AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE

DZIEDZINA nauk ścisłych i przyrodniczych

DYSCYPLINA nauki fizyczne

ROZPRAWA DOKTORSKA

Zastosowanie wybranych metod spektroskopowych w badaniach patofizjologii ludzkich mięśni szkieletowych

Autor: Patrycja Śliż-Szpytma

Promotor rozprawy: prof. dr hab. inż. Marek Lankosz
Drugi promotor: prof. dr hab. Dariusz Adamek

Praca wykonana: Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie, Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej

Kraków, 2025

Oświadczenie autora rozprawy:

Oświadczam, świadoma odpowiedzialności karnej za poświadczenie nieprawdy, że niniejszą pracę doktorską wykonałam osobiście i samodzielnie, oraz że nie korzystałam ze źródeł innych niż wymienione w pracy.

.....

(data, podpis autora rozprawy)

Oświadczenie promotora rozprawy:

Niniejsza rozprawa jest gotowa do oceny przez recenzentów.

.....

(data, podpis promotora rozprawy)

Oświadczenie promotora rozprawy:

Niniejsza rozprawa jest gotowa do oceny przez recenzentów.

.....

(data, podpis promotora rozprawy)

Niniejsza praca została zrealizowana w ramach projektu CRP, G42008, finansowanego przez Międzynarodową Agencję Energii Atomowej (IAEA, nr 23563), projektu CERIC (nr 20197010) oraz projektu RADIATE (nr 21002445).

Część badań zrealizowanych w ramach niniejszej rozprawy została wykonana dzięki pomocy dr hab. Anny Bodzoń-Kułakowskiej oraz dr. Pawła Mielczarka z Zespołu Biochemii i Neurobiologii, kierowanego przez prof. dr. hab. Piotra Sudera na Wydziale Inżynierii Materiałowej i Ceramiki Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie.

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania moim Promotorom:
Panu prof. dr. hab. inż. Markowi Lankoszowi oraz Panu prof. dr. hab. med. Dariuszowi Adamkowi
za opiekę naukową, poświęcony czas oraz merytoryczne wsparcie,
które pomogły mi w realizacji tej rozprawy.

Serdecznie dziękuję prof. dr. hab. Piotrowi Suderowi za możliwość realizacji części
badań w ramach współpracy z zespołem. Szczególne podziękowania kieruję również do
dr hab. Anny Bodzoń-Kułakowskiej oraz dr. Pawła Mielczarka za okazaną pomoc,
wsparcie i merytoryczne zaangażowanie w trakcie prac badawczych.

Szczególne podziękowania kieruję do mojego męża Marcina
za nieocenione wsparcie w chwilach zwątpienia, cierpliwość oraz
nieustanną motywację na każdym etapie powstawania niniejszej rozprawy.

Streszczenie

Mięśnie szkieletowe pełnią nie tylko funkcje mechaniczne, ale także uczestniczą w regulacji wielu procesów metabolicznych. W różnych schorzeniach mięśni takich jak dystrofie czy miopatie obserwuje się zmiany zarówno w składzie molekularnym, jak i pierwiastkowym tkanki. W niniejszej pracy podjęto próbę opisu tych zmian jakie zachodzą w tkankach mięśni na materiale ludzkim - chorych badanych w ramach diagnostyki schorzeń nerwowomięśniowych. Wykorzystano do tego celu materiał pobrany drogą biopsji chirurgicznej, który pierwotnie służył diagnostyce neuropatologicznej, a który wtórnie wykorzystano do badań za pomocą kilku uzupełniających się metod eksperymentalnych. Wykorzystano technikę emisji promieniowania rentgenowskiego wywołaną cząstkami naładowanymi μPIXE (ang. *Micro Particle Induced X-ray Emission*) wspomaganą obrazowaniem za pomocą skaningowej transmisyjnej mikroskopii jonowej STIM (ang. *Scanning Transmission Ion Microscopy*), spektrometrię masową jonów wtórnych MeV SIMS (ang. *Secondary Ion Mass Spectrometry*) oraz metodę spektrometrii masowej z desorpcją/jonizacją laserową wspomaganą matrycą i analizą czasu przelotu jonów MALDI-TOF (ang. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*). Dodatkowo dla metody MALDI została wykonana analiza widm fragmentacyjnych uzyskanych za pomocą metody LIFT (ang. *Laser-Induced Fragmentation Technology*).

Technika μPIXE połączona z mikroskopią STIM umożliwiła ilościowe określenie koncentracji i dystrybucji wybranych pierwiastków (m.in. Ca, K, Fe, Zn) w zachowanym kontekście morfologicznym tkanek ludzkich. Technika MeV SIMS dostarczyła informacji o składzie molekularnym z wysoką rozdzielczością przestrzenną, szczególnie w zakresie lipidów, drobnomolekularnych metabolitów oraz jonów. Uzupełniająca analiza z użyciem MALDI-TOF pozwoliła na identyfikację we włóknach mięśniowych konkretnych cząsteczek lipidowych, głównie z grupy fosfatydylocholin (ang. *Phosphatidylcholines, PC*), z jednoczesnym określeniem ich adduktów ($M+H^+$, $M+Na^+$, $M+K^+$) oraz potwierdzenie struktury na podstawie wykonanej fragmentacji MS/MS.

Wyniki analizy dowiodły, że głównymi cząsteczkami różnicującymi wszystkie badane grupy, były cząsteczki PC. Różniły się one między sobą długością łańcuchów acylowych, liczbą wiązań nienasyconych i rodzajem jonizacji. Takie zmiany mogą wpływać na właściwości błon biologicznych, jak tzw. płynność, zdolność do wiązania jonów oraz na funkcjonowanie białek błonowych. W kontekście mięśni, szczególnie istotne wydają się zależności między składem PC, a transportem jonów wapnia, który odpowiada za prawidłowy skurcz i rozkurcz komórek mięśniowych. Zidentyfikowane zmiany w składzie lipidowym sprzęgały się także z zaburzeniami w rozkładzie pierwiastków, zwłaszcza wapnia, co może odzwierciedlać zaburzenia funkcji siateczki sarkoplazmatycznej. Jest to szczególnie istotne w przypadku schorzeń mięśniowych, gdzie często dochodzi do spadku aktywności ATP-azy i upośledzenia zdolności wiązania

Ca^{2+} [1, 2]. Analiza molekularna i pierwiastkowa umożliwiła lepsze zrozumienie tych zmian, a także wskazała na możliwe markery funkcjonalnego stanu mięśni.

Otrzymane wyniki wskazują, że fosfatydylocholiny mogą odgrywać rolę nie tylko strukturalną, ale i regulacyjną wpływając na metabolizm komórkowy, sygnalizację i adaptację tkanek mięśniowych w stanach chorobowych. Połączenie danych uzyskanych przy użyciu różnych technik analitycznych umożliwiło zarysowanie podejścia, które może wspierać dalsze prace nad lepszym zrozumieniem zmian zachodzących w tkance mięśniowej w stanach patologicznych. Zidentyfikowane różnice molekularne i pierwiastkowe mogą stanowić punkt wyjścia do poszukiwania potencjalnych biomarkerów, jednak wymagają dalszej weryfikacji w większych grupach badawczych i w kontekście klinicznym. Uzyskane wyniki stanowią również, jak się wydaje, obiecujący punkt wyjścia do dalszych badań translacyjnych, które pozwoliłyby na przełożenie zmian w składzie lipidów oraz rozkładzie pierwiastków, na konkretne narzędzia diagnostyczne lub terapeutyczne możliwe do zastosowania w praktyce klinicznej.

Niniejsza praca wskazuje, że wykorzystanie zaawansowanych metod mikroskopowych, spektroskopowych, może być istotnym krokiem w analizie skomplikowanych patomechanizmów stanów chorobowych, jakimi są choroby nerwowomięśniowe.

Abstract

Skeletal muscles not only perform mechanical functions but also play an important role in regulating numerous metabolic processes. In various muscular disorders such as dystrophies and myopathies, alterations are observed in both the molecular and elemental composition of muscle tissue. This study aimed to describe these changes occurring in muscle tissue using human material - i.e. patients examined for the diagnosis of neuromuscular disorders. Material was obtained by surgical biopsy, originally used for neuropathological diagnostics and subsequently used for this research with the use of several complementary experimental methods.

The Micro Particle Induced X-ray Emission μPIXE was used, along with imaging aided by Scanning Transmission Ion Microscopy STIM, Secondary Ion Mass Spectrometry SIMS, and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry MALDI-TOF. Additionally, for the MALDI method, a fragmentation using the Laser-Induced Fragmentation Technology LIFT method was performed.

The μPIXE technique, supported by STIM imaging, enabled the quantitative determination of the concentration and distribution of selected elements (including Ca, K, Fe, and Zn) while preserving the morphological context of the tissue. MeV-SIMS provided high-resolution spatial information on the molecular composition, especially lipids, small-molecular metabolites and ions. The MALDI-TOF analysis allowed for the identification of specific lipid molecules mostly from the group of phosphatidylcholines (PC) including their adduct forms ($M+H^+$, $M+Na^+$, $M+K^+$) and their fragmentation patterns for structural identification.

The results showed that all discriminative peaks between the study groups corresponded to PC species. These molecules varied in acyl chain length, number of unsaturated bonds, and the ionization type. Such differences may influence the physical and chemical properties of biological membranes, including membrane fluidity, ion-binding capacity, and the function of membrane-associated proteins. In muscle tissue, these features are particularly relevant to calcium handling, which is essential for proper contraction and relaxation of muscle fibers. Changes in lipid composition were also found to be associated with alterations in elemental distribution, particularly of calcium, potentially indicating impaired sarcoplasmic reticulum function. This finding is especially relevant in the context of muscular conditions, where decreased ATP-ase activity and reduced calcium-binding capacity are frequently reported. The performed analysis allowed for a better understanding of these dysfunctions thanks to the combination of molecular and elemental analyses, which also suggested possible markers of muscle functional status.

The data obtained suggest that phosphatidylcholine may serve not only a structural role in membranes but also a regulatory one, affecting cellular metabolism, signaling, and tissue adaptation in pathological states. The presented approach may facilitate future studies on the characterization of

pathological changes in skeletal muscle by integrating findings from different analytical methods. While the identified molecular and elemental differences require further validation in larger and clinically diverse study groups, they may provide a foundation for future biomarker discovery. The results also offer a valuable starting point for translational research aiming to link alterations in lipid composition and elemental distribution with practical diagnostic or therapeutic strategies applicable in a clinical setting.

This study indicates that the use of advanced microscopic, spectrometric and spectroscopic methods may be a significant step in analyzing complex pathomechanisms such as those occurring in neuromuscular disorders.

Spis treści

Streszczenie 9

Abstract 11

Spis treści 13

Wstęp 15

1. Mięśnie szkieletowe (poprzecznie prążkowane) 17

1.1. Budowa 17
1.2. Typy włókien mięśni szkieletowych 18

2. Klasyfikacja miopatii i dystrofii mięśniowych: ujęcie patofizjologiczne i morfologiczne 21

2.1. Miopatie pierwotne i wtórne - definicje i podstawy klasyfikacyjne 21
2.2. Problematyka klasyfikacji miopatii zapalnych 22
2.3. Cechy morfologiczne uszkodzenia mięśnia w przebiegu miopatii 22
2.4. Uwagi metodologiczne 23

3. Znaczenie lipidów i pierwiastków w chorobach mięśni 25

3.1. Związek między składem molekularnym tkanek mięśniowych i miopatią oraz dystrofią mięśniową 25
3.2. Lipidom mięśni szkieletowych w miopatiach i dystrofiach mięśniowych. 25
3.3. Rola pierwiastków w patogenezie miopatii i dystrofii mięśniowej 26
3.4. Przyszłość terapii dystrofii mięśniowych: uszczelniacze błonowe jako innowacyjne podejście terapeutyczne 26

4. Teoretyczny zarys wykorzystanych metod badawczych 29

4.1. Protonowa fluorescencja rentgenowska PIXE 29
4.1.1. Wprowadzenie do metody PIXE 29
4.1.2. Mechanizm emisji promieniowania X w metodzie PIXE 30
4.1.3. Mechanizmy relaksacji atomu 30
4.1.4. PIXE jako narzędzie wysokorozdzielczej analizy składu pierwiastkowego tkanek biologicznych 32
4.1.5. Geometria układu detekcyjnego i charakterystyka detektorów promieniowania X 35
4.1.6. Wizualizacja rozkładu pierwiastków - obrazowanie z wykorzystaniem μPIXE 36
4.2. Skaningowa transmisyjna mikroskopia jonowa STIM 37
4.2.1. Zasada działania i charakterystyka metody 37
4.2.2. Zasada fizyczna i model teoretyczny 37
4.2.3. Integracja STIM z metodami spektroskopii jonowej 39
4.2.4. Charakterystyka aparatury STIM w Instytucie Ruđer Bošković 39
4.2.5. Znaczenie w badaniach biologicznych 40
4.3. Spektrometria masowa jonów wtórnych SIMS 41
4.3.1. Rozwój techniki 41
4.3.2. Zasada działania SIMS 41
4.3.3. Wydajność rozpylania jonowego 43
4.3.4. Budowa i działanie układu SIMS 44
4.3.5. Tryby pracy SIMS 46
4.4. Spektrometria masowa z desorpcją i jonizacją laserową z wykorzystaniem matrycy 48
4.4.1. Wprowadzenie do spektrometrii masowej z jonizacją miękką 48
4.4.2. Historia rozwoju techniki MALDI 48
4.4.3. Rola matryc w procesie jonizacji 49

4.4.4. Zarys teoretyczny metody MALDI 51
4.4.5. Złożoność jonizacji w MALDI w świetle danych eksperymentalnych 53
4.4.6. Modele generowania jonów w MALDI 53
4.4.7. IMS - molekularne obrazowanie tkanek przy użyciu spektrometrii mas 54

5. Metodologia pomiarowa 57

5.1. Klasyfikacja próbek 57
5.2. Technika PIXE 57
5.2.1. Preparatyka próbek 57
5.2.2. Wstępne przygotowanie i selekcja obszarów pomiarowych 58
5.2.3. Analiza próbek metodą STIM i identyfikacja włókien 60
5.2.4. Pomiar PIXE i parametry eksperymentu 60
5.2.5. Oprogramowanie i przetwarzanie danych 69
5.2.6. Normalizacja danych pomiarowych 69
5.3. Technika SIMS 70
5.3.1. Preparatyka próbek 70
5.3.2. Wstępne przygotowanie i selekcja obszarów pomiarowych 71
5.3.3. Pomiar SIMS i parametry eksperymentu 71
5.4. Technika MALDI 72
5.4.1. Przygotowanie próbek 72
5.4.2. Specyfikacja pomiarów spektrometrii mas MALDI-TOF 73
5.4.3. Strategia doboru matryc do analizy lipidowej 74
5.4.4. Fragmentacja jonów metodą LIFT w analizie MS/MS 82

6. Wyniki oraz dyskusja 83

6.1. Technika PIXE 83
6.1.1. Obserwacje rozkładów pierwiastkowych 83
6.1.2. Test Kruskala-Wallisa oraz Shapiro-Wilka 83
6.1.3. Test U Manna-Whitney'a 86
6.1.4. Wielowymiarowa analiza dyskryminacyjna (MDA) i Lambda Wilksa 90
6.1.5. Analiza Głównych Składowych (PCA) 92
6.1.6. Wnioski płynące z analizy pierwiastkowej 95
6.2. Technika SIMS 96
6.2.1. Uwagi dotyczące analizy i interpretacji wyników MeV SIMS 96
6.2.2. Kalibracja masowa i skalowanie danych w analizie widm SIMS 97
6.2.3. Ocena założenia wielowymiarowej normalności 99
6.2.4. Statystyka ANOVA 100
6.2.5. Analiza macierzy korelacji Pearsona 102
6.2.6. Analiza PCA oraz LDA 103
6.3. Technika MALDI 109
6.3.1. Analiza MALDI w trybie dodatnim i ujemnym 109
6.3.2. Analiza PLS 111
6.3.3. Fragmentacja MS/MS w trybie dodatnim 117

7. Wnioski 125

Bibliografia 127

Wstęp

W ostatnich latach coraz większe znaczenie przypisuje się badaniom z zakresu tzw. zintegrowanej biologii przestrzennej, łączącej informacje o składzie pierwiastkowym z analizą molekuł biologicznych w kontekście strukturalnym i przestrzennym. Takie podejście umożliwia dokładniejsze zrozumienie złożonych zmian zachodzących w chorobach tkanek, zwłaszcza tam, gdzie liczy się nie tylko obecność określonej cząsteczki, ale również jej rozmieszczenie w mikroskali. W tym kontekście zastosowanie nowoczesnych technik spektrometrycznych, może pozwolić na uzyskanie komplementarnego obrazu zmian zachodzących w ludzkiej tkance mięśniowej.

Mięśnie szkieletowe stanowią jedną z największych pod względem masy tkanek ludzkiego organizmu i odgrywają nie tylko zasadniczą rolę w ruchu i utrzymaniu postawy, ale także w regulacji gospodarki energetycznej, metabolizmu glukozy oraz homeostazy jonowej. Ich prawidłowe funkcjonowanie zależy od precyzyjnej regulacji procesów biochemicznych i strukturalnych, zachodzących zarówno na poziomie komórkowym, jak i subkomórkowym. W stanach patologicznych, takich jak dystrofie mięśniowe czy miopatie, dochodzi do zakłóceń w tych procesach, czego skutkiem mogą być zaburzenia w strukturze i funkcji mięśni. Wciąż jednak brakuje pełnego zrozumienia molekularnych i pierwiastkowych mechanizmów leżących u podstaw tych schorzeń, zwłaszcza u ludzi.

Dzięki użyciu analizy w skali mikrometrycznej, praca ta miała na celu nie tylko wskazanie potencjalnych biomarkerów zmian patologicznych w mięśniach, ale również zaproponowanie podejścia badawczego integrującego dane chemiczne, molekularne i przestrzenne. Dzięki zastosowaniu nowatorskiego zestawu metod możliwe było uzyskanie wglądu w lokalne zmiany biochemiczne, które mogą pozostawać niezauważone m. in. przy tradycyjnych technikach analizy masowej. Zrozumienie roli pierwiastków śladowych oraz molekularnego składu tkanek w procesach patologicznych stanowi obecnie jedno z kluczowych wyzwań współczesnej medycyny, szczególnie w obszarze chorób mięśni. Badanie ich rozlokowania, koncentracji oraz wzajemnych interakcji w obrębie zmienionych chorobowo struktur nie tylko pogłębia naszą wiedzę o biochemicznych mechanizmach leżących u podstaw tych schorzeń, lecz także otwiera drzwi do opracowywania nowatorskich strategii diagnostycznych i terapeutycznych.

Dotychczasowe prace badawcze jednoznacznie wskazują, że zarówno niedobory, jak i nadmiary konkretnych pierwiastków, a także istotne zmiany w składzie molekularnym odzwierciedlają, a co ważniejsze, mają bezpośredni wpływ na zaburzenia metaboliczne, które znacząco determinują przebieg choroby i stan zdrowia pacjentów [3, 4]. Szczególną uwagę zwraca rola lipidów, których zmieniony metabolizm może wpływać na zdolność mięśni do kompensacji skutków utraty unerwienia, zjawiska charakterystycznego dla wieku chorób neurodegeneracyjnych [5].

W realizacji założeń badawczych niniejszej pracy zastosowano zaawansowane techniki spektroskopowe i spektrometryczne, pozwalające na wielopoziomową analizę próbek tkanek mięśniowych.

Wykorzystano spektroskopię emisyjną promieniowania rentgenowskiego wzbudzonego cząstkami naładowanymi μPIXE (ang. *Micro Particle Induced X-ray Emission)* oraz połączoną z nią skaningową transmisyjną mikroskopię jonową STIM (ang. *Scanning Transmission Ion Microscopy*), co umożliwiło ilościowe obrazowanie rozmieszczenia pierwiastków śladowych w zachowanym kontekście morfologicznym. Takie połączenie metod zapewnia wysoką precyzję i miarodajność mapowania elementarnego przy jednoczesnym zachowaniu strukturalnej integralności analizowanej tkanki. Kolejnym zastosowanym narzędziem była spektrometria masowa jonów wtórnych SIMS (ang. *Secondary Ion Mass Spectrometry*), pozwalająca na wnikliwą analizę molekularną, zwłaszcza w zakresie związków o niskiej masie cząsteczkowej, z rozdzielczością przestrzenną sięgającą poziomu submikronowego. Uzupełnieniem analizy molekularnej była technika MALDI (ang. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)*, szczególnie cenna w badaniach ukierunkowanych na skład lipidowy. Metoda ta umożliwiła nie tylko detekcję, ale także charakterystykę strukturalną szerokiego spektrum lipidów w tym fosfolipidów, triglicerydów, sfingolipidów czy cholesterolu [6]. W kontekście analizowanych patologii mięśniowych, takich jak miopatie i dystrofie, zmiany w składzie lipidów mogą wpływać na integralność błon komórkowych oraz mechanizmy odpowiedzialne za ich uszkodzenie i regenerację.

Zastosowanie wyżej wymienionych metod, umożliwiających jednoczesne obrazowanie oraz pomiary spektroskopowe w skali mikro i submikronowej umożliwia wnikliwą ocenę złożonych zmian metabolicznych i degeneracyjnych w przebiegu chorób mięśniowych o różnorodnym podłożu [6, 7]. Dzięki tak zintegrowanemu podejściu możliwe było uchwycenie subtelnych, lecz istotnych, różnic pomiędzy próbkami referencyjnymi a patologicznymi.

1. Mięśnie szkieletowe (poprzecznie prążkowane)

Mięśnie szkieletowe pełnią szereg istotnych funkcji, takich jak umożliwianie poruszania się, stabilizacja postawy, regulacja temperatury ciała, magazynowanie składników odżywczych oraz utrzymanie równowagi jonowej w organizmie [8]. W odróżnieniu od mięśni gładkich i mięśnia sercowego, ich skurcze są kontrolowane przez somatyczny układ nerwowy, co pozwala na świadome sterowanie ich aktywnością. Warto podkreślić, że mięśnie szkieletowe stanowią około 40% masy ciała człowieka. Do narządów tworzonych głównie przez tkankę mięśniową (mięśnie poprzecznie prążkowane) należą także język, przepona. Znajdujemy je również w oczodole (zewnętrzne umięśnienie ruchowe gałki ocznej) oraz w ścianie górnej części przełyku. Ogólnie szacuje się, że mięśnie zawierają od 50% do 75% całkowitej ilości białek organizmu, co podkreśla ich fundamentalne znaczenie dla metabolizmu i prawidłowego funkcjonowania ciała [9].

1.1. Budowa

Aby w pełni zrozumieć mechanizmy funkcjonowania mięśni poprzecznie prążkowanych, kluczowe jest poznanie ich mikrostruktury. Szczególnie przydatna jest jej ocena w przekroju poprzecznym. Jeśli pominąć badania z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej (gdzie wykorzystuje się głównie przekroje wzdłuż osi długiej włókien) diagnostyka histopatologiczna/neuropatologiczna schorzeń mięśni jest oparta na skrawkach wykonywanych na płaszczyźnie poprzecznej względem osi podłużnej włókien. Taka orientacja skrawków umożliwia m. in. wiarygodną ocenę tkanki mięśniowej, w tym w szczególności średnicy włókien, dystrybucji funkcjonalnych typów włókien mięśniowych, ilościowych relacji między włóknami a przedzielającą je tkanką łączną, wszelkich innych znamion patologii np. nacieków zapalnych. Szczególne znaczenie stosowania poprzecznych przekrojów tkwi w tym, że używając sekwencyjnych skrawków można zastosować teoretycznie nieograniczoną liczbą różnych metod diagnostycznych i badawczych z zachowaniem tego samego układu strukturalnego badanej tkanki, co umożliwia porównanie wyników użytych metod w tych samych włóknach mięśniowych. Włókna mięśniowe to cylindryczne struktury o średnicy od 10 μm do 100 μm i długości dochodzącej do kilkudziesięciu centymetrów. Są one podstawowymi jednostkami strukturalnymi mięśnia, a ich kształt w przekroju poprzecznym można określić jako okrągły lub wielokątny. Włókna te są wielojądrowe, a jądra komórkowe, w warunkach prawidłowych, znajdują się peryferyjnie, tuż pod błoną komórkową zwaną sarkolemmą. Sarkolemma pełni funkcję ochronną i umożliwia wymianę jonów, co jest niezbędne do przewodzenia impulsów nerwowych. Co więcej jest podstawową strukturą zapewniającą integralność włókna mięśniowego, a w jej budowanie znajdujemy kluczowe dla zachowania funkcji mięśnia białka takie jak dystrofina, dysferlina, sarkoglikany, dystroglikan

i inne. W tym miejscu warto wspomnieć, że patogeneza większości dystrofii mięśniowych jest związana z genetycznym defektem któregoś z białek strukturalnych sarkolemmy, takich jak wspomniane wyżej.

Każde włókno mięśniowe otoczone jest cienką warstwą tkanki łącznej, zwaną śródmięsną (ang. *endomysium*), która dostarcza włóknom substancji odżywczych za pośrednictwem włośniczek oraz zawiera włókna nerwowe. Włókna mięśniowe są grupowane w pęczki (ang. *fascicles*). W przekroju poprzecznym pęczki mają kształt wielokątny i mogą zawierać od kilku do kilkuset włókien mięśniowych. Pęczki te otoczone są kolejną warstwą tkanki łącznej, znaną również omięsną (ang. *perimysium*), która oddziela je od siebie i stanowi miejsce przebiegu większych naczyń krwionośnych oraz nerwów.

Wnętrze włókna mięśniowego, widoczne w przekroju poprzecznym, ukazuje uporządkowaną strukturę złożoną z miofibryli będących podstawowymi elementami kurczliwymi mięśnia. Miofibryle mają średnicę około 1 - 2 μm i zbudowane są z białek kurczliwych, głównie aktyny i miozyny, ułożonych w funkcjonalne jednostki zwane sarkomerami. W sarkomerach białka takie jak titina, desmina i nebulina pełnią kluczową rolę w utrzymaniu strukturalnej integralności miofibryli.

Mięśnie szkieletowe są bogato unaczynione, co umożliwia dostarczanie tlenu i substancji odżywczych do aktywnie kurczących się włókien co jest kluczowe z punku widzenia prawidłowego funkcjonowania mięśni, tkanki szczególnie zależnej od zaopatrzenia w energię. W śródmięsnej obecne są naczynia włosowate otaczające każde włókno mięśniowe, natomiast w omięsnej i namięsnej (ang. *epimysium*) przebiegają większe naczynia krwionośne. Schematyczne przedstawienie opisanych struktur zostało przedstawione na rysunku 1.1.

Rysunek 1.1 Po lewej przedstawione zostało schematyczne przedstawienie kluczowych struktur mięśnia poprzecznie prążkowanego. Po prawej znajduje się mikroskopowy obraz próbki tkanki mięśniowej barwionej hematoksyliną i eozyną, ukazujący strukturę mięśnia szkieletowego.

1.2. Typy włókien mięśni szkieletowych

Podział włókien mięśniowych na typy można dokonać według kryteriów funkcjonalnych, histochemicznych i biochemicznych. Zgodnie z kryterium funkcjonalnym włókna mięśni szkieletowych

można podzielić na „wolnokurczliwe” (typ I) i „szybkokurczliwe” (typ II). Włókna typu I to włókna wolno kurczące się, charakteryzujące się wysoką odpornością na zmęczenie. Dzięki niskiej prędkości skurczu i niskiej aktywności miozyno-ATP-azy są najlepiej przystosowane do skurczów wytrzymałościowych. Włókna typu IIa to włókna szybko kurczące się, cechujące się wysoką aktywnością miozyno-ATP-azy i większą podatnością na zmęczenie. Zarówno włókna typu I i IIa są określane jako „włókna czerwone” przez wysoką zawartość mioglobiny. Czerpią one energię głównie z fosforylacji oksydacyjnej i obfitują w mitochondria. Włókna typu IIb uzyskują energię głównie na drodze glikolizy i charakteryzują się szybkim tempem skurczu. Są to włókna o największej średnicy, co wynika z wysokiej gęstości białek aktyny i miozyny. Zawierają niewiele mitochondriów i nazywane są „włóknami białymi” ze względu na niską zawartość mioglobiny. ATP pozyskują przede wszystkim z glikolizy beztlenowej, wykazują wysoką aktywność miozyno-ATP-azy i generują największą siłę skurczu jakkolwiek szybko ulegają zmęczeniu. Ze względu na te cechy, grają szczególną rolę podczas krótkotrwałych, intensywnych wysiłków.

Jakkolwiek zasadnicze dwa typy włókien mięśniowych można rozróżnić już w preparatach barwionych hematoksyliną i eozyną, jednak do precyzyjnego różnicowania typów włókien mięśniowych stosuje się w szczególności metody histochemiczne wykrywające aktywność ATP-azową w różnym pH. I tak włókna typu I wykazują wysoką aktywność ATP-azową w pH 4,2. W przeciwieństwie do nich włókna typu II wykazują aktywność ATP-azową przy pH 9,4. Wpośród innych metod identyfikacji typów włókien warto wspomnieć także o wykorzystaniu izoform miozyny tzw. myosin fast i myosin slow wykrywanych metodą immunohistochemiczną. Funkcjonalne różnice między typami włókien są jak widać związane różnicami w ich metabolizmie i immunoekspresji białek. Co jednak szczególnie istotne mogą one odmiennie zachowywać się w zależności od charakteru patologii np. charakterystyczny selektywny zanik włókien typu II występuje jako skutek uboczny kortykosterydoterapii. Z kolei np. w zaniku neurogennym mięśnia (w wyniku odnerwienia) obserwujemy grupowanie się typów włókien i ich grupowy zanik.

2. Klasyfikacja miopatii i dystrofii mięśniowych: ujęcie patofizjologiczne i morfologiczne

Ze względu na podobieństwo objawów klinicznych w szerokim spektrum chorób mięśniowych o zróżnicowanej etiologii, najczęściej stosowana klasyfikacja miopatii dzieli je na dwie główne grupy: miopatie pierwotne oraz miopatie wtórne [10]. Taki podział uwzględnia zasadnicze mechanizmy patogenetyczne oraz charakter zmian histopatologicznych w obrębie tkanki mięśniowej, co ma kluczowe znaczenie zarówno w diagnostyce różnicowej, jak i w ustalaniu strategii terapeutycznych. Choroby nerwowo-mięśniowe (ang. *neuromuscular diseases,* NMD) stanowią szeroką i heterogenną grupę zaburzeń, obejmującą zarówno etiologie genetyczne, jak i nabyte [11–13]. Charakteryzują się one szerokim zakresem cech klinicznych, morfologicznych i molekularnych, a ich dynamika i przebieg mogą być zróżnicowane [12, 14]. Diagnostyka NMD może wymagać wykonania biopsji mięśniowej, która często związana jest z koniecznością zastosowania wieloaspektowej interpretacji zmian, co jest w dużej mierze procesem subiektywnym i trudnym do oceny ilościowej i co stanowi wyzwanie w praktyce klinicznej [15].

2.1. Miopatie pierwotne i wtórne - definicje i podstawy klasyfikacyjne

Gdy mówimy o miopatiach mamy na myśli schorzenia dotyczące mięśni prążkowanokomórkowych (dotyczy to również mięśnia serca), natomiast w obręb tego pojęcia nie wchodzi patologia mięśni gładkich. Przy założeniu, że pojęcie miopatii jest najszerszym zakresowo określeniem schorzeń dotyczących mięśni to należy/można w nich rozróżnić np. dwie zasadnicze kategorie: miopatie pierwotne i wtórne. Do miopatii pierwotnych zaliczamy te schorzenia, w których mięśnie szkieletowe stanowią główny lub jedyny organ dotknięty procesem patologicznym i co za tym idzie są główną przyczyną dolegliwości i skutków klinicznych. Do szczególnej grupy miopatii pierwotnych należą dystrofie mięśniowe, które mają podłoże genetyczne i charakteryzują się stopniowym oraz postępującym w czasie uszkodzeniem tkanek mięśniowych. Głównym mechanizmem uszkodzeń jest w tym przypadku defekt białek, które stabilizują błonę komórkową mięśnia podczas skurczu. Uszkodzenie takich struktur, jak błona sarkolemmy ewentualnie w niektórych przypadkach otoczki jądrowej (nukleolemmy), prowadzi do zaburzenia przekazywania siły skurczu, co w konsekwencji powoduje degenerację i martwicę włókien mięśniowych. Z czasem pojawia się ich regeneracja, jednak proces ten jest niewystarczający, by zapobiec postępującemu osłabieniu mięśni [16–18]. Natomiast miopatie wtórne to grupa chorób będących wynikiem wpływu czynników zewnętrznych, takich jak [19]:

- toksyczne (np. polekowe),

- endokrynologiczne (np. niedoczynność tarczycy, hiperkortyzolemia),
- immunologiczne (np. zapalne miopatie autoimmunologiczne),
- neurogenne (np. zanik mięśni wskutek odnerwienia),
- metaboliczne (np. choroby mitochondrialne, glikogenozy),
- lub związane z uszkodzeniem złącza nerwowo-mięśniowego (np. miastenia rzekomoporaźna).

Uszkodzenie mięśni w tych przypadkach wynika z wpływu innych procesów patologicznych, które prowadzą do osłabienia mięśni lub ich zaniku [20].

2.2. Problematyka klasyfikacji miopatii zapalnych

Szczególne trudności klasyfikacyjne dotyczą miopatii zapalnych, w których obecność nacieków zapalnych w mięśniu często współistnieje z patologią ogólnoustrojową. Zmiany zapalne, które przede wszystkim charakteryzują się naciekami limfocytarnymi ale również makrofagów a niekiedy także granulocytów w mięśniach są często obecne w autoimmunologicznych chorobach tkanki łącznej, takich jak twardzina czy toczeń rumieniowaty układowy. W takich przypadkach mięsień może być jedynie jednym z wielu narządów zajętych procesem autoimmunologicznym, co prowadzi do przypisania choroby raczej do kategorii układowych chorób tkanki łącznej [20].

2.3. Cechy morfologiczne uszkodzenia mięśnia w przebiegu miopatii

Typowe zmiany patologiczne w mięśniach odzwierciedlające zniszczenie komórek i tkanek w wyniku miopatii obejmują atrofię lub przerost włókien mięśniowych, martwicę włókien mięśniowych, obecność wtrętów cytoplazmatycznych (obecność nietypowych struktur lub substancji w cytoplazmie komórki, które mogą być wynikiem różnych procesów patologicznych), regenerację włókien (bazofilia z powodu wysokiej zawartości RNA), internalizację jąder, nacieki zapalne, podwyższenie poziomu enzymów w surowicy takich jak kinaza kreatynowa (stanowią one wskaźnik uszkodzenia komórek mięśniowych). Zmiany te odzwierciedlają destrukcję tkanki mięśniowej, a ich efektem jest utrata funkcji. Opisane procesy mogą prowadzić do zastąpienia tkanki mięśniowej przez tkankę tłuszczową i łączną, co może być widoczne na poziomie histologicznym jako włóknienie (ang. *fibrosis*) i otłuszczenie (ang. *lipomatosis*) (często w literaturze określane także jako *fatty replacement*) [21]. Włóknienie jest procesem patologicznym, w którym dochodzi do nadmiernej produkcji włókien kolagenowych, prowadzących do zgrubienia i stwardnienia tkanek, natomiast otłuszczenie jest stanem, w którym komórki tłuszczowe gromadzą się w tkance mięśniowej, co może prowadzić do dodatkowego osłabienia funkcji mięśni.

W przebiegu miopatii i dystrofii mięśniowych obserwuje się uważane za mniej lub bardziej charakterystyczne zjawiska histopatologiczne takie jak:

- silne zróżnicowanie średnicy włókien mięśniowych, które są oceniane w preparatach histologicznych krojonych w płaszczyznach poprzecznych do długiej osi włókien,
- obecność włókien atroficznych jak również hypertroficznych,
- zwiększenie ilości endomysium,
- przemieszczenie jąder do wnętrza włókna (tzw. internalizacja), które w prawidłowych warunkach znajduje się tuż pod sarkolemmą,
- fragmentacja miofilamentów i rozmycie prążkowania poprzecznego, co prowadzi do zaburzenia strukturalnej integralności włókien mięśniowych, wpływając na ich zdolność do skurczu,
- tzw. combing (tłumaczone jako przeczesanie lub wyczesanie), czyli odseparowanie wewnątrzkomórkowych struktur aparatu kurczliwego mięśni, które powoduje utratę wyraźnej organizacji miofibryli co jest wynikiem rozdzielenia miofilamentów głównie przez glikogen,
- obecność tzw. włókien wielokątnych (ang. *angulated fibers*), które przyjmują nieregularny, wielokątny kształt w wyniku zaniku mięśni, występują one szczególnie w zanikach neurogennych,
- tzw. nagie jądra, które pozostają w mięśniach w końcowym etapie zaniku.

Należy wspomnieć, że zakres zmian morfologicznych w mięśniach jest znacznie szerszy. Wyżej opisane przykłady zmian to te, które można zaobserwować w mikroskopie świetlnym w barwieniu hematoksyliną i eozyną lub (w przypadku włókien „wyczesanych") w mikroskopie elektronowym. W ocenie histopatologicznej bierze się pod uwagę również wiele innych wykładników zmian patologicznych, które można ujawnić stosując metody histochemiczne i immuhistochemiczne takich jak aktywność ATP-azowa, czy też odczyn immunohistochemiczny na białko dystrofiny, co zostało szerzej opisane w rozdziale 2.4.

2.4. Uwagi metodologiczne

Diagnostyka neuropatologiczna miopatii obejmuje szereg specjalistycznych badań, które pozwalają na identyfikację, klasyfikację oraz ocenę zaawansowania chorób mięśniowych. Do kluczowych metod należą:

- badania histopatologiczne (barwienia hematoksyliną i eozyną, trichrome wg. Gomoriego), które umożliwiają ocenę ogólnej struktury mięśni, ujawniają zanik włókien, włóknienie, zwyrodnienia, nacieki zapalne, czy zmiany w rozmieszczeniu jąder komórkowych,
- badania histochemiczne dotyczące aktywności enzymatycznej takich enzymów jak ATP-azy, oksydaza cytochromowa (ang. *cytochrome oxidase*, COX), dehydrogenaza bursztynowa (ang.

succinate dehydrogenase , SDH), które pozwalają na analizę metabolizmu komórek mięśniowych, w szczególności rozróżnienie typów włókien mięśniowych i oceny funkcji mitochondriów,

- barwienia immunohistochemiczne (dystrofina, desmina, sarkoglikany itp.), które służą do wykrywania obecności i rozmieszczenia białek strukturalnych, których niedobór lub nieprawidłowa budowa jest charakterystyczna dla określonych rodzajów miopatii.

W chwili obecnej coraz większego znaczenia nabiera analiza genetyczna, która umożliwia identyfikację mutacji w genach odpowiedzialnych za dziedziczne postacie miopatii, co ma kluczowe znaczenie dla diagnozy, rokowania i poradnictwa genetycznego.

Materiał biopsyjny pod względem neuropatologicznym można zakwalifikować do następujących kategorii [16]:

- dystrofie mięśniowe, które obejmują wrodzone choroby genetyczne prowadzące do postępującego uszkodzenia i zaniku mięśni,
- miopatie - jako niespecyficzna (jeśli pominąć tzw. idiopatyczne miopatie zapalne) szeroko pojęta grupa zmian patologicznych, które jednak nie odpowiadają jednoznacznie żadnej dobrze zdefiniowanej jednostce chorobowej,
- biopsje negatywne, w których nie stwierdzono uchwytnych zmian morfologicznych w próbce, co jednak i co bardzo istotne nie wyklucza obecności choroby; m. in. z tego powodu w takich przypadkach istnieje potrzeba znalezienia niestandardowych metod nowatorskich, które mogłyby ujawnić niedostrzegalne w standardowej metodologii zmiany patologiczne.

Zgodnie w powyższym, na potrzeby niniejszej rozprawy starano się zakwalifikować materiał z biopsji mięśniowych do jednej z trzech głównych kategorii: dystrofii, miopatii oraz próbek, które nie wykazywały zmian patologicznych. Ocena neuropatologiczna opierała się na badaniu mikroskopowym z wykorzystaniem standardowych metod histologicznych, histochemicznych oraz immunohistochemicznych. Podziału analizowanych próbek dokonano na podstawie formalnych diagnoz neuropatologicznych, przygotowanych na podstawie zanonimizowanych raportów patomorfologicznych.

3. Znaczenie lipidów i pierwiastków w chorobach mięśni

3.1. Związek między składem molekularnym tkanek mięśniowych i miopatią oraz dystrofią mięśniową.

Badania nad składem molekularnym tkanek mięśniowych w kontekście miopatii i dystrofii pozwalają lepiej zrozumieć, w jaki sposób zmiany w zawartości lipidów oraz określonych pierwiastków wpływają na integralność strukturalną i funkcjonalną mięśni. Zjawisko to ma szczególne znaczenie w kontekście dysfunkcji sarkolemmy, cytoszkieletu oraz macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *extracellular matrix,* ECM), które odgrywają kluczową rolę w patogenezie miopatii i dystrofii mięśniowych [22, 23].

Analiza składu lipidowego i pierwiastkowego tkanek mięśniowych może dostarczyć cennych informacji na temat molekularnych podstaw tych zaburzeń. Szczególnie ważne jest poddanie analizie zmian w profilach lipidowych i pierwiastkowych w kontekście procesów degeneracyjnych mięśni, ponieważ mogą one nie tylko wskazywać na obecność patologii na poziomie komórkowym, ale także ujawniać mechanizmy, które mogłyby stać się potencjalnym celem terapii.

Interwencje ukierunkowane na regulację lipidów błonowych lub modulację poziomu wybranych pierwiastków, których celem jest stabilizacja błon komórkowych i poprawa zdolności regeneracyjnych mięśni, mogą znacząco poszerzyć obecną wiedzę na temat miopatii i dystrofii mięśniowych [24].

3.2. Lipidom mięśni szkieletowych w miopatiach i dystrofiach mięśniowych.

Lipidom odnosi się do zbioru wszystkich lipidów obecnych w komórkach, tkankach lub organizmach, obejmującego różnorodne klasy lipidów, takie jak fosfolipidy, glikolipidy, sterole oraz triglicerydy. Pełnią one kluczowe funkcje w strukturze błon komórkowych, przechowywaniu energii, sygnalizacji komórkowej oraz regulacji procesów biologicznych. W kontekście tkanek mięśniowych skład lipidowy, w tym profil fosfolipidów, glikolipidów, cholesterolu oraz innych związków lipidowych, ma fundamentalne znaczenie dla stabilności błon komórkowych, ich elastyczności oraz funkcji przekazywania sygnałów międzykomórkowych. Zaburzenia w tym zakresie mogą prowadzić do pogorszenia strukturalnej integralności sarkolemmy, co jest jednym z podstawowych mechanizmów prowadzących do dystrofii mięśniowych. Niedobory lub nadmiar specyficznych lipidów, a także zmiany w składzie fosfolipidów, mogą zaburzać interakcje białek transbłonowych z ECM oraz cytoszkieletem. W rezultacie dochodzi do osłabienia mechanizmów związanych z przekazywaniem sił i sygnałów mechanicznych, co pogarsza

funkcje mięśniowe [25]. Zrozumienie tych procesów na poziomie molekularnym może dostarczyć cennych wskazówek dotyczących potencjalnych celów terapeutycznych w leczeniu miopatii i dystrofii mięśniowych.

3.3. Rola pierwiastków w patogenezie miopatii i dystrofii mięśniowej

Pierwiastki, takie jak wapń, magnez, potas, sód oraz pierwiastki śladowe (np. cynk, miedź, żelazo), pełnią kluczowe funkcje w regulacji procesów enzymatycznych, równowagi jonowej oraz mechanizmach przekazywania sygnałów w komórkach mięśniowych (cynk [26, 27], miedź [28, 29], żelazo). Zaburzenia w homeostazie wapnia mogą prowadzić do nieprawidłowej aktywacji enzymów, co przyspiesza degenerację mięśni [30, 31]. Ponadto, zmiany w składzie pierwiastkowym w obrębie tkanek mięśniowych mogą wskazywać na pierwotne mechanizmy patogenne miopatii, takie jak nieprawidłowe zarządzanie reakcjami redoks, które wpływają na stabilność błon komórkowych i ich funkcjonalność [32].

Badania nad włóknami mięśniowymi wykazały, że pierwiastki takie jak wapń, miedź, potas, chlor i siarka mają statystycznie istotny wpływ w analizach dyskryminacyjnych, pomagających różnicować dystrofię, miopatię oraz próbki referencyjne [33, 34]. Przeanalizowanie tych składników może więc stanowić klucz do zrozumienia podstaw miopatii i dystrofii mięśniowych.

3.4. Przyszłość terapii dystrofii mięśniowych: uszczelniacze błonowe jako innowacyjne podejście terapeutyczne

Pomijając nowatorskie terapie genowe, co do których skuteczności nadal niewystarczająco dużo wiemy, a które są z pewnością są niezwykle kosztowne oraz posiadają silnie restrykcyjne wskazania [35, 36]; na dzień dzisiejszy nie istnieją realnie dostępne opcje leczenia dla pacjentów cierpiących na dystrofie mięśniowe. Pomimo to pojawiają się badania wskazujące na obiecujący potencjał uszczelniaczy błonowych, jako nowej klasy środków terapeutycznych, które mogą skutecznie ograniczać lub nawet zapobiegać postępującym uszkodzeniom komórkowym zachodzącym w dystrofiach mięśniowych [37]. Niestety, najbardziej efektywne stężenia uszczelniaczy błonowych nie są dobrze tolerowane przez zdrowych ochotników nawet w krótkoterminowych badaniach [38]. Jednocześnie pacjenci z dystrofią mięśniową wymagają długotrwałej terapii, ponieważ skuteczność tych substancji zależy od ich obecności w momencie uszkodzenia błony komórkowej.

Zrozumienie równowagi między uszkodzeniem błony a jej naprawą może zapewnić wgląd w różnorodne etapy penetracji w różnych chorobach mięśni oraz pomóc w opracowaniu bardziej skutecznych strategii terapeutycznych [39].

Podsumowując, badania nad molekularnym składem tkanek mięśniowych w kontekście miopatii i dystrofii mięśniowych stanowią kluczowy element w poszukiwaniach nowych możliwości terapeutycznych. Zrozumienie roli lipidów, pierwiastków oraz ich interakcji z białkami strukturalnymi i matrycą zewnątrzkomórkową otwiera nowe perspektywy w leczeniu tych niejednokrotnie nieuleczalnych schorzeń.

4. Teoretyczny zarys wykorzystanych metod badawczych

4.1. Protonowa fluorescencja rentgenowska PIXE

4.1.1. Wprowadzenie do metody PIXE

Metoda pomiarowa emisji promieniowania rentgenowskiego wzbudzonej cząstkami naładowanymi PIXE należy do grupy metod spektroskopii emisyjnej. Jest to metoda pokrewna do powszechnie stosowanej w naukach przyrodniczych oraz przemyśle techniki fluorescencji rentgenowskiej (ang. *X-ray Fluorescence,* XRF). Obie techniki opierają się na detekcji tzw. charakterystycznego promieniowania rentgenowskiego emitowanego w wyniku deekscytacji atomów badanego materiału. Cechą wspólną obu technik jest wykorzystanie unikalnych dla każdego pierwiastka linii emisyjnych, co umożliwia jednoznaczną identyfikację i ilościową analizę składu chemicznego próbki.

W metodzie PIXE wzbudzenie atomów zachodzi w wyniku oddziaływania wysokoenergetycznych cząstek naładowanych (najczęściej protonów o energiach rzędu kilku MeV) z materiałem próbki, poprzez bombardowanie jej powierzchni. Na tle innych metod analitycznych, PIXE wyróżnia się wyjątkowo wysoką czułością w detekcji pierwiastków śladowych, osiągając poziom detekcji stężeń rzędu ppm (ang. *parts per million*), a nawet ppb (ang. *parts per billion*). Dodatkowo, technika ta umożliwia analizę szerokiego zakresu pierwiastków (dla $Z > 10$), co czyni ją narzędziem uniwersalnym zarówno w badaniach materiałowych, biologicznych, jak i środowiskowych.

Metoda PIXE została po raz pierwszy eksperymentalnie zaprezentowana przez zespół Thomasa Johanssona z Uniwersytetu w Lund (Szwecja) w 1970 roku [40]. Badania dotyczyły detekcji pierwiastków śladowych w próbkach zawierających roztwór soli miedzi osadzony na folii węglowej bombardowanych protonami o energii 1,5 MeV. Zastosowanie wysokorozdzielczego, wielokanałowego detektora półprzewodnikowego Si(Li) pozwoliło na rejestrację promieniowania rentgenowskiego o bardzo niskiej intensywności, emitowanego przez pierwiastki o masie rzędu 10^{-12} g. W kolejnych latach metoda ta była sukcesywnie rozwijana. W celu optymalizacji czułości i zakresu analizowanych pierwiastków rozszerzono typ stosowanych cząstek wzbudzających (np. o cząstki α, czy ciężkie jony), a także udoskonalono systemy detekcji. Przeglądowy artykuł Johanssona z 1976 roku [41] potwierdził potencjał tej techniki, wskazując na jej wysoką selektywność pierwiastkową oraz nieniszczący charakter analizy.

Współcześnie, metoda PIXE znajduje zastosowanie również w badaniach konserwatorskich np. w analizie warstw pigmentowych obrazu *Madonna dei fusi* Leonarda da Vinci [42]. Zastosowanie wiązki protonów o energiach w zakresie 1,2 - 2,8 MeV pozwoliło na otrzymanie charakterystyki kolejnych warstw malarskich wspomnianego obrazu, dostarczając cennych informacji o składzie chemicznym zastosowanych pigmentów i materiałów barwnikowych bez narażenia na zniszczenie badanych struktur. Uniwersalność,

wysoka czułość oraz wyjątkowy potencjał metody PIXE znajdują potwierdzenie także w najnowszych osiągnięciach badawczych realizowanych we współpracy z Ruđer Bošković Institute RBI (Zagrzeb, Chorwacja), który jest przodującym ośrodkiem wyposażonym w akceleratory cząstek, umożliwiające precyzyjne wykorzystanie wiązek protonów oraz innych cząstek naładowanych o energiach rzędu kilku MeV [43–46].

4.1.2. Mechanizm emisji promieniowania X w metodzie PIXE

Zasadniczy mechanizm metody PIXE opiera się na jonizacji wewnętrznych powłok elektronowych atomów i generacji charakterystycznego promieniowania rentgenowskiego w wyniku oddziaływania wysokoenergetycznych cząstek naładowanych (np. protonów, cząstek alfa, ciężkich jonów) z materią. Cząstki te, przemieszczając się przez materiał próbki, oddziałują głównie elektrostatycznie (kulombowsko) z elektronami, co może skutkować wybiciem elektronu z jednej z wewnętrznych powłok elektronowych atomu (najczęściej K lub L). Schematyczna ilustracja tego zjawiska przedstawiona została na rysunku 4.1 znajdującego się w kolejnym rozdziale. W konsekwencji skutkuje to powstaniem wakansu i tym samym przejścia atomu w stan wzbudzony. Innymi słowy, prowadzi to do jego jonizacji. Aby powrócić do najniższego możliwego poziomu energetycznego (stanu podstawowego), elektron z wyższej powłoki musi przejść na powłokę z deficytem elektronowym. Różnica energii między tymi poziomami zostaje uwolniona w postaci promieniowania rentgenowskiego o charakterystycznej energii, specyficznej dla danego pierwiastka. Proces ten nazywany jest fluorescencją rentgenowską.

W zależności od pary powłok biorących udział w przejściu wyróżnia się charakterystyczne linie spektralne. Przykładowo, jeśli luka powstaje w powłoce K i zostaje wypełniona przez elektron z powłoki L, emitowana jest linia Kα. W przypadku tego przejścia, subtelne różnice energetyczne między podpowłokami L_3 ($2p_{3/2}$) i L_2 ($2p_{1/2}$) skutkują powstawaniem dwóch odrębnych linii: $K\alpha_1$ oraz $K\alpha_2$. Gdy elektron pochodzi z powłoki M, zgodnie z notacją Siegebahna mamy do czynienia z promieniowaniem linii Kβ, charakteryzującym się niższą intensywnością. W zależności od konkretnej podpowłoki wyróżnia się przejścia $K\beta_1$ - $K\beta_3$. Analogiczna klasyfikacja dotyczy również sytuacji, gdy elektron zostaje wybity z powłoki L, co może mieć miejsce, gdy energia wiązki bombardującej jest niższa niż energia wiązania powłoki K [47].

4.1.3. Mechanizmy relaksacji atomu

Proces deekscytacji atomu wzbudzonego w wyniku wybicia elektronu z wewnętrznej powłoki może przebiegać na różne sposoby. Najczęściej rozważanym mechanizmem jest emisja fotonu charakterystycznego promieniowania rentgenowskiego, jednak nie jest to jedyna możliwa droga relaksacji. Alternatywnym procesem, konkurencyjnym wobec fluorescencji rentgenowskiej, jest emisja elektronu Augera. Jest to zjawisko, w którym nadmiar energii uwalniany podczas przejścia elektronu z wyższej

powłoki przekazywany jest nie w postaci emisji fotonu, lecz poprzez przekazanie tej energii innemu elektronowi, w wyniku czego zostaje on wybity z atomu. Oba mechanizmy przedstawiono schematycznie na rysunku 4.1. Emisja elektronu Augera ma miejsce wyłącznie wewnątrz atomu i nie generuje bezpośrednio promieniowania X, co sprawia, że jest procesem „cichym" z punktu widzenia detekcji fotonów. Równocześnie mechanizm ten istotnie wpływa na całkowitą wydajność fluorescencji oraz interpretację widma.

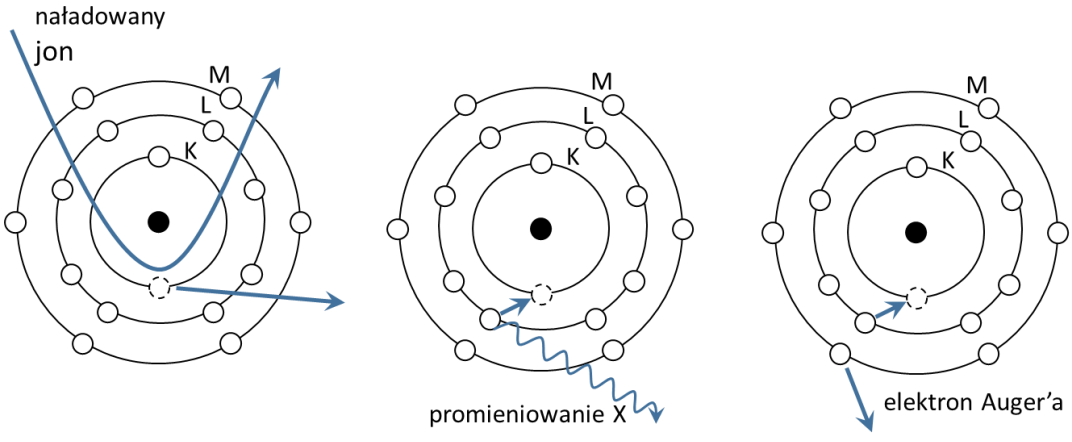
Wydajność fluorescencji ω (ang. *fluorescence yield*) definiowana jest jako stosunek prawdopodobieństwa emisji promieniowania rentgenowskiego do całkowitego prawdopodobieństwa deekscytacji atomu. Parametr ten jest silnie zależny od liczby atomowej pierwiastka i może zostać opisany za pomocą następującej zależności:

$$\omega = \frac{Z^4}{D + Z^4}\,, \tag{1}$$

gdzie: Z to liczba atomowa pierwiastka, D jest to stała zależna od rodzaju linii spektralnej i przyjmuje wartość około 10^6 dla linii K oraz około 10^8 dla linii L [48].

Co więcej, dla pierwiastków o niskim Z (np. C, N, O) emisja Augera jest procesem dominującym, natomiast dla pierwiastków ciężkich (Z > 30) prawdopodobieństwo emisji promieniowania X wzrasta znacząco, osiągając wartości bliskie 100% [47].

Mechanizmy jonizacji materii przez cząstki punktowe (np. protony) oraz ciężkie jony, a także związane z nimi procesy deekscytacji atomu i emisji promieniowania charakterystycznego, zostały szczegółowo opisane w klasycznym przeglądzie autorstwa Johanssona [41]. Przegląd ten podkreśla także zależności ilościowe między intensywnością sygnału fluorescencji a parametrami wiązki jonowej oraz charakterystyką analizowanego materiału.



Rysunek 4.1 Schemat jonizacji powłoki wewnętrznej wywołanej bombardowaniem protonami (po lewej), a także następującej po niej emisji promieniowania rentgenowskiego (środek) lub emisji elektronów Augera (po prawej).

W przypadku pierwiastków o niskiej liczbie atomowej, takich jak pierwiastki biogenne (np. P, S, Cl), dominującym mechanizmem deekscytacji jest emisja Augera, co ogranicza intensywność promieniowania rentgenowskiego i tym samym obniża czułość detekcji w metodzie PIXE. To ograniczenie należy uwzględniać podczas interpretacji danych spektroskopowych. Niemniej jednak, poprzez odpowiedni dobór energii wiązki wzbudzającej, czasu akwizycji oraz konfiguracji układu pomiarowego, możliwe jest uzyskanie obiektywnych wyników również dla pierwiastków lekkich.

4.1.4. PIXE jako narzędzie wysokorozdzielczej analizy składu pierwiastkowego tkanek biologicznych

Technika PIXE opiera się na emisji charakterystycznych kwantów promieniowania rentgenowskiego, powstających wskutek wzbudzenia atomów próbki przez naładowane cząstki. Metoda ta pozwala na precyzyjną, nieinwazyjną analizę składu pierwiastkowego różnorodnych materiałów, w tym tkanek biologicznych, bez konieczności niszczenia ich integralności.

Jedną z nieodzownych zalet metody emisji promieniowania rentgenowskiego wzbudzonej naładowanymi cząstkami jest zastosowanie cząstek o masie, której wartość znacząco przewyższa masę elektronu (np. protonów lub cząstek α). Prowadzi to do relatywnie niewielkich strat energii kinetycznej podczas ich penetracji przez materię, w porównaniu do elektronów, co ogranicza zakłócenia trajektorii wiązki i minimalizuje emisję promieniowania hamowania (niem. *Bremsstrahlung*), które jest głównym źródłem tła o ciągłym widmie w spektroskopii rentgenowskiej. Typowo wykorzystywane źródło wzbudzające w metodzie PIXE stanowi wiązka cząstek o energiach rzędu 1 - 3 MeV, przy czym dla protonów optymalna efektywność wzbudzenia przypada na energię około 3 MeV [47].

W ogólnym przypadku, liczba fotonów charakterystycznego promieniowania X emitowanych przez i-ty pierwiastek w kierunku detektora wyraża się wzorem [49]:

$$Y_i = Q \cdot e \cdot \int_0^d c(x) \cdot \sigma_i\big(E(x)\big) \cdot e^{-\frac{\mu x}{cos\theta}} dx, \tag{2}$$

gdzie:

- Y_i - liczba emitowanych fotonów charakterystycznego promieniowania rentgenowskiego dla i-tego pierwiastka w kierunku detektora,
- Q - całkowity ładunek padającej wiązki na próbkę,
- e - ładunek elementarny,
- $c(x)$ - koncentracja i-tego pierwiastka w próbce jako funkcja głębokości,
- $\sigma_i\big(E(x)\big)$ - przekrój czynny na produkcję promieniowania X dla i-tego pierwiastka, zależny od energii cząstek $E(x)$ w głębokości x,
- μ - liniowy współczynnik tłumienia promieniowania rentgenowskiego w materiale próbki,

- θ - kąt pomiędzy kierunkiem detekcji promieniowania a normalną do powierzchni próbki,
- d - maksymalna głębokość penetracji cząstek w próbce.

Źródłem ciężkich jonów wykorzystywanych w technikach spektroskopowych może być na przykład duoplasmatron. Jony te są następnie przyspieszane do określonych energii za pomocą akceleratorów elektrostatycznych, takich jak klasyczny akcelerator Van de Graaffa (o potencjale rzędu 2 - 3 MV) lub nowocześniejszy akcelerator tandemowy typu Tandetron. Dzięki zaawansowanej konstrukcji Tandetronu możliwe jest osiągnięcie porównywalnych energii wiązki przy niższym napięciu przyspieszającym, rzędu około 1,5 MV.

W ramach realizacji założeń niniejszej rozprawy pomiary zostały przeprowadzone w Instytucie RBI, który dysponuje akceleratorami obu typów. W wykorzystywanym systemie wiązka naładowanych cząstek jest kierowana na próbkę za pomocą układów optyki wiązki, obejmujących magnesy zakrzywiające, magnesy kwadrupolowe, soczewki magnetyczne i elektrostatyczne, płytki deflekcyjne (ang. *deflection plates*) oraz kolimatory. Pomiary prowadzone są w warunkach wysokiej próżni (ciśnienie poniżej $1 \cdot 10^{-6}$ mbar), co zapewnia odpowiednio długą średnią drogę swobodną cząstek i minimalizuje ich rozpraszanie.

Technika PIXE najczęściej realizowana jest in situ, chociaż możliwe są również pomiary w warunkach atmosferycznych [50, 51]. W nowoczesnych systemach pomiarowych wiązka naładowanych cząstek jest wprowadzana do komory analitycznej przez kolimator, którego zadaniem jest zarówno ograniczenie geometryczne, jak i homogenizacja energetyczna wiązki. Kolimator umożliwia uzyskanie wiązki o średnicy rzędu kilku do kilkunastu mikrometrów, co pozwala na precyzyjne ogniskowanie oraz selektywne badanie wybranych obszarów próbki. Ze względu na mikrometryczne rozmiary plamki technikę tę określa się mianem μPIXE.

Próbka umieszczana jest na stojaku, zwykle zintegrowanym z systemem translacyjnym, ustawionym w osi wiązki, z możliwością zautomatyzowanego transferu i pozycjonowania. Główne komponenty komory próżniowej obejmują detektory promieniowania rentgenowskiego, najczęściej półprzewodnikowe detektory Si(Li) lub krzemowe detektory dryftowe (ang. *Silicon Drift Detectors,* SDD), oraz puszkę Faradaya, służącą do pomiaru prądu wiązki poprzez wychwytywanie naładowanych cząstek po ich przejściu przez próbkę.

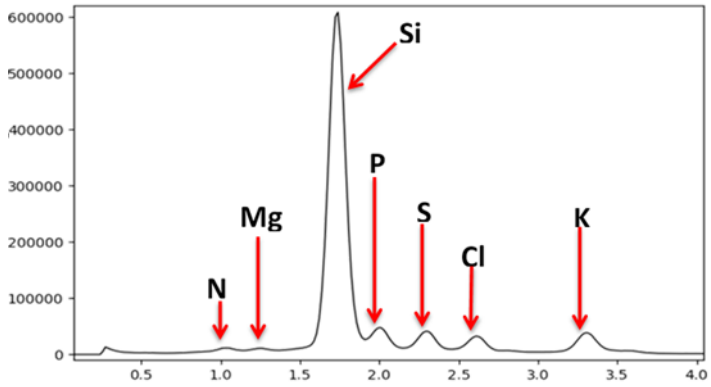
Warunkiem przeprowadzenia pomiaru jest zastosowanie próbki o grubości mniejszej niż zasięg cząstek w danym materiale, co umożliwia ich transmisję z jedynie częściową utratą energii kinetycznej. W przeciwnym razie pełna absorpcja cząstek w materiale uniemożliwia dokładne wyznaczenie dawki oraz kontrolę warunków ekspozycji.

W systemach dedykowanych do analizy materiałów wrażliwych, takich jak próbki biologiczne, stosuje się dodatkowo tzw. przerywnik wiązki (ang. *chopper*). Element ten pełni dwie podstawowe funkcje. Po pierwsze, umożliwia pomiar prądu wiązki w trybie przerywanym, co jest szczególnie istotne przy bardzo niskich natężeniach (rzędu pA lub niższych), gdy sygnał mierzony bezpośrednio może być porównywalny

z poziomem szumu elektroniki. Przerywany tryb pracy pozwala wówczas na integrację ładunku w czasie, co znacząco zwiększa dokładność oraz powtarzalność pomiaru. Po drugie, okresowo przerywa ciągłość strumienia cząstek z ustaloną częstotliwością, co pozwala na redukcję całkowitej dawki energii przekazywanej do próbki oraz ogranicza lokalną depozycję cieplną. Jest to szczególnie istotne w przypadku delikatnych próbek biologicznych, które są wrażliwe na przegrzanie i degradację strukturalną.

Chociaż metoda PIXE jest powszechnie uznawana za technikę nieniszczącą, w praktyce, zwłaszcza podczas analizy tkanek biologicznych, może dojść do uszkodzeń termicznych próbki. Zjawisko to wynika z absorpcji energii przez materiał na skutek intensywnego bombardowania cząstkami o energiach rzędu kilku MeV, co prowadzi do nagrzewania oraz potencjalnych zmian morfologicznych lub chemicznych w badanym obszarze. W przypadku wykorzystania ciężkich jonów, dodatkowym efektem może być rozpylanie (ang. *sputtering*) atomów z powierzchni próbki. W konsekwencji, planowanie parametrów ekspozycji stanowi istotny etap przygotowania eksperymentu.

Końcowym efektem pomiarów metodą PIXE jest widmo promieniowania rentgenowskiego, w którym wyraźnie wyodrębnione są piki odpowiadające charakterystycznym przejściom elektronowym w atomach pierwiastków obecnych w badanym materiale. Każdy pik odpowiada emisji promieniowania rentgenowskiego powstałej na skutek przejścia elektronu z powłoki wyższej energii (najczęściej L lub M) do powłoki niższej energii (zwykle K) lub np. pomiędzy podpowłokami tej samej powłoki. Energia emitowanego fotonu jest jednoznacznie związana z liczbą atomową Z i stanowi swoisty "odcisk palca" danego pierwiastka. Analiza energii tych charakterystycznych linii pozwala na identyfikację jakościową pierwiastków w próbce. Natomiast ilościowa analiza składu chemicznego opiera się na pomiarze intensywności tych linii, uwzględniając mechanizmy absorpcji, przekroje czynne oraz geometrię detekcji, co umożliwia detekcję składników z czułością sięgającą poziomu ppm, a w sprzyjających warunkach nawet ppb. Na rysunku 4.2 przedstawiono przykładowe widmo promieniowania rentgenowskiego uzyskane dla próbki tkanki mięśniowej. Na widmie zaznaczono charakterystyczne linie emisyjne poszczególnych pierwiastków, co umożliwia ich jednoznaczną identyfikację. Analiza takiego spektrum pozwala nie tylko na określenie składu pierwiastkowego próbki, lecz również na ocenę obecności zanieczyszczeń oraz weryfikację jakości i czystości badanego materiału biologicznego.



Rysunek 4.2. Widmo PIXE zarejestrowane dla próbki tkanki mięśniowej. Pozycje pików odpowiadają charakterystycznym liniom emisyjnym pierwiastków obecnych w próbce. Sygnał pochodzący od krzemu jest efektem użycia podkładek z azotku krzemu (Si_3N_4) podczas eksperymentu.

4.1.5. Geometria układu detekcyjnego i charakterystyka detektorów promieniowania X

Na rozmieszczenie głównych elementów detekcyjnych w komorze pomiarowej systemu PIXE wpływa szereg procesów fizycznych, takich jak tłumienie promieniowania rentgenowskiego, utrata energii wiązki jonów oraz emisja promieniowania hamowania generowanego przez elektrony wtórne. W standardowej konfiguracji stosowanej w Instytucie Ruđer Bošković skolimowana wiązka cząstek naładowanych jest kierowana prostopadle do powierzchni próbki, co minimalizuje wpływ niedoskonałości powierzchni, zwłaszcza gdy detektor rentgenowski obserwuje próbkę wzdłuż osi wiązki jonów. W praktyce jednak w RBI nie było możliwe zastosowanie takiego układu, ponieważ detektor promieniowania rentgenowskiego umieszczony jest w kriostacie zamocowanym do naczynia Dewara. W efekcie detektor znajduje się około 4 cm od powierzchni próbki i jest ustawiony pod kątem 135° względem kierunku wiązki pierwotnej, co odpowiada kątowi 45° względem powierzchni próbki. Takie rozmieszczenie jest również korzystne ze względu na redukcję tła, gdyż emisja promieniowania hamowania od wtórnych elektronów osiąga maksimum w kierunku około 90°. Umieszczenie detektora pod kątem znacząco odbiegającym od tego kąta pozwala zatem ograniczyć jego wpływ na jakość pomiaru [49].

W systemach PIXE powszechnie stosuje się dwa typy detektorów promieniowania rentgenowskiego: półprzewodnikowe detektory krzemowo-litowe Si(Li) oraz nowocześniejsze krzemowe detektory dryftowe SDD. Detektor Si(Li), bazujący na kryształach krzemu domieszkowanych litem [40], umożliwia analizę z rozdzielczością energetyczną rzędu kilkuset eV. Jednakże akwizycja jakościowych danych może wymagać czasu od kilkunastu do kilkudziesięciu minut, a konieczność chłodzenia ciekłym azotem w celu ograniczenia szumów elektroniki stanowi istotne wyzwanie eksploatacyjne [49].

Detektory typu SDD, pomimo nieco niższej rozdzielczości energetycznej, oferują znacznie szybszą akwizycję danych przy zachowaniu wysokiej czułości pomiarowej. Zastosowanie chłodzenia

termoelektrycznego (element Peltiera) eliminuje potrzebę stosowania ciekłego azotu, co upraszcza obsługę i utrzymanie systemu.

4.1.6. Wizualizacja rozkładu pierwiastków - obrazowanie z wykorzystaniem µPIXE

Udoskonalenia w technologii generacji, kolimacji wiązki jonów oraz detekcji promieniowania rentgenowskiego umożliwiły rozwój mikroanalizy metodą PIXE, określanej jako µPIXE. W tej konfiguracji skolimowana wiązka cząstek naładowanych jest kierowana do komory pomiarowej, w której znajduje się badana próbka. Wiązka przechodzi przez kolimator, element optyki wiązki ograniczający jej średnicę do kilku lub kilkunastu mikrometrów, co pozwala na skupienie jej na wybranym obszarze powierzchni próbki (ang. *region of interest,* ROI). Jednorodność energetyczna wiązki zapewniana jest przez układ akceleracyjny oraz precyzyjny system selekcji energii.

Próbka umieszczana jest na uchwycie w komorze pomiarowej, który umożliwia pozycjonowanie względem wiązki z dokładnością rzędu mikrometrów, co ma kluczowe znaczenie dla jakości danych przestrzennych uzyskiwanych w obrazowaniu pierwiastkowym - szczególnie w przypadku materiałów niejednorodnych, takich jak próbki biologiczne. W zaawansowanych systemach µPIXE stosowany jest również wspomniany wcześniej przerywnik wiązki, umożliwiający dodatkową kontrolę nad parametrami pomiaru.

System translacyjny uchwytu, na którym znajduje się próbka, umożliwia skanowanie jej powierzchni wiązką jonów. Poprzez kontrolowane przesuwanie próbki oraz rejestrację promieniowania rentgenowskiego o wybranych energiach możliwe jest uzyskanie map przestrzennego rozkładu pierwiastków w badanym materiale. Selektywność detekcji energii promieniowania X pozwala na przykład na identyfikację akumulacji poszczególnych pierwiastków w strukturach biologicznych. Obrazowanie tego typu realizowane jest zazwyczaj na powierzchniach o wymiarach od kilkudziesięciu do kilkuset μm^2, przy użyciu mikroruchów uchwytu lub wiązki w celu przesunięcia jej położenia.

Metoda µPIXE znalazła szerokie zastosowanie w analizie tkanek biologicznych, gdzie lokalizacja pierwiastków śladowych ma kluczowe znaczenie w badaniach biochemicznych, toksykologicznych oraz medycznych. Technika ta umożliwia nieniszczące określenie zawartości pierwiastków takich jak Fe, Zn, Cu, P czy Ca, które pełnią istotną rolę w procesach metabolicznych. Już w latach 80. XX wieku µPIXE została uznana za wysoce czułą i efektywną metodę obrazowania pierwiastków śladowych w próbkach biologicznych [52], a rozwój i zastosowania tej metody w badaniach biologicznych są kontynuowane do dnia dzisiejszego [53–56]. Przykładem zastosowania metody µPIXE jest analiza rozkładu pierwiastków w organizmach małych bezkręgowców, roślinach oraz wybranych narządach ssaków. Dzięki wysokiej rozdzielczości przestrzennej możliwe jest zlokalizowanie mikroobszarów o podwyższonym stężeniu określonych pierwiastków, co pozwala na wnikliwą analizę procesów biologicznych na poziomie

komórkowym. Przykładowo, Migula i współpracownicy wykorzystali tę technikę do badania rozmieszczenia pierwiastków w ciele mszycy Protaphis pseudocardui, żerującej na roślinie Berkheya coddii, znanej z akumulacji niklu [53]. Do pomiarów zastosowano wiązkę protonów o energii 3,0 MeV i prądzie 200 - 300 pA. Uzyskane wyniki umożliwiły zobrazowanie rozkładu niklu w różnych częściach ciała mszycy.

W badaniach przeprowadzonych przez Yakamaru i współpracowników na zamrożonych przekrojach żeber szczurzych wykazano zróżnicowane rozmieszczenie pierwiastków takich jak wapń, fosfor, siarka i potas w trzech wyraźnie rozgraniczonych obszarach anatomicznych: chrząstce żebrowej, połączeniu chrzęstno-żebrowym oraz kości twardej [56]. Zastosowanie analizy μPIXE umożliwiło nieinwazyjne odwzorowanie rozkładu tych pierwiastków z rozdzielczością dochodzącą do poziomu pojedynczych komórek. Uzyskane wyniki dostarczyły cennych informacji na temat różnego stopnia mineralizacji poszczególnych tkanek, podkreślając jednocześnie potencjał μPIXE w badaniach fizjologii i patologii układu kostnego. Badania te wskazują również na szerokie możliwości zastosowania tej techniki w analizie tkanek ludzkich.

4.2. Skaningowa transmisyjna mikroskopia jonowa STIM

4.2.1. Zasada działania i charakterystyka metody

Skaningowa transmisyjna mikroskopia jonowa należy do zaawansowanych technik obrazowania strukturalnego. Metoda ta wykorzystuje wysokoenergetyczne jony o energiach rzędu kilku MeV, które podczas przechodzenia przez próbkę tracą energię w zależności od lokalnej struktury materiału. Chociaż technika została przedstawiona ponad 30 lat temu, jej szerokie zastosowanie w naukach biologicznych i biomedycznych nastąpiło dopiero w ostatnich kilkunastu latach, głównie dzięki integracji z metodami analizy pierwiastkowej, takimi jak PIXE czy SIMS [57]. Technika SIMS została omówiona w rozdziale 4.3.

Główną zaletą metody STIM jest możliwość nieinwazyjnego obrazowania struktur próbki z wysoką rozdzielczością przestrzenną, bez konieczności stosowania barwników fluorescencyjnych czy znaczników radioaktywnych [58]. Technika ta nie pozwala jednak na bezpośrednią analizę składu pierwiastkowego badanych materiałów, co ogranicza jej zastosowanie jako samodzielnej metody w wielu przypadkach. W klasycznym podejściu STIM wykorzystuje skolimowaną wiązkę wysokoenergetycznych jonów o energiach sięgających kilku MeV [59], podobnych do tych stosowanych w technikach PIXE oraz SIMS. Energia ta jest zazwyczaj wystarczająca do penetracji przekrojów o grubości do około 50 μm [60].

4.2.2. Zasada fizyczna i model teoretyczny

Podstawą działania mikroskopii STIM jest pomiar strat energii wysokoenergetycznych jonów po ich przejściu przez cienką warstwę próbki. W typowym zakresie energii wykorzystywanym w STIM

(1 – 4 MeV dla protonów) głównym mechanizmem hamowania jonów jest hamowanie elektronowe, polegające na przekazywaniu energii jonów swobodnym lub związanym elektronom badanego materiału. Proces ten dominuje w zakresie MeV i odpowiada za większość strat energii jonów w materiałach biologicznych oraz organicznych. Drugorzędnym mechanizmem, o mniejszym znaczeniu w tych zakresach energii, jest hamowanie jądrowe, wynikające ze sprężystych zderzeń jonów z jądrami atomowymi próbki. W zastosowaniach STIM jego wpływ jest zwykle pomijalny, jednak może nabierać istotności przy analizie bardzo lekkich lub ultracienkich struktur. Rejestracja strat energii jonów podczas przejścia przez próbkę odbywa się najczęściej przy użyciu detektora półprzewodnikowego (np. fotodiody krzemowej typu PiN) umieszczonego bezpośrednio za próbką.

Modele Bohra i Bethego stanowią podstawę teoretycznego opisu zjawiska oddawania energii przez jony w materii. Podczas gdy model Bohra z 1913 roku oparty był na założeniach klasycznych, to opis wprowadzony przez Hansa Bethego w 1930 roku uwzględniał efekty kwantowe i relatywistyczne opisując procesy spowalniania w zakresie średnich i wysokich energii [61]. Po uwzględnieniu poprawek relatywistycznych oraz korekty gęstości, ostateczny wzór opisujący straty energii można zapisać jako:

$$S = \frac{dE}{dx} = \frac{4\pi z^2 e^4}{m_e c^2 \beta^2} \cdot n \cdot \left[ln\left(\frac{2 m_e c^2 \beta^2 \gamma^2 E_{max}}{I^2} \right) - \beta^2 - \delta(\beta\gamma) \right], \quad (3)$$

gdzie:

- m_e - masa elektronu,
- c - prędkość światła,
- n - gęstość elektronowa materiału (liczba elektronów na jednostkę objętości),
- z - ładunek cząstki naładowanej (np. z = 1 dla protonu),
- e - ładunek elementarny,
- $\beta = \frac{v}{c}$ - prędkość cząstki względem prędkości światła,
- $\gamma = \frac{1}{\sqrt{1-\beta^2}}$ - współczynnik relatywistyczny,
- E_{max} - maksymalna energia, jaką cząstka może przekazać jednemu elektronowi w zderzeniu,
- I - średni potencjał jonizacji (charakterystyczny dla materiału),
- $\delta(\beta\gamma)$- korekta gęstości (istotna przy bardzo dużych energiach).

Bethe wykazał, że strata energii cząstki naładowanej zależy logarytmicznie od jej energii kinetycznej oraz silnie od jej ładunku, co ma kluczowe znaczenie w metodach bazujących na pomiarze dE/dx, takich jak STIM. Podczas przejścia przez próbkę jon o energii z zakresu MeV oddziałuje przede wszystkim z elektronami materii, przekazując im część swojej energii kinetycznej. Lokalna gęstość elektronowa określa liczbę zderzeń jon-elektron, a tym samym wpływa na ilość energii traconej przez jon na jednostkę drogi. W obszarze próbki o wyższej gęstości elektronowej jon napotyka większą liczbę

elektronów i wydajniej przenosi im energię, co prowadzi do większej utraty energii na tej samej drodze i intensywniejszego hamowania jonu, co bezpośrednio wpływa na kontrast otrzymywany w mikroskopii STIM. Dzięki możliwości obrazowania obszarów o powierzchni sięgającej setek μm^2, STIM odgrywa istotną rolę podczas selekcji rejonów przeznaczonych do szczegółowej analizy spektroskopowej metodami PIXE lub SIMS. Pozwala ona na wykrycie anomalii strukturalnych, takich jak niejednorodności morfologiczne czy lokalne zagęszczenia materiału, co jest kluczowe dla właściwego ukierunkowania dalszych badań [58, 62].

4.2.3. Integracja STIM z metodami spektroskopii jonowej

Typowa konfiguracja aparaturowa STIM obejmuje integrację z układami spektroskopowymi, co umożliwia jednoczesne pozyskiwanie danych morfologicznych i chemicznych. W takim układzie STIM pełni funkcję wstępnego obrazowania strukturalnego, pozwalającego na identyfikację obszarów o podwyższonej lub obniżonej gęstości, które następnie poddawane są dalszej analizie metodami takimi jak PIXE lub SIMS.

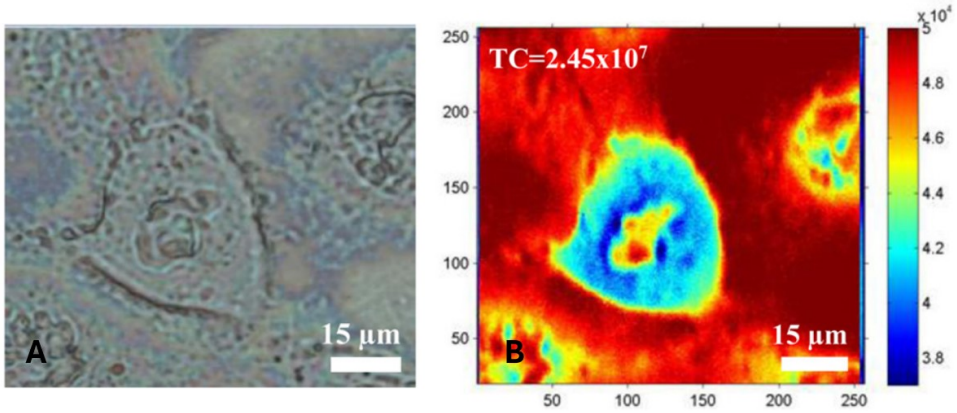
Ponieważ w metodzie STIM rejestrowana jest energia niemal wszystkich jonów transmitowanych przez badaną próbkę, konieczne jest stosowanie bardzo niskich natężeń prądów wiązki. Zwykle wartości te nie przekraczają 1 fA, co minimalizuje ryzyko uszkodzenia próbki i jednocześnie pozwala na uzyskanie obrazów o bardzo wysokiej rozdzielczości przestrzennej. Dzięki temu metoda ta jest szczególnie użyteczna w analizie struktur biologicznych na poziomie subkomórkowym [60].

4.2.4. Charakterystyka aparatury STIM w Instytucie Ruđer Bošković

W trakcie realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej przeprowadzono badania w Instytucie Ruđer Bošković w Zagrzebiu, gdzie system STIM stanowi m.in. kluczowy element zintegrowanego układu MeV TOF-SIMS. Dodatkowo możliwa jest konfiguracja systemu STIM w linii pomiarowej PIXE, co również zostało wykorzystane w ramach niniejszej pracy. W układzie SIMS wykorzystywane są m. in. jony O_4^+ przyspieszane do energii w zakresie 1 - 10 MeV za pomocą akceleratora Van de Graaffa. Wiązka jonowa jest ogniskowana przez zestaw trzech soczewek kwadrupolowych, następnie kolimowana i kierowana na próbkę. Takie połączenie umożliwia jednoczesną akwizycję danych przestrzennych oraz chemicznych, dzięki zsynchronizowanemu systemowi elektroniki impulsowej oraz wspólnemu mechanizmowi pozycjonowania. Jony transmitowane przez próbkę, po uprzednim wytraceniu energii, są rejestrowane przez fotodiodę PiN umieszczoną w odległości około 10 mm za próbką. Aby zapewnić rzetelność danych ilościowych, niezbędna jest dokładna kalibracja prądu jonowego.

Przykładem zastosowania opisanej techniki są badania przeprowadzone w RBI, podczas których poddano pomiarom liofilizowane próbki komórek linii CaCo-2. Uzyskana rozdzielczość przestrzenna wyniosła około 400 nm/piksel, co pozwoliło na rozróżnienie regionów subkomórkowych, w tym

cytoplazmy oraz jądra komórkowego. Na rysunku 4.3 zaprezentowano porównanie mikroskopowego obrazu optycznego komórki CaCo-2 (a) z odpowiadającą mapą przestrzennego rozkładu gęstości uzyskaną metodą STIM (b) [62].



Rysunek 4.3 Po lewej znajduje się obraz optyczny zliofilizowanej komórki CaCo-2, natomiast po prawej odpowiadający rozkład gęstości uzyskany metodą STIM. TC jest to całkowita liczba zarejestrowanych jonów [62].

4.2.5. Znaczenie w badaniach biologicznych

Technika STIM stanowi niezwykle cenne narzędzie uzupełniające dla metod spektroskopii jonowej, zwłaszcza w badaniach struktur biologicznych charakteryzujących się wysoką złożonością morfologiczną i heterogenicznością gęstości. Dzięki możliwości uzyskiwania obrazów o bardzo wysokiej rozdzielczości, STIM pozwala na odwzorowanie architektury tkanek, komórek, a nawet subkomórkowych struktur. W przypadku tkanek mięśniowych metoda ta umożliwia m.in. lokalizację pojedynczych włókien mięśniowych, identyfikację granic komórkowych lub nawet może zasugerować rejony objęte procesami degeneracyjnymi. Obszary dotknięte takimi procesami lub stanami zapalnymi często wykazują zmienioną lokalną gęstość, co znajduje bezpośrednie odzwierciedlenie w wartościach strat energii transmitowanych jonów.

Przygotowanie materiału biologicznego do analizy STIM wymaga zapewnienia odpowiednich właściwości fizycznych próbki, w szczególności jej wysokiej transparentności dla wysokoenergetycznej wiązki jonowej. W praktyce oznacza to konieczność uzyskania cienkich, jednorodnych przekrojów tkankowych o dobrze kontrolowanej grubości. W tym celu próbki są zazwyczaj natychmiast zamrażane bez uprzedniego utrwalenia chemicznego, co umożliwia zachowanie ich struktury w stanie możliwie najbardziej zbliżonym do fizjologicznego. Następnie, przy użyciu kriomikrotomu, wykonywane są skrawki o określonej grubości, które po umieszczeniu na podłożu pomiarowym poddaje się procesowi liofilizacji. Tak przygotowane próbki spełniają kluczowe wymagania stawiane materiałom przeznaczonym do analizy STIM, zapewniając odpowiednią jakość oraz powtarzalność wyników pomiarowych.

4.3. Spektrometria masowa jonów wtórnych SIMS

4.3.1. Rozwój techniki

Spektrometria masowa jonów wtórnych SIMS jest uniwersalną i powszechnie stosowaną techniką analizy chemicznej ciał stałych. Dzięki wyjątkowej czułości pierwiastkowej oraz zdolności do obrazowania powierzchni w skali mikro i nano oraz uzyskiwania informacji o rozkładzie składu chemicznego zarówno w płaszczyźnie próbki, jak i w głąb materiału, technika SIMS znajduje szerokie zastosowanie w fizyce ciała stałego, inżynierii materiałowej, elektronice, biologii, geologii oraz naukach o środowisku.

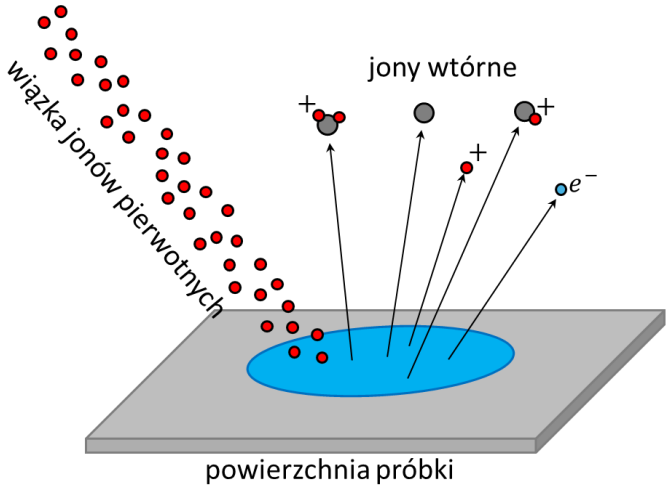
Początki metody SIMS sięgają eksperymentów J.J. Thomsona z początku XX wieku. W swoich eksperymentach po raz pierwszy zaobserwował on emisję jonów dodatnich (wtórnych) oraz atomów neutralnych z powierzchni próbki bombardowanej wysokoenergetyczną wiązką jonów pierwotnych [63]. Wspomniane badania zapoczątkowały przełomowe odkrycia w dziedzinie interakcji jonów z powierzchnią materii. W latach 40. XX wieku F.L. Arnot i J.C. Milligan badali wydajność emisji jonów wtórnych i ich zachowanie w polu magnetycznym, stanowiąc tym samym podstawę do rozwoju techniki SIMS jako metody analitycznej. Pierwszy w pełni funkcjonalny system SIMS powstał w latach 50. w RCA Laboratories (Princeton, New Jersey) dzięki pracy R.E. Honiga [64]. Owe wydarzenie stanowiło jeden z kamieni milowych w rozwoju metody SIMS, a dekadę później zaowocowało opracowaniem pierwszych komercyjnie dostępnych systemów pomiarowych, stworzonych przez zespół H. Liebla i R. Herzoga [65]. Od tamtej pory technika SIMS przeszła istotny rozwój, szczególnie na przełomie XX i XXI wieku, co było możliwe dzięki postępowi technologii próżniowych oraz dynamicznemu rozwojowi mikro i nanoelektroniki opartej na technologiach półprzewodnikowych. Współczesne, zaawansowane systemy SIMS oferują możliwość precyzyjnej analizy chemicznej powierzchni oraz profilowania głębokościowego materiałów z bardzo wysoką rozdzielczością przestrzenną i masową, co znajduje swoje zastosowanie w wielu dziedzinach nauki.

4.3.2. Zasada działania SIMS

Schematyczne przedstawienie procesów zachodzących w metodzie SIMS zostało zaprezentowane na rysunku 4.4. Podstawą metody jest zjawisko rozpylania jonowego, czyli emisja cząstek z powierzchni próbki pod wpływem bombardowania wiązką jonów pierwotnych o wysokiej energii. Wiązkę pierwotną najczęściej stanowią jony o ładunku dodatnim, ze względu na stosunkowo łatwe przyspieszenie wiązki do odpowiedniej energii. Jony te (np. O^-, O_2^+, Ar^+, Xe^+, Ga^+, Cs^+) są przyspieszane i kierowane na powierzchnię próbki, powodując szereg zjawisk fizycznych. Zderzenia jonów pierwotnych z atomami powierzchni inicjują proces transferu pędu, który następnie zapoczątkowuje kaskadę kolizji wewnątrz materiału, obejmującą zarówno bezpośrednie zderzenia jon-atom, jak i wtórne zderzenia atom-atom. Te ostatnie

odgrywają istotną rolę w przekazywaniu energii w głąb i ku powierzchni próbki, prowadząc do emisji cząstek. W wyniku propagacji energii w kierunku powierzchni dochodzi do rozpylenia atomów, cząsteczek (molekuł), klastrów, a także jonów wtórnych z powierzchni próbki, które mogą być dodatnio lub ujemnie naładowane, a następnie zanalizowane w spektrometrze masowym. Większość emitowanych cząstek pozostaje jednak obojętna elektrycznie i nie bierze udziału w dalszej analizie.

Proces rozpylania w technice SIMS ma charakter destrukcyjny, ponieważ wiąże się z sukcesywnym usuwaniem materiału z powierzchni analizowanej próbki. Dzięki temu możliwa jest również analiza głębokościowa, polegająca na monitorowaniu składu chemicznego emitowanych jonów wtórnych w funkcji czasu trwania bombardowania jonami pierwotnymi, co umożliwia uzyskanie profili głębokościowych. Informacje chemiczne uzyskane w ten sposób mogą mieć charakter punktowy, liniowy, obrazowy 2D, a nawet trójwymiarowy (3D), co czyni metodę SIMS szczególnie atrakcyjną w badaniach złożonych układów materiałowych.



Rysunek 4.4 Schematyczna prezentacja mechanizmu desorpcji jonowej w technice SIMS, w której bombardowanie powierzchni jonami pierwotnymi prowadzi do rozpylania materiału oraz emisji jonów wtórnych analizowanych pod kątem masy i ładunku.

Emisję cząstek naładowanych z materiału badanego można opisać za pomocą modelu kaskady liniowej (ang. *linear cascade model*), który jest najlepiej poznanym sposobem emisji jonów wtórnych. Zakłada on, że zjawisko rozpylania jest wynikiem wielokrotnych zderzeń między jonami pierwotnymi i atomami powierzchni. Jest to model kinetyczny, często porównywany do zderzeń kul bilardowych. Proces ten zachodzi bardzo szybko. Czas trwania jednej kaskady kolizji jest znacznie krótszy niż czas pomiędzy kolejnymi uderzeniami jonów pierwotnych, co pozwala traktować je jako niezależne zdarzenia. Model kaskady liniowej najbardziej efektywnie opisuje emisję wywołaną bombardowaniem przez jony pierwotne o dużej masie lub pojedyncze jony molekularne np: O^-, O_2^+, Ar^+, Xe^+, Ga^+ oraz Cs^+ o energiach w przedziale od 0,1 keV do 50 keV. Jest to najczęściej wykorzystywany przedział energii, ponieważ wydajność rozpylania jest najwyższa w przedziale między 10 keV a 100 keV w zależności od zastosowanych jonów.

Oddziaływanie jonów z powierzchnią próbki wywołuje kaskadę kolizji - sekwencję zderzeń jon-atom i atom-atom, w wyniku której dochodzi do emisji wtórnych cząstek z powierzchni [66]. W przypadku energii jonów przekraczającej 100 keV, efektywność sputteringu ulega obniżeniu, ponieważ przekazywana energia przenoszona jest zbyt głęboko pod powierzchnię próbki, co uniemożliwia emisję jonów wtórnych z warstwy powierzchniowej. Mechanizmy sputteringu oraz ich modele teoretyczne wciąż pozostają przedmiotem intensywnych badań, które doprowadziły m.in. do rozwoju modelu kaskady liniowej, wykluczającego uproszczone podejście oparte wyłącznie na procesach kinetycznych.

Uzupełnieniem klasycznego modelu kaskady liniowej jest tzw. sputtering potencjałowy (ang. *potential sputtering*), który zakłada, że do emisji cząstek z powierzchni może dochodzić również bez bezpośrednich zderzeń jonów pierwotnych z atomami znajdującymi się na powierzchni próbki. W praktyce jednak transfer pędu i ładunku często występuje jednocześnie, a ich wzajemne oddziaływanie jest silnie zależne od rodzaju jonów pierwotnych oraz przenoszonego przez nie ładunku elektrycznego. W modelu potencjałowym kluczowe znaczenie ma obecność jonu pierwotnego w polu potencjału atomów powierzchniowych, co umożliwia transfer elektronów pomiędzy nimi. W wyniku tego procesu jony pierwotne ulegają neutralizacji, a powstałe wzbudzenie atomów powierzchniowych sprzyja emisji naładowanych atomów lub cząsteczek z bombardowanej powierzchni próbki. Procesowi temu często towarzyszy emisja elektronów Augera. Model potencjałowy pozwala wyjaśnić obserwowaną emisję cząstek przy bardzo niskich energiach jonów pierwotnych (rzędu 15 - 40 eV), przy których energia kinetyczna jest niewystarczająca do wywołania emisji wyłącznie poprzez mechanizm przekazania pędu [66].

Warto podkreślić, że sam proces sputteringu ma charakter złożony, a jego efektywność oraz dominujący mechanizm są silnie uzależnione zarówno od parametrów wiązki jonów pierwotnych (takich jak jej energia i rodzaj), jak i od właściwości fizykochemicznych bombardowanego materiału.

4.3.3. Wydajność rozpylania jonowego

Jednym z podstawowych parametrów opisujących efektywność emisji w SIMS jest wydajność rozpylania (ang. *sputtering yield, Y*), definiowana jako liczba atomów (molekuł lub jonów), które opuściły powierzchnię materiału na każdy jon pierwotny i może ona zostać opisana prostą formułą:

$$Y = \frac{Ns}{Np}, \tag{4}$$

gdzie: Ns odpowiada średniej liczbie rozpylonych atomów, natomiast Np odpowiada licznbie jonów pierwotnych. Wydajność może silnie zależeć również od energii jonów pierwotnych, ich kąta padania, stosunku masy jonów pierwotnych do masy atomów powierzchniowych oraz energii wiązań atomowych w materiale. Badania eksperymentalne wykazały, że największa wydajność rozpylania ma miejsce zwykle dla kątów padania z zakresu 45° - 60°, ponieważ geometrycznie zapewniają one największą powierzchnię bombardowania. W literaturze, ostateczna wydajność rozpylania jest często definiowana jako tzw.

użyteczna wydajność rozpylania, uwzględniająca jedynie te jony wtórne, które mogą zostać skutecznie zarejestrowane przez system detekcyjny w aparaturze SIMS. Teoretyczne podstawy opisu wydajności rozpylania zostały szczegółowo opracowane przez Petera Sigmunda [67], którego prace stanowią fundament współczesnego modelowania zjawiska i są rozwijane do dziś.

4.3.4. Budowa i działanie układu SIMS

Typowy system SIMS pracuje w warunkach co najmniej wysokiej próżni (rzędu 10^{-6} mbar lub niższej), co pozwala na istotne zmniejszenie prawdopodobieństwa kolizji jonów (zarówno pierwotnych, jak i wtórnych) z cząsteczkami gazów resztkowych obecnych w komorze analitycznej. Utrzymanie wysokiej próżni nie tylko zwiększa średnią drogę swobodną jonów, poprawiając precyzję i czułość analizy, ale również ogranicza ryzyko wtórnego zanieczyszczenia powierzchni próbki podczas pomiaru. Oprócz systemu próżniowego instrumentacja SIMS składa się z kilku kluczowych komponentów: źródła jonów pierwotnych (działo jonowe), kolumny jonowej i systemu ogniskującego, ekstraktora, analizatora masowego oraz detektora jonów wtórnych. Działo jonowe to element odpowiedzialny za generowanie i wstępne ogniskowanie wiązki jonów pierwotnych. W zależności od zastosowania mogą być stosowane różne techniki jonizacji w źródle jonowym, np. przez zderzenia elektronów z gazem (ang. *electron impact,* EI) lub za pomocą duoplasmatronu, w którym jonizacja gazu (np. Ar, O_2) zachodzi dzięki plazmie wytworzonej w procesie termoemisji elektronów lub molekuł emitowanych z rozgrzanego filamentu (katody). Po uformowaniu, wiązka jonowa jest przyspieszana oraz kolimowana za pomocą układów elektrostatycznych i magnetycznych soczewek kwadrupolowych. Kolumna jonowa zakończona jest zazwyczaj kapilarą wykonaną ze szkła borokrzemianowego, co umożliwia uzyskanie wiązki o średnicy rzędu kilku mikrometrów. Wiązka jonowa trafia następnie do komory próżniowej pod kątem około 45° w odległości kilkudziesięciu milimetrów od próbki, co pozwala na uzyskanie wysokiej czułości powierzchniowej przy jednoczesnym ograniczeniu głębokości penetracji jonów. Jony wtórne wybite z powierzchni próbki są ekstrahowane z komory pomiarowej poprzez przyłożenie wysokiego napięcia (około 6 kV), a następnie kierowane do analizatora masowego. W nowoczesnych systemach pomiarowych najczęściej stosowany jest analizator czasu przelotu (ang. *Time of Flight*, TOF), który umożliwia separację jonów na podstawie stosunku masy do ładunku (m/z) oraz zapewnia wysoką rozdzielczość masową. Rozpylone jony trafiają ostatecznie na detektor, który wzmacnia sygnał poprzez emisję wtórną elektronów proporcjonalną do m/z danego jonu, działając na zasadzie podobnej do powielacza elektronowego. Umożliwia on zarówno pomiar masy jonów, jak i tworzenie obrazów rozkładu chemicznego powierzchni. Często stosowanym detektorem jest płytka mikrokanalikowa MCP (ang. *Microchannel Plate*). Stanowi ona kluczowy element systemu detekcji, w którym pojedynczy jon wtórny inicjuje kaskadową emisję elektronów wtórnych w mikrokanalikach o średnicy kilku mikrometrów. To zjawisko prowadzi do

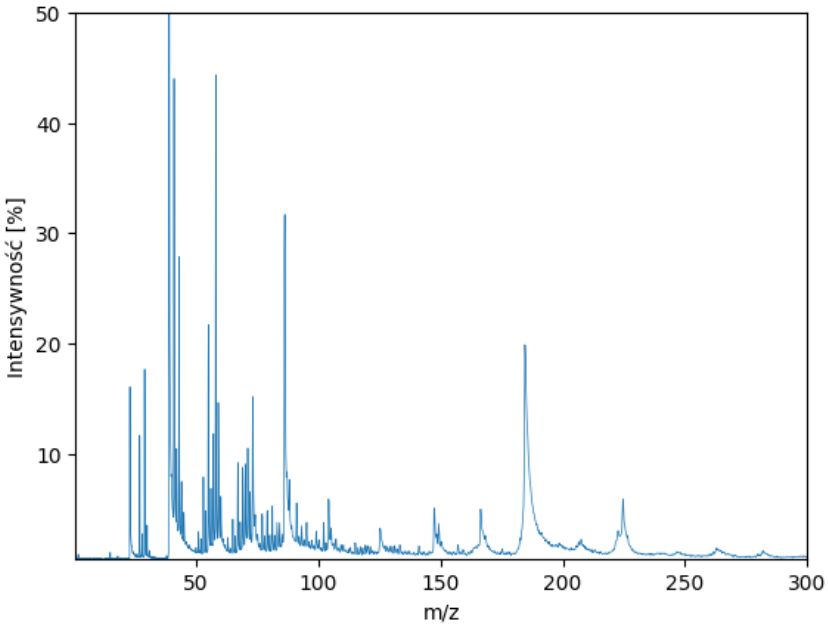
wielokrotnego wzmocnienia sygnału elektrycznego, co pozwala na detekcję nawet pojedynczych jonów z wysoką czułością.

W ramach niniejszej pracy badawczej pomiary przeprowadzono z wykorzystaniem systemu SIMS znajdującego się w Ruder Bošković Institute, wyposażonego w akceleratory Van de Graaffa (do 6 MV) oraz Tandetron (do 1,5 MV) [68–70]. Taka konfiguracja umożliwia pracę w trybie MeV-SIMS, który rozszerza możliwości techniki o analizę głębszych warstw materiału, przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej czułości detekcji informacji chemicznej w objętości próbki. W typowej konfiguracji systemu SIMS próbka umieszczana jest na manipulatorze umożliwiającym jej pozycjonowanie w płaszczyźnie powierzchni oraz regulację kąta nachylenia w zakresie ±1°. W systemie zastosowanym w RBI wykorzystano zaawansowany piezo-manipulator 4D, który umożliwia skaningowe przemieszczanie próbki z wysoką precyzją, co przekłada się na zwiększenie efektywności generowania jonów wtórnych i poprawę jakości uzyskiwanych danych analitycznych.

Należy również wspomnieć o jednym z głównych ograniczeń metody, jakim jest trudność w ogniskowaniu jonów ciężkich o wysokiej energii przy użyciu standardowych soczewek magnetycznych. W celu poprawy skupienia zastosowano w układzie dodatkowy system ogniskujący w postaci zwężającej się kapilary szklanej (tzw. soczewki kapilarnej), który zwiększa strumień wyjściowy jonów w wyniku rozpraszania Rutherforda. Ze względu na istotne obniżenie natężenia wiązki jonowej spowodowane przejściem przez kapilarę, w układzie pomiarowym zastosowano detektor cząstek umieszczony w geometrii transmisyjnej, pełniący funkcję wyzwalania sygnału START w pomiarze czasu przelotu TOF. Detektor ten jest jednak podatny na uszkodzenia wskutek intensywnego oddziaływania promieniowania jonizującego, co znacząco ogranicza jego żywotność i w praktyce wymusza jego regularną wymianę. W układzie zastosowanym w niniejszej pracy funkcję detektora wyzwalającego sygnał START pełniła dioda PiN, rejestrująca moment przejścia cząstek w pobliżu próbki i generująca impuls elektryczny inicjujący pomiar. Czas przelotu jonów określano jako różnicę między sygnałem START z diody PiN a sygnałem STOP pochodzącym z detektora MCP, będącego częścią analizatora TOF. Wyznaczenie wartości wspomnianej różnicy czasowej jest kluczowe w celu wyznaczenia masy jonów, co czyni diodę PiN elementem niezbędnym dla skutecznej synchronizacji układu oraz przeprowadzenia wiarygodnej analizy przy użyciu spektrometrii czasu przelotu.

W systemie zastosowanym w ramach niniejszej pracy badawczej, zastosowano analizator TOF-SIMS wyposażony w reflektron, czyli układ elektrostatycznych zwierciadeł umożliwiający odbicie jonów i skierowanie ich ponownie w stronę detektora. Reflektron kompensuje niewielkie różnice w energii kinetycznej jonów o tej samej wartości m/z, co pozwala na ich czasowe uporządkowanie i znacząco zwiększa rozdzielczość czasową oraz masową pomiaru. Dzięki temu system umożliwia precyzyjną identyfikację jonów, szczegółową analizę chemiczną oraz obrazowanie molekularne badanych próbek. Zastosowanie reflektronu w połączeniu z detektorem MCP pozwala na jednoczesną rejestrację pełnego spektrum jonów wtórnych oraz generowanie obrazów chemicznych analizowanej powierzchni z wysoką

rozdzielczością przestrzenną i masową. Detektor MCP zapewnia przy tym wysoką czułość i szybkość detekcji, co przekłada się na wysoką wydajność analityczną całego układu. Szczegółowy opis konstrukcji oraz zasady działania systemu TOF-SIMS wykorzystywanego w instytucie RBI został przedstawiony w publikacjach [68, 69]. Na rysunku 4.5 przedstawiono przykładowe widmo SIMS jednej z analizowanych próbek mięśniowych. W zakresie m/z poniżej 100 dominują sygnały pochodzące od małocząsteczkowych związków, takich jak fragmenty aminokwasów i jony nieorganiczne. Z kolei w wyższych wartościach m/z (powyżej 150) zauważalne są piki odpowiadające fragmentom lipidowym, typowym dla struktury komórkowej mięśni.



Rysunek 4.5. Przykładowe widmo SIMS uzyskane dla próbki mięśniowej. Analizę przeprowadzono w trybie pozytywnym przy użyciu jonów pierwotnych tlenu O^{4+}.

4.3.5. Tryby pracy SIMS

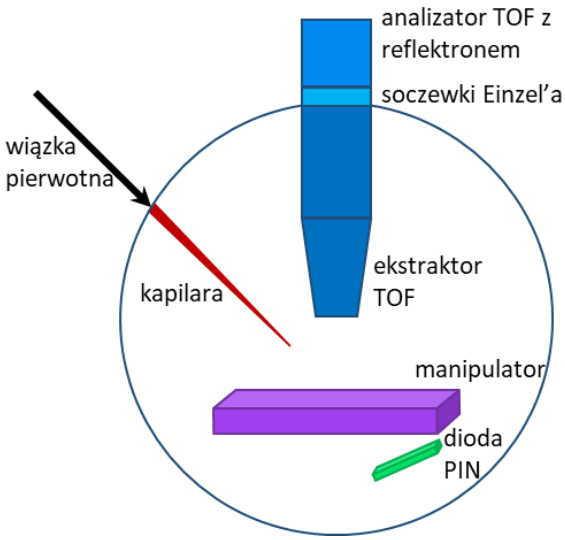
Technika SIMS może być stosowana w dwóch podstawowych trybach, które różnią się gęstością wiązki jonów pierwotnych, co definiuje głębokość analizy powierzchni badanego materiału. Wyróżnia się tryb statyczny oraz dynamiczny. Statyczny SIMS (ang. *static SIMS*) charakteryzuje się niską gęstością jonów pierwotnych (poniżej 10^{13} jonów/cm^2), dzięki czemu analizie podlega tylko wierzchnia warstwa próbki. Pozwala to na minimalizację uszkodzeń próbki, zapewniając jednocześnie wysoką czułość powierzchniową i eliminując sygnał z obszarów już poddanych bombardowaniu jonami. Natomiast dynamiczny SIMS (ang. *dynamic SIMS*) stosowany jest przede wszystkim w warunkach wysokiej gęstości wiązki jonów pierwotnych (powyżej 10^{13} jonów/cm^2) i pozwala na uzyskanie profili głębokościowych oraz szczegółową analizę zmian składu chemicznego w funkcji głębokości. Ze względu na zwiększone prawdopodobieństwo implantacji jonów pierwotnych, tryb ten wymaga uwzględnienia efektów matrycy

(ang. *matrix effect*), które wpływają na zmniejszenie wydajności emisji jonów wtórnych, przez zmianę otoczenia elektronowego powierzchni.

Technika SIMS w połączeniu z możliwością skanowania próbki umożliwia również obrazowanie molekularne. Jednakże w typowych systemach SIMS, gdzie energia wiązki jonów pierwotnych wynosi od kilku do kilkudziesięciu keV (tzw. keV-SIMS), wydajność jonów wtórnych jest zazwyczaj niewystarczająca do wygenerowania obrazu próbki przed jej zniszczeniem wskutek bombardowania. W odpowiedzi na tę ograniczoną efektywność, kilka laboratoriów na świecie [71, 72], w tym Ruđer Bošković Institute [68], wykorzystuje wiązkę ciężkich jonów o energii kilku MeV (MeV-SIMS). Metoda ta jest szczególnie użyteczna do obrazowania próbek biologicznych oraz materiałów organicznych ze względu na mniejszą fragmentację molekuł i możliwość analizy głębszych warstw materiału.

Wykorzystanie wiązki MeV-SIMS, dostępnej w RBI, zostało również udokumentowane w literaturze [69, 73, 74]. Podstawowa różnica między konwencjonalnym keV-SIMS i MeV-SIMS dotyczy generacji wiązki jonów pierwotnych. Osiągnięcie energii rzędu MeV wymaga zastosowania akceleratorów o potencjale kilku megawoltów. W MeV-SIMS rozpylanie jest wywoływane głównie przez hamowanie elektronowe jonów pierwotnych przechodzących przez próbkę, a nie poprzez bezpośrednie zderzenia i przekazanie pędu, jak ma to miejsce w keV-SIMS. Taki mechanizm prowadzi do bardziej selektywnego zrywania wiązań atomowych na skutek oddziaływań elektronowych, co istotnie ogranicza fragmentację molekuł i umożliwia dokładniejszą analizę ich składu. Jest to aspekt szczególnie istotny w kontekście badań materiałów biologicznych [75].

W badaniach przeprowadzonych na potrzeby niniejszego doktoratu wykorzystano wiązkę jonów pierwotnych O_4^+ o energii 9 MeV, pochodzącą z akceleratora Van de Graaffa. Pomiary wykonano w trybie ciągłym oraz za pomocą układu TOF-MeV-SIMS, którego szczegółowy opis konstrukcji i działania zawarto w publikacji [68]. Układ SIMS zastosowany w niniejszych badaniach obejmuje standardowe elementy aparatury tego typu, takie jak: źródło jonów pierwotnych, system skanowania, komora analityczna oraz analizator masowy; ich rozmieszczenie przedstawiono schematycznie na rysunku 4.6.



Rysunek 4.6 Schematyczna budowa układu SIMS wykorzystanego w badaniach. Główne komponenty obejmują źródło jonów pierwotnych, system skanowania próbki, komorę analityczną oraz analizator masowy z detektorem.

4.4. Spektrometria masowa z desorpcją i jonizacją laserową z wykorzystaniem matrycy

4.4.1. Wprowadzenie do spektrometrii masowej z jonizacją miękką

Spektrometria masowa MS (ang. *Mass Spectrometry*) jest zaawansowaną techniką analityczną, umożliwiającą identyfikację i charakterystykę cząsteczek chemicznych poprzez ich jonizację i analizę stosunku masy do ładunku. Chociaż fundamenty tej techniki sięgają początku XX wieku, dopiero rozwój metod tzw. „miękkiej jonizacji" umożliwił jej szerokie zastosowanie w badaniach biomolekularnych.

Do najbardziej przełomowych technik należą ESI (ang. *Electrospray Ionization*) oraz MALDI [76]. W odróżnieniu od metod twardej jonizacji np. EI (ang. *Electron Ionization*), techniki miękkie pozwalają na jonizację cząsteczek bez ich znacznej fragmentacji, co jest kluczowe w analizie związków biologicznych o dużej masie cząsteczkowej, takich jak lipidy, białka czy peptydy [77].

4.4.2. Historia rozwoju techniki MALDI

Spektrometria masowa uległa znacznemu rozwojowi na przestrzeni ostatnich pięciu dekad, umożliwiając identyfikację i szczegółową analizę związków biologicznych. Znaczący postęp osiągnięto zwłaszcza w analizie protein i lipidów, związków o dużej masie cząsteczkowej, które odgrywają istotną rolę w identyfikacji zmian degeneracyjnych w tkankach mięśniowych.

Jedną z pierwszych metod stosowanych do masowej analizy próbek organicznych był SIMS, o którym szerzej pisano w rozdziale 4.3. W ramach tej techniki próbki często przygotowywano przez rozpuszczenie w glicerolu. [78]. W trakcie rozwoju metod desorpcji i jonizacji z wykorzystaniem impulsu laserowego pojawiła się koncepcja zastosowania matrycy, jako substancji ułatwiającej przeniesienie energii

i zwiększającej efektywność jonizacji [79]. Już na przełomie lat 60. i 70. XX wieku prowadzono intensywne badania nad metodami jonizacji próbek biologicznych przy użyciu lasera, często w połączeniu z analizatorem czasu przelotu [79–81]. Przełomowym momentem było jednak wynalezienie techniki analizy masowej z wykorzystaniem mikro-próbkowania sondą laserową (ang. *Laser Microprobe Mass Analysis,* LAMMA) przez Hillenkampa i Kaufmana [82], która umożliwiła pierwsze wykrycie sygnałów pochodzących od organicznych polimerów w analizowanych próbkach. Początkowo sygnały te traktowano jako artefakty pomiaru, jednak zainicjowały one systematyczne badania próbek organicznych, które w latach 80 XX wieku doprowadziły do powstania metody spektrometrii mas z wykorzystaniem desorpcji i jonizacji laserowej wspomaganej matrycą MALDI-MS. Akronim MALDI po raz pierwszy pojawił się w literaturze naukowej w 1985 roku, w pracy dotyczącej wpływu długości fali promieniowania UV (ang. *ultraviolet*) na efektywność procesów desorpcji i jonizacji w spektrometrii masowej z użyciem lasera o wysokiej gęstości mocy [83]. Natomiast trzy lata później, opublikowano pierwsze widma masowe białek o masach przekraczających 10 kDa [84], co zapoczątkowało dynamiczny rozwój tej techniki. Od momentu swojego wprowadzenia, technika MALDI ugruntowała swoją pozycję jako jedna z kluczowych metod analizy molekularnej próbek biologicznych, ceniona za wysoką czułość w detekcji cząsteczek o dużej masie, takich jak proteiny i lipidy. Znajduje również zastosowanie w badaniach nad tkankami ludzkimi, co dodatkowo podkreśla jej szerokie możliwości aplikacyjne [85].

Nowoczesne systemy MALDI umożliwiają nie tylko identyfikację cząsteczek, lecz także obrazowanie ich przestrzennego rozkładu w próbce za pomocą techniki IMS (ang. *Imaging Mass Spectrometry*). Uzyskane w ten sposób dane stanowią istotne źródło informacji, które mogą przyczynić się do pogłębienia wiedzy na temat mechanizmów chorób mięśni [78].

4.4.3. Rola matryc w procesie jonizacji

W spektrometrii masowej MALDI kluczowym elementem jest matryca. Jest to związek, którego zadaniem jest pochłanianie energii impulsu laserowego i pośredniczenie w desorpcji oraz jonizacji analitu. Chociaż istnieją alternatywne podejścia z użyciem matryc nieorganicznych takie jak grafen [86], czy tlenki metali [87], najczęściej stosowane są niskocząsteczkowe związki organiczne, które dopasowuje się indywidualnie do rodzaju analitu oraz parametrów lasera. Najczęściej wykorzystywanymi laserami w systemach MALDI są lasery azotowe o długości fali 337 nm oraz lasery Nd:YAG emitujące światło o długości fali 355 nm lub 266 nm.

Matryce o zbyt dużej masie cząsteczkowej mogą wykazywać ograniczoną zdolność do efektywnego przekazywania energii cząsteczkom analitu, co negatywnie wpływa na wydajność jonizacji. Z tego względu istotne jest, aby masa matrycy była odpowiednio dobrana. Musi być ona na tyle niska, by umożliwić skuteczną jonizację analizowanych związków, a jednocześnie nie generować nadmiernych sygnałów własnych, które mogłyby zakłócać interpretację widma.

Matrycę nakłada się na powierzchnię analitu różnymi metodami, na przykład przez odparowanie, sublimację lub nanoszenie z rozpuszczalnikiem. Po nałożeniu matryca krystalizuje, tworząc na powierzchni analitu jednorodną warstwę z krystalitami o wielkości od kilku do kilkuset mikrometrów. Masa skrystalizowanej matrycy jest zwykle wielokrotnie większa niż masa analitu, a jej podstawową rolą jest efektywna absorpcja światła laserowego. Dzięki temu delikatne struktury, takie jak proteiny czy lipidy, nie ulegają łatwym uszkodzeniom termicznym, lecz zostają poddane procesom desorpcji i jonizacji, desorbując razem z cząsteczkami matrycy. Wydajność całego procesu zależy w dużej mierze od jakości oraz jednorodności skrystalizowanej warstwy matrycy [6]. Dobór odpowiedniej matrycy ma kluczowe znaczenie w analizie tkanek mięśniowych, których struktury wykazują wysoką wrażliwość na termiczną depozycję energii pochodzącą z impulsów laserowych.

W procesie pomiarowym przy wykorzystaniu metody MALDI, podczas ekspozycji próbki na impuls laserowy, energia pochłaniana jest głównie przez matrycę, która następnie ulega odparowaniu, wynosząc cząsteczki analitu do fazy gazowej. W powstałej chmurze dochodzi do wymiany jonów (najczęściej protonów H^+ lub kationów sodu Na^+) między matrycą a analitem, co prowadzi do powstania tzw. jonów quasi-molekularnych, takich jak $[M+H]^+$, czy $[M+Na]^+$, których masa odpowiada sumie masy cząsteczki analitu i przyłączonego jonu. Zjawisko to dominuje w trybie dodatnim jonizacji, co wynika z obecności łatwo protonujących się grup funkcyjnych (np. aminowych), powszechnych w strukturach biocząsteczek. Możliwe jest także formowanie anionów w trybie ujemnym, np. w wyniku deprotonacji (utraty H^+), jednak tryb ten stosowany jest rzadziej ze względu na mniejszą częstość występowania grup ulegających deprotonacji, takich jak grupy karboksylowe.

Mimo ponad trzydziestu lat intensywnych badań, mechanizm jonizacji w MALDI nadal nie jest do końca poznany. Obecnie przyjmuje się, że jonizacja zachodzi głównie w chmurze cząsteczek powstałej w wyniku ablacji laserowej, w której dochodzi do dynamicznej wymiany jonów między matrycą a cząsteczkami analitu. Ze względu na wciąż niepełne poznanie mechanizmu jonizacji w MALDI, przyjmuje się powszechnie, że w procesie dominują jony o pojedynczym ładunku, co ułatwia interpretację widm i umożliwia bezpośrednie przypisanie wartości m/z do masy monoizotopowej analizowanego związku.

Badania eksperymentalne przeprowadzone na potrzeby niniejszej rozprawy metodą MALDI zostały zrealizowane przy współpracy z Zespołem Biochemii i Neurobiologii znajdującym się na Wydziale Inżynierii Materiałowej i Ceramiki Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie. Wspomniany zespół badawczy w artykule [88] podkreślił kluczowe znaczenie doboru odpowiedniej matrycy w kontekście jakości uzyskiwanych widm oraz map jonowych. W pracy tej szczegółowo oceniono wpływ rodzaju matrycy, liczby warstw oraz parametrów nanoszenia (z wykorzystaniem systemu SunCollect) na efektywność analizy lipidów. Wykazano, że wybór matrycy (np. DHB, NEDC, 1,5-diaminonaftalen) oraz warunki jej aplikacji istotnie wpływają na intensywność sygnału i jakość obrazów jonowych, co wymaga

szczególnej ostrożności podczas porównywania wyników uzyskanych w różnych warunkach eksperymentalnych.

4.4.4. Zarys teoretyczny metody MALDI

Proces pomiarowy w spektrometrii mas MALDI można ogólnie podzielić na trzy etapy: ablację (desorpcję), jonizację oraz detekcję. Całość odbywa się w komorze próżniowej, zazwyczaj w warunkach wysokiej próżni (ang. *high vacuum*). Kluczowym etapem inicjującym proces MALDI jest absorpcja promieniowania laserowego przez matrycę, która skutkuje gwałtownym nagrzaniem i prowadzi do desorpcji oraz ablacji materiału z powierzchni próbki, w tym także cząsteczek analitu. Transfer energii w głąb matrycy podczas tego zjawiska opisuje prawo Beera:

$$H = H_0 \cdot e^{-\alpha z}\,, \tag{5}$$

gdzie: H reprezentuję fluencję (gęstość energii lasera) na głębokości z, H_0 jest to fluencja na powierzchni próbki, natomiast α to współczynnik absorpcji materiału [78].

Odwrotność współczynnika α stanowi tzw. głębokość penetracji δ, która przedstawia odległość od powierzchni próbki po przebyciu której fluencja światła laserowego spadła do 30% wartości początkowej. Ponieważ współczynnik materiału jest ściśle zależny od długości fali promieniowania elektromagnetycznego, głębokość penetracji również pozostaje ściśle z nią powiązana. W praktyce oznacza to, że zastosowanie różnych matryc w połączeniu z wykorzystaniem lasera o konkretnej długości fali (np. 337 nm dla lasera azotowego UV) skutkuje różnymi wartościami głębokości penetracji (sięgającymi od kilkudziesięciu do kilkuset nanometrów) w zależności od właściwości absorpcyjnych matrycy.

Alternatywnym podejściem jest wykorzystanie promieniowania laserowego o innej długości fali, na przykład w zakresie podczerwieni (ang. *infrared,* IR) około 3 μm, które pozwala na penetrację i przekazanie energii pojedynczego impulsu laserowego nawet na głębokości sięgającej 1 μm. Lasery stosowane w technice MALDI zazwyczaj generują impulsy, co umożliwia punktową absorpcję energii, a w konsekwencji ablację materiału przez wielokrotne naświetlanie tego samego miejsca, nawet przy stosunkowo niewielkiej głębokości penetracji. Nawet przy niskich głębokościach penetracji. Energia Ea zaabsorbowana przez jednostkę objętości V w technice MALDI jest w zasadzie podstawowym parametrem definiującym proces ablacji/desorpcji. Bazując na równaniu numer 5 można przedstawić zależność:

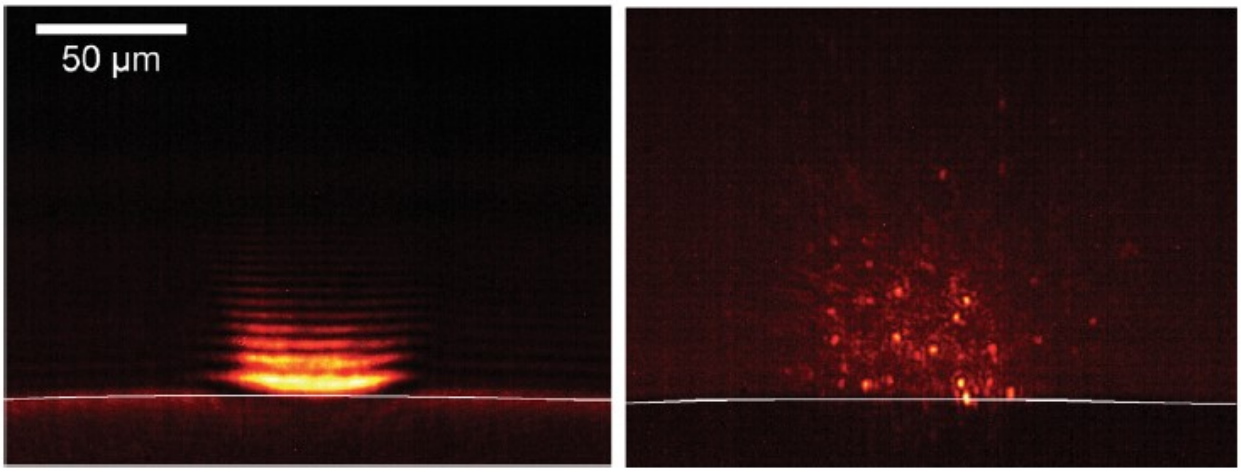
$$\frac{Ea}{V} = \alpha H. \tag{6}$$

W związku z tym, jeśli matryca zastosowana w próbce charakteryzuje się stosunkowo wysokim współczynnikiem absorpcji α, konieczne jest użycie niższych wartości fluencji powierzchniowej H_0. Z tego względu niezbędne jest indywidualne dostosowanie parametrów wiązki laserowej oraz rodzaju i sposobu

przygotowania matrycy do specyfiki danego układu pomiarowego oraz typu analizowanej próbki w metodzie MALDI.

W literaturze spotyka się dwa terminy opisujące rozpylenie próbki: ablacja oraz desorpcja. W istocie są to różne procesy. Desorpcja dotyczy rozpylenia pojedynczych cząstek lub molekuł, natomiast ablacja oznacza usunięcie kilku monowarstw atomowych materiału. Dlatego też, ablacja jest bardziej precyzyjnym określeniem, jednak z uwagi na to, że podczas depozycji energii fotonów w ciele stałym zachodzi szereg zjawisk prowadzących do rozpylenia materiału, oba terminy bywają używane zamiennie [78].

Jeśli energia zdeponowana przez impuls świetlny przekracza łączną energię wiązań międzycząsteczkowych w danej objętości, dochodzi do gwałtownego przejścia materiału z fazy skondensowanej do gazowej, co prowadzi do uwolnienia cząstek matrycy i analitu do atmosfery próżniowej. Proces ten wynika z lokalnego, intensywnego ogrzania relatywnie cienkiej warstwy powierzchniowej matrycy, która silnie absorbuje promieniowanie laserowe. Ze względu na ultrakrótki czas trwania impulsu laserowego, rozpraszanie energii termicznej przez przewodnictwo cieplne lub przeniesienie drgań jest zbyt wolne, aby rozproszyć zdeponowaną energię. Powoduje to szybkie, a czasem nawet „eksplozywne" przejście fazowe, czyli ablację. W efekcie powstaje ekspandująca w próżni chmura (ang. *plume*) złożona z cząsteczek matrycy, analitu, fragmentów molekularnych oraz klastrów (agregatów matrycy i analitu). W wspomnianej chmurze zachodzą dalsze procesy, takie jak chłodzenie przez rozprężanie, zderzenia, wymiana ładunków oraz, co najważniejsze dla MALDI, jonizacja analitu. Przykład eksperymentalnej ablacji cząstek matrycy oraz rozprężania chmury cząstek został przedstawiony na poniższym rysunku 4.7. Dolna biała linia na zdjęciach przedstawia powierzchnię matrycy, w tym przypadku alkoholu nitrobenzylowego. Lewa fotografia ukazuje obraz powierzchni w polu ciemnym, wykonany 45 ns po impulsie laserowym. Natomiast zdjęcie po prawej stronie pokazuje chmurę cząstek w świetle rozproszonym, zarejestrowaną pod kątem 90° względem powierzchni próbki, 311 ns po impulsie [89].



Rysunek 4.7. Generacja chmury cząstek w technice MALDI, z wykorzystaniem lasera Nd:YAG (266 nm), uchwycona przy użyciu fotografii szybkiej z rozdzielczością czasową 8 ns i przestrzenną 4 µm [89].

4.4.5. Złożoność jonizacji w MALDI w świetle danych eksperymentalnych

Pomimo licznych badań, mechanizmy odpowiedzialne za jonizację w technice MALDI wciąż pozostają nie do końca wyjaśnione. Dotyczy to zarówno samego procesu ablacji, jak i sposobu, w jaki dochodzi do powstania jonów analitu i matrycy. Wyniki modelowań teoretycznych często nie są ze sobą zgodne, a niektóre z nich są postrzegane jako nieintuicyjne lub kontrowersyjne. Nie ulega jednak wątpliwości, że MALDI umożliwia skuteczną jonizację związków, co przekłada się na wysoką czułość tej techniki. Eksperymenty wykazują, że wydajność jonizacji analitu (stosunek cząstek naładowanych do neutralnych) w przypadku MALDI wynosi zazwyczaj od 0,1 % do 1 %, chociaż w szczególnych przypadkach może dochodzić nawet do 10 % [78]. Jednocześnie liczba zjonizowanych cząsteczek matrycy jest kilka rzędów niższa.

Zależność między intensywnością sygnałów jonów matrycy i analitu, określona na podstawie widm masowych, sugeruje, że do wymiany ładunków dochodzi w obrębie ekspandującej chmury cząstek powstałej w wyniku ablacji, a być może także bezpośrednio po napromieniowaniu próbki. Zdarza się również zaobserwować widma, w których przy dużym nadmiarze matrycy (rzędu 10^4) rejestrowane są intensywne sygnały analitu przy jednocześnie śladowej obecności jonów matrycy [90].

4.4.6. Modele generowania jonów w MALDI

W literaturze istnieje kilka modeli próbujących wyjaśnić mechanizm powstawania jonów w technice MALDI, jednak żaden z nich nie obejmuje w pełni wszystkich obserwowanych zjawisk, ale każdy wnosi istotne elementy do ogólnego zrozumienia procesu. Obecnie dominują dwa główne modele teoretyczne: klasyczny model fotojonizacji oraz tzw. model „szczęśliwego ocalałego" (ang. *lucky survivor*). W modelu fotojonizacji zakłada się, że cząsteczki matrycy ulegają jonizacji po absorpcji najczęściej dwóch fotonów. Powstałe w ten sposób jony matrycy mają następnie przekazywać ładunek cząsteczkom analitu (np. przez transfer protonu lub elektronu) w powstającej chmurze gazowej. Jednak przy typowych (niskich) wartościach fluencji lasera prawdopodobieństwo takich nieliniowych procesów jest niewielkie. Dodatkowo obecność jonów rodnikowych matrycy (np. M^+, $[M+2H]^+$, $[M-2H]^-$) w widmach MALDI sugeruje, że ten mechanizm nie tłumaczy w pełni obserwowanych zjawisk, w szczególności dominacji jonów o pojedynczym ładunku. Alternatywny model „lucky survivor" zakłada, że jony analitu powstają jeszcze przed ablacją lub w jej bardzo wczesnym etapie, w stabilnych mikroklastrach matryca-analit. Jony powstają w efekcie oddziaływań w fazie skondensowanej, ale tylko te, które przetrwają serię procesów neutralizacji w fazie gazowej, są wykrywane przez detektor. Model ten tłumaczy m.in. dominację jonów o pojedynczym ładunku w widmach MALDI oraz niską wydajność jonizacji. Dodatkowym argumentem przeciwko występowaniu wyłącznie modelu fotojonizacji jest fakt, że widma uzyskiwane z użyciem laserów UV i IR

(mimo dużej różnicy energii fotonów) są często bardzo podobne. Sugeruje to znaczący udział procesów termicznych oraz rozpadów klastrów matryca-analit.

W praktyce proces jonizacji w MALDI jest wypadkową wielu czynników: energii fotonów, zdolności absorpcyjnej matrycy, chemicznego powinowactwa między matrycą i analitem, a także dynamiki chmury poablacyjnej [78]. Dlatego też kluczowe znaczenie dla skuteczności i powtarzalności analizy ma dobór odpowiedniej matrycy i sposób przygotowania próbki. Matryca nie tylko umożliwia efektywną absorpcję promieniowania laserowego, ale także wpływa na dynamikę desorpcji i stopień fragmentacji cząsteczek. Ostateczna efektywność metody MALDI zależy więc nie tylko od parametrów instrumentalnych, lecz także od odpowiedniego dopasowania właściwości fizykochemicznych matrycy do charakterystyki analizowanej próbki.

4.4.7. IMS - molekularne obrazowanie tkanek przy użyciu spektrometrii mas

Obrazowa spektrometria masowa IMS stanowi zaawansowaną technologię analityczną, umożliwiającą uzyskiwanie informacji molekularnych bezpośrednio z tkanek biologicznych przy jednoczesnym zachowaniu integralności przestrzennej próbki. Technika ta łączy wysoką czułość spektrometrii mas z możliwością tworzenia szczegółowych map rozkładu związków chemicznych, takich jak białka, peptydy, lipidy, metabolity czy leki, w określonym kontekście histologicznym.

IMS wyróżnia się możliwością detekcji związków bez konieczności ich uprzedniego znakowania. Oznacza to, że analiza może być prowadzona bez dodatkowej chemicznej modyfikacji próbki, co minimalizuje ryzyko interferencji z naturalnymi właściwościami badanych analitów oraz umożliwia jednoczesne obrazowanie wielu cząsteczek w pojedynczym pomiarze. Takie podejście znacząco zwiększa efektywność analiz molekularnych, czyniąc IMS szczególnie użytecznym narzędziem w badaniach nad patogenezą chorób, mikrośrodowiskiem komórkowym oraz odpowiedzią tkanek na leczenie. Przykładowo, w kontekście badań onkologicznych technika ta znajduje coraz szersze zastosowanie w diagnostyce i klasyfikacji nowotworów. Umożliwia wykrywanie szerokiego spektrum związków, takich jak białka, peptydy, lipidy, węglowodany czy glikokoniugaty. IMS pozwala na lokalizację marginesów guza, ocenę jego heterogenności, a także może wspomagać identyfikację punktu rozsiewu nowotworu na podstawie badania przerzutu [91]. Dostarcza również informacji prognostycznych i może wspomagać klasyczne metody diagnostyczne, takie jak histopatologia, immunohistochemia czy metody genetyki molekularnej [91]. Wszystko to sprawia, że IMS staje się wartościowym narzędziem w nowoczesnej diagnostyce nowotworów oraz w procesie odkrywania nowych biomarkerów diagnostycznych.

Kluczowy postęp w rozwoju IMS stanowiło zastosowanie techniki MALDI, w której matryca pełni rolę mediatora jonizacji po absorpcji promieniowania laserowego. Punktowe napromieniowanie próbki umożliwia uzyskanie mapy powierzchniowego rozkładu molekuł z wysoką rozdzielczością masową i szerokim zakresem detekcji (od kilkuset daltonów do ponad 100 kDa). W praktyce obrazowa spektrometria

masowa może być realizowana w dwóch głównych trybach akwizycji danych: trybie pełnoobszarowym (ang. *full scan imaging*) obejmującym całą powierzchnię przekroju tkankowego oraz trybie ukierunkowanym (ang. *targeted imaging*) skoncentrowanym na konkretnych, biologicznie istotnych obszarach.

W przypadku obrazowania ukierunkowanego identyfikacja regionów zainteresowania ROI opiera się zazwyczaj na wcześniejszej analizie histologicznej. Na przykład, po uprzednim zabarwieniu preparatu hematoksyliną i eozyną (H&E), patolog lub biolog może wskazać obszary o szczególnym znaczeniu diagnostycznym. Współrzędne wybranych punktów są następnie wykorzystywane do precyzyjnego naniesienia matrycy jedynie na te fragmenty próbki. Taki wybiórczy sposób aplikacji matrycy, zsynchronizowany z systemem pozycjonowania spektrometru masowego, pozwala na selektywne pozyskanie danych wyłącznie z uprzednio wskazanych obszarów.

Opisane podejście stanowi przykład synergii klasycznych metod histopatologicznych z nowoczesną analizą molekularną. Zastosowanie obrazowania ukierunkowanego nie tylko skraca czas pomiaru i ogranicza objętość generowanych danych, ale także zwiększa ich trafność biologiczną. W kontekście badań wysokoprzepustowych pozwala to na znaczne oszczędności zasobów analitycznych i czasowych.

Dobór odpowiedniej strategii akwizycji powinien być zawsze uzależniony od celu badawczego. Jeśli celem jest uzyskanie pełnego, przestrzennego rozkładu związków w próbce, zaleca się zastosowanie trybu pełnoobszarowego. Natomiast w sytuacjach, gdy kluczowe znaczenie ma analiza konkretnych zmian patologicznych, bardziej adekwatne staje się obrazowanie ukierunkowane, wymagające ścisłej współpracy z histopatologiem.

5. Metodologia pomiarowa

5.1. Klasyfikacja próbek

Na potrzeby analiz badawczych próbki tkanek mięśniowych zostały sklasyfikowane w trzech podstawowych grupach, zgodnie z podziałem zaprezentowanym w rozdziale 2.4 zatytułowanym „Uwagi metodologiczne", stanowiącym główną ideę klasyfikacji procesów patologicznych mięśni, badanych w niniejszej rozprawie:

- grupa C (kontrolna) obejmująca próbki mięśni szkieletowych bez widocznych zmian patologicznych w badaniu histopatologicznym i stanowiące odniesienie dla analizy porównawczej zmian występujących w grupach ze zmianami patologicznymi,

- grupa M (miopatyczna) obejmująca próbki mięśni wykazujące cechy miopatii o zróżnicowanej, nie zawsze jednoznacznie zidentyfikowanej etiologii, zawierające zarówno zmiany pierwotne, wtórne w tym także neurogenne,

- grupa D (dystroficzna) obejmująca próbki mięśni pochodzące od pacjentów z rozpoznaną dystrofią mięśniową niezależnie od typu, w tym m.in. dystrofią obręczowo-kończynową (LGMD) i wykazujące charakterystyczne zmiany odnoszone do dystrofii mięśniowej takie jak: silne zróżnicowanie średnicy włókien, zwiększenie endomysium, a w części przypadków także specyficzne zaburzenia immunofenotypowe np. brak ekspresji dysferliny itp..

Dla przejrzystości dalszych analiz, każdej z grup przypisano skróty C, M i D, które będą konsekwentnie stosowane w kolejnych częściach pracy. W zależności od rodzaju i specyfiki zastosowanej metody pomiarowej, dokonano również rozszerzeń i regrupowania materiału, co zostało szczegółowo opisane w odpowiednich sekcjach analitycznych.

5.2. Technika PIXE

5.2.1. Preparatyka próbek

Próbki tkanek, które wykorzystano w opisanych poniżej eksperymentach, zostały pobrane od pacjentów z podejrzeniem choroby mięśniowej podczas biopsji chirurgicznej, przeprowadzonej poprzez nacięcie skóry i pełny dostęp do mięśnia w znieczuleniu miejscowym. Przed kwalifikacją poszczególnych próbek biologicznych do dalszych etapów badań eksperymentalnych, każdorazowo przeprowadzano szczegółową ocenę diagnostyczną z zastosowaniem standardowych procedur wykorzystywanych we współczesnej miopatologii. Analizy obejmowały zarówno barwienia histologiczne m. in. z wykorzystaniem

hematoksyliny i eozyny, jak i histochemiczne w szczególności stosowane w identyfikacji poszczególnych typów włókien mięśniowych i aktywności enzymatycznej takie jak aktywność ATP-azowa włókien w różnym pH zgodnie z ogólnie przyjętymi, międzynarodowymi standardami diagnostyki neuropatologicznej. Proces ten został zrealizowany w Zakładzie Neuropatologii Katedry Patomorfologii Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie. Badania zostały zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum (numer zgody: 1072.6120.249.2020).

W celu zachowania integralności strukturalnej materiału biologicznego każda z badanych próbek mięśniowych została poddana kriokonserwacji, niezwłocznie po wykonanej biopsji metodą szokowego zamrożenia w izopentanie schłodzonym w ciekłym azocie. Takie podejście pozwala na minimalizację artefaktów mrożeniowych i maksymalną wierność odwzorowania mikrostruktury komórkowej i tkankowej. Przeciętna średnica przekroju bioptatu mięśnia mierząc w płaszczyźnie prostopadłej do podłużnej osi włókien wynosiła od około 3 mm do 5 mm. Z tak przygotowanych bloków tkankowych za pomocą kriomikrotomu (Leica Biosystems, CM 1860) w temperaturze -20 °C po uprzednim wykonaniu skrawków na potrzeby standardowej diagnostyki neuropatologicznej (o czym wspomniano w akapicie wyżej), kontynuując proces skrawania wycinano kolejne skrawki o kontrolowanej grubości rzędu kilku mikrometrów, do celów niniejszej badawczych w ramach niniejszej rozprawy. Umożliwiło to m. in. jednoczesną analizę dwuparametryczną i porównawczą w ramach zaplanowanych procedur badawczych na skrawkach bezpośrednio odwzorowujących strukturę zmian diagnozowanych neuropatologicznie.

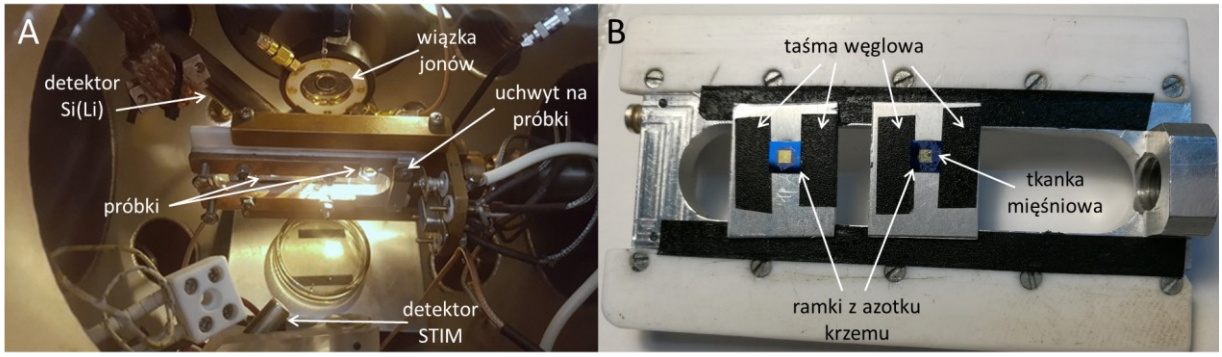
Na potrzeby metody PIXE dla każdej próbki, z wykorzystaniem kriomikrotomu pozyskano dwa sąsiadujące przekroje o grubości 8 μm. Jeden z nich przeznaczano do klasycznej analizy histologicznej i osadzono na standardowym szkiełku mikroskopowym, natomiast drugi zamocowywano na okienku z azotku krzemu Si_3N_4 o grubości 200 nm i wymiarach 2 × 2 mm² (Norcada, Kanada). Aby zminimalizować wpływ obecności wody na wyniki spektroskopowe, analizowane próbki poddawano procesowi liofilizacji w temperaturze -80 °C (bez dalszej obróbki chemicznej), zapewniając efektywne usunięcie wilgoci bez naruszania mikrostruktury. Po skompletowaniu materiału badawczego sklasyfikowano go w trzech podstawowych grupach jak wspomniano wyżej w rozdziale 5.1.

5.2.2. Wstępne przygotowanie i selekcja obszarów pomiarowych

Eksperymenty przeprowadzono w Laboratorium Interakcji Oddziaływania Wiązki Jonowej Instytutu Ruđer Bošković w Zagrzebiu (Chorwacja), przy użyciu akceleratora Tandetron o napięciu 1 MV. Do wzbudzenia atomów w analizowanych próbkach zastosowano wysokoenergetyczną, zogniskowaną mikrowiązkę protonów o energii 2 MeV, co umożliwiło analizę pierwiastkową z rozdzielczością mikrometryczną. Emisję promieniowania rentgenowskiego indukowanego zderzeniami cząstek z atomami zarejestrowano za pomocą detektora typu Si(Li) produkcji Princeton Gamma-Tech Institute, o aktywnej

powierzchni 30 mm² i oknie berylowym o grubości 12,5 µm. Detektor umieszczono pod kątem 135° względem osi wiązki, w odległości około 4 cm od powierzchni próbki. W celu ograniczenia wpływu efektów radiacyjnych na strukturę tkanek próbki zostały osadzone na tzw. „zimnym palcu" (ang. *cold finger*) i aktywnie chłodzone przy użyciu kriostatu z ciekłym azotem. Dodatkowo, w celu przeciwdziałania gromadzeniu się ładunków elektrostatycznych na napromienianych powierzchniach, ramki Si_3N_4 zamontowano na uchwytach za pomocą taśmy przewodzącej na bazie węgla.

Analiza PIXE została poprzedzona pomiarami wykonanymi metodą skaningowej transmisyjnej mikroskopii jonowej STIM, co pozwoliło na równoczesne odwzorowanie zarówno rozkładu pierwiastków, jak i zmienności gęstości powierzchniowej w obrębie poszczególnych przekrojów. Próbki skanowano mikrowiązką jonów o średnicy około 1 × 1 µm², a dane STIM rejestrowano za pomocą detektora krzemowego PIPS (ang. *Passivated Implanted Planar Silicon*) o grubości 300 µm, ustawionego pod kątem 25° względem osi wiązki. Szczegółowa konfiguracja komory detekcyjnej oraz układ optyczny przedstawione zostały schematycznie na rysunku 5.1 A, natomiast zdjęcie zastosowanego uchwytu pomiarowego wraz z zamontowanymi próbkami znajduje się na rysunku 5.1 B.

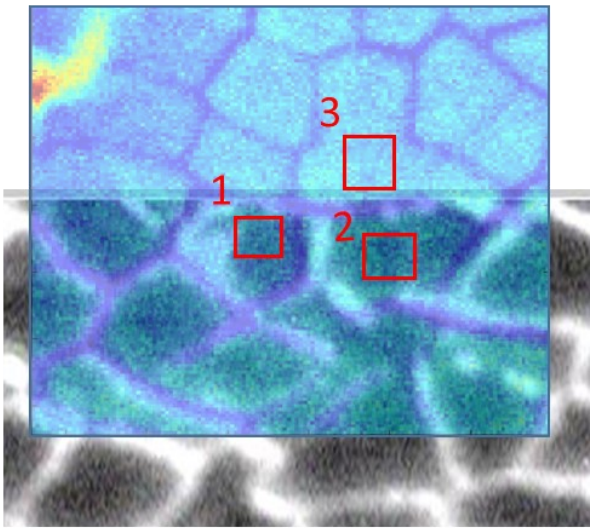


Rysunek 5.1 A - Widok wnętrza komory pomiarowej układu PIXE, z widocznymi elementami konstrukcyjnymi oraz uchwytem detektora. B - Uchwyt na próbki z zamocowanymi ramkami krzemowymi, do których przymocowano skrawki tkanek za pomocą taśmy węglowej.

W opisywanych pomiarach skoncentrowano się na wybranych obszarach zawierających pojedyncze włókna mięśniowe. Tego typu podejście umożliwiało uzyskanie lokalnych charakterystyk chemicznych bez dodatkowych sygnałów tła pochodzących ze strony struktur otaczających. W pierwszym etapie przeprowadzono wstępne skanowanie tkanek mięśniowych metodą STIM, co pozwoliło na uzyskanie ogólnego obrazu struktury tkanki. Na tej podstawie na każdej z próbek starano się wytypować po trzy obszary badawcze, w których dokonano dalszych pomiarów metodą PIXE z zastosowaniem ustalonej rozdzielczości przestrzennej wynoszącej 128 × 128 pikseli, przy wymiarze pojedynczego piksela równym 2,73 × 2,73 µm². Otrzymane wyniki wraz z szczegółową specyfikacją pomiarową zostały zaprezentowane w publikacji zatytułowanej „*Sub-cellular elemental imaging of human muscle tissues affected by neuromuscular diseases*" [34].

5.2.3. Analiza próbek metodą STIM i identyfikacja włókien

W celu precyzyjnego wyznaczenia lokalizacji włókien mięśniowych, przed rozpoczęciem pomiarów metodą PIXE przeprowadzono obrazowanie przy użyciu techniki STIM. Zastosowanie tej metody umożliwiło jednoznaczną identyfikację poszczególnych struktur mięśniowych, co pozwoliło na przeprowadzenie punktowych analiz w obrębie wybranych włókien. Przykładowe wyniki obrazowania optycznego z nałożonym obrazem STIM przedstawiono na rysunku 5.2. Obraz uzyskano poprzez zestawienie fotografii wykonanej za pomocą mikroskopu optycznego z odpowiadającym jej obrazem uzyskanym techniką STIM o wymiarach około 350 µm × 350 µm. Nałożenie obu metod obrazowania umożliwia jednoznaczną identyfikację struktur mięśniowych. Czerwonymi prostokątami zaznaczono przybliżone obszary skanowania, w których wykonano punktowe pomiary metodą PIXE dla próbki kontrolnej.



Rysunek 5.2 Obraz pochodzący z mikroskopu optycznego z nałożonym obrazem STIM dla próbki kontrolnej [34].

5.2.4. Pomiar PIXE i parametry eksperymentu

Kalibracja aparatury PIXE została przeprowadzona zgodnie z obowiązującymi w danym czasie procedurami instytutowymi, wykorzystując siatkę miedzianą (Cu grid) o stałym rozstawie linii 50 µm jako wzorzec kalibracyjny. Pomiary kalibracyjne wykonano dla dwóch różnych obszarów skanowania: 350 × 350 µm² przy ustawieniu skanu 2 × 1 oraz odpowiednio mniejszego obszaru przy skanie 0,5 × 1. Pozwoliło to na przeprowadzenie kalibracji przestrzennej oraz dokładne odwzorowanie rozkładu pierwiastków na powierzchni próbki. Wstępne skanowanie metodą PIXE wykonano na obszarach o wymiarach 350 µm × 350 µm. Obszary te poddano szczegółowej analizie w celu wytypowania lokalizacji do pomiarów punktowych, umożliwiających uzyskanie map pierwiastkowych o wysokiej rozdzielczości przestrzennej. Dla próbek kontrolnych pomiary przeprowadzono w trzech odrębnych punktach o zbliżonych wymiarach, co pozwoliło na ocenę lokalnych różnic w składzie pierwiastkowym. Lokalizacja punktów

pomiarowych względem tkanki mięśniowej została zilustrowana na rysunku 5.2. Wymiary analizowanych obszarów wyrażone w pikselach oraz ich przybliżone odpowiedniki w mikrometrach przedstawiają się następująco:

- punkt 1: 12 × 11 pikseli (około 32,8 × 30,0 μm^2),
- punkt 2: 14 × 12 pikseli (około 38,2 × 32,8 μm^2),
- punkt 3: 15 × 13 pikseli (około 41,0 × 35,5 μm^2).

Mapy rozkładu liczby zliczeń promieniowania charakterystycznego wybranych pierwiastków przedstawiono na rysunkach 5.3 oraz 5.4. Na rysunku 5.4 kolejno od lewej do prawej zaprezentowano wyniki dla punktów 1, 2 oraz 3. Analiza uzyskanych map pierwiastkowych wykazała wyraźne zróżnicowanie przestrzenne dystrybucji fosforu, siarki, chloru oraz potasu w obrębie dobrze zdefiniowanych struktur włókien mięśniowych. Zaobserwowane różnice w składzie pierwiastkowym morfologicznie niezmienionych tkanek mięśniowych mogą odzwierciedlać fizjologiczną heterogenność ich struktury i funkcji.

Analogiczne pomiary przeprowadzono również dla próbki pochodzącej z grupy dystrofii (rysunki 5.5 - 5.7). W przypadku tej próbki obserwowano mniej wyraźne zaznaczenie struktur włókien, co utrudniało ich jednoznaczną identyfikację. Pomimo tych ograniczeń wykonano punktowe analizy w trzech wybranych obszarach o wymiarach:

- punkt 1: 6 × 6 pikseli (około 16,4 × 16,4 μm^2),
- punkt 2: 6 × 9 pikseli (około 16,4 × 24,6 μm^2),
- punkt 3: 8 × 17 pikseli (około 21,8 × 46,4 μm^2).

Lokalizacja punktów pomiarowych względem tkanki mięśniowej została zobrazowana na rysunku 5.5. Mapy rozkładu liczby zliczeń promieniowania charakterystycznego wybranych pierwiastków przedstawiono na rysunkach 5.6 oraz 5.7. Na rysunku 5.7 kolejno od lewej do prawej zaprezentowano wyniki dla punktów 1, 2 oraz 3.

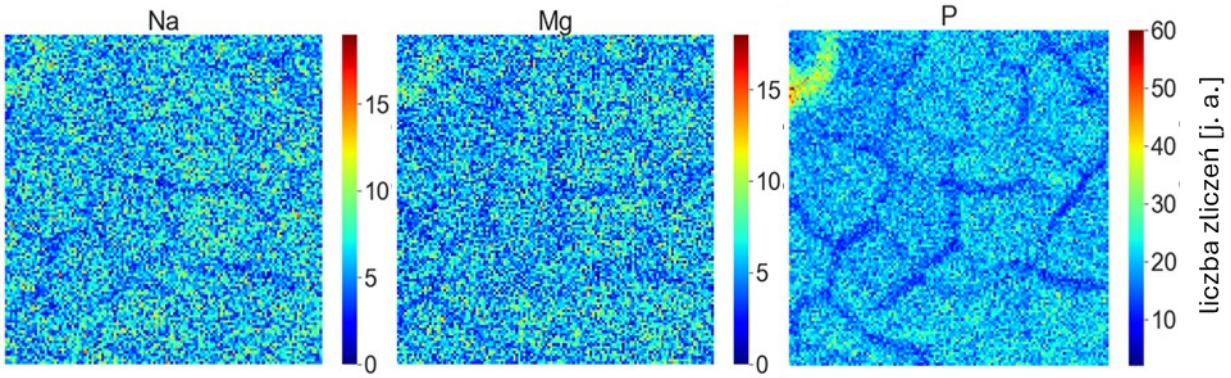
Szczególnie interesujące wyniki uzyskano dla punktu 3, gdzie odnotowano lokalne zwiększenie zawartości żelaza i cynku. Wraz z wiekiem w włóknach mięśniowych obserwuje się lokalny wzrost zawartości żelaza, co może sprzyjać nasileniu peroksydacji lipidów, zwiększonej podatności na uszkodzenia oraz upośledzeniu procesów regeneracyjnych. Stres oksydacyjny stanowi istotny czynnik przyczyniający się do zaniku mięśni oraz zaburzeń ich odbudowy. Co więcej, zwiększona peroksydacja lipidów w obecności żelaza jest charakterystyczna dla ferroptozy - formy śmierci komórkowej zależnej od żelaza. Pomimo potencjalnie niekorzystnych efektów jego nadmiaru, sugeruje się, że żelazo może również odgrywać kluczową rolę w skutecznej regeneracji mięśni [92]. Podkreśla to znaczenie precyzyjnej regulacji homeostazy żelaza w kontekście zarówno procesów degeneracyjnych, jak i naprawczych zachodzących w mięśniach szkieletowych. W świetle przedstawionych danych można przypuszczać, że lokalna

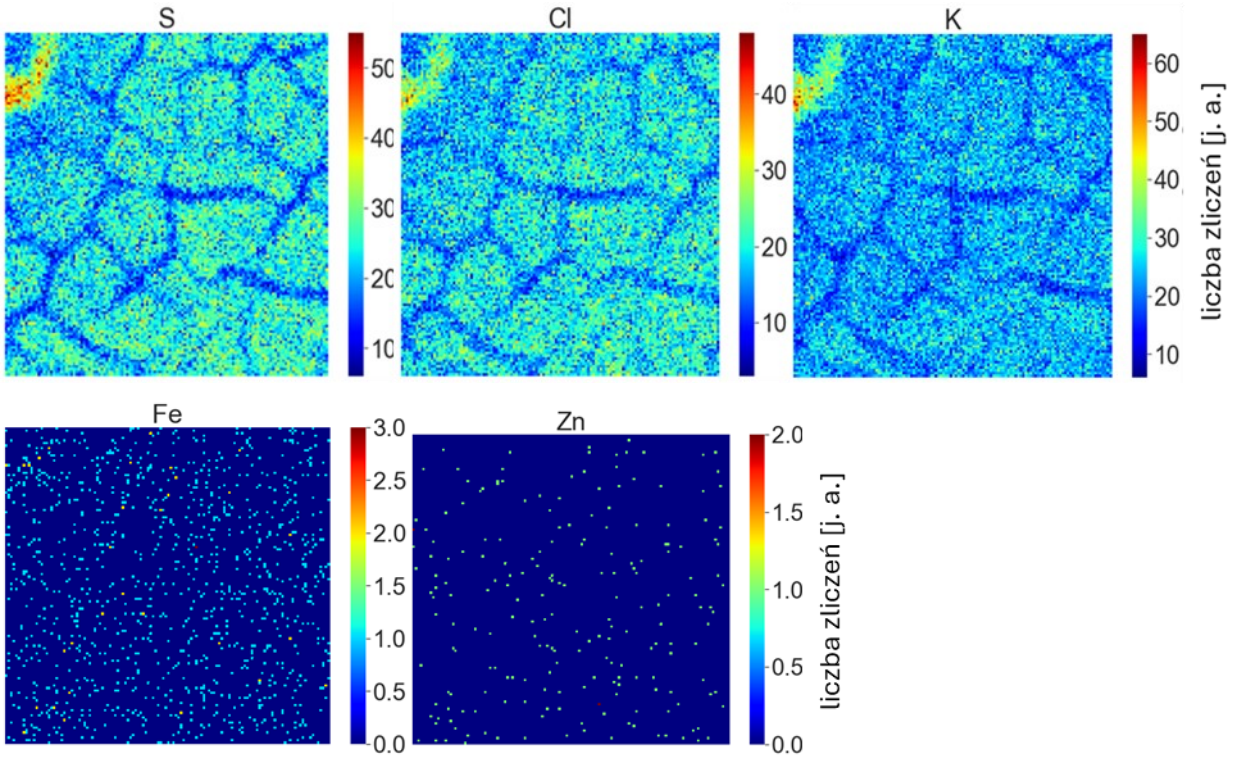
akumulacja żelaza może stanowić element mechanizmu wspierającego odpowiedź regeneracyjną. (rysunek 5.7). Z kolei jony cynku mogą wpływać na strukturę błon komórkowych oraz właściwości fizjologiczne prawidłowo funkcjonujących włókien mięśniowych poprzez wydłużanie czasu trwania potencjału czynnościowego i skurczu [93]. Cynk odgrywa również kluczową rolę w procesach regeneracyjnych, ponieważ jego stężenie oraz aktywność wybranych metaloenzymów cynkozależnych wpływają na tempo syntezy kwasów nukleinowych i białek. W literaturze wykazano, że nadmierne nagromadzenie cynku w mięśniu sercowym oraz mięśniach szkieletowych może wskazywać na zwiększone zapotrzebowanie na cynk w celu wspomagania procesów naprawczych w uszkodzonej tkance [94]. Lokalny wzrost stężenia cynku może stanowić wskaźnik intensywności reakcji komórkowej w odpowiedzi na uszkodzenie tkanek mięśniowych [95]. Dodatkowo zwiększona aktywność enzymów cynkozależnych, towarzysząca procesowi dystroficznemu, może również przyczyniać się do obserwowanego wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia Zn.

Dodatkowo, dla próbki reprezentującej grupę miopatii, przeprowadzono pomiary w dwóch wybranych strefach punktowych (rysunki 5.8 - 5.10). Wymiary tych obszarów prezentują się następująco:

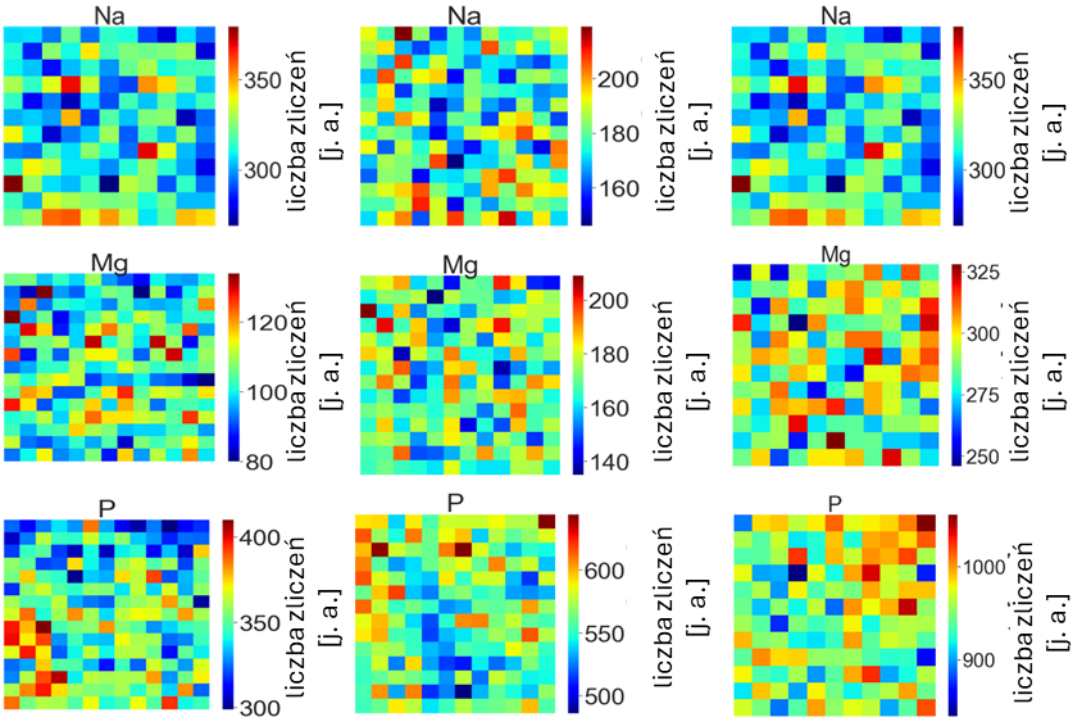
- punkt 1: 10 × 18 pikseli (około 27,3 × 49,1 µm²),
- punkt 2: 13 × 37 pikseli (około 35,5 × 101,0 µm²).

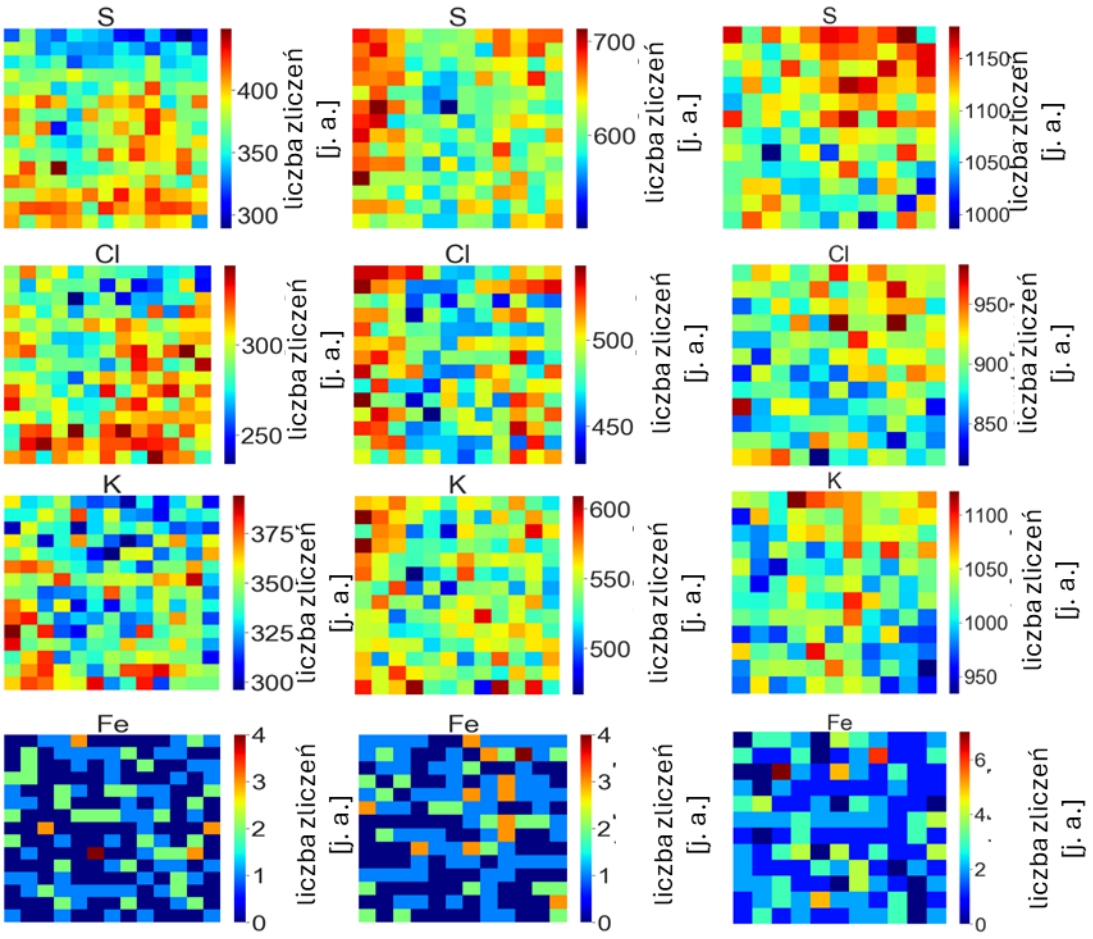
Lokalizacja punktów pomiarowych względem tkanki mięśniowej została zobrazowana na rysunku 5.8. Mapy rozkładu liczby zliczeń promieniowania charakterystycznego wybranych pierwiastków przedstawiono na rysunkach 5.9 oraz 5.10. Na rysunku 5.10 kolejno od lewej do prawej zaprezentowano wyniki dla punktów 1 oraz 2.





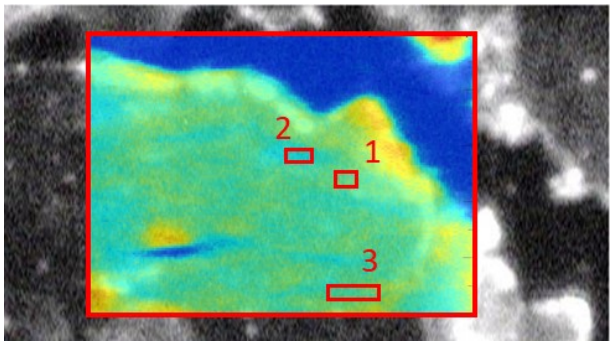
Rysunek 5.3 Mapy rozkładu liczby zliczeń wzbudzonego promieniowania charakterystycznego wybranych pierwiastków dla próbki z grupy kontrolnej, wykonane metodą PIXE na obszarze około 350 x 350 μm² [34].



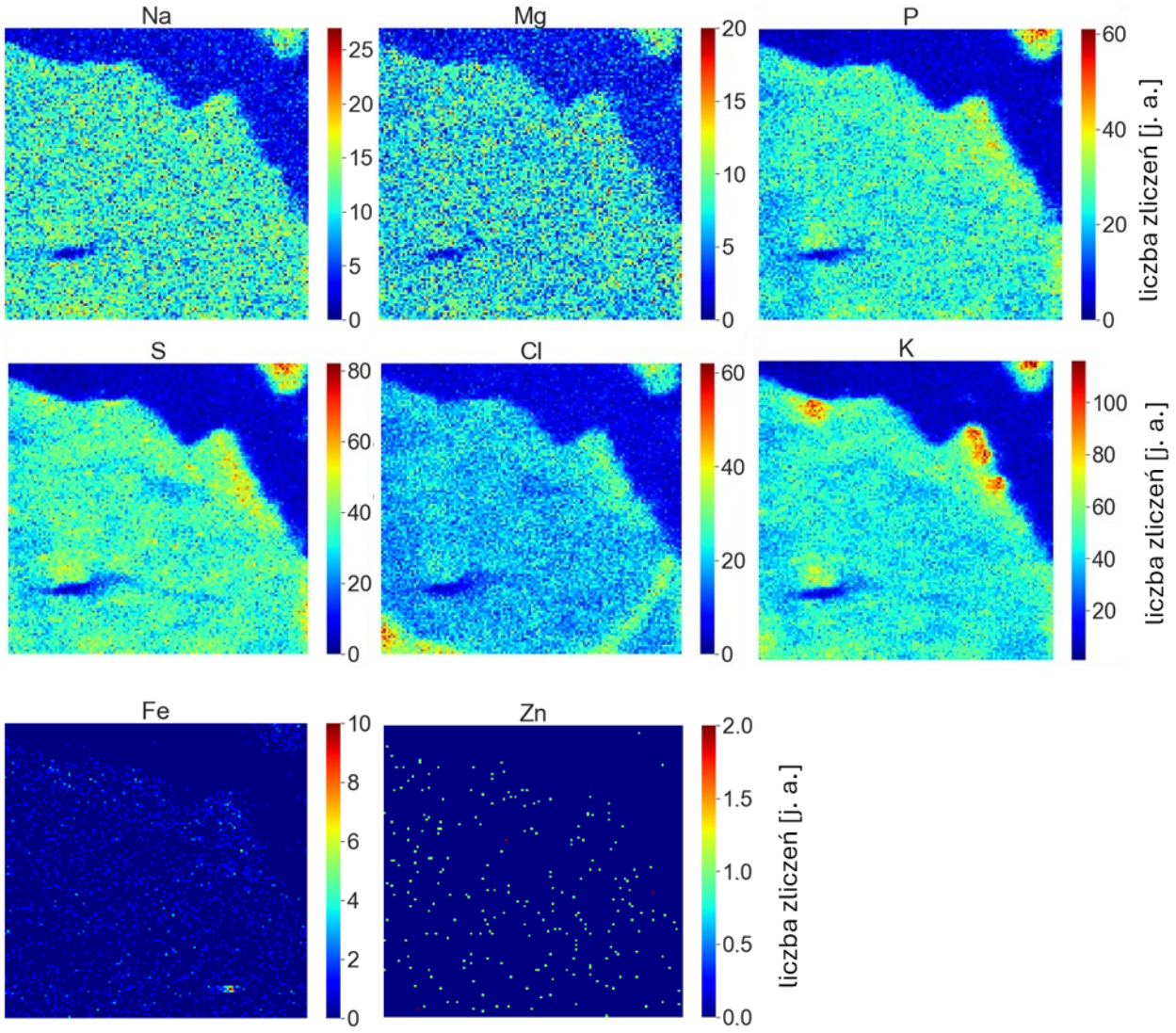


Rysunek 5.4 Mapy rozkładu liczby zliczeń promieniowania charakterystycznego dla wybranych pierwiastków w próbce kontrolnej (punkty pomiarowe 1-3, kolejno od lewej do prawej) [34].

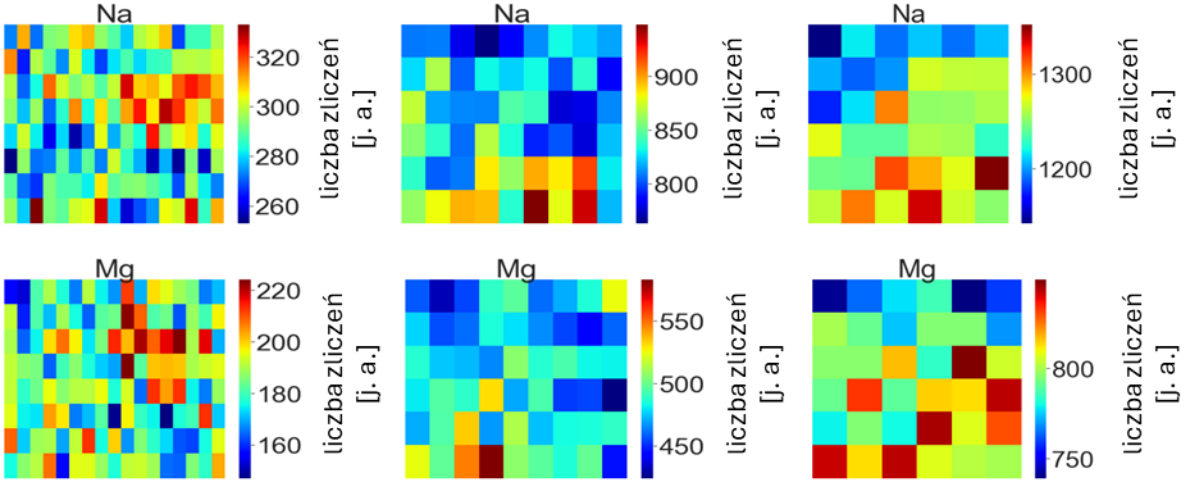
Przyjęta strategia pomiarowa, uwzględniająca różnorodność rozmiarów i lokalizacji punktów analizy, pozwoliła na dokładne określenie zmienności składu pierwiastkowego zarówno pomiędzy grupami próbek (kontrola, dystrofia miopatia), jak i w obrębie ich struktury. Zebrane dane stanowią cenną podstawę do dalszych badań nad właściwościami metabolicznymi i strukturalnymi badanych tkanek.

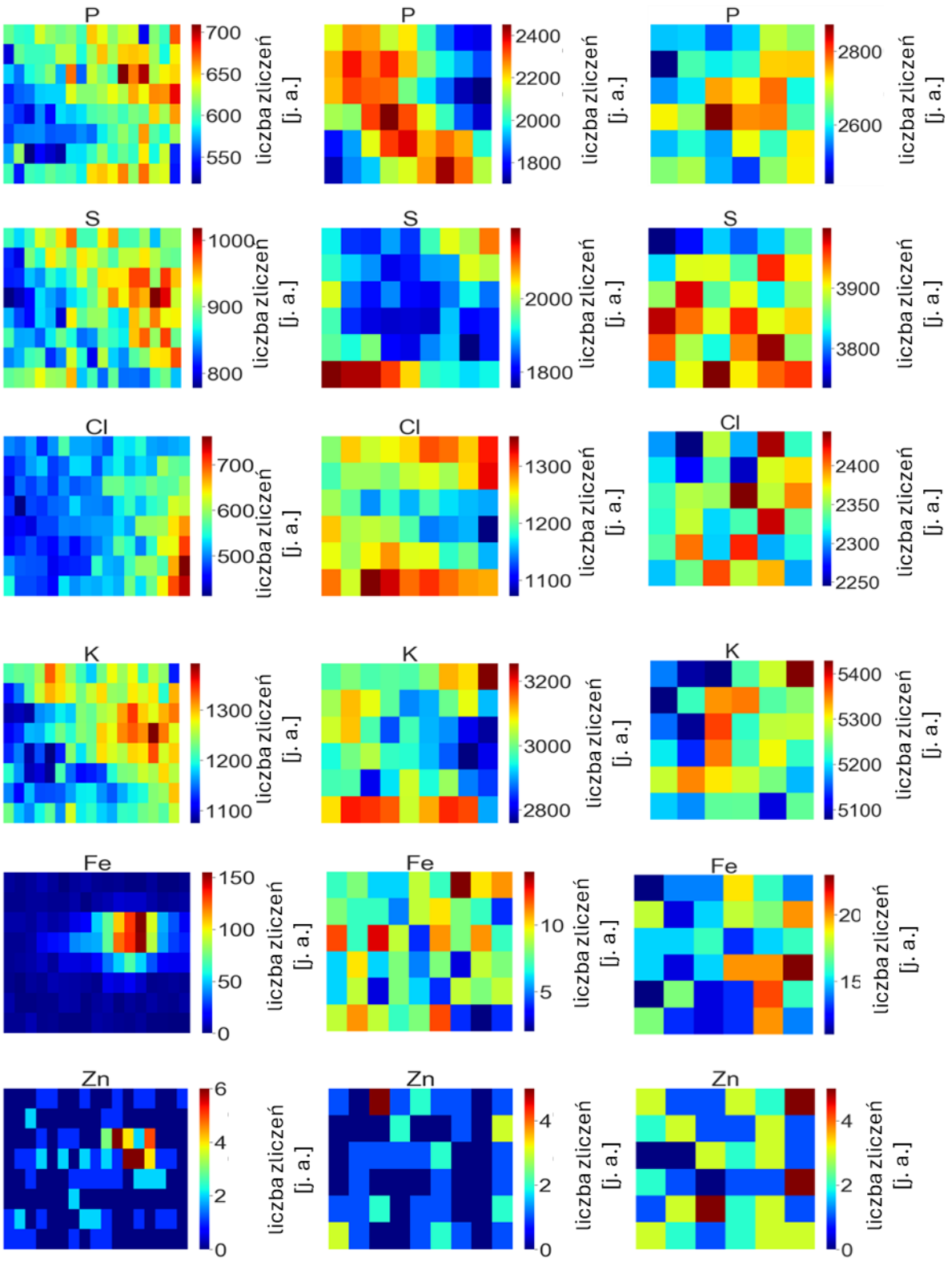


Rysunek 5.5 Obraz pochodzący z mikroskopu optycznego z nałożonym obrazem STIM dla próbki dystroficznej [34].

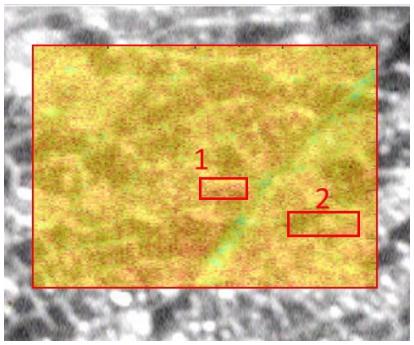


Rysunek 5.6 Mapy rozkładu liczby zliczeń wzbudzonego promieniowania charakterystycznego wybranych pierwiastków dla próbki z grupy dystrofii, wykonane metodą PIXE na obszarze około 350 x 350 μm² [34].

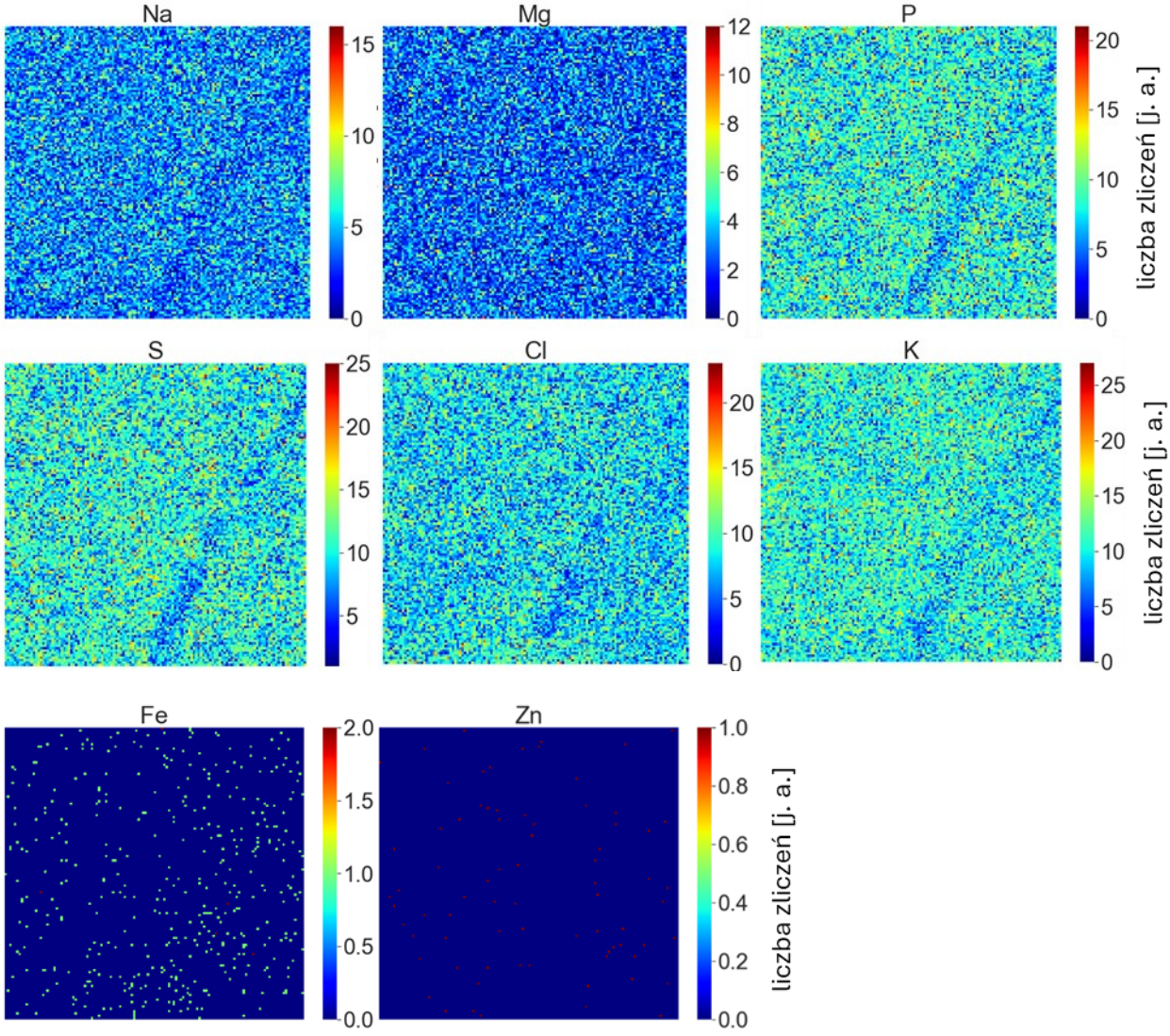




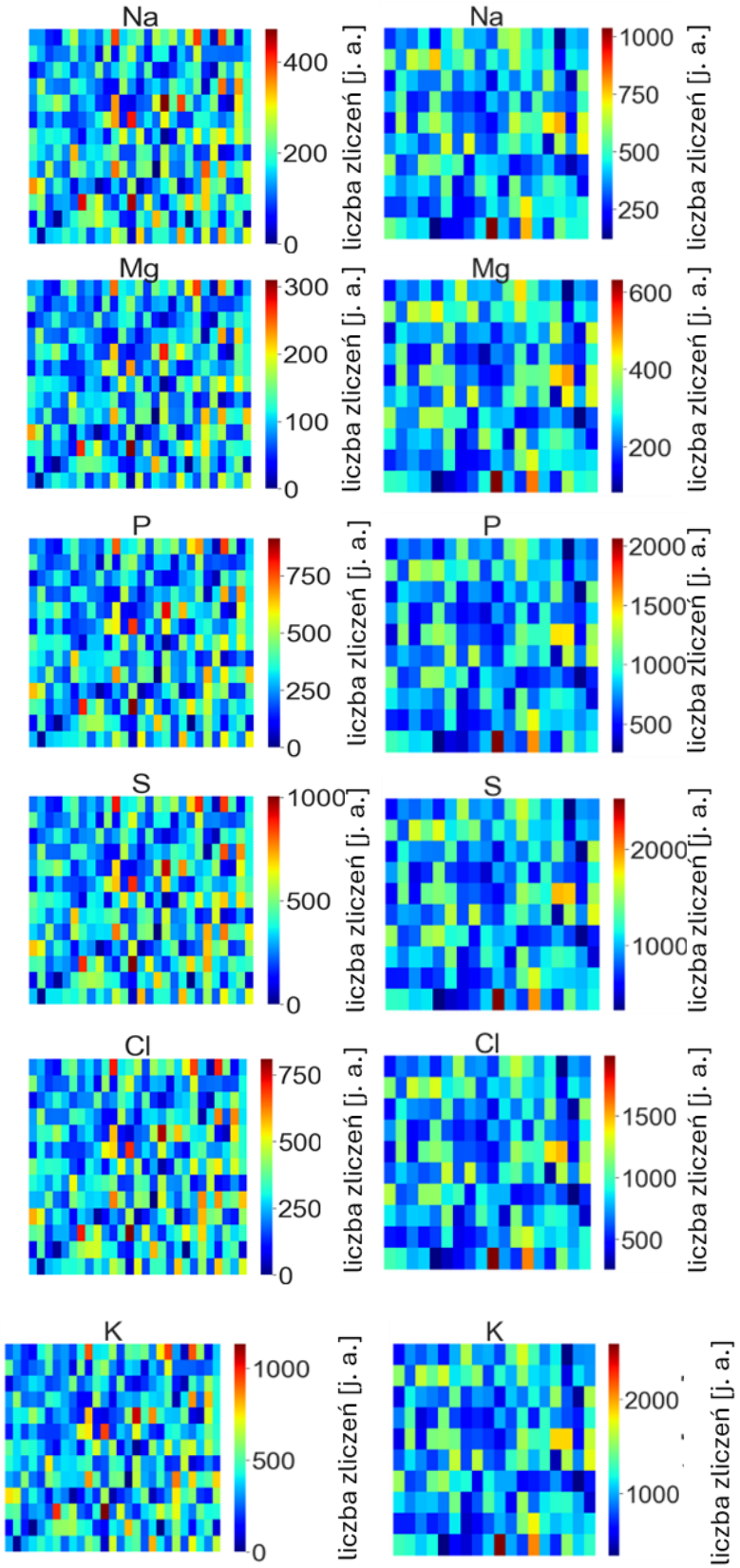
Rysunek 5.7 Mapy rozkładu liczby zliczeń promieniowania charakterystycznego dla wybranych pierwiastków dla próbki dystrofii (punkty pomiarowe 1-3, kolejno od lewej do prawej). [34].

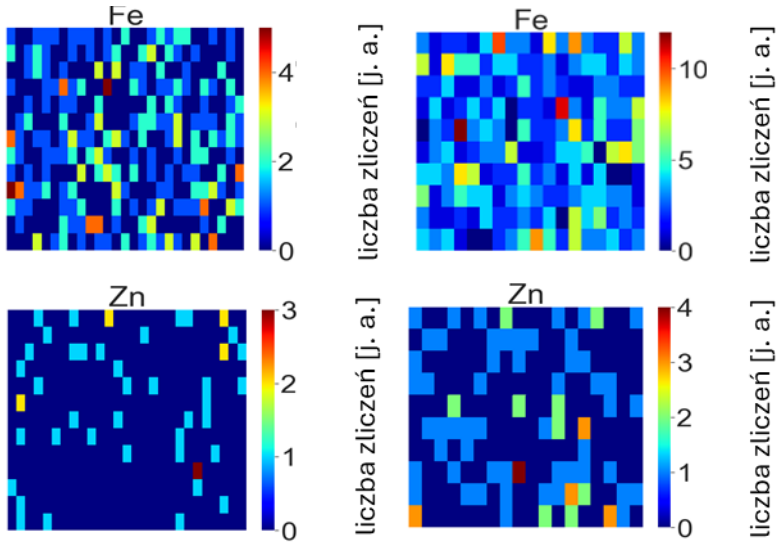


Rysunek 5.8 Obraz pochodzący z mikroskopu optycznego z nałożonym obrazem STIM dla próbki miopatii.



Rysunek 5.9 Mapy rozkładu liczby zliczeń wzbudzonego promieniowania charakterystycznego wybranych pierwiastków dla próbki z grupy miopatii, wykonane metodą PIXE na obszarze około 350 x 350 μm².


Na
400
200
0
liczba zliczeń [j. a.]
Na
1000
750
500
250
liczba zliczeń [j. a.]
Mg
300
200
100
0
liczba zliczeń [j. a.]
Mg
600
400
200
liczba zliczeń [j. a.]
P
750
500
250
0
liczba zliczeń [j. a.]
P
2000
1500
1000
500
liczba zliczeń [j. a.]
S
1000
500
0
liczba zliczeń [j. a.]
S
2000
1000
liczba zliczeń [j. a.]
Cl
750
500
250
0
liczba zliczeń [j. a.]
Cl
1500
1000
500
liczba zliczeń [j. a.]
K
1000
500
0
liczba zliczeń [j. a.]
K
2000
1000
liczba zliczeń [j. a.]



Rysunek 5.10 Mapy rozkładu liczby zliczeń promieniowania charakterystycznego dla wybranych pierwiastków dla próbki miopatii (punkty pomiarowe 1-2, kolejno od lewej do prawej).

5.2.5. Oprogramowanie i przetwarzanie danych

W celu analizy danych liczbowych dotyczących intensywności sygnałów charakterystycznych dla poszczególnych pierwiastków, reprezentowanych przez tzn. linię Kα (Na, Mg, P, S, Cl, K, Fe, Zn, Br), zastosowano oprogramowanie PyMca [96], które umożliwia identyfikację i analizę poszczególnych składowych widma. Do generowania map rozkładu przestrzennego pierwiastków opracowano autorskie skrypty w języku Python, wykorzystujące biblioteki NumPy, SciPy oraz Pandas, umożliwiające wizualizację lokalnych różnic w składzie badanych próbek. Analizy statystyczne przeprowadzono z użyciem oprogramowania Statistica 13 (StatSoft) oraz własnych skryptów Pythona opartych na tych samych bibliotekach, co umożliwiło spójne przetwarzanie i interpretację danych ilościowych oraz obrazowych.

Szczególną uwagę poświęcono analizie danych punktowych, uznanych za najbardziej reprezentatywne w kontekście diagnostyki różnicowej tkanek prawidłowych oraz patologicznie zmienionych. Podejście to umożliwiło identyfikację istotnych różnic w składzie pierwiastkowym, które mogą mieć istotne implikacje biologiczne i kliniczne.

5.2.6. Normalizacja danych pomiarowych

W analizach spektroskopowych kluczowym aspektem zapewniającym poprawność porównań ilościowych pomiędzy punktami pomiarowymi jest kontrola, bądź kompensacja zmienności warunków eksperymentalnych, przede wszystkim fluktuacji prądu wiązki. Zmienność natężenia wiązki protonowej przekłada się bezpośrednio na liczbę zliczeń rejestrowanych przez detektor, co może istotnie wpływać na interpretację danych oraz wiarygodność wyprowadzonych zależności statystycznych.

System detekcyjny zastosowany w metodzie PIXE został zintegrowany z układem skanującej wiązki protonowej, poruszającej się z dużą prędkością w płaszczyznach poziomej i pionowej względem zamocowanej próbki. Średnia prędkość skanowania wynosiła 1,73 $\frac{\mu m^2}{s}$. Takie rozwiązanie umożliwiło wielokrotne przejścia wiązki przez każdy punkt badanego obszaru powierzchni próbki (piksel) w trakcie pojedynczej akwizycji, w połączeniu ze średnim czasem skanowania przypadającym na jednostkę powierzchni rzędu 8,2 $\frac{s}{px^2}$ oraz prądem wiązki około 500 pA, zapewniało równomierne dostarczenie ładunku do każdego punktu pomiarowego. W rezultacie ewentualne krótkotrwałe fluktuacje prądu wiązki zostały uznane za zniwelowane. Dodatkowo zastosowanie wyżej opisanego systemu pomiarowego minimalizuje możliwe termiczne uszkodzenia próbki.

Mając powyższe na uwadze oraz brak informacji dotyczącej ładunku prądu wiązki dostarczonego na każdy piksel oraz zróżnicowany sumaryczny czas naświetlania poszczególnych pikseli, została przeprowadzona normalizacja z wykorzystaniem sygnału krzemu. Takie podejście umożliwiło wykonanie porównania zależności międzypierwiastkowych. Natomiast w przypadku map rozkładu liczby zliczeń promieniowania charakterystycznego wykorzystano dane bez użycia wspomnianej normalizacji, zakładając, że sygnał przestrzenny promieniowania charakterystycznego stanowi przybliżone odwzorowanie rzeczywistego rozkładu pierwiastków w próbce.

Założono, że sygnał pochodzący od krzemu pochodzi wyłącznie z podłoża znajdującego się pod próbką, a jego tłumienie przez tkankę jest pomijalne ze względu na stałą, cienką warstwę badanych tkanek. Dla każdego pierwiastka X wartość znormalizowaną obliczono według wzoru:

$$X_{norm} = \frac{X_{lz}}{Si_{lz}}\,, \tag{7}$$

gdzie: X_{lz} to liczba zliczeń danego pierwiastka w danym pikselu, natomiast Si_{lz} to liczba zliczeń krzemu w tym samym pikselu. Taka procedura pozwala na kompensację wpływu lokalnych zmian właściwości próbki i detekcji, umożliwiając miarodajne porównania ilościowe pomiędzy punktami pomiarowymi.

5.3. Technika SIMS

5.3.1. Preparatyka próbek

Przygotowanie próbek do analizy metodą SIMS zostało przeprowadzone analogicznie z procedurą stosowaną w przypadku techniki PIXE (rozdział 5.2.1) z tą różnicą, że próbki zostały pocięte w tym przypadku na grubość 5 μm. Grubość ta została ustalona na podstawie wytycznych opracowanych przez Instytut Ruđer Bošković, będący specjalistą w tej metodzie i posiadający wieloletnie doświadczenie

w prowadzeniu badań z jej wykorzystaniem. Wspomniana wartość grubości tkanki umożliwiła prowadzenie obrazowania z wysoką rozdzielczością przestrzenną, sięgającą około 400 nm w płaszczyźnie bocznej.

W celu zapewnienia efektywnej ekstrakcji jonów wtórnych, zastosowano dodatkowo pokrycie membran z azotku krzemu cienką, przewodzącą warstwą złota o grubości 12 nm. Cienka warstwa została naniesiona w procesie fizycznej depozycji par (ang. *Physical Vapour Deposition,* PVD) złota w warunkach wysokiej próżni, poprzez lokalne, gwałtowne odparowanie materiału - Au.

5.3.2. Wstępne przygotowanie i selekcja obszarów pomiarowych

Wstępna procedura przygotowania oraz selekcji obszarów do analizy SIMS była analogiczna do tej zastosowanej w pomiarach PIXE. Podczas pomiarów skupiono się na wybranych rejonach zawierających pojedyncze włókna mięśniowe, co miało na celu zminimalizowanie wpływu struktur otaczających i umożliwienie pozyskania reprezentatywnych widm dla konkretnych typów tkanek. Tutaj również zastosowanie znalazła metoda mikroskopii STIM, która pozwoliła na wybór badanych obszarów próbki.

5.3.3. Pomiar SIMS i parametry eksperymentu

W pierwszym etapie wykonano mapy rozkładu jonów wtórnych dla obszarów o wymiarach ok. $780 \times 780\ \mu m^2$, w obrębie których zidentyfikowano homogeniczne włókna mięśniowe. Na podstawie uzyskanych obrazów wytypowano interesujące regiony do dalszej analizy. Następnie każdą z map podzielono cyfrowo na mniejsze obszary odpowiadające fragmentom pojedynczych włókien. Z każdego takiego fragmentu wygenerowano zsumowane widmo (suma widm pikseli), wykorzystywane w dalszej analizie statystycznej.

Dla wszystkich trzech typów analizowanych próbek (C, M i D) zastosowano identyczne wymiary obszaru skanowania, wynoszące $78 \times 78\ \mu m^2$. W celu zapewnienia reprezentatywności danych, dla każdej próbki przeprowadzono 8 pomiarów punktowych zlokalizowanych w obrębie indywidualnie wybranych włókien mięśniowych, zgodnie z uprzednio wykonanym obrazowaniem STIM. W pomiarach zastosowano wiązkę jonów tlenu O^{4+}, co wynikało z trybu pracy aparatury w tzw. trybie transmisyjnym, stosowanym m.in. podczas obrazowania STIM. Tlen został wybrany ze względu na jego stosunkowo niewielką masę atomową w porównaniu do krzemu, co ogranicza straty energii podczas przechodzenia przez próbkę. Dzięki temu możliwe było uzyskanie dobrze zarysowanych obrazów transmisyjnych, umożliwiających lokalizację struktur wewnętrznych, takich jak włókna mięśniowe.

Kalibracja aparatury została przeprowadzona zgodnie z procedurami przyjętymi w instytucie RBI z użyciem standardowych materiałów referencyjnych. W tym celu zastosowano siatkę miedzianą Cu oraz Leucynę. Kalibrację wykonano w trybie obrazowania dla obszaru o wymiarach około $140 \times 140\ \mu m^2$, co zapewniło dokładność zarówno pozycjonowania próbki, jak i identyfikacji mas wykrywanych jonów

wtórnych. W trakcie pomiarów dążono do uzyskania porównywalnej liczby zliczeń w widmach dla każdego ROI, aby zapewnić jednorodne warunki statystyczne i umożliwić porównywalność danych po normalizacji.

5.4. Technika MALDI

5.4.1. Przygotowanie próbek

Podobnie jak w przypadku przygotowania próbek do wcześniejszych analiz metodami PIXE oraz SIMS, również na potrzeby analizy MALDI-TOF wykorzystano bioptaty mięśni pobrane śródoperacyjnie od pacjentów. Jak uprzednio wspomniano, bezpośrednio po pobraniu fragmenty mięśnia poddawano szokowemu zamrożeniu, a następnie przechowywano w temperaturze -80 °C aż do momentu przygotowania do dalszych etapów analizy. Zastosowanie szybkiego zamrażania bez chemicznego utrwalania miało na celu jak najwierniejsze zachowanie struktury tkanki oraz endogennego profilu lipidowego. Dzięki temu próbki mogą być przechowywane w tej właśnie temperaturze nawet przez okres przekraczający rok bez istotnej utraty integralności molekularnej [97].

Przygotowanie skrawków do analizy rozpoczęto od adaptacji próbek do cięcia w kriomikrotomie. Na około godzinę przed cięciem tkanki przenoszono do komory kriomikrotomowej (Cryotome FSE, Thermo Fisher Scientific, Cheshire, Wielka Brytania), gdzie zarówno temperaturę komory, jak i próbki stabilizowano na poziomie -15 °C. Chociaż cieńsze skrawki, na przykład o grubości 10 µm, mogłyby potencjalnie poprawić rozdzielczość przestrzenną dystrybucji lipidów [98], próby ich wykonania skutkowały utratą ciągłości oraz dezintegracją materiału. W związku z tym dalsze analizy przeprowadzono na skrawkach o grubości 12 µm, co stanowiło kompromis pomiędzy ilością materiału biologicznego niezbędną do uzyskania wysokiej intensywności sygnału masowego, a stabilnością i adhezją preparatu do podłoża. Warto wspomnieć, że zastosowanie grubszych skrawków mogłoby utrudniać równomierne osadzanie matrycy i zaburzać proces jonizacji. Ponadto wyłącznie cienkie i zachowujące integralność strukturalną skrawki zapewniają pełny kontakt elektryczny z przewodzącą powierzchnią szkiełka ITO (ang. *indium tin oxide*) (Bruker Daltonics, Brema, Niemcy), co stanowi warunek niezbędny do uzyskania wysokiej jakości widm masowych w analizie MALDI. Skrawki nanoszono na szkiełka pokryte tlenkiem indu i cyny (ITO), które dzięki odpowiedniej przewodności elektrycznej umożliwiają efektywny proces desorpcji i jonizacji [99]. Każdy skrawek musiał idealnie przylegać do powierzchni podłoża, gdyż wszelkie niedociśnięcia lub obecność pęcherzy powietrza skutkowałaby przerwaniem ciągłości kontaktu elektrycznego i w konsekwencji brakiem sygnału z danego obszaru podczas pomiaru. Dodatkowo, zastosowana metoda montowania skrawków bez użycia żywic ani innych środków chemicznych minimalizuje ryzyko kontaminacji próbki oraz potencjalnych interferencji w widmach masowych. Takie podejście pozwala na uniknięcie dominujących sygnałów tła oraz maskowania sygnałów właściwych dla analizowanych cząsteczek, co znacząco podnosi wiarygodność oraz jakość uzyskiwanych danych.

Po osadzeniu tkanek na szkiełkach próbki suszono przez około 45 minut w kontrolowanych warunkach, osłonięte przed światłem, w zamkniętym eksykatorze. Proces ten umożliwiał odparowanie pozostałości wilgoci bez ryzyka denaturacji cząsteczek biologicznych, jednocześnie zapobiegając kondensacji pary wodnej oraz powstawaniu artefaktów wynikających z nadmiernego wysychania tkanek. Po zakończeniu suszenia i stabilizacji, próbki przechowywano w zamkniętych pojemnikach w laboratoryjnej zamrażarce w temperaturze -80 °C (NU9483, NuAire Inc., Plymouth, MN, USA). Przed analizą próbki były ogrzewane do temperatury otoczenia w eksykatorze próżniowym, co miało na celu zapobieżenie kondensacji wilgoci na ich powierzchni, a następnie ponownie suszone przez kolejne 45 minut.

Opracowany protokół został zoptymalizowany z uwzględnieniem specyfiki analizy lipidów w tkankach mięśniowych oraz doświadczeń zdobytych przez zespół badawczy w trakcie wcześniejszych badań. Wysokie wymagania dotyczące czystości wykorzystywanego sprzętu, takiego jak kriomikrotom, oraz przewodzących szkiełek ITO, miały na celu maksymalizację intensywności sygnału analitycznego oraz minimalizację zakłóceń pochodzących z procesu preparatyki.

5.4.2. Specyfikacja pomiarów spektrometrii mas MALDI-TOF

Do analiz spektrometrycznych zastosowano aparat UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Brema, Niemcy) wyposażony w laser typu Smartbeam II pracujący z częstotliwością 2 kHz. Wszystkie parametry pomiarowe zostały uprzednio zoptymalizowane w ramach wieloetapowego procesu wstępnej kalibracji warunków eksperymentalnych. Jonizacja odbywała się przy napięciu przyspieszającym 25 kV, z impulsowym wyodrębnianiem jonów (ang. *pulsed ion extraction*) ustawionym na 120 ns oraz tłumieniem jonów (ang. *ion suppression*) o masie do 100 Da.

Proces dobór matryc został szczegółowo zaprezentowany i opisany w rozdziale 5.4.3. Widma rejestrowano w trybie jonizacji dodatniej z zastosowaniem reflektora, w zakresie od 200 do 3000 m/z. Kalibrację zewnętrzną przeprowadzono przy użyciu Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonics, Brema, Niemcy) oraz znanych jonów macierzy, takich jak sygnał 273 m/z odpowiadający jonowi $[2DHB-2H_2O+H]^+$ pochodzącemu z matrycy DHB [100]. Szerokość rastra ustawiono na 200 µm dla wszystkich analizowanych próbek. Z każdego punktu ablacji zbierano łącznie 400 impulsów lasera, z czego 20 impulsów przypadało na jedną pozycję analizowanego rastra. Średnica ogniska lasera została dostosowana w taki sposób, aby zapewnić optymalne warunki przestrzenne dla uzyskania map rozkładu jonów.

Do zbierania widm wykorzystano oprogramowanie FlexControl w wersji 3.4 (Bruker Daltonics), natomiast przetwarzanie danych i generowanie obrazów molekularnych przeprowadzono przy użyciu programu FlexImaging w wersji 4.0. Analiza widm odbywała się na podstawie oprogramowania mMass. Usykane na tej drodze widma fragmentacyjne zostały przedstawione w rozdziale 6.3.3.

Do wsparcia identyfikacji lipidów wykorzystano technikę fragmentacji opartą na technologii LIFT. Jest to opatentowane rozwiązanie firmy Bruker Daltonics, stosowane w spektrometrach typu MALDI-TOF/TOF, które umożliwia przeprowadzenie analizy MS/MS (fragmentacji jonów) bez konieczności ich wcześniejszego wychwycenia do pułapki jonowej, co wyróżnia tę metodę spośród innych technik tandemowej spektrometrii mas. Selekcja jonów rodzicielskich była przeprowadzona manualnie dla każdego widma MS/MS, co zapewniało precyzyjną interpretację uzyskanych danych fragmentacyjnych.

5.4.3. Strategia doboru matryc do analizy lipidowej

Optymalizacja kluczowych parametrów, takich jak liczba warstw matrycy czy wysokość dyszy nad próbką, znacząco wpływa na jakość oraz powtarzalność uzyskiwanych widm masowych. Ponadto umożliwia pozyskanie wysokiej jakości danych z próbek biologicznych, jednocześnie minimalizując ryzyko utraty informacji dotyczących przestrzennego rozmieszczenia analizowanych związków. Wybór odpowiedniej matrycy okazuje się kluczowy dla efektywnej wizualizacji docelowych cząsteczek, gdyż różne matryce mogą prowadzić do istotnych różnic w generowanych mapach jonów. Jak wykazano w publikacji [87], obraz jonów uzyskany dla tej samej próbki może znacząco różnić się w zależności od zastosowanej matrycy. W związku z tym, przy porównywaniu wyników oraz interpretacji biologicznej danych obrazowych pozyskanych metodą MALDI-MS, konieczne jest zachowanie szczególnej ostrożności.

Do testów porównawczych zastosowanych matryc wybrano trzy reprezentatywne próbki tkanek mięśniowych, zróżnicowane pod względem obrazu morfologicznego i klinicznego: próbkę z dominującą zawartością tkanki tłuszczowej (oznaczoną dalej w pracy jako tłuszcz), próbkę wykazującą cechy aktywnego zapalenia mięśnia (zapalenie) oraz próbkę nieobjętą procesem chorobowym (kontrola).

Kwalifikacja próbek została przeprowadzona na podstawie formalnych raportów rozpoznań neuropatologicznych, postawionych w ramach standardowej, specjalistycznej diagnostyki miopatologicznej. Tak dobrany zestaw materiału umożliwił ocenę wpływu stanu tkanki na jakość oraz efektywność uzyskiwanych widm w analizach MALDI. Próbki te posłużyły do wstępnej optymalizacji warunków napylania oraz doboru odpowiedniej matrycy. Na ich podstawie oceniono także jakość widm oraz liczbę możliwych do zidentyfikowania sygnałów lipidowych. Docelowa analiza została następnie przeprowadzona na rozszerzonym zbiorze próbek, reprezentującym spektrum stanów klinicznych.

W celu optymalizacji procedury nanoszenia matrycy do analizy lipidów metodą obrazowania spektrometrii mas z jonizacją laserową wspomaganą matrycą, zastosowano podejście zaproponowane przez zespół A. Bodzoń-Kułakowskiej oraz P. Mielczarka, z którym prowadzono współpracę podczas realizacji niniejszych pomiarów. Punktem odniesienia była publikacja „*Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging sample preparation using wet-interface matrix deposition for lipid analysis*” [87], w której przeanalizowano skuteczność różnych matryc w dwóch trybach jonizacji. Ze względu na ich wysoki potencjał analityczny w badaniach lipidomicznych, zastosowano identyczne warunki

przygotowania próbek także w niniejszej pracy. W trybie dodatnim (ang. *positive ion mode*) testowano roztwory: 25 mg/ml 2,5-dihydroksybenzoesanu (DHB) w 50% metanolu (MeOH) z dodatkiem 0,2% kwasu trifluorooctowego (TFA) oraz 2,5 mg/ml 1,5-diaminonaftalenu (DAN) w 50% acetonitrylu (ACN). Natomiast w trybie ujemnym (ang. negative ion mode) zastosowano 2,5 mg/ml 1,5-diaminonaftalenu w 50% acetonitrylu.

Dobór zastosowanych matryc opierał się na ich udokumentowanej skuteczności w analizie lipidów. Matryca DHB jest powszechnie uznawana za standard w trybie jonizacji dodatniej, natomiast DAN, ze względu na swoją uniwersalność oraz wysoką czułość wobec małocząsteczkowych metabolitów i lipidów, jest rekomendowany do stosowania w trybie jonizacji ujemnej. W literaturze opisano stosowanie różnych stężeń matrycy DHB, najczęściej mieszczących się w zakresie od 7 mg/ml [101] do 50 mg/ml [102]. Jako rozpuszczalniki stosuje się głównie metanol [103] oraz acetonitryl [104, 105], chociaż spotyka są również etanol [106] oraz mieszaniny chloroformu z metanolem [107]. Taka różnorodność umożliwia optymalizację procesu nanoszenia matrycy oraz poprawę jakości uzyskiwanych widm masowych. Ponadto matryca DHB charakteryzuje się wysoką intensywnością sygnału oraz bardzo korzystnym stosunkiem sygnału do szumu, co czyni ją szczególnie rekomendowaną do analizy lipidów w trybie jonizacji dodatniej, również w badanich prowadzonych przez P. Mielczarka i współpracowników [88, 105].

Macierz DAN zdobywa coraz większą popularność w analizie metodą MALDI w trybie jonizacji ujemnej. W literaturze opisano stosowanie roztworów DAN w stężeniu 25 mg/ml, przygotowanych w mieszaninie acetonitrylu z wodą w stosunku 1 : 1 (v/v) [108], jak również formę chlorowodorku DAN [109]. Matryca ta charakteryzuje się wysoką czułością oraz reprezentatywnością sygnałów zarówno dla małych metabolitów, jak i lipidów, szczególnie w zakresie mas poniżej 400 Da. W porównaniu z innymi powszechnie stosowanymi matrycami, takimi jak 9-aminoakrydynon (9-AA) czy DHB, DAN zapewnia wyższą efektywność jonizacji oraz szerszy zakres detekcji, co czyni ją atrakcyjnym i uniwersalnym wyborem do obrazowania oraz profilowania związków w trybie jonizacji ujemnej [108].

Zastosowane w badaniach odczynniki charakteryzowały się najwyższa dostępną czystością analityczną. Acetonitryl i metanol o czystości gradientowej HPLC pozyskano od firmy JT Baker (Amsterdam, Holandia). Etanol pochodził od firmy Avantor (Gliwice, Polska), natomiast chloroform oraz ultraczystą wodę klasy LC-MS zakupiono od Sigma-Aldrich/Merck (Darmstadt, Niemcy). Matryce wykorzystane w analizach MALDI, w tym DHB oraz TFA, również pochodziły od Sigma-Aldrich/Merck.

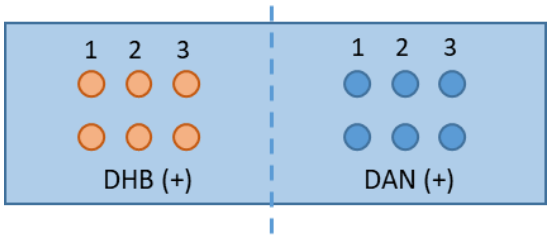
Aplikacja matryc na powierzchnię próbek odbywała się przy użyciu automatycznego systemu dozującego SunCollect (SunChrom GmbH, Friedrichsdorf, Niemcy). Proces napylania prowadzono warstwowo, z wykorzystaniem zmiennego natężenia przepływu roztworu matrycy, zgodnie z zaleceniami producenta. Parametry aplikacji obejmowały przepływ 10 µL/min dla pierwszej warstwy, 20 µL/min dla drugiej, 30 µL/min dla trzeciej, 40 µL/min dla czwartej oraz 60 µL/min dla kolejnych warstw. Matryca była nanoszona dyszą poruszającą się z prędkością 600 mm/min, przy liniowym odstępie ścieżek napylania wynoszącym 2 mm.

W zależności od zastosowanego trybu jonizacji, dobierano odpowiednią liczbę warstw matrycy oraz wysokość napylania. W przypadku matrycy DHB, zaobserwowano wzrost intensywności sygnału wraz ze zwiększaniem odległości końcówki dyszy od powierzchni próbki. Matryca ta jest powszechnie rekomendowana w analizie lipidów, szczególnie w kontekście obrazowania tkanek biologicznych. Na podstawie analiz przeprowadzonych przez zespół badawczy współpracujący przy realizacji pomiarów MALDI na potrzeby niniejszej rozprawy, ustalono optymalne parametry aplikacji DHB: 12 warstw matrycy nanoszono z odległości z = 5, co odpowiada około 10 mm.

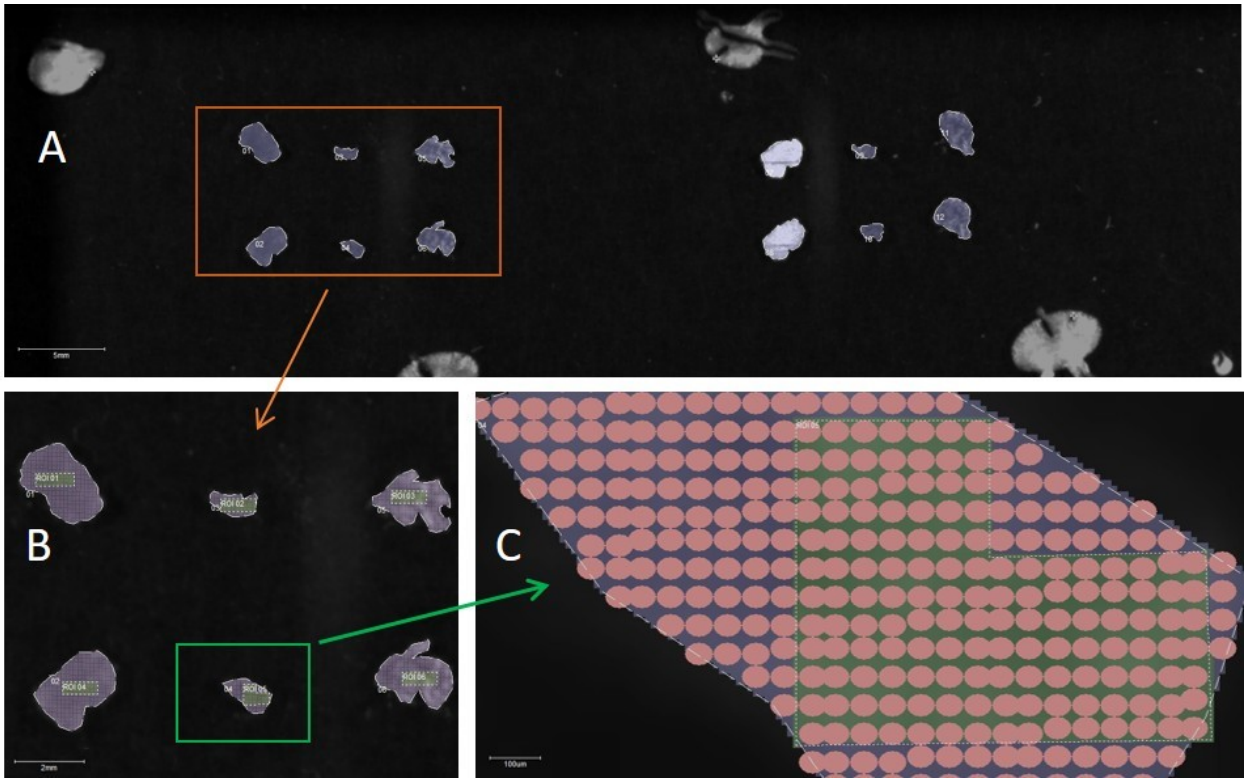
W przypadku trybu jonizacji ujemnej, zastosowano matrycę DAN, której nanoszenie przeprowadzono w 16 warstwach, przy maksymalnej możliwej odległości dyszy od próbki (z = 1), odpowiadającej około 50 mm. Zastosowane parametry napylania matrycy zostały dobrane w sposób umożliwiający maksymalizację jakości jonizacji związków lipidowych, przy jednoczesnym uwzględnieniu wcześniejszych doświadczeń zespołu badawczego w zakresie analizy tkanek biologicznych metodą obrazowania spektrometrii masowej MALDI. Kryteriami optymalizacji były przede wszystkim: intensywność sygnału oraz stosunek sygnału do szumu (signal-to-noise ratio, S/N), zgodnie z metodyką opisaną m.in. w pracy [108].

Przykładowy schemat prezentujący sposób rozmieszczenia matrycy na trzech typach analizowanych skrawków został przedstawiony na rysunku 5.11. Na rysunku 5.12 A zaprezentowano skan szkiełka ITO z naniesionymi trzema typami próbek biologicznych: tkanką z cechami zapalenia, tkanką tłuszczową oraz tkanką o morfologii mieszczącej się w granicach normy. Po lewej stronie ukazano próbki z napyloną matrycą DHB, po prawej z matrycą DAN. W obu przypadkach układ próbek był identyczny - od lewej do prawej: zapalenie, tłuszcz, norma.

W celu porównania uzyskanych widm masowych, dla każdej próbki wykonano 7 serii po 20 strzałów laserowych. Przykładowe obszary skanowania przedstawiono na rysunku 5.12 B w powiększeniu 50%, natomiast rysunek 5.12 C ilustruje powiększenie jednego z analizowanych skrawków tkanki tłuszczowej w skali 800%. Widoczne różowe punkty odpowiadają poszczególnym pozycjom ogniskowania wiązki lasera, natomiast zielony obszar wyznacza rzeczywisty fragment próbki poddany analizie masowej w kontekście doboru matrycy.

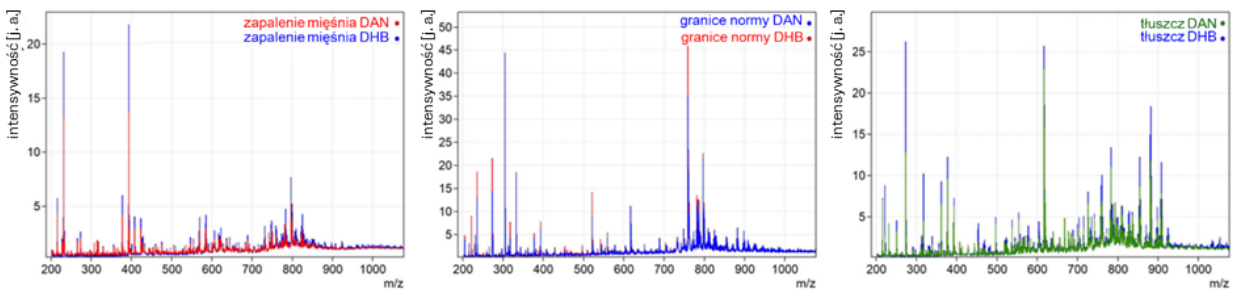


Rysunek 5.11 Schemat przedstawiający rozmieszczenie przekrojów tkanek mięśniowych na szkiełku ITO, zastosowanego podczas oceny doboru matryc do dalszych etapów analizy MALDI.

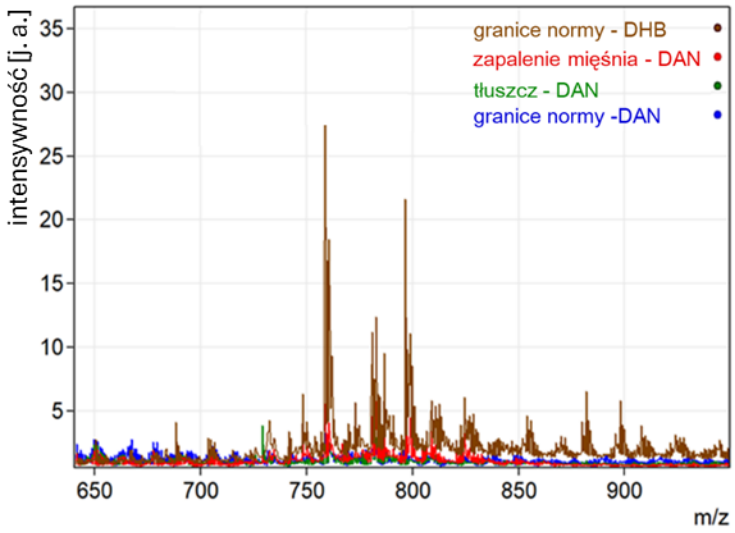


Rysunek 5.12 A - Skan szkiełka ITO z trzema typami próbek: zapalenie, tłuszcz, norma. Po lewej - matryca DHB, po prawej DAN. B - powiększenie analizowanego obszaru z matrycą DHB (50%). C - powiększenie skrawka tłuszczu (800%); różowe punkty - pozycje lasera, zielony obszar - strefa analizy.

Wszystkie uzyskane widma zostały poddane analizie porównawczej pod kątem różnic w profilach lipidowych z wykorzystaniem oprogramowania mMass [110]. Zaobserwowano zróżnicowanie zarówno w wartościach m/z, jak i w intensywnościach sygnałów jonowych, co przedstawiono na rysunku 5.13. Dodatkowo oceniono powtarzalność sygnałów w kolejnych skanach, wykazując wysoką zgodność i charakter rekursywny uzyskiwanych wyników. Na podstawie przeprowadzonych porównań stwierdzono, że w analizie prowadzonej w trybie jonizacji dodatniej, matryca oparta na 2,5-dihydroksybenzoesanie wykazuje wyższą efektywność niż matryca zawierająca 1,5-diaminonaftalen. Potwierdzeniem tego jest większa liczba oraz intensywność zarejestrowanych sygnałów jonowych. Opisane różnice zilustrowano na rysunku 5.14.



Rysunek 5.13 Widma MALDI uzyskane z dwóch matryc (DHB i DAN) dla trzech typów próbek biologicznych (tkanka z cechami zapalenia, tkanka tłuszczowa oraz tkanka o morfologii mieszczącej się w granicach normy).



Rysunek 5.14 Zbiorcze widma MALDI uzyskane dla matryc DHB i DAN, prezentujące porównanie liczby zarejestrowanych pików m/z. Wyższa intensywność sygnałów w przypadku zastosowaniu matrycy DHB świadczy o efektywności w analizie molekularnej tkanek.

Aby ocenić wpływ tolerancji masowej na liczbę potencjalnych przypisań lipidów w uzyskanym spektrum masowym, przeprowadzono analizę danych dla trzech reprezentatywnych typów tkanek: zapalenie, tłuszcz oraz granice normy. Analiza została wykonana dla różnych wartości tolerancji masowej, a wyniki zestawiono w tabeli 5.1.

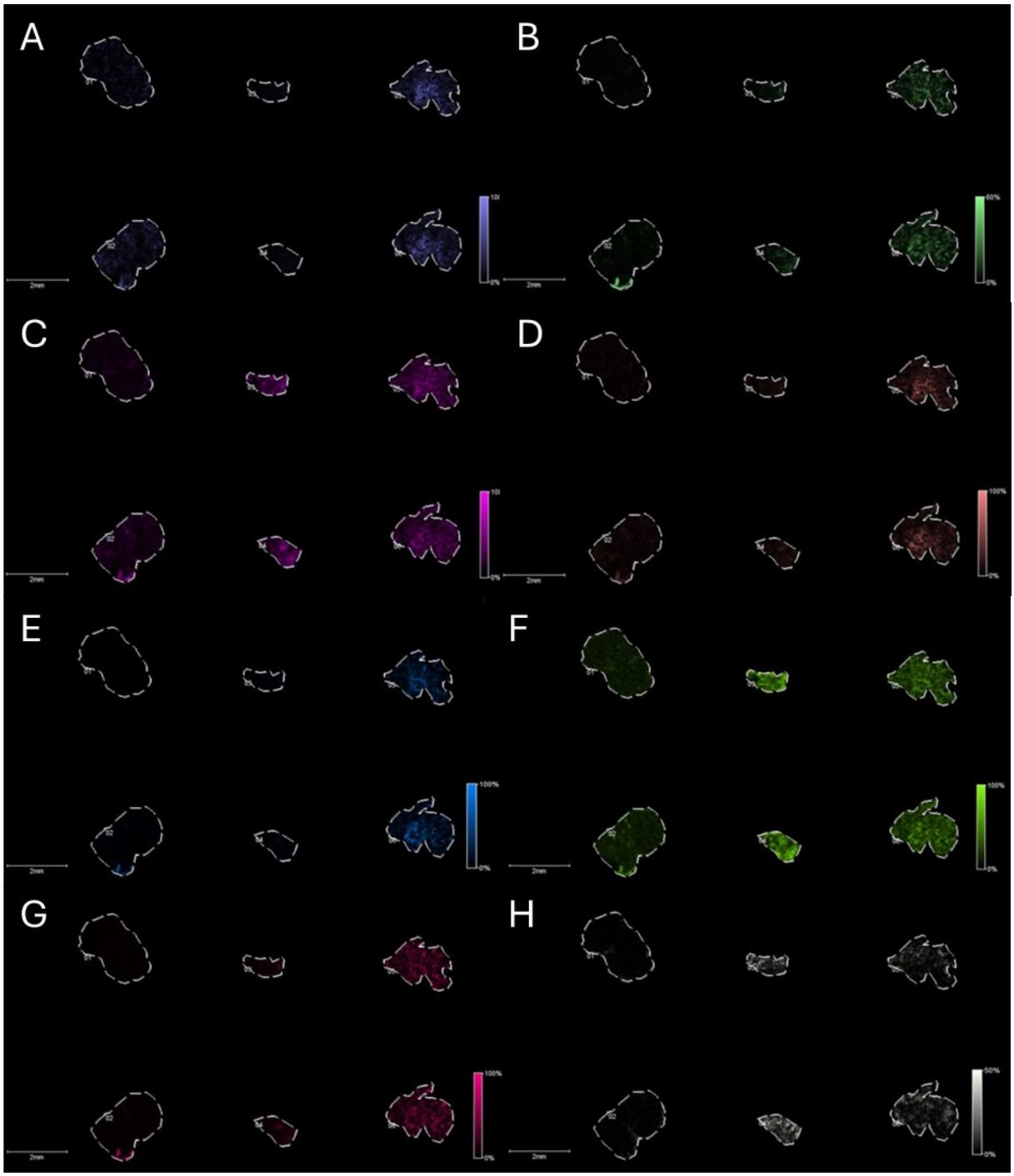
Tabela 5.1 Liczba przypisanych sygnałów masowych (anotacji) w zależności od tolerancji masowej dla danych typów próbek.

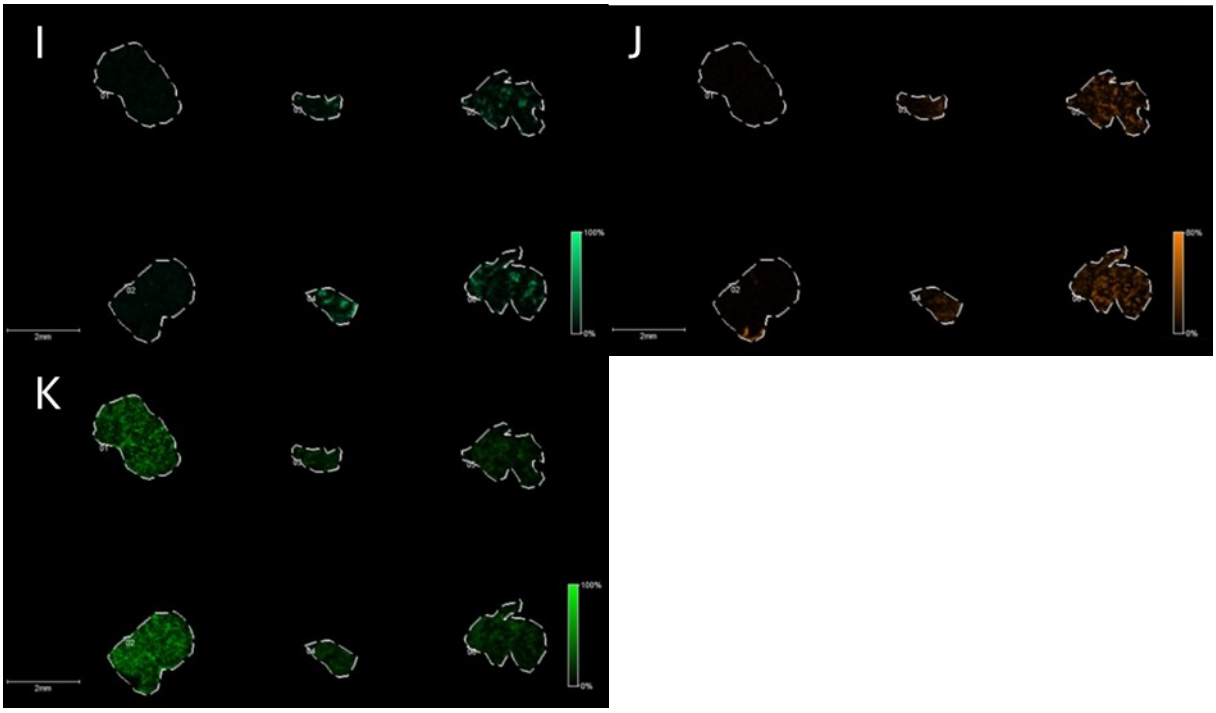
Tolerancja (Da)	Zapalenie	Tłuszcz	Granice normy
0,10	196	231	285
0,07	135	153	190
0,05	91	106	135

Z analizy wynika, że wyższa tolerancja masowa (0,10 Da) umożliwia przypisanie znacznie większej liczby sygnałów, jednak wiąże się to z obniżeniem specyficzności oraz zwiększonym ryzykiem błędnej identyfikacji związków chemicznych. Natomiast niższa tolerancja (0,05 Da) znacząco ogranicza liczbę anotacji, co z kolei podnosi wiarygodność uzyskanych identyfikacji na podstawie mierzonych wartości m/z. Dodatkowo, niezależnie od przyjętej tolerancji, próbki o morfologii mieszczącej się w granicach normy charakteryzowały się największą liczbą sygnałów przypisanych do znanych lipidów, co może odzwierciedlać ich lepszą integralność strukturalną oraz bardziej kompleksowy profil lipidowy w porównaniu do pozostałych badanych próbek.

Na rysunku 5.15 przedstawiono mapy rozkładu intensywności dla wybranych wartości m/z, uzyskane podczas optymalizacji doboru matryc oraz oceny ich skuteczności. Wszystkie obrazy wykonano

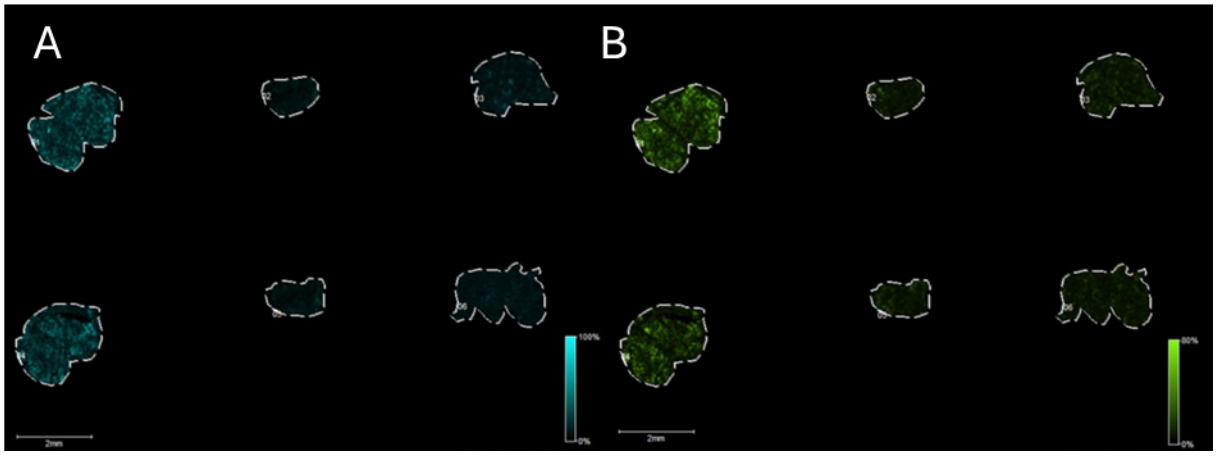
na skrawkach tkanek mięśniowych analizowanych w trybie dodatnim, przy użyciu matrycy DHB. Obrazy ilustrują przestrzenne rozmieszczenie poszczególnych jonów lipidowych, potwierdzając skuteczność zastosowanej matrycy w detekcji i wizualizacji potencjalnych markerów chorobowych. Każda mapa została oznaczona literą (A - K) i odpowiada konkretnej wartości m/z z dokładnością ± 0,5 Da.

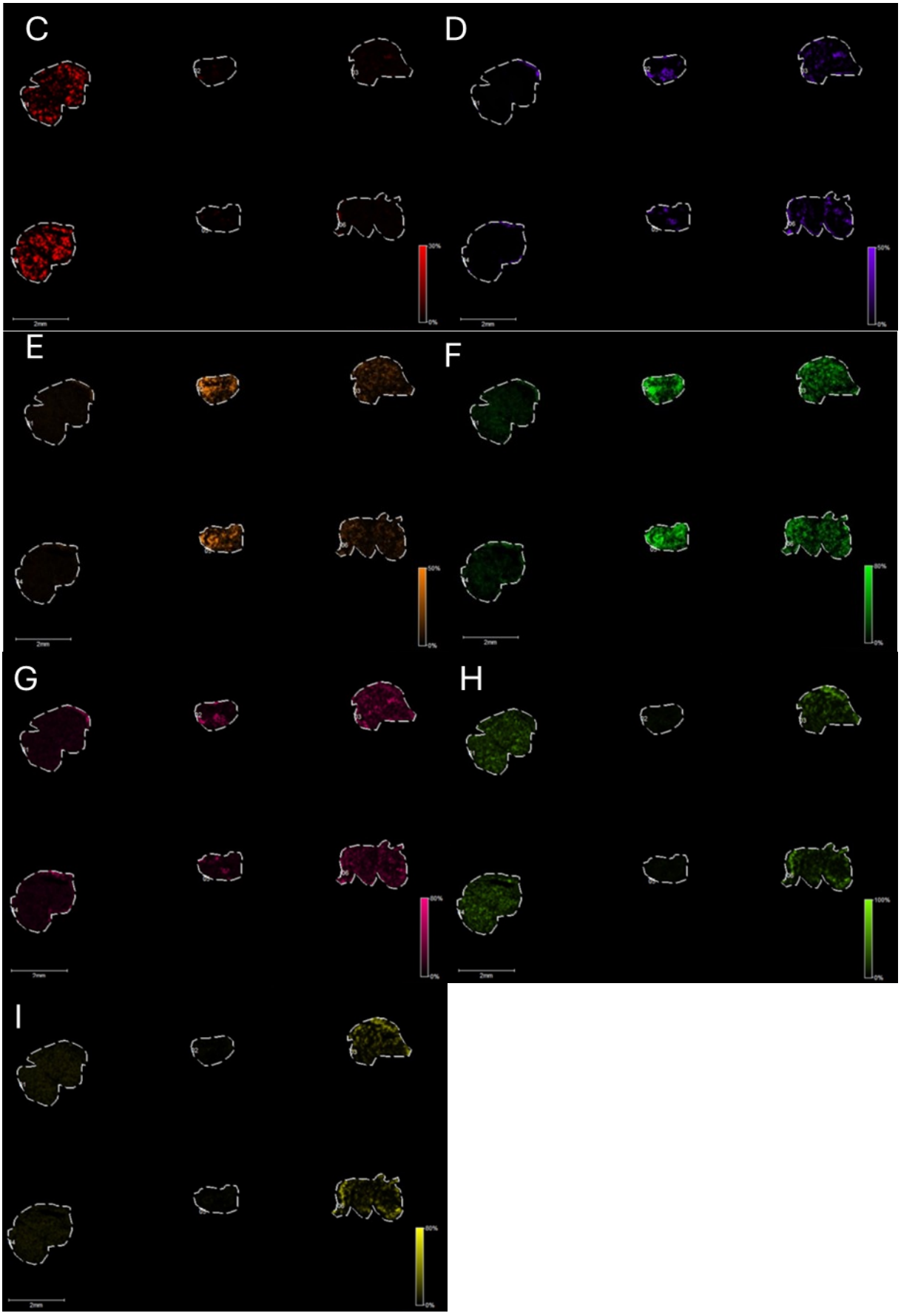




Rysunek 5.15 Zestawienie map intensywności sygnału dla wybranych jonów lipidowych (m/z), obrazujących ich rozmieszczenie w tkankach mięśniowych analizowanych metodą MALDI-MS w trybie jonizacji dodatniej z zastosowaniem matrycy DHB. Każda mapa oznaczona literą (A - K) odpowiada wartości m/z z dokładnością ± 0,5 Da: A - 798,51; B - 786,42; C - 782,55; D - 780,66; E - 758,41; F - 756,49; G - 760,60; H - 616,23; I - 603,46; J - 522,48; K - 407,30.

Analogicznie, na rysunku 5.16 przedstawiono mapy rozkładu intensywności sygnału dla wybranych jonów lipidowych na skrawkach tkanek mięśniowych analizowanych w trybie ujemnym z zastosowaniem matrycy DAN. Obrazy obrazują przestrzenne rozmieszczenie wybranych związków i potwierdzają skuteczność zastosowanej matrycy w detekcji oraz wizualizacji potencjalnych markerów chorobowych. Każda mapa została oznaczona literą (A - I) i odpowiada konkretnej wartości m/z z dokładnością ± 0,2 Da.




C
D
E
F
G
H
I

Rysunek 5.16 Zestawienie map intensywności sygnału dla wybranych jonów lipidowych (m/z), obrazujących ich rozmieszczenie w tkankach mięśniowych analizowanych metodą MALDI-MS w trybie jonizacji ujemnej z zastosowaniem matrycy DAN. Każda mapa oznaczona literą (A - K) odpowiada wartości m/z z dokładnością ± 0,2 Da, odpowiednio dla: A - 883,50 m/z, B - 696,18 m/z, C - 454,30 m/z, D - 567,14 m/z, E - 546,05 m/z, F - 521,07 m/z, G - 333,59 m/z, H - 323,10 m/z, I - 307,29 m/z.

5.4.4. Fragmentacja jonów metodą LIFT w analizie MS/MS

Technologia LIFT opracowana przez firmę Bruker stanowi zaawansowaną metodę analizy tandemowej w spektrometrii mas typu MALDI-TOF/TOF, umożliwiającą uzyskiwanie widm fragmentacyjnych (MS/MS) bez konieczności zastosowania klasycznych komór zderzeniowych czy pułapek jonowych. Jest to podejście wyjątkowo korzystne w kontekście analizy złożonych próbek biologicznych, gdzie kluczowe znaczenie ma zachowanie integralności cząsteczek oraz wysoka czułość i dokładność analityczna. Zasada działania technologii LIFT opiera się na wykorzystaniu dedykowanego modułu przyspieszającego (tzw. komory LIFT), w którym dochodzi do selektywnego zwiększenia energii kinetycznej wcześniej wyizolowanych jonów prekursorowych. W pierwszym etapie analizy MS generowane jest pełne widmo jonów, z którego wybierany jest jon o określonym stosunku masy do ładunku (m/z), określany jako jon rodzicielski (prekursor). Następnie jon ten trafia do komory LIFT, gdzie następuje podniesienie potencjału (ang. *potential lift*) - kluczowy etap technologii LIFT. Jony kontynuują ruch z zachowaniem tej samej prędkości, przechodząc do komory ogniskującej (ang. *focusing cell*), w której potencjał na kolejnej elektrodzie jest obniżany o kilka kV, powodując ich przyspieszenie. W ostatnim etapie jony zostają dodatkowo przyspieszone w procesie postakceleracji (ang. *post-acceleration cell*), co umożliwia ich czasowe skupienie w detektorze [111].

Zastosowanie tej technologii jest szczególnie korzystne w kontekście detekcji jonów o niskiej masie i niewysokiej intensywności, które w standardowym trybie często pozostają niewidoczne z powodu niskiej efektywności fragmentacji lub ograniczonej czułości detektora. Technologia LIFT zapewnia wysoką rozdzielczość oraz skuteczność identyfikacji nawet słabo reprezentowanych produktów fragmentacji. Dodatkowo pozwala na skrócenie czasu analizy, oraz redukcję interferencji tła, co czyni ją narzędziem wyjątkowo użytecznym w analizie próbek biologicznych. Ze względu na swoją precyzję, szybkość oraz możliwość integracji z molekularnym obrazowaniem MSI, technologia ta znajduje szerokie zastosowanie w nowoczesnych badaniach lipidomicznych, proteomicznych oraz metabolomicznych [111–113].

6. Wyniki oraz dyskusja

6.1. Technika PIXE

6.1.1. Obserwacje rozkładów pierwiastkowych

Zaprezentowane w tym rozdziale wyniki zostały przedstawione podczas międzynarodowej konferencji NUTECH we wrześniu 2020 oraz opisane w publikacji zatytułowanej "*Sub-cellular elemental imaging of human muscle tissues affected by neuromuscular diseases*" [34].

W przypadku analiz wykonanych metodą PIXE, materiał badawczy obejmował cztery skrawki tkanek mięśniowych, wyselekcjonowanych zgodnie z klasyfikacją przedstawioną w rozdziale 5.1. Dwie próbki pochodziły z grupy kontrolnej C, natomiast po jednej z grupy miopatii M i dystrofii D. Przypisanie próbek do poszczególnych grup oparto na rozpoznaniach kliniczno-patologicznych. Z każdego skrawka wykonano wielopunktowe pomiary, umożliwiające ocenę rozkładu pierwiastków w obrębie próbki oraz porównania międzygrupowe. Szczegółowe informacje dotyczące liczby punktów pomiarowych oraz metod analizy danych przedstawiono w kolejnych sekcjach analitycznych.

Analiza wyników pomiarów wykonanych metodą PIXE, przedstawionych w rozdziale 5.2.4 w postaci szczegółowych map przestrzennego rozkładu intensywności promieniowania charakterystycznego, ujawniła znaczące różnice w rozmieszczeniu pierwiastków pomiędzy różnymi stanami strukturalnymi tkanki mięśniowej. W obrębie wszystkich badanych próbek stwierdzono obecność podstawowych składników mineralnych takich jak sód, magnez, fosfor, siarka, chlor oraz potas. Pierwiastki te charakteryzowały się wyraźnie podwyższonym stężeniem względem pozostałych analizowanych pierwiastków, co jest zgodne z ich znaną rolą w utrzymaniu homeostazy i funkcjonowaniu komórek mięśniowych. Dodatkowo, w wybranych obszarach tkanki przedstawionych na rysunku 5.7 zaobserwowano punktowe akumulacje pierwiastków śladowych, w tym żelaza oraz cynku. Rozmieszczenie tych pierwiastków wykazywało charakter ogniskowy, co może wskazywać na ich specyficzne zaangażowanie w lokalne procesy metaboliczne, stres oksydacyjny lub zmiany patologiczne zachodzące w tkance mięśniowej. Taka heterogeniczność przestrzenna pierwiastkowego składu może stanowić cenny wskaźnik diagnostyczny, pozwalający na lepsze zrozumienie mechanizmów molekularnych towarzyszących różnym stanom chorobowym.

6.1.2. Test Kruskala-Wallisa oraz Shapiro-Wilka

Ponieważ rozkład danych nie spełniał założeń normalności, co potwierdził test Shapiro-Wilka (przeprowadzony osobno dla każdej zmiennej w podziale na grupy), zastosowanie klasycznych testów parametrycznych (takich jak jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA) nie było uzasadnione.

W związku z tym przeprowadzono nieparametryczny test Kruskala-Wallisa, będący odpowiednikiem ANOVY dla danych nieprezentujących rozkładu normalnego. Test ten ocenia, czy istnieją statystycznie istotne różnice między medianami co najmniej trzech niezależnych grup, bazując na rangach obserwacji, a nie na ich bezwzględnych wartościach.

W celu oceny normalności rozkładu danych dla każdej zmiennej w obrębie analizowanych grup, zastosowano test Shapiro-Wilka. Test ten ocenia zgodność rozkładu danych z rozkładem normalnym, a jego statystyka, oznaczona jako W, przyjmuje wartości z zakresu od 0 do 1. Im bliższa wartości 1, tym większe podobieństwo do rozkładu normalnego. Wartości W znacznie odbiegające od 1 (w szczególności $< 0,9$), w połączeniu z niskim poziomem istotności ($p < 0,05$), wskazują na odrzucenie hipotezy o normalności. Wyniki testu, przedstawione w tabeli 6.1, jednoznacznie wykazały, że zdecydowana większość analizowanych zmiennych w poszczególnych grupach wykazuje istotne odchylenia od normalności. Przykładowo, dla sodu w grupie kontrolnej odnotowano $W = 0,889$ oraz $p < 0,05$, natomiast dla magnezu w tej samej grupie $W = 0,734$, $p < 0,05$. Szczególnie silne odchylenia zauważono dla pierwiastków takich jak cynk i brom, gdzie dla cynku w grupie miopatii W wyniosło 0,176, przy $p < 0,05$, natomiast dla bromu w grupie kontrolnej $W = 0,167$, $p < 0,05$. Dodatkowo, żelazo ($W = 0,620$, $p < 0,05$) oraz fosfor ($W = 0,397$, $p < 0,05$) również wykazały wyraźny brak rozkładu normalnego. WZ tego też powodu w dalszej analizie zastosowano metody nieparametryczne, które nie wymagają założenia normalności danych.

W związku z powyższym, zastosowanie nieparametrycznego testu Kruskala-Wallisa było uzasadnione. Statystyka testowa Kruskala-Wallisa, oznaczana jako H, mierzy stopień rozproszenia rang wokół median w poszczególnych grupach. Wysokie wartości H sugerują istotne różnice w rozkładach badanych grup, co może prowadzić do odrzucenia hipotezy zerowej o ich jednorodności. Wyniki testu przedstawiono w tabeli 6.2. Przedstawia ona wyniki nieparametrycznego testu Kruskala-Wallisa przeprowadzonego dla każdego pierwiastka osobno, celem oceny różnic w zawartości chemicznej między trzema analizowanymi grupami C, D i M. Statystyka testowa H odzwierciedla łączną rangę różnic między grupami, im wyższa wartość H, tym silniejsze różnice między medianami badanych grup. Wartości p wskazują poziom istotności statystycznej tych różnic. W analizie stwierdzono istotne różnice pomiędzy grupami dla wszystkich analizowanych pierwiastków. Największe wartości H odnotowano dla fosforu ($H = 1674,512$, $p < 0,05$), siarki ($H = 1619,567$, $p < 0,05$), magnezu ($H = 1439,039$, $p < 0,05$) oraz sodu ($H = 1384,723$, $p < 0,05$). Nawet w przypadku bromu, gdzie wartość H była relatywnie niska ($H = 15,053$), uzyskano statystycznie istotny wynik, świadczący o znaczących różnicach międzygrupowych również dla tego pierwiastka.

Tabela 6.1 Wyniki testu Shapiro-Wilka oceniającego normalność rozkładu danych dla poszczególnych pierwiastków w obrębie badanych grup.

Pierwiastek	Grupa	Statystyka W	p-value
Na	Kontrola	0,889	$p < 0,05$
	Miopatia	0,958	$p < 0,05$
	Dystrofia	0,964	$p < 0,05$
Mg	Kontrola	0,734	$p < 0,05$
	Miopatia	0,822	$p < 0,05$
	Dystrofia	0,954	$p < 0,05$
P	Kontrola	0,397	$p < 0,05$
	Miopatia	0,985	$p < 0,05$
	Dystrofia	0,980	$p < 0,05$
S	Kontrola	0,961	$p < 0,05$
	Miopatia	0,950	$p < 0,05$
	Dystrofia	0,843	$p < 0,05$
Cl	Kontrola	0,462	$p < 0,05$
	Miopatia	0,977	$p < 0,05$
	Dystrofia	0,963	$p < 0,05$
K	Kontrola	0,916	$p < 0,05$
	Miopatia	0,982	$p < 0,05$
	Dystrofia	0,902	$p < 0,05$
Fe	Kontrola	0,620	$p < 0,05$
	Miopatia	0,845	$p < 0,05$
	Dystrofia	0,429	$p < 0,05$
Zn	Kontrola	0,371	$p < 0,05$
	Miopatia	0,176	$p < 0,05$
	Dystrofia	0,586	$p < 0,05$
Br	Kontrola	0,167	$p < 0,05$
	Miopatia	0,115	$p < 0,05$
	Dystrofia	0,257	$p < 0,05$

Tabela 6.2. Wyniki testu Kruskala-Wallisa przeprowadzonego dla poszczególnych pierwiastków, mającego na celu ocenę istotności różnic między trzema grupami badawczymi C, D i M.

Pierwiastek	H (statystyka)	p-value
Na	1384,723	$p < 0,05$
Mg	1439,039	$p < 0,05$
P	1674,512	$p < 0,05$
S	1619,567	$p < 0,05$
Cl	475,471	$p < 0,05$
K	980,877	$p < 0,05$
Fe	392,815	$p < 0,05$
Zn	93,456	$p < 0,05$
Br	15,053	$p < 0,05$

Wyniki testu Kruskala-Wallisa dostarczają dowodów pozwalających na stwierdzenie , że rozkłady zawartości pierwiastków różnią się istotnie pomiędzy analizowanymi grupami. Otrzymane rezultaty uzasadniają przeprowadzenie dalszych analiz post hoc (np. statystyki U Manna-Whitney'a dla par grup) oraz zastosowanie metod eksploracyjnych takich jak analiza głównych składowych (ang. *Principal Component Analysis,* PCA) czy liniowa analiza dyskryminacyjna (ang. *Linear Discriminant Analysis,* LDA), w celu identyfikacji pierwiastków o najwyższej wartości dyskryminacyjnej i interpretacji zależności wielowymiarowych pomiędzy próbkami.

6.1.3. Test U Manna-Whitney'a

Celem przeprowadzonej analizy było określenie różnic w składzie pierwiastkowym próbek mięśniowych pochodzących z trzech grup badawczych: M, D oraz C. Ocenie poddano następujące pierwiastki: sód, magnez, fosfor, siarkę, chlor, potas, żelazo, cynk oraz brom. Analizy wykonano w celu zidentyfikowania potencjalnych biomarkerów zaburzeń mięśniowych oraz charakterystyki ich dystrybucji w zmienionej patologicznie tkance.

Do oceny różnic w składzie pierwiastkowym pomiędzy parami: M-C, M-D oraz C-D, zastosowano test U Manna-Whitney'a. Jest to nieparametryczna metoda statystyczna służąca do porównania dwóch niezależnych prób, szczególnie wskazana w przypadku danych, które nie spełniają założeń normalności rozkładu. Test ten ocenia, czy rozkłady zmiennych w dwóch grupach różnią się istotnie pod względem mediany, co pozwala na wykrycie subtelnych, lecz znaczących różnic między badanymi populacjami. Kluczowe parametry tabeli:

- U - statystyka testu U Manna-Whitney'a; wartości bliskie 0 lub bardzo małe wskazują na dużą różnicę między grupami.

- Z - standaryzowana wersja statystyki U, pozwalająca ocenić, jak bardzo obserwowany wynik różni się od oczekiwanego przy braku różnic między grupami (hipoteza zerowa). Im większa bezwzględna wartość Z, tym silniejszy dowód na różnicę między grupami. Z wartości ujemnej wynika, że wartości w pierwszej grupie są przeciętnie niższe niż w drugiej.
- p - poziom istotności (ang. *p-value*); wartość < 0,05 uznawano za statystycznie istotną.
- N - liczebność prób w każdej z porównywanych grup.
- Wartość p dwustronna - uwzględnia obie możliwości różnic (większa lub mniejsza zawartość pierwiastka w danej grupie).

Wyniki zilustrowano również za pomocą wykresów pudełkowych (ang. *box-whisker plots*), ukazujących strukturę rozkładu danych w każdej grupie, wraz z oznaczeniem wartości średnich, median oraz zakresu zmienności.

Analiza porównawcza między grupą M a C wykazała istotne statystycznie różnice w zawartości sześciu spośród dziewięciu analizowanych pierwiastków (tabela 6.3). W grupie pacjentów z miopatią stwierdzono istotnie wyższą lub niższą zawartość sodu, magnezu, fosforu, siarki, cynku oraz bromu ($p < 0,05$). Dla wszystkich wymienionych pierwiastków wartość statystyki U wynosiła 0, co oznacza całkowite rozdzielenie rozkładów pomiędzy grupami. Świadczy to o znaczących różnicach w zawartości tych pierwiastków między zdrową a zmienioną chorobowo tkanką mięśniową. Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic w poziomach chloru, potasu ani żelaza ($p > 0,05$), co może wskazywać na ich brak zmienności niezależnie od obecności zmian miopatycznych lub na niewystarczającą moc statystyczną wynikającą z ograniczonej liczby próbek ($n = 2$ dla grupy miopatii).

Tabela 6.3 Wyniki testu U Manna-Whitney'a dla porównania zawartości pierwiastków w grupie miopatii i kontrolnej.

Pierwiastek	N (Miopatia/Kontrola)	U	Z	p	p (dwustronna)	Istotność statystyczna
Na	2/10	0	-2,041	0,041	0,030	p < 0,05
Mg	2/10	0	-2,041	0,041	0,030	p < 0,05
P	2/10	0	-2,041	0,041	0,030	p < 0,05
S	2/10	0	-2,041	0,041	0,030	p < 0,05
Cl	2/10	6	-0,752	0,452	0,485	n.s.
K	2/10	2	-1,611	0,107	0,121	n.s.
Fe	2/10	6	-0,752	0,452	0,485	n.s
Zn	2/10	0	-2,041	0,041	0,030	p < 0,05
Br	2/10	0	-2,041	0,041	0,030	p < 0,05

W porównaniu grupy dystroficznej z kontrolną (tabela 6.4) istotne różnice statystyczne ($p < 0,05$) odnotowano w przypadku trzech pierwiastków: sodu, potasu oraz żelaza. Dla sodu i potasu wartość

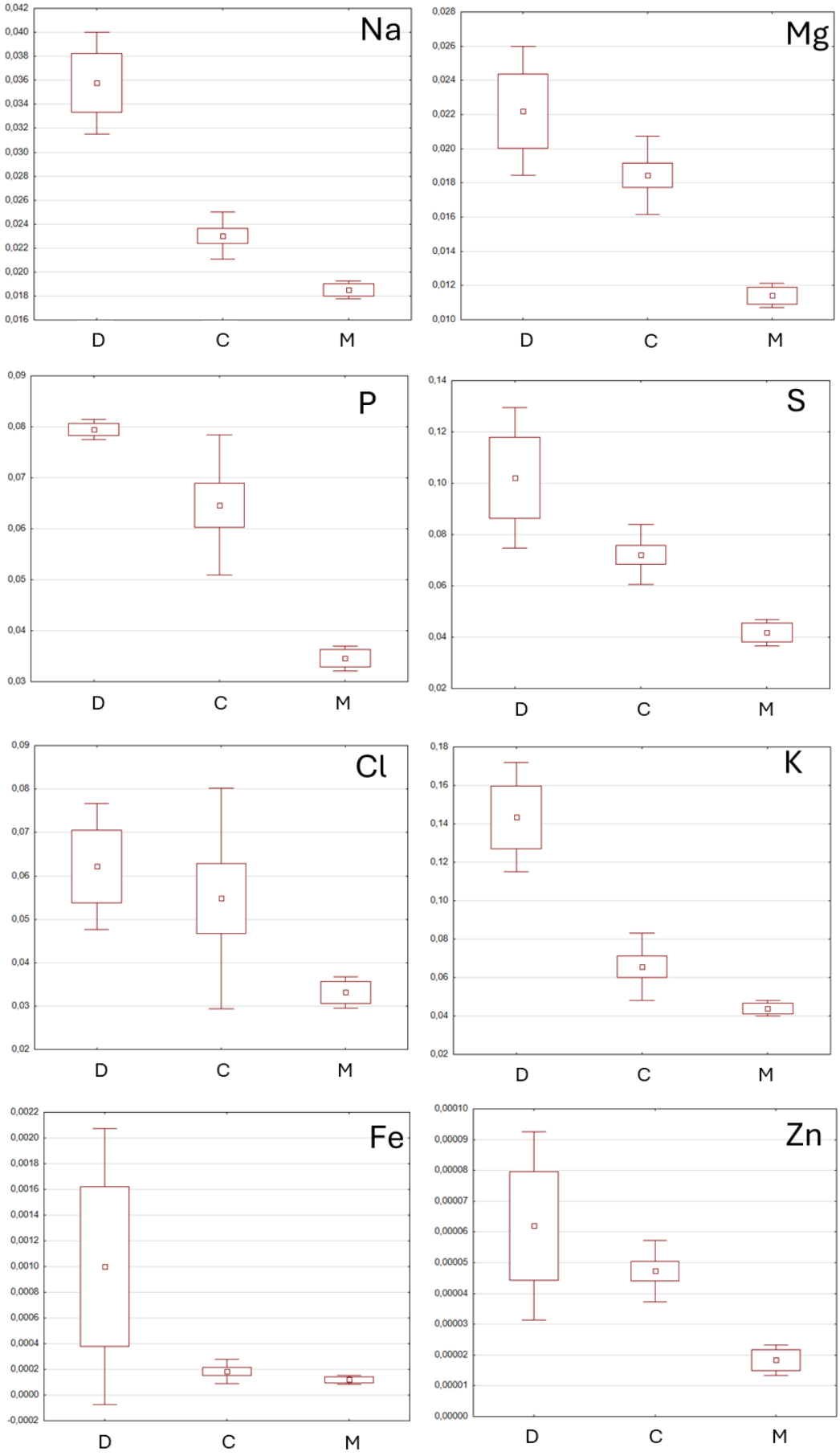
statystyki U wyniosła 0, co sugeruje silne rozdzielenie rozkładów międzygrupowych i jednoznaczne różnice w poziomach tych pierwiastków.

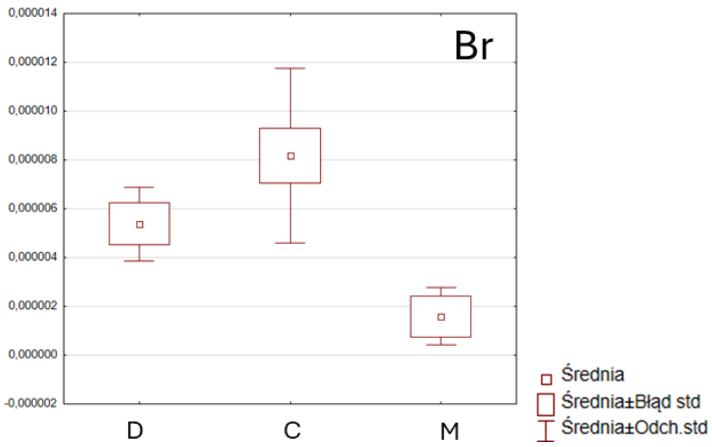
Tabela 6.4 Wyniki testu U Manna-Whitney'a dla porównania zawartości pierwiastków w grupie dystrofii i kontrolnej.

Pierwiastek	N (Dystrofia/Kontrola)	U	Z	p	p (dwustronna)	Istotność statystyczna
Na	3/10	0	2,451	0,014	0,007	$p < 0,05$
Mg	3/10	6	1,437	0,151	0,161	n.s
P	3/10	5	1,606	0,108	0,112	n.s
S	3/10	7	1,268	0,205	0,217	n.s
Cl	3/10	12	0,423	0,673	0,692	n.s
K	3/10	0	2,451	0,014	0,007	$p < 0,05$
Fe	3/10	1	2,282	0,022	0,014	$p < 0,05$
Zn	3/10	10	0,761	0,447	0,468	n.s
Br	3/10	7	-1,268	0,205	0,217	n.s

Zestawienie wyników uzyskanych dla grupy miopatii i dystrofii nie wykazało żadnych istotnych statystycznie różnic w zawartości żadnego z analizowanych pierwiastków ($p > 0,05$). Może to sugerować zbliżony profil biochemiczny obu typów uszkodzeń mięśniowych, bądź stanowić konsekwencję małej liczebności prób, co wpływa na ograniczenie mocy analizy statystycznej. Niezależnie od tego, zaobserwowane rozrzuty danych sugerują potrzebę dalszych badań z uwzględnieniem większej liczby próbek.

Obserwacje wynikające z analizy danych przedstawionej na wykresach pudełkowych zaprezentowanych na rysunku 6.1 są zgodne z wynikami testu U Manna-Whitney'a przedstawionymi w tabelach 6.3 i 6.4. Dla pierwiastków, których zawartość różni się istotnie statystycznie pomiędzy grupami, obserwuje się jednoznaczne rozdzielenie zakresów wartości (np. Na, Mg, Zn). W przypadku braku istotności statystycznej (np. Cl), wykresy odzwierciedlają dużą zmienność lub zbliżone poziomy pierwiastków między grupami.


Na
0,042
0,040
0,038
0,036
0,034
0,032
0,030
0,028
0,026
0,024
0,022
0,020
0,018
0,016
D
C
M
Mg
0,028
0,026
0,024
0,022
0,020
0,018
0,016
0,014
0,012
0,010
D
C
M
P
0,09
0,08
0,07
0,06
0,05
0,04
0,03
D
C
M
S
0,14
0,12
0,10
0,08
0,06
0,04
0,02
D
C
M
Cl
0,09
0,08
0,07
0,06
0,05
0,04
0,03
0,02
D
C
M
K
0,18
0,16
0,14
0,12
0,10
0,08
0,06
0,04
0,02
D
C
M
Fe
0,0022
0,0020
0,0018
0,0016
0,0014
0,0012
0,0010
0,0008
0,0006
0,0004
0,0002
0,0000
-0,0002
D
C
M
Zn
0,00010
0,00009
0,00008
0,00007
0,00006
0,00005
0,00004
0,00003
0,00002
0,00001
0,00000
D
C
M



Rysunek 6.1 Zestawienie wykresów pudełkowych (box-whisker plots) przedstawiających zawartość wybranych pierwiastków (Na, Mg, P, S, Cl, K, Fe, Zn, Br) w trzech analizowanych grupach: miopatia, dystrofia mięśniowa i kontrola.

6.1.4. Wielowymiarowa analiza dyskryminacyjna (MDA) i Lambda Wilksa

Dalsza analiza różnic pomiędzy wspomnianymi grupami została przeprowadzona z zastosowaniem wielowymiarowej analizy dyskryminacyjnej MDA. Jest to metoda nadzorowana, która wykorzystuje etykiety klas, aby znaleźć kombinacje zmiennych maksymalizujące separację między klasami. W procedurze krokowej do modelu sukcesywnie wprowadzano zmienne o najwyższej mocy dyskryminacyjnej, co pozwala na wyodrębnienie najbardziej istotnych pierwiastków różnicujących próbki.

Przeprowadzona analiza dyskryminacyjna pozwoliła na wyodrębnienie zmiennych w największym stopniu różnicujących badane próbki. Wartości statystyki Lambdy Wilksa, zestawione w tabeli 6.5, służą ocenie istotności różnic między grupami w ujęciu wielowymiarowym. Lambda Wilksa jest statystyką stosowaną w analizie dyskryminacyjnej i przyjmuje wartości z przedziału od 0 do 1, gdzie niższe wartości wskazują na istotne różnice między grupami, natomiast wartości zbliżone do 1 sugerują ich brak.

Tabela 6.5. Wartości lambdy Wilksa dla tkanek mięśniowych.

K	S	Na	Cl	P	Mg	Zn	Fe	Br
0,24	0,70	0,95	0,59	0,65	0,93	0,99	0,99	0,99

W przedstawionych wynikach potas charakteryzuje się najniższą wartością Lambda Wilksa (0,24), co świadczy o ewidentnych różnicach pomiędzy grupami w przypadku tego pierwiastka. Siarka i chlor wykazują umiarkowane wartości (odpowiednio 0,70 i 0,59), co może wskazywać na pewne różnice. Natomiast pozostałe pierwiastki, takie jak sód, magnez, fosfor, cynk, żelazo oraz brom, mają wartości bardzo bliskie 1 (w zakresie 0,93 - 0,99), co sugeruje, że różnice między grupami dla tych pierwiastków są niewielkie lub nieistotne w kontekście wielowymiarowej analizy.

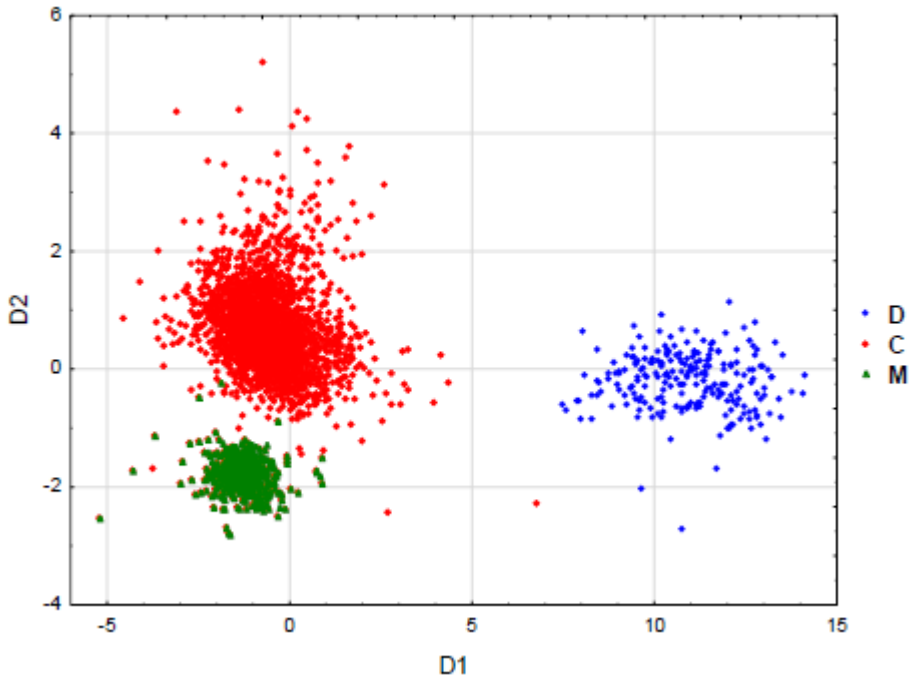
W wyniku przeprowadzonej analizy wielowymiarowej dyskryminacyjnej MDA wyznaczono funkcje dyskryminacyjne, będące liniowymi kombinacjami intensywności promieniowania charakterystycznego poszczególnych pierwiastków, które najlepiej różnicują badane grupy tkanek mięśniowych. Równania dwóch głównych funkcji dyskryminacyjnych (D1 i D2) przedstawiono poniżej:

$$D_1 = 2{,}269 \cdot K - 1{,}200 \cdot S + 0{,}286 \cdot Na - 2{,}148 \cdot Cl + 1{,}654 \cdot P - 0{,}333 \cdot Mg - 0{,}067 \cdot Zn - 0{,}036 \cdot Fe - 0{,}041 \cdot Br,$$

$$D_2 = -0{,}577 \cdot K + 0{,}963 \cdot S - 0{,}090 \cdot Na - 1{,}413 \cdot Cl + 1{,}440 \cdot P + 0{,}367 \cdot Mg + 0{,}071 \cdot Zn - 0{,}066 \cdot Fe + 0{,}040 \cdot Br.$$

Dla pierwszej funkcji dyskryminacyjnej D_1 największy wpływ miały pierwiastki potas, chlor, fosfor oraz siarka. Wysokie wartości bezwzględne współczynników przypisanych tym pierwiastkom wskazują, że to one w największym stopniu determinują rozdzielenie grup na osi D_1. Zwraca również uwagę przeciwstawny znak współczynników potasu (dodatni) oraz chloru i siarki (ujemne), co świadczy o ich antagonistycznym wpływie na klasyfikację próbek. Obecność innych pierwiastków z mniejszymi wartościami współczynników (Mg, Zn, Fe, Br) podkreśla dodatkowe, chociaż mniej istotne, czynniki różnicujące. Druga funkcja dyskryminacyjna D_2 uwypukla zbliżony zestaw pierwiastków, jednak z odmiennym rozkładem znaków współczynników oraz siłą ich wpływu. W szczególności chlor i siarka wykazują zwiększone znaczenie dyskryminacyjne, a dodatkowo istotny udział w modelu uzyskują również magnez oraz cynk. Funkcja D_2 reprezentuje niezależny wymiar zróżnicowania, który umożliwia skuteczniejsze rozdzielenie próbek w przypadkach, gdzie funkcja D_1 okazuje się mniej efektywna.

Graficzna prezentacja rozmieszczenia próbek na płaszczyźnie wyznaczonej przez funkcje dyskryminacyjne D_1 i D_2 (rysunek 6.2) ujawnia wyraźne skupienia odpowiadające trzem grupom badanych tkanek: kontroli, dystrofii i miopatii. Próbki z grupy D wykazują istotnie wyższe wartości współrzędnych na osi D_1 w porównaniu zarówno z grupą C, jak i z grupą M, co potwierdza skuteczność pierwszej funkcji dyskryminacyjnej w rozróżnianiu tej grupy. Próbki należące do grupy miopatii częściowo nakładają się na rozkład próbek kontrolnych, co może świadczyć o większym podobieństwie ich profili pierwiastkowych oraz wskazuje na potencjalne ograniczenia modelu w jednoznacznym różnicowaniu tych dwóch grup na podstawie zastosowanych zmiennych.



Rysunek 6.2 Rozmieszczenie próbek trzech typów tkanek mięśniowych na płaszczyźnie wyznaczonej przez funkcje dyskryminacyjne D_1 i D_2. Osie odpowiadają liniowym kombinacjom zmiennych, które w sposób optymalny rozróżniają analizowane grupy na podstawie ich profili pierwiastkowych. Każdy punkt odpowiada pojedynczemu punktowi pomiarowemu, natomiast przestrzenne skupienia punktów odzwierciedlają podobieństwa oraz różnice między grupami [34].

Skupienie punktów, odpowiadających poszczególnym grupom badawczym, na wykresie funkcji dyskryminacyjnych odzwierciedla wewnątrzgrupową homogeniczność danych, co jednocześnie potwierdza spójność i poprawność zastosowanej metodyki pomiarowej. Tego typu wizualizacja stanowi cenne narzędzie oceny jakości klasyfikacji, umożliwiając identyfikację zarówno przypadków jednoznacznie przynależących do grup, jak i obserwacji odstających lub trudnych do jednoznacznego przyporządkowania.

Uzyskane wyniki MDA podkreślają potencjał tej metody jako narzędzia wspomagającego diagnostykę. Metoda ta pozwala, dzięki wykorzystaniu optymalnych kombinacji pierwiastków, na skuteczną segmentację próbek. Ponadto umożliwia lepsze zrozumienie zmian biochemicznych towarzyszących zaburzeniom nerwowo-mięśniowym.

6.1.5. Analiza Głównych Składowych (PCA)

Analiza głównych składowych jest jedną z najczęściej stosowanych metod redukcji wymiarowości danych. Jej głównym celem jest uproszczenie zestawu danych poprzez wyznaczenie nowych zmiennych zwanych głównymi składowymi, które stanowią liniowe kombinacje oryginalnych cech. Wyznaczone w ten sposób nowe zmienne maksymalizują wyjaśnianą wariancję danych, co pozwala na efektywną reprezentację informacji przy jednoczesnym zmniejszeniu liczby wymiarów.

W wyniku przeprowadzonej analizy głównych składowych PCA zredukowano wymiarowość danych opisujących skład chemiczny badanych próbek tkanek mięśniowych do dwóch głównych składowych, które wyjaśniają łącznie 91,6% zmienności danych (PC_1 - 70,2%, PC_2 - 21,4%). Pierwsza główna składowa PC_1 jest liniową kombinacją intensywności pierwiastków według równania:

$$PC_1 = 0.085 \cdot Na + 0.071 \cdot Mg + 0.464 \cdot P + 0.408 \cdot S + 0.497 \cdot Cl + 0.599 \cdot K + 0.007 \cdot Fe + 0.000 \cdot Zn + 0.000 \cdot Br.$$

Równinie to wskazuje na największy wpływ potasu, chloru, fosforu oraz siarki. Wszystkie współczynniki posiadają dodatni znak, co oznacza, że wzrost ich zawartości powoduje zwiększenie wartości pierwszej głównej składowej. Druga główna składowa PC_2 opisana jest następującym wzorem:

$$PC_2 = -0.108 \cdot Na - 0.060 \cdot Mg + 0.475 \cdot P - 0.341 \cdot S + 0.557 \cdot Cl - 0.576 \cdot K - 0.010 \cdot Fe + 0.000 \cdot Zn + 0.000 \cdot Br,$$

gdzie fosfor i chlor mają istotny dodatni wkład, natomiast potas oraz siarka wpływają ujemnie, co odzwierciedla bardziej złożone zależności między pierwiastkami w kontekście drugiego wymiaru wariancji.

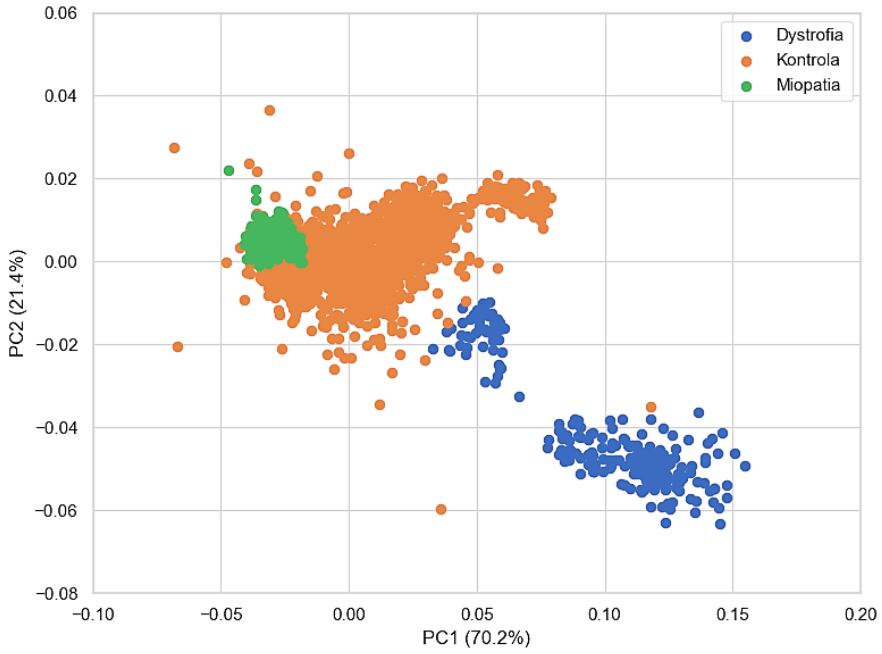
Graficzna reprezentacja wyników analizy PCA na płaszczyźnie PC_1-PC_2 ukazuje wyraźne grupowanie próbek zgodnie ze stanem chorobowym. Próbki z grupy dystrofii cechują się wyższymi wartościami PC_1, co wskazuje na ich specyficzny profil chemiczny, charakteryzujący się podwyższonym udziałem pierwiastków silnie skorelowanych z tą składową. Punkty reprezentujące próbki kontrolne oraz miopatię w dużym stopniu nakładają się, co może świadczyć o podobieństwie ich składu chemicznego względem analizowanych zmiennych (rysunek 6.3).

Przeprowadzona analiza PCA potwierdza, że zmienność danych w badanej próbce jest przede wszystkim determinowana przez stężenia potasu, chloru, fosforu oraz siarki. Wskazuje to na kluczowe znaczenie tych pierwiastków dla diagnostyki oraz różnicowania stanów chorobowych tkanek mięśniowych.

Potas odgrywa istotną rolę w fizjologii mięśni szkieletowych, a jego znaczenie jest szczególnie podkreślane w kontekście miopatii. Doniesienia literaturowe sugerują, że dieta bogata w potas może wspierać proces regeneracji osłabionych mięśni w przebiegu wybranych chorób mięśniowych [114]. Efekt ten może być związany m.in. z modulacją ekspresji genów kodujących białka kanałów potasowych. W wybranych typach miopatii obserwuje się zaburzenia regulacji genów odpowiedzialnych za utrzymanie homeostazy potasowej, co wskazuje na potencjalną rolę tych szlaków w patogenezie choroby. Sugeruje to również, że wybrane elementy układu regulującego gospodarkę potasową mogą pełnić funkcję biomarkerów diagnostycznych lub prognostycznych w kontekście schorzeń z grupy miopatii.

Chlor, a zwłaszcza anion chlorkowy, jest kluczowy dla utrzymania homeostazy komórkowej, równowagi osmotycznej oraz funkcjonowania układów pobudliwych, takich jak mięśnie i neurony. W układzie mięśniowym szczególne znaczenie mają kanały chlorkowe ClC-1, które odpowiadają za

przewodnictwo jonów Cl^- przez błonę komórkową włókien mięśni szkieletowych. Ich aktywność odgrywa fundamentalną rolę w stabilizacji potencjału błonowego i zapobieganiu nadmiernej depolaryzacji po wygenerowaniu potencjału czynnościowego. Zaburzenia funkcjonowania tych kanałów mogą prowadzić do miotonii oraz upośledzenia zdolności mięśnia do relaksacji i ponownej pobudliwości. W dystrofii miotonicznej typu 1 (DM1) dysfunkcja kanałów chlorkowych ClC-1 stanowi jeden z kluczowych czynników prowadzących do zaburzeń pobudliwości mięśni [115]. Jak wykazali Cisco i współpracownicy, upośledzenie funkcji tych kanałów działa synergistycznie z nieprawidłowościami w przewodnictwie wapniowym, co nasila objawy chorobowe i pogłębia miopatię [116].



Rysunek 6.3 Wykres przedstawia rozmieszczenie próbek trzech typów tkanek mięśniowych na płaszczyźnie pierwszych dwóch głównych składowych (PC_1 i PC_2). Osie odpowiadają zmiennym maksymalizującym wariancję danych, co umożliwia wizualizację różnic w składzie chemicznym między grupami. Każdy punkt to pojedyncza punkt pomiarowy, a skupienia odzwierciedlają podobieństwa wewnątrz grup oraz ich różnice.

Wyniki analizy PCA wyróżniły również fosfor jako pierwiastek szczególnie związany z różnicami między próbkami, co znajduje potwierdzenie w badaniach podkreślających jego rolę w nasilaniu patologii mięśniowych, zwłaszcza w kontekście dystrofii. W przypadku dystrofii mięśniowej Duchenne'a (DMD), wykorzystując model myszy, wykazano, że nadmiar fosforu w diecie znacząco pogarsza przebieg choroby, prowadząc m.in. do nasilonego stanu zapalnego i zwapnień mięśniowych [117]. Zwiększone spożycie fosforu nasilało nacieki zapalne, zwłaszcza z udziałem makrofagów typu M1, oraz promowało ektopowe zwapnienia w mięśniach szkieletowych. Z kolei ograniczenie podaży fosforu prowadziło do zmniejszenia uszkodzeń mięśniowych, obniżonej reakcji zapalnej i poprawy funkcji mięśni, co wskazuje na potencjał terapeutyczny diety ubogiej w fosfor w kontekście dystrofii mięśniowych.

Kolejnym istotnym pierwiastkiem różnicującym analizowane próbki w analizie PCA była siarka, co znajduje swoje silne uzasadnienie w danych biologicznych dotyczących dystrofii mięśniowej Duchenne'a. Zarówno w modelach nicieni (C. elegans), jak i gryzoni, wykazano deficyt siarki w tkance mięśniowej dotkniętej dystrofią. Literatura wskazuje, że zaburzenia metabolizmu siarki korelują z nasileniem objawów klinicznych DMD, a suplementacja związkami siarki może prowadzić do złagodzenia symptomów oraz poprawy funkcji mięśni [118]. Zarówno te obserwacje, jak i wyniki statystyczne uzyskane w niniejszej rozprawie sugerują, że siarka może odgrywać istotną rolę nie tylko w patogenezie choroby, ale również jako potencjalny marker prognostyczny. Bezpośrednie oznaczanie poziomu siarki w tkankach mogłoby wspierać podejmowanie decyzji klinicznych, nie tylko w kontekście suplementacji, ale także jako narzędzie do monitorowania skuteczności terapii, takich jak leczenie kortykosteroidami [118].

6.1.6. Wnioski płynące z analizy pierwiastkowej

Otrzymane wyniki potwierdzają, że choroby mięśni, w szczególności miopatie (biorąc pod uwagę ich skrajnie nie homogenną, zdywersyfikowaną grupę schorzeń pod względem patogenezy i przebiegu), pozostają wyjątkowo trudne do jednoznacznej diagnostyki. Nadal daleka od satysfakcjonującej wiedza na temat ich patogenezy sprawia, że nowoczesne metody analizy pierwiastkowej mogą stanowić cenne uzupełnienie klasycznych podejść diagnostycznych. Przeprowadzone badania wykazały, że:

- Mapowanie rozkładu pierwiastków metodą PIXE umożliwia identyfikację subtelnych, lecz istotnych różnic chemicznych między tkanką zdrową a zmienioną patologicznie.
- Pierwiastki Na, Mg, P i S wykazały istotne statystycznie różnice między badanymi grupami w testach Kruskala-Wallisa oraz U Manna-Whitney'a, co podkreśla ich potencjał w różnicowaniu stanów chorobowych,
- Wielowymiarowa analiza dyskryminacyjna wskazała na kluczową rolę pierwiastków K, Cl, P oraz S w klasyfikacji próbek. Wyznaczone funkcje dyskryminacyjne, będące liniowymi kombinacjami intensywności charakterystycznych linii pierwiastków, pozwoliły na skuteczne rozdzielenie grup. W funkcji D_1 dominowały potas (z największym dodatnim wpływem), chlor i siarka (wpływ ujemny), co wskazuje na ich przeciwstawne znaczenie w klasyfikacji. Funkcja D_2 potwierdziła znaczenie tych samych pierwiastków, jednak z odmiennymi wagami i znakami współczynników, co wprowadzało dodatkowy wymiar różnicowania.
- Analiza głównych składowych wykazała, że dwie pierwsze składowe (PC_1 - 70,2%, PC_2 - 21,4%) wyjaśniają łącznie ponad 91% wariancji danych, co świadczy o wysokiej reprezentatywności tych wymiarów. Składowa PC_1 była silnie powiązana z potasem, chlorem, fosforem i siarką, natomiast PC_2 ukazała bardziej złożone wzorce, z odmiennymi znakami współczynników, co sugeruje wielowymiarowy charakter różnic między grupami.

- Graficzne rozmieszczenie próbek na wykresach PCA i MDA ukazuje częściowe rozdzielenie grup C, D i M. W analizie MDA wyraźniej zarysowały się skupiska odpowiadające poszczególnym grupom, co potwierdza wysoką skuteczność klasyfikacji. Jednocześnie częściowe nakładanie się punktów, zwłaszcza między grupą kontrolną i miopatii, wskazuje na złożoność problemu oraz podobieństwo niektórych profili pierwiastkowych.

Głównym wnioskiem płynącym z przeprowadzonej analizy jest wskazanie potencjału technik spektroskopowych, w szczególności PIXE, jako narzędzi wspomagających diagnostykę chorób nerwowo-mięśniowych. Dzięki możliwości precyzyjnego odwzorowania przestrzennego rozkładu pierwiastków w skali mikrometrycznej, technika ta umożliwia detekcję subtelnych zmian metabolicznych i strukturalnych, często jeszcze przed pojawieniem sie wyraźnych zmian morfologicznych. Tego typu podejście może przyczynić się do identyfikacji nowych biomarkerów oraz, w dalszej perspektywie, do poprawy skuteczności diagnostyki i monitorowania przebiegu terapii chorób nerwowo-mięśniowych.

6.2. Technika SIMS

6.2.1. Uwagi dotyczące analizy i interpretacji wyników MeV SIMS

W celu wstępnej selekcji sygnałów potencjalnie istotnych dla różnicowania grup zastosowano analizę wariancji ANOVA. Należy jednak podkreślić, że metoda ta pełniła wyłącznie funkcję rankingową, służącą identyfikacji sygnałów m/z mogących różnicować analizowane próbki. Uzyskane wyniki mają charakter orientacyjny i stanowią punkt wyjścia do dalszych analiz.

Intensywności pików obliczono na podstawie integracji arbitralnie wybranych obszarów ROI w obrębie widma masowego, bez odejmowania tła, którego nieregularny charakter uniemożliwiał zastosowanie prostego modelu matematycznego. Wpływ tła oceniono jako marginalny. Dodatkowym ograniczeniem analizy jest spadek rozdzielczości masowej w obszarze wyższych wartośc m/z, co może wpływać na dokładność oceny intensywności sygnałów i ich interpretację. Z tego względu, analiza wyższych wartości m/z wymaga szczególnej ostrożności. Ponadto, ograniczona liczba próbek wpływa na siłę statystyczną przeprowadzonych analiz i ogranicza możliwość formułowania jednoznacznych wniosków o charakterze ilościowym.

W przypadku potrzeby precyzyjnej identyfikacji i ilościowej analizy wybranych związków chemicznych wskazane jest wykorzystanie bardziej specyficznych metod spektrometrii mas, takich jak MALDI. Niemniej jednak, wyniki uzyskane metodą MeV SIMS mogą pełnić rolę wstępnego narzędzia do identyfikacji związków o potencjalnym znaczeniu diagnostycznym, i w takim charakterze zostały wykorzystane w niniejszej rozprawie.

6.2.2. Kalibracja masowa i skalowanie danych w analizie widm SIMS

Po wstępnym przygotowaniu danych, polegającym na sumowaniu sygnałów z wybranych regionów ROI, dla każdego typu próbki uzyskano odrębne widma reprezentujące zróżnicowane lokalizacje w obrębie tkanki mięśniowej. Obszary pomiarowe dobrano w sposób zapewniający reprezentatywność oraz wewnętrzne zróżnicowanie materiału biologicznego, z jednoczesnym zachowaniem spójności w obrębie grup.

Do analiz wykonanych techniką SIMS wykorzystano cztery skrawki tkanek mięśniowych, pochodzące od mężczyzn w wieku 37 - 56 lat. Materiał badawczy obejmował: próbkę o potwierdzonym charakterze dystroficznym D, próbkę kontrolną C, próbkę reprezentującą miopatię M oraz próbkę o niejednoznacznym profilu histopatologicznym, wykazującą zmiany mogące odpowiadać miopatii o możliwym podłożu neurogennym, charakteryzującą się znacznym zanikiem włókien mięśniowych NM. Początkowo przyjęto podział na trzy kategorie: kontrolę, dystrofię oraz miopatię. W toku dalszych analiz, opartych na porównaniu wzorców widm jonów wtórnych, wprowadzono czwartą kategorię NM, przypisaną do opisanej próbki o możliwym podłożu neurogennym. Szczegółowy przebieg analizy oraz interpretację uzyskanych wyników przedstawiono w kolejnych częściach pracy.

Na potrzeby dalszych analiz statystycznych przygotowano macierz danych składającą się z 18 widm (wiersze) i 4500 kanałów detekcyjnych (kolumny). Początkowo każde widmo obejmowało 16 384 kanały, jednak ich liczba została ograniczona do 4500, ponieważ w wyższych zakresach nie obserwowano sygnałów innych niż szum tła. Redukcja ta pozwoliła również na istotne zmniejszenie złożoności obliczeniowej w dalszych etapach przetwarzania, w tym w analizie PCA.

Widma uzyskane z różnych próbek mogły wykazywać niewielkie przesunięcia w pozycjach szczytów masowych, wynikające z różnic w ustawieniu próbki względem detektora ekstrakcyjnego. W związku z tym dokonano korekty położenia charakterystycznych pików oraz ręcznej kalibracji masowej. Kalibrację przeprowadzono poprzez dopasowanie wielomianu trzeciego stopnia do pozycji znanych szczytów referencyjnych (np. H^+, Na^+, K^+, fragmenty PDMS).

W praktyce zależność między numerem kanału a wartością fizyczną (np. masą lub energią) rzadko ma charakter idealnie liniowy. W prostych układach detekcyjnych często wystarcza model liniowy, zakładający stały przyrost wartości na kanał oraz stałe przesunięcie. W bardziej zaawansowanych technikach, takich jak SIMS, wpływ nieliniowości detektora, zniekształceń optycznych i właściwości samej próbki prowadzi do odchyleń od tej zależności. Dlatego w celu uzyskania precyzyjnej kalibracji konieczne jest zastosowanie modelu uwzględniającego składniki nieliniowe, zazwyczaj w postaci wielomianu drugiego lub trzeciego stopnia, a niekiedy również funkcji wykładniczej.

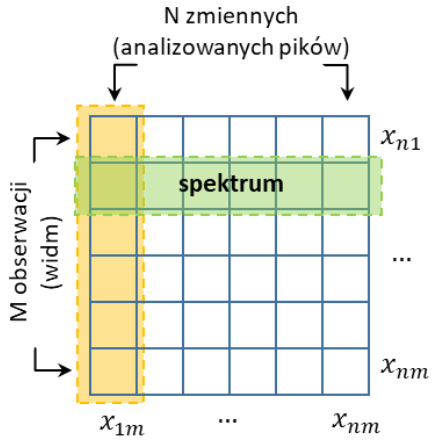
W niniejszej pracy zastosowano funkcję kalibracyjną drugiego stopnia, która pozwoliła na dokładniejsze odwzorowanie nieliniowej relacji między numerem kanału a wartością m/z. Przyjęta funkcja kalibracyjna miała postać:

$$\frac{m}{z} = 0{,}00895134 + 0{,}000317491 \cdot x + 0{,}0000505846 \cdot x^2, \quad (8)$$

gdzie: x oznacza numer kanału. Zastosowanie tej formy kalibracji umożliwiło precyzyjne przekształcenie osi kanałów do rzeczywistej osi masowej (m/z), co stanowiło niezbędny krok w dalszej analizie uzyskanych widm. Kalibracja została przeprowadzona przez współpracujący zespół badawczy i udostępniona na potrzeby niniejszej analizy.

Każde zarejestrowane widmo zostało znormalizowane względem całkowitej liczby zliczeń (ang. *total counts*), co pozwoliło na zminimalizowanie wpływu ewentualnych fluktuacji natężenia wiązki pierwotnej w trakcie pomiaru. Następnie, dla każdego punktu pomiarowego znajdującego się w obrębie wyznaczonego regionu włókna mięśniowego (ROI), obliczono widmo uśrednione. Dane te zestawiono w postaci macierzy, którą następnie poddano skalowaniu Poissona, procedurze właściwej dla danych uzyskanych techniką SIMS, charakteryzujących się statystyką zliczeń zgodną z rozkładem Poissona.

Zestaw danych uzyskanych metodą SIMS można przedstawić jako macierz X o wymiarach M × N, gdzie M oznacza liczbę widm (obserwacji), a N liczbę zmierzonych pików jonów molekularnych. Alternatywnie, zbiór ten można interpretować jako zestaw N obrazów jonowych, z których każdy zawiera M pikseli. Graficzną reprezentację tej macierzy przedstawiono na rysunku 6.4.



Rysunek 6.4 Graficzna reprezentacja danych pomiarowych uzyskanych metodą SIMS w postaci macierzy danych X, w której każdy wiersz odpowiada jednej z M obserwacji (tj. uśrednionym widmom z określonych obszarów pomiarowych – ROI), a każda kolumna jednej z N zmiennych (tj. intensywności sygnałów jonów przypisanych do określonych wartości m/z). Element Xnm oznacza intensywność sygnału jonu o wartości m/z przypisanej do zmiennej n, zmierzoną w obserwacji m.

W metodzie SIMS zliczenia jonów wtórnych są zdarzeniami losowymi, niezależnymi i o niskim prawdopodobieństwie detekcji w jednostce czasu. W efekcie wariancja intensywności sygnału danego piku jest zależna od jego średniej wartości - im większa intensywność, tym większa wariancja. W praktyce prowadzi to do sytuacji, w której poszczególne zmienne (piki) charakteryzują się różnym poziomem szumu i niepewności pomiarowej. Taka nierównomierność utrudnia bezpośrednie porównania oraz może wpływać na wyniki analiz statystycznych i modelowania wielowymiarowego.

Standardową metodą uwzględniania zmienności intensywności sygnałów jest skalowanie pierwiastkowe (ang. *square root scaling*), polegające na dzieleniu wartości macierzy X przez pierwiastek z tej wartości. Jednak podejście to okazuje się niewystarczające dla obrazów SIMS, ze względu na bardzo niskie zliczenia na piksel i duże względne niepewności. Keenan i Kotula [119] zaproponowali alternatywne skalowanie, polegające na dwustopniowej normalizacji: najpierw każdy pik (kolumna macierzy X) jest dzielony przez pierwiastek ze swojej średniej intensywności, a następnie każde widmo (wiersz macierzy) przez pierwiastek ze średniej wartości całego widma. Takie podejście, znane skalowaniem Poissona, pozwala ujednolicić poziom wariancji w całym zbiorze danych (wyrównując wpływ pików o różnej intensywności) i umożliwia rzetelne porównanie ich zmienności, co jest kluczowe przed zastosowaniem metod redukcji wymiarów, takich jak analiza głównych składowych PCA.

W praktyce, podejście to realizowane jest poprzez przekształcenie oryginalnej macierzy danych D (gdzie wiersze odpowiadają obserwacjom, a kolumny zmiennym) według wzoru:

$$D' = G^{-\frac{1}{2}} \cdot D \cdot H^{-\frac{1}{2}}. \tag{9}$$

gdzie G i H to diagonalne zawierające odpowiednio średnie wartości intensywności dla wierszy i kolumn macierzy D.

Tak przeprowadzona transformacja ogranicza zmienność wynikającą z różnic w całkowitej intensywności widm oraz nierównomierności rozkładu intensywności pomiędzy pikami. Redukując wpływ tła i artefaktów pomiarowych, zwiększa informacyjną przejrzystość zbioru danych, co istotnie poprawia co istotnie poprawia efektywność różnicowania próbek w analizie głównych składowych.

6.2.3. Ocena założenia wielowymiarowej normalności

Analiza danych spektrometrycznych, pochodzących z technik chromatograficznych czy spektrometrii mas, wymaga uprzedniej weryfikacji założeń dotyczących ich rozkładu. W szczególności, kluczowe znaczenie ma ocena zgodności z rozkładem normalnym wielowymiarowym, gdyż wiele metod statystycznych, takich jak analiza głównych składowych, regresja czy techniki grupowania, opiera się na tym założeniu.

W związku z powyższym przeprowadzono analizę normalności rozkładu wielowymiarowego pików masowych uzyskanych z różnych punktów pomiarowych. Do tego celu wykorzystano test Henzego-Zirklera (ang. *Henze-Zirkler's Multivariate Normality Test*), który uwzględnia współzależności pomiędzy zmiennymi, co czyni go szczególnie dobrym narzędziem w analizach spektrometrycznych, gdzie zmienne są silnie ze sobą powiązane.

Materiał analityczny obejmował 36 widm pochodzących z czterech skrawków tkanek mięśniowych. Analiza przeprowadzona została na podstawie intensywności 21 wybranych pików masowych, reprezentujących najbardziej wyraźne i informatywne sygnały w widmach, co zapewniało odpowiednią

reprezentatywność badanego zbioru danych. Wartości intensywności określano jako sumę liczby zliczeń w kanale odpowiadającym średniej arytmetycznej granic przedziału m/z przypisanego danemu pikowi. Takie podejście umożliwiło precyzyjne przypisanie wartości intensywności do wybranych pików, co następnie posłużyło do przeprowadzenia testu statystycznego.

Test Henzego-Zirklera przeprowadzono na macierzy intensywności 21 wybranych pików. Otrzymana wartość statystyki testowej HZ była bliska jedności, a p-value wynosiło 0,069. Ponieważ p-value przekracza przyjęty poziom istotności $\alpha = 0,05$, brak jest podstaw do odrzucenia hipotezy zerowej o zgodności z rozkładem normalnym. Oznacza to, że dane mogą być traktowane jako spełniające założenie normalności. Wynik ten stanowi istotne uzasadnienie dla zastosowania w dalszych etapach analizy metod wymagających normalności rozkładu, w szczególności PCA oraz modelowania regresyjnego.

6.2.4. Statystyka ANOVA

W analizie uzyskanych wyników zastosowano analizę wariancji ANOVA w celu weryfikacji istotności statystycznej różnic pomiędzy badanymi grupami tkanek mięśniowych. ANOVA umożliwia porównanie średnich wartości tej samej zmiennej w kilku niezależnych grupach oraz ocenę, czy zaobserwowane różnice mogą zostać uznane za statystycznie istotne, tj. niewynikające wyłącznie z losowej zmienności. Oprócz wartości p (p-value), istotnych z punktu widzenia testowania hipotezy zerowej, analizie poddano również wskaźnik η^2 (eta-kwadrat częściowe), określający jaką część całkowitej zmienności można przypisać czynnikowi grupowemu. Tym samym możliwe było nie tylko stwierdzenie istotności statystycznej, lecz także określenie siły efektu, czyli oszacowanie, w jakim stopniu dana zmienna (pik) przyczynia się do różnicowania analizowanych grup.

W tabeli 6.6 przedstawiono zestawienie uzyskanych wyników. W kolumnie „komentarz" zastosowano ujednoliconą skalę interpretacji efektu η^2, przyjmując pięciostopniową klasyfikację:

- $\eta^2 \geq 0,80$ - bardzo duży efekt, wskazujący na wyraźne różnice między grupami,
- $0,60 \leq \eta^2 < 0,80$ - duży efekt, świadczący o znaczącym zróżnicowaniu,
- $0,30 \leq \eta^2 < 0,60$ - średni efekt, sugerujący umiarkowane różnice,
- $0,14 \leq \eta^2 < 0,30$ - niewielki efekt, potencjalnie istotny biologicznie,
- $\eta^2 < 0,14$ - bardzo mały lub nieistotny efekt, wskazujący na znikomą zmienność pomiędzy grupami.

Zaproponowana skala pozwala zarówno na formalną klasyfikację intensywności efektów grupowych, jak i na identyfikację tych pików, które w największym stopniu przyczyniają się do separacji badanych grup.

Analiza ANOVA wykazała istotne statystycznie różnice pomiędzy grupami dla niemal wszytskich analizowanych pików molekularnych. Najwyższe wartości η^2 (powyżej 0,9) odnotowano dla sygnałów o m/z 23,00, 124,96, 165,93 oraz 246,56, co wskazuje na bardzo silny wpływ czynnika grupującego na zmienność tych sygnałów. Dominującą kategorię wśród uzyskanych wyników stanowiły różnice o dużym

i bardzo dużym efekcie ($\eta^2 > 0,60$), co potwierdza istotny potencjał analizowanych pików w zakresie dyskryminacji badanych typów tkanek. Jedynie pik m/z 140,72 osiągnął wartość graniczną istotności statystycznej ($p = 0,049$, $\eta^2 = 0,215$), co klasyfikuje go jako sygnał o niewielkim, ale nadal zauważalnym wpływie grupy na jego intensywność.

Tabela 6.6 Tabela prezentuje wartości statystyki F, poziomy istotności (p-value), współczynniki eta-kwadrat (η^2) obrazujące siłę efektu grupującego, a także interpretację wyników na podstawie przyjętej skali klasyfikacji efektu.

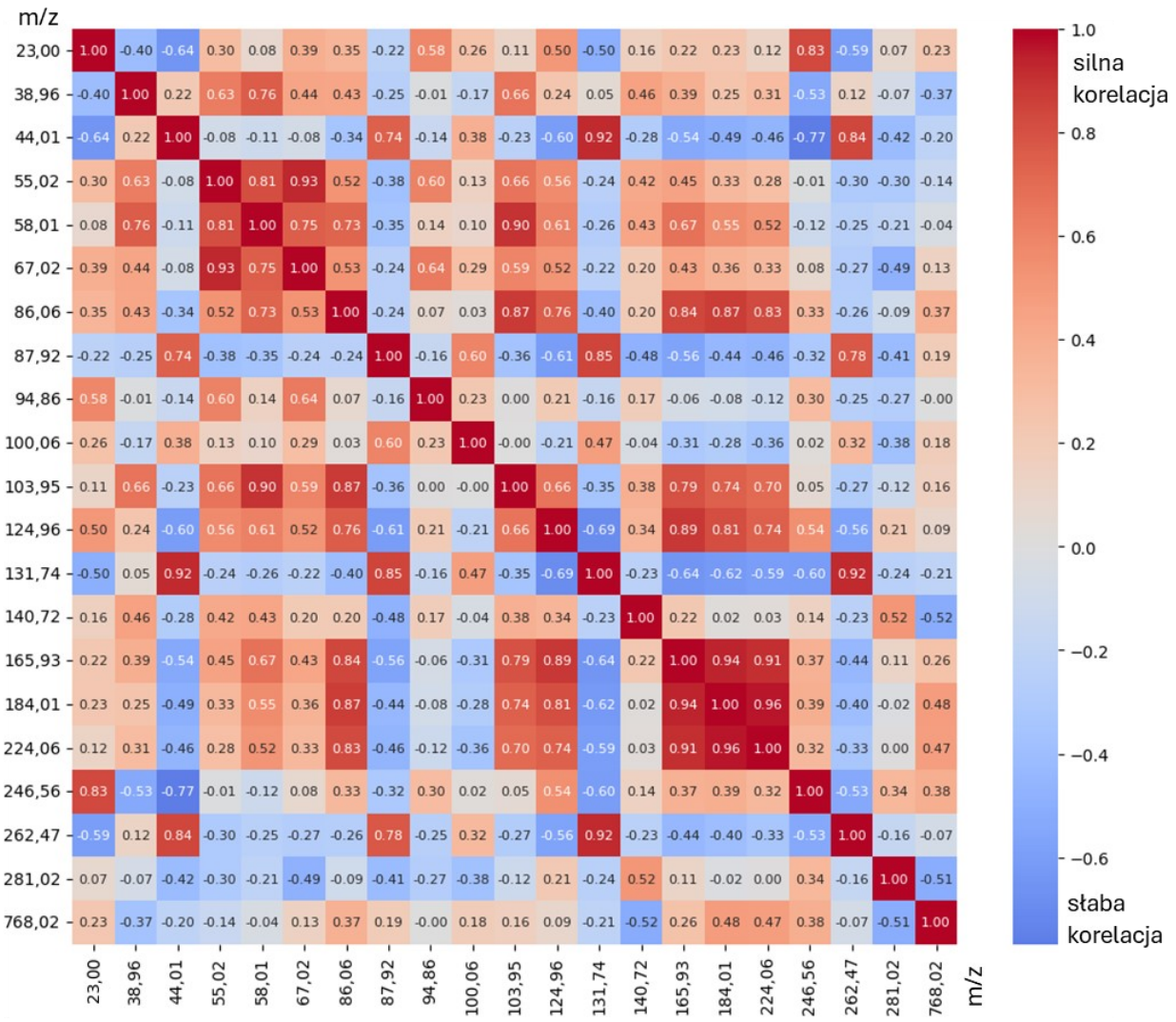
m/z	F	η^2	Istotność statystyczna	Komentarz
23,00	141,015	0,930	$p < 0,05$	bardzo duży efekt
38,96	15,788	0,597	$p < 0,05$	duży efekt
44,01	26,179	0,711	$p < 0,05$	bardzo duży efekt
55,02	6,549	0,380	$p < 0,05$	średni efekt
58,01	11,685	0,523	$p < 0,05$	duży efekt
67,02	15,312	0,589	$p < 0,05$	duży efekt
86,06	18,167	0,630	$p < 0,05$	bardzo duży efekt
87,92	10,881	0,505	$p < 0,05$	duży efekt
94,86	5,254	0,330	$p < 0,05$	średni efekt
100,06	7,479	0,412	$p < 0,05$	średni efekt
103,95	15,258	0,589	$p < 0,05$	duży efekt
124,96	103,944	0,907	$p < 0,05$	bardzo duży efekt
131,74	19,286	0,644	$p < 0,05$	bardzo duży efekt
140,72	2,915	0,215	$p < 0,05$	niewielki efekt
165,93	138,273	0,928	$p < 0,05$	bardzo duży efekt
184,01	63,097	0,855	$p < 0,05$	bardzo duży efekt
224,06	47,042	0,815	$p < 0,05$	bardzo duży efekt
246,56	98,202	0,902	$p < 0,05$	bardzo duży efekt
262,47	10,263	0,490	$p < 0,05$	duży efekt
281,02	80,748	0,883	$p < 0,05$	bardzo duży efekt
768,02	9,317	0,466	$p < 0,05$	duży efekt

6.2.5. Analiza macierzy korelacji Pearsona

W celu oceny współzależności pomiędzy sygnałami widmowymi przeprowadzono analizę korelacji Pearsona dla 21 wybranych pików m/z. Celem tego etapu było zidentyfikowanie potencjalnych grup pików powiązanych ze sobą, mogących odzwierciedlać wspólne mechanizmy chemiczne lub biologiczne.

Obliczona macierz korelacji (rysunek 6.5) ujawniła liczne silne zależności pomiędzy intensywnościami niektórych pików ($|r| > 0,7$), co wskazuje na możliwe powiązania związków. Na przykład pik m/z 58,01 wykazuje wysoką korelacje z pikami 38,96 ($r = 0,76$), 55,02 ($r = 0,81$), 67,02 ($r = 0,75$), 86,06 ($r = 0,73$) oraz 103,95 ($r = 0,90$). Zbliżone zależności zaobserwowano dla m/z 44,01, który jest silnie skorelowany z pikami 87,92 ($r = 0,74$) oraz 131,74 ($r = 0,92$), jak również dla silnie skorelowanego zestawu: 165,93, 184,01 i 224,06 ($r > 0,9$). Może to wskazywać na specyficzną grupę związków lub fragmentów molekularnych wykazujących podobny wzorzec intensywności lub ich powiązaniu w ramach podobnych procesów metabolicznych. Z kolei pik 246,56 wykazuje silne ujemne korelacje m.in. z 38,96 ($r = - 0,53$) i 44,01 ($r = - 0,77$), co może sugerować występowanie przeciwstawnych zmian intensywności tych sygnałów, a to z kolei może odzwierciedlać antagonistyczne procesy lub różne stany metaboliczne.

Zaobserwowane zależności korelacyjne wskazują na istnienie spójnych grup sygnałów potencjalnie powiązanych ze sobą chemicznie lub funkcjonalnie, co może odzwierciedlać współwystępowanie określonych związków lub wspólne szlaki metaboliczne. Stanowi to istotną przesłankę do pogłębionych badań nad charakterystyką tych pików oraz ich potencjalną rolą biologiczną w kontekście różnic obserwowanych w badanych tkankach mięśniowych.



Rysunek 6.5 Macierz korelacji między intensywnościami wybranych pików spektralnych (m/z). Macierz przedstawia współczynniki korelacji Pearsona, które ilustrują siłę i kierunek zależności między poszczególnymi pikami. Silne dodatnie i ujemne korelacje sugerują współzależności między pikami, które mogą odzwierciedlać powiązania chemiczne, wspólne szlaki metaboliczne lub przeciwstawne mechanizmy regulacyjne w badanych tkankach.

6.2.6. Analiza PCA oraz LDA

W analizie wyników spektrometrii mas SIMS przeprowadzono badania na czterech kategoriach tkanek mięśni szkieletowych, obejmujących: próbki z potwierdzoną dystrofią mięśniową D, próbki miopatii M, próbki charakteryzującej się cechami zaniku mięśniowego o prawdopodobnym podłożu neurogennym NM oraz próbki z grupy kontrolnej C. Do klasyfikacji danych zastosowano liniową analizę dyskryminacyjną LDA oraz uzupełniającą analizę głównych składowych PCA, co pozwoliło na rozróżnienie poszczególnych kategorii na podstawie wzorców widm jonów wtórnych.

W celu eksploracji struktury danych oraz redukcji ich wymiarowości zastosowano analizę głównych składowych PCA. Przed przeprowadzeniem analizy dokonano standaryzacji danych za pomocą narzędzia StandardScaler z biblioteki scikit-learn w języku Python. Metoda ta przekształca cechy tak, aby

każda zmienna charakteryzowała się średnią równą zero oraz odchyleniem standardowym równym jeden. Dzięki temu zapewniono porównywalność zmiennych o różnej skali oraz uniknięto dominacji tych o większym zakresie wartości, co istotnie poprawia efektywność analiz statystycznych oraz metod redukcji wymiarów.

Następnie wykonano analizę PCA z uwzględnieniem dwóch pierwszych komponentów, które wyjaśniły odpowiednio około 40,9% i 19,1% całkowitej wariancji danych. Wizualizacja wyników na dwuwymiarowym wykresie punktowym nie wykazała jednoznacznego rozdzielenia badanych grup, co sugeruje ograniczoną zdolność tych dwóch pierwszych komponentów do pełnego uchwycenia różnic biologicznych lub chemicznych pomiędzy grupami. W związku z powyższym rozszerzono analizę o trzecią składową główną, a wyniki przedstawiono na wykresie 3D, co umożliwiło lepszą wizualizację separacji pomiędzy grupami. Dodatkowo, w celu uzupełnienia i wzmocnienia interpretacji, zastosowano analizę dyskryminacyjną LDA, która również pozwoliła na trójwymiarową projekcję danych z podziałem na kategorie. Zarówno PCA, jak i LDA podkreśliły złożoność struktury danych oraz wskazały na potrzebę uwzględnienia większej liczby komponentów dla pełniejszego uchwycenia różnic między badanymi grupami.

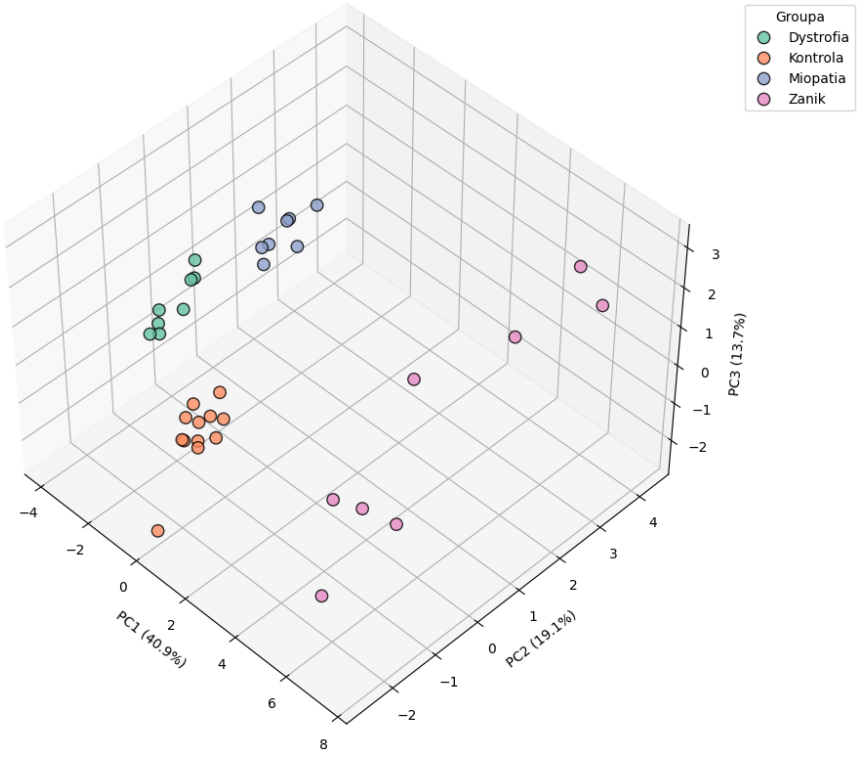
Wyniki analizy PCA wykazały, że pierwsze trzy komponenty wyjaśniają łącznie około 74% całkowitej wariancji, przy czym PC_1 odpowiada za 40,9%, PC_2 za 19,1%, a PC_3 za 13,7% (rysunek 6.6). Oznacza to, ze zdecydowana większość informacji zawartej w analizowanym zestawie 21 wartości m/z została skoncentrowana w tych trzech głównych kierunkach zmienności, co stanowi istotne rozszerzenie w porównaniu do analizy dwuwymiarowej.

Współczynniki składowych wskazują, w jakim stopniu poszczególne zmienne (m/z) wpływają na dany komponent. Wysokie wartości bezwzględne oznaczają istotny wkład zmiennej, natomiast znak współczynnika odzwierciedla kierunek tej zależności (pozytywny lub negatywny). Szczegóły dotyczące wpływu poszczególnych zmiennych zostały przedstawione w tabeli 6.7.

Zmienne charakteryzujące się silnymi ujemnymi współczynnikami (np. 124,96: -0,31; 165,93: -0,31; 184,01: -0,29; 86,06: -0,28) wskazują na odwrotną korelację intensywności tych sygnałów z wartością PC1. Natomist zmienne o dodatnich współczynnikach (np. 131,74: 0,27; 44,01: 0,23; 262,47: 0,22) wykazują korelację pozytywną z PC_1, co sugeruje, że ich wzrost przesuwa próbki w kierunku wyższych wartości na tej osi.

Dla pierwszego komponentu PC_1 największe znaczenie wykazały zmienne m/z: 165,93, 124,96, 184,01, 86,06 oraz 131,74. Cztery pierwsze spośród nich charakteryzują się wyraźnie ujemnymi współczynnikami ładunkowymi, co wskazuje, że ich intensywność maleje wraz ze wzrostem wartości PC_1. Natomiast zmienna o wartości 131,74 cechuje się dodatnim współczynnikiem, sugerując rosnącą intensywność w miarę zwiększania się PC_1.

Taki rozkład współczynników może odzwierciedlać pewien podstawowy gradient zmian metabolicznych lub chemicznych, w którym wzrost intensywności jednych składników jest skorelowany ze spadkiem innych.



Rysunek 6.6 Trójwymiarowa projekcja wyników analizy głównych składowych PCA, przedstawiająca rozkład próbek względem trzech komponentów (PC_1 = 40,91%, PC_2 = 19,11%, PC_3 = 13,66%) . Każdy punkt odpowiada jednemu badanemu obszarowi ROI, a kolory oznaczają przynależność do grup eksperymentalnych.

Drugim istotnym wymiarem analizy jest PC_2, w którym kluczową rolę odgrywają m/z 38,96, 44,01, 58,01, 67,02 i 262,47 - wszystkie cechujące się dodatnimi współczynnikami. Oznacza to, że wzrost intensywności tych sygnałów przesuwa próbki w kierunku wyższych wartości PC_2. Można przypuszczać, że PC_2 odzwierciedla niezależny od PC1 proces biologiczny czy chemiczny, który wyróżnia próbki z innej perspektywy.

W przypadku trzeciego komponentu PC_3 kluczowe znaczenie mają zmienne m/z 768,02, 100,06, 281,02, 23,00 oraz 94,86. W tym wymiarze obserwujemy bardziej zróżnicowane wzorce, niektóre zmienne wykazują wzrost intensywności wraz ze wzrostem PC_3, inne natomiast maleją, co sugeruje bardziej złożoną dynamikę procesów leżących u podstaw tych sygnałów.

Podsumowując, trójwymiarowa analiza pozwoliła na wyjaśnienie ponad 70% całkowitej wariancji danych, co świadczy o wysokiej efektywności metody w uchwyceniu najistotniejszych wzorców oraz różnic między próbkami. Ograniczenie analizy jedynie do dwóch wymiarów skutkowałoby istotną utratą informacji, ponieważ trzeci komponent tłumaczy znaczącą część zmienności danych. W konsekwencji redukcja wymiarowości do przestrzeni 2D obniżyłaby zdolność modelu do pełniejszego odwzorowania

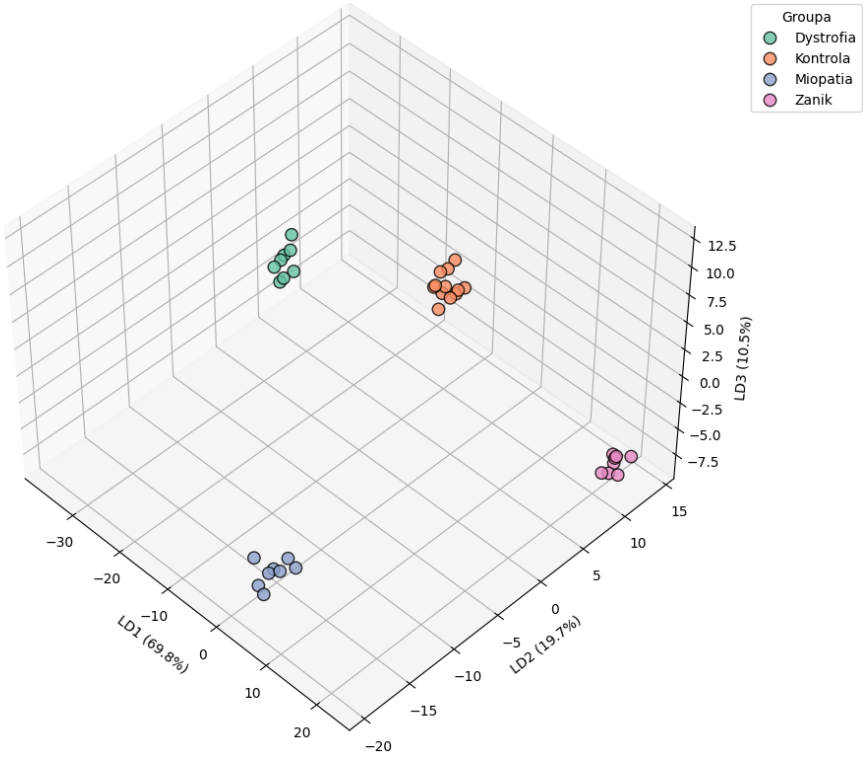
struktury danych, prowadząc do uproszczenia i potencjalnego pominięcia kluczowych wzorców różnicujących próbki. W związku z tym zastosowanie trójwymiarowej analizy nie jest jedynie narzędziem wizualizacji, ale stanowi również efektywną metodę identyfikacji i interpretacji biologicznych sygnałów ukrytych w danych spektralnych.

Tabela 6.7 Współczynniki ładunków zmiennych m/z na pierwsze trzy główne składowe (PC_1, PC_2, PC_3) uzyskane podczas analizy PCA

m/z	PC_1	PC_2	PC_3
23,00	-0,164	-0,211	0,348
38,96	-0,122	0,376	-0,288
44,01	0,234	0,337	0,011
55,02	-0,217	0,280	0,082
58,01	-0,245	0,314	-0,048
67,02	-0,206	0,263	0,243
86,06	-0,282	0,141	0.081
87,92	0,240	0,160	0,250
94,86	0,082	0,030	0,312
100,06	0,081	0,173	0,384
103,95	-0,271	0,241	-0,050
124,96	-0,314	-0,030	-0,007
131,74	0,269	0,258	0,040
140,72	-0,129	0,041	-0,258
165,93	-0,310	0,032	-0,078
184,01	-0,291	0,011	0,011
224,06	-0,276	0,019	-0,039
246,56	-0,167	-0,338	0,231
262,47	0,229	0,245	-0,014
281,02	-0,029	-0,268	-0,370
768,02	-0,072	-0,062	0,380

W analizie dyskryminacyjnej LDA, przeprowadzonej na zestawie danych obejmujących wartości m/z wyodrębniono trzy główne osie dyskryminacji (LD_1, LD_2, LD_3), które łącznie tłumaczą niemal 100%

wariancji międzygrupowej - odpowiednio: LD_1 odpowiada za 69,80%, LD_2 za 19,69%, a LD_3 za 10,51% (rysunek 6.7). Tak wysoki skumulowany udział wariancji świadczy, że zastosowanie rzutowania danych na przestrzeń trójwymiarową pozwala niemal w pełni uchwycić strukturę międzygrupową oraz skutecznie rozróżnić klasy. Ograniczenie analizy do dwóch wymiarów skutkowałoby utratą ponad 10% informacji dotyczącej struktury międzygrupowej, co w kontekście interpretacji statystycznej i biologicznej może mieć istotne konsekwencje dla jakości i trafności wniosków.



Rysunek 6.7 Wizualizacja przestrzeni dyskryminacyjnej uzyskanej w wyniku analizy LDA. Wykres prezentuje rozmieszczenie próbek względem trzech pierwszych funkcji dyskryminacyjnych: LD_1 (69,80% wyjaśnianej wariancji międzygrupowej), LD_2 (19,69%) oraz LD_3 (10,51%).

Pierwsza oś dyskryminacyjna LD_1 odpowiada za największą część zróżnicowania danych, wyjaśniając 69,80% wariancji międzygrupowej. Spośród o najsilniejszym wpływie na LD_1 wyróżniają się wartości: 23,00 (+264,1), 86,06 (+254,5), 768,02 (+197,0), 67,02 (+182,6) oraz 44,01 (+110,8). Dodatni znak współczynnika wskazuje, że wzrost intensywności tych sygnałów przesuwa próbki w kierunku wyższych wartości LD_1, co może stanowić cechę charakterystyczną dla określonej klasy próbek. Z kolei zmienne cechujące się silnie ujemnymi współczynnikami względem LD_1 to: 184,01 (-273,6), 262,47 (-209,4), 38,96 (-197,0), 55,02 (-135,2) oraz 224,06 (-114,8). Wysoka intensywność tych sygnałów wiąże się z przesunięciem próbek w przeciwnym kierunku osi LD_1, co sugeruje ich przynależność do odrębnej, kontrastującej grupy. Takie rozdzielenie wartości LD_1 moze wskazywać na podział na dwa zestawy markerów chemicznych lub biologicznych, które mogą odzwierciedlać różnice metaboliczne, toksykologiczne bądź środowiskowe. Druga oś dyskryminacyjna LD_2, wyjaśniająca 19,69% wariancji międzygrupowej, charakteryzuje się przede wszystkim dodatnim wpływem zmiennych m/z: 131,74 (+81,1),

224,06 (+48,9), 184,01 (+47,8), 262,47 (+31,4) oraz 103,95 (+16,3). Ich wzrost intensywności przesuwa próbki w kierunku wyższych wartości LD_2. Zmienne o współczynnikach ujemnych to m.in.: 44,01 (-123,5), 768,02 (-93,2), 23,00 (-95,5), 67,02 (-56,0) oraz 55,02 (-67,1). LD_2 prawdopodobnie opisuje inny, niezależny od LD_1 wymiar zmienności, uwzględniający bardziej subtelne różnice biologiczne lub fizykochemiczne, które nie zostały uchwycone przez pierwszą oś dyskryminacyjną.

Trzeci komponent LD_3, odpowiadający za 10,51% wariancji międzygrupowej, również wnosi istotne informacje. Zmienne o największym dodatnim wpływie to m/z: 262,47 (+149,5), 184,01 (+121,6), 224,06 (+90,5), 55,02 (+101,1) i 103,95 (+47,6). Z kolei najsilniejsze ujemne współczynniki odnotowano dla m/z: 86,06 (-233,2), 67,02 (-203,2), 124,96 (-120,7), 246,56 (-70,4) oraz 165,93 (-63,0). LD_3 może odpowiadać za różnicowanie mniej oczywistych podziałów wewnątrz grup lub wskazywać na wtórne markery biologiczne.

Zestawienie wartości współczynników dla poszczególnych osi dyskryminacyjnych znajduje się w tabeli 6.8, natomiast wizualizacja wyników znajduje się na rysunku 6.6. Zastosowanie trójwymiarowej projekcji LDA umożliwiło uchwycenie złożonych relacji między zmiennymi m/z a badanymi grupami próbek. Dzięki wysokiemu udziałowi wariancji przez pierwsze trzy dyskryminanty, przestrzeń ta pozwala na pełniejszą interpretację danych oraz identyfikację potencjalnych biomarkerów różnicujących klasy. Ograniczenie analizy do dwóch wymiarów skutkowałoby utratą istotnych informacji, co podkreśla wartość modelu 3D w kontekście eksploracji i interpretacji danych biologicznych, chemicznych czy środowiskowych.

W niniejszej analizie zastosowano zarówno analizę głównych składowych PCA, jak i liniową analizę dyskryminacyjną LDA w celu redukcji wymiarowości danych oraz identyfikacji kluczowych zmiennych m/z, różnicujących badane grupy. Obie metody przekształcają oryginalną przestrzeń zmiennych do nowej, zredukowanej przestrzeni, lepiej oddającej istotne wzorce ukryte w danych. Pomimo wspólnego celu, metody te różnią się podejściem: PCA maksymalizuje całkowitą wariancję bez uwzględnienia informacji o przynależności klasowej, natomiast LDA optymalizuje separację między grupami. Różnice te znalazły odzwierciedlenie w charakterze i interpretacji uzyskanych komponentów.

Tabela 6.8 Współczynniki ładunków zmiennych m/z na pierwsze trzy główne składowe (LDA, LD2, LD3) uzyskane w analizie LDA.

m/z	LD_1	LD_2	LD_3
23,00	264,088	-95,480	-13,015
38,96	-196,951	-10,756	126,470
44,01	110,842	-123,496	-0,375
55,02	-135,164	67,129	101,131
58,01	-15,678	-17,021	69,989

m/z	LD_1	LD_2	LD_3
67,02	182,648	-55,962	-203,207
86,06	254,525	-15,575	-233,211
87,92	-37,968	20,483	46,940
94,86	41,571	-4,508	-23,580
100,06	36,944	-11,677	-31,325
103,95	-31,766	16,336	47,555
124,96	71,812	2,988	-120,737
131,74	1,070	81,065	-37,916
140,72	2,944	-4,074	-10,047
165,93	38,534	-17,293	-62,952
184,01	-273,579	47,844	121,573
224,06	-114,788	48,900	90,527
246,56	79,098	0,816	-70,398
262,47	-209,423	31,357	149,491
281,02	54,758	9,291	-16,992
768,02	197,015	-93,175	-94,040

6.3. Technika MALDI

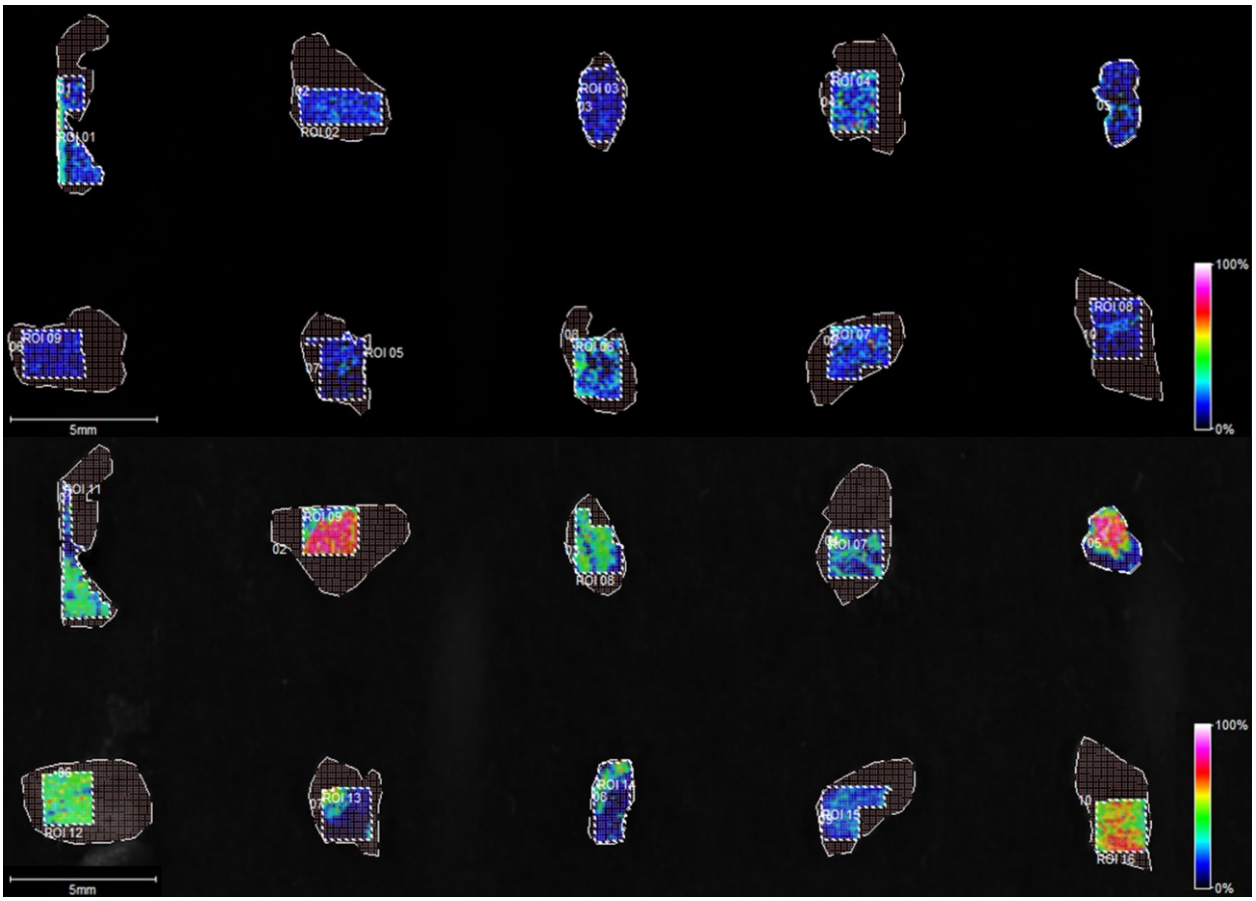
6.3.1. Analiza MALDI w trybie dodatnim i ujemnym

Podczas właściwych pomiarów zastosowano metodologię opracowaną na podstawie wyników przedstawionych w rozdziale 5.4.2. Zgodnie z opisanym protokołem, tkanki pobrane podczas biopsji były przechowywane w ciekłym azocie. Przed przystąpieniem do pomiarów próbki przenoszono najpierw do lodówki, a następnie do temperatury pokojowej, gdzie umieszczano je w eksykatorze na 45 minut.

Do przygotowania matryc zastosowano dwa roztwory: pierwszy stanowił 25 mg/ml DHB rozpuszczonego w 50% MeOH z dodatkiem 0,2% TFA, natomiast drugi to 2,5 mg/ml DAN w 50% ACN. Natężenie rozpylania matrycy było regulowane, rozpoczynając od 10 µL/min, a kończąc na 60 µL/min. Dysza nanosząca matrycę pracowała z odstępem liniowym 2 mm oraz prędkością 600 mm/min. Dla matrycy DHB nałożono 12 warstw przy ustawieniu parametru z = 5, natomiast dla DAN zastosowano 16 warstw przy z = 1. Pomiary przeprowadzono dla każdego skrawka z użyciem rastra o wymiarach 50 × 50 punktów. W celu porównania widm dla każdej próbki zastosowano po 302 strzały lasera, co odpowiadało liczbie

impulsów niezbędnych do pełnego pokrycia najmniejszego obszaru skrawka tkanki. Taki dobór parametrów zapewnił spójność i powtarzalność wyników.

W celu zobrazowania obszarów pomiarowych, na rysunku 6.8 przedstawiono zestawienie skrawków tkanki mięśniowej przygotowanej do analizy w trybach pozytywnym oraz negatywnym MALDI. Fragmenty oznaczone kolorami odpowiadają obszarom o tej samej powierzchni, które zostały wybrane do dalszej analizy.



Rysunek 6.8 Zestawienie skrawków mięśniowych wykorzystanych w pomiarach: (u góry) widok skrawków w trybie pozytywnym z użyciem matrycy DHB, (na dole) widok skrawków w trybie negatywnym z użyciem matrycy DAN. Kolorowe obszary oznaczają fragmenty o tej samej powierzchni, poddane analizie metodą MALDI.

W tabeli 6.9 przedstawiono zestawienie wszystkich próbek uwzględnionych we właściwej analizie wykorzystującej metodę MALDI. Ujęto w niej dane dotyczące numeru próbki (zgodnie z oznaczeniami w systemie FlexImaging), przypisanej grupy badawczej i postawionego rozpoznania histopatologicznego. Próbka numer 05, mimo że początkowo została zaliczona do grupy miopatii, została ostatecznie wykluczona z analizy końcowej ze względu na podejrzenie choroby Pompego, która charakteryzuje się odmiennym i ściśle określonym mechanizmem patogenetycznym. Ze względów poznawczych uwzględniono ją jednak w etapie wstępnych porównań, w celu oceny, czy jej profil molekularny wykazuje cechy zbliżone do miopatii i dystrofii, czy też tworzy wyraźnie odrębną kategorię, co mogło dostarczyć dodatkowego

kontekstu interpretacyjnego dla wyników analizy. Wszystkie próbki pochodziły od mężczyzn z szerokiego zakresu wiekowego, od 27 do 65 lat.

Tabela 6.9 Zestawienie próbek wykorzystanych w analizie wraz z podstawowymi informacjami klinicznymi i histopatologicznymi. Kolumny tabeli zawierają kolejno: numer ROI z systemu FlexImaging (zarówno dla trybu pozytywnego jak i negatywnego), numer próbki, przypisaną grupę analityczną oraz rozpoznanie histopatologiczne.

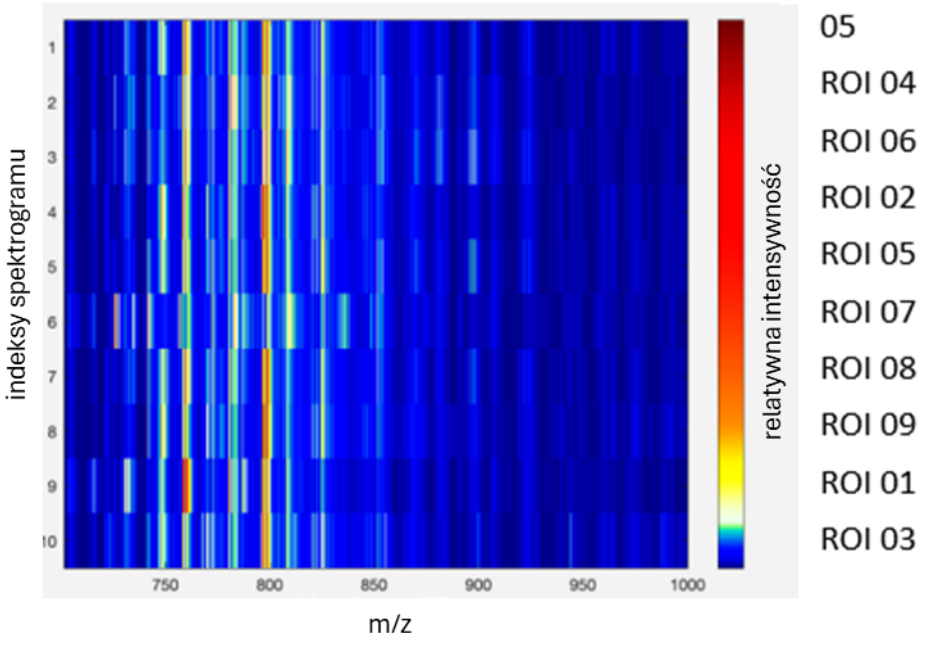
Numer ROI (matyca DHB)	Numer ROI (matryca DAN)	Numer próbki	Rozpoznanie	Grupa
ROI01	ROI11	01	Brak jednoznacznych zmian patologicznych	Kontrola
ROI02	ROI09	02	Miopatia	Miopatia
ROI03	ROI08	03	Obraz niejasny, niecharakterystyczny	Kontrola
ROI04	ROI07	04	Dystrofia	Dystrofia
05	05	05	Podejrzenie choroby Pompego	Miopatia
ROI09	ROI12	06	Miopatia	Miopatia
ROI05	ROI13	07	Cechy miopatii o niewielkim nasieniu i niecharakterystycznym obrazie	Miopatia
ROI06	ROI14	08	Dystrofia	Dystrofia
ROI07	ROI15	09	Miopatia	Miopatia
ROI08	ROI16	10	Miopatia	Miopatia

6.3.2. Analiza PLS

Zestawienie próbek znajdujące się w tabeli 6.7 stanowiło punkt wyjścia dla kolejnych etapów analizy statystycznej. Próbki przypisano początkowo do trzech grup badawczych w oparciu o wyniki diagnostyki klinicznej i histopatologicznej, co umożliwiło zastosowanie metody najmniejszych kwadratów cząstkowych (ang. *Partial Least Squares,* PLS) w celu wykrycia lipidów istotnie różnicujących grupy. Analiza została przeprowadzona z uwzględnieniem krytycznej oceny jakości danych. W celu zapewnienia

wysokiej jakości i wiarygodności wyników analizy wielowymiarowej. Próbki wykazujące największe odchylenie od trendu obserwowanego w obrębie poszczególnych grup zostały wykluczone z dalszych etapów opracowania danych. Decyzja o ich eliminacji miała na celu ograniczenie ryzyka wystąpienia błędów interpretacyjnych oraz zminimalizowanie wpływu wartości odstających, które mogłyby w istotny sposób zakłócić strukturę danych wejściowych. Jest to szczególnie istotne w przypadku zastosowania modelowania PLS, gdzie obecność próbek skrajnie odstających może prowadzić do powstania modelu obciążonego, o obniżonej zdolności predykcyjnej i mniejszej wartości diagnostycznej.

Na podstawie analizy uzyskanych widm masowych dokonano wstępnej selekcji próbek w celu poprawy jakości modelu statystycznego. Dla trybu dodatniego zidentyfikowano dwie próbki: ROI01 ROI07, które wykazywały istotne odchylenie od charakterystyki widm pozostałych próbek. Graficzne przedstawienie opisanego zróżnicowanie w widmach zostało zaprezentowane na rysunku 6.9. Próbki te zostały wykluczone z dalszej analizy, co pozwoliło ograniczyć wpływ wartości odstających mogących zafałszować wyniki modelowania. Dodatkowo, na podstawie profilu widma oraz wysokiego podobieństwa do pozostałych widm grupy miopatii, próbka ROI03 (pierwotnie zaklasyfikowana do grupy kontrolnej) została przypisana do tej właśnie grupy, co umożliwiło pełniejsze odwzorowanie wewnętrznej zmienności. W przypadku grupy zawierającej próbki o znamionach dystrofii eliminacja próbki 05, która istotnie odbiegała od charakterystyki pozostałych próbek w grupie, umożliwiła uzyskanie modelu o satysfakcjonujących parametrach statystycznych.

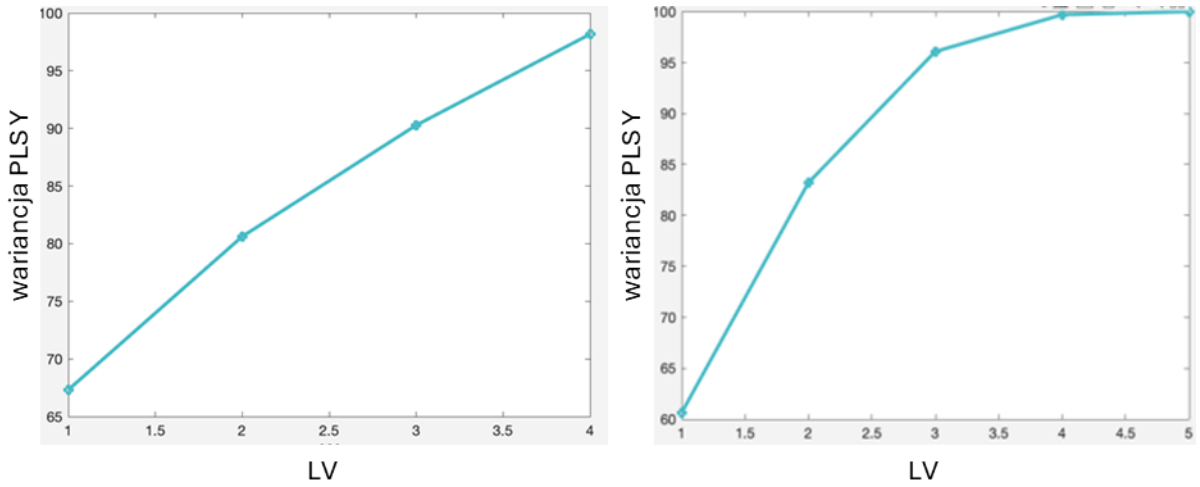


Rysunek 6.9 Graficzne zestawienie charakterystyki otrzymanych widm MALDI dla trybu dodatniego umożliwiające wizualne określenie próbek charakteryzujących się największym odchyleniem od ogólnego trendu widmowego.

Początkowo podjęto próbę modelowania przy użyciu trzech odrębnych grup odpowiadających różnym stanom biologicznym. Jednakże z perspektywy statystycznej okazało się, że jedna z grup cechowała się znaczną rozbieżnością wewnątrz swojej struktury, co przekładało się na trudności w budowie stabilnego

i wiarygodnego modelu. Obecność próbek o wyraźnie odstających profilach widmowych powodowała wzrost wariancji wewnątrzgrupowej, osłabiając tym samym zdolność modelu do efektywnego rozróżniania pomiędzy wszystkimi trzema stanami. W związku z tym zdecydowano się na ograniczenie analizy do dwóch grup, co pozwoliło zmniejszyć wpływ wartości odstających oraz poprawić parametry statystyczne modelu. Takie rozwiązanie zapewniło lepszą dyskryminację i bardziej wiarygodne wyniki, stanowiące solidną podstawę do dalszych analiz. Ostatecznie do grupy miopatii zostały zaklasyfikowane następujące próbki: ROI02, ROI03, ROI05, ROI08, ROI09. Natomiast do grupy dystrofii niezmiennie zaliczono ROI04 oraz ROI06. Ostatecznie, dla opisanych dwóch grup skonstruowano model PLS, który wyjaśniał 98% wariancji w próbce, przy błędzie predykcji wynoszącym 0,359 i optymalnej liczbie zmiennych latentnych (ang. *latent variables,* LV) równej 4, w zakresie m/z 700 - 1000 charakterystycznym dla sygnatur lipidowych w trybie dodatnim. Opisana zależność została zaprezentowana na rysunku 6.10. Model został zweryfikowany za pomocą ośmiokrotnej walidacji krzyżowej, polegającej na podziale danych na osiem podzbiorów. W każdej iteracji trenowano model na siedmiu z nich, a testowano na pozostałym, co umożliwiło ocenę stabilności i zdolności do generalizacji. Uzyskana dokładność klasyfikacji na poziomie około 94% świadczy o wysokiej skuteczności modelu w rozróżnianiu badanych próbek oraz o efektywnym wykorzystaniu informacji zawartej w wybranym zakresie spektralnym.

Analiza PLS umożliwiła wskazanie charakterystycznych pików masowych, które najpełniej odzwierciedlały różnice w profilu lipidowym próbek. Warto podkreślić, że do tego etapu identyfikacja związków chemicznych opierała się wyłącznie na wartościach m/z, co pozwalało jedynie na wskazanie potencjalnych kandydatów do dalszej analizy. Wykonanie analizy PLS miało na celu wskazanie sygnałów o największym znaczeniu w kontekście rozróżnienia badanych grup biologicznych.



Rysunek 6.10. Zależność liczby zmiennych latentnych od wyjaśnionej wariancji modelu PLS. Po lewej znajduje się charakterystyka modelu wykorzystanego dla trybu dodatniego w zakresie m/z od 700 do 1000, natomiast po prawej znajduje się charakterystyka dla trybu negatywnego w zakresie m/z od 700 do 1800.

Do najbardziej istotnych pików należały sygnały o wartościach m/z: 798,54; 799,54; 782,50; 780,60; 824,70; 796,20; 758,80; 808,60 oraz 825,60, przy czym pik o wartości m/z 798,6 wykazał najwyższą

istotność. Oznacza to, że jest to najważniejszy sygnał różnicujący grupy badanych próbek i może stanowić potencjalny biomarker. Wskazane wartości posłużyły jako podstawa do przeprowadzenia fragmentacji tandemowej (MS/MS), mającej na celu potwierdzenie struktury molekularnej wytypowanych związków oraz ich znaczenia w różnicowaniu analizowanych próbek. W tabeli 6.10 zamieszczono zestawienie sygnałów zarejestrowanych w trybie jonizacji dodatniej, wraz z listą możliwych przypisań związków lipidowych z zachowaniem niepewności masy wynoszącej ± 0,5 m/z, przypisaną formułą chemiczną, oraz powiązanym jonem. Do wykorzystania tego zestawienia posłużono się bazą danych LIPID MAPS® (LMSD). Jest to relacyjna baza danych zawierająca struktury i adnotacje biologicznie istotnych lipidów. Na dzień dzisiejszy baza LMSD zawiera 49792 unikalnych struktur lipidowych, co czyni ją największą publiczną bazą danych zawierającą wyłącznie lipidy na świecie.

Tabela 6.10 Zestawienie potencjalnych związków lipidowych odpowiadających poszczególnym m/z. Uwzględniono tolerancję pomiarową ± 0,5 Da (co odpowiada ±0,5 m/z przy ładunku 1^+). Przypisanie potencjalnych struktur lipidowych wykonano na podstawie bazy LMSD (LIPID MAPS® Structure Database).

m/z [±0,5 Da]	Jonizacja	Możliwe związki lipidowe
798,61	$[M+H]^+$	PC 37:3, PE 40:3, PC O-38:3, HexCer 40:2;O3, PC 36:4;O, PS O-38:4, HexCer 41:1;O2, PS 37:4
	$[M+Na]^+$	HexCer 37:0;O4, PC 35:0, PE 38:0, PC O-36:0, PE O-39:0, PS O-36:1, PE O-40:7, PS 35:1, PC 36:7, PE 39:7, PS 36:8
	$[M+K]^+$	PC O-35:1, PE O-38:1, HexCer 36:1;O4, PC 34:1, PE 37:1, PS O-35:2, PS 34:2, PE 38:8
799,61	$[M+H]^+$	PA 43:2; PG 38:4; PI 28:2;O3;
	$[M+Na]^+$	PG O-37:1; PG 36:1; PA 42:6; PI 30:3
	$[M+K]^+$	PA O-41:0; CerP 40:1;O3; PA 40:0; PG O-36:2; PA O-42:7; PG 35:2; PA 41:7
782,53	$[M+H]^+$	PE 38:5;O; PS 36:5; PC 36:4; PE 39:4; PC O-37:4; PE O-40:4; HexCer 40:2;O2
	$[M+Na]^+$	PS O-35:2; PS 34:2; PC 34:1; PE 37:1; HexCer 36:1;O4; PE 38:8; PC O-35:1; PE O-38:1
	$[M+K]^+$	PC O-34:2; PE O-37:2; PC 33:2; PE 36:2; HexCer 36:1;O3; PS O-34:3; PS 33:3
780,67	$[M+H]^+$	PE O-40:5; PC 36:5; PE 39:5; PE 38:6;O; PS 36:6
	$[M+Na]^+$	HexCer 38:0;O2; CerP 44:1;O2; HexCer 37:1;O3; PC O-35:2; PE O-38:2; PC 34:2; PE 37:2; PS O-35:3; PS 34:3; PE 38:9
	$[M+K]^+$	HexCer 37:1;O2; HexCer 36:2;O3; PC O-34:3; PE O-37:3; PC 33:3; PE 36:3; PS O-34:4; PS 33:4
824,68	$[M+H]^+$	PC O-40:4; PC 39:4; PE 42:4; PS O-40:5; PS 39:5
	$[M+Na]^+$	PC O-38:1; PE O-41:1; PC 37:1; PE 40:1; PS O-38:2; PS 37:2; PC 38:8; PS 38:9

m/z [±0,5 Da]	Jonizacja	Możliwe związki lipidowe
	$[M+K]^+$	HexCer 40:0;O2; HexCer 39:1;O3; PC O-37:2; PE O-40:2; PC 36:2; PE 39:2; PS O-37:3; PS 36:3; PE 40:9
796,64	$[M+H]^+$	PC O-38:4; HexCer 41:2;O2; PC 37:4; PE 40:4; PS O-38:5; PS 37:5
	$[M+Na]^+$	HexCer 38:0;O3; PC O-36:1; PE O-39:1; PC 35:1; PE 38:1; PS O-36:2; PE O-40:8; PS 35:2; PC 36:8; PE 39:8
	$[M+K]^+$	HexCer 38:0;O2; CerP 44:1;O2; HexCer 37:1;O3; PC O-35:2; PE O-38:2; PC 34:2; PE 37:2; PS O-35:3; PS 34:3; PE 38:9
758,60	$[M+H]^+$	PC O-35:2; PE O-38:2; HexCer 37:1;O3; PC 34:2; PE 37:2; CerP 44:1;O2; HexCer 38:0;O2; PS O-35:3; PS 34:3; PE 38:9
	$[M+Na]^+$	PS O-33:0; PS 32:0; PE 36:6
	$[M+K]^+$	PC O-32:0; PE O-35:0; PC 31:0; PE 34:0; PS O-32:1; PS 31:1; PC 28:3;O3
808,52	$[M+H]^+$	PS 38:6; PE 40:6;O; PC 38:5; PE 41:5; PE O-42:5
	$[M+Na]^+$	PS 36:3; PS O-37:3; PE 40:9; PC 36:2; PE 39:2; PC O-37:2; PE O-40:2; HexCer 39:1;O3; HexCer 40:0;O2
	$[M+K]^+$	PC 35:3; PE 38:3; PS O-36:4; PC O-36:3; HexCer 38:2;O3; PS 35:4; HexCer 39:1;O2
825,52	$[M+H]^+$	PI 33:0; PG 40:5; PI O-34:0; PI 30:3;O3
	$[M+Na]^+$	PA 44:7; PG 38:2; PI 32:4; PG O-39:2; PA 43:0
	$[M+K]^+$	PG 37:3; PG O-38:3; PA 42:1

Przedstawione dane zawierają listę przykładowych związków lipidowych potencjalnie odpowiadających wykrytym sygnałom m/z w analizowanych skrawkach tkanek mięśniowych. Etap ten stanowił punkt wyjścia do dalszej interpretacji profilu lipidowego, w tym identyfikacji związków na podstawie uzyskanych widm fragmentacyjnych. Dodatkowo, w celu ułatwienia interpretacji wyników, zastosowane oznaczenia w nazwach użytych w tabeli 6.10 i 6.11 (np. PC, PE, PS) wraz z ich pełnymi nazwami oraz ich charakterystyką zostały przedstawione w tabeli 6.12.

W przypadku trybu negatywnego postąpiono analogicznie. W przeprowadzonej analizie wykorzystano jednak szerszy zakres mas jonów od 700 do 1800 m/z. Po wstępnym podziale danych obejmującym wykluczenie prób ROI05 oraz ROI15 opracowano model PLS z trzema zmiennymi latentnymi (LV = 3), który wyjaśniał 96% całkowitej wariancji w danych (rysunek 6.10). Błąd klasyfikacji modelu, oceniony na podstawie procedury walidacji krzyżowej wynosił 0,49, co świadczy o umiarkowanej zdolności rozróżniania klas. Opisana analiza w szerokim zakresie masowym pozwoliła na identyfikację sześciu pików potencjalnie różnicujących m/z 700,45, 723,43, 744,49, 750,50, 766,53, oraz 885,50.

Tabela 6.11 Zestawienie potencjalnych związków lipidowych odpowiadających poszczególnym m/z. Uwzględniono tolerancję pomiarową ± 0,5 Da (co odpowiada ±0,5 m/z przy ładunku 1^+). Przypisanie potencjalnych struktur lipidowych wykonano na podstawie bazy LMSD (LIPID MAPS® Structure Database).

m/z [+/- 0,5 Da]	Jonizacja	Możliwe związki lipidowe
700,45	$[M-H]^-$	PS 30:3; PE 33:2
	$[M+Cl]^-$	PS O-28:0
723,43	$[M-H]^-$	PI 26:1
	$[M+Cl]^-$	PG 30:3; PA 35:1
744,49	$[M-H]^-$	PS 33:2; PS O-34:2
750,50	$[M-H]^-$	PE 37:5; PE O-38:5;
	$[M+Cl]^-$	PC 31:2; PE 34:2; PC O-32:2; PE O-35:2
766,53	$[M-H]^-$	PE 38:4; PE O-38:5;O; PS O-36:5
	$[M+Cl]^-$	HexCer 34:1;O4; PC 32:1; PE 35:1; PC O-33:1; PE O-36:1
885,50	$[M-H]^-$	PI 38:4
	$[M+Cl]^-$	PI 35:1; PG 42:6

Uzyskane wyniki wskazują na obecność lipidowych jonów, które potencjalnie różnicują analizowane klasy tkanek. Jednak analiza obrazów jonowych w trybie ujemnym MALDI nie wykazała istotnego zróżnicowania ich przestrzennego rozmieszczenia na skrawkach mięśni. W związku z tym, aby uniknąć fragmentacji o niskiej przydatności analitycznej i analiz MS/MS o niskim potencjale informacyjnym, zdecydowano się nie kontynuować dalszej analizy w trybie ujemnym.

Tabela 6.12 Zestawienie oznaczeń klas lipidów zastosowanych w analizie wraz z ich pełnymi nazwami oraz opisem głównych funkcji biologicznych.

Klasa	Pełna nazwa	Charakterystyka
PC	fosfatydylocholina	dominujący fosfolipid błon komórkowych, główny składnik błon mięśniowych, może mieć wpływ na wzrost mięśni szkieletowych, skurcz, wydajność wysiłkową i metabolizm glukozy [120–122]
PE	fosfatydyloamina	składnik błon mitochondrialnych, może mieć wpływ na wzrost mięśni szkieletowych, skurczu, wydajności wysiłkowej i metabolizmie glukozy [120]
PS	fosfatydyloseryna	determinuje wychwyt komórek apoptotycznych, pełni funkcje sygnalizacyjne [123]
PA	kwas fosfatydowy	jest prekursorem lipidów błonowych, pełni rolę sygnałową (pośredniczy w aktywności sygnalizacji białkowej) [124, 125]

Klasa	Pełna nazwa	Charakterystyka
PG	fosfatydyloglicerol	jest prekursorem kardiolipiny (składnika błon mitochondrialnych) [126]
PI	fosfatydyloinozytol	jest składnikiem błony komórkowej i prekursorem fosfoinozytydów, które są kluczowe w sygnalizacji komórkowej, transporcie błon i regulacji białek [126]
CL	kardiolipina	występuje wyłącznie w błonach mitochondrialnych mitochondria, pełnią kluczową rolę w zachowaniu ich funkcji oddechowej [126]
SM	sfingomielina	znajduję się w zewnętrznej warstwie błony komórkowej, bierze udział w międzybłonowym szklaku sygnałowym [127]
HexCer	glukozyloceramid	występuje w błonach biologicznych, szczególnie w ośrodkowym układzie nerwowym, kluczowy w przekazywaniu sygnałów i regulacji procesów komórkowych [128]
CerP/C1P	ceramid-1-fosforan	wtórny przekaźnik sygnałowy, który wspiera proliferację, hamuje apoptozę i reguluje odpowiedź zapalną [129–131]

6.3.3. Fragmentacja MS/MS w trybie dodatnim

Metoda spektrometrii tandemowej (MS/MS) umożliwia fragmentację jonów macierzystych, co pozwala na uzyskanie widm fragmentacyjnych zawierających informacje o strukturze chemicznej analizowanych substancji, takich jak np. lipidy. Interpretacja otrzymanych widm opierała się na porównaniu z danymi dostępnymi w specjalistycznych bazach lipidomicznych, takich jak LMSD (LIPID MAPS® Structure Database) [132], co umożliwiło przypisanie poszczególnych sygnałów do konkretnych klas lipidów oraz ich przewidywanych struktur cząsteczkowych. Takie podejście pozwoliło potwierdzić, że sygnały masowe wytypowane przez model PLS rzeczywiście odpowiadają związkom lipidowym. Zidentyfikowane lipidy mogą odgrywać kluczową rolę biologiczną jako potencjalne biomarkery różnicujące poszczególne stany patologiczne analizowanych próbek. Ich obecność oraz zmienność ilościowa i jakościowa mogą dostarczać cennych informacji na temat molekularnych mechanizmów leżących u podstaw rozwoju badanych schorzeń, co podkreśla ich znaczenie w kontekście diagnostyki oraz potencjalnych zastosowań terapeutycznych.

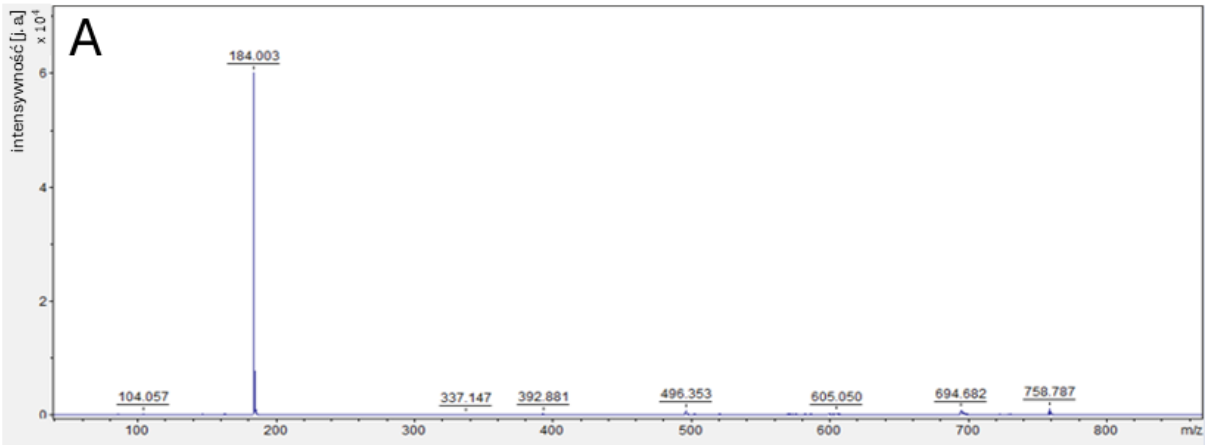
W celu potwierdzenia przypisania jonów m/z uzyskanych podczas analizy MALDI w trybie dodatnim do konkretnych lipidów, przeprowadzono również analizę fragmentacyjną (MS/MS) w tym samym trybie, co umożliwiło dokładną identyfikację związków oraz weryfikację obserwowanych różnic w składzie lipidowym między próbkami.

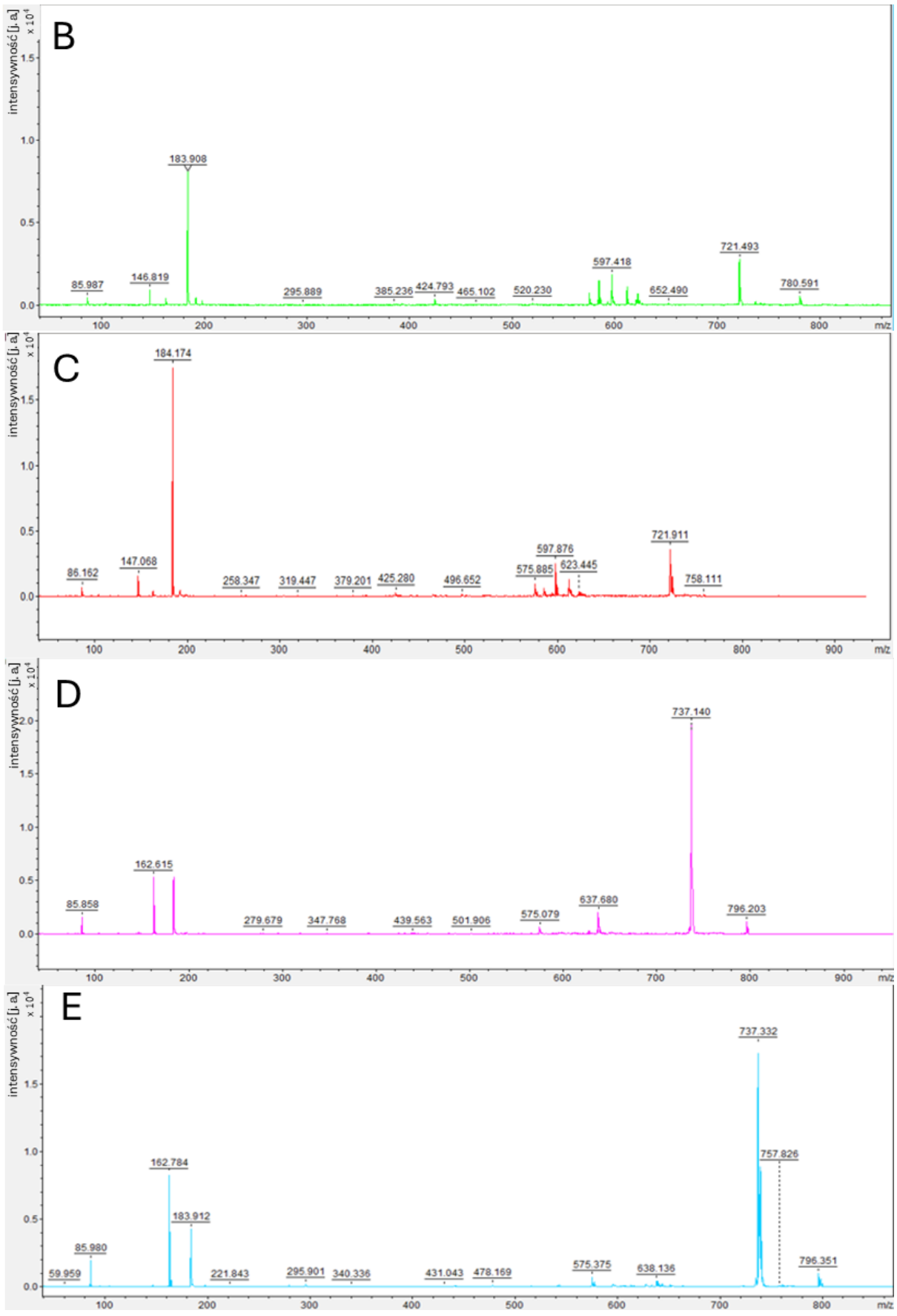
Sygnał o m/z 798,54 został przypisany do fosfatydylocholiny PC (34:1) w formie adduktu z jonem potasu [M+K]+, a jego identyfikację potwierdzono na podstawie fragmentów zgodnych z literaturowymi wzorcami. Obecność piku izotopowego przy m/z 799,54, wynikającego z naturalnego rozkładu izotopowego, dodatkowo potwierdza poprawność przypisania. Sygnał o m/z 782,50 odpowiada tej samej

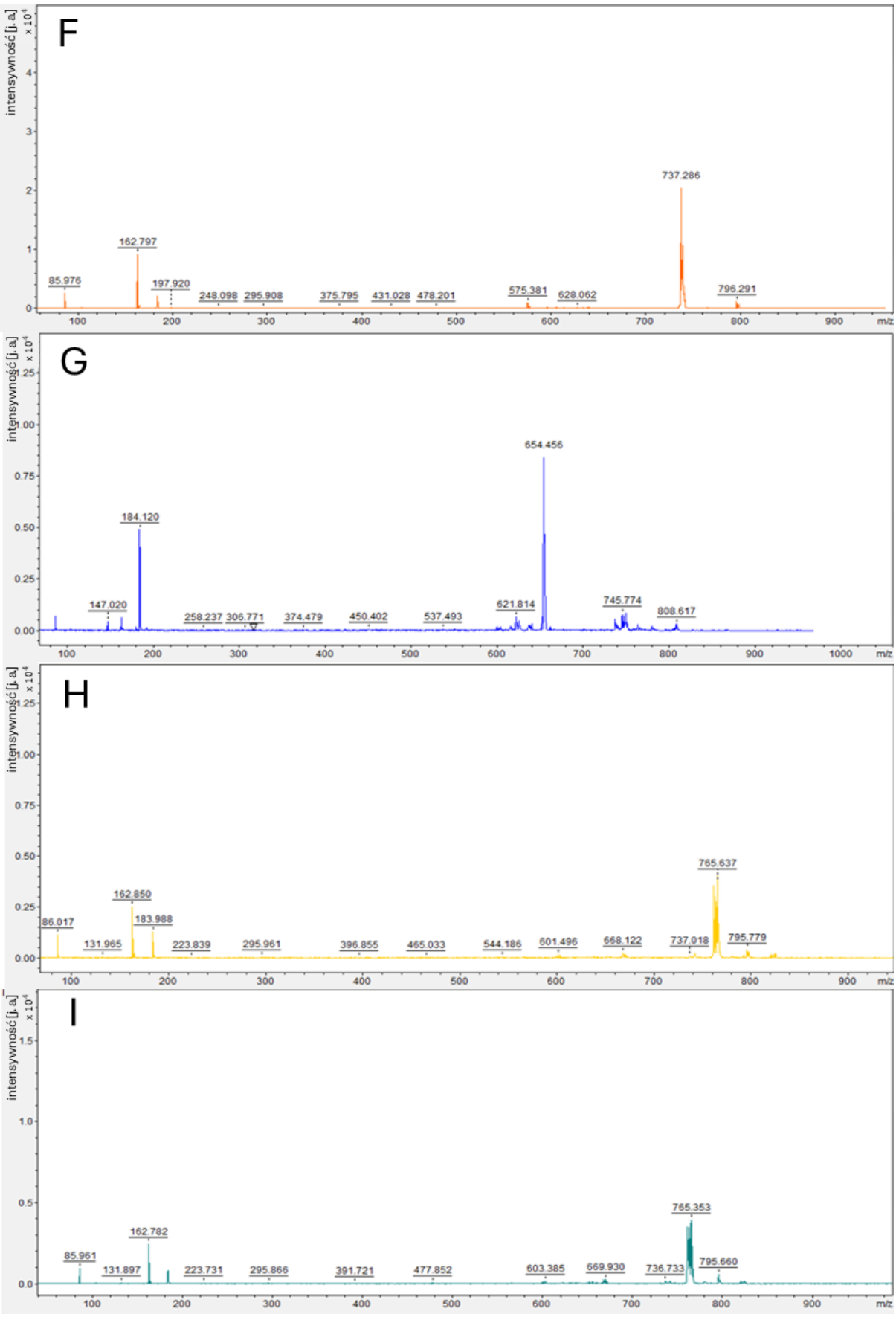
cząsteczce (PC 34:1), lecz zjonizowanej jako adukt z jonem sodu [M+Na]+, natomiast m/z 780,60 przypisano PC (16:0_18:2) w formie protonowanej [M+H]+. Wśród pozostałych zidentyfikowanych sygnałów znalazły się m.in. PC (36:2) jako adukt z jonem potasu (m/z 824,70), PC (34:2) z jonem potasowym (m/z 796,20) oraz PC (34:2) w formie protonowanej (m/z 758,80). Sygnał o m/z 808,60 został przypisany PC (36:2) z jonem sodowym [M+Na]+, a pik izotopowy przy m/z 825,60 stanowi potwierdzenie naturalnego wzorca izotopowego dla tej cząsteczki.

Zestawienie uzyskanych widm fragmentacyjnych, przedstawione na rysunku 6.11, potwierdza obecność form fosfatydylocholiny, zróżnicowanych pod względem długości i stopnia nienasycenia łańcuchów acylowych, jak również różnych typów adduktów jonowych ([M+H]$^+$, [M+Na]$^+$, [M+K]$^+$). Obecność charakterystycznych fragmentów cząsteczek fosfolipidowych oraz pików izotopowych stanowi dodatkowe potwierdzenie trafności przypisań strukturalnych. Uzyskane dane stanowią punkt wyjścia do dalszej interpretacji profilu lipidowego badanych próbek mięśniowych.

Warto podkreślić, że wszystkie sygnały wytypowane jako różnicujące pomiędzy analizowanymi grupami w oparciu o analizę statystyczną i zweryfikowane za pomocą spektrometrii tandemowej, zostały przypisane do różnych form fosfatydylocholiny. Wynik ten wskazuje na szczególną rolę tej klasy lipidów w różnicowaniu stanów patologicznych zachodzących w włóknach mięśniowych. Obrazy przedstawione na rysunku 6.12 ukazują przestrzenny rozkład intensywności sygnałów m/z odpowiadających wybranym formom fosfatydylocholiny w siedmiu skrawkach mięśniowych poddanych procesowi fragmentacji. Widoczne zróżnicowanie profilu jonowego pomiędzy próbkami odzwierciedla potencjalne różnice w składzie lipidowym związane z ich charakterystyką histopatologiczną. Pozostałe próbki, które nie zostały objęte analizą fragmentacyjną, przedstawiono kolorem czarnym.




B
intensywność [j. a.]
x 10⁴
183.908
85.987
146.819
295.889
385.236
424.793
465.102
520.230
597.418
652.490
721.493
780.591
m/z
C
184.174
86.162
147.068
258.347
319.447
379.201
425.280
496.652
575.885
597.876
623.445
721.911
758.111
D
737.140
162.615
85.858
279.679
347.768
439.563
501.906
575.079
637.680
796.203
E
737.332
757.826
162.784
183.912
85.980
59.959
221.843
295.901
340.336
431.043
478.169
575.375
638.136
796.351

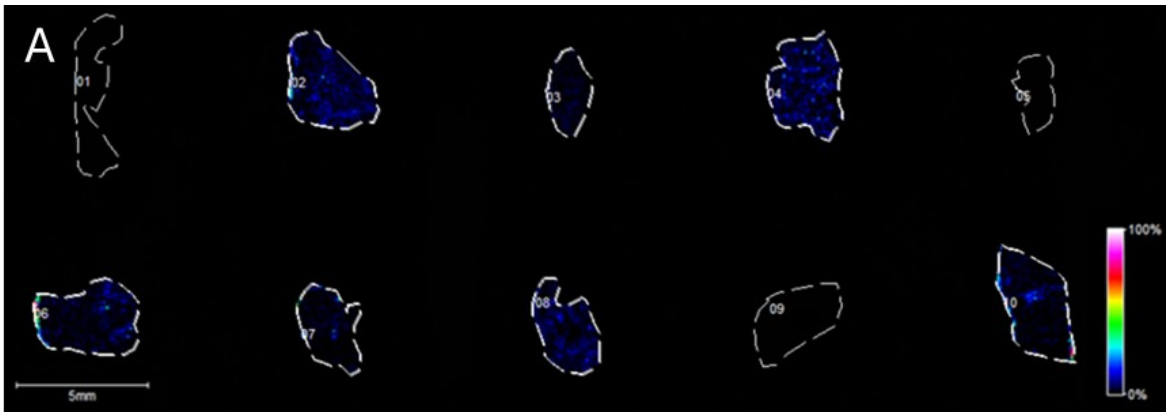

F
intensywność [j. a.]
x 10⁴
737.286
162.797
85.976
197.920
248.098
295.908
375.795
431.028
478.201
575.381
628.062
796.291
m/z
G
654.456
184.120
147.020
258.237
306.771
374.479
450.402
537.493
621.814
745.774
808.617
H
765.637
162.850
183.988
86.017
131.965
223.839
295.961
396.855
465.033
544.186
601.496
668.122
737.018
795.779
I
765.353
162.782
85.961
131.897
223.731
295.866
391.721
477.852
603.385
669.930
736.733
795.660

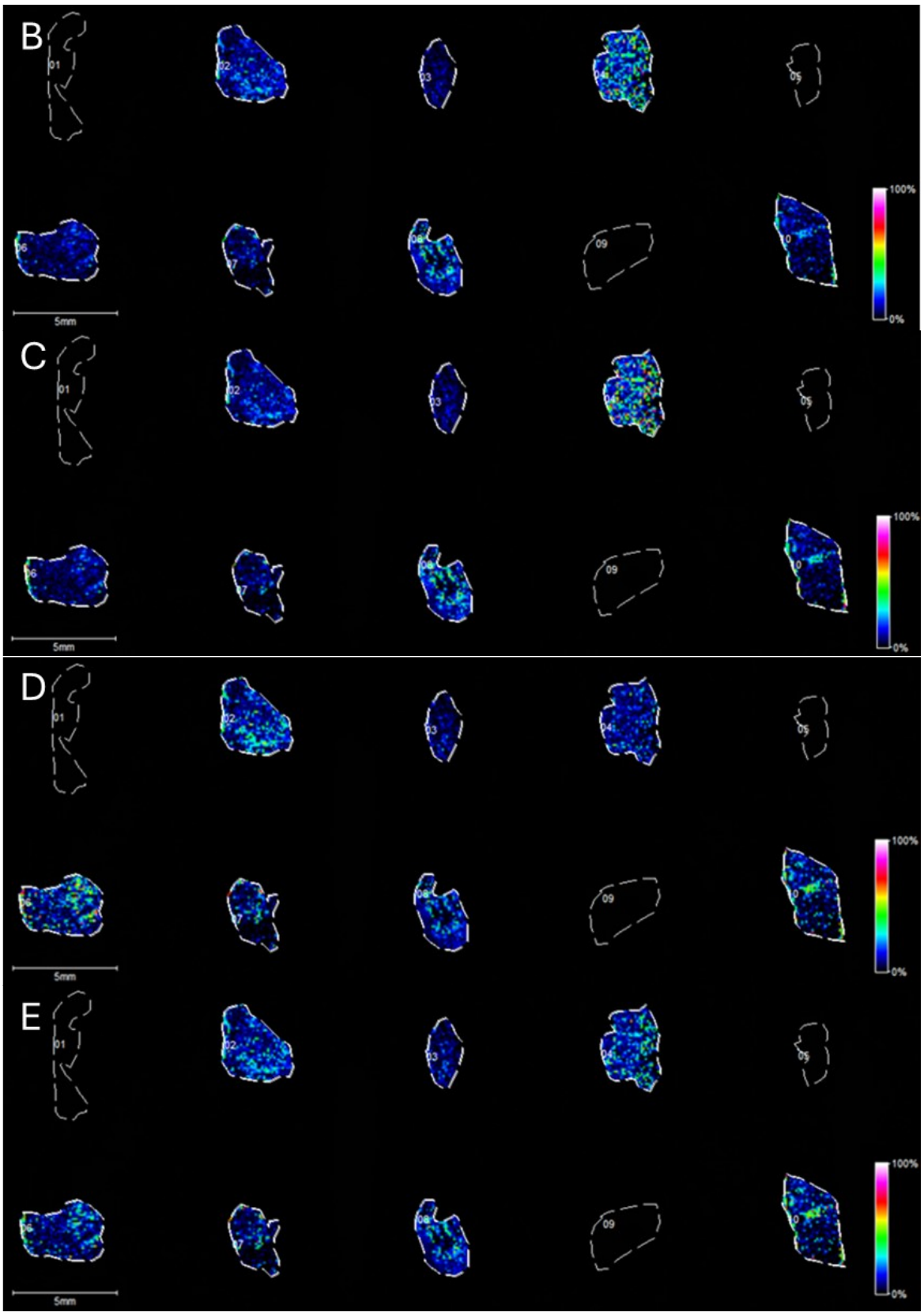
Rysunek 6.11 Zestawienie uzyskanych widm fragmentacyjnych przy wykorzystaniu technologii LIFT. Wykresy przedstawiają kolejno: A - m/z 758,80 $[M+H]^+$ (PC 34:2), B - 780,60 $[M+H]^+$ (PC 16:0_18:2), C - 782,50 $[M+Na]^+$ (PC 34:1), D - 796,20 $[M+K]^+$ (PC 34:2), E - 798,54 $[M+K]^+$ (PC 34:1), F - 799,54 - pik izotopowy odpowiadający E, G - 808,60 $[M+Na]^+$ (PC 36:2), H - 824,70 $[M+K]^+$ (PC 36:2), I - 825,60 - pik izotopowy odpowiadający H.

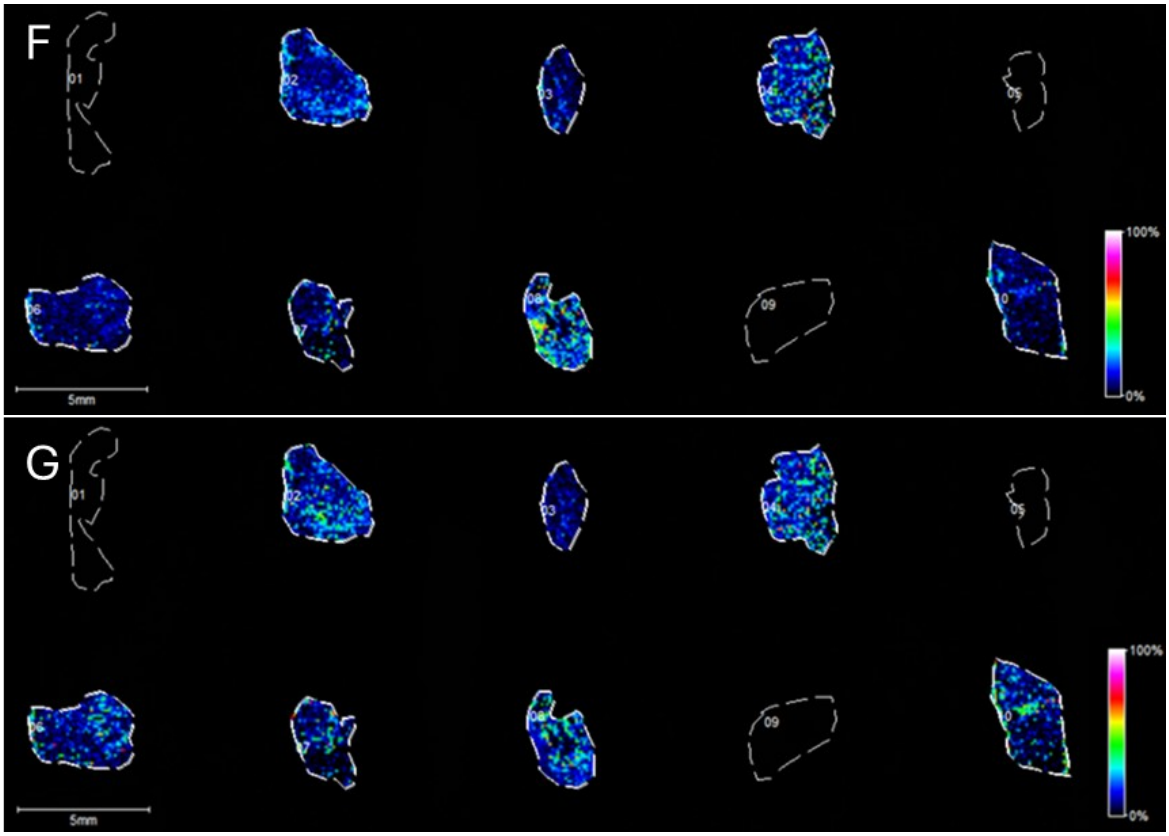
Fosfatydylocholina stanowi dominujący składnik błon komórkowych, w tym błon siateczki sarkoplazmatycznej, odpowiadającej za gospodarkę jonową, takich jak ATP-aza wapniowa. Właściwy poziom fosfatydylocholiny PC oraz jej charakterystyczny profil kwasów tłuszczowych są kluczowe dla utrzymania efektywnego wiązania i transportu jonów wapnia, co bezpośrednio warunkuje prawidłowy cykl skurczu i rozkurczu mięśnia. Zmiany w składzie PC, obejmujące długość łańcuchów kwasów tłuszczowych, stopień ich nienasycenia oraz rodzaj jonów tworzących addukty (H^+, Na^+, K^+), wpływają na fizykochemiczne właściwości błon komórkowych, determinując m.in. ich płynność, elastyczność oraz organizację przestrzenną. Te cechy z kolei oddziałują na funkcję białek błonowych, w tym kanałów jonowych i pomp, które odpowiadają za transport jonów i regulację homeostazy wapniowej w komórkach mięśniowych [121].

W kontekście chorób mięśni, takich jak dystrofie, zaburzenia składu PC mogą prowadzić do upośledzenia funkcji siateczki sarkoplazmatycznej, przedstawiającego się w postaci m.in. zmniejszonej zdolności do wiązania i uwalniania wapnia, co skutkuje nieprawidłowym przebiegiem skurczu mięśnia. W związku z tym, analiza profilu PC dostarcza istotnych informacji na temat stanu funkcjonalnego tkanki mięśniowej oraz pozwala na lepsze zrozumienie molekularnych mechanizmów patologicznych leżących u podstaw różnic obserwowanych w badanych próbkach [133]. Co jest zgodne z otrzymanymi wynikami analizy przeprowadzonej niniejszej rozprawie.

Proces dwustopniowej analizy, łączący podejście statystyczne z dokładną identyfikacją molekularną, jest niezbędny do zapewnienia wysokiej jakości i wiarygodności interpretacji danych lipidomicznych. Tego rodzaju kompleksowe podejście pozwala na wiarygodną identyfikację biomarkerów różnicujących analizowane grupy, a także na lepsze zrozumienie zmian metabolicznych i molekularnych towarzyszących badanym stanom chorobowym. W efekcie, połączenie selekcji sygnałów na podstawie ich znaczenia statystycznego z weryfikacją ich struktury za pomocą MS/MS stanowi fundament dalszych badań i interpretacji w zakresie lipidomiki oraz biologii molekularnej.




B
C
D
E
01
02
03
04
05
06
07
08
09
10
5mm
100%
0%



Rysunek 6.12 Mapy rozkładu intensywności sygnałów jonowych dla wybranych m/z uzyskanych metodą MALDI-MSI, przedstawione kolejno: A - m/z 758,80 $[M+H]^+$ (PC 34:2), B - 780,60 $[M+H]^+$ (PC 16:0_18:2), C - 782,50 $[M+Na]^+$ (PC 34:1), D - 796,20 $[M+K]^+$ (PC 34:2), E - 798,54 $[M+K]^+$ (PC 34:1), F - 808,60 $[M+Na]^+$ (PC 36:2), G - 824,70 $[M+K]^+$ (PC 36:2).

7. Wnioski

Przeprowadzone badania, wykorzystujące zaawansowane techniki analityczne (PIXE, SIMS oraz MALDI-TOF MS), pozwoliły na zrealizowanie celów badawczych przyjętych w rozprawie. Dzięki przeprowadzonym eksperymentom uzyskano dane, które umożliwiły identyfikację potencjalnych markerów chorób nerwowo-mięśniowych. Zidentyfikowane czynniki różnicujące miały charakter zarówno pierwiastkowy (w tym K, Cl, P, S, Fe, Zn), jak i molekularny (w szczególności lipidowy - zwłaszcza fosfatydylocholina). Zaobserwowane różnice w rozmieszczeniu przestrzennym i stężeniu wybranych pierwiastków, oraz w profilach molekularnych analizowanych próbek stanowią przesłankę do kontynuacji prac nad wykorzystaniem tych związków jako biomarkerów diagnostycznych i prognostycznych. Zastosowane metody badawcze pozwoliły na identyfikację oraz charakteryzację zmian biochemicznych w tkankach mięśniowych. Wykorzystanie zaawansowanych metod statystycznych umożliwiło klasyfikację próbek oraz identyfikację zmiennych o największym potencjale różnicującym, co szczególnie podkreśla potencjał zaproponowanego podejścia eksperymentalno-analitycznego w diagnostyce różnicowej chorób mięśni.

Należy jednak podkreślić, że w trakcie realizacji celów rozprawy napotkano istotne ograniczenia związane z pozyskaniem odpowiednio licznej i jednorodnej puli próbek tkanek mięśniowych, która umożliwiłaby bardziej kompleksową ocenę różnic międzygrupowych oraz charakterystykę zmienności wewnątrzgrupowej. Ze względu na fakt, że ostateczne potwierdzenie rozpoznania chorób nerwowo-mięśniowych często jest możliwe dopiero po szczegółowej analizie patomorfologicznej śródoperacyjnie pobranych bioptatów, a nawet po wykonani diagnostyki molekularno-genetycznej (obecność specyficznych mutacji genetycznych), możliwość wcześniejszego zaplanowania i kwalifikacji przypadków do badań była ograniczona. Okoliczność ta sprawia, że pozyskanie adekwatnej puli materiału badawczego jest procesem zarówno czasochłonnym, jak i złożonym. Ograniczona dostępność próbek wpłynęła istotnie na liczebność analizowanych grup, co przełożyło się na obniżenie mocy statystycznej oraz ograniczyło zakres możliwej analizy zmienności wewnątrzgrupowej. Tym samym stanowiło to istotne wyzwanie dla realizacji celów badawczych w pierwotnie zakładanych ramach czasowych. Nie bez znaczenia pozostaje również konieczność spełnienia wymogów i procedur bioetycznych. W przyszłości zasadne byłoby rozszerzenie zakresu analiz o profilowanie innych klas biomolekuł, ze szczególnym uwzględnieniem białek oraz złożonych metabolitów. Poszerzenie tych badań mogłoby się przyczynić do uzyskania pełniejszego obrazu molekularnego zmian patologicznych zachodzących w tkance mięśniowej. Chociaż zagadnienie to wykracza poza ramy niniejszej rozprawy, jego uwzględnienie w przyszłych badaniach, wraz ze zwiększeniem liczebności analizowanego materiału, stanowi uzasadnione rozwinięcie prezentowanego w tej rozprawie podejścia.

Podsumowując, uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują na potencjał integracji technik spektroskopowych w identyfikacji pierwiastkowych i molekularnych markerów zmian patologicznych w mięśniach. Przedstawione podejście eksperymentalno-analityczne może znaleźć zastosowanie zarówno w diagnostyce wczesnych etapów chorób nerwowo-mięśniowych, jak i w monitorowaniu ich postępowania oraz odpowiedzi na zastosowane leczenie. Stanowi również punkt wyjścia do dalszych badań interdyscyplinarnych, łączących metody fizyczne, chemiczne i biologiczne w celu lepszego zrozumienia mechanizmów chorób mięśniowych oraz rozwoju narzędzi wspierających medycynę spersonalizowaną.

Bibliografia

[1] T. A. Johnson, H. A. Jinnah, i N. Kamatani, „Shortage of Cellular ATP as a Cause of Diseases and Strategies to Enhance ATP", *Front Pharmacol*, t. 10, luty 2019, doi: 10.3389/fphar.2019.00098.

[2] D. H. Pesta *i in.*, „Hypophosphatemia promotes lower rates of muscle ATP synthesis", *The FASEB Journal*, t. 30, nr 10, s. 3378–3387, paź. 2016, doi: 10.1096/fj.201600473R.

[3] M. Valko, H. Morris, i M. Cronin, „Metals, Toxicity and Oxidative Stress", *Curr Med Chem*, t. 12, nr 10, s. 1161–1208, maj 2005, doi: 10.2174/0929867053764635.

[4] L. Baird i M. Yamamoto, „The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway", *Mol Cell Biol*, t. 40, nr 13, cze. 2020, doi: 10.1128/MCB.00099-20.

[5] R. Sartori, V. Romanello, i M. Sandri, „Mechanisms of muscle atrophy and hypertrophy: implications in health and disease", *Nat Commun*, t. 12, nr 1, s. 330, sty. 2021, doi: 10.1038/s41467-020-20123-1.

[6] K. M. Engel *i in.*, „A new update of MALDI-TOF mass spectrometry in lipid research", *Prog Lipid Res*, t. 86, s. 101145, kwi. 2022, doi: 10.1016/j.plipres.2021.101145.

[7] D. J. Birnkrant *i in.*, „Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: respiratory, cardiac, bone health, and orthopaedic management", *Lancet Neurol*, t. 17, nr 4, s. 347–361, kwi. 2018, doi: 10.1016/S1474-4422(18)30025-5.

[8] M. Periasamy, J. L. Herrera, i F. C. G. Reis, „Skeletal Muscle Thermogenesis and Its Role in Whole Body Energy Metabolism", *Diabetes Metab J*, t. 41, nr 5, s. 327, 2017, doi: 10.4093/dmj.2017.41.5.327.

[9] W. R. Frontera i J. Ochala, „Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function", *Calcif Tissue Int*, t. 96, nr 3, s. 183–195, mar. 2015, doi: 10.1007/s00223-014-9915-y.

[10] J. Stachura i W. Domagała, *Patologia: znaczy słowo o chorobie*, t. 2. Kraków: Polska Akademia Umiejętności, 2003.

[11] P. W. Brazis, J. C. Masdeu, i J. Biller, *Localization in Clinical Neurology*, 6. wyd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkinsons, a Wolters Kluwer business, 2011.

[12] F. Mastaglia i J. N. Walton, *Skeletal Muscle Pathology*, 2. wyd. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1992.

[13] J. Finsterer, L. Papić, i M. Auer-Grumbach, „Motor neuron, nerve, and neuromuscular junction disease", *Curr Opin Neurol*, t. 24, nr 5, s. 469–474, paź. 2011, doi: 10.1097/WCO.0b013e32834a9448.

[14] M. S. Schwartz, M. Swash, i J. Ryan, „Why is the gracilis muscle relatively uninvolved in neuromuscular disorders?", *Neuromuscular Disorders*, t. 1, nr 5, s. 365–369, sty. 1991, doi: 10.1016/0960-8966(91)90123-A.

[15] E. K. O'Ferrall i M. Sinnreich, „The role of muscle biopsy in the age of genetic testing", *Curr Opin Neurol*, t. 22, nr 5, s. 543–553, paź. 2009, doi: 10.1097/WCO.0b013e32832ffc60.

[16] V. Dubowitz, *Muscle Biopsy: A Practical Approach*, 4. wyd. Elsevier Ltd, 2013.

[17] A. E. H. Emery, „The muscular dystrophies", *The Lancet*, t. 359, nr 9307, s. 687–695, luty 2002, doi: 10.1016/S0140-6736(02)07815-7.

[18] A. Engel i C. Franzini-Armstrong, *Myology: Basic and Clinical*, 3. wyd., t. 1. New York: McGraw-Hill Co., 2004.

[19] S. DiMauro i E. A. Schon, „Mitochondrial Respiratory-Chain Diseases", *New England Journal of Medicine*, t. 348, nr 26, s. 2656–2668, cze. 2003, doi: 10.1056/NEJMra022567.

[20] M. C. Dalakas, „Inflammatory Muscle Diseases", *New England Journal of Medicine*, t. 372, nr 18, s. 1734–1747, kwi. 2015, doi: 10.1056/NEJMra1402225.

[21] L. P. Rowland i N. A. Shneider, „Amyotrophic Lateral Sclerosis", *New England Journal of Medicine*, t. 344, nr 22, s. 1688–1700, maj 2001, doi: 10.1056/NEJM200105313442207.

[22] K. E. Davies i K. J. Nowak, „Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players", *Nat Rev Mol Cell Biol*, t. 7, nr 10, s. 762–773, paź. 2006, doi: 10.1038/nrm2024.

[23] F. Muntoni i T. Voit, „The congenital muscular dystrophies in 2004: a century of exciting progress", *Neuromuscular Disorders*, t. 14, nr 10, s. 635–649, paź. 2004, doi: 10.1016/j.nmd.2004.06.009.

[24] D. Bansal *i in.*, „Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy", *Nature*, t. 423, nr 6936, s. 168–172, maj 2003, doi: 10.1038/nature01573.

[25] K. P. Campbell i J. T. Stull, „Skeletal Muscle Basement Membrane-Sarcolemma-Cytoskeleton Interaction Minireview Series", *Journal of Biological Chemistry*, t. 278, nr 15, s. 12599–12600, kwi. 2003, doi: 10.1074/jbc.R300005200.

[26] S. S. Reddy, U. R. Addi, R. Pullakhandam, i G. B. Reddy, „Dietary zinc deficiency disrupts skeletal muscle proteostasis and mitochondrial biology in rats", *Nutrition*, t. 98, s. 111625, cze. 2022, doi: 10.1016/j.nut.2022.111625.

[27] S. Choi, X. Liu, i Z. Pan, „Zinc deficiency and cellular oxidative stress: prognostic implications in cardiovascular diseases", *Acta Pharmacol Sin*, t. 39, nr 7, s. 1120–1132, lip. 2018, doi: 10.1038/aps.2018.25.

[28] J. Guo, Y. Bai, J. Liao, S. Wang, Q. Han, i Z. Tang, „Copper Induces Apoptosis Through Endoplasmic Reticulum Stress in Skeletal Muscle of Broilers", *Biol Trace Elem Res*, t. 198, nr 2, s. 636–643, grudz. 2020, doi: 10.1007/s12011-020-02076-0.

[29] Y. Wang *i in.*, „Discrepant effects of copper (II) stress on different types of skeletal muscles in chicken: Elements and amino acids", *Ecotoxicol Environ Saf*, t. 167, s. 227–235, sty. 2019, doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.10.014.

[30] A. Gręda i D. Jantas, „Dysfunkcje mitochondriów w chorobach neurodegeneracyjnych: potencjalny punkt uchwytu dla leków neuroprotekcyjnych”, *Postępy Biologii Komórki*, t. 39, nr 3, s. 321–344, 2012.

[31] M. Mosqueira, H. Brinkmeier, i E. Jaimovich, „Editorial: Calcium Homeostasis in Skeletal Muscle Function, Plasticity, and Disease”, *Front Physiol*, t. 12, mar. 2021, doi: 10.3389/fphys.2021.671292.

[32] S. K. Powers i M. Schrager, „Redox signaling regulates skeletal muscle remodeling in response to exercise and prolonged inactivity”, *Redox Biol*, t. 54, s. 102374, sie. 2022, doi: 10.1016/j.redox.2022.102374.

[33] P. Kasprzyk *i in.*, „Elemental Composition of Skeletal Muscle Fibres Studied with Synchrotron Radiation X-ray Fluorescence (SR-XRF)”, *Int J Mol Sci*, t. 23, nr 14, s. 7931, lip. 2022, doi: 10.3390/ijms23147931.

[34] P. Śliż-Szpytma *i in.*, „Sub-cellular elemental imaging of human muscle tissues affected by neuromuscular diseases”, *Nukleonika*, t. 66, nr 4, s. 159–164, grudz. 2021, doi: 10.2478/nuka-2021-0024.

[35] R. J. Butterfield *i in.*, „AAV mini-dystrophin gene therapy for Duchenne muscular dystrophy: a phase 1b trial”, *Nat Med*, t. 31, nr 8, s. 2712–2721, sie. 2025, doi: 10.1038/s41591-025-03750-3.

[36] Y.-A. Heo, „Golodirsen: First Approval”, *Drugs*, t. 80, nr 3, s. 329–333, luty 2020, doi: 10.1007/s40265-020-01267-2.

[37] S. Yasuda, D. Townsend, D. E. Michele, E. G. Favre, S. M. Day, i J. M. Metzger, „Dystrophic heart failure blocked by membrane sealant poloxamer”, *Nature*, t. 436, nr 7053, s. 1025–1029, sie. 2005, doi: 10.1038/nature03844.

[38] R. C. Jewell, S. P. Khor, D. F. Kisor, K. A. K. LaCroix, i W. A. Wargin, „Pharmacokinetics of RheothRx Injection in Healthy Male Volunteers”, *J Pharm Sci*, t. 86, nr 7, s. 808–812, lip. 1997, doi: 10.1021/js960491e.

[39] J. Lammerding i R. T. Lee, „Torn apart: membrane rupture in muscular dystrophies and associated cardiomyopathies”, *Journal of Clinical Investigation*, t. 117, nr 7, s. 1749–1752, lip. 2007, doi: 10.1172/JCI32686.

[40] T. B. Johansson, R. Akselsson, i S. A. E. Johansson, „X-ray analysis: Elemental trace analysis at the 10^{-12} g level”, *Nuclear Instruments and Methods*, t. 84, nr 1, s. 141–143, lip. 1970, doi: 10.1016/0029-554X(70)90751-2.

[41] S. A. E. Johansson i T. B. Johansson, „Analytical application of particle induced X-ray emission”, *Nuclear Instruments and Methods*, t. 137, nr 3, s. 473–516, wrz. 1976, doi: 10.1016/0029-554X(76)90470-5.

[42] N. Grassi, A. Migliori, P. A. Mandò, i H. Calvo del Castillo, „Differential PIXE measurements for the stratigraphic analysis of the painting *Madonna dei fusi* by Leonardo da Vinci”, *X-Ray Spectrometry*, t. 34, nr 4, s. 306–309, lip. 2005, doi: 10.1002/xrs.821.

[43] I. B. Mihalić *i in.*, „Multivariate analysis of PIXE + XRF and PIXE spectral images”, *J Anal At Spectrom*, t. 36, nr 3, s. 654–667, 2021, doi: 10.1039/D0JA00529K.

[44] M. Čargonja, D. Mekterović, P. Žurga, J. Ravlić-Gulan, I. Bogdanović Radović, i G. Žauhar, „Elemental analysis of particulate matter in a metal workshop and of biological samples from exposed workers”, *X-Ray Spectrometry*, t. 50, nr 1, s. 68–79, sty. 2021, doi: 10.1002/xrs.3197.

[45] T. Calligaro *i in.*, „Emerging nuclear methods for historical painting authentication: AMS-^{14}C dating, MeV-SIMS and O-PTIR imaging, global IBA, differential-PIXE and full-field PIXE mapping”, *Forensic Sci Int*, t. 336, s. 111327, lip. 2022, doi: 10.1016/j.forsciint.2022.111327.

[46] S. Fazinić, I. B. Mihalić, A. Mioković, M. R. Ramos, i M. Petric, „Influence of chemical effects on Al high-resolution Kα X-ray spectra in proton and alpha particle induced X-ray spectra”, *J Anal At Spectrom*, t. 38, nr 10, s. 2179–2187, 2023, doi: 10.1039/D3JA00178D.

[47] H. R. Verma, *Atomic and Nuclear Analytical Methods*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007. doi: 10.1007/978-3-540-30279-7.

[48] E. A. . Preoteasa, Elena. Preoteasa, i Ioana. Suciu, *Atomic and nuclear surface analysis methods : a novel perspective for the characterization of dental composites*. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2012.

[49] M. Jakšić, F. Pászti, A. Kótai, i S. Fazinic, *Instrumentation for PIXE and RBS*. Vienna: International Atomic Energy Agency, 2000.

[50] M. Salvadori *i in.*, „Quantitative elemental analysis of a specimen in air via external beam laser-driven particle-induced x-ray emission with a compact proton source”, *Phys Rev Appl*, t. 21, nr 6, s. 064020, cze. 2024, doi: 10.1103/PhysRevApplied.21.064020.

[51] V. Vijayan *i in.*, „External particle-induced X-ray emission”, *Curr Sci*, t. 85, nr 6, s. 772–777, wrz. 2003.

[52] S. A. E. Johansson, „PIXE: a novel technique for elemental analysis”, *Endeavour*, t. 13, nr 2, s. 48–53, sty. 1989, doi: 10.1016/0160-9327(89)90002-1.

[53] P. Migula *i in.*, „Micro-PIXE studies of elemental distribution in sap-feeding insects associated with Ni hyperaccumulator, Berkheya coddii”, *Plant Soil*, t. 293, nr 1–2, s. 197–207, kwi. 2007, doi: 10.1007/s11104-007-9231-7.

[54] P. Vavpetič *i in.*, „Micro-PIXE on thin plant tissue samples in frozen hydrated state: A novel addition to JSI nuclear microprobe”, *Nucl Instrum Methods Phys Res B*, t. 306, s. 140–143, lip. 2013, doi: 10.1016/j.nimb.2012.12.035.

[55] M. E. Benavidez *i in.*, „Micro PIXE mapping proves a differential distribution and concentration of trace elements in fungal structures of Rhizophagus intraradices”, *Fungal Biol*, t. 128, nr 7, s. 2089–2093, lis. 2024, doi: 10.1016/j.funbio.2024.08.008.

[56] H. Yakumaru *i in.*, „Micro-PIXE imaging of the rib bones of rats”, *Nucl Instrum Methods Phys Res B*, t. 553, s. 165386, sie. 2024, doi: 10.1016/j.nimb.2024.165386.

[57] R. Minqin *i in.*, „Nano-imaging of single cells using STIM”, *Nucl Instrum Methods Phys Res B*, t. 260, nr 1, s. 124–129, lip. 2007, doi: 10.1016/j.nimb.2007.02.015.

[58] M. B. H. Breese, J. P. Landsberg, P. J. C. King, G. W. Grime, i F. Watt, „Applications of scanning transmission ion microscopy”, *Nucl Instrum Methods Phys Res B*, t. 64, nr 1–4, s. 505–511, luty 1992, doi: 10.1016/0168-583X(92)95524-U.

[59] H. W. Lefevre, R. M. S. Schofield, G. S. Bench, i G. J. F. Legge, „STIM with energy loss contrast: an imaging modality unique to MeV ions”, *Nucl Instrum Methods Phys Res B*, t. 54, nr 1–3, s. 363–370, mar. 1991, doi: 10.1016/0168-583X(91)95538-O.

[60] M. B. H. Breese, G. W. Grime, i F. Watt, „The Nuclear Microprobe”, *Annual Review of Nuclear and Particle Science*, t. 42, nr 1, s. 1–38, grudz. 1992, doi: 10.1146/annurev.ns.42.120192.000245.

[61] H. Bethe, „Zur Theorie des Durchgangs schneller Korpuskularstrahlen durch Materie”, *Ann Phys*, t. 397, nr 3, s. 325–400, sty. 1930, doi: 10.1002/andp.19303970303.

[62] Z. Siketić, I. Bogdanović Radović, M. Jakšić, M. Popović Hadžija, i M. Hadžija, „Submicron mass spectrometry imaging of single cells by combined use of mega electron volt time-of-flight secondary ion mass spectrometry and scanning transmission ion microscopy”, *Appl Phys Lett*, t. 107, nr 9, sie. 2015, doi: 10.1063/1.4930062.

[63] J. J. Thomson, „LXXXIII. *Rays of positive electricity*”, *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, t. 20, nr 118, s. 752–767, paź. 1910, doi: 10.1080/14786441008636962.

[64] R. E. Honig, „Sputtering of Surfaces by Positive Ion Beams of Low Energy”, *J Appl Phys*, t. 29, nr 3, s. 549–555, mar. 1958, doi: 10.1063/1.1723219.

[65] H. Liebl, „Ion Microprobe Mass Analyzer”, *J Appl Phys*, t. 38, nr 13, s. 5277–5283, grudz. 1967, doi: 10.1063/1.1709314.

[66] P. van der Heide, *Secondary Ion Mass Spectrometry: An Introduction to Principles and Practices*. John Wiley & Sons, 2014.

[67] P. Sigmund, „Theory of Sputtering. I. Sputtering Yield of Amorphous and Polycrystalline Targets”, *Physical Review*, t. 184, nr 2, s. 383–416, sie. 1969, doi: 10.1103/PhysRev.184.383.

[68] T. Tadić *i in.*, „Development of a TOF SIMS setup at the Zagreb heavy ion microbeam facility”, *Nucl Instrum Methods Phys Res B*, t. 332, s. 234–237, sie. 2014, doi: 10.1016/j.nimb.2014.02.068.

[69] M. Brajković, M. Barac, D. Cosic, I. Bogdanović Radović, i Z. Siketić, „Development of MeV TOF-SIMS capillary microprobe at the Ruđer Bošković Institute in Zagreb”, *Nucl Instrum Methods Phys Res B*, t. 461, s. 237–242, grudz. 2019, doi: 10.1016/j.nimb.2019.10.006.

[70] M. Jakšić *i in.*, „New capabilities of the Zagreb ion microbeam system”, *Nucl Instrum Methods Phys Res B*, t. 260, nr 1, s. 114–118, lip. 2007, doi: 10.1016/j.nimb.2007.01.252.

[71] B. N. Jones, V. Palitsin, i R. Webb, „Surface analysis with high energy time-of-flight secondary ion mass spectrometry measured in parallel with PIXE and RBS”, *Nucl Instrum Methods Phys Res B*, t. 268, nr 11–12, s. 1714–1717, cze. 2010, doi: 10.1016/j.nimb.2010.02.045.

[72] K.-U. Miltenberger, M. Döbeli, C. Vockenhuber, i H.-A. Synal, „A simultaneous dual-polarity mass spectrometer with electron start for MeV-SIMS”, *Nucl Instrum Methods Phys Res B*, t. 507, s. 36–41, lis. 2021, doi: 10.1016/j.nimb.2021.09.010.

[73] M. C. Malloy, I. Bogdanović Radović, Z. Siketić, i M. Jakšić, „Determination of deposition order of blue ballpoint pen lines by MeV Secondary Ion Mass Spectrometry”, *Forensic Chemistry*, t. 7, s. 75–80, mar. 2018, doi: 10.1016/j.forc.2017.10.004.

[74] Y. Nakata *i in.*, „Imaging mass spectrometry with nuclear microprobes for biological applications”, *Nucl Instrum Methods Phys Res B*, t. 267, nr 12–13, s. 2144–2148, cze. 2009, doi: 10.1016/j.nimb.2009.03.094.

[75] M. Brajković, I. Bogdanović Radović, M. Barac, D. D. Cosic, i Z. Siketić, „Imaging of Organic Samples with Megaelectron Volt Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry Capillary Microprobe”, *J Am Soc Mass Spectrom*, t. 32, nr 10, s. 2567–2572, paź. 2021, doi: 10.1021/jasms.1c00200.

[76] W. M. Nadler *i in.*, „MALDI versus ESI: The Impact of the Ion Source on Peptide Identification”, *J Proteome Res*, t. 16, nr 3, s. 1207–1215, mar. 2017, doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00805.

[77] J. L. Norris i R. M. Caprioli, „Analysis of Tissue Specimens by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Imaging Mass Spectrometry in Biological and Clinical Research”, *Chem Rev*, t. 113, nr 4, s. 2309–2342, kwi. 2013, doi: 10.1021/cr3004295.

[78] F. Hillenkamp i J. Peter-Katalinić, Red., *MALDI MS: A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2007. doi: 10.1002/9783527610464.

[79] D. Zakett, A. E. Schoen, R. G. Cooks, i P. H. Hemberger, „Laser-desorption mass spectrometry/mass spectrometry and the mechanism of desorption ionization”, *J Am Chem Soc*, t. 103, nr 5, s. 1295–1297, mar. 1981, doi: 10.1021/ja00395a086.

[80] N. C. Fenner i N. R. Daly, „Laser Used for Mass Analysis”, *Review of Scientific Instruments*, t. 37, nr 8, s. 1068–1070, sie. 1966, doi: 10.1063/1.1720410.

[81] F. J. Vastola, R. O. Mumma, i A. J. Pirone, „Analysis of organic salts by laser ionization”, *Organic Mass Spectrometry*, t. 3, nr 1, s. 101–104, sty. 1970, doi: 10.1002/oms.1210030112.

[82] F. Hillenkamp, E. Unsöld, R. Kaufmann, i R. Nitsche, „Laser microprobe mass analysis of organic materials”, *Nature*, t. 256, nr 5513, s. 119–120, lip. 1975, doi: 10.1038/256119a0.

[83] Michael. Karas, Doris. Bachmann, i Franz. Hillenkamp, „Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules”, *Anal Chem*, t. 57, nr 14, s. 2935–2939, grudz. 1985, doi: 10.1021/ac00291a042.

[84] Michael. Karas i Franz. Hillenkamp, „Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons”, *Anal Chem*, t. 60, nr 20, s. 2299–2301, paź. 1988, doi: 10.1021/ac00171a028.

[85] J. Schiller, O. Zschörnig, M. Petkovic´, M. Müller, J. Arnhold, i K. Arnold, „Lipid analysis of human HDL and LDL by MALDI-TOF mass spectrometry and ^{31}P-NMR”, *J Lipid Res*, t. 42, nr 9, s. 1501–1508, wrz. 2001, doi: 10.1016/S0022-2275(20)34196-1.

[86] X. Dong, J. Cheng, J. Li, i Y. Wang, „Graphene as a Novel Matrix for the Analysis of Small Molecules by MALDI-TOF MS”, *Anal Chem*, t. 82, nr 14, s. 6208–6214, lip. 2010, doi: 10.1021/ac101022m.

[87] T. Kinumi, T. Saisu, M. Takayama, i H. Niwa, „Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using an inorganic particle matrix for small molecule analysis”, *Journal of Mass Spectrometry*, t. 35, nr 3, 2000.

[88] P. Mielczarek *i in.*, „Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging sample preparation using wet-interface matrix deposition for lipid analysis”, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, t. 37, nr 14, lip. 2023, doi: 10.1002/rcm.9531.

[89] A. Rohlfing, „Untersuchungen zum Desorptionsprozess in der UV-matrix-unterstützten Laserdesorption/-ionisation mit einer Flüssigmatrix”, Praca Doktorska, Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, Münster , 2006.

[90] R. Knochenmuss, F. Dubois, M. J. Dale, i R. Zenobi, „The Matrix Suppression Effect and Ionization Mechanisms in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization”, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, t. 10, nr 8, 1996.

[91] J. Kriegsmann, M. Kriegsmann, i R. Casadonte, „MALDI TOF imaging mass spectrometry in clinical pathology: A valuable tool for cancer diagnostics (Review)”, *Int J Oncol*, t. 46, nr 3, s. 893–906, mar. 2015, doi: 10.3892/ijo.2014.2788.

[92] F. M. Alves *i in.*, „Iron accumulation in skeletal muscles of old mice is associated with impaired regeneration after ischaemia–reperfusion damage”, *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, t. 12, nr 2, s. 476–492, kwi. 2021, doi: 10.1002/jcsm.12685.

[93] A. Sandow i M. K. D. Pagala, „Detubulation effects on the action of zinc on frog skeletal muscle action potential”, *J Membr Biol*, t. 41, nr 4, s. 309–321, grudz. 1978, doi: 10.1007/BF01871995.

[94] A. J. Crawford i S. K. Bhattacharya, „Excessive intracellular zinc accumulation in cardiac and skeletal muscles of dystrophic hamsters”, *Exp Neurol*, t. 95, nr 2, s. 265–276, luty 1987, doi: 10.1016/0014-4886(87)90137-3.

[95] R. Yarom, E. Wisenberg, P. D. Peters, i T. A. Hall, „Zinc distribution in injured myocardium”, *Virchows Arch B Cell Pathol*, t. 23, nr 1, s. 65–77, grudz. 1977, doi: 10.1007/BF02889120.

[96] V. A. Solé, E. Papillon, M. Cotte, Ph. Walter, i J. Susini, „A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra”, *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc*, t. 62, nr 1, s. 63–68, sty. 2007, doi: 10.1016/j.sab.2006.12.002.

[97] R. L. Caldwell i R. M. Caprioli, „Tissue Profiling by Mass Spectrometry: A Review of Methodology and Applications”, *Molecular & Cellular Proteomics*, t. 4, nr 4, s. 394–401, kwi. 2005, doi: 10.1074/mcp.R500006-MCP200.

[98] X. Wang, L. Zhang, Y. Xiang, N. Ye, i K. Liu, „Systematic study of tissue section thickness for MALDI MS profiling and imaging”, *Analyst*, t. 148, nr 4, s. 888–897, 2023, doi: 10.1039/D2AN01739C.

[99] C. López de Laorden *i in.*, „Nanostructured Indium Tin Oxide Slides for Small-Molecule Profiling and Imaging Mass Spectrometry of Metabolites by Surface-Assisted Laser Desorption Ionization MS”, *Anal Chem*, t. 87, nr 1, s. 431–440, sty. 2015, doi: 10.1021/ac5025864.

[100] E. L. Gill, R. A. Yost, V. Vedam-Mai, i T. J. Garrett, „Precast Gelatin-Based Molds for Tissue Embedding Compatible with Mass Spectrometry Imaging”, *Anal Chem*, t. 89, nr 1, s. 576–580, sty. 2017, doi: 10.1021/acs.analchem.6b04185.

[101] S. R. Shanta *i in.*, „Global changes in phospholipids identified by MALDI MS in rats with focal cerebral ischemia”, *J Lipid Res*, t. 53, nr 9, s. 1823–1831, wrz. 2012, doi: 10.1194/jlr.M022558.

[102] M. Visscher *i in.*, „Data Processing Pipeline for Lipid Profiling of Carotid Atherosclerotic Plaque with Mass Spectrometry Imaging”, *J Am Soc Mass Spectrom*, t. 30, nr 9, s. 1790–1800, wrz. 2019, doi: 10.1007/s13361-019-02254-y.

[103] M. K. Andersen *i in.*, „Spatial differentiation of metabolism in prostate cancer tissue by MALDI-TOF MSI”, *Cancer Metab*, t. 9, nr 1, s. 9, grudz. 2021, doi: 10.1186/s40170-021-00242-z.

[104] Y. Chen *i in.*, „Imaging MALDI Mass Spectrometry of Sphingolipids Using an Oscillating Capillary Nebulizer Matrix Application System”, 2010, s. 131–146. doi: 10.1007/978-1-60761-746-4_7.

[105] P. Mielczarek, T. Slowik, J. H. Kotlinska, P. Suder, i A. Bodzon-Kulakowska, „The Study of Derivatization Prior MALDI MSI Analysis—Charge Tagging Based on the Cholesterol and Betaine Aldehyde”, *Molecules*, t. 26, nr 9, s. 2737, maj 2021, doi: 10.3390/molecules26092737.

[106] H. J. Wang, C. Bin Liu, H. Wu, i J. S. Kuo, „Direct profiling of phospholipids and lysophospholipids in rat brain sections after ischemic stroke”, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, t. 24, nr 14, s. 2057–2064, lip. 2010, doi: 10.1002/rcm.4620.

[107] A. J. Scott *i in.*, „Norharmane matrix enhances detection of endotoxin by MALDI-MS for simultaneous profiling of pathogen, host and vector systems”, *Pathog Dis*, t. 74, nr 8, lis. 2016, doi: 10.1093/femspd/ftw097.

[108] A. R. Korte i Y. J. Lee, „MALDI-MS analysis and imaging of small molecule metabolites with 1,5-diaminonaphthalene (DAN)”, *Journal of Mass Spectrometry*, t. 49, nr 8, s. 737–741, sie. 2014, doi: 10.1002/jms.3400.

[109] H. Liu *i in.*, „1,5-Diaminonaphthalene Hydrochloride Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging of Small Molecules in Tissues Following Focal Cerebral Ischemia”, *Anal Chem*, t. 86, nr 20, s. 10114–10121, paź. 2014, doi: 10.1021/ac5034566.

[110] M. Strohalm, M. Hassman, B. Košata, i M. Kodíček, „*mMass* data miner: an open source alternative for mass spectrometric data analysis”, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, t. 22, nr 6, s. 905–908, mar. 2008, doi: 10.1002/rcm.3444.

[111] D. Suckau, A. Resemann, M. Schuerenberg, P. Hufnagel, J. Franzen, i A. Holle, „A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics”, *Anal Bioanal Chem*, t. 376, nr 7, s. 952–965, sie. 2003, doi: 10.1007/s00216-003-2057-0.

[112] H. Neubert, J. M. Halket, M. Fernandez Ocaña, i R. K. P. Patel, „MALDI post-source decay and LIFT-TOF/TOF investigation of α-cyano-4-hydroxycinnamic acid cluster interferences”, *J Am Soc Mass Spectrom*, t. 15, nr 3, s. 336–343, mar. 2004, doi: 10.1016/j.jasms.2003.11.002.

[113] R. T. Nordvang *i in.*, „It All Starts with a Sandwich: Identification of Sialidases with Trans-Glycosylation Activity”, *PLoS One*, t. 11, nr 7, s. e0158434, lip. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0158434.

[114] M. G. Hanson, J. J. Wilde, R. L. Moreno, A. D. Minic, i L. Niswander, „Potassium dependent rescue of a myopathy with core-like structures in mouse”, *Elife*, t. 4, sty. 2015, doi: 10.7554/eLife.02923.

[115] L. Nitschke i T. A. Cooper, „Combinatorial effects of ion channel mis-splicing as a cause of myopathy in myotonic dystrophy”, *Journal of Clinical Investigation*, t. 134, nr 1, sty. 2024, doi: 10.1172/JCI176089.

[116] L. A. Cisco, M. T. Sipple, K. M. Edwards, C. A. Thornton, i J. D. Lueck, „Verapamil mitigates chloride and calcium bi-channelopathy in a myotonic dystrophy mouse model”, *Journal of Clinical Investigation*, t. 134, nr 1, sty. 2024, doi: 10.1172/JCI173576.

[117] E. Wada *i in.*, „Dietary Phosphorus Overload Aggravates the Phenotype of the Dystrophin-Deficient mdx Mouse”, *Am J Pathol*, t. 184, nr 11, s. 3094–3104, lis. 2014, doi: 10.1016/j.ajpath.2014.07.007.

[118] R. A. Ellwood *i in.*, „Sulfur amino acid supplementation displays therapeutic potential in a C. elegans model of Duchenne muscular dystrophy”, *Commun Biol*, t. 5, nr 1, s. 1255, lis. 2022, doi: 10.1038/s42003-022-04212-z.

[119] M. R. Keenan i P. G. Kotula, „Accounting for Poisson noise in the multivariate analysis of ToF-SIMS spectrum images”, *Surface and Interface Analysis*, t. 36, nr 3, s. 203–212, mar. 2004, doi: 10.1002/sia.1657.

[120] S. Lee *i in.*, „Skeletal muscle phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine respond to exercise and influence insulin sensitivity in men”, *Sci Rep*, t. 8, nr 1, s. 6531, kwi. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-24976-x.

[121] S. A. Newsom *i in.*, „Skeletal muscle phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine are related to insulin sensitivity and respond to acute exercise in humans”, *J Appl Physiol*, t. 120, nr 11, s. 1355–1363, cze. 2016, doi: 10.1152/japplphysiol.00664.2015.

[122] S. Muralidharan *i in.*, „A reference map of sphingolipids in murine tissues”, *Cell Rep*, t. 35, nr 11, s. 109250, cze. 2021, doi: 10.1016/j.celrep.2021.109250.

[123] Z. Szondy, N. Al-Zaeed, N. Tarban, É. Fige, É. Garabuczi, i Z. Sarang, „Involvement of phosphatidylserine receptors in the skeletal muscle regeneration: therapeutic implications”, *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, t. 13, nr 4, s. 1961–1973, sie. 2022, doi: 10.1002/jcsm.13024.

[124] B. J. Shad, B. Smeuninx, P. J. Atherton, i L. Breen, „The mechanistic and ergogenic effects of phosphatidic acid in skeletal muscle”, *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, t. 40, nr 12, s. 1233–1241, grudz. 2015, doi: 10.1139/apnm-2015-0350.

[125] A. M. Gonzalez *i in.*, „Effects of phosphatidic acid supplementation on muscle thickness and strength in resistance-trained men”, *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, t. 42, nr 4, s. 443–448, kwi. 2017, doi: 10.1139/apnm-2016-0564.

[126] R. Bargui *i in.*, „Phospholipids: Identification and Implication in Muscle Pathophysiology”, *Int J Mol Sci*, t. 22, nr 15, s. 8176, lip. 2021, doi: 10.3390/ijms22158176.

[127] J. Görski, A. Dobrzyn, i M. Zendzian-Piotrowska, „The Sphingomyelin-Signaling Pathway in Skeletal Muscles and Its Role in Regulation of Glucose Uptake”, *Ann N Y Acad Sci*, t. 967, nr 1, s. 236–248, cze. 2002, doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb04279.x.

[128] C. Ma *i in.*, „Lipidomic Profiling Identifies Serum Lipids Associated with Persistent Multisite Musculoskeletal Pain”, *Metabolites*, t. 12, nr 3, s. 206, luty 2022, doi: 10.3390/metabo12030206.

[129] P. Gangoiti *i in.*, „Control of metabolism and signaling of simple bioactive sphingolipids: Implications in disease”, *Prog Lipid Res*, t. 49, nr 4, s. 316–334, paź. 2010, doi: 10.1016/j.plipres.2010.02.004.

[130] A. Gómez-Muñoz, P. Gangoiti, M. H. Granado, L. Arana, i A. Ouro, „Ceramide-1-Phosphate in Cell Survival and Inflammatory Signaling”, New York: Springer, 2010, s. 118–130. doi: 10.1007/978-1-4419-6741-1_8.

[131] S. Tan-Chen, J. Guitton, O. Bourron, H. Le Stunff, i E. Hajduch, „Sphingolipid Metabolism and Signaling in Skeletal Muscle: From Physiology to Physiopathology”, *Front Endocrinol (Lausanne)*, t. 11, sie. 2020, doi: 10.3389/fendo.2020.00491.

[132] LIPID MAPS, https://www.lipidmaps.org/, dostęp z dnia 02.08.2025.

[133] A. Takagi, „Lipid comosition of arcoplasmic reticulum of human skeletal muscle”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, t. 248, nr 1, s. 12–20, paź. 1971, doi: 10.1016/0005-2760(71)90069-5.