, ale také geologie či archeologie. Dalšími speciálními aplikacemi ICP-MS je hmotnostně spektrometrické zobrazování ve spojení s laserovou ablací^{1,11-13}, studium izotopových poměrů^{9,14}, studium velikosti a distribuce nanočástic¹⁵⁻¹⁸ („*single particle mode*“, FFF-ICP-MS), generování těkavých sloučenin a speciální prvková analýza¹⁹⁻²¹, kde ICP-MS ve spojení se separačními metodami (HPLC, GC, CE, FIA atd.) plní funkci prvkově specifického detektoru.

2.1 Princip a instrumentace ICP-MS

V současné době je na trhu široká nabídka ICP-MS spektrometrů, které však mají společné základní konstrukční prvky, a to systém zavádění kapalných vzorků (zmlžovač a mlžná komora), plazmovou hlavici, hmotnostní analyzátor a detektor. Princip funkce ICP-MS je založen na zavádění nejčastěji kapalného vzorku pomocí peristaltického čerpadla do zmlžovače, kde je v důsledku působení kinetické energie proudícího nosného plynu převeden na polydisperzní aerosol (přibližně 1–2 % původního vzorku). Vzniklý aerosol následně vstupuje do mlžné komory sloužící k separaci jemného aerosolu od částic větších než 10 μm a k vyrovnávání zmlžovacích pulzů. Jemný aerosol opouštějící mlžnou komoru prochází injektorem horizontálně umístěné plazmové hlavy do indukčně vázaného plazmatu s teplotou 6 000–10 000 K, ve kterém dochází k desolvataci, odpaření, atomizaci a ionizaci prvků za vzniku kladně nabitých iontů. Vzniklé ionty jsou vedeny do hmotnostního analyzátoru spojením („*interface*“) tvořeným obvykle dvojicí niklových nebo platinových kónusů („*sampler*“ a „*skimmer*“) s velmi malými kruhovými otvory, které se nacházejí v oblasti

nízkého tlaku 2–5 mbar vytvářeného rotační pumpou. Spojení patří mezi nejvíce namáhané a kritické části ICP-MS spektrometru, jelikož zprostředkovává stabilní a účinný přechod iontů z atmosférické části přístroje (tlak $\sim 1\ 000$ mbar a teplota $\sim 7\ 500$ K) do vysokého vakua (tlak $\sim 10^{-5}$ – 10^{-9} mbar a teplota ~ 300 K). Extrahované ionty vstupují do vakuové komory (vakuum přibližně 10^{-3} mbar) obsahující iontovou optiku složenou ze série elektrostaticky ovládaných čoček. Iontová optika slouží k elektrostatické fokusaci svazku iontů prvků a matrice, přičemž neutrálním částicím a fotonům emitovaných z ICP zabrání před jejich dopadem na detektor. Následně je svazek iontů s úzkým rozdělením kinetické energie veden do hmotnostního analyzátoru, kde jsou ionty separovány podle poměru m/z . Hmotnostní analyzátoři jsou dle použitého typu udržovány při vakuu přibližně 10^{-5} – 10^{-9} mbar vytvářeného turbomolekulární pumpou. Nejčastěji používanými typy analyzátorů jsou kvadrupólový analyzátor (Q, $R = \sim 300$), průletový analyzátor (*Time of Flight*, TOF, $R = \sim 2\ 000$) a statický sektorový analyzátor (SF) dosahující vysoké rozlišovací schopnosti ($R = \sim 10\ 000$). Většina dnešních ICP-MS s kvadrupólovým analyzátořem je současně vybavena kolizní/reakční celou sloužící k eliminaci polyatomických interferencí¹⁻⁴. Po průchodu hmotnostním analyzátořem dopadají separované ionty na detektor (elektronásobič) tvořený sérií dynod převádějící proud iontů na měřitelný elektrický signál. Schéma konstrukce ICP-MS s kvadrupólovým analyzátořem je na Obr. 2.1.

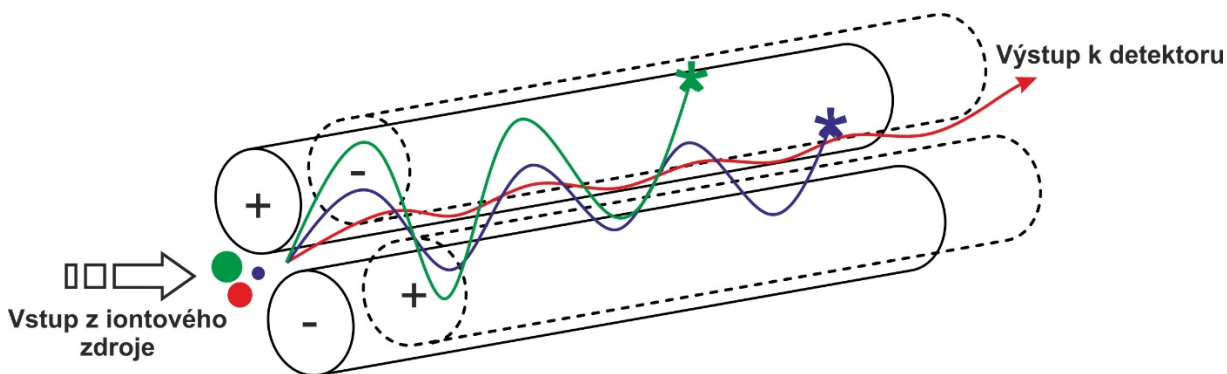


Obr. 2.1 Schéma ICP-MS spektrometru s kvadrupólovým analyzátozem (A), alternativní systémy vnášení vzorků a spojené techniky, které lze kombinovat s ICP-MS (B), ETV – elektrotermické vypařování, HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Převzato z cit. ²².

Kvadrupólový analyzátoz

Kvadrupólový hmotnostní analyzátoz se skládá ze čtveřice paralelně uspořádaných kovových tyčí obvykle kruhového či ideálně hyperbolického průřezu s délkou 15–25 cm, kdy na protilehlé tyče je současně vkládáno stejnosměrné napětí shodné polarity (U) a vysokofrekvenční střídavé (V) napětí, které je fázově posunuto o 180° . Elektrické pole kvadrupólu způsobí oscilaci vstupujících iontů, kdy při definované hodnotě napětí U a amplitudy střídavého napětí V proletí kvadrupólem pouze ionty se zvolenou hodnotou m/z (stabilní trajektorie), ostatní ionty jsou vypuzeny z elektrického pole s následným zachycením a vybitím na tyčích kvadrupólu. Plynulou změnou hodnot U a V (jejich poměr zůstává konstantní) jsou postupně propouštěny (proměřeny) všechny ionty v definovaném rozsahu hodnot m/z (Obr. 2.2). Výhodou kvadrupólového analyzátozu je vysoká skenovací rychlost v řádu 2 500 amu/s, což teoreticky umožňuje skenování celého rozsahu 0–300 amu za jednu

desetinu sekundy. Nevýhodou je nízká rozlišovací schopnost ($R = \sim 300$) ovlivňující přesnost kvantitativního stanovení prvků (Fe, K, As, V, Cr, aj.) zatížených spektrálními interferencemi¹⁻⁴. Z tohoto důvodu je většina ICP-MS spektrometrů s kvadrupólovým analyzátozem vybavena kolizní/reakční celou.



Obr. 2.2 Schéma zobrazující princip separace iontů s rozdílnou hodnotou m/z pomocí kvadrupólového analyzátozu. Stabilní oscilace dosahuje pouze červený ion, jehož trajektorie umožňuje průlet iontu kvadrupólem. Ilustrace autora.

Interference a metody jejich eliminace

Nespektrální interference vznikají v důsledku ovlivnění transportu a zmlžování vzorku, ovlivnění ionizační rovnováhy v ICP vysokým obsahem solí, kyselin a snadno ionizovatelných prvků přítomných v analyzovaných vzorcích. Vysoká koncentrace solí ($< 2\ 000\ \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) může navíc vést k zanášení vstupních otvorů kónusů spojení, což negativně ovlivňuje jejich reálný průměr a geometrii (významné ovlivnění signálu analytů). K nejběžnějším metodám eliminace patří využití vhodně zvoleného interního standardu přidávaného v nízkých koncentracích ke kalibračním standardům a reálným vzorkům. Interní standard musí splňovat tato kritéria: nesmí být obsažen v analyzovaných vzorcích, musí mít podobné chování v ICP (podobný ionizační potenciál) a měl by mít i podobnou relativní atomovou hmotnost. V případě multielementární analýzy je tedy potřeba využít kombinace několika interních standardů pro pokrytí celého rozsahu analyzovaných prvků (^{45}Sc , ^{89}Y , ^{115}In , ^{232}Th , ^{209}Bi aj.)¹⁻⁴.

Spektrální interference, považované za nejproblematictější druh interferencí v ICP-MS, jsou způsobeny atomovými či molekulárními ionty, které mají velice podobnou hodnotou m/z jako izotop analyzovaného prvku. Vliv spektrálních interferencí závisí především na rozlišovací schopnosti použitého hmotnostního analyzátoru. Spektrální interference můžeme rozdělit na izobarické a polyatomické (molekulární) interference¹⁻⁴.

Izobarické interference nastávají v případě, kdy je ve vzorku přítomen izotop prvku s velmi podobnou hodnotou m/z jako analyt. Příkladem může být vanad, který se vyskytuje v podobě izotopu ^{50}V (49,94716 amu, relativní zastoupení 0,25 %) a ^{51}V (50,94396 amu, relativní zastoupení 99,75 %), přičemž izotop ^{50}V je zatížen interferencí izotopu ^{50}Cr (49,94605 amu, relativní zastoupení 4,35 %) a izotopu ^{50}Ti (49,94479 amu, relativní zastoupení 5,40 %)⁴. V případě kvadrupolových analyzátorů (obecně analyzátorů s nízkou rozlišovací schopností) je k jejich potlačení využito volby vhodného izotopu analytu, popřípadě matematických korekčních rovnic¹⁻⁴.

Na druhou stranu polyatomické (molekulární) interference vznikají v důsledku spojení dvou nebo i více druhů atomů, jejichž výsledná hodnota m/z je velmi podobná s hodnotou m/z měřeného analytu. Ke vzniku polyatomických interferencí dochází vzájemnou interakcí atomů analytu a ostatních prvků přítomných v analyzovaném vzorku (matrice) nebo použitým rozpouštědlem s prvky plazmového plynu a okolní atmosféry (hlavně kyslík, dusík). Mezi nejznámější příklady polyatomických interferencí patří polyatomický ion $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ interferující stanovení $^{56}\text{Fe}^+$ především při analýze vodných roztoků či polyatomický ion $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ interferující stanovení $^{75}\text{As}^+$ v prostředí chloridových iontů. Dále mohou vznikat molekulární hydridy ($+^1\text{H}^+$), oxidy ($+^{16}\text{O}^+$), hydroxidy ($+^{16}\text{O}^1\text{H}^+$) a v neposlední řadě i dvojnásobně nabitě ionty (např. ion $^{138}\text{Ba}^{2+}$ interferující stanovení $^{69}\text{Gd}^+$). Příklady polyatomických interferencí způsobených atomy matrice či rozpouštědla jsou uvedeny v Tabulce 2.1. Množství vznikajících polyatomických, dvojnásobně nabitých iontů závisí nejen na koncentraci interferujících prvků, ale i na vhodném nastavení parametrů zmlžování, plazmatu a také na geometrii vstupních kónusů¹⁻⁴.

Tab. 2.1 Polyatomické interference způsobené atomy matrice či rozpouštědla. Převzato z cit⁴ .

Prvek/Izotop	Matrice/Rozpouštědlo	Interference
³⁹ K ⁺	H ₂ O	³⁸ Ar ¹ H ⁺
⁵⁶ Fe ⁺	H ₂ O	⁴⁰ Ar ¹⁶ O ⁺
⁸⁰ Se ⁺	H ₂ O	⁴⁰ Ar ⁴⁰ Ar ⁺
⁵¹ V ⁺	HCl	³⁵ Cl ¹⁶ O ⁺
⁷⁵ As ⁺	HCl	⁴⁰ Ar ³⁵ Cl ⁺
²⁸ Si ⁺	HNO ₃	¹⁴ N ¹⁴ N ⁺
⁴⁴ Ca ⁺	HNO ₃	¹⁴ N ¹⁴ N ¹⁶ O ⁺
⁵⁵ Mn ⁺	HNO ₃	⁴⁰ Ar ¹⁵ N ⁺
⁴⁸ Ti ⁺	H ₂ SO ₄	³² S ¹⁶ O ⁺
⁵² Cr ⁺	H ₂ SO ₄	³⁴ S ¹⁶ O ⁺
⁶⁴ Zn ⁺	H ₂ SO ₄	³² S ¹⁶ O ¹⁶ O ⁺
⁶³ Cu ⁺	H ₃ PO ₄	³¹ P ¹⁶ O ¹⁶ O ⁺
²⁴ Mg ⁺	organická matrice	¹² C ¹² C ⁺
⁵² Cr ⁺	organická matrice	⁴⁰ Ar ¹² C ⁺
⁶⁵ Cu ⁺	horniny	⁴⁸ Ca ¹⁶ O ¹ H ⁺
⁶⁴ Zn ⁺	horniny	⁴⁸ Ca ¹⁶ O ⁺
⁶³ Cu ⁺	mořská voda	⁴⁰ Ar ²³ Na ⁺

Metody eliminace spektrálních interferencí

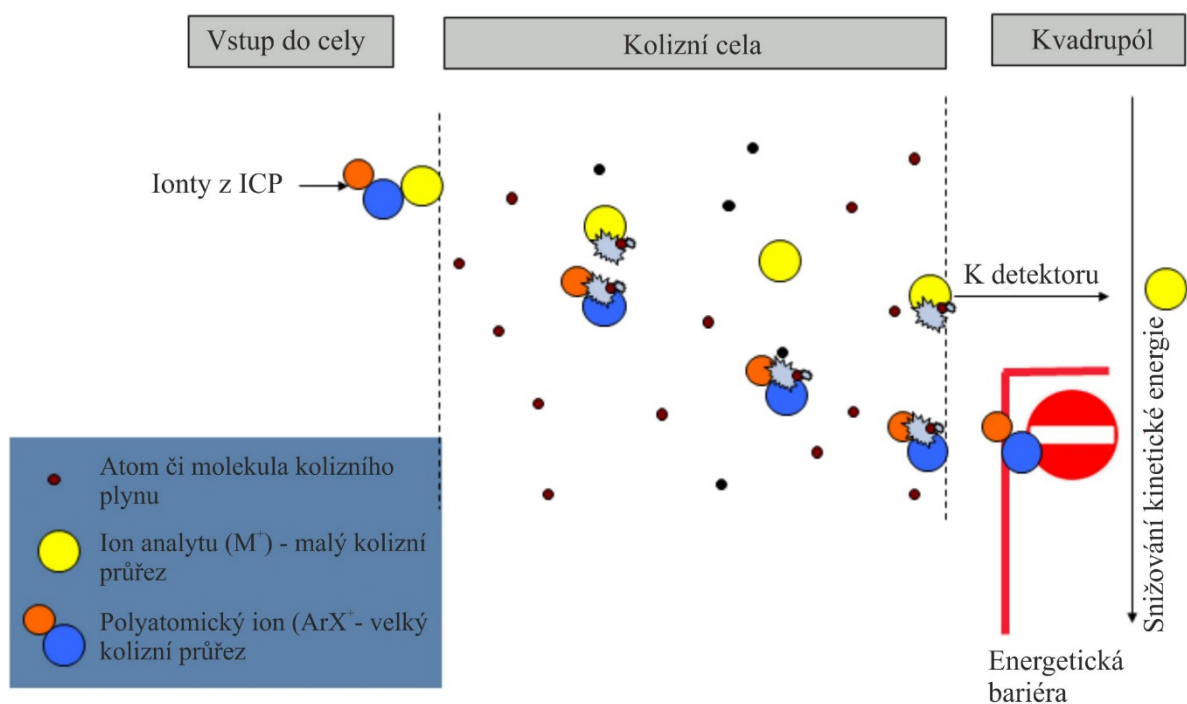
Významnou roli hraje nejen volba vhodného izotopu analyzovaného prvku, který je co nejméně zatížen spektrálními interferencemi, ale obzvláště pak využití ICP-MS přístrojů s vysokým rozlišením (např. sektorové přístroje) majících dostatečnou rozlišovací schopnost pro separaci většiny spektrálních interferencí¹⁻⁴. Kromě toho moderní ICP-MS spektrometry poskytují další řešení k efektivnímu potlačení spektrálních interferencí, mezi které patří:

Matematické korekční rovnice – potlačení izobarických, ale i některých méně závažných polyatomických interferencí s využitím matematického modelu zohledňujícího distribuci, relativní zastoupení izotopů analytu a interferujícího iontu¹⁻⁴.

Cool/Cold plasma – tzv. „studené“ plazma vytvářené při nízkém příkonu do ICP a současně zvýšeném průtoku nosného plynu má za následek snížení teploty (energie) plazmatu, čím dochází k minimalizaci vzniku tzv. „argon-based“ polyatomických interferencí. Používá se v případech nízké intenzity (koncentrace) analyzovaného prvku a současně vysoké intenzity interferujícího iontu, kdy není vhodné využít matematických korekčních rovnic. Nevýhodou

tohoto řešení je omezené využití pro multielementární analýzu z důvodu negativního ovlivnění ionizace prvků s ionizační energií $> 8 \text{ eV}$ (cit. ¹⁻⁴).

Kolizně/reakční cely – využívají řady ion-molekulových kolizí a reakcí k efektivnímu odstranění nežádoucích polyatomických interferencí. Kolizně/reakční cely lze na základě mechanismu eliminace a použitého multipólu rozdělit na cely kolizní nebo reakční. Kolizní celou je nejčastěji hexapól nebo oktapól promývaný inertním plynem (He, Ne, Xe, a Ar). K potlačení polyatomických interferencí dochází prostřednictvím diskriminace kinetické energie založené na rozdílné pravděpodobnosti vícenásobných srážek iontů analytu a interferentu s kolizním plynem (Obr. 2.3). V případě reakční cely je kvadrupól naplněn reaktivním plynem (H_2 , NH_3 , CH_4 , O_2 atd.), který s polyatomickými ionty reaguje za vzniku neinterferujících iontů s odlišnou nominální hodnotou m/z či neškodných neutrálních částic. Praktickou výhodou využití vysoce reaktivních plynů spočívá ve zvýšení počtu ion-molekulových reakcí, což má za následek rychlejší a účinnější potlačení (odstranění) polyatomických interferencí¹⁻⁴.



Obr. 2.3 Schéma mechanismu diskriminace kinetické energie na příkladu eliminace polyatomické interference ArX^+ ovlivňující stanovení iontu M^+ . Převzato z cit. ⁴.

2.2 Rozklad biologických vzorků

Ve většině aplikací ICP-MS zaměřených na stanovení prvků v biologických a organických materiálech je nezbytné, aby byl pevný vzorek kvantitativně převeden do roztoku. Pro tyto účely se využívá různých typů rozkladů. Rozklad může být definován jako chemický proces, při kterém v důsledku chemických reakcí dochází k uvolnění analytu z různých vazeb či chemických forem společně se současnou nevratnou destrukcí původní organické sloučeniny²³. Podle použitého postupu lze používané rozklady rozdělit do tří základních skupin, a to rozklady na suché cestě (složené ze sušení, zuhelnatění, žíhání a loužení vzniklého popela), rozklady na mokré cestě (zahrnující mineralizaci vzorku směsí kyselin v otevřeném či uzavřeném systému s konvenčním nebo mikrovlnným ohřevem) a v neposlední řadě speciální druhy rozkladů (hydrolytický, UV fotolytický rozklad aj.). Významné postavení má především mikrovlnný rozklad v uzavřeném systému využívající k rozkladu oxidačních účinků koncentrovaných kyselin (HNO_3 , H_2SO_4 , HClO_4 aj.) a přidávaných oxidačních činidel (H_2O_2 , KI aj.). Výhodami tohoto systému jsou vysoká účinnost rozkladu, potlačení či úplná eliminace ztrát těkavých prvků, zkrácení rozkladné doby, snížení spotřeby rozkladných činidel a kontaminace slepých, reálných vzorků z okolního prostředí nebo dalších rozkládaných vzorků²³.

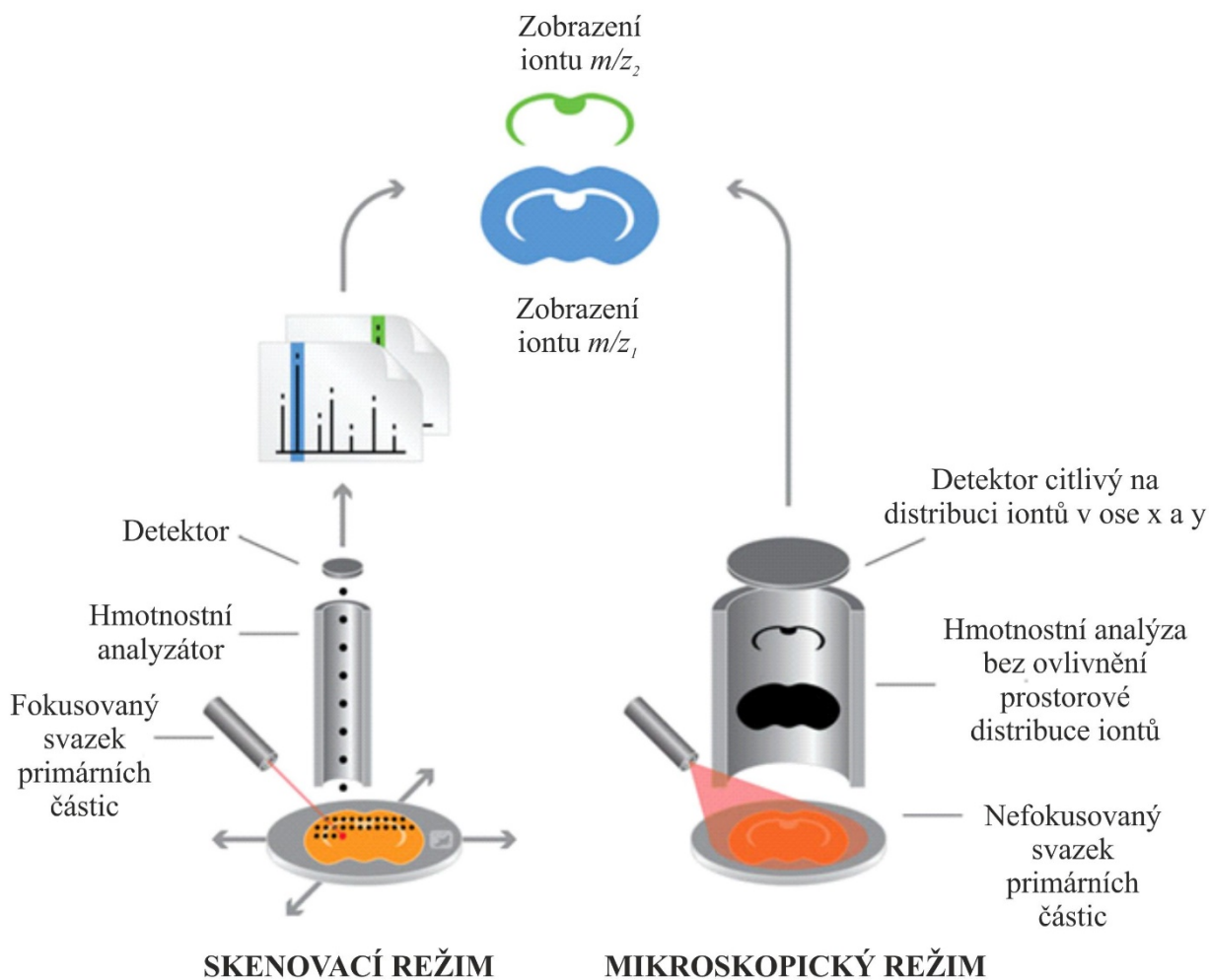
3. Zobrazovací hmotnostní spektrometrie

Zobrazovací hmotnostní spektrometrie („*mass spectrometry imaging*“, MSI) je jednou z nejvýznamnějších analytických technik zaměřených na analýzu prostorové distribuce molekul a prvků v biologických tkáních. Současným trendem je využití multimodálního přístupu kombinujícího možnosti elementárního a molekulárního zobrazování pro účely získání komplexních informací o chemickém složení povrchu a prostorové distribuci významných prvků a molekul (biomarkerů)²⁴⁻²⁶. Mapování prostorové distribuce molekul a prvků na povrchu biologického vzorku může být provedeno ve skenovacím („*microprobe mode*“) nebo mikroskopickém („*microscope mode*“) režimu^{12,24-27} (Obr. 3.1).

V případě skenovacího režimu se jedná o postupnou analýzu biologického vzorku fokusovaným svazkem primární částic, který dopadá na malou definovanou oblast (bod „*spot*“). Po dopadu primárních částic na povrch vzorku dochází k desorpci a následné ionizaci molekul/prvků uvolněných z povrchu. Vzniklé ionty jsou po separaci v hmotnostních

analyzátořech detekovány a výsledné hmotnostní spektrum je uloženo společně s informací o prostorových souřadnicích analyzovaného bodu. Následně je vzorek posunut o definovanou vzdálenost a celý proces od ionizace analytů až po záznam hmotnostního spektra se opakuje. Tímto způsobem je provedeno mapování celého vzorku, přičemž jednotlivá spektra jsou sbírána z pravidelně rozmístěných bodů s předem definovaným prostorovým rozlišením v ose x a y. Dosahované prostorové rozlišení je limitováno velikostí a profilem fokusovaných primárních částic iontového zdroje. Získaná hmotnostní spektra jsou rekonstruována příslušnými programy za vzniku molekulárních/prvkových 2D map, kde každé spektrum odpovídá jednomu pixelu. Ve výsledných 2D mapách jsou příslušné intenzity každé analyzované molekuly/prvku znázorněny barevnou škálou napříč analyzovanou oblastí. Výhodou skenovacího režimu je snadnost provedení, kompatibilita se všemi dostupnými desorpčně-ionizačními technikami, ale i hmotnostními analyzátoři²⁴⁻²⁶.

V případě mikroskopického režimu jsou molekuly/prvky z celého povrchu biologické tkáně ionizovány současně, a to prostřednictvím nefokusovaného svazku primárních částic. V průběhu desorpce a ionizace molekul/prvků potom nedochází ke změnám v jejich prostorové distribuci v ose x a y. Vzniklé ionty jsou po separaci v hmotnostním analyzátoři (separace iontů v ose z) detekovány speciálním detektorem, jenž musí být schopen zaznamenat nejen intenzitu a informaci charakteristickou pro přesné určení hodnoty m/z (nejčastěji dobu letu), ale i prostorové souřadnice dopadajícího iontu. Výhodami mikroskopického režimu je lepší prostorové rozlišení, které není omezeno možnostmi zaostření svazku primárních částic, výrazné zkrácení doby analýzy. Nevýhodou je vysoká cena, vysoké nároky na iontovou optiku a detektor, kompatibilita je zajištěna pouze s průletovým či magnetickým sektorovým analyzátořem („*dispersing magnetic sector analyzer*“)²⁴⁻²⁶.



Obr. 3.1 Schéma hmotnostně spektrometrického zobrazování vzorku mozku ve skenovacím a mikroskopickém režimu. Převzato z cit.²⁶.

V principu lze pro hmotnostně spektrometrické zobrazování použít kteroukoliv desorpčně-ionizační techniku, ale v praxi se ukazuje, že ne každá může nabídnout dostatečně nízké meze detekce a prostorové rozlišení. Pro hmotnostně spektrometrické zobrazování jsou nyní komerčně dostupné čtyři techniky, a to MALDI-MSI, DESI-MSI, SIMS (hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů) a LA-ICP-MSI^{12,24-26,28}.

Laserová desorpce a ionizace za účasti matrice je měkká ionizační technika založená na desorpční ionizaci molekul z povrchu biologických vzorků za přítomnosti organické matrice (kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA), kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (DHB), kyselina 3,5-dimethoxy-4-hydroxy skořicová (SA)), která jednak absorbuje energii laserového pulzu a po přechodu do plynné fáze ionizuje molekuly analytu. MALDI-MSI patří k rychle se rozvíjejícím metodám vhodným k simultánnímu mapování stovek malých i velkých biomolekul

($m/z > 10\ 000$ Da) s prostorovým rozlišením 20–50 μm . Nejen proto si našla široké uplatnění v analýze metabolitů (biomarkerů), lipidů, léčiv a jejich metabolitů, peptidů i proteinů a dalších^{12,24,25}.

DESI-MSI je zobrazovací hmotnostně spektrometrickou technikou umožňující přímou analýzu malých a středně velkých polárních biomolekul (lipidy, peptidy, proteiny, léčiva, polymery a výbušniny) za ambientních podmínek. V případě desorpčního elektrospreje je pomocí sprejovací špičky produkován velmi jemný sprej nabitých kapiček rozpouštědla, který je směřován přímo na analyzovaný povrch. Interakcí nabitých kapiček s povrchem vzorku dochází k jeho smáčení, extrakci molekul z povrchu do rozpouštědla a následné desorpci sekundárních kapek obsahujících rozpuštěné analyty. Vzniklé sekundární kapky jsou transportovány vyhřívanou kapilárou do hmotnostního spektrometru. Dusík proudící okolo sprejovací kapiláry pomáhá jednak fokusovat jemný sprej nabitých kapiček na povrch vzorku a zároveň transportovat vznikající sekundární kapky do hmotnostního spektrometru. K výhodám DESI-MSI patří přímá analýza tenkých řezů biologických tkání za ambientních podmínek bez nutnosti nanášení matrice nebo dalších úprav vzorku. Nicméně, DESI-MSI dosahuje prostorové rozlišení obvykle v rozmezí 250–500 μm , které jen stěží konkuruje rozlišení dosahovaného technikami MALDI a SIMS^{12,24,25}.

V současnosti si hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů našla široké uplatnění pro detailní studium prostorové distribuce prvků a malých molekul s vynikajícím plošným rozlišením obvykle pod 1 μm (nano-SIMS <50 nm). Princip SIMS spočívá v bombardování analyzovaného povrchu fokusovaným proudem primárních monoatomických (Cs^+ , Ga^+ , Bi^+ , Au^+ , O^-) či polyatomických iontů (Bi_n^+ , Au_3^+ , C_{60}^+) s kinetickou energií až několik keV a následné detekci sekundárních iontů uvolněných z povrchu vzorku. Relativně vysoká kinetická energie primárních iontů způsobuje fragmentaci většiny biomolekul s molekulovou hmotností $> 1\ 000$ Da. Kvantitativní analýza je velmi obtížná, neboť relativní citlivostní faktory prvků („*relative sensitivity factors*“, (RSF)) se značně liší (až o několik řádů) v závislosti na typu analyzované matrice^{12,24,25,29}. Poslední jmenované hmotnostně spektrometrické technice laserové ablaci ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem bude dále věnována samostatná kapitola.

Naproti tomu ke konvenčnímu medicínskému stanovení nativní distribuce volných kovů se stále využívá specifických histologických barvicích technik, které sice poskytují přijatelné meze detekce, ale neumožňují multielementární stanovení a jsou známé svým špatným

prostorovým rozlišením. Mimo to byla publikována celá řada studií využívajících rentgenové spektrometrické techniky k mapování povrchu s velmi vysokým rozlišením. Mezi zobrazovací techniky založené na interakci rentgenového záření s povrchem biologického vzorku patří zejména skenovací elektronová mikroskopie ve spojení s energiově disperzním spektrometrem (SEM-EDS), energiově filtrovaná transmisní elektronová mikroskopie (EFTEM), částicově indukovaná RTG emisní spektrometrie (PIXE) a rentgenová fluorescence (nanoXRF). Uvedené techniky sice poskytují submikrometrické prostorové rozlišení, ale často nedosahují dostatečných mezí detekce vhodných k mapování stopových prvků a/nebo vykazují omezení pro kvantitativní analýzu^{11,12,29}.

3.1 LA-ICP-MS

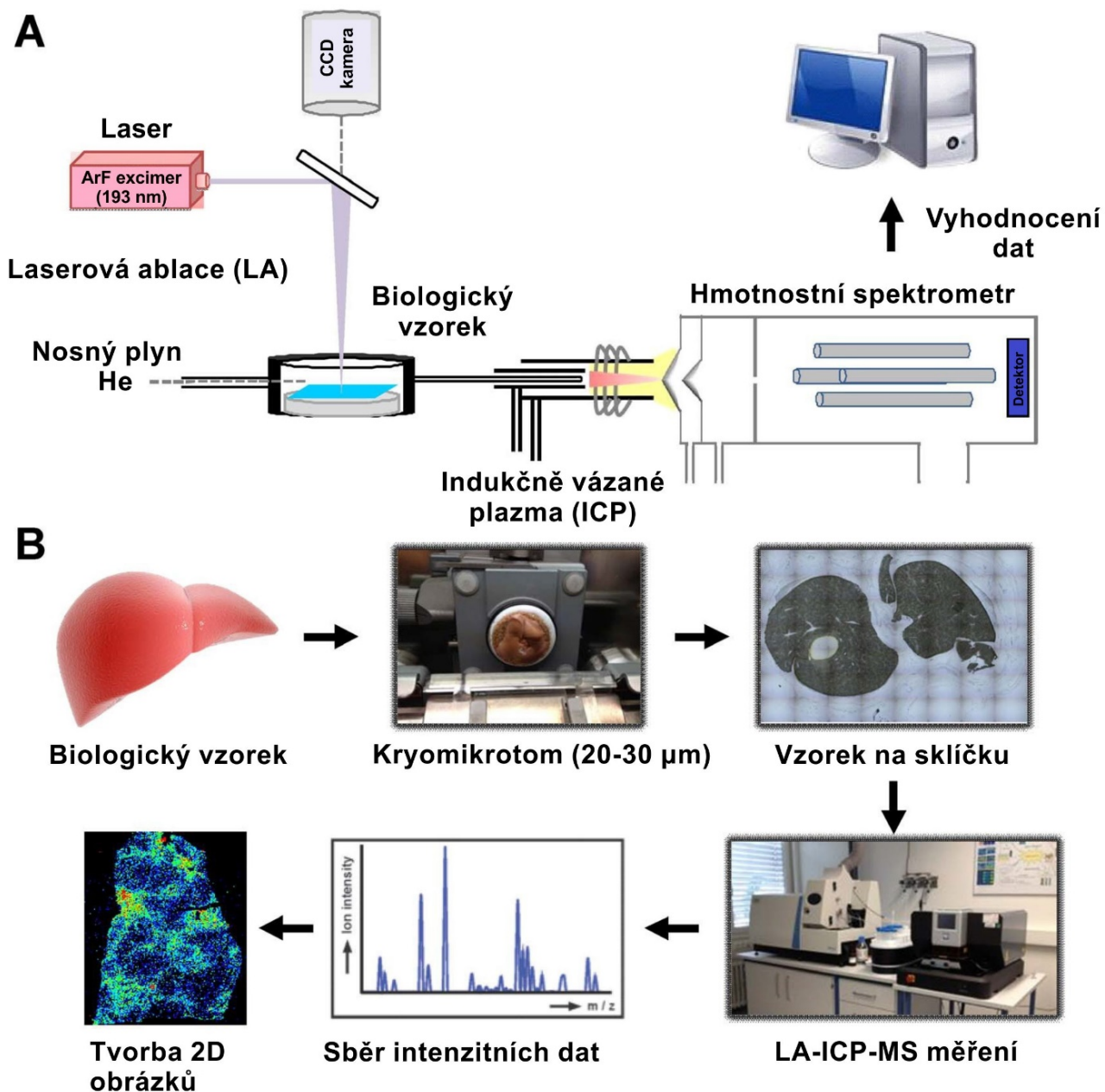
Laserová ablace ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem patří mezi nejrozšířenější mikroanalytické techniky zaměřené na multielementární stanovení kovů, polokovů a nekovů s prostorovým rozlišením obvykle v rozmezí 5–200 μm . LA-ICP-MS mimo jiné nabízí nízké meze detekce ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ až $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), široký lineární dynamický rozsah až 10 řádů, ale i možnost velmi přesného stanovení izotopových poměrů pro určení původu a stáří analyzovaných předmětů. K dalším výhodám náleží minimální příprava biologických vzorků, a hlavně možnost analýzy vodivých, nevodivých, neprůhledných i transparentních vzorků. Nejen proto LA-ICP-MS našla široké uplatnění v povrchové mikroanalýze, hloubkovém profilování anebo mapování distribuce prvků na povrchu tenkých řezů různých biologických vzorků^{1,11-13,28,30,31}.

Současný trend LA-ICP-MSI spočívá v zobrazování prostorové distribuce esenciálních, prospěšných nebo toxických kovů (Fe, Zn, Cu, Mn, Mo, Ca, Mg, K, Cd, Cr, Pb, Tl, Hg, U, Th a dalších), polokovů (Se, As a dalších) a nekovů (Se, S, P, I, Cl a dalších) v biologických vzorcích pro účely objasnění funkce jednotlivých životně důležitých biologických procesů, detailnímu studiu biologické dostupnosti a bioakumulace prvků pro hodnocení ekologických či toxikologických rizik u lidí, zvířat a rostlin^{1,11-13,28}. Dalšími rozvíjejícími oblastmi LA-ICP-MS je selektivní detekce a lokalizace imunochemicky značených intracelulárních a extracelulárních proteinů³²⁻³⁴ (např. nádorové značky Her 2, CK 7 a MUC 1), studium neurodegenerativních onemocnění (Parkinsonova a Alzheimerova choroba)^{1,11,12,28}, mapování

kontrastních látek a metalofarmak, metalomika, metaloproteomika^{28,35-39}, studium velikosti a distribuce nanočástic, analýza jediné buňky tzv., „*single cell analysis*“^{32,33,40-43}.

3.1.1 Princip a instrumentace LA-ICP-MS

Princip LA-ICP-MS je založen na využití fokusovaného laserového paprsku emitovaného pevnolátkovým nebo excimerovým laserem k postupnému a přesnému vzorkování biologického vzorku umístěného v ablační komoře. V důsledku interakce fotonů laserového svazku s povrchem vzorku (tzv. laserové ablaci) dochází pomocí celé řady reakcí k destrukci materiálu a vzniku laserem indukovaného mikroplazmatu vedoucích k tvorbě částečně ionizovaného aerosolu ablatovaných částic (atomy, ionty, molekuly a fragmenty částic z povrchu). Částečně ionizovaný aerosol je poté kontinuálním proudem nosného plynu (argon, helium) transportován do indukčně vázaného plazmatu, kde je atomizován a ionizován za vzniku kladně nabitých iontů. Vzniklé ionty jsou extrahovány z atmosférické části do hmotnostního spektrometru vybaveného kvadrupólovým analyzátozem (popřípadě i kolizně/reakční celou) nebo sektorovým analyzátozem s dvojitou fokusací. V hmotnostním analyzátozu dochází k separaci iontů dle poměru m/z a následné detekci detekčním systémem hmotnostního spektrometru. V případě LA-ICP-MS jsou intenzitní data pro každý analyzovaný prvek zaznamenávána v závislosti na čase a pohybu laserového svazku napříč biologickým vzorkem. Tato surová (časově závislá) data jsou dále zpracována příslušnými programy za vzniku 2D map prostorové distribuce prvků. Naměřená intenzita či přepočtená koncentrace každého analyzovaného prvku je poté znázorněna barevnou škálou napříč analyzovanou oblastí^{1,11,12}. Schéma zapojení a princip LA-ICP-MS zobrazování lze zjednodušeně vyjádřit schématem na Obr. 3.2.



Obr. 3.2 Schéma spojení LA-ICP-MS (A). Popis postupu LA-ICP-MSI experimentu (B) od přípravy tkáňových řezů, přes LA-ICP-MS analýzu až po zpracování surových dat do 2D map prostorové distribuce prvků. Převzato z cit.⁴⁴.

3.1.2 Příprava vzorků tkání pro LA-ICP-MS zobrazování

Příprava tkání a jejich následná úprava patří mezi zásadní kroky, které mohou výrazně ovlivnit kvalitu získaných výsledků. Nejdůležitějším úkolem správné přípravy vzorku je zachování prostorové distribuce prvků tak, aby co nejvíce odpovídala stavu za fyziologických podmínek. Proto pro LA-ICP-MS zobrazování je žádoucí biologické vzorky nikterak neupravovat, a tedy vzorky ihned po extrakci z těla jedince hluboce zmrazit v kapalném dusíku a následně uchovat k dalšímu zpracování při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. U biologických tkání fixovaných ve 4 % vodném roztoku formaldehydu může totiž docházet k rozdílnému vymývání prvků, dále i ke změně tvaru a velikosti původního biologického vzorku. Studium kinetiky uvolňování (vymývání) prvků ze vzorku krysího srdce fixovaného ve 4 % roztoku formaldehydu prokázalo, že po 6 dnech dochází k výrazné změně koncentrace Pt , Pb ($\leq 10\%$ vymytí) $> \text{Fe}$, S , C $> \text{Mn}$ $> \text{P}$ $> \text{Cu}$ $> \text{Zn}$ $> \text{Sr}$ $> \text{Rb}$, Ca $> \text{Na}$, Cl , K , Li ($\geq 90\%$ vymytí)¹¹.

Před vlastním krájením biologických tkání na tenké řezy je doporučeno tkáň temperovat až 120 minut při optimální teplotě pro krájení. Optimální teplota závisí především na typu zpracovávané tkáně (obvykle -12 až $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$). Tkáň jsou krájeny v kryomikrotomech na tenké řezy o tloušťce 20–30 μm , které jsou následně přeneseny na vychlazené mikroskopické sklíčko a fixovány elektrostatickou adhezí či tepelnou fixací. K tepelné fixaci využijeme vlastní prst nebo hřbet ruky, jehož přiložením na zadní stranu mikroskopického sklíčka a kontinuálním pohybem z jedné strany na druhou dochází k postupnému „rozmrazování“ tenkého řezu tkáně a k fixaci. Zafixovaný řez tkáně by měl být poté vysušen ve vakuu nebo termostatu ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) a následně vhodně uchován. V případě potřeby zachování proteinů, metabolitů, ale i jiných bioorganických molekul musí být řezy skladovány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, zatímco pro zobrazování prvků a histologické barvení lze vysušené řezy skladovat při pokojové teplotě¹¹.

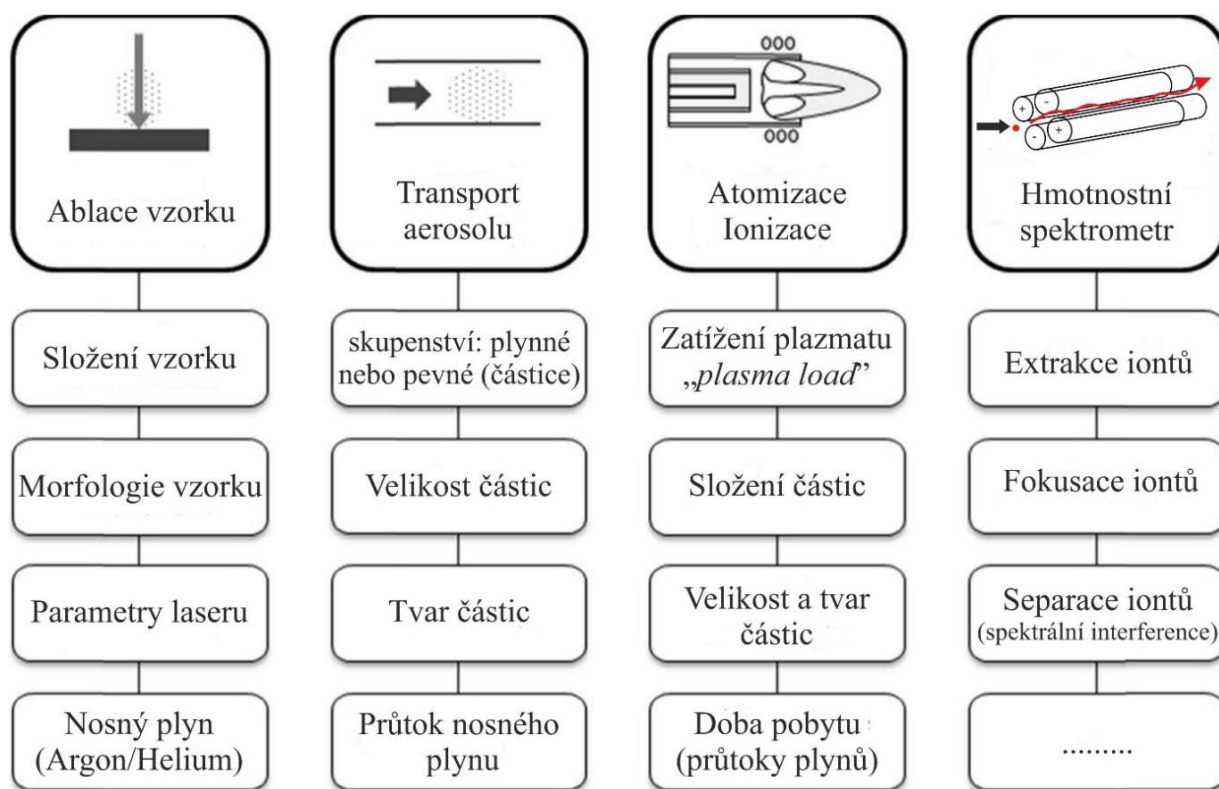
3.1.3 Režimy laserové ablace

Hmotnostně spektrometrické zobrazování laserovou ablací umožňuje mapování povrchu biologického vzorku ve dvou režimech, a to linií bodů (rastrem bodů „*line of spots*“) nebo liniovým skenem („*line scan*“). V prvním případě se jedná o ablaci pravidelně rozmístěných diskretních bodů, které se mohou, ale nemusí překrývat. Tento přístup poskytuje snadnou rekonstrukci nedeformovaných 2D map prostorové distribuce prvků. Při tomto postupu může být značně obtížné nejen synchronizovat funkci hmotnostního spektrometru s pulzem laserové ablace, ale i následně odstranit hmotnostní spektra (datové body) neobsahující signál analyzovaného vzorku. Mimoto ablace do bodu poskytuje lepší prostorové rozlišení a dostatečnou dobu pro měření i většího počtu izotopů. Doba ablace jednoho bodu je však omezena zahlubováním kráteru, který způsobuje deformaci časového průběhu signálu analytů i v případě analýzy homogenních vzorků či kalibračních standardů¹¹.

Zobrazování liniovým skenem je založeno na nepřerušované ablací vzorku s vhodnou opakovací frekvencí laserových pulzů při současném kontinuálním lineárním posunu vzorku. Rychlost posunu vzorku je limitována minimální dobou potřebnou k měření signálu, obzvláště pak při analýze většího počtu izotopů pomocí skenujících hmotnostních analyzátorů. Tedy optimalizací rychlosti posuvu je zajištěno, že každé hmotnostní spektrum (datový bod) obsahuje signál analytů. Mapování celého biologického preparátu je provedeno postupnou analýzou paralelně uspořádaných liniových skenů umístěných ve vhodné vzdálenosti od sebe (nejčastěji 20 % velikosti laserového svazku). Tímto je zabráněno lámání, praskání a tříštění analyzovaného vzorku. Při tomto postupu dochází ke snížení frakcionace během ablace. V porovnání s ablací do bodu je analýza liniovým skenem rychlejší, a tudíž vhodnější pro zobrazování větších objektů¹¹.

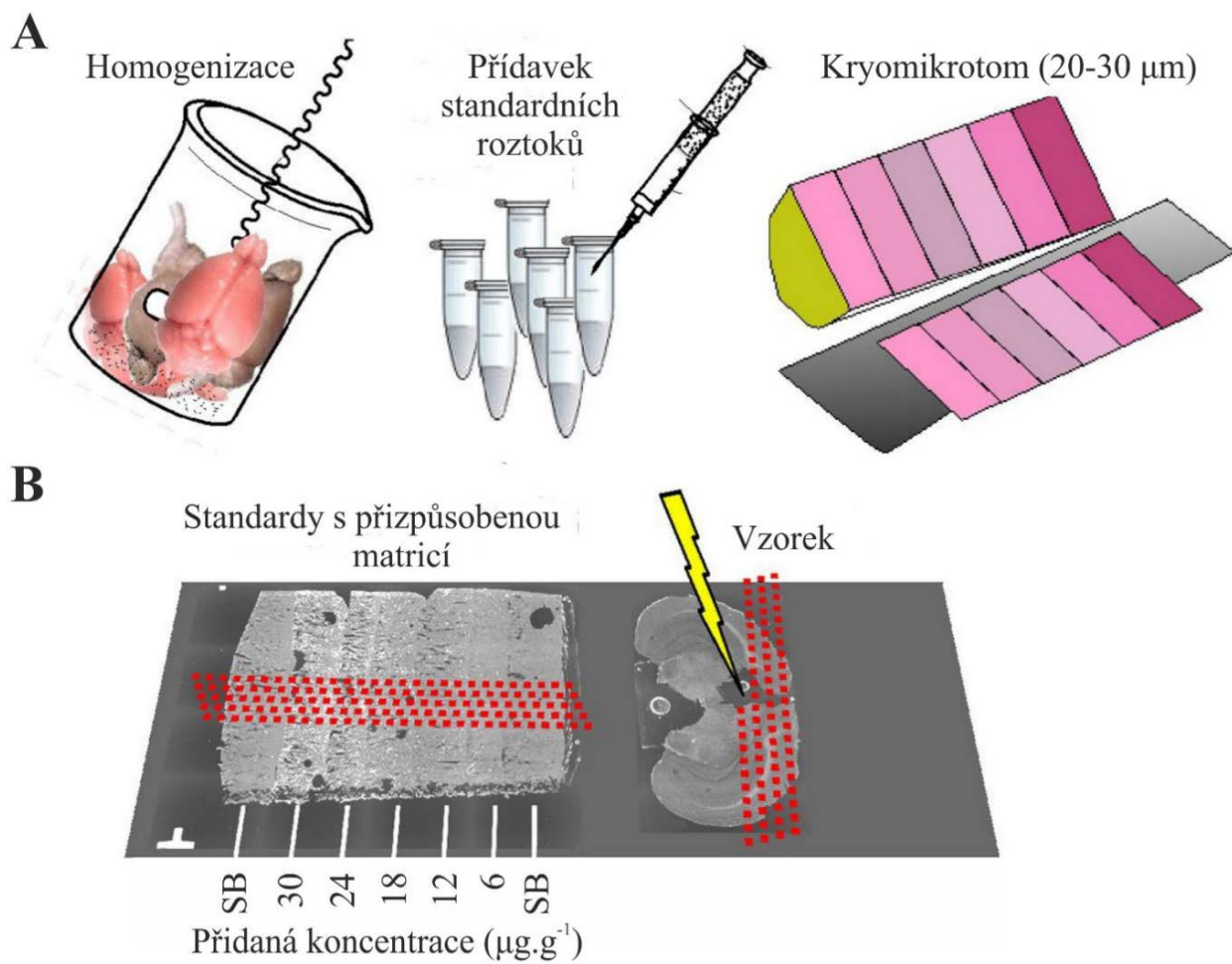
3.1.4 Kvantitativní analýza a postupy kalibrace

Navzdory tomu, že byla publikována celá řada nejrůznějších kalibračních postupů, tak dosud nebyl vyvinut univerzální postup kalibrace vhodný pro kvantitativní analýzu všech typů biologických vzorků. Hlavní omezení pro získání univerzálního a robustního kalibračního postupu pramení přímo z vlivů a odchylek spojených především s interakcí laserového svazku s povrchem vzorku, tvorbou reprezentativního jemného aerosolu, transportem částic aerosolu do ICP a následným odpařením, atomizací, ionizací prvků v ICP (Obr. 3.3). Příspěvky jednotlivých vlivů vedoucích ke vzniku elementární frakcionace a matričních efektů jsou podrobně popisovány a diskutovány literatuře⁴⁵⁻⁵². Stupeň elementární frakcionace a matričních vlivů značně závisí na složení a fyzikálních vlastnostech analyzovaného vzorku. Zajištěním stejného chování (složení) analyzovaného vzorku a standardu můžeme značně vylepšit správnost a přesnost kalibračního postupu^{11,13,30,31}.



Obr. 3.3 Zdroje chyb vyskytující se během LA-ICP-MS analýzy. Převzato z cit.¹³.

Nejrozšířenější kalibrační metodou pro LA-ICP-MS je externí kalibrace dostupnými certifikovanými referenčními materiály (CRM) nebo laboratorně připravenými kalibračními standardy (Obr. 3.4) s přizpůsobenou maticí („*matrix-matched*“). Nicméně v případech, kdy není dostupný vhodný CRM a nemáme dostatek analyzované tkáně pro přípravu laboratorních standardů lze matriční standardy připravit následujícími postupy: přidáním známého množství analyzovaných prvků do podobné práškové matrice (výběr dle dostupnosti či složení matričních prvků) nebo nakápnutím malého množství standardu přímo na povrch analyzovaného vzorku. Pro účely zjednodušení zdlouhavého procesu přípravy klasických matričních standardů se využívá tenkých filmů želatinových, agarózových gelů a sol-gel standardů, které jsou obohaceny o známé množství analyzovaných prvků. Alternativním postupem přípravy může být i tisk kalibračních standardů s využitím komerčních inkoustových tiskáren a inkoustů obohacených o analyzované prvky^{53,54}, případně příprava tzv. „*dried droplet*“ standardů založená na analýze zaschlých kapek vodných kalibračních standardů nanesených na definovaných discích z filtračního papíru^{11,13,30,31}. Interních standardů se v LA-ICP-MS zobrazování využívá ke korekci proměnlivosti signálu způsobené časovou nestabilitou přístroje nebo driftem signálu či pro porovnávání intenzity signálů. V následující tabulce (Tab. 3.1) jsou přehledně porovnány výhody a nevýhody tradičně využívaných kalibračních postupů.



Obr. 3.4 Příprava kalibračních standardů s přizpůsobenou maticí (A) a schéma postupu měření biologického vzorku a kalibračních standardů (B). Převzato z cit.¹¹. SB-slepý pokus „*sample blank*“.

Tab. 3.1 Porovnání kalibračních postupů. Převzato z cit.³⁰.

Kalibrační postup	Výhody	Nevýhody
Matriční certifikované referenční materiály (CRM)	Přizpůsobená matrice, rychlost, nezávislost certifikované koncentrace	Omezená dostupnost, jednobodová kalibrace, omezená volba koncentračního rozsahu, obvykle vysušené standardy
Laboratorně připravené standardy	Přizpůsobená matrice, volba koncentračního rozsahu, ekvivalentní obsah vody	Specifická aplikace, zdlouhavá příprava
Přimíchávání aerosolu kapalného standardu	Rychlost, vyšší počet analytů, využití standardních vodních kalibračních roztoků	Doposud popsáno omezené množství aplikací pro zobrazování
Izotopické zředování	Robustní jednobodová kalibrace, přesnost	Homogenní promíchání obohaceného standardu se vzorkem je značně obtížné, náročnost provedení, nepoužitelné pro monoizotopické prvky
Inkoustový tisk	Rychlost, snadná přizpůsobitelnost pro nové aplikace, možnost přizpůsobení matrice	Doposud popsáno omezené množství aplikací pro zobrazování

4. Cíle disertační práce

Cíle disertační práce jsou spojeny především s aplikací laserové ablace ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem v klinické a forenzní analýze.

Cíle disertační práce lze shrnout do následujících bodů:

- Aplikace multimodálního přístupu zahrnujícího využití pětice komplementárních technik, a to PET/CT, LA-ICP-MS, SEM-EDS zobrazování společně se standardním histologickým vyšetřením, pro detailní studium invazivní plicní aspergilózy v kontrolních a infikovaných potkaních plicích.
- Vývoj a optimalizace vhodného složení prostorových značek pro správný a přesný překryv molekulárních/prvkových map získaných pomocí zobrazovacích technik, a to MALDI-MSI, DESI-MSI, LA-ICP-MSI s optickými snímky z histologického barvení a fluorescenční mikroskopie.
- Detailní studium povýstřelových zplodin ulpělých na ruku střelce po použití střelné zbraně s následnou identifikací osoby na základě vizuálního porovnání shody rozmístění papilárních linií a rozmanitých daktyloskopických markantů na odpovídajících prvkových mapách a kontrolním (referenčním) otisku.
- Vývoj a validace ICP-MS metody pro stanovení železa a mědi v biologických tkáních. Kvantitativní stanovení obou kovů ve vzorcích biopsií srdečních svalů odebraných pacientům s chronickým srdečním selháním během transplantace srdce prováděné v Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze.

Nejvýznamnější výsledky prezentované v této práci byly publikovány ve čtyřech impaktovaných publikacích⁵⁵⁻⁵⁸.

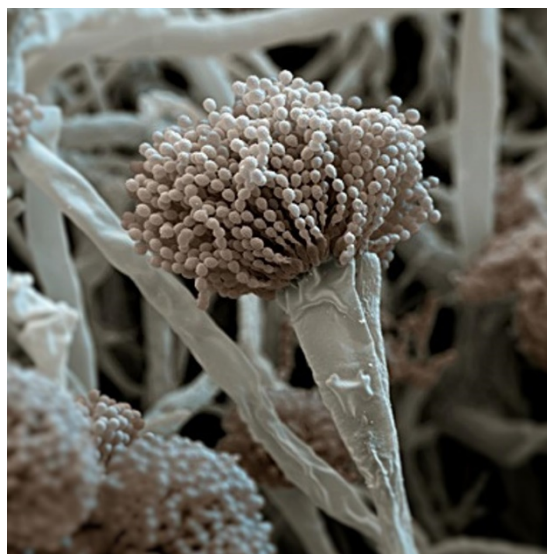
5. Multimodální zobrazování invazivní plicní aspergilózy

5.1 *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus je nejrozšířenější všudypřítomná vláknitá houba rodu *Aspergillus* patřícího mezi vřecovýtrusné houby, tzv. askomycety^{59,60}. V dnešní době rod *Aspergillus* zahrnuje přibližně 200 známých druhů, z nichž téměř 40 druhů je považováno za potenciální lidské patogeny⁶¹. Taxonomické zařazení *A. fumigatus* je uvedeno v Tabulce 5.1. V životním prostředí se tato saprofytická plíseň hojně vyskytuje ve vodě, vzduchu a půdě, kde přežívá a roste na rostlinných či živočišných zbytcích. *A. fumigatus* tak zaujímá tak klíčovou roli při návratu organického uhlíku a dusíku zpět do koloběhu. *A. fumigatus* je schopen růstu a reprodukce v širokém rozmezí teplot 20–55 °C, zatímco optimální teplota je 37 °C (cit.^{59,62}). Pro rod *Aspergillus* je typický tvar a uspořádání konidioforu, které jsou i základními znaky pro morfologickou identifikaci jednotlivých druhů (Obr. 5.1).

Tab. 5.1 Taxonomické zařazení *A. fumigatus*.
Převzato z cit.⁶³

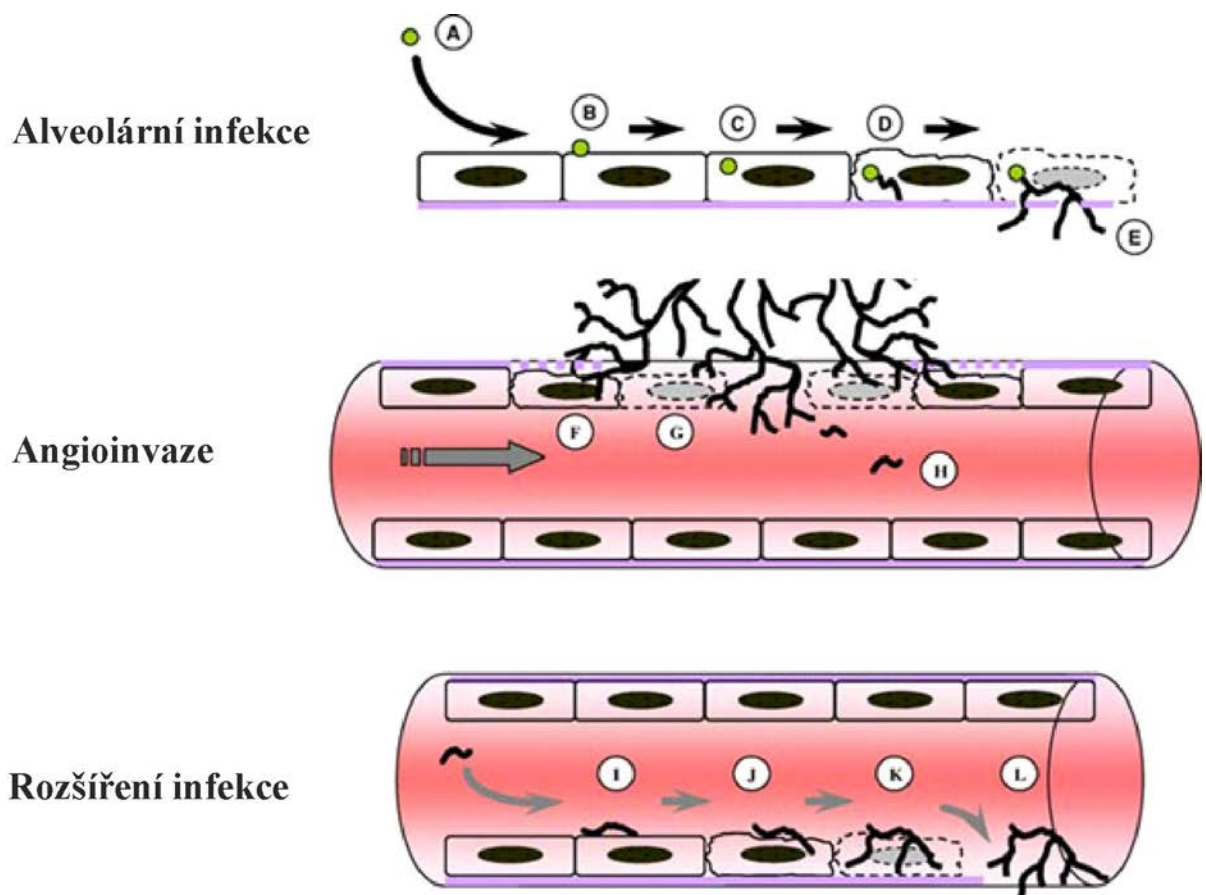
Říše:	<i>Fungi – houby</i>
Podříše:	<i>Dikarya</i>
Kmen:	<i>Ascomycota</i>
Podkmen:	<i>Pezizomycotina</i>
Třída:	<i>Eurotiomycetes</i>
Podtřída:	<i>Eurotiomycetidae</i>
Řád:	<i>Eurotiales</i>
Čeleď:	<i>Trichocomaceae</i>
Rod:	<i>Aspergillus</i>
Druh:	<i>Aspergillus fumigatus</i>



Obr. 5.1 Konidiofor *A. fumigatus*. Převzato z cit.⁶⁴

Jediný konidiofor je schopen vyprodukovat tisíce hydrofobních konidií (spor) s rozměrem 2 - 3 μm , které se jsou následně přenášeny proudem okolního vzduchu^{59,60,65}. Díky svým malým rozměrům pronikají spory *A. fumigatus* přímo do plicních alveol, kde jsou v závislosti na stavu hostitelského organismu buďto zničeny a odstraněny sofistikovanými mechanismy imunitního systému anebo v případě oslabené imunitní reakce organismu vyrůstají ve formě vláken (hyf) vytvářejících tzv. mycelia. Hlavní vstupní branou infekce jsou dýchací

cesty a jen v minimech případů byly popsány i infekce způsobené pozřením kontaminované potravy či infekce skrze poraněnou pokožku. U citlivých jedinců mohou aspergily vyvolat celou škálu mykotických onemocnění od alergické reakce až po invazivní infekce. V závislosti na stupni imunokompetence infikovaného jedince mohou mít tyto infekce akutní či chronický charakter a mohou být buď lokalizované anebo diseminované hematogenní cestou do dalších orgánů (játra, ledviny, CNS)⁶⁵⁻⁶⁸. Schéma průběhu jednotlivých fází invazivní plicní aspergilózy (IPA) je znázorněno na Obr. 5.2. Mezi hlavní původce mykotických onemocnění patří *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* a *A. nidulans*^{61,65,66}. Nicméně *A. fumigatus* je považován za hlavní příčinu vzniku většiny oportunních plicních infekcí zahrnujících aspergilom, invazivní plicní aspergilózu, alergickou bronchoplicní aspergilózu, chronickou plicní aspergilózu, chronickou nekrotizující aspergilózu a alergickou plísňovou rýmu^{66,69-71}.



Obr. 5.2 Model interakcí *A. fumigatus* s epiteliálními buňkami plic a endoteliálními buňkami cév v průběhu angioinvaze (pronikání do cév) a následného rozšíření invazivní plicní aspergilózy. Převzato z cit⁶⁶. Průběh IPA infekce probíhá v následujících krocích: infekce je zahájena vdechnutím malého počtu spor z ovzduší (A), které snadno ulpívají na plicních epiteliálních buňkách (B) před tím, než jsou transportovány skrze buněčnou membránu (endocytovány) do buněk (C). Uvnitř buněk dochází ke klíčení spor *A. fumigatus* a tvorbě hyf (D). Vzniklé hyfy se invazivně rozrůstají a dostávají se tak ven z plicních epiteliálních buněk (E). Posléze hyfy pronikají i abuminální vrstvou endoteliálních buněk cév (F), čímž způsobují jejich poškození (G). Fragменты hyf *A. fumigatus* se dále šíří krevním oběhem (H) a ulpívají tak na luminální vrstvě endoteliálních buněk (I), kde následně do těchto buněk proniknou (J). Luminální invaze vede k poškození endoteliálních buněk cév (K) a k mimo cévnímu rozšíření IPA infekce do ostatních orgánů (L). Fáze (A-E) probíhají v plicních alveolách, (F-H) v plicních cévách a (I-L) v systémových cévách.

5.2 Invazivní plicní aspergilóza

V posledních letech došlo k výraznému zvýšení počtu populace imunodeficientních pacientů, čímž prudce vzrostl i výskyt invazivních mykotických infekcí vyvolaných vláknitými houbami⁷². Invazivní plicní aspergilóza představuje progresivní smrtelné onemocnění s výskytem více než 200 000 infekcí ročně, které jsou spojeny s úmrtností 30-90 % (cit.⁷¹). Mezi nejvíce postižené skupiny pacientů patří především pacienti s hematologickými malignitami (pacienti s akutní leukémií, po transplantaci kostní dřeně, alogenní a autogenní transplantaci krvetvorných kmenových buněk), pacienti s febrilní neutropenií, pacienti po transplantaci orgánů, chemoterapii, pacienti trpící rakovinou a HIV, ale i pacienti po dlouhodobém užívání léků k potlačení imunity^{58,71}. *A. fumigatus* produkuje během IPA infekce nesčetné množství extracelulárních sloučenin přispívajících nejen k získávání životně důležitých prvků a živin, ale i k infekci hostitele a následnému masivnímu rozvoji IPA infekce. Obecně platí, že pro rozvoj mykotických infekcí je nezbytné, aby patogenní mikroorganismus získal kontrolu nad získáváním železa z hostitelského organismu. Nicméně obranou hostitelského organismu proti mikrobiálním infekcím je zejména udržování velmi nízké hladiny volného železa v tělních tekutinách, k čemuž hostitelský organismus využívá jeho specifické vazby na železo vázajícími proteiny (transferin, laktoferin, feritin aj.) nebo zabudování do hemu v hemoglobinu či Fe-S klastrů (tzv. nutriční imunita)^{57,69,73}. Z tohoto důvodu *A. fumigatus* vyvinul sofistikovaný mechanismus pro získávání hostitelského železa založený na produkci nízkomolekulárních neribozomálních peptidů (ligandů) schopných vytvářet koordinační komplexy s vysokou selektivitou a afinitou pro železité ionty, tzv. siderofory^{57,73,74}. Mezi hlavní produkované siderofory patří extracelulární fusarinin C, triacetylfusarinin C (TAFC) zodpovědné za „krádež“ železa z hostitelského organismu a intracelulární ferricrocin (FC), hydroxyferricrocin zodpovědné za ukládání železa v hyfách či konidiích houby *A. fumigatus*⁷⁵. Desferri a ferri formy TAFC a FC jsou považovány za potenciální markery IPA infekce^{58,76}.

Přestože již bylo publikováno značné množství experimentálních přístupů k identifikaci mykotických infekcí, tak překvapivě v 21. století doposud nebyla vyvinuta neinvazivní metoda pro včasnou identifikaci IPA infekce s dostatečnou senzitivitou a specificitou. V současné době se k diagnostice IPA infekce využívá počítačová tomografie (CT), kde se přítomnost infekce projeví buďto tzv. „halo sign“ nálezem (počáteční stádium, pozitivní u 68 % nemocných v 3. den infekce) nebo v pozdní fázi infekce tzv. „air-crescent sign“ nálezem (pozitivní u 63 %

nemocných v 14. den infekce)⁷⁷. Mezi další diagnostické metody patří mikroskopické či histopatologické vyšetření přítomnosti hyf *A. fumigatus* přímo v biopsiích plicní tkáně nebo v kulturách vzniklých kultivací klinických vzorků odebraných z infikované oblasti (biopsie, resekát, likvor, bronchoalveolární laváž (BAL), aj.). Nekultivační diagnostické metody se obecně dělí do dvou skupin, a to na serologické metody využívající detekce přítomnosti antigenů, protilátek nebo metabolitů *Aspergillus* spp. (galaktomananu, 1,3-β-D-glukanu) a molekulárně genetické metody založené na detekci a sekvenování specifických nukleových kyselin *Aspergillus* spp. pomocí metod polymerázové řetězové reakce (PCR)^{78,79}. Uváděná senzitivita a specifická stanovení galaktomananu v séru se pohybuje v rozmezí 48–77 % a 81–100 % (cit.^{70,80-82}), zatímco senzitivita a specifická stanovení 1,3-β-D-glukanu se pohybuje v rozmezí 85–100 % a 36–70 % (cit.^{80,83,84}). Avšak některé z prezentovaných metod stále nejsou zahrnuty v diagnostických kritériích pro mykotické infekce podle Evropské organizace pro výzkum a léčbu rakoviny/ Skupiny pro výzkum mykóz (EORTC/MSG, „*European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group*“) , a to hlavně z důvodu nedostatečné standardizace⁸².

V rámci studia IPA infekce v potkaním modelu experimentální aspergilózy jsme se zaměřili na stanovení mikrobiálních sideroforů jakožto potenciálních markerů IPA infekce⁵⁷. K zobrazování rozšíření IPA infekce s následnou jednoznačnou lokalizací oblastí potkaních plic postižených IPA infekcí jsme využili multimodálního přístupu s využitím technik molekulárního a prvkového hmotnostně spektrometrického zobrazování (MALDI-MSI, LA-ICP-MSI), skenovací elektronové mikroskopie s energiově disperzním spektrometrem (SEM-EDS), pozitronové emisní tomografie (PET) a počítačové tomografie (CT).

5.3 Experimentální část

5.3.1 Použité chemikálie a materiál

V experimentálním modelu experimentální aspergilózy provedeného na samicích LEWIS potkanů byl použit cyklofosfamid (Endoxan, Baxter, Česká republika), teikoplanin (Targocid, Sanofi, Česká republika), ciprofloxacin (Ciprofloxacin Kabi, Fresenius Kabi, Česká republika), polymyxin (Colomycin, Forest Laboratories, Velká Británie), ketamin (Calypsol, Gedeon Richter, Maďarsko), xylazin (Xylazin Ecuphar, Ecuphar, Německo), isofluran (Forane, Abbvie, Česká republika), atropin (Atropin Biotika, Biotika, Česká republika) a ^{68}Ga značený triacetylfusarinin C, jehož příprava je popsána v publikaci⁷⁵. Pro hmotnostně spektrometrické zobrazování a histologické barvení byl použit peroxid vodíku 30 % p.a.+, kyselina dusičná 65 % Analpure[®], CRM vodný kalibrační roztok Fe, Ag a Au o koncentraci $1\,000 \pm 2 \text{ mg.l}^{-1}$ a CRM vodný kalibrační roztok interního standardu pro ICP-MS „*INT-MIX I*“ (Sc, Y, In, Tb, Bi) o koncentraci $10 \pm 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ (Analytika, spol. s.r.o, Česká republika), chlorid železitý hexahydrát, chlorid zlatitý, dusičnan stříbrný $\geq 99,9 \%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), poly[N-(2-hydroxypropyl)methakrylamid] polymer (pHPMA, $M_w = 145\,000$), „*indium-tin oxide*“ (ITO) mikroskopická sklíčka $75 \times 25 \times 1,1 \text{ mm}$ (Bruker Daltonics, Německo), barvicí kit dle Grocotta obsahující roztoky kyseliny jodisté, chloridu zlatitého, thiosíranu sodného, „*silver methenamine*“ (roztok hexamethylentetraminu a dusičnanu stříbrného), boraxu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a Eosin-Y (VWR Chemicals, Česká republika). Deionizovaná voda (měrný odpor $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) byla získána z dvoustupňové deionizační stanice Milli-Q water systému (Millipore, Francie).

5.3.2 Instrumentace

In vivo zobrazování rozšíření IPA infekce bylo prováděno pomocí Albira PET/SPECT/CT zobrazovacího systému pro malá zvířata (Bruker Biospin Corporation, VA, USA), kdy po 10-ti minutovém PET zobrazování (axiální délka zorného pole 148 mm) následovalo CT zobrazování (zorné pole 65 mm, 45 kVp, 400 μ A, nasbíráno 600 obrazů). Data byla rekonstruována v programu Abira (Bruker Biospin Corporation, VA, USA) a následně analyzována v programu PMOD (PMOD Technologies Ltd., Švýcarsko). Zobrazování 3D struktury bylo provedeno v programu VoIView (Kitware, NY, USA).

Pro LA-ICP-MS mapování byl použit laserový ablační systém Analyte G2 (Photon Machines, USA) s argonfluoridovým (ArF) excimerovým laserem o vlnové délce 193 nm a délkou pulzu < 4 ns. Součástí tohoto systému byla dvou objemová ablační komora HelEx II s efektivní plochou 100 cm² a malou pohyblivou vnitřní celou. Povrch ablatovaného vzorku byl snímán barevnou CCD kamerou v HD rozlišení. Transport ablatovaného aerosolu byl zajištěn kontinuálním proudem helia, do kterého byl před vstupem do ICP přimícháván argon. Ablací celá byla spojena pomocí Tygon[®] hadičky (4 mm \times 1,2 m) s ORS-ICP-MS Agilent 7700x (Agilent Technologies, Japonsko) vybaveným oktapólovou kolizně/reakční celou pracující v heliovém módu pro potlačení spektrálních interferencí ovlivňujících zejména stanovení železa. LA-ICP-MSI data byla zpracovávána a vizualizována programem ImageLab (verze 2.18, Epina GmbH, Rakousko)⁸⁵. Optimalizace parametrů LA-ICP-MS (energie laseru, frekvence, průtoky nosného plynu) pro účely minimalizace frakcionace a zvýšení intenzity signálů byla založena na LA-ICP-MS analýze matričního kalibračního standardu s koncentrací 50 μ g.g⁻¹ železa. V průběhu optimalizaci parametrů nastavení laserové ablace byl monitorován signál i pro izotop křemíku (²⁸Si), za účelem nastavení vhodné hodnoty energie laseru tak, aby při LA-ICP-MS zobrazování pomocí linie bodů docházelo ke kompletní ablaci vzorku. Následně byl optimalizován průtok helia oktapólovou kolizně/reakční celou za účelem minimalizace vlivu polyatomických interferencí (např. ⁴⁰Ar¹⁶O⁺) negativně ovlivňujících kvantitativní stanovení ⁵⁶Fe⁺. Pro ověření koncentrace matričních kalibračních standardů bylo využito mikrovlnného rozkladného systému MLS 1 200 mega (Milestone, Itálie) a konvenční roztokové ICP-MS analýzy pomocí ORS-ICP-MS Agilent 7700x vybaveného autosamplerem (ASX-520), mikrokonzentrickým zmlžovačem, chlazenou mlžnou komorou dle Scotta a oktapólovou kolizně/reakční celou. Optimalizované parametry nastavení laserové ablace a ORS-ICP-MS jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 5.2). K zobrazování rozšíření

patogenní houby *A. fumigatus* v tenkých řezech plicní tkáně bylo využito skenovacího elektronového mikroskopu FEI Nova NanoSEM 450 vybaveného CBS detektorem („concentric backscatter detector“) pro zobrazování nevodivých vzorků s vysokým prostorovým rozlišením a EDAX Octane plus detektorem pro EDS analýzu a mapování prvků.

Tab. 5.2 Parametry laserové ablace a ORS-ICP-MS

Parametr	LA-ICP-MS	Roztoková analýza
Hustota zářivé energie (J.cm ⁻²)	2,12	-
Režim ablace	Linie bodů	-
Frekvence (Hz)	20	-
Integrační čas (ms)	80	100
Průměr laserového paprsku (μm)	3, 5, 10, 30	-
Počet laserových pulzů	5	-
Nosný plyn He (l.min ⁻¹)	0,65	-
Příkon generátoru (W)	1 200	1 550
Vnější plazmový plyn (l.min ⁻¹)	15,0	15,0
Střední plazmový plyn (l.min ⁻¹)	0,9	0,9
Pomocný plyn/nosný Ar (l.min ⁻¹)	0,75	1,1
Monitorované izotopy	[No Gas] – ¹⁰⁷ Ag, ¹⁹⁷ Au [He] – ⁵⁴ Fe, ⁵⁶ Fe, ⁵⁷ Fe	[He] – ⁴⁵ Sc, ⁵⁴ Fe, ⁵⁶ Fe, ⁵⁷ Fe, ⁸⁹ Y
He v kolizní cele (ml.min ⁻¹)	2,0	4,3

5.3.3 Kultivace houby *Aspergillus fumigatus* a IPA infekční model

Kmen *A. fumigatus* 1059 CCF získaný ze Sbírký kultur hub (CCF- „Culture Collection of Fungi“), Přírodovědecké fakulty, Univerzity Karlovy v Praze byl uchováván na YM („yeast medium“) šikmém agaru (složení média: 3 g kvasničný extrakt, 3 g sladovit, 5 g pepton mykologický, 5 g glukóza, 20 g agar) při teplotě 4 °C. Inokulum bylo připraveno z kultury připravené na YM agaru v Petriho misce, která byla kultivována při teplotě 30 °C po dobu 7 dnů do úplné sporulace. Spory byly získány spláchnutím kultivační misky fosfátovým pufrům s 0,1 % Tweenem 80 s následnou filtrací přes 1,0 μm nitrocelulózový membránový filtr (Whatman, UK) za účelem odstranění hyf. Koncentrace spor *A. fumigatus* v inokulační suspenzi byla stanovena hemacytometrem.

Zvířecí model experimentální aspergilózy byl proveden v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání a s povolením Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (MSMT-21235/2013-12) a Odborné komise na ochranu zvířat proti týrání Lékařské fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci. Všechny experimenty byly prováděny na samicích LEWIS potkana (Anlab, Praha, Česká republika), kterým byla 5 dní před vlastní aplikací suspenze spor *A. fumigatus* snižována imunitní reakce organismu podáním léku cyklofosfamid. Potkani byli infikováni 150 μ l inokulační suspenze obsahující spory houby *A. fumigatus* o koncentraci 10^7 - 10^8 CFU/ml (CFU-„*colony forming unit*“, jednotky tvořící kolonie), která byla potkanům aplikována endotracheální rourkou přímo do průdušnice (intratracheální aplikace). Rozvoj IPA infekce byl monitorován *in vivo* s využitím PET/CT zobrazování, které bylo realizováno 1 hodinu po retroorbitální aplikaci ^{68}Ga značeného TAFC (aktivita 4-6 MBq). Po provedení PET/CT zobrazování byli potkani usmrceni předávkováním ketaminem/xylazinem v poměru 2:1 a potkaní plíce byly odebrány pro další detailní studium IPA infekce pomocí technik hmotnostně spektrometrického zobrazování. K hmotnostně spektrometrickému zobrazování byly odebírány tři typy vzorků potkaních plic: kolabované plíce infikované houbou *A. fumigatus*, infikované plíce fixované pHPMA polymerem⁸⁶ a kontrolní plíce odebrané jedincům, kterým byl podán jen lék na potlačení imunitní reakce organismu (cyklofosfamid) a preventivní dávky antibiotik. Vzorky potkaních plic byly ihned po extrakci z těla zvířete hluboce zmrazeny v kapalném dusíku a následně uchovány k dalšímu zpracování při teplotě -80 °C.

5.3.4 Příprava vzorků a histologické barvení

Před vlastní přípravou tenkých řezů byly vzorky potkaních plic ponechány při teplotě -20 °C v kryomikrotomu po dobu 60 minut a poté krájeny kryomikrotomem CM1950 (Leica, Německo) na řezy o tloušťce 15 μ m pro SEM a 30 μ m pro LA-ICP-MS zobrazování. Řezy tkání byly přeneseny na předem vychlazená ITO sklíčka, tepelně fixovány a následně vakuově sušeny v exikátoru po dobu 40 minut. V této fázi byly pořízeny optické obrazy jednotlivých tkání pomocí skeneru HP Scanjet 4890 s rozlišením 4 800 dpi. Takto připravené vzorky tenkých řezů kontrolních a infikovaných tkání byly histologicky barveny modifikovaným postupem barvení dle Grocotta (GMS – „*Grocott-Gomori's methenamine silver stain*“) zahrnujícím kontrastní barvení Eosinem. Barvení dle Grocotta je založeno na selektivní redukci stříbra na mukopolysacharidových složkách buněčné stěny houby *A. fumigatus*, čímž dochází k jejímu

zviditelnění v důsledku vzniku charakteristického černého zbarvení vyredukovaného elementárního stříbra. K histologickému vyhodnocení přítomnosti IPA infekce byl použit optický mikroskop Leica DM2000 (Leica, Německo) a následné semikvantitativní vyhodnocení rozsahu IPA infekce založené na porovnání poměru počtu černých pixelů vyredukovaného stříbra a celkové zkoumané plochy⁸⁷ bylo provedeno v programu ImageJ⁸⁸.

5.3.5 Příprava kalibračních standardů s přizpůsobenou maticí

Kalibrační standardy pro LA-ICP-MS byly připraveny dle modifikovaného metodického postupu přípravy kalibračních standardů s přizpůsobenou maticí⁸⁹. Hluboce zmrazené potkaní plíce (-80 °C) byly temperovány přes noc na laboratorní teplotu a následně několikrát opláchnuty deionizovanou vodou pro odstranění zbytků krve. Promytá tkáň byla homogenizována polykarbonátovým dispergačním nástavcem připojeným k ULTRA-TURRAX[®] T 18 basic homogenizátoru (IKA[®], Německo) s možností plynulé regulace rychlosti otáček. Částečně homogenizovaná tkáň byla uschována přes noc při teplotě 4 °C. K připraveným alikvótním podílům byly napipetovány přídavky standardního roztoku železa tak, aby výsledná koncentrace odpovídala přídavku 0; 50; 100; 150 a 200 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ železa. Pro minimalizaci vlivu ředění matrice kalibračních standardů nesmí celkový objem přídavku standardního roztoku železa překročit 20 μl . Každý kalibrační standard byl následně homogenizován po dobu 5 minut při 5000 $\text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$ a uchováván k dalšímu zpracování (testování homogenity, LA-ICP-MS mapování) v polypropylenových mikrozkuškových při teplotě -80 °C. Pro testování homogenity roztokovou ICP-MS analýzou byly z každého matričního kalibračního standardu (po 10 sekundové homogenizaci) odebrány tři 50 mg alikvótní podíly. Vzorky kalibračních standardů byly naváženy do teflonových mineralizačních kelímků, kde k nim byla přidána mineralizační směs složená z 2 ml 65 % kyseliny dusičné a 1 ml 30 % peroxidu vodíku. Takto připravené vzorky byly rozkládány v mikrovlnném rozkladném systému MLS 1200 mega umožňujícího souběžný rozklad v šesti teflonových mineralizačních kelímcích. K mineralizaci byl použit softwarově řízený víceřadový rozkladný program (Tab. 5.3). Vychlazené mineralizáty byly kvantitativně převedeny do 25 ml odměrných baněk a doplněny po rysku deionizovanou vodou. Slepý pokus byl připraven z 2 ml 65 % kyseliny dusičné a 1 ml 30 % peroxidu vodíku. Koncentrace železa byla stanovena ORS-ICP-MS Agilent 7700x. Pro kvantitativní stanovení koncentrace železa technikou LA-ICP-MS byla sada tenkých řezů matričních kalibračních standardů připravena dle postupu uvedeného v kap. 5.3.4.

Na druhou stranu kvantitativní LA-ICP-MS analýza stříbra a zlata byla založena na využití sady šesti matričních kalibračních standardů připravených nakápnutím 0,2 µl standardních roztoků Ag a Au (0; 0,1; 1; 10; 100 a 1 000 µg.g⁻¹) přímo na povrch 30 µm řezu zhomogenizované potkaní plicní tkáně³⁴.

Tab. 5.3 Rozkladný program

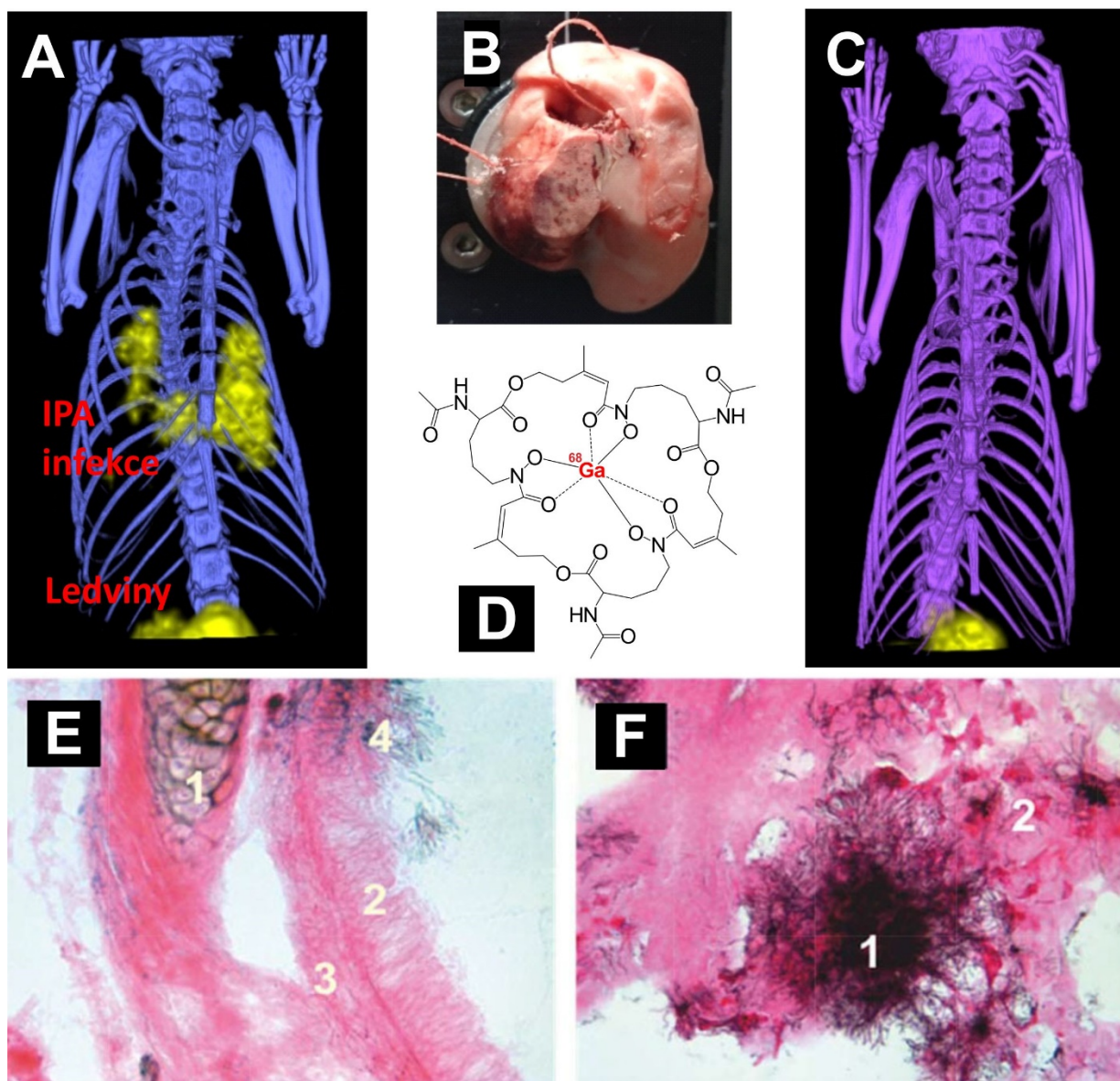
Krok	Doba trvání kroku (min)	Výkon (W)
1	2	250
2	2	0
3	5	400
4	2	0
5	2	500
6	2	0
7	6	600

Ventilace: 10 min

5.4 Výsledky a diskuze

5.4.1 Monitorování invazivní plicní aspergilózy v potkaních plicích

Jelikož by v případě popsaného potkaního modelu experimentální aspergilózy imunodeficientní jedinci nepřežili více než 5 až 6 dnů od intratracheální aplikace spor *A. fumigatus*, proto byli potkani usmrceni již třetí den. Jak již bylo zmíněno, tak před jejich usmrcením bylo u vybraných jedinců provedeno *in vivo* zobrazování rozšíření IPA infekce pomocí PET/CT a poté byly odebrány vzorky infikovaných kolabovaných plic, infikovaných plic fixovaných pHPMA polymerem a kontrolních plic (Obr. 5.3B). Princip PET zobrazování IPA infekce je založen na využití velice podobných vlastností radioizotopicky značeného ^{68}Ga -TAFC (Obr. 5.3D) a ^{56}Fe -TAFC (ferri-forma TAFC produkovaná *A. fumigatus*). Po retroorbitální aplikaci ^{68}Ga -TAFC dochází rovněž k jeho specifickému a selektivnímu vychytávání houbou *A. fumigatus*, což umožňuje *in vivo* zobrazení oblastí potkaních plic postižených IPA infekcí⁷⁵. Detekční limit PET zobrazování se pohybuje v rozmezí 10^{-11} až 10^{-12} mol.l⁻¹ (cit.⁹⁰). U většiny infikovaných jedinců byla invazivní plicní aspergilóza lokalizována v obou plicních lalocích, avšak s různým rozsahem ložisek IPA infekce (Obr. 5.3A). Signál ^{68}Ga -TAFC byl také detekován v dalších orgánech potkanů, a to konkrétně v ledvinách, zažívacím traktu a močovém měchýři, které jsou však součástí vylučovací cesty radioizotopicky značeného ^{68}Ga -TAFC (Obr. 5.3A,C) Ke studiu rozšíření IPA infekce bylo využito i histologického vyšetření přítomnosti hyf *A. fumigatus* v plicní tkáni (barvení dle Grocotta), které rovněž odhalilo rozsáhlá ložiska IPA infekce v plicích infikovaných jedinců projevující se četným prorůstáním hyf houby *A. fumigatus* z plicní tkáně do prostoru bronchiolů a alveol (Obr. 5.3E,F).



Obr. 5.3 Vizualizace invazivní plicní aspergilózy v potkaních plicích. 3D projekce PET/CT dat pro potkana infikovaného houbou *A. fumigatus* (A) a neinfikovaného (kontrolního) potkana (C), kterým byl retroorbitálně aplikován radioizotopicky značený ^{68}Ga -TAFC (D). Infikovaná plicní tkáň v kryomikrotomu (B). Tenký řez infikované tkáně obarvený modifikovaným postupem barvení dle Grocotta detailně znázorňující jednotlivé části stěny průdušnice (E): hyalinní chrupavka (1), řasinkový cylindrický epitel (2), pojivová tkáň (3), hyfy *A. fumigatus* (4). Prokázání přítomnosti IPA infekce v řezu infikované plicní tkáně (F): mycelium houby *A. fumigatus* (1), krvácení (2).

5.4.2 Vliv optimalizace průtoku helia kolizní celou na LOD, LOQ a SNR

Hlavním omezením LA-ICP-MS zobrazování nízkých koncentrací biologicky relevantních kovů s vysokým rozlišením je zejména nedostatečná citlivost, a to z důvodu vysokého pozadí způsobeného přítomností polyatomických interferencí. V případě podmínek tzv. suchého plazmatu vytvářeného během LA-ICP-MS jsou hlavním zdrojem polyatomických interferencí především nečistoty v nosném plynu (CO_2 , N_2 , H_2O a O_2). Pro potlačení spektrálních interferencí během LA-ICP-MS zobrazování se stejně jako u konvenční roztokové ICP-MS analýzy využívá buďto hmotnostních spektrometrů s vysokým rozlišením nebo kolizně/reakčních cel. Avšak využití kolizně/reakčních cel pro LA-ICP-MS zobrazování není rozšířené, a to především z důvodu poklesu intenzity signálu pro analyt⁹¹. Tedy v případě LA-ICP-MS zobrazování biologicky relevantních pomocí hmotnostních spektrometrů vybavených kolizně/reakční celou je nutné provádět nejen optimalizaci nastavení parametrů laserové ablace (energie laseru, frekvence, průtoky nosného plynu), ale i optimalizaci průtoku kolizního či reakčního plynu skrze kolizně/reakční celou. Pro optimalizaci průtoku helia oktapólovou kolizně/reakční celou ORS-ICP-MS Agilent 7700x v rozmezí 0,0 až 2,5 ml.min⁻¹ bylo využito opakované ablace matričního kalibračního standardu s koncentrací 50 $\mu\text{g.g}^{-1}$ železa. Intenzitní data byla sbírána po dobu 2 minut, kdy prvních 10 a posledních 30 sekund byl zaznamenáván signál pozadí nosného plynu. Intenzitní data byla pro daný průtok kolizního plynu měřena ve třech nezávislých replikách. Průměrné hodnoty intenzity signálu pozadí a analytu byly použity pro výpočet meze detekce (LOD), meze stanovitelnosti (LOQ) a poměru signálu k šumu (SNR- „Signal to noise ratio“). K výpočtu LOD, LOQ a SNR byly použity následující rovnice:⁹¹

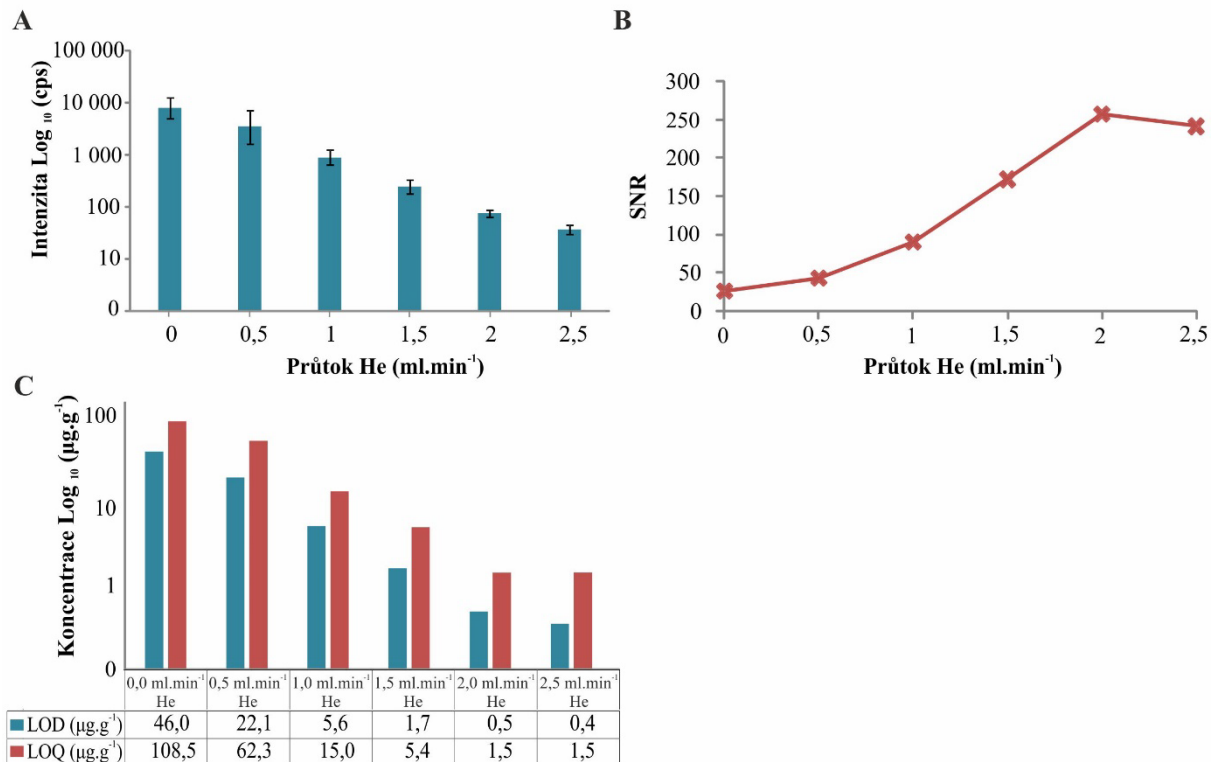
$$LOD = y_0 + 3s_0 \quad (1)$$

$$LOQ = y_0 + 10s_0 \quad (2)$$

$$SNR = \frac{y_c + x_c}{y_0}, \quad (3)$$

kde y_0 je průměr intenzity signálu pozadí nosného plynu, s_0 je směrodatná odchylka intenzity signálu pozadí nosného plynu, y_c je průměr intenzity signálu analytu, x_c je ověřená koncentrace železa v matričním kalibračním standardu.

Ze získaných výsledků vyplývá, že během postupného zvyšování průtoku helia kolizní celou dochází k výraznému snižování intenzity signálu pozadí nosného plynu pro izotop ^{56}Fe (Obr. 5.4A). Tento trend lze vysvětlit skutečností, že s rostoucím průtokem helia se zvyšuje tlak v kolizní cele, čímž se zvýší počet (pravděpodobnost) ion-molekulových kolizí iontů analytu ($^{56}\text{Fe}^+$) a interferentu (např. $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$) s kolizním plynem vedoucích k efektivnější eliminaci významných polyatomických interferencí. Navíc klesající pozadí železa vedlo k významnému zvyšování poměru signálu k šumu, který pro průtok $2,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ helia dosáhl svého maxima (Obr. 5.4B). Vliv průtoku helia kolizně/reakční celou na hodnoty LOD a LOQ pro izotop ^{56}Fe je znázorněn na Obrázku 5.4C. S rostoucím průtokem helia dochází k výraznému zlepšení meze detekce a stanovitelnosti, které v případě optimálního průtoku helia ($2,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) dosáhly hodnot $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Fe pro LOD a $1,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Fe pro LOQ. LA-ICP-MS mapování distribuce železa bylo tedy provedeno s využitím kolizně/reakční cely a průtoku helia $2,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Použití kolizně/reakční cely pro LA-ICP-MS zobrazování železa vedlo ke snížení LOD a LOQ, zvýšení poměru signálu k šumu a zejména ke snížení pozadí železa ovlivňující správnost a přesnost kvantitativního stanovení, ale i kvalitu získaných 2D map distribuce železa v kontrolní a infikované plicní tkáni.

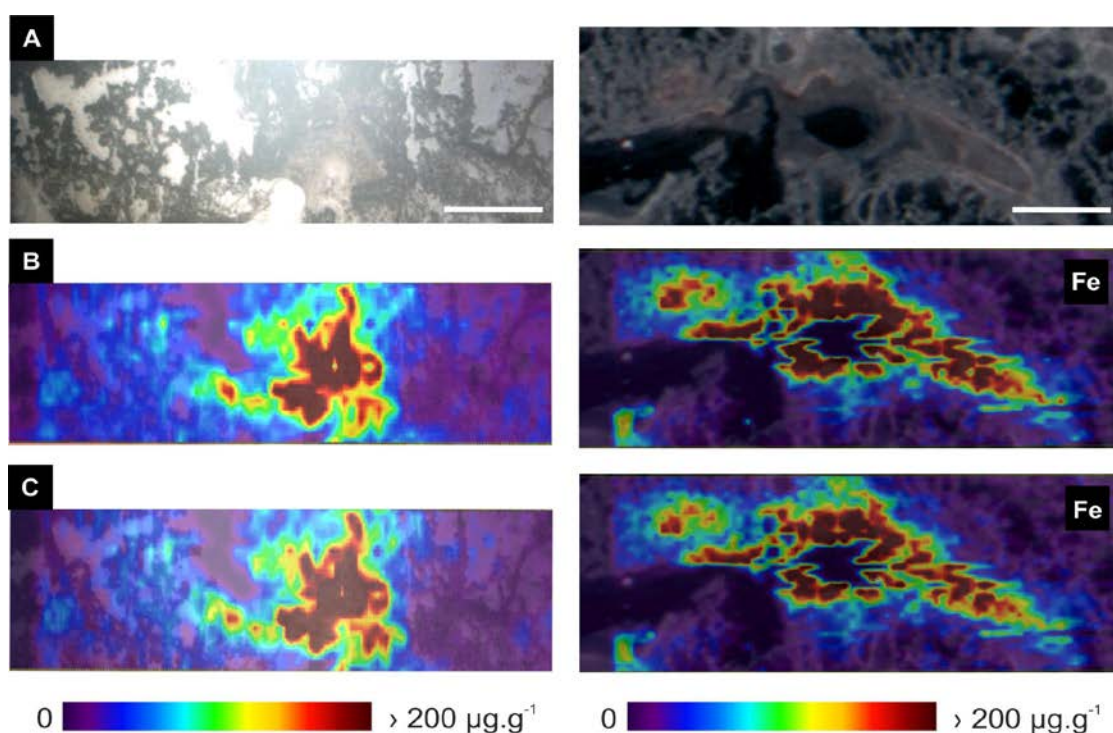


Obř. 5.4 Optimalizace průtoku He kolizně/reakční celou v rozmezí 0,0 až 2,5 ml.min⁻¹ pro izotop ⁵⁶Fe. (A) Změna intenzity signálu pozadí nosného plynu na průtoku He (intenzita log₁₀ (cps – „counts per second“) vs průtok He (ml.min⁻¹). (B) Závislost poměru signálu k šumu na průtoku He. (C) Vliv průtoku helia kolizně/reakční celou na vypočtené hodnoty LOD a LOQ (µg.g⁻¹). LA-ICP-MS data byla nasbírána s šířkou laserového svazku 30 µm.

5.4.3 LA-ICP-MS zobrazování železa v plicní tkáni

První část experimentální práce byla zaměřena na studium prostorové distribuce desferri a ferri-forem mikrobiálních sideroforů produkovaných patogenní houbou *A. fumigatus*, jakožto potenciálních markerů rozšiřující se IPA infekce. Prvotní aplikovanou hmotnostně spektrometrickou technikou bylo MALDI-MS zobrazování s využitím hmotnostního spektrometru s vysokým rozlišením Solarix 12T FT-ICR (Bruker Daltonics, Německo). Bohužel molekulární přístup zobrazování mikrobiálních sideroforů nebyl úspěšný, a to buď z důvodu nekompatibility ionizačních procesů s fixačním polymerem na bázi pHPMA, anebo kvůli limitovanému dynamického rozsahu MALDI-MS zobrazování. Z tohoto důvodu jsme se zaměřili na zobrazování prostorové distribuce železa navázaného do komplexu s mikrobiálními siderofory pomocí LA-ICP-MS zobrazování. K LA-ICP-MS zobrazování bylo využito sady 30 µm řezů plicní tkáně sestávající se z kontrolních vzorků, infikovaných vzorků kolabovaných plic, infikovaných vzorků fixovaných pHPMA polymerem. V porovnání

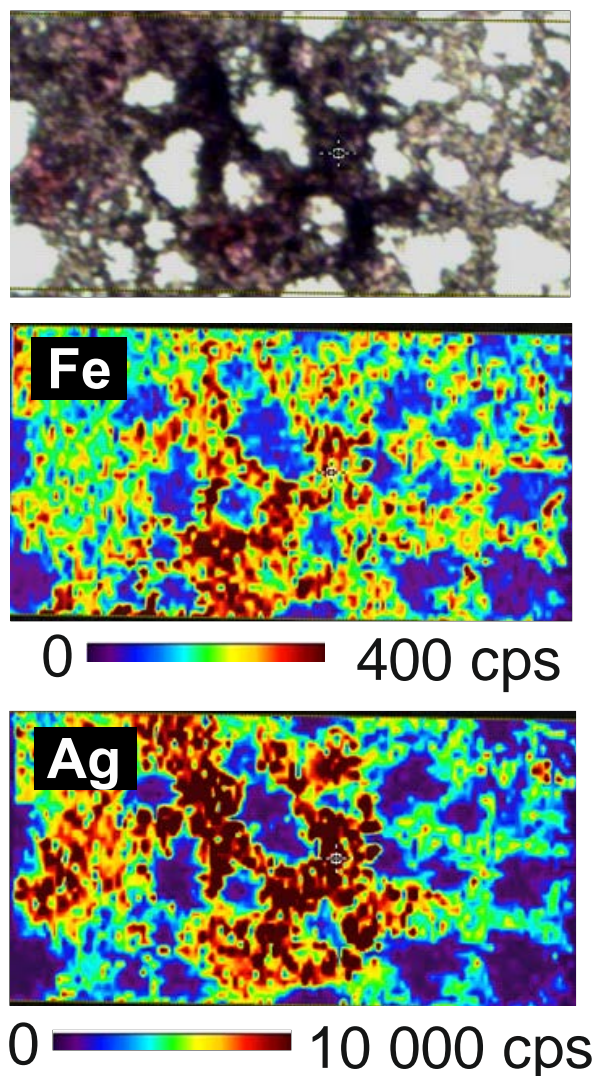
s kontrolní tkání, kvantitativní LA-ICP-MS analýza prokázala přibližně 20-ti násobné zvýšení koncentrace železa v oblastech postižených IPA infekcí (Obr. 5.5). Významné zvýšení koncentrace železa tak může souviset přímo s IPA infekcí, a to v důsledku výskytu ferri-forem sekundárních metabolitů, zejména pak sideroforů, zodpovědných za „krádež“ železa z organismu hostitele anebo ukládání železa v hyfách a konidiích houby *A. fumigatus*. Na druhou stranu, rozšíření IPA infekce může být často spojeno s rozsáhlým krvácením v plicní tkáni, kdy pozadí železa z hemu může zhoršit správnost a přesnost stanovení koncentrací železa odpovídající skutečnému obsahu ferri-forem sekundárních metabolitů.



Obr. 5.5 LA-ICP-MS zobrazování IPA infekce. (A) Optický obraz IPA infekce, odpovídající 2D mapy prostorové distribuce ^{54}Fe (B) a ^{56}Fe (C) v infikované plicní tkáni. LA-ICP-MS data byly nasbírány s šířkou laserového svazku $30 \mu\text{m}$, měřítko $500 \mu\text{m}$.

Vliv pozadí (interference) hemového železa byl dále studován pomocí LA-ICP-MS zobrazování železa a stříbra ve vzorku infikované plicní tkáně předem obarvené dle Grocotta (specifická vazba Ag na mukopolysacharidové složky buněčné stěny *A. fumigatus*). Z výsledků vyplývá, že interference hemového železa není tak významná, jelikož 2D mapa stříbra je prakticky totožná s 2D mapou železa a kromě toho se obě mapy plně shodují s optickým obrazem infikované oblasti po histologickém barvení (Obr. 5.6). Navíc bylo zjištěno,

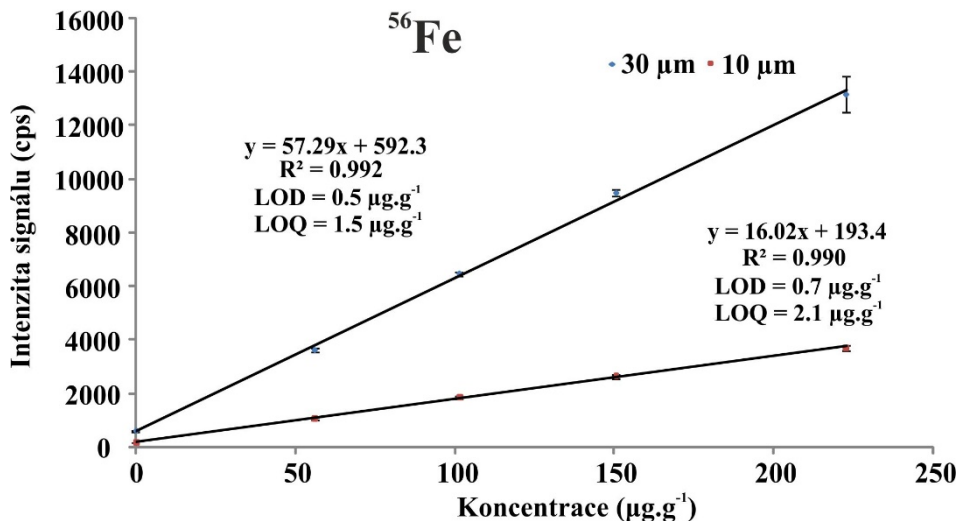
že LA-ICP-MS poskytuje výrazně lepší dynamický rozsah pro zobrazování stříbra specificky navázaného na buněčné stěny houby *A. fumigatus* během barvení dle Grocotta.



Obr. 5.6 Porovnání výsledků LA-ICP-MS mapování distribuce ^{56}Fe a ^{107}Ag v infikované plicní tkáni s optickým obrazem IPA infekce po barvení dle Grocotta. LA-ICP-MS data byly nasbírány s šířkou laserového svazku 10 μm (intenzita signálu vyjádřena v cps - „counts per second“).

Kvantitativní stanovení železa bylo založeno na využití dat získaných opakovanou LA-ICP-MS analýzou pěti kalibračních standardů s přizpůsobenou maticí na koncentrační hladině 0 (slepý vzorek), 60, 100, 150 a 220 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Fe. Z každého kalibračního standardu byla opakovaně provedena analýza dvou linií bodů s délkou 1,5 mm. Po odečtení signálu pozadí byly průměry naměřených intenzit vynášeny do kalibračního grafu proti skutečným koncentracím získaným roztokovou ICP-MS analýzou po předchozí mikrovlnné mineralizaci.

Kalibrační závislosti pro jednotlivé velikosti laserového svazku 10, 30 μm jsou společně s odpovídajícími mezemi detekce a stanovitelnosti uvedeny na Obr. 5.7.



Obr. 5.7 Kalibrační graf pro železo získaný LA-ICP-MS analýzou pětice kalibračních standardů společně s přizpůsobenou maticí a odpovídající mezemi detekce a stanovitelnosti (intenzita signálu vyjádřena v cps - „counts per second“).

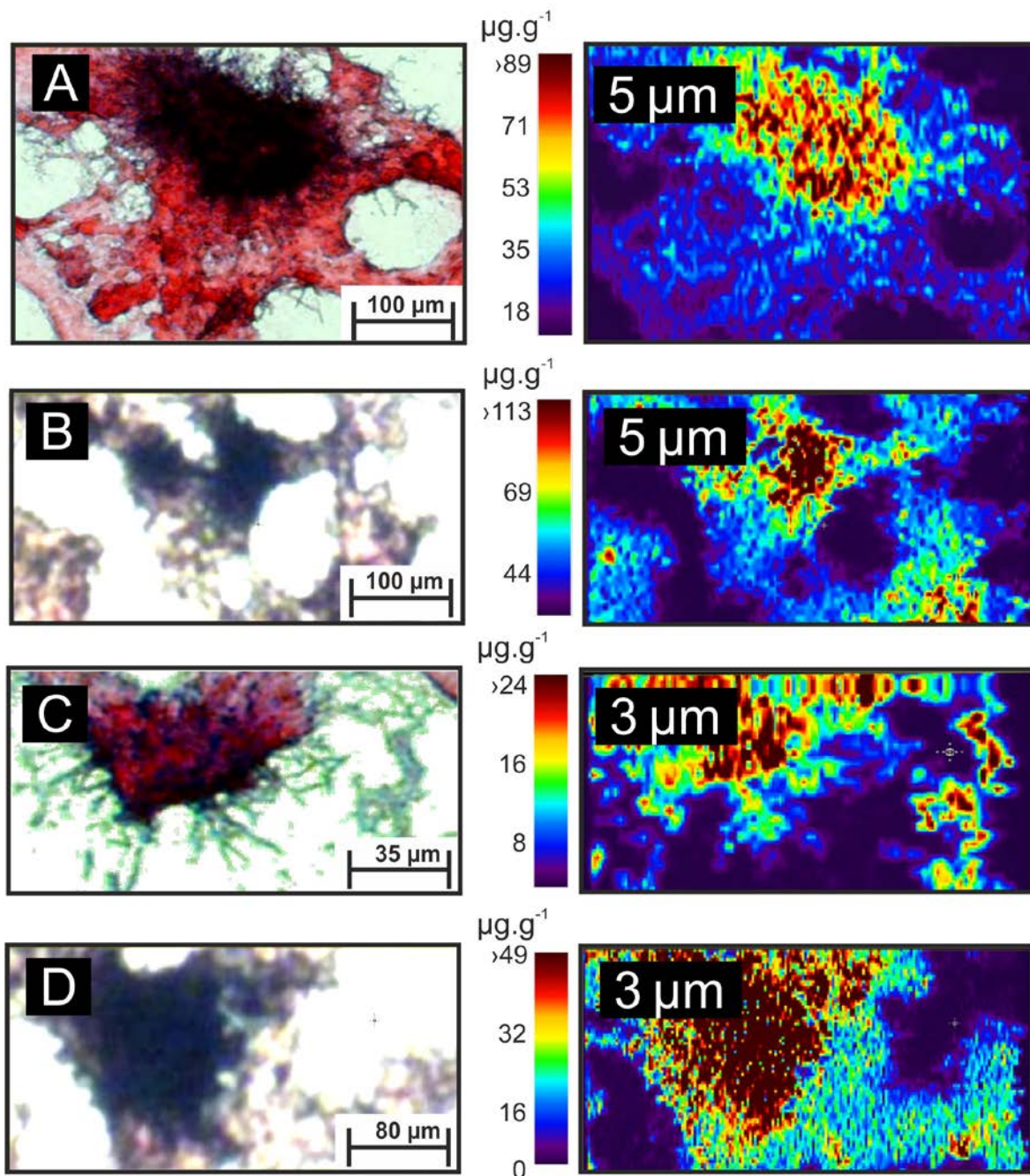
Kvantitativní LA-ICP-MS analýza přibližně 20-ti násobné zvýšení koncentrace železa v oblastech postižených IPA infekcí. Nárůst koncentrace železa v uvedených oblastech tak může souviset přímo s přítomností ferri-forem sekundárních metabolitů, zejména sideroforů. Kromě toho LA-ICP-MSI nabízí výrazně lepší dynamický rozsah pro zobrazování stříbra, které je specificky redukováváno na buněčné stěně *A. fumigatus* během histologického barvení dle Grocotta.

5.4.4 Mapování stříbra a zlata jako specifických markerů IPA infekce v plicní tkáni

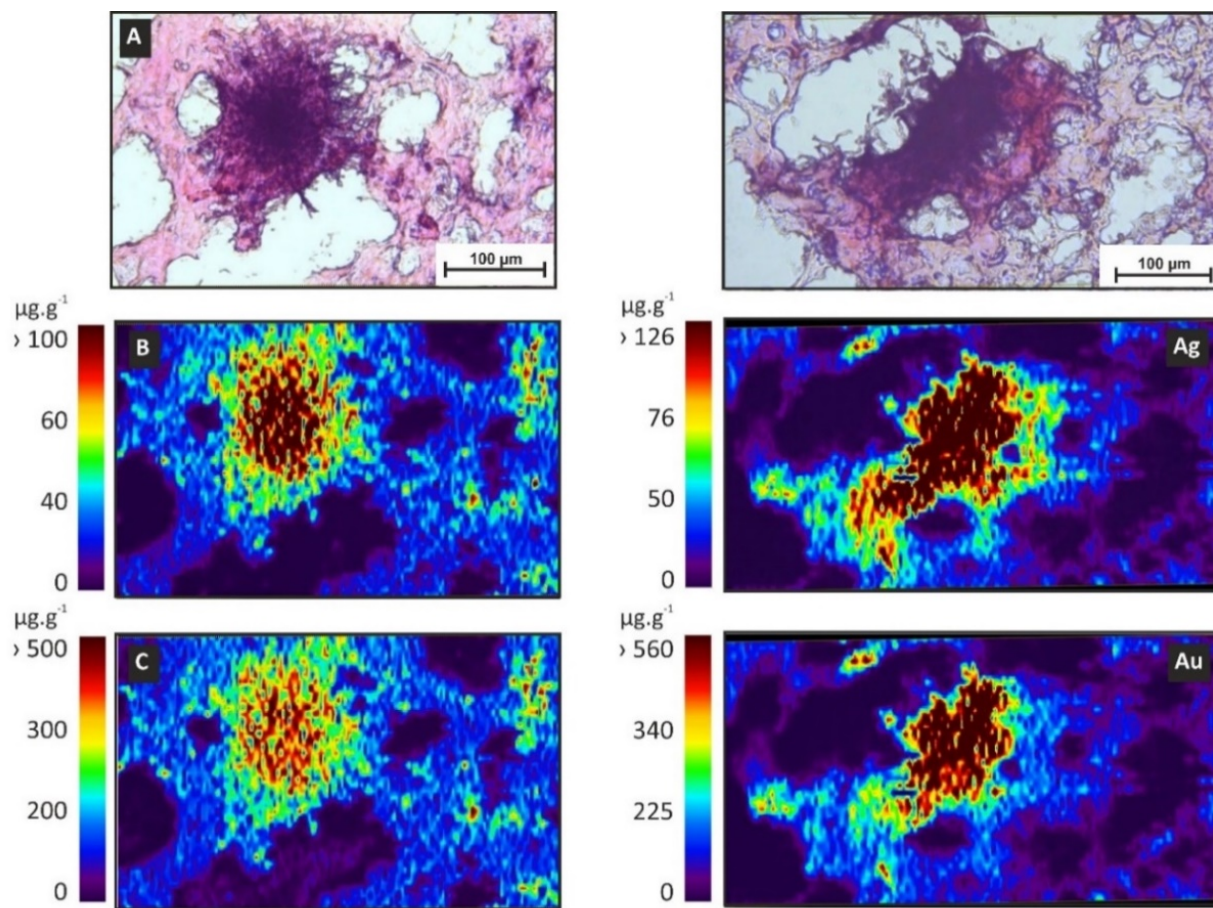
Další významnou aplikací LA-ICP-MS v kontextu multimodálního zobrazování IPA infekce bylo mapování distribuce stříbra a zlata specificky navázaných na mukopolysacharidové složky buněčné stěny houby *A. fumigatus* během histologického barvení dle Grocotta. Díky nízkým mezím detekce ($0,03 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) a nízkému chemickému pozadí pro oba prvky bylo možné snížit velikost laserového svazku (spotu) pro LA-ICP-MS zobrazování na 3–5 μm , což prakticky odpovídá rozměrům jednotlivých hyf houby *A. fumigatus* s velikostí 2 až 3 μm . V rámci LA-ICP-MS zobrazování byly testovány dva rozdílné protokoly sušení řezů po histologickém barvení, a to sušení provedené sérií roztoků se zvyšujícím se obsahem ethanolu (50, 70, 80, 90, 95 a 100 %) anebo sušení za pomoci vakua v exikátoru po dobu 40 minut. Sušení tenkých řezů stoupající řadou ethanolu se prokázalo být méně citlivé, jelikož během něj docházelo ke ztrátám malé části vyredukovaného stříbra a zlata (Obr. 5.8 a Obr. 5.9). Nicméně vzhledem k velmi nízkému pozadí stříbra v plicní tkáni ($<0,45 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) bylo i pro 2D mapy s velikostí pixelu 3 μm dosaženo dostatečného kontrastu umožňujícího jednoznačnou identifikaci rozšiřující se IPA infekce (Obr. 5.8C,D). Kvantitativní LA-ICP-MS mapování selektivně vyredukovaného stříbra definuje možnost jeho využití jako selektivního markeru pro monitorování rozšiřující se IPA infekce.

Obdobných výsledků bylo dosaženo i v případě LA-ICP-MS mapování navázaného zlata s velikostí laserového svazku 5 μm . Specifické navázání zlata na buněčnou stěnu *A. fumigatus* nastává během tónování GMS barvených řezů 0,2 % roztokem chloridu zlatitého, kdy dochází k selektivní iontové výměně vyredukovaného stříbra za ionty zlata z roztoku chloridu zlatitého. K současnému LA-ICP-MS zobrazování stříbra a zlata bylo rovněž využito sady GMS barvených 30 μm řezů plicních tkání sestávající se z kontrolního vzorku, infikovaného vzorku sušeného po GMS barvení stoupající řadou ethanolu a infikovaného vzorku sušeného za pomoci vakua. Výsledné 2D mapy prostorové distribuce stříbra a zlata přináší spolehlivý obraz rozšiřující se IPA infekce v plicní tkáni infikované houbou *A. fumigatus*. Mimoto LA-ICP-MS zobrazování poskytuje vynikající korelaci charakteristických znaků (rysů) IPA infekce vůči standardnímu histologickému vyšetření založeném na vyhodnocení GMS barveného preparátu metodami optické mikroskopie (Obr. 5.9). Na rozdíl od optické mikroskopie, LA-ICP-MS zobrazování nabízí citlivé

a selektivní kvantitativní stanovení obou prvků, které může pomoci mikrobiologům zejména v diagnostice nejednoznačných případů IPA infekce.

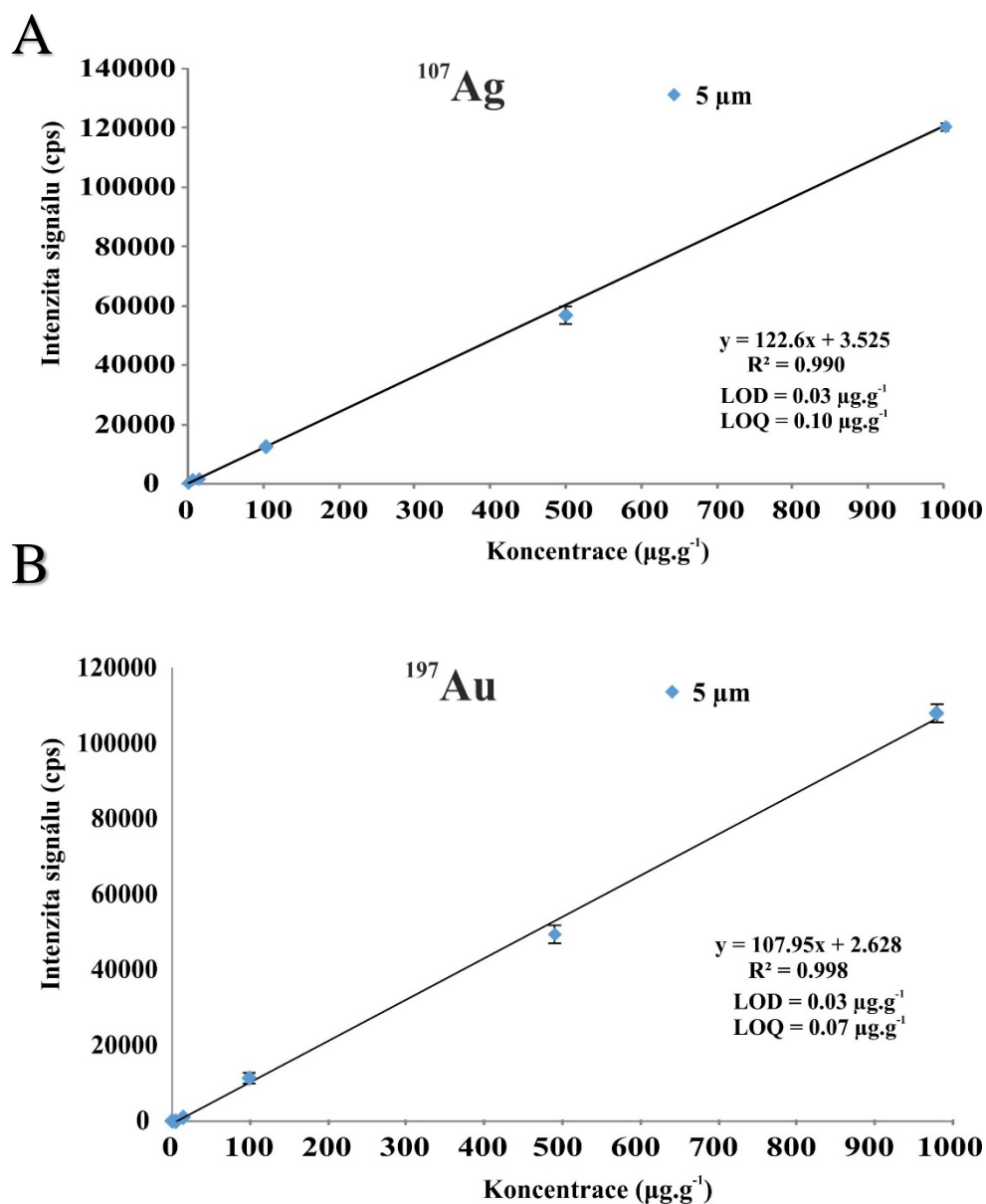


Obr. 5.8 LA-ICP-MS zobrazování IPA infekce. (vlevo) Optický obraz IPA infekce, (vpravo) odpovídající 2D mapy prostorové distribuce ^{107}Ag v infikované plicní tkáni. LA-ICP-MS data byla nasbírána se šířkou laserového svazku 3 nebo 5 μm a vysušení řezů po GMS barvení byla provedena stoupající řadou ethanolu (A, C) nebo za pomoci vakua v exikátoru (B, D).



Obr. 5.9 LA-ICP-MS zobrazování IPA infekce. (A) Optický obraz IPA infekce, odpovídající 2D mapy prostorové distribuce ^{107}Ag (B) a ^{197}Au (C) v infikované plicní tkáni. LA-ICP-MS data byla nasbírána s šířkou laserového svazku $5\ \mu\text{m}$ a vysušení řezů po GMS barvení byla provedena stoupající řadou ethanolu (vlevo) nebo za pomoci vakua v exikátoru (vpravo).

Kvantitativní analýza specificky navázaného stříbra a zlata byla založena na využití dat získaných opakovanou analýzou šesti kalibračních standardů s přizpůsobenou maticí na koncentrační hladině 0 (slepý vzorek), 0,1; 1; 10; 100 a 1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Ag a Au. Kalibrační závislosti společně s odpovídajícími mezemi detekce a stanovitelnosti jsou uvedeny na Obr. 5.10.



Obr. 5.10 Kalibrační grafy pro stříbro (A) a zlato (B) získané LA-ICP-MS analýzou šestice matričních kalibračních standardů společně s odpovídajícími mezemi detekce a stanovitelnosti (intenzita signálu vyjádřena v cps - „counts per second“).

Dalším cílem experimentální práce bylo určit teoretické množství prvků desorbovaných z jednoho spotu či pixelu při LA-ICP-MS mapování s velikostí laserového svazku 3, 5, 10, 30 μm . K teoretickému odhadu bylo využito předpokladu, že při LA-ICP-MS mapování dochází ke kompletní ablaci vzorku, a tedy povrch ITO mikroskopického sklíčka je znovu obnoven. Pro výpočet množství desorbovaných prvků byla proto využita hmotnost (2,7 mg)

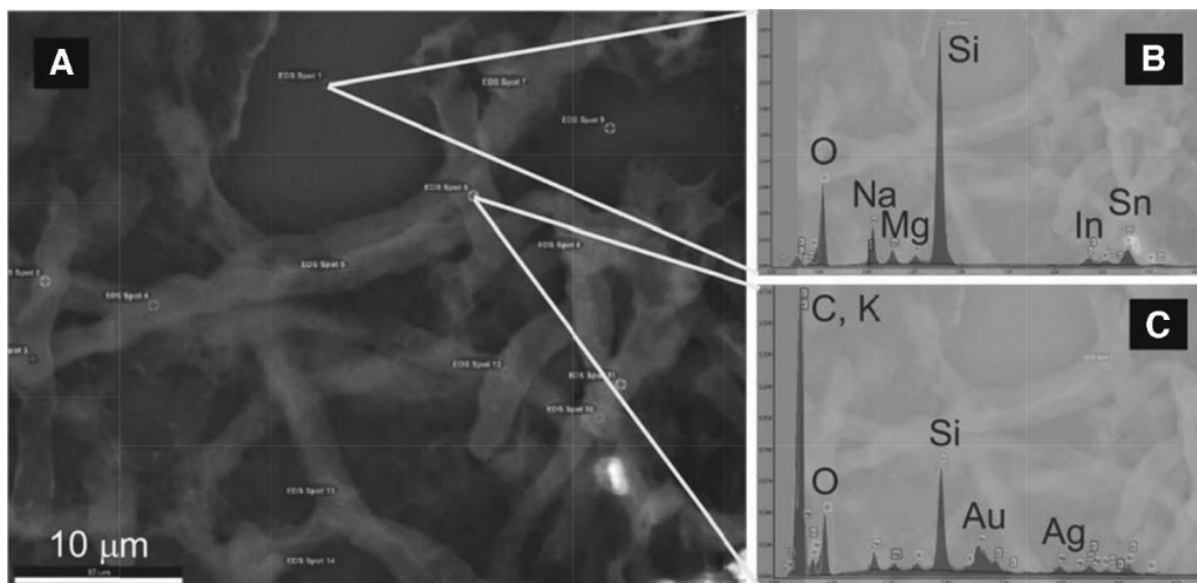
a skutečná plocha (189,22 mm²) 30 µm tenkého řezu kontrolní potkaní plíce fixované pHPMA polymerem, tepelně fixovaná tkáň byla vážena v mokřém stavu (w.w.-, „wet weight“). Odhadované teoretické množství desorbovaných prvků (Fe, Ag, Au) se pohybuje v rozsahu jednotek femtogramů (Tab. 5.4), a to i pro velikost laserového svazku 30 µm. Z čehož vyplývá, že ablatované množství vzorku je sice dostačující pro LA-ICP-MS zobrazování, ale zároveň nemusí být postačující molekulární přístup zaměřený na mapování prostorové distribuce jednotlivých forem sekundárních metabolitů *A. fumigatus*.

Tab. 5.4 Odhad teoretického množství prvků desorbovaných z jednoho spotu či pixelu na úrovni LOD a LOQ pro rozdílné velikosti laserového svazku (spotu) 3, 5, 10, 30 µm.

Prvek / velikost spotu	Hmotnost spotu (ng) w.w.	LOD (fg/kruhový spot)	LOQ (fg/ kruhový spot)	LOD (fg/pixel)	LOQ (fg/ pixel)
Ag 3 µm	0,10	0,01	0,02	0,01	0,02
Ag 5 µm	0,28	0,01	0,03	0,01	0,04
Fe 10 µm	1,12	0,80	2,40	1,00	3,00
Fe 30 µm	10,09	5,20	14,90	6,70	19,00

w.w. – „wet weight“

Masivní rozšíření invazivní plicní aspergilózy bylo dále potvrzeno pomocí skenovacího elektronového mikroskopu, který díky svému submikrometrickému rozlišení umožňuje získat morfologické detaily rozšíření hyf *A. fumigatus* napříč celou infikovanou plicní tkání (Obr. 5.11A). Mimo to byla na povrchu GMS barveného řezu infikované plicní tkáně provedena bodová SEM-EDS analýza za účelem stanovení matričních prvků odpovídajících složení jak povrchu ITO mikroskopického sklíčka (pozadí), tak i povrchu hyf houby *A. fumigatus*. V případě analýzy pozadí EDS analýza prokázala přítomnost křemíku, india a cínu pocházejících z ITO mikroskopického sklíčka, zatímco chemické pozadí pro Ag a Au bylo zanedbatelné (Obr. 5.11B). Na druhou stranu, EDS analýza povrchu hyfy potvrdila selektivní navázání stříbra a zlata na složky buněčné stěny *A. fumigatus* během barvení dle Grocotta (Obr. 5.11C).



Obr. 5.11 SEM zobrazování řezu tkáňe infikované houbou *A. fumigatus* (A) s vyznačenými body pro prvkovou analýzu (barvení dle Grocotta, 15 kV, primární zvětšení 8 000x), (B) ED spektrum pozadí povrchu ITO mikroskopického skla, (C) ED spektrum nasbírané z povrchu hyfy houby *A. fumigatus*.

5.5 Závěr

Multimodální zobrazování invazivní plicní aspergilózy v potkaním modelu ukázalo, že využití jediné zobrazovací techniky může být nedostatečné, a to zejména v případě studia prostorové distribuce sekundárních metabolitů jakožto potenciálních biomarkerů invazivních mykotických infekcí. Bohužel molekulární přístup mapování sekundárních metabolitů *A. fumigatus* nebyl úspěšný, jelikož během MALDI-MS zobrazování došlo k potlačení signálů mikrobiálních sideroforů, a to buď přítomností fixačního PHPMA polymeru anebo kvůli omezenému dynamickému rozsahu MALDI-MSI. Na druhou stranu LA-ICP-MS zobrazování prostorové distribuce železa prokázalo přibližně 20-ti násobné zvýšení koncentrace železa v regionech postižených IPA infekcí, kdy nárůst obsahu železa může souviset přímo s přítomností ferri-forem sekundárních metabolitů zodpovědných za „krádež“ železa z organismu hostitele anebo ukládání železa v hyfách a konidiích houby *A. fumigatus*. Dále LA-ICP-MS mapování specificky navázaného stříbra a zlata umožnilo detailní studium rozšiřující se IPA infekce v plicní tkáni infikované houbou *A. fumigatus*. Vzhledem k nízkému chemickému pozadí, nízkým detekčním limitům na koncentrační úrovni $0,03 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a unikátnímu dynamickému rozsahu pro oba kovy bylo možné provést kvantitativní LA-ICP-MS mapování s velikostí laserového svazku 3–5 μm, což by mohlo pomoci klinickým mikrobiologům zejména v diagnostice nejednoznačných případů výskytu IPA infekce.

Selektivní navázání stříbra a zlata na mukopolysacharidové složky buněčné stěny *A. fumigatus* společně s nízkým chemickým pozadím pro oba kovy bylo potvrzeno SEM-EDS, který využívá submikrometrického rozlišení elektronové mikroskopie. LA-ICP-MS zobrazování zlata a stříbra s prostorovým rozlišením 3–5 μm odpovídající prakticky velikosti jednotlivých hyf má značný potenciál stát se citlivější alternativou ke standardním vizualizačním postupům používaných v klinické mykologii.

6. Prostorové značky

6.1 Multimodální zobrazování a prostorové značky

Zobrazovací hmotnostní spektrometrie (MSI-„*mass spectrometry imaging*“) je jednou z nejvýznamnějších a nejrozšířenějších analytických technik poskytující detailní studium prostorové distribuce molekul a prvků v různorodých biologických vzorcích. Techniky MSI umožňují provést komplexní studium biologických vzorků od jednotlivých buněk, přes biopsie, orgány až po kompletní biologické systémy^{25,26,92}. Nejen proto je hmotnostně spektrometrického zobrazování hojně využíváno v oblastech biologie, biomedicíny, patologie, farmakologie, aj^{26,92,93}. Avšak žádná z komerčně dostupných MSI technik není sama o sobě schopna poskytnout kompletní informace o prostorové distribuci biologicky významných molekul a prvků na povrchu studovaných biologických tkání. Proto je pro detailní studium biologických vzorků považovaných za prostorově, morfologicky a metabolicky komplexní systémy využíván multimodální přístup kombinující možnosti elementárního a molekulárního zobrazování. V současnosti multimodální zobrazování využívá nejčastěji pětice komerčně dostupných MSI technik, a to MALDI-MS, DESI-MS, SIMS, laserové ablace ve spojení s ionizací elektrosprejem (LAESI) a LA-ICP-MS^{26,93}. Mimoto pro účely získání kompletních informací o patofyziologických změnách v biologických tkáních mohou být molekulární/prvkové 2D mapy dále porovnávány s výsledky histologického barvení (morfologické změny), imunohistochemického barvení (detailní distribuce vybraných proteinů podílejících se na patologických změnách) či fluorescenční mikroskopie (distribuce fluorescentních proteinů, účinnost signálních drah atd.). Správná interpretace takto získaných dat ale vyžaduje přesný překryv molekulárních/prvkových 2D map s příslušnými optickými snímky, což může být značně obtížné zejména v případech, kdy analyzovaná tkáň neobsahuje

charakteristické anatomické znaky. Navíc i molekulární/prvkové 2D mapy mohou být lehce posunuty (deformovány), a to v důsledku změny tvaru a velikosti řezu během krájení a fixace biologického vzorku či hardwarového nastavení iontového zdroje. V případě multimodálního zobrazování je pro správný a přesný překryv multimodálně nasbíraných dat nezbytné využít referenčních bodů tzv. prostorových značek (PZ, „*fiducial markers*“)⁹²⁻⁹⁴. Další významnou aplikací PZ je 3D zobrazování biologických tkání, kde jsou PZ využívány ke správnému a přesnému uspořádání celé série molekulárních/prvkových 2D map získaných zobrazováním konsekutivně odebíraných řezů do jediného trojrozměrného objektu^{92,95}.

Volba optimálního složení prostorové značky může být obtížná, a to zejména v případě multimodálního zobrazování s využitím kombinace MSI technik, optické mikroskopie, fluorescenční mikroskopie a histologického barvení. Základními požadavky kladenými na PZ je intenzivní zabarvení (optická mikroskopie), absorpce/emise při zvolené vlnové délce (fluorescenční mikroskopie), dostatečná účinnost ionizace ve vybraných iontových zdrojích a v neposlední řadě také zanedbatelná difúze během přípravy biologického vzorku či v průběhu histologického a imunohistochemického barvení.

Prvotní práce zaměřené na multimodální zobrazování s využitím PZ byly založeny na vkládání kovových jehel^{96,97} a teflonových tyčí⁹⁸ (různé průměry a tvary) do biologických tkání, bohužel žádná z uvedených PZ není kompatibilní s komerčně dostupnými technikami hmotnostně spektrometrického zobrazování. Mezi PZ vhodné pro MSI, optickou a fluorescenční mikroskopii patří PZ využívající směsi organických barviv či inkoustů. PZ na bázi kresylové violeti, Ponceau S a bromfenolové modři byly využity k 2D/3D zobrazování xenograftu rakoviny prsu pomocí MALDI-MSI a fluorescenční mikroskopie⁹². Zatímco komerční červený inkoust obsahující směs Rhodaminu B, inhibitoru koroze a N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-etansulfonové kyseliny (HEPES) byl použit k fúzi 2D map prostorové distribuce aktivních farmaceutických ingrediencí a pomocných látek na povrchu pevných lékových forem, které byly multimodálně nasbírané technikou DESI-MSI⁹⁴. Kromě PZ na bázi organických barviv bylo pro multimodální zobrazování potkaního mozku a vzorku rakoviny prsu technikami MALDI a SIMS využito i katodového naprašování tenkých a dobře definovaných PZ zlata s velikostí 500 x 500 μm ⁹³. Mezi další velmi významnou oblastí využití různých typů prostorových značek jsou zobrazovací metody používané v klinické praxi zahrnující magnetickou rezonanci (MRI)⁹⁹, pozitronovou emisní tomografii (PET)¹⁰⁰, počítačovou tomografii (CT) a cílenou protonovou léčbu¹⁰¹.

Cílem této práce bylo navrhnout a optimalizovat složení prostorové značky vhodné k přesnému a správnému překryvu molekulárních/prvkových 2D map získaných MALDI-MS, DESI-MS, LA-ICP-MS zobrazování s optickými snímky z histologického barvení (optická mikroskopie) a fluorescenční mikroskopie.

6.2 Experimentální část

6.2.1 Použité chemikálie a materiál

Rhodamin B (≥ 95 %, HPLC), kyselina mravenčí (98 %), kyselina trifluoroctová (99,0 %) byly dodány společností Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Poly[N-(2-hydroxypropyl)methakrylamid] (pHPMA, $M_w = 145\,000$) byl syntetizován modifikovanou reakcí methakryl chloridu s 1-aminopropan-2-olem v dichlormethanu za přítomnosti uhličitanu sodného¹⁰². Methanol, acetonitril a HPLC voda byly zakoupeny od firmy Merck Millipore (Praha, Česká republika). Kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA) a „*indium-tin oxide*“ (ITO) mikroskopická sklíčka (75 x 25 x 0,9 mm) byly dodány společností Bruker Daltonics (Brémy, Německo). Mikroskopická sklíčka „*Omni slides*“ potažená hydrofobní vrstvou teflonu byla zakoupena od firmy Prosolia, Inc (Indianapolis, IN, USA). Zlaté nanočástice o velikosti 100 nm byly dodány společností PerkinElmer Inc. (Waltham, MA, USA). CRM vodný kalibrační roztok Ag o koncentraci $1\,000 \pm 2$ mg.l⁻¹ byl zakoupen od firmy Analytika, spol. s.r.o. (Praha, Česká republika). Inzulinové injekční stříkačky Omnican 100 (vnější průměr 300 μ m) byly zakoupeny od firmy B. Braun (Praha, Česká republika).

6.2.2 Instrumentace

LA-ICP-MS zobrazování bylo provedeno s využitím laserového ablačního systému Analyte G2 (Photon Machines, USA) ve spojení s ORS-ICP-MS Agilent 7700x (Agilent Technologies, Japonsko). Parametry LA-ICP-MS zobrazování byly následující: hustota zářivé energie 2,12 J.cm⁻², frekvence 20 Hz, režim ablace liniový sken, průměr laserového svazku 85 μ m, rychlost pohybu vzorku 85 μ m.s⁻¹, průtok nosného plynu He 0,65 l.min⁻¹, příkon generátoru 1 200 W, průtok vnějšího plazmového plynu 15,0 l.min⁻¹, průtok středního plazmového plynu 0,9 l.min⁻¹, průtok pomocného/nosného plynu Ar 0,75 l.min⁻¹, průtok He

kolizní celou $2,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. LA-ICP-MSI data byla zpracovávána a vizualizována programem ImageLab (verze 2.18, Epina GmbH, Rakousko)⁸⁵.

Pro MALDI-MS zobrazování bylo využito hmotnostního spektrometru s vysokým rozlišením Solarix 12T FTICR (Bruker Daltonics, Německo). Parametry MALDI-MS zobrazování byly následující: výkon laseru 16 %, počet laserových pulzů 200, frekvence laseru 1 000 Hz, prostorové rozlišení $75 \text{ }\mu\text{m} \times 75 \text{ }\mu\text{m}$, pozitivní mód, hmotnostní rozsah 100-1 600 m/z . Z každého bodu bylo získáno jedno hmotnostní spektrum. MALDI MSI data byla zpracovávána a vizualizována programem FlexImaging (verze 4.1, Bruker Daltonics, Německo).

K DESI-MS zobrazování byl použit DESI 2D systém (Prosolia, Inc., USA) ve spojení s Synapt G2-Si hmotnostním spektrometrem (Waters Corporation, USA). Parametry DESI-MS zobrazování byly následující: sprejovací kapalina methanol:voda 9:1 (v/v), průtok sprejovací kapaliny $1,5 \text{ }\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, sprejovací napětí 5 kV, tlak zmlžovacího plynu 0,45 MPa, vzdálenost sprejovací špičky od povrchu vzorku $\sim 2 \text{ mm}$ a od vstupu do hmotnostního spektrometru 5 mm, velikost spotu $75 \text{ }\mu\text{m}$, rychlost pohybu vzorku $75 \text{ }\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, pozitivní mód, hmotnostní rozsah 100-1 200 m/z . Z každého bodu bylo získáno jedno hmotnostní spektrum. DESI MSI data byla zpracovávána a vizualizována programem HDImaging (verze 1.4, Waters Corporation, USA).

6.2.3 Analyzované vzorky, složení prostorových značek a jejich aplikace

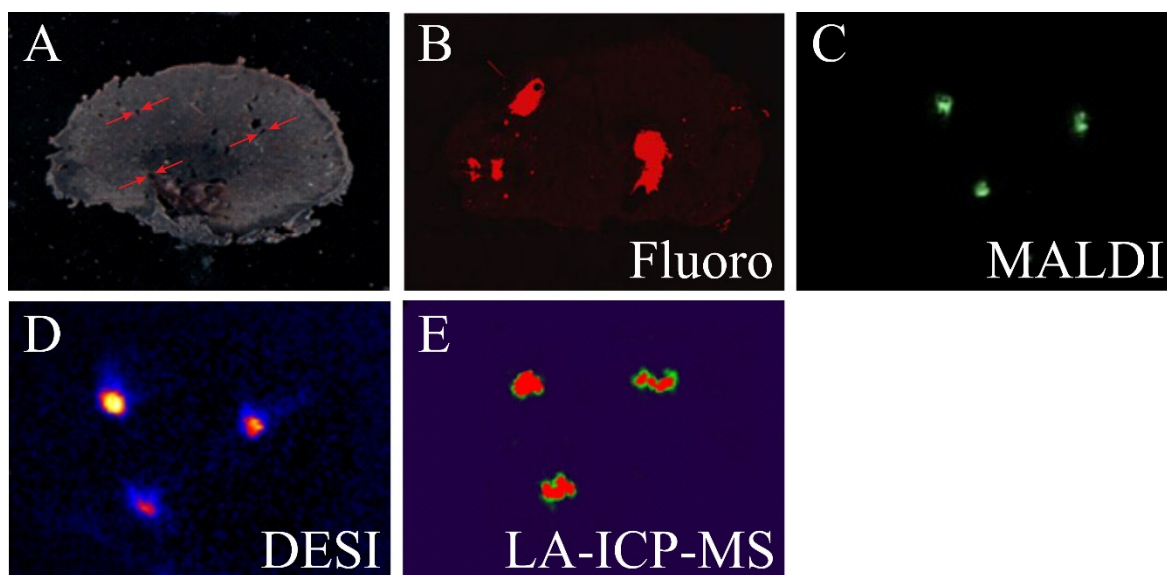
Vzorky myších ledvin byly získány od zdravých jedinců a ihned po vyjmutí z těla byly zmrazeny v kapalném dusíku a následně uchovány při teplotě -80°C . Před aplikací prostorových značek a vlastním krájením byly tkáně ponechány při teplotě -20°C po dobu 45 minut v kryomikrotomu CM1950 (Leica, Německo). Pro účely multimodálního zobrazování technikami MALDI-MS, DESI-MS LA-ICP-MS, optickou a fluorescenční mikroskopií bylo výsledné (optimální) složení PZ následující: $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ rhodaminu B, $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ iontového stříbra a $5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ nanočástic zlata připravených v roztoku obsahujícím $100 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ pHPMA. Takto připravená polymerní směs byla postupně aplikována do myší ledviny injekční stříkačkou s vnějším průměrem injekční jehly $300 \text{ }\mu\text{m}$, za vzniku tří prostorových značek rozmístěných do vrcholů pravoúhlého trojúhelníku tvořícího písmeno „L“. Po aplikaci PZ byly vzorky myších ledvin korunárně krájeny v předem definovaných vzdálenostech na řezy o tloušťce $10 \text{ }\mu\text{m}$ (MALDI-MSI), $20 \text{ }\mu\text{m}$ (DESI-MSI, optická a fluorescenční mikroskopie) a $30 \text{ }\mu\text{m}$ (LA-ICP-MSI) při teplotě -20°C pomocí kryomikrotomu

CM1950. Řezy tkání byly přeneseny buď na ITO sklíčko (MALDI-MSI, LA-ICP-MSI) a „*Omni slides*“ (DESI-MSI) nebo na standardní mikroskopická sklíčka (optická, fluorescenční mikroskopie) a poté tepelně fixovány. Vzorčky pro MALDI, LA-ICP-MS zobrazování, optickou a fluorescenční mikroskopii byly vakuově sušeny po dobu 40 minut v exsikátoru, zatímco vzorky pro DESI-MSI byly analyzovány bez jakéhokoliv další úpravy. V této fázi byly pořízeny optické obrazy jednotlivých tkání pomocí skeneru HP Scanjet 4890 s rozlišením 1 200 dpi (DESI) a 4 800 dpi (MALDI, LA-ICP-MS). Poté byla na vzorky pro MALDI-MSI rovnoměrně nanášena CHCA matrice (7 g.l⁻¹ v ACN:voda 50:50 (v/v) s 0,2 % kyselinou trifluoroctovou) s využitím přístroje ImagePrep (Bruker Daltonics, Německo) a přednastavené nanášecí metody.

6.3 Výsledky a diskuze

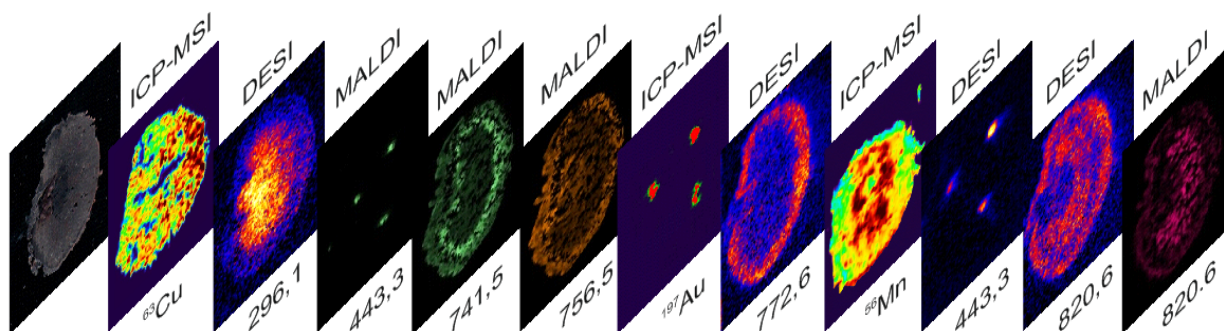
6.3.1 Prostorové značky, multimodální a 3D zobrazování myší ledviny

První část experimentální práce byla zaměřena na výběr optimálního složení PZ a na ověření jeho kompatibility s technikami MALDI-MS, DESI-MS, LA-ICP-MS zobrazování, optickou a fluorescenční mikroskopii. Výsledné složení PZ poskytovalo sytě fialovo-růžové zbarvení, které zůstalo nezměněno jak po aplikaci PZ do myší ledviny a opakovaném zmrazení vzorku na -80 °C, tak i během přípravy tenkých řezů a následném nanesení CHCA matrice pro MALDI-MSI. Unikátních vlastností rhodaminu B (intenzivní růžovo-fialové zbarvení, snadná ionizace a charakteristická fluorescence) bylo využito pro zobrazování rozmístění PZ na povrchu myší ledviny pomocí MALDI-MSI, DESI-MSI, optické a fluorescenční mikroskopie (Obr. 6.1A až D). Zatímco v případě LA-ICP-MS bylo rozmístění PZ určeno na základě detekce signálů odpovídajících stříbru (ve formě Ag⁺ iontů) a zlatu (100 nm nanočástice) přidaných do výsledné směsi PZ (Obr. 6.1E). Výsledné složení PZ tedy poskytuje intenzivní fialovo-růžové zbarvení (optická mikroskopie), intenzivní fluorescenci (fluorescenční mikroskopie), dobré ionizační vlastnosti rhodaminu B v pozitivním módu (MALDI-MSI, DESI-MSI) a intenzivní signál stříbra a zlatu pro LA-ICP-MSI.



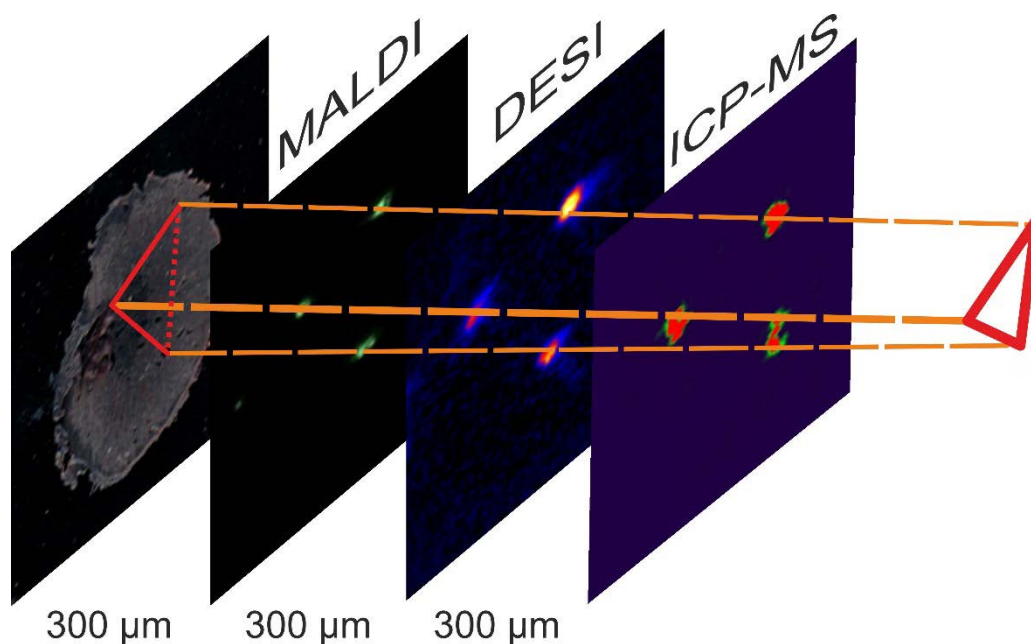
Obr. 6.1 Porovnání signálů PZ získaných pomocí (B) fluorescenční mikroskopie, (C) MALDI-MSI, (D) DESI-MSI (rhodamin B 443,3 m/z), (E) LA-ICP-MS (^{107}Ag , identická 2D mapa byla získána i pro signál ^{197}Au) s (A) optickým obrazem řezu myší ledviny.

Dále byly prostorové značky použity pro multimodální zobrazování molekul/prvků v myší ledvině. Po aplikaci PZ byla ledvinová tkáň krájena kryomikrotomem v předem definovaných vzdálenostech na tenké řezy, které byly následně upraveny dle postupů uvedených v kap. 6.2.3. V našem případě multimodální zobrazování zahrnovalo využití MALDI-MSI, DESI-MSI, LA-ICP-MSI společně s optickou a fluorescenční mikroskopií. Získaná 2D data byla zpracována a vizualizována příslušnými programy za vzniku 2D map distribuce molekul a prvků, které byly následně porovnávány s odpovídajícím optickým snímkem myší ledviny. Ke správnému a přesnému překryvu multimodálně nasbíraných dat bylo využito PZ respektive odpovídajících signálů pro jednotlivé komponenty PZ. Vzájemné uspořádání (překryv) vybraných molekulárních/prvkových 2D map s optickým snímkem analyzované myší ledviny je znázorněno na Obr. 6.2. Charakteristicky rozmístěných prostorových značek bylo úspěšně využito k vzájemnému překryvu multimodálně nasbíraných dat, což je nezbytné pro získání detailních informací o chemickém složení myších ledvin a prostorové distribuci biologicky významných prvků a molekul.



Obr. 6.2 Vzájemný překryv 2D map prostorové distribuce vybraných molekul (zejména lipidů) a biogenních prvků z multimodálně zobrazovacího experimentu s optickým snímkem myší ledviny. Součástí porovnání jsou i 2D mapy odpovídající prostorové distribuci třech PZ – 443.3 m/z (MALDI, DESI) ^{197}Au (LA-ICP-MS).

Poslední část prezentované práce byla zaměřena na studium možnosti aplikace PZ pro 3D multimodální zobrazování. Pro testování vhodnosti PZ pro 3D zobrazování myší tkáně bylo využito molekulárních/prvkových 2D map vzniklých analýzou tenkých řezů nakrájených v předem definovaných vzdálenostech (300 μm) napříč celou analyzovanou myší ledvinou. Ke správnému a přesnému překryvu multimodálně nasbíraných 2D map bylo využito PZ respektive odpovídajících signálů pro jednotlivé komponenty PZ. Vzájemné uspořádání jednotlivých molekulárních/prvkových 2D map prostorové distribuce prostorových značek na povrchu analyzované tkáně společně s optickým snímkem analyzované myší ledviny je znázorněno na Obr. 6.3. Uvedený příklad demonstruje význam aplikace PZ pro správné a přesné uspořádání multimodálně získaných molekulárních/prvkových 2D map za vzniku jediného trojrozměrného objektu analyzované biologické tkáně. Předpokladem pro přesnou rekonstrukci 3D struktury analyzované tkáně je současná vizualizace PZ na základě detekce fyzikálně-chemických vlastností jednotlivých složek PZ všemi použitými zobrazovacími technikami.



Obr. 6.3 Aplikace PZ pro 3D multimodální zobrazování biologických tkání. Vzájemný překryv 2D map prostorové distribuce PZ vzniklých analýzou tenkých řezů nakrájených v předem definovaných vzdálenostech napříč celou analyzovanou myší ledvinou. Detekovaný signál PZ – rhodamin B 443.3 m/z (MALDI-MS, DESI-MS) a ^{197}Au (LA-ICP-MS).

6.4 Závěr

Multimodální zobrazování vyžaduje použití vhodných prostorových značek pro správný a přesný překryv molekulárních/prvkových 2D map pro účely získání detailních informací o chemickém složení povrchu a prostorové distribuci biologicky významných prvků a molekul. Aplikované PZ složené z 20 mmol.l^{-1} rhodaminu B, 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ iontového stříbra a 5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ nanočástic zlata připravených v roztoku 100 mg.ml^{-1} pHPMA polymeru se osvědčily pro správnou a přesnou kombinaci multimodálně nasbíraných molekulárních/prvkových 2D map získaných pomocí pětice doplňujících se zobrazovacích technik, a to MALDI-MS, DESI-MS, LA-ICP-MS, optické a fluorescenční mikroskopie. Následující experimenty budou zaměřeny na aplikaci PZ pro 3D zobrazování různých biologických tkání a pro normalizaci intenzity signálu jednotlivých molekulárních/elementárních 2D map nezbytnou pro správnou rekonstrukci 3D struktury analyzované tkáně na základě vzájemného překryvu celé série multimodálně nasbíraných molekulárních/prvkových 2D map.

7. LA-ICP-MSI ve forenzní analýze – analýza povýstřelových zplodin přímo na latentních otiscích prstu

7.1 Otisk prstu a kriminalistická daktyloskopie

První identifikační systém pro forenzní účely byl zaveden na konci 19. století v Anglii a postupně se rozšířil do celého světa¹⁰³. Od té doby patří odběr otisků prstu a jejich následná analýza k základním úkonům při vyšetřování kriminálních činů. Studium otisku papilárních linií vychází z poznatků o fyziologických vlastnostech pokožky člověka, které popisuje daktyloskopie. Průběh kožních papilárních linií vytvořený na vnitřní straně prstů, na dlaních, na prstech nohou a chodidel je pro každého jedince charakteristický, jedinečný a do jisté míry i dědičný¹⁰⁴. Papilární linie jsou tvořeny souvisle vyvýšenými kožními reliéfy s výškou 0,1-0,4 mm a šířkou 0,2-0,7 mm, které se tvarují do nejrůznějších obrazců – tzv. dermatoglyfů. Vznik a existence dermatoglyfů papilárních linií se řídí třemi obecně uznávanými zákonitostmi otisků prstů: individuálnost, neměnnost a neodstranitelnost, které stanovil na konci 19. století Francis Galton¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. První z nich říká, že na světě neexistují dva lidé, kteří by měli naprosto shodné obrazce papilárních linií. Je velice zajímavé, že i jednovaječná dvojčata s identickou DNA mají rozdílné otisky prstů, což umožňuje jejich jednoznačnou identifikaci. Druhý zákon uvádí, že obrazce tvořené papilárními liniemi (skladba, návaznost, sled a relativní vzdálenost mezi jednotlivými daktyloskopickými markanty) zůstávají relativně neměnné, přestože v průběhu života dochází ke změnám ve velikosti papilárních linií i celých sledovaných ploch pokožky, ale i k poškození či porušení papilárních linií v důsledku různých zranění či tvorbě vrásek. Třetí z uvedených zákonů říká, že obrazce papilárních linií jsou trvale neodstranitelné. Informace o tvaru papilárních linií je totiž uložena až v zárodečné vrstvě pokožky (*stratum germinatum*). Drobné povrchové poranění nezanechávají na obrazcích tvořených papilárními liniemi žádné trvalé změny, a to bez ohledu na způsob poškození (řezné rány, odřeniny, popáleniny). Zatímco v případě hlubokých poranění, kdy je poškozena či účelně odstraněna zárodečná vrstva, dochází k trvalé změně charakterizované jizvou. Vzniklá jizva však může být nositelem relevantní informace, neboť je sama o sobě dostatečně jedinečným a charakteristickým znakem. Daktyloskopie společně s DNA analýzou představuje dva základní pilíře forenzní identifikace osob¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

Vzhledem k vylučování potu obsahujícího komplexní směs chemických látek (lipidy, aminokyseliny, proteiny, hormony, anorganické prvky apod.) mohou být otisky prstů

zanechány na celé řadě povrchů Většina zanechaných otisků prstů jsou pro lidské oko nedetekovatelné, a proto jsou označovány jako latentní (skryté). Latentní otisky prstů je možné zviditelnit různými fyzikálními, fyzikálně-chemickými a chemickými metodami. Běžné fyzikální, fyzikálně-chemické a chemické metody umožňují sejmutí latentních otisků přímo z povrchů nalezených na místě činu, a to na základě zvýraznění kontrastu mezi vystouplými papilárními liniemi a prohlubněmi¹⁰⁸. Tyto postupy musí být velmi jednoduché, ale spolehlivé natolik aby byl odebrán co nejkvalitnější otisk prstu, který může být následně porovnán s databází otisků prstů, popřípadě s otiskem referenčním. Zviditelnění otisků prstů může být prováděno pomocí celé řady látek, které interagují s chemickými látkami obsažených v otisku (aminokyseliny – ninhydrin, 1,8-diazafluoren-9-on, 1,2-indanedion, 5-methylthioninhydrin). Na druhou stranu pro terénní vizualizaci otisků prstů byl velmi rozšířen postup využívající depozice různých druhů daktyloskopických prášků (argentorát, bronz, práškový hliník, železný prach, apod.)¹⁰⁹. Některé nové trendy zahrnující využití anorganických nanočástic a kvantových teček však byly publikovány teprve nedávno¹¹⁰⁻¹¹³. Zkoumání daktyloskopických stop, tedy daktyloskopická identifikace, v kriminalistické praxi dosud představuje aplikaci identifikačního algoritmu tzv. „*fingerprint matching algoritmus*“ založeného na přímém vizuálním či programovém srovnání shody daktyloskopických markantů na otisku z místa činu s kontrolním (referenčním) otiskem („*Automated Fingerprint Identification System*“, (AFIS)). Minimální počet daktyloskopických markantů potřebných pro určení shody daktyloskopických stop s referenčním otiskem se pro jednotlivé země značně liší. Minimální počet markantů pro vybrané země je: 7 (Rusko), 8–12 (Německo a Švýcarsko), 10–12 (Nizozemsko), 10 (Česká republika a Slovensko), 12 (Belgie, Portugalsko, Francie, Izrael, Slovinsko, Španělsko, Turecko, Státy Jižní Ameriky, 16–17 (Itálie), popřípadě na základě vyjádření experta (USA, Anglie)¹⁰⁴.

Nicméně v posledních letech jsme svědky renesance detailního studia latentních otisků prstů pomocí sofistikovaných instrumentálních technik s cílem získat dodatečné informace napomáhající k objasnění trestného činu. K doposud získaným doplňujícím informacím patří zejména pohlaví a věk, přítomnost endogenních chemických látek (lidské metabolity s diagnostickou hodnotou), přítomnost exogenních chemických látek (zneužívání drog, farmak, exploziv, kosmetiky, potravin) či přítomnost částic povýstřelových zplodin¹¹⁴⁻¹²¹. Současný stav v oblasti zobrazování latentních otisků prstů a možnosti analýzy endogenních a exogenních chemických látek obsažených v otiscích prstů shrnuje přehledový článek z roku 2016¹¹².

7.2 Povýstřelové zplodiny

Detekce a identifikace povýstřelových zplodin („*gunshot residues*“ - GSR) na povrchu latentních otisků prstů poskytuje stěžejní informace k určení, zda podezřelá osoba použila střelnou zbraň při trestném činu. Povýstřelové zplodiny jsou charakterizovány jako částice vytvářené v důsledku procesu hoření zážehové složky zápalky, prachové náplně náboje a následné interakce vzniklých zplodin s konstrukčními prvky náboje za teplot a tlaků vznikajících při samotném výstřelu¹²²⁻¹²⁴. Povýstřelové zplodiny opouští střelnou zbraň (hlaveň, závěr, netěsnosti) v plynném skupenství a vytváří oblak zplodin v okolí zbraně, který rychle kondenzuje (několik milisekund) za vzniku mikroskopických částic charakteristických pro povýstřelové zplodiny. Zkondenzované částice následně sedimentují a ulpívají nejen na ruku, obličej a oděvu střelce, ale i na předmětech a osobách nacházejících se v těsné blízkosti střelné zbraně¹²²⁻¹²⁵. Dle ENFSI („*European Network of Forensic Science Institutes*“) jsou za charakteristické povýstřelové zplodiny považovány kulovité částice s velikostí 0,5 – 5,0 μm a chemickým složením odpovídajícím střelné zbraně, projektilu a nábojnici. Na základě profilu obsažených prvků jsou povýstřelové zplodiny klasifikovány do 9 základních tříd: třída 1: Pb–Sb–Ba (navíc částice mohou obsahovat jeden nebo i několik uvedených prvků: Si, Ca, Al, Cu, Fe, S, P, Zn, Ni); třída 2: Ba–Ca–Si; třída 3: Sb–Ba; třída 4: Pb–Sb; třída 5: Ba–Al; třída 6: Pb–Ba; třída 7: Pb, třída 8: Ba a třída 9: Sb. Množství ulpělých částic na ruku, obličej, vlasech a oděvu střelce závisí na několika faktorech, mezi které patří typ zbraně, použité střelivo, stáří a technický stav zbraně, hygienické návyky střelce a uplynulá doba^{122,124}.

Za standardní techniku pro analýzu a jednoznačnou identifikaci částic povýstřelových zplodin je stále považována skenovací elektronová mikroskopie s energiově-disperzním spektrometrem (SEM-EDS)¹²⁶⁻¹²⁸, a to i navzdory tomu, že v průběhu let byla použita celá řada instrumentálních technik^{129,130}. Mezi další používané techniky prvkové analýzy patří neutronová aktivační analýza (NAA)¹³¹, rentgenová fluorescenční spektrometrie (XRF), částicově indukovaná RTG emisní spektrometrie (PIXE)^{132,133}, hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů (SIMS), atomová absorpční spektrometrie (AAS), optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES), hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS)¹³⁴ a v neposlední řadě její spojení s laserovou ablací (LA-ICP-MS)^{123,124,135,136}. Jednotlivé aplikace uvedených technik jsou dále shrnuty v přehledových člancích¹³⁷⁻¹⁴⁰. Přestože již bylo LA-ICP-MS využito pro analýzu povýstřelových zplodin, tak doposud nebyla publikována metoda umožňující současné

provedení detekce a identifikace jednotlivých typů částic povýstřelových zplodin přímo na povrchu latentního otisku prstu společně s jeho následnou rekonstrukcí pro účely identifikaci „střelce“ pomocí standardních daktyloskopických metod. Cílem této práce bylo vyvinout a optimalizovat LA-ICP-MSI metodu pro detekci a charakterizaci jednotlivých částic povýstřelových zplodin na povrchu latentního otisku prstu se současnou identifikací „střelce“. Přímá identifikace byla založena jednak na porovnání 2D map kovů charakteristických pro povýstřelové zplodiny se zviditelněnými kontrolními (referenčními) otisky nebo na vizuálním porovnání rozmístění charakteristických papilárních linií a rozmanitých daktyloskopických markantů.

7.3 Experimentální část

7.3.1 Použité chemikálie, materiál, pistole a munice

Kyselina dusičná 65 % Analpure[®], peroxid vodíku 30 % PA+, CRM vodné kalibrační roztoky Cu, Zn, Sb, Ba, Hg a Pb o koncentraci $1\,000 \pm 2 \text{ mg.l}^{-1}$ a CRM vodný kalibrační roztok interního standardu pro ICP-MS „*INT-MIX 1*“ (Sc, Y, In, Tb, Bi) o koncentraci $10 \pm 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ byly zakoupeny od firmy Analytika, spol. s.r.o. (Praha, Česká republika). Deionizovaná voda (měrný odpor 18,2 MΩ.cm) byla získána z dvoustupňové deionizační stanice Milli-Q water systému (Millipore, Francie). Mikroskopická sklička (76 x 26 x 1 mm), bronzový daktyloskopický prášek, bílé daktyloskopické fólie (3,8 x 5,2 cm), transparentní daktyloskopická páska (šířka 3,8 cm), daktyloskopický štětec (materiál veverka) byly zakoupeny od firmy Sirchie (Youngsville, NC, USA). Pro získání vzorků povýstřelových zplodin byla použita samonabíjecí pistole CZ 75D Compact P-01 ráže 9 mm (Česká zbrojovka, a.s., Uherský brod, Česká republika) a střelivo 9 x 19 mm Luger s celoplášťovou střelou „*full metal jacket*“ 7,5 g (Sellier & Bellot, Vlašim, Česká republika).

7.3.2 Instrumentace

Pro stanovení koncentrace Cu, Zn, Sb, Ba, Hg a Pb ve vzorcích otisků prstů odebraných na daktyloskopickou pásku bylo využito konvenční roztokové ICP-MS analýzy využívající mikrovlnného rozkladného systému MLS 1200 mega a ORS-ICP-MS Agilent 7700x (Agilent Technologies, Japonsko) vybaveného autosamplerem ASX-520, mikrokoncentrickým zmlžovačem, chlazenou mlžnou komorou dle Scotta a oktapólovou kolizně/reakční celou. Pro LA-ICP-MS mapování byl použit laserový ablační systém Analyte G2 (Photon Machines, USA) ve spojení s ORS-ICP-MS. Optimalizované parametry nastavení laserové ablace a ORS-ICP-MS jsou uvedeny v Tabulce 7.1. Získaná (časově závislá) hmotnostní spektra byla rekonstruována zobrazovacím programem ImageLab za vzniku 2D map prostorové distribuce Cu, Zn, Sb, Ba, Hg a Pb. Následně byly výsledné 2D mapy korelovány s příslušnými otisky prstů třech střelců po jejich předchozím zviditelnění bronzovým daktyloskopickým práškem. Optimalizace parametrů laserové ablace (energie laseru, průtoky nosného plynu atd.) pro účely minimalizace frakcionace a získání nejvyšší intenzity signálů byla založena na LA-ICP-MS analýze Cu, Zn, Sb, Ba, Hg a Pb ve skleněném certifikovaném referenčním materiálu NIST 612.

Tab. 7.1 Optimalizované parametry laserové ablace a ORS-ICP-MS

Parametr	LA-ICP-MS	Roztoková analýza
Hustota zářivé energie ($J.cm^{-2}$)	2,12	-
Režim ablace	Liniový sken	-
Frekvence (Hz)	20	-
Integrační čas (ms)	80	100
Průměr laserového paprsku (μm)	110	-
Rychlost pohybu vzorku ($\mu m.s^{-1}$)	110	-
Vzdálenost mezi liniemi (μm)	10	-
Nosný plyn He ($l.min^{-1}$)	0,65	-
Příkon generátoru (W)	1 200	1 550
Vnější plazmový plyn ($l.min^{-1}$)	15,0	15,0
Střední plazmový plyn ($l.min^{-1}$)	0,9	0,9
Pomocný plyn/nosný Ar ($l.min^{-1}$)	0,75	1,1
Monitorované izotopy	^{63}Cu , ^{66}Zn , ^{121}Sb , ^{137}Ba , ^{202}Hg , ^{208}Pb	^{45}Sc , ^{63}Cu , ^{66}Zn , ^{89}Y , ^{121}Sb , ^{137}Ba , ^{159}Tb , ^{202}Hg , ^{208}Pb , ^{209}Bi
He v kolizní cele ($ml.min^{-1}$)	2,0	4,3

7.3.3 Střelba a odběr otisků prstu

Reálné vzorky povýstřelových zplodin ulpělých na rukou střelce po střelbě ze samonabíjecí pistole CZ 75D Compact P-01 ráže 9 mm byly získány v prostorách venkovní střelnice v Olomouci (LAZECKÁ STŘELNICE, spol. s.r.o.). Před samotnou střelbou byla zbraň důkladně vyčištěna dle pokynů výrobce a poté jemně ošetřena 1 % roztokem kyseliny dusičné. Navíc před každým experimentem byly střelcovy ruce důkladně očištěny a opláchnuty v 1 % (v/v) roztoku HNO_3 . Tento postup byl prováděn za účelem odstranění všech možných kovových kontaminantů ulpělých jak na zbrani, tak i na rukou střelce z předchozí střelby. Pro detailní studium povýstřelových zplodin byly vzorky kontrolních otisků ($n = 3$), otisků prstu po manipulaci se střelivem a střelnou zbraní ($n = 3$), po jednom výstřelu ($n = 3$) a po pěti výstřelech ($n = 3$) odebírány duplicitně. První z nich byl otisknut na čisté mikroskopické sklíčko (LA-ICP-MS zobrazování) a druhý otisk byl po otisknutí na mikroskopické sklíčko odebrán transparentní daktyloskopickou páskou (roztoková ICP-MS analýza), která byla poté důkladně zabalena a vložena do čisté a předem označené PP mikrozkušavky. Kromě reálných vzorků byly mezi každým experimentem odebírány slepé vzorky otisků prstu střelce. Pro účely porovnání rozdílů mezi jednotlivými testovanými skupinami na základě výsledků roztokové ICP-MS analýzy byly také odebírány kontrolní otisky ($n = 10$, sestávající ze 7 otisků mužů a 3 otisků žen) a otisk po manipulaci s mincemi, konkrétně s mincemi o nominální hodnotě 10, 20 a 50 Kč ($n = 1$).

7.3.4 Zviditelnění otisku prstu

Následně byly v laboratoři odebírány kontrolní otisky prstů od všech testovaných osob, kdy testované osoby opět otiskly palec pravé ruky na mikroskopické sklíčko označené příslušnými iniciálami. Kontrolní otisky prstů byly poté zviditelněny bronzovým daktyloskopickým práškem a po jejich přenesení na bílou daktyloskopickou folii byly snímány skenerem Epson Perfection Photo V370 s rozlišením 1 200 dpi. Zviditelněné otisky prstů byly použity jednak k výpočtu ploch jednotlivých otisků, ale zejména k identifikaci střelce na základě porovnání s 2D mapami distribuce Cu, Zn, Sb, Ba, Hg a Pb získaných pomocí LA-ICP-MS zobrazováním.

7.3.5 Analýza povýstřelových zplodin

Transparentní daktyloskopické pásky s otisky prstů osob rozdělených do 5 testovaných skupin: kontrolní (n = 10), manipulace s mincemi (n = 1), manipulace se střelivem a střelnou zbraní (n = 3), po jednom výstřelu (n = 3) a po pěti výstřelech (n = 3) byly naváženy do teflonových mineralizačních kelímků, kde k nim byla přidána mineralizační směs složená z 2 ml 65 % kyseliny dusičné a 1 ml 30 % peroxidu vodíku. Takto připravené vzorky byly rozkládány v mikrovlnném rozkladném systému MLS 1200 mega podle víceokrového rozkladného programu uvedeném v Tabulce 5.3 Vychlazené mineralizáty byly kvantitativně převedeny do 10 ml odměrných baněk a doplněny po rysku deionizovanou vodou. Slepý pokus byl připraven mikrovlnným rozkladem transparentní daktyloskopické pásky bez odebraného otisku prstu. V takto připravených vzorcích byly koncentrace Cu, Zn, Sb, Ba, Hg a Pb stanoveny pomocí roztokové ICP-MS analýzy. Pro výpočet mezí detekce byly slepé pokusy připraveny rozkladem 2 ml 65 % kyseliny dusičné a 1 ml 30 % peroxidu vodíku.

7.3.6 Statistická analýza

Výsledná data jsou dále v textu vyjádřena jako průměr \pm SD. Statistický program NCSS 2007 (NCSS LLC, Kaysville, UT, USA) byl použit k jednorozměrné analýze dat, zatímco program EZinfo (Umetrics, Švédsko) byl použit k vícerozměrné (multivariační) analýze dat zahrnující analýzu hlavních komponent (PCA). Ověření normálního rozdělení dat bylo prováděno Shapirovým-Wilkovým testem normality. Pro porovnání významnosti rozdílů v průměrných koncentracích Cu, Zn, Sb, Ba, Hg a Pb mezi jednotlivými testovanými skupinami (kontrolní, manipulace s mincemi, manipulace se střelivem a střelnou zbraní, po jednom a pěti výstřelech) bylo využito dvouvýběrového *t*-testu. Pro všechny použité jednorozměrné statistické testy byla P-hodnota $\leq 0,05$ považována za statisticky významnou. Meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) byly vypočteny pomocí matematického modelu „meze: 3s – IUPAC“ ve validovaném programu EffiValidation 3.0 (Effichem, s.r.o., Česká republika).

7.4 Výsledky a diskuze

7.4.1 Rostoková analýza povýstřelových zplodin

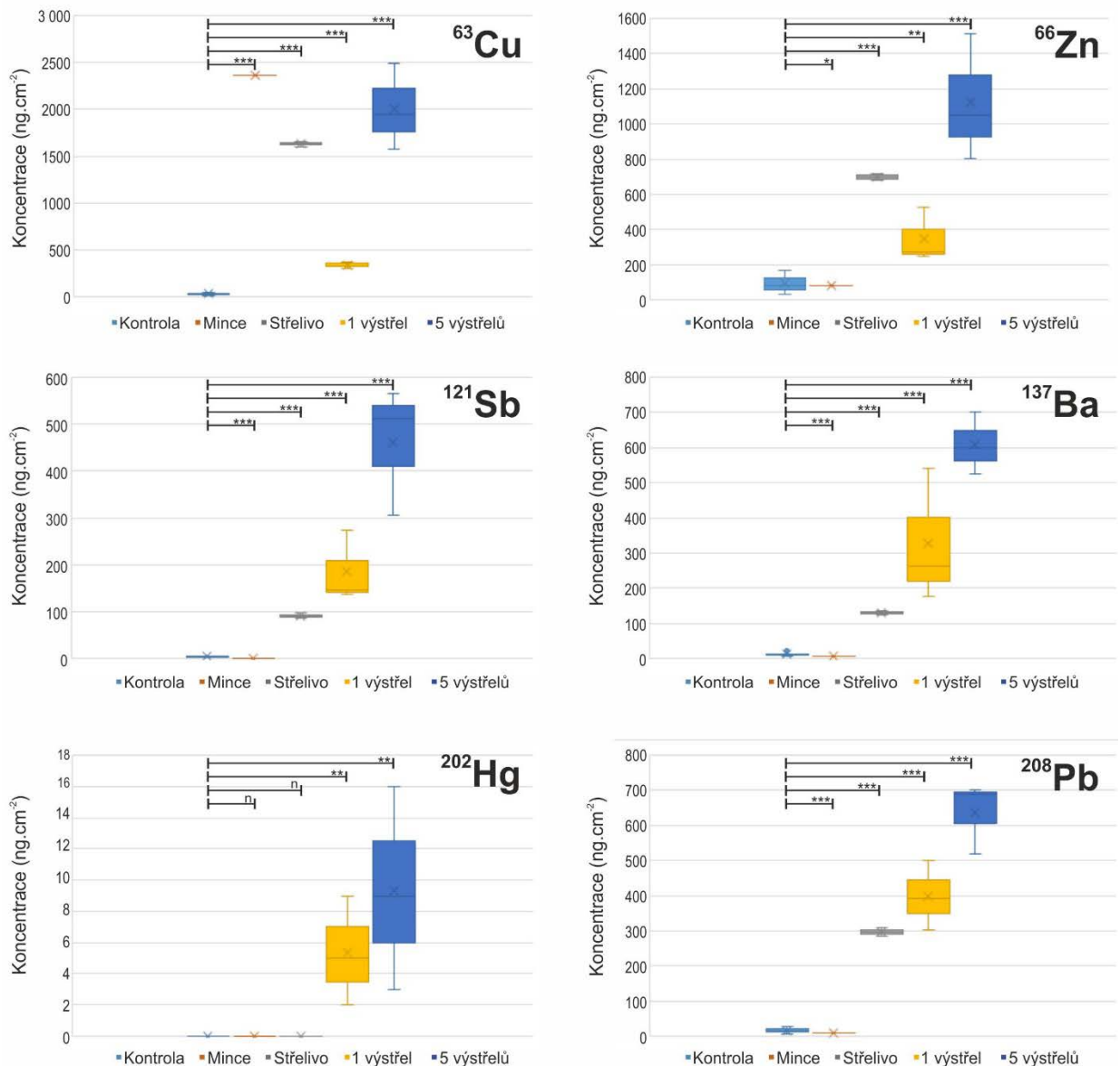
První část práce byla zaměřena na testování přítomnosti kovů charakteristických pro povýstřelové zplodiny s následným porovnáním koncentračních hladin pro Cu, Zn, Sb, Ba, Hg, Pb v mineralizátech přenesených otisků prstů pocházejících 5 testovaných skupin: kontrolní, manipulace s mincemi, manipulace se střelivem a střelnou zbraní, po jednom a pěti výstřelech. Kvantitativní stanovení bylo provedeno pomocí ORS-ICP-MS po předchozím mikrovlnném rozkladu sady vzorků otisků prstů odebraných na transparentní daktyloskopické pásky (viz. kapitola 7.3.5 Analýza povýstřelových zplodin). Meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) byly vypočteny na základě dat získaných analýzou 6 nezávisle připravených slepých pokusů podle matematického modelu „meze: 3s – IUPAC“, kdy získané hodnoty byly dále přepočteny na průměrnou plochu otisku prstu $4,5 \pm 0,8 \text{ cm}^2$ a ředění do 10 ml odměrných baněk. Získané hodnoty LOD a LOQ jsou shrnuty v Tabulce 7.2.

Tab. 7.2 Meze detekce a meze stanovitelnosti

Izotop	LOD (ng.cm ⁻²)	LOQ (ng.cm ⁻²)
⁶³ Cu	0,06	0,20
⁶⁶ Zn	0,28	0,93
¹²¹ Sb	0,02	0,07
¹³⁷ Ba	0,05	0,17
²⁰² Hg	0,25	0,83
²⁰⁸ Pb	0,02	0,07

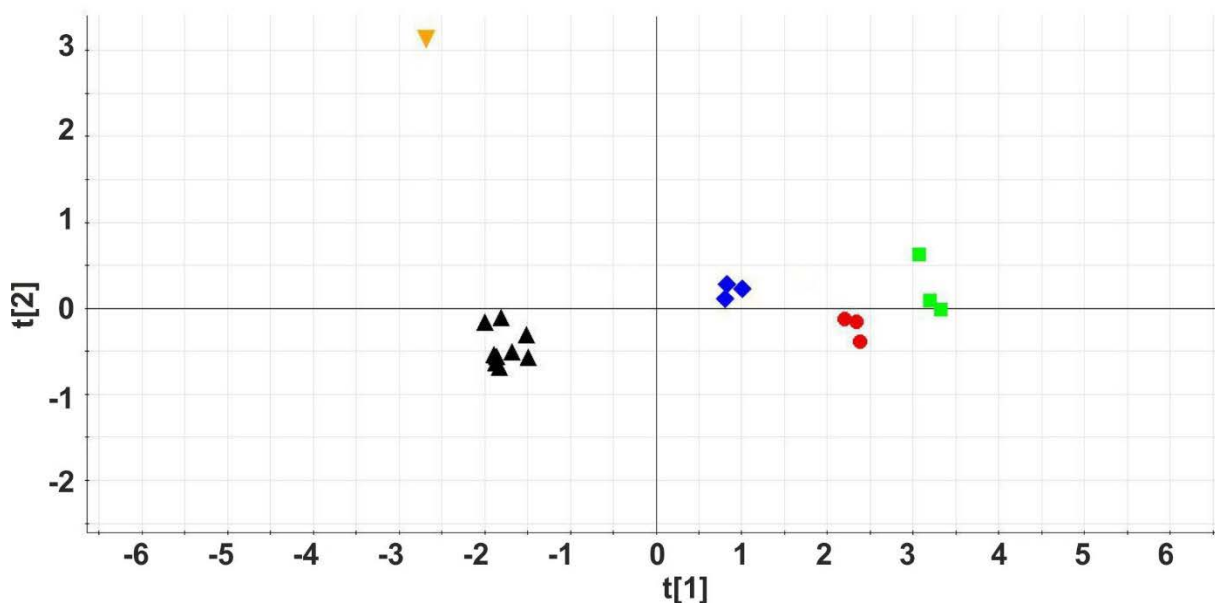
Kvantitativní ICP-MS analýza prokázala výrazné zvýšení koncentrací prvků charakteristických pro složení povýstřelových zplodin (Sb, Ba, Hg, Pb) ve vzorcích po jednom, a hlavně po pěti výstřelech. Na druhou stranu ve vzorcích po manipulaci se střelivem a střelnou zbraní byly zvýšené zejména koncentrace Cu, Zn a Pb odpovídající složení materiálu nábojnice (70 % Cu a 30 % Zn) a celoplášťové střely s jádrem ze slitiny olova, zatímco koncentrace rtuti byla pod mezí detekce ICP-MS metody. V porovnání s kontrolní skupinou byla u vzorku po manipulaci s mincemi naměřena výrazně vyšší koncentrace Cu, což plně odpovídá prvkovému složení úpravy povrchu mincí s nominální hodnotou 10, 20 a 50 Kč. Průměrné koncentrace kovů pro kontrolní skupinu byly $35 \pm 16 \text{ ng.cm}^{-2}$ pro Cu, $89 \pm 37 \text{ ng.cm}^{-2}$ pro Zn,

$3 \pm 1 \text{ ng.cm}^{-2}$ pro Sb, $11 \pm 4 \text{ ng.cm}^{-2}$ pro Ba, $<\text{LOQ}$ ($0,83 \text{ ng.cm}^{-2}$) pro Hg a $17 \pm 6 \text{ ng.cm}^{-2}$ pro Pb. Přičemž koncentrace všech analyzovaných kovů ve slepém vzorku (transparentní páska bez otisku prstu) se pohybovaly pod 1 ng.cm^{-2} . Pro porovnání významnosti rozdílů v průměrných koncentracích Cu, Zn, Sb, Ba, Hg a Pb mezi jednotlivými testovanými skupinami bylo využito dvouvýběrového *t*-testu. V porovnání s kontrolní skupinou, jsou rozdíly v koncentračních hladinách pro Cu, Zn, Sb, Ba, Hg a Pb na otiscích prstů pocházejících ze skupiny po manipulaci s mincemi, po manipulaci se střelivem a střelnou zbraní, po jednom a pěti výstřelech statisticky velmi významné ($p < 0,01$). Výjimkou je Zn (manipulace s mincemi vs kontrolní otisk) $p = 0,038$ (statisticky významné) a Hg (manipulace s mincemi vs kontrolní otisk ($p = 0,369$), manipulace se střelivem a střelnou zbraní vs kontrolní otisk ($p = 0,676$)), kdy rozdíly v naměřených koncentracích jsou statisticky nevýznamné (Obr. 7.1).



Obr. 7.1 Porovnání koncentračních hladin Cu, Zn, Sb, Ba, Hg, Pb ve vzorcích přenesených otisků prstů pocházejících z 5 testovaných skupin: kontrolní, manipulace s mincemi, manipulace se střelivem a střelnou zbraní, po jednom výstřelu a po pěti výstřelech. Dvouvýběrový *t*-test byl považován za významný pro $p \leq 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, n – statisticky nevýznamný.

Pro účely vícerozměrné analýzy byla data upravena prostřednictvím logaritmické transformace za účelem potlačení kvantitativní a zvýšení kvalitativní funkce dat. Vzniklý soubor dat byl poté zpracováván a studován ve statistickém programu EZinfo s využitím analýzy hlavních komponent (PCA). Rozptylový diagram komponentního skóre (Obr. 7.2) ukazuje významné rozdíly mezi testovanými skupinami (kontrolní, manipulace s mincemi, manipulace se střelivem a střelnou zbraní, po jednom a pěti výstřelech), které jsou tak rozděleny do 5 oddělených klastrů. Kontrolní otisky jsou koncentrovány v oblasti definované jako obdélník se souřadnicemi $(x_1; x_2; y_1; y_2)$ -2,0; -1,4; -0,7; -0,1, zatímco otisk po manipulaci s mincemi se nachází v oblasti definované bodem -2,7; 3,1. Oproti tomu otisky související s použitím střelné zbraně se nacházejí v obdélníkových oblastech definovanými body $(x_1; x_2; y_1; y_2)$ 0,7; 1,2; 0,0; 0,4 (otisky po manipulaci se střelivem a střelnou zbraní), 2,2; 2,4; -0,4; -0,1 (otisky po jednom výstřelu) a 3,1; 3,4; -0,1; 0,7 (otisky po pěti výstřelech). Získané výsledky potvrdily, že odběr latentních otisků prstu na mikroskopická sklíčka je dostatečně účinný tak, aby docházelo i k přenesení částiček povýstřelových zplodin ulpělých na papilárních liniích jedince. Navíc kvantitativní ICP-MS stanovení Cu, Zn, Sb, Ba, Hg, Pb umožnilo odlišit jednotlivé otisky prstu pocházejících ze všech testovaných skupin, překvapivě i otisky prstů po manipulaci se střelivem a střelnou zbraní, po jednom a pěti výstřelech.



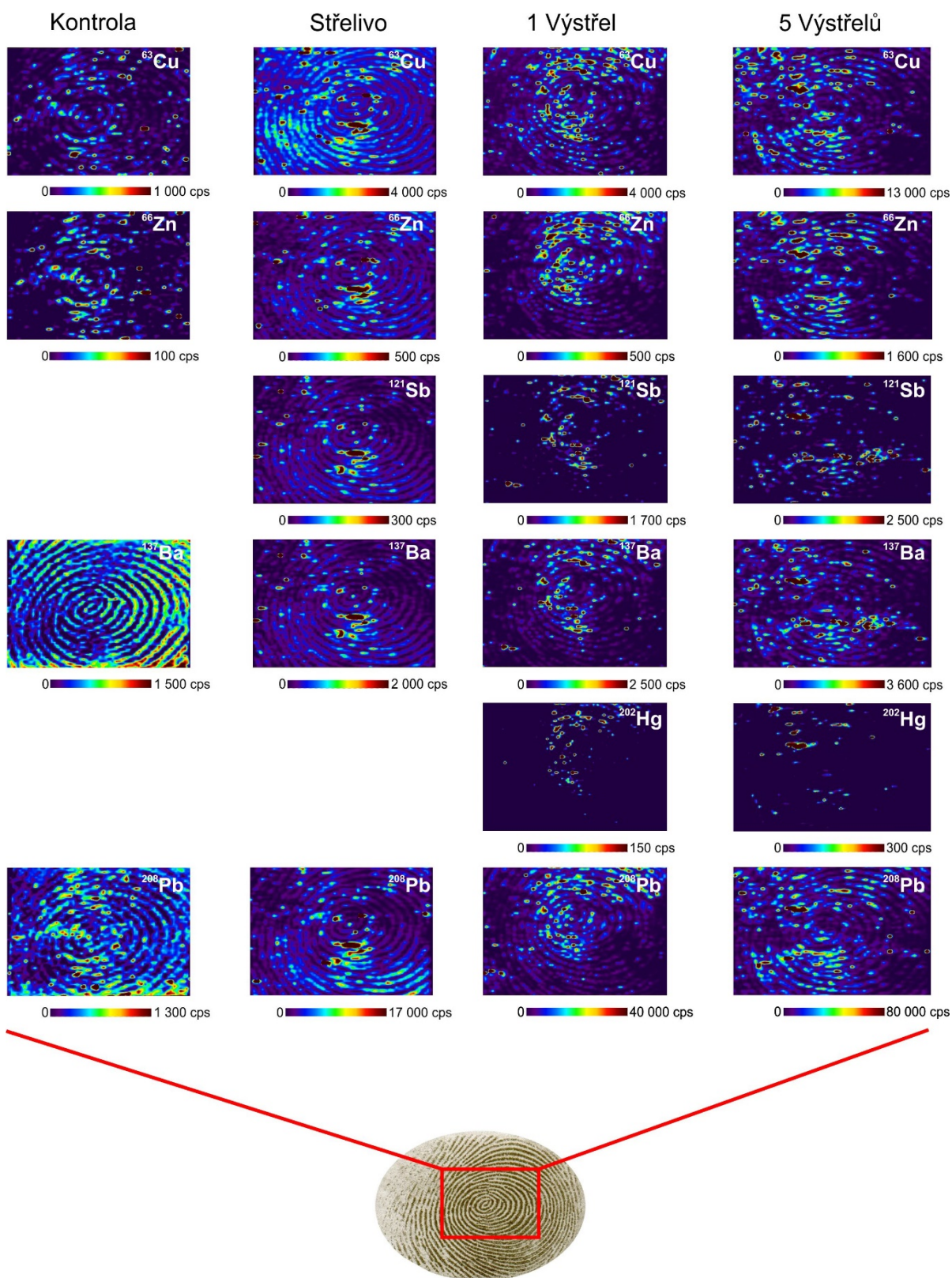
Obr. 7.2 Rozptylový diagram komponentního skóre, PC1: 80,84 %, PC2: 12,25 %. ▲ – kontrolní skupina, ▼ – manipulace s mincemi, ◆ – manipulace se střelivem a střelnou zbraní, ● – po jednom výstřelu, ■ – po pěti výstřelech.

7.4.2 LA-ICP-MS zobrazování povýstřelových zplodin

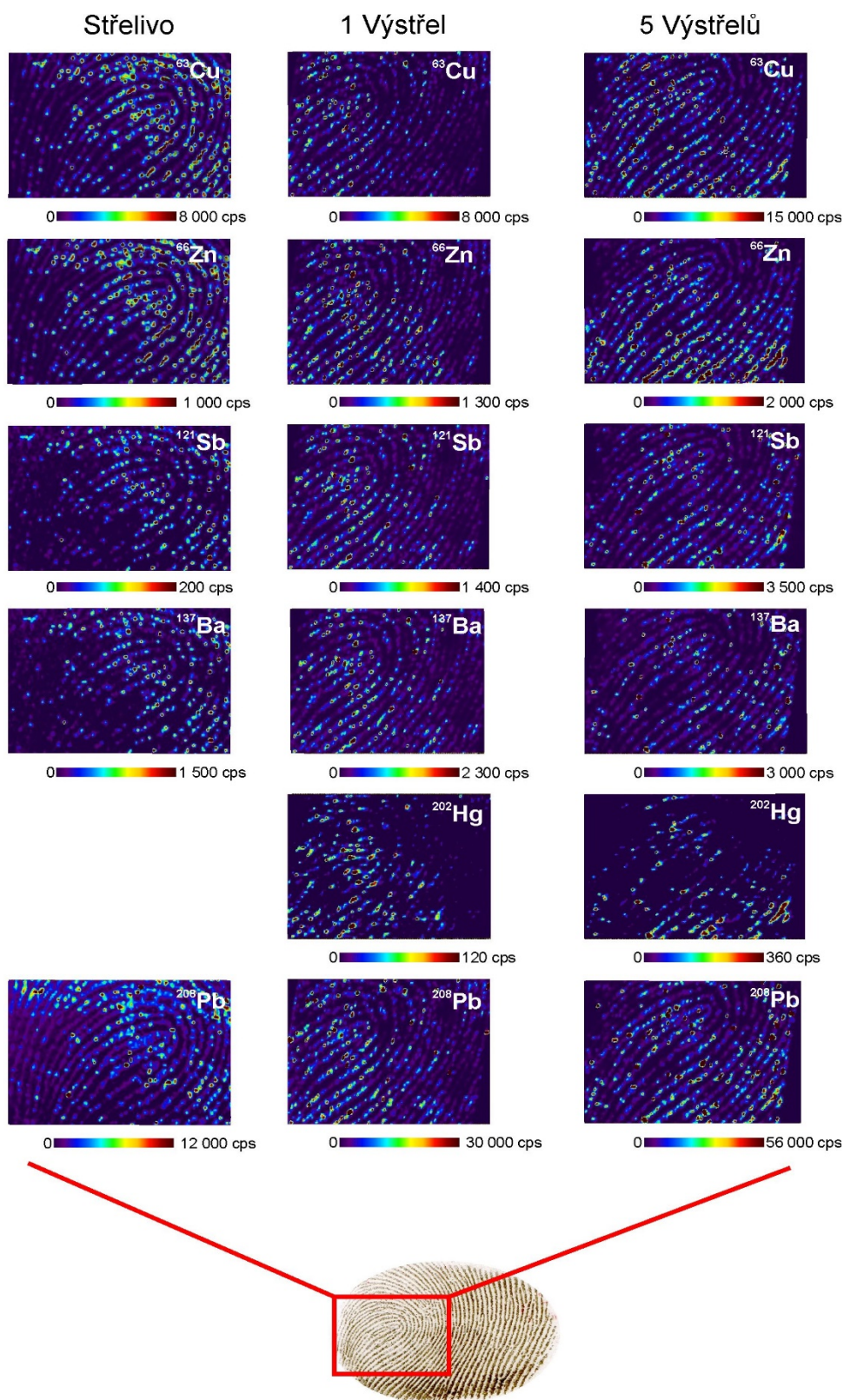
LA-ICP-MS zobrazování bylo využito jednak k detekci a charakterizaci jednotlivých částic povýstřelových zplodin na povrchu latentního otisku prstu, ale především k identifikaci „střelce“ na základě porovnání 2D map prostorové distribuce Cu, Zn, Sb, Ba, Hg, Pb se zviditelněnými kontrolními (referenčními) otisky. Monitorované kovy byly vybrány na základě prvkového složení částic povýstřelových zplodin¹²²⁻¹²⁴, prvkového složení nábojnice, zápalkové složky, celoplášťové střely a v neposlední řadě na základě výsledků roztokové analýzy otisků prstu s ulpělými povýstřelovými zplodinami. Mapována byla sada latentních otisků prstů sestávající se ze slepého vzorku (povrch mikroskopického skla bez otisku prstu), kontrolního otisku, otisk po manipulaci se střelivem a střelnou zbraní, otisku po jednom a pěti výstřelech. Pro LA-ICP-MS analýzu byla vybrána oblast s rozměrem ~ 0,9 x 1,3 cm (doba analýzy ~ 2,5 až 3 hodiny), která byla symetricky rozmístěná okolo středu (vrcholu) otisku, z důvodu maximalizace pokrytí rozmanitých daktyloskopických znaků.

LA-ICP-MS mapování poskytlo detailní informace o prostorové distribuci jednotlivých částic povýstřelových zplodin na povrchu latentních otisků prstu souvisejících přímo se samotnou střelbou, ale i kovových částiček a dalších nečistot ulpělých na otiscích prstu po manipulaci se střelivem a střelnou zbraní a na kontrolním otisku (Cu, Zn, Pb). Výsledky

mapování Cu, Zn, Sb, Ba, Hg, Pb na povrchu odebraných otisků prstů jsou uvedeny na Obr. 7.3 (střelec 1) a Obr. 7.4 (střelec 2). V případě kontrolního latentního otisku však nebylo možné získat (rekonstruovat) 2D mapu prostorové distribuce Sb a Hg, a to z důvodu jejich nízkého přirozeného výskytu v životním prostředí. Mimo to rtuť nebyla detekována ani na povrchu otisku prstu po manipulaci se střelivem a střelnou zbraní, což oba prvky řadí mezi velmi významné a unikátní markery povýstřelových zplodin. V porovnání s kontrolním otiskem, LA-ICP-MS mapování prokázalo výrazný nárůst intenzity signálu pro Cu, Zn, Sb, Ba, Hg, Pb u otisků pocházejících ze všech tří testovaných skupin (střelivo, 1 výstřel, 5 výstřelů). V případě otisků po manipulaci se střelivem a střelnou zbraní byla zjištěna rovnoměrnější distribuce kovů na povrchu papilárních linií, která je zřejmě způsobena otěrem celého bříška palce při vkládání nábojů do zásobníku. Vzhledem k nedostupnosti certifikovaného referenčního materiálu s definovaným složením, respektive velikostí částic povýstřelových zplodin (intenzita analytického signálu závisí zejména na velikosti částic povýstřelových zplodin) nebyla bohužel provedena kvantitativní LA-ICP-MS analýza kovů charakteristických pro povýstřelové zplodiny. Z uvedených výsledků vyplývá, že studium rozdílů v intenzitě signálů, ale především v distribuci Cu, Zn, Sb, Ba, Hg, Pb má značný dopad pro identifikaci a charakterizaci povýstřelových zplodin, kdy můžeme odlišit, zda odebraný otisk souvisí s manipulací se střelivem a střelnou zbraní, nebo přímo se samotnou střelbou. Tedy v případě, že na povrchu otisku prstu nejsou identifikovány typické kulovité částice s prvkovým profilem odpovídajícím jednotlivým třídám povýstřelových zplodin, tak je možné vyvodit závěr, že odebraný otisk není spojen se střelbou ze zbraně anebo jiné kontaminace povýstřelovými zplodinami (osoba v blízkosti střelby).

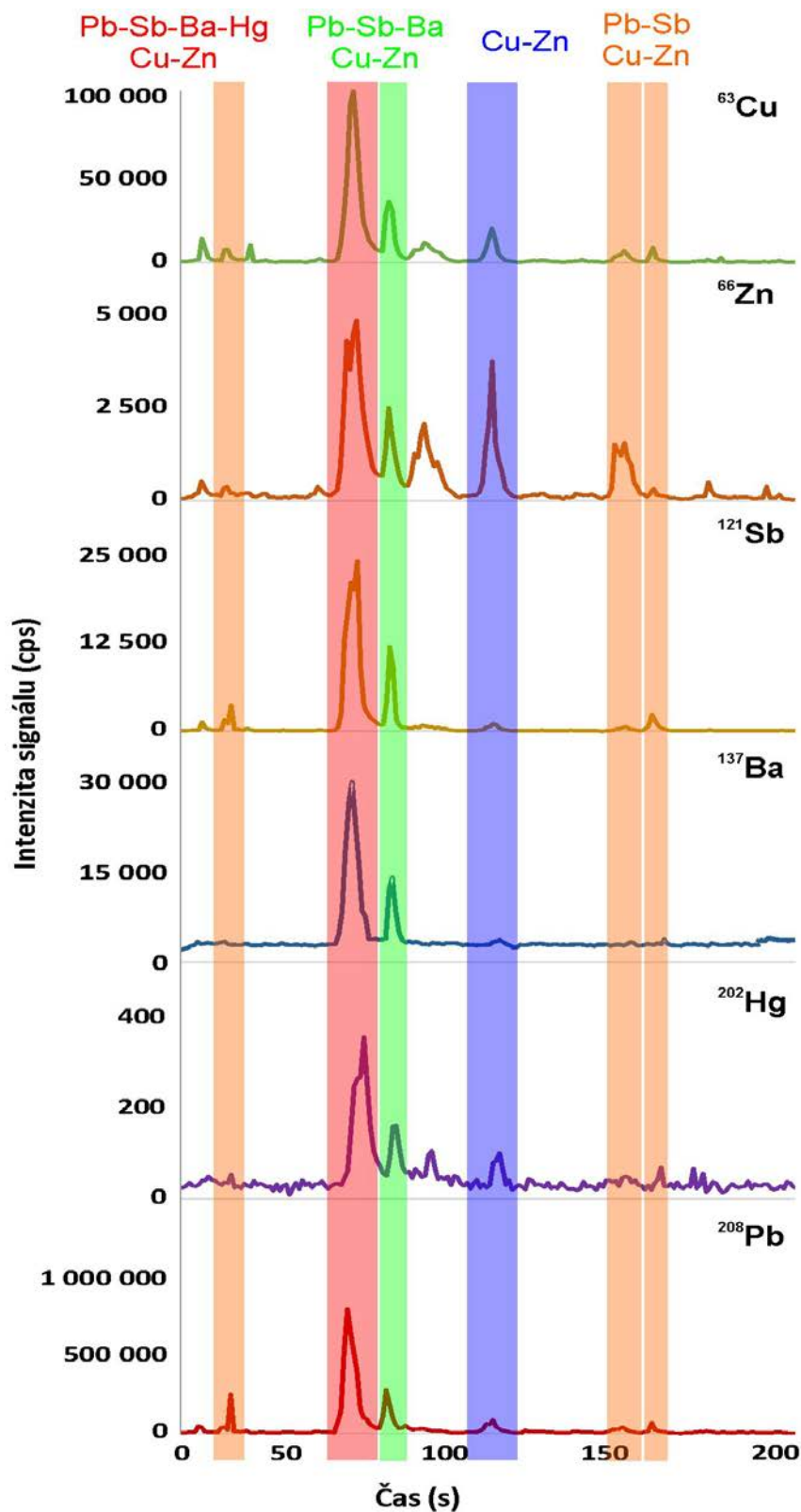


Obr. 7.3 Identifikace povýstřelových zplodin na základě LA-ICP-MS zobrazování prostorové distribuce Cu, Zn, Sb, Ba, Hg, Pb na povrchu latentních otisků prstů střelce č. 1 pocházejících ze 4 testovaných skupin: kontrolní, manipulace se střelivem a střelnou zbraní (střelivo), po jednom výstřelu a po pěti výstřelech, (cps – intenzita signálu).



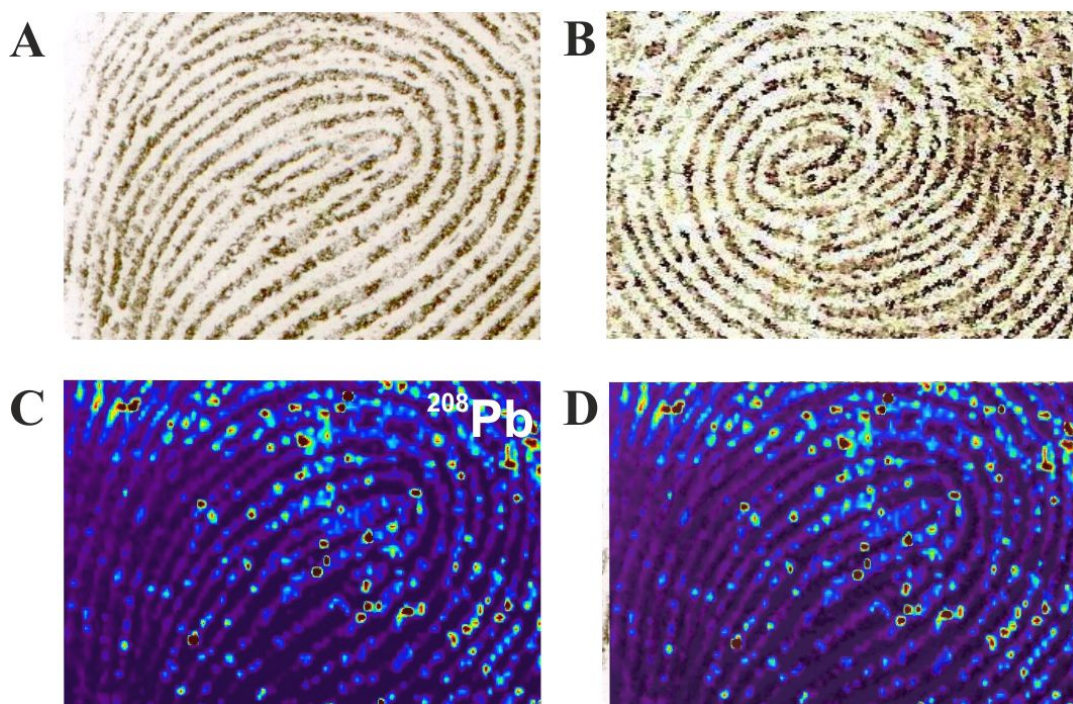
Obr. 7.4 Identifikace povýstřelových zplodin na základě LA-ICP-MS zobrazování prostorové distribuce Cu, Zn, Sb, Ba, Hg, Pb na povrchu latentních otisků prstů střelce č. 2 pocházejících ze 3 testovaných skupin: manipulace se střelivem a střelnou zbraní (střelivo), po jednom výstřelu a po pěti výstřelech, (cps – intenzita signálu).

Částice povýstřelových zplodin byly na otiscích prstů souvisejících s použitím střelné zbraně identifikovány jednak na základě přítomnosti kulovitých částic a jejich shluků, které mají shodnou prostorovou distribuci prvků (Sb, Ba, Hg, Pb, ale i Cu a Zn) odpovídající charakteristickému prvkovému složení jednotlivých tříd povýstřelových zplodin (Obr. 7.3 a Obr. 7.4). Navíc LA-ICP-MS časově (prostorově) závislá data byla využita pro detekci a následnou charakterizaci jednotlivých skupin povýstřelových zplodin. Jednotlivé částice byly identifikovány na základě simultánního záznamu signálu pro izotopy Pb, Sb, Ba, Hg, Cu, Zn představujících prvkový profil charakteristických částic povýstřelových zplodin. Tedy v případě současné detekce (identický ablační čas) signálů pro Pb, Sb, Ba, Hg, Cu, Zn lze tyto signály považovat za charakteristické pro částice povýstřelových zplodin s typickým prvkovým složením (Obr. 7.5). Nicméně podmínkou pro detekci částic povýstřelových zplodin bylo nastavení minimální intenzity potřebné pro pozitivní identifikaci signálu pro příslušné izotopy kovů charakteristické pro povýstřelové zplodiny. Minimální hodnota signálu odpovídající nejmenší detekované částici byla stanovena jako desetinásobek průměru signálu pozadí pro slepý vzorek¹²⁴ (1 640 cps pro Cu, 160 cps pro Zn, 101 cps pro Sb, 2 050 cps pro Ba, 230 cps pro Hg a 6 850 cps pro Pb). Použití méně přísných kritérií by sice přispělo k výraznému zvýšení počtu identifikovaných částic, avšak přísnější kritéria byla volena z důvodu zvýšení věrohodnosti získaných výsledků. Detailní studium částic povýstřelových zplodin ulpělých na otisku prst střelců po střelbě ze samonabíjecí pistole CZ 75D Compact P-01 ráže 9 mm s náboji 9x19 mm Luger s celoplášťovou střelou 7,5 g potvrdilo přítomnost 8 různých tříd povýstřelových zplodin, a to Pb-Sb-Ba-Hg, Pb-Sb-Ba, Sb-Ba, Sb-Hg, Pb, Ba, Sb, Cu-Zn.

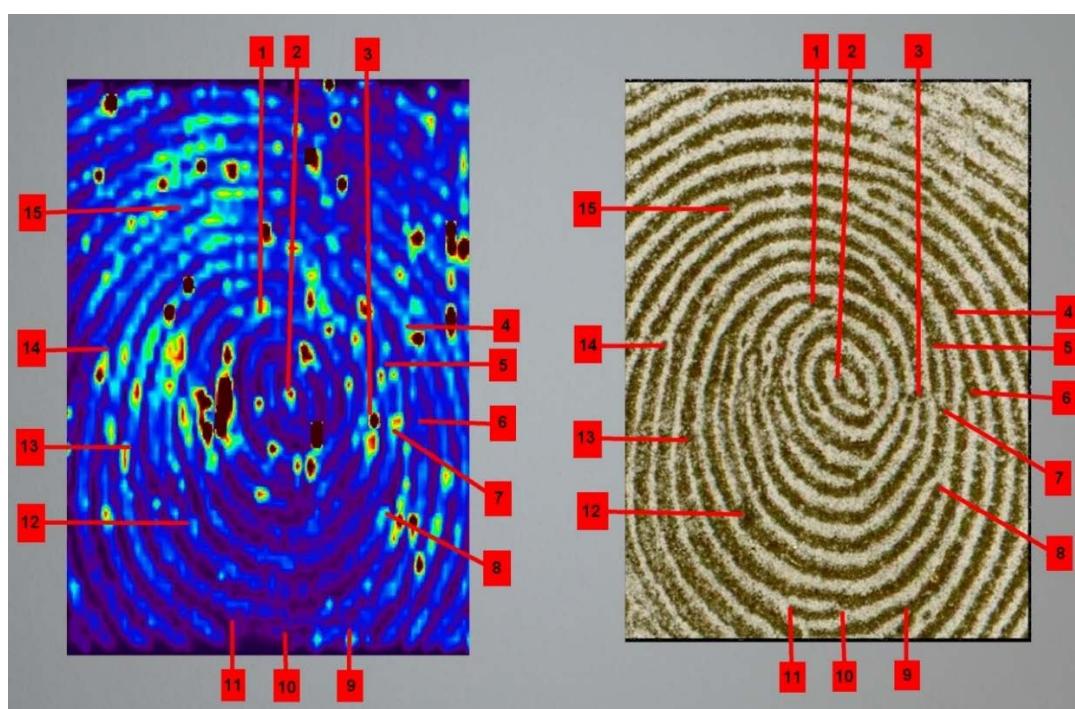


Obr. 7.5 Charakterizace jednotlivých typů povýstřelových zplodin. Barevné svíslé pruhy reprezentují identifikované typy povýstřelových zplodin. Liniový sken pochází ze vzorku otisku střelce, který vypálil 5 po sobě jdoucích ran ze samonabíjecí pistole CZ 75D Compact P-01 ráže 9 mm s náboji 9 x 19 mm Luger s celoplášťovou střelou 7,5 g.

Hlavním cílem celé práce byla především aplikace LA-ICP-MS zobrazování pro přímou identifikaci střelce. Přímá identifikace byla založena jednak na vzájemném porovnání (překryvu) 2D map prostorové distribuce Cu, Zn, Sb, Ba, (Hg), Pb s kontrolním (referenčním) otiskem prstu, ale i na principu daktyloskopické identifikaci zahrnující porovnání charakteristických identifikačních znaků (daktyloskopických markantů). Pro tyto účely byla odebrána sada 4 neznámých otisků, které byly odebírány duplicitně na čistá mikroskopická sklíčka. První otisk byl určen pro LA-ICP-MS zobrazování a druhý (referenční) otisk byl zviditelněn bronzovým daktyloskopickým práškem. Pro účely testování vhodnosti LA-ICP-MS zobrazování pro přímou identifikaci střelce obsahovala připravená sada i otisky odebrané jednovaječným dvojčatům. Ze série odebraných otisků byly poté vybrány dva otisky pro LA-ICP-MS zobrazování a získané 2D mapy prostorové distribuce Cu, Zn, Sb, Ba, Pb byly porovnávány (překrývány) se sadou zviditelněných otisků prstu získaných od všech třech testovaných osob. Identifikace otisku prstu střelce pomocí vizuálního porovnání 2D mapy prostorové distribuce olova s referenčním otiskem střelce a jeho jednovaječného dvojčete je uvedeno na Obr. 7.6. Identifikace střelce na základě vizuálního porovnání charakteristického rozmístění papilárních linií a rozmanitých daktyloskopických znaků je prezentováno na Obr. 7.7. Daktyloskopická identifikace byla provedena ve spolupráci s daktyloskopickými znalci z Odboru kriminalistické techniky a expertíz Krajského ředitelství policie Moravskoslezského kraje. V případě porovnání shody rozmístění daktyloskopických markantů bylo identifikováno 15 daktyloskopických markantů, což představuje dostatečný počet pro určení shody s referenčním otiskem v České republice, ale i jiných evropských státech. Prezentované postupy detailního studia povýstřelových zplodin definují významnost a unikátnost LA-ICP-MS zobrazování pro účely analýzy latentních otisků prstů v kontextu analýzy povýstřelových zplodin. Optimalizovaná LA-ICP-MS metoda je vhodná nejen k detekci a charakterizaci částic povýstřelových zplodin, ale především k přímé identifikaci osoby na základě porovnání 2D map prostorové distribuce prvků charakteristických pro povýstřelové zplodiny s kontrolním (referenčním) otiskem prstu.



Obr. 7.6 Identifikace otisku prstu střelce založená na přímém vizuálním 2D mapy distribuce olova s odpovídajícími referenčními otisky jednovaječných dvojčat. Referenční otisk dvojčete 1 (A) a dvojčete 2 (B), odpovídající 2D mapa distribuce ^{208}Pb na povrchu latentního otisku prstu (C). Identifikace střelce na základě fúzování získané 2D mapy distribuce olova s referenčním otiskem dvojčete 1 (D).



Obr. 7.7 Identifikace otisku prstu střelce založená na přímém vizuálním srovnání shody rozmístění daktyloskopických markantů (označených čísly 1 až 15) na otisku z místa činu s kontrolním (referenčním) otiskem.

7.5 Závěr

Prezentovaná metoda LA-ICP-MS zobrazování latentních otisků prstů umožňuje provést jednak vyhodnocení přítomnosti charakteristických kovů odpovídajících složení částic povýstřelových zplodin, ale především umožňuje rekonstruovat otisk prstů z prostorové distribuce kovů po LA-ICP-MS mapování. Metoda využívá skutečnosti, že při manipulaci s náboji, střelnou zbraní a střelbě dochází k ulpění charakteristických kovů na prstech (Cu, Zn, Sb, Ba, Hg, Pb) a tyto kovy jsou pak přeneseny ve formě otisků na různé povrchy. Následně mohou být získané 2D mapy prostorové distribuce Cu, Zn, Sb, Ba, Hg, Pb na povrchu latentního otisku použity k přímé identifikaci střelce jednak na základě porovnání (fůzování) s kontrolním (referenčním) otiskem nebo na základě vyhodnocení shody jejich daktyloskopických markantů. LA-ICP-MS mapování distribuce Cu, Zn, Sb, Ba, Hg, Pb má značný potenciál stát se citlivější a spolehlivější alternativou ke standardním forezním metodám identifikace a charakterizace povýstřelových zplodin založených na využití skenovací elektronové mikroskopie ve spojení s energiově-disperzním spektrometrem (SEM-EDS). Následující experimenty budou zaměřeny na LA-ICP-MS zobrazování větší série otisků prstů a jejich fragmentů, kdy bude testován vliv použití různých střelných zbraní i druhů komerčně dostupných nábojů a v neposlední řadě budou experimenty zaměřeny na analýzu otisku prstů zviditelněných pomocí daktyloskopických prášků.

8. Studium vztahu mezi obsahem železa a mědi v myokardu a funkcí srdečních mitochondrií v kontextu srdečního selhání

8.1 Chronické srdeční selhání

Srdeční selhání je považováno za velmi komplikovaný klinický syndrom, během kterého dochází k dysfunkci srdečního svalu zabraňující srdci pumpovat dostatečné množství krve k pokrytí metabolických potřeb lidského těla¹⁴¹. V Evropě je udávána prevalence Chronického srdečního selhání (ChSS) mezi 2–3 %, nicméně ChSS se podílí významnou měrou na mortalitě a morbiditě zejména starší populace¹⁴². Chronické srdeční selhání vzniká nejčastěji následkem onemocnění srdečního svalu nebo z extrakardiálních příčin. K nejčastějším příčinám ChSS patří ischemická choroba srdeční, idiopatická kardiomyopatie, zánětlivá onemocnění, chlopenní vady a hypertenze. Následkem ChSS dochází nejen ke zhoršení funkce kardiovaskulárního, endokrinního, nervového, imunitního systému a krvetvorby, ale i k postižení cílových orgánů (svalstvo, kostra, plíce, ledviny)¹⁴¹.

Tedy pro správnou funkci srdečního svalu je nutné zajistit, aby byl srdeční sval dostatečně a včasné zásobován energií produkovanou mitochondriemi¹⁴³. Z čehož vyplývá, že mitochondriální dysfunkce vyznačující se sníženou biogenezí, sníženou substrátovou flexibilitou a odolností vůči oxidativnímu poškození reaktivními formami kyslíku může být myšlenkou vedoucí k vysvětlení stárnutí srdečního svalu a patofyziologii srdečního selhání¹⁴⁴⁻¹⁴⁷. Detailnější porozumění vztahu mitochondriální dysfunkce v kontextu srdečního selhávání může tedy přinést nové terapeutické postupy zaměřené na bioenergetiku a účinnost srdečního svalu^{143,148}. Bioenergetika srdečního svalu je značně regulována obsahem železa¹⁴⁸⁻¹⁵², jelikož mitochondriální enzymy podílející se na oxidativní fosforylaci, antioxidační ochraně a transportu kyslíku potřebují pro svou správnou funkci „volné“ železo, železo navázané v hemu nebo v Fe-S klastrech. Ve většině případů je ChSS doprovázeno sníženým obsahem železa v myokardu¹⁵³ či anémií, které způsobují mitochondriální abnormality v srdečním svaly a přispívají tak ke zhoršení ChSS a zvýšení úmrtnosti^{154,155}. Nicméně korekce anémie skrze zvýšenou erytropoézu není v případě pacientů se srdečním selháním účinná¹⁵⁵, zatímco u pacientů bez anémie intravenózní podávání železa vede ke zvýšení tolerance zátěže, zlepšení kvality života, a to i u pacientů se srdečním selháním a systematickým deficitem železa^{156,157}. Tento fakt naznačuje, že relativní nedostatek železa v neerytroidních tkáních může mít klíčovou úlohu při vysvětlení patofyziologie vzniku

srdečního selhání. Avšak doposud publikované práce studující obsah železa u pacientů se srdečním selháním byly zaměřeny zejména na analýzu cirkulujících markerů železa na systémové úrovni^{153,155-158}, přičemž jen dvě studie se zabývaly stanovením obsahu železa přímo v myokardu^{159,160}. Studie však odhalily jen marginální vztah mezi myokardiálními a cirkulujícími markery železa^{159,160}.

Překvapivě doposud bylo získáno jen velmi málo informací o obsahu železa a mědi přímo v srdečním svalu u kontrolních a ChSS pacientů, zejména pak jejich dopadu na správnou funkci srdečních mitochondrií. Pro detailnější porozumění uvedených vztahů jsme se zaměřili na studium vztahu mezi obsahem železa a mědi v myokardu, funkcí srdečních mitochondrií přímo v biopsiích srdečních svalů odebraných kontrolním pacientům a pacientům s ChSS během transplantace srdce v IKEMu v Praze.

8.2 Experimentální část

8.2.1 Použité chemikálie a materiál

Kyselina dusičná 65 % Analpure[®], peroxid vodíku 30 % PA+, CRM vodné kalibrační roztoky Fe a Cu o koncentraci $1\ 000 \pm 2\ \text{mg.l}^{-1}$ a CRM vodný kalibrační roztok interního standardu pro ICP-MS „*INT-MIX 1*“ (Sc, Y, In, Tb, Bi) o koncentraci $10 \pm 0,1\ \text{mg.l}^{-1}$ byly zakoupeny od firmy Analytika, spol. s.r.o (Praha, Česká republika). CRM jezerní vody TM-15.2 (LOT 0313) a TMDA-64.2 (LOT 1010) byly zakoupeny u firmy NRC–CNRC (Ottawa, Kanada). SRM tkáňě ústřice SRM[®] 1566b byl zakoupen od NIST (Gaithersburg, MD, USA). Deionizovaná voda (měrný odpor $18,2\ \text{M}\Omega\cdot\text{cm}$) byla získána z dvoustupňové deionizační stanice Milli-Q water systému (Millipore, Francie).

8.2.2 Instrumentace

Pro stanovení celkové koncentrace železa a mědi ve vzorcích biopsií lidských srdcí bylo využito mikrovlnného rozkladného systému MLS 1200 mega a ORS-ICP-MS Agilent 7700x (Agilent Technologies, Japonsko) vybaveného autosamplerem ASX-520, mikrokoncentrickým zmlžovačem, chlazenou mlžnou komorou dle Scotta a oktapólovou kolizně/reakční celou. Parametry nastavení ORS-ICP-MS byly následující: příkon generátoru $1\ 550\ \text{W}$, průtok vnějšího plazmového plynu $14,95\ \text{l.min}^{-1}$, průtok středního plazmového plynu $0,9\ \text{l.min}^{-1}$,

průtok nosného plynu $1,09 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ a průtok helia kolizní celou $4,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Monitorovány byly izotopy ^{56}Fe , ^{63}Cu a ^{45}Sc , ^{89}Y , které byly zvoleny jako vhodné interní standardy.

8.2.3 Analyzované vzorky srdeční tkáně

Vzorky srdeční svalové tkáně byly získány od 91 pacientů s pokročilým ChSS, kteří postoupili transplantaci srdce v Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze. Kontrolní vzorky srdeční svalové tkáně byly získány od 38 dárců bez ChSS a systolické dysfunkce, jejichž srdce nemohla být použita k transplantaci z technických nebo zdravotních důvodů. V porovnání s kontrolní skupinou, byla u pacientů s ChSS diagnostikována těžká dysfunkce levé komory s častější přítomností anémie, navíc se jednalo o pacienty nepatrně starší a častěji mužského pohlaví. Příčiny smrti kontrolních pacientů zahrnovaly hemoragickou cévní mozkovou příhodu (56 %), poranění hlavy (26 %), posthypoxický otok mozku (14 %) a jiné příčiny (5 %). Ze srdeční svalové tkáně byly odebrány vzorky levých komor tak, aby se zabránilo odběru zjizvené části tkáně či epikardiálního tuku. Odebrané vzorky byly okamžitě hluboce zmrazeny v kapalném dusíku a následně uchovány při teplotě $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

8.2.4 Stanovení železa a mědi

Před vlastním stanovením celkové koncentrace železa a mědi byly vzorky srdeční svalové tkáně sušeny v lyofilizátoru dosucha. Lyofilizované vzorky (4,3–57,4 mg) byly naváženy do teflonových mineralizačních kelímků, kde k nim byla přidána mineralizační směs složená z 1 ml 65 % kyseliny dusičné a 0,25 ml 30 % peroxidu vodíku. Takto připravené vzorky byly rozkládány v mikrovlnném rozkladném systému MLS 1200 mega podle rozkladného programu uvedeném v Tabulce 5.3. Vychlazené mineralizáty byly kvantitativně převedeny do 10 ml odměrných baněk a doplněny po rysku deionizovanou vodou. Standardní referenční materiál SRM[®] 1566b byl před použitím vysušen dle postupu uvedeného v certifikátu a následně bylo odebíráno 250 mg referenčního materiálu pro mikrovlnný rozklad. Slepý pokus byl připraven z 1 ml 65 % kyseliny dusičné a 0,25 ml 30 % peroxidu vodíku. V takto připravených vzorcích byl celkový obsah železa a mědi stanoven pomocí ORS-ICP-MS Agilent 7700x. Dále pro zajištění kontroly kvality výsledků stanovení celkové koncentrace železa a mědi v srdečních tkáních byly průběžně analyzovány certifikované referenční materiály TM-15.2 a TMDA-64.2.

8.2.5 Statistická analýza

Výsledná data jsou dále v textu vyjádřena jako průměr \pm SD. Statistický program JMP10 (SAS, Cary, NC, USA) byl použit k vyhodnocení naměřených dat. Ověření normálního rozdělení dat bylo prováděno Shapirovým-Wilkovým testem normality, zatímco rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly porovnávány s využitím nepárového t -testu či χ^2 testu. Korelační analýza byla prováděna pomocí Pearsonova testu. Pro všechny použité statistické testy byla P-hodnota $<0,05$ považována za statisticky významnou. Meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) byly vypočteny pomocí matematického modelu „meze: $3s$ – IUPAC“ ve validovaném programu EffiValidation 3.0 (Effichem, s.r.o., Česká republika).

8.3 Výsledky a diskuse

8.3.1 Validace ICP-MS metody

Validace metody zahrnovala testování linearitu, meze detekce, meze stanovitelnosti, správnosti a přesnosti. Linearita byla ověřována v rozsahu LOQ – 2 000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pro Fe a LOQ – 1 000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pro Cu. Meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) byly vypočteny na základě dat získaných analýzou 6 nezávisle připravených slepých pokusů podle matematického modelu „meze: $3s$ – IUPAC“, kdy získané hodnoty byly dále přepočteny na průměrnou navážku 25 mg a ředění do 10 ml odměrných baněk. Získané hodnoty pro validační parametry linearita, LOD a LOQ jsou shrnuty v Tabulce 8.1. Z důvodu nedostupnosti CRM lidského srdce bylo ověření správnosti a přesnosti ICP-MS metody provedeno s využitím SRM tkáně ústřice SRM[®] 1566b s certifikovanou hodnotou $205,8 \pm 6,8 \text{ mg.kg}^{-1}$ pro železo a $71,6 \pm 1,6 \text{ mg.kg}^{-1}$ pro měď odpovídající koncentrační hladině obou kovů v reálných vzorcích srdečních biopsií. Výsledky ověření správnosti a přesnosti ICP-MS metody jsou uvedeny v Tabulce 8.2. Za účelem zajištění kontroly kvality výsledků ICP-MS stanovení Fe a Cu byly každou 10. a 11. analýzu opakovaně měřeny certifikované referenční materiály TM-15.2 (certifikované koncentrace $26,0 \pm 4,7 \mu\text{g.l}^{-1}$ pro Fe, $17,3 \pm 1,6 \mu\text{g.l}^{-1}$ pro Cu) a TMDA 64.2 (certifikované koncentrace $306 \pm 27,1 \mu\text{g.l}^{-1}$ pro Fe, $274 \pm 24,1 \mu\text{g.l}^{-1}$ pro Cu). Výsledky opakované analýzy referenčních materiálů jsou společně s certifikovanými hodnotami, hodnotami výtěžností a relativních směrodatných odchylek uvedeny v Tabulce 8.3.

Tab. 8.1 Linearita, mez detekce a mez stanovitelnosti.

Prvek	Korelační koeficient R	LOD ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	LOD* ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	LOQ* ($\mu\text{g.g}^{-1}$)
Fe	1,0000	0,8	2,7	0,3	1,1
Cu	0,9999	0,2	0,7	0,1	0,3

*hodnoty LOD a LOQ přepočtené na průměrnou navážku 25 mg a ředění do 10 ml.

Tab. 8.2 Správnost a přesnost ICP-MS metody

Prvek	SRM [®] 1566b			
	Certifikovaná hodnota $\bar{X} \pm U$ (mg.kg^{-1})	Průměrná koncentrace $\bar{X} \pm \sigma$ (mg.kg^{-1})	Výtěžnost (%)	RSD (%)
Fe	205,8 \pm 6,8	212,1 \pm 11,4	103,1	5,4
Cu	71,6 \pm 1,6	73,3 \pm 2,4	102,3	3,3

U – rozšířená nejistota s koeficientem rozšíření $k = 2$ (95 % hladina spolehlivosti)

$n = 6$

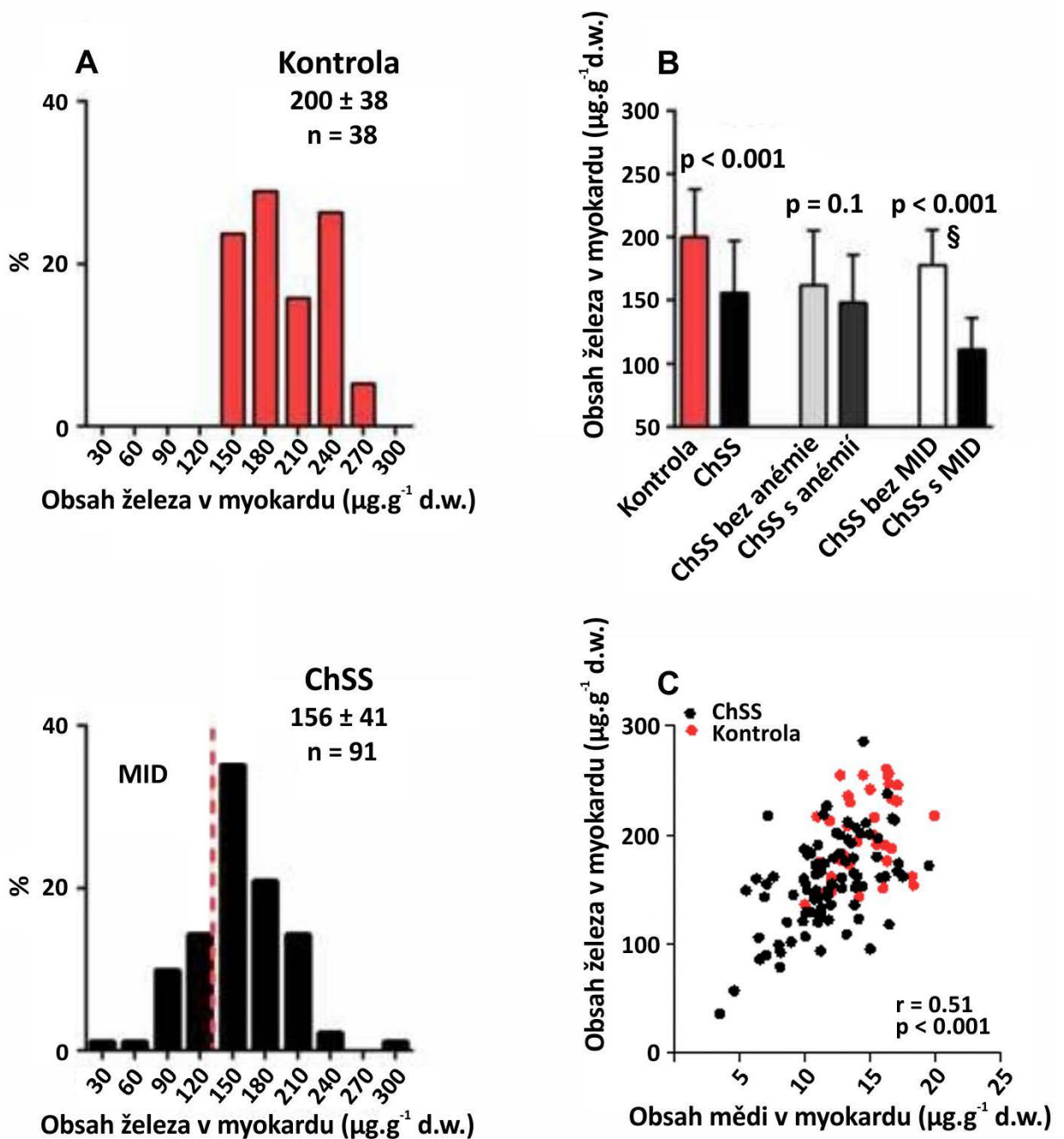
Tab. 8.3 Výsledky opakované analýzy železa a mědi v CRM TM-15.2 a TMDA-64.2

Prvek	CRM TM-15.2			
	Certifikovaná hodnota $\bar{X} \pm 2\sigma$ ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	Průměrná koncentrace $\bar{X} \pm 2\sigma$ ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	Výtěžnost (%)	RSD (%)
Fe	26,0 \pm 4,7	26,6 \pm 2,2	101,6	4,1
Cu	17,3 \pm 1,6	17,4 \pm 1,1	100,4	3,1
CRM TMDA-64.2				
Fe	306 \pm 27,1	308 \pm 6	100,6	1,0
Cu	274 \pm 24,1	277 \pm 10	101,1	1,8

$n = 13$

8.3.2 Obsah železa a mědi v srdeční svalové tkáni

Validovaná metoda ICP-MS stanovení železa a mědi v biologických tkáních byla aplikována na 129 reálných vzorků srdečních biopsií odebraných během transplantace srdce v IKEMu v Praze. Reálné vzorky byly připraveny dle postupu uvedeného v kap. 8.2.4. Kvantitativní ICP-MS analýza prokázala výrazné snížení koncentrace železa a mědi u pacientů s chronickým srdečním selháním. V porovnání s kontrolní skupinou byla celková koncentrace obou kovů v srdeční tkáni ChSS pacientů snížena přibližně o 22 %, a to z 200 ± 38 na $156 \pm 41 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pro železo (Obr. 8.1A) a $15,1 \pm 3,9$ na $11,7 \pm 3,1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pro měď. Výsledky stanovení železa v srdeční tkáni korespondují s dosud publikovanými menšími studii, kdy bylo rovněž pozorováno snížení koncentrace železa u pacientů s ChSS v rozmezí 16-29 % (cit. ^{159,160}). Překvapivě, myokardiální deficit železa („*myocardial iron deficiency*“ – MID) měl jen marginální vztah k přítomnosti anémie u ChSS pacientů a jeho prahová hodnota byla definována *a priori* jako obsah železa $<142,9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (Obr. 8.1A). Detailní porovnání celkové koncentrace železa pro kontrolní skupinu a jednotlivé podskupiny pacientů s ChSS je prezentováno na Obr. 8.1B. Z porovnání vyplývá, že i u ChSS pacientů bez MID došlo k výraznému snížení celkového obsahu železa. Nicméně, pacienti s MID měli delší anamnézu ChSS, nižší dávku betablokátorů a větší rozsah koronární aterosklerózy, v porovnání s pacienty bez MID. Kromě toho koncentrace železa a mědi v srdečním svaly vykazovaly významnou korelaci ($r = 0,51$), která byla silnější v případě výsledků pro ChSS skupinu (Obr. 8.1C).



Obr. 8.1 (A) Distribuce obsahu železa v myokardu ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, d. w.) pro kontrolní (nahore) a ChSS skupinu pacientů (dole), kde přerušovaná čára představuje prahovou hodnotu pro myokardiální deficit železa ($142,9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, d. w.). (B) Zobrazení obsahu železa v myokardu (průměr \pm SD) pro vybrané skupiny ChSS pacientů, § $p \leq 0,001$ vs kontrolní skupina. (C) Korelace obsahu železa a mědi v srdeční svalové tkáni.

Další část experimentální práce byla zaměřena na studium vztahu mezi obsahem železa a mědi v myokardu a funkcí srdečních mitochondrií v kontextu srdečního selhání. Funkce srdečních mitochondrií (stanovení aktivity enzymů citrátového cyklu a dýchacího řetězce, mitochondriální respirace a exprese mitochondriálních proteinů) byla studována výzkumnými skupinami pod vedením doc. RNDr. Jiřího Petráka, Ph.D., RNDr. Tomáše Mráčka, Ph.D. a doc. MUDr. Vojtěcha Melenovského, CSc. (cit.⁵⁶). Výsledky detailního studia funkce srdečních mitochondrií potvrdily, že v důsledku srdečního selhání dochází k prohloubení mitochondriální dysfunkce, což je v souladu s dříve publikovanými studiemi^{148,161,162}. Vliv koncentrace železa a mědi v srdeční tkáni na funkci srdečních mitochondrií bude ilustrován na příkladu studia enzymové aktivity. V případě stanovení aktivit mitochondriálních enzymů u pacientů s ChSS bylo zjištěno jejich výrazné snížení. V porovnání s kontrolní skupinou byly aktivity akonitázy, citrátsyntázy, NADH-cytochrom c reduktázy (NCCR), sukcinát-cytochrom c reduktázy (SCCR) a cytochrom c oxidázy (COX) výrazně sníženy, a to konkrétně o -19 % pro akonitázu ($p < 0,001$), -22 % pro citrátsyntázu ($p < 0,001$), -27 % pro NCCR ($p < 0,001$), -27 % pro SCCR ($p < 0,001$) a -33 % pro COX ($p < 0,001$). Přítomnost MID vedla k dalšímu snížení aktivity enzymů citrátového cyklu (akonitázy o -26 % ($p < 0,05$) a citrátsyntázy o -15 % ($p < 0,05$)), přičemž aktivity oxidoreduktáz dýchacího řetězce zůstaly prakticky nezměněny. V případě skupiny pacientů s ChSS byla zjištěna významná korelace mezi obsahem železa a enzymovou aktivitou akonitázy, citrátsyntázy a SCCR. Výsledky korelační analýz pro skupinu pacientů s ChSS jsou uvedeny v Tab 8.4.

Tab. 8.4 Korelační analýza mezi obsahem železa a aktivitou mitochondriálních enzymů pro skupinu pacientů s ChSS. Převzato z cit⁵⁶.

Enzym	r	p-hodnota
Akonitáza	0,23	0,03
Citrátsyntáza	0,30	0,004
NADH-cytochrom c reduktáza	0,1	0,3
Sukcinát-cytochrom c reduktáza	0,24	0,02
Cytochrom c oxidáza	0,18	0,08

r – Pearsonův korelační koeficient

Získané výsledky přímé tkáňové analýzy odhalily, že v případě pacientů s ChSS dochází k systematickému snížení celkové koncentrace železa a mědi v myokardu. Snížení koncentrace železa je navíc spojeno s mitochondriální dysfunkcí zahrnující snížení aktivity mitochondriálních enzymů a mitochondriální respirace, ale i snížení exprese katalázy, glutathion peroxidázy, komplexu III a V respiračního řetězce. Zatímco snížený obsah mědi u pacientů s ChSS byl spojen především se snížením COX dependentní respirace. Mezi klíčové poznatky patří zejména skutečnost, že část změn ve funkci srdečních mitochondrií u ChSS pacientů může souviset s přítomností myokardiálního deficitu železa, který tak přispívá k prohloubení mitochondriální dysfunkce spojené se sníženou substrátovou flexibilitou (snížená aktivita citrátového cyklu – nižší využití acetyl-CoA) a odolností vůči oxidativnímu poškození reaktivními formami kyslíku. Předkládaná idea je založena na skutečnosti, že celá řada mitochondriálních enzymů podílejících se na oxidativní fosforylaci nebo na antioxidační ochraně totiž využívají volné železo jako kovového kofaktoru, ale i železo navázaného v hemu nebo v Fe-S klastrech.

8.4 Závěr

Prezentovaná studie jako první systematicky zkoumá vztah mezi obsahem železa, mědi a funkcí mitochondrií přímo ve vzorcích srdeční svalové tkáně odebrané kontrolním a ChSS pacientům podstupujícím transplantaci srdce. Validovaná ICP-MS metoda byla využita ke kvantitativnímu stanovení železa a mědi ve 129 reálných vzorcích srdečních biopsií odebraných během transplantace srdce v IKEMu v Praze. V porovnání s kontrolní skupinou, došlo u pacientů s pokročilým ChSS výraznému snížení (~22 %) obsahu železa a mědi, které je spojeno se současným snížením aktivit enzymů citrátového cyklu, mitochondriální respirací, snížením exprese proteinů dýchacího řetězce. Kromě toho, přítomnost MID u ChSS pacientů se projevuje ještě výraznějším snížením aktivity klíčových enzymů citrátového cyklu a sníženou expresí tzv. „*ROS-protecting enzymes*“. Přítomnost MID může přispívat k prohloubení mitochondriální dysfunkce spojené se sníženou substrátovou flexibilitou a odolností vůči oxidativnímu poškození reaktivními formami kyslíku.

9. Literatura

- (1) Becker, J. S. *Inorganic mass spectrometry: principles and applications*; John Wiley & Sons Inc.: Chichester, 2007.
- (2) Hill, J. S. *Inductively coupled plasma spectrometry and its applications*; Blackwell Publishing Ltd.: Oxford, 2007.
- (3) Nelms, S. M. *ICP Mass spectrometry handbook*; Blackwell Publishing Ltd.: Oxford, 2005.
- (4) Thomas, R. *Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners*, 2nd ed.; CRC Press: Boca Raton, 2008.
- (5) Butler, O. T.; Cairns, W. R. L.; Cook, J. M.; Davidson, C. M. *J. Anal. At. Spectrom.* **2016**, *31*, 35-89.
- (6) Carter, S.; Fisher, A.; Garcia, R.; Gibson, B.; Marshall, J.; Whiteside, I. *J. Anal. At. Spectrom.* **2016**, *31*, 2114-2164.
- (7) Profrock, D.; Prange, A. *Appl. Spectrosc.* **2012**, *66*, 843-868.
- (8) Taylor, A.; Barlow, N.; Day, M. P.; Hill, S.; Patriarca, M.; White, M. *J. Anal. At. Spectrom.* **2016**, *31*, 554-596.
- (9) Rodriguez-Gonzalez, P.; Alonso, J. I. G. *J. Anal. At. Spectrom.* **2010**, *25*, 239-259.
- (10) Timerbaev, A. R. *J. Anal. At. Spectrom.* **2014**, *29*, 1058-1072.
- (11) Becker, J. S.; Matusch, A.; Wu, B. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *835*, 1-18.
- (12) Becker, J. S.; Zoriy, M.; Matusch, A.; Wu, B.; Salber, D.; Palm, C.; Becker, J. S. *Mass Spectrom. Rev.* **2010**, *29*, 156-175.
- (13) Limbeck, A.; Galler, P.; Bonta, M.; Bauer, G.; Nischkauer, W.; Vanhaecke, F. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 6593-6617.
- (14) Costas-Rodriguez, M.; Delanghe, J.; Vanhaecke, F. *Trac-Trends Anal. Chem.* **2016**, *76*, 182-193.
- (15) da Silva, B. F.; Perez, S.; Gardinalli, P.; Singhal, R. K.; Mozeto, A. A.; Barcelo, D. *Trac-Trends Anal. Chem.* **2011**, *30*, 528-540.
- (16) Leopold, K.; Philippe, A.; Worle, K.; Schaumann, G. E. *Trac-Trends Anal. Chem.* **2016**, *84*, 107-120.
- (17) Majedi, S. M.; Lee, H. K. *Trac-Trends Anal. Chem.* **2016**, *75*, 183-196.
- (18) Montano, M. D.; Olesik, J. W.; Barber, A. G.; Challis, K.; Ranville, J. F. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408*, 5053-5074.
- (19) Clough, R.; Harrington, C. F.; Hill, S. J.; Madrid, Y.; Tyson, J. F. *J. Anal. At. Spectrom.* **2016**, *31*, 1330-1373.
- (20) Marcinkowska, M.; Baralkiewicz, D. *Talanta* **2016**, *161*, 177-204.
- (21) Mketi, N.; Nomngongo, P. N.; Ngila, J. C. *Trac-Trends Anal. Chem.* **2016**, *85*, 107-116.
- (22) Mihaljevic, M.; Strnad, L.; Sebek, O. *Chem. Listy* **2004**, *98*, 123-130.
- (23) Krakowska, E.; Kuss, H. M. *Rozklady v analytickej chemii Súčasný stav a trendy*; VIENALA: Košice, 2001.
- (24) Bodzon-Kulakowska, A.; Suder, P. *Mass Spectrom. Rev.* **2016**, *35*, 147-169.
- (25) McDonnell, L. A.; Heeren, R. M. A. *Mass Spectrom. Rev.* **2007**, *26*, 606-643.

- (26) Pol, J.; Strohal, M.; Havlicek, V.; Volny, M. *Histochem. Cell Biol.* **2010**, *134*, 423-443.
- (27) Heeren, R. M. A. *Int. J. Mass Spectrom.* **2015**, *377*, 672-680.
- (28) Sussulini, A.; Becker, J. S.; Becker, J. S. *Mass Spectrom. Rev.* **2017**, *36*, 47-57.
- (29) Qin, Z. Y.; Caruso, J. A.; Lai, B.; Matusch, A.; Becker, J. S. *Metallomics* **2011**, *3*, 28-37.
- (30) Hare, D.; Austin, C.; Doble, P. *Analyst* **2012**, *137*, 1527-1537.
- (31) Miliszkiewicz, N.; Walas, S.; Tobiasz, A. *J. Anal. At. Spectrom.* **2015**, *30*, 327-338.
- (32) Liu, R.; Wu, P.; Yang, L.; Hou, X. D.; Lv, Y. *Mass Spectrom. Rev.* **2014**, *33*, 373-393.
- (33) Managh, A. J.; Hutchinson, R. W.; Riquelme, P.; Broichhausen, C.; Wege, A. K.; Ritter, U.; Ahrens, N.; Koehl, G. E.; Walter, L.; Florian, C.; Schlitt, H. J.; Reid, H. J.; Geissler, E. K.; Sharp, B. L.; Hutchinson, J. A. *J. Immunol.* **2014**, *193*, 2600-2608.
- (34) Seuma, J.; Bunch, J.; Cox, A.; McLeod, C.; Bell, J.; Murray, C. *Proteomics* **2008**, *8*, 3775-3784.
- (35) Egger, A. E.; Theiner, S.; Kornauth, C.; Heffeter, P.; Berger, W.; Keppler, B. K.; Hartinger, C. *G. Metallomics* **2014**, *6*, 1616-1625.
- (36) Reifschneider, O.; Wehe, C. A.; Raj, I.; Ehmcke, J.; Ciarimboli, G.; Sperling, M.; Karst, U. *Metallomics* **2013**, *5*, 1440-1447.
- (37) Theiner, S.; Kornauth, C.; Varbanov, H. P.; Galanski, M.; Van Schoonhoven, S.; Heffeter, P.; Berger, W.; Egger, A. E.; Keppler, B. K. *Metallomics* **2015**, *7*, 1256-1264.
- (38) Theiner, S.; Schreiber-Brynzak, E.; Jakupec, M. A.; Galanski, M.; Koellensperger, G.; Keppler, B. K. *Metallomics* **2016**, *8*, 398-402.
- (39) Van Acker, T.; Van Malderen, S. J. M.; Van Heerden, M.; McDuffie, J. E.; Cuyckens, F.; Vanhaecke, F. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *945*, 23-30.
- (40) Buchner, T.; Drescher, D.; Traub, H.; Schrade, P.; Bachmann, S.; Jakubowski, N.; Kneipp, J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 7003-7014.
- (41) Drescher, D.; Giesen, C.; Traub, H.; Panne, U.; Kneipp, J.; Jakubowski, N. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 9684-9688.
- (42) Wang, M.; Zheng, L. N.; Wang, B.; Chen, H. Q.; Zhao, Y. L.; Chai, Z. F.; Reid, H. J.; Sharp, B. L.; Feng, W. Y. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 10252-10256.
- (43) Zhai, J.; Wang, Y. L.; Xu, C.; Zheng, L. N.; Wang, M.; Feng, W. Y.; Gao, L.; Zhao, L. N.; Liu, R.; Gao, F. P.; Zhao, Y. L.; Chai, Z. F.; Gao, X. Y. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 2546-2549.
- (44) Pornwilard, M. M.; Weiskirchen, R.; Gassler, N.; Bosserhoff, A. K.; Becker, J. S. *Plos One* **2013**, *8*.
- (45) Fernandez, B.; Claverie, F.; Pecheyran, C.; Donard, O. F. X. *Trac-Trends Anal. Chem.* **2007**, *26*, 951-966.
- (46) Guillong, M.; Gunther, D. *J. Anal. At. Spectrom.* **2002**, *17*, 831-837.
- (47) Hattendorf, B.; Latkoczy, C.; Gunther, D. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 341A-347A.
- (48) Hergenroder, R.; Samek, O.; Hommes, V. *Mass Spectrom. Rev.* **2006**, *25*, 551-572.
- (49) Koch, J.; Gunther, D. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387*, 149-153.
- (50) Pisonero, J.; Gunther, D. *Mass Spectrom. Rev.* **2008**, *27*, 609-623.
- (51) Resano, M.; Garcia-Ruiz, E.; Vanhaecke, F. *Mass Spectrom. Rev.* **2010**, *29*, 55-78.

- (52) Russo, R. E.; Mao, X. L.; Liu, C.; Gonzalez, J. *J. Anal. At. Spectrom.* **2004**, *19*, 1084-1089.
- (53) Hoesl, S.; Neumann, B.; Techritz, S.; Linscheid, M.; Theuring, F.; Scheler, C.; Jakubowski, N.; Mueller, L. *J. Anal. At. Spectrom.* **2014**, *29*, 1282-1291.
- (54) Hoesl, S.; Neumann, B.; Techritz, S.; Sauter, G.; Simon, R.; Schluter, H.; Linscheid, M. W.; Theuring, F.; Jakubowski, N.; Mueller, L. *J. Anal. At. Spectrom.* **2016**, *31*, 801-808.
- (55) Luptakova, D.; Pluhacek, T.; Palyzova, A.; Prichystal, J.; Balog, J.; Lemr, K.; Havlicek, V. *Acta virologica* **2017**, *61*, 353-360.
- (56) Melenovsky, V.; Petrak, J.; Mracek, T.; Benes, J.; Borlaug, B. A.; Nuskova, H.; Pluhacek, T.; Spatenka, J.; Kovalcikova, J.; Drahota, Z.; Kautzner, J.; Pirk, J.; Houstek, J. *European Journal of Heart Failure* **2017**, *19*, 522-530.
- (57) Pluhacek, T.; Lemr, K.; Ghosh, D.; Milde, D.; Novak, J.; Havlicek, V. *Mass Spectrom. Rev.* **2016**, *35*, 35-47.
- (58) Pluhacek, T.; Petrik, M.; Luptakova, D.; Benada, O.; Palyzova, A.; Lemr, K.; Havlicek, V. *Proteomics* **2016**, *16*, 1785-1792.
- (59) Latge, J. P. *Clinical Microbiology Reviews* **1999**, *12*, 310-350.
- (60) Tekaiia, F.; Latge, J. P. *Current Opinion in Microbiology* **2005**, *8*, 385-392.
- (61) Kuch, M. A. *Medical Mycology* **2006**, *44*, S127-S131.
- (62) O'Gorman, C. M.; Fuller, H. T.; Dyer, P. S. *Nature* **2009**, *457*, 471-U475.
- (63) Index Fungorum, <http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=211776> (Staženo 5.4.2017).
- (64) <http://biobalance.pl/grzyby/aspergillus-2/> (Staženo 5.4.2017).
- (65) Tochigi, N.; Okubo, Y.; Ando, T.; Wakayama, M.; Shinozaki, M.; Gocho, K.; Hata, Y.; Ishiwatari, T.; Nemoto, T.; Shibuya, K. *Mediators of Inflammation* **2013**.
- (66) Filler, S. G.; Sheppard, D. C. *Plos Pathogens* **2006**, *2*, 1099-1105.
- (67) Barnes, P. D.; Marr, K. A. *Infectious Disease Clinics of North America* **2006**, *20*, 545-561.
- (68) Hope, W. W.; Walsh, T. J.; Denning, D. W. *Medical Mycology* **2005**, *43*, S207-S238.
- (69) Haas, H. *Frontiers in Microbiology* **2012**, *3*.
- (70) Racil, Z.; Kocmanova, I.; Toskova, M.; Buresova, L.; Weinbergerova, B.; Lengerova, M.; Rolencova, M.; Winterova, J.; Hrnairova, K.; Volfova, P.; Skrickova, J.; Mayer, J. *International Journal of Infectious Diseases* **2011**, *15*, E874-E881.
- (71) Thornton, C. R. *Expert Review of Clinical Immunology* **2014**, *10*, 771-780.
- (72) Brown, G. D.; Denning, D. W.; Levitz, S. M. *Science* **2012**, *336*, 647-647.
- (73) Hider, R. C.; Kong, X. L. *Natural Product Reports* **2010**, *27*, 637-657.
- (74) Haas, H.; Eisendle, M.; Turgeon, B. G. In *Annual Review of Phytopathology*, 2008, pp 149-187.
- (75) Petrik, M.; Haas, H.; Laverman, P.; Schrettl, M.; Franssen, G. M.; Blatzer, M.; Decristoforo, C. *Molecular Imaging and Biology* **2014**, *16*, 102-108.
- (76) Carroll, C. S.; Amankwa, L. N.; Pinto, L. J.; Fuller, J. D.; Moore, M. M. *Plos One* **2016**, *11*.
- (77) Ruhnke, M.; Maschmeyer, G. *European Journal of Medical Research* **2002**, *7*, 227-235.

- (78) Eigl, S.; Prattes, J.; Lackner, M.; Willinger, B.; Spiess, B.; Reinwald, M.; Selitsch, B.; Meilinger, M.; Neumeister, P.; Reischies, F.; Wolfler, A.; Raggam, R. B.; Flick, H.; Eschertzhuber, S.; Krause, R.; Buchheidt, D.; Thornton, C. R.; Lass-Florl, C.; Hoenigl, M. *Critical Care* **2015**, *19*.
- (79) Havlicek, V.; Lemr, K.; Schug, K. A. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 790-797.
- (80) Acosta, J.; Catalan, M.; del Palacio-Perez-Medel, A.; Lora, D.; Montejo, J. C.; Cuetara, M. S.; Moragues, M. D.; Ponton, J.; del Palacio, A. *Clinical Microbiology and Infection* **2011**, *17*, 1053-1060.
- (81) Rogers, T. R.; Morton, C. O.; Springer, J.; Conneally, E.; Heinz, W.; Kenny, C.; Frost, S.; Einsele, H.; Loeffler, J. *British Journal of Haematology* **2013**, *161*, 517-524.
- (82) White, P. L.; Parr, C.; Thornton, C.; Barnes, R. A. *Journal of Clinical Microbiology* **2013**, *51*, 1510-1516.
- (83) De Vlieger, G.; Lagrou, K.; Maertens, J.; Verbeken, E.; Meersseman, W.; Van Wijngaerden, E. *Journal of Clinical Microbiology* **2011**, *49*, 3783-3787.
- (84) Sulahian, A.; Porcher, R.; Bergeron, A.; Touratier, S.; Raffoux, E.; Menotti, J.; Derouin, F.; Ribaud, P. *Journal of Clinical Microbiology* **2014**, *52*, 2328-2333.
- (85) Ofner, J.; Kamilli, K. A.; Eitenberger, E.; Friedbacher, G.; Lendl, B.; Held, A.; Lohninger, H. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 9413-9420.
- (86) Strohalm, M.; Strohalm, J.; Kaftan, F.; Krasny, L.; Volny, M.; Novak, P.; Ulbrich, K.; Havlicek, V. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 5458-5462.
- (87) O'Dea, E. M.; Amarsaikhan, N.; Li, H. T.; Downey, J.; Steele, E.; Van Dyken, S. J.; Locksley, R. M.; Templeton, S. P. *Infection and Immunity* **2014**, *82*, 3199-3205.
- (88) Schindelin, J.; Rueden, C. T.; Hiner, M. C.; Eliceiri, K. W. *Molecular Reproduction and Development* **2015**, *82*, 518-529.
- (89) Hare, D. J.; Lear, J.; Bishop, D.; Beavis, A.; Doble, P. A. *Anal. Methods* **2013**, *5*, 1915-1921.
- (90) Levin, C. S. *Proceedings of the Ieee* **2008**, *96*, 439-467.
- (91) Lear, J.; Hare, D. J.; Fryer, F.; Adlard, P. A.; Finkelstein, D. I.; Doble, P. A. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 6707-6714.
- (92) Chughtai, K.; Jiang, L.; Greenwood, T. R.; Klinkert, I.; van Hove, E. R. A.; Heeren, R. M. A.; Gunde, K. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 1817-1823.
- (93) Potocnik, N. O.; Skraskova, K.; Flinders, B.; Pelicon, P.; Heeren, R. M. A. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 6781-6785.
- (94) Ferreira, C. R.; Wu, L. M.; Vogt, F. G.; Bornancini, E. R.; Cooks, R. G. *Analytical Letters* **2014**, *47*, 91-101.
- (95) Palmer, A. D.; Alexandrov, T. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 4055-4062.
- (96) Breen, M. S.; Lazebnik, R. S.; Wilson, D. L. *Annals of Biomedical Engineering* **2005**, *33*, 1100-1112.
- (97) Lazebnik, R. S.; Lancaster, T. L.; Breen, M. S.; Lewin, J. S.; Wilson, D. L. *Ieee Transactions on Medical Imaging* **2003**, *22*, 653-660.
- (98) Humm, J. L.; Ballon, D.; Hu, Y. C.; Ruan, S.; Chui, C.; Tulipano, P. K.; Erdi, A.; Koutcher, J.; Zakian, K.; Urano, M.; Zanzonico, P.; Mattis, C.; Dyke, J.; Chen, Y.; Harrington, P.; O'Donoghue, J. A.; Ling, C. C. *Medical Physics* **2003**, *30*, 2303-2314.

- (99) Parker, C. C.; Damyanovich, A.; Haycocks, T.; Haider, M.; Bayley, A.; Catton, C. N. *Radiotherapy and Oncology* **2003**, *66*, 217-224.
- (100) Unlu, M. Z.; Krol, A.; Magri, A.; Mandel, J. A.; Lee, W.; Baum, K. G.; Lipson, E. D.; Coman, I. L.; Feiglin, D. H. *Computers in Biology and Medicine* **2010**, *40*, 37-53.
- (101) Lim, Y. K.; Kwak, J.; Kim, D. W.; Shin, D.; Yoon, M.; Park, S.; Kim, J. S.; Ahn, S. H.; Shin, J.; Lee, S. B.; Park, S. Y.; Pyo, H. R.; Kim, D. Y.; Cho, K. H. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **2009**, *74*, 1609-1616.
- (102) Ulbrich, K.; Subr, V.; Strohalm, J.; Plocova, D.; Jelinkova, M.; Rihova, B. *Journal of Controlled Release* **2000**, *64*, 63-79.
- (103) Polson, C. J. *Nature* **1950**, *166*, 115-115.
- (104) Maltoni, D.; Maio, D.; Jain, A. K.; Prabhakar, S. *Handbook of Fingerprint Recognition - Second Edition*; Springer: London, 2009.
- (105) Choi, M. J.; McDonagh, A. M.; Maynard, P.; Roux, C. *Forensic Science International* **2008**, *179*, 87-97.
- (106) Hazarika, P.; Russell, D. A. *Angewandte Chemie-International Edition* **2012**, *51*, 3524-3531.
- (107) Xu, L. R.; Li, Y.; Wu, S. Z.; Liu, X. H.; Su, B. *Angewandte Chemie-International Edition* **2012**, *51*, 8068-8072.
- (108) Becue, A.; Moret, S.; Champod, C.; Margot, P. *Biotechnic & Histochemistry* **2011**, *86*, 140-160.
- (109) Wilshire, B. *Endeavour* **1996**, *20*, 12-15.
- (110) Ryu, S. J.; Kim, A.; Kim, M. D.; Hong, S. W.; Min, S. S.; Lee, J. H.; Lee, J. K.; Jung, H. *Applied Clay Science* **2014**, *101*, 52-59.
- (111) Saif, M.; Shebl, M.; Nabeel, A. I.; Shokry, R.; Hafez, H.; Mbarek, A.; Damak, K.; Maalej, R.; Abdel-Mottaleb, M. S. A. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2015**, *220*, 162-170.
- (112) Su, B. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408*, 2781-2791.
- (113) Tang, H. W.; Lu, W.; Che, C. M.; Ng, K. M. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 1589-1593.
- (114) Bailey, M. J.; Bright, N. J.; Croxton, R. S.; Francese, S.; Ferguson, L. S.; Hinder, S.; Jickells, S.; Jones, B. J.; Jones, B. N.; Kazarian, S. G.; Ojeda, J. J.; Webb, R. P.; Wolstenholme, R.; Bleay, S. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 8514-8523.
- (115) Bailey, M. J.; Ismail, M.; Bleay, S.; Bright, N.; Elad, M. L.; Cohen, Y.; Geller, B.; Everson, D.; Costa, C.; Webb, R. P.; Watts, J. F.; de Puit, M. *Analyst* **2013**, *138*, 6246-6250.
- (116) Bradshaw, R.; Bleay, S.; Wolstenholme, R.; Clench, M. R.; Francese, S. *Forensic Science International* **2013**, *232*, 111-124.
- (117) Francese, S.; Bradshaw, R.; Ferguson, L. S.; Wolstenholme, R.; Clench, M. R.; Bleay, S. *Analyst* **2013**, *138*, 4215-4228.
- (118) Huynh, C.; Brunelle, E.; Halamkova, L.; Agudelo, J.; Halamek, J. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 11531-11536.
- (119) Ifa, D. R.; Manicke, N. E.; Dill, A. L.; Cooks, G. *Science* **2008**, *321*, 805-805.
- (120) Kaplan-Sandquist, K.; LeBeau, M. A.; Miller, M. L. *Forensic Science International* **2014**, *235*, 68-77.
- (121) Sisco, E.; Dake, J.; Bridge, C. *Forensic Science International* **2013**, *232*, 160-168.

- (122) Diaz, E.; Sarkis, J. E. S.; Viebig, S.; Saldiva, P. *Forensic Science International* **2012**, *214*, 44-47.
- (123) Abrego, Z.; Grijalba, N.; Unceta, N.; Maguregui, M.; Sanchez, A.; Fernandez-Isla, A.; Goicolea, M. A.; Barrio, R. J. *Analyst* **2014**, *139*, 6232-6241.
- (124) Abrego, Z.; Ugarte, A.; Unceta, N.; Fernandez-Isla, A.; Goicolea, M. A.; Barrio, R. J. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 2402-2409.
- (125) Basu, S. *Journal of Forensic Sciences* **1982**, *27*, 72-91.
- (126) Wolten, G. M.; Nesbitt, R. S.; Calloway, A. R.; Loper, G. L.; Jones, P. F. *Journal of Forensic Sciences* **1979**, *24*, 409-422.
- (127) ASTM. *Standard Guide for Gunshot Residue Analysis by Scanning Electron Microscopy/Energy-Dispersive Spectroscopy $\epsilon 1$* ; (Reapproved 2001) E 1588-10 Pennsylvania USA, 2010.
- (128) Niewoehner, L. *ENFSI-Guide for gunshot residue analysis by scanning electron microscopy/energy-dispersive X-ray spectrometry*; ENFSI Working Group Firearms: Prague, 2008.
- (129) Degaetano, D.; Siegel, J. A. *Journal of Forensic Sciences* **1990**, *35*, 1087-1095.
- (130) Zeichner, A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *376*, 1178-1191.
- (131) Capannesi, G.; Ciavola, C.; Sedda, A. F. *Forensic Science International* **1993**, *61*, 75-84.
- (132) Rutty, G. N.; Boyce, P.; Robinson, C. E.; Jeffery, A. J.; Morgan, B. *International Journal of Legal Medicine* **2008**, *122*, 1-5.
- (133) Stein, K. M.; Bahner, M. L.; Merkel, J.; Ain, S.; Mattern, R. *International Journal of Legal Medicine* **2000**, *114*, 15-18.
- (134) Santos, A.; Magalhaes, T.; Vieira, D. N.; Almeida, A. A.; Sousa, A. V. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology* **2007**, *28*, 24-30.
- (135) Koons, R. D. *Journal of Forensic Sciences* **1998**, *43*, 748-754.
- (136) Stulova, K.; Vaculovic, T.; Kanicky, V. *Chem. Listy* **2012**, *106*, S133-S136.
- (137) Chang, K. H.; Jayaprakash, P. T.; Yew, C. H.; Abdullah, A. F. L. *Australian Journal of Forensic Sciences* **2013**, *45*, 3-23.
- (138) Dalby, O.; Butler, D.; Birkett, J. W. *Journal of Forensic Sciences* **2010**, *55*, 924-943.
- (139) Taudte, R. V.; Beavis, A.; Blanes, L.; Cole, N.; Doble, P.; Roux, C. *Biomed Research International* **2014**.
- (140) Romolo, F. S.; Margot, P. *Forensic Science International* **2001**, *119*, 195-211.
- (141) Klener, P. e. a. *Vnitřní lékařství Čtvrté, přepracované a doplněné vydání*; Galén Karolinum: Praha, 2011.
- (142) Nieminen, M. S.; Bohm, M.; Cowie, M. R.; Drexler, H.; Filippatos, G. S.; Jondeau, G.; Hasin, Y.; Lopez-Sendon, J.; Mebazaa, A.; Metra, M.; Rhodes, A.; Swedberg, K.; European Society Inten Care, M. *European Heart Journal* **2005**, *26*, 384-416.
- (143) Neubauer, S. *New England Journal of Medicine* **2007**, *356*, 1140-1151.
- (144) Dai, D. F.; Johnson, S. C.; Villarin, J. J.; Chin, M. T.; Nieves-Cintrón, M.; Chen, T.; Marcinek, D. J.; Dorn, G. W.; Kang, Y. J.; Prolla, T. A.; Santana, L. F.; Rabinovitch, P. S. *Circulation Research* **2011**, *108*, 837-846.

- (145) Garnier, A.; Zoll, J.; Fortin, D.; N'Guessan, B.; Lefebvre, F.; Geny, B.; Mettauier, B.; Veksler, V.; Ventura-Clapier, R. *Circulation-Heart Failure* **2009**, *2*, 342-350.
- (146) Ide, T.; Tsutsui, H.; Kinugawa, S.; Utsumi, H.; Kang, D. C.; Hattori, N.; Uchida, K.; Arimura, K.; Egashira, K.; Takeshita, A. *Circulation Research* **1999**, *85*, 357-363.
- (147) Scheubel, R. J.; Bartling, B.; Simm, A.; Silber, R. E.; Drogaris, K.; Darmer, D.; Holtz, J. *Journal of the American College of Cardiology* **2002**, *39*, 481-488.
- (148) Doehner, W.; Frenneaux, M.; Anker, S. D. *Journal of the American College of Cardiology* **2014**, *64*, 1388-1388.
- (149) Blayney, L.; Baileywood, R.; Jacobs, A.; Henderson, A.; Muir, J. *Circulation Research* **1976**, *39*, 744-748.
- (150) Finch, C. A.; Miller, L. R.; Inamdar, A. R.; Person, R.; Seiler, K.; Mackler, B. *Journal of Clinical Investigation* **1976**, *58*, 447-453.
- (151) Rensvold, J. W.; Ong, S. E.; Jeevananthan, A.; Carr, S. A.; Mootha, V. K.; Pagliarini, D. J. *Cell Reports* **2013**, *3*, 237-245.
- (152) Xu, W. J.; Barrientos, T.; Mao, L.; Rockman, H. A.; Sauve, A. A.; Andrews, N. C. *Cell Reports* **2015**, *13*, 533-545.
- (153) Klip, I. T.; Comin-Colet, J.; Voors, A. A.; Ponikowski, P.; Enjuanes, C.; Banasiak, W.; Lok, D. J.; Rosentryt, P.; Torrens, A.; Polonski, L.; van Veldhuisen, D. J.; van der Meer, P.; Jankowska, E. A. *American Heart Journal* **2013**, *165*, 575-582.
- (154) Okonko, D. O.; Mandal, A. K. J.; Missouris, C. G.; Poole-Wilson, P. A. *Journal of the American College of Cardiology* **2011**, *58*, 1241-1251.
- (155) Jankowska, E. A.; von Haehling, S.; Anker, S. D.; Macdougall, I. C.; Ponikowski, P. *European Heart Journal* **2013**, *34*, 816-826.
- (156) Anker, S. D.; Colet, J. C.; Filippatos, G.; Willenheimer, R.; Dickstein, K.; Drexler, H.; Luscher, T. F.; Bart, B.; Banasiak, W.; Niegowska, J.; Kirwan, B.; Mori, C.; Rothe, B. V.; Pocock, S. J.; Poole-Wilson, P. A.; Ponikowski, P.; Investigators, F.-H. T. *New England Journal of Medicine* **2009**, *361*, 2436-2448.
- (157) Ponikowski, P.; van Veldhuisen, D. J.; Comin-Colet, J.; Ertl, G.; Komajda, M.; Mareev, V.; McDonagh, T.; Parkhomenko, A.; Tavazzi, L.; Levesque, V.; Mori, C.; Roubert, B.; Filippatos, G.; Ruschitzka, F.; Anker, S. D.; Investigators, C.-H. *European Heart Journal* **2015**, *36*, 657-668.
- (158) Jankowska, E. A.; Rozentryt, P.; Witkowska, A.; Nowak, J.; Hartmann, O.; Ponikowska, B.; Borodulin-Nadzieja, L.; Banasiak, W.; Polonski, L.; Filippatos, G.; McMurray, J. J. V.; Anker, S. D.; Ponikowski, P. *European Heart Journal* **2010**, *31*, 1872-1880.
- (159) Leszek, P.; Sochanowicz, B.; Szperl, M.; Kolsut, P.; Brzoska, K.; Piotrowski, W.; Rywik, T. M.; Danko, B.; Polkowska-Motrenko, H.; Rozanski, J. M.; Kruszewski, M. *International Journal of Cardiology* **2012**, *159*, 47-52.
- (160) Maeder, M. T.; Khammy, O.; dos Remedios, C.; Kaye, D. M. *Journal of the American College of Cardiology* **2011**, *58*, 474-480.
- (161) Ahuja, P.; Wanagat, J.; Wang, Z. H.; Wang, Y. B.; Liem, D. A.; Ping, P. P.; Antoshechkin, I. A.; Margulies, K. B.; MacLellan, W. R. *Circulation* **2013**, *127*, 1957-1967.
- (162) Lemieux, H.; Semsroth, S.; Antretter, H.; Hofer, D.; Gnaiger, E. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2011**, *43*, 1729-1738.

10. Seznam zkratek

2D	Dvoudimenzionální
3D	Trojdimenzionální
AAS	Atomová absorpční spektrometrie
AFIS	Daktyloskopický identifikační systém (<i>Automatic Fingerprint Identification System</i>)
ANOVA	Analýza rozptylu (<i>Analysis of variance</i>)
BAL	Bronchoalveolární laváž
CCF	Sbírka kultur hub (<i>Culture Collection of Fungi</i>)
CFU	Jednotky tvořící kolonie (<i>Colony forming unit</i>)
CE	Kapilární elektroforéza (<i>Capillary electrophoresis</i>)
CHCA	α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (<i>α-cyano-4-hydroxycinnamic acid</i>)
CNS	Centrální nervová soustava
COX	Cytochrom c oxidáza (<i>Cytochrome c oxidase</i>)
CT	Počítačová tomografie (<i>Computed tomography</i>)
CRM	Certifikovaný referenční materiál
DESI	Desorpční elektrosprejová ionizace (<i>Desorption electrospray ionisation</i>)
DHB	2,5-dihydroxybenzoová kyselina
EDS	Energiově disperzní spektrometrie (<i>Energy dispersive X-ray spectrometry</i>)
EFTEM	Energiově filtrovaná transmisní elektronová mikroskopie (<i>Energy filtered transmission electron microscopy</i>)
ETV	Elektrotermické vypařování (<i>Electrothermal vaporization</i>)
FC	Ferricrocin
FIA	Průtoková injekční analýza (<i>Flow injection analysis</i>)
FFF	Frakcionace tokem v poli (<i>Field-flow fractionation</i>)
FT-ICR	Iontová cyklotronová resonance s Fourierovou transformací
GC	Plynová chromatografie (<i>Gas chromatography</i>)
GMS	Histologické barvení dle Grocotta (<i>Grocott-Gomori's methenamine silver staining</i>)
GSR	Povýstřelové zplodiny (<i>Gunshot residues</i>)
HEPES	N-2-hydroxyetylpiiperazin-N'-etansulfonová kyselina
HIV	Virus lidské imunitní nedostatečnosti (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (<i>High performance liquid chromatography</i>)

ChSS	Chronické srdeční selhání
ICP	Indukčně vázané plazma (<i>Inductively coupled plasma</i>)
ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (<i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
ICP-OES	Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (<i>Inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>)
IKEM	Institut klinické a experimentální medicíny
IPA	Invazivní plicní aspergilóza (<i>Invasive pulmonary aspergillosis</i>)
ITO	Cínem dopovaný oxid inditý (<i>Indium Tin Oxide</i>)
LA	Laserová ablace (<i>Laser ablation</i>)
LAESI	Laserová ablace ve spojení s ionizací elektrosprejem (<i>Laser ablation electrospray ionization</i>)
LA-ICP-MS	Laserová ablace ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (<i>Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
LOD	Mez detekce (<i>Limit of detection</i>)
LOQ	Mez kvantifikace (<i>Limit of quantification</i>)
MALDI	Laserová desorpce a ionizace za účasti matrice (<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>)
MID	Myokardiální deficit železa (<i>Myocardial iron deficiency</i>)
MRI	Magnetická rezonance (<i>Magnetic resonance imaging</i>)
MS	Hmotnostní spektrometrie (<i>Mass spectrometry</i>)
MSI	Zobrazovací hmotnostní spektrometrie (<i>Mass spectrometry imaging</i>)
NAA	Neutronová aktivační analýza
NCCR	NADH-cytochrom c reduktáza (<i>NADH-cytochrome c reductase</i>)
ORS-ICP-MS	ICP-MS ve spojení s oktapólovým reakčním systémem (<i>ICP-MS equipped with an octopole reaction system</i>)
PCA	Analýza hlavních komponent (<i>Principal component analysis</i>)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PET	Pozitronová emisní tomografie (<i>Positron emission tomography</i>)
pHPMA	Poly[N-(-2hydroxypropyl)methakrylamid] polymer
PIXE	Částicově indukovaná RTG emisní spektrometrie (<i>Particle-induced X-ray emission</i>)
PZ	Prostorová značka
Q	Kvadrupól (<i>Quadrupole</i>)
R	Rozlišovací schopnost (<i>Resolving power</i>)

RSF	Relativní citlivostní faktor (<i>Relative sensitivity factor</i>)
RSD	Relativní směrodatná odchylka (<i>Relative standard deviation</i>)
SA	3,5-dimethoxy-4-hydroxy skořicová kyselina (<i>Sinapinic acid</i>)
SD	Směrodatná odchylka (<i>Standard deviation</i>)
SCCR	Sukcinát-cytochrom c reductáza (<i>Succinate-cytochrome c reductase</i>)
SEM-EDS	skenovací elektronový mikroskop ve spojení s energiově disperzním spektrometrem (<i>Scanning electron microscope with an energy dispersive x-ray spectrometer</i>)
SF	Sektorový analyzátor (<i>Sector field</i>)
SIMS	Hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů (<i>Secondary ion mass spectrometry</i>)
SNR	Poměru signálu k šumu (<i>Signal to noise ratio</i>)
TAFC	Triacetylfusarinin C
TFA	trifluoroctová kyselina (<i>Trifluoroacetic acid</i>)
TOF	Analyzátor doby letu (<i>Time of flight</i>)
UV	Ultrafialové záření (<i>Ultraviolet</i>)
XRF	Rentgenová fluorescence (<i>X-ray fluorescence</i>)

11. Přílohy

Přílohy obsahují reprints publikovaných článků a profesní životopis autora.

- Příloha č. 1: **Pluháček T.**, Lemr K., Ghosh D., Milde D., Novák J., Havlíček V.: Characterization of microbial siderophores by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **35** (2016) 35-47.
- Příloha č. 2: **Pluhacek T.**, Petrik M., Luptakova D., Benada O., Palyzova A., Lemr K., Havlicek V.: *Aspergillus* infection monitored by multimodal imaging in a rat model. *Proteomics* **16** (2016) 1785-1792.
- Příloha č. 3: Luptáková D., **Pluháček T.**, Palyzová A., Přichystal J., Balog J., Lemr K., Havlíček V.: Meet interesting abbreviations in clinical mass spectrometry: from compound classification by REIMS to multimodal and mass spectrometry imaging (MSI). *Acta Virologica* **61** (2017) 353-360.
- Příloha č. 4: Melenovsky V., Petrak J., Mracek T., Benes J., Borlaug B. A., Nuskova H., **Pluhacek T.**, Spatenka J., Kovalcikova J., Drahota Z., Kautzner J., Pirk J., Houstek J.: Myocardial iron content and mitochondrial function in human heart failure: a direct tissue analysis. *European Journal of Heart Failure* **19** (2017) 522-530.
- Příloha č. 5 Profesní životopis

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

AUTOREFERÁT

k disertační práci

Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem v metabolomice a forenzní analýze

Jméno autora:	RNDr. Tomáš Pluháček
Studijní program:	P1407 Chemie
Studijní obor:	Analytická chemie
Vedoucí disertační práce:	prof. Ing. Vladimír Havlíček, Dr.
Konzultant:	doc. Ing. David Milde, Ph.D.

Olomouc 2017

Souhrn

Disertační práce se zabývá studiem nových možností aplikací laserové ablace ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem v klinické a forenzní analýze. Teoretická část disertační práce je věnována hmotnostní spektrometrii s indukčně vázaným plazmatem se zaměřením na analýzu prvků v biologických vzorcích. Jsou zde popsány základní principy hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem, rozklady biologických tkání, princip komerčně dostupných technik hmotnostně spektrometrického zobrazování se zaměřením na laserovou ablaci ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem.

První část práce je zaměřena na multimodální zobrazování invazivní plicní aspergilózy (IPA) v kontrolních a infikovaných potkaních plicích. K zobrazování IPA infekce bylo využito PET/CT, LA-ICP-MSI, SEM-EDS, ale i standardního histologického vyšetření založeného na využití barvení dle Grocotta. Multimodální zobrazování umožnilo detailní studium masivně se rozšiřující infekce s následnou jednoznačnou lokalizací oblastí postižených IPA infekcí. LA-ICP-MS mapování distribuce stříbra a zlata specificky navázaného na mukopolysacharidové složky buněčné stěny *Aspergillus fumigatus* s velikostí laserového svazku 3-5 μm poskytlo spolehlivý obraz rozšiřující se IPA infekce v plicní tkáni infikované houbou *Aspergillus fumigatus*. Masivní rozšíření IPA infekce bylo dále potvrzeno SEM-EDS jenž vzhledem ke svému submikrometrickému rozlišení umožnil získat morfologické detaily rozšíření hyf *Aspergillus fumigatus* napříč celou infikovanou plicní tkání.

Druhá část práce se zabývá vývojem a následnou aplikací prostorových značek pro správný a přesný překryv molekulárních/prvkových map pro účely multimodálního a 3D zobrazování biologických tkání. Prostorové značky obsahující Rhodamin B, iontové stříbro a nanočástice zlata připravené v roztoku pHPMA polymeru se osvědčily pro vzájemné uspořádání molekulárních/prvkových map získaných prostřednictvím pětice doplňujících se zobrazovacích technik, a to MALDI-MSI, DESI-MSI, LA-ICP-MSI optické a fluorescenční mikroskopie.

Třetí část se věnuje detailní analýze povýstřelových zplodin ulpělých na ruku střelce po použití střelné zbraně s následnou přímou identifikací osoby. LA-ICP-MS mapování Cu, Zn, Sb, Ba, Hg a Pb na povrchu latentních otisků poskytuje nejen obraz distribuce částic povýstřelových zplodin na povrchu otisku prstu, ale i možnost jejich klasifikace do příslušných tříd na základě prvkového profilu. Mimo to LA-ICP-MS zobrazování umožňuje i spolehlivou

a přesnou rekonstrukci otisku prstu střelce, který tak může být přímo identifikován na základě vizuálního porovnání shody rozmístění papilárních linií a rozmanitých daktyloskopických markantů na 2D mapách distribuce Cu, Zn, Sb, Ba, Hg, Pb a kontrolním (referenčním) otisku.

Poslední část disertační práce je zaměřena na studium vlivu obsahu celkového železa a mědi v myokardu na funkci srdečních mitochondrií během chronického srdečního selhání (ChSS). V rámci studie byla vyvinuta a validována ICP-MS metoda pro stanovení železa a mědi v biologických tkáních, která byla dále použita ke kvantitativnímu stanovení obou kovů ve vzorcích biopsií srdečních svalů odebraných pacientům s chronickým srdečním selháním během transplantace srdce prováděné v Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze. Kvantitativní ICP-MS stanovení odhalilo, že v případě pacientů s pokročilým ChSS došlo k výraznému snížení (~22 %) obsahu železa a mědi, které je spojeno se současným snížením aktivit enzymů citrátového cyklu, mitochondriální respirací a snížením exprese proteinů dýchacího řetězce. Kromě toho přítomnost myokardiálního deficitu železa přispívá k prohloubení mitochondriální dysfunkce spojené se sníženou substrátovou flexibilitou a odolností vůči oxidativnímu poškození reaktivními formami kyslíku.

Summary

This dissertation thesis is focused on new applications of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry in clinical and forensic analyses. The theoretical part of the thesis is devoted to the theoretical aspects of inductively coupled plasma mass spectrometry with focus to elemental analysis in various biological samples. In the next part, the principles of commonly used MSI techniques, especially laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry are discussed.

The first part reports on multimodal imaging of an invasive pulmonary aspergillosis in control and infected rat lung tissue. PET/CT, LA-ICP-MSI, SEM-EDS and the standard histological evaluation employing Grocott's methenamine silver staining were used for the multimodal imaging of IPA infection. Multimodal imaging described the fungal burden in rats with a subsequent localization of the regions affected by the IPA infection. LA-ICP-MS imaging of silver and gold with 3-5 μm laser foci combined with GMS staining provided a reliable image of fungal hyphae deposition in *Aspergillus* infected lung tissue. SEM-EDS with its submicrometric lateral resolution confirmed the presence of the massive aspergillosis and provided morphological details on hyphae spreading within the *Aspergillus* infected lung tissue.

The second part of the thesis was focused on the development and application of fiducial markers for accurate alignment of individual molecular or elemental images in multimodal and 3D imaging of biological samples. Fiducial markers consisting of Rhodamine B, ionic silver and gold nanoparticles in a pHPMA solution were suitable for a correct fusion of molecular/elemental images obtained by five complementary imaging techniques, namely MALDI-MSI, DESI-MSI, LA-ICP-MSI, optical and fluorescence microscopy.

The consecutive part of the thesis was aimed at analysing gunshot residues adhered onto the shooter's hands after firing followed by a subsequent identification of the shooter based on the dactyloscopic principle. LA-ICP-MS imaging of Cu, Zn, Sb, Ba, Hg and Pb on the latent fingerprints provided not only a detailed image of the gunshot residues distribution, but also the possibility of the gunshot residue classification based on a specific elemental profile. Moreover, the LA-ICP-MS imaging offered a reliable and correct reconstruction of shooter fingerprint, which could be directly identified based on the visual comparison of the consistency in the distribution of papillary lines and various dactyloscopic markers on the 2D images of Cu, Zn, Sb, Ba, Hg, Pb and the control (reference) fingerprint.

The last part of the dissertation thesis studied the relationship between the myocardial iron content and mitochondrial function in human heart failure. The ICP-MS method for the determination of iron and copper in biological samples was developed and validated. The validated ICP-MS method was used for the determination of both metals in samples of failing myocardium that were obtained from patients undergoing transplantation at the Institute for Clinical and Experimental Medicine in Prague. The ICP-MS analysis revealed that myocardial iron and copper contents were systematically diminished (~22 %) in patients with heart failure. Moreover, decreased myocardial iron content was associated with a mitochondrial dysfunction, particularly with a reduced activity of citric acid cycle enzymes, reduced mitochondrial oxygen respiration, and reduced expression of mitochondrial respiratory chain enzymes. In addition, the presence of myocardial iron deficit contributed to worsening the mitochondrial dysfunction by altering substrate metabolism (i.e. by reducing substrate flexibility) and handling of reactive oxygen species.

Obsah

1. LA-ICP-MS	1
1.1 Princip a instrumentace LA-ICP-MS	2
2. Cíle disertační práce	4
3. Multimodální zobrazování invazivní plicní aspergilózy	5
3.1 <i>Aspergillus fumigatus</i>	5
3.2 Experimentální část	6
3.2.1 IPA infekční model	6
3.2.2 Příprava vzorků a histologické barvení	7
3.3 Výsledky a diskuze	7
3.3.1 Monitorování invazivní plicní aspergilózy v potkaních plicích	7
3.3.2 LA-ICP-MS zobrazování železa v plicní tkáni	9
3.3.3 Mapování stříbra a zlata jako specifických markerů IPA infekce v plicní tkáni	10
3.4 Závěr	12
4. Prostorové značky	14
4.1 Multimodální zobrazování a prostorové značky	14
4.2 Experimentální část	15
4.2.1 Analyzované vzorky, složení prostorových značek a jejich aplikace	15
4.3 Výsledky a diskuze	16
4.3.1 Prostorové značky, multimodální a 3D zobrazování myší ledviny	16
4.4 Závěr	18
5. LA-ICP-MSI ve forenzní analýze – analýza povýstřelových zplodin přímo na latentních otiscích prstu	19
5.1 Otisk prstu a kriminalistická daktyloskopie	19
5.2 Povýstřelové zplodiny	20
5.3 Experimentální část	21
5.3.1 Střelba a odběr otisků prstu	21
5.4 Výsledky a diskuze	22
5.4.1 LA-ICP-MS zobrazování povýstřelových zplodin	22
5.5 Závěr	27
6. Studium vztahu mezi obsahem železa a mědi v myokardu a funkcí srdečních mitochondrií v kontextu srdečního selhání	28
6.1 Chronické srdeční selhání	28
6.2 Experimentální část	29

6.2.1 Analyzované vzorky srdeční tkáně	29
6.2.2 Stanovení železa a mědi	29
6.2.3 Statistická analýza.....	30
6.3 Výsledky a diskuse	30
6.3.1 Validace ICP-MS metody	30
6.3.2 Obsah železa a mědi v srdeční svalové tkáni.....	31
6.4 Závěr.....	34
7. Literatura	35
Curriculum vitae.....	38

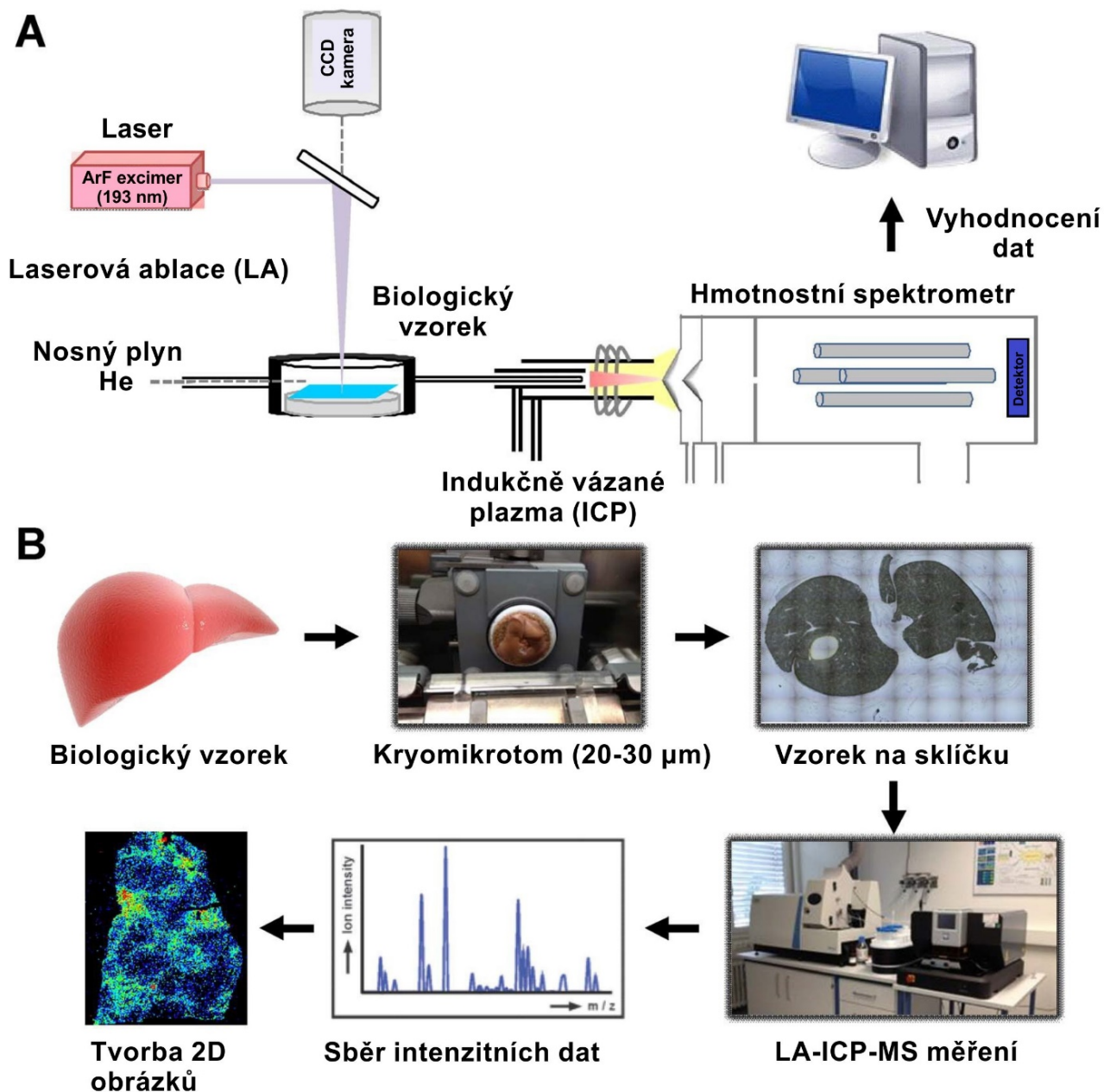
1. LA-ICP-MS

Laserová ablace ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem patří mezi nejrozšířenější mikroanalytické techniky zaměřené na multielementární stanovení kovů, polokovů a nekovů s prostorovým rozlišením obvykle v rozmezí 5–200 μm . LA-ICP-MS mimo jiné nabízí nízké meze detekce ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ až $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), široký lineární dynamický rozsah až 10 řádů, ale i možnost velmi přesného stanovení izotopových poměrů pro určení původu a stáří analyzovaných předmětů. K dalším výhodám náleží minimální příprava biologických vzorků, a hlavně možnost analýzy vodivých, nevodivých, neprůhledných i transparentních vzorků. Nejen proto LA-ICP-MS našla široké uplatnění v povrchové mikroanalýze, hloubkovém profilování anebo mapování distribuce prvků na povrchu tenkých řezů různých biologických vzorků^{1,2}.

Současný trend LA-ICP-MSI spočívá v zobrazování prostorové distribuce esenciálních, prospěšných nebo toxických kovů (Fe, Zn, Cu, Mn, Mo, Ca, Mg, K, Cd, Cr, Pb, Tl, Hg, U, Th a dalších), polokovů (Se, As a dalších) a nekovů (Se, S, P, I, Cl a dalších) v biologických vzorcích pro účely objasnění funkce jednotlivých životně důležitých biologických procesů, detailnímu studiu biologické dostupnosti a bioakumulace prvků pro hodnocení ekologických či toxikologických rizik u lidí, zvířat a rostlin^{1,2}. Dalšími rozvíjejícími oblastmi LA-ICP-MS je selektivní detekce a lokalizace imunochemicky značených intracelulárních a extracelulárních proteinů (např. nádorové značky Her 2, CK 7 a MUC 1), studium neurodegenerativních onemocnění (Parkinsonova a Alzheimerova choroba), mapování kontrastních látek a metalofarmak, metalomika, metaloproteomika, studium velikosti a distribuce nanočástic, analýza jediné buňky tzv., „*single cell analysis*“^{1,2}.

1.1 Princip a instrumentace LA-ICP-MS

Princip LA-ICP-MS je založen na využití fokusovaného laserového paprsku emitovaného pevnolátkovým nebo excimerovým laserem k postupnému a přesnému vzorkování biologického vzorku umístěného v ablační komoře. V důsledku interakce fotonů laserového svazku s povrchem vzorku (tzv. laserové ablaci) dochází pomocí celé řady reakcí k destrukci materiálu a vzniku laserem indukovaného mikroplazmatu vedoucích k tvorbě částečně ionizovaného aerosolu ablatovaných částic (atomy, ionty, molekuly a fragmenty částic z povrchu). Částečně ionizovaný aerosol je poté kontinuálním proudem nosného plynu (argon, helium) transportován do indukčně vázaného plazmatu, kde je atomizován a ionizován za vzniku kladně nabitých iontů. Vzniklé ionty jsou extrahovány z atmosférické části do hmotnostního spektrometru vybaveného kvadrupólovým analyzátozem (popřípadě i kolizně/reakční celou) nebo sektorovým analyzátozem s dvojitou fokusací. V hmotnostním analyzátozu dochází k separaci iontů dle poměru m/z a následné detekci detekčním systémem hmotnostního spektrometru. V případě LA-ICP-MS jsou intenzitní data pro každý analyzovaný prvek zaznamenávána v závislosti na čase a pohybu laserového svazku napříč biologickým vzorkem. Tato surová (časově závislá) data jsou dále zpracována příslušnými programy za vzniku 2D map prostorové distribuce prvků. Naměřená intenzita či přepočtená koncentrace každého analyzovaného prvku je poté znázorněna barevnou škálou napříč analyzovanou oblastí³. Schéma zapojení a princip LA-ICP-MS zobrazování lze zjednodušeně vyjádřit schématem na Obr. 1.1.



Obr. 1.1 Schéma spojení LA-ICP-MS (A). Popis postupu LA-ICP-MSI experimentu (B) od přípravy tkáňových řezů, přes LA-ICP-MS analýzu až po zpracování surových dat do 2D map prostorové distribuce prvků. Převzato z cit.⁴.

2. Cíle disertační práce

Cíle disertační práce jsou spojeny především s aplikací laserové ablace ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem v klinické a forenzní analýze.

Cíle disertační práce lze shrnout do následujících bodů:

- Aplikace multimodálního přístupu zahrnujícího využití pětice komplementárních technik, a to PET/CT, MALDI-MSI, LA-ICP-MS, SEM-EDS zobrazování společně se standardním histologickým vyšetřením, pro detailní studium invazivní plicní aspergilózy v kontrolních a infikovaných potkaních plicích.
- Vývoj a optimalizace vhodného složení prostorových značek pro správný a přesný překryv molekulárních/prvkových map získaných pomocí zobrazovacích technik, a to MALDI-MSI, DESI-MSI, LA-ICP-MSI s optickými snímky z histologického barvení a fluorescenční mikroskopie.
- Detailní studium povýstřelových zplodin ulpělých na ruku střelce po použití střelné zbraně s následnou identifikací osoby na základě vizuálního porovnání shody rozmístění papilárních linií a rozmanitých daktyloskopických markantů na odpovídajících prvkových mapách a kontrolním (referenčním) otisku.
- Vývoj a validace ICP-MS metody pro stanovení železa a mědi v biologických tkáních. Kvantitativní stanovení obou kovů ve vzorcích biopsií srdečních svalů odebraných pacientům s chronickým srdečním selháním během transplantace srdce prováděné v Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze.

Nejvýznamnější výsledky prezentované v této práci byly publikovány ve čtyřech impaktovaných publikacích⁵⁻⁸.

3. Multimodální zobrazování invazivní plicní aspergilózy

3.1 *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus je nejrozšířenější všudypřítomná vláknitá houba rodu *Aspergillus* patřícího mezi vřeckovýtrusné houby, tzv. askomycety^{9,10}. V dnešní době rod *Aspergillus* zahrnuje přibližně 200 známých druhů, z nichž téměř 40 druhů je považováno za potenciální lidské patogeny¹¹. Pro rod *Aspergillus* je typický tvar a uspořádání konidioforu, které jsou i základními znaky pro morfologickou identifikaci jednotlivých druhů. Jediný konidiofor je schopen vyprodukovat tisíce hydrofobních konidií (spor) s rozměrem 2-3 μm , které se jsou následně přenášeny proudem okolního vzduchu^{9,10}. Díky svým malým rozměrům pronikají spory *A. fumigatus* přímo do plicních alveol, kde jsou v závislosti na stavu hostitelského organismu buďto zničeny a odstraněny sofistikovanými mechanismy imunitního systému anebo v případě oslabené imunitní reakce organismu vyrůstají ve formě vláken (hyf) vytvářejících tzv. mycelia. Mezi hlavní původce mykotických onemocnění patří *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* a *A. nidulans*¹¹⁻¹³. Nicméně *A. fumigatus* je považován za hlavní příčinu vzniku většiny oportunních plicních infekcí zahrnujících aspergilom, invazivní plicní aspergilózu, alergickou bronchoplicní aspergilózu, chronickou plicní aspergilózu, chronickou nekrotizující aspergilózu a alergickou plísňovou rýmu^{14,15}.

Invazivní plicní aspergilóza představuje progresivní smrtelné onemocnění s výskytem více než 200 000 infekcí ročně, které jsou spojeny s úmrtností 30-90 % (cit.¹⁵). Mezi nejvíce postižené skupiny pacientů patří především pacienti s hematologickými malignitami, pacienti s febrilní neutropenií, pacienti po transplantaci orgánů, chemoterapii, pacienti trpící rakovinou a HIV, ale i pacienti po dlouhodobém užívání léků k potlačení imunity^{9,15}. *A. fumigatus* produkuje během IPA infekce nesčetné množství extracelulárních sloučenin přispívajících nejen k získávání životně důležitých prvků a živin, ale i k infekci hostitele a následnému masivnímu rozvinutí IPA infekce. Pro získávání hostitelského železa *A. fumigatus* vyvinul sofistikovaný mechanismus založený na produkci nízkomolekulárních neribozomálních peptidů (ligandů) schopných vytvářet koordinační komplexy s vysokou selektivitou a afinitou pro železité ionty, tzv. sideroforů (fusarinin C, triacetyl-fusarinin C (TAFC), ferricrocin (FC) a hydroxyferricrocin), které jsou považovány za potenciální markery IPA infekce^{8,16}. Přestože již bylo publikováno značné množství experimentálních přístupů k identifikaci mykotických infekcí, tak překvapivě v 21. století doposud nebyla vyvinuta

neinvazivní metoda pro včasnou identifikaci IPA infekce s dostatečnou senzitivitou a specificitou.

V rámci studia IPA infekce v potkaním modelu experimentální aspergilózy jsme se zaměřili na stanovení mikrobiálních sideroforů jakožto potenciálních markerů IPA infekce⁶. K zobrazování rozšíření IPA infekce s následnou jednoznačnou lokalizací oblastí potkaních plic postižených IPA infekcí jsme využili multimodálního přístupu s využitím technik molekulárního a prvkového hmotnostně spektrometrického zobrazování (MALDI-MSI, LA-ICP-MSI), skenovací elektronové mikroskopie s energiově disperzním spektrometrem (SEM-EDS), pozitronové emisní tomografie (PET) a počítačové tomografie (CT).

3.2 Experimentální část

3.2.1 IPA infekční model

Zvířecí model experimentální aspergilózy byl proveden v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání a s povolením Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (MSMT-21235/2013-12) a Odborné komise na ochranu zvířat proti týrání Lékařské fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci. Všechny experimenty byly prováděny na samicích LEWIS potkana (Anlab, Praha, Česká republika), kterým byla 5 dní před vlastní aplikací suspenze spor *A. fumigatus* snižována imunitní reakce organismu podáním léku cyklofosfamid. Potkani byli infikováni 150 μ l inokulační suspenze obsahující spory houby *A. fumigatus* (kmen *A. fumigatus* 1059 CCF) o koncentraci 10^7 - 10^8 CFU/ml (CFU-„*colony forming unit*“, jednotky tvořící kolonie), která byla potkanům aplikována endotracheální rourkou přímo do průdušnice (intratracheální aplikace). Rozvoj IPA infekce byl monitorován *in vivo* s využitím PET/CT zobrazování, které bylo realizováno 1 hodinu po retroorbitální aplikaci ^{68}Ga značeného TAFC (aktivita 4-6 MBq). Po provedení PET/CT zobrazování byli potkani usmrceni předávkováním ketaminem/xylazinem v poměru 2:1 a potkaní plíce byly odebrány pro další detailní studium IPA infekce pomocí technik hmotnostně spektrometrického zobrazování. K hmotnostně spektrometrickému zobrazování byly odebírány tři typy vzorků potkaních plic: kolabované plíce infikované houbou *A. fumigatus*, infikované plíce fixované poly[N-(2-hydroxypropyl) methakryamid] polymerem (pHPMA)¹⁷ a kontrolní plíce odebrané jedincům, kterým byl podán jen lék na potlačení imunitní reakce organismu (cyklofosfamid) a preventivní dávky antibiotik. Vzorky potkaních plic byly ihned po extrakci z těla zvířete

hluboce zmrazeny v kapalném dusíku a následně uchovány k dalšímu zpracování při teplotě -80 °C.

3.2.2 Příprava vzorků a histologické barvení

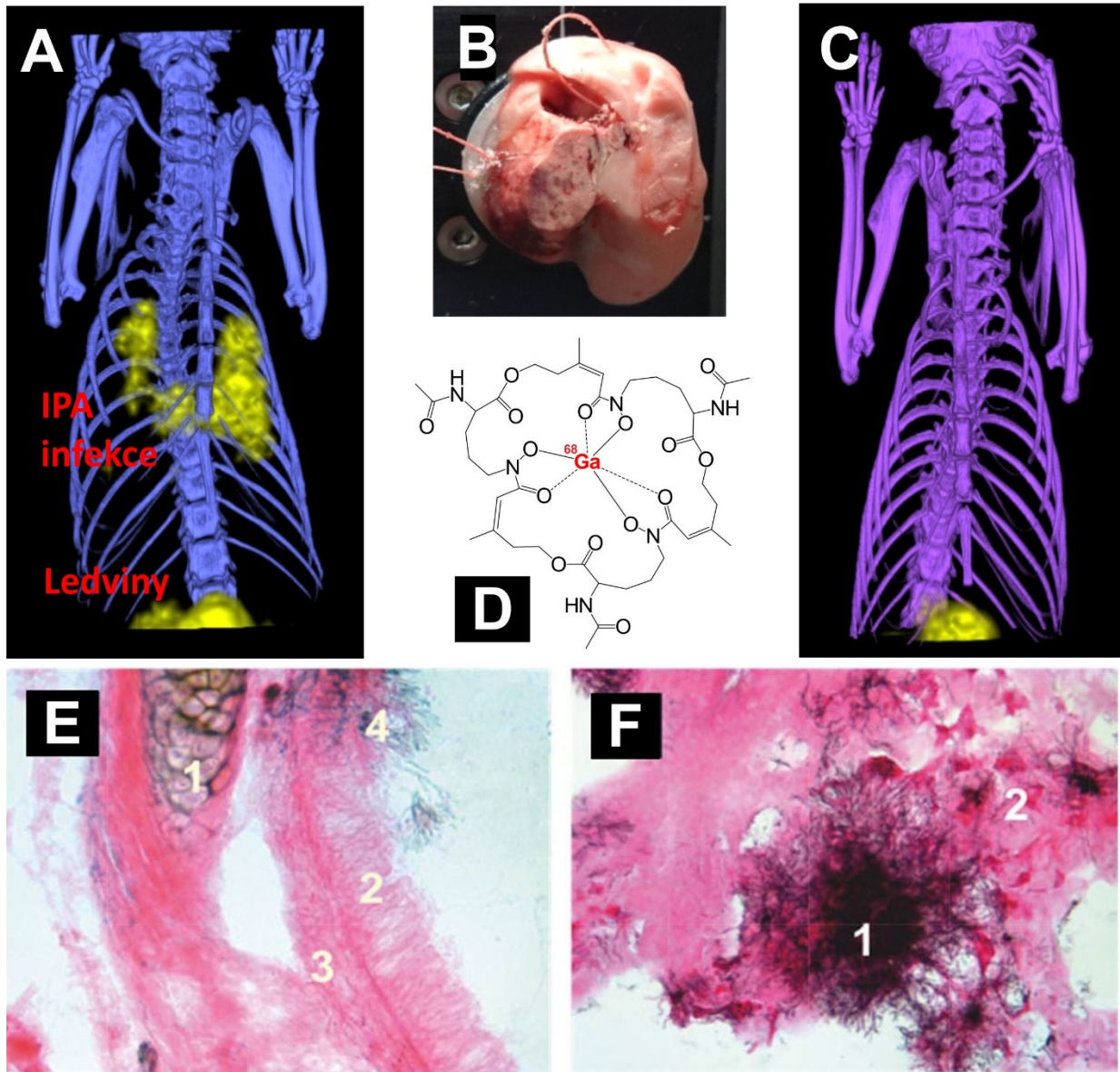
Před vlastní přípravou tenkých řezů byly vzorky potkaních plic ponechány při teplotě -20 °C v kryomikrotomu po dobu 60 minut a poté krájeny kryomikrotomem CM1950 (Leica, Německo) na řezy o tloušťce 15 μm pro SEM a 30 μm pro LA-ICP-MS zobrazování. Řezy tkání byly přeneseny na předem vychlazená ITO sklíčka, tepelně fixovány a následně vakuově sušeny v exikátoru po dobu 40 minut. V této fázi byly pořízeny optické obrazy jednotlivých tkání pomocí skeneru HP Scanjet 4890 s rozlišením 4 800 dpi. Vzorky tenkých řezů byly histologicky barveny modifikovaným postupem barvení dle Grocotta (GMS – „*Grocott-Gomori's methenamine silver stain*“) zahrnujícím kontrastní barvení Eosinem. Barvení dle Grocotta je založeno na selektivní redukci stříbra na mukopolysacharidových složkách buněčné stěny houby *A. fumigatus*, čímž dochází k jejímu zviditelnění v důsledku vzniku charakteristického černého zbarvení vyredukovaného elementárního stříbra.

3.3 Výsledky a diskuze

3.3.1 Monitorování invazivní plicní aspergilózy v potkaních plicích

Jak již bylo zmíněno, tak třetí den od intratracheální aplikace spor *A. fumigatus* bylo u vybraných jedinců provedeno *in vivo* zobrazování rozšíření IPA infekce pomocí PET/CT a poté byly odebrány vzorky infikovaných kolabovaných plic, infikovaných plic fixovaných pHMA polymerem a kontrolních plic (Obr. 3.1B). Princip PET zobrazování IPA infekce je založen na využití velice podobných vlastností radioizotopicky značeného ⁶⁸Ga-TAFC (Obr. 3.1D) a ⁵⁶Fe-TAFC (ferri-forma TAFC produkovaná *A. fumigatus*). Po retroorbitální aplikaci ⁶⁸Ga-TAFC dochází rovněž k jeho specifickému a selektivnímu vychytávání houbou *A. fumigatus*, což umožňuje *in vivo* zobrazení oblastí potkaních plic postižených IPA infekcí¹⁸. Detekční limit PET zobrazování se pohybuje v rozmezí 10⁻¹¹ až 10⁻¹² mol.l⁻¹ (cit.¹⁹). U většiny infikovaných jedinců byla invazivní plicní aspergilóza lokalizována v obou plicních lalocích, avšak s různým rozsahem ložisek IPA infekce (Obr. 3.1A). Signál ⁶⁸Ga-TAFC byl také detekován v dalších orgánech potkanů, a to konkrétně v ledvinách, zažívacím traktu a močovém měchýři, které jsou však součástí vylučovací cesty ⁶⁸Ga značeného TAFC (Obr. 3.1A,C). Ke studiu rozšíření IPA infekce bylo využito i histologického vyšetření přítomnosti hyf

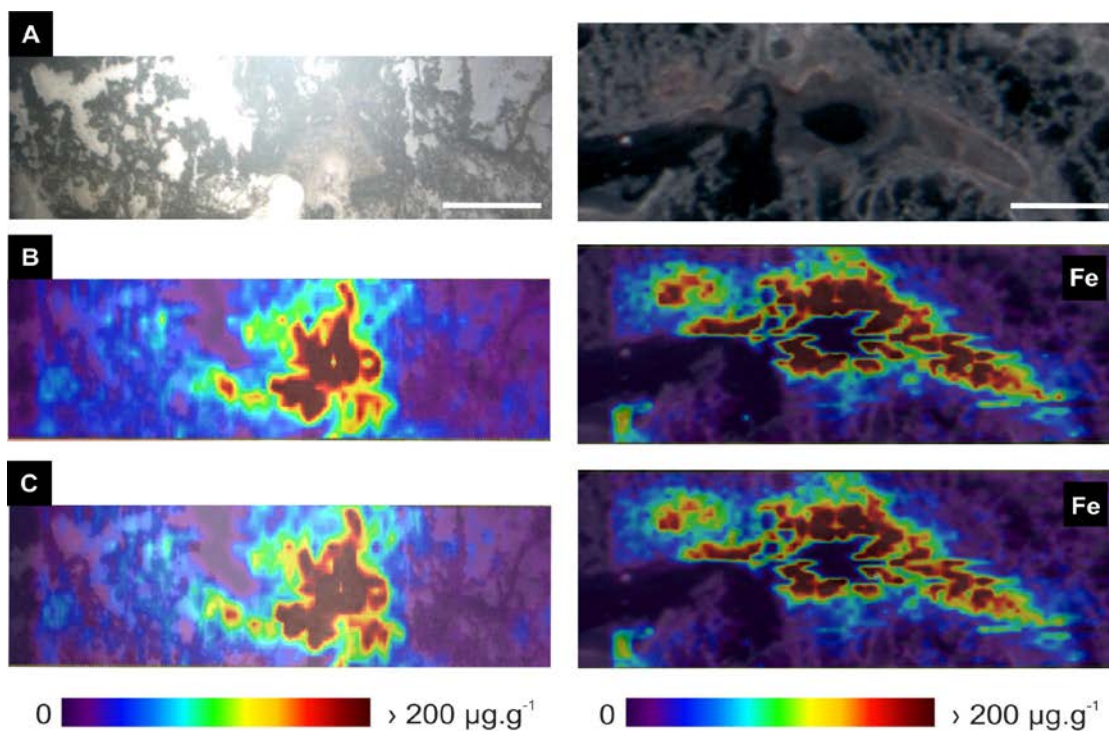
A. fumigatus v plicní tkáni (barvení dle Grocotta), které rovněž odhalilo rozsáhlá ložiska IPA infekce v plicích infikovaných jedinců projevující se četným prorůstáním hyf houby *A. fumigatus* z plicní tkáně do prostoru bronchiolů a alveol (Obr. 3.1E,F).



Obr. 3.1 Vizualizace invazivní plicní aspergilózy v potkaních plicích. 3D projekce PET/CT dat pro potkana infikovaného houbou *A. fumigatus* (A) a neinfikovaného (kontrolního) potkana (C), kterým byl retroorbitálně aplikován ^{68}Ga značený T AFC (D). Infikovaná plicní tkáň v kryomikrotomu (B). Tenký řez infikované tkáně obarvený modifikovaným postupem barvení dle Grocotta detailně znázorňující jednotlivé části stěny průdušnice (E): hyalinní chrupavka (1), řasinkový cylindrický epitel (2), pojivová tkáň (3), hyfy *A. fumigatus* (4), Prokázání přítomnosti IPA infekce v řezu infikované plicní tkáně (F): mycelium houby *A. fumigatus* (1), krvácení (2).

3.3.2 LA-ICP-MS zobrazování železa v plicní tkáni

První část experimentální práce byla zaměřena na studium prostorové distribuce desferri a ferri-forem mikrobiálních sideroforů produkovaných patogenní houbou *A. fumigatus*, jakožto potenciálních markerů rozšiřující se IPA infekce. Prvotní aplikovanou hmotnostně spektrometrickou technikou bylo MALDI-MS zobrazování s využitím hmotnostního spektrometru s vysokým rozlišením Solarix 12T FT-ICR (Bruker Daltonics, Německo). Bohužel molekulární přístup zobrazování mikrobiálních sideroforů nebyl úspěšný, a to buď z důvodu nekompatibility ionizačních procesů s fixačním polymerem na bázi pHPMA, anebo kvůli limitovanému dynamickému rozsahu MALDI-MS zobrazování. Z tohoto důvodu jsme se zaměřili na zobrazování prostorové distribuce železa navázaného do komplexu s mikrobiálními siderofory pomocí LA-ICP-MS zobrazování. K LA-ICP-MS mapování železa bylo využito laserového ablačního systému Analyte G2 (Photon Machines, USA) ve spojení s ORS-ICP-MS Agilent 7700x (Agilent Technologies, Japonsko) vybaveného kolizně/reakční celou pracující v heliovém módu pro potlačení polyatomických interferencí. V porovnání s kontrolní tkání, kvantitativní LA-ICP-MS analýza prokázala přibližně 20-ti násobné zvýšení koncentrace železa v oblastech postižených IPA infekcí (Obr. 3.2). Významné zvýšení koncentrace železa tak může souviset přímo s IPA infekcí, a to v důsledku výskytu ferri-forem sekundárních metabolitů, zejména pak sideroforů, zodpovědných za „krádež“ železa z organismu hostitele (TAFC) anebo ukládání železa v hyfách a konidiích houby *A. fumigatus* (FC). Na druhou stranu, rozšíření IPA infekce může být často spojeno s rozsáhlým krvácením v plicní tkáni, kdy pozadí železa z hemu může zhoršit správnost a přesnost stanovení koncentrací železa odpovídající skutečnému obsahu ferri-forem sekundárních metabolitů. Kvantitativní stanovení železa bylo založeno na využití dat získaných opakovanou LA-ICP-MS analýzou pěti kalibračních standardů s přizpůsobenou maticí na koncentrační hladině 0 (slepý vzorek), 60, 100, 150 a 220 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Fe. Mez detekce a mez stanovitelnosti byla stanovena na 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a 1,5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pro izotop železa ^{56}Fe .

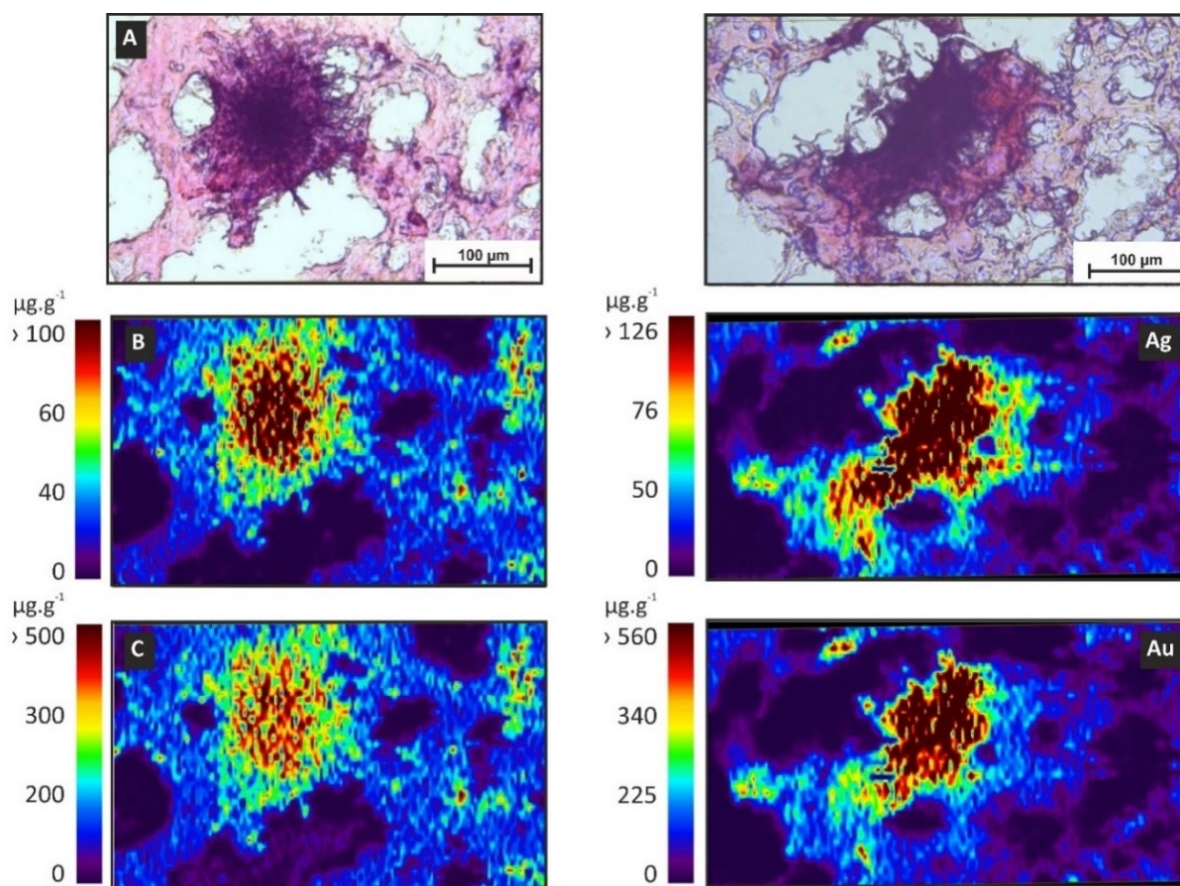


Obr. 3.2 LA-ICP-MS zobrazování IPA infekce. (A) Optický obraz IPA infekce, odpovídající 2D mapy prostorové distribuce ^{54}Fe (B) a ^{56}Fe (C) v infikované plicní tkáni. LA-ICP-MS data byly nasbírány s šířkou laserového svazku 30 μm , měřítko 500 μm .

3.3.3 Mapování stříbra a zlata jako specifických markerů IPA infekce v plicní tkáni

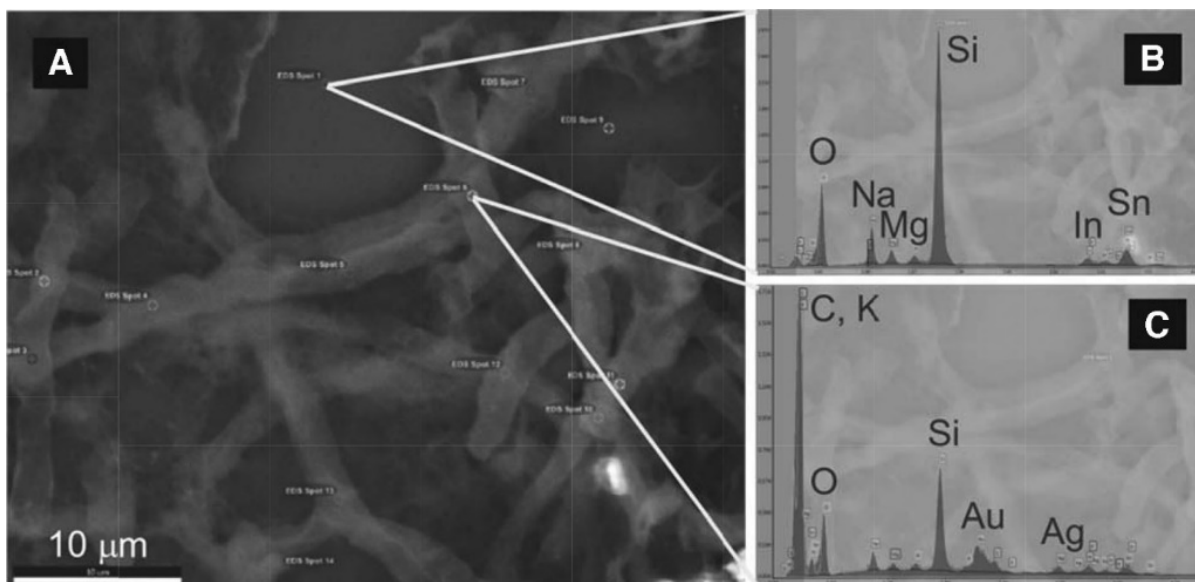
Další významnou aplikací LA-ICP-MS v kontextu multimodálního zobrazování IPA infekce bylo mapování distribuce stříbra a zlata specificky navázaných na mukopolysacharidové složky buněčné stěny houby *A. fumigatus* během histologického barvení dle Grocotta. Díky nízkým mezím detekce ($0,03 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) a nízkému chemickému pozadí pro oba prvky bylo možné snížit velikost laserového svazku (spotu) pro LA-ICP-MS zobrazování na 3–5 μm , což prakticky odpovídá rozměrům jednotlivých hyf houby *A. fumigatus* s velikostí 2 až 3 μm . V rámci LA-ICP-MS zobrazování byly testovány dva rozdílné protokoly sušení řezů po histologickém barvení, a to sušení provedené sérií roztoků se zvyšujícím se obsahem ethanolu (50, 70, 80, 90, 95 a 100 %) anebo sušení za pomoci vakua v exikátoru po dobu 40 minut. Sušení tenkých řezů stoupající řadou ethanolu se prokázalo být méně citlivé, jelikož během něj docházelo ke ztrátám malé části vyredukovaného stříbra a zlata (Obr. 3.3). Nicméně vzhledem k velmi nízkému pozadí stříbra v plicní tkáni ($<0,45 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) bylo i pro 2D mapy s velikostí pixelu 3 μm dosaženo dostatečného kontrastu

umožňujícího jednoznačnou identifikaci rozšiřující se IPA infekce. Výsledné 2D mapy prostorové distribuce stříbra a zlata přináší spolehlivý obraz rozšiřující se IPA infekce v plicní tkáni infikované houbou *A. fumigatus*. Mimoto LA-ICP-MS zobrazování poskytuje vynikající korelaci charakteristických znaků (rysů) IPA infekce vůči standardnímu histologickému vyšetření založeném na vyhodnocení GMS barveného preparátu metodami optické mikroskopie (Obr. 3.3). Na rozdíl od optické mikroskopie, LA-ICP-MS zobrazování nabízí citlivé a selektivní kvantitativní stanovení obou prvků, které může pomoci mikrobiologům zejména v diagnostice nejednoznačných případů IPA infekce. Kvantitativní analýza specificky navázaného stříbra a zlata byla založena na využití dat získaných opakovanou analýzou šesti kalibračních standardů s přizpůsobenou maticí na koncentrační hladině 0 (slepý vzorek); 0,1; 1; 10; 100 a 1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Ag a Au. Mez detekce byla pro oba kovy stanovena na 0,03 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, zatímco mez stanovitelnosti byla stanovena na 0,10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pro ^{107}Ag a 0,07 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pro ^{197}Au .



Obr. 3.3 LA-ICP-MS zobrazování IPA infekce. (A) Optický obraz IPA infekce, odpovídající 2D mapy prostorové distribuce ^{107}Ag (B) a ^{197}Au (C) v infikované plicní tkáni. LA-ICP-MS data byla nasbírána s šířkou laserového svazku 5 μm a vysušení řezů po GMS barvení byla provedena stoupající řadou ethanolu (vlevo) nebo za pomoci vakua v exikátoru (vpravo).

Masivní rozšíření invazivní plicní aspergilózy bylo dále potvrzeno pomocí skenovacího elektronového mikroskopu, který díky svému submikrometrickému rozlišení umožňuje získat morfologické detaily rozšíření hyf *A. fumigatus* napříč celou infikovanou plicní tkání (Obr. 3.4A). Mimo to byla na povrchu GMS barveného řezu infikované plicní tkáně provedena bodová SEM-EDS analýza za účelem stanovení matričních prvků odpovídajících složení jak povrchu ITO mikroskopického sklíčka (pozadí), tak i povrchu hyf houby *A. fumigatus*. V případě analýzy pozadí EDS analýza prokázala přítomnost křemíku, india a cínu pocházejících z ITO mikroskopického sklíčka, zatímco chemické pozadí pro Ag a Au bylo zanedbatelné (Obr. 3.4B). Na druhou stranu, EDS analýza povrchu hyfy potvrdila selektivní navázání stříbra a zlata na složky buněčné stěny *A. fumigatus* během barvení dle Grocotta (Obr. 3.4C).



Obr. 3.4 SEM zobrazování řezu tkáně infikované houbou *A. fumigatus* (A) s vyznačenými body pro prvkovou analýzu (barvení dle Grocotta, 15 kV, primární zvětšení 8 000x), (B) ED spektrum pozadí povrchu ITO mikroskopického skla, (C) ED spektrum nasbírané z povrchu hyfy houby *A. fumigatus*.

3.4 Závěr

Multimodální zobrazování invazivní plicní aspergilózy v potkaních plicích ukázalo, že využití jediné zobrazovací techniky může být nedostatečné, a to zejména v případě studia prostorové distribuce sekundárních metabolitů jakožto potenciálních biomarkerů invazivních mykotických infekcí. Bohužel molekulární přístup mapování sekundárních metabolitů *A. fumigatus* nebyl úspěšný, jelikož během MALDI-MS zobrazování došlo k potlačení signálů

mikrobiálních sideroforů, a to buď přítomností fixačního pHPMA polymeru anebo kvůli omezenému dynamickému rozsahu MALDI-MSI. Na druhou stranu LA-ICP-MS zobrazování prostorové distribuce železa prokázalo přibližně 20-ti násobné zvýšení koncentrace železa v regionech postižených IPA infekcí, kdy nárůst obsahu železa může souviset přímo s přítomností ferri-forem sekundárních metabolitů zodpovědných za „krádež“ železa z organismu hostitele anebo ukládání železa v hyfách a konidiích houby *A. fumigatus*. Dále LA-ICP-MS mapování specificky navázaného stříbra a zlata umožnilo detailní studium rozšiřující se IPA infekce v plicní tkáni infikované houbou *A. fumigatus*. Vzhledem k nízkému chemickému pozadí, nízkým detekčním limitům na koncentrační úrovni $0,03 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a unikátnímu dynamickému rozsahu pro oba kovy bylo možné provést kvantitativní LA-ICP-MS mapování s velikostí laserového svazku 3–5 μm , což by mohlo pomoci klinickým mikrobiologům zejména v diagnostice nejednoznačných případů výskytu IPA infekce. Selektivní navázaní stříbra a zlata na mukopolysacharidové složky buněčné stěny *A. fumigatus* společně s nízkým chemickým pozadím pro oba kovy bylo potvrzeno SEM-EDS, který využívá submikrometrického rozlišení elektronové mikroskopie. LA-ICP-MS zobrazování zlata a stříbra s prostorovým rozlišením 3–5 μm odpovídající prakticky velikosti jednotlivých hyf má značný potenciál stát se citlivější alternativou ke standardním vizualizačním postupům používaných v klinické mykologii.

4. Prostorové značky

4.1 Multimodální zobrazování a prostorové značky

Zobrazovací hmotnostní spektrometrie (MSI-„*mass spectrometry imaging*“) je jednou z nejvýznamnějších a nejrozšířenějších analytických technik poskytující detailní studium prostorové distribuce molekul a prvků v různorodých biologických vzorcích. Techniky MSI umožňují provést komplexní studium biologických vzorků od jednotlivých buněk, přes biopsie, orgány až po kompletní biologické systémy²⁰⁻²². Avšak žádná z komerčně dostupných MSI technik není sama o sobě schopna poskytnout kompletní informace o prostorové distribuci biologicky významných molekul a prvků na povrchu studovaných biologických tkání. Proto je pro detailní studium biologických vzorků považovaných za prostorově, morfologicky a metabolicky komplexní systémy využíván multimodální přístup kombinující možnosti elementárního a molekulárního zobrazování. V současnosti multimodální zobrazování využívá zejména pětice komerčně dostupných MSI technik, a to MALDI-MS, DESI-MS, SIMS, laserové ablace ve spojení s ionizací elektrosprejem (LAESI) a LA-ICP-MS^{22,23}. Mimoto pro účely získání kompletních informací o patofyziologických změnách v biologických tkáních mohou být molekulární/prvkové 2D mapy dále porovnávány s výsledky histologického a imunohistochemického barvení či fluorescenční mikroskopie.

Správná interpretace takto získaných dat ale vyžaduje přesný překryv molekulárních/prvkových 2D map s příslušnými optickými snímky, což může být značně obtížné zejména v případech, kdy analyzovaná tkáň neobsahuje charakteristické anatomické znaky. Navíc i molekulární/prvkové 2D mapy mohou být lehce posunuty (deformovány), a to v důsledku změny tvaru a velikosti řezu během krájení a fixace biologického vzorku či hardwarového nastavení iontového zdroje. V případě multimodálního zobrazování je pro správný a přesný překryv multimodálně nasbíraných dat nezbytné využít referenčních bodů tzv. prostorových značek (PZ, „*fiducial markers*“) ^{20,23,24}. Další významnou aplikací PZ je 3D zobrazování biologických tkání, kde jsou PZ využívány ke správnému a přesnému uspořádání celé série molekulárních/prvkových 2D map získaných zobrazováním konsekutivně odebíraných řezů do jediného trojrozměrného objektu²⁰. Volba optimálního složení prostorové značky může být obtížná, a to zejména v případě multimodálního zobrazování využívajícího kombinace MSI technik, optické mikroskopie, fluorescenční mikroskopie a histologického barvení. Základními požadavky kladenými na PZ je intenzivní zbarvení (optická

mikroskopie), absorpce/emise při zvolené vlnové délce (fluorescenční mikroskopie), dostatečná účinnost ionizace ve vybraných iontových zdrojích a v neposlední řadě také zanedbatelná difúze během přípravy biologického vzorku či v průběhu histologického a imunohistochemického barvení.

Cílem této práce bylo navrhnout a optimalizovat složení prostorové značky vhodné k přesnému a správnému překryvu molekulárních/prvkových 2D map získaných MALDI-MS, DESI-MS, LA-ICP-MS zobrazování s optickými snímky z histologického barvení (optická mikroskopie) a fluorescenční mikroskopie.

4.2 Experimentální část

4.2.1 Analyzované vzorky, složení prostorových značek a jejich aplikace

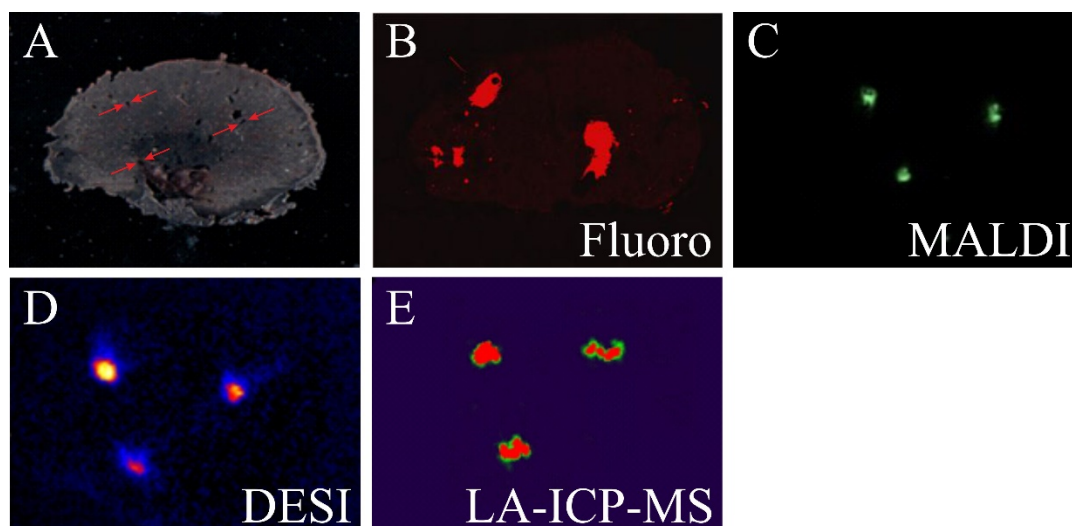
Vzorky myších ledvin byly získány od zdravých jedinců a ihned po vyjmutí z těla byly zmrazeny v kapalném dusíku a následně uchovány při teplotě -80°C . Před aplikací prostorových značek a vlastním krájením byly tkáně ponechány při teplotě -20°C po dobu 45 minut v kryomikrotomu CM1950 (Leica, Německo). Pro účely multimodálního zobrazování technikami MALDI-MS, DESI-MS LA-ICP-MS, optickou a fluorescenční mikroskopií bylo výsledné (optimální) složení PZ následující: 20 mmol.l^{-1} rhodaminu B, $100\text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ iontového stříbra a $5\text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ nanočástic zlata připravených v roztoku obsahujícím 100 mg.ml^{-1} PHPMA. Takto připravená polymerní směs byla postupně aplikována do myší ledviny injekční stříkačkou s vnějším průměrem injekční jehly $300\text{ }\mu\text{m}$, za vzniku tří prostorových značek rozmístěných do vrcholů pravoúhlého trojúhelníku tvořícího písmeno „L“. Po aplikaci PZ byly vzorky myších ledvin koronárně krájeny v předem definovaných vzdálenostech na řezy o tloušťce $10\text{ }\mu\text{m}$ (MALDI-MSI), $20\text{ }\mu\text{m}$ (DESI-MSI, optická a fluorescenční mikroskopie) a $30\text{ }\mu\text{m}$ (LA-ICP-MSI) při teplotě -20°C pomocí kryomikrotomu CM1950. Řezy tkání byly přeneseny buď na ITO sklíčko (MALDI-MSI, LA-ICP-MSI) a „*Omni slides*“ (DESI-MSI) nebo na standardní mikroskopická sklíčka (optická, fluorescenční mikroskopie) a poté tepelně fixovány. Vzorky pro MALDI, LA-ICP-MS zobrazování, optickou a fluorescenční mikroskopii byly vakuově sušeny po dobu 40 minut v exsikátoru, zatímco vzorky pro DESI-MSI byly analyzovány bez jakéhokoliv další úpravy. V této fázi byly pořízeny optické obrazy jednotlivých tkání pomocí skeneru HP Scanjet 4890 s rozlišením $1\text{ }200\text{ dpi}$ (DESI) a $4\text{ }800\text{ dpi}$ (MALDI, LA-ICP-MS). Poté byla na vzorky pro MALDI-MSI rovnoměrně nanášena CHCA matrice (7 g.l^{-1} v ACN:voda 50:50 (v/v) s 0,2 % kyselinou

trifluoroctovou) s využitím přístroje ImagePrep (Bruker Daltonics, Německo) a přednastavené nanášecí metody.

4.3 Výsledky a diskuze

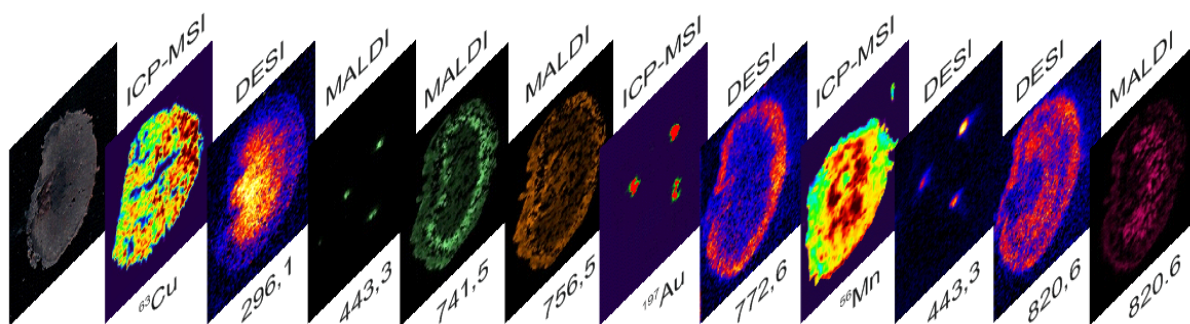
4.3.1 Prostorové značky, multimodální a 3D zobrazování myší ledviny

První část experimentální práce byla zaměřena na výběr optimálního složení PZ a na ověření jeho kompatibility s technikami MALDI-MS, DESI-MS, LA-ICP-MS zobrazování, optickou a fluorescenční mikroskopií. Výsledné složení PZ poskytovalo sytě fialovo-růžové zbarvení, které zůstalo nezměněno jak po aplikaci PZ do myší ledviny a opakovaném zmrazení vzorku na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, tak i během přípravy tenkých řezů a následném nanesení CHCA matrice pro MALDI-MSI. Unikátních vlastností rhodaminu B (intenzivní růžovo-fialové zbarvení, snadná ionizace a charakteristická fluorescence) bylo využito pro zobrazování rozmístění PZ na povrchu myší ledviny pomocí MALDI-MSI, DESI-MSI, optické a fluorescenční mikroskopie (Obr. 4.1A až D). Zatímco v případě LA-ICP-MS bylo rozmístění PZ určeno na základě detekce signálů odpovídajících stříbru (ve formě Ag^+ iontů) a zlata (100 nm nanočástice) přidaných do výsledné směsi PZ (Obr. 4.1E). Výsledné složení PZ tedy poskytuje intenzivní fialovo-růžové zbarvení (optická mikroskopie), intenzivní fluorescenci (fluorescenční mikroskopie), dobré ionizační vlastnosti rhodaminu B v pozitivním módu (MALDI-MSI, DESI-MSI) a intenzivní signál stříbra a zlata pro LA-ICP-MSI.



Obr. 4.1 Porovnání signálů PZ získaných pomocí (B) fluorescenční mikroskopie, (C) MALDI-MSI, (D) DESI-MSI (rhodamin B 443,3 m/z), (E) LA-ICP-MS (^{107}Ag , identická 2D mapa byla získána i pro signál ^{197}Au) s (A) optickým obrazem řezu myší ledviny.

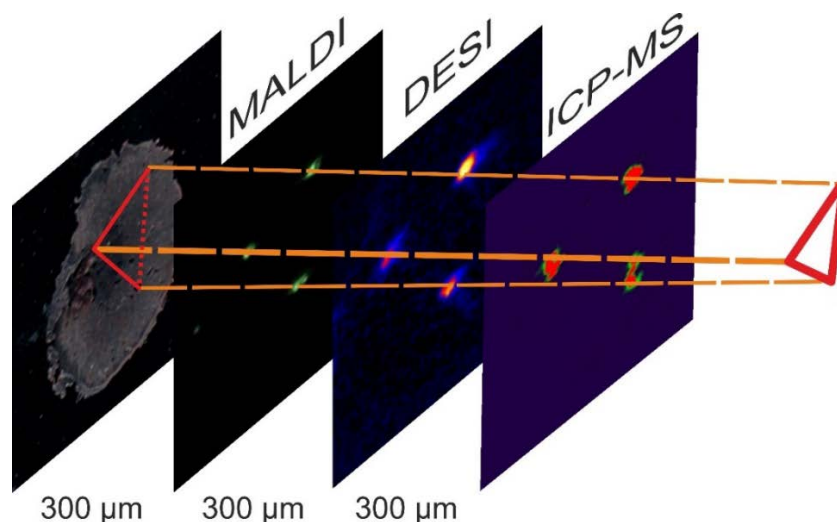
Dále byly prostorové značky použity pro multimodální zobrazování molekul/prvků v myší ledvině. V našem případě multimodální zobrazování zahrnovalo využití MALDI-MSI, DESI-MSI, LA-ICP-MSI společně s optickou a fluorescenční mikroskopií. Získaná 2D data byla zpracována a vizualizována příslušnými programy za vzniku 2D map distribuce molekul a prvků, které byly následně porovnávány s odpovídajícím optickým snímkem myší ledviny. Ke správnému a přesnému překryvu multimodálně nasbíraných dat bylo využito PZ respektive odpovídajících signálů pro jednotlivé komponenty PZ. Vzájemné uspořádání (překryv) vybraných molekulárních/prvkových 2D map s optickým snímkem analyzované myší ledviny je znázorněno na Obr. 4.2. Charakteristicky rozmístěných prostorových značek bylo úspěšně využito k vzájemnému překryvu multimodálně nasbíraných dat, což je nezbytné pro získání detailních informací o chemickém složení myších ledvin a prostorové distribuci biologicky významných prvků a molekul.



Obr. 4.2 Vzájemný překryv 2D map prostorové distribuce vybraných molekul (zejména lipidů) a biogenních prvků z multimodálně zobrazovacího experimentu s optickým snímkem myší ledviny. Součástí porovnání jsou i 2D mapy odpovídající prostorové distribuci třech PZ – 443.3 m/z (MALDI, DESI) ^{197}Au (LA-ICP-MS).

Poslední část prezentované práce byla zaměřena na studium možnosti aplikace PZ pro 3D multimodální zobrazování. Pro testování vhodnosti PZ pro 3D zobrazování myší tkáně bylo využito molekulárních/prvkových 2D map vzniklých analýzou tenkých řezů nakrájených v předem definovaných vzdálenostech (300 μm) napříč celou analyzovanou myší ledvinou. Ke správnému a přesnému překryvu multimodálně nasbíraných 2D map bylo využito PZ respektive odpovídajících signálů pro jednotlivé komponenty PZ. Vzájemné uspořádání jednotlivých molekulárních/prvkových 2D map prostorové distribuce prostorových značek na povrchu analyzované tkáně společně s optickým snímkem analyzované myší ledviny je znázorněno na Obr. 4.3. Uvedený příklad demonstruje význam aplikace PZ pro správné

a přesné uspořádání multimodálně získaných molekulárních/prvkových 2D map za vzniku jediného trojrozměrného objektu analyzované biologické tkáně. Předpokladem pro přesnou rekonstrukci 3D struktury analyzované tkáně je současná vizualizace PZ na základě detekce fyzikálně-chemických vlastností jednotlivých složek PZ všemi použitými zobrazovacími technikami.



Obr. 4.3 Aplikace PZ pro 3D multimodální zobrazování biologických tkání. Vzájemný překryv 2D map prostorové distribuce PZ vzniklých analýzou tenkých řezů nakrájených v předem definovaných vzdálenostech napříč celou analyzovanou myší ledvinou. Detekovaný signál PZ – rhodamin B 443.3 m/z (MALDI-MS, DESI-MS) a ^{197}Au (LA-ICP-MS).

4.4 Závěr

Multimodální zobrazování vyžaduje použití vhodných prostorových značek pro správný a přesný překryv molekulárních/prvkových 2D map pro účely získání detailních informací o chemickém složení povrchu a prostorové distribuci biologicky významných prvků a molekul. Aplikované PZ se osvědčily pro správnou a přesnou kombinaci multimodálně nasbíraných molekulárních/prvkových 2D map získaných pomocí pětice doplňujících se zobrazovacích technik, a to MALDI-MS, DESI-MS, LA-ICP-MS, optické a fluorescenční mikroskopie. Následující experimenty budou zaměřeny na aplikaci PZ pro 3D zobrazování různých biologických tkání a pro normalizaci intenzity signálu jednotlivých molekulárních/elementárních 2D map nezbytnou pro správnou rekonstrukci 3D struktury analyzované tkáně na základě vzájemného překryvu celé série multimodálně nasbíraných molekulárních/prvkových 2D map.

5. LA-ICP-MSI ve forenzní analýze – analýza povýstřelových zplodin přímo na latentních otiscích prstu

5.1 Otisk prstu a kriminalistická daktyloskopie

První identifikační systém pro forenzní účely byl zaveden na konci 19. století v Anglii a postupně byl rozšířen do celého světa²⁵. Od té doby patří odběr otisků prstu a jejich následná analýza k základním úkonům při vyšetřování kriminálních činů. Studium otisku papilárních linií vychází z poznatků o fyziologických vlastnostech pokožky člověka, které popisuje daktyloskopie. Průběh kožních papilárních linií vytvořený na vnitřní straně prstů, na dlaních, na prstech nohou a chodidel je pro každého jedince charakteristický, jedinečný a do jisté míry i dědičný²⁶. Vznik a existence dermatoglyfů papilárních linií se řídí třemi obecně uznávanými zákonitostmi otisků prstů: individuálnost, neměnnost a neodstranitelnost, které stanovil na konci 19. století Francis Galton²⁷⁻²⁹. Daktyloskopie společně s DNA analýzou představuje dva základní pilíře forenzní identifikace osob²⁷⁻²⁹.

Otisky prstů mohou být zanechány na celé řadě povrchů, a to díky vylučování potu obsahujícího komplexní směs chemických látek (lipidy, aminokyseliny, proteiny, hormony, anorganické prvky apod.). Většina zanechaných otisků prstů jsou pro lidské oko nedetekovatelné, a i proto jsou označovány jako latentní (skryté). Latentní otisky prstů je možné zviditelnit různými fyzikálními, fyzikálně-chemickými a chemickými metodami. Běžné fyzikální, fyzikálně-chemické a chemické metody umožňují sejmutí latentních otisků přímo z povrchů nalezených na místě činu, a to na základě zvýraznění kontrastu mezi vystouplými papilárními liniemi a prohlubněmi³⁰. Zkoumání daktyloskopických stop, tedy daktyloskopická identifikace, v kriminalistické praxi dosud představuje aplikaci identifikačního algoritmu tzv. „*fingerprint matching algoritmus*“ založeného na přímém vizuálním či programovém srovnání shody daktyloskopických markantů na otisku z místa činu s kontrolním (referenčním) otiskem („*Automated Fingerprint Identification System, AFIS*“).

Nicméně v posledních letech jsme svědky renesance detailního studia latentních otisků prstů pomocí sofistikovaných instrumentálních technik s cílem získat dodatečné informace napomáhající k objasnění trestného činu. K doposud získaným doplňujícím informacím patří zejména pohlaví a věk, přítomnost endogenních chemických látek (lidské metabolity s diagnostickou hodnotou), přítomnost exogenních chemických látek (zneužívání drog, farmak, exploziv, kosmetiky, potravin) či přítomnost částic povýstřelových zplodin³¹⁻³⁵. Současný stav

v oblasti zobrazování latentních otisků prstů a možnosti analýzy endogenních a exogenních chemických látek obsažených v otiscích prstů shrnuje přehledový článek z roku 2016³⁶.

5.2 Povýstřelové zplodiny

Detekce a identifikace povýstřelových zplodin („*gunshot residues*“-GSR) na povrchu latentních otisků prstů poskytuje stěžejní informace k určení, zda podezřelá osoba použila střelnou zbraň při trestném činu. Povýstřelové zplodiny jsou charakterizovány jako částice vytvářené v důsledku procesu hoření zážehové složky zápalky, prachové náplně náboje a následné interakce vzniklých zplodin s konstrukčními prvky náboje za teplot a tlaků vznikajících při samotném výstřelu³⁷. Povýstřelové zplodiny opouští střelnou zbraň (hlaveň, závěr, netěsnosti) v plynném skupenství a vytváří oblak zplodin v okolí zbraně, který rychle kondenzuje (několik milisekund) za vzniku mikroskopických částic charakteristických pro povýstřelové zplodiny. Zkondenzované částice následně sedimentují a ulpívají nejen na rukou, obličejích a oděvu střelce, ale i na předmětech a osobách nacházejících se v těsné blízkosti střelné zbraně^{37,38}. Dle ENFSI („*European Network of Forensic Science Institutes*“) jsou za charakteristické povýstřelové zplodiny považovány kulovité částice s velikostí 0,5 – 5,0 μm a chemickým složením odpovídajícím střelné zbraně, projektilu a nábojnici. Na základě profilu obsažených prvků jsou povýstřelové zplodiny klasifikovány do 9 základních tříd: třída 1: Pb–Sb–Ba (navíc částice mohou obsahovat jeden nebo i několik uvedených prvků: Si, Ca, Al, Cu, Fe, S, P, Zn, Ni); třída 2: Ba–Ca–Si; třída 3: Sb–Ba; třída 4: Pb–Sb; třída 5: Ba–Al; třída 6: Pb–Ba; třída 7: Pb, třída 8: Ba a třída 9: Sb. Množství ulpělých částic na rukou, obličejích, vlasech a oděvu střelce závisí na několika faktorech, a to typu zbraně a použitém střelivu, stáří a technickém stavu zbraně, hygienických návycích střelce a uplynulé době^{37,39}.

Za standardní techniku pro analýzu a jednoznačnou identifikaci částic povýstřelových zplodin je stále považována skenovací elektronová mikroskopie s energiově-disperzním spektrometrem (SEM-EDS)⁴⁰, a to i navzdory tomu, že v průběhu let byla použita celá řada instrumentálních technik. Mezi další používané techniky prvkové analýzy patří neutronová aktivační analýza (NAA), rentgenová fluorescenční spektrometrie (XRF), částicově indukovaná RTG emisní spektrometrie (PIXE), hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů (SIMS), atomová absorpční spektrometrie (AAS), optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES), hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) a v neposlední řadě její spojení s laserovou ablací (LA-ICP-MS). Jednotlivé aplikace

uvedených technik jsou dále shrnuty v přehledových člancích⁴¹⁻⁴³. Přestože již bylo LA-ICP-MS využito pro analýzu povýstřelových zplodin, tak doposud nebyla publikována metoda umožňující současné provedení detekce a identifikace jednotlivých typů částic povýstřelových zplodin přímo na povrchu latentního otisku prstu společně s jeho následnou rekonstrukcí pro účely identifikaci „střelce“ pomocí standardních daktyloskopických metod.

Cílem této práce bylo vyvinout a optimalizovat LA-ICP-MSI metodu pro detekci a charakterizaci jednotlivých částic povýstřelových zplodin na povrchu latentního otisku prstu se současnou identifikací „střelce“. Přímá identifikace byla založena jednak na porovnání 2D map kovů charakteristických pro povýstřelové zplodiny se zviditelněnými kontrolními (referenčními) otisky nebo na vizuálním porovnání rozmístění charakteristických papilárních linií a rozmanitých daktyloskopických markantů.

5.3 Experimentální část

5.3.1 Střelba a odběr otisků prstu

Reálné vzorky povýstřelových zplodin ulpělých na rukou střelce po střelbě ze samonabíjecí pistole CZ 75D Compact P-01 ráže 9 mm byly získány v prostorách venkovní střelnice v Olomouci (LAZECKÁ STŘELNICE, spol. s.r.o.). Před samotnou střelbou byla zbraň důkladně vyčištěna dle pokynů výrobce a poté jemně ošetřena 1 % roztokem kyseliny dusičné. Navíc před každým experimentem byly střelcovy ruce důkladně očištěny a opláchnuty v 1 % (v/v) roztoku HNO₃. Tento postup byl prováděn za účelem odstranění všech možných kovových kontaminantů ulpělých jak na zbrani, tak i na rukou střelce z předchozí střelby. Pro detailní studium povýstřelových zplodin byly vzorky kontrolních otisků (n=3), otisků prstu po manipulaci se střelivem a střelnou zbraní (n = 3), po jednom výstřelu (n = 3) a po pěti výstřelech (n = 3) odebírány duplicitně. První z nich byl otisknut na čisté mikroskopické sklíčko (LA-ICP-MS zobrazování) a druhý otisk byl po otisknutí na mikroskopické sklíčko odebrán transparentní daktyloskopickou páskou (roztoková ICP-MS analýza), která byla poté důkladně zabalena a vložena do čisté a předem označené PP mikrozkumavky. Následně byly v laboratoři odebírány kontrolní otisky prstů od všech testovaných osob, které byly zviditelněny bronzovým daktyloskopickým práškem a po jejich přenesení na bílou daktyloskopickou folii byly snímány skenerem Epson Perfection Photo V370 s rozlišením 1 200 dpi.

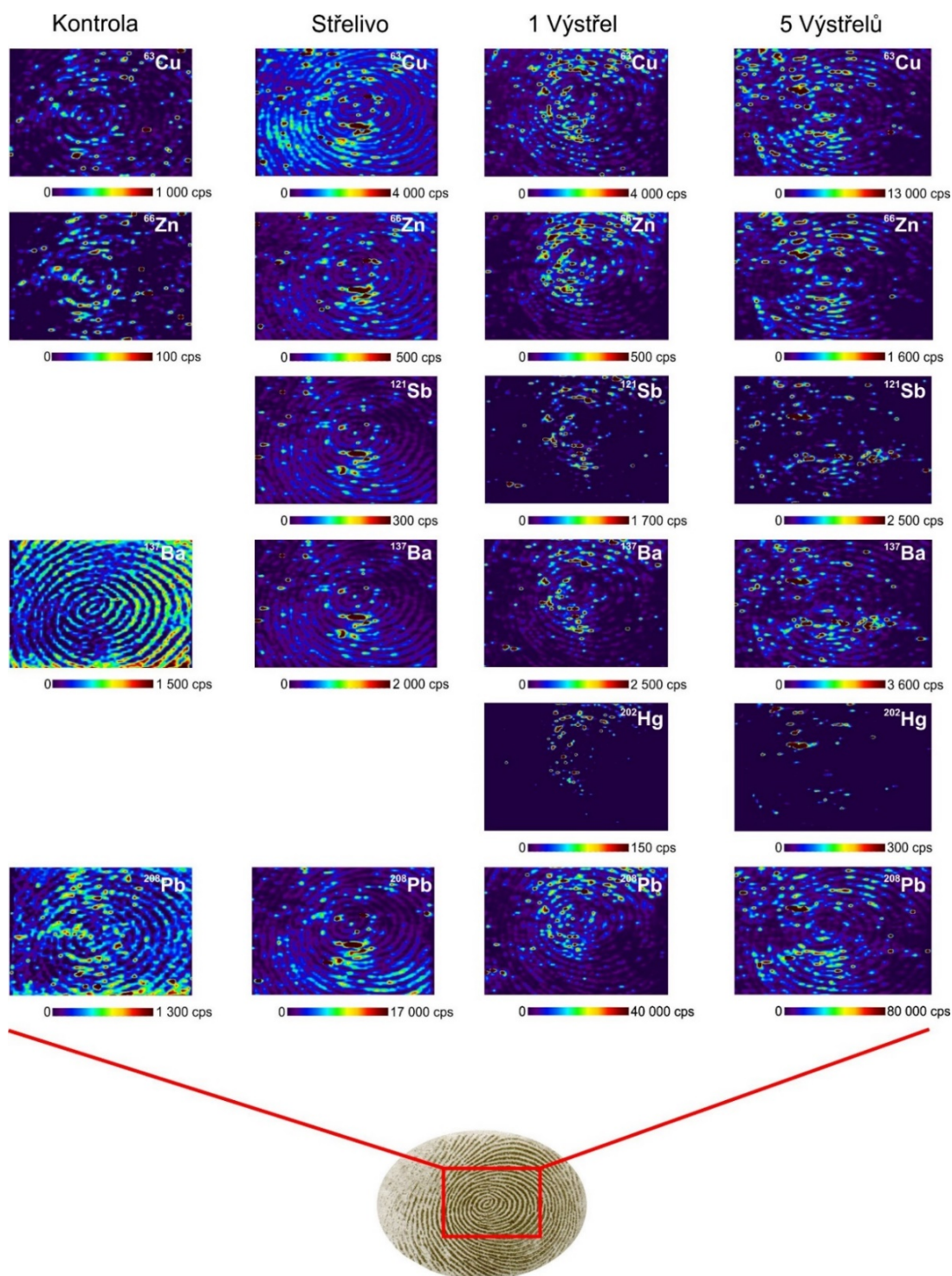
5.4 Výsledky a diskuze

5.4.1 LA-ICP-MS zobrazování povýstřelových zplodin

LA-ICP-MS zobrazování bylo využito jednak k detekci a charakterizaci jednotlivých částic povýstřelových zplodin na povrchu latentního otisku prstu, ale především k identifikaci „střelce“. Monitorované kovy Cu, Zn, Sb, Ba, Hg, Pb byly vybrány zejména na základě prvkového složení částic povýstřelových zplodin, prvkového složení nábojnice, zápalkové složky, celoplášťové střely a v neposlední řadě na základě výsledků roztokové ICP-MS analýzy. Mapována byla sada latentních otisků prstů sestávající se ze slepého vzorku (povrch mikroskopického skla bez otisku prstu), kontrolního otisku, otisk po manipulaci se střelivem a střelnou zbraní, otisku po jednom a pěti výstřelech. Pro LA-ICP-MS analýzu byla vybrána oblast s rozměrem $\sim 0,9 \times 1,3$ cm (doba analýzy $\sim 2,5$ až 3 hodiny), která byla symetricky rozmístěná okolo středu (vrcholu) otisku, z důvodu maximalizace pokrytí rozmanitých daktyloskopických znaků.

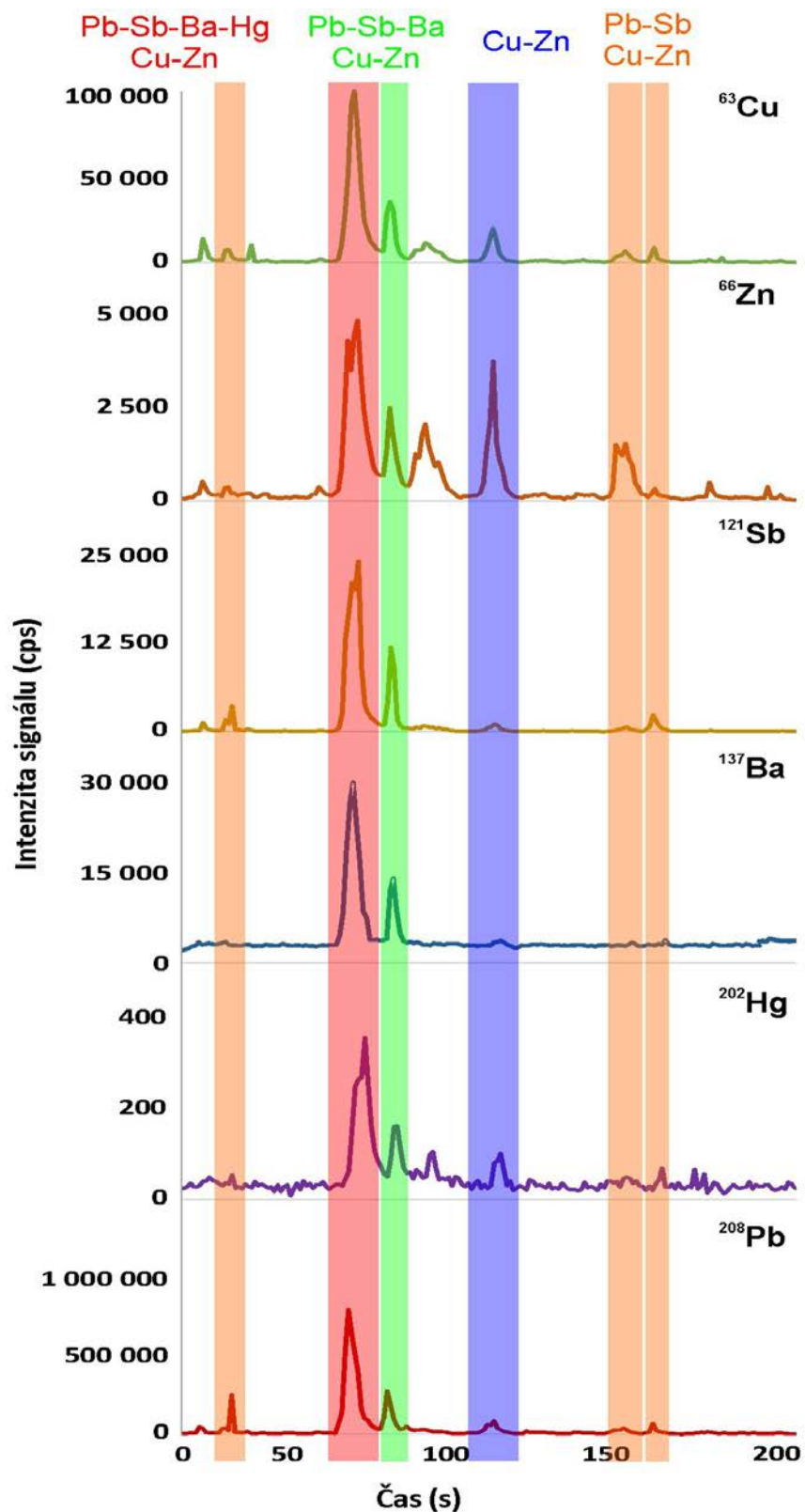
LA-ICP-MS mapování poskytlo detailní informace o distribuci částic povýstřelových zplodin na povrchu latentních otisků prstu souvisejících přímo se samotnou střelbou, ale i kovových částíček a dalších nečistot ulpělých na otiscích prstu po manipulaci se střelivem a střelnou zbraní a na kontrolním otisku (Cu, Zn, Pb). Výsledky mapování Cu, Zn, Sb, Ba, Hg, Pb na povrchu odebraných otisků prstů jsou uvedeny na Obr. 5.1 (střelec 1). V případě kontrolního latentního otisku však nebylo možné získat (rekonstruovat) 2D mapu prostorové distribuce Sb a Hg, a to z důvodu jejich nízkého přirozeného výskytu v životním prostředí. Mimo to rtuť nebyla detekována ani na povrchu otisku prstu po manipulaci se střelivem a střelnou zbraní, což oba prvky řadí mezi velmi významné a unikátní markery povýstřelových zplodin. V porovnání s kontrolním otiskem, LA-ICP-MS mapování prokázalo výrazný nárůst intenzity signálu pro Cu, Zn, Sb, Ba, Hg, Pb u otisků pocházejících ze všech tří testovaných skupin (střelivo, 1 výstřel, 5 výstřelů). V případě otisků po manipulaci se střelivem a střelnou zbraní byla zjištěna rovnoměrnější distribuce kovů na povrchu papilárních linií, která je zřejmě způsobena otěrem celého bříška palce při vkládání nábojů do zásobníku. Z uvedených výsledků vyplývá, že studium rozdílů v intenzitě signálů, ale především v distribuci Cu, Zn, Sb, Ba, Hg, Pb má značný dopad pro identifikaci a charakterizaci povýstřelových zplodin, kdy můžeme odlišit, zda odebraný otisk souvisí s manipulací se střelivem a střelnou zbraní, nebo přímo se samotnou střelbou. Tedy v případě, že na povrchu otisku prstu nejsou identifikovány typické kulovité částice s prvkovým profilem odpovídajícím jednotlivým třídám povýstřelových

zplodin, tak je možné vyvodit závěr, že odebraný otisk není spojen se střelbou ze zbraně anebo jiné kontaminace povýstřelovými zplodinami (osoba v blízkosti střelby).



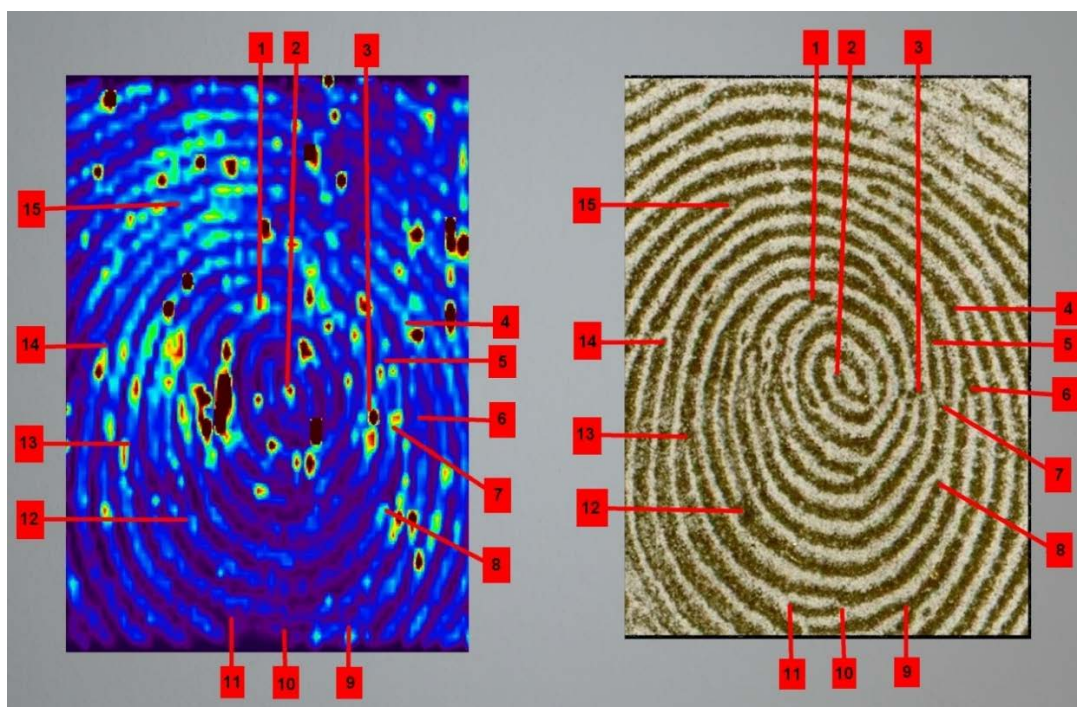
Obr. 5.1 Identifikace povýstřelových zplodin na základě LA-ICP-MS zobrazování prostorové distribuce Cu, Zn, Sb, Ba, Hg, Pb na povrchu latentních otisků prstů střelce č. 1 pocházejících ze 4 testovaných skupin: kontrolní, manipulace se střelivem a střelnou zbraní (střelivo), po jednom výstřelu a po pěti výstřelech, (cps – intenzita signálu).

Částice povýstřelových zplodin byly na otiscích prstů souvisejících s použitím střelné zbraně identifikovány jednak na základě přítomnosti kulovitých částecek a jejich shluků, které mají shodnou prostorovou distribuci prvků (Sb, Ba, Hg, Pb, ale i Cu a Zn) odpovídající charakteristickému prvkovému složení jednotlivých tříd povýstřelových zplodin (Obr. 5.1). Navíc LA-ICP-MS časově (prostorově) závislá data byla využita pro detekci a následnou charakterizaci jednotlivých skupin povýstřelových zplodin. Částice byly identifikovány na základě simultánního záznamu signálu pro izotopy Pb, Sb, Ba, Hg, Cu, Zn představujících prvkový profil charakteristických částic povýstřelových zplodin. Tedy v případě současné detekce (identický ablační čas) signálů pro Pb, Sb, Ba, Hg, Cu, Zn lze tyto signály považovat za charakteristické pro částice povýstřelových zplodin s typickým prvkovým složením (Obr. 5.2). Nicméně podmínkou pro detekci částic povýstřelových zplodin bylo nastavení minimální intenzity potřebné pro pozitivní identifikaci signálu pro příslušné izotopy kovů charakteristické pro povýstřelové zplodiny. Minimální hodnota signálu odpovídající nejmenší detekované částici byla stanovena jako desetinásobek průměru signálu pozadí pro slepý vzorek³⁷ (1 640 cps pro Cu, 160 cps pro Zn, 101 cps pro Sb, 2 050 cps pro Ba, 230 cps pro Hg a 6 850 cps pro Pb). Použití méně přísných kritérií by sice přispělo k výraznému zvýšení počtu identifikovaných částic, avšak přísnější kritéria byla volena z důvodu zvýšení věrohodnosti získaných výsledků. Detailní studium částic povýstřelových zplodin ulpělých na otisku prst střelců po střelbě ze samonabíjecí pistole CZ 75D Compact P-01 ráže 9 mm s náboji 9x19 mm Luger s celoplášťovou střelou 7,5 g potvrdilo přítomnost 8 různých tříd povýstřelových zplodin, a to Pb-Sb-Ba-Hg, Pb-Sb-Ba, Sb-Ba, Sb-Hg, Pb, Ba, Sb, Cu-Zn.



Obr. 5.2 Charakterizace jednotlivých typů povýstřelových zplodin. Barevné svislé pruhy reprezentují identifikované typy povýstřelových zplodin. Liniový sken pochází ze vzorku otisku střelce, který vypálil 5 po sobě jdoucích ran ze samonabíjecí pistole CZ 75D Compact P-01 ráže 9 mm s náboji 9 x 19 mm Luger s celoplášťovou střelou 7,5 g.

Hlavním cílem celé práce byla především aplikace LA-ICP-MS zobrazování pro přímou identifikaci střelce. Přímá identifikace byla založena na principu daktyloskopické identifikaci zahrnující porovnání charakteristických identifikačních znaků (daktyloskopických markantů). Identifikace střelce osoby na základě vizuálního porovnání charakteristického rozmístění papilárních linií a rozmanitých daktyloskopických znaků je prezentováno na Obr. 5.3. Daktyloskopická identifikace byla provedena ve spolupráci s daktyloskopickými znalci z Odboru kriminalistické techniky a expertíz Krajského ředitelství policie Moravskoslezského kraje. V případě porovnání shody rozmístění daktyloskopických markantů bylo identifikováno 15 daktyloskopických markantů, což představuje dostatečný počet pro určení shody s referenčním otiskem v České republice, ale i jiných evropských státech. Prezentované postupy detailního studia povýstřelových zplodin definují významnost a unikátnost LA-ICP-MSI pro účely analýzy latentních otisků prstů v kontextu analýzy povýstřelových zplodin. Optimalizovaná LA-ICP-MS metoda je vhodná nejen k detekci a charakterizaci částic povýstřelových zplodin, ale především k přímé identifikaci osoby na základě porovnání shody charakteristického rozmístění rozmanitých daktyloskopických markantů na 2D mapách prostorové distribuce Cu, Zn, Sb, Ba, (Hg), Pb a kontrolním (referenčním) otisku prstu.



Obr. 5.3 Identifikace otisku prstu střelce založená na přímém vizuálním srovnání shody rozmístění daktyloskopických markantů (označených čísly 1 až 15) na otisku z místa činu s kontrolním (referenčním) otiskem.

5.5 Závěr

Prezentovaná metoda LA-ICP-MS zobrazování latentních otisků prstů umožňuje provést jednak vyhodnocení přítomnosti charakteristických kovů odpovídajících složení částic povýstřelových zplodin, ale především umožňuje rekonstruovat otisk prstů z prostorové distribuce kovů po LA-ICP-MS mapování. Metoda využívá skutečnosti, že při manipulaci s náboji, střelnou zbraní a střelbě dochází k ulpění charakteristických kovů na prstech (Cu, Zn, Sb, Ba, Hg, Pb) a tyto kovy jsou pak přeneseny ve formě otisků na různé povrchy. Následně mohou být získané 2D mapy prostorové distribuce Cu, Zn, Sb, Ba, Hg, Pb na povrchu latentního otisku použity k přímé identifikaci střelce jednak na základě porovnání (fůzování) s kontrolním (referenčním) otiskem nebo na základě vyhodnocení shody jejich daktyloskopických markantů. LA-ICP-MS mapování distribuce Cu, Zn, Sb, Ba, Hg, Pb má značný potenciál stát se citlivější a spolehlivější alternativou ke standardním forezním metodám identifikace a charakterizace povýstřelových zplodin založených na využití skenovací elektronové mikroskopie ve spojení s energiově-disperzním spektrometrem (SEM-EDS). Následující experimenty budou zaměřeny na LA-ICP-MS zobrazování větší série otisků prstů a jejich fragmentů, kdy bude testován vliv použití různých střelných zbraní i druhů komerčně dostupných nábojů a v neposlední řadě budou experimenty zaměřeny na analýzu otisku prstů zviditelněných pomocí daktyloskopických prášků.

6. Studium vztahu mezi obsahem železa a mědi v myokardu a funkcí srdečních mitochondrií v kontextu srdečního selhání

6.1 Chronické srdeční selhání

Srdeční selhání je považováno za velmi komplikovaný klinický syndrom, během kterého dochází k dysfunkci srdečního svalu zabraňující srdci pumpovat dostatečné množství krve k pokrytí metabolických potřeb lidského těla⁴⁴. V Evropě je udávána prevalence Chronického srdečního selhání (ChSS) mezi 2–3 %, nicméně ChSS se podílí významnou měrou na mortalitě a morbiditě zejména starší populace⁴⁵. Chronické srdeční selhání vzniká nejčastěji následkem onemocnění srdečního svalu nebo z extrakardiálních příčin. K nejčastějším příčinám ChSS patří ischemická choroba srdeční, idiopatická kardiomyopatie, zánětlivá onemocnění, chlopenní vady a hypertenze. Následkem ChSS dochází nejen ke zhoršení funkce kardiovaskulárního, endokrinního, nervového, imunitního systému a krvetvorby, ale i k postižení cílových orgánů (svalstvo, kostra, plíce, ledviny)⁴⁴.

Tedy pro správnou funkci srdečního svalu je nutné zajistit, aby byl srdeční sval dostatečně a včasné zásobován energií produkovanou mitochondriemi⁴⁶. Z čehož vyplývá, že mitochondriální dysfunkce vyznačující se sníženou biogenezí, sníženou substrátovou flexibilitou a odolností vůči oxidativnímu poškození reaktivními formami kyslíku může být myšlenkou vedoucí k vysvětlení stárnutí srdečního svalu a patofyziologii srdečního selhání⁴⁷. Bioenergetika srdečního svalu je značně regulována obsahem železa⁴⁸⁻⁵⁰, jelikož mitochondriální enzymy podílející se na oxidativní fosforylaci, antioxidační ochraně a transportu kyslíku potřebují pro svou správnou funkci „volné“ železo, železo navázané v hemu nebo v Fe-S klastrech. Ve většině případů je ChSS doprovázeno sníženým obsahem železa v myokardu⁵¹ či anémií, které způsobují mitochondriální abnormality v srdečním svaly a přispívají tak ke zhoršení ChSS a zvýšení úmrtnosti^{52,53}. Nicméně korekce anémie skrze zvýšenou erythropoézu není v případě pacientů se srdečním selháním účinná⁵³, zatímco u pacientů bez anémie intravenózní podávání železa vede ke zvýšení tolerance zátěže, zlepšení kvality života a to i u pacientů se srdečním selháním a systematickým deficitem železa^{54,55}. Tento fakt naznačuje, že relativní nedostatek železa v neerytroidních tkáních může mít klíčovou úlohu při vysvětlení patofyziologie vzniku srdečního selhání. Avšak doposud publikované práce studující obsah železa u pacientů se srdečním selháním byly zaměřeny zejména na analýzu cirkulujících markerů železa na systémové úrovni^{51,53-56}, přičemž jen dvě studie

se zabývaly stanovením obsahu železa přímo v myokardu^{57,58}. Studie však odhalily jen marginální vztah mezi myokardiálními a cirkulujícími markery železa^{57,58}.

Překvapivě doposud bylo získáno jen velmi málo informací o obsahu železa a mědi přímo v srdečním svalu u kontrolních a ChSS pacientů, zejména pak jejich dopadu na správnou funkci srdečních mitochondrií. Pro detailnější porozumění uvedených vztahů jsme se zaměřili na studium vztahu mezi obsahem železa a mědi v myokardu, funkcí srdečních mitochondrií přímo v biopsiích srdečních svalů odebraných kontrolním pacientům a pacientům s ChSS během transplantace srdce v IKEMu v Praze.

6.2 Experimentální část

6.2.1 Analyzované vzorky srdeční tkáně

Vzorky srdeční svalové tkáně byly získány od 91 pacientů s pokročilým ChSS, kteří postoupili transplantaci srdce v Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze. Kontrolní vzorky srdeční svalové tkáně byly získány od 38 dárců bez ChSS a systolické dysfunkce, jejichž srdce nemohla být použita k transplantaci z technických nebo zdravotních důvodů. Ze srdeční svalové tkáně byly odebrány vzorky levých komor tak, aby se zabránilo odběru zjizvené části tkáně či epikardiálního tuku. Odebrané vzorky byly okamžitě hluboce zmrazeny v kapalném dusíku a následně uchovány při teplotě -80 °C.

6.2.2 Stanovení železa a mědi

Před vlastním stanovením celkové koncentrace železa a mědi byly vzorky srdeční svalové tkáně sušeny v lyofilizátoru dosucha. Lyofilizované vzorky (4,3–57,4 mg) byly naváženy do teflonových mineralizačních kelímků, kde k nim byla přidána mineralizační směs složená z 1 ml 65 % kyseliny dusičné a 0,25 ml 30 % peroxidu vodíku. Takto připravené vzorky byly rozkládány v mikrovlnném rozkladném systému MLS 1200 mega podle softwarově řízeného vícekrokového rozkladného programu. Vychlazené mineralizáty byly kvantitativně převedeny do 10 ml odměrných baněk a doplněny po rysku deionizovanou vodou. Slepý pokus byl připraven z 1 ml 65 % kyseliny dusičné a 0,25 ml 30 % peroxidu vodíku. V takto připravených vzorcích byl celkový obsah železa a mědi stanoven pomocí ORS-ICP-MS Agilent 7700x. (Agilent Technologies, Japonsko) vybaveného kolizně/reakční celou.

6.2.3 Statistická analýza

Výsledná data jsou dále v textu vyjádřena jako průměr \pm SD. Statistický program JMP10 (SAS, Cary, NC, USA) byl použit k vyhodnocení naměřených dat. Ověření normálního rozdělení dat bylo prováděno Shapirovým-Wilkovým testem normality, zatímco rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly porovnávány s využitím nepárového t -testu či χ^2 testu. Korelační analýza byla prováděna pomocí Pearsonova testu. Pro všechny použité statistické testy byla P-hodnota $<0,05$ považována za statisticky významnou. Meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) byly vypočteny pomocí matematického modelu „meze: 3s – IUPAC“ ve validovaném programu EffiValidation 3.0 (Effichem, s.r.o., Česká republika).

6.3 Výsledky a diskuse

6.3.1 Validace ICP-MS metody

Validace metody zahrnovala testování linearity, meze detekce, meze stanovitelnosti, správnosti a přesnosti. Linearita byla ověřována v rozsahu LOQ – 2 000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pro Fe a LOQ – 1 000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pro Cu, kdy byla pro oba kovy získána lineární kalibrační závislost s korelačním koeficientem ≥ 0.9999 . Meze detekce a meze stanovitelnosti byly vypočteny na základě dat získaných analýzou 6 nezávisle připravených slepých pokusů a získané hodnoty byly následně přepočteny na průměrnou navážku 25 mg a ředění do 10 ml odměrných baněk. Mez detekce byla vypočtena na 0,3 $\mu\text{g.g}^{-1}$ pro Fe a 0,1 $\mu\text{g.g}^{-1}$ pro Cu, zatímco mez stanovitelnosti byla vypočtena na 1,1 $\mu\text{g.g}^{-1}$ pro Fe a 0,3 $\mu\text{g.g}^{-1}$ pro Cu. Z důvodu nedostupnosti CRM lidského srdce bylo ověření správnosti a přesnosti ICP-MS metody provedeno s využitím standardního referenčního materiálu SRM[®] 1566b. Výsledky ověření správnosti a přesnosti ICP-MS metody jsou uvedeny v Tabulce 6.1. Za účelem zajištění kontroly kvality výsledků ICP-MS stanovení Fe a Cu byly každou 10. a 11. analýzu opakovaně měřeny certifikované referenční materiály TM-15.2 a TMDA. Výsledky opakovaných analýz referenčních materiálů jsou společně s certifikovanými hodnotami, hodnotami výtěžností a relativních směrodatných odchylek uvedeny v Tabulce 6.2.

Tab. 6.1 Správnost a přesnost ICP-MS metody

Prvek	SRM®1566b			
	Certifikovaná hodnota $\bar{X} \pm U$ (mg.kg ⁻¹)	Průměrná koncentrace $\bar{X} \pm \sigma$ (mg.kg ⁻¹)	Výtěžnost (%)	RSD (%)
Fe	205,8 ± 6,8	212,1 ± 11,4	103,1	5,4
Cu	71,6 ± 1,6	73,3 ± 2,4	102,3	3,3

U – rozšířená nejistota s koeficientem rozšíření k = 2 (95 % hladina spolehlivosti)
n = 6

Tab. 6.2 Výsledky opakované analýzy železa a mědi v CRM TM-15.2 a TMDA-64.2

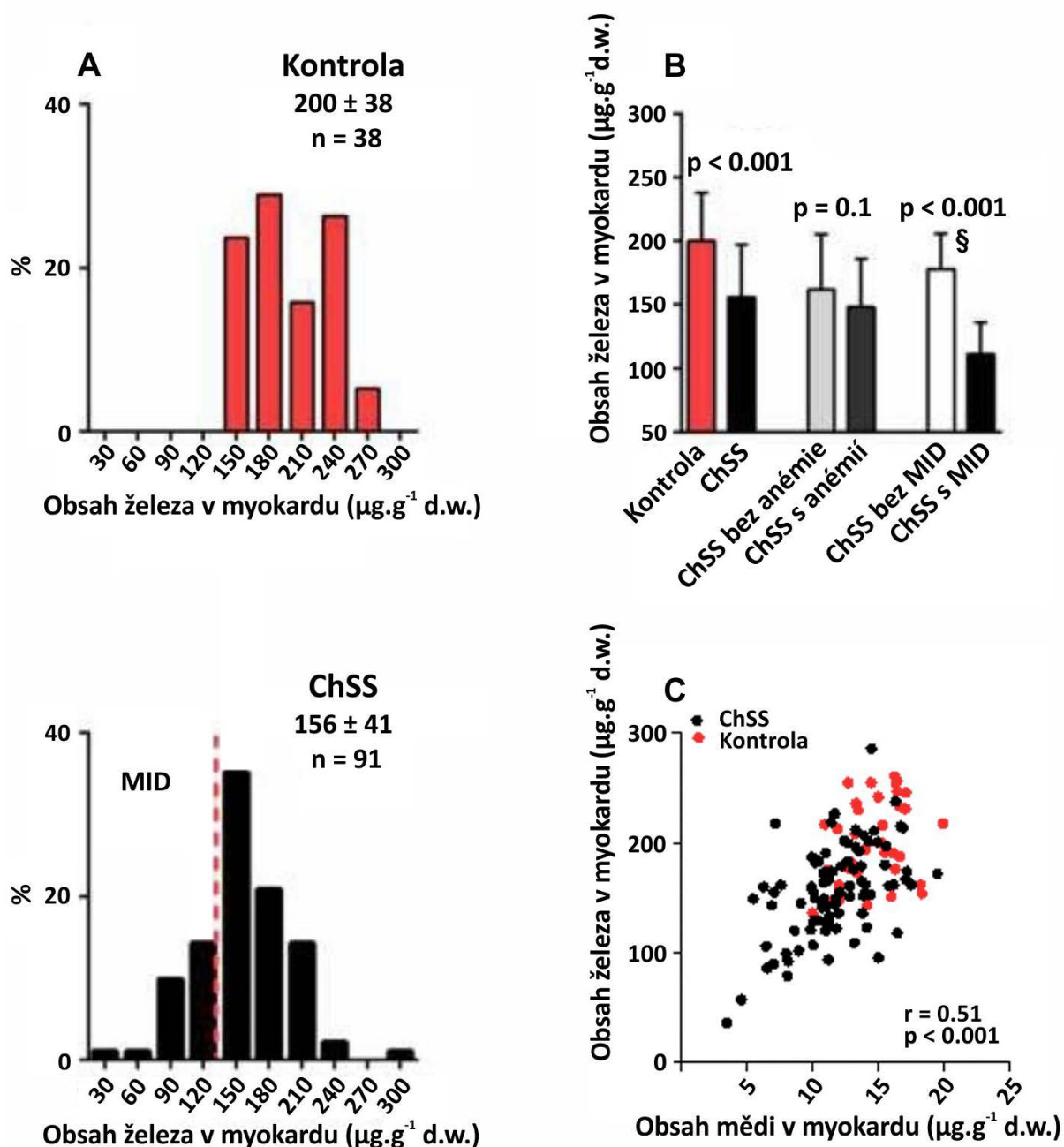
Prvek	CRM TM-15.2			
	Certifikovaná hodnota $\bar{X} \pm 2\sigma$ (μg.l ⁻¹)	Průměrná koncentrace $\bar{X} \pm 2\sigma$ (μg.l ⁻¹)	Výtěžnost (%)	RSD (%)
Fe	26,0 ± 4,7	26,6 ± 2,2	101,6	4,1
Cu	17,3 ± 1,6	17,4 ± 1,1	100,4	3,1
CRM TMDA-64.2				
Fe	306 ± 27,1	308 ± 6	100,6	1,0
Cu	274 ± 24,1	277 ± 10	101,1	1,8

n = 13

6.3.2 Obsah železa a mědi v srdeční svalové tkáni

Validovaná metoda ICP-MS stanovení železa a mědi v biologických tkáních byla aplikována na 129 reálných vzorků srdečních biopsií odebraných během transplantace srdce v IKEMu v Praze. Reálné vzorky byly připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 7.2.2. Kvantitativní ICP-MS analýza prokázala výrazné snížení koncentrace železa a mědi u pacientů s chronickým srdečním selháním. V porovnání s kontrolní skupinou byla celková koncentrace obou kovů v srdeční tkáni ChSS pacientů snížena přibližně o 22 %, a to z 200 ± 38 na 156 ± 41 μg.g⁻¹ pro železo (Obr. 6.1A) a $15,1 \pm 3,9$ na $11,7 \pm 3,1$ μg.g⁻¹ pro měď. Výsledky stanovení železa v srdeční tkáni korespondují s dosud publikovanými menšími studiemi, kdy bylo rovněž pozorováno snížení koncentrace železa u pacientů s ChSS v rozmezí 16-29 % (cit.^{57,58}). Překvapivě, myokardiální deficit železa („myocardial iron deficiency“ – MID) měl jen marginální vztah k přítomnosti anémie u ChSS pacientů a jeho prahová hodnota byla definována *a priori* jako obsah železa $<142,9$ μg.g⁻¹ (Obr. 6.1A). Detailní porovnání celkové koncentrace železa pro kontrolní skupinu a jednotlivé podskupiny pacientů s ChSS je prezentováno na Obr. 6.1B. Z porovnání vyplývá, že i u ChSS pacientů bez MID došlo

k výraznému snížení celkového obsahu železa. Nicméně, pacienti s MID měli delší anamnézu ChSS, nižší dávku betablokátorů a větší rozsah koronární aterosklerózy, v porovnání s pacienty bez MID. Kromě toho koncentrace železa a mědi v srdečním svalu vykazovaly významnou korelaci ($r = 0,51$), která byla silnější v případě výsledků pro ChSS skupinu (Obr. 6.1C).



Obr. 6.1 (A) Distribuce obsahu železa v myokardu ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, d. w.) pro kontrolní (nahore) a ChSS skupinu pacientů (dole), kde přerušovaná čára představuje prahovou hodnotu pro myokardiální deficit železa ($142,9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, d. w.). (B) Zobrazení obsahu železa v myokardu (průměr \pm SD) pro vybrané skupiny ChSS pacientů, § $p \leq 0,001$ vs kontrolní skupina. (C) Korelace obsahu železa a mědi v srdeční svalové tkáni.

Další část experimentální práce byla zaměřena na studium vztahu mezi obsahem železa a mědi v myokardu a funkcí srdečních mitochondrií v kontextu srdečního selhání. Funkce srdečních mitochondrií (stanovení aktivity enzymů citrátového cyklu a dýchacího řetězce, mitochondriální respirace a exprese mitochondriálních proteinů) byla studována výzkumnými skupinami pod vedením doc. RNDr. Jiřího Petráka, Ph.D., RNDr. Tomáše Mráčka, Ph.D. a doc. MUDr. Vojtěcha Melenovského, CSc. (cit.⁷). Výsledky detailního studia funkce srdečních mitochondrií potvrdily, že v důsledku srdečního selhání dochází k prohloubení mitochondriální dysfunkce. Vliv koncentrace železa a mědi v srdeční tkáni na funkci srdečních mitochondrií bude ilustrován na příkladu studia enzymové aktivity. V případě stanovení aktivit mitochondriálních enzymů u pacientů s ChSS bylo zjištěno jejich výrazné snížení. V porovnání s kontrolní skupinou byly aktivity akonitázy, citrátsyntázy, NADH-cytochrom c reduktázy (NCCR), sukcinát-cytochrom c reduktázy (SCCR) a cytochrom c oxidázy (COX) výrazně sníženy, a to konkrétně o -19 % pro akonitázu ($p < 0,001$), -22 % pro citrátsyntázu ($p < 0,001$), -27 % pro NCCR ($p < 0,001$), -27 % pro SCCR ($p < 0,001$) a -33 % pro COX ($p < 0,001$). Přítomnost MID vedla k dalšímu snížení aktivity enzymů citrátového cyklu (akonitázy o -26 % ($p < 0,05$) a citrátsyntázy o -15 % ($p < 0,05$)), přičemž aktivity oxidoreduktáz dýchacího řetězce zůstaly prakticky nezměněny. V případě skupiny pacientů s ChSS byla zjištěna významná korelace mezi obsahem železa a enzymovou aktivitou akonitázy, citrátsyntázy a SCCR. Výsledky korelační analýz pro skupinu pacientů s ChSS jsou uvedeny v Tab. 6.3.

Tab. 6.3 Korelační analýza mezi obsahem železa a aktivitou mitochondriálních enzymů pro skupinu pacientů s ChSS. Převzato z cit.⁷

Enzym	r	p-hodnota
Akonitáza	0,23	0,03
Citrátsyntáza	0,30	0,004
NADH-cytochrom c reduktáza	0,1	0,3
Sukcinát-cytochrom c reduktáza	0,24	0,02
Cytochrom c oxidáza	0,18	0,08

r – Pearsonův korelační koeficient

6.4 Závěr

Prezentovaná studie jako první systematicky zkoumá vztah mezi obsahem železa, mědi a funkcí mitochondrií přímo ve vzorcích srdeční svalové tkáně odebrané kontrolním a ChSS pacientům podstupujícím transplantaci srdce. Validovaná ICP-MS metoda byla využita ke kvantitativnímu stanovení železa a mědi ve 129 reálných vzorcích srdečních biopsií odebraných během transplantace srdce v IKEMu v Praze. V porovnání s kontrolní skupinou, došlo u pacientů s pokročilým ChSS výraznému snížení (~22 %) obsahu železa a mědi, které je spojeno se současným snížením aktivit enzymů citrátového cyklu, mitochondriální respirací, snížením exprese proteinů dýchacího řetězce. Zatímco snížený obsah mědi u pacientů s ChSS byl spojen především se snížením COX dependentní respirace. Kromě toho, přítomnost MID u ChSS pacientů se projevuje ještě výraznějším snížením aktivity klíčových enzymů citrátového cyklu a sníženou expresí tzv. „*ROS-protecting enzymes*“. Přítomnost MID může přispívat k prohloubení mitochondriální dysfunkce spojené se sníženou substrátovou flexibilitou a odolností vůči oxidativnímu poškození reaktivními formami kyslíku.

7. Literatura

- (1) Limbeck, A.; Galler, P.; Bonta, M.; Bauer, G.; Nischkauer, W.; Vanhaecke, F. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 6593-6617.
- (2) Sussulini, A.; Becker, J. S.; Becker, J. S. *Mass Spectrom. Rev.* **2017**, *36*, 47-57.
- (3) Becker, J. S.; Matusch, A.; Wu, B. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *835*, 1-18.
- (4) Pornwilard, M. M.; Weiskirchen, R.; Gassler, N.; Bosserhoff, A. K.; Becker, J. S. *Plos One* **2013**, *8*.
- (5) Luptakova, D.; Pluhacek, T.; Palyzova, A.; Prichystal, J.; Balog, J.; Lemr, K.; Havlicek, V. *Acta virologica* **2017**, *61*, 353-360.
- (6) Pluhacek, T.; Lemr, K.; Ghosh, D.; Milde, D.; Novak, J.; Havlicek, V. *Mass Spectrom. Rev.* **2016**, *35*, 35-47.
- (7) Melenovsky, V.; Petrak, J.; Mracek, T.; Benes, J.; Borlaug, B. A.; Nuskova, H.; Pluhacek, T.; Spatenka, J.; Kovalcikova, J.; Drahota, Z.; Kautzner, J.; Pirk, J.; Houstek, J. *European Journal of Heart Failure* **2017**, *19*, 522-530.
- (8) Pluhacek, T.; Petrik, M.; Luptakova, D.; Benada, O.; Palyzova, A.; Lemr, K.; Havlicek, V. *Proteomics* **2016**, *16*, 1785-1792.
- (9) Latge, J. P. *Clinical Microbiology Reviews* **1999**, *12*, 310-350.
- (10) Tekaia, F.; Latge, J. P. *Current Opinion in Microbiology* **2005**, *8*, 385-392.
- (11) Kuch, M. A. *Medical Mycology* **2006**, *44*, S127-S131.
- (12) Filler, S. G.; Sheppard, D. C. *Plos Pathogens* **2006**, *2*, 1099-1105.
- (13) Tochigi, N.; Okubo, Y.; Ando, T.; Wakayama, M.; Shinozaki, M.; Gocho, K.; Hata, Y.; Ishiwatari, T.; Nemoto, T.; Shibuya, K. *Mediators of Inflammation* **2013**.
- (14) Racil, Z.; Kocmanova, I.; Toskova, M.; Buresova, L.; Weinbergerova, B.; Lengerova, M.; Rolencova, M.; Winterova, J.; Hrnckova, K.; Volfova, P.; Skrickova, J.; Mayer, J. *International Journal of Infectious Diseases* **2011**, *15*, E874-E881.
- (15) Thornton, C. R. *Expert Review of Clinical Immunology* **2014**, *10*, 771-780.
- (16) Carroll, C. S.; Amankwa, L. N.; Pinto, L. J.; Fuller, J. D.; Moore, M. M. *Plos One* **2016**, *11*.
- (17) Strohalm, M.; Strohalm, J.; Kaftan, F.; Krasny, L.; Volny, M.; Novak, P.; Ulbrich, K.; Havlicek, V. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 5458-5462.
- (18) Petrik, M.; Haas, H.; Laverman, P.; Schrettl, M.; Franssen, G. M.; Blatzer, M.; Decristoforo, C. *Molecular Imaging and Biology* **2014**, *16*, 102-108.
- (19) Levin, C. S. *Proceedings of the Ieee* **2008**, *96*, 439-467.
- (20) Chughtai, K.; Jiang, L.; Greenwood, T. R.; Klinkert, I.; van Hove, E. R. A.; Heeren, R. M. A.; Gunde, K. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 1817-1823.
- (21) McDonnell, L. A.; Heeren, R. M. A. *Mass Spectrom. Rev.* **2007**, *26*, 606-643.
- (22) Pol, J.; Strohalm, M.; Havlicek, V.; Volny, M. *Histochem. Cell Biol.* **2010**, *134*, 423-443.
- (23) Potocnik, N. O.; Skraskova, K.; Flinders, B.; Pelicon, P.; Heeren, R. M. A. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 6781-6785.
- (24) Ferreira, C. R.; Wu, L. M.; Vogt, F. G.; Bornancini, E. R.; Cooks, R. G. *Analytical Letters* **2014**, *47*, 91-101.
- (25) Polson, C. J. *Nature* **1950**, *166*, 115-115.
- (26) Maltoni, D.; Maio, D.; Jain, A. K.; Prabhakar, S. *Handbook of Fingerprint Recognition - Second Edition*; Springer: London, 2009.
- (27) Choi, M. J.; McDonagh, A. M.; Maynard, P.; Roux, C. *Forensic Science International* **2008**, *179*, 87-97.
- (28) Hazarika, P.; Russell, D. A. *Angewandte Chemie-International Edition* **2012**, *51*, 3524-3531.
- (29) Xu, L. R.; Li, Y.; Wu, S. Z.; Liu, X. H.; Su, B. *Angewandte Chemie-International Edition* **2012**, *51*, 8068-8072.

- (30) Becue, A.; Moret, S.; Champod, C.; Margot, P. *Biotechnic & Histochemistry* **2011**, *86*, 140-160.
- (31) Bailey, M. J.; Bright, N. J.; Croxton, R. S.; Francese, S.; Ferguson, L. S.; Hinder, S.; Jickells, S.; Jones, B. J.; Jones, B. N.; Kazarian, S. G.; Ojeda, J. J.; Webb, R. P.; Wolstenholme, R.; Bleay, S. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 8514-8523.
- (32) Bradshaw, R.; Bleay, S.; Wolstenholme, R.; Clench, M. R.; Francese, S. *Forensic Science International* **2013**, *232*, 111-124.
- (33) Huynh, C.; Brunelle, E.; Halamkova, L.; Agudelo, J.; Halamek, J. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 11531-11536.
- (34) Ifa, D. R.; Manicke, N. E.; Dill, A. L.; Cooks, G. *Science* **2008**, *321*, 805-805.
- (35) Kaplan-Sandquist, K.; LeBeau, M. A.; Miller, M. L. *Forensic Science International* **2014**, *235*, 68-77.
- (36) Su, B. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**, *408*, 2781-2791.
- (37) Abrego, Z.; Ugarte, A.; Unceta, N.; Fernandez-Isla, A.; Goicolea, M. A.; Barrio, R. J. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 2402-2409.
- (38) Basu, S. *Journal of Forensic Sciences* **1982**, *27*, 72-91.
- (39) Diaz, E.; Sarkis, J. E. S.; Viebig, S.; Saldiva, P. *Forensic Science International* **2012**, *214*, 44-47.
- (40) ASTM. *Standard Guide for Gunshot Residue Analysis by Scanning Electron Microscopy/ Energy—Dispersive Spectroscopy $\epsilon 1$* ; (Reapproved 2001) E 1588-10 Pennsylvania USA, 2010.
- (41) Chang, K. H.; Jayaprakash, P. T.; Yew, C. H.; Abdullah, A. F. L. *Australian Journal of Forensic Sciences* **2013**, *45*, 3-23.
- (42) Dalby, O.; Butler, D.; Birkett, J. W. *Journal of Forensic Sciences* **2010**, *55*, 924-943.
- (43) Taudte, R. V.; Beavis, A.; Blanes, L.; Cole, N.; Doble, P.; Roux, C. *Biomed Research International* **2014**.
- (44) Klener, P. e. a. *Vnitřní lékařství Čtvrté, přepracované a doplněné vydání*; Galén Karolinum: Praha, 2011.
- (45) Nieminen, M. S.; Bohm, M.; Cowie, M. R.; Drexler, H.; Filippatos, G. S.; Jondeau, G.; Hasin, Y.; Lopez-Sendon, J.; Mebazaa, A.; Metra, M.; Rhodes, A.; Swedberg, K.; European Society Inten Care, M. *European Heart Journal* **2005**, *26*, 384-416.
- (46) Neubauer, S. *New England Journal of Medicine* **2007**, *356*, 1140-1151.
- (47) Dai, D. F.; Johnson, S. C.; Villarín, J. J.; Chin, M. T.; Nieves-Cintrón, M.; Chen, T.; Marcinek, D. J.; Dorn, G. W.; Kang, Y. J.; Prolla, T. A.; Santana, L. F.; Rabinovitch, P. S. *Circulation Research* **2011**, *108*, 837-846.
- (48) Doehner, W.; Frenneaux, M.; Anker, S. D. *Journal of the American College of Cardiology* **2014**, *64*, 1388-1388.
- (49) Rensvold, J. W.; Ong, S. E.; Jeevananthan, A.; Carr, S. A.; Mootha, V. K.; Pagliarini, D. J. *Cell Reports* **2013**, *3*, 237-245.
- (50) Xu, W. J.; Barrientos, T.; Mao, L.; Rockman, H. A.; Sauve, A. A.; Andrews, N. C. *Cell Reports* **2015**, *13*, 533-545.
- (51) Klip, I. T.; Comin-Colet, J.; Voors, A. A.; Ponikowski, P.; Enjuanes, C.; Banasiak, W.; Lok, D. J.; Rosentryt, P.; Torrens, A.; Polonski, L.; van Veldhuisen, D. J.; van der Meer, P.; Jankowska, E. A. *American Heart Journal* **2013**, *165*, 575-582.
- (52) Okonko, D. O.; Mandal, A. K. J.; Missouris, C. G.; Poole-Wilson, P. A. *Journal of the American College of Cardiology* **2011**, *58*, 1241-1251.
- (53) Jankowska, E. A.; von Haehling, S.; Anker, S. D.; Macdougall, I. C.; Ponikowski, P. *European Heart Journal* **2013**, *34*, 816-826.
- (54) Anker, S. D.; Colet, J. C.; Filippatos, G.; Willenheimer, R.; Dickstein, K.; Drexler, H.; Luscher, T. F.; Bart, B.; Banasiak, W.; Niegowska, J.; Kirwan, B.; Mori, C.; Rothe, B. V.; Pocock, S. J.; Poole-Wilson, P. A.; Ponikowski, P.; Investigators, F.-H. T. *New England Journal of Medicine* **2009**, *361*, 2436-2448.

- (55) Ponikowski, P.; van Veldhuisen, D. J.; Comin-Colet, J.; Ertl, G.; Komajda, M.; Mareev, V.; McDonagh, T.; Parkhomenko, A.; Tavazzi, L.; Levesque, V.; Mori, C.; Roubert, B.; Filippatos, G.; Ruschitzka, F.; Anker, S. D.; Investigators, C.-H. *European Heart Journal* **2015**, *36*, 657-668.
- (56) Jankowska, E. A.; Rozentryt, P.; Witkowska, A.; Nowak, J.; Hartmann, O.; Ponikowska, B.; Borodulin-Nadzieja, L.; Banasiak, W.; Polonski, L.; Filippatos, G.; McMurray, J. J. V.; Anker, S. D.; Ponikowski, P. *European Heart Journal* **2010**, *31*, 1872-1880.
- (57) Leszek, P.; Sochanowicz, B.; Szperl, M.; Kolsut, P.; Brzoska, K.; Piotrowski, W.; Rywik, T. M.; Danko, B.; Polkowska-Motrenko, H.; Rozanski, J. M.; Kruszewski, M. *International Journal of Cardiology* **2012**, *159*, 47-52.
- (58) Maeder, M. T.; Khammy, O.; dos Remedios, C.; Kaye, D. M. *Journal of the American College of Cardiology* **2011**, *58*, 474-480.

Curriculum vitae

RNDr. Tomáš Pluháček

Datum narození: 14. dubna 1988 Brno, Česká republika
Bydliště: Cihelna II 286, 798 52 Konice

Vzdělání:

2013 – dosud postgraduální studium, obor Analytická chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

2014 státní rigorózní zkouška, obor Analytická chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

2011 – 2013 navazující magisterské studium, obor Analytická chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

2008 – 2011 bakalářské studium, obor Chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Zaměstnání:

prosinec 2013 – dosud Laboratoř charakterizace molekulární struktury, Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4 – Krč, Česká republika, Pozice: Ph.D. student

leden 2015 – dosud Katedra analytické chemie, PřF UP v Olomouci, 17. Listopadu 12, 771 46 Olomouc, Česká republika, Pozice: vědecký pracovník

Studijní pobyty:

srpen - listopad 2015 vědecko-výzkumná stáž na Université de Pau et des Pays de l'Adour, Institut des Sciences Analytiques et de Physico-Chimie pour l'Environnement et les Matériaux IPREM UMR 5254, Pau, Francie (Prof. Dr. Dirk Schaumlöffel)

říjen 2014 Teva Czech Industries s.r.o., Opava, Česká republika

červen 2014 Teva Czech Industries s.r.o., Opava, Česká republika

Odborné vědecké zaměření:

Analytická chemie, hmotnostní spektrometrie malých molekul, hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem, kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií, multimodální zobrazování, analýza klinických, forenzních, farmaceutických a archeologických vzorků

Účast na výzkumných projektech:

- Člen řešitelského týmu projektu GA ČR GAČR P206/12/1150: Vzorkování a účinnost desorpce/ionizace za atmosférického tlaku při hmotnostně spektrometrickém experimentu (2012-2016)
- Člen řešitelského týmu projektu GA ČR GAČR 16-20229S: Multimodální zobrazování (2016-2018)
- Člen řešitelského týmu projektů IGA_PrF_2014031, IGA_PrF_2015020, IGA_PrF_2016016 a IGA_PrF_2017020

Pedagogická činnost:

Vedoucí laboratorních cvičení, matematického semináře, vedoucí bakalářské práce, konzultant diplomové práce

Publikační činnost:

- Pluhacek T., Lemr K., Ghosh D., Milde D., Novak J., Havlicek V.: Characterization of microbial siderophores by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **35** (2016) 35-47.
- Pluhacek T., Hanzal J., Hendrych J., Milde D.: Microwave-assisted digestion using nitric acid for heavy metals and sulfated ash testing in active pharmaceutical ingredients. *Pharmazie*. **71** (2016) 177-180.
- Pluhacek T., Petrik M., Luptakova D., Benada O., Palyzova A., Lemr K., Havlicek V.: *Aspergillus* infection monitored by multimodal imaging in a rat model. *Proteomics* **16** (2016) 1785-1792.
- Melenovsky V., Petrak J., Mracek T., Benes J., Borlaug B. A., Nuskova H., Pluhacek T., Spatenka J., Kovalcikova J., Drahotka Z., Kautzner J., Pirk J., Houstek J.: Myocardial iron content and mitochondrial function in human heart failure: a direct tissue analysis. *European Journal of Heart Failure* **19** (2017) 522-530.
- Novak J., Sokolova L., Lemr K., Pluhacek T., Palyzova A., Havlicek V.: Batch-processing of imaging or liquid-chromatography mass spectrometry datasets and *De Novo* sequencing of polyketide siderophores. *BBA Proteins a Proteomics* **1865** (2017) 768-775.
- Luptakova D., Pluhacek T., Palyzova A., Prichystal J., Balog J., Lemr K., Havlicek V.: Meet interesting abbreviations in clinical mass spectrometry: from compound classification by REIMS to multimodal and mass spectrometry imaging (MSI). *Acta Virologica* **61** (2017) 353-360.
- Pauk V., Pluhacek T., Havlicek V., Lemr K.: Ultra-high performance supercritical fluid chromatography-mass spectrometry procedure for analysis of monosaccharides from plant gum binders. *Analytica Chimica Acta*, doi.org/10.1016/j.aca.2017.07.036.

Prezentace na konferencích:

- Pluháček T., Milde D., Kuba M., Gallo J.: Determination of selected metals in clinical samples after joint replacement surgeries, poster, 65th Congress of the Slovak and Czech Chemical Society, 9.-13. 9. 2013, Vysoké Tatry, Slovensko. Book of abstracts, page 154, ISSN 1336-7242.
- Pluháček T., Milde D., Lemr K., Havlíček V.: Mass spectrometry as a tool for determination of fungal siderophores, poster, European Symposium on Atomic Spectrometry ESAS 2014, 16.-21. 3. 2014, Hotel Diplomat, Praha, Česká republika. Book of abstracts, page 218, ISBN 978-80-905704-1-2.
- Pluhacek T., Luptakova D., Petrik M., Milde D., Havlicek V.: Bioimaging of ferriforms of siderophores in lung tissues by LA-ICP-MS, poster, 4th Conference of the Czech Mass Spectrometry Society, 15.-17. 4. 2015, Hradec Králové, Česká republika. Book of abstracts, page 76, ISBN 978-80-905045-4-7.
- Pluhacek T., Petrik M., Novak J., Lemr K., Havlicek V.: Bioimaging of ferriforms of aspergillus siderophores in murine lung tissues, poster, 19th ISHAM Conference, 4.-8. 5. 2015, Melbourne, Austrálie.
- Pluhacek T., Petrik M., Milde D., Havlicek V.: Bioimaging of ferriforms of siderophores in lung tissues by LA-ICP-MS, poster, 33rd Informal Meeting on Mass Spectrometry, 10.-13.5 2015, Szczyrk, Polsko. Book of abstracts, page 116, ISBN 978-83-940417-1-7.
- Pluhacek T., Luptakova D., Petrik M., Milde D., Havlicek V.: Bioimaging of ferriforms of siderophores in lung tissues by LA-ICP-MS, poster, Kurz ICP-MS/OES 2015, 26.-28. 5 2015, Brno, Česká Republika. Book of abstracts, ISBN 978-80-905704-3-6.
- Pluhacek T., Hanzal J., Hendrych J., Milde D.: Heavy metals and sulfated ash testing: an alternative approach, poster, European Symposium on Atomic Spectrometry ESAS 2016, 31.3-2.4. 2016, Eger, Maďarsko. Book of abstracts, page 133, ISBN 978-963-9970-65-6.
- Pluhacek T., Petrik M., Luptakova D., Benada O., Palyzova A., Lemr K., Havlicek V.: High resolution imaging of *Aspergillus fumigatus* infection, poster, 5th Conference of the Czech Mass Spectrometry Society, 13.-15.4. 2016, České Budějovice, Česká republika. Book of abstracts, page 59, ISBN 978-80-905045-6-1.
- Pluhacek T., Prichystal J., Luptakova D., Benada O., Havlicek V.: Fiducial markers for multimodal imaging, poster, 5th Conference of the Czech Mass Spectrometry Society, 13.-15.4. 2016, České Budějovice, Česká republika. Book of abstracts, page 59, ISBN 978-80-905045-6-1.
- Pluhacek T., Prichystal J., Luptakova D., Benada O., Havlicek V.: Fiducial markers for multimodal imaging. oral presentation, 34th Informal Meeting on Mass Spectrometry, 15.-18. 5. 2016, Fiera di Primiero, Itálie. Book of abstracts, page 52, ISBN 976-88-89884-31-7.