

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
**Katedra biologických a lékařských věd**

**Analýza biologických tkání**  
**(vybraných typů nádorů)**  
**metodou laserové ablace**

**(bakalářská práce)**

Hradec Králové, 2012

Veronika Ryvolová

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že tato bakalářská práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, řádně cituji na konci této práce.

Datum:

Podpis:

## **Poděkování**

Velice bych chtěla poděkovat Mgr. Tomáši Vaculovičovi, PhD, že se nebál, pustil se se mnou do boje a vedl mou bakalářskou práci, za cenné rady a zkušenosti, které mi během přípravy této práce předal, a díky kterým mohla tato práce vzniknout.

Děkuji také Doc.RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc., že mou práci zaštilil jako garant.

Dále patří veliké poděkování mé sestře Markétě za velikou pomoc, rady a podporu a v neposlední řadě bych také chtěla velmi poděkovat celé mojí rodině, příteli Petrovi a jeho rodičům za velikou psychickou podporu a trpělivost...

**Jen díky Vám jsem dnes tam, kde jsem.**

**DĚKUJI !!!**

## OBSAH

I.	ABSTRAKT	7
II.	CÍL PRÁCE, ZADÁNÍ PRÁCE	9
III.	ÚVOD	10
IV.	TEORETICKÁ ČÁST	12
1.	Vznik a růst rakovinných buněk	12
2.	Stopové prvky	12
3.	Jmenované prvky a jejich úloha v organismu	13
3.1	Železo (Fe)	13
3.2	Měď (Cu)	14
3.3	Zinek (Zn)	14
3.4	Uhlík (C)	15
4.	Metalothionein, jeho úloha v organismu a stanovení	15
4.1	Separace a stanovení MT	16
4.2	Brdičkova reakce	16
5.	Laserová ablace s hmotnostní spektrometrií	18
5.1	Princip	19
5.2	Laserová ablace	19
5.2.1	LASER	19
5.2.2	LASEROVÁ ABLACE – frakcionace a transport	22
5.2.3	ICP- MS	23

5.3 Příklady použití LA-ICP-MS	25
<b>V. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>27</b>
6. Materiály a metody	27
6.1 Miniaturní prasata linie MeLim	27
6.2 Řezy nádorů – použité vzorky	27
6.3 LA – ICP – MS	28
6.4 Zpracování získaných dat - Program Laser Ablation Tool	29
6.5 Brdičkova reakce	29
6.5.1 Příprava vzorku pro elektrochemické a chromatografické analýzy	30
6.5.2 Stanovení MT	30
7. Výsledky a diskuze	31
7.1 Laterální rozložení prvků ve zdravé kůži a v jednotlivých typech nádorů	32
7.1.1 Kůže	32
7.1.2 Nádor v progresi	35
7.1.3 Výrazně nodulární nádor	38
7.2 Výsledky stanovení MT	42
<b>VI. ZÁVĚR</b>	<b>43</b>

## SEZNAM ZKRATEK:

<b>LA</b>	laserová ablace
<b>ICP</b>	indukčně vázané plazma
<b>MS</b>	hmotnostní spektrometrie
<b>MT</b>	metalothionein
<b>DPV</b>	diferenční pulzní voltametrie
<b>CZE</b>	kapilární zónová elektroforéza
<b>HPLC</b>	vysokoúčinná kapalinová chromatografie

# I. ABSTRAKT

Maligní melanom se řadí do skupiny deseti nejčastěji se vyskytujících typů karcinomů u dospělé populace. Metabolismus melanomových buněk je předmětem rozsáhlého výzkumu zejména z pohledu nových diagnostických a terapeutických možností. Jednou z velmi zajímavých otázek je hospodaření těchto nádorových buněk s ionty kovů, které jsou velmi důležité pro funkci více než třetiny celkového obsahu proteinů v buňce. Z tohoto důvodu je hladina iontů kovů a významných kov-dependentních proteinů důležitým tématem. Jedním ze zajímavých kov-vázajících proteinů je metalothionein, jehož hladina a exprese jsou v poslední době intenzivně studovány ve spojitosti se vznikem a progresí nádorového onemocnění.

Hlavním cílem předkládané bakalářské práce je spektrometrická a elektrochemická analýza řezů nodulárních a povrchově se šířících melanomů získaných z miniaturních prasat linie MeLiM s dědičným melanomem. Ve tkáních je sledována prostorová distribuce iontů kovů pomocí metody laserové ablace s hmotnostní spektrometrií (LA-ICP-MS). Metoda LA-ICP-MS využívá zaostřeného laserového paprsku pro vzorkování studovaného materiálu. Paprsek lze zaostřit na bod o definované velikosti v rozmezí od 4 do 250  $\mu\text{m}$ . Proto je tato metoda vhodná pro studium rozložení prvků na povrchu studovaného materiálu. Předmětem této práce je optimalizovat metodu LA-ICP-MS a zjistit, zda je tato metoda použitelná pro studium laterálního rozdělení sledovaných kovů ve zkoumaných melanomech.

Dále bude stanoven obsah kov-vázajícího proteinu metalothioneinu. Hladina proteinu metalothioneinu bude stanovena pomocí diferenční pulzní voltametrie Brdičkovy reakce.

# ABSTRACT

Malignant melanomas belong to group of ten the most frequent types of carcinoma of adult population. The metabolism of melanomas cells is the point of extensive research, mostly because of new diagnostic and therapeutic possibilities. One of very interesting questions is handling of this cancer cells with metal ions, which are important for more than one third of all proteins in cell. That is why a concentration of metal ions and metal-dependent proteins is still very interesting question. One of important metal-dependent protein is metallothionein, which amount and expression are intensively studied to connection to formation and progress of tumor disease.

The main target of this work will be spectrometric and electrochemical analysis of cryoscopic incisions of nodular and surface spread melanomas acquired from minipigs line MeLim with hereditary melanoma. Spatial distribution of ions of metals is detected by laser ablation with mass spectrometry (LA-ICP-MS). This method uses focused laser beam for sampling of studied material in this work. The beam is possible to focus to the point of define size from 4 to 250  $\mu\text{m}$ . It is the reason, why this method is suitable for studying distribution of the elements on surface of study material. The subject of this work is optimization of method LA-ICP-MS and find out, if this method is useful for study of lateral distribution of monitored metals in examined melanomas.

Then there will be determine the content of metal-binding protein metallothionein in biological samples by differential pulse voltametry of Brdička reaction.



## II. Cíl práce, zadání práce

Hlavním cílem předkládané bakalářské práce je spektrometrická a elektrochemická analýza kryoskopických řezů nodulárních a povrchově se šířících melanomů získaných z miniaturních prasat linie MeLiM s dědičným melanomem. V tkáních byla detekována prostorová distribuce iontů kovů pomocí metody laserové ablace s hmotnostní spektrometrií (LA-ICP-MS). Předmětem této práce je optimalizovat metodu LA-ICP-MS a zjistit, zda je tato metoda použitelná pro studium laterálního rozdělení sledovaných kovů ve zkoumaných melanomech. Dále byl stanoven obsah kov-vázajícího proteinu metalothioneinu. Hladina proteinu metalothioneinu byly stanovena pomocí diferenční pulzní voltametrie Brdičkovy reakce.

### III. ÚVOD

Nádorová onemocnění jsou skupinou chorob, které lidstvo postihují od nepaměti. V posledních letech se ale stávají oblastí více a více diskutovanou, prozkoumávanou a v neposlední řadě také obávanou, ať už v kruzích odborníků či laické veřejnosti. Hlavním důvodem je stále stoupající incidence (výskyt případů onemocnění za určitou dobu<sup>1</sup>) a prevalence (počet nemocných osob k určitému datu na 1000 osob<sup>1</sup>) těchto onemocnění. Je to jakási daň za prodlužování života a potlačování zánětlivých chorob. Po kardiovaskulárních onemocněních jsou kancerózy druhou nejčastější příčinou úmrtí v ČR.

Definice nádorových onemocnění říká, že „jsou to onemocnění charakteristická nekontrolovatelným růstem a dělením buněk a jejich infiltrací do zdravé tkáně. Mají-li následky této infiltrace negativní až fatální dopad, jedná se o maligní nádorové bujení.<sup>2</sup> Takto „onemocnět“ může prakticky každá tkáň, potažmo orgán v těle - mozek, trávicí ústrojí, vylučovací soustava, ale také krev a v neposlední řadě kůže. Kožní karcinom nebo také invazivní melanom je „zvlášť maligní kožní nádor typický rychlým šířením a tvorbou metastáz“<sup>2</sup>

V roce 2009 bylo do Národního onkologického registru hlášeno 78 846 nových případů zhoubných novotvarů včetně novotvarů „*in situ*“ (zhoubné nádory, které však ještě nevykazují zhoubný růst<sup>2</sup>), z toho 40 903 případů u mužů a 37 943 u žen.<sup>3</sup>

Nejčastěji diagnostikovaným onkologickým onemocněním je „jiný zhoubný novotvar kůže.“ (dg. C44). V roce 2009 bylo hlášeno celkem 19 138 těchto nádorů, což představovalo cca 24 % všech hlášených případů zhoubných nádorů v tomto roce.<sup>3</sup> Pravý zhoubný melanom kůže (dg C 43) je typ onemocnění, jehož výskyt se za posledních 25 let značně navršil. V porovnání s rokem 1970 s léty do roku 2002, došlo k nárůstu výskytu této diagnózy u pacientů až 5x - u mužů i žen. Úmrtnost na toto onemocnění nemá takový vzestup jako incidence, nicméně je stále velmi důležité do podvědomí lidí zapracovat fakt, že jde o velmi závažné onemocnění, kterému je nutné v nejvyšší možné míře předcházet – minimalizovat pobyt na ostrém slunci či umělém UV záření bez ochranných prostředků.<sup>4</sup>

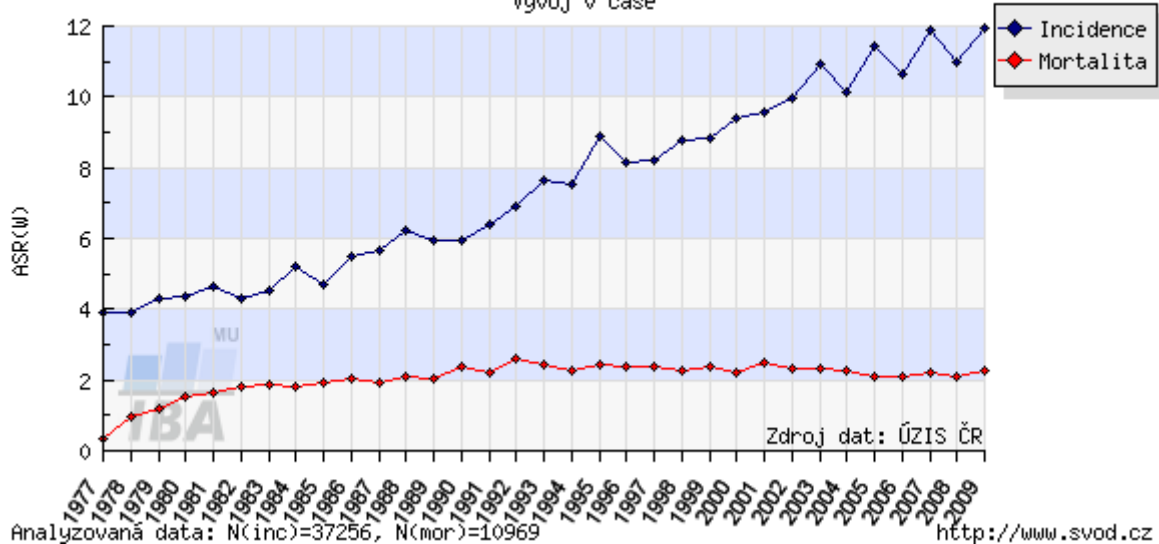
Incidence zhoubného melanomu kůže neustále stoupá a nevyhýbá se téměř žádné věkové kategorii. Tato fakta dokazují graf č. 1 – na kterém můžeme vidět nárůst počtu nemocných na 1000 obyvatel v letech 1977-2009 a také graf č. 2, který ukazuje závislost procentuálního zastoupení případů na věkové kategorii. Nejen to jsou důvody, proč si toto onemocnění zaslouží velkou pozornost v oblasti vědy a výzkumu, za účelem nalézt co nejvhodnější způsob včasného zachytu tohoto onemocnění a prozkoumání návazností a pravidel chování nádorových buněk. To vše pro získání co nejpřesnější

představy o prognostickém vývoji takovéto choroby – tvorba metastáz, riziko úmrtí apod.

**Graf č. 1: Vývoj incidence zhoubného melanomu kůže v čase<sup>5</sup>**

**C43 - Zhoubný melanom kůže**

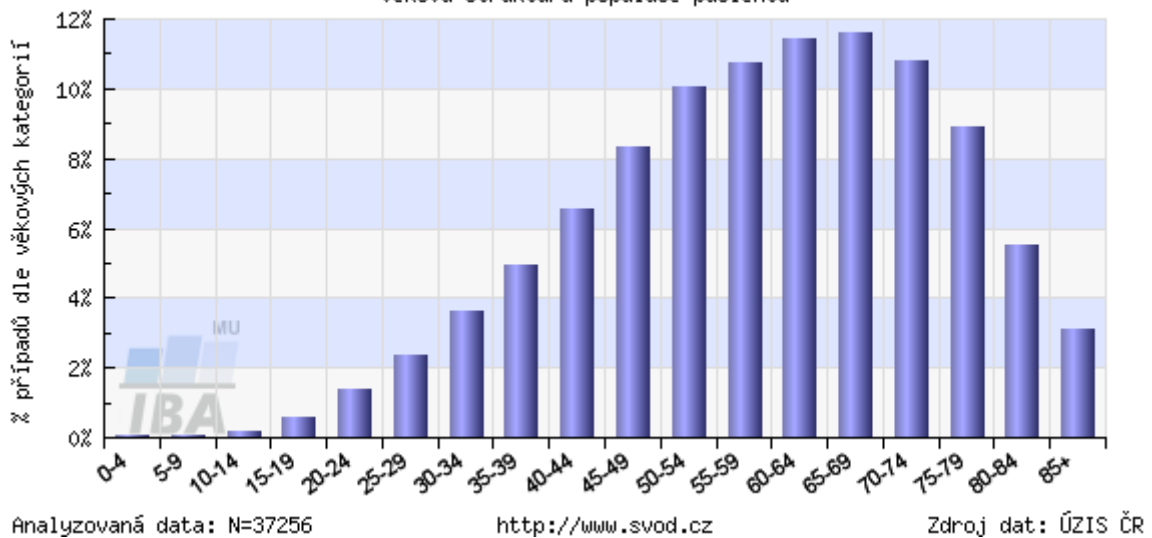
Vývoj v čase



**Graf č. 2: Věková struktura pacientů se zhoubným melanomen kůže<sup>5</sup>**

**C43 - Zhoubný melanom kůže - Incidence**

věková struktura populace pacientů



## IV. Teoretická část

### 1. Vznik a růst rakovinných buněk

Proliferace nádorových buněk je vlastně porucha regulace obnovy odumřelých buněk. Důvodem je fakt, že buňky nereagují na kontrolní mechanismy, které za normální situace nastavují rovnováhu mezi odumíráním a vznikem nových buněk a dochází tak k nekontrolovanému množení buněk. Látky, které za toto zodpovídají, se nazývají růstové faktory – peptidy. Nádorové buňky si své růstové faktory umí produkovat sami. Dělení buněk je naopak potlačováno tzv. chalony – peptidy či glykoproteiny produkované příslušnou tkání.<sup>6</sup>

Klinický obraz jednotlivých nádorových onemocnění je různý, společným rysem ale bývá výrazný úbytek hmotnosti. Příčinou je absence regulace růstu buněk bez přísunu proteinů. Zatím co normální tkáň při nedostatku proteinů dále nerostou, nádorové buňky v takovém případě jako zdroj využívají proteiny těla a dále rostou. Důkazem může být negativní dusíková bilance nemocných, kterou způsobuje vysoký obrat proteinů v nádorech a četné nekrózy v jejich špatně prokrvených oblastech.<sup>6</sup>

### 2. Stopové prvky

Organismus je složitý systém chemických látek a jejich vzájemných interakcí, jejichž cílem je organismus ochránit, připravit na ohrožující situace a také zajistit přežití pokud možno za jakýchkoliv podmínek.

Součástí tohoto systému jsou látky makromolekulární, jako tuky, složité cukry a bílkoviny, které více či méně zajišťují potřebné zdroje energie pro správnou funkci mozku a jiných životně důležitých orgánů, neméně důležitou roli ovšem v organismu hrají i látky, jejichž koncentrace v organismu se pohybuje ve velice nízkých koncentracích a přesto je jejich úloha a funkce nezastupitelná. Příkladem takových látek jsou stopové prvky, které zajišťují správné fungování všech buněk v našem organismu, konkrétně jejich metabolismus a homeostázu.<sup>7</sup>

Jedná se o prvky, jejichž koncentrace v organismu nepřesahuje 50 mg/kg, většinou se jedná o kovy (kromě jódu a fluoru). V lidském organismu se mezi takové prvky řadí železo, jód, měď, zinek, kobalt, chrom, molybden, selen, fluor, mangan, nikl, arsen, selen, křemík a vanad.<sup>8</sup>

Stopové prvky se dělí na esenciální a toxické. Esenciální si organismus neumí vyrobit sám a je nutné dodávat je potravou. Toxické jsou přítomny v životním prostředí a jejich akumulace ve tkáních je nežádoucí až fatální.<sup>8</sup>

Důležité je najít takovou analytickou metodu, která by uměla zmapovat rozložení prvků v tenkém řezu tkáně, dala se užít také pro kvantitativní analýzu a zároveň byla univerzální pro široké spektrum prvků. Jako taková se v posledních letech jeví metoda laserové ablace s induktivně vázanou plazmou.<sup>7</sup>

Předmětem experimentální části této bakalářské práce budou prvky železo (Fe), měď (Cu), zinek (Zn) a uhlík (C), přesněji izotopy těchto prvků – <sup>56</sup>Fe, <sup>63</sup>Cu, <sup>66</sup>Zn a <sup>12</sup>C.

### **3. Jmenované prvky a jejich úloha v organismu**

#### **3.1 Železo (Fe)**

Jedná se o nejhojnější kovový prvek na zemi, ale pouze malé množství železa je biologicky dostupné pro plnění důležitých funkcí jako přenos kyslíku a řadu oxidoredukčních dějů ve tkáních. V organismu je železo jak součástí proteinů (hemoglobin, myoglobin) tak součástí enzymů (cytochromy, enzymy syntézy DNA či Krebsova cyklu). Fe přijaté potravou je žaludečními kyselinami převedeno do rozpustné formy a vstřebáváno ve střevě. Mn, Zn a Cu mají se železem stejný transportní mechanismus, což vede k tomu, že při vzestupu koncentrace některého z těchto prvků ve střevě dochází k omezení transportu a resorpci prvků ostatních. Ve vysokých koncentracích působí železo toxicky a ukládá se v orgánech jako játra, slinivka, myokard a kůže. Způsobuje tím jaterní cirhózu, fibrózu pankreatu, kardiomiopatii apod. Při nedostatku Fe v organismu se dostavuje únava, snižuje fyzická kondice a zvyšuje hladina kyseliny mléčné ve svalech. Dále se při přetrvávajícím nedostatku rozvíjí hypochromní anémie a neurologické poruchy.<sup>8</sup>

### 3.2 Měď (Cu)

Tento kov v organismu působí jako kofaktor řady metaloenzymů a složka důležitých proteinů. Po Zn a Fe je měď třetím nejhojnějším esenciálním stopovým prvkem v lidském organismu. Enzymů, ve kterých je měď obsažena je celá řada, např. cytochrom-c-oxidáza, superoxid-dismutáza, histamináza.<sup>8</sup>

Mezi proteiny obsahující měď patří metalothionein (o jeho funkci bude pojednáno dále), albumin, krevní srážecí faktor V a další. Role Cu v organismu tedy souvisí právě s enzymy a proteiny, ve kterých je obsažena – oxidačně redukční reakce, syntéza melaninu a kolagenu, transport železa, ale také role v termoregulaci a ovlivnění imunitních funkcí.<sup>8</sup>

Vysoký příjem vitamínu C, Fe a Zn ovlivňují resorpci mědi v organismu – v případě resorpce pomocí metalothioneinu se jedná o soutěžení o vazebné místo s Zn a Cd. Nedostatek mědi v organismu nebývá příliš častý, ale když už k němu dojde, projevuje se především anémií, projevy osteoporózy, sníženou tvorbou myelinu v nervové tkáni, poruchami pigmentace atd. Hladina mědi a jeho proteinu ceruloplazminu klesá při poruchách metabolismu bílkovin - bílkovinná malnutrice či jaterní insuficience v oblasti proteosyntézy. Volná měď je toxická, ukládá se v játrech, mozkových buňkách a renálních tubulech. Mezi příznaky intoxikace patří gastroenteritida, jaterní cirhóza, renální selhání, neurologické poruchy atd.<sup>8</sup>

### 3.3 Zinek (Zn)

Tento stopový prvek je nezbytný pro růst a reprodukci. Je kofaktorem více než 200 metaloproteinů, souvisí s antioxidačními reakcemi organismu – jako součást enzymu superoxid-dismutázy stabilizuje buněčné membrány, snižuje toxický účinek olova a kadmia, je potřebný pro syntézu nukleových kyselin – jeho deficit postihuje enzymy jejich syntézy a tím ovlivňuje rychlost buněčného dělení, růstu a regenerace. Dále je důležitý pro udržení správné funkce a celistvosti kůže. Ke vstřebávání zinku dochází v tenkém střevě, kde je vázán na metalothionein a transportován do krevního oběhu - vysoký obsah Zn vyvolává syntézu metalothioneinu.<sup>8</sup>

Mezi projevy nedostatku Zn v organismu patří kožní poškození – erytém, puchýře, ale také vypadávání vlasů apod. a dále také narušení imunity, psychosomatické poruchy, poruchy metabolismu kostí, poruchy vývoje pohlavních orgánů atd.<sup>8</sup>

### 3.4 Uhlík (C)

Uhlík je jeden ze čtyř prvků (dále vodík, dusík a kyslík), který tvoří lidský organismus z 96%. Jeho vnitřní struktura (čtyři volná vazebná místa) mu umožňuje tvořit dlouhé řetězce, které se stávají základní stavební jednotkou téměř všech sloučenin v organismu.<sup>9</sup>

Uhlík nám při studiu prostorového uložení těchto prvků v tenkých histologických řezech poslouží jako jakýsi indikátor tvaru řezu – vzhledem k jeho převážnému zastoupení v organické tkáni nám poskytne představu o vzhledu preparátu, se kterým bude možné porovnat výsledné zobrazení rozložení výše zmíněných izotopů.

## 4. Metalothionein, jeho úloha v organismu a stanovení

Důležitou bílkovinou pro transport stopových prvků, zejména zinku a mědi, je metalothionein (MT).

Tento protein byl objeven v roce 1957 v ledvinách koně a později byl prokázán i u jiných živočichů, ale i u hub a kvasinek. Dále byla jeho přítomnost prokázána i ve tkáních jako játra, slezina apod. a většinou v souvislosti s ukládáním těžkých kovů v těchto tkáních. Původně byla za funkci tohoto proteinu v organismu považována ochrana buněk před oxidativním stresem, který může být vyvolán například rentgenovým zářením či UV zářením a před volnými kyslíkovými radikály, které je nutné v takové situaci z buňky odstranit, protože by mohly způsobit její poškození. Proto jsou syntetizovány tzv. antioxidanty, které jsou volnými radikály oxidovány místo buněčných komponent. Jedním takovým je i MT či glutathion, kteří jsou za určitých situací schopni sami se oxidovat či redukovat. MT takto efektivně redukuje hydroxylové radikály, které jsou pro buňku nebezpečné, čímž je indukována jeho exprese buňkou.<sup>10</sup>

To všechno MT může hlavně díky své vnitřní struktuře, kdy je schopen vázat až sedm dvojmocných a dvanáct jednomocných iontů těžkých kovů - nejčastěji  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$ , ale i toxických kovů, jako  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ . Molekuly MT saturované těžkými kovy jsou transportovány do ledvin, kde dochází k jejich vyloučení. Za normálních okolností ovšem vazebná místa MT nejsou saturována.<sup>11</sup>

Mimo jiné další důležité funkce je role MT v organismu spojována také s proliferací nádorových buněk, jejichž metabolismus má za následek zvýšenou produkci MT. Růst nádoru je mimo jiné umožňován působením tzv. matrixových metaloproteináz. Jedná se o zinek-dependentní proteázy, které degradují extracelulární matrix v okolí nádoru a tím umožňují jeho invazi do okolní tkáně.

Bylo zjištěno, že MT aktivuje tyto proteázy a potlačuje sílu imunitní reakce namířené proti nádoru. Tím se podílí na nádorovém bujení a tvorbě metastáz.<sup>11</sup>

#### 4.1 Separace a stanovení MT

Vzhledem k tomu, že MT má malou molekulu, neobsahuje žádné aromatické kyseliny a v nativním stavu ani disulfidické vazby, klade zvláštní požadavky na jeho separaci. K tomu jsou využívány elektroforetické metody jako zonální elektroforéza (CZE) a chromatografické metody, jako gelová chromatografie či vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) – ionexová či na reversní fázi. Nevýhodou je dlouhá doba separace.<sup>10</sup>

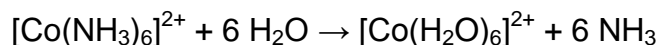
K detekci se užívá především UV protilátek, v některých studiích také hmotnostní detekce metodou time of flight (TOF). Při správně provedené separaci je možné k detekci užít i metodu ICP-MS (viz. níže).<sup>10</sup>

#### 4.2 Brdičkova reakce:

Tato metoda slouží k analýze proteinů, tudíž ji lze užít i ke stanovení MT. Jedná se o elektrochemický princip stanovení hladiny MT, např. u pacientů s poraněním mozku či nádorovým onemocněním.

Profesor Brdička, žák profesora Heyrovského a autor této metody, se zabýval elektrochemickými odezvami látek s použitím polarografie. Autor zkoumal  $\text{Co}^{3+}$  komplexy a jejich reakci na přidání séra. Vzniknou tím katalytické vlny, které jsou zaznamenávány na voltamogramu. Přes to, že je v souvislosti s katalytickými reakcemi v elektrochemii stále mnoho nejasností, u reakce chloridu hexaaminkobaltitého komplexu ( $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ ) s proteinem obsahujícím –SH skupinu, lze popsat následující chemické jevy:

- elektrolytem je amonný pufr o vysokém pH ( $\text{NH}_3 + \text{NH}_4\text{Cl}$ )
- dochází k redukci  $\text{Co}^{3+}$  na  $\text{Co}^{2+}$  za vzniku  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$
- tento hexaaminkobaltnatý ion je hydrolyzován podle reakce:



Redukce kobaltitého iontu na kobaltnatý vytvoří první polarografickou vlnu o potenciálu  $E_p = -0,3 \text{ V}$ .

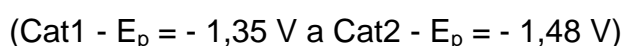
Redukce hexaaquakobaltnatého iontu (produkt reakce výše) probíhá při potenciálu  $-1,2 \text{ V}$  za současného vytvoření druhé polarografické vlny.



Výsledkem redukce  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$  v amonném pufru jsou tedy dvě polarografické vlny o potenciálu přibližně  $E_p = -0,3 \text{ V}$  ( $\text{Co}^{\text{III}} \rightarrow \text{Co}^{\text{II}}$ ) a  $E_p = -1,2 \text{ V}$  ( $\text{Co}^{\text{II}} \rightarrow \text{Co}^0$ ). Vytvoří se tedy 2 signály na voltamogramu.<sup>10</sup>

Po přidání látky obsahující  $-\text{SH}$  skupiny (např. MT) děj ale probíhá jinak – na výsledném voltogramu se objeví signály 4:

- První stejný jako v prvním případě = signál redukce kobaltitého komplexu na kobaltnatý
- Vzniká stabilní komplex  $\text{RS}_2\text{Co}$  podle rovnice  $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+} + \text{R}(\text{SH})_2 \rightarrow \text{RS}_2\text{Co} + 6 \text{ H}_2\text{O} + 2 \text{ H}^+$ , tudíž redukce Co neběží stejně jako v prvním případě, ale podle rovnice  $\text{RS}_2\text{Co} + 2 \text{ e}^- \rightarrow \text{Co}^0 + \text{R}(\text{S}^-)_2$ .  $\text{Co}^0$  je okamžitě protonována  $\text{NH}_4^+$  skupinou a obnovená sloučenina je tak schopna opět vázat hexaaquakobaltnaté ionty.
- Poslední dva signály na voltamogramu jsou katalytické povahy



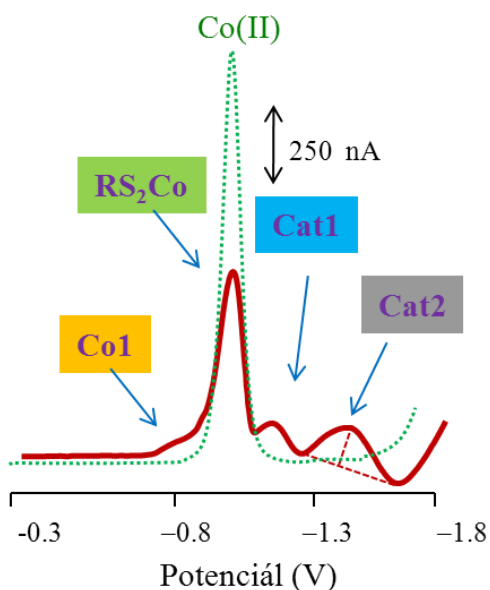
Cat2 je výsledkem redukce  $\text{H}^+$  iontů z reakce mezi  $\text{R}(\text{SH})_2$  a  $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ . Ta probíhá na povrchu elektrody  $\text{R}(\text{SH})_2$  a proto jde o katalýzu vývoje  $\text{H}^+$  z elektrolytu.<sup>10</sup>

Výška tohoto posledního signálu voltamogramu je závislá na koncentraci MT.<sup>10</sup>

Záznam voltamogramu Brdičkovy reakce pro stanovení MT je zobrazen na obrázku č.1.

Jelikož se v případě Brdičkovy reakce jedná o fyzikálně-chemický proces, je nutné udržovat konstantní podmínky reakce (pH elektrolytu, koncentrace amoniaku, teplota apod.). Tím je zajištěna opakovatelnost měření.<sup>10</sup>

Obrázek č. 1: Diferenční pulzní voltamogram Brdičkovy soluce (tečkovaná čára) a metalothioneinu měřeného v prostředí Brdičkovy soluce.



## 5. Laserová ablace s hmotnostní spektrometrií

Laserová ablace v několika minulých letech zaznamenala velký pokrok. Rozvoj a zájem o tuto metodu v analytické chemii stoupá. Důvodem je hlavně variabilita této metody a široké spektrum využití nejen v analytické chemii, ale i v oblastech života, počínaje životním prostředím a konče kriminalistikou.<sup>12</sup>

V analytické chemii se v převážné většině jako vzorky používají roztoky stanovovaných látek, kdy se analyt rozpustí ve vhodném rozpouštědle, roztok se nadávkuje do systému vhodného k potřebné analýze a odezva tohoto systému se následně detekuje na vhodně zvoleném detektoru.

Někdy ovšem převedení vzorku do roztoku představuje problém, jehož řešení není vždy jednoduché – je například nutné použít nebezpečná rozpouštědla nebo proces rozpouštění může trvat hodiny, případně dny. Dalším rizikem je pak možná kontaminace vzorku způsobená manipulací se vzorkem a riziko ztráty těkavých analytů (např. látky organické povahy jako toluen, xylen apod.). Převedení vzorku do roztoku také nemusí být vhodné z důvodu ztráty informace o distribuci analytu ve vzorku, tudíž se hledají metody, které by umožnily zjištění laterální distribuce prvku ve vzorku nebo metody, které by umožňovaly převedení vzorků do analytického systému rovnou, bez nutnosti předchozího rozpouštění a převádění do kapalné fáze. Jako vhodnou metodou se v posledních letech ukazuje metoda LA-ICP-MS, která využívá intenzivních pulzů laserového paprsku k převodu vzorku do nosného plynu. Ten vzniklý

aerosol transportuje do ICP-MS spektrometru a umožní tak stanovení obsahu jednotlivých prvků v tomto vzorku.<sup>12</sup>

Právě díky možnosti transportovat pomocí krátkého laserového paprsku pevné látky je možné jejich přímé stanovení bez předchozího rozpouštění a tím i redukce možného rizika kontaminace, analýza velmi malého množství vzorku a určení prostorového rozložení prvků ve vzorku.<sup>12</sup>

## 5.1 Princip metody

Metoda je založená na „odstranění“ analyzovaného materiálu z povrchu vzorku (ablaci) pomocí pulzů laserového paprsku - laserová ablace (LA). Tento materiál je nosným plynem (nejčastěji héliem) transportován do indukčně vázaného plazmatu (ICP), kde dochází kromě jiného (atomizace, excitace) k jeho ionizaci (alternativa zmlžování u kapalných vzorků). Ionty následně vstupují do hmotnostního spektrometru – mass spectrometry (MS), kde jsou separovány a převáděny dále do detektoru, kde jsou následně detekovány – u ICP zdroje se jedná nejčastěji o kombinaci s kvadrupólovým analyzátozem.<sup>13</sup>

## 5.2 Laserová ablace

Běžně se zařízení pro laserovou ablaci skládá z laseru, ablační cely, transportního systému. Jako nosný plyn, určený k přenosu ablatovaných částic do ICP-MS spektrometru se nejčastěji používá helium.<sup>14</sup>

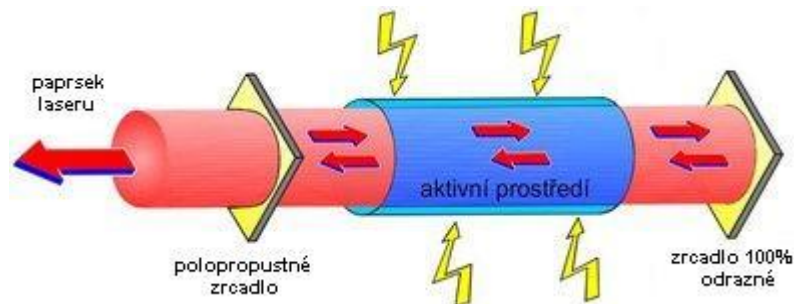
### 5.2.1 LASER

(z anglického Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation)<sup>15</sup>

Obecně lze říct, že laserový paprsek vzniká po zesílení elektromagnetického záření vznikajícího emisí fotonů. Fotony jsou vyzářeny při přechodu prvků, nejčastěji atomů – aktivní prostředí - ze stavu s vyšší energií do stavu s nižší energií. Toto se děje spontánně, jelikož prvky mají vždy snahu nacházet se ve stavu s nejnižší energií. Optickým či elektrickým buzením tento stav porušíme a převedeme elementy do stavu s vyšší energií (excitovaného stavu). Získáme tedy proud fotonů, který pomocí procesu stimulované emise přeměníme na laserový paprsek, přičemž je využíván jakýsi lavinovitý efekt, kdy jeden vyzářený foton převede do excitovaného stavu další element a tím dojde po jeho návratu do nižší energetické hladiny k vyzáření dalšího fotonu. K dalšímu zesílení signálu se používá systému zrcadel, díky kterému je proud fotonů přeměněn na laserový paprsek. Ten je oproti jiným zdrojům světla

unikátní ve 3 základních vlastnostech, což vyplývá z toho, že jak dopadající, tak vyzářený foton mají stejnou frekvenci, stejný směr, polarizaci a fázi. Proto je tedy laserový paprsek takzvaně kolimovaný (nerozbíhá se), monochromatický (má jednu vlnovou délku) a je koherentní (spojitý).<sup>15</sup> Vytvoření laserového paprsku je znázorněno na Obrázku č. 2.

**Obrázek č. 2: schéma laseru; upraveno dle<sup>15</sup>:**



### **Dělení laserů :**

podle typu aktivního prostředí:

- plynové lasery – aktivním prostředím je plyn, např. směs HeNe (helium neonový) nebo CO<sub>2</sub> laser
- pevnolátkové lasery – aktivním prostředím je pevná látka, nejčastěji monokrystal, představitelem je Nd:YAG, jehož aktivním prostředím je monokrystal yttrito-hlinitého granátu dopovaný atomy neodymu
- vláknové lasery – aktivním prostředím je optické vlákno dopované atomy erbia nebo yterbia
- diodové lasery – aktivním prostředím je elektricky buzená polovodičová dioda
- chemické lasery – buzeny chemickou reakcí
- excimerové lasery – třída plynových laserů, aktivním prvkem je tzv. excimer = molekula jejíž jedna složka je v excitovaném stavu
- barvivové lasery – aktivním prostředím je organické barvivo

další možné dělení laserů podle typu výstupního svazku:

- kontinuální – generuje souvislý výstupní výkon
- pulsní – generuje laserové pulsy<sup>15</sup>

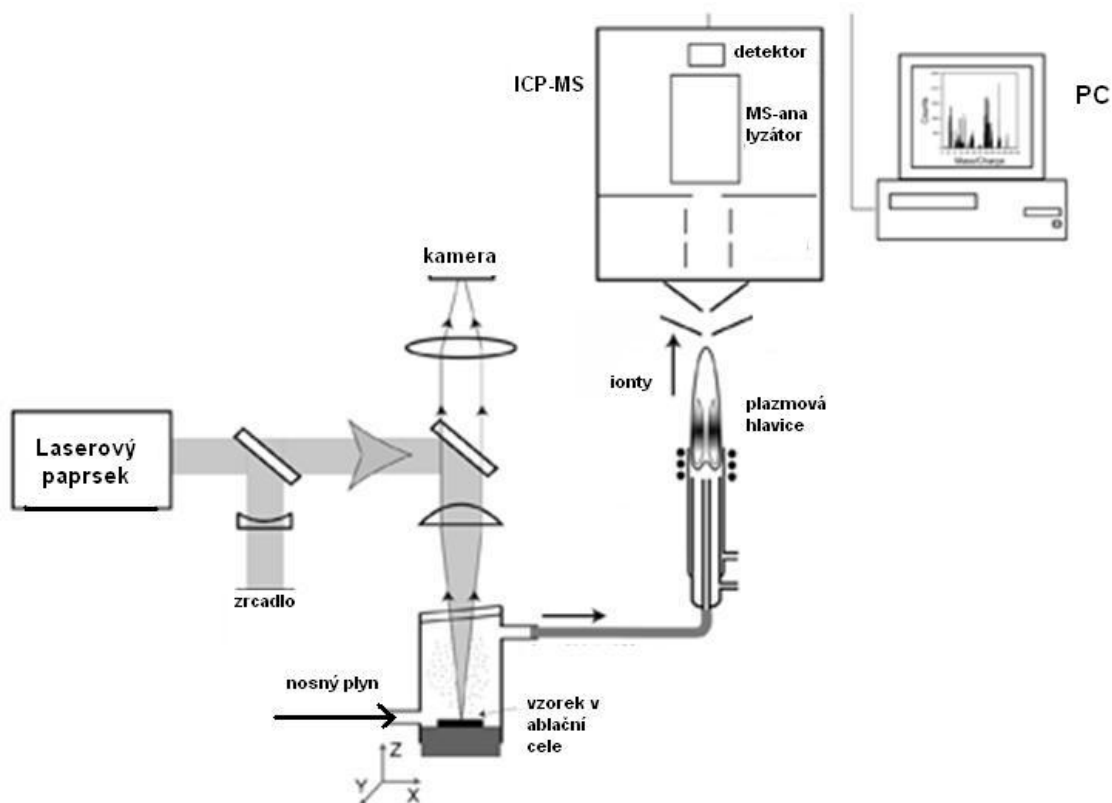
Pro laserovou ablací je nejčastěji využíván Nd:YAG nebo excimerový laser, z nichž první jmenovaný je využíván pro svou relativně nízkou cenu, pro snadné zabudování do malých ablačních systémů a pro nenáročnou údržbu.<sup>12</sup>

U ablace hraje významnou roli vlnová délka laserového paprsku. Čím je jeho vlnová délka kratší, tím je ablace rychlejší a tím menší částice vzorku jsou ablatovány. Kratší vlnová délka laseru poskytuje vyšší energii fotonů pro efektivní ionizaci pevných vzorků.<sup>12</sup>

U Nd:YAG laseru je základní vlnová délka emitovaného záření 1064 nm. Pomocí krystalů je pak možné dosáhnout u tohoto laseru i vlnových délek 532, 355, 266 a 213 nm. U excimerových laserů je pro vlnovou délku rozhodující operační plyn. Užitím XeCl, KrF, ArF, nebo F<sub>2</sub> lze dosáhnout vlnových délek 308, 248, 193 a 157 nm<sup>12</sup>. Na vlnové délce také závisí, bude-li ablace probíhat tepelným nebo netepelným mechanismem. Elektrony absorbují tepelnou energii dodanou laserem a přenesou tuto energii do atomové mřížky. Dojde tak k tání a vypařování vzorku. Vzhledem k tomu ale, že různé látky mají různou teplotu vypařování, může teplotní mechanismus způsobit příliš silnou frakcionaci vzorku.<sup>12</sup>

## 5.2.2 LASEROVÁ ABLACE – frakcionace a transport

Obrázek č.3: schéma LA-ICP-MS analyzátoru; upraveno dle<sup>16</sup>



Na obrázku č 3 vidíme kompletní schéma LA-ICP-MS analyzátoru. V dolní části se nachází ablační cela, ze které je vzorek transportován laserovým impulzem do proudu nosného plynu. Ten vzorek přenesení do ICP-MS analyzátoru – v horní části obrázku. Záznam detektoru je zapisován v počítači. Pro přehled o pozici a stavu vzorku je nad ablační celou umístěna kamera. Jednotlivé části jsou podrobně popsány níže.

Pojem „laserová ablace“ vyjadřuje interakci laserového paprsku se zkoumaným materiálem. Dochází k přenosu zářivé energie paprsku na vzorek, což vede k odpaření materiálu, odštěpení atomů, iontů, molekul a fragmentů molekul z povrchu vzorku, současně za vzniku rázové vlny a vytvoření a expanze laserového mikroplazmatu. Největší vliv na tyto procesy mají hustota zářivého toku laserového paprsku a tepelné a optické vlastnosti vzorku. Odpařený materiál je transportován nosným plynem do budícího zdroje – nejčastěji ICP.<sup>17</sup>

Velikost částic, transportovaných do ICP analyzátoru se pohybuje v rozmezí od 5nm do 10  $\mu\text{m}$ . Částce menší než 5 nm mohou být usazeny na

stěnách ablační cely, částice větší než 3  $\mu\text{m}$  mohou zůstat v transportním potrubí např. vlivem gravitace. Částice mezi těmito hranicemi jsou transportovány s účinností větší než 80%.<sup>18</sup>

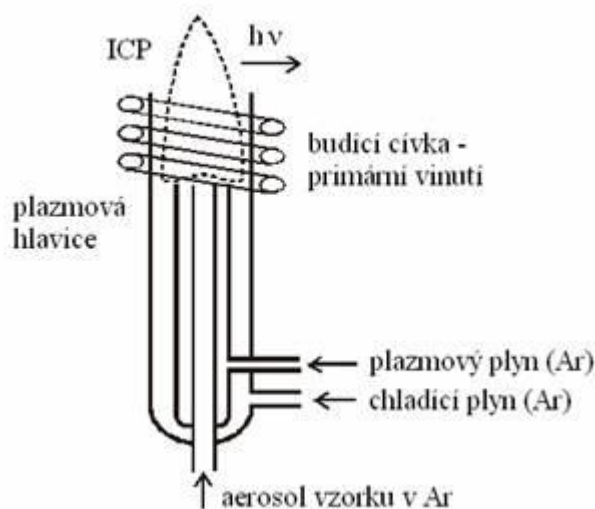
Při ablaci, transportu do budícího zdroje, či přímo v ICP může docházet k tzv. frakcionaci, jejímž důsledkem je odlišné složení analyzovaného mikroplazmatu a průměrné složení vzorku. Frakcionace závisí na složení vzorku, chemické formě prvku a na přítomné matici. Byly prováděny pokusy, spojující frakcionaci s bodem tání a bodem varu prvků, ale také s poloměrem atomů a iontů.<sup>19, 20</sup> Dále je frakcionace ovlivněna vlastnostmi laseru (plošná hustota výkonu, délka pulsu, vlnová délka).<sup>17</sup> Právě u vlnové délky laserového paprsku bylo zjištěno, že vlnové délky UV laserů způsobují frakcionaci v menší míře než IR lasery.<sup>21</sup> Dalším faktorem ovlivňujícím frakcionaci je velikost a tvar kráteru po dopadu laserového paprsku. Jeho geometrie se po určitém počtu pulzů mění – dochází ke zvětšování povrchu stěn kráteru, sníženému ozáření na stěnách a ke zvýšené frakcionaci.<sup>22</sup>

### 5.2.3 ICP- MS

ICP se jeví jako velmi vhodný iontový zdroj hlavně proto, že pracuje za atmosférického tlaku a měl by zajišťovat kompletní disociaci a ionizaci vzorku s vysokým výtěžkem jednonásobně nabitých iontů a minimálním podílem molekulárních fragmentů a vícenásobně nabitých iontů.<sup>14</sup>

*Plazmová hlavice* slouží k tvorbě argonového plazmatu a je tvořena dvěma soustřednými křemennými trubicemi. Aerosol vzorku je přiváděn do křemenného injektoru. Vnější i vnitřní trubicí proudí argon, který slouží jako hlavní zdroj pro plasma zároveň chrání hrot injektoru před horkým plazmatem. Další důležitou součástí systému je indukční cívka, jež vytváří vysokofrekvenční elektromagnetické pole (40 Mhz). Tato energie je přenášena do plazmatu ve formě příkonu v rozmezí 700-1500 W. Proud argonu vytváří plazmový útvar tvaru prstence, jehož středem prochází ve směru osy proud nosného plynu s ablatovaným materiálem. Tento proud proráží ve středu prstence tzv. analytický kanál, jehož teplota se pohybuje okolo 5000 K a kde se také nachází většina atomu a iontů vzorku.<sup>14</sup> Schéma plazmové hlavice je znázorněno na obrázku č.4.

Obrázek č.4: schéma plasmové hlavice<sup>23</sup>



#### Odběr iontů:

Ionty vzorku jsou odebírány z analytického kanálu pomocí dvou kónusů, které oddělují atmosférickou část od evakuované části hmotnostního spektrometru. Tlak uvnitř spektrometru dosahuje až  $10^{-4}$  Pa. Kónusy jsou nejčastěji vyráběny z niklu pro jeho dobré elektricky a tepelně vodivé vlastnosti.<sup>14</sup>

K usměrnění prošlého paprsků iontů slouží tzv. *iontová optika*, která paprsek navádí do iontového analyzátoru. Iontová optika se skládá z tzv. fotonové zarážky a systému iontových čoček. Fotonová zarážka je v systému umístěna, aby zabránila dopadu fotonů a neutrálních částic na detektor a iontové čočky elektrickým polem elektrod, ze kterých jsou tvořeny, vychyluje dráhu iontů a do iontového analyzátoru přivádí pouze ionty s úzkým rozdělením kinetické energie. „Potenciál iontové čočky ovlivňuje citlivost stanovení a měl by být optimalizován pro každou skupinu analytů s podobnou atomovou hmotností.“<sup>14</sup>

K separaci iontů v námi užitém hmotnostním spektrometru slouží *kvadrupólový analyzátor*. Jedná se o čtveřici kovových elektrod s eliptickým průřezem (v ideálním případě), na které je přiváděno střídavé a stejnosměrné napětí. Ionty určené k separaci vstupují z iontové optiky mezi tyto tyče. K separaci iontů dochází na základě rozdílného poměru hmotnosti a náboje  $m/z$ . Ionty při průletu kmitají mezi tyčemi. Volbou vhodné velikosti střídavého napětí projdou analyzátozem pouze ionty s vhodným poměrem  $m/z$ . Ostatní ionty se při styku s některou z tyčí vybijí a analyzátozem tudíž neprojdou. Běžná

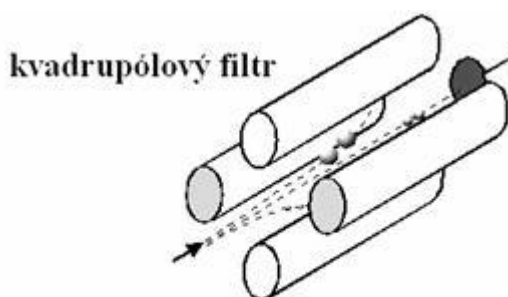


doba měření na kvadrupólovém analyzátoru je pro kvantitativní analýzu pohybuje okolo desítek až stovek milisekund.<sup>14</sup>

K detekci prošlých iontů se často používají elektronové násobiče. Dopadající iont vyrazí z první elektrody jeden nebo více sekundárních elektronů, jejichž počet je dále násoben v systému dynod s klesajícím potenciálem. Výsledkem může být pulz obsahující až  $10^8$  elektronů. Tento pulz je zachycen, digitalizován a vyhodnocen. Dynamický rozsah detektoru je možné zvýšit například pomocí iontové optiky, pomocí které dochází k rozdělení proudu detekovaných iontů a do detektoru pak přejde jen jeho určitá část. „Druhá možnost spočívá ve snížení zesílení detektoru snížením napětí na násobiči. Detektor potom z pulzního režimu přechází do analogového a je měřen celkový procházející proud. Dynamický rozsah takového detektoru, který automaticky přepíná mezi pulzním a analogovým režimem, je osm až devět řádů.“<sup>14</sup> Tento způsob je používanější.

Schéma kvadrupólového analyzátoru ukazuje obrázek č .5.

**Obrázek č.5: schéma kvadrupólového filtru<sup>23</sup>**



### 5.3 Příklady použití LA-ICP-MS

Jak již bylo zmíněno v úvodu, tato metoda je pro svoji vysokou citlivost a snadnou přípravu vzorků užitečná v mnoha vědních odvětvích a oborech.

Kromě životního prostředí, kdy lze pomocí LA-ICP-MS sledovat vývoj znečištění prostředí analýzou vzorků jako dřevo stromů nebo mořských mušlí a lastur, geologii, která tuto metodu využívá k datování různých časových období, archeologii, kde LA-ICP-MS pomáhá např. k určení stáří různých nálezů a dalších vědních disciplín, je LA-ICP-MS využívána k analýze

biologických vzorků, jako například analýza mozkové tkáně jak zvířecí tak lidské.<sup>12</sup>

Jsou známi případy, kdy byla LA-ICP-MS využita ke stanovení prostorového uspořádání prvků v tenkých řezech lidského mozku, lidských vlasů či nehtů. Dále je známo, že tato metoda byla použita k určení multielementárního profilu lidských zubů.<sup>13</sup>

Existují také celkem unikátní způsoby využití LA-ICP-MS, kdy je tato metoda propojena s gelovou elektroforézou za účelem stanovení kov-vázajících proteinů lidského séra.<sup>13</sup> První, kteří toto spojení popsali, byli Nielsen a kol.<sup>24</sup> Ti použili lidské sérum s přídatkem kobaltu a zmapovali a kvantifikovali rozložení metaloproteinů v tomto vzorku.<sup>13</sup>

Dalším příkladem může být stanovování zinku, mědi a olova ve třech odlišných oblastech lidského mozku<sup>7</sup> nebo zmapování rozložení prvků jako P, S, Fe, Cu, Zn, a C v tenkých řezech mozkových nádorů u pokusných krys.<sup>25</sup>

V případě mé práce půjde o studium povrchového rozložení izotopů <sup>56</sup>Fe, <sup>63</sup>Cu a <sup>66</sup>Zn v maligních melanomech miniaturních prasat.

# V. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 6. Materiály a metody

### 6.1 Miniaturní prasata linie MeLim

Histologické řezy maligních melanomů byly připraveny z experimentálního živočišného modelu –miniprasat linie MeLim. Tato prasata jsou chována na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky akademie věd České republiky v Libechově. V roce 1967 bylo z USA dovezeno 5 kusů prasat plemena Hormel, která byla následně křížena s několika dalšími plemeny – Landrasa, Large White, Cornwall, Vietnamské prase a miniaturní prasegottingského původu. – původně za účelem zkoumání prasečích krevních skupin. Výsledkem křížení bylo několik černých selat s melaniny v heterogenní populaci.<sup>26</sup>

### 6.2 Řezy nádorů – použité vzorky

Z kožních melanomů miniprasat byly rovněž na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky akademie věd České republiky v Libechově zhotoveny histologické řezy tenké 30  $\mu\text{m}$ , zalité do parafínu a nanesené na podložní sklíčko. Takovéto preparáty nám byly poskytnuty k dispozici a při měření přímo vkládány do ablační cely analyzátoru LA-ICP-MS, kde byly podrobeny laserové ablací.

Jednalo se o vzorky:

- kůže
- nádoru v progresi
- výrazně nodulárního nádoru  
pozn.: nodulární nádor = nádor rostoucí ve formě uzliny

Před ablací jsme z každého vzorku zhotovili fotografii, která posléze poslouží k lepší představě o prostorovém rozložení jednotlivých prvků na povrchu řezu nádorů.

### 6.3 LA – ICP – MS

Samotné měření jsme prováděli na kvadrupólovém ICP-MS spektrometru Agilent 7500CE (Agilent, Japonsko), který je vybaven kolizní celou pro potlačování polyatomických interferencí. K laserové ablaci slouží laserový ablační systém UP213 (New Wave, USA), pracující s vlnovou délkou laserového záření 213 nm.

**Obrázek č 6: laserový ablační systém a ICP-MS spektrometr**



Podmínky LA-ICP-MS jsme před analýzou reálných vzorků optimalizovali s ohledem na několik parametrů - na maximální poměr signál/šum a minimalizaci ablace podložního materiálu pod nádozem. Proto jsme optimalizovali velikost laserového paprsku, frekvenci laserového záření a jeho hustotu zářivé energie. Pro zajištění dostatečného laterálního rozlišení jsme optimalizovali velikost laserového paprsku a rychlost posunu vzorku během laserové ablace. Ostatní podmínky laserové ablace a parametry ICP-MS spektrometru jsme převzali ze standardně prováděných LA-ICP-MS analýz na Ústavu chemie PŘF MU. Všechny tyto parametry jsou shrnuty v Tabulce č. 1.

**Tabulka č. 1: Přehled optimálních parametrů pro LA-ICP-MS**

Parametr	Hodnota
Průměr laserového paprsku	100 $\mu\text{m}$
Frekvence laserového záření	10 Hz
Hustota zářivé energie	5 J.cm <sup>-2</sup>
Rychlost posunu vzorku během ablace	100 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
Nosný plyn a jeho průtok	He; 1,0 l.min <sup>-1</sup>
Příkon do plazmatu	1500 W

#### **6.4 Zpracování získaných dat - Program Laser Ablation Tool**

Z ablace jednotlivých vzorků byly počítačem zaznamenány intenzity signálů jako odpověď na prostorové rozložení jednotlivých analyzovaných izotopů v histologických vzorcích.

Tato data jsem zpracovala v počítačovém programu Laser Ablation Tool, jehož autorem je Dr. Lenka Vysloužilová z ČVUT v Praze. Tento program zpracovává intenzity jednotlivých signálů z analyzátoru do plošného grafu – mapy, která nám poskytne představu o rozložení obsahu konkrétního prvku v řezu nádorem.

#### **6.5 Brdičkova reakce**

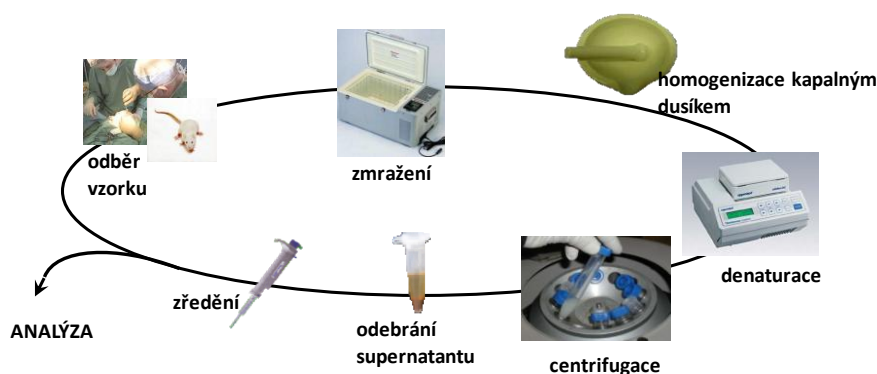
Stanovení metalothioneinu diferenční pulzní voltametrií Brdičkovou reakcí (viz. výše) bylo provedeno v Laboratoři metalomiky a nanotechnologií na ústavu chemie a biochemie Mendelovy univerzity v Brně.

Tato metoda se jeví jako jedna z nejcitlivějších pro stanovení MT v klinických vzorcích melanomových buněk, tkání zvířat či v séru pacientů s maligním melanomem.<sup>22</sup> Výsledky tohoto měření jsou uvedeny v části Výsledky a diskuze.

### 6.5.1 Příprava vzorku pro elektrochemické a chromatografické analýzy

Homogenizované vzorky o objemu 100  $\mu\text{l}$  byly denaturovány 15 min. při 99°C v termobloku (Eppendorf 5430). Zde se využívá termostability MT, což je vlastnost, kdy dojde k zdenaturování termolabilních proteinů a MT zůstává nezdenaturovaný v supernatantu. Vzniklá směs byla ochlazena na 4°C a centrifugována při 4°C, 16 400 x g po dobu 15 min. (Eppendorf 5402, USA). Po oddělení supernatantu od sedimentu byly vzorky 100× zředěny a analyzovány diferenční pulzní voltametří (DPV). Množství analyzovaného vzorku bylo 5  $\mu\text{l}$ . Názorné schéma procesu přípravy vzorku můžete vidět na Obr. 7.

Obrázek č. 7: Příprava vzorku pro detekci MT



### 6.5.2 Stanovení MT

Elektrochemické měření bylo prováděno s 747 VA Stand zařízením spojeném s 746 VA Trace analyzer a 695 Autosampler (Metrohm) v klasickém tříelektrodovém zapojení. Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky 0,4  $\text{mm}^2$ ; referentní elektrodou byla Ag/AgCl/3M KCl a pomocnou grafitová elektroda. Základní elektrolyt (1  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$  a 1 mM amonný pufr;  $\text{NH}_3(\text{aq}) + \text{NH}_4\text{Cl}$  (Sigma Aldrich, ACS), pH = 9,6) byl po každých 5 analýzách automaticky vyměněn. Parametry Brdičkovy reakce byly následující: čas akumulace 240 s, počáteční potenciál – 0,6 V, konečný potenciál –1,6 V, modulační čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, potenciálový krok 1 mV/s, modulační amplituda 250 mV,  $E_{\text{ads}} = 0$  V, teplota 4 °C udržovaná pomocí termostatu JULABO F12/ED (Labortechnik GmbH). Analyzované vzorky byly zbaveny kyslíku pomocí aktivního probublávání argonu o čistotě 99,999%. Na odečítání dat byl použit program GPES 4.9 od EcoChemie.

## 7. Výsledky a diskuze

Hlavním cílem předkládané bakalářské práce je spektrometrická a elektrochemická analýza kryoskopických řezů nodulárních a povrchově se šířících melanomů získaných z miniaturních prasat linie MeLiM s dědičným melanomem. V tkáních byla detekována prostorová distribuce iontů kovů pomocí metody laserové ablace s hmotnostní spektrometrií (LA-ICP-MS). Předmětem této práce je optimalizovat metodu LA-ICP-MS a zjistit, zda je tato metoda použitelná pro studium laterálního rozdělení sledovaných kovů ve zkoumaných melanomech. Dále byl stanoven obsah kov-vázacího proteinu metalothioneinu. Hladina proteinu metalothioneinu byly stanoveny pomocí diferenční pulzní voltametrie Brdičkovy reakce.

V této kapitole jsou zobrazeny fotografie a výsledné mapy jednotlivých vzorků s příslušnými komentáři a dále výsledky stanovení MT.

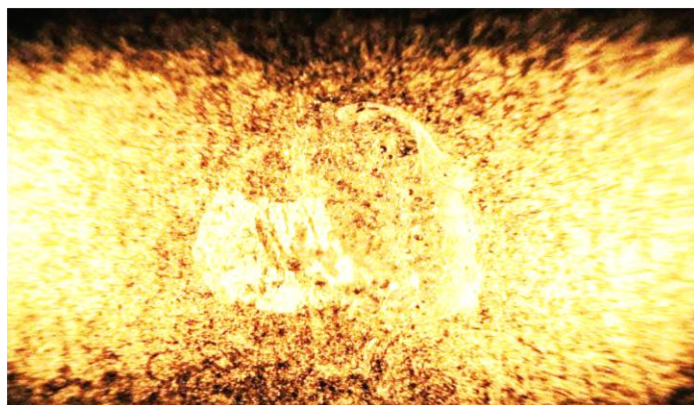
Každou vytvořenou mapu je možné porovnat s barevnou škálou, umístěnou vlevo. Ta vyjadřuje intenzity jednotlivých signálů stanovovaných prvků.

Z námi dostupných výsledků a studií lze konstatovat, že proces vzniku tumoru a jeho rozvoje je proces, který v sobě zahrnuje velké množství na sebe navazujících biochemických přeměn, které se mohou pro každý typ nádorového onemocnění lišit. Proto se dnes hledají společné znaky vzniku a rozvoje tohoto onemocnění, mezi které patří mechanismy spouštění programované buněčné smrti, opakovaného dělení a schopnosti metastazovat. Všechny zmíněné procesy jsou závislé na přítomnosti proteinů, z nichž řada obsahuje ionty kovů. Metalomika nádorových onemocnění je novým směrem studia tohoto onemocnění, které by mohlo přinést odpovědi na otázky samotného vzniku a rozvoje tumoru. Proto jsme se v této práci zaměřili na sledování obsahu třech kovů a to železa, mědi a zinku v melanomu, které jsou esenciální pro buněčný cyklus.

## 7.1 Laterální rozložení prvků ve zdravé kůži a v jednotlivých typech nádorů

### 7.1.1 Kůže

Obrázek č 8: fotografie řezu kůží



Na fotografii vidíme řez vzorkem kůže před podrobením laserové ablaci a následné ICP-MS analýze.

U toho vzorku jsme ablaci provedli pouze na polovině preparátu. Důvodem byl fakt, že prostorově rozsáhlé vzorky (tento patřil mezi větší preparáty) nemohou být analyzovány v celku vzhledem k časové náročnosti. Vzhledem k morfologické homogenitě vzorku jsme pro poskytnutí představy o prostorovém rozložení stanovovaných izotopů ve vzorku zdravé kůže analyzovali reprezentativní část vzorku.

Na fotografii můžeme vidět preparát celý, jednotlivé mapy (obr. 9-12) ale reprezentují spodní polovinu vzorku.

Na obrázku č. 9 vidíme část řezu zdravou kůží jako výsledek LA-ICP-MS analýzy. Nahromadění uhlíku  $^{12}\text{C}$  v pravé části obrázku odpovídá rozložení tkáně na podložním sklíčku a koresponduje s povahou zkoumané tkáně. Světlá místa vyjadřují ty části řezu, kde tkáň není tak hojně obsažená.

Na mapě rozložení  $^{56}\text{Fe}$  (obr. 10) je patrné, že železo se ve zdravé kůži v podstatě téměř nevyskytuje. Ojedinelá tmavá místa vyjadřující místně zvýšenou koncentraci tohoto prvku, které se vyskytují na spodní části řezu, kde se již vyskytuje hypodermis, souvisí s přítomností buněk podkožního vaziva, které mohou místně obsahovat zvýšené obsahy železa.

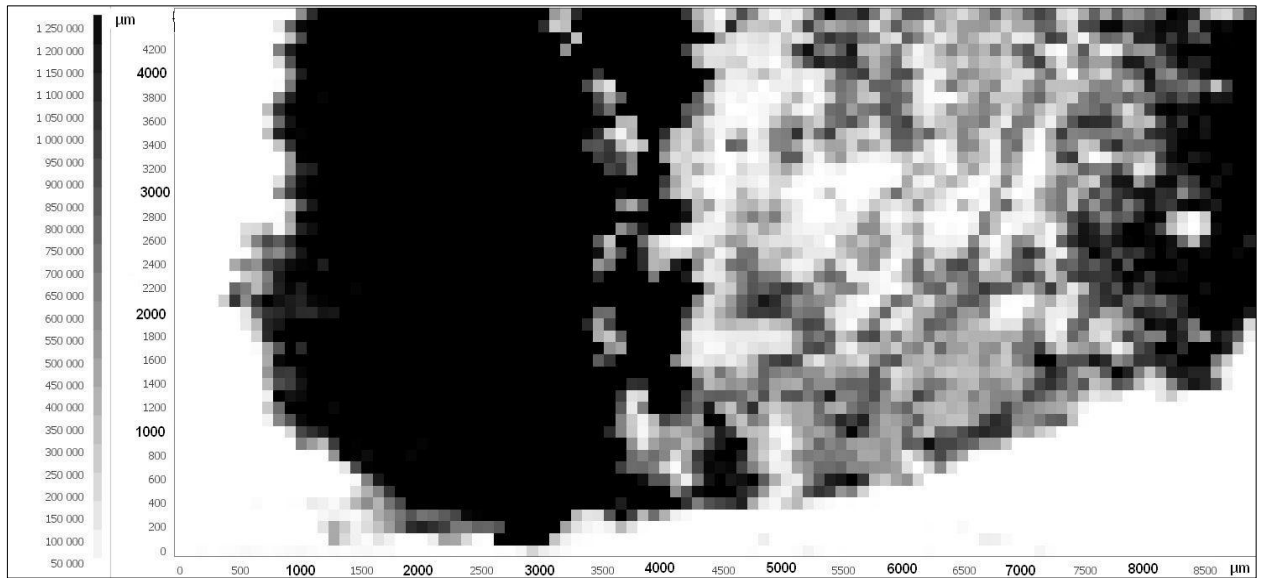
Obrázek 11 ukazuje, že měď  $^{63}\text{Cu}$  v kůži téměř obsažena není. Tmavá místa mohou vyjadřovat ojedinělá stopová ložiska Cu.



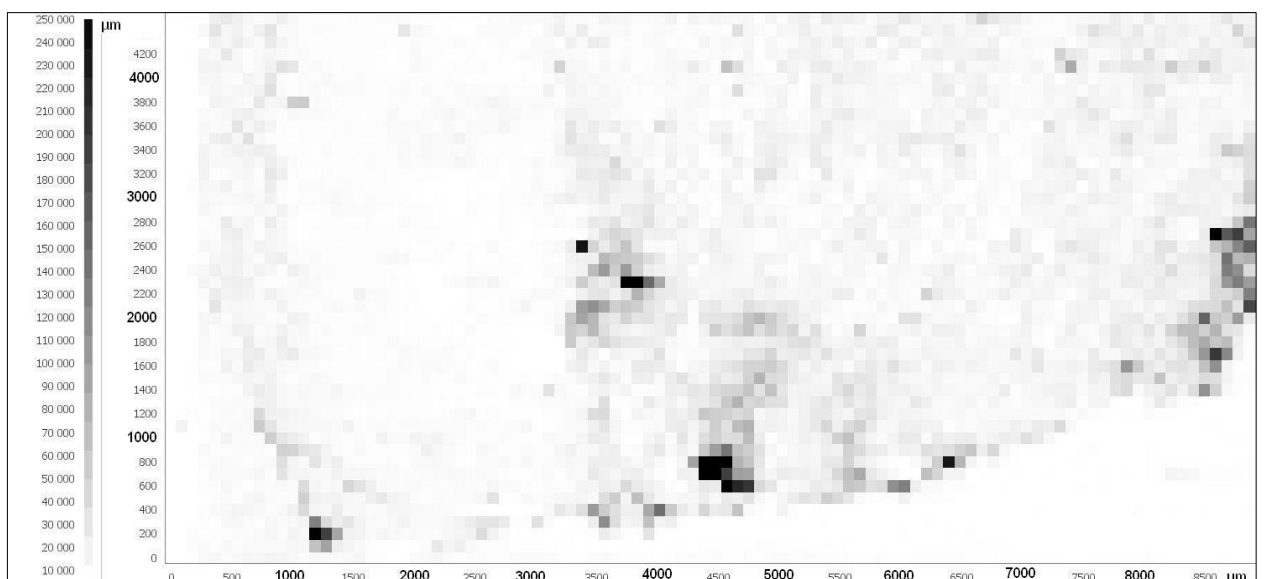
Stejně jako měď, i zinek  $^{66}\text{Zn}$  v kůži obsažen téměř není (obr. 12). Tmavá ložiska při dolním okraji preparátu mohou korespondovat se stopovými depozity zinku v této tkáni. V případě těchto dvou sledovaných prvků je pozorován velmi podobný trend jako v případě železa, opět se tedy jedná o analýzu hypodermis

### Jednotlivé izotopy:

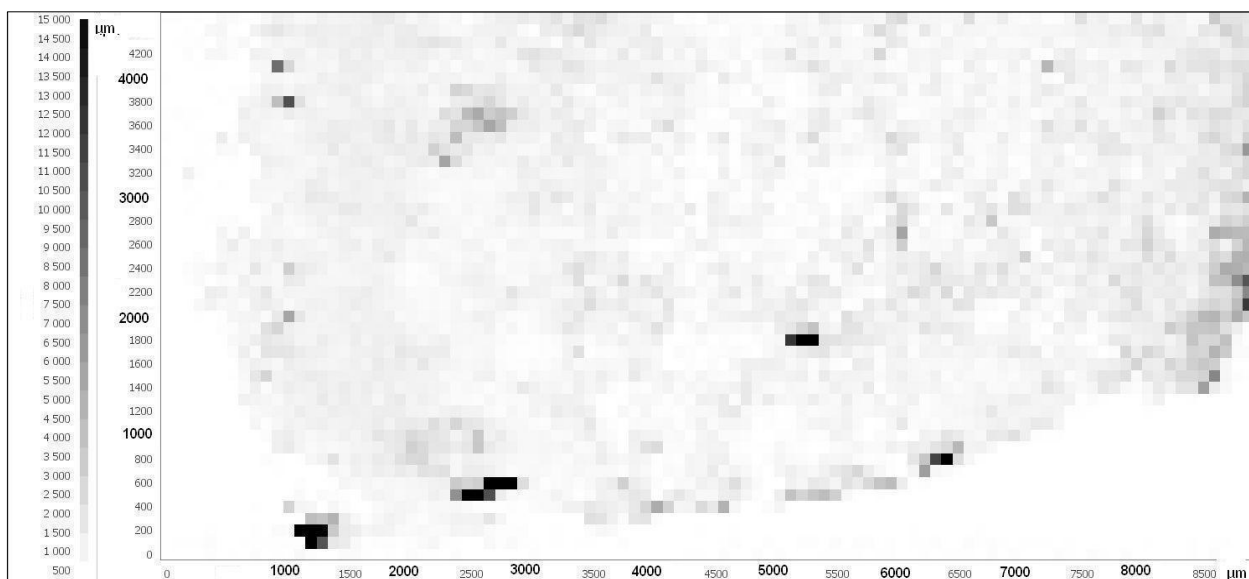
**Obrázek č 8: Uhlík  $^{12}\text{C}$  ve vzorku**



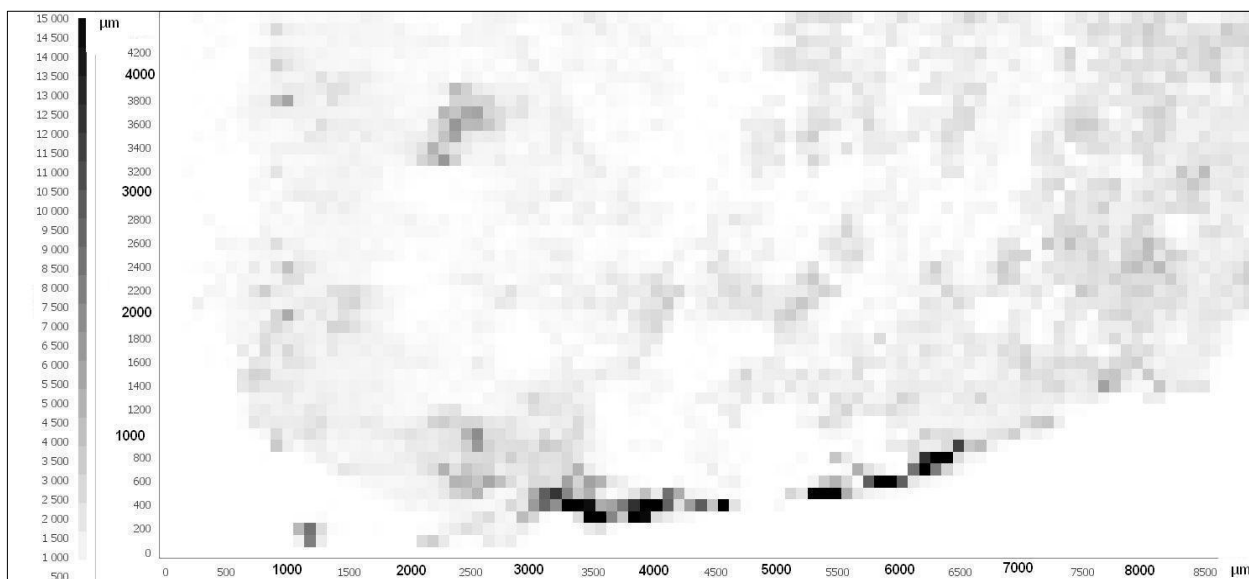
**Obrázek č 9: Železo  $^{56}\text{Fe}$  ve vzorku**



Obrázek č 10: Měď  $^{63}\text{Cu}$  ve vzorku



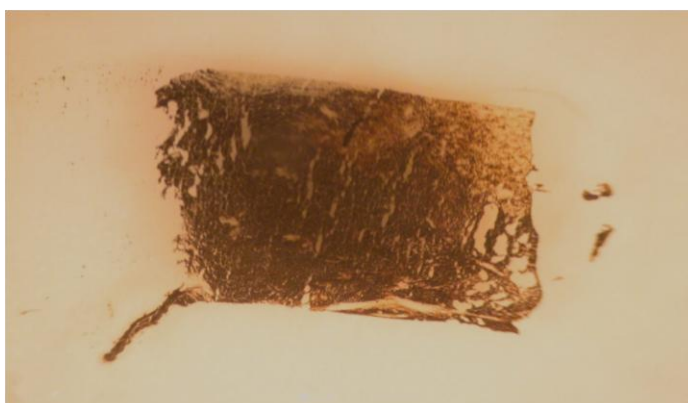
Obrázek č 11: Zinek  $^{66}\text{Zn}$  ve vzorku



Výsledky získanými analýzou kůže jsme ověřili hypotézu, že tento typ tkáně obsahuje minimum kovů a je vhodná jako kontrola pro porovnání obsahů sledovaných kovů v melanomu.

## 7.1.2 Nádor v progresi

**Obrázek č 13: Fotografie řezu nádorem v progresi**



Na obrázku č. 13 vidíme fotografii řezu dalším vzorkem – nádorem v progresi, před analýzou LA-ICP-MS. Další obrázky (14 – 17) dokládají prostorové uspořádání sledovaných prvků (C, Fe, Cu a Zn) v tomto řezu.

Tento vzorek patřil také mezi rozsáhlejší. Analýze jsme ovšem tentokrát podrobili celý vzorek = obě poloviny, aby nedošlo ke zkreslení výsledných informací o distribuci těžkých kovů v tomto nádoru. Celkové mapy tedy vznikly spojením dvou jednotlivých map dvou polovin vzorku.

Oblast nahromadění izotopu uhlíku, viditelná v pravém horním rohu obrázku 14 nám ukazuje místo, kde je tkáň výrazněji zastoupena, jinak nám tato mapa opět poskytuje představu o téměř rovnoměrném výskytu organického materiálu.

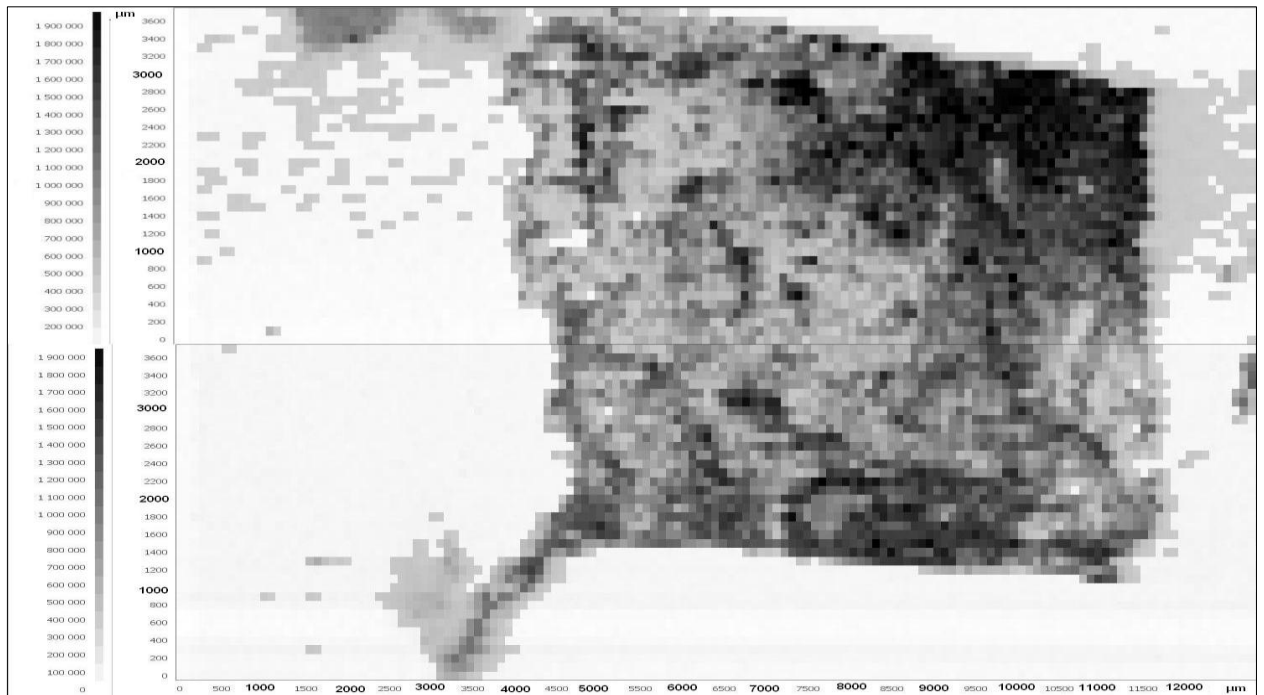
Naproti tomu železo se v tomto vzorku vyskytuje jen v jednotlivých bodových oblastech- černé tečky v ploše vzorku, jak dokazuje obrázek č. 15, jinak se jeho koncentrace pohybuje spíše v nižších hladinách – šedivé až bílé oblasti preparátu.

Zastoupení mědi je o mnoho zajímavější než v případě železa. Na obrázku č. 16 vidíme oblasti spíše při okrajích vzorku, které se vyznačují černou barvou, což svědčí o vysoké kumulaci mědi. Další takové místo je v pravé části, blíže ke středu. Výrazná jsou ale i bílá místa, která nám říkají, že zde se měď vyskytuje jen velmi málo.

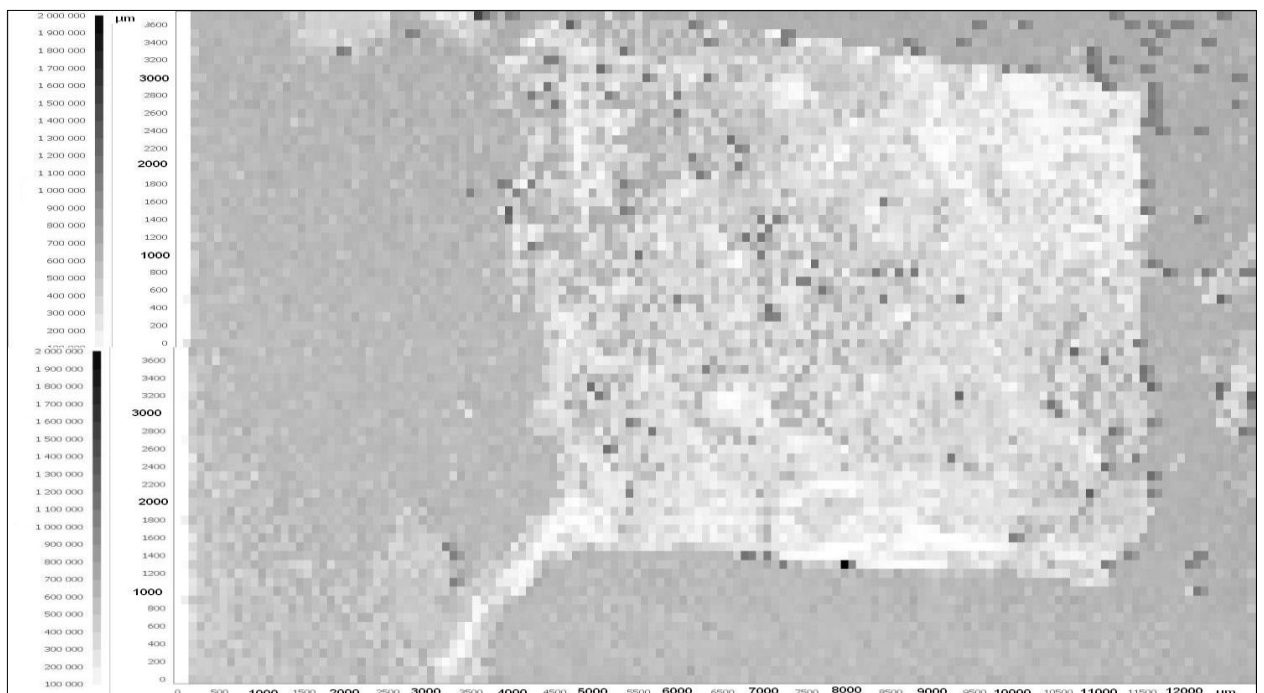
U zinku (obr. 17) je u tohoto preparátu vidět jistá podobnost s výskytem mědi, není již ovšem tak výrazná. Společnou mají tyto dva prvky u tohoto vzorku oblast pravého horního rohu, kde je i zinek hojně soustředován. Ve zbytku preparátu je jeho koncentrace nízká, až téměř není zastoupen.

Jednotlivé izotopy:

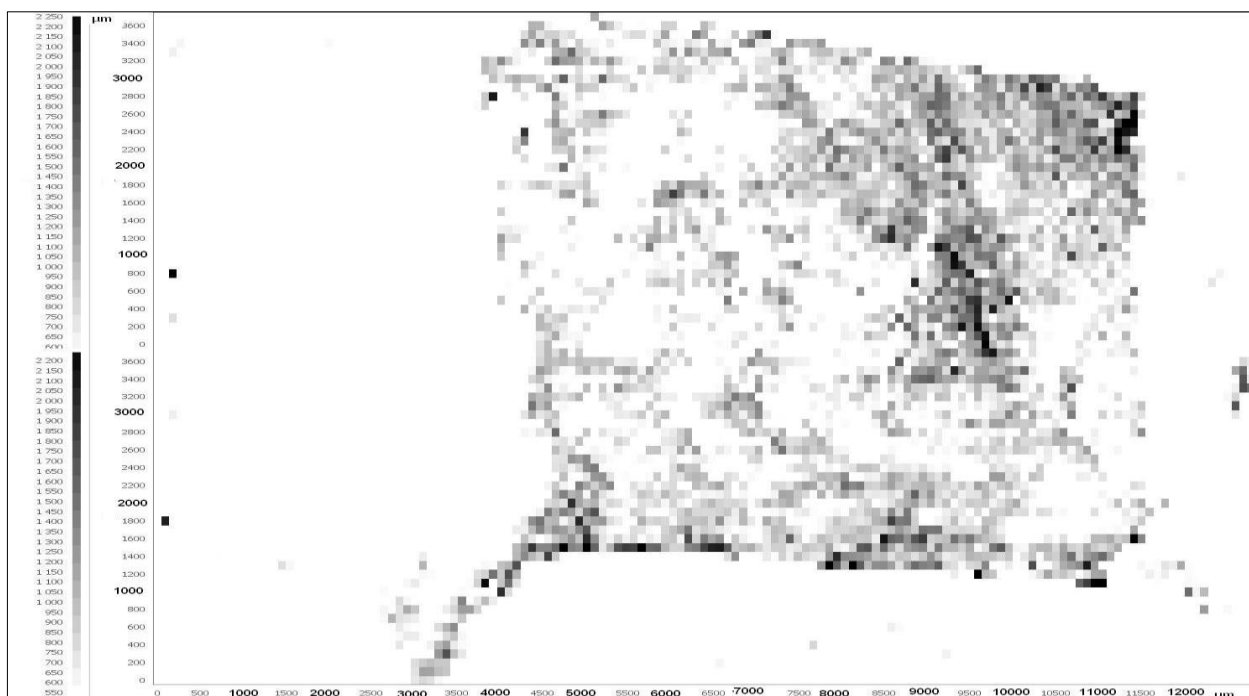
**Obrázek č 14: Uhlík  $^{12}\text{C}$  ve vzorku**



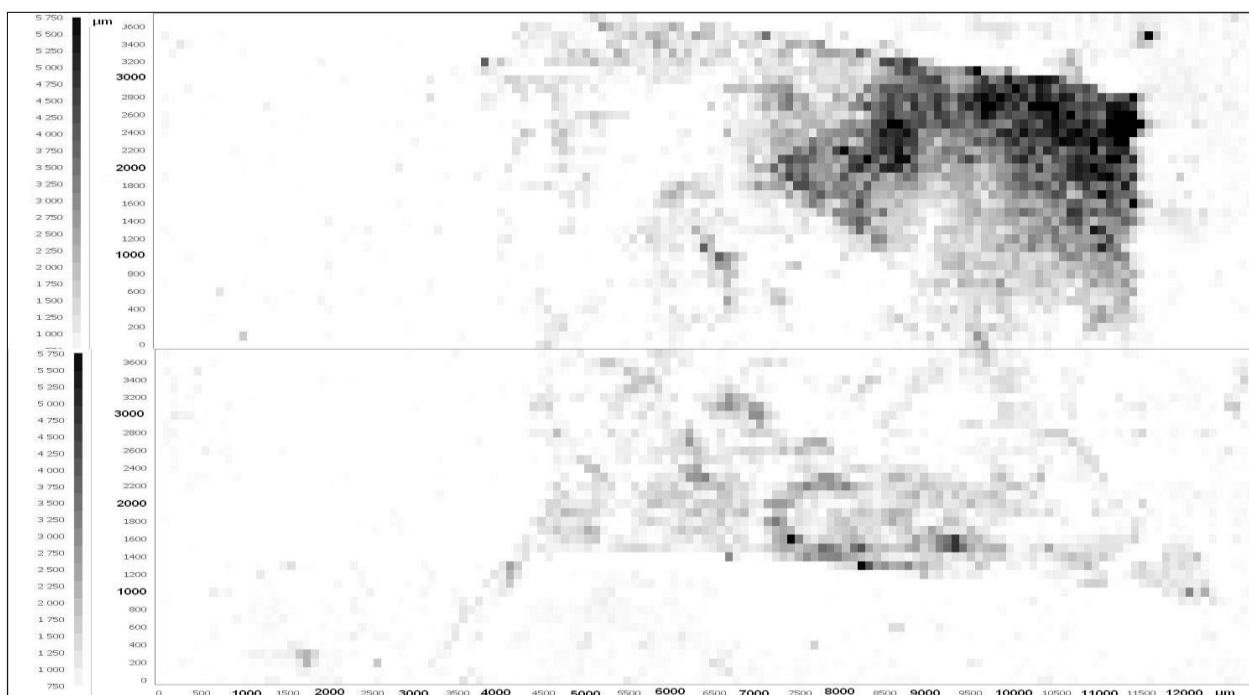
**Obrázek č.15: Železo  $^{56}\text{Fe}$  ve vzorku**



Obrázek č.16: Měď  $^{63}\text{Cu}$  ve vzorku

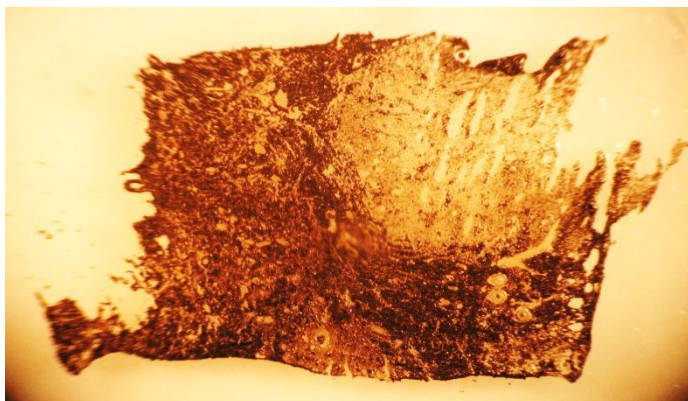


Obrázek č 17: Zinek  $^{66}\text{Zn}$  ve vzorku



### 7.1.3 Výrazně nodulární nádor

Obrázek č.18: fotografie řezu výrazně nodulárním nádorem



Na obrázku č. 18 je zachycen řez výrazně nodulárním nádorem před analýzou pomocí LA-ICP-MS. Na obrázcích 19-22 je znázorněno plošné rozložení C, Fe, Zn a Cu na řezu nodulárním nádorem.

Na obrázku č 19 je patrné celkem pravidelné rozložení izotopu uhlíku  $^{12}\text{C}$  ve vzorku, které dokládá organickou povahu testované tkáně. Nižší zastoupení prvku v pravém horním kvadrantu může být způsobeno nižší ablační účinností v tomto místě.

Obrázek č. 20 ukazuje, že izotop železa  $^{56}\text{Fe}$  ve vzorku téměř přítomný není. Napovídá tomu světlá barva v téměř celé ploše vzorku. V pravém horním kvadrantu řezu nádoru je patrné navýšení obsahu Fe v tomto nádoru.

Mapa rozložení izotopu mědi (obr. č 21) je ve srovnání s rozložením železa o něco pestřejší. Můžeme vidět vyšší zastoupení tohoto prvku v levé dolní části, zatímco v pravém horním kvadrantu se měď v podstatě nenachází. Za zmínku také stojí intenzivní tmavá barva při horním okraji vzorku, která také svědčí o zvýšené akumulaci Cu.

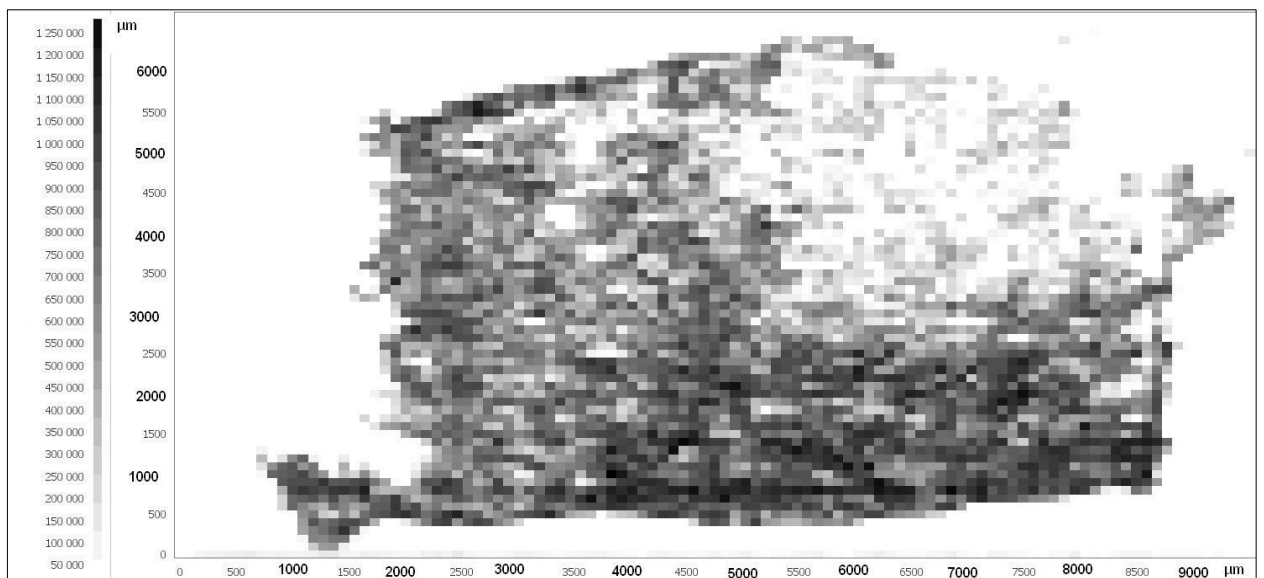
Zinek je výrazně koncentrován ve střední části řezu, jak můžeme vidět na obrázku č 22. Minimální hladina tohoto prvku je opět vidět v pravé horní části preparátu. Za zmínku stojí jistá podobnost s rozložením mědi a zinku i u tohoto preparátu. Jsou viditelné stejně tmavé oblasti- pás v dolní části preparátu + výrazná tmavá oblast v levé horní části. Vysvětlením může být fakt, že měď a zinek mají podobné vazebné vlastnosti – např. v případě proteinu metalothioneinu se jedná o kompetitivní vazbu těchto dvou prvků (viz. text výše).

Výsledky jasně naznačují společnou akumulaci zinku a mědi, které jsou shromažďovány v částech, které se přímo dotýkají zdravé tkáně, tedy místech, kde je soustředěna největší metabolická aktivita nádoru. Tento fakt odhaluje

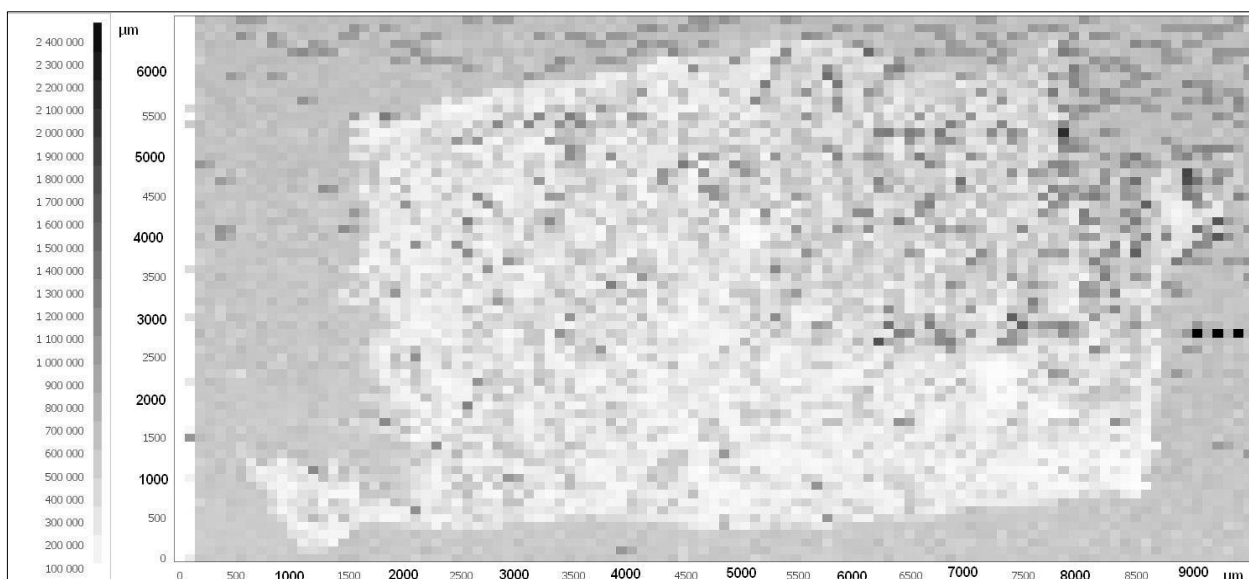
schopnost nádoru transportovat cíleně tyto prvky do buněk s nejvyšší aktivitou, která je nezbytná pro rozvoj nádoru (např. aktivita zinek dependentních matrixových metaloproteináz). Mechanismy, které se zde uplatňují, jsou neznámé, ale je možné předpokládat, že transportéry kovů jako metalothionein, se budou v těchto procesech uplatňovat. Naprosto opačný obsah železa oproti zinku a mědi ukazují na zvýšený oxidační stres, který je přítomen v hypoxických částech nádoru. Zde nedochází k dostatečnému prokrvení tkáně a tím pádem může docházet k akumulaci tohoto kovu.

### Jednotlivé izotopy:

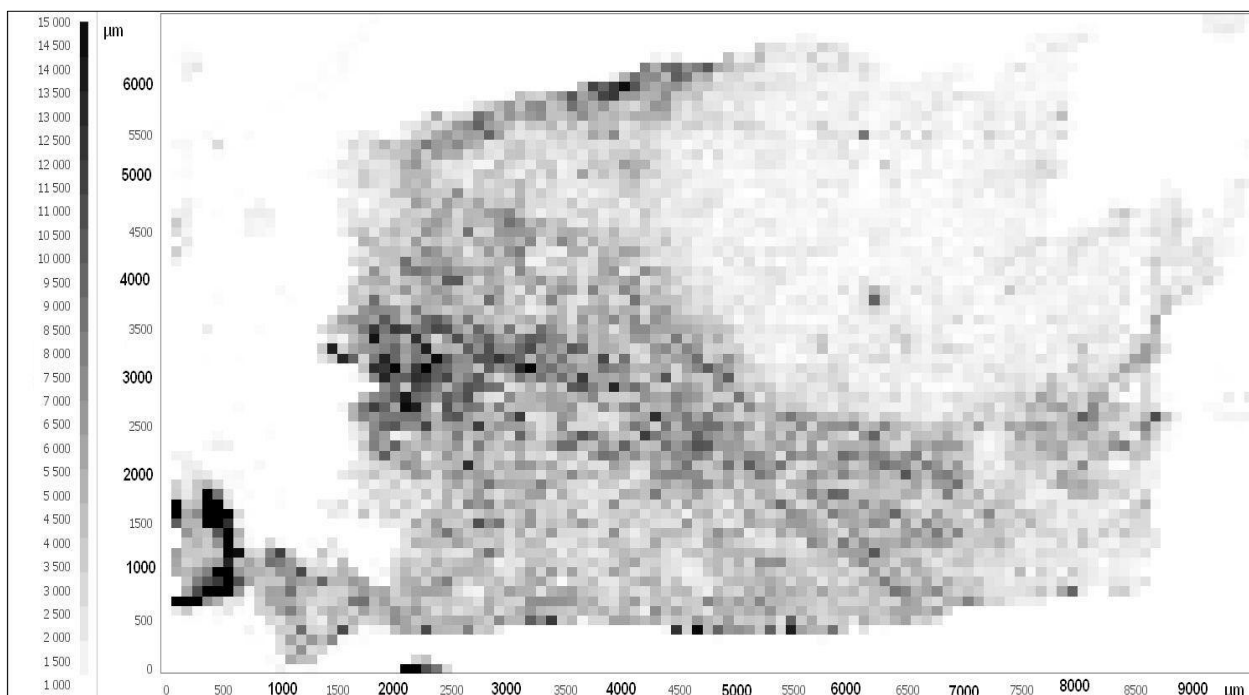
**Obrázek č. 18: Uhlík  $^{12}\text{C}$  ve vzorku**



Obrázek č. 19: Železo  $^{56}\text{Fe}$  ve vzorku

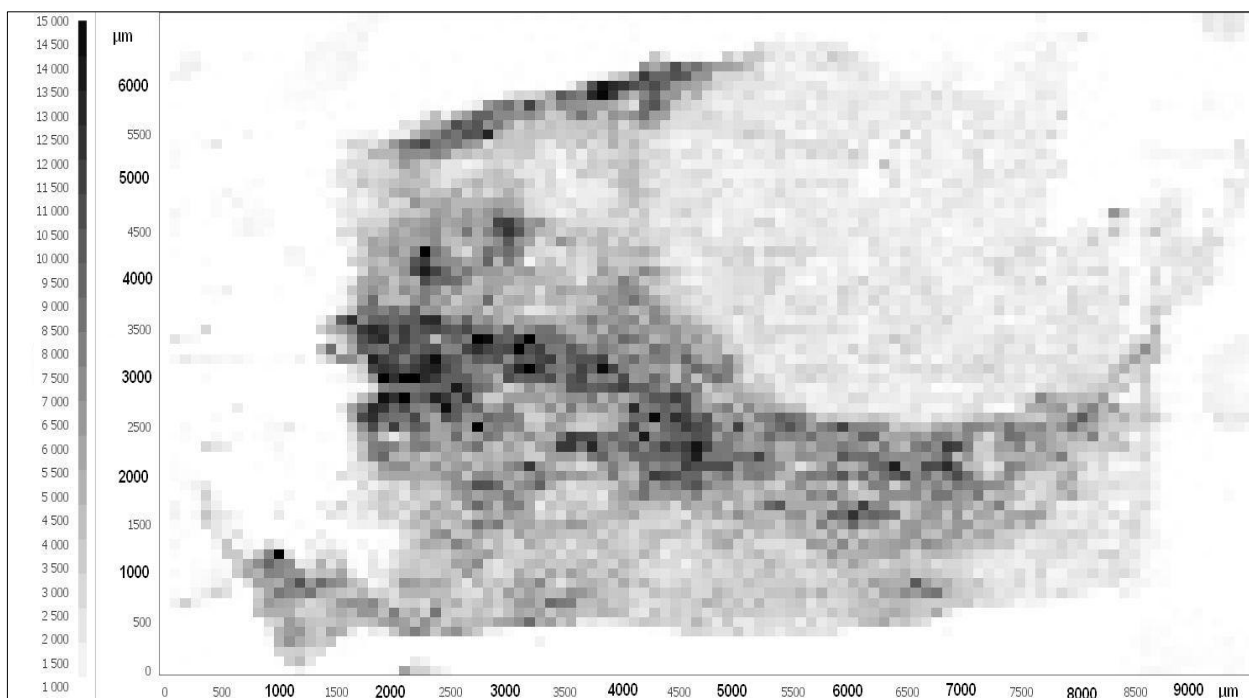


Obrázek č. 20: Měď  $^{63}\text{Cu}$  ve vzorku





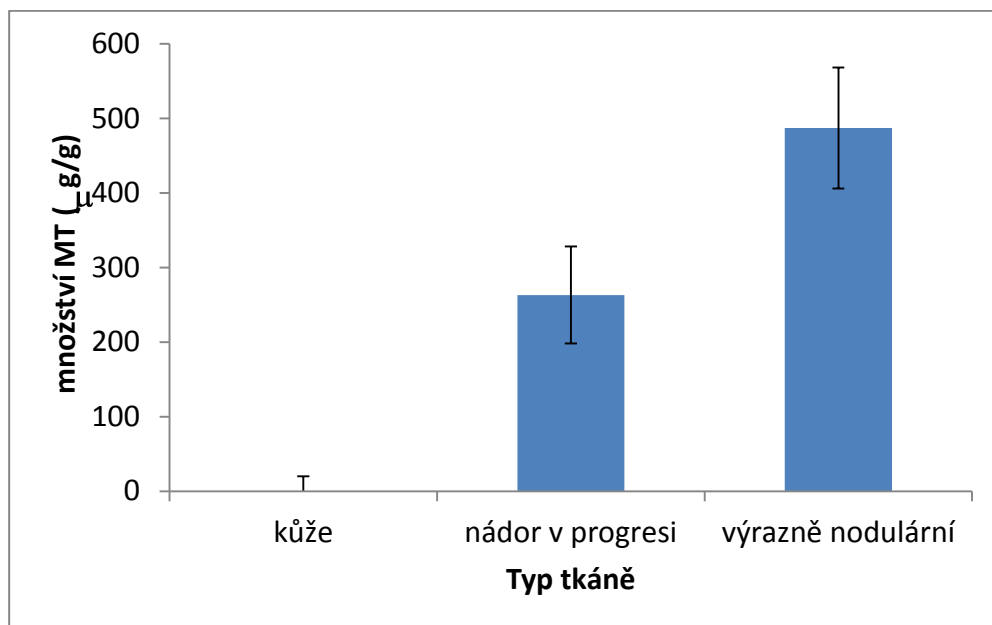
Obrázek č 21: Zinek  $^{66}\text{Zn}$  ve vzorku



## 7.2 Výsledky stanovení MT

Z grafu č. 3 je vidět, že množství metalothioneinu v jednotlivých tkáních se výrazně liší. Bylo zjištěno, že nejvyšší obsah MT je ve výrazně nodulární tkáni ( $487 \pm 81 \mu\text{g/g}$ ), v nádoru v progresi byl obsah MT významně nižší ( $263 \pm 65 \mu\text{g/g}$ ). Naproti tomu, ve zdravé kožní tkáni byl obsah MT pod hranicí meze detekce. Tato data potvrzují předpokládanou souvislost mezi stádiem nádoru a množstvím MT přítomného ve tkáni. Navíc je z porovnání laterálních map Cu a Zn patrná korelace mezi těmito prvky a MT.

**Graf č. 3: Závislost množství MT na typu tkáně**



*Z grafu je patrné, že s nádorovou progresí ve tkáni stoupá hladina MT.*

## VI. ZÁVĚR

K analýze řezu rakovinné tkáně jsme užili metodu LA-ICP-MS, která nám poskytla představu o rozložení těžkých kovů v nádorech různého stádia a z výsledků jsme mohli vyvodit následující závěry:

Je patrné, že nádorové buňky jistým mechanismem hospodaří s těžkými kovy, a že způsob ukládání těchto prvků ve tkáni může být vodítkem pro určení stádia vývoje nádoru. Porovnáním plošných map rozložení Fe, Zn a Cu v řezech výrazně nodulárním nádorem, nádorem v progresi a zdravou kůží zjistíme, že zatímco v kůži se těžké kovy téměř nevyskytují, s postupujícím stádiem nemoci se jejich kumulace ve tkáni zvyšuje. Patrné je to hlavně na uložení mědi a zinku v řezech nádorem v progresi a výrazně nodulárním nádorem. Souviset tento jev může se zvyšující se hladinou proteinu metalothioneinu (MT). Z grafu č. 3 jasně vyplývá, že s postupujícím onemocněním stoupá hladina tohoto kov- vázajícího proteinu ve tkáni a tudíž dochází k hromadění prvků, pro které má tento protein vazebná místa. Samotný nárůst koncentrace MT může souviset se zvýšenou produkcí MT tkání a to mimo jiné v důsledku oxidativního stresu souvisejícího s nádorovým bujením.

V této práci jsme ukázali, že souvislost mezi ukládáním těžkých kovů, k jejichž analýze je metoda LA-ICP-MS vhodná, a progresí nádorového bujení existuje, a že v kombinaci s využitím stanovení koncentrace proteinu metalothioneinu coby nádorového markeru ve vzorcích pacientů, by mohla v onkologické praxi pomoci k upřesnění stádia onemocnění a tím pomoci k volbě vhodné léčby.

## Literatura

1. Kraus Jiří; Buchtelová; kol., *Slovník cizích slov*. Nakladatelství Academica; 343, 650: 2005.
2. [http://www.pvzp.cz/export/sites/default/common/docs/GM-GP-zavazna\\_onemoceni-CZ.pdf](http://www.pvzp.cz/export/sites/default/common/docs/GM-GP-zavazna_onemoceni-CZ.pdf), In 13.4. 2012.
3. Srb, T., Zhoubné nádory v roce 2009. *Aktuální informace*

Ústavu zdravotnických informací a statistiky

České republiky **2012**.

4. Ajmová, J., Zhoubný melanom kůže

*Aktuální informace*

Ústavu zdravotnických informací a statistiky

České republiky **2005**.

5. <http://www.svod.cz>, In 13.4. 2012.
6. Karlson, P.; kol., *Patobiochemie*. Academica; 418, 419, 431: 1987.
7. Dobrowolska, J.; Dehnhardt, M.; Matusch, A.; Zoriy, M.; Palomero-Gallagher, N.; Koscielniak, P.; Zilles, K.; Becker, J. S., Quantitative imaging of zinc, copper and lead in three distinct regions of the human brain by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta* **2008**, *74*, 717-723.
8. Vávrová, J.; kol, *Vitamíny a stopové prvky*. Česká společnost klinické biochemie ČLS JEP; SEKK spol. s.r.o.; 97, 114, 118: 2007.
9. Schirber, M., Chemistry of Life: The Human Body In *LiveScience* - 15.4.2012: electronical article (<http://www.livescience.com/3505-chemistry-life-human-body.html>), 2009.
10. Fabrik, I., Využití metalothioneinu jako potenciálního nádorového markeru. In 13.4. 2012: bakalářská práce, 2008.
11. Křížková, S., Studium vzniku rezistence během protinádorové léčby. In 1.4. 2012: disertační práce, 2010.
12. Russo, R. E.; Mao, X. L.; Liu, H. C.; Gonzalez, J.; Mao, S. S., Laser ablation in analytical chemistry - a review. *Talanta* **2002**, *57*, 425-451.
13. Mokgalaka, N. S.; Gardea-Torresdey, J. L., Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: Principles and applications. *Applied Spectroscopy Reviews* **2006**, *41*, 131-150.
14. Mestek, O., Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem. In 3.3.2012: výukový text pro Podzemní výukové středisko JOSEF, 2010.
15. Novák, M., Základní princip laseru a jejich dělení  
In 4.3.2012: elektronický článek (<http://www.lao.cz/aktualne/clanky-a-zpravy/serial-o-laserech/serial-princip-a-typy-laseru.htm>), 2011
16. <http://teamd.lbl.gov/images/chem-analysis-2.png>, In 15.4. 2012.
17. 6. kurz ICP spektrometrie. *Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, editor - V. Otruba*

**2011, Brno.**

18. Durrant, S. F., Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: achievements, problems, prospects. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **1999**, *14*, 1385-1403.
19. Liu, H. C.; Borisov, O. V.; Mao, X. L.; Shuttleworth, S.; Russo, R. E., Pb/U fractionation during Nd : YAG 213 nm and 266 nm laser ablation sampling with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Applied Spectroscopy* **2000**, *54*, 1435-1442.

20. Yoo, J. H.; Borisov, O. V.; Mao, X. L.; Russo, R. E., Existence of phase explosion during laser ablation and its effects on inductively coupled plasma-mass spectroscopy. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 2288-2293.
21. Figg, D. J.; Cross, J. B.; Brink, C., More investigations into elemental fractionation resulting from laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry on glass samples. *Applied Surface Science* **1998**, *127*, 287-291.
22. Jeffries, T. E.; Pearce, N. J. G.; Perkins, W. T.; Raith, A., Chemical fractionation during infrared and ultraviolet laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry - Implications for mineral microanalysis. *Analytical Communications* **1996**, *33*, 35-39.
23. [www.users.prf.jcu.cz](http://www.users.prf.jcu.cz), In 1.4.2012.
24. Neilsen, J. L.; Abildtrup, A.; Christensen, J.; Watson, P.; Cox, A.; McLeod, C. W., Laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry in combination with gel electrophoresis: a new strategy for speciation of metal binding serum proteins. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* **1998**, *53*, 339-345.
25. Zoriy, M. V.; Dehnhardt, M.; Matusch, A.; Becker, J. S., 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* **2008**, *63*, 375-382.
26. Křížková, S.; kol, Utilizing of Adsorptive Transfer Stripping Technique Brdicka Reaction for Determination of Metallothioneins Level in Melanoma Cells, Blood Serum and Tissues. *Sensors* **2008**, 3006-3021.