



Univerzita Komenského v Bratislave
Fakulta matematiky, fyziky a informatiky



Zuzana Grolmusová

Autoreferát dizertačnej práce

**ŠTÚDIUM VPLYVU RÔZNYCH FAKTOROV NA PRVKOVÉ
A IZOTOPOVÉ ZLOŽENIE BIOTKANÍV METÓDAMI LIBS A SIRMS**

na získanie akademického titulu philosophiae doctor

v odbore doktorandského štúdia: 4.1.12 Biofyzika

Bratislava 2013

Dizertačná práca bola vypracovaná v dennej forme doktorandského štúdia na Katedre experimentálnej fyziky

Predkladateľ: **Mgr. Zuzana Grolmusová**
Katedra experimentálnej fyziky
Mlynská dolina F2
842 48 Bratislava

Školiteľ: **prof. RNDr. Pavel Veis, CSc.**
Katedra experimentálnej fyziky
Mlynská dolina F2
842 48 Bratislava

Oponenti:
.....
.....
.....
.....
.....

(meno a priezvisko oponenta s uvedením jeho titulov a hodností a názov ustanovizne, s ktorou je oponent v pracovnom pomere)

Obhajoba dizertačnej práce sa koná o h pred komisiou pre obhajobu dizertačnej práce v odbore doktorandského štúdia vymenovanou predsedom odborovej komisie

4.1.12 Biofyzika

na Univerzite Komenského, Fakulte matematiky, fyziky a informatiky

Predseda odborovej komisie:

.....

1 Úvod a ciele práce

Živé organizmy predstavujú neoddeliteľnú súčasť zemského celku. Bohato komunikujú so svojim okolím, takže sú to otvorené systémy závislé na príjme potravy a udržaní optimálnych podmienok pre život. V tejto práci poukazujeme na niektoré faktory ovplyvňujúce prvkové a izotopové zloženie vybraných biotkanív. Zamerali sme sa vo veľkej miere na vplyv konzumovanej potravy na biologické vzorky ako ľudské nechty alebo aminokyseliny izolované z krvi medveďov grizly. Cieľom bolo odhaliť vplyv stravy na prvkové a izotopové zloženie skúmaných tkanív. V štúdiu nechtov sme sa zamerali na odhalenie rozdielov v prvkovom zložení nechtov vegetariánov a kontrolnej skupiny, vplyvu spracovania vzorky a spôsobu semikvantitatívnej analýzy. Cieľom izotopovej štúdie nechtov bola analýza izotopového zloženia uhlíka a dusíka a ich zmien vplyvom rôznych faktorov (pohlavie, fajčenie, konzumácia mäsa či morskej stravy). Jedným z cieľov spolupráce na Washingtonskej štátnej Univerzite v Pullmane bolo zavedenie metodiky merania stabilných izotopov aminokyselín izolovaných z krvi medveďov grizly. Úlohou bolo charakterizovať izotopové zloženie dusíka aminokyselín krvných frakcií a ich vzťah s podávanou stravou.

Prvkové zloženie biotkanív na jednej strane odráža vplyv okolitého prostredia ale aj procesy prebiehajúce vnútri organizmu. Príkladom je geneticky podmienená Wilsonova choroba vyznačujúca sa poruchou metabolizmu medi a jej následnou akumuláciou v tkanivách ako pečeni. Cieľom tejto časti bolo zhodnotiť vhodnosť LIBS analýzy ako pomocnej diagnostickej metódy.

Na analýzy prvkového zloženia sme použili laboratórne zostavenú aparatúru určenú pre spektroskopiu laserom indukovanej iskry (LIBS – Laser Induced Breakdown Spectroscopy) a za účelom sledovania pomerov stabilných izotopov komerčný hmotnostný spektrometer (SIRMS – Stable Isotope Ratio Mass Spectrometry).

2 Spektroskopia laserom indukovanej iskry

Spektroskopia laserom indukovanej iskry (LIBS) je optická emisná analytická metóda určená na detekciu prvkového zloženia skúmanej látky. Vysokovýkonný laserový pulz fokusovaný na povrch vzorky spôsobí zapálenie plazmovej iskry, ktorá odleptá malé množstvo vzorky (rádovo nanogramy až pikogramy). Plazmová iskra sa rýchlo vyvíja v čase, dosahuje vysoké teploty a spôsobí rozbitie alebo disociáciu materiálu na atómy a ióny. Následne dochádza k ďalšej absorpcii energie voľných elektrónov a excitácii disociovaných častíc. Iskrú možno zaznamenať voľným okom ako záblesk bieleho svetla vychádzajúceho z ohniska a je sprevádzaná hlasným puknutím, ktoré vzniká v dôsledku rázovej vlny generovanej počas optického prierazu (Miziolek, 2006). Emisia plazmy zberaná optickými vláknami sa zaznamenáva pomocou spektrometra vo forme spektier, ktoré postupne menia svoj charakter tak, ako sa plazma rozpína a chladne. Na začiatku dominuje biele svetlo kontinua. Predstavuje ho najmä brzdné žiarenie a rekombinačné žiarenie plazmy (voľných elektrónov a iónov v chladnšej plazme). Nepodáva užitočnú informáciu a preto ho treba pri nastaveniach snímania spektrometrom vylúčiť zvolením vhodného oneskorenia. Približne po 200 ns začína nad emisiou kontinua prevládať emisia iónov, neutrálnych atómov a neskôr začne prevládať emisia vznikajúcich radikálov a molekúl.

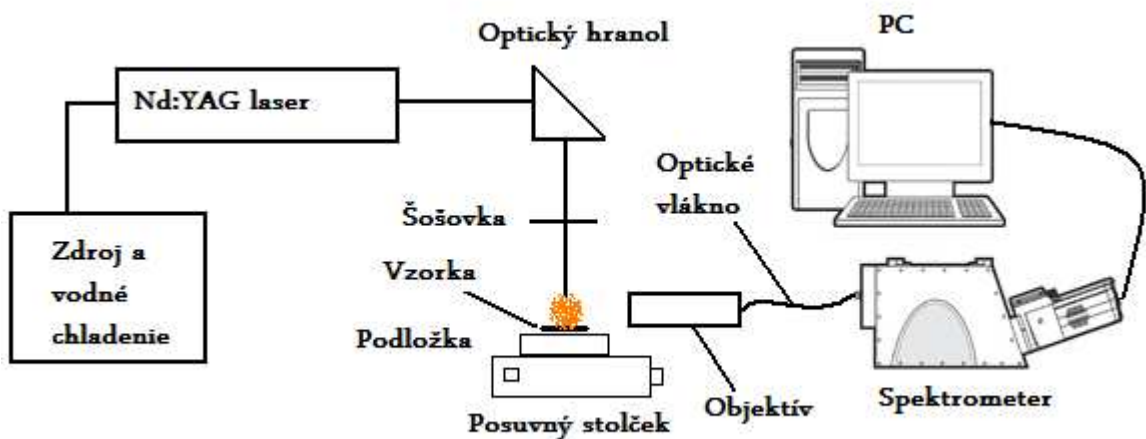
LIBS nachádza uplatnenie vo viacerých priemyselných oblastiach (Noll, 2007; Harmon, 2009; Gondal 2010). Je to vďaka jej výhodám (meranie v reálnom čase, nepotrebnosť špeciálnej prípravy vzoriek, vhodnosť pre každé skupenstvo), ktoré chýbajú niektorým iným optickým analytickým metódam. Na opodstatnenosť aplikácie LIBS na biologických vzorkách poukázalo viacero autorov napr. prvková štúdia vzoriek zubov a kostí (Samek, 2001), mäkkých tkanív (Yueh, 2009) či rastlinných materiálov (Galiová, 2007; Kaiser, 2009). Problematike obtiažnej kvantifikácie biologických vzoriek sa venoval napr.

Trevizan a kol. (2008), Braga a kol. (2010) alebo Ferreira a kol. (2010). Tieto a mnohé iné práce poukazujú na fakt, že skúmanie vplyvu rôznych faktorov na prvkové zloženie biotkanív pomocou LIBS nachádza vo vedeckej komunite významné miesto. Biologické vzorky sú však charakteristické svojou komplikovanou maticou, preto sa kvantitatívna analýza rieši homogenizovaním, tvorbou tlačných tabliet a vlastných kalibračných materiálov (Braga, 2010). Takýto prístup si vyžaduje dostatočné množstvo vzorky a navyše sa stráca význam niektorých predností LIBS. V tejto práci sme použili semikvantitatívnu analýzu a to buď porovnaním plôch vybraných spektrálnych čiar, alebo porovnaním hmotnostných percentuálnych zastúpení niektorých prvkov vypočítaných bezkalibračnou CF-LIBS analýzou (Tognoni, 2007).

2.1 LIBS experimentálna aparátúra

Experimentálna schéma aparátúry je znázornená na obr.1. Na laserovú abláciu bol použitý pulzný Nd:YAG laser pracujúci na druhej harmonickej frekvencii (QUANTEL – Brilliant EaZy, vlnová dĺžka 532 nm, frekvencia 10 Hz, max energia 165 mJ, dĺžka pulzu 4 ns). Na nasmerovanie a fokusovanie laserového lúča na povrch vzoriek bol použitý optický hranol (Thorlabs, kremenné sklo) a šošovka s fokálnou vzdialenosťou 4 cm (Thorlabs, BK7). Po zapálení plazmovej iskry bola vzniknutá emisia sústredená pomocou šošovky do optického vlákna privádzaného signál na optickú štrbinu spektrometra so schodkovou mriežkou (Mechelle ME 5000, Andor Technology), ktorý dokáže zaznamenať rozsah vlnových dĺžok od 200 nm do 950 nm s vysokým spektrálnym rozlíšením ($\lambda/\Delta\lambda = 5000$). Emisné spektrá boli zaznamenávané pomocou iCCD kamery (iStar DH 734, Andor technology). Teplota detektora bola -15°C a zosilnenie bolo 100 násobné. Intenzifikovaná CCD kamera bola trigrovaná na laser. Nastavenie oneskorenia, šírky snímaného okna či počtu akumulovaných spektier záviselo od typu vzorky.

Na kalibráciu vlnovej dĺžky bola použitá ortuťovo-argónová lampa (HG-1, Ocean Optics). Spektrá boli predelené citlivostnou krivkou spektrometra Mechelle ME 5000.

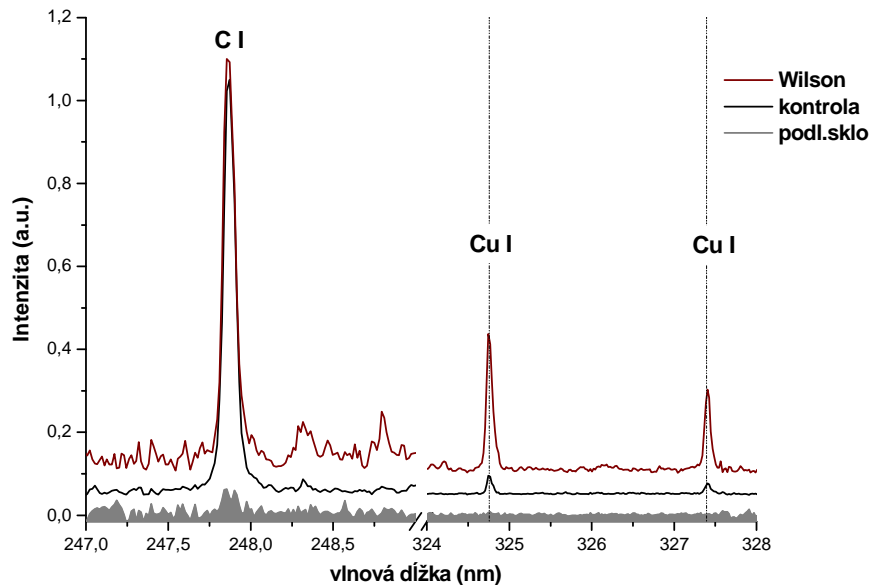


Obr. 1 Experimentálna aparátúra - schéma konfigurácie pre merania pod atmosferickým tlakom.

2.2 LIBS analýza ľudskej pečene s Wilsonovou chorobou

V spolupráci s kolektívom prof. Pavla Babála, CSc. z Ústavu patologickej anatómie Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave sme skúmali vplyv patologického metabolizmu na obsah medi v ľudskej pečeni. Hlavným cieľom našej spolupráce bolo overenie možnosti aplikácie LIBS pri diagnostike Wilsonovej choroby, počas ktorej sa v

Ľudských tkanivách akumuluje meď. Získali sme sedem vzoriek ľudskej pečene s podozrením na Wilsonovu chorobu, ktoré sme porovnávali s kontrolnou skupinou piatich vzoriek. Spracovanie biologického materiálu prebiehalo na Lekárskej fakulte podľa štandardných histologických postupov (Vacek a Mišák, 1990), výsledkom boli tenké histologické rezy pečene na podložných sklíčkach. Po ablácii laserovým pulzom sa odparila so vzorkou aj časť podložného sklíčka. Kvalitatívnou identifikáciou spektier sme zistili, že v podložnom sklíčku sa nenachádza ani uhlík ani meď ako ilustruje obr. 2.



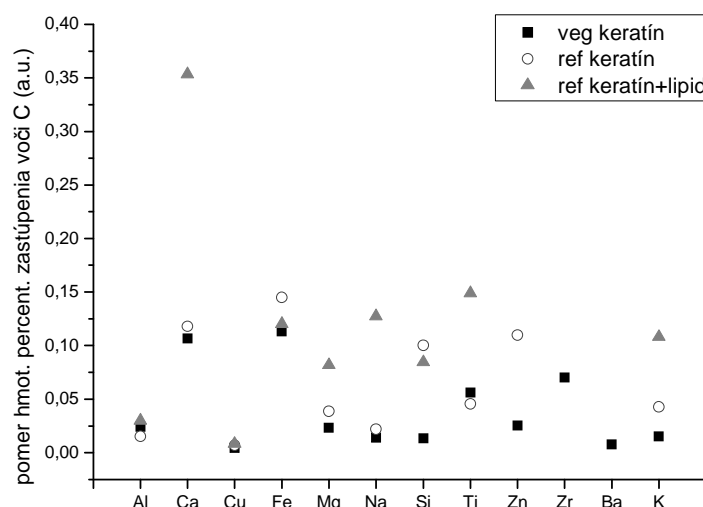
Obr. 2 Porovnanie neutrálnej emisnej čiary uhlíka (247,86 nm) a medi (324,75 nm a 327,40 nm) vo vzorke pečene podozrivej na Wilsonovú chorobu (označené ako Wilson), so spektrom z pečene od zdravého jedinca (označená ako kontrola) a spektrom z podložného sklíčka (označeným *podl.sklo*). Spektrá zo vzoriek pečene sú normalizované na uhlíkovú čiaru.

Porovnaním pomerov plôch pod spektrálnymi čiarami medi a uhlíka sme zistili signifikantné zvýšenie u piatich vyšetovaných vzoriek oproti kontrolnej skupine (studentov t-test, $P < 0,05$). Len dve vyšetované vzorky vykazovali porovnateľné pomery čiar ako kontrolná skupina. Získané údaje sme porovnávali s klinickými informáciami. Z piatich vzoriek, ktorým sme identifikovali zvýšený pomer Cu/C, štyri mali klinicky potvrdenú Wilsonovu chorobu a piata nebola doteraz klinicky hodnotená. Zo zvyšných dvoch vyšetovaných vzoriek, ktorým sme určili porovnateľný pomer Cu/C s kontrolou, jedna nebola klinicky doteraz hodnotená a druhá mala fyziologický obsah medi. Takže sa nám podarilo úspešne testovať LIBS metódu pri identifikovaní obsahu medi v biopsiách ľudskej pečene s Wilsonovou chorobou. Otázka vhodnosti LIBS analýzy ako doplnkovej diagnostickej metódy v medicíne za účelom diagnostiky Wilsonovej choroby si však bude musieť počkať na vyriešenie problematiky kvantifikácie minoritných prvkov v zložitej biologickej matrici.

2.3 Vplyv konzumovanej potravy na prvkové zloženie nechtov

Nechty sú výborným tkanivom na analýzy z hľadiska neinvazívneho odberu, rýchlosť ich rastu je cca 0,10-0,12 mm/deň, takže odstrihnuté nechty nesú informáciu o stravovaní spreď 4 až 6 mesiacov (Bucharďt, 2007). Prvkové zloženie ľudských nechtov nie je vo vedeckej komunite ťiadnou neznámou. Majoritnú zložku tvorí uhlík, vodík, kyslík a dusík. Podľa Bucharďta a kol. (2007) sa v ľudskom nechtovom keratíne nachádza 6% vodíka, 50% uhlíka, 17% kyslíka a 5% síry. Ostatné prvky predstavujú variabilnú minoritnú zložku ako uvádza Walters a kol. (2012), analýzou nechtov od zdravých respondentov pomocou ICP-MS boli schopní detegovať širokú škálu prvkov. Napriek tomu sa neustále otvárať otázky vplyvu

rôznych faktorov na keratinizované tkanivá a ich možný význam pri určovaní zmien v ľudskom organizme. V tejto práci sme pomocou LIBS analyzovali prvkové zloženie nechtového keratínu dobrovoľných darcov (11 vegetariánov a 11 referenčných vzoriek). Z majoritných prvkov vyskytujúcich sa v nechtoch sme identifikovali uhlík, kyslík, dusík a vodík. Ďalej s rozdielnou mierou variability sme identifikovali aj Al, Ca, Cu, Fe, Mg, Na, Si, Ti, Zn, Zr, Ba a K. Semikvantitatívna analýza pomerov hmotnostného zastúpenia odhalila signifikantné zníženie obsahu vápnika a horčíka v nechtovom keratíne vegetariánov oproti kontrolnej skupine. Grafické znázornenie priemerných hodnôt percentuálnych hmotnostných pomerov jednotlivých prvkov voči uhlíku v troch sledovaných skupinách možno vidieť na obr. 3. Po odstránení lipidovej zložky z nechtov sa zdá byť koncentrácia väčšiny minoritných prvkov nižšia, hoci štatisticky sa toto tvrdenie na našom súbore nepotvrdilo.



Obr. 3 Priemerné hodnoty pomerov hmotnostného percentuálneho zastúpenia identifikovaných minoritných prvkov voči uhlíku v skupine vegetariánov (veg keratín) a kontrolnej skupiny pred (ref keratín+lipid) a po odstránení lipidov (ref keratín).

3 Hmotnostná spektrometria pomerov stabilných izotopov

Izotopy sú atómy jedného prvku, v jadre ktorých je rovnaký počet protónov ale rozdielny počet neutrónov a teda majú rozdielnú hmotnosť. Niektoré izotopy sú radioaktívne (podliehajú jadrovému rozpadu) a preto sú označované ako radioizotopy, kým ostatné nepodliehajú rádioaktívnemu rozpadu a označujú sa ako stabilné izotopy. Rozdiely v hmotnostiach kvôli rozličnému počtu neutrónov, vedú k čiastočnej separácii ľahkých izotopov od ťažších počas chemicko-fyzikálnych procesov. Frekvencia vibrácií atómov v molekulách je nepriamo úmerná hmotnosti atómu. Väzby v molekulách vytvorených z ťažších atómov sú silnejšie než väzby v molekulách z ľahších atómov. Jedným z dôsledkov je, že pri chemických reakciách reagujú rýchlejšie molekuly obsahujúce ľahšie izotopy ako molekuly ťažších izotopov. Tento proces nazývame izotopová frakcionácia. Najčastejšie sa analyzujú stabilné izotopy ľahkých prvkov: kyslík O (^{16}O , ^{17}O , ^{18}O), uhlík C (^{13}C , ^{12}C), dusík N (^{14}N , ^{15}N), vodík H (^1H , ^2H) a síra S (^{32}S , ^{33}S , ^{34}S , ^{36}S). Distribúcia stabilných izotopov v prírode nie je rovnovážna a preto sa stabilné izotopy stávajú významným markerom pre rozličné prírodné procesy. Na charakterizáciu skúmanej látky sa pritom používa pomer ťažšieho a ľahšieho izotopu toho istého prvku napr. $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$. Pre zabezpečenie svetovo porovnateľných výsledkov sa zaviedlo δ značenie a izotopový pomer sa vyjadruje v δ notácii v promile (‰) relatívne voči štandardu:

$$\delta(\text{‰}) = \left(\frac{R_{VZ}}{R_{ST}} - 1 \right) \times 1000 \quad (1)$$

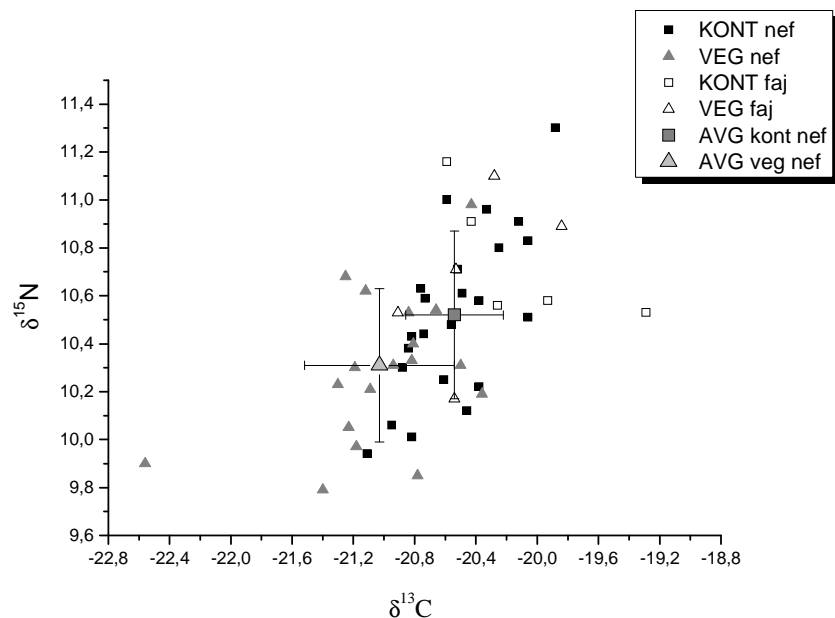
kde R_{VZ} a R_{ST} reprezentujú pomer ťažšieho izotopu k ľahšiemu toho istého prvku vo vzorke a štandarde napr. pre kyslík $R = {}^{18}\text{O}/{}^{16}\text{O}$.

Hmotnostná spektrometria pomerov stabilných izotopov (SIRMS) má široký rozsah aplikácií v mnohých vedných oblastiach od hydrogeológie (Costinel, 2009), klimatológie (Ruppenthal, 2010), farmakológie (Jasper, 2004), potravinárstve (Padovan, 2007) a iných. SIRMS nachádza uplatnenie aj vo forenzných vedách (Meier-Augenstein a Fraser, 2008), ktoré poukázali na keratinizovaná tkanivá ako na bohatý zdroj informácií.

Zložitejšie procesy prebiehajúce v metabolizme rastlín alebo živočíchov možno identifikovať len určením izotopového zloženia jednotlivých stavebných zložiek tkanív ako sú aminokyseliny. Takéto informácie možno získať použitím GC-C-IRMS (Gas Chromatography-Combustion Isotope Ratio Mass Spectrometry – kombinácia plynovej chromatografie a spaľovania so spektrometriou pomerov stabilných izotopov). Analýzam izotopového zloženia aminokyselín extrahovaných zo živých tkanív sa venovali viaceré biochemické laboratória (Metges a Deaner, 2000; Persson and Näsholm, 2001).

3.1 Vplyv stravy na izotopové zloženie nechtov

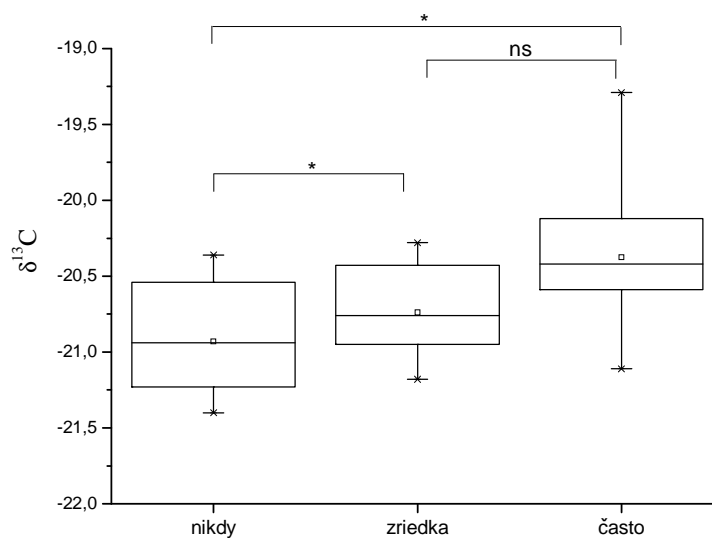
Z dôvodu frakcionácie stabilných izotopov v procese metabolizmu bolo vykonaných viacero štúdií, ktoré poukazujú na vzťah izotopového zloženia tkanív a konzumovanej potravy. Nechty ako aj vlasy patria medzi tkanivá, ktoré sú ľahko odoberateľné a uchovávajú informáciu o nedávnych dietetických zvyklostiach (cca. pol roka). Analýzy nechtového keratínu môžu odhaliť vplyv geografie na izotopový charakter nechtov z dôvodu odlišnosti konzumovanej stravy (Nardoto, 2006). Izotopový charakter kyslíka a vodíka v ľudských nechtoch môže poskytnúť informácie o konzumácii vody (Fraser a Meier-Augenstein, 2007).



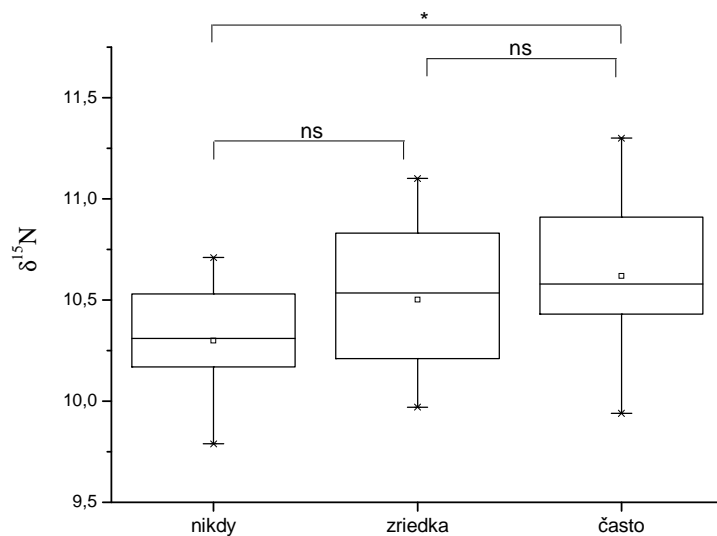
Obr. 4 Distribúcia dát $\delta^{15}\text{N}$ vs. $\delta^{13}\text{C}$ nechtového keratínu slovenských dobrovoľníkov vegetariánov nefajčiarov – VEG nef, kontrolnej skupiny nefajčiarov – KONT nef, vegetariánov fajčiarov – VEG faj, kontrolnej skupiny fajčiarov – KONT faj, s vyznačenou priemernou hodnotou kontrolnej skupiny nefajčiarov – AVG kont nef a priemernou hodnotou vegetariánov nefajčiarov – AVG veg nef (chybové úsečky predstavujú štandardnú odchýlku)

V tejto štúdií sme zozbierali vzorky nechto v od 52 respondentov - dobrovoľníkov vo veku od 22 do 47 rokov (priemerný vek $28,2 \pm 5,1$ roku), jednalo sa o 24 vegetariánov a 28 všežravcov, mužského aj ženského pohlavia. Spracovanie vzoriek prebiehalo podľa O`Connell a kol. (2001). Izotopové analýzy prebiehali na hmotnostnom spektrometri na meranie pomerov stabilných izotopov Delta V Advantage (Thermo Fischer Scientific) v spojení s elementárnym analyzátorom Flash HT 2000 (Thermo Fischer Scientific) určeným na spaľovanie (N/C analýzy) alebo pyrolýzu (H/O analýzy) vzoriek. Distribúciu analyzovaných $\delta^{15}\text{N}$ a $\delta^{13}\text{C}$ hodnôt nechtového keratínu vegetariánov a kontrolnej skupiny ilustruje obr. 4.

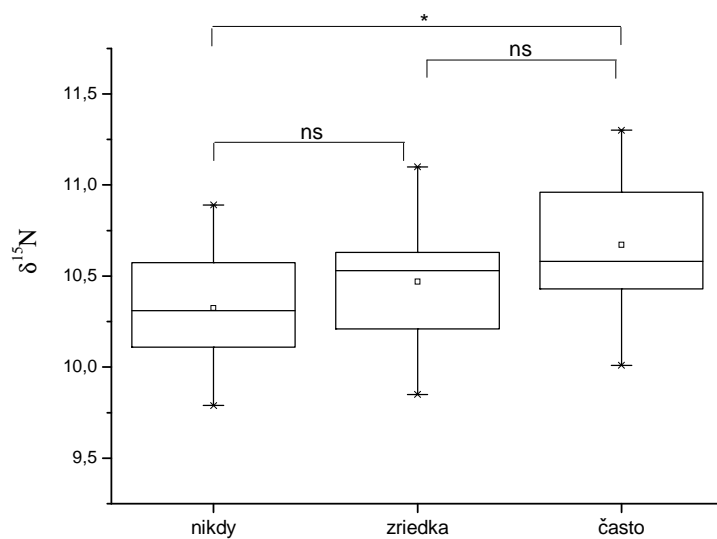
Pohlavie nemalo žiadny vplyv na izotopové zloženie nechtového keratínu. Na druhej strane fajčenie spôsobovalo signifikantné zvýšenie hodnôt $\delta^{15}\text{N}$ a $\delta^{13}\text{C}$. Vplyv konzumácie mäsa v skupine nefajčiarov bol signifikantný opäť pre oba izotopy. Nechtový keratín vegetariánov bol pritom obohatený o ľahšie izotopy. Vplyv mäsitej potravy na zloženie stabilných izotopov uhlíka a dusíka sme lepšie pozorovali po rozdelení vzoriek do skupín podľa frekvencie jedenia mäsa, ako to znázorňuje obr.5 a obr.6. Signifikantné zmeny sú medzi skupinami označené hviezdikou. Podobnú tendenciu sme pozorovali pri porovnávaní skupín s odlišnou frekvenciou morskej stravy. Buchar dt a kol. (2007) zaznamenali, že zvýšená konzumácia morských plodov v grónskej komunite s bohatým rybolovom vedie k obohacovaniu nechtového keratínu o ťažšie izotopy uhlíka a dusíka. Vplyv morskej stravy bol zjavný aj v nechtovom keratíne Slovákov ako ilustruje obr. 7 a obr.8. Hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ celého meraného súboru vykazovali signifikantnú koreláciu ($P < 0,0001$), Pearsonov koeficient bol 0,576. Uvedené dáta boli porovnané s doteraz publikovanými dátami na celosvetovej škále. Podobne aj hodnoty $\delta^{18}\text{O}$ nechtového keratínu boli dané do súvisu s hodnotami $\delta^{18}\text{O}$ zrážok a porovnané s údajmi v globálnom meradle.



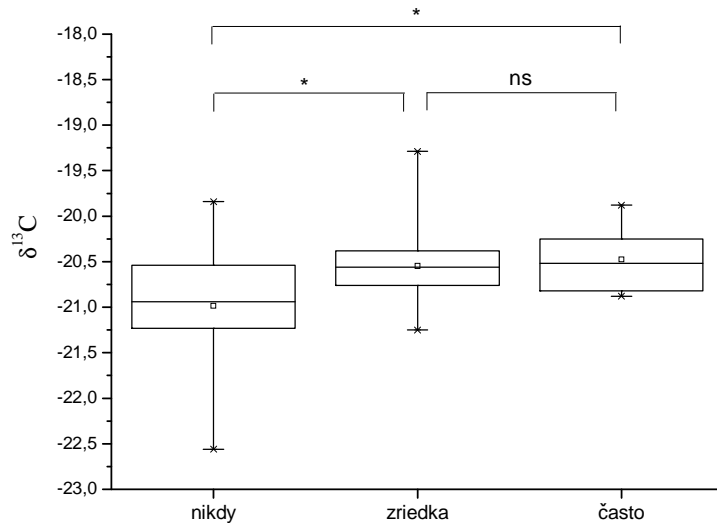
Obr. 5 Porovnanie hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ nechtového keratínu v troch skupinách líšiacich sa frekvenciou konzumácie mäsa. (* označuje signifikantný rozdiel s $P \leq 0.05$; ns označuje nesignifikantný rozdiel; krabicový graf: min < hranica - [dolný kvartil - medián a priemer - horný kvartil] - hranica > max)



Obr. 6 Porovnanie hodnôt $\delta^{15}\text{N}$ nechtového keratínu v troch skupinách líšiacich sa frekvenciou konzumácie mäsa. (* označuje signifikantný rozdiel s $P \leq 0.05$; ns označuje nesignifikantný rozdiel; krabicový graf: min < hranica - [dolný kvartil - medián a priemer - horný kvartil]- hranica > max)



Obr. 7 Porovnanie hodnôt $\delta^{15}\text{N}$ nechtového keratínu v troch skupinách líšiacich sa frekvenciou konzumácie morskej stravy. (* označuje signifikantný rozdiel s $P \leq 0.05$; ns označuje nesignifikantný rozdiel; krabicový graf: min < hranica - [dolný kvartil - medián a priemer - horný kvartil]- hranica > max)



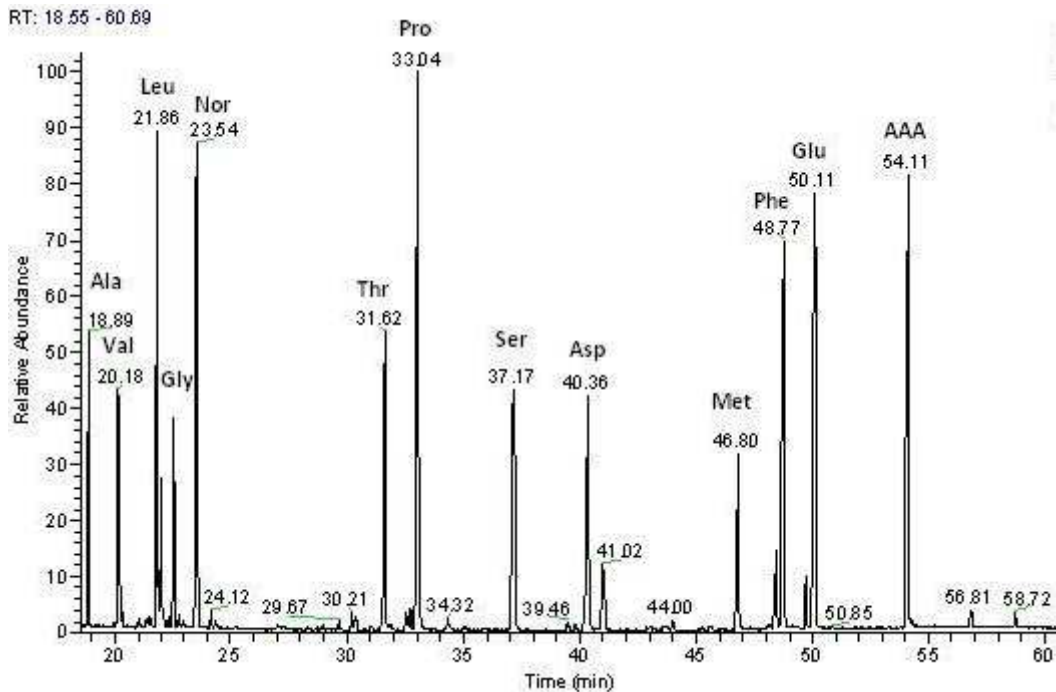
Obr. 8 Porovnanie hodnôt $\delta^{13}\text{C}$ nechťového keratínu v troch skupinách líšiacich sa frekvenciou konzumácie morskej stravy. (* označuje signifikantný rozdiel s $P \leq 0.05$; ns označuje nesignifikantný rozdiel; krabicový graf: min < hranica - [dolný kvartil - medián a priemer - horný kvartil]- hranica > max)

3.2 Štúdium stabilných izotopov dusíka aminokyselín v krvi medveďov grizly

Poznanie procesov metabolizmu a vplyvu stravy na izotopový charakter tkanív živočíchov má veľký význam pri sledovaní vplyvu zmien v životnom prostredí na stravovacie návyky živočíchov a následný dopad na ekosystém. Za týmto účelom sa na Washingtonskej štátnej univerzite v Pullmane v skupine prof. Davida Evansa, PhD. rozvíja štúdium izotopového zloženia aminokyselín izolovaných z krvi medveďov grizly a vplyvu stravy na pomer stabilných izotopov. Cieľom študijného pobytu v Pullmane bolo zavedenie novej metodiky analýz pomerov stabilných izotopov uhlíka a dusíka z aminokyselín izolovaných z krvi a porovnanie izotopového charakteru aminokyselín z konzumovanej stravy a jednotlivých frakcií izolovaných z krvi medveďov grizly. Na americkom kontinente zohrávajú medvede grizly dôležitú úlohu v transporte morských živín do suchozemských rastlín. Významnou zložkou ich potravy sú lososy, ktoré putujú z oceánov do sladkovodných tokov ďaleko do vnútrozemia, aby sa rozmnožili. Zatiaľ čo medvede grizly využívajú energiu z lososov na tvorbu tuku, väčšinu dusíkových, fosforových a iných prebytočných látok vylučujú počas svojho putovania krajinou. Tieto živiny sú zase využívané prednostne rastlinami. Štúdie izotopového zloženia aminokyselín biotkanív pokrývajú aplikáciu GC-C-IRMS od rastlinných vzoriek (Persson, 2001) až po živočíšne (McClelland, 2002; Hare, 1991).

Za účelom analýz stabilných izotopov aminokyselín sme použili vzorky krvi štyroch približne jednoročných medveďov grizly z chovnej stanice WSU Bear Center Washingtonskej štátnej univerzity z dvoch rôznych dátumov vzorkovania. Vzorky krvi boli odoberané z krčnej tepny do dvoch skúmaviek, jedna obsahovala antikoagulačné činidlo EDTA (kyselinu etyléndiamintetraoctovú) a druhá nie. Vzorky boli krátko po odobratí centrifugované. Pre každého medveďa sme tak z vialky bez antikoagulačného činidla získali vzorku krvných elementov a vzorku séra, z vialky s antikoagulačným činidlom sme dostali jednu vzorku krvných elementov a jednu vzorku krvnej plazmy. Pre účely GC-C-IRMS bola nutná predpríprava vzorky. Krvné frakcie boli hydrolyzované podľa Popp a kol. (2007) a následne

derivatizované podľa modifikovaného NAP (N-acetyl, O-propylát) protokolu pre derivatizáciu aminokyselín podľa Meier-Augensteina (2004). Pripravené vzorky vo forme roztokov boli merané v dvoch fázach. Na začiatku sme identifikovali špecifické komponenty pomocou kvadrupólovej plynovej chromatografie spojenej s hmotnostnou spektrometriou GC-MS na prístroji DSQ II (Thermo Electron Corporation). Po identifikácii jednotlivých frakcií a analýze retenčných časov izolovaných aminokyselín bola vzorka analyzovaná pomocou GC-C-IRMS na prístroji GC-IsoLink v spojení s Delta V Plus (Thermo Fisher Scientific). Nastavenie teplotného programu a chromatografický výstup uvádzame na obr.9.



Obr. 9 Chromatograf zmesi 18 aminokyselín zhotovený pomocou DSQ II pri teplotnom programe: 80°C (2min), 10°C/min do 180°C, 1°C/min do 210°C, 3°C/min do 250°C, 250°C (135 min) (detailne od 10 do 60min)

Porovnanie $\delta^{15}N$ dát medzi dvomi vzorkovaniami

Porovnanie $\delta^{15}N$ hodnôt prvého a druhého vzorkovania nepreukázalo významné rozdiely pre väčšinu testovaných aminokyselín, použité boli párové štatistické testy a testované pritom boli len dáta s počnosťou 3 a viac. Preto sme testovali len vzorky krvnej plazmy (Ala, Val, Leu+Ile, Thr, Pro, Ser, Asp, Phe, Glu) a krvných elementov s EDTA (Leu+Ile, The, Pro, Ser, Asp, Phe, Glu). Signifikantný rozdiel bol pozorovaný iba u kyseliny glutámovej vo vzorke krvných elementov s EDTA (párový studentov t-test, $P=0,0428$).

Porovnanie $\delta^{15}N$ dát medzi aminokyselinami jednotlivých frakcií krvi

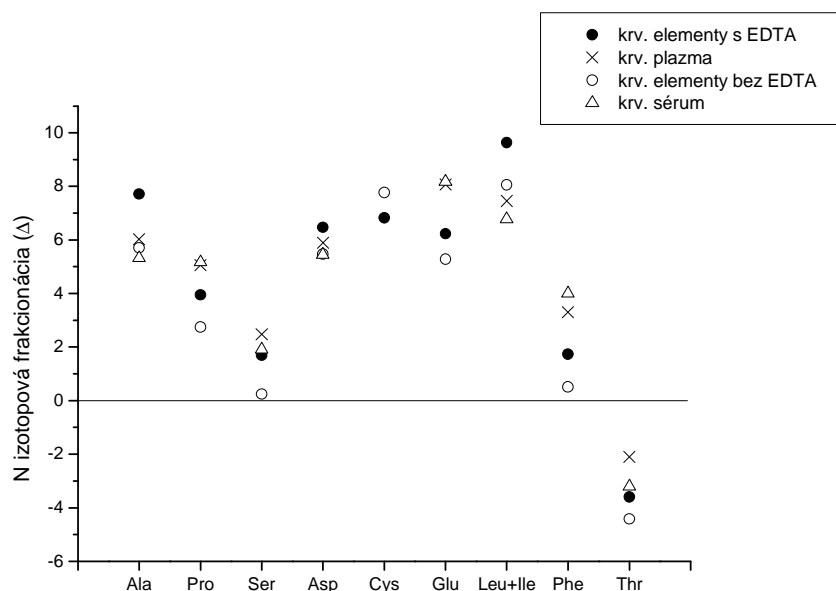
Keď sme obe vzorkovania zlúčili do jedného testovacieho súboru zistili sme významné rozdiely v $\delta^{15}N$ hodnotách niektorých aminokyselín. $\delta^{15}N$ hodnoty boli významne zvýšené pre Thr v krvnej plazme oproti krvným elementom bez EDTA; pre Ser v krvnej plazme v porovnaní s krvnými elementami bez EDTA; pre Glu v krvnej plazme oproti krvným elementom bez EDTA a v krvnom sére v porovnaní s krvnými elementmi bez EDTA.

Uvedené rozdiely najmä medzi $\delta^{15}N$ hodnotami krvných elementov a plazmou či sérom môžu byť vysvetlené rozdielom časovej škály, ktoré jednotlivé frakcie odrážajú. Krvná plazma a sérum obsahujú aminokyselinové zásoby spred 7-14 dní (MacLean, 1979), zatiaľ čo červené

krvinky predstavujúce majoritnú zložku krvných elementov sa obnovujú každých 120 dní. Vplyv EDTA t.j. rozdiely medzi plazmou a sérom sa nepreukázali, čo logicky vyplýva z faktu, že rozdelením vzorky na jednotlivé aminokyseliny možno účinok EDTA zanedbať, pretože bude eluovaná v inom retenčnom čase ako sledované aminokyseliny.

Pre určenie vzťahu medzi $\delta^{15}\text{N}$ hodnotami aminokyselín izolovaných z potravy a jednotlivých krvných frakcií sme použili Pearsonov korelačný koeficient. Pre všetky krvné frakcie bola potvrdená signifikantná korelácia s izotopovým zložením dusíka potravy.

Na obr. 10 možno pozorovať, že priemerné hodnoty stabilných izotopov dusíka sú pre väčšinu aminokyselín všetkých krvných frakcií obohatené o ^{15}N v porovnaní s konzumovanou potravou. Jedine v prípade treonínu možno pozorovať opačný efekt frakcionácie podobne ako McClelland (2002) alebo Hare (1991). Obohatenie väčšiny aminokyselín tkanív o ^{15}N oproti konzumovanej strave vyplýva z frakcionácie v procesoch metabolizmu, ktoré neboli priamo pozorované, ale jednoznačný trend na meraných vzorkách dokazuje, že tkanivá konzumentov sú obohatené o ťažšie izotopy v porovnaní s potravou a produkty vylučované z tela organizmov predstavujú izotopovo ochudobnenú frakciu molekúl relatívne voči celému organizmu (ochudobnené o ^{15}N) (Hare, 1991). Treonín je v tomto prípade výnimkou. Pre cicavce je esenciálnou aminokyselinou, preto pochádza priamo z konzumovanej potravy. Hare a kol. (1991) konštatovali, že napriek tomu, že sa jedná o esenciálnu aminokyselinu u všetkých cicavcov, v kolagéne izolovanom z kostí prasiat už treonín podlieha nejakému druhu katabolizmu, pretože inak by mali byť $\delta^{15}\text{N}$ hodnoty treonínu z kolagénu a potravy identické. Podobné výsledky sme dosiahli pre hodnoty $\delta^{15}\text{N}$ treonínu v krvi medved'ov. Predpokladá sa, že treonín sa stáva donorom niektorých dusíkových atómov do bežnej dusíkovej zásoby, ale enzým potrebný na reamináciu výslednej ketokyseliny nie je prítomný. Väčšina enzýmových reakcií sa asociuje s nerovnovážnym izotopovým efektom, kde produkt je obohatený o ľahší izotop a zvyšný reaktant sa stáva obohatený o ťažší izotop. Treonínová deamináza môže v tomto prípade predstavovať enzým s reakčným mechanizmom spôsobujúcim opačný izotopový efekt (Hare, 1991).



Obr. 10 Izotopová frakcionácia dusíka medzi aminokyselinami izolovanými z jednotlivých krvných frakcií medved'ov a aminokyselín izolovaných z konzumovanej potravy. (frakcionácia $\Delta = \delta^{15}\text{N}_{\text{krvi}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{potravy}}$; priemerná štandardná odchýlka bola 3,2‰)

Z uvedených výsledkov možno zhrnúť, že analyzovaním izotopového zloženia dusíka aminokyselín v krvi medved'ov grizly, žijúcich v zajatí, možno na základe presného zloženia

potravy študovať vzťah metabolizmu a konzumovanej stravy. Na základe takýchto štúdií možno v budúcnosti odhaliť dopad environmentálnych zmien na dietetické zvyklosti medveďov grizly vo voľnej prírode.

4 ZHRNUTIE A ZÁVER

Prezentovaná práca sa zaoberala prvkovou LIBS a izotopovou SIRMS analýzou za účelom sledovania rôznych vplyvov na biotkanivá. Použitím laboratórne zostavenej LIBS aparatury sme úspešne analyzovali prvkové zloženie zdravej ľudskej pečene a pečene s Wilsonovou chorobou. Sledovali sme tak vplyv geneticky podmienenej choroby na obsah medi v pečeni a schopnosť LIBS analýzy tieto zmeny detegovať. Otázka vhodnosti LIBS analýzy ako doplnkovej diagnostickej metódy v medicíne, napr. za účelom diagnostiky Wilsonovej choroby, si však bude musieť počkať na vyriešenie problematiky kvantifikácie minoritných prvkov v zložitej biologickej matici.

Sledovali sme tiež zmeny pomerovej koncentrácie vybraných prvkov vo vzorkách ľudských nechťov v závislosti od konzumovanej potravy. Prvkové zloženie nechťov bolo variabilné a po odstránení lipidovej zložky sa zdala byť koncentrácia väčšiny minoritných prvkov nižšia, hoci štatisticky sa toto tvrdenie na našom súbore dát nepotvrdilo. Obsah vápnika a horčíka v nechťovom keratíne vegetariánov bolo signifikantne znížené oproti kontrolnej skupine.

Keratinizované tkanivá sú svojou z dôvodu neinvazívneho odobratia vhodným materiálom nielen na LIBS analýzy ale aj na detekciu stabilných izotopov, čo sme preukázali na rozšírenom súbore ľudských nechťov od vegetariánov a kontrolnej skupiny. Zistili sme nielen signifikantné zmeny v pomeroch stabilných izotopov uhlíka a dusíka v súvislosti s frekvenciou konzumácie masa, alebo morskej stravy, ale aj s fajčením, čo v doteraz publikovaných prácach nebolo sledované. Analyzované hodnoty pomerov stabilných izotopov uhlíka, dusíka ale aj kyslíka sme porovnali s publikovanými dátami v globálnom meradle.

Na sledovanie kolobehu nutrientov v prírode a vplyvu konzumovanej potravy na tkanivá organizmov sú stabilné izotopy najlepším markerom. Vďaka spolupráci s Washingtonskou štátnou univerzitou v Pullmane sme mohli túto prácu obohatiť aj o analýzy stabilných izotopov dusíka v aminokyselinách izolovaných z krvi medveďov grizly a separovaných pomocou plynovej chromatografie. Porovnaním priemerných hodnôt $\delta^{15}\text{N}$ zo všetkých doterajších meraní krvných vzoriek medveďov grizly s izotopovým zložením konzumovanej potravy sme potvrdili očakávanú koreláciu. Väčšina aminokyselín izolovaných z krvi medveďov bola obohatená o izotop ^{15}N v porovnaní s konzumovanou potravou. Jedinou analyzovanou aminokyselinou, ktorá bola ochudobnená o ^{15}N oproti konzumovanej potrave, bol treonín. Poznanie izotopového zloženia tkanív medveďov grizly v súvislosti s podávanou stravou môže byť jedným z kľúčových mechanizmov, ako lepšie porozumieť vplyvu environmentálnych zmien na chovanie živočíchov a predpokladať ich dopad na okolitý ekosystém.

SUMMARY

Living organisms are an inherent part of the Earth. As open systems they intensively communicate with their environment and are dependent on the food intake, energy and information exchange. In this work we presented the study of selected factors influencing the elemental and isotopic composition of the biological tissues. Using the laboratory laser induced breakdown spectroscopy (LIBS) method we successfully analysed copper in a healthy and a diseased human liver. We focused on the genetically determined Wilson's disease, which caused the copper accumulation in liver. The LIBS was able to determine the normal and the increased copper content in the liver biopsy samples. The comparison between the copper and the carbon emission lines ratio of the healthy and the diseased livers showed a significant difference. But before the practical use in the medicine it is necessary to solve the problem of the LIBS quantification, which is particularly difficult in the case of biological tissues.

The next part of the presented work focused on the food influence on the human fingernails or amino acids isolated from the blood of grizzly bears. The goal was to reveal the food influence on the elemental and isotopic composition of selected tissues. First we investigated the elemental composition of the human fingernails depending on the consuming food. The elemental composition of fingernails was variable. Besides carbon, hydrogen, oxygen and nitrogen, there were also identified following elements: Al, Ca, Cu, Fe, Mg, Na, Si, Ti, Zn, Zr, Ba and K. The concentration of calcium and magnesium in the fingernail keratin of the vegetarians was significantly decreased in comparison to the control.

Keratinized tissues showed to be a suitable material for the analyses because of the non-invasive sampling. Human fingernail preserves the information about half year ago. For stable isotope measurements they collect the information about the food and water consumption. We compared the $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ data obtained from the vegetarians and the omnivores fingernail keratin. We found out significant changes in stable isotopes composition depending on the frequency of the meat or seafood intake and moreover depending on smoking, which was not published so far. The meat consumption, seafood intake and smoking caused the enrichment by the heavier isotopes.

The stable isotope ratio mass spectrometry (SIRMS) is very good tool for monitoring the nutrient cycle in the nature. Thanks to the cooperation with the Washington state university in Pullman we performed the GC-C-IRMS (gass chromatography-combustion isotope ratio mass spectrometry) measurements of the amino acids isolated from the bear blood samples. The $\delta^{15}\text{N}$ values of the isolated amino acids (alanine, proline, serine, aspartic acid, cystein, glutamic acid, phenylalanine and threonine) from blood and from food were in good correlation. Most of the amino acids isolated from bear blood were enriched by the ^{15}N in comparison to the food. The only measured amino acid which was not enriched was threonine, but it was in good agreement with the other published data. The stable isotopes analyses of amino acids isolated from captured grizzly bears blood can be useful in the future for reconstruction of the behavioral changes caused by environmental intervention.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- BRAGA, J.W.B., TREVIZAN, L.C., NUNES, L.C. et al. 2010. Comparison of univariate and multivariate calibration for determination of micronutrients in pellets of plant materials by laser induced breakdown spectrometry. In *Spectrochimica Acta Part B*. 2010, vol.65, pp. 66-74.
- BUCHARDT, B., BUNCH, V., HELIN, P. 2007. Fingernails and diet: Stable isotope signatures of a marine hunting community from modern Uummannaq, North Greenland. In *Chemical Geology* 2007, vol. 244, pp. 316-329.
- COSTINEL, D., GRECU, V.V., VREMERA, R. et al. 2009. Stable oxygen and hydrogen isotopes measurement by CF-IRMS with applications in hydrology studies. In *Journal of Physics: Conference Series*. 2009, vol. 182, pp.1-4.
- FERREIRA, E., MENEZES, E.A., MATOS, W.O. et al. 2010. Determination of Ca in breakfast cereals by laser induced breakdown spectroscopy. In *Food control*. 2010, vol. 21, pp. 1327-1330.
- FRASER, I. a MEIER-AUGENSTEIN, W. 2007. Stable ^2H isotope analysis of modern-day human hair and nails can aid forensic human identification. In *Rapid Commun, Mass Spectrom*. 2007, vol.21, pp. 3279-3285.
- GALIOVÁ, M., KAISER, J. NOVOTNÝ, K. et al. 2007. Utilization of laser induced breakdown spectroscopy for investigation of the metal accumulation in vegetal tissues. In *Spectrochimica Acta Part B*. 2007, vol.62, pp.1597-1605.
- GONDAL, M.A., SEDDIGI, Y.S., NASR, M.M. et al. 2010. Spectroscopic detection of health hazardous contaminants in lipstick using Laser Induced Breakdown Spectroscopy. In *J. Hazard. Mater*. 2010, vol. 175, pp. 726-732.
- HARE, P.E., FOGEL, M.L., STAFFORD, T.W. et al. 1991. The Isotopic Composition of Carbon and Nitrogen in Individual Amino Acids Isolated from Modern and Fossil Proteins. In *Journal of Archaeological Science* 1991, vol. 18, pp. 277-292.
- HARMON, R.S., REMUS, J., McMILLAN, N.J. et al. 2009. LIBS analysis of geomaterials: Geochemical fingerprint for the rapid analysis and discrimination of minerals. In *Applied Geochemistry*. 2009, vol. 24, pp. 1125 – 1141.
- JASPER, J.P., WESTENBERGER, B.J., SPENCER, J.A. et al. 2004. Stable isotopic characterization of active pharmaceutical ingredients. In *J. Pharmaceut. Biomed*. 2004, vol. 35, pp. 21-30.
- KAISER, J., GALIOVÁ, M., NOVOTNÝ, K. et al. 2009, Mapping of lead, magnesium and copper accumulation in plant tissues by laser-induced breakdown spectroscopy and laser-ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. In *Spectrochimica Acta Part B*. 2009, vol.64, pp.67-73.
- MACLEAN, W.C., PLACKO, R.P. and GRAHAM, G.G. 1979. Postprandial Plasma Free Amino Acid Changes in Preschol Children Consuming Exclusively Rice Protein. In *Jurnal of nutrition*. 1979, vol. 109, pp. 1285-1289.
- MCCLELLAND, J.W. a MONTOYA, J.P. 2002. Trophic relationships and the nitrogen isotopic composition of amino acids in plankton. In *Ecology* 2002, vol. 83, pp. 20173-2180.
- MEIER-AUGENSTEIN, W. 2004. GC and IRMS Technology for ^{13}C and ^{15}N Analysis of Organic Compounds and Related Gases. In *Handbook of Stable Isotope Analytical Techniques vol.1*: Elsevier, 2004, pp. 153-176. ISBN: 0 444 51114 8.
- MEIER-AUGENSTEIN, W.M. a FRASER, I. 2008. Forensic isotope analysis leads to identification of a mutilated murder victim. In *Science and Justice*. 2008, vol. 48, pp. 153-159.

- METGES, C.C. a DAENZER, M. 2000. ^{13}C Gas Chromatography-Combustion Isotope Ratio Mass Spectrometry Analysis of N-Pivaloyl Amino Acid Esters of Tissue and Plasma Samples. In *Analytical Biochemistry*, 2000, vol. 278, pp. 156-164.
- MIZIOLEK A.W., PALLESCHI V., SCHECHTER I. 2006. Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS): Fundamentals and applications. New York: Cambridge University Press, 2006. ISBN-13 978-0-521-85274-6.
- NARDOTO, G.B., SILVA, S., KENDALL, C. et al. 2006. Geographical Patterns of Human Diet Derived from Stable-Isotope Analysis of Fingernails. In *American journal of physical anthropology* 2006, vol. 131, pp. 137-146.
- NOLL, R., STURM, V., AYDIN, U. et al. 2007. Laser-induced breakdown spectroscopy – from research to industry, new frontiers for process control. In *Spectrochimica Acta Part B*. 2007, vol. 63, pp. 1159 – 1166.
- O'CONNELL, T.C.O., HEDGES, R.E.M., HEALY, M.A. et al. 2001. Isotopic Comparison of Hair, Nail and Bone: Modern Analyses. In *Journal of Archaeological Science* 2001, vol. 28, pp. 1247-1255.
- PADOVAN, G.J., RODRIGUES, L.P., LEME, I.A. et al. 2007. Presence of C4 sugars i honey samples detected by the carbon isotope ratio measured by IRMS. In *Eurasian Journal of Analytical Chemistri*. 2007, vol. 2, pp. 134-141.
- PERSSON, J. a NÄSHOLM, T. 2001. A GC-MS method for determination of amino acid uptake by plants. In *Physiologia plantarum*, 2001, vol. 113, pp. 352-358.
- POPP, B.N., GRAHAM, B.S., OLSON, R.J. et al. 2007. Insight into the Trophic Ecology of Yellow Tuna, *Thunnus albacares*, from Compound-Specific Nitrogen Isotope Analysis of Proteinaceous Amino Acids. In *Terrestrial Ecology*. 2007, vol. 1, pp. 173 – 190.
- RUPPENTHAL, M., OELMANN, Y., WILCKE, W. 2010. Isotope ratios of nonexchangeable hydrogen in soils from different climate zones. In *Geoderma*. 2010, vol. 155, pp. 231-241.
- SAMEK, O., BEDDOWS, D.C.S., TELLE, H. H. et al. 2001. Quantitative laser-induced breakdown spectroscopy analysis of calcified tissue samples. In *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2001, vol. 56, pp. 865-875.
- TOGNONI, E., CRISTOFORETTI, G., LEGNAIOLI, S. et al. 2007. A numerical study of expected accuracy and precision in Calibration-Free Laser-Induced Breakdown Spectroscopy... In *Spectrochimica Acta Part B*. 2007, vol. 62, pp. 1287-1302.
- TREVIZAN, L.C., SANTOS, D., SAMAD, R.E. et al. 2008. Evaluation of laser induced breakdown spectroscopy for the determination of macronutrients in plant materials. In *Spectrochimica Acta Part B*. 2008, vol.63, pp. 1151-1158.
- WALTERS, K.A., ABDALGHAFOR, H.M., LANE, M.E. 2012. The human nail – Barrier characterisation and permeation enhancement. In *International Journal of Pharmaceutics* 2012, vol. 435, pp. 10-21.
- YUEH, F.Y., ZHENG, H., SINGH, J.P. et al. 2009. Preliminary evaluation of laser-induced breakdown spectroscopy for tissue classification. In *Spectrochimica Acta Part B*. 2009, vol 64, pp. 1059-1067.

Zoznam publikačnej činnosti

ADC Vedecké práce v zahraničných karentovaných časopisoch

ADC01 Hornáčková, Michaela 19% - Grolmusová, Zuzana 19% - Hornáček, M. 19% - Rakovský, Jozef 19% - Hudec, P. 5% - Veis, Pavel 19%: Calibration analysis of zeolites by laser induced breakdown spectroscopy
Lit. 27 záz.

In: Spectrochimica Acta Part B - Atomic Spectroscopy. - Vol. 74-75 (2012), s. 119-123

[EMSLIBS 2011 : Laser-Induced Breakdown Spectroscopy : Euro-Mediterranean Symposium. Cesme, 11.-15.9.2011]

POZNÁMKA: Vyšlo aj ako abstrakt - EMSLIBS 2011 : Euro-Mediterranean Symposium on Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. - [Cesme] : [IZTECH], 2011. - S. 191. -

Ohlasy (2):

[o1] 2013 Fortes, F. J. - Moros, J. - Lucena, P. - Cabalín, L. M. - Laserna, J. J.: Laser-induced breakdown spectroscopy. In: Analytical Chemistry, Vol. 85, No. 2, 2013, s. 640-669 - SCI ; SCOPUS

[o1] 2013 Hrdlicka, A. - Prokes, L. - Galiova, M. V. - Novotny, K. - Vitesnikova, A. - Helesicova, T. - Kanicky, V.: Provenance study of volcanic glass using 266-1064 nm orthogonal double pulse laser induced breakdown spectroscopy. In: Chemical Papers, Vol. 67, No. 5, 2013, s. 546-555 - SCI

ADF Vedecké práce v domácich nekarentovaných časopisoch

ADF01 Haviarová, Dagmar 50% - Malík, Peter 20% - Grolmusová, Zuzana 20% - Veis, Pavel 5% - Michalko, Juraj 5%: Predbežné výsledky monitorovania izotopového zloženia vôd v Demänovskej doline a jej podzemnom hydrologickom systéme

In: Aragonit. - Roč. 16, č. 1-2 (2011), s. 69-70

ADF02 Michalko, Juraj 16% - Bodiš, Dušan 14% - Malík, Peter 14% - Kordík, Jozef 14% - Fajčíková, Katarína 14% - Grolmusová, Zuzana 14% - Veis, Pavel 14%: Potenciálne zdroje strategických množstiev podzemnej vody v Bratislavskom samosprávnom kraji =Potential sources of strategic amounts of groundwater in the Bratislava region

Lit. 34 záz., 7 obr., 4 tab.

In: Mineralia Slovaca. - Roč. 43, č. 4 (2011), s. 449-462

AED Vedecké práce v domácich recenzovaných vedeckých zborníkoch, monografiách

AED01 Šimera, Michal 20% - Foltin, Viktor 20% - Lettrichová, Ivana 5% - Grolmusová, Zuzana 5% - Morvová, Marcela, st. 15% - Neu, Eva 15% - Foltinová, Janka 20%: Výsledky interdisciplinárneho výskumu olova v placentе indikujú hyperkinetický syndróm u detí

Recenzované

Lit. 10 záz.

In: Aktuality súčasného biomedicínskeho výskumu I. - Bratislava : Asklepios, 2007. - S. 101-105. - ISBN 978-80-7167-120-6

AED02 Grolmusová, Zuzana 50% - Šarišská, Stanislava 30% - Kopáni, Martin 5% - Čaplovičová, Mária 5% - Veis, Pavel 5% - Babál, Pavel 5%: Analýza prvkového zloženia mäkkých tkanív metódou bezkalibračnej laserom-indukovanej breakdown spektroskopie

Lit. 11 záz.

In: Aktuality súčasného biomedicínskeho výskumu V. - Bratislava : Asklepios, 2010. - S. 8-12. - ISBN 978-807167-155-8

AFC Publikované príspevky na zahraničných vedeckých konferenciách

AFC01 Grolmusová, Zuzana 11% - Mináriková, L. - Rakovský, Jozef 11% - Čermák, Peter 11% - Veis, Pavel 11% - Kopáni, Martin - Jakubovský, Ján - Babál, Pavel - Čaplovičová, Mária : Elementar LIBS analysis of biological samples

Lit. 6 záz., 6 obr.

In: WDS 2009: Proceedings of Contributed Papers: Part III Physics of Plasmas and Ionized Media. - Prague : MATFYZPRES, 2009. - S. 189-192. - ISBN 978-80-7378-103-3

[WDS 2009 : Week of Doctoral Students : Annual Conference of Doctoral Students. 18th, Prague, 2.-5.6.2009]

URL: http://www.mff.cuni.cz/veda/konference/wds/contents/pdf09/WDS09_332_f4_Grolmusova.pdf

- AFC02 Plavčan, Jozef 100% - Grolmusová, Zuzana 20% - Rakovský, Jozef 20% - Čermák, Peter 20% - Veis, Pavel 20%: Determinatin of stark broading parameters for O, N from H alpha using laser inducaed breakdown spectroscopy
Recenzované
Lit. 6 záz., 5 obr., 1 tab.
In: WDS 2010: Proceedings of Contributed Papers: Part II Physics of Plasmas and Ionized Media. - Prague : MATFYZPRES, 2010. - S. 101-104. - ISBN 978-80-7378-140-8
[WDS 2010 : Week of Doctoral Students : Annual Conference of Doctoral Students. 19th, Prague, 1.-4.6.2010]
- AFC03 Horňáčková, Michaela 20% - Grolmusová, Zuzana 19% - Rakovský, Jozef 19% - Plavčan, Jozef 19% - Veis, Pavel 19% - Heitz, Johannes 2% - Pedarnig, Johannes D. 2%: Optimization of plasma parameters for preliminary analysis of chromium containing tablety laser induced breakdown spectroscopy
Lit. 13 záz.
In: WDS 2011: Proceedings of Contributed Papers: Part II Physics of Plasmas and Ionized Media. - Prague : MATFYZPRES, 2011. - S. 198-203. - ISBN 978-80-7378-185-9
[WDS 2011 : Week of Doctoral Students : Annual Conference of Doctoral Students. 20th, Prague, 31.5.-3.6.2011]
- AFC04 Grolmusová, Zuzana 16% - Rapčanová, A. 12% - Veis, Pavel 12% - Čech, P. 12% - Michalko, J. 12% - Šivo, Alexander 12% - Richtáriková, Marta 12% - Povinec, Pavel P. 12%: 13C measurements of alpha-cellulose from tree-ring samples using the IRMSspectrometry
Recenzované
Lit. 11 záz., 3 obr.
In: WDS 2012: Proceedings of Contributed Papers: Part III Physics. - Prague : MATFYZPRESS, 2012. - S. 73-76. - ISBN 978-80-7378-226-9
[WDS 2012 : Week of Doctoral Students : Annual Conference of Doctoral Students. 21st, Prague, 29.5.-1.6.2012]
- AFC05 Horňáčková, Michaela 16% - Plavčan, Jozef 15% - Grolmusová, Zuzana 15% - Rakovský, Jozef 15% - Kociánová, Mária 15% - Tóth, Juraj 3% - Porubčan, Vladimír 3% - Svoreň, Ján 3% - Veis, Pavel 15%: Evaluation of minor and trace elements in meteorite"Košice" by calibration - free laser induced breakdown spectroscopy
In: 21st Europhysics Conference on Atomic and Molecular Physics of Ionised Gases: Proceedings [elektronický zdroj]. - Lisbon : Euroepan Physical Society, 2012. - s. P3.12.9 [USB klíč]. - ISBN 2-914771-74-6. - (Europhysics Conference Abstracts ; Vol. 36A)
[ESCAMPIG 2012 : Europhysics Conference on Atomic and Molecular Physics of Ionised Gases. 21st, Viana do Castelo, 10.-14.7.2012]
- AFC06 Horňáčková, Michaela 16% - Grolmusová, Zuzana 12% - Plavčan, Jozef 12% - Kociánová, Mária 12% - Rakovský, Jozef 12% - Veis, Pavel 12% - Hornáček, M. 12% - Hudec, Ladislav 12%: Pre-study of silicon and aluminum containing materials for furtherzeolites CF-LIBS analysis
Recenzované
Lit. 8 záz., 5 obr., 2 tab.
In: WDS 2012: Proceedings of Contributed Papers: Part II Physics of Plasmas and Ionized Media. - Prague : MATFYZPRESS, 2012. - S. 134-139. - ISBN 978-80-7378-225-2
[WDS 2012 : Week of Doctoral Students : Annual Conference of Doctoral Students. 21st, Prague, 29.5.-1.6.2012]
- AFC07 Hulík, J. 16% - Kociánová, Mária 12% - Grolmusová, Zuzana 12% - Horňáčková, Michaela 12% - Plavčan, Jozef 12% - Rakovský, Jozef 12% - Veis, Pavel 12% - Kopáni, Martin 12%: Study of spleen elemental composition using CF-LIBS
Recenzované
Lit. 9 záz., 4 obr.
In: WDS 2012: Proceedings of Contributed Papers: Part III Physics. - Prague : MATFYZPRESS, 2012. - S. 36-39. - ISBN 978-80-7378-226-9
[WDS 2012 : Week of Doctoral Students : Annual Conference of Doctoral Students. 21st, Prague, 29.5.-1.6.2012]

AFC08 Kociánová, Mária 16% - Grolmusová, Zuzana 12% - Plavčan, Jozef 12% - Horňáčková, Michaela 12% - Rakovský, Jozef 12% - Veis, Pavel 12% - Bača, M. 12% - Barta, Peter 12%: Assigning of parts of archaeological bronzeartefacts and their fragments using laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS)
Recenzované
Lit. 13 zázň., 6 obr.
In: WDS 2012: Proceedings of Contributed Papers: Part II Physics of Plasmas and Ionized Media. - Prague : MATFYZPRESS, 2012. - S. 140-145. - ISBN 978-80-7378-225-2
[WDS 2012 : Week of Doctoral Students : Annual Conference of Doctoral Students. 21st, Prague, 29.5.-1.6.2012]

AFC09 Plavčan, Jozef 20% - Horňáčková, Michaela 16% - Grolmusová, Zuzana 16% - Kociánová, Mária 16% - Rakovský, Jozef 16% - Veis, Pavel 16%: Sikhote-Alin meteorite, elemental composition analysis using CF LIBS
Recenzované
Lit. 11 zázň., 4 obr.
In: WDS 2012: Proceedings of Contributed Papers: Part II Physics of Plasmas and Ionized Media. - Prague : MATFYZPRESS, 2012. - S. 123-127. - ISBN 978-80-7378-225-2
[WDS 2012 : Week of Doctoral Students : Annual Conference of Doctoral Students. 21st, Prague, 29.5.-1.6.2012]

AFD Publikované príspevky na domácich vedeckých konferenciách

AFD01 Foltin, Viktor 30% - Martišovitéš, Viktor 30 % - Grolmusová, Zuzana 12, 5% - Rossi, L. 12, 5% - Macko, Peter 5% - Lukáč, Peter 5 % - Veis, Pavel 5%: New pulsed microwave afterglow system-test with Hg-Ar plasma
Lit. 18 zázň.
In: The 3rd Seminar on New Trends in Plasma Physics and Solid State Physics. - Bratislava : Knižničné a edičné centrum FMFI UK, 2007. - S. 25-29. - ISBN 978-80-89186-24-2
[Seminar on New Trends in Plasma Physics and Solid State Physics 2007. 3rd, Bratislava, 4.10.2007]

AFD02 Čermák, Peter 14 % - Földes, Tomáš 14 % - Krištof, Jaroslav 14 % - Rakovský, Jozef 14 % - Grolmusová, Zuzana 14 % - Veis, Pavel 14 % - Macko, Peter 14 %: High resolution and high sensitivity cavity ring-down spectroscopy
Lit. 15 zázň.
In: Contributed Papers of the 5th Seminar on New Trends in Plasma Physics and Solid State Physics. - Bratislava : Knižničné a edičné centrum FMFI UK, 2010. - S. 11-17. - ISBN 978-80-89186-62-4
[New Trends in Plasma Physics and Solid State Physics 2009 : Seminar. 5th, Doľany, 4.10.2009]

AFD03 Plavčan, Jozef 12 % - Grolmusová, Zuzana 12 % - Čermák, Peter 12 % - Jašík, Juraj 12 % - Rakovský, Jozef 12 % - Vojtek, Pavel 12 % - Zábudlá, Zuzana 12 % - Veis, Pavel 12 %: Diagnostics of laser induced breakdown in argon at atmospheric pressure
Lit. 7 zázň.
In: Contributed Papers of the 5th Seminar on New Trends in Plasma Physics and Solid State Physics. - Bratislava : Knižničné a edičné centrum FMFI UK, 2010. - S. 45-50. - ISBN 978-80-89186-62-4
[New Trends in Plasma Physics and Solid State Physics 2009 : Seminar. 5th, Doľany, 4.10.2009]

AFD04 Grolmusová, Zuzana 50% - Plavčan, Jozef 10% - Horňáčková, Michaela 20% - Kociánová, Mária 10% - Veis, Pavel 10%: Silicon wafer as a support material for LIBS bioapplications
Recenzované
Lit. 4 zázň.
In: ELITECH '12 [elektronický zdroj]. - Bratislava : Slovenská technická univerzita, 2012. - [nestr., 2 s.] [CD-ROM]. - ISBN 978-80-227-3705-0
[ELITECH 2012 : Electrical Engineering and Information Technology : Conference of Doctoral Students. 14th, Bratislava, 22.5.2012]

AFD05 Horňáčková, Michaela 19% - Hornáček, M. 19% - Grolmusová, Zuzana 19% - Plavčan, Jozef 19% - Veis, Pavel 19% - Hudec, P. 5%: LIBS - an alternative method for analysis of microporous crystalline materials
Recenzované

Lit. 2 záz. n.

In: ELITECH '12 [elektronický zdroj]. - Bratislava : Slovenská technická univerzita, 2012. - [nestr., 2 s.] [CD-ROM]. - ISBN 978-80-227-3705-0
[ELITECH 2012 : Electrical Engineering and Information Technology : Conference of Doctoral Students. 14th, Bratislava, 22.5.2012]

AFD06 Michalko, Juraj 16% - Bodiš, Dušan 12% - Čech, Peter 12% - Černák, Radovan 12% - Grolmusová, Zuzana 12% - Možiešiková, Katarína 12% - Pažická, Alexandra 12% - Veis, Pavel 12%: Izotopové zloženie sulfátu vo vode Dunaja a Moravy v Bratislave = Isotopecomposition of sulphate in water of Danube and Morava rivers in Bratislava
lit. 16 záz. n., 1 obr., 1 tab.

In: 16. Slovenská hydrogeologická konferencia : Aktuálne hydrogeologické problémy regiónov Slovenska. - Bratislava : Slovenská asociácia hydrogeológov, 2012. - S. 56-59. - ISBN 978-80-971126-0-8
[Slovenská hydrogeologická konferencia 2012. 16., Bardejovské kúpele, 2.-5.10.2012]

AFG Abstrakty príspevkov zo zahraničných konferencií

AFG01 Grolmusová, Zuzana 34% - Plavčan, Jozef 33% - Veis, Pavel 33%: Prvková analýza húb použitím LIBS
In: Sborník 14. česko-slovenské spektroskopické konferencie. - Pardubice : Univerzita Pardubice, 2010. - S. Po-50. - ISBN 978-80-7395-282-2
[Česko-slovenská spektroskopická konferencia 2010. 14., Litomyšl, 31.5.-3.6.2010]

AFG02 Grolmusová, Zuzana 70% - Horňáčková, Michaela 10% - Plavčan, Jozef 5% - Veis, Pavel 5% - Kopáni, Martin 5% - Babál, Pavel 5%: LIBS as a diagnostic tool for human soft tissues
Lit. 3 záz. n.

In: EMSLIBS 2011 : Euro-Mediterranean Symposium on Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. - [Cesme] : [IZTECH], 2011. - S. 164
[EMSLIBS 2011 : Laser-Induced Breakdown Spectroscopy : Euro-Mediterranean Symposium. Cesme, 11.-15.9.2011]

AFG03 Grolmusová, Zuzana 20% - Záhradník, S. 20% - Krištof, Jaroslav 20% - Plavčan, Jozef 20% - Veis, Pavel 20%: Elemental analysis of bone tissues using Laser induced breakdown spectriscopy
In: Regional Biophysics Conference 2012. - Beograd : Družstvo biofizičara Srbije, 2012. - S. 109. - ISBN 978-86-904161-2-7
[RBC 2012 : Regional Biophysics Conference. 6th, Kladovo-Belgrade, 3.-7.9.2012]

AFH Abstrakty príspevkov z domácich konferencií

AFH01 Grolmusová, Zuzana 20% - Michalko, Juraj 20% - Pažická, Alexandra 20% - Černák, Radovan 20% - Veis, Pavel 20%: Stable isotope ratio mass spectrometry of water samples from Dunaj and Morava rivers in Bratislava, Slovakia
In: European Symposium on Atomic Spectrometry 2012 and 20th Slovak-Czech Spectroscopic Conference : Book of Abstracts. - Bratislava : Univerzita Komenského, 2012. - S. 136. - ISBN 978-80-223-3292-7
[ESAS 2012 : European Symposium on Atomic Spectrometry. Tatranská Lomnica, 7.-12.10.2012]
[SCSC 2012 : Slovak-Czech Spectroscopic Conference. 20th, Tatranská Lomnica, 7.-12.10.2012]

Štatistika kategórií (Záznamov spolu: 24):

ADC Vedecké práce v zahraničných karentovaných časopisoch (1)
ADF Vedecké práce v domácich nekarentovaných časopisoch (2)
AED Vedecké práce v domácich recenzovaných vedeckých zborníkoch, monografiách (2)
AFC Publikované príspevky na zahraničných vedeckých konferenciách (9)
AFD Publikované príspevky na domácich vedeckých konferenciách (6)
AFG Abstrakty príspevkov zo zahraničných konferencií (3)
AFH Abstrakty príspevkov z domácich konferencií (1)

Štatistika ohlasov (2):

[o1] Citácie v zahraničných publikáciách registrované v citačných indexoch (2)

25. 4. 2013