

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program : Biologie

Studijní obor : Biologie



**Využití stabilních izotopů ve vlasech k poznání  
výživy a migrace populací**

Use of stable isotopes in hair for understanding nutrition and population migration

**Anežka Tomášková**

Bakalářská práce

vedoucí práce : doc. RNDr. Jaroslav Brůžek, CSc., PhD.

Praha, 2015

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Jaroslavu Brůžkovi, CSc., PhD. za cenné rady, odbornou pomoc při psaní a za poskytnutí relevantní literatury. Dále mé díky patří rodině za její nekonečnou trpělivost a přátelům za pomoc se záludnou počítačovou technikou.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 12. 5. 2015

podpis

## **Abstrakt**

Nový rozměr v bioarcheologii, jak nahlížet na výživu, subsistenci a mobilitu lidí populací minulosti přináší analýzy stabilních izotopů zubů a kostí. Nicméně rovněž kvalitní informace o těchto jevech obdržíme studiem stabilních izotopů (uhlíku -  $\delta^{13}\text{C}$ , dusíku -  $\delta^{15}\text{N}$  nebo kyslíku -  $\delta^{18}\text{O}$  a snad i jiných) obsažených ve zvířecích chlupcích a lidských vlasech. Informace tohoto druhu obohacují nejen bioarcheologii, ale mají své místo i v jiných oborech souvisejících s antropologií, jako jsou forenzní vědy a medicína.

Práce podává základní přehled o principech stanovení obsahu stabilních izotopů v biologickém materiálu a ukazuje přednosti i nevýhody užití vlasů a chlupů. Na příkladech z bioarcheologie, forenzní medicíny a klinické medicíny jsou ukázány informace, které využívá analýza pro poznání výživy, mobility a geopůvodu.

**Klíčová slova:** izotopy, bioarcheologie, vlas, výživa, migrace, hmotnostní spektrometrie

## **Abstract**

The analysis of stable isotopes of teeth and bones shines a new light on bioarcheology, understanding of nutrition as well as mobility of mankind in past. However studying stable isotopes which can be found in animal or human hair (carbon –  $\delta^{13}\text{C}$ , nitrogen –  $\delta^{15}\text{N}$ , oxygen –  $\delta^{18}\text{O}$  and probably more) provide information of the same quality. This kind of information is not enriching only to bioarcheology, but also to other fields connected to antropology such as forensic science or medicine.

This paper delivers basic overview of principles of determining the content of stable isotopes in biological material and show advantages and disadvantages of using hair. Information which are used for further understanding of nutrition, mobility and geo-origins are demonstrated on examples from bioarcheology, forensic and clinical medicine.

**Keywords:** isotopes, bioarchaeology, hair, nutrition, migracion, mass spectrometry

## Obsah:

1. Úvod	1
2. Stabilní izotopy v antropologii a bioarcheologii k poznání výživy a migrací populací	2
3. Izotopy ve výzkumu výživy	7
3.1 kolagen a apatit	7
3.1.1 Stabilní izotopy uhlíku	8
3.1.2 Stabilní izotopy dusíku	10
4. Izotopy ve výzkumu migrace a původu	12
4.1 Stabilní izotopy kyslíku	12
4.2 Stabilní izotopy stroncia	13
5. Vlasy jako nástroj biologické antropologie současných populací	18
5.1 Lidský vlas	18
5.1.1 Růst vlasů a vliv prostředí	19
5.1.2 Ukládání do vlasové matrix	22
5.2 Měření izotopů v biologických materiálech pomocí hmotnostní spektrometrie	23
5.2.1 Princip měření a příprava vzorku	23
5.2.2 Ošetření vlasů pro potřeby izotopové analýzy	24
5.3 Chlupy savců	26
5.4 Lidské vlasy	27
5.4.1 Forezní využití	27
5.4.2 Medicinální Využití	30
6. Závěr	33
7. Seznam užitě literatury a internetové zdroje	34

## 1. Úvod

Ráda bych se v této práci věnovala možnostem využití izotopové analýzy vlasů. Na rozdíl od běžněji užívané analýzy kostí a zubů, je využití vlasů neinvazivní alternativou. Jak je z názvu této práce patrné, tato metoda je vhodná pro studium migrace a výživy jak u populací minulosti tak v přítomnosti. Poznání migrace, ať už zvířat či lidských populací, je asi nejvýznamněji spojeno s izotopem stroncia. Druhým, neméně důležitým ukazatelem pohybu z místa na místo, je stabilní izotop kyslíku. Pro potřeby výzkumu výživy jsou nejčastěji používány stabilní izotopy uhlíku a dusíku, které se dají stanovit jak z kosterních pozůstatků, tak u recentní populace například z vlasů (nehtů) či vydechovaného CO<sub>2</sub>.

První polovina práce je věnována obecnému přehledu izotopů, které se při izotopové analýze nejčastěji používají. Tuto část považuji za důležitou pro lepší pochopení problematiky. Následující oddíly shrnují metody a interpretace výsledků různých výzkumů izotopového signálu ve vlasech, které používají antropologové, ekologové či lékaři pro výzkum výživy, migrací a zdravotního stavu jedinců i populací.

Ve své práci představuji některé z mnoha zajímavých studií napříč obory. Pro mne jsou jedněmi z nejzajímavějších a nejrozmantějších práce z řady medicínálních a forezních věd.

## 2. Stabilní izotopy v antropologii a archeologii k poznání výživy a migrací

Jde o soubor atomů o stejném protonovém, nukleovém a neutronovém čísle. Označujeme jej nuklid (např.:  $^{16}_8\text{O}$ ). Většina chemických prvků se shoduje v protonovém čísle a naopak se liší v čísle neutronovém. Takové nuklidy, náležící ke stejnému prvku, nazýváme izotopické nuklidy, nebo-li izotopy (Hladíková, 1988).

Týž prvek může mít tedy několik izotopů (nejčastěji 1-4). Existuje na 329 nuklidů, z toho 273 je stabilním izotopem (jde o izotopy převážně lehkých prvků – uhlík, kyslík, síra) a 56 radioaktivním (nestabilním) izotopem (izotopy středně těžkých a těžkých prvků – stroncium, olovo) (Jelínek, Košler, Pačesová 1997, s. 7). Zároveň existuje řada izotopů vyrobených uměle. Síra má izotopy  $^{32}_{16}\text{S}$  (95%),  $^{33}_{16}\text{S}$  (0,75%) a  $^{34}_{16}\text{S}$  (4,2%) - údaje v procentech vyjadřují relativní přirozený výskyt v přírodě (viz. tab.1). Tato abundance je daná pro všechny izotopy.

Tab.1: Přehled výskytu jednotlivých stabilních izotopů vybraných prvků (Upraveno podle: Cotton, Wilkinson, 1973; Kubištová, 2011)

Prvek	Izotop	Výskyt v přírodě, v %
uhlík	$^{12}\text{C}$	98,98
	$^{13}\text{C}$	1,02
dusík	$^{14}\text{N}$	99,63
	$^{15}\text{N}$	0,37
kyslík	$^{16}\text{O}$	99,76
	$^{17}\text{O}$	0,04
	$^{18}\text{O}$	0,20
síra	$^{32}\text{S}$	95,02
	$^{33}\text{S}$	0,75
	$^{34}\text{S}$	4,21
	$^{36}\text{S}$	0,02
stroncium	$^{84}\text{Sr}$	0,56
	$^{86}\text{Sr}$	9,86
	$^{87}\text{Sr}$	7,00
	$^{88}\text{Sr}$	82,58

U jednotlivých izotopů je rozdíl v relativní atomové hmotnosti, což celkově ovlivní relativní hmotnost celého prvku. Jeden prvek může zároveň obsahovat jak stabilní, tak nestabilní izotopy. Např.:  $^{14}\text{C}$  je radioaktivní a poločas rozpadu je 5 730 let a používá se k radiokarbonovému datování, naopak  $^{12}\text{C}$  (98,9%) a  $^{13}\text{C}$  (1,1%) jsou stabilní a jejich zastoupení v přírodě se jeví spíše konstantní (Kovačiková, Brůžek, 2008).

Izotopová analýza, ať už vlasů, zubů či kostí, se vždy vztahuje ke standardu (viz. tab. 2). Různé standardy se pro dané izotopy liší.

Tab. 2: Izotopové standardy (Upraveno podle: Kovačiková, Brůžek, 2008)

Izotopy	Český název standardu	Mezinárodní název standardu
$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	Průměrná hodnota oceánské vody	Standard Mean Ocean Water (SMOW standard)
$^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$	Atmosferický dusík	Atmospheric nitrogen standard
$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	Fosilní mořský vápenec v Jižní Karolíně	Pee Dee Belemnite (PDB standard)
<b>S</b>	Trolit (FeS) z meteoru	Canyon Diablo standard

Poměr izotopů (značený R) při výzkumu je poměrem těžšího izotopu k lehčímu.

Příklad zápisu pro izotopy uhlíku:  $R^{13}\text{C} = {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$ . Změny poměru izotopů jsou minimální. Izotopové složení vzorku se vyjadřuje jako relativní odchylka poměru těžšího a lehčího izotopu ve vzorku a standardu k poměru těžšího a lehčího izotopu ve standardu. Viz rovnice (Dawson et al, 2002):

$$\delta = (R_{\text{vz}} - R_{\text{stand.}}) / R_{\text{stand.}} \rightarrow \delta = (R_{\text{vz}} / R_{\text{stand.}}) - 1$$

$$\delta [‰] = [(R_{\text{vz}} / R_{\text{stand.}}) - 1] * 1000$$

*„Izotopový efekt ( $\alpha$ ) je způsoben rozdílnými fyzikálními nebo chemickými vlastnostmi, které vyplývají z rozdílů v atomové hmotnosti. Jedná se o kinetický izotopový efekt a rovnovážný izotopový efekt. Kinetický izotopový efekt je spojen s nepřímými, ireverzibilními procesy jako je evaporace, difuze, disociační reakce. Je následkem různých rychlostí přesunu různých izotopů*

(např.  $^{12}\text{CO}_2$  nebo  $^{13}\text{CO}_2$ ). Rovnovážný (termodynamický) izotopový efekt je způsoben vlivem hmotnosti na termodynamické vlastnosti molekul, tzn. vliv hmotnosti na pevnost vazeb v chemické sloučenině. Molekuly obsahující těžký izotop jsou stabilnější než molekuly s lehkým izotopem.“ (Kubištová, 2011: 1)

Izotopové složení lze nalézt také pod pojmem izotopová diskriminace. Zavedení vyjádření izotopové diskriminace pomocí  $\Delta$  umožnilo lepší porovnávání vzorků. Výhoda této metody spočívá v tom, že je nezávislá na standardu a je možné ji použít při sériových pokusech. Viz rovnice (Dawson et al., 2002; Kubištová, 2011):

$$\Delta [‰] = (\alpha - 1) * 1000 = [(R_s / R_p) - 1] * 1000$$

$$\Delta [‰] = (\delta_s - \delta_p) / [1 + (\delta_p / 1000)]$$

Ve studiích s obohacným materiálem (přidání značkovací substance tzv. traceru) se rovnice modifikuje. Protože izotopové složení se vymyká jakékoli přirozené úrovni, používá se k vyjádření "atomové procento" (Ab), které je definováno jako :

$$Ab = X_{\text{heavy}} / (X_{\text{heavy}} + X_{\text{light}}) = 100 * [R_{\text{sample}} / (R_{\text{sample}} + 1)]$$

(Dawson et al., 2002; Kubištová, 2011)

Jak je uvedeno výše, poměr izotopů se vyjadřuje jako podíl vzácnějšího, těžšího izotopu k izotopu běžnějšímu, lehčímu, např.  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  nebo zkráceně  $\delta^{13}\text{C}$ . Takto se zapisují i nejpoužívanější izotopy v archeologii a antropologii: poměr izotopů dusíku  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ , kyslíku  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ , síry  $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$  (Kovačiková, Brůžek, 2008, s. 43).

Obsah izotopů se v laboratořích stanoví hmotnostním spektrometrem, který měří poměr těžšího a lehčího izotopu ve vzorku a srovnává jej s tímž poměrem u mezinárodního standardu (Katzenberg, 1992, s. 106). To je nezbytné proto, že změny poměrů izotopů jsou jen minimální a vyjadřuje se jejich relativní změna.



Např. zápis pro izotopy uhlíku by vypadal následovně:

$$\delta^{13}\text{C} [\text{‰}] = \left( \frac{{}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}_{\text{vzorek}}}{{}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}_{\text{st}}} - 1 \right) * 1\,000$$

Vzorky, které obsahují více těžkého izotopu, se označují jako obohacené a mají hodnotu  $\delta X$  větší než nula. Vzorky s menším obsahem těžkého izotopu se označují jako ochuzené a hodnota  $\delta X$  je záporná (*Procházka, 2006; Lajtha, Michener, 1994*).

Počátkem 60. let 20. století byl objeven potenciál stabilních izotopů pro určení migrací, o necelých deset let později se izotopy začaly využívat také pro sledování výživy (*Kovačiková, Brůžek, 2008*). Analýza stopových prvků byla předchůdkyní analýzy izotopové, avšak u této metody dochází často ke kontaminaci stopovými prvky z prostředí, proto je izotopům dávána ve výzkumu přednost - jsou tzv. odolné proti postdepozičním změnám (*Kovačiková, Brůžek, 2008*).

Izotopy mají shodné chemické vlastnosti, ale rozdíl ve hmotnosti dovoluje fyzikálním, chemickým a biologickým procesům zvýhodňovat jeden z izotopů, čímž předávají environmentální signál (*McCarroll, Loader, 2004*).

Izotopy se přirozeně vyskytují okolo nás – v atmosféře, ve vodě, v půdě. Odtud pak vstupují do rostlin, skrze ně do býložravců atd. Díky tomuto potravnímu řetězci lze pomocí izotopové analýzy určit nejen historické životní prostředí, ale také migrace obyvatel a jejich stravovací návyky (závislost na mořské či suchozemské potravě, rostlinné a živočišné zdroje) (*Katzenberg 1992*). Rozdílné vnější podmínky (např. změny tlaku či teploty) během nichž izotopy vstupují do chemických reakcí mohou způsobit měřitelné změny v izotopovém složení prvků (rozdílné zastoupení  $\delta^{13}\text{C}$  a  $\delta^{14}\text{C}$  u rostlin ve vyšších nadmořských výškách oproti rostlinám z nížin). Studium těchto změn v izotopovém signálu nám poskytuje jasnější informace o řadě procesů provázejících život organismů.

Multielementární analýzu izotopů lze v bioarcheologii využít při rekonstrukci stravy (*Arnay-de-la-Rosa et al., 2009*), laktačního období (*Reynard, Tuross, 2014*), geografického původu (*Burton et al., 2003, Bentley et al., 2003*), trofické

úrovně organismů (*Blum et al., 2000*) nebo u kontaminace těžkými kovy (*Budd et al., 1998*). Kromě bioarcheologie je však rovněž zajímavé využití izotopů pro pochopení výživy a s tím spojeného zdraví a nemoci u recentních populací. Příkladem takového využití izotopů může být například tzv. capnografie spojená s izotopovou analýzou. Jde o vyšetření vydechovaného CO<sub>2</sub> pomocí izotopové analýzy, jako důkaz probíhajícího akutního (např. celotělového) zánětu, který by v krvi byl prokazatelný až za několik desítek hodin (*Bütz et al, 2013*).

### 3. Izotopy ve výzkumu výživy

Pro potřeby výzkumu výživy jsou nejčastěji používány stabilní izotopy uhlíku a dusíku, které se dají stanovit jak z kosterních pozůstatků (kostí a zubů), tak u recentní populace například z vlasů (nehtů) či vydechovaného CO<sub>2</sub>. Dříve než se budeme věnovat speciálním otázkám použití vlasů a chlupů, představím zde obecné principy využití izotopů z tradičních materiálů jako jsou kosti a zuby.

#### 3.1 kolagen a apatit

Vzorky pro izotopovou analýzu ve výzkumu migrace a výživy minulých populací jsou zpravidla odebírány z kostí či zubů. Izotopové složení kostí i zubů se nejčastěji stanovuje z organické složky – z bílkoviny. Nejvíce využívanými jsou stabilní izotopy uhlíku, kyslíku, dusíku, stroncia a síry.

Pokud jako zkoumaný materiál využijeme např. zuby, máme k dispozici sklovinu, která je z 97% minerální, tvořená hydroxyapatitem ( $\text{Ca}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_6$ , přičemž -OH skupina může být nahrazena), a dřeň, ta je minerální ze 75% a zbylých 25% tvoří část organická, tedy kolagen (Konrádová, Vajner a Uhlík, 2005).

Mineralizace zubu probíhá v rané ontogenezi, zuby tedy v sobě konzervují látky ze začátku našeho života. Můžeme z nich odhadnout dobu laktace, přibližné místo narození a podmínky panující při narození (Arnay-de-la-Rosa et al., 2009; Reynard, Tuross, 2014; Burton et al., 2003; Bentley et al., 2003).

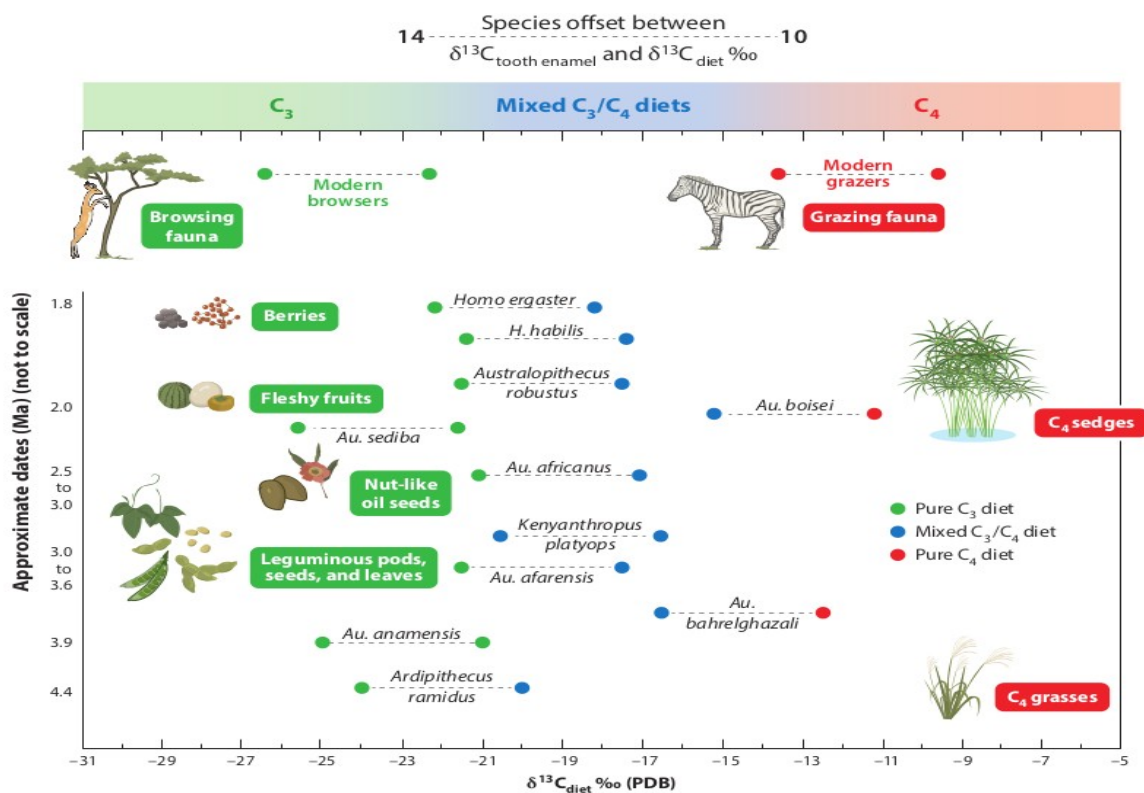
Naopak, vybereme-li si ke studiu kost, dostaneme „současné“ informace. Kost je ze 70% minerální a z 30% organická (Konrádová, Vajner a Uhlík, 2005). Je tedy stejně jako zub tvořena hydroxyapatitem a kolagenem. Remodelace probíhá po celý život a uchovává v sobě informace několika posledních let před úmrtím. Pokud porovnáme informace z analýzy zubů a kostí, jsme schopni říci, co se s daným člověkem v období narození a smrti dělo a tedy, zda došlo k významnějším změnám ve stravování či k migraci.

Chceme-li analyzovat například kyslík, musíme z kosti či zubu odebrat přibližně 50mg hydroxyapatitu nebo 100mg kolagenu (Kovačiková, Brůžek, 2008).

### 3.1.1 Stabilní izotopy uhlíku

Stabilní izotopy uhlíku jsou zkoumány jak v kostech a zubech, tak ve vlasech pro poznání výživy. Hodnoty  $\delta^{13}\text{C}$  jsou nejčastěji záporná čísla v rozmezí -30 až -10 ‰. Hodnota naměřeného  $\delta^{13}\text{C}$  odráží postavení organismu v potravním řetězci, ale také ekologické faktory na organismus působící. Hodnota  $\delta^{13}\text{C}$  je přímo úměrná růstu teploty, se stoupající vlhkostí bude naopak klesat (Van Klinken et al., 1994). Pokud budeme studovat rostliny nacházející se nad 1000m nad mořem, setkáme se u nich s adaptací na snížený parciální tlak a jejich pletiva jsou tedy o několik  $\delta^{13}\text{C}$  ‰ obohacena. V některých výjimečných případech výhradních konzumentů tropických trav lze narazit i na kladné hodnoty  $\delta^{13}\text{C}$  (Schoeninger, 2014; Kovačiková, Brůžek, 2008).

Ve výzkumu lidských populací je uhlík výborným ukazatelem stravovacích návyků. Z daného izotopového zastoupení v těle lze určit, zda se populace živila na C3 či C4 (případně CAM) bohatou stravou (viz. obr. 1).



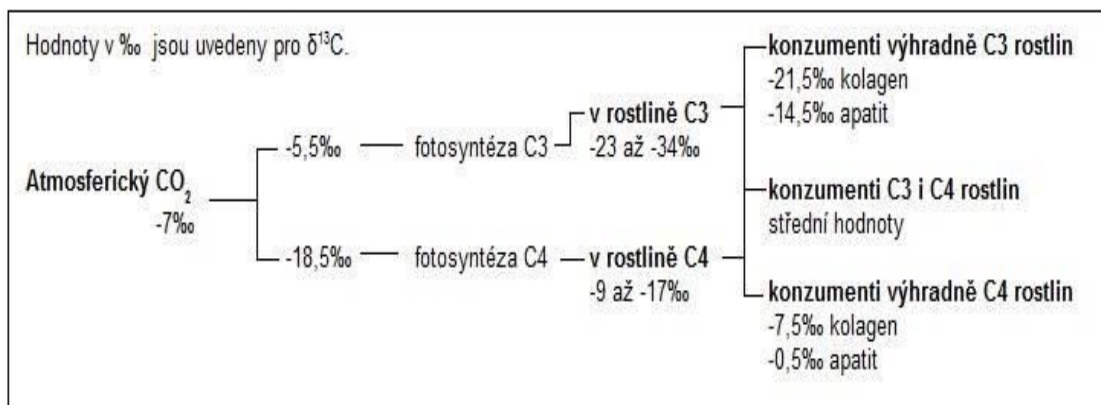
Obr. 1: Přehled živočichů stravujících se potravou bohatou na C3 a C4 rostliny. (Převzato z: Schoeninger, 2014).

Příčemž C3, C4 a CAM je označení pro tři různé typy rostlin s odlišným průběhem fotosyntézy (Schoeninger, 2014). C3 rostliny mají nižší obsah  $\delta^{13}\text{C}$ , než-li rostliny typu C4 (viz. obr. 1). Patří mezi ně většina druhů rostlin, jako např. stromy, keře, traviny chladnějších oblastí, byliny a další... tedy většina rostlin mírného pásu. Jejich  $\delta^{13}\text{C}$  hodnoty se pohybují v rozsahu -23 až -34‰, tato hodnota negativně koreluje s průměrnými ročními srážkami, a nepřekrývá se s hodnotou C4 rostlin (Schwarcz, Schoeninger, 2012). Nejnížší hodnoty  $\delta^{13}\text{C}$  mají rostliny rostoucí ve stínu stromů se zapojenou korunou, vyšší hodnoty jsou spojeny s otevřenými stanovišti (Gannes, O'Brien, del Rio, 1997).

Do C4 rostlin patří mnoho druhů trav a některé ostřice (Peters, Vogel, 2005) a dále např. kukuřice, pšenice, čirok nebo cukrová třtina (Kovačiková, Brůžek, 2008). Hodnoty  $\delta^{13}\text{C}$  jsou v rozsahu -9 až -17‰.

Třetí možností jsou rostliny typu CAM, CAM cyklus zahrnuje kaktusy a jiné sukulenty s  $\delta^{13}\text{C}$  hodnotami, které mohou spadat mezi C3 a C4 rostliny, nebo se kryjí s hodnotami C4 rostlin (Schwarcz, Schoeninger, 2012).

Díky tomuto rozdílu ve zpracování uhlíku v rostlinách je následně patrné jejich zastoupení ve výživě lidí a zvířat (viz. obr. 2).



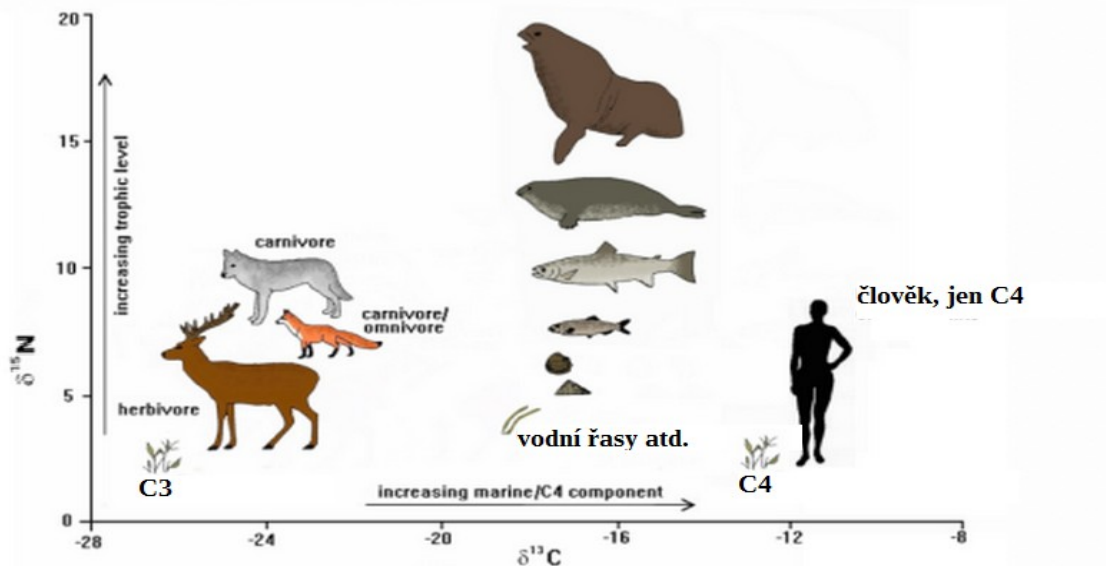
Obr. 2: Množství izotopu  $\delta^{13}\text{C}$  v potravním řetězci v závislosti na typu fotosyntézy u rostlin typu C3 a C4. (Vlastní, upraveno podle: Kovačiková, Brůžek, 2008; respektive Tykot 2004) .

### 3.1.2 Stabilní izotopy dusíku

Hodnoty dusíku, vyskytujícího se v rostlinách, jsou silně závislé na způsobu příjmu a na celkovém metabolismu rostliny. V průměru se hodnoty u luštěnin  $\delta^{15}\text{N}$  blíží nule, protože luštěniny závisí na fixaci vzdušného dusíku pomocí dusíkatých bakterií ( $\delta^{15}\text{N} = 0\text{‰}$ , podle definice), na rozdíl od zbytku rostlin, které přijímají dusík z půdy, kde  $\delta^{15}\text{N}$  hodnoty jsou okolo 3-7‰.

V hodnotách  $\delta^{15}\text{N}$  hraje svou úlohu také klima. Velmi teplé podnebí (Sahara) vykazuje hodnoty prokazatelně vyšší než např. mírný pás (Lajtha, Michener, 1994).

Býložravci mají hodnoty  $\delta^{15}\text{N}$  o 3‰ vyšší než rostliny, kterými se živí a rozdíl mezi býložravci a masožravci činí taktéž 3‰ (Schwarcz, Schoeninger, 2012, Schoeninger, 2014). Obecně se tedy každý trofický schod potravní pyramidy odrazí na  $\delta^{15}\text{N}$  v podobě zvýšení o 2-3‰. Mořští živočichové mají vyšší obsah  $\delta^{15}\text{N}$  jak živočichové suchozemští (viz. obr. 3), díky čemuž se dá prokázat závislost populace na moři jakožto jediném (či významném) zdroji potravy (Touzeau et al., 2014).



Obr. 3: Poměr v zastoupení  $\delta^{15}\text{N}$  a  $\delta^{13}\text{C}$  u suchozemských a mořských živočichů. (Převzato z: <https://bonesdontlie.wordpress.com/2014/04/15/what-did-genghis-khan-eat-assessing-the-elite-mongolian-diet/> [cit. 2015-04-18], upraveno).

Díky rozdílnému množství  $\delta^{15}\text{N}$  v mase a rostlinách je dusík ideálním ukazatelem živočišné stravy. Dusík se zabudovává do kolagenu a  $\delta^{15}\text{N}$  je tedy detekovatelný jak z kostí a zubů, tak z vlasů. V případě recentních populací se analýza  $\delta^{15}\text{N}$  ve vlasech jeví jako ideální ukazatel stavu výživy u vegetariánů, kteří často trpí nedostatkem bílkovin (*Schwarcz, Schoeninger, 2012; Webb, White, Longstaffe, 2013; Huang, Nkrumah, Appiah-Sefah, 2013*).

Vyšší obsah  $\delta^{15}\text{N}$  má také mateřské mléko, lze tedy určit délku laktace a přibližný věk odstavení dítěte, což se projeví náhlým poklesem hodnot  $\delta^{15}\text{N}$  (*Reynard, Tuross, 2014*).

## 4. Izotopy ve výzkumu migrace a původu

Poznání migrace, ať už zvířat či lidských populací, je asi nejvýznamněji spojeno s izotopem stroncia. Druhým, neméně důležitým ukazatelem pohybu z místa na místo, je stabilní izotop kyslíku. Stroncium, jakožto izotop těžkého prvku, bude probráno později.

### 4.1 Stabilní izotopy kyslíku

Pro výzkum migrací a původu, ať už lidí či zvířat, je velmi často využíváno izotopu kyslíku  $^{18}\text{O}$ . Kyslík je přítomný jednak v atmosféře a jednak ve vodě. Odtud je zabudováván do kostí a zubů v podobě uhličitanových minerálů ( $\text{CO}_{3,2}$ ) a fosforečnanových ( $\text{PO}_{4,3}$ ) iontů.

Koloběh vody a obsah vody v prostředí silně ovlivňuje výsledné izotopové složení organismu. Je rozdíl mezi jezery, řekami a ledovci. Množství  $^{18}\text{O}$  ve srážkové vodě klesá v závislosti na teplotě, zvyšující se nadmořské výšce a vzdálenosti od moře. Proto i podle  $\delta^{18}\text{O}$  dokážeme rekonstruovat migrační cesty ryb a savců (*Kirsanow, Tuross, 2011*).

Variabilitu hodnot dále zvyšují klimatické podmínky jako třeba roční teplota a množství srážek. Studium paleoklimatických jevů přineslo poznatek, že rozdíl  $\delta^{18}\text{O}$  o 1 promile odpovídá změně teploty prostředí zhruba o  $2,6\text{ }^{\circ}\text{C}$  (*Yurtsever a Gat 1981*). Změna v obsahu  $^{18}\text{O}$  je patrná také mezi rostlinami typu C3 a C4 v závislosti na jiném druhu fotosyntézy. V aridních oblastech dosahují rozdíly mezi C4 a C3 rostlinami až 10 promile (*Bowen, Wassenaar, Hobson, 2005*).

Ke změnám dochází také v rámci jediné rostliny. V kořenech je typicky podobný obsah  $^{18}\text{O}$  jako v půdě (srážkové vodě), v listech (zabudován do celulózy) se obsah  $^{18}\text{O}$  zvyšuje (*Kirsanow, Tuross, 2011*).

Kyslík se běžně používá při sledování migrací zvířat. Je dále použitelný ve výzkumu mobility lidských populací dávnověku. U recentních populací však už není takové využití téměř možné. Globalizace, s nástupem balených vod, dovážených z různých koutů země, zamezila možnosti zkoumat mobilitu u dnešních populací.



## 4.2 Stabilní izotopy stroncia

Izotopy stroncia jsou izotopy těžkého prvku, což znamená, že stroncium je silně reaktivní a v přírodě ho nalézáme jen v podobě sloučenin s mocenstvím  $\text{Sr}^{+2}$ . Stroncium se v přírodě vyskytuje v podobě čtyř izotopů ( $^{84}\text{Sr}$  (0,56 %),  $^{86}\text{Sr}$  (9,86 %),  $^{87}\text{Sr}$  (7,0 %) a  $^{88}\text{Sr}$  (82,58 %)) (Cotton, Wilkinson 1973).

Izotop  $^{87}\text{Sr}$  v přírodě vzniká beta rozpadem izotopu rubidia  $^{87}\text{Rb}$ , proto se mu říká radiogenní. Pomocí poměrů množství izotopů  $^{87}\text{Sr}$ ,  $^{86}\text{Sr}$  a  $^{87}\text{Rb}$  se dá odhadnout i stáří hornin či samotného Vesmíru (Bentley, 2006).

Z důvodu reaktivity je zpracování stroncia poněkud odlišné od ostatních dříve zmíněných izotopů. Stroncium je dále zajímavé svým využitím. Téměř nepodléhá diagenézi. Výskyt jeho izotopů je silně vázán na prostředí a je tedy skvělým nástrojem nejen k odhalení výživy, ale především k určení migrace.

Analýza stroncia za účelem výzkumu výživy je velmi často vázána na analýzu vápníku (viz. tab. 3). Jejich poměr je ukazatelem přibližného složení potravy (Prokeš et al., 2004; Bentley, 2006). Stroncium přispívá k určení zastoupení rostlinné stravy, vstupuje do potravního řetězce na úrovni rostlin. Ty ho absorbují z půdy v podobě solí společně s vápníkem. Směrem vzhůru v potravním řetězci jeho množství klesá. Je to dáno především tím, že se stroncium zabudovává do kostí na místo vápníku. Valná většina stroncia tedy zůstává v kostech a nepostupuje dál v potravním řetězci (Schoeninger, Moore, 1992).

Metabolismus stroncia a vápníku je do jisté míry shodný, proto lze použít pro porovnání zastoupení rostlinné a živočišné stravy. Dostaneme však jen velmi hrubou představu o složení potravy (viz. tab. 3).

Vzájemný vztah mezi poměry  $\text{Sr}/\text{Ca}$  v kosti a potravě vyjadřuje rovnice  $(\text{Sr}/\text{Ca})_{\text{kost}} = 0,25 \times (\text{Sr}/\text{Ca})_{\text{potrava}}$  (Bentley, 2006).

Tab.3: Poměry Sr/Ca pro různé potraviny (Převzato z Prokeš et al., 2004)

	(Sr/Ca) <sub>potrava</sub> x 10 <sup>-3</sup>		(Sr/Ca) <sub>potrava</sub> x 10 <sup>-3</sup>
<b>Obiloviny</b>	4,57	<b>Kravné mléko</b>	0,24
<b>Mouka</b>	2,15	<b>Lidské mléko</b>	0,06
<b>Mrkev</b>	4,31	<b>Sýr</b>	0,55
<b>Kapusta, zelí</b>	2,19	<b>Maso (savci)</b>	0,58
<b>Luštěniny</b>	2,67	<b>Slepičí vejce</b>	1,00

Stroncium vstupuje do potravního řetězce na úrovni rostlin. Ty ho absorbují z půdy společně s vápníkem. Směrem vzhůru v potravním řetězci jeho množství klesá (viz. obr. 4). S každým dalším trofickým stupněm se obsah  $\delta^{87}\text{Sr}$  snižuje. Tento jev je dán především faktem, že stroncium se zabudovává namísto vápníku do kostí živočichů a tedy v mase, které konzument vyššího řádu přijme, se nachází pouze +/- 0,9% z celkového množství (Burton et al., 2003). Proto obsah stroncia v kostech masožravců je nižší než u býložravců.

Díky tomu se poměr Sr/Ca často využívá v ekologii, při studiu trofických úrovní a provázanosti potravních řetězců (Bentley, 2006; Blum et al., 2000). Tyto poměry mohou být také použity k identifikaci trofické úrovně z níž organizmus primárně čerpá potravu.

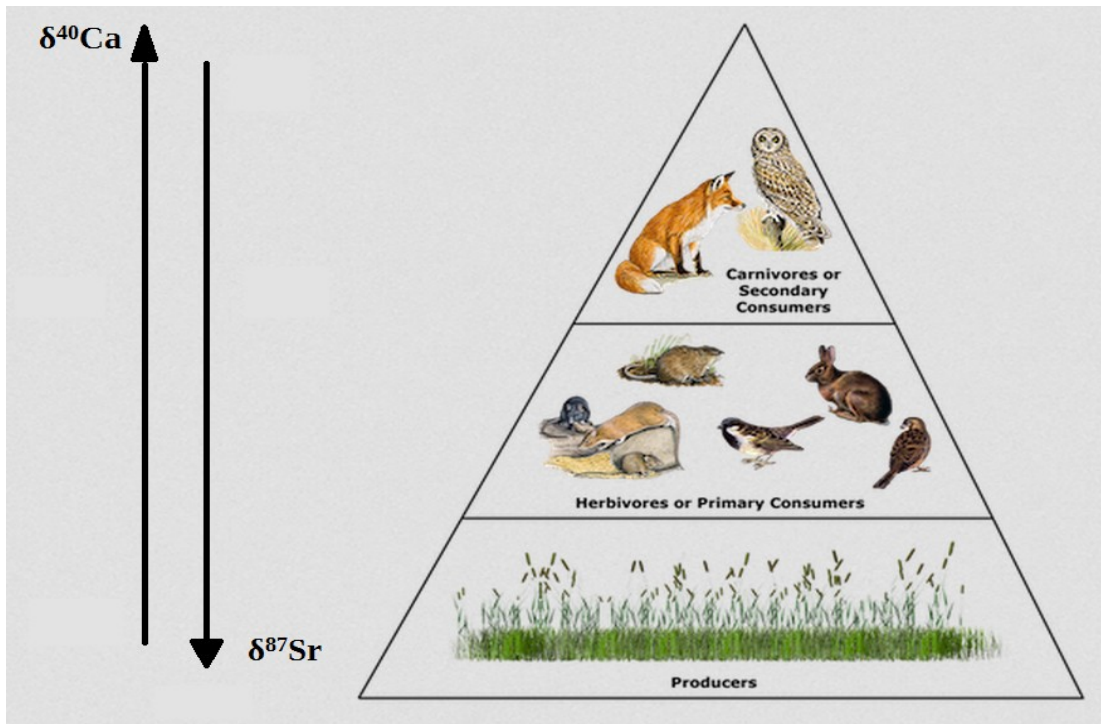
Burton et al. (2003) provedl rozsáhlou studii, v níž zaznamenal koloběh stroncia. Hodnoty zjištěné analýzou solí, vody, rostlin, kostí býložravců a masožravců odráží postupné zvyšování zastoupení masité stravy.

„Po tisících jednotlivých analýzách půd, vod, rostlin, zvířecích a lidských kostí, Burton et al. (2003) stanovil rozmezí +/- 0,0940 pro Sr/Ca v půdách, +/- 0,00957 v rostlinách, +/- 0,00090 v kostech herbivorů a +/- 0,00036 v kostech carnivorů.“ (Bently, 2006: 154)\*.

---

\*původní text z Bentley, 2006: 154 : „After thousands of individual analyses of soils, water, plants, animal bones and human bones, Burton et al. (2003) found rangers of +/- 0,0940 for Sr/Ca in soils, +/- 0,00957 for plants, +/- 0,00090 for herbivore bones and +/- 0,00036 fot carnivore bones.“

Výsledky různých studií poskytují důkazy podporující využití poměru Sr/Ca při stanovení lidských paleo-diet a poukazují na možnost využití tohoto poměru při studiu moderních potravních sítí (Blum et al., 2000). Analýza stroncia z kostí zdravého jedince může zobrazit zdroj potravy až 5 let zpátky (Smrčka, 2005). Vyšší hodnoty stroncia tedy odráží vyšší příjem rostlinné stravy a nižší hodnoty reprezentují vyšší přísun živočišných proteinů.



Obr. 4: Trofické úrovně s naznačením změny v poměru Sr/Ca. (Upraveno podle: Blum et al., 2000; převzato z: <http://www.mrsapora.com/day-9---215.html> [cit. 2015-04-18]).

Při rekonstrukci stravy je ovšem nutno mít na paměti, že konzumováním měkkýšů, mořských koryšů a ořechů obsah stroncia v kostech vzrůstá. Navíc se také mění s věkem.

Poměrně nízký obsah stroncia mají novorozenci, a to až do konce kojení. Množství stroncia silně stoupá během růstu a vývoje, dále pak u těhotných a kojících žen. Analýza obsahu stroncia by proto měla být omezena jen na dospělé členy populace (Burton et al., 2003; Bentley, 2006).

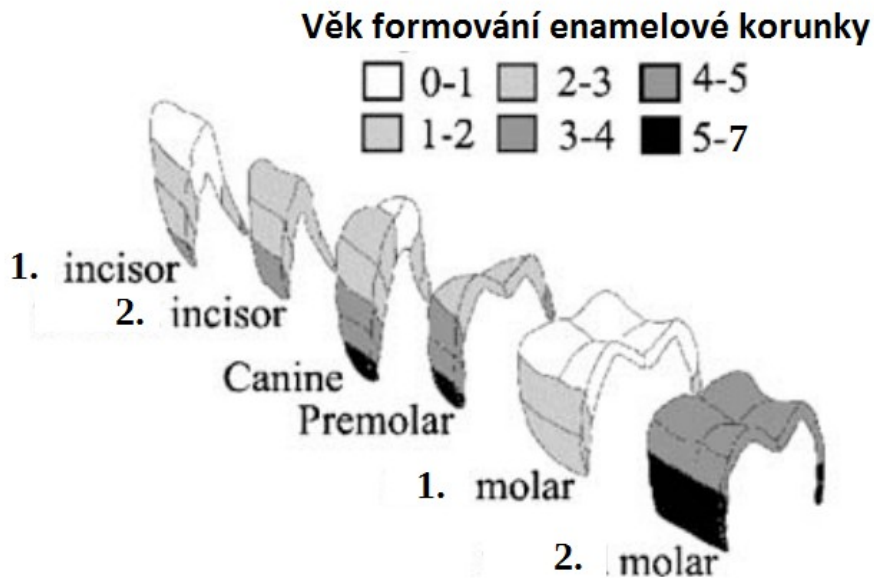
Sledování změn  $\delta^{87}\text{Sr}$  se často využívá při vytváření trofických úrovní organismů. Čím výše se organismus v potravní pyramidě nachází, tím menší je obsah stroncia v jeho kostech.

Kromě zmíněného využití stroncia ve výzkumu výživy je mnohem zajímavější a podstatnější jeho využití pro potřeby určení migrace a původu. Stroncium v zásadě slouží jako geochemický podpis místa. Jak bylo řečeno, stroncium se zabudovává do kostí a zubů na místo vápníku. Pokud tedy provedeme analýzu kosterních pozůstatků, a porovnáme  $\delta^{87}\text{Sr}$  z kosti a zubu, jsme schopni říci, zda daná populace migrovala, či zda žila přisedle po celou dobu své existence (Bentley, 2006). Byla vypracována geochemická mapa země s daným zastoupením izotopů stroncia vztaženým ku standardu (PDBstandard). Na Zemi jsou různá místa napříč kontinenty, která díky horotvorné činnosti v prehistorii mají jiný  $\delta^{87}\text{Sr}$ . Tento gradient nám umožňuje spojit kosterní pozůstatky s místem, odkud daná osoba pochází (Burton *et al.*, 2003; Bentley, 2006). V Evropě například existuje rozdíl mezi koncentrací izotopů stroncia u velmi starých pohoří, jako jsou francouzské Vogézy či německý Černý les, a u velmi mladých Alp, coby zdroje vody Rýna. Bohužel, tyto gradienty nejsou zdaleka všude (Kovačiková, Brůžek, 2008).

Další možností je analýza kostí malých zvířat. Nejlépe se hodí malá domácí zvířata s krátkou generační dobou nebo s obdobnou stravou a velikostí odpovídající člověku.

Pomocí analýzy kostí malých živočichů lze určit lokální izotopový signál krajiny. Tento lokální gradient stroncia v kostech malých zvířat nám umožňuje sledovat migraci populací. Obsah stroncia u malých živočichů odráží lokální signál a může sloužit jako podklad pro stanovení obsahu stroncia u vyšších savců. Pokud tedy porovnáme obsah stroncia z kosterních vzorků místní fauny stejného stáří s obsahem v zubech sledovaného jedince/populace, jsme schopni přibližně určit zda je místo úmrtí i místem narození, či nikoli (Bentley, 2006). Dá se také vysledovat, zda došlo k jednomu či k více přesunům. Pokud existuje rozdíl mezi jednotlivými zuby jedince, existuje i rozdíl v prostředí, které v době mineralizace jednotlivých typů zubů obýval (viz. obr. 5).

Pokud budeme naopak srovnávat naměřené hodnoty u malých zvířat s hodnotami z nalezených kostí, můžeme říci, zda místo hrobu odpovídá poslednímu místu usídlení nebo zda byly ostatky přemístěny (*Prokeš et al., 2004*).



Obr. 5: Věk utváření enamelové korunky u jednotlivých typů zubů. (Převzato z: *Bentley, 2006*, upraveno)

Avšak, pokud se dvě místa od sebe v zastoupení stroncia neliší, nelze tento izotop pro sledování migrace využít. Velkým problémem při sledování poměru  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  je také kontaminace recentními antropogenními zásahy do prostředí (hnojení) a tedy ovlivnění lokálních izotopových signálů (*Bentley, 2006; Kovačiková, Brůžek, 2008*).

## 5. Vlasy jako nástroj biologické antropologie současných populací

Cílem této kapitoly je shrnout poznatky dosavadní práce s izotopovou analýzou vlasů. Zabývat se bude především jejím použitím v praxi.

Jakožto relativně nová metoda se vlasová analýza používá stále častěji a má stále větší možnosti využití. Největší potenciál se zdá být ve využití pro toxikologické účely a v medicíně. Problémem zůstává vysoká cena provedení a zatím ne zcela jasně definovaná pravidla pro postup při přípravě vzorku (Procházka, 2006).

Tato analýza je vhodná jak pro studium výživy minulých populací, tak studie populací recentních (ať už lidských či zvířecích). Poskytuje nám údaje o kratším časovém období, než analýzy jiných tkání (Katzenberg et al., 2000). Postupný růst vlasu nám umožňuje zaznamenávat změny ve stravování v průběhu měsíců a sekvenční analýza vlasového keratinu nám poskytuje vhled do stravovacích návyků a celkového metabolismu jedince (Yan et al., 2013; Huelsemann et al., 2009).

### 5.1 Lidský vlas

Vlasy (v textu dále používáno i ve smyslu chlup) jsou přítomny téměř u všech savců a zastávají termoregulační funkci. Vlas je derivát pokožky tvořený keratinem. Lidský vlas se skládá ze dvou částí, ze stvolu nad a z kořene pod pokožkou. Kořen se dále dělí na vlasovou cibulku a zbytek kořene, přičemž cibulka je kryta dvěma epitelovými a jednou vazivovou pochvou. Celé toto uskupení je nazýváno vlasovým folikulem, jehož součástí jsou i mazové a potní žlázy spolu s cévním zásobením (Harkey, 1995).

Vlasový stvol se skládá ze tří částí :

Z kutikuly, nejsvrchnější vrstvy, tvořící přirozenou ochranou vrstvu před vnějším prostředím. Mazová žláza konzervuje tuto vrstvu vlasovým mazem a ta je pak méně propustná pro škodliviny a vodné roztoky. Skládá se z 5-10 souběžně a stříškovitě poskládaných odumřelých buněk (tzv. šupin), které k sobě přiléhají. Jednotlivé buňky se z 1/7 překrývají a s osou vlasu tvoří uhel cca

18°. Jednotlivé vrstvy kryje jemná membrána a navzájem propojuje proteinový a lipidový tmel (*Harkey, 1995; Konrádová, Vajner a Uhlík, 2005; Kučerová, Bienová, 2012*).

Z kortexu, střední části vlasu. Tato část představuje 75-80% vlasové hmoty. Vlasový kortex je uspořádán z makrofibril (ty jsou kruhovitě složené z mikrofibril), které se pravidelně kruhovitě seskupují. Toto seskupení makrofibril se nazývá ortokortex. Při barvení a odbarvování (ale i dalších chemických úpravách vlasu) se pravidelné uspořádání mění v uspořádání nepravidelné – parakortex. Tyto dvě struktury se liší fyzikálně, ale i chemicky (ve složení aminokyselin a v reaktivitě). V kortexu se nachází pigmentová zrna, jejichž složení dává vlasu barvu a množství odstín (*Harkey, 1995; Kučerová, Bienová, 2012*).

Z medully, centrální části. U dlouhých vlasů je jen u kořínků, ve vousech je naproti tomu velmi dobře vyvinuta. Má nepravidelný hvězdicovitý tvar. Keratin zde má houbovitou strukturu s mnoha dutinkami. Obsahuje asi 3,5 % lipidů. A má jiné chemické složení než keratin kortex (*Harkey, 1995; Konrádová, Vajner a Uhlík, 2005; Kučerová, Bienová, 2012*).

### **5.1.1 Růst vlasů a vliv prostředí**

Množství vlasů, barva a jejich typ se řídí mnoha faktory. Nejdůležitějšími jsou věk, pohlaví a etnická příslušnost. U zvířat pak ještě sezónní změny v množství srsti. Regulace růstu je řízena hormony, růstovými faktory, cytokiny, léky a mnohými dalšími látkami. Vlasy, stejně tak i další kožní deriváty, jsou tedy odrazem vnitřního prostředí a jejich stav a složení může signalizovat různá vnitřní onemocnění (*Kučerová, Bienová, 2012*).

Vlas se skládá z dermálních a epiteliárních částí. Epiteliární část se skládá z matrix, medully, kortexu, kutikuly, vnitřní a zevní epitelové pochvy. Nejdůležitější je zevní epitelová pochva folikulu. Obsahuje multipotentní kmenové buňky, díky nimž vlas opakovaně vyrůstá ze stejného místa. Tomuto procesu se říká vlasový cyklus (*Saitoh, Uzuka, Sakamoto, 1970; Kučerová, Bienová, 2012*). Dermální část obsahuje papilu a vazivovou pochvu (*Harkey, 1993*).

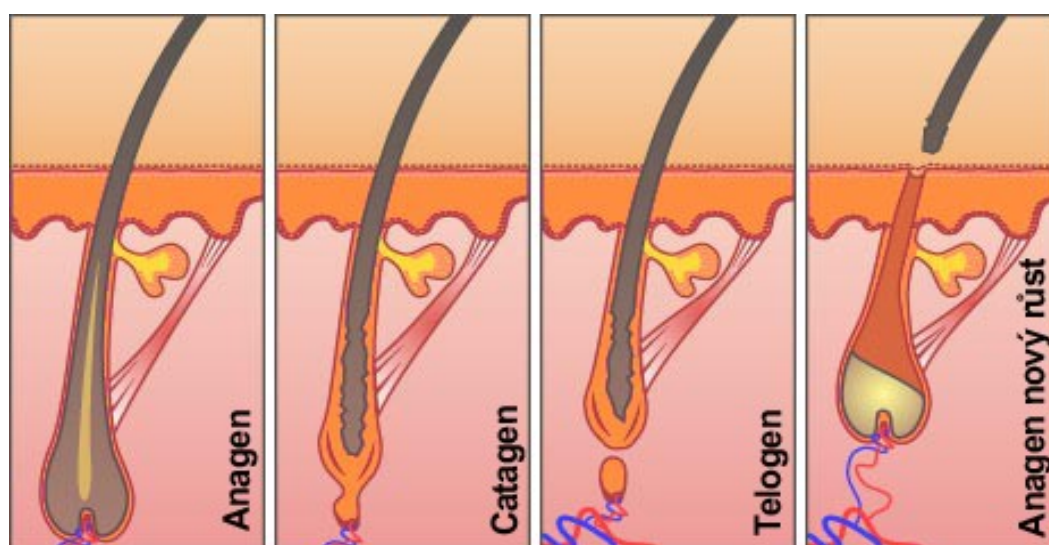
Vlasový cyklus probíhá v každém folikulu opakovaně. V každé části vypadá vlasový folikul (resp. jeho spodní 2/3) jinak. Vlasový cyklus jednotlivých folikulů je u lidí asynchronní, u zvířat naopak synchronní. Souvisí to se sezónním línáním (Kučerová, Bienová, 2012).

Každý folikul opakovaně prochází fází anagenu (aktivní růst), katogenu (krátké přechodné období) a telogenu (klid) (viz. obr. 6).

Anagen charakterizuje proliferace a diferenciací buněk vlasu. Ve folikulu dochází k silnému mitotickému dělení a tvorbě nového vlasu. Toto období je nejdelší a trvá několik let (3-6 let) (Saitoh, Uzuka, Sakamoto, 1970; Harkey, 1993; Kučerová, Bienová, 2012).

Katagen je velice krátké přechodné období. Dochází k poklesu mitotické aktivity a následně k apoptóze určitých buněk (apoptóza je integrální částí normálního vlasového cyklu). Katagen trvá jen několik málo dní (Kučerová, Bienová, 2012).

Telogen – klidové období. Trvá zpravidla několik týdnů (někteří autoři uvádějí 3-4 měsíce (Saitoh, Uzuka, Sakamoto, 1970)). Folikul je v této části nečinný a nejmenší (Kučerová, Bienová, 2012).

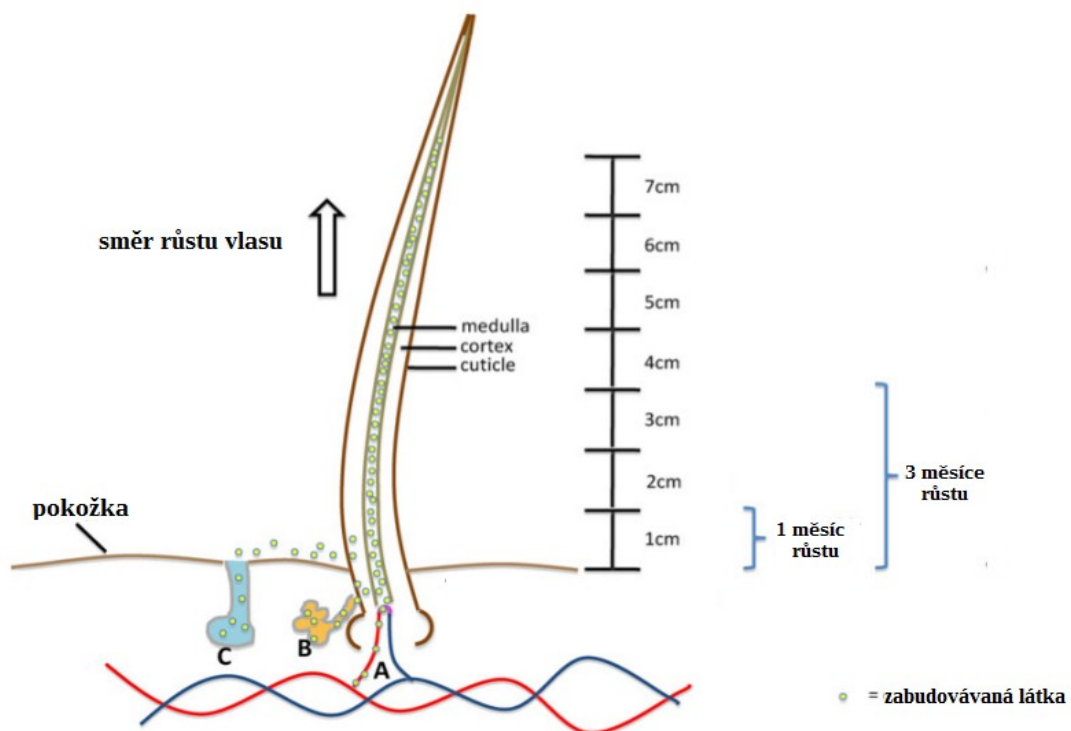


Obr. 6: Fáze vlasového cyklu a změny probíhající na vlasovém folikulu. (Převzato z: Kučerová, Bienová 2012, upraveno).



Vlas je tedy výsledkem proliferace, diferenciaci a keratinizace buněk. Vlasy rostou v průměru rychlostí 0,35 mm za den, tedy 1 cm za měsíc (Kučerová, Bienová, 2012). Vlas lze tedy na takto veliké segmenty rozdělit a sledovat tak změny látek v jednotlivých měsících (viz. obr. 7). Tento proces se nazývá sekvenční analýza (Balíková, 2005; Balíková, 2004; Procházka, 2006).

Bohužel je vlasová analýza omezena rozsahem látek, které lze ve vlasu stanovit. Některé látky se ve vlasech vůbec neukládají, u jiných se ukládají jen jejich metabolity. Je tedy nutné zvážit, jakou látku vlastně hledáme a bude-li ve vlasech vůbec k nalezení.



Obr. 7: Růst vlasu a zabudovávání látek do vlasové matrix. A – krevní řečiště, B – mazová žláza, C – potní žláza (Převzato z: Russell et al., 2012, upraveno)

Analýzy vlasů jsou především vhodné pro uplatnění ve forenzní antropologii. Jde o neinvazivní metodu podávající nám ucelenou představu o daném člověku. Do vlasové matrix se ukládá celá řada metabolitů, které je možno detekovat. Použití analýzy vlasů úzce souvisí s dostupností. Pokud je prováděn odběr post mortem a tělo je v pokročilém stadiu rozkladu, případně není k dispozici díky hnilobě žádný jiný standardní materiál, jsou vlasy cennou

náhradou. Jelikož mají vlasy omezené spektrum použití, patří mezi tzv. alternativní biologické materiály (*Balíková, 2005*). Do této skupiny patří například ještě sliny.

Oproti tradičním materiálům pro izotopovou analýzu (kosti, zuby), má analýza vlasů mnoho výhod a značné uplatnění. Jejím největším kladem je neinvazivnost a tedy široké medicínální uplatnění. Z odebraného vzorku se sice nedá zjistit momentální stav (vliv léků nebo drog v době odběru), na druhou stranu jde o spolehlivý ukazatel např. dlouhodobé závislosti na drogách, dodržování diety a celkové životosprávy. V mnoha případech vlasová analýza např. usvědčila vraha (*Kovačiková, Brůžek, 2008*). Její využití se proto zdá nejzajímavější právě v soudní a forenzně-medicínální praxi. V evropských zemích je analýza vlasů navíc omezena právě pouze na soudní praxi (*Balíková, 2005*).

### **5.1.2 Ukládání do vlasové matrix**

Ve složení vlasu převládají proteiny (65 – 95%), dále jsou zastoupeny lipidy, polysacharidy, stopové minerály a voda. Vlas má tedy slabě zásadité pH, což se projevuje na typu ukládaných látek. *Balíková (2004)* udává, že dalším významným faktorem je také afinita ukládaných látek k melaninu.

Vlasová matrix je proti krvi mírně kyselejší, proto je gradient vhodnější pro prostup bazických látek nežli látek neutrálních či kyselých (*Balíková, 2005*).

Tyto látky do vlasu vstupují třemi způsoby. Pasivní difuzí, kterou využívá většina látek a jejich metabolitů. Vylučováním na povrch vlasu potem a mazem. Následuje částečná difuze do vnitřních struktur vlasu (viz. obr. 6). A nakonec přímo vstup látek z vnějšího prostředí, tzv. externí kontaminace (*Procházka, 2006*).

Externí kontaminace je nežádoucím jevem a je ji nutno odstranit před samotným testováním. Proto příprava vzorku zahrnuje vždy mytí a praní testovaných vlasů. Je zajímavé, že byla například prokázána vyšší koncentrace drog ve vlasech tmavých než ve vlasech světlých (*Balíková, 2004; Balíková, 2005*).

## 5.2 Měření izotopů v biologických materiálech pomocí hmotnostní spektrometrie

Hladíková (1988) uvádí, že vývoj hmotnostních spektrometrů začal již v roce 1918 a od té doby bylo vyvinuto několik základních typů, které mají širokou škálu použití. Principy jednotlivých typů hmotnostních spektrometrů jsou společné, avšak určité jejich části se liší. Je rozdíl mezi spektrometrem, na němž se zjišťuje izotopické složení stroncia a spektrometrem, zjišťujícím izotopické složení např. uhlíku. První z nich je sestaven pro měření pevných látek, zatímco druhý pro měření plynů (Kovačiková, Brůžek, 2008).

### 5.2.1 Princip měření a příprava vzorku

Obecně jde o analytickou techniku, která zkoumá převážně organické látky. Je využívána při kvalitativní i kvantitativní analýze.

Kvalitativní analýza organických látek nejčastěji stanovuje molekulovou hmotnost nebo objasňuje strukturu. Kvantitativní analýza zase detekuje celou řadu sloučenin. Kromě elektronové ionizace se dnes využívají i ostatní ionizační techniky či tzv. vícenásobné hmotnostní spektrometrie (MS/MS) ve spojení s některou ze separačních technik. Hmotnostní spektrometrie je nejčastěji spojována s plynovou chromatografií (GC), ale často se užívá i chromatografie kapalná (především s reverzním uspořádáním fází (LC/MS)). Hmotnostní spektrometrie pracuje na základě detekce nabitých částic (iontů), které vznikají ionizací vzorku. Vzniklé ionty jsou rozděleny podle podílu hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) a následně jsou detekovány v podobě hmotnostních spekter.

Kromě normální hmotnostní spektrometrie existuje ještě tzv. Tandemová (vícenásobná) hmotnostní spektrometrie. Ta v prvním kroku snímá vybraný ion popř. více iontů, které se poté znovu (definovaně) rozštěpí. Výsledkem je dceřinné spektrum původních iontů. Tento režim se využívá např. pro potřeby strukturní analýzy nebo kvantitativní analýzy, kdy produkt štěpení slouží k potvrzení identifikace sledovaného analytu.

(<http://old.vscht.cz/clab/ms/spektrometrie.htm> [cit. 2015-04-18]).

### 5.2.2 Ošetření vlasů pro potřeby izotopové analýzy

Metodika vlasové analýzy je poněkud problematičtější. Ani odborníci se neshodují na standardním jednotném postupu. Obecná doporučení pro metodické postupy jsou vydávána společností Society of hair testing (*Procházka, 2006*). S přihlédnutím k těmto doporučením lze sestavit konkrétní postup pro daný izotop (izotopy).

Množství potřebných vlasů pro izotopovou analýzu není stále přesně definováno a velikosti vzorků se pohybují v rozmezí jediného vlasu až do 200mg. Nejčastěji se však doporučuje odběr pramene vlasů rovnající se tloušťce tužky. Odběr by měl být prováděn co nejbližší pokožce v zadní části lebky nazývané vertex posterior.

Lokalita odběru musí být zaevidována. Vlasy jsou následně uloženy při pokojové teplotě v hliníkové fólii, obálce nebo plastové trubici (*Procházka, 2006*). Ještě před testováním hmotnostním spektrometrem je nutné vlasy zbavit externí kontaminace. Vlasy se musí velmi pečlivě promýt nejrůznějšími saponáty a mycími prostředky. Po dekontaminaci následuje samotná příprava vzorku. Pokud chceme vidět změny hladin látek v jednotlivých měsících, musíme vlasy rozstříhat na centimetr dlouhé úseky a ty následně homogenizovat. Pokud nás zajímá čistě množství látek ve vlasech obsažených, stříhání na centimetrové segmenty se přeskočí.

V rámci samotné homogenizace se vlasy také stříhají, tentokrát na velikost 1mm. To usnadňuje následnou dezintegraci, která je nezbytná pro uvolnění co největšího množství analyzované látky.

Vlasy dezintegrujeme (hydrolyzujeme) methanolem, kyselinou či alkalickým hydroxidem. Pro správnou dezintegraci je také podstatná doba a teplota hydrolyzy. (*Balíková, 2004; Kinz, 2004; Procházka, 2006; Kinz, 1997*).

*Procházka (2006)* jako další postup uvádí podrobení vzorku extrakci. Díky té analyzované látce z vlasové matrix izolujeme. Jsou k dispozici dva typy extrakčních metod. Extrakce kapalina – kapalina nebo extrakce na pevné fázi. Výběr metody může být občas problematičtější. Následuje vlastní testování, a to pomocí metody GC/MS (plynová chromatografie s hmotnostní detekcí) nebo LC/MS (kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí), popř. HPLC/MS

(vysoce účinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí) (*Balíková, 2005; Balíková, 2004; Procházka, 2006*).

Příprava vlasového vzorku se bude pro potřeby hmotnostní spektrometrie lehce měnit v závislosti na určovaném izotopu. Uvedme například postup přípravy vzorku pro stanovení  $\delta^{13}\text{C}$  ve vlasech, při analýze širokého spektra aminokyselin v nich zastoupených, za použití trimethylsilyl derivatizace a plynové chromatografie, spalování a hmotnostní spektrometrie (GC / C / IRMS). Tento postup ve své práci představili Yan An, Zeland Schwartz a Glen P. Jackson (*2013*).

Odebraný vlasový vzorek se nejprve celý dvakrát promývá vodou a následně ještě jednou roztokem methanol / aceton / chloroform (1:1:1). Jednotlivé vlasy se pak musí zbavit veškeré vody před zahájením dezintegrace a to pomocí *vortexu* (1min) a následného sušení v proudu dusíku.

Následně je vhodné vzorek rozemlít na prášek. Cca 12mg vlasů se uzavře do plastové lahvičky spolu s 6 – 8 ložiskovými kuličkami z nerezové oceli a po dobu 5min se prudce míchají při 4800rpm. Prášek je vhodnější z důvodu zvýšení poměru plocha/objem a tím vyšší rychlosti a rozsahu hydrolyzy. Ložiska se následně vyjmou a prášek z vlasů se přesype do 10ml skleněné lahvičky.

Proteiny jsou z vlasového prášku izolovány silnou kyselou hydrolyzou. Jeden vzorek obsahuje 1mg prášku a 1ml 6M HCL. Tato směs je po dobu 16hod sušena při 110°C v sušárně. Díky hydrolyze máme nyní kapalný vzorek, ten přefiltrujeme (0,45mm) a sušíme v proudu dusíku. Následně přidáme 100ml BSTFA (N,O - bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamid) a 100ml acetonitrilu a temperujeme 30min při 100°C. Vzniklý roztok je testován pomocí CG/MS (*Yan, Schwartz, Jackson, 2013*).

Tato metoda je velice časově náročná a složitá na provedení. Existuje velké množství dalších metod, většina je však shodná až do bodu hydrolyzy vlasu, přičemž další postup bývá zpravidla rozdílný (*Yan, Schwartz, Jackson, 2013; Cawley et al. 2008; Mareck et al., 2008; Geyer et al., 2014*).

### 5.3 Chlupy savců

V ekologii zvířat má izotopová analýza své nezastupitelné místo. A všechny poznatky z analýz zvířecích chlupů jsou využitelné i u analýzy lidských vlasů. Při pozorování zvěře není vždy možné přesně určit složení stravy. Izotopová analýza chlupů nám odhaluje přesný nutriční stav zvířete (*West et al., 2004*) a často je dále kombinována s analýzou kostí a zubů. Podle Cerlinga a jeho spolupracovníků (*2006*) lze pomocí analýzy chlupů například stanovit rozdíly v chování při hledání potravy a v rozsahu migrace za ní. Bylo provedeno roční testování chlupů z ocasu keňských slonů. Výsledky  $\delta^{13}\text{C}$  byly srovnány s týdenními záznamy o příjmu potravy a vody a se satelitními snímky výskytu vegetace. Podle této analýzy bylo stanoveno přesné rozmezí výskytu slonů v závislosti na výskytu potravy.

Dalším, kdo se zabývá zvířecími chlupy, jakožto materiálem pro izotopovou analýzu, byl např. Ayliffe s kolegy (*2004*). Provedli rozsáhlou studii koňských žíní, z které vyplývá, že změna  $\delta^{13}\text{C}$  je rychle zjistitelná, pro dosažení rovnováhy je však nutno čekat několik dní až týdnů. Dále představil myšlenku, že změny  $\delta^{13}\text{C}$  lze vysvětlit pomocí tří-poolového exponenciálního rozpadového modelu. Jde o za 1. rychlý pool, který odráží přímo v potravě zastoupené aminokyseliny, za 2. o rychlý pool aminokyselin pocházejících z metabolického rozpadu bílkovin a za 3. o pomalý pool zastupující aminokyseliny uvolněné po rozpadu strukturních proteinů (*Ayliffe et al., 2004*).

## 5.4 Lidské vlasy

Nespornou výhodou izotopové analýzy lidských vlasů je neinvazivnost. Je to velmi přínosné nejen u žijících jedinců, ale také pokud jde například o cenné a jedinečné nálezy (mumie apod.), kdy testování kostí (zubů) nepřipadá v úvahu. Vlasová analýza představuje plnohodnotnou náhradu za běžnou izotopovou analýzu a často nám přináší mnohem lepší a cennější informace. Je také nesmírně cenná v případech, kdy není dostupný jiný materiál pro testování (pokročilé stádium hniloby mrtvol) nebo jako doplněk ke krevním testům a testování moči. Nejčastěji jsou využívány izotopy uhlíku a dusíku.

### 5.4.1 Forezní využití

Izotopová analýza se využívá stále častěji. Její použití mimo rámec výzkumu je však v zemích EU zatím běžné jen v soudní praxi (*Balíková, 2005*). Kromě zmíněných izotopů uhlíku, dusíku a kyslíku, se ve forezní antropologii často používají také izotopy vodíku a síry.

Byla provedena osmiměsíční studie vlasů a nehtů studentů *Queen's University Belfast*. Studie zkoumá spojení mezi izotopovým složením potravy a izotopovým složením analyzovaných tkání. Byla hodnocena velikost přirozené variability izotopového složení vlasů a nehtů. Vzorky byly analyzovány za účelem stanovení jejich izotopového složení pro  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^2\text{H}$  a  $^{18}\text{O}$ . Údaje ukazují relativně nízký stupeň přirozené odchylky v izotopech  $^{13}\text{C} / ^{15}\text{N}$  ve vlasech a nehtech, zatímco větší odchylky jsou pak u vodíku a kyslíku. Hodnoty pro  $^{15}\text{N}$  a  $^{18}\text{O}$  u nehtů jsou mnohem variabilnější než u vlasů. Vědci se domnívají, že to je dáno rychlostí růstu. Vlasy rostou rychleji a jejich složky jsou tedy méně biochemicky ovlivněny než nehty. (*Fraser et al., 2006*).

Studie kolektivu Lehn et al. (2014) dokládá vliv geo-původu potravy na izotopový signál H–C–N–S ve vlasech (vousech). Izotopová analýza byla provedena na vousech vojáků pravidelně cestujících mezi Německem (*Fürstenfeldbruck*, Bavorsko) a USA (*Phoenix*, Arizona). Množství  $\delta^{13}\text{C}$  v Arizoně stoupl o 2.3 ‰ ( $\pm 0.6$ ), naopak  $\delta^{34}\text{S}$  pokleslo o 1.8 ‰ ( $\pm 1.2$ ). U izotopů

N a H nedošlo k viditelné změně. Tato změna v zastoupení izotopů C a S byla pozorovatelná po 8 – 9 dnech od změny prostředí. Tento čas koresponduje s rychlostí růstu vousů a dobou než vous doroste 2-3 mm nad pokožku (*Lehn et al., 2014*). Je tedy vidět, že izotopy získané ze stravy se téměř okamžitě začleňují do vlasové matrix. Díky tomu je možné například spolehlivě identifikovat oběti války (*Bartelink, 2014*) nebo pachatele trestného činu (*Fraser et al., 2006; Raucha et al., 2007*).

Pokud například víme, že pohřešovaná osoba byla dlouhodobě závislá a víme, co přesně užívala, je možné vlasovou analýzou identifikovat tělo, a to i přesto, že je například v pokročilém stádiu rozkladu (*Procházka, 2006; Raucha et al. 2007; Zhu et al., 2011*). Případně z nalezeného vlasu na místě činu můžeme zjistit odkud pachatel pochází, čím se živí a kde v uplynulých několika měsících byl (*Procházka, 2006; Fraser et al., 2006; Raucha et al., 2007; Kovačiková, Brůžek, 2008*).

Analýzu lze také využít při průkazu zanedbání dětí. Z analýzy vlasů odebraných dítěti je dobře patrné, zda trpí dlouhodobým nedostatkem jídla. Neuberger s kolegy (2013) uvedli, že vlasová analýza může být použita jako nezaujatý biomarker při podezření na zneužívání nebo zanedbávání dětí. Zvýšení  $\delta^{15}\text{N}$  ukazuje na dlouhodobé hladovění, kdy tělo přednostně odbourává zásoby tělesného tuku a svalové bílkoviny. Zároveň byly naměřeny i menší rozdíly v  $\delta^{13}\text{C}$  (*Neuberger et al., 2013*).

Izotopová analýza je ideální např. pro testování vrcholových sportovců na doping (*Cawley et al., 2008; Mareck et al., 2008; Geyer et al., 2014*). Tato analýza umožňuje například odhalit syntetický původ steroidů.

Cawley et al. (2008) ve své studii poukazují na rozdíl v izotopovém signálu u steroidních metabolitů a jejich syntetických analogů. Syntetické steroidní přípravky jsou z velké části odvozeny ze stigmasterolu a sitosterolu získaných ze sóji chudé na  $^{13}\text{C}$  (*Cawley et al., 2008*).

Rozdíl mezi přirozenými a syntetickými steroidy je signifikantní a proto je pomocí hmotnostní spektrometrie možno potvrdit zneužívání endogenních steroidů vrcholovými sportovci (*Cawley et al., 2008*).



Referenční hodnoty pro endogenní steroidní metabolity jsou  $\delta^{13}\text{C} = -15 \text{ ‰}$  až  $-25 \text{ ‰}$  a pro komerčně dostupné steroidy  $\delta^{13}\text{C} = -26 \text{ ‰}$  až  $-36 \text{ ‰}$  (Ueki et al., 1999; De la Torre et al., 2001).

Studie Cawley et al. (2008) se zaměřuje na využití v rámci dopingových kontrol vrcholových sportovců, a je tedy (podobně jako i jiné studie) zaměřena na analýzu stabilních izotopů tělesných tekutin (moč, krev, sliny) (Cawley et al., 2008; Mareck et al., 2008; Geyer et al., 2014).

Mezi sledovatelnými látkami jsou amfetaminy,  $\beta$ -blokátory, různá analgetika nebo např. některá lokální anestetika a peptidické hormony (růstový hormon, choriový gonadotropin, erythropoetin a další) (Kinz, 2003; Zhu et al., 2011; Thevis et al., 2014). Tyto a další látky jako jsou testosteron, androstenedion či dihydrotestosteron je možné ve vlasech prokázat. Díky tomu lze metody aplikované při izotopové analýze krve (moči, slin) využít i v rámci izotopové analýzy vlasů (Geyer et al., 2014). Izotopová analýza vlasů však není běžně užívána pro dopingovou kontrolu. Světová antidopingová agentura (World Anti-Doping Agency) testuje pouze moč a krev sportovců (World Anti-Doping Agency: play true, 2015).

V práci publikované skupinou Gottardo R, Fanigliulo A, Soria D, Liotta E, Bortolotti F a Tagliaro F (2012) byl uveden příklad využití vlasové analýzy při léčbě drogově závislých.

*„Kapilární elektroforéza spojen s time-of-flight hmotnostní spektrometrií byla použita v této práci pro stanovení terapeutických a zneužívaných drog a jejich metabolitů ve vlasech pacientů podstupujících léčbu závislostí, s cílem kontrolovat jejich dodržování léčebných postupů“*  
(Gottardo et al., 2012: 1)\*.

---

\* původní text z Gottardo et al., 2012: 1 : *„Capillary electrophoresis coupled to time-of-flight mass spectrometry was used in the present work for the determination of therapeutic and abused drugs and their metabolites in the hair of subjects undergoing addiction treatments, in order to monitor their compliance to therapy.“*

Pokud se pacientovi při nástupu léčby odebere vzorek vlasů, provedená analýza odráží metabolity užívaných drog. Tato metoda byla již v minulosti využívána pro prokázání dlouhodobé závislosti u osob obviněných z trestné činnosti. Následné odběry probíhají po dobu léčby při užívání léků v rámci detoxikace. Metabolity naměřené v té době ve vlasech by měly tedy výhradně odpovídat užívaným léčivům. Změna je díky růstu vlasů pozorovatelná i zpětně s ohledem na délku vlasu (*Gottardo et al., 2012; Nakahara et al., 1991*).

#### 5.4.2 Medicinální využití

Pro účely stanovení diagnózy zatím není v EU izotopová analýza vlasů běžně používána. Tato analýza v sobě nesporně skrývá velký potenciál a mohla by být i dále rozvíjena.

Huelsemann, Flenker, Koehler a Schaenzer (2009) provedli studii vlasů čtyř jedinců (dvou mužů a dvou žen) ukazující změny ve složení vlasového keratinu při změně jídelníčku za dobu jednoho měsíce (přesněji 28 dní). Změna stravy zahrnovala přechod od C3 rostlin na C4 a zařazení mořských živočichů namísto suchozemských. Testovány byly  $\delta^{13}\text{C}$  a  $\delta^{15}\text{N}$ . U každého testovaného jedince za dobu 28 dnů došlo ke zvýšení obou sledovaných izotopů.  $\delta^{13}\text{C}$  se ve vlasech zvýšila o 8,5 až 9,9‰ a  $\delta^{15}\text{N}$  o 1.5 až 2.2‰ (*Huelsemann et al., 2009*). Přestože ke změně v  $\delta^{13}\text{C}$  i v  $\delta^{15}\text{N}$  došlo rychle, nebyla ustanovena rovnováha. Což podle poznatků Ayliffe a jeho kolegů (2004) může trvat až několik týdnů.

Sledování příjmu potravy je nejen vhodné ke zjištění složení stravy, ale také k ověření příjmu potravy a jejího množství. Izotopová analýza by měla být dobře využitelná v lékařské praxi pro zjištění stavu výživy jedince. Pokud například vezmeme v úvahu využití v oblasti dietologie, izotopová analýza vlasů nám je schopna poskytnout jednak informace o neléčeném (či špatně léčeném) diabetes mellitus I. typu (*Hart et al., 2011; Butz et al., 2014; De Luca et al., 2014*) nebo o nedodržování diety v rámci léčby obezity či poruch příjmu potravy (mentální anorexie / bulimie) (*Strumia, 2013; Hatch et al., 2006*). Z analyzovaného pramene vlasů můžeme zjistit, jaké je složení jídelníčku léčené osoby a to bez nutnosti spoléhat se na dotazníky, které jsou vždy vyplňovány

zcela subjektivně.

Ve studii „*An objective means of diagnosing anorexia nervosa and bulimia nervosa using  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios in hair*“ (2006) Kent Hatch s kolegy poukázal na možnost průkazu mentální anorexie a bulimie a zároveň na možnost od sebe rozlišit tyto dvě poruchy. Analýza byla zaměřena na individuální rozlišení mezi jedinci s mentální anorexií a jedinci s bulimií. Byla prováděna na osobách s klinicky normální kontrolou.

Příjem nutrientů se přímo odráží v obsahu aminokyselin z nichž pochází uhlík a dusík ukládaný do vlasového keratinu. Ve výsledcích analýzy je tedy rozdíl mezi mentální anorexií, kdy pacient potravu téměř vůbec nepřijímá, a bulimií, kdy je potrava hned po snědení vyzvracena.

Kromě studia poruch příjmu potravy, byla provedena řada studií vycházejících z poznatků o stravování populací dávnověku. Našla se například spojitost mezi výskytem celiakie a přechodem na výhradní pěstování pšenice s vyšším obsahem lepku namísto jiných obilovin (*Touzeau et al., 2014*).

Vlasovou analýzu lze také využít k odhalení dlouhodobého stresu. Škodlivé účinky stresu na lidské zdraví jsou stále více uznávány. Můžeme sledovat hladinu  $\delta^{13}\text{C}$  a kortizolu. Sliny a moč zachycují hladinu kortizolu v reálném čase, analýza vlasů je doplňkovým prostředkem pro sledování dlouhodobého vlivu stresu na zdraví člověka, zachycujícím systémovou expozici kortizolu po delší dobu. Tento nový přístup se stále více používá k identifikaci účinků stresu u různých patologických stavů, od chronické bolesti po akutní infarkt myokardu. Vzhledem ke své schopnosti poskytovat dlouhodobou míru systémové expozice kortizolem, analýza vlasů se stává užitečným nástrojem, který je schopen odpovídat na otázky, které by dříve nebyly zodpovězeny jinými testy (*Russell et al., 2012*).

Dalším přínosem analýzy  $\delta^{13}\text{C}$  a  $\delta^{15}\text{N}$  ve vlasech je možnost studia dětí. Díky neinvazivnosti jde o elegantní metodu vyšetření malých dětí, především při výzkumu doby laktace (*Romek et al., 2013*). Bylo provedeno několik studií na toto téma, které zjistily, že existuje rozdíl mezi dětmi výhradně krmenými mateřským mlékem, dětmi na umělé výživě (Sunar atd.) a dětmi příkrmovanými (mateřské mléko + Sunar). Děti výhradně sající mateřské mléko mají  $\delta^{13}\text{C}$  o 1‰ a  $\delta^{15}\text{N}$  o 2-3‰ ve vlasech zvýšené (*Romek et al., 2013*). Náhlý poklesem

hodnot  $\delta^{15}\text{N}$  při studiu kosterních pozůstatků dětí ukazuje na skončení laktace a přechod dítěte na pevnou stravu (De Luca et al., 2012; Reynard, Tuross, 2014).

V praxi by se kromě vlasové analýzy jistě také uplatnila izotopová analýza dechu. Podle článku D. Butz a jeho kolegů „*The emerging role of carbon isotope ratio determination in health research and medical diagnostics*“ se podle obsahu izotopů uhlíku v dechu dá určit, zda je člověk zdravý, či v jeho těle probíhá zánět.

Měření je prováděno pomocí capnografie. Jde o metodu monitorující koncentraci  $\text{CO}_2$  ve výdechu. Ta je spojena s izotopovou analýzou uhlíku (tzv. BDV – *breath delta value*). Z výsledků jsme schopni objasnit tělesný metabolismus jedince. Kromě toho článek odkazuje také na využití při diagnostice diabetes mellitus I. typu a dalších metabolických poruch (Butz et al., 2014; De Luca et al., 2014).

## 6. Závěr

Práce podává přehled možností využití izotopové analýzy vlasů. Izotopová analýza je vhodným a nezastupitelným nástrojem v bioarcheologii a v příbuzných oborech, přičemž analýza vlasů poskytuje doplňující informace k získaným hodnotám z tradičně běžnějších materiálů, jakými jsou zuby a kosti. Navíc je velmi cenná pro svou neinvazivnost. Lze ji tedy použít u velmi vzácných objevů, kde by tradiční postup nález znehodnotil, nebo u nespolutracujících malých dětí.

Kromě studia minulosti je izotopová analýza kožních derivátů (vlasů, chlupů) běžně užívána v oblasti ekologie současných zvířecích populací. Díky této metodě více chápeme vzájemné vztahy mezi organizmy, dokážeme lépe určit trofické stupně a provázanost potravního řetězce. Dále nám umožňuje sledovat migraci živočichů, případně určovat jejich geografický původ.

Významný je také přínos této metody v medicíně a forenzních vědách. Díky analýze stabilních izotopů jsme v medicíně schopni např. odhalit škodlivé vlivy stresu, sledovat dodržování diety u pacientů s diabetem či celiakií. Pomocí kontroly změn v hodnotách izotopů je možné prokázat také probíhající záněť nebo mentální poruchy příjmu potravy.

Z forenzního hlediska zase tato analýza představuje možnost, jak prokázat geografický původ lidí, zvířat či zboží, a jak osvětlit dlouhodobou závislost na drogách či doping u vrcholových sportovců. Je vhodná také pro určování identity osob obviněných z trestních činů.

Metoda analýzy stabilních izotopů má obrovský potenciál a jistě se bude dále rozvíjet. Hlavním a nejspíše jediným problémem zůstává její náročnost, a to jak profesionální, tak finanční.

Z tohoto důvodu se nedá předpokládat, že by se stala metodou běžnou, především v medicíně. Své využití, i přes tento zápor, však bezesporu má pro vědecké účely a v soudní praxi.

## 7. Seznam užité literatury a internetové zdroje

- An Y, Schwartz Z, Jackson GP (2013).  $\delta(13)$  C analysis of amino acids in human hair using trimethylsilyl derivatives and gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 27(13): 1481-1489
- Arnay-de-la-Rosa M, González – Reimers E, Gámez – Mendoza A, Galindo – Martín L (2009). The Ba/Sr ratio, carious lesions, and dental calculus among the population buried in the church La Concepción (Tenerife, Canary Islands). *Journal of Archaeological Science*, 36(2): 351-358.
- Ayliffe LK, Cerling TE, Robinson T, West AG, Sponheimer M, Passey B, Hammer J, Roeder B, Dearing D, Ehleringer J (2004). Turnover of carbon isotopes in tail hair and breath CO<sub>2</sub> of horses fed an isotopically varied diet. *Oecologia*. 139(1): 11- 12.
- Balíková M (2004). *Forenzní a klinická toxikologie*. Praha, Galén.
- Balíková M (2005). *Hair analysis for drugs of abuse. Possibility of interpretation*. *Biomedical Papers – Palacky University in Olomouc*, 149(2): 199-207.
- Bartelink EJ, Berg GE, Beasley MM, Chesson LA (2014). Application of stable isotope forensics for predicting region of origin of human remains from past wars and conflicts. *Annals of Anthropological Practice*, 38(1): 124-136.
- Ben-David M, Flaherty EA (2012). *Stable isotopes in mammalian research: a beginner's guide*. *Journal of Mammalogy*, 93(2): 312-328.

- Bentley RA, Krause R, Price TD, Kaufmann B (2003). *Human mobility at the Early Neolithic settlement of Vaihingen, Germany. Archaeometry, 45(3): 471-486*
- Bentley RA (2006). *Strontium isotopes from the Earth to the archaeological skeleton: A review. Journal of Archaeological Method and Theory, 13(3): 135-179*
- Blum JD, Taliaferro EH, Weisse MT, Holmes RT (2000). *Changes in Sr/Ca, Ba/Ca and  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  ratios between trophic levels in two forest ecosystems in the northeastern USA. Biogeochemistry, 49(1): 87-101.*
- Bowen GJ, Wassenaar LI, Hobson KA (2005). *Global application of stable hydrogen and oxygen isotopes to wildlife forensics. Oecologia, 143(3): 337-348.*
- Burton JH, Price TD, Cahue L, Wright LE (2003). *The use of barium and strontium abundances in human skeletal tissues to determine their geographic origins. International Journal of Osteoarchaeology, 13(1-2): 88-95.*
- Butz DU, Casperson SL, Whigham LD (2014). *The emerging role of carbon isotope ratio determination in health research and medical diagnostics. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 29(4): 594–598.*
- Burton JH (2008). *Bone Chemistry and Trace Element Analysis. Biological Anthropology of the Human Skeleton, edited by M. Anne Katzenberg and Shelley R. Saunders. New York: Wiley – Liss, s. 443-446*

- Cawley AT, Flenker U (2008). *The application of carbon isotope ratio mass spectrometry to doping control. Journal of mass spectrometry*, 43(7): 854-864.
- Cerling TE, Wittemyer G, Rasmussen HB, Vollrath F, Cerling CE, Robinson TJ (2006). *Stable isotopes in elephant hair document migration patterns and diet changes. PNAS*, 103(2): 371–373
- Chesson LA, Ehleringer JR, Cerling TE (2012). *Light-element isotopes (H, C, N, and O) as tracers of human diet: a case study on fast food meals. In Handbook of Environmental Isotope Geochemistry (s. 707-723). Springer Berlin Heidelberg.*
- Cotton FA, Wilkinson G (1973). *Advanced inorganic chemistry: a comprehensive text. New York: Interscience Publishers, 511.*
- Dalerum F, Angerbjörn A (2005). *Resolving temporal variation in vertebrate diets using naturally occurring stable isotopes. Oecologia*, 144(4): 647-658.
- Dawson TE, Mambelli S, Plamboeck AH, Templer PH, Tu KU (2002). *Stable isotopes in plant ecology. An. Rev. of Ecology Systematics*, s. 507- 59.
- De la Torre X, Gonzalez JC, Pichini S, Pascual JA, Segura J (2001). *<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C isotope ratio MS analysis of testosterone, in chemicals and pharmaceutical preparations. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24(4): 645 - 650.
- De Luca A, Boisseau N, Tea I, Louvet I, Robins RJ, Forhan A, Hankard R (2012).  *$\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  in hair from newborn infants and their mothers: a cohort study. Pediatric research*, 71(5): 598-604.



- De Luca A, Laugier S, Tea I, Robins RJ, Saulnier PJ, Torremocha F, Hadjadj, S (2014). *Impact on bulk 15 N natural isotopic abundance in hair of kidney function in type 2 diabetic nephropathy. e-SPEN Journal, 9(6): e204-e209.*
- Ehleringer JR, Thompson AH, Podlesak DW, Bowen GJ, Chesson LA, Cerling TE, Schwarcz H (2010). *A framework for the incorporation of isotopes and isoscapes in geospatial forensic investigations. In Isoscapes (s. 357- 387). Springer Netherlands.*
- Fraser I, Meier-Augenstein W, Kalin RM (2006). *The role of stable isotopes in human identification: a longitudinal study into the variability of isotopic signals in human hair and nails. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 20(7): 1109-1116.*
- Gannes LZ, O'Brien DM, del Rio CM (1997). *Stable isotopes in animal ecology: assumptions, caveats, and a call for more laboratory experiments. Ecology, 78(4): 1271-1276.*
- Geyer H, Schänzer W, Thevis M (2014). *Anabolic agents: recent strategies for their detection and protection from inadvertent doping. British journal of sports medicine, bjsports-2014.*
- Gottardo R, Fanigliulo A, Sorio D, Liotta E, Bortolotti F, Tagliaro F (2012). *Monitoring compliance to therapy during addiction treatments by means of hair analysis for drugs and drug metabolites using capillary zone electrophoresis coupled to time-of-flight mass spectrometry. Forensic Science International, 216(1): 101-107.*
- Harkey MR (1993). *Anatomy and physiology of hair. Forensic Science International, 63(1): 9-18.*

- Hart S, Russell J, Abraham S (2011). *Nutrition and dietetic practice in eating disorder management. Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 24(2): 144-153.
- Haskins NJ (1982). *The application of stable isotopes in biomedical research. Biological Mass Spectrometry*, 9(7): 269-277.
- Hatch KA, Crawford MA, Kunz AW, Thomsen SR, Eggett DL, Nelson ST, Roeder BL (2006). *An objective means of diagnosing anorexia nervosa and bulimia nervosa using  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios in hair. Rapid communications in mass spectrometry*, 20(22): 3367-3373.
- Hladíková J (1988). *Základy geochemie stabilních izotopů lehkých prvků. Brno: Univerzita J. E. Purkyně.*
- Huang J, Nkrumah PN, Appiah-Sefah G (2013). *The use of nitrogen-stable isotope technique to identify L-leucine extracted from human hair. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 8(1-2), s. 45-50.
- Huelsemann F, Flenker U, Koehler K, Schaenzer W (2009). *Effect of a controlled dietary change on carbon and nitrogen stable isotope ratios of human hairy. Rapid Commun. Mass Spectrom*, 23(16): 2448–2454
- Jelínek E, Košler J, Pačesová M (1997). *Základy izotopové geologie a geochronologie: Radiogenní izotopy. Praha: Karolinum*, s. 114.
- Katzenberg AM (1992). *Advances in Stable Isotope Analysis of Prehistoric Bones. In: Saunders, Shelley R. – Katzenberg, Anne M., ed., Skeletal Biology of Past Peoples: Research Methods. New York: Wiley – Liss*, s. 105-106, 116.

- Kinz P, Cirimele, V (1997). *Interlaboratory comparison of quantitative determination of amphetamine and related compounds in hair samples. Forensic Science International, 84: 151-156.*
- Kinz P, Samyn N (1999). *Determination of "Ecstasy" components in alternative biological specimens. Journal of Chromatography B, 733: 137-143.*
- Kirsanow K, Tuross N (2011). *Oxygen and hydrogen isotopes in rodent tissues: Impact of diet, water and ontogeny. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology, 310(1): 9-16.*
- Konrádová V, Vajner L a Uhlík J (2005). *Histologie: přednášky pro bakalářské studium. H & H Vyšehradská, s.r.o., Jinočany, 2. vydání, s. 166-167.*
- Kovačiková L, Brůžek J (2008). *Stabilní izotopy a bioarcheologie: výživa a sledování migrací v populacích minulosti. Živa, 1: 42-45.*
- Kučerová MR, Bienová MM (2012). *Úvod do klinické trichologie. Dermatologie pro praxi, 6(3): 118-122.*
- Lajtha K, Michener RH (1994). *Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science. Blackwell Scientific, London.*
- Lee S, Miyaguchi H, Han E, Kim E, Park Y, Choi H, Chung KH (2010). *Homogeneity and stability of a candidate certified reference material for the determination of methamphetamine and amphetamine in hair. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 53(4): 1037-1041.*
- Lehn C, Mützel E, Rossmann A (2011). *Multi-element stable isotope analysis of H, C, N and S in hair and nails of contemporary human remains. International Journal of Legal Medicine, 125(5): 695-706.*

- Lehn C, Lihl C, Roßmann A (2015). Change of geographical location from Germany (Bavaria) to USA (Arizona) and its effect on H–C–N–S stable isotopes in human hair. *Isotopes in environmental and health studies*, (ahead-of-print), 1-12.
- Mareck U, Geyer H, Opfermann G, Thevis M, Schänzer W (2008). Factors influencing the steroid profile in doping control analysis. *Journal of mass spectrometry*, 43(7): 877-891
- McCarroll D, Loader NJ (2004). Stable isotopes in tree rings. *Quaternary Science Reviews*, 23: 771–801.
- Mekota AM, Grupe G, Ufer S, Cuntz U (2009). Identifying starvation episodes using stable isotopes in hair. *Rechtsmedizin*, 19(6): 431-440.
- Nakahara Y, Takahashi K, Shimamine M, Takeda Y (1991). Hair analysis for drug abuse: I. Determination of methamphetamine and amphetamine in hair by stable isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry method. *Journal of forensic sciences*, 36(1): 70-78.
- Nakahara Y, Takahashi K, Shimamine M, Saitoh A (1991). Hair analysis for drugs of abuse. IV. Determination of total morphine and confirmation of 6-acetylmorphine in monkey and human hair by GC/MS. *Archives of Toxicology*, 66(9): 669-674.
- Neuberger FM, Jopp E, Graw M, Püschel K, Grupe G (2013). Signs of malnutrition and starvation – Reconstruction of nutritional life histories by serial isotopic analyses of hair. *Forensic Science International*, 226(1): 22-32.

- O'Connell TC, Hedges RE, Healey MA, Simpson AHRW (2001). *Isotopic comparison of hair, nail and bone: modern analyses. Journal of Archaeological Science, 28(11): 1247-1255.*
- Phillips DL (2012). *Converting isotope values to diet composition: the use of mixing models. Journal of Mammalogy, 93(2): 342-352.*
- Poulson SR, Kuzminsky SC, Scott GR, Standen VG, Arriaza B, Muñoz I, Dorio L (2013). *Paleodiet in northern Chile through the Holocene: extremely heavy  $\delta^{15}N$  values in dental calculus suggest a guano-derived signature?. Journal of Archaeological Science, 40(12): 4576-4585.*
- Procházka P (2006). *Problems of hair analysis in forensic toxicology. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta, katedra radiologie a toxikologie. Biomedicína, 2: 366-369*
- Prokeš L, Vystrčilová M, Shbat A, Kanický V, Otruba V (2004). *Chemická analýza kosterních pozůstatků z františkánského kláštera v Uherském Hradišti: příspěvek k identifikaci pozůstatků biskupa Jana Filipce. Ve službách archeologie, 5: 259-269.*
- Randall VA, Ebling FJG (1991). *Seasonal changes in human hair growth. British Journal of Dermatology, 124(2): 146-151.*
- Raucha E, Rummelb S, Lehna C, Büttnera A (2007). *Origin assignment of unidentified corpses by use of stable isotope ratios of light (bio-) and heavy (geo-) elements—A case report. Forensic Science International, 168(2–3): 215–218*
- Reynard LM, Tuross N (2015). *The known, the unknown and the unknowable: weaning times from archaeological bones using nitrogen isotope ratios. Journal of Archaeological Science, 53: 618-625.*

- Romek KM, Julien M, Frasquet-Darrieux M, Tea I, Antheaume I, Hankard R, Robins RJ (2013). Human baby hair amino acid natural abundance  $^{15}\text{N}$ -isotope values are not related to the  $^{15}\text{N}$ -isotope values of amino acids in mother's breast milk protein. *Amino Acids*, 45(6): 1365-1372.
- Russell E, Koren G, Rieder M, Van Uum S (2012). Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology*, 37(5): 589-601.
- Saitoh M, Uzuka M, Sakamoto M (1970). Human hair cycle. *Journal of Investigative Dermatology*, 54(1): 65-81.
- Schoeninger MJ, Moore K (1992). Bone stable isotope studies in archaeology. *Journal of World Prehistory*, 6(2): 247-296.
- Schoeninger MJ (2014). Stable isotope analyses and the evolution of human diets. *Annual Reviews of Anthropology*, 43: 413 – 430.
- Schwarcz HP, White CD, Longstaffe FJ (2010). Stable and radiogenic isotopes in biological archaeology: some applications. In *Isoscapes* (s. 335-356). Springer Netherlands.
- Schwarcz HP, Schoeninger MJ (2012). Stable isotopes of carbon and nitrogen as tracers for paleo-diet reconstruction. In *Handbook of Environmental Isotope Geochemistry* (s. 725-742). Springer Berlin Heidelberg.
- Shen M, Chen H, Xiang P (2014). Determination of opiates in human fingernail— Comparison to hair. *Journal of Chromatography*, 967: 84-89.

- Smrčka V, Bůzek F, Erban V, Neumanová K, Dočkalová M, Berkovec T (2004). *Stabilní izotopy v kosterním souboru z neolitického sídliště ve Vedrovicích: předběžné sdělení o nově zaváděných metodách výzkumu. Ve službách archeologie, 5: 274- 276.*
- Smrčka V (2005). *Trace Elements in Bone Tissue. Praha: Karolinum.*
- Stenn KS, Paus R (2001). *Controls of hair follicle cycling. Physiological reviews, 81(1): 449-494.*
- Strumia R (2013). *Eating disorders and the skin. Clinics in dermatology, 31(1): 80-85.*
- Taru P, Backwell L (2013). *Identification of fossil hairs in Parahyaena brunnea coprolites from Middle Pleistocene deposits at Gladysvale cave, South Africa. Journal of Archaeological Science, 40(10): 3674-3685.*
- Thevis M, Thomas A, Schänzer W (2014). *Detecting peptidic drugs, drug candidates and analogs in sports doping: current status and future directions. Expert review of proteomics, 11(6): 663-673.*
- Tieszen LL, Boutton TW, Tesdahl KG, Slade NA (1983). *Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: implications for  $\delta^{13}C$  analysis of diet. Oecologia, 57(1-2): 32-37.*
- Touzeau A, Amiot R, Blichert-Toft J, Flandrois JP, Fourel F, Grossi V, Lécuyer C (2014). *Diet of ancient Egyptians inferred from stable isotope systematics. Journal of Archaeological Science, 46: 114-124.*

- Ueki M, Okano M (1999). Analysis of exogenous dehydroepiandrosterone excretion in urine by gas chromatography/combustion/ isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 13(22): 2237 – 2243.
- Van Klinken GJ, van der Plicht H, Hedges RE (1994). Bond  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios reflect (palaeo-) climatic variations. *Geophysical Research Letters*, 21(6): 445-448.
- Vautour G, Poirier A, Widory D (2015). Tracking mobility using human hair: What can we learn from lead and strontium isotopes?. *Science & Justice*, 55(1): 63-71.
- Wang H, Wang H, Zhang L, Zhang J, Guo Y (2011). N-Alkylpyridinium isotope quaternization for matrix-assisted laser desorption/ionization. Fourier transform mass spectrometric analysis of cholesterol and fatty alcohols in human hair. *Analytica Chimica Acta*, 690(1): 1-9.
- Webb E, Thomson S, Nelson A, White C, Koren G, Rieder M, Van Uum S (2010). Assessing individual systemic stress through cortisol analysis of archaeological hair. *Journal of Archaeological Science*, 37(4): 807-812.
- Webb E, White C, Longstaffe F (2013). Dietary shifting in the Nasca Region as inferred from the carbon-and nitrogen-isotope compositions of archaeological hair and bone. *Journal of Archaeological Science*, 40(1): 129-139.
- Williams JS, Katzenberg AM (2012). Seasonal fluctuations in diet and death during the late horizon: a stable isotopic analysis of hair and nail from the central coast of Peru. *Journal of Archaeological Science*, 39(1): 41-57.



Wunder MB (2012). *Determining geographic patterns of migration and dispersal using stable isotopes in keratins. Journal of Mammalogy, 93(2): 360-367.*

Yurtsever Y, Gat JR (1981). *Atmospheric waters. In Stable Isotope Hydrology: Deuterium and Oxygen- 18 in the Water Cycle IAEA, Vienna.*

Zhu KY, Leung KW, Ting AK, Wong ZC, Fu Q, Ng WY, Tsim KW (2011). *The establishment of a highly sensitive method in detecting ketamine and norketamine simultaneously in human hairs by HPLC-Chip–MS/MS. Forensic Science International, 208(1): 53-58.*

## Internetové zdroje

Kubištová L (2011). *Stabilní izotopy v ekologii*. Příroda.cz: příroda, ekologie, život... [online]. [cit. 2015-05-07].

Dostupné z: <http://www.priroda.cz/clanky.php?detail=1566>

Meyers K (2014). *What did Genghis Khan eat?*. In: Meyers K. *Bones don't lie* [online]. 2014-04-15. Michigan State, 2014 [cit. 2015-04-18].

Dostupné z: <https://bonesdontlie.wordpress.com/2014/04/15/what-did-genghis-khan-eat-assessing-the-elite-mongolian-diet/>

(obr. 3, str. 10)

Sapora S (2015). *Day 9 (2/15): Energy Pyramid Direct Reading*. In: Sapora S. *Mr. Sapora's Biolosite* [online]. 2015-02-09. Oregon, 2015 [cit. 2015-04-18].

Dostupné z: <http://www.mrsapora.com/day-9---215.html>

(obr. 4, str. 15)

VŠCHT (2015). *Spektrometrie*. In: VŠCHT: *Centrální laboratoře* [online]. Praha [cit. 2015-04-18].

Dostupné z: <http://old.vscht.cz/clab/ms/spektrometrie.htm>

World Anti-Doping Agency: *play true* (2015). *Laboratories: Laboratory testing figures*. [online]. Montreal [cit. 2015-05-09].

Dostupné z:

<https://www.wada-ama.org/en/what-we-do/science-medical/laboratories>

## **Anotace bakalářské práce**

### Využití stabilních izotopů ve vlasech k poznání výživy a migrace populací

Nový rozměr v bioarcheologii, jak nahlížet na výživu, subsistenci a mobilitu lidí populací minulosti přináší analýzy stabilních izotopů zubů a kostí. Nicméně rovněž kvalitní informace o těchto jevech obdržíme studiem stabilních izotopů (uhlíku -  $\delta^{13}\text{C}$ , dusíku -  $\delta^{15}\text{N}$  nebo kyslíku -  $\delta^{18}\text{O}$  a snad i jiných) obsažených ve zvířecích chlupech a lidských vlasech. Informace tohoto druhu obohacují nejen bioarcheologii, ale mají své místo i v jiných oborech souvisejících s antropologií, jako jsou forenzní vědy a medicína.

Práce podává základní přehled o principech stanovení obsahu stabilních izotopů v biologickém materiálu a ukazuje přednosti i nevýhody užití vlasů a chlupů. Na příkladech z bioarcheologie, forenzní medicíny a klinické medicíny jsou ukázány informace, které využívá analýza pro poznání výživy, mobility a geopůvodu.