



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

STUDIUM ZMĚN PRVKOVÉ DISTRIBUCE JATERNÍ TKÁNĚ POTKANA S MYOKARDIÁLNÍ FIBRÓZOU POMOCÍ LA-ICP- MS

CHANGES IN ELEMENTAL DISTRIBUTION OF RAT LIVER TISSUE ASSOCIATED WITH MYOCARDIAL
FIBROSIS USING LA-ICP-MS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Eliška Štenclová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

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

BRNO 2023

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1875/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany
životního prostředí
Studentka: **Eliška Štenclová**
Studijní program: Aplikovaná analytická,
environmentální a forenzní chemie
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Michaela Vašinová
Galiová, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Studium změn prvkové distribuce jaterní tkáně potkana s myokardiální fibrózou pomocí LA-ICP-MS

Zadání bakalářské práce:

1. Zpracování rešerše na téma anatomie a funkce jater, identifikace změn probíhajících v játrech v souvislosti s myokardiální fibrózou a dále jejich detekce pomocí pokročilých instrumentálních analytických metod umožňující in situ analýzu se zaměřením na LA-ICP-MS.
2. 2D imaging vzorků jater odebraných potkanům s myokardiální fibrózou včetně jaterní tkáně kontrolní skupiny potkanů s využitím LA-ICP-MS.
3. Porovnání prvkové distribuce a zhodnocení prvkové asociace kontrolní skupiny vs skupina s myokardiální fibrózou.

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2023:

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

Eliška Štenclová
studentka

doc. Mgr. Michaela VašinováGaliová, Ph.D.
vedoucí práce

vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Myokardiální fibróza je patologický stav vyznačující se nadměrnou akumulací extracelulární matrix v srdeční tkáni, což má za následek zhoršenou srdeční funkci a hrozí potenciálně vážné kardiovaskulární komplikace. Novodobé studie ovšem naznačují, že myokardiální fibróza může ovlivnit nejen srdeční tkáň, ale také další orgány, jako jsou například játra. Cílem této bakalářské práce bylo prozkoumat změny v prvkové distribuci jaterní tkáně zdravých jedinců s porovnáním prvkové distribuce jaterní tkáně jedinců, u kterých byla vyvolána myokardiální fibrózou pomocí metody LA-ICP-MS. Při porovnání distribučních map kontrolní a experimentální skupiny byly pozorovány změny především v distribuci izotopů železa, proto mu byla nadále věnována zvláštní pozornost. Výsledky tohoto výzkumu mohou výrazně přispět k lepšímu porozumění vztahu mezi myokardiální fibrózou a jaterní tkání, získané poznatky mohou napomoci k vývoji nových diagnostických přístupů.

ABSTRACT

Myocardial fibrosis is a pathological condition characterized by excessive accumulation of extracellular matrix in cardiac tissue, resulting in impaired cardiac function and potentially serious cardiovascular complications. However, recent studies suggest that myocardial fibrosis may affect not only cardiac tissue but also other organs such as the liver. The aim of this bachelor thesis was to investigate changes in the elemental distribution of liver tissue from healthy individuals by comparing the elemental distribution of liver tissue from individuals with myocardial fibrosis using the LA-ICP-MS method. When comparing the distribution maps of the control and experimental groups, changes were observed mainly in the distribution of iron isotopes; therefore, particular attention was later paid to it. The results of this research may contribute significantly to a better understanding of the relationship between myocardial fibrosis and liver tissue, and the knowledge gained may help to develop new diagnostic approaches.

KLÍČOVÁ SLOVA

Myokardiální fibróza, jaterní tkáň, potkaní model, analýza měkkých tkání, LA-ICP-MS, 2D imaging

KEYWORDS

Myocardial fibrosis, liver tissue, rat model, soft tissue analysis, LA-ICP-MS, 2D imaging

ŠTRENČLOVÁ, Eliška. *Studium změn prvkové distribuce jaterní tkáně potkana s myokardiální fibrózou pomocí LA-ICP-MS*. Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/149042>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí. Vedoucí práce Michaela Vašinová Galiová.

PROHLÁŠENÍ

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

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala své vedoucí doc. Mgr. Michaela Vašinové Galiové, Ph. D za čas, který mi věnovala, odborné rady, jež mi předala, a především za možnost pracovat na tomto výzkumu. Poděkování patří také mému konzultantovi MUDr. Tiborovi Stračinovi a zaměstnancům Fakultní nemocnice u sv. Anny za zpracování vzorků. V neposlední řadě bych chtěla velice poděkovat své rodině a přátelům, kteří při mně stáli po celou dobu mého studia i v těch nejnáročnějších časech.

OBSAH

1. ÚVOD	6
2. TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1 Játra	7
2.1.1 Stavba jater	7
2.1.2 Onemocnění jater	9
2.2 Myokardiální fibróza.....	11
2.2.1 Důvody vzniku myokardiální fibrózy	12
2.3 Diagnostické a zobrazovací metody využívané v medicíně	12
2.4 Porovnání metod pro přímou analýzu pevných vzorků s roztokovými metodami ..	13
2.5 Analytické metody pro in situ analýzu měkkých tkání	14
2.5.1 Analytické metody využívající RTG záření	14
2.5.2 „Laser assisted“ metody	15
2.5.3 Hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů	20
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
3.1 Použité chemikálie a certifikované referenční materiály	22
3.2 Použité pomůcky a přístroje	22
3.2.1 Laserový ablační systém	22
3.2.2 Hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem.....	23
3.3 Vzorky	23
3.3.1 Vyvolání myokardiální fibrózy	23
3.3.2 Odebrání vzorků	24
3.3.3 Příprava řezů pro analýzu	24
3.4 Analýza pomocí LA-ICP-MS	25
3.4.1 Ladění ICP-MS	25
3.4.2 Experimentální parametry laserové ablace	26
3.4.3 Postup měření	26
3.4.4 Vyhodnocení signálu	28
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	29
4.1 2D imaging kontrolních vzorků	30
4.1.1 Porovnání distribuce pouze vybraných prvků	33
4.2 Porovnání skupiny fibrózou zasažených tkání s kontrolní skupinou a v závislosti na stupni fibrózy	36
5. ZÁVĚR	40
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	41
7. BIBLIOGRAFIE	42

1. ÚVOD

Myokardiální fibróza je charakteristický znak doprovázející srdeční selhání a je definována zvýšeným množstvím kolagenu v myokardu, oproti srdečním myocytům. Tento stav zásadním způsobem ovlivňuje funkci srdce a může vyústit vážnými kardiovaskulárními komplikacemi. Nicméně samotná myokardiální fibróza může nepříznivě ovlivnit i jiné orgány, například játra.

Játra jsou pro lidský organismus klíčovým orgánem, hlavně z hlediska detoxikace. Důležitou roli hrají také v metabolismech tuků, bílkovin a sacharidů. Jakékoliv změny proběhlé v játrech mohou zásadním způsobem ovlivnit celkové zdraví jedince. Novodobé studie vykazují, že srdeční selhání a funkce jater spolu velmi úzce souvisí. Avšak přesné mechanismy a interakce mezi myokardiální fibrózou a jaterní tkání nebyly dosud dostatečně prozkoumány.

Pozornost byla věnována především problematice v oblasti anatomie a funkce jater, důvodům vzniku myokardiální fibrózy, a také procesům probíhajícím v jaterní tkáni v důsledku myokardiální fibrózy.

Četné epidemiologické studie také prokázaly vliv polutantů v životním prostředí na funkci jater a vznik různých kardiovaskulárních onemocnění.

Ke včasnému odhalení poškození jaterní tkáně se v lékařském prostředí využívá různých zobrazovacích metod, jakými jsou například magnetická rezonance nebo výpočetní tomografie. V dnešní době je centrem zájmu zdokonalení těchto metod a tím umožnění snadnější a rychlejší predikce patologických změn na jednotlivých orgánech.

Velkým přínosem mohou být v této oblasti také pokročilé analytické instrumentální metody, díky kterým získáme informace o prvkové distribuci v zasažených tkáních. Jednou z nich je například hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem ve spojení s laserovou ablací (LA-ICP-MS), která umožňuje ultrastopovou analýzu vybraných prvků v měkkých tkáních.

Identifikace a kvantifikace změn prvkové distribuce v dané tkáni může být velice nápomocná a přispět k lepšímu porozumění patofyziologických procesů a změn spojených s tímto onemocněním. Dále můžou tyto výsledky také výrazně přispět k identifikaci potenciálních biomarkerů a léčebných postupů a strategií při léčbě pacientů trpících myokardiální fibrózou.

V této bakalářské práci byla podrobněji rozebrána příprava daných vzorků jaterní tkáně, analýza prvků pomocí pokročilé analytické instrumentální metody LA-ICP-MS s porovnáním výsledků mezi kontrolní a experimentální skupinou. Následně byla sepsána diskuze nad dosaženými výsledky, interpretace jejich významu a také zařazení výsledků do kontextu v rámci předchozí vědecké rešerše.

Tato práce představuje důležitý krok v rámci lepšího porozumění vzájemného vztahu mezi myokardiální fibrózou a jaterní tkání, její výsledky mají potenciál ovlivnit diagnostiku, léčbu a prevenci kardiovaskulárních onemocnění.

2. TEORETICKÁ ČÁST

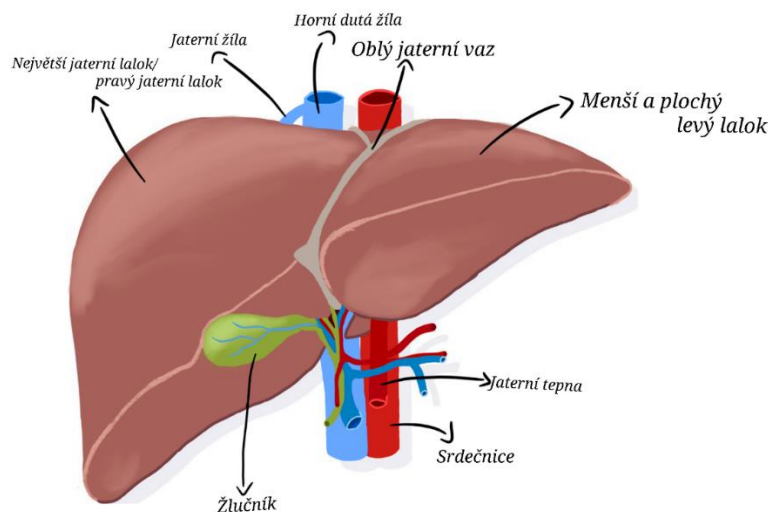
2.1 Játra

Játra jsou jedinečným orgánem, nacházejícím se v pravé horní části dutiny břišní, jenž nese mnoho neobvyklých vlastností, jak anatomických, tak funkčních, žádný jiný nepárový orgán se s játry nedá srovnávat. Je to největší a nejtěžší žláznový orgán v těle s bohatým krevním zásobením [1]. Zvláštností je, že krevní zásobením jater přichází ze dvou zdrojů, přibližně 25 % krve pochází z jaterní tepny a zbylých 75 % tvoří žilní krev z vrátnicové žíly [2].

Při narození představují játra asi 4 % tělesné hmotnosti člověka, což se s věkem mění a na konci růstového období játra tvoří už jen 2,5–3 % váhy jedince [2]. Játra jsou nejdůležitějším orgánem pro udržování homeostázy v těle, probíhá zde většina metabolických procesů, mají klíčovou roli v metabolismech tuků, sacharidů a bílkovin [2; 3]. V důsledku množství probíhajících metabolických procesů mají játra vysokou spotřebu energie, okolo 20 % celkové tělesné spotřeby kyslíku [2]. Unikátní funkcí jater je produkce a recirkulace žluči, což je nezbytné pro trávení lipidů a vylučování toxických vedlejších produktů jako je například bilirubin nebo xenobiotika [3].

2.1.1 Stavba jater

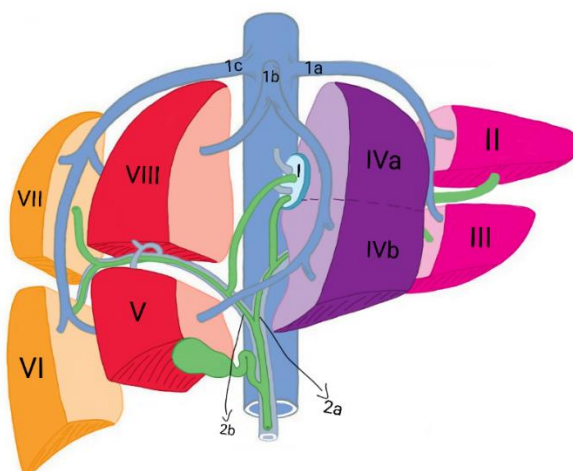
Zevně jsou játra rozdělena srpovitým vazem na dva laloky, menší levý a větší pravý lalok (Obrázek 1). Srpovitý vaz slouží také pro připojení jater k břišní stěně. Z jeho dolního okraje vychází oblý jaterní vaz, který spojuje játra s pupkem, což je pozůstatkem pupečnickové žíly. [4].



Obrázek 1: Schéma jater

Dle Couinaudovy klasifikace, tedy jedné z nejpoužívanějších, se játra dále vnitřně dělí na osm segmentů očíslovaných podle hodinových ručiček (Obrázek 2). Každý segment má

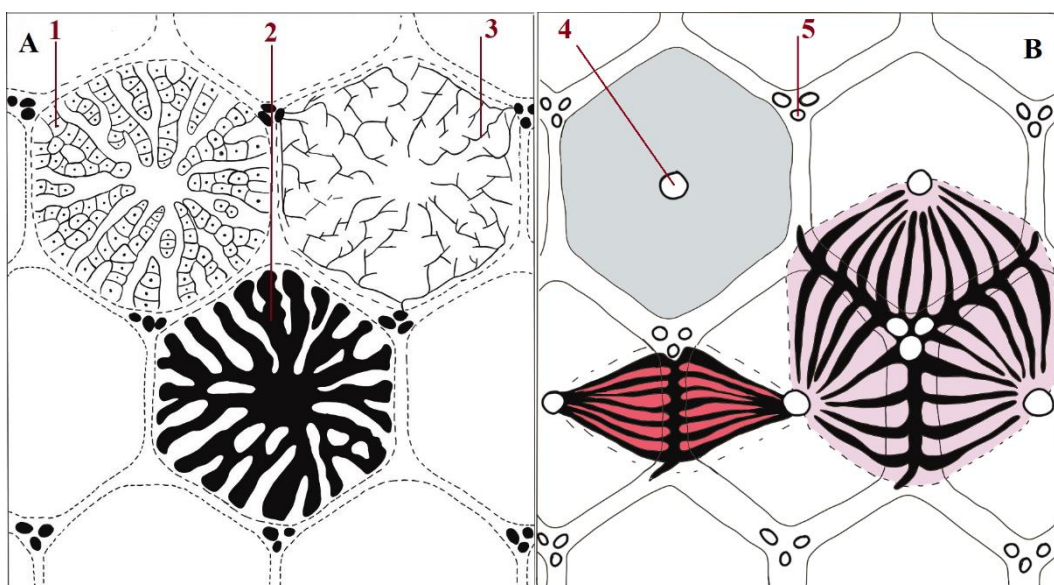
ve středu svou tepnu, žílu a žlučovod [4]. Toto rozdělení umožňuje chirurgům odstranění jednotlivých segmentů podle vlastního cévního zásobení [5].



Obrázek 2: Jaterní segmenty dle Couinauda

1a, 1b, 1c – levá, střední, pravá jaterní žíla; 2a, 2b – levá a pravá větev porty; I-VIII – jaterní segmenty

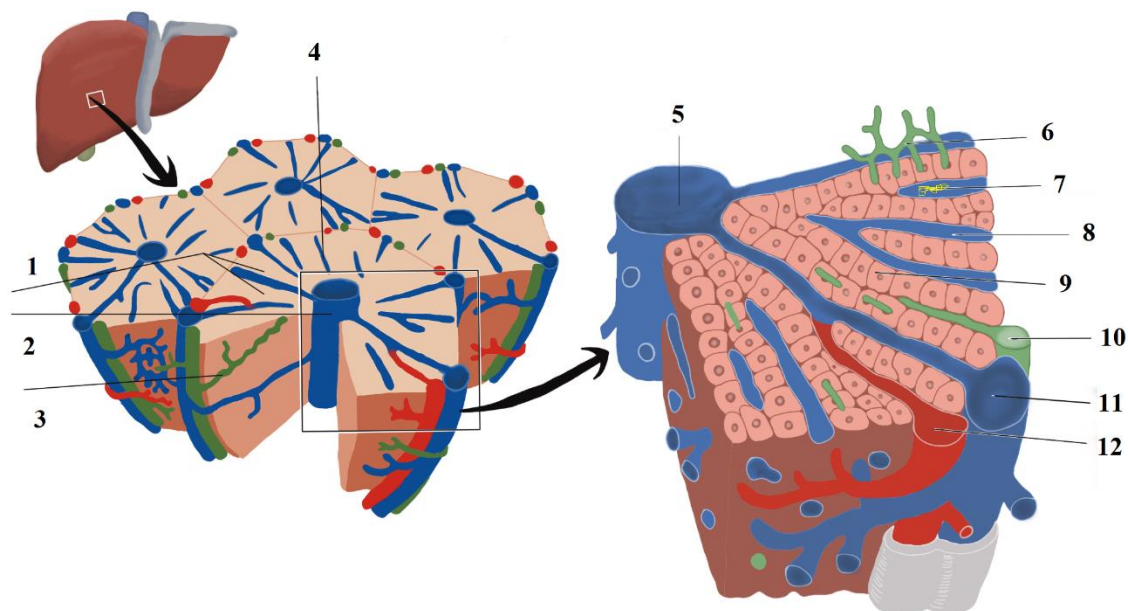
Jaterní parenchym, jehož základem jsou jaterní buňky (hepatocyty), je hlavní součástí jater. Hepatocyty tvoří trámce, které jsou uspořádané do polyedrických lalůčků (Obrázek 3, 4) a slouží k tvorbě žluči, která je dále odváděna žlučovými kanálky, jež se spojují do intralobulárních žlučovodů ústících do portobiliárních prostorů [6].



Obrázek 3: Stavba jaterního lalůčku a funkční jednotky jaterní tkáně

1 – radiálně uspořádané trámce jaterních buněk (hepatocyty); 2 – krevní sinusoidy; 3 – žlučové kanálky;

4 – v. centralis (centrální žíla); 5 – portobiliární prostor; klasický, polygonální jaterní lalůček/lalůček centrální žíly (šedě); portální lalůček, má střed v portobiliárním prostoru (růžově); jaterní acinus, je kosodélníková výseč dvou sousedních klasických lalůčků (červeně)



Obrázek 4: Stavba jater

1 – hepatocyty; 2 – v. centralis; 3 – žlučová kapilára; 4 – jaterní sinusoida; 5 – v. centralis; 6 – žlučové kapiláry; 7 – Kupfferova buňka; 8 – jaterní sinusoida; 9 – hepatocyt; 10 – interlobulární žlučovod; 11 – v. interlobularis; 12 – a. interlobularis

Již zmíněné lalůčky centrální žíly jsou základní morfologickou jednotkou jater a mají tvar šestiúhelníku (Obrázek 3, 4) [5]. Trámce hepatocytů se sbíhají směrem do středu lalůčku a mezi nimi se proplétají jaterní sinusoidy (vlásečnice), na jejichž úrovni dochází k mísení portální a arteriální krve. V místě spojení tří sousedních centrálních lalůčků se vyskytuje takzvaný portobiliární prostor obsahující trias hepatica – interlobulární žílu, tepnu a žlučovod (Obrázek 3) [6]. Portální jaterní lalůček je tvořen z úseků tří přilehlých jaterních lalůčků, které jsou zásobeny z cév portobiliárního prostoru. Část dvou sousedních jaterních lalůčků tvoří funkční jednotku jaterního parenchymu – jaterní aciny, které jsou zásobované ze společné interlobulární větve vrátnicové žíly (Obrázek 3) [6].

Jelikož jsou játra pro lidské tělo nenahraditelným orgánem, a ačkoliv je jejich regenerační schopnost vysoká, je problematika jejich onemocnění mezi odborníky stále hojně diskutované téma.

2.1.2 Onemocnění jater

Onemocnění jater, jakými jsou například hepatitida B (C), nealkoholové ztučnění jater, alkoholové onemocnění jater se související jaterní cirhózou nebo hepatocelulárním karcinomem, jsou hlavními příčinami nemoci a úmrtí na celém světě, což představuje přibližně 2 miliony úmrtí za rok [7; 8]. Orgánová fibróza u chronických zánětlivých onemocnění

charakterizuje vývoj onemocnění a podílí se na 45 % všech příčin úmrtí na světě. Podobně tak vývoj fibrózy u jater odráží kvalitu života, stejně jako prognóza. Fáze fibrózy koreluje s funkcí jater a představuje hlavní rizikový faktor pro rozvoj hepatocelulárního karcinomu [8].

2.1.2.1 Jaterní fibróza

Jaterní fibróza je charakterizována nadměrnou akumulací extracelulární matrix (ECM), což vede k poškození fyziologické architektury jater [8]. Po akutním poškození jater se parenchymatické buňky regenerují a nahrazují nekrotické buňky. Tento proces je spojen se zánětlivou odpovědí a omezeným ukládáním ECM. Pokud poškození jater přetrvává, jejich regenerace nakonec selže a hepatocyty jsou nahrazeny ECM, včetně fibrilárního kolagenu. Distribuce tohoto vláknitého materiálu závisí na původu poškození jater. U chronické virové hepatitidy nebo chronických cholestatických poruch se fibrotická tkáň zprvu vytváří kolem portálních cest, zatímco u jaterních onemocnění vyvolaných konzumací alkoholu se vyskytuje především v pericentrálních a perisinusoidálních oblastech [9]. Jaterní fibróza je reverzibilní proces, dokud není v progresivním stádiu a nevede k celkové cirhóze jater [10].

2.1.2.2 Exposom a jaterní onemocnění

Je dobře známo, že některá jaterní onemocnění jsou spojena s 1) návykovým chováním, jako je konzumace alkoholu, kouření a do určité míry dietní nerovnováha a obezita, 2) virovými a parazitickými infekcemi a expozicí toxinům. Nedávné studie ovšem ukázaly, že vystavení životnímu prostředí je také významně spojeno onemocněními jater. Mezi takové faktory životního prostředí patří například znečištění ovzduší (pevné prachové částice, těžké chemikálie), kontaminanty jako jsou kovy, polyaromatické uhlovodíky, bisfenol A, per- a polyfluorované látky (PFAS) a fyzikální faktory, jako je záření. V posledních letech byl kladen velký důraz především na PFAS, které představují velkou skupinu perzistentních organických polutantů (POPs), z nichž některé sloučeniny jsou velice perzistentní a ukládají se v játrech. Expozice zmíněným látkám je spojena s řadou zdravotních následků, včetně imunotoxicity, metabolických onemocnění, reprodukční a vývojové toxicity a rakoviny. Existují také důkazy o vlivu těchto látek za určitých podmínek na metabolismus sacharidů, aminokyselin, žlučových cest a lipidů. V nedávné metabolické studii byla expozice PFAS u lidí a hlodavců spojena se změnami v různých metabolických drahách, které se jevíly závažnějšími u ženského pohlaví [11].

S rychlým rozvojem průmyslu a stále rostoucí urbanizací se kontaminanty životního prostředí staly vážným problémem veřejného zdraví dnešní doby. Četné vědecké studie došly k závěru, že některé kontaminanty životního prostředí mohou v organismu vyvolat steatózu a steatohepatitidu. Je proto nezbytné považovat environmentální polutanty za třídu rizikových faktorů pro vznik nealkoholového tukového jaterního onemocnění (NAFLD). NAFLD se stává nejběžnější jaterní poruchou na světě. Charakteristická je pro tuto poruchu nadměrná akumulace lipidů, zejména triglyceridů v cytoplazmě hepatocytů, která není připisována infekci virem hepatitidy ani nadměrné konzumaci alkoholu. Obecně je definována přítomností makrovezikulární steatózy u více než 5 % hepatocytů. Nealkoholové tukové jaterní onemocnění zahrnuje širokou škálu jaterních patologií, od nealkoholového ztučnění jater, po pokročilou

nealkoholovou steatohepatitidu a fibrotické komplikace, které mohou pokročit až do jaterní cirhózy, případně život ohrožujícího hepatocelulárního karcinomu [12].

2.1.2.1 Ovlivnění jaterních funkcí následkem srdečního selhání

Onemocnění jater a selhání srdce často koexistují, děje se tak hlavně kvůli systémovým poruchám, onemocněním, které postihují oba orgány (užívání alkoholu a drog, záněty, autoimunita) a komplexním kardiohepatickým interakcím [13]. Až 80 % pacientů se srdečním selháním trpí nějakou formou jaterní dysfunkce [14].

Srdeční selhání je komplexní syndrom, kdy srdce přestává být schopno zásobovat ostatní orgány dostatečným množstvím okysličené krve a dochází k překrvení myokardu. V důsledku anatomického umístění jater v blízkosti srdce a jejich vysoké metabolické aktivity spojené s vysokou spotřebou kyslíku, jsou játra často zasaženým orgánem v případě výskytu srdečního selhání. Například zvýšení tlaku v pravé síni je přenášeno na jaterní žílu, to způsobuje dilataci krevních sinusoid a kompresi hepatocytů, což v kombinaci s hypoxií vede k atrofii, nekróze a fibróze jaterní tkáně [15].

2.2 Myokardiální fibróza

Myokardiální fibróza (MF) je charakteristický znak u srdečního selhání. Na elektrokardiogramu se fibróza projevuje častým předčasným komorovým rytmem, prodloužením QRS a komorovou tachykardií [16].

Myokardiální fibróza je definována zvýšeným množstvím kolagenu v myokardu, oproti srdečním myocytům. Tento stav je spojen se změnami ve složení kolagenových vláken (nadbytek kolagenu typu I, oproti typu III) a fyzikálně-chemických vlastností (zvýšené zesíťování kolagenových vláken). Rozeznávají se dva typy MF, a to *reparativní* (zjizvení myokardu) a *intersticiální*. *Reparativní fibróza* vzniká jako reakce na nekrózu myocytů, může být fokální, jako při myokarditidě, nebo rozsáhlá, pozorovaná u infarktu myokardu. Tento typ fibrózy spočívá ve vývoji jizvy v místě ztráty myocytů. Naproti tomu *intersticiální fibróza* vzniká z produkce a ukládání kolagenu aktivovanými myofibroblasty. Na rozdíl od *fibrózy reparativní*, nemusí tento proces nutně souviset s poškozením myocytů. Obvykle se jedná o difúzní proces, zahrnující perivaskulární prostor a intersticiium. Ukázalo se, že se včasným zásahem se jedná o reverzibilní a léčitelný stav. Oba typy mohou současně koexistovat a jsou běžným rysem patologické srdeční remodelace [17].

Pokud dojde k poškození srdce, různé látky způsobí aktivaci fibroblastů a jejich transdiferenciaci na myofibroblasty. Myofibroblasty zvyšují produkci proteinů, které se ukládají v ECM. Kolagen typu I tvoří asi 80 % celkového množství kolagenu v myokardu a činí myokard ztuhlejším, jeho produkce se u MF zvyšuje. Zesíťování dělá kolagenovou hmotu tužší a pro proteázy obtížněji odbouratelnou [18].

Fibróza omezuje přísun výživy a kyslíku do myokardu, způsobuje strukturní změny a změny v elektrické aktivitě srdce, díky nimž má člověk predispozice k arytmiím, srdečnímu selhání a ischemii [18].

2.2.1 Důvody vzniku myokardiální fibrózy

Srdeční fibróza je charakterizována akumulací ECM v myokardu a je nedílnou součástí většiny srdečních patologií. Jelikož myokard u dospělých jedinců má téměř zanedbatelnou regenerační schopnost, je nejrozsáhlejší fibrotická remodelace komor pozorovatelná u onemocnění spojených s akutní smrtí kardiomyocytů. Po akutním infarktu myokardu je spuštěna zánětlivá reakce v důsledku náhlé ztráty velkého počtu kardiomyocytů, což nakonec vede k nahrazení mrtvé části myokardu jizvou s vysokým obsahem kolagenu [19].

Srdeční selhání je maligní a smrtelné onemocnění, které způsobuje celosvětovou zdravotní a finanční zátěž. Klíčovým mechanismem srdečního selhání je remodelace srdce, která zahrnuje dva aspekty – poškození kardiomyocytů a fibrózu myokardu. Poškození kardiomyocytů se projevuje jako hypertrofie kardiomyocytů, nekróza nebo apoptóza. Ačkoliv se na tuto oblast zaměřilo v posledních desetiletích mnoho vědců, účinnost dostupné léčby u pacientů se srdečním selháním je stále neuspokojující [16].

Omezené porozumění fibróze je příčinou pomalého pokroku ve vývinu antifibrotické léčby. Problém je v objasnění fibrotického mechanismu, jelikož se fibróza vyskytuje u různých typů srdečních poruch. Jednou z bariér pro optimalizaci specifických markerů myofibroblastů je rozmanitost jejich vzniku. Myofibroblasty jsou specifické buňky pro myokardiální fibrózu a nejen, že vznikají ze srdečních fibroblastů a endotelových buněk, ale také se liší od cirkulujících buněk, které migrují do zraněného srdce [20].

V současné době neexistuje pro myokardiální fibrózu žádná speciální léčba, proto je velmi důležité najít léčebnou metodu k její inhibici. Množství studií ukázalo, že velkou roli u různých metabolických a kardiovaskulárních onemocnění hrají adipokiny. Adipokiny jsou vylučovány tukovou tkání a vystupují jako autokrinní, parakrinní a endokrinní mediátory, regulující především chuť k jídlu, metabolismus, imunitu, chování a kardiovaskulární funkce. Někteří zástupci, jako je například leptin nebo rezistin rozvoj fibrózy a remodelaci myokardu podporují, naopak jiní zástupci, včetně adiponektinu, omentinu nebo apelinu vystupují jako kardioprotektivní a mají schopnost MF inhibovat [21].

2.2.1.1 *Exposom a myokardiální fibróza*

Četné epidemiologické a klinické studie prokázaly, že vystavení znečištění ovzduší, zejména pevným částicím (PM) bylo spojeno se zvýšenou nemocností a úmrtností na kardiovaskulární onemocnění, jakými jsou například ischemická choroba srdeční, ateroskleróza, hypertenze, arytmie nebo srdeční selhání [22].

Zdůrazňována je také souvislost mezi kritickými složkami PM_{2,5}, jakými jsou například olovo, hliník, železo, titan, nikl, měď, draslík, síra, křemík, vanad, zinek, polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) a kardiovaskulárními onemocněními. Expozice Pb je významně spojena s ischemickou chorobou srdeční [23].

2.3 Diagnostické a zobrazovací metody využívané v medicíně

K zobrazení vnitřních struktur pod kůží, diagnostice abnormalit a léčbě nemocí se používají lékařské zobrazovací metody. Lékařské zobrazování se změnilo v samostatnou zdravotnickou vědu. Jde o vizuální reprezentaci funkcí různých tkání a orgánů lidského těla pro klinické

a vědecké účely. Mezi takové metody řadíme například rentgenovou radiografii, výpočetní tomografii (CT), magnetickou rezonanci (MRI) nebo třeba jednofotonovou emisní výpočetní tomografii (SPECT) [24].

V lékařské oblasti je CT využívána k vytváření snímků, které dále slouží k diagnostice abnormalit. CT je založena na principu rotace rentgenových paprsků vygenerovaných generátorem, kolem snímaného objektu. Rentgenové záření je následně detekováno rentgenovým detektorem, jenž se nachází na druhé straně oproti generátoru paprsků. Výstupem této metody je tomogram, jenž vizuálně prezentuje nezpracovaná data, která jsou dále podrobena tomografické rekonstrukci a konečným výsledkem je série průřezových fotografií zkoumaného objektu [24].

Magnetická rezonance je primárně zobrazovací technika, která je aplikovatelná pro neinvazivní vizualizaci anatomie a fyziologie těla při různých onemocněních. Během procesu skenování, magnet v zařízení vyvolá velice silné stabilní magnetické pole, díky kterému se ve zkoumané části pacientova těla rovnají vodíkové ionty ve směru orientace magnetického pole. Vodíkové ionty jsou zdrojem radiofrekvenčních vln, které způsobí jejich vychýlení a následný návrat do rovnovážného stavu. Připojený počítačový systém zachycuje vlnění a převádí daný signál na obraz, které jsou následně použity k diagnostice [24].

Jednofotonová emisní výpočetní tomografie (SPECT) je pokročilá zobrazovací technika využívající gama záření, která poskytuje trojrozměrné (3D) zobrazení objektů s vysokou přesností. Vytvářením sérií tenkých řezů z tomografických snímků monitoruje 3D informace o objektu. Pomocí vysokoenergetického gama záření vyhodnocuje SPECT více dvourozměrných snímků z různých úhlů. Data jsou rekonstruována a zaznamenávána, následně jsou pomocí počítačového programu vytvářeny 3D snímky cílové části těla. SPECT je jedna z technik využívajících radiofarmaka, která jsou podána pacientům před vyšetřením a poté se měří jimi emitované gama záření. V případě SPECT je gama záření emitované podanými radiofarmaky detekováno přímo detektorem a počítačový systém následně vytváří věrný obraz oblasti, kam byla radiofarmaka aplikována [24].

Základní platformou, na které je postavena moderní kardiologie je zobrazování srdce pomocí různých metod. Moderní pokročilé zobrazovací techniky umožňují nejen důslednější kontrolu stavu srdce, ale také určení příčiny a remodelace některých kardiovaskulárních onemocnění, stejně jako jejich včasnou detekci [25].

2.4 Porovnání metod pro přímou analýzu pevných vzorků s roztokovými metodami

Stopové prvky hrají v biologických systémech důležitou roli. V živých systémech lze detekovat až 50 prvků v měřitelných obsazích, kdy více než 10 z těchto prvků je považováno za esenciální stopové prvky. Ukázalo se, že nadbytek, nedostatek nebo porucha distribuce stopových prvků souvisí se vznikem různých poškození. Proto je výzkumné zaměření na analýzu těchto prvků ve tkáních a orgánech velice důležité [26].

Existuje velké množství analytických metod pro analýzu měkkých tkání. Mohou být použity jak roztokové metody, tak metody pro přímou analýzu pevných vzorků. Tyto metody se liší ve způsobu, jakým jsou vzorky připravovány a následně analyzovány, což může mít také

velký vliv na výsledky. Roztokové metody jsou založeny na převedení daného vzorku do roztoku a jeho následné analýze. Jejich nevýhodou je, že výsledky mohou být ovlivněny nečistotami v analyzovaném roztoku nebo jeho ztrátou. Naopak metody pro přímou analýzu pevných vzorků poskytují prostorové rozlišení a vyšší přesnost, jelikož se vyhýbají problémům spojeným s přítomností nečistot v roztoku, avšak mohou být citlivé na nehomogenitu vzorku. Volba mezi roztokovými metodami a metodami pro přímou analýzu pevných vzorků závisí na konkrétní aplikaci, požadované preciznosti a rychlosti analýzy. Pro zjištění průměrného složení prvků v daném vzorku je vhodnější využít roztokové metody, ovšem pokud je cílem zjistit distribuci pouze v určité části vzorku, je vhodné použít metody pro přímou analýzu pevných vzorků.

2.5 Analytické metody pro in situ analýzu měkkých tkání

Analytická chemie hraje v oblasti medicíny důležitou roli, a to zejména při studiu složení biologických materiálů. Jednou z klíčových oblastí, kde se analytické metody uplatňují, je analýza měkkých tkání. Tyto tkáně jsou základní stavební kameny organismu a jsou tvořeny různými typy buněk, extracelulární matrix a dalšími složkami. Analytická chemie nabízí široké spektrum metod pro analýzu těchto tkání, mezi něž patří například rentgenová fluorescenční spektrometrie (XRF), částicemi indukovaná rentgenová emise (PIXE), rentgenová fluorescenční mikroskopie (XFM), hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů (SIMS), spektrometrie laserem buzeného plazmatu (LIBS) nebo hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem ve spojení s laserovou ablací (LA-ICP-MS) a optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem ve spojení s laserovou ablací (LA-ICP-OES).

Některé metody vyžadují použití vodných vzorků, proto je potřeba vzorky například tkání rozkládat vhodnými rozpouštědly, někdy i kyselinami. Aplikace takto destruktivní předúpravy ovšem způsobuje ztrátu informací o prvkové distribuci ve vzorku. Pro správnou analýzu biologických vzorků, zejména pokud jsou používány k diagnostice, je zapotřebí, aby nebyly žádným způsobem poškozeny [26].

2.5.1 Analytické metody využívající RTG záření

Typickou nedestruktivní metodou je například rentgenová fluorescenční spektrometrie (XRF) nebo méně využívaná částicemi indukovaná rentgenová emise (PIXE) [26].

Rentgenová fluorescenční spektrometrie je schopna stanovit téměř všechny prvky periodické tabulky mezi sodíkem a uranem. Detekční limity se pohybují mezi 1–10 mg/kg. Principem XRF je excitace atomů ve vzorku vyvolaná pomocí zdroje rentgenových fotonů, které jsou energeticky dostatečně nabitě, aby způsobily ionizaci elektronů uvnitř obalu. Výsledné atomy jsou vnitřně nestabilní, jelikož ve vnitřním elektronovém orbitalu mají prázdné místo a okamžitě přecházejí do stabilnějšího elektronového stavu, což je doprovázeno přechodem elektronu z vnějšího orbitalu na prázdné místo vnitřního orbitalu. Jak elektron klesá, ztrácí energii a vyzařuje rentgenový foton s charakteristickou energií, která je zaznamenávána v podobě rentgenových čar [27].

Když se těžké nabitě částice (protony, α -částice) srazí s atomy, elektrony ve vnitřním obalu atomu se ionizují a produkují charakteristické rentgenové záření, tento jev se nazývá částicemi indukovaná rentgenová emise [28].

Další technikou využívající rentgenové záření je rentgenová fluorescenční mikroskopie (XFM), také známá jako synchrotronová fluorescenční mikroskopie. XFM je relativně nedestruktivní technika, která je schopná detekovat a kvantifikovat kovy a další prvky přítomné ve vzorcích tkání nebo jednotlivých buněk s velice vysokou citlivostí. Pro detekci stopových prvků a toxických těžkých kovů je ideální zejména XFM provedená tvrdým rentgenovým zářením [29]. Základem XFM je udržování konstantní energie nad absorpční hranou a následné skenování polohy vzorku, přičemž je vytvářena elementární mapa vycházející z intenzity fluorescence v každé skenované poloze. Působením energie dojde k excitaci prvku, který detekujeme, ale také prvků s nižšími atomovými čísly, než má zkoumaný prvek, tím je generováno několik elementárních map zároveň. Kromě mapování distribuce jednotlivých prvků v buňkách a tkáních, lze také identifikovat prostorové vztahy mezi prvky a srovnáním s elementárními standardy je možné určit jejich obsah [30].

2.5.2 „Laser assisted“ metody

Analytické metody založené na laserové ablací, mezi které řadíme LIBS, LA-ICP-OES a LA-ICP-MS, se v posledních desetiletích těší rostoucí popularitě. Tyto metody se pyšní zejména schopností analýzy prakticky jakéhokoliv druhu pevného materiálu, vysokou citlivostí a vysokým prostorovým rozlišením, což umožňuje skenovací mikroanalýzu povrchů různých materiálů. Avšak dobře známá jsou i omezení způsobená matricovými efekty nebo potíže s kalibrací [31]. Matricové efekty způsobují změny velikosti a složení generovaných částic během interakce laserového paprsku s různými povrchy vzorku [32].

Základem technik LA-ICP-MS/OES je transport suchého aerosolu, který vznikl při ablačním procesu, do indukčně vázaného plazmatu pomocí nosného plynu. V tomto případě může být signál ovlivněn nejen nežádoucími procesy při laserové ablací, ale také frakcionací.

K frakcionaci může docházet hned během několika procesů, například při produkci částic z laserové ablace, transportu částic z ablační cely do ICP nebo při jejich odpařování v ICP. Pro zlepšení přesnosti a preciznosti získávání kvantitativních výsledků se velmi často používají vnitřní standardy a matrice [31].

2.5.2.1 *Spektrometrie laserem buzeného plazmatu (LIBS)*

LIBS umožňuje spojení získaných informací o elementárním složení zkoumaného vzorku, s jeho prostorovými souřadnicemi, čímž se tato metoda stala předmětem hojného zájmu v mnoha studiích zaměřených na elementární zobrazování [33].

Základní princip metody LIBS vychází z krátké (nanosekundové) interakce mezi zaostřeným laserovým pulsem a zkoumaným objektem. Toto záření jak v prostoru, tak v čase (hodnoty ozáření se pohybují v řádu několika GW/cm^2), je klíčem k zahájení procesu zvaného laserová ablace (LA). LA zajišťuje rychlou tvorbu mikroplazmatu těsně nad povrchem vzorku. Po laserovém pulzu toto mikroplazma přetrvává pouze několik mikrosekund a emituje charakteristické záření, které vzniká relaxací jeho složek (elektronů, excitovaných atomů

a iontů). Záznamem této emise pomocí spektrometru vzniká typické LIBS spektrum, jehož emisní píky na charakteristických vlnových délkách odrážejí elementární složení vzorku (kvalitativní analýza). Dále díky znalosti intenzit píků a jejich ploch mohou být určeny obsahy specifických prvků v matrici (kvantitativní analýza). Pro získání čistých spekter, je nezbytné začít měřit emisi mikroplazmatu s krátkým zpožděním vzhledem k laserovému pulsu (cca 0,5–1 μ s), jelikož přibližně do 0,5 μ s po interakci laserového pulsu se vzorkem je emise mikroplazmatu silná, ve formě nestrukturovaného spektrálního kontinua, které se až s malou prodlevou rozpadá za produkce ostrých atomových emisních čar [34].

V posledních dvou desetiletích se metoda LIBS stala uznávanou a cennou analytickou metodou pro analýzu elementární povahy různých typů vzorků, ať už se jedná o pevnou látku, kapalinu nebo plyn. Tato metoda se pyšní celou řadou výhod, jakými jsou například její jednoduchost nebo schopnost pracovat při pokojové teplotě a za podmínek okolního tlaku. Dalšími z mnoha výhod, které s sebou LIBS přináší je schopnost detekovat téměř každý prvek v periodické tabulce s vysokou citlivostí a dynamickým rozsahem detekce. Dostupné rozlišení je omezeno difrakčním limitem, který umožňuje dosažení měřítka v řádu mikrometrů. Tato metoda umožňuje jak jednorázovou mikroanalýzu vzorku, tak 2D charakterizaci (prostorové mapování) a nechybí ani schopnost 3D (včetně hloubkového profilování). Všechny tyto přednosti činí LIBS velice slibnou zobrazovací technikou pro různé oblasti biologie a medicíny [35].

2.5.2.2 LA-ICP-OES

Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem je velice výkonná, všestranná a pokročilá analytická technika s dobrými detekčními vlastnostmi. Jedná se o moderní metodu používanou primárně pro analýzu prvků v různých vzorcích, jakými jsou například environmentální, průmyslové, rostlinné nebo tkáňové vzorky, se širokou škálou obsahů. S velkou přesností umožňuje detekovat až 70 prvků současně [36].

Základním principem ICP-OES je měření spontánní emise fotonů z excitovaných atomů nebo iontů. Po laserové ablacii jsou vzorky ve formě aerosolu převáděny do indukčně vázaného plazmatu pomocí nosného plynu [37; 36]. Jako nosný plyn se většinou používá argon (Ar) [38]. Teplota v ICP se pohybuje okolo 8000–10000 K, zaváděný aerosol je tudíž velice rychle vypařován a analytické prvky jsou zde uvolňovány ve formě volných atomů v plynném stavu. Díky následné srážkové excitaci, která v ICP probíhá, se volné atomy dostávají na vyšší energetickou hladinu a při návratu zpět do základního stavu emitují fotony. Fotony jsou poté soustředěny za pomoci čočky nebo konkávního zrcadla na vstupní otvor zařízení pro selekci vlnové délky, například monochromátoru. Následně je zvolená vlnová délka převedena fotodetektořem na elektrický signál, který je dále zpracován počítačovým programem [37]. Zastoupení prvku v plazmatu je úměrné energetickému rozdílu mezi excitovaným a základním stavem atomu. Tento rozdíl odpovídá intenzitám emisního signálu charakteristických vlnových délek měřených detektorem [36].

Hojného využití se ICP-OES dostalo například ve farmaceutickém průmyslu, díky své schopnosti rychlé a víceprvkové analýzy s vysokou citlivostí se v této oblasti stala jednou z nejvyužívanějších technik [36].

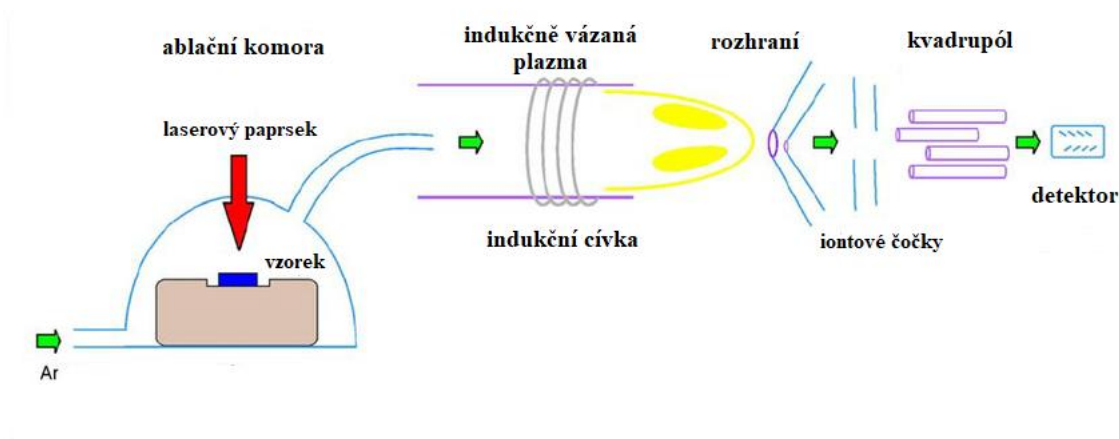
V porovnání s ICP-MS jsou pro ICP-OES výhodou nižší pořizovací náklady. Na druhou stranu ICP-MS je známá svou vyšší citlivostí a schopností detekovat jak prvky samotné, tak jejich izotopy.

2.5.2.3 LA-ICP-MS

Metoda LA-ICP-MS je v současné době považována za jednu z univerzálních technik pro přímou analýzu stopových prvků a izotopů pevných látek. Využívána je v celé řadě oblastí, včetně geologie, materiálového výzkumu, biologie nebo medicíny [39].

Princip metody je podobný jako u LA-ICP-OES. Nejprve fokusovaný laserový paprsek provede ablací vzorku vloženého do ablační komory. Ablatovaný materiál je následně ve formě aerosolu transportován nosným plynem (nejčastěji Ar nebo směs Ar a He) do ICP zdroje, kde probíhá ionizace. Dále je na řadě samotný hmotnostní spektrometr, kde dochází k rozdělení iontů podle poměru hmotnosti ku náboji (m/z) a jejich detekci detekčním systémem. V průběhu celého měření jsou zaznamenávány iontové intenzity v závislosti na čase. Tato data jsou následně rekonstruována na obraz nebo podrobena jiným úpravám a vizualizacím [40].

Schéma stavby LA-ICP-MS je znázorněno na obrázku číslo 5.



Obrázek 5: Schéma LA-ICP-MS [41]

2.5.2.4 Laserová Ablace

Popularita využití laserové ablace v analytické chemii v posledních letech výrazně vzrostla, a to hlavně díky možnosti analyzovat všechny druhy materiálu s ohledem na velikost cely. Laserová ablace začala také značně vytěsňovat klasické roztokové metody, které vyžadují mít k dispozici větší množství vzorku a také jeho předúpravu, například rozpouštěním v různých kyselinách, což zvyšuje riziko kontaminace vzorku. Základem laserové ablace je interakce zaostřeného pulsního laserového paprsku s povrchem vzorku. Hustota zářivého toku se pohybuje v řádech vyšších než 10^9 W/cm², což způsobuje prudké ohřátí ablatovaného materiálu, nárůst tlaku uvnitř vzorku a následnou explozi a fragmentaci povrchové vrstvy [38].

Pokud je energie laseru dostatečně vysoká, je tento proces doprovázen vznikem laserového mikroplazmatu s krátkou dobou životnosti, kde jsou atomy i ionty excitovány. Vzniklý aerosol

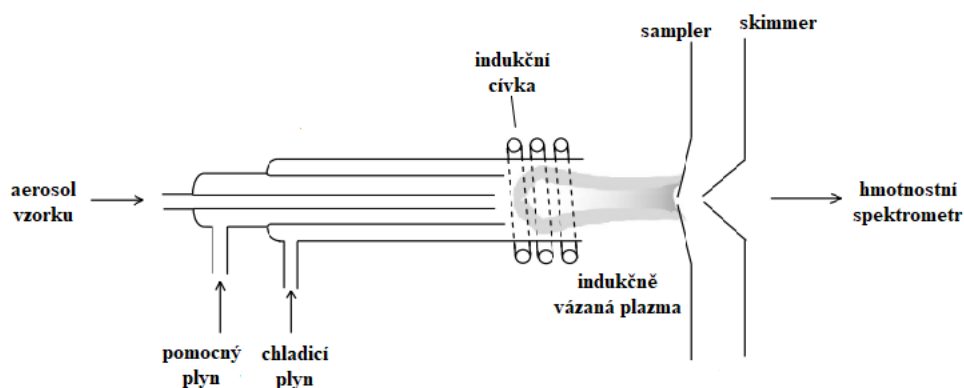
může být také převeden pomocí nosného plynu do jiného budícího zdroje, nejčastěji do ICP [38].

2.5.2.5 Indukčně vázané plazma

Indukčně vázané plazma je tvořeno žhavým plamenem produkovaným indukční vazbou, do kterého je zaváděn aerosol vzorku. ICP jako iontový zdroj obsahuje plazmovou hlavici, jež se skládá ze 3 křemenných trubic, kde horní část největší z nich obklopuje chlazená indukční cívka napájená generátorem [42]. Ve vysokofrekvenčním elektromagnetickém poli ICP je udržováno argonové plazma o teplotách pohybujících se okolo 10^4 K [37]. Vysoké teploty způsobují desolvataci, odpaření a atomizaci vzorku. Výsledné atomy mohou strávit v oblasti při teplotě okolo 10000 K až několik milisekund. Za těchto podmínek je většina prvků ionizována. Ionty jsou extrahovány a přes dvoustupňové rozhraní zaváděny do hmotnostního spektrometru [42].

2.5.2.6 Rozhraní

Největší zátěž nese rozhraní tzv. interface situované mezi iontovým zdrojem (ICP) a hmotnostním spektrometrem, které je v přímém styku s plazmatem. Interface představuje dva kužely (sampler a skimmer) s malými otvory ve vrcholech o průměru kolem 1 mm. Kužely jsou vyrobené z tepelně vodivých materiálů a chlazené vodou. (Obrázek 6) [38].



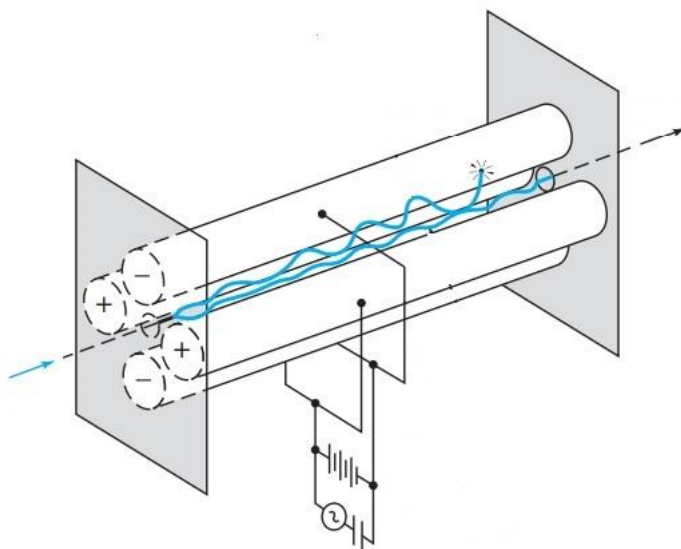
Obrázek 6: Schéma interface [43]

Tlak mezi samplerem a skimmerem je udržován na úrovni 500 Pa. Úkolem interface je oddělení hlavního toku argonu od středního toku atomů a iontů analyzovaného vzorku. Po průchodu skimmerem obsahuje iontový tok řadu elektricky nenabitých atomů a fotonů, které je třeba před vstupem do analyzátoru separovat, aby nedocházelo ke zvyšování šumu detektoru. Této separace je možno dosáhnout umístěním mechanické překážky do dráhy proudění, o kterou se fotony i nenabité částice zastaví. V dnešní době už se ale využívá z-cela. Analyzované ionty jsou následně usměrněny a vychýleny elektrickým polem, odkud pokračují analyzátoru [38].

2.5.2.7 Hmotnostní spektrometr

Hmotnostní spektrometr je přístroj, který umožňuje separaci iontů na základě poměru jejich hmotnosti ku náboji (m/z). V současné době je dostupných několik typů hmotnostních spektrometrů odlišujících se svými analyzátory [44]. Mezi nejvyužívanější patří kvadrupólový analyzátor (Q-MS), dále jsou ještě v nabídce například průletové analyzátory (TOF-MS) nebo analyzátory s dvojitou fokusací (SF-MS, HR-MS) [38].

Kvadrupólový analyzátor je využívanější, levnější a odolnější než většina ostatních typů. Vyznačuje se také vysokou rychlostí skenování, kdy celé hmotnostní spektrum je lze získat za méně než 100 ms. Srdcem celého Q-MS jsou 4 paralelní elektrody v podobě válcových tyčí (Obrázek 7). Protilehlé tyče jsou elektricky propojeny, jeden pár se pojí ke kladné straně zdroje s proměnným stejnosměrným proudem a druhý k zápornému pólu. Kromě toho se na každý pár tyčí přivádí vysokofrekvenční střídavé napětí, které je fázově posunuto o 180° . Ionty jsou urychlovány do prostoru mezi tyčemi s rozdílem potenciálů 5–10 V, mezitím se střídavě zvyšuje stejnosměrné a střídavé napětí na tyčích. V každém daném okamžiku dojde ke srážce iontů, které nemají požadovanou hodnotu m/z s tyčemi a k jejich přeměnění na neutrální částice. Detektoru dosáhnou pouze ionty s požadovaným rozsahem hodnot m/z [44].



Obrázek 7: Kvadrupólový analyzátor [44]

Analyzátory typu TOF měří čas potřebný pro cestu iontů z ionizačního zdroje k detektoru. Ionty se dostávají při zrychlování a ionizaci na přibližně stejnou hodnotu kinetické energie. Urychlené částice putují do driftové trubice. Protože všechny ionty vstupující do driftové oblasti mají v ideálním případě stejnou kinetickou energii, jejich rychlosti v oblasti bez působení pole se musí měřit nepřímo s jejich hmotnostmi, přičemž lehčí ionty dorazí k detektoru dříve než ty těžší [44].

V analyzátoru s dvojitou fokusací jsou ionty ze zdroje urychlovány štěrbinou do zakřiveného elektrostatického pole, které zaměřuje proud iontů s omezenými hodnotami kinetické energie na štěrbinu, která vede k zakřivenému magnetickému poli. V tomto poli jsou nejlehčí ionty

vychylovány nejvíce a nejtěžší naopak nejméně. Dispergované ionty poté dopadají na snímač, který je zaznamenává [44].

Mezi nejčastěji využívané detektory v hmotnostní spektrometrii patří například Faradayův kelímek, vhodný pro analýzu velkých iontových toků, konstrukčně je jednoduchý, ale má nízkou citlivost. Naproti tomu elektronový násobič s kontinuální dynodou, je známý svou vysokou citlivostí, avšak relativně krátkou časovou konstantou a životností. Další možností jsou tzv. multikolektory, ve kterých jsou použity kombinace několika detektorů. Pro stanovení přesných izotopových poměrů jsou však multikolektory nutné [38].

2.5.2.8 Využití LA-ICP-MS

V roce 2021 vyšla vůbec první studie, která se zaměřila na náhradu argonu jako nosného plynu v systému LA-CP-MS. Pro srovnání s klasickou LA-ICP-MS byla tedy použita hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem na bázi dusíku LA. Výzkum byl zaměřen na kvantifikační schopnosti přístroje u hlavních až stopových prvků. Zkoumány byly druhy pozadí plazmatu za podmínek suchého plazmatu, aby byly identifikovány nejvhodnější izotopy pro analýzu a také kvůli popsání nově vzniklých interferencí dusíkového plazmatu. Detekční limity po porovnání výsledků vyšly pro většinu prvků nižší při použití dusíkatého nosného plynu. Tento nový přístup má tedy potenciál překonat již zaběhlou LA-ICP-MS hlavně snížením nákladů na plazmový plyn a také překonáním argonových interferencí [45].

Mezi zajímavé oblasti výzkumu souvisejícího s LA-ICP-MS patří vývoj nových strategií pro elementární a izotopové zobrazování distribuce heteroatomů podél mikrometrických struktur pevných vzorků, například v tenkých tkáňových řezech biologických materiálů. V tomto směru hrají v dnešní době zobrazovací analytické metody klíčovou roli. Účelem je hlubší porozumění roli heteroatomů v biologických systémech (akumulace kovů v určitých oblastech nebo jejich distribuce mezi patogenními a nepatogenními tkáněmi) [39].

Další zajímavá studie, kde byla LA-ICP-MS využita se zabývala o změny distribuce kovů v mozku myši při stárnutí. Za pomoci LA-ICP-MS byly vytvořeny vizualizace distribucí železa a zinku, jak v mozku odebraném ze staršího (14 měsíců), tak mladšího jedince (2 měsíce). Konečné vizualizace prokázaly zvýšenou koncentraci Fe v některých strukturách mozku u starších jedinců. Železo katalyzuje tvorbu reaktivních forem kyslíku a zvýšené hladiny Fe mohou přispívat k neurodegeneraci související s věkem. Obsahy zinku se zdály být z velké části konstantní [46].

Hojnému využití se LA-ICP-MS dostává také v oblasti geologie, především pro rychlou bulk analýzu celých hornin a půd nebo při studiu prvkové distribuce [47].

2.5.3 Hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů

Základním principem zobrazovací metody SIMS je „bombardování“ povrchu vzorku jemně zaostřeným vysokoenergetickým paprskem primárních iontů, pomocí iontového děla. Tento proces způsobuje generaci charakteristických sekundárních iontů z povrchu vzorku, které jsou následně detekovány hmotnostním analyzátozem [48].

Jako primární iontové zdroje slouží například kovy (Au^+ , Bi^+ , Ga^+ , Cs^+), plyny (Ar^+ , O_2^+), atomové nebo molekulové shluky (Bi_n^+ , Ar_n^+ , $(\text{H}_2\text{O})_n^+$) a další ionizované molekuly (C_{60}^+ , SF_5^+) [48].

SIMS představuje extrémně výkonnou metodu využívanou především k analýze povrchů. Díky své vysoké citlivosti, vysokému dynamickému rozsahu, schopnosti rozlišovat mezi izotopy a vysokému hmotnostnímu rozlišení se stává průlomovou technikou v mnoha odvětvích [49].

Avšak navzdory veškerým výhodám, jež s sebou metoda SIMS přináší, je nutné zmínit i její omezení týkající se laterálního rozlišení. Konvenčními přístroji SIMS je možné dosáhnout laterálního rozlišení v řádu několik desítek nm (například pro Cameca NanoSIMS je to 50 nm), což je někdy nedostatečné. Je nezbytné myslet také na detekční limit a minimální detekovatelnou velikost prvků, což přináší určité hranice pro citlivé zobrazování s velkým rozlišením [49].

Spojení techniky SIMS s analyzátozem typu TOF umožňuje analýzu distribuce všech složek materiálu, včetně lehkých a těžkých prvků, a molekul ve 3D s rozlišením v řádu nanometrů. Povrch vzorku lze zkoumat v širokém rozsahu (většinou mezi $1 \mu\text{m}^2 - 10^4 \mu\text{m}^2$), díky čemuž získáváme informace, jak o prostorové distribuci prvků v určité části vzorku, tak o jeho struktuře. Výhodou je, že dokud je povrch vzorku plochý a vodivý, není potřeba jeho předúprava. Problém může nastat u slabě ionizujících prvků. Další problémy způsobují například hmotnostní interference, maticový efekt nebo rozdílná polarita složek u komplexních vzorků [50].

Hojnému využití se metodě SIMS dostává také při studiu povrchů bio materiálů. Pro lepší pochopení vztahů mezi chováním buněk je třeba důkladně charakterizovat povrch biologických materiálů, jelikož chemické a fyzikální vlastnosti jejich povrchu hrají zásadní roli při zprostředkovávání buněčné odpovědi [51].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie a certifikované referenční materiály

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

3.2 Použité pomůcky a přístroje

3.2.1 Laserový ablační systém

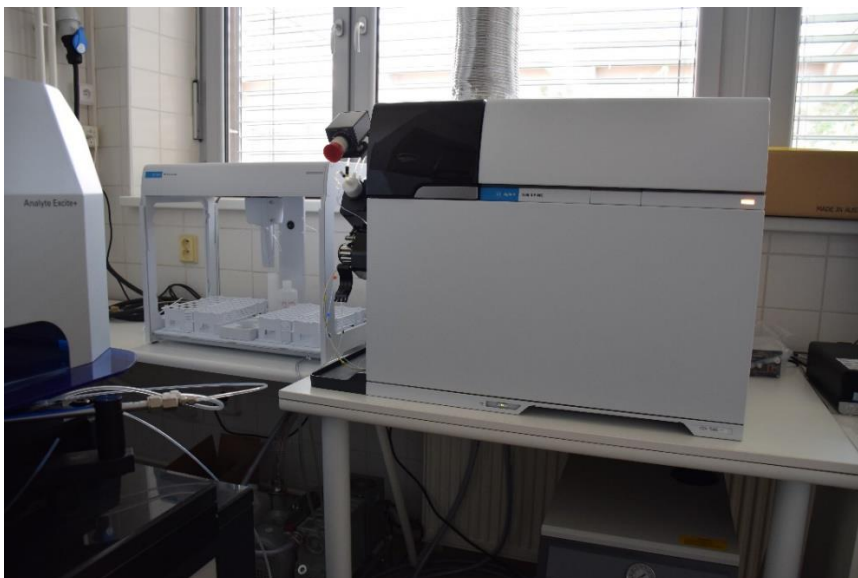
Laserový ablační systém Analyte Excite+ (Teledyne CETAC Technologies, USA) (Obrázek 8) je vybaven ArF excimerovým laserem schopným emitovat záření o vlnové délce 193 nm s délkou pulzu < 4 ns. Celý systém je řízen počítačem (pomocí softwaru Chromium) a díky kamerovému vybavení umožňuje sledování vzorků v reálném čase. Počítačový program také umožňuje nastavení několika parametrů, kterými jsou například průměr laserového svazku (1,0–245 μm), hustota zářivé energie (1–15 J/cm^2) a frekvence (1–300 Hz). Módy softwaru nabízejí liniový sken, bodovou analýzu nebo různé složitější vzorce. Systém je vybaven dvouobjemovou ablační celou HelEx II umožňující rychlý výplach. S Agilent 7900 ICP-MS je plně kompatibilní, propojený polyuretanovými hadičkami.



Obrázek 8: Laserový systém Analyte Excite+. Autor: doc. Mgr. Michaela Vašinová Galiová, Ph.D.

3.2.2 Hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem

Vzorek odprašený laserovým zářením je vnášen do ICP hmotnostního spektrometru Agilent 7900 (Agilent Technologies, Inc, USA) (Obrázek 9). Plazma, do něhož je vzorek vnášen, je tvořeno za pomoci radiofrekvenčního generátoru o rozsahu výkonu 500–1600 W v jednodílné plazmové křemenné hlavici s průměrem injektoru 2,5 mm. Následující rozhraní je složeno z vnějšího kuželu (sampler) o průměru 1 mm a kuželu vnitřního (skimmer) o průměru 0,45 mm. Iontová optika je tvořena z extrakční a mimoosé čočky. Po iontové optice následuje oktapólová kolizně-reakční cela s tokem helia (1–12 ml/min) minimalizující případné interference. Jako analyzátor je využíván hyperbolický kvadrupól separující ionty podle m/z s vysokou citlivostí a rozsahem 2–260 atomových hmotnostních jednotek. Detektor tvoří elektronásobič pracující v pulzním a analogovém režimu. Vakuum je v hmotnostním spektrometru zajištěno turbomolekulárním čerpadlem s děleným průtokem a externím rotačním čerpadlem.



Obrázek 9: Agilent 7900 ICP-MS. Autor: doc. Mgr. Michaela Vašínová Galiová, Ph.D.

3.3 Vzorky

Experiment zpracováváný v této bakalářské práci byl připraven ve spolupráci s Lékařskou fakultou Masarykovy univerzity (LF MU), MUDr. Tiborem Stračinou, Ph.D. Zpracování vzorků na řezy a jejich obarvování probíhalo ve Fakultní nemocnici u sv. Anny v Brně. Poskytnuté vzorky tvořily řezy jaterní tkáně potkanů zasažených myokardiální fibrózou (FIB) a řezy jaterní tkáně kontrolní skupiny (CON).

3.3.1 Vyvolání myokardiální fibrózy

Vyvoláním myokardiální fibrózy u potkanů se ve svém experimentu zabýval na Fyziologickém ústavu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity MUDr. Tibor Stračina, Ph.D. [52].

Po náhodném rozdělení zvířat do dvou skupin, bylo u skupiny FIB provedeno jednostranné odstranění ledviny. Stejně skupině bylo po zákroku podáváno 20 mg deoxykortikosteronu týdně, a přístup měla zvířata výhradně k pitné vodě obohacené solemi NaCl a KCl o obsazích (0,9 % a 0,3 %) [52].

Kontrolní skupině byla provedena tzv. sham operace (placebo operace bez vyjmut ledviny) a namísto deoxykortikosteronu požívala zvířata arašídový olej při dávkování 0,2 ml týdně, zároveň měla také přístup k pitné vodě neobohacené solemi [52].

3.3.2 Odebrání vzorků

Tři týdny po operaci podstoupila zvířata vyšetření magnetickou rezonancí na Ústavu přístrojové techniky AV ČR. Následný den byla zvážena a poté za pomoci sedativ uspána, nejprve inhalačně izofuranem a následně injekčně pomocí směsi ketaminu a xylazinu. V této fázi proběhlo také vyšetření pomocí EKG a měření tlaku. Jelikož tělesná teplota ovlivňuje srdeční funkce, proběhlo vyšetření na vyhřívané podložce.

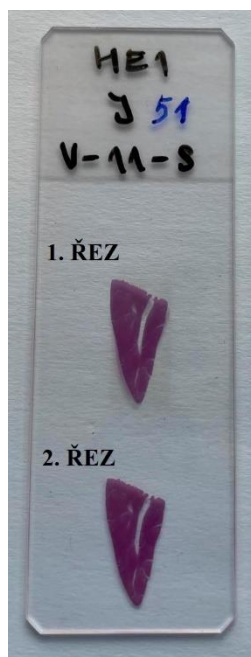
Po usmrcení pod celkovou anestezií jsou potkanům odebrány následující orgány: játra, srdce a ledviny. Z jater se odebírá pouze část, jelikož jsou homogenním orgánem a srdce je odebíráno bez předsíní. Odebrané orgány jsou opláchnuty od zbytků krve vychlazeným fyziologickým roztokem. Vzorky jsou dále stabilizovány až na 48 hodin za pomoci 10 % formaldehydu [53].

3.3.3 Příprava řezů pro analýzu

Po stabilizaci byly odebrané orgány následně zpracovány ve Fakultní nemocnici u sv. Anny. Kde byly vzorky dehydratovány za pomoci autotechnikonu s 90 % ethanolem, 10 % isopropanolem (Bamed, ref.: 9010X05) a xylenem (VWR CHEMICALS, ref.: 28975.325). Následně byly takto zpracované orgány zality do parafinu (Dr. Kulich Pharma) a krájeny na tloušťku 1–1,5 μm . Řezy byly krájeny vždy 2 těsně pod sebou a dále pokládány na podložní sklíčko (Obrázek 10). Poté byly připravené řezy vybarvovány pomocí Mayerova hematoxynu (Bamed, ref.: C0306) a Eosinu Y (MERCK, ref.: 1.15935.0025). Tabulka 1 zahrnuje seznam analyzovaných vzorků.

Tabulka 1: Seznam vzorků analyzovaných pomocí LA-ICP-MS

série	skupina	označení
V	CON	V-11-S
V	CON	V-16-S
V	CON	V-14-S
V	FIB	V-21-J
V	FIB	V-26-J
V	FIB	V-22-J



Obrázek 10: Sklíčko s obarvenými řezy jater vzorku V-11-S z kontrolní skupiny

3.4 Analýza pomocí LA-ICP-MS

Po obarvení byly vzorky skladovány až do provedení analýzy v mrazáku při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Výběr prvků pro sledování distribuce probíhal na základě literární rešerše zaměřené na analýzu biologických měkkých tkání, jelikož studie o přímém vztahu mezi změnami v jaterní tkáni a myokardiální fibrózou nejsou k dispozici, a také s ohledem na diplomovou práci Ing. Martiny Machalové [53]. Z výsledků bylo možné odvodit, které prvky by měly být potenciálně sledovány i v játrech. Celkem bylo pro analýzu vybráno 11 izotopů prvků uvedených v tabulce 2.

3.4.1 Ladění ICP-MS

Před zahájením samotné analýzy každého vzorku je nutné provést optimalizaci parametrů ICP hmotnostního spektrometru za využití standardního referenčního materiálu (SRM) NIST 612. Cílem je minimalizace tvorby oxidů ($^{248}\text{ThO}/^{232}\text{Th}^+ < 1\%$), dvakrát nabitých iontů ($^{70}\text{Ce}^{2+}/^{140}\text{Ce}^+ < 5\%$) a hodnoty faktoru minimalizace frakcionace vyjádřeného poměrem $^{232}\text{Th}/^{238}\text{U}$ dosahují přibližně 1. V rámci ladicího procesu bylo provedeno i kontrolní měření s vybranými izotopy z důvodu získání maximální odezvy. Pracovní parametry pro ICP-MS jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Pracovní parametry ICP-MS

parametry	vzorky jater
Příkon [W]	1550
Přítok nosného [l/min]	~ 1
Hloubka vzorkování [mm]	5,5
Kolizně reakční cela – He	1 ml/min
Izotop prvku	Integrační čas [s]
$^{12}\text{C}^+$, $^{23}\text{Na}^+$, $^{26}\text{Mg}^+$, $^{28}\text{Si}^+$, $^{34}\text{S}^+$, $^{43}\text{Ca}^+$, $^{55}\text{Mn}^+$, $^{56}\text{Fe}^+$, $^{63}\text{Cu}^+$, $^{66}\text{Zn}^+$, $^{78}\text{Se}^+$	0,009

3.4.2 Experimentální parametry laserové ablace

Nastavení laserové ablace bylo také zvoleno na základě diplomové práce Ing. Marty Machalové [53], která byla pilotní studií a tento výzkum na ni přímo navazuje. Vzorky byly ablatovány kontinuálně laserovým svazkem v módu liniového skenu.

Po každé analýze byl měřen rovněž NIST 610, z důvodu ověření odezvy stability signálu a možnost pozdější kvantifikace. Veškeré parametry ablace vzorku a měření standardního referenčního materiálu NIST 610 jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 3: Pracovní parametry LA-ICP-MS

parametry	vzorky jater	NIST 610
Ablační mód	liniový sken	liniový sken
Průměr svazku [μm]	50	110
Rychlost posunu [$\mu\text{m/s}$]	621	10
Hustota zářivé energie [J/cm^2]	1,41	2
Frekvence [Hz]	50	10
Průtok ablačního plynu – He	0,5+0,3 l/min	

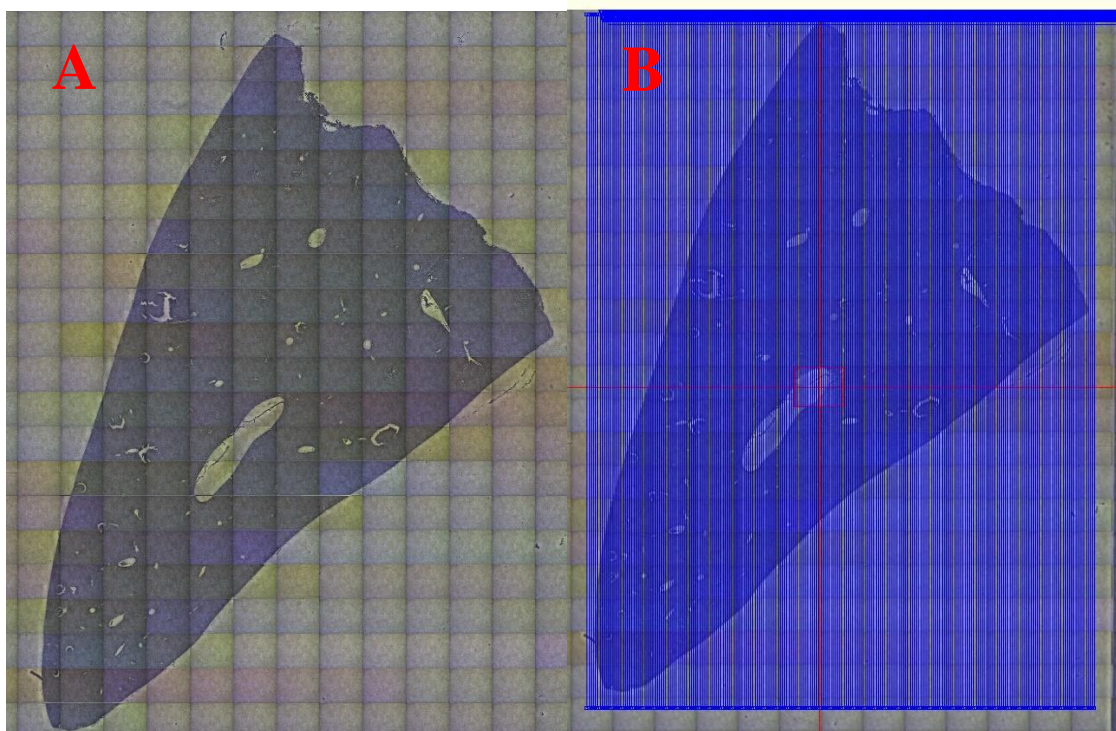
3.4.3 Postup měření

V úvodu měření byla podložní sklička se vzorky umístěna do držáku, na kterém se nachází i SRM NIST 610 a NIST 612. U každého vzorku byl vybrán jeden řez a celý držák byl následně umístěn do ablační cely. Dále byl zvolen kruhový svazek laserového paprsku a následně umístěn rastr linií přes celou plochu vybraného řezu. Délka linií a jejich počet se vždy volila úměrně velikosti daného řezu a jejich vzájemná vzdálenost byla 50 μm .

V průběhu měření dochází k nestabilitě přístroje, což je faktorem možného ovlivnění výsledků měření. Aby mohlo dojít k eliminaci efektu, který to na výsledcích zanechává, probíhá před počátkem analýzy každého vzorku a po jejím skončení měření SRM NIST 610, jehož signálů se následně ke zhodnocení využívá.



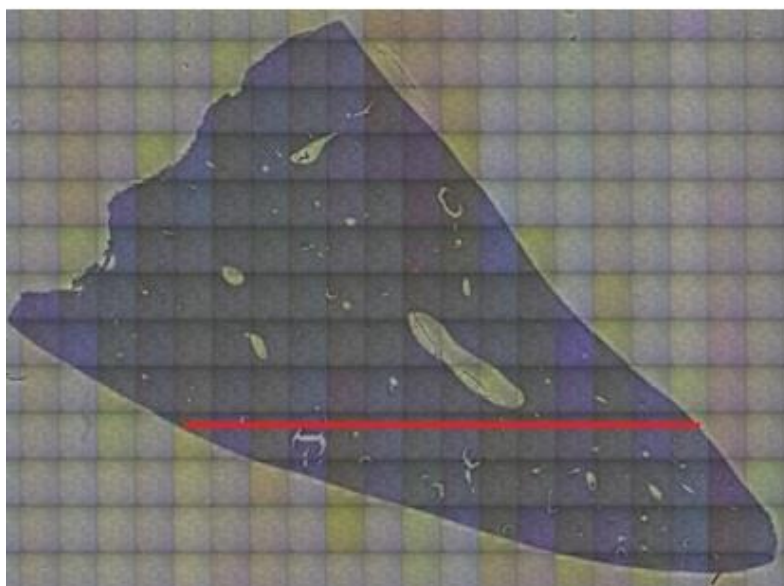
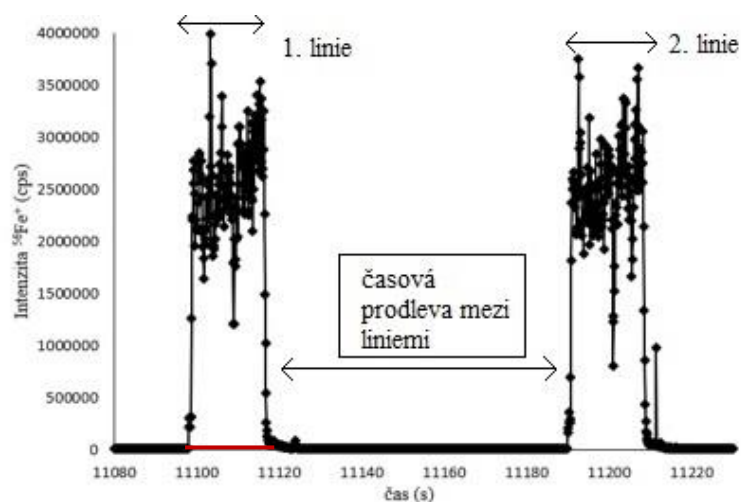
Obrázek 11: Držák laserové ablační komory se vzorkem (V-16-S) a standardními referenčními materiály



Obrázek 12: *A – Sken povrchu vzorku pořízený kamerou laserového ablačního systému (vzorek V-26-J); B – Liniové skeny umístěné na vzorku V-26-J*

3.4.4 Vyhodnocení signálu

Po skončení měření byl výsledný signál představující závislost intenzity izotopu na čase zpracováván pomocí programu HDIP (Teledyne CETAC Technologies, USA). Program poskytuje vizualizaci distribuce izotopů prvků s možností odečtení pozadí, separace signálu pro jednotlivé linie a změny rozsahu intenzit, barevné škály nebo automatického dělení vybraných izotopů.



Obrázek 13: Závislost intenzity signálu $^{56}\text{Fe}^+$ na čase vzorku V-26-J sken řezu pořízený kamerou laserového ablačního systému

Na obrázku 13 je možné pozorovat graf závislosti intenzity signálu $^{56}\text{Fe}^+$ v závislosti na čase. V grafické závislosti jsou vyznačeny dvě linie. Mezi oběma liniemi byla časová prodleva trvající 20 s.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem analýzy vzorků jaterní tkáně potkana pomocí pokročilé instrumentální analytické metody LA-ICP-MS umožňující in situ analýzu bylo porovnání prvkové distribuce a zhodnocení prvkové asociace mezi kontrolní skupinou zvířat a skupinou s myokardiální fibrózou. Jak již bylo zmíněno, tento výzkum přímo navazuje na výzkum, který v rámci své diplomové práce řešila Ing. Martina Machalová na srdeční tkáni [53]. Jaterní tkáň byla odebírána ze stejných zvířecích jedinců jako srdce.

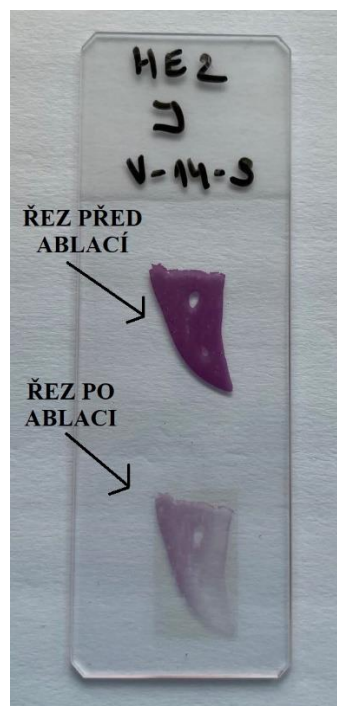
4.1 2D imaging kontrolních vzorků

Vyvíjení vhodné metodiky pro laserovou ablaci a vybírání analyzovaných prvků probíhalo z velké části na základě pilotního výzkumu [53], a také předešlé literární rešerše, již zmiňované v experimentální části. Vhodné integrační časy (IT) daných izotopů byly nastaveny na základě jejich předpokládaného zastoupení ve vzorku. Čím je integrační čas izotopu nižší, tím je lépe vykreslena prostorová distribuce, avšak za cenu nižšího signálu. Důraz byl kladen především na udržení vhodného odstupů daného izotopu od pozadí a na dostatečné prostorové rozlišení signálu. Uvažovány byly také detekční schopnosti metody ICP-MS.

První část je věnována vzorkům z kontrolní skupiny, jelikož na základě prvkové distribuce ve zdravé jaterní tkáni, je možné identifikovat distribuční změny u jater jedinců zasažených myokardiální fibrózou. Kontrolní skupina obsahovala celkem 3 vzorky.

Obrázek 15 ukazuje distribuční mapy prvků analyzovaného vzorku V-14-S, jehož tkáň byla analyzována za účelem sledování distribuce uhlíku, sodíku, hořčíku, křemíku, síry, vápníku, manganu, železa, mědi, zinku a selenu.

Křemík byl sledován z důvodu kontroly míry ablace skla laserovým paprskem. Na obrázku 15 je možné sledovat jeho zvýšenou intenzitu v levém dolním a horním okolí vzorku (označeno obdélníkem), až na $\approx 7,0 \cdot 10^4$ cps, což je asi sedmkrát vyšší intenzita než ve vzorku. Avšak zvýšenou intenzitu signálu vykazují pouze některé části podložního skla v přímé blízkosti řezu, nikoliv celá ablatovaná část, což by mohlo být způsobeno předchozí úpravou řezu a zalitím orgánu do parafínu. Na obrázku 13 je patrné, že řez byl ablatován nerovnoměrně, v pravé části spodního řezu je možné pozorovat, že bylo ablatováno více materiálu oproti levé části řezu. Tato nerovnoměrná ablace mohla být způsobena například nedokonalým zaostřením laserového svazku nebo rozdílnou výškou řezu, což mohlo také zapříčinit špatné přilnutí řezu k podložnímu sklíčku. Avšak nízké intenzity signálu izotop křemíku vykazuje i uvnitř řezu. Jelikož dochází současně k ablaci jak řezu samotného, tak i podložního sklíčka, měřený signál může být směsí organické fáze i skla. (Obrázek 14, 15).



Obrázek 14: Sklíčko s řezy jater před a po laserové ablaci vzorku V-14-S z kontrolní skupiny

Uhlík je základním matričním prvkem organické tkáně, je tedy dalším prvkem měřeným pro kontrolu, aby bylo možné sledovat změnu hustoty tkáně, a také kde se měkká tkáň nachází. Jak je možné sledovat na obrázku 15, izotop uhlíku vykazuje poměrně vysoké intenzity signálu v celé ploše řezu, avšak jsou zde viditelná místa s mírně vyšší intenzitou při pravém okraji vzorku (vyznačeno bílým obdélníkem), kde zřejmě došlo k ablaci většího množství materiálu oproti levé části řezu, jak je možné vidět na obrázku 14 (levá část řezu je značně tmavší), což mohlo způsobit špatné zaostření laserového svazku nebo nedokonalé přilnutí řezu k podložnímu sklíčku, jak již bylo diskutováno u křemíku, což může vést k nepřesné interpretaci dat distribuce daného prvku. Na distribuční mapě jsou pozorovatelné také části s intenzitou velmi nízkou (Obrázek 15), kde je tkáň naopak velmi řídká nebo úplně chybí.

Dalším sledovaným prvkem je síra, jejíž přítomnost se ve vzorku dá předpokládat z hlediska její důležitosti pro funkčnost biologického systému. Síra je jako prvek přítomna v proteinech a je často využívána k normalizaci, stejně jako uhlík. Normalizace distribučních map je využívána k přesnějšímu vizuálnímu zaznamenání poklesu množství ablatovaného materiálu v určitých částech vzorku, využívá se k tomu distribuce matričního prvku. Normalizace eliminuje možné nepřesnosti v interpretaci dat distribuce daného prvku. Avšak tento prvek s sebou nese i jistá omezení. Signály izotopů $^{32}\text{S}^+$ a $^{34}\text{S}^+$ jsou významně rušeny ionty $^{16}\text{O}^{16}\text{O}^+$ a $^{17}\text{O}^{17}\text{O}^+$. Omezení spočívá v tom, že pomocí kvadrupólového ICP-MS není zcela možné rozlišit izotopy $^{17}\text{O}^{17}\text{O}^+$ od $^{34}\text{S}^+$ a $^{16}\text{O}^{16}\text{O}^+$ od $^{32}\text{S}^+$, což způsobuje vzájemné interference daných iontů. Jelikož ICP-MS funguje za laboratorních podmínek, projeví se to hlavně zvýšenými hodnotami pozadí, ale pokud je kyslík vázán ve vzorku, způsobí to komplikace ve formě zvýšených interferencí. Jelikož přirozený výskyt izotopu ^{16}O dosahuje až 99 %, oproti izotopu ^{17}O , jehož zastoupení na zemi odpovídá přibližně 0,038 %, je ^{16}O daleko běžněji

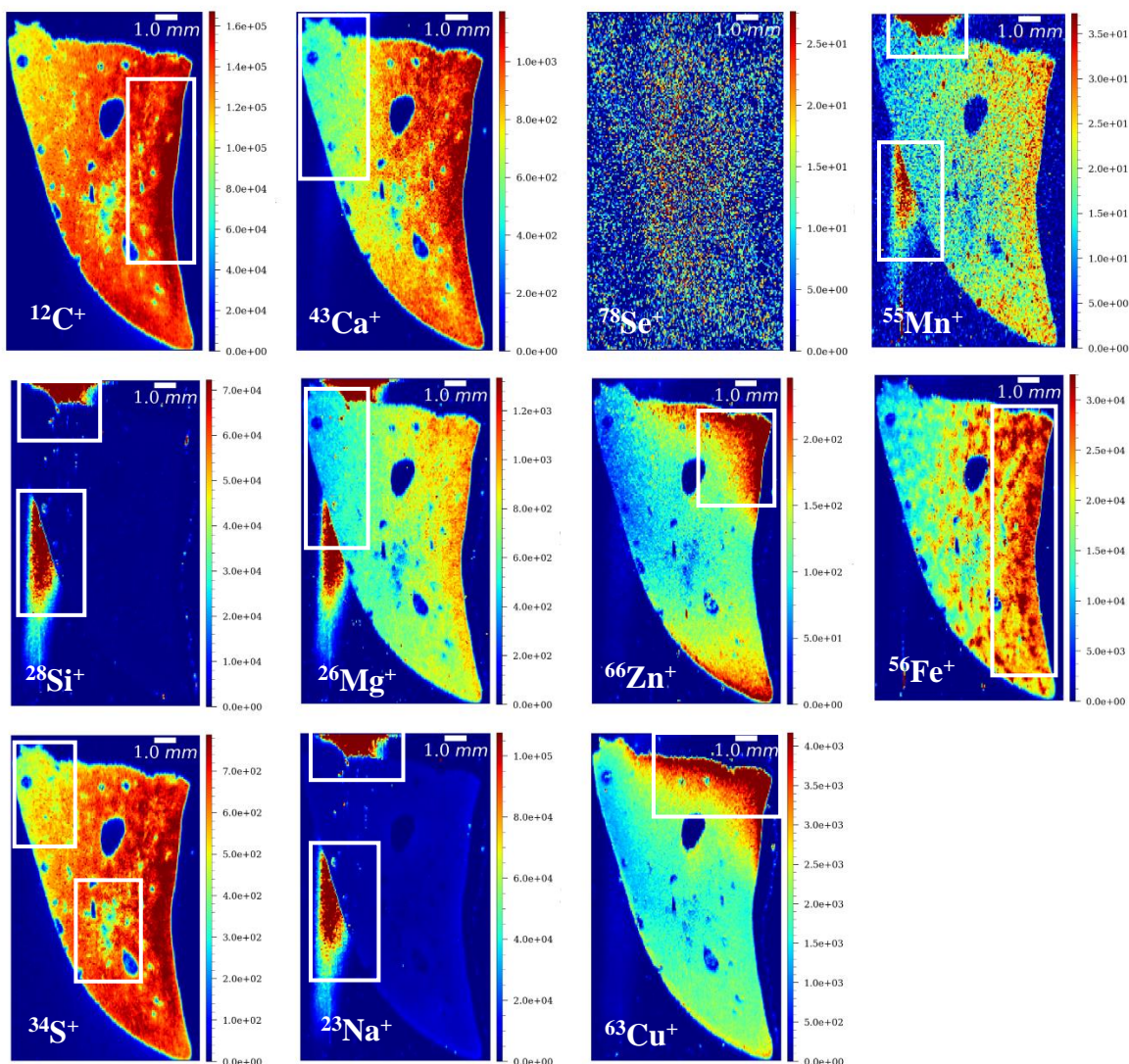
vyskytujícím se izotopem. Z toho důvodu byl v rámci této práce pro analýzu vybrán izotop síry $^{34}\text{S}^+$, ve snaze co největší minimalizace možných interferencí. Jak je možné vidět na obrázku 15 síra vykazuje vyšší hodnoty signálu v téměř celé ploše řezu, podobně jako uhlík, s výjimkou částí, kde je měkká tkáň řidší nebo zcela chybí.

U sodíku je možné na obrázku 15 pozorovat, zvýšené hodnoty signálu se při levém horním a dolním okraji vzorku, tyto hodnoty několikanásobně převyšují intenzitu signálu v řezu.

V případě selenu je celá distribuční mapa tvořena převážně pozadím i u ostatních vzorků, tudíž byl pro další vyhodnocování vyloučen.

Ostatní sledované prvky jako je mangan, hořčík, vápník, zinek, měď a železo vykazují poměrně vysoké hodnoty odstupu signálu od pozadí. V případě vápníku a hořčíku můžeme na distribučních mapách pozorovat místa s mírným poklesem intenzity, což může odrážet menší množství ablatované tkáně.

Pozorovatelná jsou naopak jistá ložiska železa se zvýšenou intenzitou signálu. Tato ložiska pravděpodobně korespondují s jaterními lalůčky, které tvoří základní morfológickou jednotku jater a mají tvar nepravidelného šestiúhelníku (Obrázek 3, 4).



Obrázek 15: Intenzitní distribuční mapy prvků (cps) vzorku V-14-S z kontrolní skupiny

Na obrázku 15 jsou u některých prvků pozorovatelná místa se zvýšenými intenzitami signálu pouze v určitých částech vzorku, proto těmto prvkům bude nadále věnována větší pozornost. Týká se to zejména manganu, železa, mědi a zinku, ostatní prvky nejsou pro další vyhodnocení uvažovány.

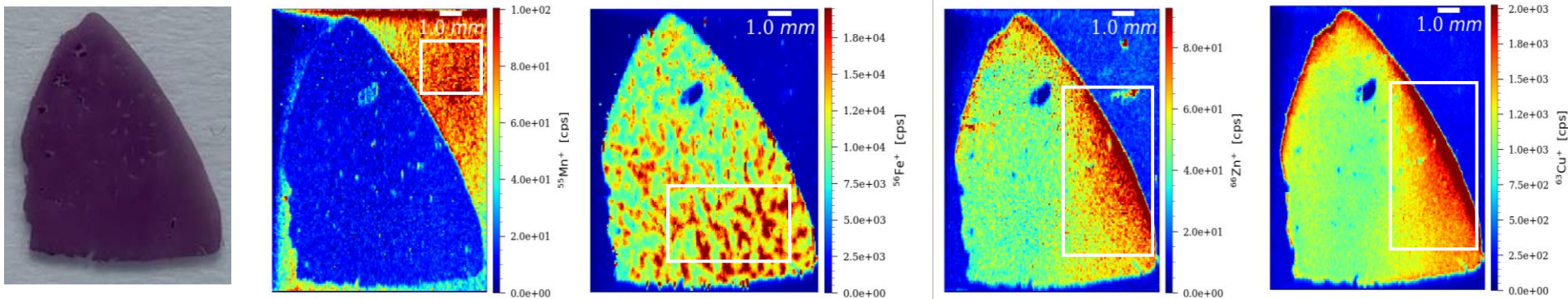
4.1.1 Porovnání distribuce pouze vybraných prvků

Řezy vzorků kontrolní skupiny a distribuční mapy vybraných prvků lze vidět na obrázcích 15, 16 a 17.

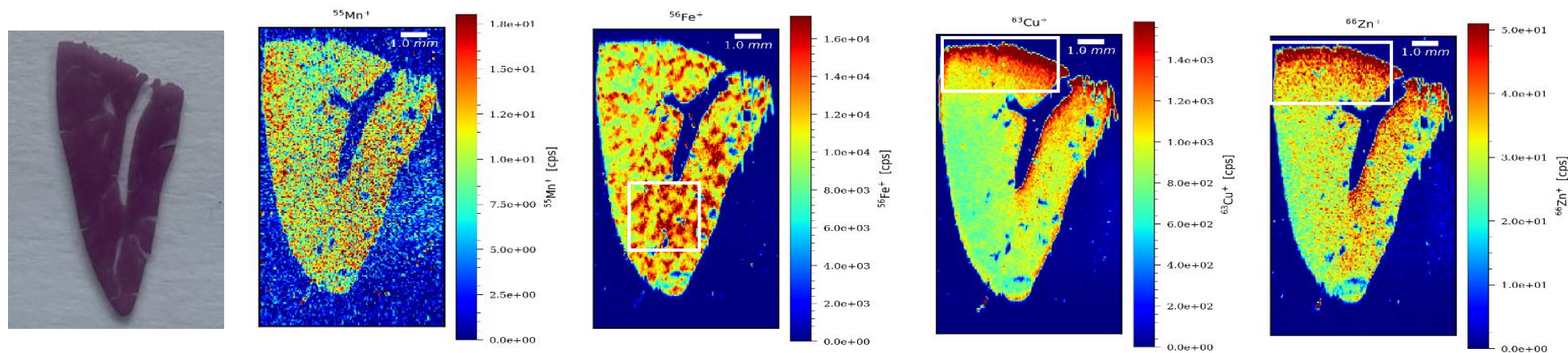
Z distribučních map lze vyčíst pozitivní korelace signálů mědi a zinku, oba prvky se vyskytují ve stejných částech vzorku. Jak je možné si na obrázcích povšimnout, zvýšené intenzity Cu a Zn jsou převážně v okrajových částech vzorků, což se také dá přisuzovat stékání barvicího roztoku v rámci histologického obarvování, kterému byly vzorky vystaveny. V takovém případě by ale nebylo vhodné obarvené řezy k analýze využívat.

Železo tvoří zásobárnu kyslíku a je vázané na myoglobin. U všech kontrolních vzorků je možné si v případě $^{56}\text{Fe}^+$ povšimnout ložisek s významně vyšší intenzitou signálu oproti zbylým částem vzorku (označení bílými obdélníky), což jak už bylo řečeno je přikládáno základním morfologickým jednotkám jater. Avšak u vzorku V-14-S je pozorovatelná zvýšená intenzita signálu hlavně při pravém okraji řezu, příčinou může být v tomto případě nižší hustota, tloušťka ablatované tkáně nebo problém se zaostřením laserového svazku.

V případě manganu je na obrázku 17 odezva téměř homogenní v celé ploše řezu, avšak u zbylých dvou vzorků (Obrázek 15, 16 – bílé obdélníky) je možné pozorovat zvýšené intenzity signálu hlavně v okolí řezů, v některých částech je až čtyřikrát vyšší (Obrázek 16, označení bílým obdélníkem).



Obrázek 16: Intenzitní distribuční mapy prvků (cps) a řez vzorku V-16-S z kontrolní skupiny



Obrázek 17: Intenzitní distribuční mapy prvků (cps) a řez vzorku V-11-S z kontrolní skupiny

Z výsledků kontrolní skupiny lze usuzovat stejné nebo podobné chování prvků mědi a zinku, jejichž výskyt a intenzity signálů vybraných izotopů značně korelují. Jejich zvýšené intenzity se pohybují převážně v okrajových částech řezů, což je možné přisuzovat také předešlému histologickému barvení vzorků.

Železo u všech vzorků vytváří výrazně viditelná ložiska téměř v celých plochách řezů, což je přisuzováno základním morfologickým jednotkám jater.

Mangan tvoří anomálii mezi vybranými prvky, jelikož jeho distribuce není při porovnání mezi jednotlivými vzorky úplně konstantní. U některých vzorků vykazuje daleko vyšší intenzitu signálu mimo řez tkáně.

Při posuzování prvkové distribuce ve vzorcích musí být brán ohled také na předešlou úpravu vzorků, zaostření laserového svazku a samotnou přípravu řezu na podložní sklíčko, což může také způsobit různé anomálie a změny prvkové distribuce.

4.2 Porovnání skupiny fibrózou zasažených tkání s kontrolní skupinou a v závislosti na stupni fibrózy

Výběr vzorků pro analýzu probíhal s ohledem na míru rozsahu myokardiální fibrózy identifikované v srdeční tkáni. V tabulce 4 jsou uvedeny procentuální míry kvantifikace vybraných vzorků. V srdci nejvíce zasaženém myokardiální fibrózou odpovídá kvantifikace fibrózy 2,148 %, tudíž největší zasažená plocha srdeční tkáně tvořila 2,148 % a naopak nejméně zasažená plocha tvořila pouze 0,708 % z celkové plochy srdeční tkáně.

Tabulka 4: Kvantifikace myokardiální fibrózy ve vzorcích srdce

vzorek	kvantifikace [%]
V-21-S	0,708
V-22-S	1,891
V-26-S	2,148

Na základě pilotního výzkumu byly pro interpretaci myokardiální fibrózy zvoleny pouze prvky měď, zinek, mangan a železo.

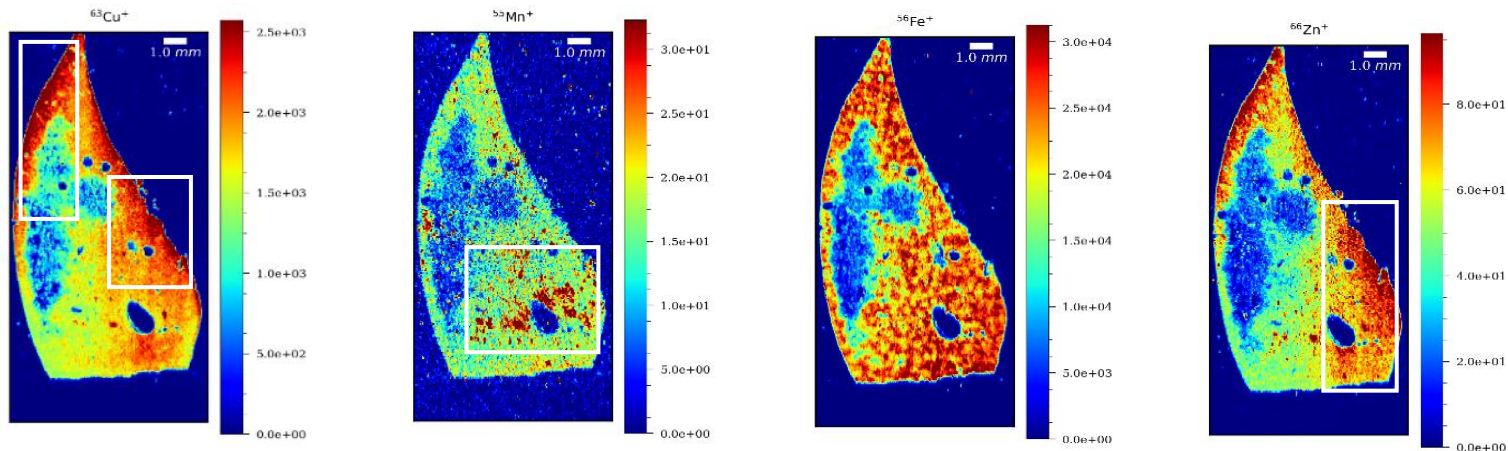
Řezy vzorků pro analýzu a distribuční mapy vybraných prvků je možné vidět na obrázcích 18, 19 a 20.

Při porovnání distribuce prvků mědi a zinku mezi kontrolními vzorky a vzorky s fibrózou je možné pozorovat rozdíly mezi intenzitami, vzorky s fibrózou vykazují vyšší intenzity v obou případech. Jelikož myokardiální fibrózu charakterizuje nadměrné ukládání extracelulární matrix (ECM) v srdeční tkáni, mohla by se zvýšená intenzita prvků vzhledem ke vzájemnému vztahu srdce s játry souviset právě s extracelulárními enzymy, v jejichž struktuře je zinek velmi často zastoupen.

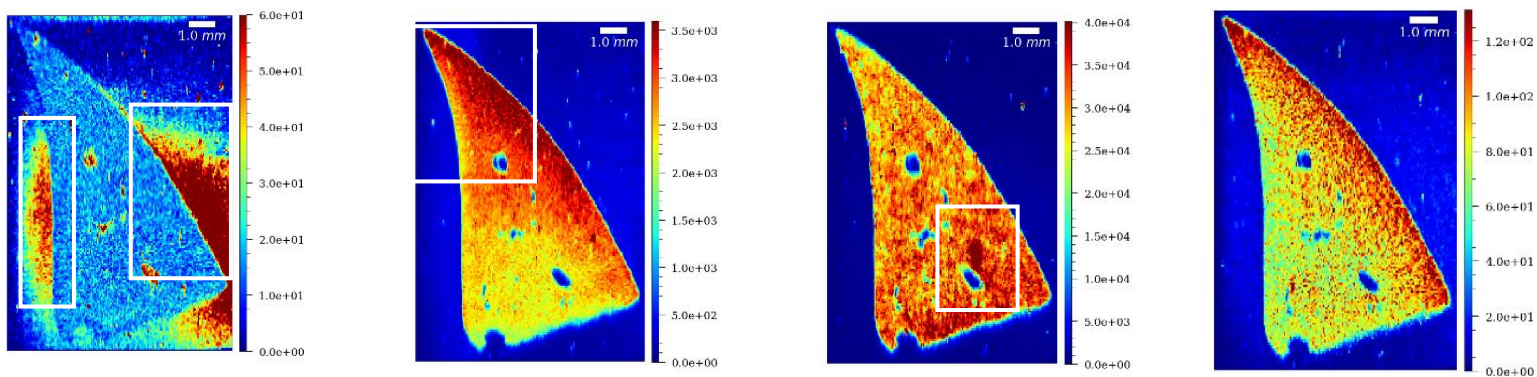
Dále při studiu distribuce železa v jednotlivých řezech je možné pozorovat velká ložiska s významnou intenzitou prvku. Ložiska je možné přisuzovat jaterním lalůčkům.

Při porovnání mezi vzorky z kontrolní skupiny a vzorky zasaženými fibrózou je možné u železa pozorovat zvýšené intenzity signálů u jedinců zasažených fibrózou, v některých případech jsou intenzity skoro dvakrát vyšší. Což se dá přisuzovat větší prokrvenosti tkáně. Kumulace železa pozorovatelná pouze v určitých částech vzorku může odkazovat na postižení (poškození) dané tkáně a její možnou následnou přeměnu (vyznačení bílými obdélníky u všech vzorků).

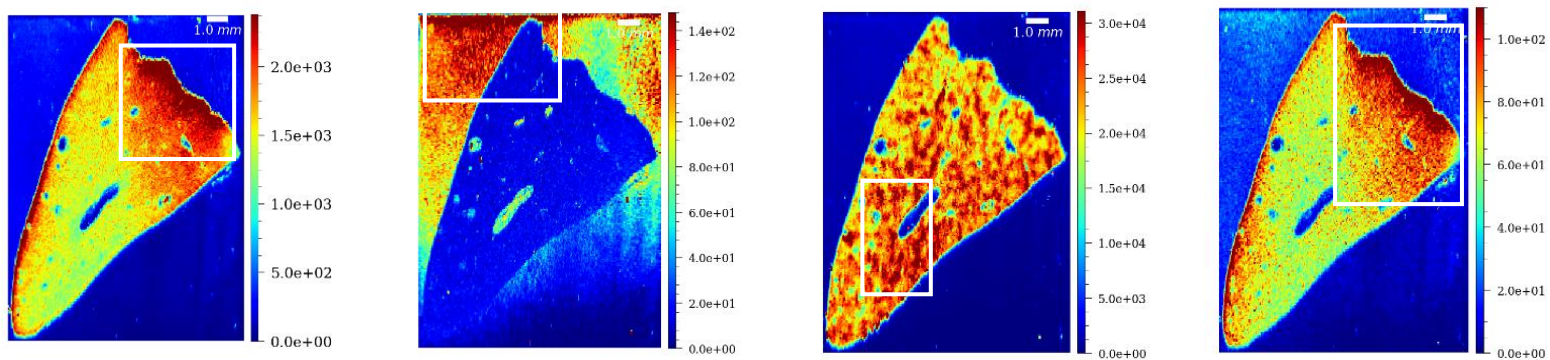
Při posuzování distribuce manganu v řezech, není pozorovatelný žádný zásadní rozdíl v intenzitách mezi kontrolou a fibrózou. Avšak u vzorku V-21-J (Obrázek 18 – bílý obdélník) je možné zahlédnout ložiska manganu s lehce zvýšenou intenzitou oproti zbylé části řezu, další z pozorovatelných anomálií v případě manganu. Na obrázcích 19 a 20 můžeme opět sledovat zvýšené intenzity signálu v přímém okolí řezů, stejně jako u některých kontrolních vzorků (opět vyznačeno bílými obdélníky).



Obrázek 18: Intenzitní distribuční mapy prvků (cps) a řez vzorku V-21-J z kontrolní skupiny



Obrázek 19: Intenzitní distribuční mapy prvků (cps) a řez vzorku V-22-J z kontrolní skupiny



Obrázek 20: Intenzitní distribuční mapy prvků (cps) a řez vzorku V-26-J z kontrolní skupiny

V distribuci prvků v závislosti na rozsahu fibrózy nejsou patrné významné rozdíly mezi jednotlivými vzorky.

Avšak při shrnutí rozdílů patrných mezi kontrolní skupinou a skupinou zasaženou myokardiální fibrózou lze pár rozdílů pozorovat. Například větší prokrvenost tkáně u zasažené skupiny, což se viditelně odráží zvýšenými intenzitami signálu patrnými na distribučních mapách železa. Významná ložiska železa jsou zde pozorovatelná téměř v celé ploše řezů (vyznačeno bílými obdélníky).

Výskyt mědi a zinku zde opět výrazně koreluje, stejně jako u vzorků kontrolní skupiny. Zvýšené intenzity signálů vykazují hlavně okrajové části řezů.

Stejně jako u vzorků z kontrolní skupiny je třeba při posuzování prvkové distribuce brát v potaz také možné nedokonalé zaostření laserového svazku, předešlé histologické obarvení, kterému byly vzorky vystaveny nebo špatné uchycení řezu na podložní sklíčko, což může způsobit nerovnoměrnou ablaci materiálu a následné chyby v interpretaci dat.

5. ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla zaměřena na studium změn prvkové distribuce v jaterní tkáni potkana zasaženého myokardiální fibrózou pomocí pokročilé analytické instrumentální metody LA-ICP-MS. Cílem bylo identifikovat a porovnat rozdíly v prvkové distribuci mezi kontrolní skupinou a skupinou zasaženou myokardiální fibrózou.

Výsledky tohoto výzkumu naznačují zřejmou změnu distribuce v přímé návaznosti na myokardiální fibrózu především u zinku, mědi, železa a manganu. Z toho důvodu byl následně kladen důraz z větší části především na tyto prvky.

U mědi a zinku byla zjištěna pozitivní korelace ve výskytu, oba izotopy prvků vykazovaly zvýšené intenzity signálů především v okrajových částech vzorku, u obou porovnávaných skupin. V tomto případě byl také potvrzen rozdíl mezi kontrolní a experimentální skupinou. U jedinců zasažených myokardiální fibrózou byla zjištěna vyšší intenzita signálů obou zmíněných izotopů, jak mědi, tak zinku. Důvodem změn může být například předchozí příprava a úprava vzorků, nadměrné ukládání ECM v srdeční tkáni, jejíž součástí jsou enzymy obsahující zinek, jelikož jakákoliv srdeční nerovnováha ve většině případů přímo ovlivní i jaterní tkáň.

V případě manganu nebyla zjištěna žádná změna související s vlivem myokardiální fibrózy, výsledky manganu jsou takovou anomálií, jelikož v některých případech izotopy manganu vykazují vyšší intenzity signálů především v přímém okolí řezu, avšak u jednoho vzorku je možné pozorovat určitá ložiska manganu naopak uprostřed řezu. Naproti tomu při studiu distribuce železa je možné pozorovat na distribučních mapách velká ložiska s významně vyšší intenzitou, což bylo přisuzováno jaterním lalůčkům, základním morfologickým jednotkám jater. Při porovnání mezi vzorky kontrolní a experimentální skupiny, byly u izotopu železa potvrzeny zvýšené intenzity signálů u jedinců zasažených myokardiální fibrózou. Tato zvýšená intenzita byla přisuzována větší prokrvenosti tkáně. Jak již bylo řečeno, kumulace železa pozorovatelná pouze v určitých částech řezu může odkazovat na poškození jaterní tkáně a její možnou následnou přeměnu.

Tento výzkum přináší nové poznatky ve vzájemném vztahu myokardiální fibrózy a jaterní tkáně. Výsledky mohou mít velký význam pro diagnostiku, léčbu a prevenci kardiovaskulárních onemocnění.

Jak již bylo zmíněno v experimentální části, tento výzkum má přímou návaznost na pilotní výzkum, kterým se v rámci své diplomové práce zabývala Ing. Martina Machalová [53], tudíž byl brán ohled i na různé aspekty zjištěné v rámci této práce.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ECM	extracelulární matrix
PFAS	per- a polyfluorované látky
POPs	perzistentní organické polutanty
NAFLD	nealkoholové tukové jaterní onemocnění
MF	myokardiální fibróza
PM	pevné částice
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
CT	výpočetní tomografie
MRI	magnetická rezonance
SPECT	jednofotonová emisní výpočetní tomografie
3D	trojrozměrný
2D	dvourozměrný
XRF	rentgenová fluorescenční spektrometrie
PIXE	částicemi indukovaná rentgenová emise
XFM	rentgenová fluorescenční mikroskopie
SIMS	hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů
LIBS	spektrometrie laserem buzeného plazmatu
LA-ICP-MS	laserová ablace ve spojení s hmotnostní spektrometrií indukčně vázaného plazmatu
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie indukčně vázaného plazmatu
LA-ICP-OES	laserová ablace ve spojení s optickou emisní spektrometrií indukčně vázaného plazmatu
ICP-OES	optická emisní spektrometrie indukčně vázaného plazmatu
LA	laserová ablace
Q-MS	kvadrupólový hmotnostní analyzátor
TOF-MS	průletový hmotnostní analyzátor
SF-MS	hmotnostní analyzátor s dvojí fokusací
HR-MS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
SRM	standardní referenční materiál
IT	integrační čas

7. BIBLIOGRAFIE

- [1] MAHADEVAN, Vishy. Anatomy of the liver. *Surgery (Oxford)*. 2020, **38**(8), 427-431. ISSN 0263-9319. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2014.10.004>
- [2] D'ANTIGA, Lorenzo. *Pediatric Hepatology and Liver Transplantation*. 2019. Cham: Springer International Publishing AG, 2019. ISBN 3319963996. Dostupné z: doi:[10.1007/978-3-319-96400-3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-96400-3)
- [3] MEYER, Jeffrey a Tracey SCHEFTER. *Radiation Therapy for Liver Tumors*. 2017. Cham: Springer International Publishing AG, 2017. ISBN 9783319545301. Dostupné z: doi:[10.1007/978-3-319-54531-8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-54531-8)
- [4] SIBULESKY, Lena. Normal liver anatomy. *Clinical Liver Disease*. John Wiley & Sons, Ltd, 2013, **2**(1), 1-3. ISSN 2046-2484. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/cld.124>
- [5] HUDÁK, Radovan a David KACHLÍK. *Memorix anatomie*. Praha: Triton, 2013. ISBN 978-80-7387-674-6.
- [6] GRIM, Miloš a Rastislav DRUGA. *Základy anatomie*. Praha: Galén, 2005. ISBN 80-726-2302-8.
- [7] WANG, Fu-Sheng, Jian-Gao FAN, Zheng ZHANG, Bin GAO a Hong-Yang WANG. The global burden of liver disease: The major impact of China: The major impact of China. *Hepatology*. John Wiley & Sons, Ltd, 2014, **60**(6), 2099-2108. ISSN 0270-9139. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/hep.27406>
- [8] ROEHLEN, Natascha, Emilie CROUCHET a Thomas F. BAUMERT. Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. *Cells*. 2020, **9**(4). ISSN 2073-4409. Dostupné z: doi:[10.3390/cells9040875](https://doi.org/10.3390/cells9040875)
- [9] BATALLER, Ramón a David A. BRENNER. Liver fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*. 2005, **115**(2), 209-218. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:[10.1172/JCI200524282](https://doi.org/10.1172/JCI200524282)
- [10] AYDIN, M. Merve a Kamil Can AKCALI. Liver fibrosis. *The Turkish Journal of Gastroenterology*. 2018, **29**(1), 14-21. ISSN 13004948. Dostupné z: doi:[10.5152/tjg.2018.17330](https://doi.org/10.5152/tjg.2018.17330)
- [11] BAROUKI, Robert, Michel SAMSON, Etienne B. BLANC, Massimo COLOMBO, Jessica ZUCMAN-ROSSI, Konstantinos N. LAZARIDIS, Gary W. MILLER a Xavier COUMOUL. The exposome and liver disease - how environmental factors affect liver health. *Journal of Hepatology*. 2023. ISSN 0168-8278. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.02.034>
- [12] ZHENG, Shuilin, Yue YANG, Cong WEN et al. Effects of environmental contaminants in water resources on nonalcoholic fatty liver disease. *Environment International*. 2021, **154**, 106555. ISSN 0160-4120. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106555>

- [13] XANTHOPOULOS, Andrew, Randall C. STARLING, Takeshi KITAI a Filippos TRIPOSKIADIS. Heart Failure and Liver Disease: Cardiohepatic Interactions: Cardiohepatic Interactions. *JACC: Heart Failure*. 2019, **7**(2), 87-97. ISSN 2213-1779. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.jchf.2018.10.007>
- [14] VALENTOVÁ, Miroslava, Stephan VON HAEHLING, Wolfram DOEHNER, Ján MURÍN, Stefan D. ANKER a Anja SANDEK. Liver dysfunction and its nutritional implications in heart failure. *Nutrition*. 2013, **29**(2), 370-378. ISSN 0899-9007. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.nut.2012.06.002>
- [15] GONCALVESOVA, E. a M. KOVACOVA. Heart failure affects liver morphology and function. What are the clinical implications?. *Bratislava Medical Journal*. 2018, **119**(02), 98-102. ISSN 1336-0345. Dostupné z: doi:[10.4149/BLL_2018_018](https://doi.org/10.4149/BLL_2018_018)
- [16] LIU, Tong, Deli SONG, Jianzeng DONG et al. Current Understanding of the Pathophysiology of Myocardial Fibrosis and Its Quantitative Assessment in Heart Failure. *Frontiers in Physiology*. 2017, **8**. ISSN 1664-042X. Dostupné z: doi:[10.3389/fphys.2017.00238](https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00238)
- [17] GIORDANO, Carla, Marco FRANCONI, Giulia CUNDARI, Annalinda PISANO a Giulia D'AMATI. Myocardial fibrosis: morphologic patterns and role of imaging in diagnosis and prognostication: morphologic patterns and role of imaging in diagnosis and prognostication. *Cardiovascular Pathology*. 2022, **56**, 107391. ISSN 1054-8807. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.carpath.2021.107391>
- [18] ESPELAND, Torvald, Ida Gjervold LUNDE, Brage H. AMUNDSEN, Lars GULLESTAD a Svend AAKHUS. Myokardfibrose. *Tidsskrift for Den norske legeforening*. 2019. ISSN 0029-2001. Dostupné z: doi:[10.4045/tidsskr.17.1027](https://doi.org/10.4045/tidsskr.17.1027)
- [19] KONG, Ping, Panagiota CHRISTIA a Nikolaos G. FRANGOGIANNIS. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2014, **71**(4), 549-574. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:[10.1007/s00018-013-1349-6](https://doi.org/10.1007/s00018-013-1349-6)
- [20] LIU, Mengrui, Blanca LÓPEZ DE JUAN ABAD a Ke CHENG. Cardiac fibrosis: Myofibroblast-mediated pathological regulation and drug delivery strategies: Myofibroblast-mediated pathological regulation and drug delivery strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2021, **173**, 504-519. ISSN 0169-409X. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.03.021>
- [21] HAN, Xiaoying, Yi ZHANG, Xinyu ZHANG et al. Targeting adipokines: A new strategy for the treatment of myocardial fibrosis: A new strategy for the treatment of myocardial fibrosis. *Pharmacological Research*. 2022, **181**, 106257. ISSN 1043-6618. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106257>
- [22] JIANG, Jinjin, Yang LI, Shuang LIANG et al. Combined exposure of fine particulate matter and high-fat diet aggravate the cardiac fibrosis in C57BL/6J mice. *Journal of Hazardous Materials*. 2020, **391**, 122203. ISSN 0304-3894. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122203>

- [23] XING, Qisong, Meiqiong WU, Zhen XUE et al. Biochemical evidence of PM2.5 critical components for inducing myocardial fibrosis in vivo and in vitro. *Science of The Total Environment*. 2023, **857**, 159258. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159258>
- [24] HUSSAIN, Shah, Iqra MUBEEN, Niamat ULLAH et al. Modern Diagnostic Imaging Technique Applications and Risk Factors in the Medical Field: A Review. *BioMed Research International*. 2022, **2022**, 1-19. ISSN 2314-6141. Dostupné z: doi:[10.1155/2022/5164970](https://doi.org/10.1155/2022/5164970)
- [25] JAN, M. Fuad a A. Jamil TAJIK. Modern Imaging Techniques in Cardiomyopathies. *Circulation Research*. 2017, **121**(7), 874-891. ISSN 0009-7330. Dostupné z: doi:[10.1161/CIRCRESAHA.117.309600](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309600)
- [26] SUGIYAMA, Tomoko, Motohiro UO, Takahiro WADA, Daisuke OMAGARI, Kazuo KOMIYAMA, Tadahide NOGUCHI, Yoshinori JINBU a Mikio KUSAMA. Estimation of trace metal elements in oral mucosa specimens by using SR-XRF, PIXE, and XAFS. *BioMetals*. 2015, **28**(1), 11-20. ISSN 0966-0844. Dostupné z: doi:[10.1007/s10534-014-9796-6](https://doi.org/10.1007/s10534-014-9796-6)
- [27] TSUJI, Kouichi. X-ray Fluorescence and Emission: X-ray Fluorescence Theory. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier, 2018. ISBN 9780124095472. Dostupné z: doi:[10.1016/B978-0-12-409547-2.14474-9](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14474-9)
- [28] ISHII, Keizo. PIXE and Its Applications to Elemental Analysis. *Quantum Beam Science* [online]. 2019, **3**(2) [cit. 2023-04-03]. ISSN 2412-382X. Dostupné z: doi:[10.3390/qubs3020012](https://doi.org/10.3390/qubs3020012)
- [29] PAUNESKU, T., M. B. WANZER, E. N. KIRILLOVA et al. X-Ray Fluorescence Microscopy for Investigation of Archival Tissues. *Health Physics*. 2012, **103**(2), 181-186. ISSN 0017-9078. Dostupné z: doi:[10.1097/HP.0b013e31824e7023](https://doi.org/10.1097/HP.0b013e31824e7023)
- [30] WEEKLEY, Claire, Jade AITKEN, Lydia FINNEY, Stefan VOGT, Paul WITTING a Hugh HARRIS. Selenium Metabolism in Cancer Cells: The Combined Application of XAS and XFM Techniques to the Problem of Selenium Speciation in Biological Systems. *Nutrients*. 2013, **5**(5), 1734-1756. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:[10.3390/nu5051734](https://doi.org/10.3390/nu5051734)
- [31] ŠTĚPÁNKOVÁ, K., K. NOVOTNÝ, M. VAŠINOVÁ GALIOVÁ, V. KANICKÝ, J. KAISER a D.W. HAHN. Laser ablation methods for analysis of urinary calculi: Comparison study based on calibration pellets: Comparison study based on calibration pellets. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2013, **81**, 43-49. ISSN 0584-8547. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.sab.2012.12.009>
- [32] HOLÁ, Markéta, Veronika KONEČNÁ, Pavel MIKUŠKA, Jozef KAISER a Viktor KANICKÝ. Influence of physical properties and chemical composition of

- sample on formation of aerosol particles generated by nanosecond laser ablation at 213nm. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2010, **65**(1), 51-60. ISSN 0584-8547. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.sab.2009.11.003>
- [33] LIMBECK, A., L. BRUNNBAUER, H. LOHNINGER et al. Methodology and applications of elemental mapping by laser induced breakdown spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*. 2021, **1147**, 72-98. ISSN 0003-2670. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.12.054>
- [34] Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) in cultural heritage. *Analytical Methods*. 2019, **11**(45), 5833-5836. ISSN 1759-9660. Dostupné z: doi:[10.1039/C9AY90147G](https://doi.org/10.1039/C9AY90147G)
- [35] BUSSER, 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: A new and promising approach for biological and medical applications. *Coordination Chemistry Reviews*. 2018, **358**, 70-79. ISSN 0010-8545. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.12.006>
- [36] KHAN, Sharib Raza, Babita SHARMA, Pooja A. CHAWLA a Rohit BHATIA. Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES): a Powerful Analytical Technique for Elemental Analysis. *Food Analytical Methods*. 2022, **15**(3), 666-688. ISSN 1936-9751. Dostupné z: doi:[10.1007/s12161-021-02148-4](https://doi.org/10.1007/s12161-021-02148-4)
- [37] MAJUMDAR, Arti J. a Nidhi DUBEY. Applications of inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-OES) in impurity profiling of Pharmaceuticals. *International Journal of Pharmacy* [online]. 2017, **8**(1), 5420-5425 [cit. 2023-04-09]. ISSN 09767126.
- [38] *Kurz ICP spektrometrie*. Brno: Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, [200-]-. ISBN 978-80-903732-8-0.
- [39] FERNÁNDEZ, Beatriz. Elemental and molecular imaging by LA-ICP-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2019, **411**(3), 547-548. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:[10.1007/s00216-018-1523-7](https://doi.org/10.1007/s00216-018-1523-7)
- [40] BECKER, J.Sabine, Andreas MATUSCH a Bei WU. Bioimaging mass spectrometry of trace elements – recent advance and applications of LA-ICP-MS: A review: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2014, **835**, 1-18. ISSN 0003-2670. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.04.048>
- [41] ELKADI, Mirella, Avin PILLAY, Sai Cheong FOK, Fadi FEGHALI, Ghada BASSIONI a Sasi STEPHEN. Depth Profiling (ICP-MS) Study of Toxic Metal Buildup in Concrete Matrices: Potential Environmental Impact. *Sustainability*. 2010, **2**(10), 3258-3269. ISSN 2071-1050. Dostupné z: doi:[10.3390/su2103258](https://doi.org/10.3390/su2103258)
- [42] DE HOFFMANN, Edmond a Vincent STROOBANT. *Mass spectrometry: principles and applications*. Third edition. Chichester: John Wiley, 2007. ISBN 978-0-470-03310-4.

- [43] AMMANN, Adrian A. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): a versatile tool. *Journal of Mass Spectrometry*. 2007, **42**(4), 419-427. ISSN 10765174. Dostupné z: doi:10.1002/jms.1206
- [44] SKOOG, Douglas A., F. James HOLLER a Stanley R. CROUCH. *Principles of instrumental analysis*. Seventh edition. Boston: Cengage Learning, 2018. ISBN 978-1-305-57721-3.
- [45] NEFF, Christoph, Pascal BECKER, Bodo HATTENDORF a Detlef GÜNTHER. LA-ICP-MS using a nitrogen plasma source. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2021, **36**(8), 1750-1757. ISSN 0267-9477. Dostupné z: doi:10.1039/D1JA00205H
- [46] SABINE BECKER, J., Andreas MATUSCH, Christoph PALM, Dagmar SALBER, Kathryn A. MORTON a J. SUSANNE BECKER. Bioimaging of metals in brain tissue by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) and metallomics. *Metallomics*. 2010, **2**(2), 104-111. ISSN 1756-5901. Dostupné z: doi:10.1039/B916722F
- [47] LIU, YongSheng, ZhaoChu HU, Ming LI a Shan GAO. Applications of LA-ICP-MS in the elemental analyses of geological samples. *Chinese Science Bulletin*. 2013, **58**(32), 3863-3878. ISSN 1001-6538. Dostupné z: doi:10.1007/s11434-013-5901-4
- [48] HUANG, Di, Xin HUA, Guang-Li XIU, Yong-Jie ZHENG, Xiao-Ying YU a Yi-Tao LONG. Secondary ion mass spectrometry: The application in the analysis of atmospheric particulate matter: The application in the analysis of atmospheric particulate matter. *Analytica Chimica Acta*. 2017, **989**, 1-14. ISSN 0003-2670. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.07.042
- [49] AUDINOT, Jean-Nicolas, Patrick PHILIPP, Olivier DE CASTRO, Antje BIESEMEIER, Quang Hung HOANG a Tom WIRTZ. Highest resolution chemical imaging based on secondary ion mass spectrometry performed on the helium ion microscope. *Reports on Progress in Physics*. 2021, **84**(10). ISSN 0034-4885. Dostupné z: doi:10.1088/1361-6633/ac1e32
- [50] PRIEBE, Agnieszka a Johann MICHLER. Review of Recent Advances in Gas-Assisted Focused Ion Beam Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (FIB-TOF-SIMS). *Materials*. 2023, **16**(5). ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma16052090
- [51] YANG, J. a I. GILMORE. Application of secondary ion mass spectrometry to biomaterials, proteins and cells: a concise review. *Materials Science and Technology*. 2014, **31**(2), 131-136. ISSN 0267-0836. Dostupné z: doi:10.1179/1743284714Y.0000000613
- [52] STRAČINA, Tibor. *T1 Relaxační čas v detekci myokardiální fibrózy v potkaním modelu*. Brno: Masarykova univerzita, 2020.

- [53] MACHALOVÁ, Martina. *Studium vlivu myokardiální fibrózy na prvkovou distribuci v měkkých tkáních potkana pomocí laserové ablace ve spojení s ICP-MS*. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická, 2022.