



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

ANALÝZA ZUBŮ A KOSTÍ METODOU SPEKTROSKOPIE LASEREM BUZENÉHO PLAZMATU

ANALYSIS OF TEETH AND BONES BY LASER-INDUCED BREAKDOWN SPECTROSCOPY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Anna Šindelářová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Pavlína Modlitbová, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1626/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Anna Šindelářová**
Studijní program: Spotřební chemie
Studijní obor: Spotřební chemie
Vedoucí práce: **Ing. Pavlína Modlitbová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Analýza zubů a kostí metodou spektroskopie laserem buzeného plazmatu

Zadání diplomové práce:

V teoretické části bude sepsána literární rešerše zabývající se metodou spektroskopie laserem buzeného plazmatu, instrumentací metody, a bude doplněna přehledem dostupné vědecké literatury k analýze kostí a zubů právě touto metodou.

V experimentální části bude provedena série LIBS experimentů vedoucích k získání prostorové distribuce vybraných prvků v zubech a kostech.

Termín odevzdání diplomové práce: 28.5.2021:

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

Bc. Anna Šindelářová
student(ka)

Ing. Pavlína Modlitbová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Předložená diplomová práce se zabývá studiem prvkového složení tvrdých tkání – lidských zubů a myších čelistí metodou spektroskopie laserem buzeného plazmatu (LIBS). Vzorčky lidských zubů obsahovaly onemocnění zvané ankylóza a byl zde sledován rozdíl v prvkovém složení mezi zdravou a nemocnou tkání s cílem lokalizace ankylózy v zubu. Při vyhodnocení map prostorové distribuce fosforu a vápníku bylo zjištěno, že v oblasti ankylózy dochází k poklesu koncentrace těchto dvou prvků. Dále byly analyzovány myší čelisti s obsahem olova. Při posouzení prostorové distribuce ukládání olova v tkáni, bylo zjištěno, že olovo má tendenci se v myších zubech ukládat ve sklovině na špičce řezáku a ve stoličkách. Závěrem této diplomové práce bylo, že metoda LIBS dosahuje při detekci prvkového složení tvrdých tkání dobrých výsledků; umožňuje rozlišit různé části zubu z hlediska prvkového složení i tvrdosti tkáně a také je pomocí této metody možné detekovat změny ve složení vlivem onemocnění či bioakumulace těžkých kovů.

ABSTRACT

The presented diploma thesis deals with the elemental composition of hard tissues – human and murine jaws studied by laser-induced plasma spectroscopy (LIBS). Samples of human teeth contained a disease called ankylosis and the difference in elemental composition of healthy and diseased tissue was observed to localize ankylosis in the tooth. When evaluating the map of the spatial distribution of phosphorus and calcium, a decrease in the concentration of these elements in the ankylosis infected area was observed. Furthermore, murine jaws containing lead were analyzed. When assessing the spatial distribution of lead in tissue, it was found that lead was incorporated in murine teeth in the enamel at the tip of the incisor and molars. In conclusion, LIBS method achieved good results considering the detection of the elemental distribution of hard tissues. It enables to differentiate parts of the tooth in terms of elemental composition and tissue hardness and also to detect changes in the matrix caused by a disease or bioaccumulation of heavy metals.

KLÍČOVÁ SLOVA

ankylóza, bioakumulace těžkých kovů, mapování prvkového složení, olovo, spektroskopie laserem buzeného plazmatu, zuby

KEYWORDS

ankylosis, bioaccumulation of heavy metals, mapping of elemental distribution, lead, laser-induced breakdown spectroscopy, teeth

ŠINDELÁŘOVÁ, Anna. *Analýza zubů a kostí metodou spektroskopie laserem buzeného plazmatu*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/133032>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Pavlína Modlitbová.

PROHLÁŠENÍ:

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

.....
Anna Šindelářová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí své diplomové práce, Ing. Pavlíně Modlitbové, Ph.D., za její odborné vedení, cenné rady a čas, který mi věnovala při konzultacích a opravách. Také bych chtěla poděkovat doc. Ing. Pavlu Pořízkovi, Ph.D. za jeho pomoc s vyhodnocením dat, Ing. Davidu Prochazkovi, Ph.D. za jeho pomoc s měřením a doc. RNDr. Marcele Buchtové, Ph.D. a jejímu týmu z AVČR za přípravu a konzultaci vzorků. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat i své rodině, přátelům a kamarádům za podporu, kterou mi během studia poskytovali.

OBSAH

1 ÚVOD	6
2 TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1 Optická emisní spektrometrie.....	7
2.2 Princip laseru	7
2.3 Spektroskopie laserem buzeného plazmatu	9
2.4 Mapování prvkového rozložení v biologických tkáních metodou LIBS.....	21
2.5 Mapování prvkového rozložení v biologických tkáních dalšími technikami.....	22
2.6 Zuby.....	23
2.7 Prostorově rozlišená analýza zubů	28
3 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	29
3.1 Analýza zubních tkání metodou LIBS	29
3.2 Prostorová analýza lidských zubů metodou LIBS.....	30
3.3 Prostorová analýza zvířecích tvrdých tkání metodou LIBS	32
3.4 Kvantitativní analýza zubů a kostí metodou LIBS.....	34
3.5 Shrnutí poznatků z literatury	35
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
4.1 Použité materiály	36
4.2 Použité přístroje a software	36
4.3 Pracovní postup	36
4.4 LIBS experimenty	38
4.5 Zpracování dat	42
5 VÝSLEDKY A DISKUSE.....	44
5.1 Optimalizace atmosféry měření.....	44
5.2 Lidské zuby s ankylozou	45
5.3 Myši čelisti	56
6 ZÁVĚR	61
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	62
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	73
8.1 Seznam použitých zkratk	73
8.2 Seznam použitých symbolů.....	74
9 PŘÍLOHY.....	75

1 ÚVOD

Tvrdé tkáně, kosti a zuby, jsou biotické matrice tvořené především hydroxyapatitem. Studium jejich prvkového složení umožňuje identifikaci chorobných stavů, jako jsou zubní kazy a další patologická onemocnění zubní matrice, z lokální změny prvkového zastoupení v porovnání se zdravou tkání. Tvrdé tkáně také poskytují cenné informace v archeologii a antropologii, ze kterých lze vyvodit způsob života studovaných jedinců, z nichž vzorky pochází. Na základě analýzy kontaminace těžkými kovy je možná i klasifikace jedinců z hlediska věku, zdraví a místa původu. Je proto důležité znát prvkové prostorové rozložení těchto tkání. To umožňuje několik analytických metod, jednou z nichž je spektroskopie laserem buzeného plazmatu.

Spektroskopie laserem buzeného plazmatu (LIBS, z anglického *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*) je perspektivní analytická metoda, která poskytuje informaci o prvkovém složení vzorku jakéhokoli skupenství. Funguje na principu detekce emisního záření z plazmatu, které se vytvoří po dopadu laserového pulzu na povrch vzorku. Je to rychlá, jednoduchá a citlivá technika, kterou lze sestavit mapy prostorové distribuce prvků v analyzovaném vzorku. V několika studiích zaměřených na tvrdé tkáně tato metoda již použita byla, avšak ve srovnání s mapováním měkkých biologických vzorků (např. ledvin) je zde velký prostor pro další výzkum a posouvání limitů měření prostorové distribuce prvků, jak z hlediska dosaženého prostorového rozlišení, tak i vyhodnocování získaných výsledků a vizualizace map.

Cílem této práce je tedy seznámit se hlouběji s teoretickými a praktickými aspekty metody LIBS a dále uskutečnit sérii LIBS experimentů vedoucí k dosažení 2D map prostorové distribuce vybraných prvků v kostech a zubech. Studovány budou dvě skupiny vzorků tvrdých tkání – obsahující onemocnění a obsahující kontaminanty. Použití metody LIBS v mapování těchto vzorků bude posouzeno na základě dosaženého prostorového rozlišení a schopnosti detekovat změny ve složení tkáně.

Tato diplomová práce je rozdělena na pět částí. V první části jsou uvedeny teoretické základy vysvětlující princip optických emisních spektroskopických metod, mezi něž patří i metoda LIBS. Jedním ze zdrojů excitace u těchto metod je laser, který je v LIBS stěžejní částí, zde je tedy dále vysvětlen jeho princip. Poté je popsáno, jak funguje spektroskopie laserem buzeného plazmatu, instrumentace a mapování touto metodou. Také zde uvádím teoretické základy stavby lidských a myších tvrdých tkání. Ve druhé části je shrnutá současná literatura týkající se mapování a detekce prvkového prostorového rozložení metodou LIBS v tvrdých tkáních. V další části je popsáno, jaké vzorky byly studovány, způsob jejich přípravy a postup měření. V předposlední části jsou uvedeny a diskutovány výsledky, v závěru je poté shrnuto, čeho bylo dosaženo v této diplomové práci.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Optická emisní spektrometrie

Optická emisní spektrometrie (OES, z anglického *Optical Emission Spectrometry*) jinak též atomová emisní spektrometrie (AES, z anglického *Atomic Emission Spectrometry*) je jednou ze základních metod kvalitativní a kvantitativní analýzy prvkového složení pevných, kapalných i plynných vzorků. Tato analytická technika se používá k detekci hladin různých chemických látek a stopových prvků (např. v monitoringu životního prostředí), v metalurgii má významné využití při řízení výroby surovin a kontrolování hotových výrobků [1].

Metoda OES je založena na principu detekce elektromagnetického záření emitovaného při deexcitaci atomů látky. Zaznamená se spektrum, které má čárový charakter a je charakteristické pro každý prvek. V praxi je nutné vzorek nejprve rozpustit/roztavit, odpařit a atomizovat, aby mohlo dojít k oddělení a excitaci atomů. Kapalně vzorky se rozprašují a pomocí proudícího plynu se přenášejí do zdroje excitace, kde se rozdělí na jednotlivé atomy. Pevné vzorky mohou být ablatovány nebo také přímo odpařovány a excitovány jiskrou mezi elektrodami či laserovým pulzem. K samotné excitaci může sloužit plamen, plazma, laser, elektrický oblouk či jiný zdroj vysoké energie. Tyto vysokoteplotní budící zdroje poskytují dostatečnou energii k vybuzení elektronů do vyšších energetických hladin. Podle použitých budících zdrojů se rozlišují jednotlivé typy optické emisní spektroskopie, například plamenová fotometrie, plazmová spektrometrie a další [2].

Při následné deexcitaci dochází k přechodu z vyššího kvantového stavu do nižšího vyzařováním elektromagnetického záření o charakteristické vlnové délce. Z tohoto záření je poté možné určit, o jaký prvek se jedná, na základě hodnoty vlnové délky dané emisní čáry. Tomu, v jaké míře je daný prvek ve vzorku zastoupený, pak následně odpovídá intenzita této spektrální čáry. Výsledné spektrum je čárové, přičemž počet čar pro daný prvek se zvyšuje s počtem elektronů obsažených v jeho valenčních hladinách. Při analýze metodou optické emisní spektrometrie se využívá rozsah vlnových délek 110–900 nm [3].

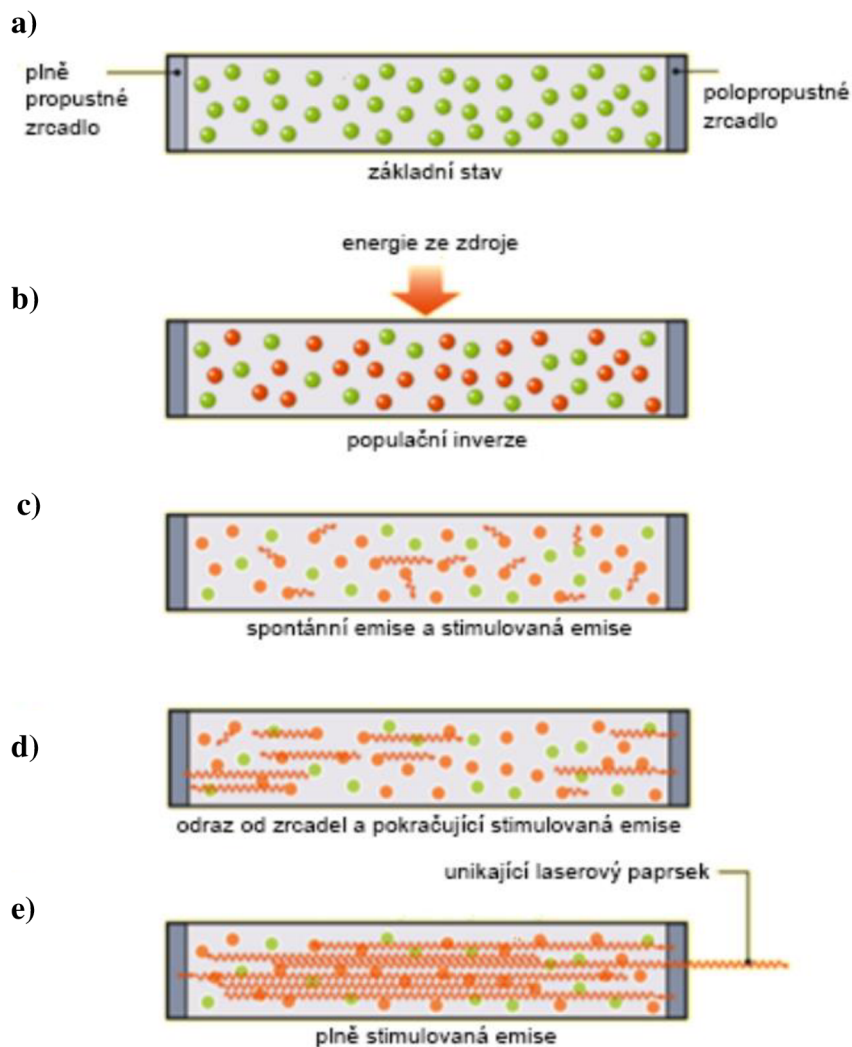
2.2 Princip laseru

Laser (akronym z anglického *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) je kvantový generátor světla, které generuje pomocí optického zesílení založeného na stimulované emisi elektromagnetického záření. V roce 1916 jeho existenci předpověděl Albert Einstein, když teoreticky popsal jev stimulované emise. O 38 let později (1954) byl sestaven první předchůdce laseru – maser (akronym z anglického *Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) týmem vědců Townese, Basova a Prochorova, kteří za svou práci o deset let později dostali Nobelovu cenu. Americký fyzik Theodore H. Maiman poté v roce 1960 vynalezl první funkční laser. Od té doby se technologie laserů velmi posunula a začala využívat v našem každodenním životě [4].

Laser pracuje podobně jako maser, ale na rozdíl od mikrovlnného generuje elektromagnetické záření. Jeho princip je založený na excitaci aktivního prostředí, látky obsahující oddělené kvantové energetické hladiny elektronů, zdrojem energie. Tím může být elektrický výboj, exotermní chemická reakce či vysokoenergetické záření. Elektrony poté absorbují energii ze zdroje a excitují se na horní energetickou hladinu. To je pro ně energeticky

nevýhodné, a proto se následně vrací na pracovní hladinu a spontánně emitují fotony. Pokud kolem excitovaného atomu projde foton o určité frekvenci, která odpovídá rozdílu energií mezi excitovaným a základním stavem atomu, pak atom deexcituje do základního stavu za současného vyzáření druhého fotonu. Výsledkem jsou tedy 2 fotony o stejné frekvenci, čímž se dopadající záření zesílí. Takto dojde k lavinovému efektu a vznikající fotony se vždy pohybují stejným směrem. Pro stabilní fungování laseru je klíčovým jevem inverze populace. K té dochází, pokud se systém nachází ve stavu, při kterém je více částic ve vyšších excitovaných stavech než polovina částic ve stavu základním [4]. K tomu je zapotřebí kontinuální zdroj energie, pokud je přísun energie přerušovaný, výsledkem je laserový pulz [5].

V komoře se nachází optický rezonátor, což je soustava dvou rovnoběžných zrcadel kolmých na osu laseru, které mezi sebou odráží záření průchodem přes aktivní látku a navyšují tak jeho intenzitu. Jedno ze zrcadel je polopropustné a druhé nepropustné. Při dosažení dostatečné intenzity může záření přes polopropustné zrcadlo procházet ven z komory (Obrázek 1). Vzniklý laserový paprsek je monochromatický, vysoce koherentní a je schopen se šířit na velké vzdálenosti bez velkých odchylek.



Obrázek 1. Proces generace laserového záření. Převzato a upraveno z Williams a kol. [5].

Laserová zařízení se v současnosti používají v širokém spektru aplikací od operací v medicíně, zbraní ve vojenství, obrábění a svařování v průmyslu po tiskárny a laserové skenery ve spotřební elektronice. Ve výzkumu se lasery uplatňují v mnoha analytických metodách jako zdroj vysoké energie, mezi ty nejznámější patří laserová interferometrie, fluorescenční mikroskopie, hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS, z anglického *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry*) a laserová ablace s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (LA-ICP-MS, z anglického *Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) a také spektroskopie laserem buzeného plazmatu.

2.3 Spektroskopie laserem buzeného plazmatu

Spektroskopie laserem buzeného plazmatu, v minulosti také označovaná zkratkou LIPS (z anglického *Laser-Induced Plasma Spectroscopy*), je optická emisní analytická metoda. Na rozdíl od konvenčních spektroskopických metod není vzorek dopravován do zdroje plazmatu, ale naopak se plazma, díky přesně zaměřeným laserovým pulzům, tvoří přímo na jeho povrchu [6]. Ke vzniku metody LIBS došlo v 60. letech a to krátce po tom, co byl podrobně popsán laser [7]. Významný vývoj u ní však nastal až na začátku 80. let 20. století, a to zejména díky tomu, že se začaly vyrábět moderní lasery Nd:YAG s vyšší výkonností a detektory s nábojovou vazbou (CCD, z anglického *Charged Coupled Device*) [8]. Neustálý vědecký pokrok jak v laserové technologii, tak i v pochopení procesů, ke kterým dochází v plazmatu, umožňuje použití LIBS jako spolehlivé, rychlé a citlivé metody v rozšiřující se škále analytických aplikací [9]. Jedná se o kvalitativní i kvantitativní metodu, avšak kvůli obtížné přípravě setů kalibračních vzorků a různým nežádoucím jevům, ke kterým v plazmatu dochází, se metoda LIBS používá nejčastěji pouze pro semikvantitativní stanovení prvkového složení vzorku.

2.3.1 Princip metody

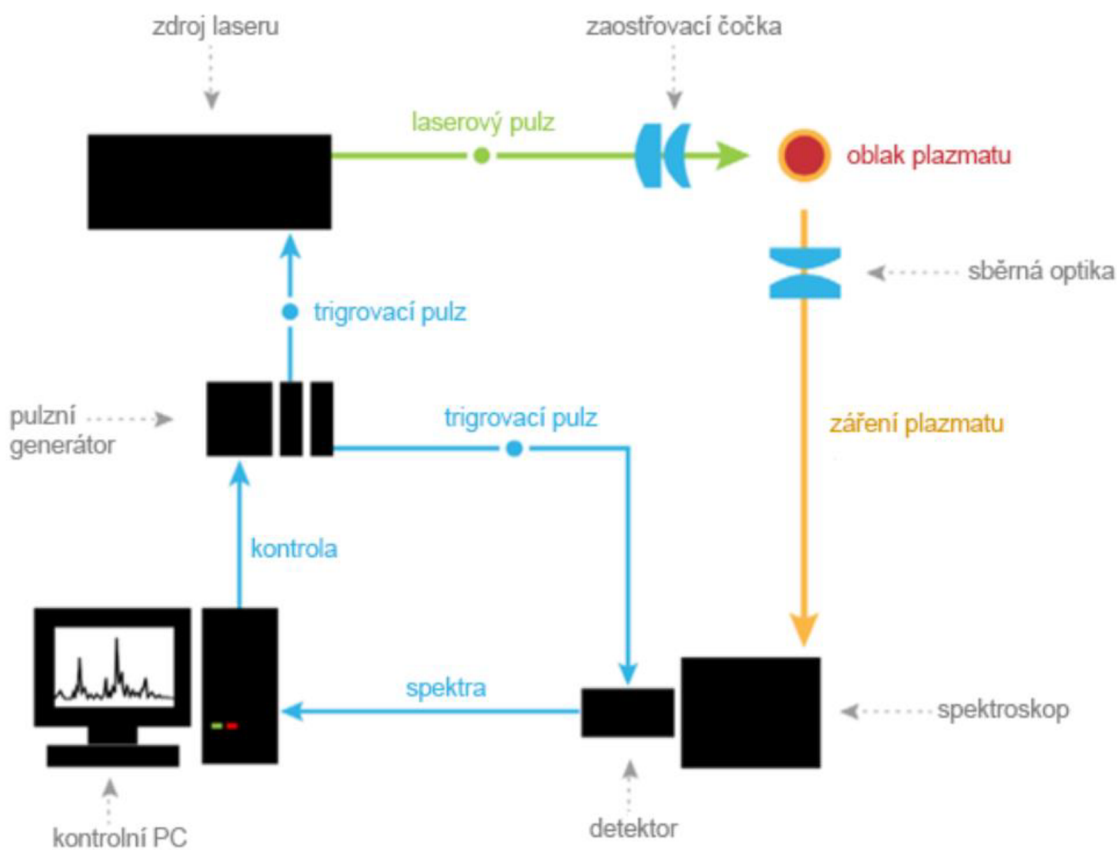
Metoda LIBS je založená na principu laserové ablace a tvorby plazmatu. Vysokoenergetické laserové pulzy jsou pomocí zaměřovací optiky namířeny na povrch vzorku, čímž se malé množství vzorku odpaří a vznikne kráter obvykle s průměrem v jednotkách až stovkách mikronů. Tento jev se souhrnně označuje jako laserová ablace [7]. Ablatovaná hmota stlačuje okolní atmosféru a vede k tvorbě rázové vlny (odtud *breakdown* v názvu metody). Během tohoto procesu dojde k prudkému ohřevu vzorku, což má za následek tání a intenzivní odpařování materiálu. Chemické vazby se ruší a vzorek je atomizován a ionizován. Částice absorbují energii a tvoří se plazma, které se poté rozpíná nad povrchem vzorku jako oblak částic obsahující elektrony, ionty a neutrální částice. Elektronová hustota plazmatu přibližně odpovídá 10^{17} – 10^{20} cm⁻³, teplota je 10^3 – 10^4 K a jeho velikost dosahuje až několika milimetrů, tyto vlastnosti však závisí především na tlaku a energii laserového pulzu [8].

Atomy a ionty excitované na vyšší energetické hladiny jsou v energeticky nevýhodném stavu a po krátké době mají tendenci se vracet do základního stavu. Přitom dochází k emitování záření, které představuje specifickou elementární odezvu [7]. Stejně jako u jiných optických emisních metod se toto záření detekuje externími optickými systémy a dále analyzuje pomocí spektrometru s intenzifikovaným CCD čipem (ICCD, z anglického *Intensified Charged Coupled Device*). Výstupem je spektrum s charakteristickými vlnovými délkami, které

odpovídají prvkovému složení studovaného vzorku. Každý prvek přítomný v matici má odpovídající emisní čáry a jejich intenzity souvisejí s množstvím daného prvku ve vzorku.

2.3.2 Instrumentace

Vysokoenergetický laserový paprsek je zaostřen přes zaostřovací optiku na vzorek. Zaostřovací optika může být jednoduchá, ve formě čočky, nebo komplexnější, např. objektivy schopné homogenizovat laserový paprsek nebo optická vlákna, která se používají především při dálkové analýze. Vyzařované světlo je detekováno a přes sběrnou čočku směřováno do optického vlákna. Tím je poté vedeno do spektrometru s monochromátorem a z toho dále do detektoru. V detektoru je záření zpracováno na signál a v podobě spekter, kde je každé vlnové délce přiřazena určitá intenzita záření, se informace ukládá (Obrázek 2).



Obrázek 2. Schéma typické měřicí aparatury LIBS. Převzato a upraveno z Novotný a kol. [8].

Laser

Použití laseru v metodě LIBS zajistí vysokou plošnou hustotu výkonu, nazývanou irradiance, v podobě proudu fotonů na malou plochu, čímž může dojít k požadovanému odpaření, atomizaci a excitaci materiálu. Při kombinaci laseru s pulzním generátorem lze vysílat místo kontinuálního koherentního laserového paprsku časově ohraničené laserové pulzy. Generátor pulzů (Q-switch) doplňuje laserovou komoru o další prvek, který nejprve nedovoluje laserovému záření vůbec projít. Tím se v rezonátoru postupně zvyšuje inverze a v požadovanou chvíli je průchod otevřen. Dojde k vyzáření vysokoenergetického pulzu a průchod je opět uzavřen. Laserové pulzy mají většinou dobu trvání v řádu ns až ps, z toho nanosekundové lasery jsou v LIBS analýze nejvíce používané.

V poslední době se čím dál častěji používají i femtosekundové lasery, které umožňují eliminovat přenos tepla napříč vzorkem a předejít stínění laserového paprsku oblakem plazmatu. Ke stínění u femtosekundových laserů nedochází, protože je laserový paprsek velmi rychlý a k tvorbě samotného plazmatu dochází až po přerušení laserového pulzu. Díky tomu lze významně zlepšit reprodukovatelnost analýzy [9].

Ve spektroskopii laserem buzeného plazmatu se nejčastěji používají lasery v pevné fázi, např. Nd:YAG či rubínový laser, a plynové lasery, jako CO₂ a excimerový. Vhodnost jejich použití se posuzuje podle požadované aplikace z hlediska vlnové délky, délky laserových pulzů a provozní charakteristiky [6]. Například u pevných a kompaktních vzorků, jako keramika, nerosty a kovy, je vhodné použít laser s vlnovou délkou v ultrafialové (UV, z anglického *Ultraviolet*) oblasti. Naopak u vzorků s vysokým obsahem vody by při použití UV a infračerveného (IR, z anglického *Infrared*) laseru mohlo docházet k samoabsorpci, a proto bude lepší použít laserový paprsek z viditelné oblasti [10].

V praxi je běžně používaný laser na bázi polovodiče Nd:YAG. Jeho základní vlnová délka je 1 064 nm, ale používá se také při 532 a 266 nm za současného použití generátoru harmonické frekvence, trvání jeho pulzů se běžně pohybuje mezi 5 až 10 ns [6]. Dále se z laserů v pevné fázi využívá rubínový laser se základní vlnovou délkou 693 nm a délkou pulzu 20 ns.

Z plynových laserů jsou to často CO₂ o základní vlnové délce 22,6 pm a délce trvání pulzu 100 ns, ty mají vysokou účinnost a jsou vhodné pro průmyslové aplikace [6]. Dusíkový laser o vlnové délce 337 nm je kompaktní a disponuje krátkými pulzy o délce trvání 30 ps až 10 ns [6]. Tyto lasery umí vyprodukovat vysokou energii za krátké časové období (několik nanosekund). Kvůli nízké UV odrazivosti u většiny kovů se v poslední době rozšířilo používání excimeru o vlnové délce 193 nm a délce pulzu 10–20 ns. Ten totiž umožňuje vysoké optické rozlišení při relativně krátké vlnové délce [6].

Spektrometr

Spektrometry umožňují rozklad světla podle vlnové délky na disperzním prvku, kterým může být optický hranol či difrakční mřížka. Záření prochází přes čočku zvanou kolimátor, kde se uspořádá do rovnoběžného svazku, do monochromátoru. Tam se rozdělí na jednotlivé vlnové délky a dále putuje na druhou čočku, která svazek zamíří na výstupní šterbinu. Zde může být přidán filtr, který propustí pouze některé vlnové délky [11]. Na spektrometry jsou kladeny vysoké nároky z hlediska propustnosti, rozlišení a spektrálního rozsahu, na kterém jsou schopny pracovat. Nejčastější typy spektrometrů používaných u metody LIBS jsou Echelle a Czerny-Turner (Cz-T) v kombinaci s ICCD detektorem.

Echelle většinou detekuje celá spektra od 200 do 900 nm s relativně dobrým rozlišením, a je proto vhodný na detekci několika prvků zároveň [8, 12]. Vstupní šterbina ve spektrometru Echelle je obvykle 50 μm, což snižuje množství světla, které účinně dosáhne difrakční mřížky, a tak omezuje jeho citlivost. Kromě toho musí spektrometry Echelle číst celý obraz zařízení s vazbou na náboj (CCD), aby získaly spektrum, což má za následek zvýšení doby odečtu a snižuje rychlost snímání a provozní rychlost pouze na několik Hz.

Spektrometr Cz-T snímá omezené spektrální okno, přičemž dosahuje vyšší citlivosti a rozlišení. Rozsah u spektrometru typu Czerny-Turner závisí na hustotě použité difrakční mřížky [8], například pokud je hustota šterbin 1 200 na milimetr, pak je velikost spektrálního okna zhruba 25 nm.

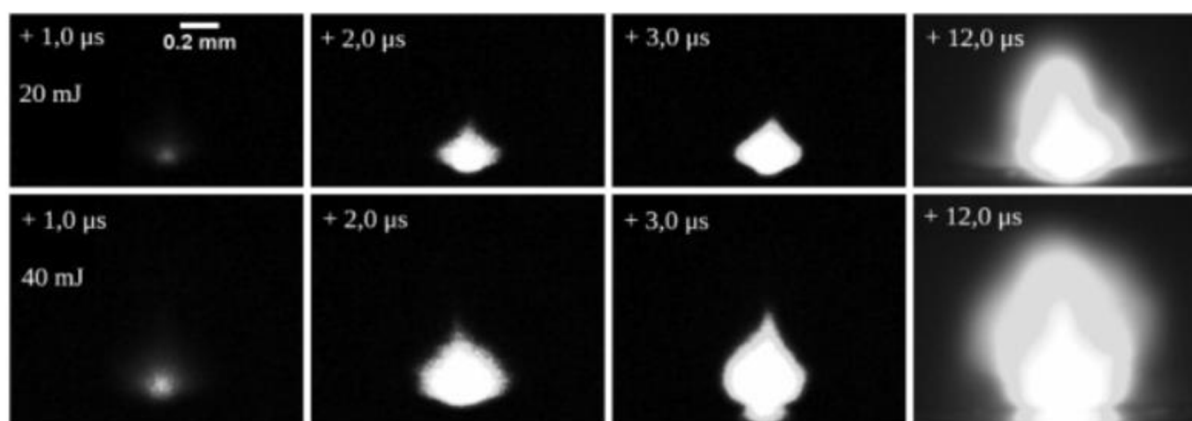
Rozmezí vlnových délek od 200 nm do 900 nm obsahuje atomové emisní čáry většiny chemických prvků z periodické tabulky a jsou zde pozorovány nejintenzivnější přechody [11]. Toto rozmezí zahrnuje blízkou ultrafialovou, viditelnou (VIS, z anglického *Visible*) i blízkou infračervenou oblast záření. Blízká ultrafialová oblast má rozsah 185–400 nm, zde se v biologických aplikacích nejčastěji sledují: hořčík (Mg II 279,55; Mg I 285,21 nm) a vápník (Ca II 317,96; 373,69; 393,37 nm). V oblasti VIS (400 až 700 nm) se detekuje většina spektrálních čar, příklady často detekovaných piků z biologických aplikací jsou vápník (Ca I 422,67 nm) sodík (Na I 589,00; 589,59 nm). Blízká infračervená oblast (700–900 nm) se v metodě LIBS používá například pro analýzu draslíku (K I 766,49; 769,89 nm).

Detektor

Jako detektory se používají fotonásobiče (PMT, z anglického *Photomultiplier Tube*) či fotodiodové pole (PDA, z anglického *Photodiode Array*). Fotonásobič je umístěn za výstupní štěrbinou disperzního prvku a úměrně s intenzitou dopadajícího záření produkuje proud. Pro správné fungování je však třeba použít komplikovanou instrumentaci. Pro analýzu více prvků současně jsou vhodné PDA, které jsou v metodě LIBS často využívány. V posledních letech však získávají větší popularitu i zobrazovací CCD kamery, které poskytují rychlé a přesné měření, dokonce třikrát citlivější než PDA. Lze je časově omezit tak, aby izolovaly časové intervaly během vývoje plazmatu, což se dá využít v různých aplikacích [12].

2.3.3 Proces laserové ablace

Po odpaření vzorku se hmota vlivem vysoké energie atomizuje. Elektronů trojnými srážkami nabývají další energie a společně s dalšími nabitými částicemi jsou urychlovány elektrickým polem iontů, což se projevuje emisí brzděného záření [13]. Zvyšováním energie a termalizací elektronů je umožněna další ionizace až postupně dochází k lavinové ionizaci a plazma expanduje do okolí (Obrázek 3). Tento děj společně s multifotonovými procesy vede k optickému průrazu atmosféry doplněné rázovou vlnou a zvukovým efektem v podobě slyšitelného prasknutí [13].



Obrázek 3. Porovnání časového vývoje růstu plazmatu pro energii 20 a 40 mJ na oceli. Převzato z Buday a kol. [14].

Zvyšováním hustoty nabitých částic dojde k vytvoření a postupnému rozpínání oblaku plazmatu a stínění laserového paprsku. Ten poté nedosáhne až na vzorek a k ablaci dochází zprostředkovaně přes plazma. Oblak plazmatu, který rychle expanduje s dostatečným množstvím elektronů, může absorbovat významnou část laserového pulzu přes inverzní brzdovou absorpci (*inverse Bremsstrahlung*) [15].

2.3.4 Plazma

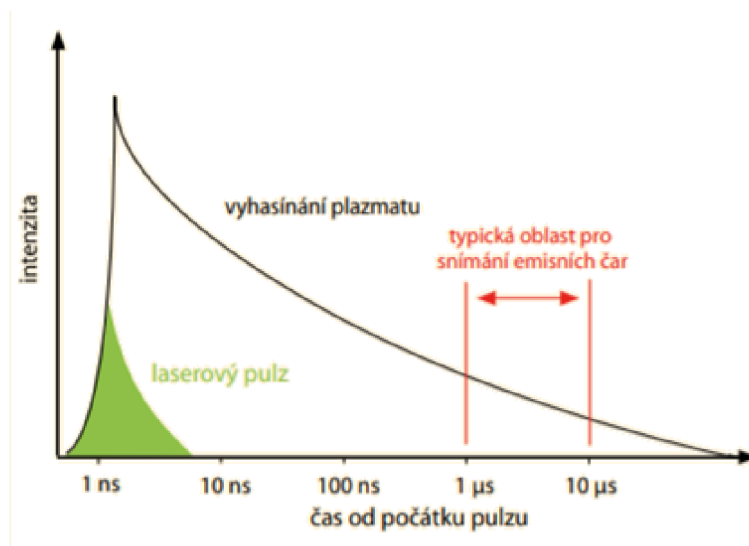
Vlastnosti plazmatu

Plazma se často označuje jako 4. skupenství hmoty a skládá se jak z volných nosičů elektrického náboje: elektronů, kladných a záporných iontů, tak i z neutrálních molekul [16]. Je definované jako kvazineutrální ionizovaný plyn, jehož částice vykazují kolektivní chování. Kvazineutrální znamená, že v celém objemu plazmatu je počet záporně a kladně nabitých částic stejný (jejich náboj se vyruší a výsledek je neutrální), zatímco v bezprostřední blízkosti částic to tak není. Na jakou vzdálenost to platí, určuje Debeyova délka λ_D . Plazma je vodivé. Projev jeho kolektivního chování je, že jako celek reaguje na globální elektrické a magnetické pole a také je umí generovat [16].

Doba života plazmatu

Plazma může být generované po dosažení prahové hodnoty rozpadu, která je kvalitativně definovaná jako minimální ozáření potřebné k vytvoření viditelného plazmatu [9]. Plazma tvoří ionty, molekuly, neutrální částice a elektrony. Když se laserový pulz přeruší, plazma se postupně ochlazuje. Zářením se ionizované částice rekombinují za vzniku neutrálních atomů a molekul. Excitované částice se vrací zpět do základního stavu, a při tom dochází k emisní záření.

Emisní spektrum plazmatu se mění v závislosti na čase. V počáteční fázi, kde se ještě rozšiřuje, vyzařuje intenzivní kontinuální brzdové záření. To není z hlediska spektroskopie velmi přínosné a po čase slábne, díky čemuž lze detekovat slabší emisní signály s diskrétními spektrálními vrcholy (píky) ze sledovaných prvků obsažených v testované matici [9]. Protože se spektroskopický signál dá snímat až po určitém čase, který je delší než trvání laserového pulzu, je třeba jeho sběr zpozdít. Řádově se čas zpoždění detekce pohybuje od 100 ns od začátku laserového pulzu, kdy lze detekovat emisní záření iontů, po jednotky až desítky μ s, kdy je možné detekovat atomové emisní čáry (Obrázek 4). Molekulové pásy zpožděné o další desítky μ s se také dají zachytit, ale ve spektroskopii laserem buzeného plazmatu se běžně (až na určité výjimky např. při analýze polymerů [17]) nepoužívají [13].



Obrázek 4. Časový průběh intenzity emitovaného záření. Převzato z Novotný a kol. [13].

Doba, po kterou je otevřena štěrbinu spektrometru, ovlivňuje, kolik světla je propuštěno do detektoru. Při krátkém intervalu nemusí být vpuštěno dost spektroskopického záření pro detekci signálu, naopak při dlouhém intervalu hrozí, že bude vpuštěno i záření z okolí, které zvýší intenzitu pozadí [9]. Tyto parametry je nutné optimalizovat v závislosti na sledovaném prvku, ale i typu testované matrice tak, aby bylo dosaženo co nejlepší možné analytické odezvy.

2.3.5 Nežádoucí jevy v plazmatu

Samoabsorpce

Detekce záření může být komplikována různými jevy, jež v plazmatu probíhají. Jedním z nich je i samoabsorpce, ke které může docházet při vysoké koncentraci atomů stejného druhu při průchodu emitovaného záření z atomu přes okrajové chladnější části plazmatu. Pokud je frekvence emitovaných fotonů shodná s přechodem ze základního do excitovaného stavu, emitované záření může být znovu absorbováno jiným atomem stejného prvku v základním stavu. Tento úbytek se pak projeví ve spektru výrazným poklesem v intenzitě, což negativně ovlivňuje výsledky. Ve spektru je pak patrný propad intenzity ve středu emisní čáry, popřípadě rozšíření profilu spektrální čáry. Proto je vhodné tento jev, co nejvíce omezit, popřípadě pečlivě vybírat spektrální čáry použité pro následnou analýzu [18].

Matriční jevy

Matriční jev popisuje závislost kvality signálu daného analytu na struktuře vzorku, koncentraci ostatních prvků a homogenitě matrice. Bylo pozorováno, že při stejné koncentraci analytu ve vzorcích, které se lišily schopností absorbovat záření, byl signál intenzivnější u látky, která dokázala absorbovat více záření. Intenzita signálu také závisela na velikosti částic vzorku, ale tento jev šel eliminovat použitím cylindrické čočky [19].

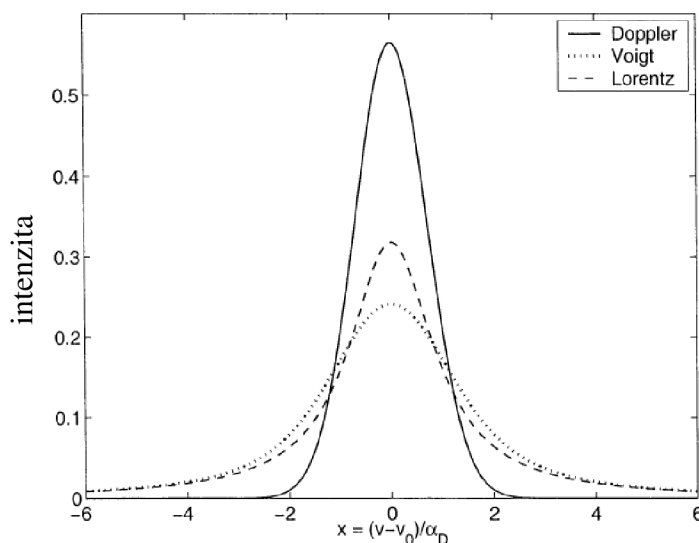
Pro korekci tohoto jevu se běžně používá normalizace na referenční prvek, který je homogenně distribuován napříč celým objemem vzorku. Nedávno byla k tomuto účelu navržena i bezkalibrační analýza (CF LIBS, z anglického *Calibration Free LIBS*). Tento přístup však předpokládá zjednodušené experimentální podmínky, např. že částice jsou homogenně distribuovány ve sledované oblasti plazmatu [20].

2.3.6 Spektra

Profil spektrální čáry

V detektoru je signál převeden na spektra, která je možné dále zpracovat a vyvodit z nich hledanou analytickou informaci. Ve spektrech je vyneseno detekovaný signál mezi 2 osy, X znázorňuje vlnovou délku záření a osa Y vyznačuje jeho intenzitu. Intenzita spektrální čáry je přímo úměrná pravděpodobnosti, s jakou dojde k zářivému přechodu. Pravděpodobnost přechodu popisuje Einsteinův koeficient a čím je vyšší, tím spíše k přechodu dojde. Intenzita píku se vyčítá v jeho maximu z osy Y.

Spektrální čára má svou přirozenou šířku danou Heisenbergovým principem neurčitosti polohy hladin energií. Vlivem různých jevů v plazmatu však dochází k jejímu dodatečnému rozšíření. Šířka píku ve spektrech LIBS je primárně způsobena Starkovým (*Stark broadening*) a Dopplerovým (*Doppler broadening*) rozšířením. Starkovo rozšíření je důsledek působení elektrického pole na atom, který emituje záření. Vliv srážek (mezi částicemi okolního prostředí a daným atomem) na tvar spektrální čáry je označován jako Lorentzovo rozšíření (*Lorentz broadening*). Dopplerovo rozšíření je úměrné teplotě plazmatu (tepelnému pohybu částic) [15]. Také zde působí van der Waalovy síly. Dopplerovo rozšíření a Lorentzovo rozšíření lze zkombinovat a jejich sloučení je pak uváděno jako Voigtův profil (*Voigt profile*) emisní čáry (Obrázek 5).



Obrázek 5. Dopplerův, Voigtův a Lorentzův profil emisní čáry. Převzato a upraveno z Finch a kol. [21].

Korekce spekter

Intenzita detekovaného signálu je ovlivněna fluktuací energie laseru. Pro korekci tohoto jevu se používá interní standardizace. Můžeme ji provést vztažením intenzity spektrální čáry na odlišnou hodnotu, která souvisí s parametry měření [18]. Nejčastěji se provádí vztažením na vlnovou délku píku prvku, který je přítomný v neměnné koncentraci v celém vzorku, nebo intenzity spektra na celkovou emisivitu (velikost plochy pod spektrem).

Při měření, kde je vysoký signál z okolí (tzv. pozadí), se provádí korekce pozadí pomocí pohyblivého minima [22]. U této funkce se určuje velikost minimálního a vyhlazovacího okna a pro různé vzorky a různé spektrometry tyto hodnoty mohou být odlišné, proto je třeba je vždy optimalizovat.

Kvalitativní analýza

Každý prvek má charakteristické spektrum, podle kterého se dá identifikovat složení vzorku. Určení prvku přítomného v materiálu probíhá tak, že se přesně určí vlnové délky spektrálních čar ve spektru (vyčítá se vlnová délka na ose x v maximu intenzity píku) a ty se porovnají s knihovnou spektrálních čar. Existují online databáze, kde jsou uvedeny parametry spektrálních čar, jako je jejich vlnová délka, relativní intenzita, Einsteinův koeficient a horní a dolní energetické hranice přechodu. Obecně uznávaná a často používaná je databáze Národního institutu pro standardy a technologie Spojených států amerických (NIST, z angl. *National Institute of Standards and Technology*) [23]. Na základě parametrů spektrálních čar se dá ověřit, který prvek je přítomný ve spektru.

Kvantitativní analýza

Intenzita píku odpovídá tomu, v jakém množství je prvek obsažený ve vzorku. Kvantifikace je však u metody LIBS obtížná v tom, že ablací materiálu ovlivňuje celá řada faktorů a dochází zde k nežádoucím jevům v plazmatu, které mohou ovlivnit intenzitu signálu (viz 2.3.5). Kvantitativní analýza se standardně provádí pomocí kalibračních křivek. Pro jejich vytvoření je zapotřebí kalibračních standardů se známou koncentrací prvku, které se naměří za stejných podmínek a mají stejnou matici jako studovaný vzorek pro eliminaci matričního jevu [10].

Limity detekce měření

Pro každý analyt ve vzorku lze také určit limity (nebo také meze) detekce měření (LOD, z anglického *Limits of Detection*). Limity detekce jsou Mezinárodní unií pro čistou a užitou chemii (IUPAC, z anglického *International Union of Pure and Applied Chemistry*) definovány jako koncentrace c_L nebo množství q_L , které je odvozeno od nejmenší naměřené intenzity signálu x_L , kterou lze pro daný analytický postup, zde metoda LIBS, s rozumnou jistotou detekovat [24]. Hodnota x_L je dána rovnicí (1):

$$x_L = \bar{x}_{bi} + ks_{bi} \quad (1)$$

kde \bar{x}_{bi} je průměrný signál ze vzorku s nulovou koncentrací analytu (blank), k je číselný faktor odpovídající požadované jistotě a s_{bi} je standardní odchylka blanku. U metody LIBS se LOD většinou nachází v rozmezí 1–100 ppm v závislosti na struktuře vzorku a typu hledaného prvku.

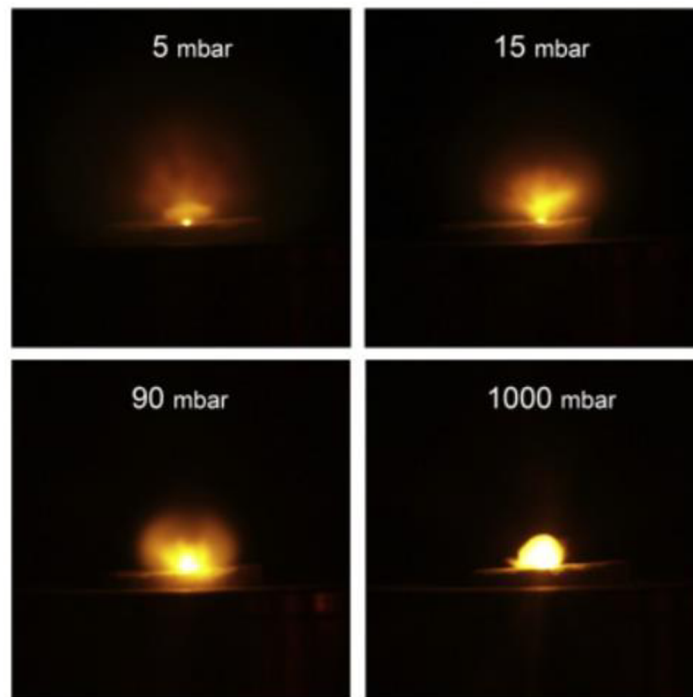
2.3.7 Zesílení LIBS signálu

Zesílit detekovaný signál u metody LIBS lze buď změnou nastavení měřících parametrů anebo patřičnou manipulací se vzorkem [25]. Vhodnou manipulací s měřicí sestavou (s výkonem laseru, vlnovou délkou a šířkou laserového pulzu, zpožděním detekce a změnou šířky štěrbin...) a úpravou experimentálních podmínek, jako je změna tlaku a atmosféry, je možné zesílit emise plazmatu. Například čím vyšší je energie laserového pulzu, tím více materiálu se ablatuje a důsledkem je i vyšší intenzita signálu, což platí až do jeho saturace. Zároveň se tím však zvětšuje velikost kráterů, a tedy snižuje prostorové rozlišení, a proto je třeba najít kompromis mezi těmito parametry. Optimalizace experimentálních podmínek a nastavení přístroje by měla být provedena před samotnou analýzou pro každou matici a každou měřicí sestavu, aby se zvýšila citlivost a reprodukovatelnost měření detekovaných prvků [9].

Optimalizace parametrů měření

Vzorek může být umístěn do tzv. interakční komory, která umožňuje analýzu v různých atmosférách. Pro zesílení signálu je možné použít různé podpůrné plyny, jako helium, argon či dusík, pro ofuk vzorku nebo jako náplň komory při měření. Důvodem lepších výsledků při použití inertního plynu, například zmíněného argonu, je vysoká excitační energie argonových částic (více než 20 eV) ve srovnání s běžně přítomnými prvky ve vzduchu (O_2, N_2). Ve vzdušné atmosféře by excitované částice z materiálu přenášely svoji energii na částice kyslíku a vodíku, což by vedlo k sekundární ablací nebo ke zhášení emisních čar. Odezva signálu by tedy byla ovlivněna těmito prvky a celková intenzita by byla nižší. Během ablace v atmosféře argonu je však vzduch nahrazen argonem a excitované částice z materiálu nepřenáší svoji energii na částice plynu kvůli vyšší excitační energii, díky čemuž je teplota a hustota elektronů v oblaku plazmatu vyšší. Generace plazmatu z materiálu je snazší a to vede k vyšší účinnosti ablace a ke zvýšení intenzity signálu [9]. Při analýze matric, které obsahují dusík a kyslík, např. organických sloučenin, je použití inertního plynu nutné. Tím, že argon vytěsňuje molekuly dusíku a kyslíku ve vzduchu, účinně eliminuje jakékoli interference těchto molekul a je tak možné detekovat jejich signál pouze ze vzorku [9].

Laserová ablace se také může provádět ve vakuu nebo za sníženého tlaku, čímž se dosahuje nižších teplot plazmatu a v oblaku plazmatu se nachází nižší koncentrace elektronů než v plynném prostředí. Protože ve vakuu není žádný tlak působící proti volné expanzi plazmatu, rychlost expanze se zvyšuje a rázová vlna je méně hustá (Obrázek 6) [9, 26]. Výsledkem snížené hustoty rázové vlny je pokles ve stínění plazmatu u nanosekundových laserů, tedy je umožněno více fotonům dosáhnout vzorku. To vede ke zvýšené ablací vzorku, sníženému Starkovu rozšíření čar, což může také vést k intenzivnějšímu spektru, vylepšení spektrální intenzity, poměru signálu a šumu (SNR, z anglického *Signal to Noise Ratio*), rozlišení spektrálních čar a větší uniformitu kráterů. Analýza metodou LIBS za zvýšeného tlaku byla studována přímo pro konkrétní aplikace, například při výzkumu povrchu planety Venuše či při simulaci podmínek nukleárního reaktoru [15]. V obou studiích došlo ke snížení intenzity spektra i SNR za současného zvyšování tlaku. Na spektrech také bylo pozorováno významné rozšiřování píků a samoabsorpci.



Obrázek 6. Tvar oblaku plazmatu za různého tlaku atmosféry v interakční komoře. Převzato z Novotný a kol. [26].

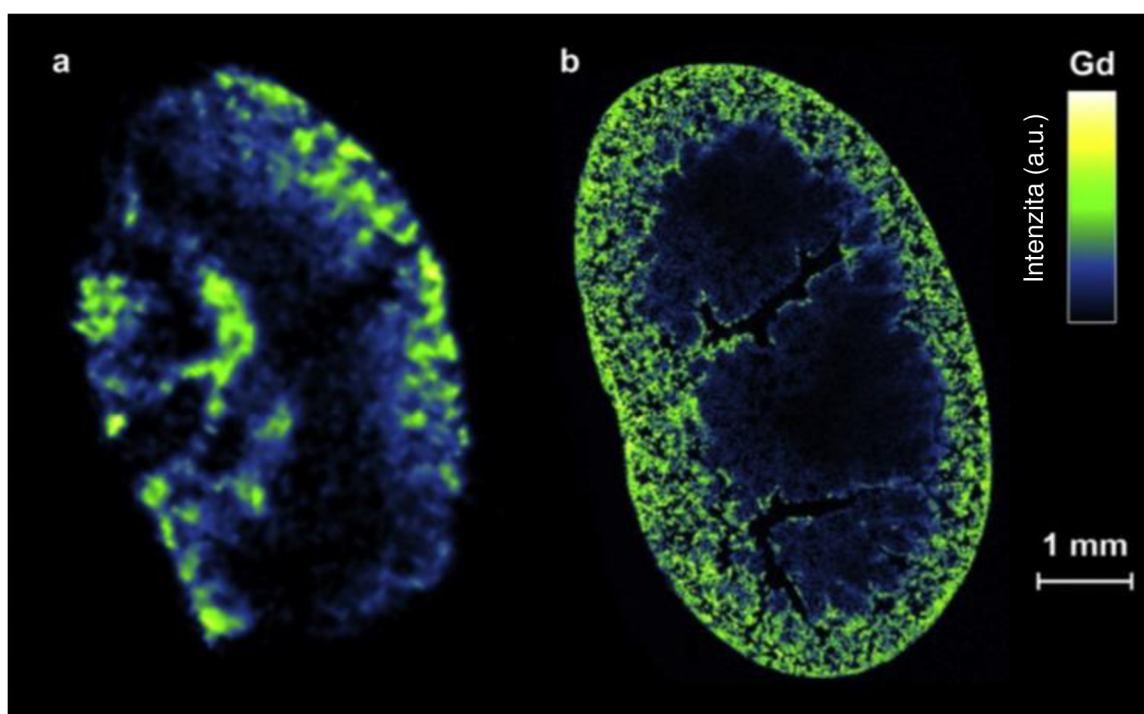
Další metodou, jak zlepšit kvalitu signálu a citlivost metody LIBS manipulací s měřicí sestavou, je přidání druhého laseru. Takové úpravě se říká dvoupulzní LIBS (DP LIBS, z anglického *Double Pulse LIBS*) a umožňuje i zmenšení velikosti kráterů při analýze. Při analýze se používají dva laserové paprsky, které jsou vůči sobě časově posunuté, nejčastěji ve čtyřech geometrických uspořádáních [27]. Nejjednodušší z nich je kolineární uspořádání, kde jsou oba laserové paprsky zaměřené kolmo na vzorek. Při ortogonálním uspořádání je jeden laserový paprsek nasměrovaný kolmo na vzorek a druhý je veden paralelně s jeho povrchem, přičemž spolu paprsky svírají úhel 90° . Druhý laserový paprsek v tomto případě může sloužit buď na preablaci vzorku anebo na opětovný ohřev plazmatu. Při opětovném ohřátí plazmatu je energie absorbovaná již ionizovanými částicemi z prvního laserového pulzu, což významně zesílí emitované záření [9]. Čtvrtý způsob vedení laserových paprsků využívá jejich překřížení pod určitým úhlem [27]. Podobně jako použití argonové atmosféry umožňuje i DP LIBS analýzu vzorků obsahující dusík a kyslík, lze ho však použít i pro dálkové měření, a proto je tato metoda všestrannější. Dvoupulzní technika LIBS pomáhá i při ablaci v kapalných vzorcích, kde první pulz tvoří v roztoku bublinu, což snižuje plazmové zhášení druhého pulzu [9].

Manipulace se vzorky

Jak již bylo výše zmíněno, druhým způsobem pro zesílení získaného signálu je vhodná úprava vzorku před samotným měřením. Při hledání takové úpravy vzorků je snaha je o snížení limitů detekce metody LIBS a zvýšení stability měření [25].

U pevných vzorků ovlivňuje intenzitu detekovaného signálu např. drsnost, tvrdost, odrazivost povrchu a struktura matrice. Nejjednodušší příprava tedy spočívá v jejich mechanickém zpracování a úpravě povrchu. Díky zarovnání povrchu seřiznutím lze dosáhnout lepší reprodukovatelnosti měření. U nerostů a kovů může zvýšení drsnosti povrchu vzorku vést ke zlepšení účinnosti laserové ablace, a tedy i SNR [28].

Náročnější příprava vzorku může zahrnovat fyzickou či chemickou změnu struktury matrice a je většinou nutná pro biologické vzorky, které jsou měkčí než kovy a nerosty. Biologické vzorky jsou také obecně heterogenní, což je činí velmi zajímavými pro prvkové mapování, ale na druhou stranu to podstatně komplikuje jejich analýzu a reprodukovatelnost měření [25]. Mezi nejpoužívanější úpravy patří například homogenizace mletím a peletování (obě úpravy se aplikují nejčastěji za účelem kvantifikace) nebo upevnění na substrátu či zmrazení (spíše při mapování). Upevněním ledvin v epoxidové pryskyřici bylo dosaženo přibližně desetinásobně vyššího prostorového rozlišení ve srovnání s měřením neupevněné čerstvé tkáně (Obrázek 7) [25]. Při přípravě biologických vzorků je však třeba dávat pozor na možnou kontaminaci, především z důvodu, že sledované analyty jsou ve většině případů spíše běžné minerální prvky, jako je vápník, sodík, hořčík nebo draslík [25].



Obrázek 7. Ukázka výsledku mapování distribuce gadolinia v myši ledvině s různým prostorovým rozlišením a) 100 μm ; b) 12 μm . Převzato a upraveno ze Sancey a kol. [25].

2.3.8 Výhody a nevýhody metody LIBS

Metoda LIBS se za posledních 20 let stala významnou spektroskopickou technikou v prvkové analýze různorodých vzorků všech skupenství [29, 30]. Instrumentální jednoduchost měřicí aparatury je jedním z hlavních benefitů metody LIBS v porovnání s dalšími, rutinně používanými optickými technikami, jako jsou např. atomová absorpční spektrometrie (AAS, z anglického *Atomic Absorption Spectroscopy*), indukčně vázaná plazmová atomová emisní spektrometrie (ICP-OES, z anglického *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*), indukčně vázaná plazmová hmotnostní spektroskopie (ICP-MS, z anglického *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) [6]. Protože je zapotřebí pouze pulzního laseru, zaměřovací a sběrné optiky a spektrometru s detektorem, mnoho výzkumných týmů si LIBS aparaturu je schopno sestavit bez nutnosti koupě komerčně dostupných přístrojů.

Vysoká rychlost měření je další výhodou, protože rychlost analýzy LIBS je omezena pouze frekvencí detektoru a frekvencí laseru. Tato metoda se proto často používá pro elementární zobrazování v reálném čase, což by v budoucnu mohlo být prospěšné například během chirurgického zákroku. Plazma může být v rámci jednoho místa generováno opakovaně pomocí násobných laserových pulzů, čímž se dá získat informace o hloubkovém profilování materiálu [31, 32]. Je také možné detekovat většinu prvků z periodické tabulky, což je významná výhoda LIBS oproti např. ICP-MS. Běžně se LIBS označuje jako semidestruktivní metoda, při analýze je totiž odpařeno pouze velmi malé množství vzorku, zhruba 0,1 pg–0,1 mg, ale v závislosti na velikosti vzorku je v literatuře běžné i označení této metody jako nedestruktivní [6].

Dále má také LIBS schopnost měřit za pokojové teploty a atmosférického tlaku, díky čemuž se na velikost a tvar vzorku nevztahují žádná omezení. Měření je možné provádět i pod vodou, LIBS byl například použit pro analýzu materiálů na mořském dně [33, 34]. Aparatura navíc nemusí být v přímém kontaktu se vzorkem. Dálkové měření se využívá při nakládání s nebezpečnými materiály, analýze látek nacházejících se v nebezpečném prostředí nebo na fyzicky nepřístupných místech [9]. Také byla vyvinuta přenosná LIBS zařízení, kterými je možné měřit vzorky přímo v terénu.

Metoda LIBS je univerzální technika, která neklade vysoké nároky na vlastnosti vzorku, jako jiné analytické metody. Vzorek může být jakéhokoli skupenství a nemusí fluoreskovat, být Ramanovsky aktivní či citlivý na infračervené záření [9]. Často uváděnou výhodou této metody je to, že vzorky není nutné před měřením jakkoli upravit [35]. To sice platí u pevných materiálů (horniny, kovy a oceli, beton, sklo...), díky čemuž je také možná dálková analýza, ale i u těch může vhodná úprava povrchu látky vést k několikanásobnému zvýšení signálu. U některých obtížně analyzovatelných vzorků, jako jsou například měkké tkáně, je dokonce správná úprava vzorku před samotným měřením nutností, jinak by pro určité prvky nebylo možné detekovat žádný signál, jak již bylo podrobněji popsáno v kapitole 2.3.7.

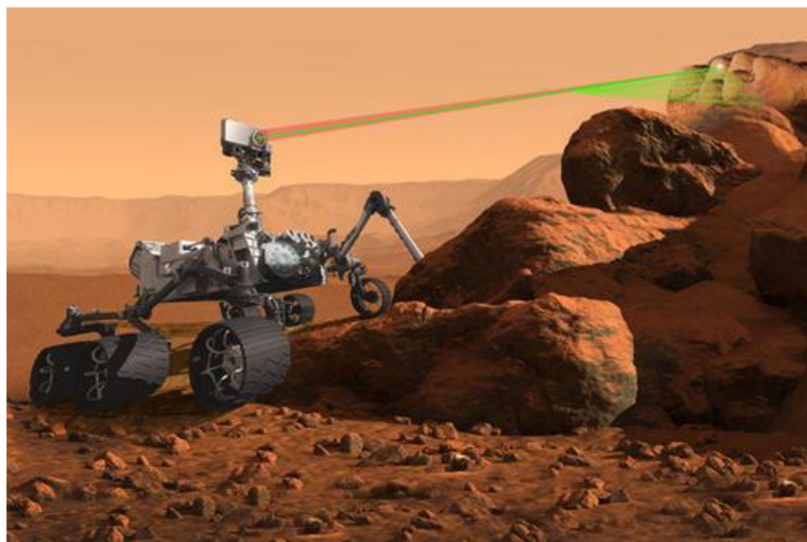
Nevýhoda LIBS oproti ostatním metodám spočívá v nižší citlivosti měření. Metoda LIBS dosahuje citlivosti v řádu ppm (zkratka z anglického *Parts Per Million*), zatímco další analytické metody, jako např. ICP-OES a ICP-MS, mají limity detekce až do řádu ppb (zkratka z anglického *Parts Per Billion*) či nižší [9]. Další slabinou LIBS je obtížná kvantifikace naměřených výsledků a nízká stabilita detekovaného signálu [36], kvůli čemu se dá považovat pouze za semikvantitativní metodu.

Spektroskopie laserem buzeného plazmatu umožňuje prostorově rozlišené prvkové analýzy různorodých pevných vzorků a je navíc kompatibilní s dalšími analytickými metodami, jako je například LA-ICP-MS, Ramanova spektroskopie či laserem indukovaná fluorescence (LIF, z anglického *Laser-Induced Fluorescence*). Tandemové měření umožňuje dosažení vyšší citlivosti měření [31, 32, 37].

2.3.9 Příklady použití metody LIBS

Metoda LIBS je čím dál více využívaným nástrojem pro sledování změn prvkového rozložení v různých maticích. Nejčastěji se využívá pro stanovení složení pevných anorganických materiálů, především kovů a slitin, protože se jedná o homogenní matrice, dosahuje u nich velice reprezentativních výsledků. Tato metoda se dá uplatnit v průmyslové výrobě pro okamžité stanovení prvkového složení slitin spolu s jejich kvantitativní analýzou v pevném i roztaveném stavu, čímž úspěšně umožňuje řízení a monitorování procesu tavení ocelí [12].

Metodou LIBS je možné uskutečnit měření v terénu, čehož se využívá např. při zkoumání brzdných stop pneumatik na silnicích ve forenzní analýze [38]. Přenosné LIBS zařízení lze použít i pro detekci kontaminantů v půdě a při měření olova v betonu a v barvivech [12]. Použití metody LIBS na vozítku MARS rover od roku 2012 umožnilo dálkovou analýzu povrchu Marsu. To se velmi osvědčilo a v roce 2020 byl LIBS opět použit na sestavě SuperCam (Obrázek 8). Dále byly touto metodou dálkově identifikovány výbušniny [39].

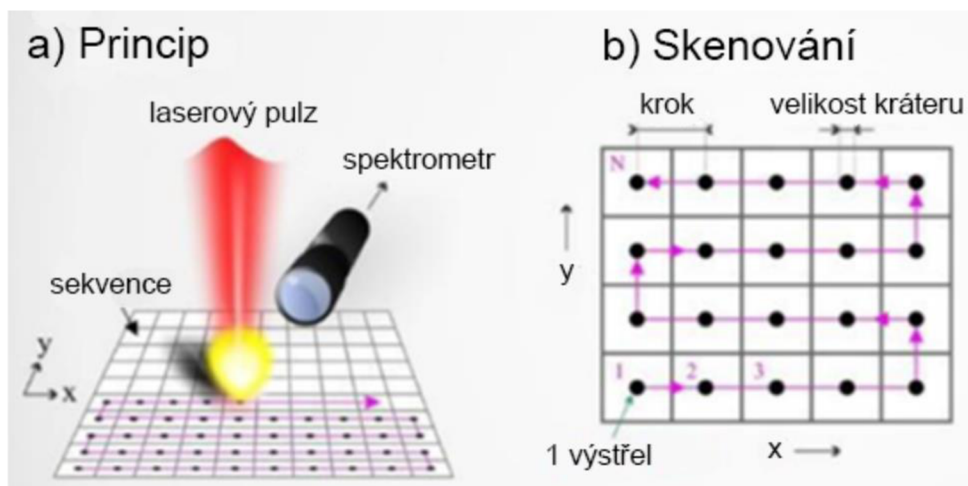


Obrázek 8. Ilustrace dálkového měření SuperCam na Marsu. Převzato z [40].

Čím dál více se však LIBS uplatňuje i při analýze živočišných a rostlinných vzorků. Spektroskopie laserem buzeného plazmatu nachází uplatnění v biomedicině a histopatologii, často se používá k odlišení zdravé a nezdravé tkáně, nejen u zvířat [41] a rostlin [42], ale jsou známé aplikace i v analýze zooplanktonu [43]. Technika LIBS také umožňuje detekovat onemocnění a jeho fáze i ve zjevně zdravé kostní tkáni sledováním distribuce hlavních komponent a vybraných stopových prvků [44]. Navíc už byla v průběhu chirurgického zákroku úspěšně provedena identifikace různých prasečích tkání s vysokou citlivostí a specificitou [27, 28]. Metoda LIBS představuje velký potenciál pro klinické aplikace jako prostředek diagnostiky lidských nádorů [47] a již bylo i navrženo jeho použití při vrtání zubní tkáně pomocí laserů [48].

2.4 Mapování prvkového rozložení v biologických tkáních metodou LIBS

Chemické zobrazování je velmi zajímavou a užitečnou schopností LIBS, díky které se dá snímat prvkové rozložení vzorku na určité definované ploše. Během mapování je vzorek většinou umístěn na motorizovaném XY podstavci, který umožňuje posunutí vzorku mezi po sobě jdoucími laserovými pulzy o konstantní vzdálenost (krok). Při kontinuálním pohybu vzorku vzhledem k laserovému paprsku odstraní každý laserový pulz nový materiál z jiné polohy na vzorku (Obrázek 9). Každé takové unikátní poloze lze poté přiřadit souřadnice. Vypočtením intenzity spektrální čáry pro daný prvek u všech spekter z každé polohy lze poté vynést zastoupení tohoto prvku na ploše vzorku. Velikost kroku poté udává prostorové rozlišení výsledné mapy. Prostorové rozlišení LIBS může být až desítky nebo dokonce jednotky mikronů v závislosti na použité energii laserového pulzu, parametrech zaostřovací optiky a velikosti kráteru [8, 49].



Obrázek 9. a) Princip mapování. b) Souřadnice jednotlivých kráterů na mapě. Prostorové rozlišení je dáno vzdáleností mezi středy dvou kráterů. Převzato a upraveno z Jolivet a kol. [50].

Mapování metodou LIBS se široce využívá především při studiu heterogenních anorganických i organických vzorků. Prvkové rozložení geologických vzorků se zkoumá za účelem jejich elementární kvantifikace, klasifikace minerálů a stanovení jejich vlastností a původu [49]. Dále je tato technika stále častěji používána při prostorové analýze heterogenních biotických vzorků jako jsou např. měkké tkáně [25]. Mapovány mohou být prvky, které se přirozeně vyskytují v tkáni [51] či prvky, které byly do tkáně uměle vpraveny a studuje se jejich biologická retence [52–55]. Také je možné sledovat distribuci prvků v 3D prostorovém rozlišení [56]. Komplexní shrnutí aplikací metody LIBS a jejího potenciálu pro zobrazování biologických vzorků bylo sumarizováno v několika přehledových publikacích [57–59].

2.5 Mapování prvkového rozložení v biologických tkáních dalšími technikami

Nejčastěji se při detekci prvkového rozložení biologických vzorků používají následující techniky: autometalografické zobrazování (AMG, zkratka z anglického *Autometallographical Imaging*) [60], PIXE (zkratka z anglického *Particle (proton)-Induced X-ray Emission Spectroscopy*) [61, 62] a hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů (SIMS, zkratka z anglického *Secondary Ion Mass Spectrometry*) [63, 64].

Další metodou analýzy prvkového rozložení je rentgenová fluorescence (XRF, anglicky *X-ray Fluorescence*) [65, 66]. Tato technika poskytuje výsledky s vysokou citlivostí a prostorovým rozlišením až 10 nm nebo méně, ale kvantifikace je zde podobně jako u LIBS docela náročná [67]. Jmenovitě byla XRF použita například k rozlišení mezi maligní a benigní nádorovou tkání u rakoviny prsu [68] a dále ke studiu přítomnosti železa v mozkové tkáni s Alzheimerovou chorobou [69].

Metoda LA-ICP-MS umožňuje analýzu elementárního rozložení s vysokou citlivostí, její aplikace byly přehledně popsány v několika přehledových článcích [70, 71]. Tato metoda byla například použita k rozlišení nádoru rakoviny prsu od okolní zdravé tkáně [72], ke stanovení distribuce různých kovů v placentární tkáni [73], sledování prostorového rozložení stopových prvků v mozkové tkáni myši [74] nebo k rozlišení myši trpící Parkinsonovou chorobou od zdravých jedinců [75].

Metoda na podobném principu jako LA-ICP-MS je laserová ablace s optickou emisní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (LA-ICP-OES, z anglického *Laser Ablation Inductively Coupled Plasma OES*) [76]. LA-ICP-MS je však prozatím mnohem rozšířenější.

Každá z těchto metod má mnoho výhod a dosahuje dobrých výsledků, ale jejich použití je většinou omezeno náročným vícekrokovým zpracováním vzorků, nemožností stanovit obsah nekovových prvků, složitostí požadovaného vybavení, časově náročným či ekonomicky nákladným měřením.

2.6 Zuby

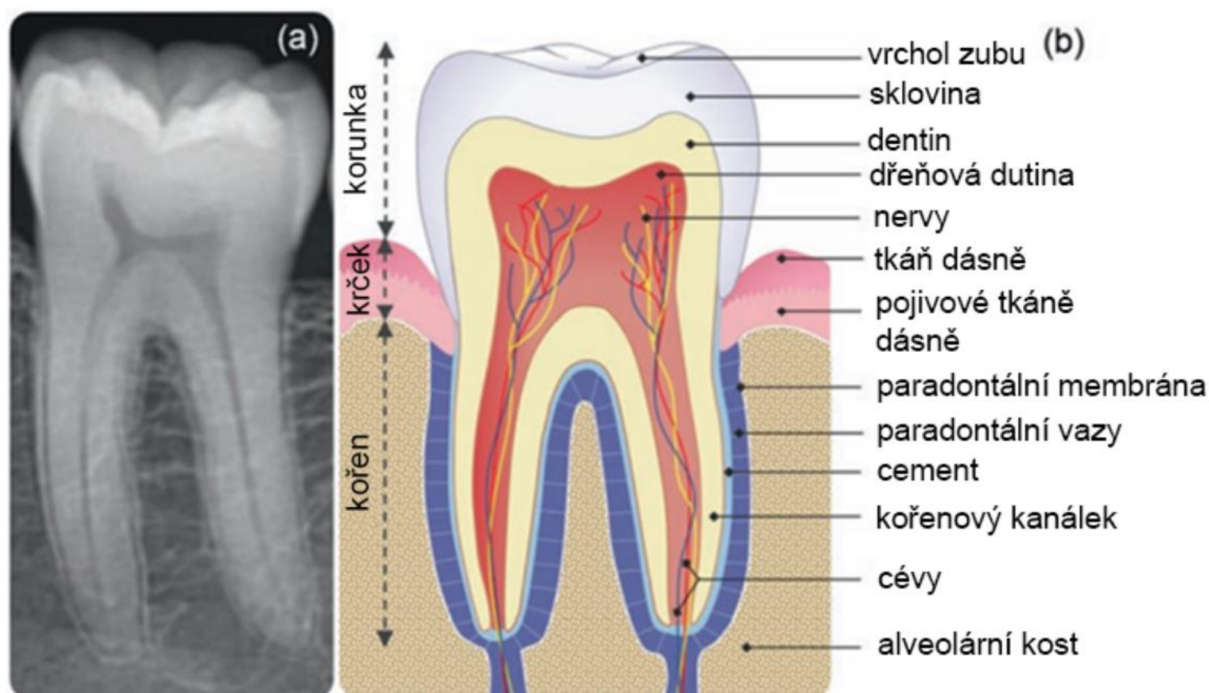
2.6.1 Lidské zuby

Zubní tkáň je nejtvrdější částí lidského těla. Zuby jsou v organismu nezbytné pro správné zpracování potravy a jejich hlavní funkcí je mechanické rozmělnění jídla. Spolu s jazykem a slinnými žlázami jsou prvním orgánem trávicího traktu. Tím, že zuby žvýkají potravu a pomocí slin započnou její trávení, dutina ústní napomáhá k řádnému zpracování a rozkladu jídla a efektivnímu vstřebávání živin. Dále hrají zuby důležitou roli i v řeči a dorozumívání se, popřípadě pomáhají v obranných reflexech.

Počet zubů se v průběhu života mění. V mládí se soubor zubů označuje jako mléčný (dočasný) chrup a celkem ho tvoří 20 zubů, které jsou s přibývajícím věkem nahrazeny. V dospělosti se pak počet zubů zvýší na 32. Zuby jsou rozlišeny dle tvaru a umístění v ústní dutině na řezáky, špičáky, třenové zuby a stoličky [77].

Stavba zubů

Lidské zuby se skládají ze tří hlavních částí: korunka, krček a kořen vyrůstající ze zubního lůžka (Obrázek 10). Důležitou částí jsou i dásně a čelistní kost, které zuby upevňují na místě. Korunka je část zubu vystupující nad dásně do dutiny ústní a pokrývá ji sklovina (enamel). Místo, kde korunka končí a začíná kořen zubu, se označuje jako krček. Pokud se jedná o zdravé zuby, krček by měl být skrytý pod dásní. V případě onemocnění se však může odkrývat. Pod krčkem je další částí zubu kořen. Kořen je obzvláště zranitelný vůči zranění a infekci, protože postrádá ochrannou sklovinu. Infekce kořene zubu se mohou šířit do krevního řečiště nebo do okolní čelisti a tkání, a proto vyžadují okamžitou a důkladnou lékařskou péči [77].



Obrázek 10. (a) Radiografický snímek a (b) ilustrované schéma struktury zubu a upevňovacího aparátu. Převzato a upraveno z Tayebi a kol. [77].

Jak již bylo řečeno, korunka je pokrytá silnou vrstvou skloviny, což je nejtvrďší část celého zubu (a tedy i celého těla), protože je v přímém kontaktu s potravou, kterou musí být schopna rozmělnit. Sklovina je vysoce mineralizovaná tkáň odolná proti poškození, ale v případě porušení se nedokáže regenerovat. Dosahuje tloušťky 1 až 3 mm. Její povrch pokrývá Nasmythova blanka.

Pod sklovinou se nachází zubovina (dentin), která tvoří největší část zubu. Její struktura je podobná kostní tkáni, je však tvrdší, barvou žlutobílá a obsahuje i živé buňky. Dentin se rozděluje na primární a sekundární. Primární dentin se tvoří až do okamžiku, dokdy je zub funkční. Poté začíná tvorba sekundárního dentinu a ta pokračuje po celou dobu životnosti zubu. Kromě klesajícího počtu zubovinových tubulů mezi primárním a sekundárním dentinem není žádný strukturální nebo chemický rozdíl [78]. Tato tkáň je citlivá na teplotní podněty a její podráždění se bolestivě projeví.

Hlouběji do zubu se nachází zubní dřeň, jediná nemineralizovaná část zubu [78]. Ta obsahuje cévy, které vyživují zub a nervy, jenž mají upozornit organismus na nebezpečné poranění zubů či infekce. Na povrchu kořene až po krček se vyskytuje zubní cement, modifikovaná vláknitá kost. Je to nažloutlá tenká vrstva, která je nejsilnější na krčku a rozlišuje se na primární a sekundární cement. Tato tkáň připojuje zub k paradontálním vazům, které ho drží pevně na místě v čelistní kosti.

Složení

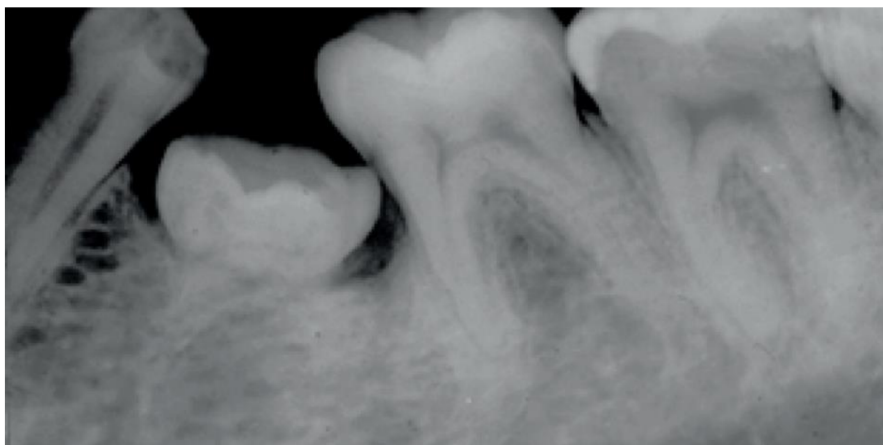
Zuby jsou v podstatě anorganické/organické kompozity s vysokou tvrdostí a odolností proti poškození jejichž nejzastoupenější stavební složkou je fosforečnan vápenatý [79]. V lidských zubech krystalická sklovina obsahuje přibližně 96 % fosforečnanu vápenatého, a to buď ve formě hydroxyapatitu ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) nebo fluorapatitu ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$), dále 4 % vody

a 1 % organické hmoty [48]. Tyto komponenty nejsou rovnoměrně rozloženy v tkáni, ale přizpůsobují se funkci jednotlivých částí zubu. Byla studována absorpce a difúze vody ve sklovině a závěry naznačují, že přibližně polovina vody je pevně vázána na sklovinu ve formě hydratační vody. Druhá polovina je vázána volněji a nachází se v bílkovinném plášti obklopujícím jednotlivé krystaly skloviny. Dentin se skládá z přibližně 70 % hydroxyapatitu, 20 % organické hmoty, převážně kolagenových vláken, a 10 % vody. Hlavními chemickými sloučeninami alveolární kosti jsou hydroxyapatit 50–60 %, voda 15–20 %, uhličitany 5 %, fosfáty 1 %, kolagen 20 % a bílkoviny 1 % [48].

Na základě koncentrace jednotlivých prvků v zubu lze identifikovat zdravou a nemocnou tkáň. V případě snížení koncentrace nejzastoupenějších prvků matrice – vápníku a fosforu, anebo zvýšení koncentrace nematričních prvků – typicky lithia, stroncia, barya, sodíku, hořčíku, zinku a uhlíku – můžeme usuzovat, že tkáň je nemocná a je třeba ji ošetřit [80].

2.6.2 Ankylóza

Ankylóza představuje častou zpožděnou komplikaci v ústní dutině, která následuje po poranění parodontální membrány při těžkém poranění zubů, jako je avulze (zlomenina zubu) a intruze (vrazení zubu do lůžka) [81]. Nastává, když se cement z kořene zubu spojí s alveolární kostí dento-alveolárním procesem (Obrázek 11). Žádné příznaky nenaznačují, že k procesu ankylózy dochází. Rychlost resorpce se liší s věkem a rychlostí růstu kostí. Jako prevence výskytu ankylózy by měla být parodontální membrána udržovaná zdravá a mělo by se vyhnout jejímu poranění. Pokud už k zubním traumatům došlo, lze zub upevnit do adhezní dlahy, která ho drží na místě a zároveň mu umožňuje alespoň malou flexibilitu [81]. Tímto způsobem by se mělo ankylóze předejít.



Obrázek 11. Zub je postižen ankylozou. Jeho kořeny jsou již v pokročilém stádiu nahrazení kostní tkání. Převzato z Hadi a kol. [82].

Proces vzniku ankylózy

Zdravá parodontální membrána (PDM, z anglického *Periodontal Membrane*) je fyziologická bariéra, která chrání kořen a umožňuje mu správně růst. Když je PDM vážně poraněna, ochranná bariéra přestane fungovat a může dojít k zahájení patologických procesů. Ty mohou vést až k proniknutí kosti do zubní tkáně, následované postupným nahrazením zubu kostí [81]. Osifikování zubní tkáně, nejčastěji dentinu, se označuje jako náhradová resorpce (*replacement resorption*) a je to jev, který ankylózu velmi často doprovází [82].

Mechanismus za kořenovou resorpcí spojenou s dentoalveolární ankylozou není zcela objasněn. Novější studie naznačují, že při vyražení a opětovném zasazení zubu do dásně, počáteční resorpce kořene může být spojena se zánětlivou reakcí proti postižené periodontální membráně nově zasazeného zubu [83]. Nebo se také pojí s fagocytózou její nekrotické periodontální měkké tkáně [84]. Bylo dokázáno, že antibiotická léčba výrazně sníží počáteční resorpci [85]. Samotná ankylóza není důvodem k odstranění trvalého zubu. Zuby, které musí být odstraněny z jiných důvodů, se však podstatně obtížněji odstraňují, pokud jsou postiženy ankylozou, protože pak pevněji drží v dásni a jsou více rigidní.

Typy ankylózy

Byly rozlišeny dva typy ankylózy se dvěma různými vývojovými vzory. Jeden typ je charakterizován ukládáním osifikované tkáně na povrchu kořene a stěnách lůžka. Tomuto typu obvykle předchází povrchová resorpce povrchu kořene [86, 87]. Druhý typ se vyskytuje v oblastech, kde je všechna periodontální membrána nekrotická. Tento druhý typ ankylózy je charakterizován úplnou mineralizací nekrotické periodontální membrány bez předchozí resorpce kořene [86]. V závislosti na tom, do jaké míry se spojí části kořene s kostí, může jít o buď úplnou nebo částečnou ankylozu. S tímto stavem je spojen nedostatečný nebo výrazně snížený dentoalveolární vývoj [78, 81]. Postupně může dojít až k náhradě celé zubní tkáně kořene procesem náhradové resorpce, poté korunka praskne anebo odpadne.

Metody pro diagnostiku ankylózy

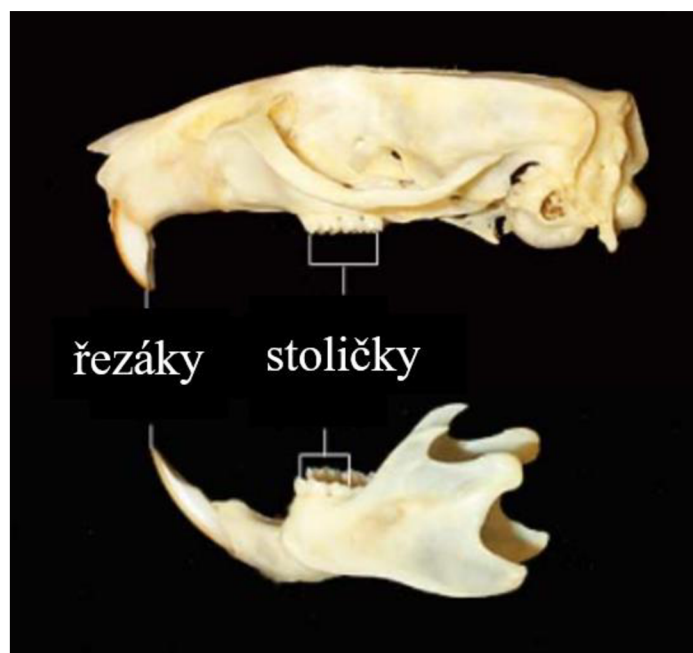
Diagnóza ankylózy je komplikovaná a k tomu, aby se mohlo potvrdit, že jde opravdu o pozitivní nález je třeba více kroků. Úplně nejzákladnější metodou pro posouzení stavu zubu a okolní kosti je histologie pomocí mikroskopu. Pro tuto metodu je však potřeba rozřezat zub na dostatečný počet sekcí, aby byly vidět i malé změny přítomné v tkáni. Tato metoda byla použita pro stanovení vlivu konzistence stravy na tvorbu ankylózy v zubu a bylo zjištěno, že jde o ankylozu při vystavení zubu běžné žvýkací funkci částečně předejít [87].

Další technikou je rentgenografie. Tato metoda zobrazuje bohužel pouze ve 2D a hrozí, že neodhalí všechny výskyty ankylózy. Pokud je zasažena orální nebo vestibulární část nebo jsou přítomny pouze malé zasažené oblasti [83, 88], rentgenografie poskytuje vysokou míru falešně negativních výsledků. Pro 3D rekonstrukci lze použít CT snímky (zkratka z anglického *Computed Tomography*) s velmi dobrými výsledky [89]. Omezením však zůstává, že CT skeny nejsou běžně dostupné v zubních ordinacích. Ankylozu lze částečně diagnostikovat i podle charakteristického zvuku vydávaného při poklepání na zub (tupý zvuk: normální periodontální membrána; ostrý a čistý zvuk: ankylóza). Tato metoda je však velmi subjektivní [88]. Dalším možným diagnostickým nástrojem pro identifikaci ankylozovaných zubů je analýza rezonanční frekvence, která může kvantifikovat tuhost spojení zubního implantátu s kostí [90].

2.6.3 Myší zuby

Myši se řadí mezi hlodavce, což je řád zvířat pojmenovaný podle způsobu zpracování potravy. Poznávacím znakem hlodavců jsou dva výrazné obloukovitě prohnuté řezáky v horní i dolní čelisti, které jsou používány ke hlodání, odtud se jim říká hlodáky. Hlodáky nemají kořeny a rostou z čelistních kostí po celý život jedince.

Myší chrup je oproti lidskému chrupu tvořen pouze šestnácti zuby, a to řezáky a stoličkami (Obrázek 12). Chrup se v průběhu života nemění jako u lidí, ale od narození zůstává po celý život ta stejná sada zubů. Sklovinou je narozdíl od lidských zubů pokryta jen přední strana řezáků, zadní strana je tvořená pouze měkkým dentinem [91]. To umožňuje, aby se neustále rostoucí řezáky obušovaly o tvrdou potravu, a tak zůstaly ostré i po opotřebení. Pokud myši nemají materiál na žvýkání nebo mají vadný skus, jejich řezáky se nebudou normálně obušovat. Zvířata s tímto typem onemocnění mohou dokonce zemřít hladem [92, 93]. Tím, že je sklovina pouze v přední části zubu, mají myši zuby charakteristický tvar a není zde možné rozlišit typické části zubů jako korunka a krček.



Obrázek 12. Horní a dolní čelist myši, pohled z boku. Převzato a upraveno z Rouge a kol. [93].

Stavba stoliček je podobná stavbě lidských zubů, skládají se ze stejných částí: korunky, krčku a kořene. Povrch korunky je pokryt sklovinou, nejtvrďší tkání, a pod ní se nachází dentin, který tvoří většinou část zubu. Sklovina u myších zubů je často přirozeně zbarvena do žluto-oranžova, protože se na její povrch zachycují oxidy železa [94]. Prvkové složení myších zubů je také velmi podobné lidským zubům. Uvádí se, že obsah minerálů ve sklovině hlodavců se pohybuje v rozmezí 86,20 % až 95,06 % [95].

2.6.4 Bioakumulace prvků v zubech

Tvrdé tkáně, kosti a zuby, jsou známé tím, že jsou schopny bioakumulovat a po dlouhou dobu uchovávat prvky, které se do těchto tkání vstřebávají přes erytrocyty z krve nebo ústní dutinou [96]. Schopnost bioakumulace je nejvýraznější u těžkých kovů, které se do těla dostávají v potravě, vdechováním výparů z nátěrů barev či z ovzduší v blízkosti průmyslových továren. Těžké kovy se začlení do hydroxyapatitové struktury zubní matrice, a poté se velmi pomalu vymývají. Analýzou těchto prvků je poté možné získat biologickou informaci o stylu života. Díky tomu jsou tvrdé tkáně široce využívány v antropologii a archeologii jako spolehlivý archiv informací o lidech i zvířatech, jejich výživě, stáří a migračních návycích [96].

Olovo

Olovo je jeden z těžkých kovů, které mají schopnost se v zubních tkáních hromadit a dlouhá léta uchovávat. Bioakumulace a postupné uvolňování olova v tvrdých tkáních umožňuje sledovat dlouhodobé vystavení jedince tomuto těžkému kovu. Díky tomu zuby poskytují integrovanou míru absorpce olova a tuto informaci lze využít například pro stanovení přibližného místa života jedince či jeho věku. U trvalých i mléčných zubů se koncentrace olova snižuje směrem od povrchu do středu zubu v pořadí: sekundární dentin – dentin – sklovina. U řady studií byl zjištěn poměr koncentrací olova ve zmíněných třech oblastech (sklovina : dentin : sekundární dentin) přibližně 1 : 2 : 6. Trend se očekává s ohledem na růstový model, sklovina se tvoří brzy v životě zubu, zatímco dentin neustále roste a udržuje se a sekundární dentin je v těsném kontaktu s krví. Hladiny olova v sekundárním dentinu klesají do zubu, což naznačuje, že to je způsob, jakým olovo vstupuje do dentinu [97].

Při interpretaci analytických výsledků olova v zubech existují tři významné problémy. Za prvé olovo není rovnoměrně rozloženo po celém zubu a v určitých částech, například na povrchu sekundárního dentinu se absorbuje lépe. Množství obsaženého olova se navíc liší podle typu zubu a souvisí i s věkem zubu. V neposlední řadě existují významné rozdíly ve výsledcích analýzy olova v zubech různými laboratořemi, což může být způsobeno i kontaminací, předúpravou vzorků a chybou analytických metod [98].

2.7 Prostorově rozlišená analýza zubů

Mapy distribuce prvků v tkáni poskytují semikvantitativní informaci o prvkovém složení tkáně v závislosti na čase. Umožňují sledovat mineralizaci hydroxyapatitové matrice a migraci prvků v ní. Dále napomáhají při identifikaci chorobných stavů, jako jsou zubní kazy a další patologická onemocnění zubní matrice [48]. Zuby mohou na základě prvkového rozložení poskytnout informaci o způsobu života studovaných jedinců, což se využívá v archeologii a antropologii [96]. Na základě analýzy kontaminace těžkými kovy je možná i klasifikace jedinců na základě věku, zdraví a místa původu.

Využití zubů jako zdroje informace o životě studovaného jedince má řadu výhod. Například lehké získání vzorků i nenáročná a dlouhodobá skladování zubů poskytuje podstatnou výhodu oproti jiným často používaným materiálům pro tyto účely, jako je krev, měkké tkáně, vlasy, které snadno podléhají rozpadu po relativně krátkém čase. Nevýhody zubů spočívají v tom, že jsou to heterogenní matrice a skládají se převážně ze dvou pevných fází s různou hustotou a schopností akumulovat stopové prvky. Vzorkování a samotná analýza proto může být někdy problém. Proto je třeba zuby pro samotnou analýzu vhodně upravit. Běžně se používá ukotvení v epoxidové pryskyřici následované seříznutím a naleštěním diamantovou pastou.

Metody prostorově rozlišené analýzy zubů

Analýza prvkového složení zubní tkáně se běžně provádí několika analytickými technikami. Mezi současné techniky patří XRF [99], PIXE [100], SIMS [101] a hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů s detektorem doby průletu (TOF-SIMS, z anglického *Time of Flight Secondary Ion Mass Spectrometry*) [102, 103] a LA-ICP-MS [104–106].

Dále se k mapování zubních tkání používá i metoda LIBS. Přehled dosavadních studií věnujících se této problematice je podrobně popsán v následující kapitole.

3 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Analýza zubních tkání metodou LIBS

Spektroskopie laserem buzeného plazmatu nachází využití i při zkoumání zubů díky již vyjmenovaným výhodám (rychlost, jednoduchost, nízké náklady na provoz). V archeologii a zubním lékařství se LIBS uplatňuje díky nízké destruktivitě vzorku. V archeologii se také využívá přenosných přístrojů LIBS. Tato možnost je velmi důležitá především v případě starověkých zubů, tyto vzorky může být obtížné transportovat z místa jejich naleziště. Pomocí přenosných nástrojů LIBS mohou být vzorky analyzovány přímo na místech, kde byly nalezeny, nebo v muzeích, kde jsou umístěny [107].

Tím, že technika LIBS nabízí rychlé a prostorově závislé měření, poskytuje důležité informace o kvalitě studované tkáně a v budoucnu by mohla být využívána jako běžná součást zubní ordinace. V Tabulce 1 je uvedena dostupná literatura věnující se studiu prostorového rozložení prvků metodou LIBS v zubních tkáních. Články jsou podrobně popsány v dalších kapitolách z hlediska experimentálních podmínek a výsledků měření.

Tabulka 1. *Přehled literatury věnující se LIBS mapování prvkového rozložení v tvrdých tkáních. V tabulce jsou uvedené testované matrice, detekované prvky, úprava vzorků společně se šířkou použitého řezu [μm], prostorové rozlišení při měření [μm], počet spekter v mapě a v jakém roce byl článek vydán.*

	vzorky tvrdých tkání	detekované prvky	úprava vzorků	prostorové rozlišení [μm]	počet spekter v mapě	reference/rok
lidé	zuby	Na, Ni, P, Sn, Ti, Zn, Ag, Al, Ca, Cr, Hg, K, Mg, Mn	řezy (1 500 μm)	–	–	[108]/1999
	zuby, kosti	Pb, Ca, Mg, Sr, Al, Mn	řezy (1 500 μm)	1 000	100	[48]/2001
	zuby	Sr, Ca, Na	žádné	1 000	7	[80]/2008
	zuby	Mg, Ca, Sr	řezy (5 μm)	500	–	[107]/2010
	zuby	Sr, Ca	řezy (300 μm)	500	432	[109]/2011
	zuby	Sr, Ca	upevnění epoxidem	550	–	[110]/2014
	zuby	Co, Mn, V, Ni, Sr	upevnění epoxidem	215	702	[111]/2019
zvířata	hadí pátěř	P, Mg, Fe, Ca, Ba, Sr, Na	řezy	150	2 100	[112]/2010
	medvědí zuby	Na, P, Mg, Ca, Fe, Ba, Sr	řezy (3 000 μm)	500	1 560	[44]/2010
	zuby chameleona	P, Ca, Mg	upevnění epoxidem	150	612	[113]/2016

3.2 Prostorová analýza lidských zubů metodou LIBS

Samek, O. a kol. [108] studoval přítomnost stopových kovů v zubech. Byly zkoumány zuby různých věkových skupin, aby v nich bylo možné sledovat vliv faktorů prostředí na bioakumulaci prvků. Laserem typu Nd:YAG o vlnové délce 1 064 nm a energii laserového svazku 20 mJ byly ablatované řady kráterů o velikosti do 200 μm na řezech zubů. Spektra byla detekovaná na rozsahu 250–800 nm. Byla zjištěna úzká souvislost mezi prvky detekovanými v zubních výplních a pastách s těmi, které jsou přítomny v zubech. Hliník byl detekován více než 2 mm od zubní výplně. Z toho bylo usouzeno, že zuby absorbují určitou koncentraci prvků z pasty a ze zubních výplní. Dále byla provedena kvantitativní analýza pro hliník, kde intenzita signálu hliníku v zubu byla vztažena na signál hliníku v zubní výplni, a díky tomu byla stanovena relativní koncentrace hliníku v zubu.

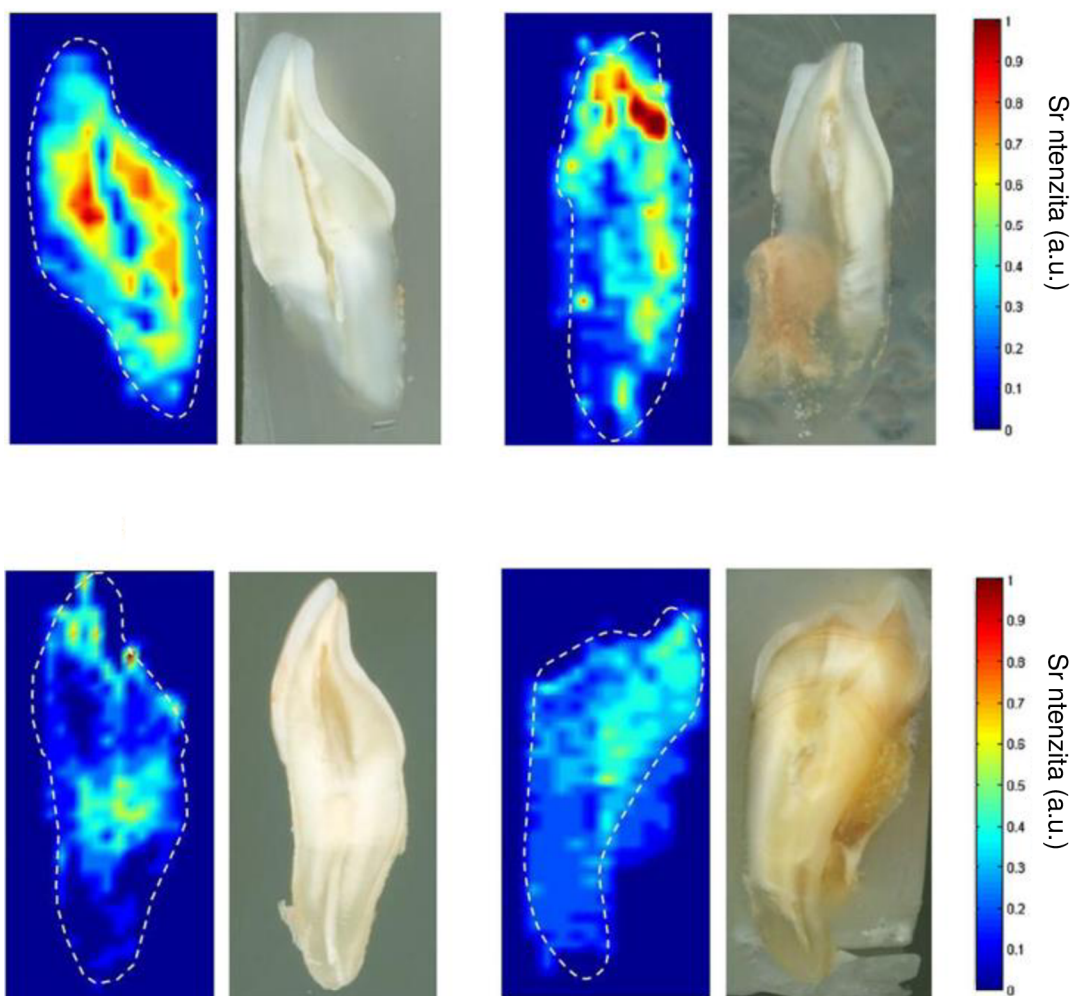
Ve své další návazné studii Samek, O. a kol. [48] zkoumali opět zuby různých věkových skupin a tentokrát i vzorky kostí s cílem analyzovat důležité minerály a potenciálně toxické prvky (hliník, olovo a stroncium) pro sledování různých biologických faktorů. Použit byl stejný laser jako v předchozím článku, ale s laserovými pulzy o energii 30 mJ. Spektra byla detekovaná na rozsahu 200 až 700 nm. Ablatované krátery měly průměr 200 μm a byly rozmístěny 1 mm od sebe. Byla sestavena mapa rozložení relativní koncentrace stroncia v řezu zubu a kosti. Pro ostatní prvky to nebylo možné, protože byly ve tkáni většinou obsaženy v koncentracích pod limity detekce. Ve sklovině některých zubů však například emisní čáry olova byly pozorovány a související hodnoty koncentrace odpovídaly řádově 150 ppm. V článku byl ukázán graf koncentrace stroncia podle souřadnic X a Y pro vzorek zubu spojeného s kostí. Podle vyšší koncentrace stroncia v kosti a nižší v zubu bylo možné obě tkáně jasně odlišit. Dále byly generovány jedno-dimenziální mapy podílu obsahu hořčíku ku vápníku po délce zubu s kazem, čím bylo umožněno odlišit zdravou a nemocnou tkáň. V nakažené části zubu byl sledován zvýšený obsah hořčíku.

Thareja, R. K. a kol. [80] detekovali rozdíl v prvkovém (sodík, stroncium a vápník) složení ve zdravých a zkažených lidských zubech. Byl použit Nd:YAG laser s vlnovou délkou 355 nm a laserovými pulzy o energii 10 mJ. Spektra byla snímána v rozmezí 400 až 700 nm. Prostorová analýza prvkového složení byla provedena na řadě kráterů (každý z nich vytvořen 100 laserovými pulzy). Průměr kráterů byl 200 μm a jejich vzájemná vzdálenost, tj. prostorové rozlišení bylo 1 mm. Bylo zjištěno, že koncentrace vápníku i fosforu významně poklesla v oblasti zubního kazu, a na základě toho bylo s velkou přesností (skoro 100% spolehlivost) možné od sebe zdravou a nemocnou tkáň odlišit. Podobně byla příznakem zkažené tkáně zvýšená koncentrace stroncia a sodíku.

Alvira, F. C. a kol. [107] aplikovali LIBS na stanovení obsahu stroncia a hořčíku v dentinu a sklovině neolitických, středověkých a moderních zubů *Homo sapiens*. Byl využit Nd:YAG laser na vlnové délce 1 064 nm. Spektrální rozmezí bylo 350 až 1 100 nm. Vzorky zubů byly seříznuty na 5 μm řezy a upevněny na sklíčka. Na základě získaných dat byly vytvořeny mapy distribuce poměrů Mg I/Ca II a Sr I/Ca I a hodnoty těchto poměrů byly vyšší v dentinu než ve sklovině. V této studii byly nalezeny významné rozdíly mezi zuby jednotlivých studovaných skupin, které odrážejí způsob života studovaných jedinců, ale je třeba je dále interpretovat.

V návazné studii se Alvira, F. C. a kol. [109] opět věnoval studiu relativní koncentrace stroncia v zubní tkáni, přičemž byl využit femtosekundový LIBS s Ti:Safírovým laserem s pulzy o vlnové délce 800 nm a energii 700 μ J. Zuby byly seříznuty na 300 μ m podélné řezy. Vzniklé krátery měly průměr 50 μ m a byly sestaveny mapy s prostorovým rozlišením 300 μ m. Bylo zjištěno, že metoda je dostatečně citlivá, aby detekovala odchylky poměru Sr I/Ca I ve sklovině. Dále bylo odhadnuto, že femtosekundový LIBS má citlivost k detekci změn v intenzitách poměru Sr I/Ca I, které jsou menší než 5 %. Bylo uvedeno, že ze změn poměru Sr I/Ca I lze získat informace o průběhu života jedinců, ze kterých zuby pocházejí, k těmto závěrům je však nutná další detailní studie.

Fortes, J. F. a kol. [110] studovali zuby lidí, kteří zemřeli utonutím v mořské vodě. Ke generování plazmatu na povrchu vzorku byl použit Nd:YAG o vlnové délce 1 064 nm a laserovými pulzy o energii 50 mJ. Spektrometr snímal záření v rozsahu 370–470 nm. Na deseti vzorcích zubů zalitých v epoxidové pryskyřici a podélně seříznutých byla provedena analýza na 27 pozicích tvořící řadu kráterů vzdálených 250 μ m od sebe. Byly pozorovány spektrální rozdíly mezi dentínem a sklovinou, přičemž vyšší koncentrace stroncia byla lokalizována v dentinu. Dále byly vygenerovány mapy prostorové distribuce stroncia podél zubu s prostorovým rozlišením 550 μ m a krátery menšími než 500 μ m. Na každé pozici v mapě bylo snímáno 25 spekter. Pro porovnání byly analyzovány i zuby lidí, kteří umřeli jinou příčinou než utonutím. Ze všech případů byl obsah stroncia nejvyšší při smrti utopením (Obrázek 13). Byl proveden kontrolní experiment, jehož závěrem bylo možné vyloučit, že zvýšení obsahu stroncia v zubu je způsobeno pasivní difúzí z krve. Diagnóza utonutí může být nesmírně obtížná, zvláště když nejsou přítomny typické morfologické známky utonutí nebo když je tělo v pokročilém stadiu hniloby. Závěrem této studie bylo, že LIBS je pro tuto problematiku použitelný a umožňuje diagnózu příčiny smrti utopením v mořské vodě.



Obrázek 13. Prvkové mapy distribuce stroncia ($Sr\ I\ 407,77\ nm$) v lidských zubech (nahore utonutí v mořské vodě a dole jiné příčiny smrti). Na obrázku je vidět zvýšená koncentrace stroncia v zubech utonutých. Převzato a upraveno z Fortes a kol. [110].

Martinez, M. a kol. [111] se zaměřili na problematiku přípravy referenčních materiálů. Připravili čtyři hydroxyapatitové kalibrační materiály a pro ověření jejich použitelnosti analyzovali dva lidské zuby, které byly upevněny v epoxidové pryskyřici a podélně seříznuty. Měřicí sestava sestávala z 266 nm Nd:YAG laseru s pulzou o energii 15 mJ. Spektrometr snímal na spektrálním rozsahu 185 až 1 040 nm. Vzorek byl ofukován argonem rychlostí $1\ l \cdot min^{-1}$. Krátery měly velikost 100 μm a byly rozmístěny v matici se vzdáleností 215 μm mezi jednotlivými body. Byla detekována koncentrace stroncia v lidských zubech a díky kalibračním křivkám sestaveným pomocí měření kalibračních standardů byla provedena kvantifikace. Výsledky korelovaly s referenční metodou ICP-MS.

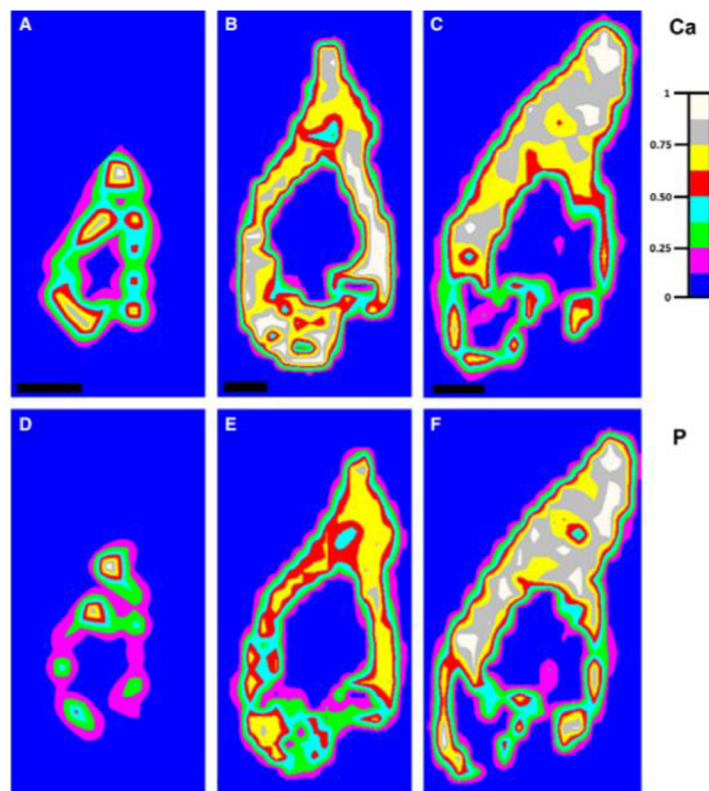
3.3 Prostorová analýza zvířecích tvrdých tkání metodou LIBS

Galiová, M. a kol. [44] optimalizovali DP-LIBS pro analýzu fosilních a novodobých hadích obratlů a onemocnění *osteitis deformans*. Dvoupulzní LIBS byl pro optimalizaci na zubních tkáních použit poprvé a úpravou parametrů bylo dosaženo velikosti kráteru 100 μm při použití Nd:YAG (266 nm) laseru s energií 10 mJ. Druhý Nd:YAG (1 064 nm) laser s 90 mJ pulzou byl veden paralelně s povrchem vzorku a oba laserové paprsky se setkaly 0,5 mm nad povrchem

matrice. Vzorčky obratlů byly před mapováním nařezány a upevněny v pryskyřici. Detekované bylo prostorové rozložení hliníku, železa, křemíku, fosforu a vápníku a velikost map byla 2 100 bodů, přičemž bylo dosaženo prostorové rozlišení 150 μm s průměrem kráterů do 100 μm . Jako kontrolní techniky byly použity roztoková analýza metodou ICP-MS za účelem stanovení celkové koncentrace vybraných prvků ve vzorcích a rentgenová mikrotomografie (X-ray mikro CT, z anglického *X-ray Microcomputed Tomography*) s cílem nedestruktivního zobrazení mikrostruktury fosilních vzorků. Koncentrace stopových prvků byly vyšší spíše ve větších plochách v obratli. Bylo dokázáno, že prvkové mapování kostní tkáně pomocí DP-LIBS je účinným nástrojem pro posuzování fázi *osteitis deformans* ve fosilních obratlích. V nemocné části obratle byl poměr Ca I/P I vyšší, což naznačovalo pozdní fázi onemocnění.

Galiová, M. a kol. [114] dále použili metody LIBS a LA-ICP-MS při prostorové analýze dentinu u prehistorického medvěda hnědého (*Ursus arctos*). Pro LIBS analýzu byl použit Nd:YAG laser o vlnové délce 532 nm a laserovými pulzy o energii 90 mJ. Spektra byla detekována ze spektrální oblasti 253–617 nm. Distribuce vybraných stopových prvků (stroncium, barya, železa, sodíku, hořčíku) a nejzastoupenějších prvků z matrice (vápníku a fosforu) byla měřena na příčném řezu medvědího špičáku, který nebyl upevněn, ale pouze naleštěn. Měření probíhalo na vzduchu za atmosférického tlaku. Prostorové rozlišení mapy bylo 500 μm a průměr kráterů byl 200 μm . Distribuce fosforu korelovala s distribucí vápníku, rozložení hořčíku bylo podobné sodíku a téměř homogenně distribuováno po řezu zubu. Dále byla vypočítána tvrdost vzorku za použití poměrů intenzity iontové a atomové spektrální čáry hořčíku: Mg II/Mg I (bylo možné použít i poměry vápníkových spektrálních čar Ca II/Ca I) napříč zubem. Pro ověření výpočtů tvrdosti vzorku byla tvrdost měřena také pomocí mikrotvrdoměru Vickers a hodnoty z obou způsobů měření spolu korelovaly. Bylo dokázáno, že LIBS i LA-ICP-MS lze úspěšně použít pro rychlou, prostorově rozlišenou analýzu vzorků prehistorických zubů a že poskytují podobné výsledky. Z archeologického hlediska bylo možné na základě těchto měření zrekonstruovat etologii fosilního medvěda hnědého (výživu, zdravotní stav a migraci).

Dosedělová, H. a kol. [113] zkoumali zuby chameleona metodou LIBS za účelem sledování změn akrodontního chrupu chameleona souvisejících s věkem. Měřicí sestava byla vybavena Nd:YAG laserem o vlnové délce 266 nm a energii laserového pulzu 10 mJ. Spektra byla snímána na třech spektrálních oknech s centrálními vlnovými délkami 251, 284 a 456 nm. Dolní čelisti chameleonů byly upevněny v parafínu a nařezány podélně. Velikost kráteru po dopadu laserového svazku byla 120 μm a krok mezi jednotlivými krátery byl 150 μm . V zubech byla studována ankylóza, což u chameleonů představuje běžný fyziologický jev při dospívání, a byly sledovány především změny morfologie zubní tkáně a minerálního složení (vápník, fosfor a hořčík) vedoucí k ankylóze. Distribuce všech třech prvků byla odlišná v různých oblastech tvrdých tkání a v místě dentinu a sousedící kosti došlo k výraznému nárůstu mineralizace (Obrázek 14). Vzorčky byly kromě metody LIBS analyzovány i pomocí X-ray mikro CT. Bylo zjištěno, že spojení zubu a kosti u chameleonů je výsledkem zvýšené produkce mineralizované tkáně během vývoje po vylíhnutí.



Obrázek 14. Prvkové mapy ilustrující rozložení vápníku (Ca I 452,69 nm) a fosforu (P I 253,56 nm) v dolní čelisti chameleonů. Měřítka značí 100 μm . Převzato a upraveno z Dosedělová a kol. [113].

3.4 Kvantitativní analýza zubů a kostí metodou LIBS

Shahedi, A. a kol. [115] zkoumal vliv olova na koncentraci ostatních prvků (železo, vápník, hořčík) ve vzorcích myších kostí. K analýze byl použit Nd:YAG laser o vlnové délce 1 064 nm a energii pulzů 160 mJ. Spektra byla detekována v rozsahu vlnových délek 115–920 nm. Vzorky kostí byly připraveny ze stehna laboratorních potkanů, kterým byl orálně podán octan olovnatý. Deset spekter bylo shromážděno z deseti různých míst na každém vzorku. Byl zjištěn pokles v intenzitě vápníkových a hořčíkových čar (iontových i atomových), který byl způsobený právě absorpcí olova do kostí. Nebyla zjištěna přímá souvislost koncentrace železa s ukládáním olova v kostech, bylo však pozorováno snížení množství železa v celé tkáni.

Alhasmi, A. M. a kol. [116] detekoval koncentrace toxických prvků přítomných v kořenech zubů kuřáků a nekuřáků trpících chronickou paradontózou a výsledky byly srovnány s kontrolní skupinou zdravých zubů. Pro měření byl využit Nd:YAG laser (266 nm) a laserovými pulzy o energii 40 mJ. Bylo detekováno záření plazmatu z 20 ablatovaných pozicí na každém zubu ve spektrálním rozsahu 200 až 900 nm. Vzniklé krátery měly průměr 120 μm . Byly určeny koncentrace tří vybraných prvků (olovo, kadmium a arsen) v jednotkách ppm. Správnost výsledků byla potvrzena referenční metodou (ICP-MS). Analýza metodou LIBS ukázala nejvyšší hladinu olova, kadmia a arsenu v zubech kuřáků, dokonce přesahující bezpečný limit. Vysoká koncentrace těžkých kovů byla detekovaná na povrchu kořenů, což bylo přisouzeno klinické ztrátě úponu. Kadmium a arsen byly také nalezeny na povrchu kořenů zubů nekuřáků, což bylo přisouzeno pasivnímu kouření a špatným hygienickým návykům.

Kasem, A. M. a kol. [117] použili LIBS k analýze archeologických kostí původem z Egypta za účelem zjištění stravovacích návyků tehdejších obyvatel. Měřicí sestava zahrnovala Nd:YAG laser o vlnové délce 1 064 nm a laserové pulzy měly energii 100 mJ. Spektra byla detekována na rozmezí vlnových délek 200–1 000 nm. Aby se zachovaly všechny informace o složení, byly všechny vzorky měřeny bez jakékoli úpravy jejich původního stavu. Detekováno bylo stroncium, bariem, hliník a olovo a matriční prvky fosfor a vápník. Výsledná spektra byla porovnána se spektry ze vzorků z půdy pohřebiště, odkud byly kosti odebrány, aby se tak mohly vyloučit možné kontaminace z okolního prostředí. Bylo zjištěno, že biologická degradace materiálu a absorpce prvků z prostředí mají velký vliv na výsledné získané prvkové složení, a je proto třeba tyto zmíněné faktory zahrnout do studií, které se stravovacími návyky zabývají. Měření poměrů Ca I/P I lze použít pro hodnocení biologické integrity kostí. Ve studii byl zjištěn dramatický pokles tohoto poměru se zvyšujícím se stářím kostí, což indikuje ztrátu biologické integrity kosti v důsledku diagenese. Poměry intenzit iontových a atomových spektrálních čar vápníku také klesaly se zvyšujícím se stářím vzorků, což souviselo se snižující se tvrdostí kostí.

3.5 Shrnutí poznatků z literatury

Metoda LIBS je vhodná pro použití při analýze prvkového složení zubů a dosahuje přitom velmi dobrých výsledků, jak bylo dokázáno ve výše uvedených studiích.

Pro přípravu vzorků zubů před měřením se většinou používá pouze seříznutí bez další úpravy či zalití do bloku pryskyřice a následné nabroušení a naleštění povrchu. V některých aplikacích byl použit pro uchycení i parafín, ale epoxid je z hlediska manipulace preferovaný. Také byly v literatuře uvedeny analýzy řezů zubů uchycených na podložním mikroskopickém sklíčku.

Ve většině studií byl použit laser o vlnové délce 1 064 nm a vzorky byly většinou měřeny na vzduchu za atmosférického tlaku. Pouze v jednom případě bylo při mapování použito ofukování proudem argonu. Co se týče energie laserového pulzu, nejčastěji byla jeho hodnota 10 mJ a výsledné prostorové rozlišení bylo 150 μm . V případě použití vyšší energie došlo i ke zvětšení velikosti kráterů, například při 50 mJ (resp. 90 mJ) byl průměr kráteru 500 μm (resp. 200 μm), ale tato závislost nebyla lineární. Prostorové rozlišení u uvedených článků nedosáhlo menší hodnoty než 100 μm . Vzhledem k tomu, že u měkkých biologických vzorků je běžné prostorové rozlišení při mapování mnohem menší (často kolem 30 μm), je dosažení lepšího prostorového rozlišení směr, kterým by se LIBS analýza zubů mohla dále ubírat.

Při identifikaci spektrálních čar ve spektrech je důležité, aby byly vybrány vhodné spektrální čáry, které nejsou ovlivněny samoabsorpcí ani příliš rozšířené např. Starkovým rozšířením. Je známo, že poměr Mg II/Mg I (popřípadě Ca II/Ca I) je indikátorem tvrdosti, protože tyto spektrální čáry nejsou do takové míry ovlivněny samoabsorpcí [113, 117]. Toto by mohlo být zajímavé při posuzování ankylózy v této diplomové práci, protože sklovina, dentin a kost by měly mít rozdílnou tvrdost.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité materiály

Argon, (čistota $\geq 99,996\%$), EC 231-174-0	SIAD, Praha, CZ
Isopropanol Kontakt IPA	KONTAKT CHEMIE, Iffezheim, DE
Stlačený vzduch na čištění DUST OFF 67	KONTAKT CHEMIE, Iffezheim, DE

4.2 Použité přístroje a software

Pro měření vzorků byly použity následující přístroje s uvedeným vybavením:

Optický mikroskop Olympus DSX510	Olympus, Waltham, USA
----------------------------------	-----------------------

Přístroj LIBS Discovery vybavený laserem Quantel CFR Ultra a tripletovou čočkou	CEITEC, Brno, CZ Lumibird, Les Ulis, FR Sill Optics, Wendelstein, DE
---	--

Přístroj FireFly s laserem Viron Quantel a laserem Standa	Lightigo, Brno, CZ Lumibird, Les Ulis, FR Standa Ltd., Vilnius, LT
---	--

spektrometr Czerny-Turner SR-500i-B2-R s detektorem iSTAR-sCMOS-18F-E3	Andor Technology, Belfast, IE Andor Technology, Belfast, IE
---	--

spektrometr AvaSpec-ULS2048CL-EVO s detektorem CMOS linear Image Sensor	Avantes, Apeldoorn, NL Avantes, Apeldoorn, NL
--	--

Pro měření vzorků byly použity tyto programy:

SpectraController	Lightigo, Brno, CZ
LIBS Navigator	CEITEC, Brno, CZ
Andor Solis	Oxford Instruments, Abingdon, GB

Pro zpracování dat byly použity tyto programy:

LIBS Analyzer	CEITEC, Brno, CZ
Lightigo ImageLab	Lightigo, Brno, CZ
Origin 2019	OriginLab, Northampton, USA

4.3 Pracovní postup

4.3.1 Příprava vzorků

Odebírání a příprava vzorků lidských a myších čelistí byla provedena externě bez mé účasti na níže uvedených odborných pracovištích. Vzorky pro tuto diplomovou práci byly dodány již připravené pro LIBS měření. Pro úplnost zde však uvádím celý postup jejich přípravy.

Lidské zuby s ankylózou

Lidské vzorky byly odebrány na zubní klinice Fakultní nemocnice sv. Anny (Brno, CZ) a Fakultní nemocnici v Ostravě (Ostrava, CZ). Všechny postupy byly prováděny podle protokolu schváleného Etickou komisí obou nemocnic. Extrakce zubů byla uskutečněna v lokální anestézii pacientů chirurgickými pákami a kleštěmi. V případě rozšířené ankylózy byly použity také další chirurgické nástroje, jako je například disektor, skalpel a řezačka kostí. Vzorky byly fixovány v 10% formaldehydu a připraveny pro histologickou analýzu. Každému pacientovi bylo provedeno rentgenové vyšetření a byl vyvolán rentgenový snímek. Všechny klinicky relevantní informace byly zaznamenány v dotaznících.

Lokalizace ankylózy byla provedena MDDr. Petrou Nevoránkovou. Pro vyhodnocení byla použita tato kritéria: ankylóza v jakékoli poloze zubu, vhodné vyhodnocení proměnných týkajících se pacientů včetně věku, pohlaví, zánětu dásní, periodontitidy, poranění, polohy zubu, léčby, oligodontie a dalších. Kromě toho byla použita tato vylučovací kritéria: absence údajů v jakékoli z proměnných, onkologičtí pacienti a těhotné ženy, absence podpisu informovaného souhlasu.

Myši čelisti

Myši samice z kmene ICR (z anglického *Institute of Cancer Research*) vážící mezi 16 až 24 g byly poskytnuty Masarykovou Univerzitou (Brno, CZ). Myši byly na začátku experimentu rozděleny do dvou skupin: kontrolní a exponované. Expozice myši probíhala inhalací v uzavřených klecích. Nanočástice olova byly připraveny na Ústavu analytické chemie AV ČR, v. v. i. (Brno, CZ) a v klecích byly generované do ovzduší. Celý proces expozice je podrobně popsán v Dumková, J. a kol. [118].

Při pitvách v různých časových obdobích experimentu se z myši vybraly reprezentativní vzorky. Před usmrcením se myši zvážily (v této části experimentu vážily zhruba 40 g). Dále byly uspány v chloroformu a usmrceny dislokací páteře. Celé dolní čelisti (zuby a kosti) byly poté vyjmuty při pitvě a byly očištěny od zbytků tkániva. Myši zuby byly ponechány v čelisti. Preparáty byly vymyty 4% formaldehydem, ve kterém byly následně ponechány v lednici do té doby než byly dále zpracovány.

Všechny výše popsané kroky byly provedeny na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v. v. i. (Brno, CZ). Vše bylo v souladu s experimentálními protokoly a pravidly schválenými Etickou komisí pro laboratorní zvířata Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v. v. i. (Liběchov, CZ).

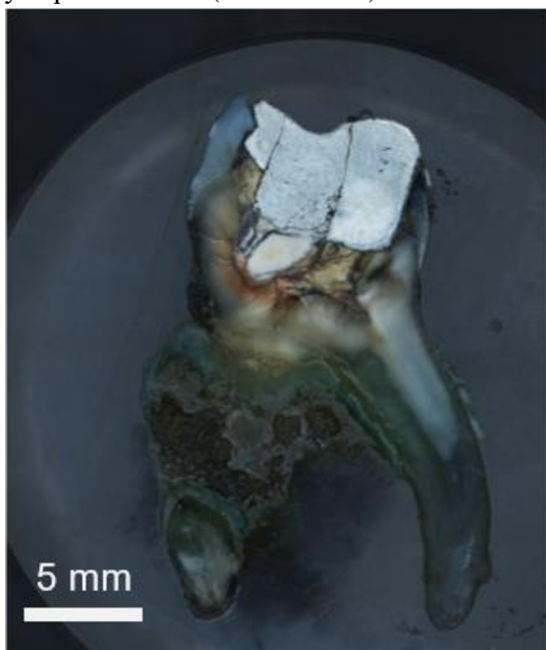
Celková koncentrace olova v myších zubech byla stanovena metodou ICP-OES na Masarykově Univerzitě (Brno, CZ). Pro analýzu metodou LIBS byly vybrány vzorky z kontrolní skupiny (označení Kontrola) (koncentrace olova pod LOD) a dále vzorky z myši exponovaných olovem po dobu 6 týdnů (označení PbO/6T), průměrná koncentrace: $(10,37 \pm 0,10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1})$, a vzorky z myši exponovaných olovem po dobu 9 týdnů (označení PbO/9T), průměrná koncentrace: $(14,81 \pm 0,10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1})$.

Upevnění vzorků v epoxidu

Zuby byly vyjmuty z formaldehydu, opláchnuty kohoutkovou vodou a umístěny do pece vyhřáté na 70 °C, kde byly ponechány po dobu 24 hodin. Epoxid byl nalit na zuby do silikonových forem velikosti od 30 mm do 40 mm v průměru (podle velikosti zubu), které byly

vymazány silikonovou pastou, aby se zamezilo přilepení epoxidu k formě. Vzorek byl umístěn do olejové vakuové pumpy na 15 min, aby došlo k vytlačení bublin podtlakem. Poté byl vzorek opět ponechán v peci na 70 °C do dalšího dne. Zatvrdlý vzorek byl vyjmut z formy a rozříznut napůl ve svíslé rovině, která procházela špičkou zubu, na řezačce kamenů Struers (Kodaň, DK) pomocí diamantového kotouče Dias Turnov (Turnov, CZ). Celý proces zalévání do epoxidu byl poté zopakován a obě poloviny zubu (označení A, B) byly nabroušeny pro dosažení rovné plochy na měření. Broušení probíhalo nasucho korundovým smirkovým papírem různé hrubosti (od E 120 po 2 400). Všechny výše popsané kroky byly provedeny na Katedře geologických věd Masarykovy univerzity (Brno, CZ).

Před samotným měřením byly na mikroskopu Olympus DSX510 zhotoveny snímky vzorků lidských zubů s 31násobným přiblížením (Obrázek 15).



Obrázek 15. Snímek vzorku lidského zubu 6A zalitého do epoxidu.

4.4 LIBS experimenty

4.4.1 Experimentální nastavení

Pro analýzu tvrdých tkání metodou LIBS byly využity dvě měřicí sestavy, Discovery a FireFly:

Discovery

Přístroj Discovery (Obrázek 16) byl vybaven pulzním Nd:YAG laserem Quantel CFR Ultra s vlnovou délkou 532 nm, délkou laserového pulzu 10 ns a opakovací frekvencí 20 Hz. Průměr laserového paprsku byl 7 mm. Laserové pulzy o energii 22 mJ byly zaměřeny přesně na povrch vzorku pomocí tripletové čočky s ohniskovou vzdáleností 24,5 mm, která umožnila zaostřit laserový paprsek na povrch vzorku. Emisní záření plazmatu bylo detekováno se zpožděním 500 ns širokouhlou optikou a vedeno optickým vláknem do vstupní štěrbině široké 50 μm spektrometru Czerny-Turner vybaveného mřížkou 1 200 linek $\cdot \text{mm}^{-1}$, což umožnilo pracovat na spektrálním rozsahu 25 nm. Centrální vlnová délka spektrometru Cz-T mohla být nastavena v rozmezí 180 až 900 nm podle detekovaných prvků. Spektra byla získána pomocí detektoru sCMOS.



Obrázek 16. Přístroj LIBS Discovery.

FireFly

V případě přístroje FireFly (Obrázek 17) byl použit diodově čerpaný pulzní laser Nd:YAG Viron Quantel o vlnové délce 1 064 nm s maximální délkou laserového pulzu 12 ns a opakovací frekvencí 50 Hz. Energie laserového pulzu byla 22 mJ a pulz byl zaostřen na povrch vzorku zaměřovací optikou. Dále byl použit i druhý laser Standa jehož vlnová délka byla 1 064 nm, opakovací frekvence 100 Hz (při současném snímání Cz-T a Avantesu byla použita frekvence 50 Hz) a energie laserových pulzů 1 mJ. Emisní záření plazmatu dopadalo na sběrnou optiku, která se skládala ze širokoúhlé 12 mm čočky a optického vlákna. Záření bylo dále vedeno do dvou spektrometrů a to: Czerny-Turner (stejný jako u Discovery sestavy) a spektrometr AvaSpec, který umožnil detekci v rozsahu vlnových délek 260 až 430 nm. Zpoždění detekce emisního záření plazmatu bylo 1 400 ns. Spektrální signál byl detekován pomocí CCD detektoru.



Obrázek 17. Měřicí sestava FireFly.

4.4.2 Mapování

Všechna měření LIBS probíhala v interakčních komorách každé z měřících sestav Discovery i FireFly. Vzorky byly umístěny na počítačem ovládaný motorizovaný podstavec, který umožnil posun na osách X, Y, Z. Posun podstavce byl u Discovery nastaven na 100 μm a pro přístroj FireFly byl 30 μm při použití laseru Viron Quantel a 16 μm při použití laseru Standa. Pro každé ablatované místo na vzorku bylo detekováno jedno spektrum kontinuálním mapováním.

Výsledné mapy měly prostorové rozlišení, odpovídající rozestupům mezi jednotlivými krátery, 100 μm (resp. 30 μm , 16 μm) v ose X i Y. Velikost mapy byla specifická pro každý vzorek, protože každý zub měl jinou velikost a byly měřeny celé zuby. Zobrazená plocha s největším počtem spekter dosahovala až $821 \times 1\,220$, což celkově odpovídalo 1 001 620 spektrům.

4.4.3 Postup měření

Po zapnutí přístroje byl ponechán čas (10 min), aby se zahřál laser. Před každým měřením bylo nutné očistit čočku isopropanolem. Dále byl vzorek zubu upevněn na pohyblivý stoleček tak, aby byl vodorovně po celé ploše. Argonová tryska byla nastavena tak, aby mířila na povrch vzorku a lokálně nahradila atmosféru vzduchu, ale přitom nestínila sběrné optice. Komora byla pevně uzavřena. Dále byly v programu LIBS Navigator nastaveny příslušné parametry pro každou měřicí sestavu, viz. kapitola 4.4.1. Při zachování všech parametrů došlo k postupnému proměření všech vzorků zubů v epoxidu. Po dokončení měření a uložení dat byla komora vyčištěna stlačeným vzduchem a byla znovu vyčištěna čočka i stoleček isopropanolem.

4.4.4 Optimalizace měření

Před samotným měřením byla optimalizována atmosféra v interakční komoře. Atmosféra měření byla optimalizovaná na přístroji Discovery a vzorky lidských zubů byly změřeny na vzduchu, v atmosféře argonu a při ofukování komory argonovým proudem rychlostí $9\text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$ za současného odtahu. Při měření v atmosféře argonu byl z komory nejprve vyčerpán vzduch a poté do ní byl načerpán argon. Pro zajištění co nejčistší atmosféry argonu byl celý proces zopakován. V každé z uvedených atmosfér byly proměřeny 2 vzorky zubů dvěma následnými měřeními každého zubu. První měření bylo zaměřeno na detekci fosforu a uhlíku (centrální vlnová délka 247 nm) a druhé na detekci vápníku a hořčíku (centrální vlnová délka 393 nm).

Výsledky optimalizace byly vyhodnoceny z hlediska intenzity signálu a na základě toho byly stanoveny optimální podmínky pro měření všech vzorků zubů. Ostatní parametry měření (energie, zpoždění detekce emisního záření, šířka štěrbiny a vzdálenost mezi krátery) byly nastaveny na základě doporučení vedoucího Laboratoře laserové spektroskopie doc. Ing. Pavla Pořízky, Ph.D. a Ing. Davida Procházky, Ph.D., kteří mají oba bohaté zkušenosti s analýzou biologických vzorků, především zubů a kostí.

4.4.5 Lidské zuby s ankylozou

Na sestavě Discovery byly provedeny dvě následná měření každého zubu. Druhé měření bylo provedeno na ablatované ploše stejného rozměru jako při prvním měření. Na měřicí sestavě FireFly bylo pro každý zub provedeno pouze jedno měření, protože pro tento přístroj bylo možné snímání na dvou spektrometrech současně. Na spektrometru Avantes bylo měřeno celé spektrum 260–430 nm pro detekci hořčíku a vápníku. Na spektrometru Cz-T byl analyzovaný spektrální rozsah s centrální vlnovou délkou 247 nm pro detekci uhlíku a fosforu.

Tabulka 2. Seznam vzorků lidských zubů, jejichž výsledky budou ukázány v této práci. Označení A a B je pro dvě poloviny stejného zubu. V tabulce jsou uvedeny následující parametry měření: souřadnice X a Y označující velikost mapy pro každý vzorek, celkový počet spekter pro každou mapu a měřené prvky

Discovery: prostorové rozlišení 100 μm			
označení vzorku	souřadnice X a Y	celkový počet spekter	měřené prvky
1A	170 \times 242	41 140	C, P, Ca
2A	112 \times 213	23 856	C, P, Ca
3A	100 \times 228	22 800	C, P, Ca
4A	95 \times 165	15 675	C, P, Ca
5A	126 \times 179	22 554	C, P, Ca
FireFly: prostorové rozlišení 30 μm, laser Viron Quantel			
označení vzorku	souřadnice X a Y	celkový počet spekter	měřené prvky
3B	355 \times 753	267 315	C, P, Mg, Ca
4B	343 \times 532	182 476	C, P, Mg, Ca
5B	431 \times 592	255 152	C, P, Mg, Ca
6A	495 \times 748	370 260	C, P, Mg, Ca
FireFly: prostorové rozlišení 16 μm, laser Standa			
označení vzorku	souřadnice X a Y	celkový počet spekter	měřené prvky
7A	821 \times 1 220	1 001 620	Mg, Ca
7B	1 082 \times 576	623 232	C, P, Mg, Ca

4.4.6 Myší čelisti

Myší tvrdé tkáně byly měřeny na přístroji Discovery. Nejprve byla provedena kontrolní měření pro srovnání spekter olova pro budoucí identifikaci spektrálních čar a výběr nejvhodnější vlnové délky pro detekci olova. Tato měření byla provedena na vzorku celulózové peletky s příměsí kousků olova. Centrální vlnové délky spektrometru Cz-T byly postupně nastaveny na 368 nm a 405 nm a proměřeny za stejného nastavení jako při měření lidské zubní tkáně na Discovery s tím rozdílem, že nebylo provedeno kontinuální měření, ale akumulace spekter z různých pozic na vzorku. Z jednoho místa vždy bylo akumulací z pěti laserových pulzů detekováno jedno spektrum. Optimální vlnová délka poté byla vybrána na základě nejvyšší intenzity, tvaru spektra a možné interference s dalšími detekovanými prvky.

Dále byla provedena samotná měření myších čelistí. Vzorky myších tvrdých tkání byly mapovány za stejných podmínek jako během mapování vzorků lidských zubů na měřicí sestavě Discovery a FireFly s laserem Standa. Centrální vlnová délka spektrometru Cz-T odpovídala vhodné vlnové délce pro detekci olova, zjištěné při optimalizaci na celulózové peletce.

Tabulka 3. Seznam vzorků myších čelistí, jejichž výsledky z měření jsou ukázány v této práci. V tabulce jsou uvedeny následující parametry měření: souřadnice X a Y označující velikost mapy pro každý vzorek, celkový počet spekter pro každou mapu a měřené prvky

Discovery: prostorové rozlišení 100 μm			
označení vzorku	souřadnice X a Y	celkový počet spekter	měřené prvky
PbO/6T	30 \times 36	1 080	Ca, Pb
PbO/9T	65 \times 122	7 930	Ca, Pb
FireFly: prostorové rozlišení 16 μm, laser Standa			
označení vzorku	souřadnice X a Y	celkový počet spekter	měřené prvky
Kontrola	335 \times 735	246 225	Mg, Ca

4.5 Zpracování dat

Data ve formě spekter byla nahrána do programu LIBS Analyzer, kde se jednotlivým spektrům z příslušných pozic na vzorku přiřadily souřadnice X a Y. V tomto formátu se spektra uložila a byla nahrána do programu Lightigo ImageLab, kde byly analyzovány jednotlivé spektrální čáry.

K rozpoznání a přiřazení spektrálních čar ze získaných spekter ke konkrétním prvkům byla použita databáze NIST [23]. Všechny detekované a identifikované spektrální čáry prvků jsou uvedeny v Tabulce 4. Dále byly vybrány spektrální čáry hledaných prvků, které nás zajímaly pro další analýzu. Pro každou spektrální čáru byla vypočtena intenzita a následně byla sestavena mapa intenzity signálu v závislosti na souřadnicích. Také byly vypočteny podíly intenzit spektrálních čar a tyto hodnoty byly vyneseny do map.

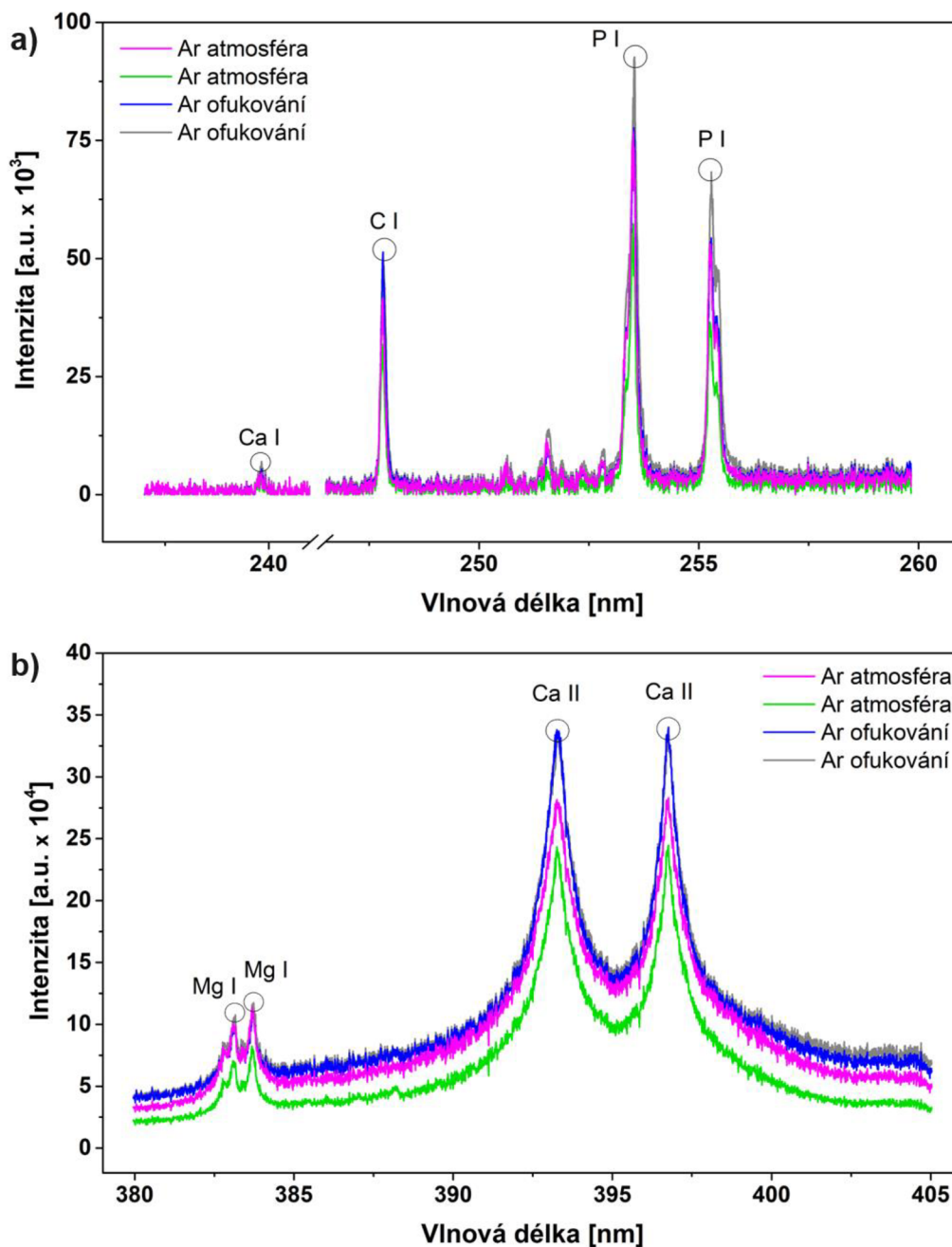
Tabulka 4. Seznam identifikovaných detekovaných spektrálních čar prvků s příslušnými parametry (λ – vlnová délka, A_{ki} – Einsteinův koeficient, E_i – dolní hranice ionizační energie, E_k – horní hranice ionizační energie).

spektrální čára	λ [nm]	A_{ki} [s^{-1}]	E_i [eV]	E_k [eV]
C I	247,86	$2,80 \cdot 10^8$	2,684 0	7,684 8
Fe I	252,28	$2,13 \cdot 10^8$	0,000 0	4,913 0
P I	253,56	$9,50 \cdot 10^7$	2,324 5	7,212 7
P I	255,33	$7,10 \cdot 10^7$	2,321 3	7,175 8
Mg II	279,55	$2,60 \cdot 10^8$	0,000 0	4,433 8
Mg II	280,27	$2,57 \cdot 10^8$	0,000 0	4,422 4
Mg I	285,21	$4,91 \cdot 10^8$	0,000 0	4,345 8
Si I	288,17	$2,17 \cdot 10^8$	0,781 0	5,082 3
Ca II	315,89	$3,10 \cdot 10^8$	3,123 3	7,047 2
Zn I	330,25	$1,20 \cdot 10^8$	3,000 0	5,000 0
Zn I	334,50	$1,70 \cdot 10^8$	5,000 0	7,000 0
Pb I	357,27	$9,90 \cdot 10^7$	–	–
Pb I	363,96	$3,40 \cdot 10^7$	0,969 5	4,375 1
Hg I	368,02	–	5,460 6	8,828 6
Pb I	368,35	$1,50 \cdot 10^8$	0,969 5	5,710 8
Ca II	370,60	$8,80 \cdot 10^7$	3,123 3	6,467 9
Ca II	373,69	$1,70 \cdot 10^8$	3,151 0	6,467 9
Pb I	373,99	$7,30 \cdot 10^7$	2,660 4	5,974 6
Mg I	382,94	$8,99 \cdot 10^7$	2,709 1	5,945 9
Ca II	393,37	$1,47 \cdot 10^8$	0,000 0	3,151 0
Pb I	405,78	$8,90 \cdot 10^7$	1,320 5	5,711 8
Sr II	407,77	$1,41 \cdot 10^8$	0,000 0	3,039 7
Ca I	422,67	$2,18 \cdot 10^8$	0,000 0	2,932 5

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Optimalizace atmosféry měření

Na Obrázku 18 lze vidět průměrná spektra z jednotlivých měření v atmosféře argonu (zub 1A, 3A) a při ofukování komory proudem argonu rychlostí $9\text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$ (zub 2A, 4A). Zuby byly měřeny na měřicí sestavě Discovery s prostorovým rozlišením $100\ \mu\text{m}$ na spektrometru Cz-T s centrálními vlnovými délkami 247 nm a 393 nm. Uvedená spektra jsou průměrné hodnoty pro celou plochu zuby (signál detekovaný z epoxidu započítaný nebyl).



Obrázek 18. Srovnání spektrálních rozsahů pro centrální vlnovou délku a) 247 nm, b) 393 nm při měření na Discovery sestavě s prostorovým rozlišením $100\ \mu\text{m}$ v argonové atmosféře (spektrum ze zuby 1A je vyneseno růžovou linkou, spektrum ze zuby 3A zelenou linkou) a za ofukování proudem argonu (spektrum ze zuby 2A je vyneseno modrou linkou, spektrum ze zuby 4A je vyneseno šedou linkou).

Nejlepších výsledků bylo dosaženo při měření vzorků na vzduchu s proplachováním interakční komory argonem, což se projevilo zvýšením intenzity spektrální čáry fosforu (P I 255,33 nm) a uhlíku (C I 247,86 nm) na Obrázku 18 a) a především vápníku (Ca II 393,37 nm) na Obrázku 18 b). Také se zlepšila stabilita měření, protože obě spektra měřená při ofukování proudem argonu měla stejný průběh, zatímco spektra měřená v argonové atmosféře se lišila dosaženou intenzitou (Obrázek 18 b). Pro posouzení stability a reprodukovatelnosti měření by však bylo třeba provést analýzu pro více vzorků, zde byly uvedeny výsledky pouze pro 4 vzorky, kvůli jejich omezenému množství.

Lepší výsledky při ofukování proudem argonu mohou být způsobeny tím, že je vytvořena lokální koncentrovaná argonová atmosféra přímo na povrchu vzorku v místě ablace, zatímco v případě argonové atmosféry může dojít ke smísení atmosféry se vzduchem a jejímu naředění. Při ofukování proudem argonu je navíc zajištěn kontinuální přísun argonu a zároveň se tak dá zabránit znečištění čočky ablatovaným materiálem, který je díky tomu odfukován z místa ablace. Ve srovnání s měřením za argonové atmosféry je také celá analýza rychlejší, protože nemusí dojít k časově náročnému vyčerpání komory. Z těchto důvodů bylo pro další měření lidských a myších zubů dále použité ofukování proudem argonu.

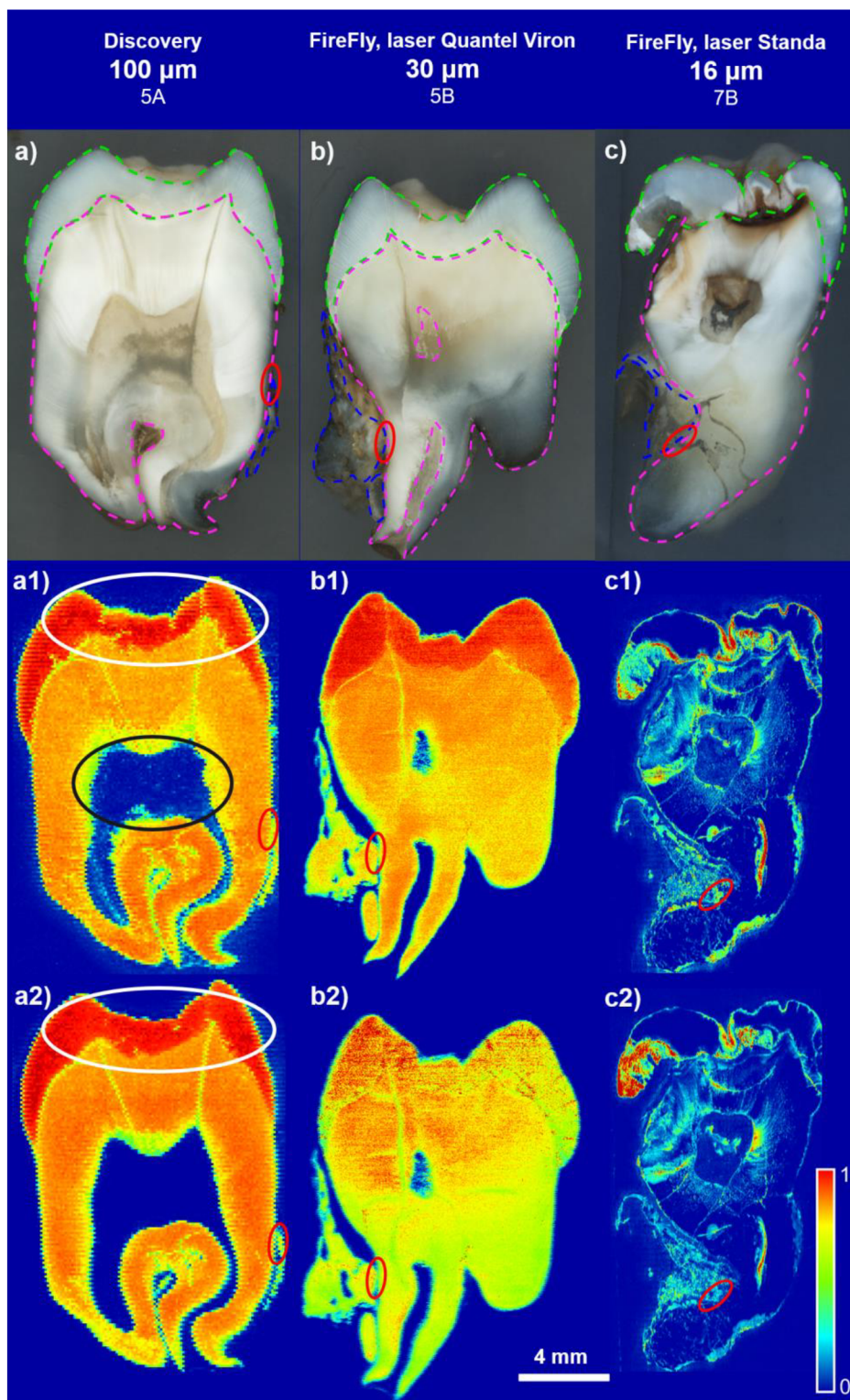
5.2 Lidské zuby s ankylózou

Srovnání prostorového rozlišení

Na Obrázku 19 a1), b1), c1) je vidět srovnání prostorového rozlišení získaných map prostorové distribuce vápníku (Ca II 373,69 nm) a na Obrázku 19 a2), b2), c2) fosforu (P I 255,33 nm) na třech vzorcích zubů (5A na Obrázku 19 a), 5B na Obrázku 19 b), 7B na Obrázku 19 c). Při nejmenším dosaženém prostorovém rozlišení 16 μm pro mapy prostorové distribuce ze zubu 7B (Obrázek 19 c1), c2) byly vidět jemné struktury v zubu, to však bylo dosaženo na úkor citlivosti detekce (pro toto prostorové rozlišení byl použit laser Standa o relativně nízké energii laserového pulzu 1 mJ). Systematická chyba u tohoto měření byla vyloučena při jeho zopakování pro druhou půlku analyzovaného zubu (7A) v rozmezí 21 dní od prvního měření, přičemž bylo dosaženo stejného výsledku při vynesení prostorové distribuce prvků.

Mezi citlivostí měření a prostorovým rozlišením je nutné dosáhnout kompromisu, což bylo nejvíce umožněno při prostorovém rozlišení 30 μm u zubu 5B (Obrázek 19 b1), b2) analyzovaného na měřicí sestavě FireFly. Tato měřicí sestava s laserem Quantel Viron o energii laserového pulzu 22 mJ umožňuje detekovat vzorky s výborným prostorovým rozlišením zároveň na dvou spektrometrech, a proto byly dále ukázány a vyhodnoceny výsledky z měření na této sestavě.

Je třeba zmínit, že u měření vápníku (Ca II 373,69 nm) při 100 μm prostorovým rozlišením pro vzorek 5A je mapa (Obrázek 19 a1) výrazně ovlivněna tím, že analýza probíhala na již ablatovaném povrchu z předchozího měření fosforu (P I 255,33 nm). Lze vidět, že zřejmě došlo ke znečištění povrchu vzorku ablatovaným materiálem, protože byl vápník částečně detekovaný i z oblasti kořenového kanálku (Obrázek 19 a1), vyznačeno černou křivkou), kde by se měl nacházet pouze epoxid. Prostorové rozlišení 100 μm však plně postačí na odlišení základních částí lidského zubu, jako je sklovina a dentin (Obrázek 19 a1), a2), vyznačeno bílou křivkou).



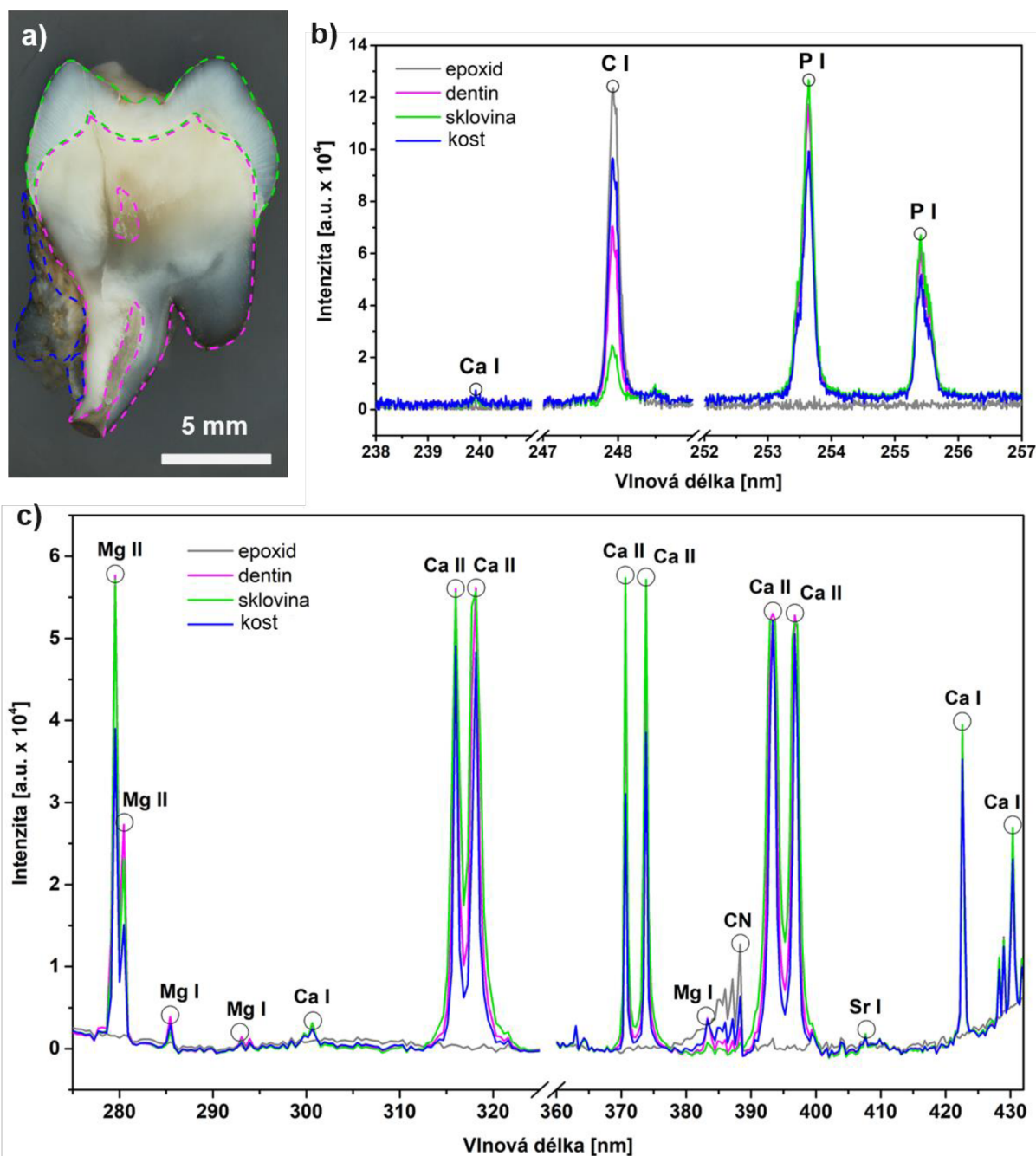
Obrázek 19. Porovnání prvkových map zubů s různým prostorovým rozlišením. a) Fotografie zubu 5A měřeného s prostorovým rozlišením 100 μm na sestavě Discovery, b) fotografie zubu 5B měřeného s prostorovým rozlišením 30 μm na sestavě FireFly, c) fotografie zubu 7B měřeného s prostorovým rozlišením 16 μm na sestavě FireFly. Zelenou konturou je označena oblast skloviny, růžovou konturou oblast dentinu a modrou konturou je označena oblast kosti. Pro každý zub jsou vyneseny mapy prvkové distribuce vápníku (Ca II 373,69 nm) – a1), b1), c1); a fosforu (P I 255,33 nm) – a2), b2), c2). Na mapě a1) a a2) je bílou křivkou označena oblast skloviny a dentinu; na mapě a1) je černou křivkou označena oblast kořenového kanálku.

Spektrální analýza

Charakteristická spektra z měření lidských zubů měřící sestavou FireFly s laserem Quantel Viron při prostorovém rozlišení 30 μm a detekcí spektrometrem Avantes jsou uvedena na Obrázku 20 c). Spektrální rozsah 260 až 430 nm byl v grafu pro lepší přehlednost zkrácen, aby byly vidět především detekované prvky hořčík (Mg II 279,55 nm; Mg I 382,33 nm) a vápník (Ca II 373,69 nm; Ca I 422,67 nm). Spektra detekovaná spektrometrem Cz-T s centrální vlnovou délkou 247 nm jsou zobrazena na Obrázku 20 b). Detekována byla spektra z jednotlivých částí (epoxid, dentin, sklovina, kost) vzorku zubu 5B (Obrázek 20 a). Spektrum z každé části odpovídá průměrnému signálu z celé oblasti a je v grafu vyneseno příslušnou barvou, jakou je vyznačená celá oblast na Obrázku 20 a).

Ve spektru z epoxidové pryskyřice lze na Obrázku 20 c) vidět typický molekulový přechod CN 386 nm. Kromě píku na 360 nm, který se nepodařilo identifikovat, zde nejsou vidět žádné další zřetelné píky, čímž se spektrum epoxidu výrazně odlišuje od ostatních spekter ze vzorku. Spektrum ze skloviny, dentinu i kosti na Obrázku 20 c) má podobný vzhled, ale liší se intenzitami jednotlivých spektrálních čar. Iontová spektrální čára hořčíku (Mg II 279,55 nm) je podobně intenzivní v dentinu i ve sklovině, ale iontová spektrální čára hořčíku (Mg I 280,27 nm) má vyšší intenzitu v dentinu. To může být způsobeno ionizačními procesy, ke kterým v plazmatu dochází. Obě iontové spektrální čáry hořčíku pak mají nižší intenzitu v kosti a nejsou vůbec přítomny v epoxidu. Atomové spektrální čáry hořčíku (Mg I 285,21 nm; Mg I 382,94 nm) mají podobný průběh, nejvíce intenzivní jsou v dentinu a kosti, nejméně ve sklovině a v epoxidu se nenachází. Vápník má v tomto rozmezí vlnových délek (Obrázek 20 c) zastoupených mnoho spektrálních čar, které se liší intenzitou přechodu, ale z hlediska zastoupení v jednotlivých částech zubu jsou velmi podobné. Nejintenzivnější jsou iontové spektrální čáry Ca II 370,60 nm a Ca II 373,69 nm. Spektrální čára Ca II 393,37 nm a Ca II 396,85 nm je ovlivněna samoabsorbací a saturací signálu. Z atomových spektrálních čar je nejvíce intenzivní Ca I 422,67 nm. Vápníkové spektrální čáry jsou nejvíce zastoupeny ve sklovině a poté v dentinu, menší signál je detekovaný z oblasti kosti a v epoxidu (stejně jako v případě hořčíku) nejsou přítomné vůbec.

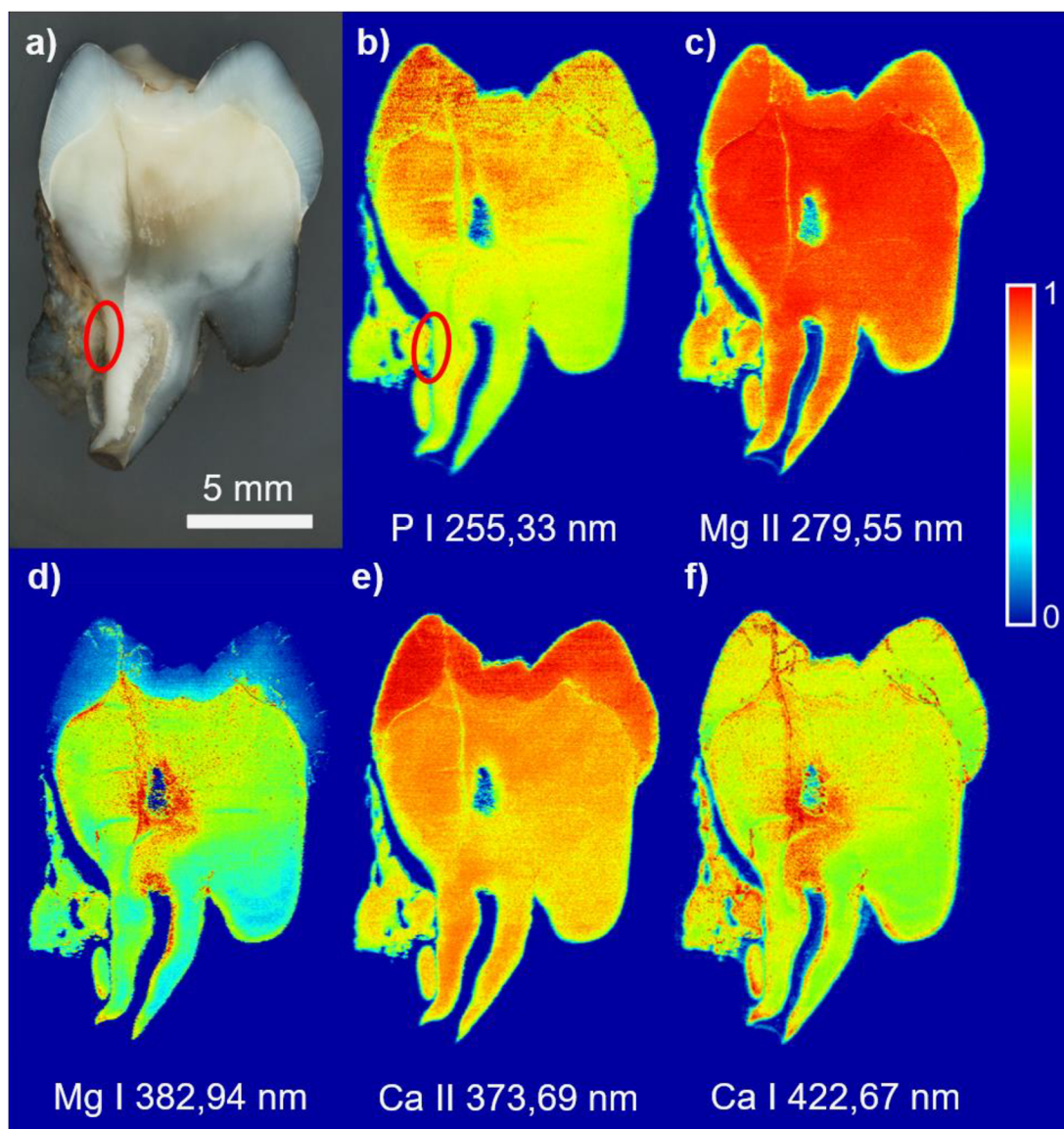
V zubní tkáni byl dále detekovaný fosfor (P I 253,56 nm; P I 255,33 nm) (Obrázek 20 b), z těchto dvou atomových spektrálních čar je intenzivnější P I 253,56 nm, což odpovídá, protože tato spektrální čára má za podobných hodnot ionizačních energií vyšší pravděpodobnost přechodu. Spektrální čáry fosforu vystupují nejintenzivněji ve spektru dentinu, o něco méně ve sklovině i kosti a nejsou zastoupeny v epoxidu. Ve spektrálním rozsahu na Obrázku 20 b) byl detekován i uhlík (C I 247,86 nm), který je zastoupený v obou hlavních částech matrice vzorku: epoxidu i v samotné zubní tkáni. Ze srovnání spekter epoxidu a jednotlivých částí zubu lze vidět, že intenzita spektrální čáry, a tedy i relativní koncentrace uhlíku, je několikanásobně vyšší v epoxidu. O něco menší intenzita je detekovaná v kosti, poté v dentinu a nejméně intenzivní je spektrální čára uhlíku přítomná ve spektru ze skloviny.



Obrázek 20. a) Fotografie zubu 5B před LIBS analýzou, označené jednotlivé části zubů (dentin – růžová, sklovina – zelená, kost – modrá). Ukázka průměrných spekter z jednotlivých částí zubu (epoxid – šedá, dentin – růžová, sklovina – zelená, kost – modrá) pro měření na FireFly s laserem Quantel Viron při prostorovém rozlišení 30 μm a spektrometrem b) Cz-T s centrální vlnovou délkou 247 nm; c) Avantes

Distribuce prvků v zubní tkáni

Prostorové rozložení vybraných detekovaných prvků: fosforu (P I 255,33 nm), hořčíku (Mg II 279,55 nm; Mg I 382,94 nm) a vápníku (Ca II 373,69 nm; Ca I 422,67 nm) je zobrazeno na Obrázku 21 b)–f). Zde je uveden příklad pro zub označený 5B (Obrázek 21 a), v příloze jsou pak uvedeny mapy ostatních vzorků zubů 3B (Obrázek 30), 4B (Obrázek 31) a 6A (Obrázek 32).



Obrázek 21. *Prostorová distribuce prvkového složení pro zub 5B měřený na sestavě FireFly s laserem Quantel Viron při prostorovém rozlišení 30 μm . a) Fotografie zubu 5B před LIBS měřením. Oblast ankylotického spojení je vyznačena červeně. b) Mapa distribuce fosforu (P I 255,33 nm); měřená na spektrometru Cz-T. c)–d) Mapa distribuce hořčíku (Mg II 279,55 nm; Mg I 382,94 nm) a e)–f) mapa distribuce vápníku (Ca II 373,69 nm; Ca I 422,67 nm); měřeno na spektrometru Avantes.*

Z map distribuce fosforu (P I 255,33 nm) na Obrázku 21 c) v zubní tkáni lze vidět, že ve sklovině je nejvyšší intenzita signálu spektrální čáry fosforu ve srovnání s dentinem a kostí. V dentinu rozložení fosforu není homogenní, postupně klesá směrem ke kořenům. V kořenech je pak podobná intenzita jako v kosti. Dále jsou zde uvedeny výsledky prostorové analýzy rozložení hořčíku (Mg II 279,55 nm; Mg I 382,94 nm) (Obrázek 21 c)–d) v tkáni zubu 5B lze vidět, že v dentinu je jeho koncentrace vyšší než ve sklovině, což je nejvýraznější u atomové spektrální čáry. Toto rozložení hořčíku v zubu se shoduje s výsledky z jiných článků [119]. V kosti je koncentrace hořčíku podobná jako ve spodních částech zubu, ve srovnání s dentinem je zde průměrně nižší intenzita. Vápník (Ca II 373,69 nm; Ca I 422,67 nm) (Obrázek 21 e)–f) se nachází především ve sklovině, jak lze vidět z rozložení na mapě vynesené z intenzity iontové spektrální čáry (Ca II 373,69 nm). Jak bylo zmíněno v kapitole 2.6.1, hydroxyapatit je nejvíce zastoupený ve sklovině, proto je zde pozorovaná vyšší koncentrace fosforu a vápníku,

ze kterých se skládá. Tyto výsledky se shodují s jinými studii zabývajícími se zobrazováním prostorového zastoupení prvků [120]. Iontová spektrální čára vápníku (Ca II 373,69 nm) je méně intenzivní v kosti. Je zajímavé, že u atomové spektrální čáry vápníku (Ca I 422,67 nm) je distribuce vápníku víceméně homogenní napříč celým zubem, kromě oblasti u kořenového kanálku, kde je mírně zvýšená intenzita. Obě atomové spektrální čáry hořčíku i vápníku ukázaly zvýšenou intenzitu v oblasti povrchu skloviny, kde zvýrazňují malé praskliny. Mohlo by jít o praskliny stejného druhu jako viditelná rýha v zubní tkáni, která je přítomná skrz celý střed zubu. Praskliny pochází pravděpodobně z namáhání zubní tkáně, buď vlivem opotřebení v průběhu života nebo pocházející z odebírání vzorků a jejich řezání.

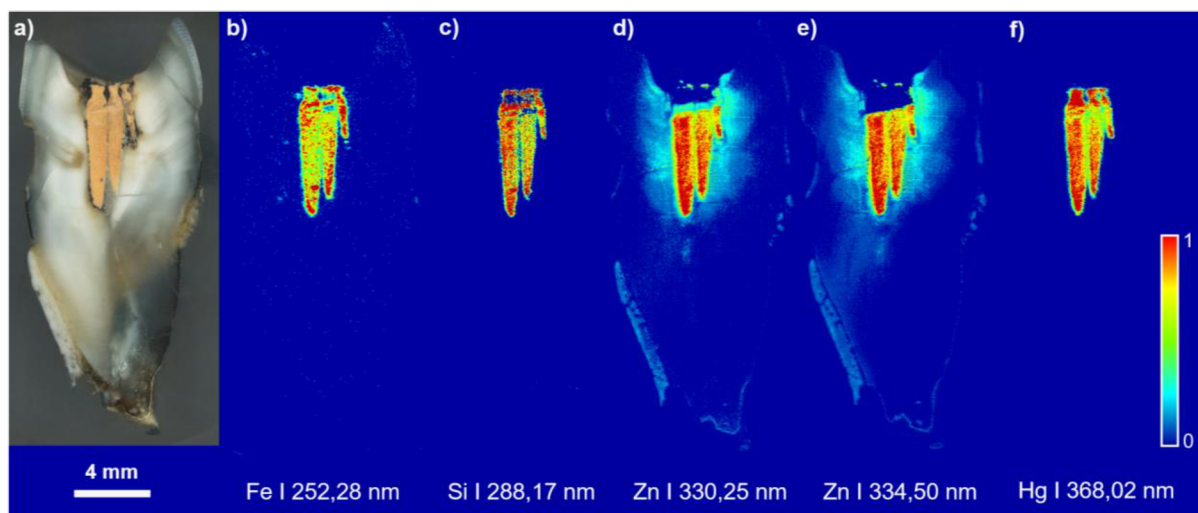
Všechny zobrazené atomové spektrální čáry mají nejnižší intenzitu v oblasti kořene a v oblasti kosti. Může to být způsobené tím, že kořen resorpcí přeměňuje svou strukturu a částečně se mění i jeho prvkové zastoupení, které je více podobné kostní tkáni. Další důvod může být to, že je kořen hodně zbroušený a je tam pouze slabá vrstva dentinu, která oproti silnější vrstvě ve středu zubu vykazuje menší intenzitu signálu. Toto tvrzení podporuje i to, že na obrázku zubu 5B (Obrázek 21 a) z mikroskopu je kořen tmavší než zbylá část zubu a že na okrajích zubu je nižší intenzita všech prvkových čar. Červenou křivkou je na Obrázku 21 a) vyznačena oblast, kde je podezření na ankylotické spojení kosti se zubem. U mapy prostorové distribuce fosforu se toto spojení potvrdilo a ze všech prvků je zde nejlépe viditelné (vyznačeno na Obrázku 21 b), ale i u ostatních prvků ho lze částečně pozorovat. Ankylóza byla také pozorována u zubu 3B (Obrázek 30), zde byly nejlepší výsledky pro hořčíkové a vápníkové spektrální čáry. Ankylotické spojení se v zubech 3B a 5B zřejmě nachází minimálně na jednom místě a je třeba ho dále ověřit.

Zubní výplně

V některých vzorcích lidských zubů (3B na Obrázku 30 a) a 6A na Obrázku 32 a) byla přítomná zubní výplň. Emisní čáry jednotlivých kovů ze zubní výplně byly velmi hustě zastoupené ve spektru a v některých případech i interferovaly s detekovanými spektrálními čarami prvků zubní matrice (například spektrální čára rtuti Hg II 253,65 nm z amalgámu a spektrální čára fosforu P I 253,57 nm ze zubní tkáně). Pokud by byla vynesena do mapy intenzita takové spektrální čáry, která interferuje se spektrální čarou jiného prvku, nebude zobrazený výsledek vypovídající, protože bude mapa zobrazovat zastoupení obou prvků. Kvůli tomu bylo třeba pečlivě vybrat spektrální čáry matričních analytů, které se dále použijí pro generaci map.

Na Obrázku 22 b)–f) jsou uvedeny výsledky prostorové analýzy kovů ve výplni zubu s označením 3B (Obrázek 22 a). Bylo zjištěno, že zubní výplně jsou tvořeny ze dvou různých materiálů lišících se prvkovým složením, z nichž jeden je plomba z amalgámu a druhý (umístěný pod ní) zubní cement. Nejintenzivnější spektrum vykazoval právě amalgám, který obsahuje výrazné zastoupení kovů (např. rtuť, železo, mangan, zinek, křemík). Křemík (Si I 288,17 nm) (Obrázek 22 c) a rtuť (Hg I 368,02 nm) (Obrázek 22 f) jsou lokalizovány pouze v zubní výplni a pravděpodobně nedošlo k jejich migraci do zubní tkáně. Jak lze vidět na Obrázku 22 d), e) zinek (Zn I 330,25 nm; Zn I 334,50 nm) je intenzivně zastoupený v amalgámu a poté je obsažen i v zubní tkáni kolem výplně a zřetelně i v kosti. To může být způsobeno migrací prvku z plomby a jeho včleněním se do tvrdé matrice zubu, protože je detekován hlavně kolem samotné plomby. Jak je vidět na Obrázku 22 b) železo (Fe I 252,28 nm) bylo kromě zubní výplně detekováno slabě i na několika místech v horní části zubu 3B. To může být

pravděpodobně způsobeno znečištěním vzorku tímto prvkem během přípravy. Zřejmě nejde o migraci prvků ze zubní výplně, protože pak by byla očekávaná distribuce podobně jako u zinku v těsné blízkosti amalgámu. Migrace kovů z výplně do zubní tkáně je zajímavý jev, který už byl pozorován v jiných studiích, např. pro hliník [108]. Pro ustanovení jednoznačných závěrů pro migraci kovů je v této práci však provedené měření nedostatečné a je třeba se této problematice systematicky věnovat v budoucích klinických studiích.

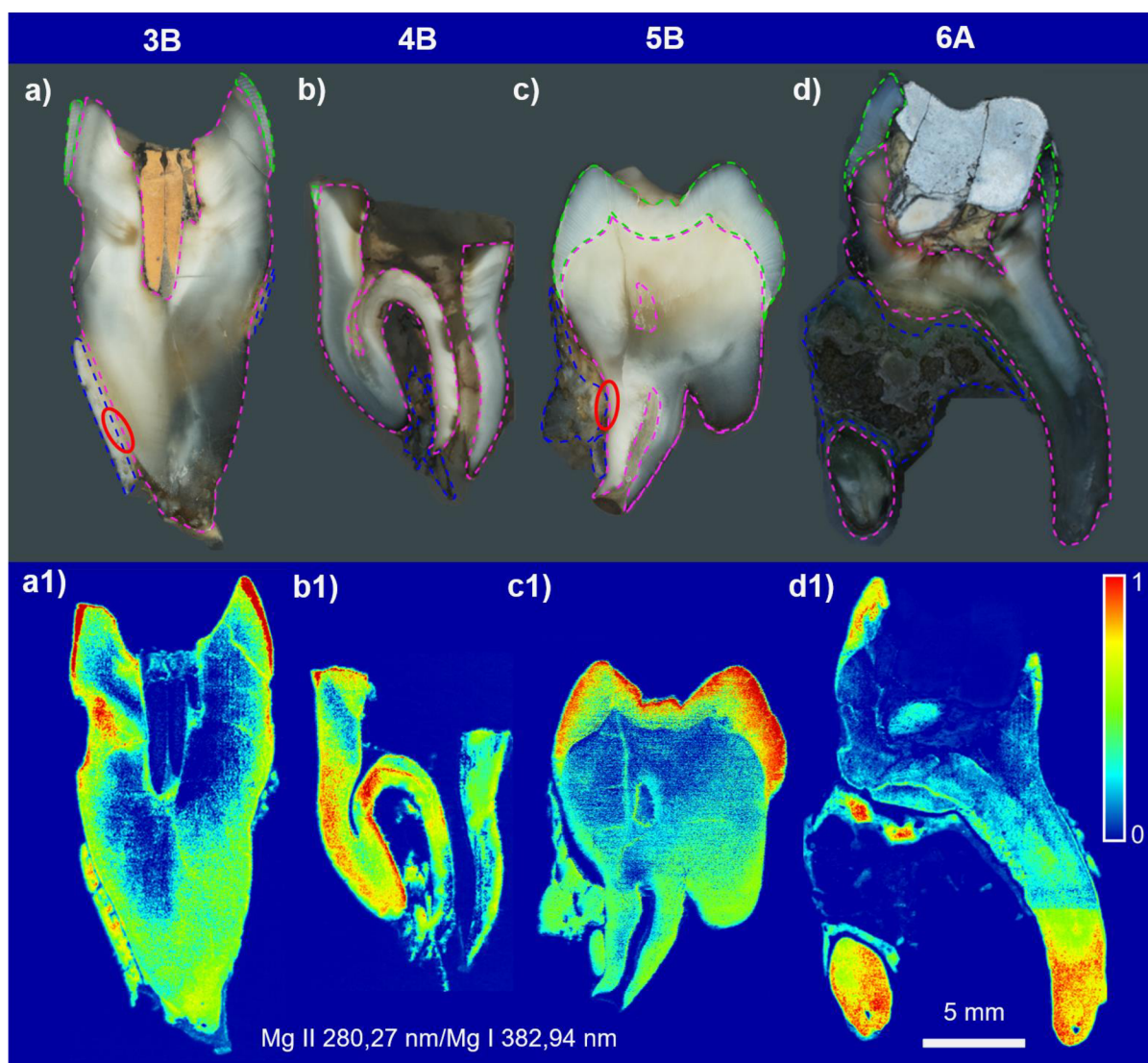


Obrázek 22. a) Fotografie zubu 3B před LIBS analýzou. Mapy prostorové distribuce b) železa ($Fe I 252,28 \text{ nm}$), c) křemíku ($Si I 288,17 \text{ nm}$), d)–e) zinku ($Zn I 330,25 \text{ nm}$; $Zn I 334,50 \text{ nm}$); f) rtuti ($Hg I 368,02 \text{ nm}$) v zubních výplních; měřeno na sestavě Firefly s laserem Quantel Viron s prostorovým rozlišením $30 \mu\text{m}$.

Posouzení tvrdosti tkáně

Z průzkumu současné literatury věnující se analýze zubních tkání bylo zjištěno, že poměry atomových a iontových spektrálních čar hořčíku mohou sloužit jako indikátor tvrdosti. Pro jednotlivé zuby 3B (Obrázek 23 a), 4B (Obrázek 23 b), 5B (Obrázek 23 c), 6A (Obrázek 23 d) jsou vyneseny mapy prostorové distribuce poměru spektrálních čar hořčíku ($Mg II 280,27 \text{ nm}/Mg I 382,94 \text{ nm}$) (Obrázek 23 a1), b1), c1), d1) a lze vidět, že sklovina vykazuje vyšší intenzitu tohoto poměru než dentin. To souhlasí s tím, že sklovina je mnohem více mineralizovaná než dentin, proto je to i tvrdší materiál. Bylo předpokládáno, že kost vlivem odlišné struktury a mineralizace bude mít odlišnou tvrdost oproti zbylé zubní tkáni. Z map distribuce poměrů hořčkových spektrálních čar pro jednotlivé zuby (Obrázek 23 a1), b1), c1), d1) lze vidět, že kost je tvrdostí podobná dentinu, a na několika místech je vyneseny poměr méně intenzivní. U zubu 4B a 6A je zvýšená intenzita i v určitých oblastech v dentinu. Zde se pravděpodobně jedná o lokální zvýšení tvrdosti. Na mapách zubů 3B a 5B na Obrázku 23 a2) a c2) je dobře pozorovatelné ankylotické spojení kosti se zubem (Obrázek 23 a1) a c1) červeně).

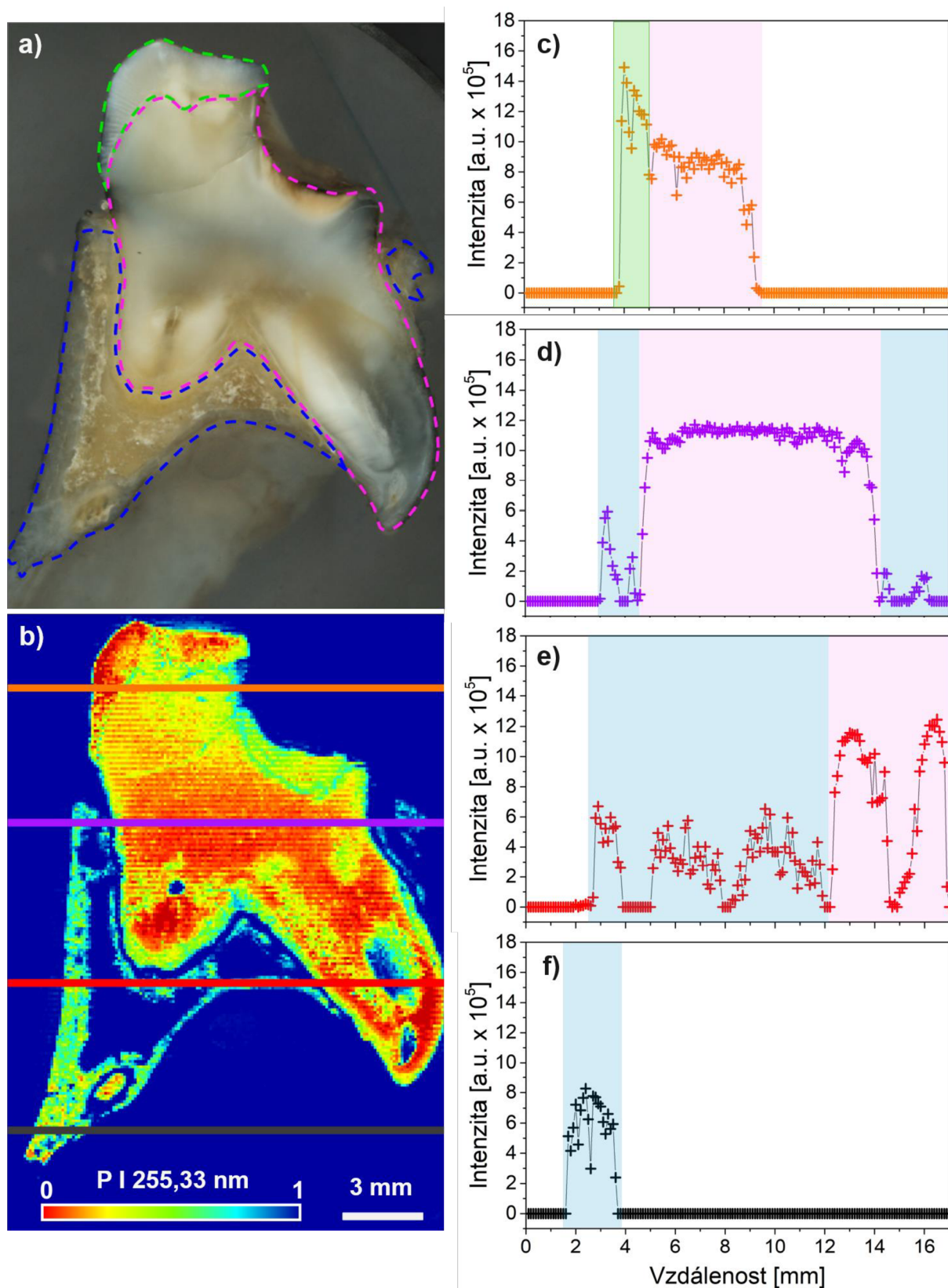
Tímto způsobem tedy lze porovnat tvrdost dvou biotických materiálů obsahujících hořčík a výsledky této práce se shodují s výsledky z literatury [114, 117]. Tento jev však není jednoznačný a k přesnému určení tvrdosti by bylo vhodné doplnit tyto experimenty o kontrolní měření tvrdosti jednotlivých částí zubu přímo na mikrotvrdoměru, které však nebylo možné z důvodu zalití vzorků do epoxidu.



Obrázek 23. Fotografie zubů a) 3B, b) 4B, c) 5B, d) 6A měřených při prostorovém rozlišení 30 μm na sestavě Firefly s laserem Quantel Viron a spektrometrem Avantes. Jednotlivé části zubů jsou barevně odlišeny (dentin – růžová, sklovina – zelená, kost – modrá). Oblast ankylotického spojení je vyznačena červeně. Porovnání map prostorové distribuce poměru hořčkových spektrálních čar (Mg II 280,27 nm/Mg I 382,94 nm) – a1), b1), c1), d1).

Přímková analýza kosti a zubu

Kost má pórovitou strukturu odlišnou od zubu a obsahuje menší koncentraci hydroxyapatitu, tedy i zastoupení vápníku a fosforu. V této části je dále zkoumaná distribuce fosforu v zubu a kosti vnesením intenzity fosforu (P I 255,33 nm) na 4 přímkách vedoucích napříč analyzovaným zubem 1A (Obrázek 24 a) do grafů. Přímký byly vedeny přes oblasti epoxidu, kosti, dentinu a skloviny. V grafech (Obrázek 24 c)–f) je poté signál z každé emisní čáry vnesený příslušnou barvou a části zubu jsou podle vzdálenosti od počátku mapy v poloze, ze které signál pochází, zvýrazněny v grafech stejnou barvou, jakou jsou vyznačeny na Obrázku 24 a) (dentin – růžová, sklovina – zelená, kost – modrá).



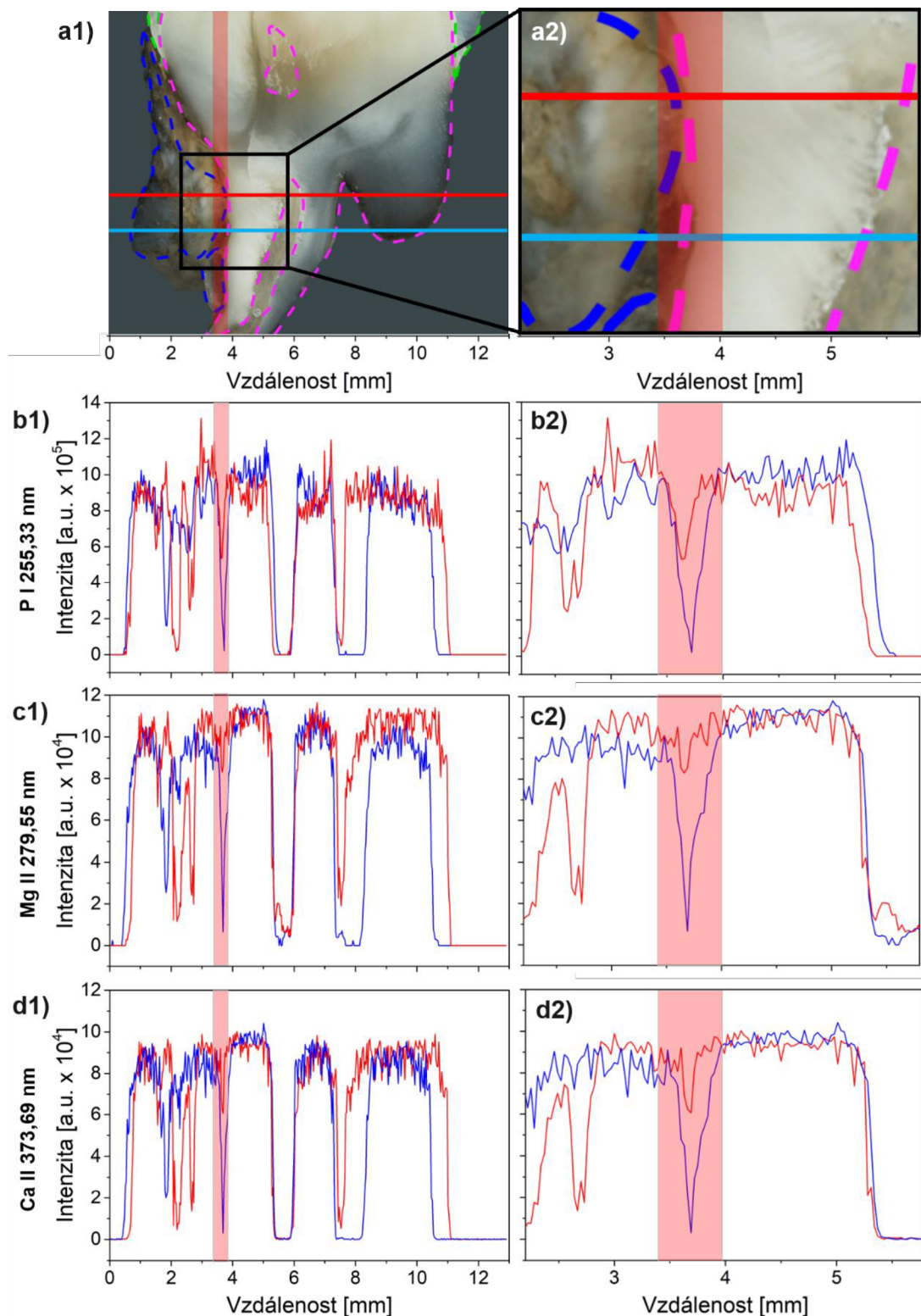
Obrázek 24. a) Fotografie zubu 1A měřeného na sestavě Discovery při prostorovém rozlišení $100\ \mu\text{m}$. Jednotlivé části zubů jsou barevně odlišeny (dentin – růžová, sklovina – zelená, kost – modrá). b) Mapa prostorové distribuce fosforu (P I 255,33 nm). c)–f) Grafy intenzit spektrální čáry fosforu (P I 255,33 nm) na přímkách vedených napříč matricí zubu. Osa x popisuje vzdálenost od počátku mapy, každý bod v grafu přísluší jednomu spektru, osa y popisuje intenzitu spektrální čáry fosforu (P I 255,33 nm).

Z grafu na Obrázku 24 d)–f) lze vidět, že v oblasti kosti je intenzita signálu spektrální čáry fosforu nižší než u dentinu a dosahuje maximální hodnoty 8×10^5 a.u. Ve srovnání se zdravou dentinovou tkání, kde intenzita fosforu dosahuje hodnot kolem 11×10^5 a.u. Epoxid má ve všech grafech nulovou intenzitu fosforu. Na Obrázku 24 d) lze vidět, že signál fosforu je v této části dentinu velmi homogenní a jeho intenzita se výrazně mění pouze na krajích zubu. Na Obrázku 24 c) jsou výsledky z přímky vedené napříč sklovinou i dentinem, lze vidět, že sklovina má ze všech částí zubu nejvyšší intenzitu, ale na takto malé části signál kolísá v intenzitě. Kost je tedy možné odlišit od zubní tkáně z hlediska zastoupení fosforu v porovnání s ostatními částmi zubu.

Lokalizace ankylózy

Pro detekci ankylózy bylo předpokládáno, že tkáň podstupuje demineralizaci a se změnou struktury se mění i prvkové složení tkáně, dojde k pevnému spojení kosti a cementu zubu. Na Obrázku 25 je uvedena lineární distribuce třech vybraných prvků fosforu, hořčíku a vápníku napříč zubem 5B. V příloze je pak uvedena lineární distribuce třech vybraných prvků fosforu, hořčíku a vápníku napříč zubem 3B (Obrázek 33). V grafech na ose y byly vyneseny intenzity spektrálních čar fosforu (P I 255,33 nm), hořčíku (Mg II 279,55 nm), vápníku (Ca II 373,69 nm) na dvou přímkách vedených napříč zubem přes oblast kosti a dentinu. Signál z každé emisní čáry je vyneseny příslušnou barvou a část zubu, kde by se mělo nacházet ankylotické spojení, je zvýrazněna v grafech a fotografiích zubu červenou plochou. Osa x popisuje vzdálenost od počátku mapy, která byla na zubu 5B naměřena. Uvedené fotografie zubu 5B (Obrázek 25 a1), a2) pak na šířku odpovídají vzdálenosti na ose y, na výšku byly pro lepší přehlednost zkráceny.

Na Obrázku 25 b2) je uvedena lineární distribuce fosforu (P I 255,33 nm). Na červené přímce je v celé červené oblasti je detekovaný intenzivní signál fosforu, pravděpodobně se tedy jedná o ankylotické spojení, čímž se potvrzují předchozí výsledky z analýzy prostorových map distribuce prvků. Dochází zde sice k určitému poklesu v intenzitě, to však lze přisoudit změně ve struktuře a prvkovém zastoupení, mělo by zde docházet k demineralizaci a úbytku hydroxyapatitu. U modré přímky je pozorované výrazné snížení intenzity, zde je pravděpodobně kost velmi blízko zubu, ale ke spojení ještě nedošlo. Podobné výsledky pozorujeme i u rozložení hořčíku a vápníku na obou přímkách. Především u hořčíkové spektrální čáry (Mg II 279,55 nm) je spojení kosti a zubu v grafu zřetelně viditelné a dochází pouze k minimálnímu poklesu v intenzitě hořčíkové spektrální čáry.



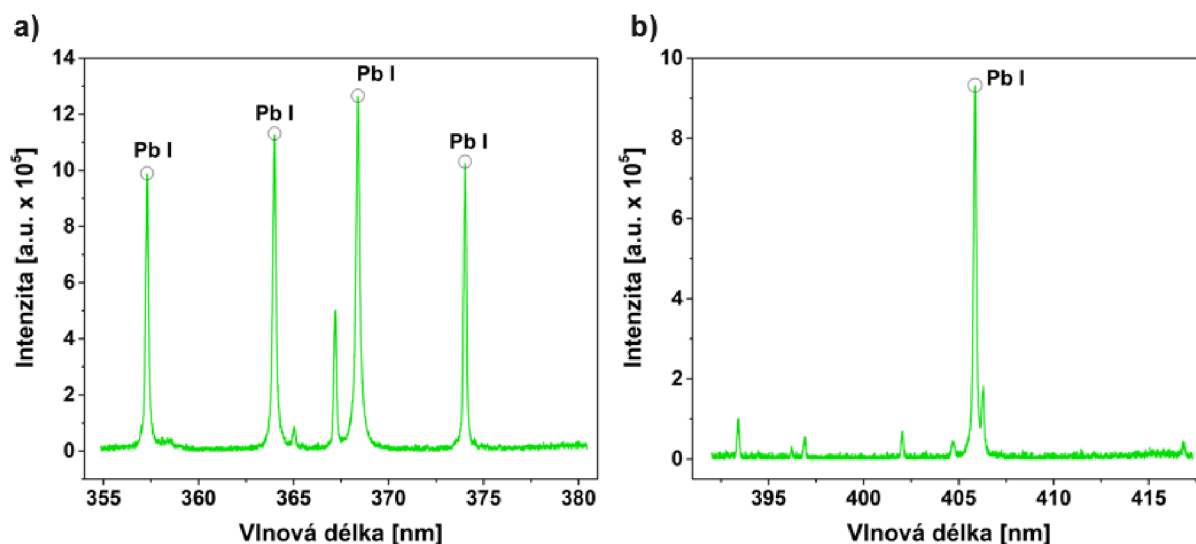
Obrázek 25. a1) Fotografie zubu 5B měřeného na sestavě FireFly s laserem Quantel Viron při prostorovém rozlišení 30 μm . Jednotlivé části zubů jsou barevně odlišeny (dentin – růžová, sklovina – zelená, kost – modrá). a2) Přibližná část zubu 5B, kde se nachází ankylóza (označena červeným svislým pruhem). b1– d2) Grafy distribuce fosforu (P I 255,33 nm), hořčíku (Mg II 279,55 nm) a vápníku (Ca II 373,69 nm) vyneseny ve dvou přímkách vedených napříč matricí zubu. Vpravo (b2), c2), d2) je přibližná část zubu 5B. Osa x popisuje vzdálenost od počátku mapy, osa y popisuje intenzitu spektrálních čar. Červeným svislým pruhem je označena oblast ankylózy ve všech fotografiích (a1), a2) a v grafech (b1– d2).

5.3 Myší čelisti

Detekce olova v peletce

Na Obrázku 26 lze vidět průměrná spektra z měření celulózové peletky s příměsí kousků olova při centrální vlnové délce 368 nm a 405 nm na spektrometru Cz-T. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při detekci olova v oblasti 368 nm, protože zde byla detekovaná nejvyšší intenzita spektrální čáry olova (Pb I 368,37 nm) (Obrázek 26 a). Druhá nejintenzivnější spektrální čára olova je (Pb I 405,81 nm) (Obrázek 26 b). Obě spektrální čáry nejsou satureované, a tudíž by obě mohly být použity pro vynesení map prostorové distribuce olova v myší čelisti.

Dále byly tyto emisní čáry porovnány v databázi NIST se spektrálními čarami prvků, které se nachází ve vzorku zubu, jestli nedochází k interferenci s prvky z biotické matrice. U spektrální čáry olova (Pb I 368,37 nm) by k interferenci dojít mohlo, protože na vlnové délce 370,60 nm se nachází intenzivní iontová spektrální čára vápníku. V blízkosti spektrální čáry olova (Pb I 405,81 nm) se žádné další intenzivní spektrální čáry nejzastoupenějších prvků v zubu nenachází, proto je tato emisní čára vhodnější pro analýzu.

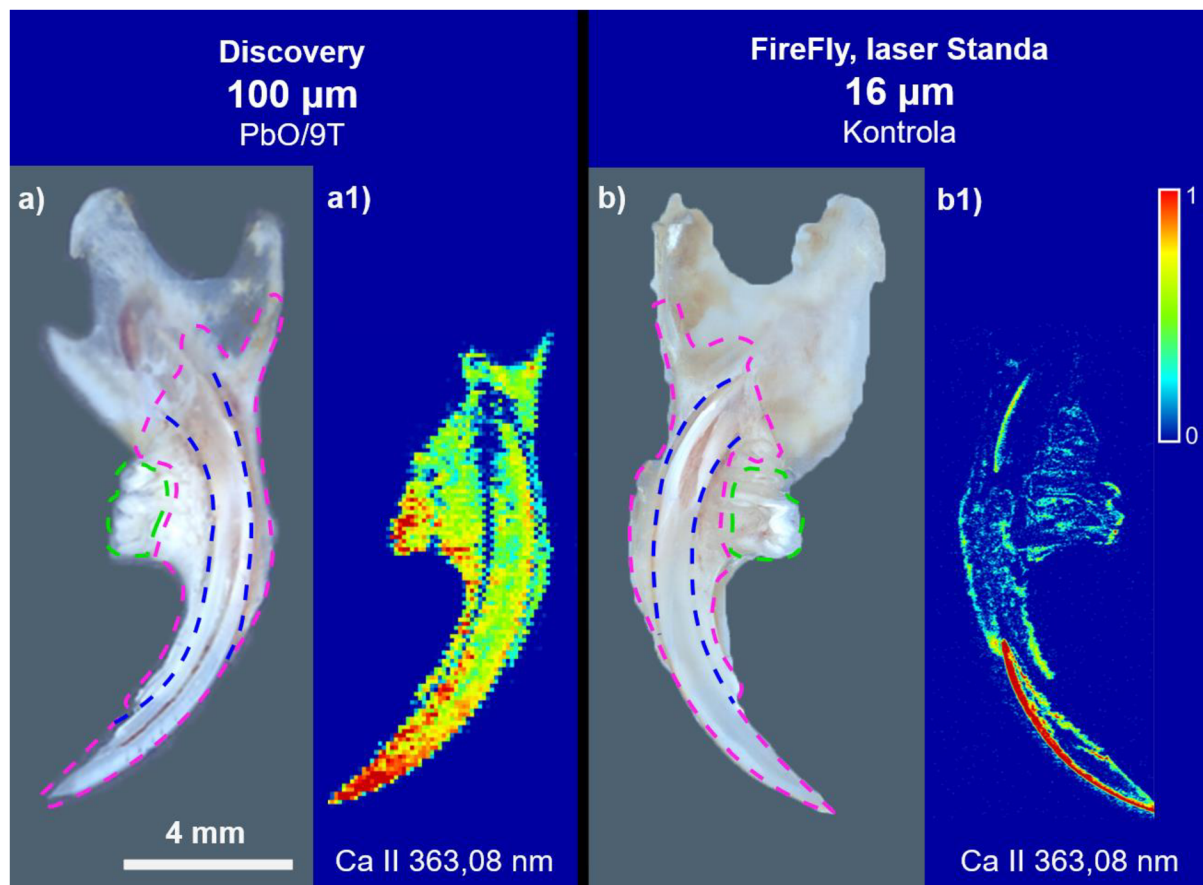


Obrázek 26. Ukázka průměrných spekter při akumulaci signálu na celulózové peletce s obsahem olova z pěti následných laserových pulzů při měření na sestavě Discovery se spektrometrem Czerny-Turner s centrální vlnovou délkou a) 368 nm a b) 405 nm. Označeny jsou emisní čáry olova Pb I (357,27 nm; 363,96 nm; 368,35 nm; 373,99 nm; 405,78 nm).

Srovnání prostorového rozlišení

Na Obrázku 27 a1), b1) je vidět srovnání prostorového rozlišení získaných map prostorové distribuce vápníku (Ca II 363,08 nm) na zubu PbO/9T (Obrázek 27 a) měřeného s prostorovým rozlišením 100 μm a zubu s označením Kontrola (Obrázek 27 b) měřeného s prostorovým rozlišením 16 μm . Jednotlivé části myších čelistí jsou vyznačeny barvami v Obrázek 27 a), b) (oblast řezáku a kosti – růžová, stoličky – zelená, ohraničení mezi zubem a kostí, ve které je zasazený – modrá).

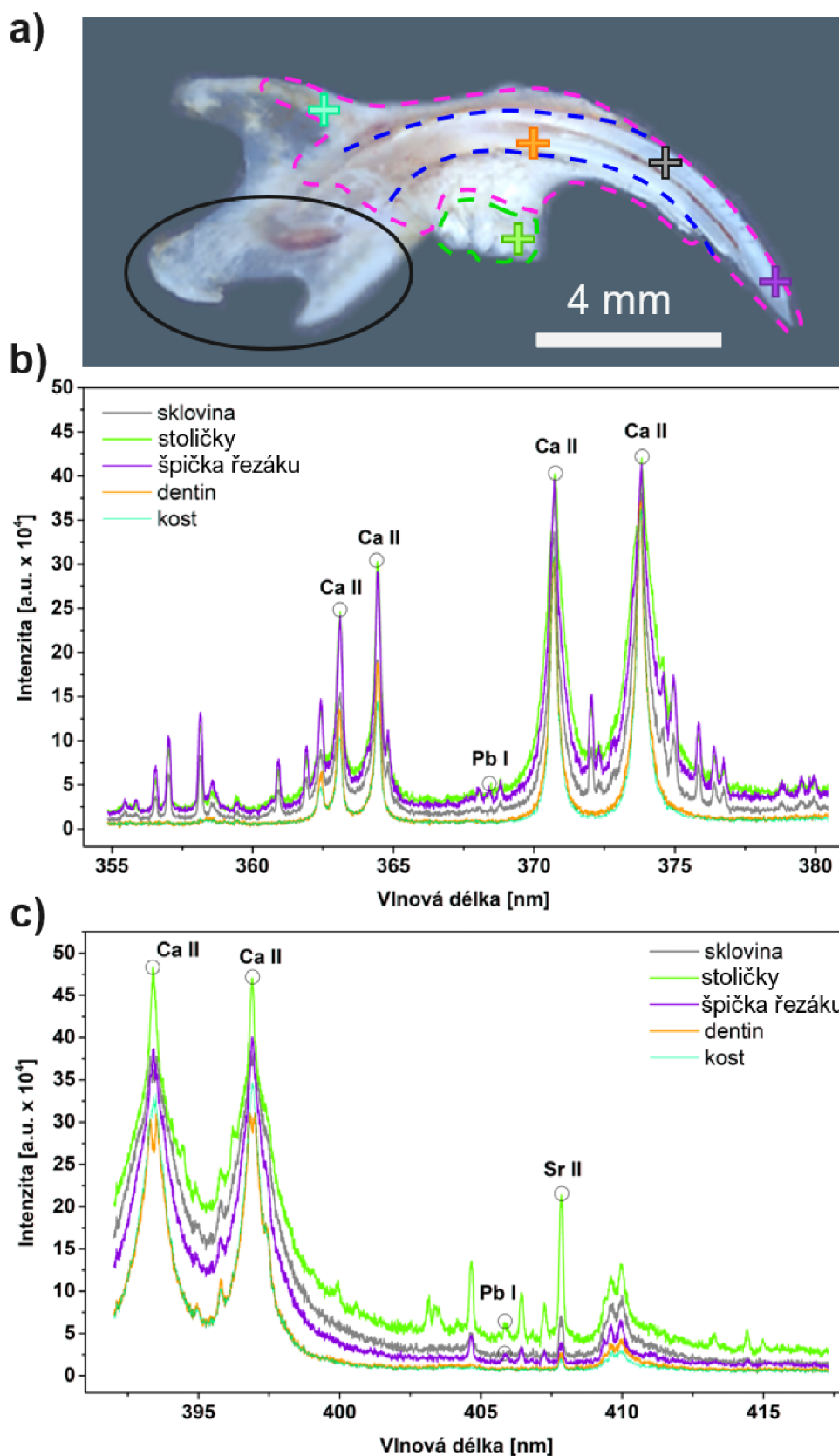
Při prostorovém rozlišení 16 μm pro kontrolní zub lze od sebe v mapě distribuce vápníku (Obrázek 27 b1) dobře rozlišit jednotlivé struktury zubu, to je však (jako v případě lidských zubů) dosaženo na úkor citlivosti detekce. Kompromis mezi citlivostí měření a prostorovým rozlišením byl dosažen při mapování s prostorovým rozlišením 100 μm u zubu PbO/9T (Obrázek 27 a1). Při měření bioakumulace olova v myších zubech, je navíc třeba dosáhnout co nejvyšší citlivosti, protože hrozí, že koncentrace olova v zubu bude pod LOD, proto bylo dále použito prostorové rozlišení 100 μm u sestavy Discovery se spektrometrem Cz-T.



Obrázek 27. Porovnání prvkových map čelistí s různým prostorovým rozlišením. a) Fotografie zubu PbO/9T měřeného s prostorovým rozlišením 100 μm na měřicí sestavě Discovery se spektrometrem Cz-T; b) Fotografie kontrolního zubu měřené při prostorovém rozlišení 16 μm na měřicí sestavě FireFly s laserem Standa a spektrometrem Avantes. Růžovou konturou je vyznačena oblast čelisti, zelenou stoličky a modrou rozhraní mezi řezákem a čelistní kostí. Pro každý zub jsou vyneseny mapy prvkové distribuce vápníku (Ca II 363,08 nm) – a1), b1).

Spektrální analýza myších čelistí

Na Obrázku 28 byla vynesena charakteristická spektra z různých částí myší čelisti PbO/9T (Obrázek 28 a) měřené sestavou Discovery a spektrometrem Cz-T. Detekována byla spektra z jednotlivých částí (kost – azurová, dentin – oranžová, stoličky – zelená, sklovina – šedá, špička řezáku – fialová) vzorku čelisti a spektrum z každé části je v grafu vyneseno příslušnou barvou, jakou je vyznačená poloha, kde bylo spektrum detekováno na Obrázku 28 a). Je třeba zdůraznit, že zuby jsou zbroušeny a z epoxidu vystupuje pouze růžová (čelist) a zelená (stoličky) oblast. Kost pokračuje pod epoxidem (vyznačeno černým kruhem), a proto také není v mapě distribuce vápníku (Obrázek 27 a1) z této oblasti detekovaný žádný signál.



Obrázek 28. a) Fotografie zubu PbO/9T před LIBS měřením, označené jednotlivé části zubu (stoličky – zelená, čelist – růžová, rozhraní mezi kostí a řezákem – modrá linka). Ukázka spekter z jednotlivých částí zubu (kost – azurová, dentin – oranžová, stoličky – zelená, sklovina – šedá, špička řezáku – fialová) z měření na sestavě Discovery při prostorovém rozlišení 100 μm a spektrometrem Cz-T s centrální vlnovou délkou b) 368 nm; c) 405 nm.

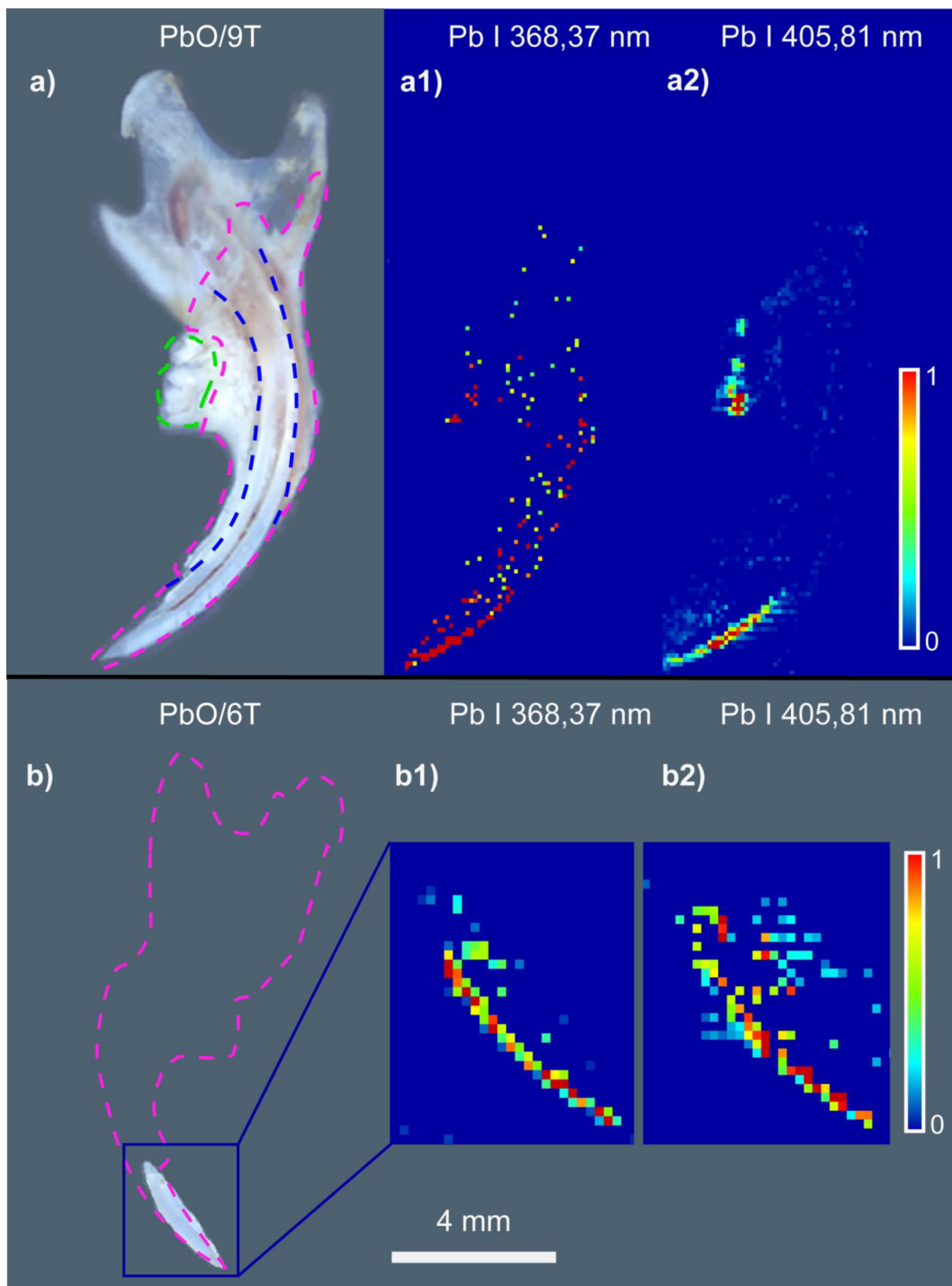
Ve spektrálním okně s centrální vlnovou délkou 368 nm (Obrázek 28 b) byla pozorována nejvyšší intenzita všech spektrálních čar vápníku ve stoličkách a ve špičce řezáku. Menší intenzity poté dosahovaly spektrální čáry vápníku v oblasti dentinu a nejnižší intenzita byla detekována v kosti a ve sklovině. V oblasti špičky řezáku a stoliček byl detekovaný signál olova (Pb I 368,37 nm), ale intenzita této spektrální čáry olova byla nízká a z části jí překrývala spektrální čára vápníku (Ca II 370,60 nm), která je saturovaná a značně rozšířená. Při detekci intenzivního signálu ze stoliček a špičky řezáku také docházelo ke zvýšení intenzity pozadí. Tento jev byl nejmenší u spekter z kosti a dentinu, která měla velmi podobný průběh.

Ve spektrálním okně s centrální vlnovou délkou 405 nm (Obrázek 28 c) byla pozorována nejvyšší intenzita spektrálních čar vápníku (Ca II 393,37 nm; Ca II 396,85 nm) ve stoličkách. Spektrum z oblasti stoliček bylo celkově nejintenzivnější a také mělo nejvíce zvýšené pozadí, dále v něm byla detekována spektrální čára stroncia (Sr II 407,78 nm) a olova (Pb I 405,81 nm). Spektrální čára olova byla detekována i v oblasti špičky řezáku, ale v jiných oblastech se nevyskytovala. Dentin a kost měly opět stejný průběh detekovaných spekter.

Prostorová distribuce olova v myších čelistech

Na Obrázku 29 je zobrazená prostorová distribuce bioakumulovaného olova (Pb I 368,37 nm; Pb I 405,81 nm) v zubech PbO/9T (Obrázek 29 a), kde byla měřena celá plocha zubu, a PbO/6T (Obrázek 29 b), u kterého byla měřena pouze špička řezáku (pro lepší představu je zbytek zubu dokreslený růžovou přerušovanou čarou).

Olovo bylo detekováno především v oblasti stoliček a špičky řezáku, a to v obou vzorcích PbO/6T s koncentrací olova ($10,37 \pm 0,10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) a PbO/9T s koncentrací olova ($14,81 \pm 0,10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Nejlepší výsledky z hlediska intenzity byly u obou zubů dosaženy při detekci na spektrální čáře olova (Pb I 405,81 nm) na Obrázku 29 a2), b2), což potvrzuje výsledky z analýzy spekter. Avšak i spektrální čára (Pb I 368,37 nm) (Obrázek 29 a1), b1) lze použít pro detekci olova v myších čelistech. U vzorků z kontrolní skupiny byla koncentrace olova pod LOD a nebyl detekovaný žádný signál. Protože je olovo detekováno hlavně v přední části řezáku a na horní části stoliček, je možné, že se ukládá především do skloviny. Bioakumulaci olova by měla doprovázet i dekalifikace – úbytek vápníku. Tento jev však na mapách prostorové distribuce prokazatelně pozorován nebyl a pro ověření by bylo třeba provést další měření s vyšším počtem vzorků.



Obrázek 29. a) Fotografie myši čelisti PbO/9T; b) fotografie myši čelisti PbO/6T analyzovaných s prostorovým rozlišením 100 μm na měřící sestavě Discovery se spektrometrem Cz-T. Růžovou konturou je vyznačena oblast čelisti, zelenou stoličky a modrou rozhraní mezi řezákem a čelistní kostí. Mapa prostorové distribuce olova Pb I 368,37 nm – a1), b1). Mapa prostorové distribuce olova Pb I 405,81 nm – a2), b2).

6 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce byla analýza tvrdých tkání metodou spektroskopie laserem buzeného plazmatu a následné sestavení map prostorové distribuce vybraných prvků v měřených vzorcích. Byly vybrány dva příklady využití metody LIBS pro studium kalcifikovaných tkání, a to lokalizace onemocnění na základě změny prvkového složení a detekce obsahu kontaminantů. Pro lokalizaci onemocnění byly studovány lidské zuby s ankylozou a v případě kontaminantů byla zkoumána bioakumulace olova v zubech a kostech myši. V obou případech byly vzorky skladovány ve formaldehydu a poté zality do epoxidové pryskyřice a naleštěny. Dále bylo provedeno měření metodou LIBS na dvou měřících sestavách Discovery a FireFly. Vzorky byly měřeny při třech různých prostorových rozlišeních a velikost mapy byla specifická pro každý vzorek, přičemž bylo v rámci jedné mapy dosaženo i více než milionu spekter. Spektrální čáry prvků pro rekonstrukci map byly vybrány na základě intenzity, tvaru spektra a možné interference s dalšími spektrálními čarami detekovaných prvků.

Lidské zuby s ankylozou byly studovány na základě prostorové distribuce nejzastoupenějších prvků: fosforu, hořčíku a vápníku. Pro každý z těchto prvků byla vynesena mapa prostorového rozložení v jednotlivých částech zubu a výsledky dosažené v této diplomové práci se shodovaly s literaturou. Také bylo úspěšně ověřeno použití poměrů spektrálních čar hořčíku pro posouzení tvrdosti různých částí zubu. Bylo zjištěno, že ankylóza obsahuje menší množství fosforu a vápníku než dentin, což by mohlo souviset s přeměnou zubu na kostní tkáň a úbytkem hydroxyapatitu.

Bylo úspěšně detekováno olovo v myších zubech v obou testovaných vzorcích (šesti i devíti týdenní expozice myši nanočásticím olova vedla k bioakumulaci olova, a to v koncentracích $10,37 \pm 0,10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, respektive $14,81 \pm 0,10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Následně byly vyneseny mapy distribuce olova v myších zubech, přičemž olovo bylo podle předpokladů nejzastoupenější ve špičce myšního řezáku a ve stoličkách. V kontrolním vzorku olovo detekováno nebylo.

V této práci bylo úspěšně dosaženo doposud nejlepšího prostorového rozlišení v LIBS analýze tvrdých tkání ($30 \mu\text{m}$ vůči v literatuře běžně používaným $100 \mu\text{m}$). Dále byl významně posunut počet pixelů obsažených v jedné mapě, z v literatuře publikovaných 2 100 spekter obsažených v jedné mapě až na 1 001 620 pixelů. Tento skokový posun však kladl extrémně velké nároky na uložení, manipulaci a zpracování naměřených dat spojený s velkými časovými požadavky. Při pokračování výzkumu by bylo zajímavé optimalizovat podmínky měření pro prostorové rozlišení $16 \mu\text{m}$ a dále posunout hranice měření tvrdých tkání. Dále by mohlo být zajímavé se zaměřit na migraci kovů ze zubních výplní do tkáně zubu a potvrdit hypotézu, že zinek se ukládá v dentinu v blízkosti výplně. Výzkum by také mohl pokračovat stanovením limitů detekce jednotlivých prvků, především olova při měření jeho bioakumulace v myších zubech a kostech.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] TWYMAN, R.M. ATOMIC EMISSION SPECTROMETRY | Principles and Instrumentation. In: *Encyclopedia of Analytical Science* [online]. B.m.: Elsevier, 2005, s. 190–198. Dostupné z: doi:10.1016/B0-12-369397-7/00029-7
- [2] NĚMCOVÁ, Irena. *Spektrometrické analytické metody*. 1. Prague: Karolinum, 1997. ISBN 80-7184-365-2.
- [3] MILDE, David. *Optická emisní spektrometrie* [online]. 2010. Dostupné z: <http://ach.upol.cz/user-files/intranet/05-asx-oes-1321623178.pdf>
- [4] NANCY, Parvathy, Juby Alphonsa MATHEW, Jerry JOSE, Jemy JAMES, Blessy JOSEPH, Ashin SHAJI, Sabu THOMAS a Nandakumar KALARIKKAL. Laser, nanoparticles, and optics. In: *Nano-Optics* [online]. B.m.: Elsevier, 2020, s. 47–65. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-818392-2.00004-4
- [5] WILLIAMS, David. Laser basics. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* [online]. 2008, **9**(12), 550–552. ISSN 14720299. Dostupné z: doi:10.1016/j.mpaic.2008.09.008
- [6] SONG, Kyuseok, Yong-Ill LEE a Joseph SNEDDON. Applications of Laser-Induced Breakdown Spectrometry. *Applied Spectroscopy Reviews* [online]. 1997, **32**(3), 183–235. ISSN 0570-4928. Dostupné z: doi:10.1080/05704929708003314
- [7] FORTES, Francisco J., Javier MOROS, Patricia LUCENA, Luisa M. CABALÍN a J. Javier LASERNA. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *Analytical Chemistry* [online]. 2013, **85**(2), 640–669. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac303220r
- [8] NOVOTNÝ, Jan, Novotný KAREL, Prochazka DAVID, Hrdlička ALEŠ a Kaiser JOZEF. Two dimensional elemental mapping by laser-induced breakdown spectroscopy. *Spectroscopy Europe* [online]. 2014, **26**(6), 5. Dostupné z: <https://www.spectroscopyeurope.com/article/two-dimensional-elemental-mapping-laser-induced-breakdown-spectroscopy>
- [9] WONG, Diane M, Alexander A. BOL'SHAKOV a Richard E. RUSSO. Laser Induced Breakdown Spectroscopy. In: *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* [online]. B.m.: Elsevier, 2010, s. 1281–1287. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-374413-5.00062-2
- [10] HAHN, David W. a Nicoló OMENETTO. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS), Part II: Review of Instrumental and Methodological Approaches to Material Analysis and Applications to Different Fields. *Applied Spectroscopy* [online]. 2012, **66**(4), 347–419. ISSN 0003-7028. Dostupné z: doi:10.1366/11-06574
- [11] *Spectrophotometry* [online]. 2020. Dostupné z: <https://chem.libretexts.org/@go/page/1431>
- [12] RAI, V N a S N THAKUR. Instrumentation for Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. In: *LASER-INDUCED BREAKDOWN SPECTROSCOPY* [online]. B.m.: Elsevier B.V., 2007, s. 113–133. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-51734-0.50008-9
- [13] NOVOTNÝ, Karel, Jozef KAISER, Aleš HRDLIČKA, Radomír MALINA, Tomáš VÉMOLA, David PROCHAZKA, Jan NOVOTNÝ a Viktor KANICKÝ. Spektroskopie laserem buzeného plazmatu (LIBS). *Československý časopis pro fyziku*. 2010, **60**(4–5), 280–285.
- [14] BUDAY, Jakub, Pavel POŘÍZKA a Jozef KAISER. Imaging laser-induced plasma under different laser irradiances. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2020, **168**, 105874. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2020.105874
- [15] EFFENBERGER, A., SCOTT, J. Effect of Atmospheric Conditions on LIBS Spectra. *Sensors* [online]. 2010, **10**(5), 4907–4925. Dostupné z: doi:10.3390/s100504907
- [16] KULHÁNEK, Petr. *Úvod do teorie plazmatu* [online]. první upra. Praha: Aldebaran

- Group for Astrophysics, 2017. ISBN 978-80904582-2-2. Dostupné z: <https://www.aldebaran.cz/studium/fpla.pdf>
- [17] COSTA, Vinicius Câmara, Francisco Wendel Batista AQUINO, Caio Marcio PARANHOS a Edenír Rodrigues PEREIRA-FILHO. Identification and classification of polymer e-waste using laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) and chemometric tools. *Polymer Testing* [online]. 2017, **59**, 390–395. ISSN 01429418. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymertesting.2017.02.017
- [18] H. WIGGENHAUSER, D. SCHAURICH, G. WILSCH. LIBS for non-destructive testing of element distributions on surfaces. *NDT & E International* [online]. 1998, **31**(4), 07–313. Dostupné z: doi:10.1016/S0963-8695(98)00008
- [19] EPPLER, Aaron S., David A. CREMERS, Donald D. HICKMOTT, Monty J. FERRIS a Aaron C. KOSKELO. Matrix Effects in the Detection of Pb and Ba in Soils Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *Applied Spectroscopy* [online]. 1996, **50**(9), 1175–1181. ISSN 0003-7028. Dostupné z: doi:10.1366/0003702963905123
- [20] TOGNONI, E., G. CRISTOFORETTI, S. LEGNAIOLI a V. PALLESCHI. Calibration-Free Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: State of the art. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2010, **65**(1), 1–14. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2009.11.006
- [21] FINCH, Michael, Adam FRISS, Andrew KUSTAS, Jason SLAVIK, Brian LEE a Azer. YALIN. Development of a Near-Infrared Cavity Ring-Down Spectroscopy System for CO₂ Isotope Detection. In: *Conference Paper* [online]. 2012, s. 8. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/305220662_Development_of_a_Near-Infrared_Cavity_Ring-Down_Spectroscopy_System_for_CO_2_Isotope_Detection
- [22] YAROSHCHYK, Pavel a John E. EBERHARDT. Automatic correction of continuum background in Laser-induced Breakdown Spectroscopy using a model-free algorithm. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy* [online]. 2014, **99**, 138–149. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2014.06.020
- [23] KRAMIDA, A., RALCHENKO, YU., READER, J. and NIST ASD Team. NIST Atomic Spectra Database. *version 5.6.1* [online]. 2018. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.18434/T4W30F>
- [24] MCNAUGHT, A. D. a A. WILKINSON. Limit of detection in analysis. In: *IUPAC Compendium of Chemical Terminology* [online]. 2. vydání. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997. ISBN 0-9678550-9-8. Dostupné z: doi:10.1351/goldbook.L03540
- [25] JANTZI, Sarah C., Vincent MOTTO-ROS, Florian TRICHARD, Yuri MARKUSHIN, Nouredine MELIKECHI a Alessandro DE GIACOMO. Sample treatment and preparation for laser-induced breakdown spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2016, **115**, 52–63. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2015.11.002
- [26] NOVOTNÝ, J., M. BRADA, M. PETRILAK, D. PROCHAZKA, K. NOVOTNÝ, A. HRDLIČKA a J. KAISER. A versatile interaction chamber for laser-based spectroscopic applications, with the emphasis on Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2014, **101**, 149–154. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2014.08.004
- [27] AHMED, Rizwan, Javed IQBAL a M Aslam BAIG. Effects of laser wavelengths and pulse energy ratio on the emission enhancement in dual pulse LIBS. *Laser Physics Letters* [online]. 2015, **12**(6), 066102. ISSN 1612-2011. Dostupné z: doi:10.1088/1612-2011/12/6/066102
- [28] LOPEZ-QUINTAS, I., M.P. MATEO, V. PIÑON, A. YAÑEZ a G. NICOLAS. Mapping of mechanical specimens by laser induced breakdown spectroscopy method: Application to an engine valve. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2012,

- 74–75, 109–114. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2012.06.035
- [29] RADZIEMSKI, Leon a David CREMERS. A brief history of laser-induced breakdown spectroscopy: From the concept of atoms to LIBS 2012. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2013, **87**, 3–10. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2013.05.013
- [30] CREMERS, David A. a Andrew K. KNIGHT. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. In: *Encyclopedia of Analytical Chemistry* [online]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2000. ISBN 9780444517340. Dostupné z: doi:10.1002/9780470027318.a5110t
- [31] CREMERS, David A. a Rosemarie C. CHINNI. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy—Capabilities and Limitations. *Applied Spectroscopy Reviews* [online]. 2009, **44**(6), 457–506. ISSN 0570-4928. Dostupné z: doi:10.1080/05704920903058755
- [32] HAHN, David W. a Nicoló OMENETTO. Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS), part II: Review of instrumental and methodological approaches to material analysis and applications to different fields. *Applied Spectroscopy* [online]. 2012, **66**(4), 347–419. ISSN 00037028. Dostupné z: doi:10.1366/11-06574
- [33] TAKAHASHI, Tomoko, Soichi YOSHINO, Yutaro TAKAYA, Tatsuo NOZAKI, Koichi OHKI, Toshihiko OHKI, Tetsuo SAKKA a Blair THORNTON. Quantitative in situ mapping of elements in deep-sea hydrothermal vents using laser-induced breakdown spectroscopy and multivariate analysis. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* [online]. 2020, **158**, 103232. ISSN 09670637. Dostupné z: doi:10.1016/j.dsr.2020.103232
- [34] THORNTON, Blair, Tomoko TAKAHASHI, Takumi SATO, Tetsuo SAKKA, Ayaka TAMURA, Ayumu MATSUMOTO, Tatsuo NOZAKI, Toshihiko OHKI a Koichi OHKI. Development of a deep-sea laser-induced breakdown spectrometer for in situ multi-element chemical analysis. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* [online]. 2015, **95**, 20–36. ISSN 09670637. Dostupné z: doi:10.1016/j.dsr.2014.10.006
- [35] JANTZI, Sarah C., Vincent MOTTO-ROS, Florian TRICHARD, Yuri MARKUSHIN, Nouredine MELIKECHI a Alessandro DE GIACOMO. Sample treatment and preparation for laser-induced breakdown spectroscopy. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy* [online]. 2016, **115**, 52–63. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2015.11.002
- [36] TOGNONI, Elisabetta a Gabriele CRISTOFORETTI. Signal and noise in Laser Induced Breakdown Spectroscopy: An introductory review. *Optics & Laser Technology* [online]. 2016, **79**, 164–172. ISSN 00303992. Dostupné z: doi:10.1016/j.optlastec.2015.12.010
- [37] BONTA, Maximilian, Jhanis J. GONZALEZ, C. Derrick QUARLES, Richard E. RUSSO, Balazs HEGEDUS a Andreas LIMBECK. Elemental mapping of biological samples by the combined use of LIBS and LA-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* [online]. 2016, **31**(1), 252–258. ISSN 0267-9477. Dostupné z: doi:10.1039/C5JA00287G
- [38] PROCHAZKA, David, Martin BILÍK, Petra PROCHAZKOVÁ, Jakub KLUS, Pavel POŘÍZKA, Jan NOVOTNÝ, Karel NOVOTNÝ, Barbora TICOVÁ, Albert BRADÁČ, Marek SEMELA a Jozef KAISER. Detection of tire tread particles using laser-induced breakdown spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2015, **108**, 1–7. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2015.03.011
- [39] LUCENA, P., A. DOÑA, L.M. TOBARIA a J.J. LASERNA. New challenges and insights in the detection and spectral identification of organic explosives by laser induced breakdown spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2011, **66**(1), 12–20. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2010.11.012
- [40] SuperCam for Scientists - NASA Mars. *NASA's Mars Exploration Program* [online].

- [vid. 2021-04-04]. Dostupné z: <https://mars.nasa.gov/mars2020/spacecraft/instruments/supercam/for-scientists/>
- [41] KUMAR, Akshaya, Fang-Yu YUEH, Jagdish P. SINGH a Shane BURGESS. Characterization of malignant tissue cells by laser-induced breakdown spectroscopy. *Applied Optics* [online]. 2004, **43**(28), 5399. ISSN 0003-6935. Dostupné z: doi:10.1364/AO.43.005399
- [42] PENG, Jiyu, Kunlin SONG, Hongyan ZHU, Wenwen KONG, Fei LIU, Tingting SHEN a Yong HE. Fast detection of tobacco mosaic virus infected tobacco using laser-induced breakdown spectroscopy. *Scientific Reports* [online]. 2017, **7**(1), 44551. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep44551
- [43] NIKOLAI, Sushkov, Timur LABUTIN, Nikolai LOBUS a Galbács GÁBOR. EXPLORATORY ANALYSIS OF ZOOPLANKTON SPECTRA USING MATRIX DECOMPOSITION TECHNIQUES. In: [online]. 2020, s. 179. Dostupné z: http://www2.sci.u-szeged.hu/libsconf/index_htm_files/libsconf2020_book_of_abstracts_final.pdf
- [44] GALIOVÁ, Michaela, Jozef KAISER, Francisco J. FORTES, Karel NOVOTNÝ, Radomír MALINA, Lubomír PROKEŠ, Aleš HRDLIČKA, Tomáš VACULOVÍČ, Miriam NÝVLTOVÁ FIŠÁKOVÁ, Jiří SVOBODA, Viktor KANICKÝ a Javier J. LASERNA. Multielemental analysis of prehistoric animal teeth by laser-induced breakdown spectroscopy and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Applied Optics* [online]. 2010, **49**(13), C191. ISSN 0003-6935. Dostupné z: doi:10.1364/ao.49.00c191
- [45] MEHARI, Fanuel, Maximilian ROHDE, Christian KNIPFER, Rajesh KANAWADE, Florian KLÄMPFL, Werner ADLER, Florian STELZLE a Michael SCHMIDT. Laser induced breakdown spectroscopy for bone and cartilage differentiation - ex vivo study as a prospect for a laser surgery feedback mechanism. *Biomedical Optics Express* [online]. 2014, **5**(11), 4013. ISSN 2156-7085. Dostupné z: doi:10.1364/BOE.5.004013
- [46] KANAWADE, Rajesh, Fanuel MAHARI, Florian KLÄMPFL, Maximilian ROHDE, Christian KNIPFER, Katja TANGERMANN-GERK, Werner ADLER, Michael SCHMIDT a Florian STELZLE. Qualitative tissue differentiation by analysing the intensity ratios of atomic emission lines using laser induced breakdown spectroscopy (LIBS): prospects for a feedback mechanism for surgical laser systems. *Journal of Biophotonics* [online]. 2015, **8**(1–2), 153–161. ISSN 1864-063X. Dostupné z: doi:10.1002/jbio.201300159
- [47] HAN, Jung Hyun, Youngmin MOON, Jong Jin LEE, Sujeong CHOI, Yong-Chul KIM a Sungho JEONG. Differentiation of cutaneous melanoma from surrounding skin using laser-induced breakdown spectroscopy. *Biomedical Optics Express* [online]. 2016, **7**(1), 57. ISSN 2156-7085. Dostupné z: doi:10.1364/BOE.7.000057
- [48] SAMEK, O., D.C.S BEDDOWS, H.H TELLE, J. KAISER, M. LIŠKA, J.O CÁCERES a A GONZÁLES UREÑA. Quantitative laser-induced breakdown spectroscopy analysis of calcified tissue samples. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2001, **56**(6), 865–875. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/S0584-8547(01)00198-7
- [49] MOTTO-ROS, V., S. MONCAYO, C. FABRE a B. BUSSER. LIBS imaging applications. In: *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy* [online]. B.m.: Elsevier, 2020, s. 329–346. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-818829-3.00014-9
- [50] JOLIVET, L., M. LEPRINCE, S. MONCAYO, L. SORBIER, C.-P. LIENEMANN a V. MOTTO-ROS. Review of the recent advances and applications of LIBS-based imaging. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2019, **151**, 41–53. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2018.11.008

- [51] KALOT, Ghadir, Amélie GODARD, Benoît BUSSE, Jacques PLIQUETT, Mans BROEKGAARDEN, Vincent MOTTO-ROS, Karl David WEGNER, Ute RESCH-GENGER, Ulli KÖSTER, Franck DENAT, Jean-Luc COLL, Ewen BODIO, Christine GOZE a Lucie SANCEY. Aza-BODIPY: A New Vector for Enhanced Theranostic Boron Neutron Capture Therapy Applications. *Cells* [online]. 2020, **9**(9), 1953. ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:10.3390/cells9091953
- [52] SANCEY, Lucie, Shady KOTB, Charles TRUILLET, Florence APPAIX, Arthur MARAIS, Eloïse THOMAS, Boudewijn VAN DER SANDEN, Jean Philippe KLEIN, Blandine LAURENT, Michèle COTTIER, Rodolphe ANTOINE, Philippe DUGOURD, Gérard PANCZER, François LUX, Pascal PERRIAT, Vincent MOTTO-ROS a Olivier TILLEMENT. Long-term in Vivo clearance of gadolinium-based AGuIX nanoparticles and their biocompatibility after systemic injection. *ACS Nano* [online]. 2015, **9**(3), 2477–2488. ISSN 1936086X. Dostupné z: doi:10.1021/acsnano.5b00552
- [53] LE GUÉVEL, Xavier, Maxime HENRY, Vincent MOTTO-ROS, Elena LONGO, Maria I. MONTAÑEZ, Frédéric PELASCINI, Ombeline DE LA ROCHEFOUCAULD, Philippe ZEITOUN, Jean-Luc COLL, Véronique JOSSERAND a Lucie SANCEY. Elemental and optical imaging evaluation of zwitterionic gold nanoclusters in glioblastoma mouse models. *Nanoscale* [online]. 2018, **10**(39), 18657–18664. ISSN 2040-3364. Dostupné z: doi:10.1039/C8NR05299A
- [54] KAISER, Jozef, Karel NOVOTNÝ, Madhavi Z. MARTIN, Aleš HRDLIČKA, Radomír MALINA, Martin HARTL, Vojtěch ADAM a René KIZEK. Trace elemental analysis by laser-induced breakdown spectroscopy—Biological applications. *Surface Science Reports* [online]. 2012, **67**(11–12), 233–243. ISSN 01675729. Dostupné z: doi:10.1016/j.surfrep.2012.09.001
- [55] MOTTO-ROS, V., L. SANCEY, X.C. WANG, Q.L. MA, F. LUX, X.S. BAI, G. PANCZER, O. TILLEMENT a J. YU. Mapping nanoparticles injected into a biological tissue using laser-induced breakdown spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2013, **87**, 168–174. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2013.05.020
- [56] GIMENEZ, Y., B. BUSSE, F. TRICHARD, A. KULESZA, J. M. LAURENT, V. ZAUN, F. LUX, J. M. BENOIT, G. PANCZER, P. DUGOURD, O. TILLEMENT, F. PELASCINI, L. SANCEY a V. MOTTO-ROS. 3D Imaging of Nanoparticle Distribution in Biological Tissue by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *Scientific Reports* [online]. 2016, **6**(June), 1–9. ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/srep29936
- [57] JOLIVET, L., M. LEPRINCE, S. MONCAYO, L. SORBIER, C.-P. LIENEMANN a V. MOTTO-ROS. Review of the recent advances and applications of LIBS-based imaging. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2019, **151**, 41–53. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2018.11.008
- [58] BUSSE, Benoit, Samuel MONCAYO, Jean-Luc COLL, Lucie SANCEY a Vincent MOTTO-ROS. Elemental imaging using laser-induced breakdown spectroscopy: A new and promising approach for biological and medical applications. *Coordination Chemistry Reviews* [online]. 2018, **358**, 70–79. ISSN 00108545. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2017.12.006
- [59] MODLITBOVÁ, Pavlína, Pavel POŘÍZKA a Jozef KAISER. Laser-induced breakdown spectroscopy as a promising tool in the elemental bioimaging of plant tissues. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2020, **122**, 115729. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2019.115729
- [60] LO, Su-Tang, André F. MARTINS, Veronica Clavijo JORDAN a A. Dean SHERRY. Zinc as an Imaging Biomarker of Prostate Cancer. *Israel Journal of Chemistry* [online]. 2017, **57**(9), 854–861. ISSN 00212148. Dostupné z: doi:10.1002/ijch.201700043

- [61] MULWARE, Stephen Juma. Comparative Trace Elemental Analysis in Cancerous and Noncancerous Human Tissues Using PIXE. *Journal of Biophysics* [online]. 2013, **2013**, 1–8. ISSN 1687-8000. Dostupné z: doi:10.1155/2013/192026
- [62] SINGH, Sudhir P., Katarina VOGEL-MIKUŠ, Primož VAVPETIČ, Luka JEROMEL, Primož PELICON, Jitendra KUMAR a Rakesh TULI. Spatial X-ray fluorescence micro-imaging of minerals in grain tissues of wheat and related genotypes. *Planta* [online]. 2014, **240**(2), 277–289. ISSN 0032-0935. Dostupné z: doi:10.1007/s00425-014-2084-4
- [63] DUNHAM, Sage J. B., Joanna F. ELLIS, Nameera F. BAIG, Nydia MORALES-SOTO, Tianyuan CAO, Joshua D. SHROUT, Paul W. BOHN a Jonathan V. SWEEDLER. Quantitative SIMS Imaging of Agar-Based Microbial Communities. *Analytical Chemistry* [online]. 2018, **90**(9), 5654–5663. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.7b05180
- [64] MONROE, Eric B., Suresh P. ANNANGUDI, Nathan G. HATCHER, Howard B. GUTSTEIN, Stanislav S. RUBAKHIN a Jonathan V. SWEEDLER. SIMS and MALDI MS imaging of the spinal cord. *PROTEOMICS* [online]. 2008, **8**(18), 3746–3754. ISSN 16159853. Dostupné z: doi:10.1002/pmic.200800127
- [65] PUSHIE, M. Jake, Ingrid J. PICKERING, Malgorzata KORBAS, Mark J. HACKETT a Graham N. GEORGE. Elemental and Chemically Specific X-ray Fluorescence Imaging of Biological Systems. *Chemical Reviews* [online]. 2014, **114**(17), 8499–8541. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr4007297
- [66] ZHANG, Run, Li LI, Yasmina SULTANBAWA a Zhi Ping XU. X-ray fluorescence imaging of metals and metalloids in biological systems. *American journal of nuclear medicine and molecular imaging* [online]. 2018, **8**(3), 169–188. ISSN 2160-8407. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30042869>
- [67] COLLINGWOOD, Joanna F a Freddy ADAMS. Chemical imaging analysis of the brain with X-ray methods. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2017, **130**, 101–118. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2017.02.013
- [68] SILVA, Marina P., Danilo F. SOAVE, Alfredo RIBEIRO-SILVA a Martin E. POLETTI. Trace elements as tumor biomarkers and prognostic factors in breast cancer: A study through energy dispersive x-ray fluorescence. *BMC Research Notes* [online]. 2012, **5**, 1–11. ISSN 17560500. Dostupné z: doi:10.1186/1756-0500-5-194
- [69] FINNEGAN, Mary E., Naomi P. VISANJI, Isolda ROMERO-CANELON, Emily HOUSE, Surya RAJAN, J. Frederick W. MOSSELMANS, Lili-Naz HAZRATI, Jon DOBSON a Joanna F. COLLINGWOOD. Synchrotron XRF imaging of Alzheimer's disease basal ganglia reveals linear dependence of high-field magnetic resonance microscopy on tissue iron concentration. *Journal of Neuroscience Methods* [online]. 2019, **319**, 28–39. ISSN 01650270. Dostupné z: doi:10.1016/j.jneumeth.2019.03.002
- [70] SABINE BECKER, J. Imaging of metals in biological tissue by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS): state of the art and future developments. *Journal of Mass Spectrometry* [online]. 2013, **48**(2), 255–268. ISSN 10765174. Dostupné z: doi:10.1002/jms.3168
- [71] SUSSULINI, Alessandra, Julia Susanne BECKER a Johanna Sabine BECKER. Laser ablation ICP-MS: Application in biomedical research. *Mass Spectrometry Reviews* [online]. 2017, **36**(1), 47–57. ISSN 02777037. Dostupné z: doi:10.1002/mas.21481
- [72] GONZÁLEZ DE VEGA, Raquel, María Luisa FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, Jorge PISONERO, Noemí EIRÓ, Francisco J. VIZOSO a Alfredo SANZ-MEDEL. Quantitative bioimaging of Ca, Fe, Cu and Zn in breast cancer tissues by LA-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* [online]. 2017, **32**(3), 671–677. ISSN 0267-9477. Dostupné z: doi:10.1039/C6JA00390G
- [73] NIEDZWIECKI, Megan M., Christine AUSTIN, Romain REMARK, Miriam MERAD,

- Sacha GNJATIC, Guadalupe ESTRADA-GUTIERREZ, Aurora ESPEJEL-NUÑEZ, Hector BORBOA-OLIVARES, Mario GUZMAN-HUERTA, Rosalind J. WRIGHT, Robert O. WRIGHT a Manish ARORA. A multimodal imaging workflow to visualize metal mixtures in the human placenta and explore colocalization with biological response markers. *Metallomics* [online]. 2016, **8**(4), 444–452. ISSN 1756-5901. Dostupné z: doi:10.1039/C6MT00010J
- [74] ZORIY, Myroslav V., Markus DEHNHARDT, Andreas MATUSCH a J. Sabine BECKER. Comparative imaging of P, S, Fe, Cu, Zn and C in thin sections of rat brain tumor as well as control tissues by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2008, **63**(3), 375–382. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2007.11.030
- [75] NEUMANN, Boris, Simone HÖSL, Karima SCHWAB, Franz THEURING a Norbert JAKUBOWSKI. Multiplex LA-ICP-MS bio-imaging of brain tissue of a parkinsonian mouse model stained with metal-coded affinity-tagged antibodies and coated with indium-spiked commercial inks as internal standards. *Journal of Neuroscience Methods* [online]. 2020, **334**, 108591. ISSN 01650270. Dostupné z: doi:10.1016/j.jneumeth.2020.108591
- [76] THYSSEN, G. M., M. HOLTKAMP, H. KAULFÜRST-SOBOLL, C. A. WEHE, M. SPERLING, A. VON SCHAEWEN a U. KARST. Elemental bioimaging by means of LA-ICP-OES: investigation of the calcium, sodium and potassium distribution in tobacco plant stems and leaf petioles. *Metallomics* [online]. 2017, **9**(6), 676–684. ISSN 1756-5901. Dostupné z: doi:10.1039/C7MT00003K
- [77] TAYEBI, Lobat, ed. *Applications of Biomedical Engineering in Dentistry* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2020. ISBN 978-3-030-21582-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-21583-5
- [78] RETROUVEY, Jean-Marc, Michel GOLDBERG a Stéphane SCHWARTZ. Dental Development and Maturation, from the Dental Crypt to the Final Occlusion. In: *Pediatric Bone* [online]. B.m.: Elsevier, 2012, s. 83–108. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-382040-2.10005-X
- [79] LOW, I.M., N. DURAMAN a U. MAHMOOD. Mapping the structure, composition and mechanical properties of human teeth. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2008, **28**(2), 243–247. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2006.12.013
- [80] THAREJA, R.K., A.K. SHARMA a Shobha SHUKLA. Spectroscopic investigations of carious tooth decay. *Medical Engineering & Physics* [online]. 2008, **30**(9), 1143–1148. ISSN 13504533. Dostupné z: doi:10.1016/j.medengphy.2008.02.005
- [81] ANDERSSON, Lars a Barbro MALMGREN. The Problem Of Dentoalveolar Ankylosis And Subsequent Replacement Resorption In The Growing Patient. *Australian Endodontic Journal* [online]. 1999, **25**(2), 57–61. ISSN 13291947. Dostupné z: doi:10.1111/j.1747-4477.1999.tb00088.x
- [82] HADI, Aslan, Coval MARIUS, Shemesh AVI, Webber MARIEL a Birnboim-Blau GALIT. Ankylosed permanent teeth: incidence, etiology and guidelines for clinical management. *Medical and Dental Research* [online]. 2018, **1**(1). ISSN 26315785. Dostupné z: doi:10.15761/MDR.1000101
- [83] HAMMARSTROM, Lars, Leif BLOMLOF a Sven LINDSKOG. Dynamics of dentoalveolar ankylosis and associated root resorption. *Dental Traumatology* [online]. 1989, **5**(4), 163–175. ISSN 1600-4469. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-9657.1989.tb00354.x
- [84] LINDSKOG, Sven, Angela M. PIERCE, Leif BLOMLOF a Lars HAMMARSTROM. The role of the necrotic periodontal membrane in cementum resorption and ankylosis. *Dental Traumatology* [online]. 1985, **1**(3), 96–101. ISSN 1600-4469. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-9657.1985.tb000354.x

- z: doi:10.1111/j.1600-9657.1985.tb00569.x
- [85] HAMMARSTROM, Lars, Leif BLOMLOF, Barry FEIGLIN, Lars ANDERSSON a Sven LINDSKOG. Replantation of teeth and antibiotic treatment. *Dental Traumatology* [online]. 1986, **2**(2), 51–57. ISSN 1600-4469. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-9657.1986.tb00124.x
- [86] ANDREASEN, J O. Analysis of pathogenesis and topography of replacement root resorption (ankylosis) after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Swedish dental journal* [online]. 1980, **4**(6), 231–40. ISSN 0347-9994. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6938062>
- [87] ANDERSSON, Lars, Sven LINDSKOG, Leif BLOMLÖF, Karl-Goran HEDSTRÖM a Lars HAMMARSTRÖM. Effect of masticatory stimulation on dentoalveolar ankylosis after experimental tooth replantation. *Dental Traumatology* [online]. 1985, **1**(1), 13–6. ISSN 16004469. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-9657.1985.tb00552.x
- [88] RAGHOEBAR, G. M., G. BOERING, H.W.B. JANSEN a A. VISSINK. Secondary retention of permanent molars: a histologic study. *Journal of Oral Pathology and Medicine* [online]. 1989, **18**(8), 427–431. ISSN 0904-2512. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0714.1989.tb01338.x
- [89] DUCOMMUN, Franziska, Michael M BORNSTEIN, Dieter BOSSHARDT, Christos KATSAROS a Karl DULA. Diagnosis of tooth ankylosis using panoramic views, cone beam computed tomography, and histological data: a retrospective observational case series study. *European Journal of Orthodontics* [online]. 2018, **40**(3), 231–238. ISSN 0141-5387. Dostupné z: doi:10.1093/ejo/cjx063
- [90] BERTEL, Michael H., Thomas WEINBERGER, Kerstin SCHWARZ, Reinhard GRUBER a Adriano G. CRISMANI. Resonance frequency analysis: a new diagnostic tool for dental ankylosis. *European Journal of Oral Sciences* [online]. 2012, **120**(3), 255–258. ISSN 09098836. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0722.2012.00959.x
- [91] MARATOVÁ, Klára. *BIOLOGIE MYŠI DOMÁČÍ (MUS MUSCULUS)* [online]. Dostupné z: <http://biologie.pedf.cuni.cz/maratova/biologie-mysi-domaci.html>
- [92] DANNEMAN, Peggy J., Mark A. SUCKOW a Cory BRAYTON. *The Laboratory Mouse* [online]. B.m.: CRC Press, 2000. ISBN 9780849376276. Dostupné z: doi:10.1201/9780849376276
- [93] ROUGE, Melissa a Richard BOWEN. *Dental Anatomy of Rodents* [online]. Dostupné z: <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/pregastric/rodentpage.html>
- [94] MALOCCLUSION IN THE LABORATORY MOUSE. *JAX Notes* [online]. 2003. Dostupné z: <https://www.jax.org/news-and-insights/2003/april/malocclusion-in-the-laboratory-mouse#>
- [95] PUGACH, Megan K. a Carolyn W. GIBSON. Analysis of enamel development using murine model systems: approaches and limitations. *Frontiers in Physiology* [online]. 2014, **5**. ISSN 1664-042X. Dostupné z: doi:10.3389/fphys.2014.00313
- [96] FORSHAW, R. Dental indicators of ancient dietary patterns: dental analysis in archaeology. *British Dental Journal* [online]. 2014, **216**(9), 529–535. ISSN 0007-0610. Dostupné z: doi:10.1038/sj.bdj.2014.353
- [97] GRANDJEAN, Philippe a Poul J. JØRGENSEN. Retention of lead and cadmium in prehistoric and modern human teeth. *Environmental Research* [online]. 1990, **53**(1), 6–15. ISSN 00139351. Dostupné z: doi:10.1016/S0013-9351(05)80126-4
- [98] FERGUSSON, Jack E. a Nigel G. PURCHASE. The analysis and levels of lead in human teeth: A review. *Environmental Pollution* [online]. 1987, **46**(1), 11–44. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/0269-7491(87)90143-6
- [99] CARVALHO, M.L, C CASACA, T PINHEIRO, J.P MARQUES, P CHEVALLIER a A.S CUNHA. Analysis of human teeth and bones from the chalcolithic period by X-ray

- spectrometry. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* [online]. 2000, **168**(4), 559–565. ISSN 0168583X. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-583X(00)00049-5
- [100] BRENN, R, Ch HAUG, U KLAR, S ZANDER, K.W ALT, D.N JAMIESON, K.K LEE a H SCHUTKOWSKI. Post-mortem intake of lead in 11th century human bones and teeth studied by milli- and microbeam PIXE and RBS. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* [online]. 1999, **158**(1–4), 270–274. ISSN 0168583X. Dostupné z: doi:10.1016/S0168-583X(99)00305-5
- [101] EDINBOROUGH, Marija, Matthew PILGRIM, Sarah FEARN, Andrijana CVETKOVIĆ, Branko MIHAILOVIĆ, Rade GRBIĆ a Kevan EDINBOROUGH. Mineralisation within human tooth cementum identified by secondary ion mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* [online]. 2020, **35**(6), 1199–1206. ISSN 0267-9477. Dostupné z: doi:10.1039/D0JA00045K
- [102] MELIN, Lisa, Jesper LUNDGREN, Per MALMBERG, Jörgen G. NORÉN, Fabian TAUBE a David H. CORNELL. XRMA and ToF-SIMS Analysis of Normal and Hypomineralized Enamel. *Microscopy and Microanalysis* [online]. 2015, **21**(2), 407–421. ISSN 1431-9276. Dostupné z: doi:10.1017/S1431927615000033
- [103] ALMHÖJD, Ulrica S, Jörgen G NORÉN, Anna ARVIDSSON, Åke NILSSON a Peter LINGSTRÖM. Analysis of carious dentine using FTIR and ToF-SIMS. *Oral health and dental management* [online]. 2014, **13**(3), 735–44. ISSN 2247-2452. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25284549>
- [104] HANĆ, Anetta, Aneta OLSZEWSKA a Danuta BARALKIEWICZ. Quantitative analysis of elements migration in human teeth with and without filling using LA-ICP-MS. *Microchemical Journal* [online]. 2013, **110**, 61–69. ISSN 0026265X. Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2013.02.006
- [105] HARE, Dominic, Christine AUSTIN, Philip DOBLE a Manish ARORA. Elemental bio-imaging of trace elements in teeth using laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Journal of Dentistry* [online]. 2011, **39**(5), 397–403. ISSN 03005712. Dostupné z: doi:10.1016/j.jdent.2011.03.004
- [106] FARELL, Jana, Dulasiri AMARASIRIWARDENA, Alan H. GOODMAN a Bernardo ARRIAZA. Bioimaging of trace metals in ancient Chilean mummies and contemporary Egyptian teeth by laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Microchemical Journal* [online]. 2013, **106**, 340–346. ISSN 0026265X. Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2012.09.005
- [107] ALVIRA, F. C., F. Ramirez ROZZI a G. M. BILMES. Laser-induced breakdown spectroscopy microanalysis of trace elements in homo sapiens teeth. *Applied Spectroscopy* [online]. 2010, **64**(3), 313–319. ISSN 00037028. Dostupné z: doi:10.1366/000370210790918328
- [108] SAMEK, O., D.C.S. BEDDOWS, H.H. TELLE, G.W. MORRIS, M. LISKA a J. KAISER. Quantitative analysis of trace metal accumulation in teeth using laser-induced breakdown spectroscopy. *Applied Physics A Materials Science & Processing* [online]. 1999, **69**(S1), S179–S182. ISSN 0947-8396. Dostupné z: doi:10.1007/s003399900277
- [109] ALVIRA, Fernando C., Fernando V. Ramirez ROZZI a Gustavo A. TORCHIA. A new method for relative Sr determination in human teeth enamel. *Journal of Anthropological Sciences* [online]. 2011, **89**, 153–160. Dostupné z: doi:10.4436/jass.89012
- [110] FORTES, Francisco J., Maria D. PEREZ-CARCELES, Agustin SIBON, Aurelio LUNA a J. Javier LASERNA. Spatial distribution analysis of strontium in human teeth by laser-induced breakdown spectroscopy: application to diagnosis of seawater drowning. *International Journal of Legal Medicine* [online]. 2015, **129**(4), 807–813. ISSN 0937-

9827. Dostupné z: doi:10.1007/s00414-014-1131-9
- [111] MARTINEZ, Mauro, Courtney BAYNE, Dylan AIELLO, Matthew JULIAN, Romain GAUME a Matthieu BAUDELET. Multi-elemental matrix-matched calcium hydroxyapatite reference materials for laser ablation: Evaluation on teeth by laser-induced breakdown spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2019, **159**, 105650. ISSN 05848547. Dostupné z: doi:10.1016/j.sab.2019.105650
- [112] GALIOVÁ, M., J. KAISER, K. NOVOTNÝ, M. IVANOV, M. NÝVLTOVÁ FIŠÁKOVÁ, L. MANCINI, G. TROMBA, T. VACULOVÍČ, M. LIŠKA a V. KANICKÝ. Investigation of the osteitis deformans phases in snake vertebrae by double-pulse laser-induced breakdown spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2010, **398**(2), 1095–1107. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-010-3976-1
- [113] DOSEDĚLOVÁ, Hana, Kateřina ŠTĚPÁNKOVÁ, Tomáš ZIKMUND, Herve LESOT, Jozef KAISER, Karel NOVOTNÝ, Jan ŠTEMBÍREK, Zdeněk KNOTEK, Oldřich ZAHRADNÍČEK a Marcela BUCHTOVÁ. Age-related changes in the tooth-bone interface area of acrodont dentition in the chameleon. *Journal of Anatomy* [online]. 2016, **229**(3), 356–368. ISSN 00218782. Dostupné z: doi:10.1111/joa.12490
- [114] GALIOVÁ, Michaela, Jozef KAISER, Francisco J. FORTES, Karel NOVOTNÝ, Radomír MALINA, Lubomír PROKEŠ, Aleš HRDLIČKA, Tomáš VACULOVÍČ, Miriam NÝVLTOVÁ FIŠÁKOVÁ, Jiří SVOBODA, Viktor KANICKÝ a Javier J. LASERNA. Multielemental analysis of prehistoric animal teeth by laser-induced breakdown spectroscopy and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Applied Optics* [online]. 2010, **49**(13), C191. ISSN 0003-6935. Dostupné z: doi:10.1364/AO.49.00C191
- [115] SHAHEDI, Abdolhamed, Esmaeil ESLAMI a Mohammad Reza NOURANI. Influence of Lead on the Interpretation of Bone Samples with Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *Journal of Spectroscopy* [online]. 2016, **2016**, 1–6. ISSN 2314-4920. Dostupné z: doi:10.1155/2016/8205479
- [116] ALHASMI, Abdul M., Mohammed A. GONDAL, Mohamed M. NASR, Sami SHAFIK a Yusuf B. HABIBULLAH. Detection of toxic elements using laser-induced breakdown spectroscopy in smokers' and nonsmokers' teeth and investigation of periodontal parameters. *Applied Optics* [online]. 2015, **54**(24), 7342. ISSN 0003-6935. Dostupné z: doi:10.1364/ao.54.007342
- [117] KASEM, Mohamed A., Richard E. RUSSO a Mohamed Abdel HARITH. Influence of biological degradation and environmental effects on the interpretation of archeological bone samples with laser-induced breakdown spectroscopy. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* [online]. 2011, **26**(9), 1733–1739. ISSN 02679477. Dostupné z: doi:10.1039/c1ja10057b
- [118] DUMKOVÁ, Jana, Tereza SMUTNÁ, Lucie VRLÍKOVÁ, Hana KOTASOVÁ, Bohumil DOČEKAL, Lukáš ČAPKA, Michaela TVRDOŇOVÁ, Veronika JAKEŠOVÁ, Vendula PELKOVÁ, Kamil KŘŮMAL, Pavel COUFALÍK, Pavel MIKUŠKA, Zbyněk VEČEŘA, Tomáš VACULOVÍČ, Zuzana HUSÁKOVÁ, Viktor KANICKÝ, Aleš HAMPL a Marcela BUCHTOVÁ. Variability in the Clearance of Lead Oxide Nanoparticles Is Associated with Alteration of Specific Membrane Transporters. *ACS Nano* [online]. 2020, **14**(3), 3096–3120. ISSN 1936-0851. Dostupné z: doi:10.1021/acsnano.9b08143
- [119] SHAW, James H. a Peter K.-J. YEN. Sodium, Potassium, and Magnesium Concentrations in the Enamel and Dentin of Human and Rhesus Monkey Teeth. *Journal of Dental Research* [online]. 1972, **51**(1), 95–101. ISSN 0022-0345. Dostupné

- z: doi:10.1177/00220345720510013701
- [120] OLSZEWSKA, Aneta a Anetta HANĆ. The potential of trace elements mapping in child's natal tooth by laser ablation-ICPMS method. *Journal of Environmental Health Science and Engineering* [online]. 2021. ISSN 2052-336X. Dostupné z: doi:10.1007/s40201-021-00611-2

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

8.1 Seznam použitých zkratek

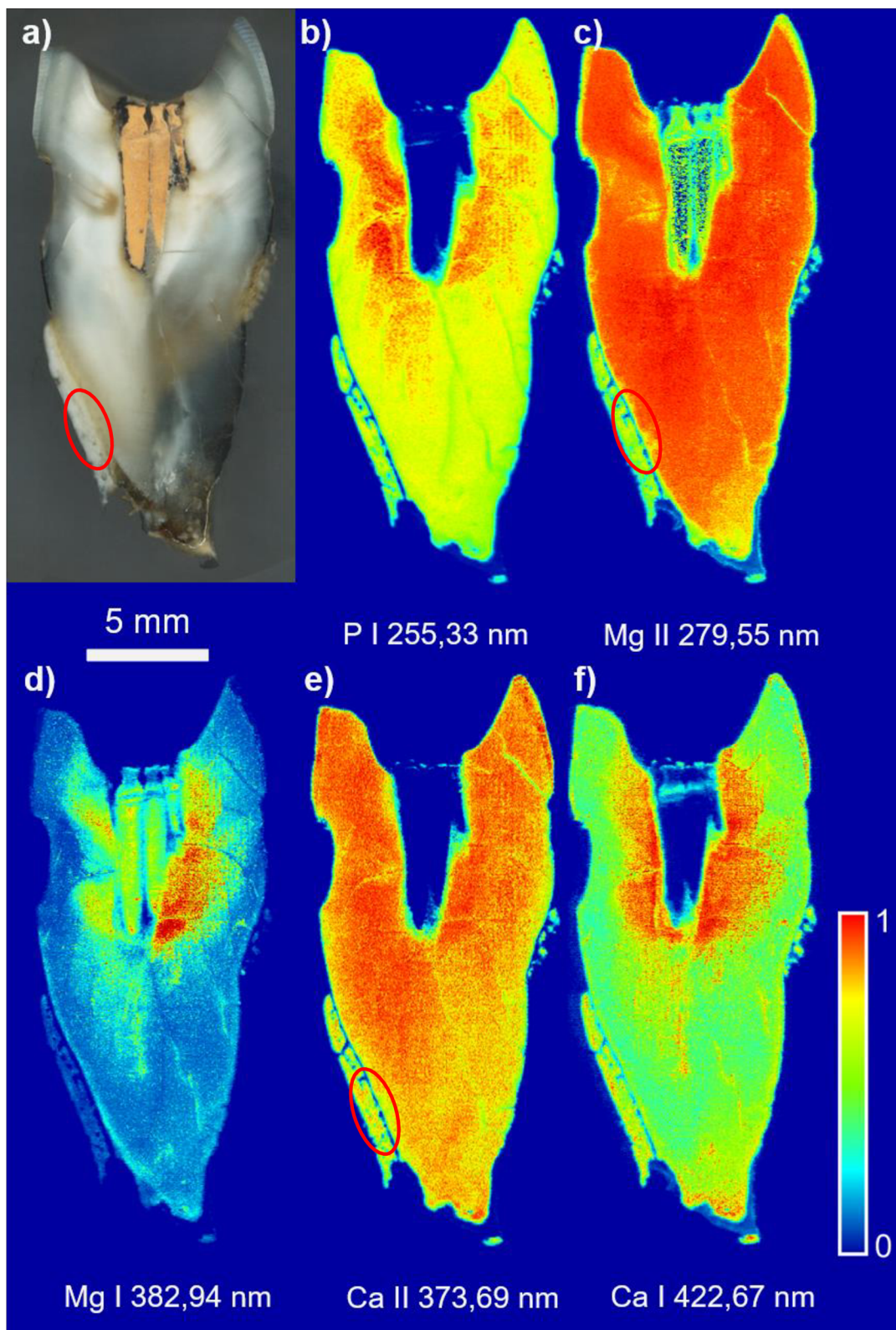
AAS	atomová absorpční spektrometrie, <i>Atomic Absorption Spectroscopy</i>
AES	atomová emisní spektrometrie, <i>Atomic Emission Spectrometry</i>
AMG	autometalografické zobrazování, <i>Autometallographical Imaging</i>
CCD	zařízení s nábojovou vazbou, <i>Charged Coupled Device</i>
CF LIBS	bezkalibrační spektroskopie laserem buzeného plazmatu, <i>Calibration Free Laser-Induced Breakdown Spectroscopy</i>
CT	výpočetní tomografie, <i>Computed Tomography</i>
DP LIBS	dvoupulzní spektroskopie laserem buzeného plazmatu, <i>Double Pulse Laser-Induced Breakdown Spectroscopy</i>
ICCD	intenzifikované zařízení s nábojovou vazbou, <i>Intensified Charged Coupled Device</i>
ICP-MS	indukčně vázaná plazmová hmotnostní spektroskopie, <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
ICP-OES	indukčně vázaná plazmová optická emisní spektrometrie, <i>Inductively coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
ICR	Institut výzkumu rakoviny, <i>Institute of Cancer Research</i>
IR	infračervené, <i>Infrared</i>
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii, <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LA-ICP-MS	laserová ablace s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem, <i>Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
LA-ICP-OES	laserová ablace s optickou emisní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem, <i>Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
LIBS	spektroskopie laserem buzeného plazmatu, <i>Laser-Induced Breakdown Spectroscopy</i>
LIF	laserem indukovaná fluorescence, <i>Laser-Induced Fluorescence</i>
LIPS	laserem indukovaná plazmová spektroskopie, <i>Laser-Induced Plasma Spectroscopy</i>
LOD	limity detekce, <i>Limits of Detection</i>
MALDI-TOF MS	hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem, <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry</i>
NIST	Národní institut pro standardy a technologie, <i>National Institute of Standards and Technology</i>
OES	optická emisní spektrometrie, <i>Optical Emission Spectrometry</i>
PDA	fotodiodové pole, <i>Photodiode Array</i>
PDM	parodontální membrána, <i>Periodontal Membrane</i>
PIXE	částicemi indukovaná rentgenová spektroskopie, <i>Particle Induced X-ray Emission Spectroscopy</i>

PMT	fotonásobič, <i>Photomultiplier Tube</i>
ppb	části na bilion, <i>Parts Per Billion</i>
ppm	části na milion, <i>Parts Per Million</i>
SIMS	hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů, <i>Secondary Ion Mass Spectrometry</i>
SNR	poměr signálu ku šumu, <i>Signal to Noise Ratio</i>
TOF-SIMS	hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů s detektorem doby průletu, <i>Time of Flight Secondary Ion Mass Spectrometry</i>
UV	ultrafialové, <i>Ultraviolet</i>
VIS	viditelné, <i>Visible</i>
XRF	rentgenová fluorescence, <i>X-ray Fluorescence</i>
X-ray mikro CT	rentgenová mikrotomografie, <i>X-ray Microcomputed Tomography</i>

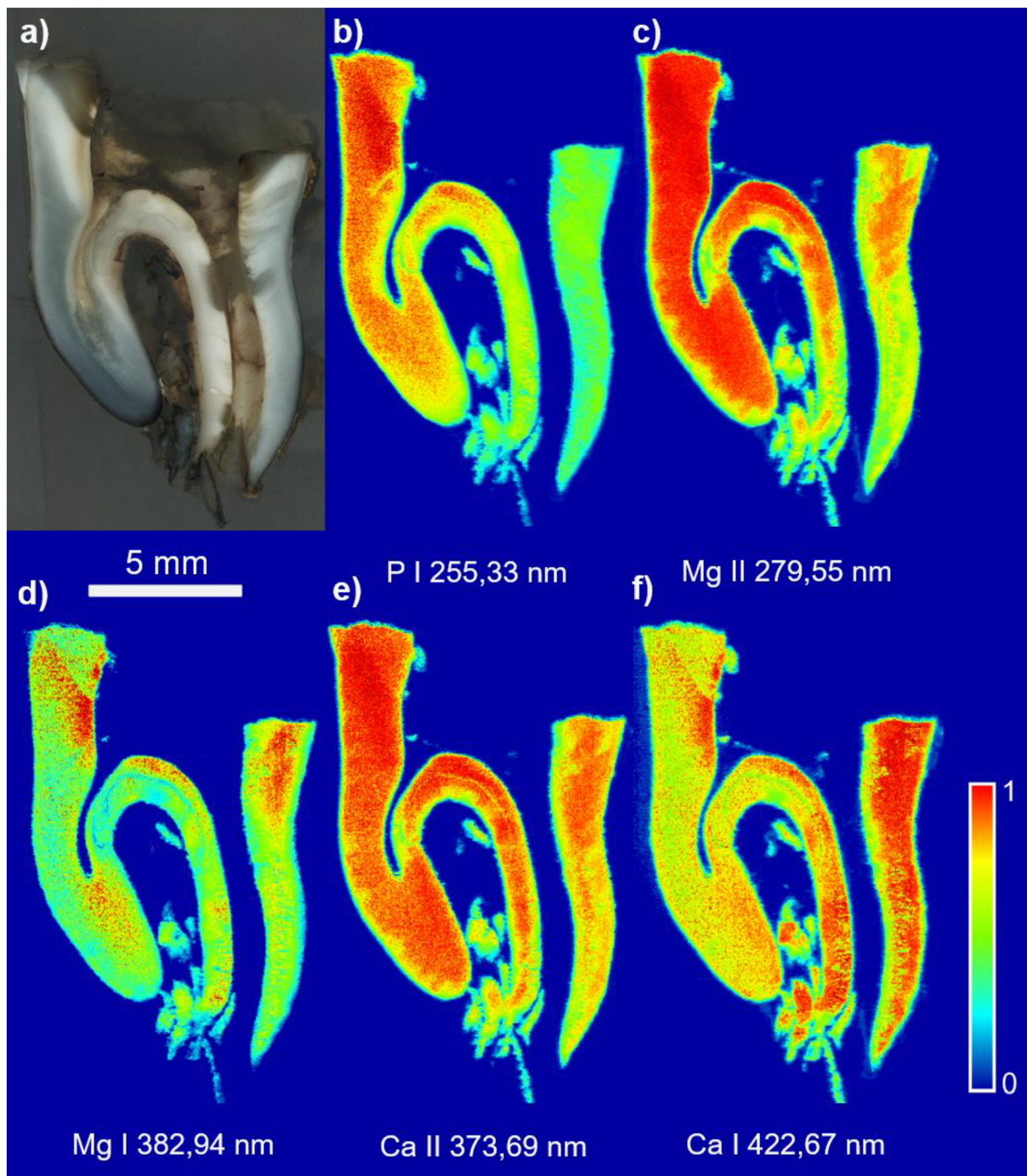
8.2 Seznam použitých symbolů

λ_D	Debeyova délka
c_L	koncentrace analytu
q_L	množství analytu
x_L	nejmenší naměřené intenzity signálu
\bar{x}_{bi}	průměrný signál z blanku
k	číselný faktor
s_{bi}	standardní odchylka blanku

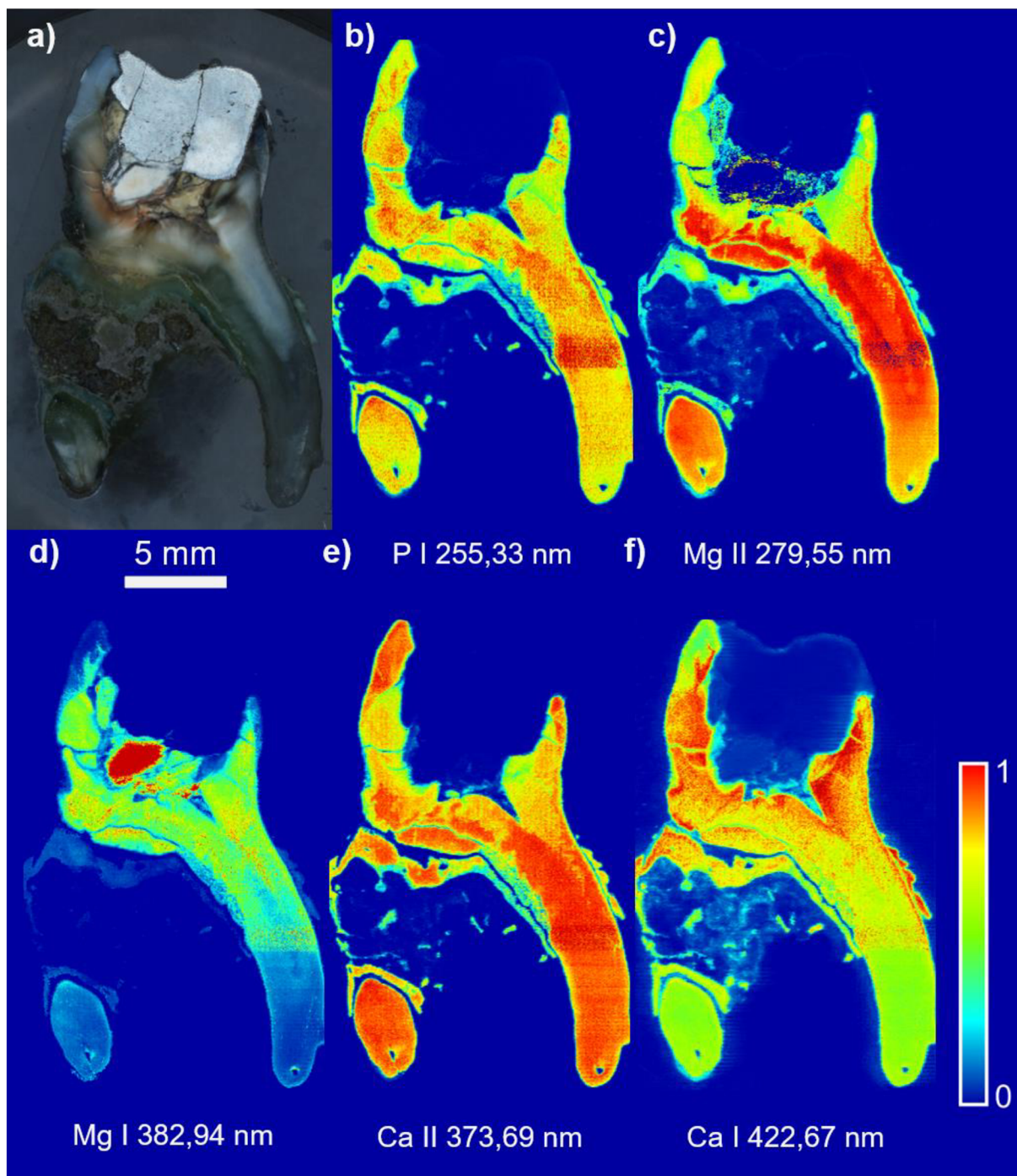
9 PŘÍLOHY



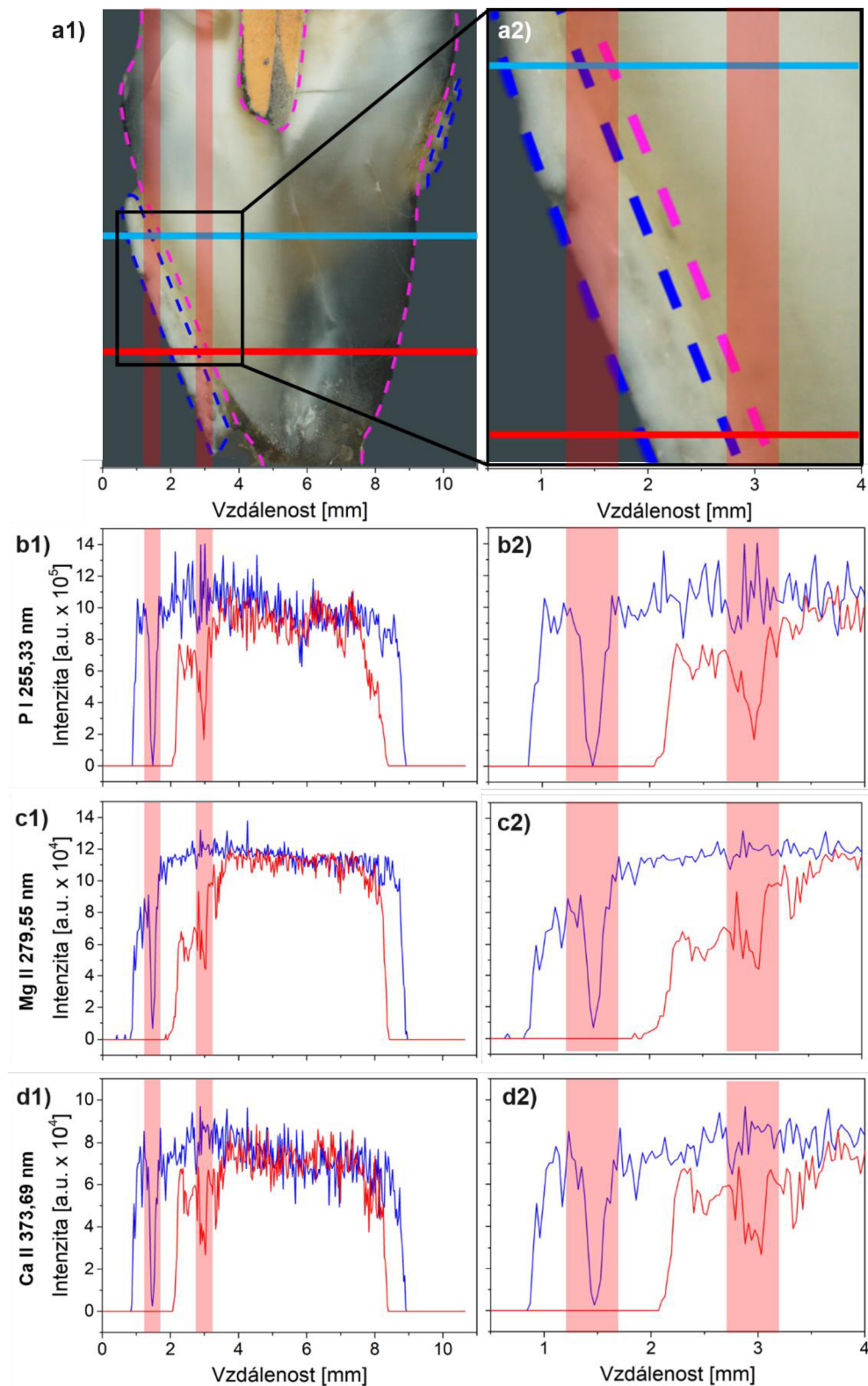
Obrázek 30. Prostorová distribuce prvkového složení pro zub 3B měřený na sestavě FireFly s laserem Quantel Viron při prostorovém rozlišení 30 μm . a) Fotografie zubu 3B před LIBS měřením. b) Mapa distribuce fosforu (P I 255,33 nm); měřená na spektrometru Cz-T. c)–d) Mapa distribuce hořčíku (Mg II 279,55 nm; Mg I 382,94 nm) a e)–f) mapa distribuce vápníku (Ca II 373,69 nm; Ca I 422,67 nm); měřeno na spektrometru Avantes. Červeně je vyznačeno ankylotické spojení.



Obrázek 31. Prostorová distribuce prvkového složení pro zub 4B měřený na sestavě FireFly s laserem Quantel Viron při prostorovém rozlišení $30\ \mu\text{m}$. a) Fotografie zubu 4B před LIBS měřením. b) Mapa distribuce fosforu (P I 255,33 nm); měřená na spektrometru Cz-T. c)–d) Mapa distribuce hořčíku (Mg II 279,55 nm; Mg I 382,94 nm) a e)–f) mapa distribuce vápníku (Ca II 373,69 nm; Ca I 422,67 nm); měřeno na spektrometru Avantes.



Obrázek 32. Prostorová distribuce prvkového složení pro zub 6A měřený na sestavě FireFly s laserem Quantel Viron při prostorovém rozlišení $30\ \mu\text{m}$. a) Fotografie zubu 6A před LIBS měřením. b) Mapa distribuce fosforu (P I 255,33 nm); měřená na spektrometru Cz-T. c)–d) Mapa distribuce hořčíku (Mg II 279,55 nm; Mg I 382,94 nm) a e)–f) mapa distribuce vápníku (Ca II 373,69 nm; Ca I 422,67 nm); měřeno na spektrometru Avantes.



Obrázek 33. a1) Fotografie zubu 3B měřeného na sestavě FireFly s laserem Quantel Viron při prostorovém rozlišení 30 μm . Jednotlivé části zubů jsou barevně odlišeny (dentin – růžová, sklovina – zelená, kost – modrá). a2) Přibližná část zubu 3B, kde se nachází ankylóza (označena červeným svislým pruhem). b1– d2) Grafy distribuce fosforu (P I 255,33 nm), hořčíku (Mg II 279,55 nm) a vápníku (Ca II 373,69 nm) vynesných ve dvou přímkách vedených napříč matricí zubu. Vpravo (b2), c2), d2) je přibližná část zubu 3B. Osa x popisuje vzdálenost od počátku mapy, osa y popisuje intenzitu spektrálních čar. Červeným svislým pruhem je označena oblast ankylózy ve všech fotografiích (a1), a2) a v grafech (b1– d2).