

# Mikroanalitikai módszerfejlesztések és elemspeciáció biológiai rendszerek vizsgálatára

Doktori értekezés

**Polgári Zsófia Márta**

Semmelweis Egyetem

Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Záray Gyula, DSc  
Konzulens: Dr. Szoboszlai Norbert, PhD

Hivatalos bírálók: Dr. Hartyáni Zsuzsanna, CSc  
Dr. Horváth Péter, PhD

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szökő Éva, DSc  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Lázár László, CSc  
Dr. Gergely András, CSc

Eötvös Loránd Tudományegyetem  
Kémiai Intézet, Analitikai Kémiai Tanszék

Budapest, 2011

## Tartalomjegyzék

<b>1. Rövidítések jegyzéke .....</b>	<b>7</b>
<b>2. Irodalmi háttér.....</b>	<b>9</b>
<b>2.1. Bevezetés .....</b>	<b>9</b>
<b>2.2. A legfontosabb mikroelemek és a sejtekben betöltött szerepük.....</b>	<b>10</b>
<b>2.3. A Fe szerepe az emberi sejtekben .....</b>	<b>13</b>
2.3.1. A vas fiziológiás funkciói .....	13
2.3.2. A vas kémiai tulajdonságai .....	13
2.3.3. A sejtek vas homeosztázisa.....	14
2.3.4. Vastranszporterek .....	14
2.3.5. A „labile iron pool” .....	14
<b>2.4. A rákos sejtek vas metabolizmusa és a vaskelátorok lehetséges     támadáspontjai .....</b>	<b>15</b>
2.4.1. A ferritin .....	15
2.4.2. Transzferrin receptor 1 .....	15
2.4.3. A ribonukleotid-reduktáz és a DNS szintézis .....	15
2.4.4. A vas hatása a sejtciklusban szerepet játszó molekulákra .....	16
2.4.5. A vas szerepe a tumornövekedésben: az angiogenezis és a metasztázis 16	
2.4.5.1. Angiogenezis .....	16
2.4.5.2. Metasztázis.....	17
2.4.5.2.1. A sejtadhézió befolyásolása invazív tumorokban.....	17
2.4.5.2.2. A tumor-host mikrokörnyezet átalakulása a metasztázisban ..	18
2.4.5.2.3. Ndrp-1: gátolja tumornövekedést és a metasztázist.....	18
<b>2.5. A vaskelátorok mint potenciális rákellenes szerek .....</b>	<b>18</b>
2.5.1. Desferroksamin .....	19
2.5.2. Tachpyridine .....	19
2.5.3. ICL670A .....	20
2.5.4. Aroil-hidrazonok.....	20
2.5.5. Tioszemikarbazonok .....	20

2.5.6. Di-2-piridilketon-tioszemikarbazonok, 2-benzoilpiridin-tioszemikarbazonok.....	21
<b>2.6. A Cu szerepe a sejtekben .....</b>	<b>23</b>
2.6.1. A réz fiziológiás funkciói.....	23
2.6.2. A réz kémiai tulajdonságai.....	23
2.6.3. A sejtek réz homeosztázisa .....	24
<b>2.7. A Zn szerepe a sejtekben.....</b>	<b>24</b>
2.7.1. A cink fiziológiás funkciói.....	24
2.7.2. A sejtek cink homeosztázisa .....	25
<b>2.8. Sejtminták elemtartalmának meghatározására alkalmas analitikai módszerek.....</b>	<b>27</b>
2.8.1. Röntgenfluoreszcencia jelenségén alapuló technikák.....	27
2.8.1.1. Elektrongerjesztéses röntgenfluoreszcens mikroanalízis .....	27
2.8.1.2. Részecske indukált röntgenfluoreszcens spektrometria .....	28
2.8.1.2.1. Részecske Indukált Röntgen Emisszió.....	28
2.8.1.2.2. Visszaszórásos spektrometria.....	29
2.8.1.2.3. Pásztázó Transzmissziós Ionmikroszkópia.....	30
2.8.1.3. Nagyenergiájú fotonokkal végzett gerjesztésen alapuló módszerek	31
2.8.1.3.1. Totálreflexiós Röntgenfluoreszcens spektrometria.....	31
2.8.1.3.1.1. Kisrendszámú elemek TXRF meghatározása .....	35
2.8.1.3.1.2. Fe, Cu, Zn meghatározása sejtekben TXRF technika segítségével.....	36
2.8.1.3.1.3. Pt meghatározása sejtmintákban TXRF módszerrel .....	37
2.8.1.3.2. Szinkrotron sugárzást alkalmazó röntgenfluoreszcens spektrometria .....	38
2.8.2. Tömegspektrometriás módszerek .....	39
2.8.3. Szekunder ionemissziós tömegspektroszkópia .....	39
2.8.3.1. Induktív csatolású plazma tömegspektrometria.....	40
2.8.4. Atomabszorpciós spektrometria.....	41
2.8.4.1. Grafítkemencés/Elektrotermikus Atomabszorpciós Spektrometria.	41
2.8.4.2. Sejtminták elemtartalmának meghatározása GF-AAS módszerrel.	45
<b>2.9. Sejtminták speciációjára alkalmas analitikai módszerek .....</b>	<b>51</b>

2.9.1. Elemspeciáció .....	51
2.9.2. Elemspeciációs módszerek .....	51
2.9.2.1. XANES .....	51
2.9.2.1.1. XANES spektroszkópia felhasználása sejtminták esetében .....	53
<b>3. Célkitűzések .....</b>	<b>56</b>
<b>3.1. Kisrendszámú elemek (<math>Z \leq 23</math>) meghatározása TXRF módszerrel .....</b>	<b>56</b>
<b>3.2. Fe, Cu, Zn meghatározása TXRF és GF-AAS módszerrel HT-29 sejtekben .....</b>	<b>56</b>
<b>3.3. Rákos sejtek SR-TXRF-XANES analízise .....</b>	<b>57</b>
<b>4. Anyagok és módszerek .....</b>	<b>58</b>
<b>4.1. A sejtenyészteshez használt anyagok és módszerek .....</b>	<b>58</b>
4.1.1. Tumorsejtvonalak tenyésztése .....	58
<b>4.2. A kisrendszámú elemek (<math>Z \leq 23</math>) TXRF meghatározásához használt anyagok és módszerek .....</b>	<b>58</b>
4.2.1. Referenciaanyagok .....	58
4.2.2. Reagensek .....	58
4.2.3. A kalibrációs faktorok meghatározásához használt oldatok .....	59
4.2.4. A kimutatási és meghatározási határértékek megállapítása .....	59
4.2.5. Műszerek .....	59
4.2.6. Feltárási módszerek .....	59
<b>4.3. A Fe, Cu és Zn TXRF meghatározásához használt anyagok és módszerek.. ..</b>	<b>61</b>
4.3.1. Reagensek .....	61
4.3.2. Műszerek .....	61
4.3.2.1. GF-AAS .....	61
4.3.2.2. TXRF .....	62
4.3.3. A sejtek vassal történő kezelése és mintaelőkészítése .....	62
4.3.4. A sejtek kelátorokkal történő kezelése és mintaelőkészítése .....	63
4.3.5. A kvarclapokon kialakult réteg ellenőrzése pásztázó elektronmikroszkópiával és atomerő mikroszkópiával .....	63
4.3.6. Statisztikai analízis .....	64
<b>4.4. Az elemspeciációs analízishez használt anyagok és módszerek .....</b>	<b>64</b>
4.4.1. Reagensek, vegyszerek .....	64

4.4.2. Standardoldatok .....	64
4.4.3. A sejtek kezelése, mintaelőkészítés .....	65
4.4.4. Az SR-TXRF-XANES mérések kivitelezése.....	66
4.4.5. A kvarclapokon kialakult mintafelszín vizsgálata pásztázó elektronmikroszkópiával .....	67
<b>5. Eredmények .....</b>	<b>68</b>
<b>5.1. Kisrendszámú elemek (<math>Z \leq 23</math>) meghatározása TXRF módszerrel .....</b>	<b>68</b>
5.1.1. Kalibrációs faktorok meghatározása.....	68
5.1.2. Kimutatási és meghatározási határ.....	69
5.1.3. A SERONORM referenciaanyaggal végzett kísérletek és eredményeik	70
5.1.4. MURST-ISS-A2 antarktisi rák referenciaanyag .....	75
5.1.5. NIST 1577a marhamáj referenciaanyag .....	76
5.1.6. IAEA-331 spenót referenciaanyag.....	78
5.1.7. Rákos sejtek S tartalmának meghatározása „lowZ TXRF” spektrométerrel.....	79
5.1.7.1. Sejtszám és a fehérjetartalom közötti összefüggés.....	79
<b>5.2. Fe, Cu, Zn meghatározása TXRF és GF-AAS módszerrel HT-29 sejtekben</b>	<b>80</b>
5.2.1. Módszerfejlesztés Fe, Cu, Zn meghatározására TXRF technika esetében .....	80
5.2.2. Módszerfejlesztés Fe, Cu, Zn meghatározására GF-AAS technika esetében .....	87
5.2.3. A kidolgozott TXRF és GF-AAS módszer összehasonlítása.....	89
5.2.4. HT-29 sejtek vasfelvételének vizsgálata a kidolgozott analitikai módszerekkel.....	91
5.2.5. HT-29 sejtek kezelése kelátorokkal .....	94
5.2.5.1. 4 órás kezelések .....	95
5.2.5.2. 8 órás kezelések .....	98
<b>5.3. Az SR-TXRF XANES mérések eredményei.....</b>	<b>101</b>
5.3.1. A különböző Fe standardok összehasonlítása .....	102
5.3.2. A különböző Fe standardok ferritinnel való összehasonlítása .....	103
5.3.3. A különböző mintaelőkészítési technikák hatása a kvarclapon kialakuló mintarétegre .....	105

5.3.4. A vas oxidációs állapotának meghatározása kezelt és kezeletlen sejtekben, XANES spektrumuk standardokhoz való hasonlítása útján.....	107
5.3.5. A különböző sejtvonalak, valamint a sejtek különböző növekedési fázisainak összehasonlítása .....	109
5.3.6. Vaskezelések hatása a HT-29 sejtek XANES spektrumaira.....	110
5.3.7. A sejtek elemanalízise TXRF technikával .....	111
<b>6. Megbeszélés .....</b>	<b>113</b>
<b>6.1. Kisrendszámú elemek meghatározása biológiai mintákban „lowZ TXRF“ technikával.....</b>	<b>113</b>
<b>6.2. Eredmények vonatkoztatása sejtminták esetében .....</b>	<b>116</b>
<b>6.3. Fe, Cu, Zn meghatározása TXRF és GF-AAS módszerrel HT-29 sejtekben.....</b>	<b>119</b>
<b>6.4. Mintaelőkészítés XANES technikához rákos sejtek esetében .....</b>	<b>120</b>
<b>7. Következtetések .....</b>	<b>125</b>
<b>7.1. Kisrendszámú elemek (<math>Z \leq 23</math>) TXRF meghatározása .....</b>	<b>125</b>
<b>7.2. Fe, Cu, Zn meghatározása TXRF és GF-AAS módszerrel HT-29 sejtekben.....</b>	<b>126</b>
<b>7.3. SR-TXRF-XANES .....</b>	<b>127</b>
<b>8. Összefoglalás .....</b>	<b>129</b>
<b>9. Summary .....</b>	<b>130</b>
<b>10. Irodalomjegyzék .....</b>	<b>131</b>
<b>11. Saját publikációk jegyzéke .....</b>	<b>154</b>
<b>12. Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>155</b>

## 1. Rövidítések jegyzéke

<b>AFM</b>	<i>atomic force microscopy</i> , atomerő mikroszkópia
<b>BpT vegyületek</b>	2-benzoilpiridin-tioszemikarbazonok
<b>CDK</b>	ciklin-dependens kinázok
<b>CKI</b>	ciklin-dependens kináz inhibitorok
<b>CP</b>	cöruoplazmin
<b>DFO</b>	desferroxamin
<b>Dp44mT</b>	2,2'-dipiridil-N,N-dimetilszemikarbazon
<b>DpT vegyületek</b>	Di-2-piridilketon-tioszemikarbazonok
<b>EDTA</b>	etiléndiamintetraecetsav
<b>EELS</b>	elektron energiaveszteségi spektroszkópia
<b>EPMA</b>	<i>electron probe microanalysis</i> , elektronsugaras mikroanalízis
<b>ES-MS</b>	elektrospray ionizációs tömegspektrometria
<b>ET-AAS</b>	<i>electrothermal atomic absorption spectrometry</i> , elektrotermikus atomabszorpciós spektrometria
<b>EXAFS</b>	<i>extended X-ray absorption fine structure</i>
<b>FCS</b>	<i>fetal calf serum</i> , magzati borjúsavó
<b>GF-AAS</b>	<i>graphite furnace atomic absorption spectrometry</i> , grafitkemencés atomabszorpciós spektrometria
<b>HIF-1</b>	hipoxia-indukálható transzkripciós faktor
<b>ICP-MS</b>	induktív csatolású plazma tömegspektrometria
<b>IRP</b>	<i>iron regulatory protein</i>
<b>LIP</b>	<i>labile iron pool</i>
<b>LOD</b>	<i>limit of detection</i> , kimutatási határ
<b>LOQ</b>	<i>limit of quantification</i> , meghatározási határ
<b>MALDI</b>	mátrixszal segített lézer deszorpció/ionizáció
<b>NdrG-1</b>	<i>N-myc downstream regulated gene-1</i>
<b>NMR</b>	mágneses rezonanciaspektroszkópia
<b>NTBI</b>	<i>non transferrin bound iron uptake</i> , nem transferrinhez kötött vasfelvétel
<b>PBS</b>	<i>phosphate buffered saline</i> , foszfát pufferelt sóoldatot

<b>PIH</b>	piridoxal-izonikotinoil-hidrazon
<b>PIXE</b>	<i>particle-induced X-ray emission</i> , részecske indukált röntgen emisszió
<b>PKIH</b>	di-2-piridilketon izonikotinoilhidrazonok
<b>ppm, ppb</b>	<i>parts per million, parts per billion</i>
<b>(R)BS</b>	<i>(Rutherford) backscattering spectrometry</i> , (Rutherford) visszaszórásos spektrometria
<b>ROS</b>	reaktív oxigén gyökök
<b>RR</b>	ribonukleotid-reduktáz
<b>SEM</b>	<i>scanning electron microscope</i> , pásztázó elektronmikroszkóp
<b>SIMS</b>	<i>secondary ion mass spectrometry</i> , szekunder ionemissziós tömegspektroszkópia
<b>SR-XRF</b>	<i>synchrotron radiation X-ray fluorescence</i> , szinkrotron sugárzást alkalmazó röntgenfluoreszcens spektrometria
<b>SRIXE</b>	<i>synchrotron radiation-induced X-ray emission</i>
<b>STEM</b>	<i>scanning transmission electron microscope</i> , transzmissziós pásztázó elektronmikroszkóp
<b>STIM</b>	<i>scanning transmission ion microscopy</i> , pásztázó transzmissziós ionmikroszkópia
<b>SXRM</b>	<i>synchrotron x-ray microscopy</i>
<b>Tf</b>	transzferrin
<b>TfR1</b>	Transzferrin receptor 1
<b>THGA</b>	<i>transverse heated graphite atomizer</i> , keresztben fűtött grafit atomizáló
<b>TOF</b>	<i>Time-of-Flight</i>
<b>TXRF</b>	Totálreflexiós Röntgenfluoreszcens spektrometria
<b>XAFS</b>	<i>X-ray absorption fine structure</i>
<b>XANES</b>	<i>X-ray absorption near edge structure</i>
<b>XAS</b>	röntgenabszorpciós spektroszkópia
<b>XFM</b>	<i>X-ray fluorescence microscopy</i>
<b>XRF</b>	<i>X-ray fluorescence</i> , röntgenfluoreszcencia



## 2. Irodalmi háttér

### 2.1. Bevezetés

Az utóbbi két évtizedben egyre több biológiai kérdés megválaszolásában kapnak szerepet műszeres analitikai kémiai módszerek. Ezen módszerek kidolgozásánál figyelembe kell venni a biológiai minta jellegét, mennyiségét, kezelését és ehhez kell illeszteni egy pontos, reprodukálható és megfelelő kimutatási határral rendelkező analitikai módszert. Ennek megvalósításához szükség van kémikusként a biológiai háttér és módszerek, biológusként az analitikai módszer alaposabb megismerésére ahhoz, hogy a feltett kérdésekre megbízható válaszokat lehessen adni. Vizsgálataink során olyan módszerek alkalmazása és fejlesztése került előtérbe, amelyek alkalmasak kismennyiségű jellemzően 100-300 µg össztömegű biológiai minta (a dolgozat alapvetően rákos sejtek vizsgálatát célozza), szennyezésmentes vizsgálatára.

Munkánk során az elemanalitika és elemspeciáció területén foglalkoztunk analitikai kémiai módszerfejlesztésekkel.

A disszertáció első része biológiai mintákban lévő kisrendszámú elemek ( $Z \leq 23$ ) meghatározásának lehetőségével foglalkozik totálreflexiós röntgenfluoreszcens spektrometriai (TXRF) módszerrel. Ezen módszerfejlesztés során humán, állati és növényi referenciaanyagok Na, Mg, P, S, K, Ca tartalmát határoztuk meg különböző módszerekkel végzett mintaelőkészítést követően.

A disszertáció további módszerfejlesztései a rákos sejtekben található vas mennyiségi, valamint oxidációs állapotának meghatározására irányultak. A rákos sejtek vas homeosztázisa intenzív kutatás tárgya. A vas alapvető fontosságú elem az emberi szervezetben, de az irodalomban sok tanulmány foglalkozik a szervezet vasraktárainak feltöltöttsége és a különböző rákos elváltozások közötti összefüggés vizsgálatával. A gyorsan osztódó rákos sejteknek nagyobb vas szükségletük van, mint egészséges társaiknak, így a vas kelációja (vaskelátorok) egy új lehetőséget nyújt a kemoterápiában. A vaskelátorokkal folyó kísérletekben a sejtek vastartalmának változását többnyire  $^{59}\text{Fe}$  izotóppal követik nyomon. Ezen irodalmak tanulmányozásakor vetődött fel a kérdés, hogy vajon ezen kelátorok nem befolyásolják-e a sejtek Cu és Zn tartalmát is? Ezen témakörhöz kapcsolódik a disszertáció második része, melyben rákos sejtek Fe, Cu és Zn tartalmának meghatározását végeztük el TXRF módszerrel, illetve Fe és Cu

meghatározását grafitkemencés atomabszorpciós spektrometriai (GF-AAS) módszerrel, valamint kidolgoztuk az ehhez szükséges analitikai mintaelőkészítést.

A vasat Fe(II) és Fe(III) állapotok közti könnyű átalakulása teszi esszenciális és egyben veszélyes elemmé is. Az SR-TXRF-XANES (synchrotron radiation induced total reflection X-ray fluorescence X-ray absorption near edge structure) módszer segítségével lehetőségünk nyílt a rákos sejtekben a vas oxidációs állapotának és koordinációs környezetének vizsgálatára. A mintaelőkészítésre kidolgozott módszert és az ezzel nyert eredményeket mutatja be a disszertáció harmadik része.

Mivel a disszertáció biológiai mintákhoz kapcsolódó analitikai módszerfejlesztéssel foglalkozik, az irodalom feldolgozásánál szükség volt mind a vizsgált elemek biológiai szerepének, mind a meghatározásukhoz alkalmazható analitikai módszerek bemutatására.

## **2.2. A legfontosabb mikroelemek és a sejtekben betöltött szerepük**

Mai ismereteink 25 elem biológiai szükségességét igazolják. Hat elem (H, C, O, N, P, S) minden földi életforma számára nélkülözhetetlen, ezekből épülnek fel a biomolekulák. Az alapvető fontosságú alkotók második csoportját a sejtek elektrokémiai sajátosságaiért felelős kationok (pl.  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ) és anionok (pl.  $Cl^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $HPO_4^{2-}$ ) alkotják, amelyek megfelelő ionegyensúlyt alakítanak ki a sejthártya két oldalán és állandó ozmózisnyomást biztosítanak. A létfontosságú elemek harmadik csoportjába az ún. mikroelemek tartoznak. Mikroelemeknek nevezzük azokat az elemeket, amelyek mennyisége 100 mg/testtömeg kilogramm alatt van a szervezetben (pl.: Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Se, Mo) [1].

A nagyon kis koncentrációban előforduló elemek, mint például a különböző fémionok nagyon fontos szerepet játszanak a különböző biológiai folyamatokban. Vizsgálatuk a különböző sejt és szövetmintákban elengedhetetlen a biológiai rendszerek működésének jobb megértésében, a különböző biokémiai, toxikológiai folyamatokban betöltött szerepük tisztázásában. A legtöbb esszenciális fémion valamilyen proteinhez vagy enzimhez kötődik a szervezetben, kulcsszerepet töltenek be azok aktív helyeinek vagy szerkezetüknek kialakításában.

A különböző fehérjék és enzimek körülbelül 40%-a tartalmaz valamilyen fémiont. Ezen fehérjék és enzimek számos metabolikus folyamat résztvevői, illetve irányítói:

biológiai energiatermelés és felhasználás (fotoszintézis, sejtlégzés), jelátviteli folyamatok, katalízisek, szubsztrát-kötés, -aktiválás, szállítás, raktározás. Metalloproteinekről akkor beszélünk, ha a végleges fehérje-konformáció kialakításában mindig a megfelelő típusú és számú ligandum vesz részt. Csak a megfelelő geometriájú ligandumok képesek az adott fémion megkötésére és aktiválására. A természetes és különböző tervezett fehérjék szerkezetéből levonható a következtetés, hogy viszonylag egyszerűek azok a struktúrák, melyek számos fémion megkötésére alkalmasak. Peptidek, fehérjék különböző méretű részei tartalmaznak olyan funkcionális csoportokat, melyek képesek fémionok koordinációjára. Az aminosavak közül a cisztein és a metionin vesz részt azon fémionok koordinációs helyeinek kialakításában, melyek S affinitással rendelkeznek. A hisztidin esetében a benne lévő N válik alkalmassá koordinációs kötés kialakítására a fém indukálta deprotonációt követően.

A metalloproteineket megkülönböztetjük a fémkötő fehérjéktől (metal-binding proteins). A metalloproteinek fémionkötő affinitása nagy, a kialakult kötés erős és nem szűnik meg a különböző mintakezelési lépések (hígítás, izolálás) során sem. A fémkötő fehérjék esetében a fém-fehérje kapcsolat gyengébb és könnyen megszüntethető. A fehérjék egyértékű alkálifém ionokkal kialakított kapcsolata a leggyengébb ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ), a kétértékű alkáliföldfém ionokkal ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) már közepesen erős kötések alakulnak ki. A legerősebb az átmeneti fémionokkal létrejövő kölcsönhatás (köszönhetően a sűrűségüknek, a viszonylag kis atomsugaruknak, az elektromágneses és elektrosztatikus erők révén kialakított kötéseiknek), így nem meglepően főleg ezen ionok találhatóak a különböző metalloproteinekből [2].

*Az 1. táblázat az átmeneti fémek közül az értekezésben vizsgált három esszenciális elem, a Fe, Cu és Zn vonatkozásában ad áttekintést a velük kötést létesítő partner fehérjékről és enzimekről, továbbá a hiányukban jelentkező tünetekről és betegségekről (zárójelben azon betegségek találhatóak, melyek esetében az adott elem szerepe még nem teljes egészében tisztázott) [2, 3, 4, 5].*

1. táblázat: A Fe, Cu és Zn sejtbeli kötőpartnerei, valamint a hiányukban fellépő tünetek és betegségek [2, 3, 4, 5].

Elem	Protein/enzim	Hiánytünetek/hiánybetegségek	Betegségek
<b>Fe</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hemtartalmú fehérjék (a vas porfirin-gyűrűben található): hemoglobin, myoglobin, citokrómok.</li> <li>• Nem hemtartalmú fehérjék: transferrin, ferritin, ovotranszferrin, kazein, hemosziderin, albumin</li> <li>• Kataláz, citokróm, nitrogenáz, hidrogenáz</li> <li>• Ribonukleotid redukáz, prolil-hidroxiláz, fenilalanin-hidroxiláz, akonitáz</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anaemia</li> <li>• fáradékonyság;</li> <li>• irritabilitás;</li> <li>• fizikai és szellemi teljesítmény csökkenése;</li> <li>• szervezet védekezőképességének csökkenése;</li> <li>• celluláris immunitás csökkenése.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Parkinson-kór (vas felhalmozódása a substantia nigrában)</li> <li>• Alzheimer-kór</li> <li>• Hemokromatózis (vas anyagcserezavara, autoszómális recesszív módon öröklődik)</li> <li>• fertőzések (Mycobacterium smegmatis, M. tuberculosis, M. avium, Plasmodium falciparum)</li> <li>• kancerogenezis (reaktív oxigén gyökök képzése, angiogenezis, metasztázis)</li> <li>• <i>(Atherosclerosis, kardiovaszkuláris betegségek, amiotrófiás laterálszklerózis, örökletes retinadegeneráció)</i></li> </ul>
<b>Cu</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cöruoplazmin (humán szérumprotein)</li> <li>• Szuperoxid-dizmutáz</li> <li>• Tirozináz</li> <li>• Citokróm c oxidáz</li> <li>• Monoamin-oxidáz</li> <li>• Lizil-oxidáz</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• vázrendszer defektusai,</li> <li>• az idegrendszer degenerációja,</li> <li>• a haj szerkezetének és pigmentációjának megváltozásai,</li> <li>• a szaporodás zavarai</li> <li>• kardiovaszkuláris léziók,</li> <li>• anaemia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Wilson-kór (a réz anyagcserezavara, autoszómális recesszív módon öröklődik)</li> <li>• Menkes-szindróma (a réz szállítás zavara, X kromoszómához kötött, recesszív módon öröklődik)</li> <li>• Parkinson-kór, Alzheimer-kór</li> <li>• kancerogenezis (angiogenezis, reaktív oxigén gyökök képzése)</li> <li>• <i>(Örökletes retinadegeneráció, atherosclerosis, kardiovaszkuláris betegségek, epilepsziás roham)</i></li> </ul>
<b>Zn</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A cink több mint 200 enzim és fehérje alkotóeleme.</li> <li>• Legismertebbek: karboanhidráz, karboxipeptidáz, aminopeptidáz, alkalikus foszfátáz, alkohol-dehidrogenáz, DNS polimeráz, termolizin, szuperoxid-dizmutáz, metalloproteinázok.</li> <li>• Inzulin, "cinkujj" fehérjék, metallotionein</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• anaemia;</li> <li>• nagyfokú levertség;</li> <li>• étvágytalanság;</li> <li>• törpenövés;</li> <li>• durva és száraz bőr;</li> <li>• máj és lépmegegyesülés;</li> <li>• hypogonadizmus;</li> <li>• elhúzódó sebgyógyulás;</li> <li>• íz- és szagérzés romlása</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alzheimer-kór</li> <li>• <i>(Amiotrófiás laterálszklerózis, Parkinson-kór, örökletes retinadegeneráció, atherosclerosis, kardiovaszkuláris betegségek, osteoporosis, epilepsziás roham, prosztatarák)</i></li> </ul>

## 2.3. A Fe szerepe az emberi sejtekben [6]

### 2.3.1. A vas fiziológiás funkciói

A megfelelő mennyiségű vas jelenléte a szervezetben alapvető fontosságú az állatok, növények, mikroorganizmusok szempontjából is. A vas számos fehérje alkotóeleme: hemtartalmú proteinek, elektron transzportlánc proteinek, mikroszómális elektron transzportlánc proteinek, vas-kén proteinek és enzimek, mint például a ribonukleotid reductáz, prolil hidroxiláz, fenilalanin hidroxiláz, akonitáz.

A vasnak különösen nagy jelentősége van a vörösvértestek képzésében. A hemoglobin előállításához szükséges vas hiánya következtében kialakuló vashiányos vérszegénység (anémia) a WHO (World Health Organization) szerint az 5 és 14 év közötti korosztály 46%-át érinti.

A vasnak kiemelten fontos szerepe van az idegrendszer és az immunrendszer normális működésében is. Állatkísérletekben kimutatták, hogy patkányokat alacsony vastartalmú étrenden tartva az agyfunkciók visszafordíthatatlan károsodása következik be az elégtelen mielinizáció, valamint a dopaminerg pályák hiányos kialakulása következtében. Felnőtt állatokban és emberekben a vashiány több ponton befolyásolja az immunválaszt is. Makrofágok esetében csökkent baktériumölő-aktivitást figyeltek meg.

### 2.3.2. A vas kémiai tulajdonságai

A vas két oxidációs formában fordul elő az élő szervezetben:  $\text{Fe}^{2+}$  és  $\text{Fe}^{3+}$ . Vizes oldatban a  $\text{Fe}^{2+}$  oxidálószer jelenlétében  $\text{Fe}^{3+}$ -má oxidálódik a pH függvényében. Mivel oxigén jelenlétében a vas oldhatósága igen csekély, így az élő szervezetek fejlődésük során olyan fehérjéket kezdtek el termelni, melyek képesek termodinamikailag stabilan megkötni a vasat, de mindeközben a vas kinetikailag elérhető marad a különböző biológiai folyamatokhoz.

Gerincesekben az extracelluláris  $\text{Fe}^{3+}$  megkötéséért és szállításáért a plazma protein, transferrin (Tf) a felelős. A transferrinnek két  $\text{Fe}^{3+}$  kötőhelye van, melyek stabilitási állandója  $1-6 \times 10^{22} \text{ M}^{-1}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ -ra nézve.

A Fenton reakcióban a  $\text{Fe}^{2+}$  a hidrogén peroxidból hidroxil gyököt képez ( $\text{HO}\cdot$ ), ami a legreaktívabb szabad gyökök egyike. A sejtben lévő redukzív környezetben a  $\text{Fe}^{3+}$  aztán nem enzimatis úton, a sejtben található redukálószerrel (aszorbát, redukált

glutation) segítségével visszaredukálódik  $\text{Fe}^{2+}$ -vé, ezzel a hidroxil gyökök folyamatos termelődését indítva el.

### 2.3.3. A sejtek vas homeosztázisa

A vas felvétele a sejtekbe történhet transferrinhez és nem transferrinhez kötött módon. A bekerülő vas a „labile iron pool” része lesz, a felesleg pedig ferritinben tárolódik, illetve számos enzim alkotóelemévé válik, melyek aktivitásához nélkülözhetetlen.

### 2.3.4. Vastranszporterek

A Fe-Tf endocitózis révén kerül be a sejtbe, ahol az endoszóma 6,0-os pH-ján a Tf elengedi a kötött vasat. A  $\text{Fe}^{3+}$  ezután egy endoszómális ferrireduktáz (Dcytb=duodenal cytochrome b reductase, mely aszkorbátot használ redukálószerként) segítségével redukálódik. A vas transzportjárt felelősek még: a DMT1 és Ireg1 (más néven ferroportin 1 vagy MTP1) transzporterek. A  $\text{Fe}^{2+}$  közvetlenül a plazmamembránban található DMT1 transzporterén keresztül is bejuthat a sejtbe, úgynevezett nem transferrinhez kötött vasfelvétel (NTBI, non transferrin bound iron uptake) segítségével. A DMT1 egy  $\text{Fe}^{2+}$  atom és egy proton kotranszportját valósítja meg. Az Ireg1 transzporter felelős a  $\text{Fe}^{2+}$  sejtből kifelé történő transzportjárt, majd a  $\text{Fe}^{2+}$ -t a hephaestin ferroxidáz oxidálja az apoTf-hez való kötődése előtt.

A plazma Tf jelen lehet apo formában, illetve egy vagy két  $\text{Fe}^{3+}$  atomot kötve. A Tf szaturáció normális esetben 35%, ami azt jelenti, hogy az egyetlen  $\text{Fe}^{3+}$ -at kötő Tf forma az uralkodó.

### 2.3.5. A „labile iron pool” (LIP)

A vas citoszolba való bekerülésekor a „labile vagy reactive iron pool” része lesz. A Fe „felesleg” pedig ferritin formájában tárolódik, mely legfeljebb 4500  $\text{Fe}^{3+}$  atom/ 1 ferritin megkötésére képes  $[\text{FeO}(\text{OH})]_8[\text{FeO}(\text{H}_2\text{PO}_4)]$  formában. (34. ábra, 105. oldal)

A LIP-ban a vas egy gyengén kötött formában van jelen. A LIP komplexek kötési konstansa kisebb, mint  $10^6$ . A sejtben lévő redukzív környezet miatt a LIP-ban lévő vas jórészt  $\text{Fe}^{2+}$  állapotban van, de  $\text{Fe}^{3+}$  is előfordulhat a sejtbeli oxidáció következményeként. A LIP-ban a vas kötésében szerepet játszó összetevők pontosan nem ismertek, de valószínűleg kis molekulásúlyú foszfátok, nukleotidok, szerves savak és membránfehérjék alkotják. Alapvetően a sejt vastartalmának 3-5%-a van LIP-ban, de ez a kis mennyiség felelős a sejt tényleges vas „státuszáért”. Magas vastartalmú

médiumban tenyésztett neuroblasztóma sejtek 3-4-szer nagyobb LIP-lal rendelkeznek, mint az alacsony vastartalmú médiumban tenyésztett társaik. Valamint a nagyobb LIP-lal rendelkező sejtek minden esetben több reaktív oxigén gyököt is termelnek. Tehát a LIP nemcsak a sejt teljes vastartalmának egyfajta markere, hanem meghatározza a sejt redox "státuszát" is.

A gerincesekben a sejtekben található vas koncentrációját a citoszolban található IRP1 és IRP2 (iron regulatory protein) fehérjék szabályozzák poszttranszkripcionálisan. Az IRP1 és IRP2 proteinek működését elsősorban a celluláris vas szintjének változása alakítja.

## **2.4. A rákos sejtek vas metabolizmusa és a vaskelátorok lehetséges támadáspontjai [7]**

### **2.4.1. A ferritin**

Több tanulmány is foglalkozik a ferritin és a különböző rákos elváltozások közti kapcsolattal. Bár a vasraktárak nagysága nem növekedett, több rákos folyamat esetében megfigyelték a ferritin szérumszintjének megemelkedését. Egyelőre nincs rá magyarázat, hogy egyes rákos sejtek miért szekretálnak ferritint, de például leukémiás sejtek esetében azonosítottak egy növekedési faktort, ami immunológiai szempontból teljesen megegyezik a ferritinnel. (Ferritin elleni ellenanyag gátolta ezen sejtek további növekedését, mely jelenség alátámasztja, hogy ez a protein szerepet játszott a sejtproliferáció elősegítésében.)

### **2.4.2. Transzferrin receptor 1 (TfR1)**

A rákos sejtek vas metabolizmusa több ponton eltér a normál sejtektől. A legismertebb eltérés a sejtfelszíni TfR1 emelkedett expressziója, amely részben magyarázható a DNS szintézishez szükséges vas-függő ribonukleotid reduktáz (RR) fokozott expressziójával. A rákos sejtekben az osztódás mértéke és a DNS szintézis foka sokkal magasabb, mint a normál sejtekben és ez sokkal több aktív RR-t igényel.

### **2.4.3. A ribonukleotid-reduktáz (RR) és a DNS szintézis**

Mivel a ribonukleotidok redukciója a DNS szintézis sebességmeghatározó lépése, így a RR inaktivációjának számos következménye van: leáll a DNS szintézis, sejtosztódás, DNS repair, mely folyamatok a sejtciklus leállításához és apoptózishoz vezetnek. Az emelkedett RR aktivitást pedig összefüggésbe hozzák a sejtek malignus

transzformációjával, és a tumor növekedéssel, ezért is lehet a vas-függő RR az újgenerációs rákellenes szerek célpontja.

#### **2.4.4. A vas hatása a sejtciklusban szerepet játszó molekulákra**

A DNS szintézisen kívül a vas ugyancsak fontos szerepet játszik a sejtciklus szabályozásában is, ugyanis befolyásolja egyes szabályozó fehérjék expresszióját.

A sejtciklus 5 részre tagolható: G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>, M és G<sub>0</sub>. Az egyes ciklusok közti továbblépés nagyon szigorúan ellenőrzött a különböző ciklinek és ciklin dependens kinázok (CDK), ciklin dependens kináz inhibitorok (CKI) és a p53 tumorszupresszor fehérje által.

Sok tanulmány foglalkozik a vasmegvonás hatásával sejtciklus szabályozására. Összességében elmondható, hogy a vaskeláció okozta vaselvonás megváltoztatja egy sor, a sejtciklus szabályozásában résztvevő molekula expresszióját (p53, GADD45, ciklin D1, D2, D3, p21, CDK2). Ezen változások pedig kulcsfontosságúak a vaskelátorok esetében megfigyelt G<sub>1</sub>/S átmenet felfüggesztésében, és a kiváltott apoptózisban.

#### **2.4.5. A vas szerepe a tumornövekedésben: az angiogenezis és a metasztázis**

A tumorsejteknek bizonyos daganatnagyság (1-2 mm<sup>3</sup>) elérése után vérellátásra van szükségük az oxigén és tápanyagellátás (pl. glükóz) biztosítására. Csak az a tumor képes tovább növekedni, amely a környező érendotélsejtek osztódásának serkentésével (angiogenezis) ezt biztosítani tudja.

##### **2.4.5.1. Angiogenezis**

Valószínűsíthetően a vasnak ebben a folyamatban van kulcsszerepe, ezért is befolyásolhatja a vas kelációja a tumorok angiogenezisét. A rákos sejtek gyors szaporodása és a gyors tumornövekedés során oxigén hiány – hipoxia – jön létre a tumorban, és ez indukálja az angiogenezist. Sejt szinten a hipoxiára adott válasz a hipoxia-indukálható transzkripciós faktor (HIF-1) rendszeren keresztül történik. Ennek egyik eleme a HIF-1 $\alpha$ , melynek szabályozásában a Fe tartalmú enzim, a prolin hidroxiláz játszik szerepet. Megfelelő oxigén és vas ellátottság esetén, ez az enzim felelős a HIF-1 $\alpha$  hidroxilációjáért és degradációjáért.

Hipoxiás körülmények között a prolin-hidroxiláz inaktív, így a HIF-1 $\alpha$  nem bomlik le, hanem felhalmozódik a citoplazmában, majd bekerül a sejtmagba ahol a célgének



hipoxiareszponzív elemeihez kötődve befolyásolja a hipoxia által kiváltott transzkripciós választ.

A prolil-hidroxiláz enzim működéséhez Fe(II)-re van szükség, tehát az intracelluláris vas elvonása az enzim inaktiválódásához vezet. Az inaktív prolil-hidroxiláz nem tudja hidroxilálni a HIF-1 $\alpha$  proteint, ami végül a HIF-1 célgénnek átíródásához vezet. Mindezeket és a vaskelátorok azon tulajdonságát is figyelembe véve, hogy a pro-angiogenezis faktor VEGF1 upregulációját indukálják, elméletileg arra a következtetésre juthatunk, hogy a vaskelátorokkal való kezelés következménye lehet angiogenezis és tumornövekedés is. Természetesen fontos megemlíteni, hogy az angiogenezis, valamint a tumornövekedést gátló folyamatok is igen komplexek, rengeteg angiogenezist segítő és gátló faktor eredőjeként jön ki a tényleges eredmény. A vas megvonás tehát a VEGF1 megnövelt expresszióján keresztül az angiogenezist serkenti, de a vas megvonás ugyanakkor gátolja a ribonukleotid-reduktázt, hatására a metasztázis és növekedés szupresszor Ndr-1, valamint az apoptózis indukáló gén BNIP3 upregulációja következik be, a ciklin D1 downregulációja kapcsán gátlódik a G<sub>1</sub> átmenet a sejtciklusban, a p21 apoptózist indukáló fehérje downregulációja következik be, növekszik a p53 fehérje expressziója, ami pedig az angiogenezist gátolja. Mivel a kísérletek alapján a hatékony vaskelátorok gátolják a tumornövekedést, kijelenthető, hogy az angiogenezis esetén is az antiproliferatív hatás dominál.

#### **2.4.5.2. Metasztázis**

##### **2.4.5.2.1. A sejtadhézió befolyásolása invazív tumorokban**

A rákban elhunytak 90%-a a metasztázisos szövődmények miatt hal meg. Amikor egy primer tumor számára “elérhetővé” válik az érrendszer a rákos sejtek képesek szétterjedni a szervezetben a szisztémás és nyirokkeringés segítségével. A metasztázisra hajlamos tumortípusoknál kimutatták, hogy a rákos sejtek csökkent sejtadhéziós fenotípus-tulajdonságokkal rendelkeznek. Ez főleg a sejtadhéziós molekulák mutációjának köszönhető.

Számos tanulmány támasztja alá, hogy a vaskelátorok hatással vannak a sejt felszíni adhéziós molekulák expressziójára (E-szelektin, VCAM-1, ICAM-1). Az egyelőre tisztázatlan, hogy ezek a kelátorok okozta expressziós változások hogyan, illetve befolyásolják-e egyáltalán a rákos sejtek metasztázisát, invázióját in vivo.

#### **2.4.5.2.2. A tumor-host mikrokörnyezet átalakulása a metasztázisban**

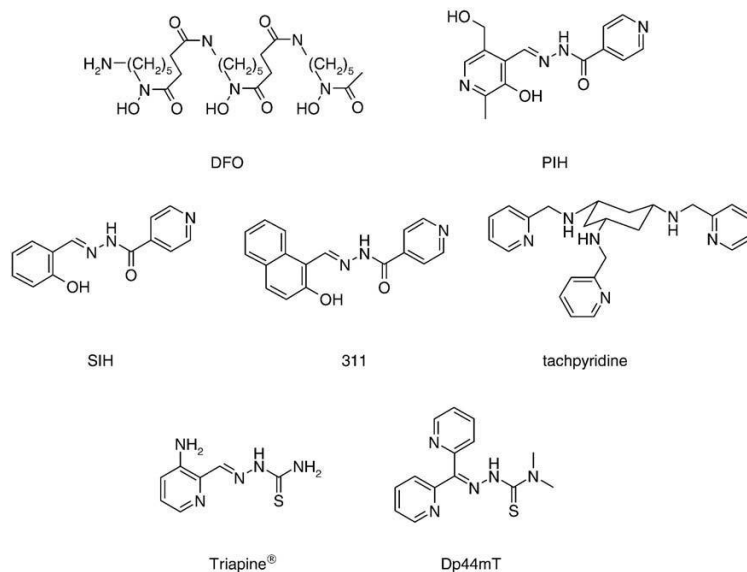
A tumorsejtek a metasztázis folyamata során egy sor olyan enzimet termelnek, melyek lebontják az extracelluláris mátrixot és a sejtekhez kapcsolódó proteineket a daganat környezetében. Ilyen enzimek például a mátrix metalloproteinázok, szövet szerin proteináz. A mátrix metalloproteinázok cinktartalmú enzimek, a cink szükséges az endopeptidáz aktivitáshoz. Több tanulmány is foglalkozott mostanában a vas szerepével a metalloproteinázok szabályozásában, illetve a vaskelátorok hatásával ezen enzimekre, de a kísérletek eredményei gyakran igen eltérőek. A legtöbb kísérleti modell esetében azt figyelték meg, hogy a vas kelációja csökkenti a metalloproteinázok expresszióját. Mindez arra utal, hogy egyes vaskelátorok nemcsak gátolják a tumornövekedést, hanem metasztázist gátló hatást is kifejtenek a mátrix metalloproteinázok expressziójának csökkentésével.

#### **2.4.5.2.3. NdrG-1: gátolja tumornövekedést és a metasztázist**

A metasztázist vizsgáló kutatásokban igazi áttörést jelentett a metasztázis szupresszor proteinek felfedezése, köztük az NdrG-1 (N-myc downstream regulated gene-1). A vas kelációja növeli az NdrG-1 expresszióját HIF-1 $\alpha$  függő és független utakon. Ezen adatok alapján az NdrG-1 expressziójának növelése fontos szerepet játszhat a vaskelátorok antiproliferatív és antimetasztatikus hatásának kialakításában.

### **2.5. A vaskelátorok mint potenciális rákellenes szerek [7]**

A gyorsan osztódó rákos sejteknek sokkal nagyobbak a vas szükségleteik, mint normál társaiké, így jóval érzékenyebbek a vas elvonására is [ 8, 9, 10]. Ezért is jelenthet a vas kelációja egy új kemoterápiás lehetőséget. Az alábbiakban a vaskelátorok új generációit (*1. ábra*) mutatjuk be, különös tekintettel azokra, melyek jelentős és szelektív tumorelles hatással rendelkeznek.



1. ábra: Vaskelátorok generációi.

### 2.5.1. Desferroxamin (DFO)

A desferroxamin ma is forgalomban lévő hatóanyag (Desferal inj.), melyet a thalassemia major terápiájában használnak. A thalassemia major egy öröklött betegség, melyben a szervezet nem képes funkcióképes hemoglobin előállítására. A betegség következménye vérszegénység, ami miatt gyakori vérátömlesztésre van szükség. A gyakori vérátömlesztés miatt túlzott mértékű vasfelhalmozódás alakulhat ki, ezért van szükség a vaskelációra.

Több tanulmány is leírja a desferroxamin antiproliferatív hatását különböző típusú tumorsejteken [8, 9, 11], mások viszont ennek ellenkezőjét állítják [12, 13]. Ezen ellentétes tapasztalatoknak több oka is lehet: a hatóanyag rövid félélettideje, a molekula nagy hidrofilitása, valamint a membránokon való csekély átjutási képessége [14, 15].

Ezen tapasztalatok alapján a későbbiekben nagyobb szelektivitású és nagyobb hidrofóbitású rákellenes vaskelátorokat próbáltak kifejleszteni.

### 2.5.2. Tachpyridine

A tachpyridine a Fe(II) mellett Ca(II), Mg(II), Mn(II), Cu(II) és Zn(II) ionokat is képes megkötni, de citotoxikus hatásában a vas kelációja játszik szerepet [14, 16, 17]. A tachpyridine nagyobb affinitással köti meg a Fe(II)-t mint a Fe(III)-at anaerob körülmények között, valamint kimutatták, hogy a tachpyridinnel történő keláció révén bekövetkezik a Fe(III) redukciója Fe(II)-vé, ami kritikus lépés a Haber-Weiss reakcióban a reaktív oxigén gyökök keletkezéséhez (ROS) [16, 17]. A tachpyridine

gátolja a ferritin szintézist, valamint p53 független úton apoptózist indukál. Mivel a rákos elváltozások nagytöbbségében hibás a p53 gén, így igen nagy klinikai jelentősége lehet egy rákellenes szernek, mely p53-független apoptózist képes indukálni [18].

### **2.5.3. ICL670A**

Az ICL670A molekulát a Novartis fejlesztette ki, mely orálisan is adható gyógyszer vasfelhalmozódással járó kórképekben. In vitro tanulmányokban antiproliferatív hatását is kimutatták sejt kultúrákon, ám a DNS szintézis gátlásához szükséges koncentráció igen magasnak bizonyult [19, 20].

### **2.5.4. Aroil-hidrazonok**

A kelátorok ezen csoportját a piridoxal izonikotinoil hidrazonnal (PIH) végzett ígéretes kísérletek után fejlesztették ki. Bár a PIH hatékonyabb vaskelátor mint a DFO, DNS szintézist gátló hatásukban csak kis eltérés volt megfigyelhető az SK-N-MC neuroblasztóma sejtekben. Ezen megfigyelés alapján feltételezhető, hogy nincs összefüggés az adott molekula vaskelatizáló hatékonysága és DNS szintézist gátló tulajdonsága között [21], valamint valószínűsíthető az is, hogy a különböző vaskelátoroknak más-más sejtbeni vasraktárak a célpontjai, melyeken keresztül kifejtik tumorelles hatásukat [22]. A későbbiekben számos PIH-analóg szintézisére került sor és vizsgálták a különböző szubsztituensek szerepét a szerkezet-hatás összefüggésben [22, 23]. A szintetizált vegyületek közül a 2-hidroxi-1-naftilaldehid izonikotinoil hidrazon (más néven 311) volt az egyik leghatékonyabb kelátor. A 311 vegyület antiproliferatív hatását azáltal éri el, hogy a RR (ribonukleotid-reduktáz) működéséhez szükséges vasraktárakat üríti ki, mely végső soron apoptózishoz vezet [24, 25].

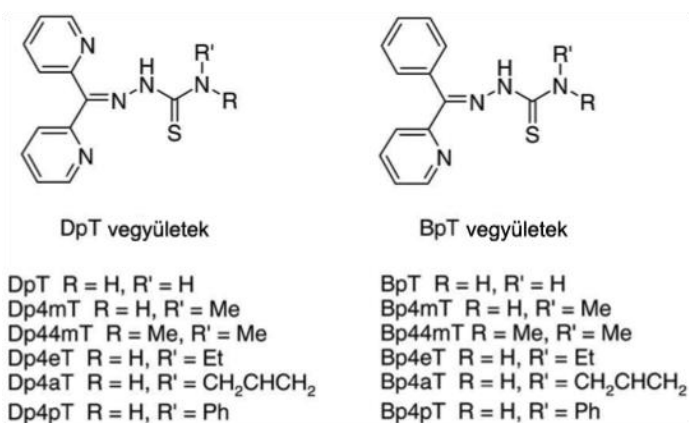
A kelátorok egy következő csoportját képezik a di-2-piridilketon izonikotinoilhidrazonok (PKIH), melyek ugyancsak antiproliferatív hatással rendelkeznek [26].

### **2.5.5. Tioszemikarbazonok**

A kelátorok ezen csoportja volt az egyik legelső, melyben igen jelentős antiproliferatív hatású molekulákat azonosítottak. Ezen háromfajú ligandumok a vasat egy S és két N donoratom segítségével kelatizálják. A Fe(II) mellett, Cu(II), Co(II), Ga(II), Mn(II) és Zn(II) kelációjára is képesek. A feltételezések szerint erős antiproliferatív hatásukat a RR enzim hatékony gátlásával érik el [27, 28, 29, 30]. A régebbi tanulmányokban az szerepel, hogy a tioszemikarbazonok valószínűleg a RR két

Fe atomot tartalmazó centrumának gátlásával érik el hatásukat (a vas kelációjával), de a 3-aminopiridin-2-karboxialdehid tioszemikarbazon (Triapine®) vizsgálatakor kiderült, hogy a vegyület redox-aktív [31]. A kísérletek szerint a Fe(III)-Triapine® komplex redukciója ROS termelődéséhez, és több lépésen keresztül a RR enzim inaktivációjához vezet [32]. Az utóbbi években a Triapine® klinikai fázis I és II vizsgálatokban került kipróbálásra [33, 34, 35].

### 2.5.6. Di-2-piridilketon-tioszemikarbazonok (DpT vegyületek), 2-benzoilpiridin-tioszemikarbazonok (BpT vegyületek)



2. ábra: DpT és BpT származékok.

A kelátorok (főleg a tioszemikarbazonok és a PKIH származékok) szerkezet-hatás összefüggéseinek vizsgálata során azonosították azokat a szerkezeti elemeket, melyek fontosak a vaskeláció és az antiproliferatív hatás szempontjából. Ezen szerkezeti elemek kombinációja vezetett az ún. “hibrid”-molekulák szintéziséhez [36]. Ebbe a csoportba tartoznak a di-2-piridilketon-tioszemikarbazon (DpT) származékok (2. ábra), melyek a PKIH és a 2-hidroxi-1-naftilaldehid tioszemikarbazon vegyületek “hibridizációjával” jöttek létre. Az így létrehozott DpT vegyületek hatékonyságát in vitro és in vivo is vizsgálták és összehasonlították a DFO és 311 vegyületekével. A DpT vegyületek jelentősen nagyobb antiproliferatív hatást és vasmobilizáló képességet mutattak ezekben a kísérletekben. (Egy Fe<sup>2+</sup> vagy Fe<sup>3+</sup> kelatizálásához 2 DpT molekulára van szükség [37].) A tanulmány azt is kimutatta, hogy a kelátorok vaskötő tulajdonsága elengedhetetlen az antiproliferatív hatáshoz. A DpT vegyületek közül a leghatékonyabbnak a Dp44mT bizonyult. Az ígéretes in vivo eredmények után a Dp44mT in vitro is 47%-kal csökkentette a tumor növekedését a kontrollhoz viszonyítva (egerekbe oltott - a citotoxikus szerekre rezisztens - M109 tüdőkarcinóma

sejtvonallal végezték ezt a kísérletet), valamint a szer nem csökkentette az állatok súlyát, a hemoglobin koncentrációt, a hematokrit értéket, a eritrociták és leukociták számát sem [38]. Whitnall és munkatársai in vivo és in vitro vizsgálatokban is összehasonlította a Dp44mT és a Triapine® hatékonyságát. A Dp44mT vegyület erős antiproliferatív hatását 28 sejtvonalon igazolta [39]. A szer a proliferáció gátlását p53 független úton éri el, melynek nagy jelentősége lehet, mivel a tumorok 50%-ában található mutáns p53 gén/fehérje. A tanulmányban bemutatták, hogy a Dp44mT gátolja az egerekbe oltott emberi tumor xenograftok növekedését is. Mindamelllett, hogy a szer jelentős tumorelleses hatékonyságot mutat, az egerek jól tolerálták.

Meglepő módon azt tapasztalták, hogy a kezelés nem vezetett az intracelluláris vas mobilizációjához a tumorban [39], pedig a sejtvonalakon elvégzett kísérletekben gátolta a vas felvételét a transferrinből, valamint a sejtekben lévő vas mobilizációját indította el [38]. Ezen tapasztalatok alapján a szer in vivo tumorelleses hatásában valószínűleg nem a vas sejtekből való kivonása játsza a legfőbb szerepet, hanem Dp44mT-Fe komplex redox aktivitása.

Dp44mT hatékonyságában bizonyára szerepet játszik a DpT vegyületekre jellemző nagy lipofilitás, valamint hogy a fiziológias pH-n neutrális formában vannak jelen [40]. Ezen tulajdonságaiknak köszönhetően képesek a membránokon való átjutásra és férnek hozzá a sejtproliferációhoz szükséges intracelluláris “labile iron poolban” található vashoz. Ugyanebben a tanulmányban arra következtetésre jutottak, hogy a Dp44mT nem kapcsolódik erősen a DNS-hez. Ez alapján feltételezhető, hogy a szer antiproliferatív hatásának alapja nem a hidroxil gyökök közvetlen DNS károsító hatása, hanem valószínűleg más mechanizmusok. Az egyik feltételezhető mechanizmus az lehet, hogy a Fe-Dp44mT komplex által termelt reaktív oxigén gyökök (ROS) keltette oxidatív stressz hatására a holo-citokrom c a mitokondriumból a citoszolba transzlokálódik, ahol apoptózis indukáló kaszkádféherjét aktivál [38].

Tehát a DpT vegyületekről (különösen kiemelve a Dp44mT molekulát) elmondható, hogy nagy antiproliferatív aktivitásuk annak köszönhető, hogy képesek bejutni az intracelluláris kompartmentekbe, ott vasat megkötni, mellyel redox-aktív komplexet képeznek, ami ROS képződését indukálja. Így a DpT vegyületek két ponton is “támadnak”: az intracelluláris vas mobilizációját idézik elő, valamint redox-aktív vas komplexet is képeznek [40]. Ez a kettős mechanizmus kritikus feltétele az

antiproliferatív hatásnak, amit érdemes lehet figyelembe venni a későbbi rákellenes szerek kifejlesztésekor is.

A BpT vegyületek szintézisére a DpT származékokkal végzett sikeres kísérletek után került sor. A DpT molekulákban található 2-piridil gyűrűt fenil csoportra cserélve jutottak el a BpT vegyületekhez [37] (2. ábra). Ennek a strukturális változtatásnak a célja a vegyületek lipofilitásának növelése, valamint a piridil nitrogén elektronszívó hatásának csökkentése volt, mely fontos a vaskötő affinitás szempontjából.

## **2.6. A Cu szerepe a sejtekben [6]**

### **2.6.1. A réz fiziológiai funkciói**

A réz alapvető fontosságú nyomelem. A csecsemőkor a legkritikusabb időszak a réz ellátottság szempontjából, mivel a gyors fejlődés növekvő réz igénnyel párosul, míg tejalapú táplálás során a réz csak igen kis mennyiségben kerül az emberi szervezetbe. Bár a réz hiánya a leggyakoribb ebben az életszakaszban, de nagy a veszélye a réz toxikus hatásainak is, mivel a májfunkciók még nem tökéletesek, így a szervezet képtelen kezelni a magasabb réz bevitel során kialakuló helyzetet.

A réz több mint 30 enzim működéséhez szükséges, pl.: szuperoxid dizmutáz (Cu/Zn-SOD), cöruoplazmin (CP), lizil oxidáz, citokróm c oxidáz, tirozináz, dopamin- $\beta$ -hidroxiláz.

A réz metabolizmusa megváltozik a különböző gyulladásos, fertőzőes és rákos folyamatok során. Ellentétben a vassal, melynek szérumszintje csökken fertőzés és gyulladás esetén, a Cu és CP szintje emelkedik. A megfelelő immunválasz kialakulásához is szükséges elem a réz. Fertőzés esetén szükség van a Cu-re az aktivált limfocita sejtek interleukin-2 termeléséhez. A rákos megbetegedések esetén pedig pozitív korrelációt találtak a plazma CP szintje és az elváltozás súlyossági foka között. Malignus tumorok esetében pedig azt találták, hogy a tumorszövet Cu koncentrációja többnyire magasabb, mint az egészséges szöveteké.

### **2.6.2. A réz kémiai tulajdonságai**

A réz ugyancsak az átmeneti fémek közé tartozik, mint a vas. A réz is két oxidációs állapotban fordulhat elő az élő szervezetben:  $\text{Cu}^{2+}$  és  $\text{Cu}^+$  formában. A  $\text{Cu}^{2+}$  jó oldódási tulajdonságokkal rendelkezik, míg a  $\text{Cu}^+$  esetében csak mikromólosnál kisebb koncentrációjú oldat nyerhető. Az élő szervezetben a réz főleg  $\text{Cu}^{2+}$  formájában fordul

elő, mivel oxigén jelenlétében az elektron akceptor  $\text{Cu}^+$  könnyen oxidálódik  $\text{Cu}^{2+}$ -vé. Ez a folyamat visszafelé is működik, ha a  $\text{Cu}^{2+}$  felvesz egy elektront valamely erős redukálószerrel, például a redukált glutationtól vagy az aszkorbáttól. A réz – ahogy a vas is – az élő szervezetben a redox reakciók fontos elemévé válik, mivel képes egy elektron cseréjével lejátszódó folyamatokban részt venni.

A Fenton reakcióban a  $\text{Cu}^+$  (akárcsak a  $\text{Fe}^{2+}$ ) a hidrogén peroxidból hidroxil gyököt képez ( $\text{HO}\cdot$ ). A sejtben lévő redukzív környezetben a  $\text{Cu}^{2+}$  aztán nem enzimatis úton, a sejtben található redukálószerrel (aszorbát, redukált glutation) segítségével visszaredukálódik  $\text{Cu}^+$  ionná, ezzel a hidroxil gyökök folyamatos termelődését indítva el.

### **2.6.3. A sejtek réz homeosztázisa**

Két homológ P típusú ATPáz kation transzporter a két legfontosabb elem a Cu homeosztázisban: a Menkes és a Wilson ATPáz (MNK, WND). Szerkezetük és a sejtek, szövetek rézanyagcseréjében betöltött szerepük is hasonló. A legtöbb sejtben az MNK végzi a Cu exkrécióját magas rézsintnél, ugyanezt a funkciót a hepatocitákban a WND látja el, a felesleges rézet az epébe juttatva. Mindkét protein szerepet játszik a Cu-ellátás biztosításában a réztartalmú fehérjék szintéziséhez: bejuttatják a rézet a transz-Golgi hálózatba, ahol a fém beépül az apoenzimbe. A Cu eltávolítása sejtekből vagy a plazmamembránon keresztül az extracelluláris tér felé történik (MNK), vagy egy belső intracelluláris vezikuláris kompartmentbe (WND). A réz transzportjában a kefeszegélyben részt vesz még a DMT1 protein, ami más fémek felvételéért is felelős ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ).

A Cu szállítása kapcsán még meg kell említeni a réz chaperonokat, melyek a sejten belül szállítják a rézet a megfelelő enzimekhez, kötőhelyekre. Ezen chaperonok megakadályozzák a szabad Cu kialakulását a sejtekben azáltal, hogy közvetlenül a felhasználás helyére szállítják őket. A sejtbe bekerülő réz egy részét a citoszolban lévő metallotioneinek kötik meg. Egy általános chaperon a réz számára a glutation, mely a plazmamebrán Ctr1 (Cu transzporter 1)-éhez szállítja a rézet, de ez a folyamat még nincs teljes egészében és részleteiben feltérképezve.

## **2.7. A Zn szerepe a sejtekben [41]**

### **2.7.1. A cink fiziológiás funkciói**

A vas mellett a cink a leggyakoribb nyomelem az emberi szervezetben. A legtöbb



cink az agyban (hippocampus, amygdala, cortex) és a hasnyálmirigy  $\beta$  sejtjeiben található. Számos enzimben megtalálható, ionos formában szerepet játszik a neurotranszmissziós és szinaptikus folyamatok befolyásolásában, valamint jelátviteli utak szabályozásában.

A cink az emlős szervezetben megtalálható proteinek 3-10%-ának nélkülözhetetlen kofaktora, mely szükséges a megfelelő szerkezet kialakulásához, konformációs változáshoz, vagy az enzimaktivitáshoz. Mivel több, mint 300 enzim alkotórésze, hiányában a szervezet igen sokféle és súlyos tünetet produkál: pl. a gasztrointesztinális rendszer gyulladása, szívgyengeség, bőrfelületek károsodása (durva bőr), elhúzódó sebgyógyulás, agyi funkciózavarok, ivarmirigy működés rendellenességei. Fontos megemlíteni, hogy a cink "szabad" formában nagyon toxikus: szerepe van az ischémiához és agyvérzéshez kapcsolódó idegsejt pusztulásokban, az Alzheimer-kórban jellemző  $\beta$ -amiloid plakkok kialakulásában, a hasnyálmirigy  $\beta$  sejtjeinek degenerációjában.

### **2.7.2. A sejtek cink homeosztázisa**

A fentiekben említettek miatt a Zn transzportja a sejteken belül és kívül nagyon szigorúan és sok ponton szabályozott. A cink fiziológiás koncentrációja nagyon különböző lehet funkciótól függően:  $\mu\text{M}$ -os a szinaptikus részben,  $\text{pM}$ -os intracellulárisan mint szabad Zn,  $\text{mM}$ -os az intracelluláris szekréciós vezikulákban.

A Zn(II) a glutamáttal együtt szabadul fel számos serkentő szinapsziszból. A neuronokban nagyon alacsony a szabad cink koncentrációja: a  $\text{fM}$  tartományban van. A Zn(II)-grádiens fenntartásában valószínűleg résztvevő mechanizmusok: elsődleges ATPáz pumpa,  $\text{Na}^+$  gradienst használó másodlagos aktív transzport. A Zn(II) pumpa léte még nem bizonyított emlősöknél, valószínűbb, hogy a Na(I)/Zn(II) cserélő másodlagos aktív transzportja tartja fenn az 500-szoros transzmembrán gradienst a neuronokban.

A cink homeosztázis fenntartásának összetettsége jól látszik a cink szállításáért, puffereleséért felelős fehérjék számából is: a ZnT (Zn(II) Transporter) családnak legalább 10, a ZIP (Zn(II)-regulated metal transporter, iron-regulated metal transporter-like protein) családnak 15 tagja van, a metallothionein 3 különböző izoformája létezik.

A Zn(II) transzporter proteinek (ZnT) a CDF (cation diffusion facilitator) család tagjai, eddig 10 féle ZnT-t határoztak meg. A ZnT-1 és 3 például nagymértékben az agyban expresszálódik, a ZnT-4 pedig az emlőmirigyek epitélisejtjeiben. A

cinktranszporterek másik nagy csoportja a ZIP proteinek, melyek a ZnT fehérjékkel ellentétes funkciót töltenek be. A ZnT transzporterek az intracelluláris cinkkoncentráció csökkentésében, míg a ZIP proteinek annak növelésében játszanak szerepet. A metallothioneinek (MT) nagyon fontos szerepet játszanak a citoszol Zn(II) koncentrációjának puffereálásában. A metallothioneinek kis proteinek (61-68 aminosav), 20 cisztein reziduomot tartalmazó nagyon konzervatív szekvenciával, 2 Zn(II)-kötő domainnel. A pH vagy redox státusz változása a sejtben könnyen módosítja a Zn(II)/cisztein klaszter szerkezetét, a Zn(II) megkötését vagy elengedését indukálva. Például az oxidatív stressz az egyik kulcsszereplő a Zn(II) koncentráció szabályozásában, megakadályozza a Zn(II) kötődését a metallothioneinekhez. A sejtbeni oxidálószerkezetek a Zn(II) felszabadulását segítik elő a metallothioneinekből, a redukálószerkezetek pedig a Zn(II) megkötését gyorsítják.

A citoszol felesleges Zn(II) tartalmának csökkentésében a mitokondriumnak van a legnagyobb szerepe (ugyanúgy, mint a Ca(II)-túltöltöttség megszüntetésében is). A Zn(II) felvétele a mitokondriumba egy Ca(II) uniporter segítségével történik. A mitokondrium nagy Zn(II) felvételi kapacitással rendelkezik. A Zn(II) felszabadulása a mitokondriumból ugyancsak Ca(II)-függő folyamat.

A 2.2. - 2.6. fejezetekben bemutattuk Fe, Cu és a Zn fiziológiás funkcióit, a sejtekhez kapcsolódó transzportfolyamataikat és ezek szabályozását. Külön fejezet foglalkozott a rákos sejtek megváltozott vas metabolizmusával és a vaskelátorok különböző generációival és azok lehetséges hatásmechanizmusával. A legújabb, antiproliferatív hatással rendelkező vaskelátorok hatásmechanizmusára intenzív kutatás tárgya és a legígéretesebb molekulákkal már fázis I és II vizsgálatok folynak. A vaskelátorokkal folyó kísérletekben sokféle sejtbiológiai paramétert mérnek a kutatók és a tanulmányok nagytöbbségében a sejtek vastartalmának változását <sup>59</sup>Fe izotóppal követik nyomon. Ezen vaskelátorok szerkezetét megfigyelve felvetődik a kérdés, hogy ezen vegyületek vajon csak a vas homeosztázisba avatkoznak-e be, vagy esetleg befolyásolják a sejtek réz és cink anyagcseréjét is?

Ezen kérdés megválaszolásához szükség van egy pontos és megfelelő analitikai módszerre, mellyel a Fe, Cu és Zn koncentráció is követhető a sejtekben. A következő fejezetben a sejtek elemvizelésére alkalmas analitikai módszereket vesszük sorra.

## **2.8. Sejtminták elemtartalmának meghatározására alkalmas analitikai módszerek**

### **2.8.1. Röntgenfluoreszcencia jelenségén alapuló technikák (Microprobe X-ray fluorescence Imaging Techniques) [4]**

A röntgenfluoreszcencia (X-ray fluorescence=XRF) jelenségén alapuló módszereket manapság a legérzékenyebb mérés technikák közé sorolják, melyekkel 1 mikrométernél kisebb felbontással valósítható meg a nyomelemek koncentrációjának, illetve eloszlásának meghatározása biológiai mintákban.

Ezen módszereknél a vizsgálandó atomok belső elektronhéjáról gyors elektronokkal, nagy energiájú részecskékkel (pl. protonokkal) vagy primer röntgenfotonokkal való ütköztetés révén egy elektront eltávolítunk. Ezt a „belső ionizációt“ egy elektron belépése követi valamelyik külső elektronhéjról, melynek során egy fluoreszcens foton emittálódik. A kvantált energiaátmenetnek köszönhetően a fluoreszcens foton energiája jellemző az illető atomra (minőségi elemzés), míg az adott energiájú fotonok száma összefüggésben van az atomok koncentrációjával (mennyiségi elemzés).

A gerjesztéshez használt módszertől függően az XRF technikák három osztályba sorolhatók:

- *Elektrongerjesztéses röntgenfluoreszcens mikroanalízis (2.8.1.1)*
- *Részecske indukált röntgenfluoreszcens mikroanalízis (2.8.1.2)*
- *Nagyenergiájú fotonokkal végzett gerjesztésen alapuló módszerek (2.8.1.3)*

Mivel a disszertáció kísérleti része csak a nagyenergiájú fotonokkal végzett gerjesztésen alapuló módszerekkel foglalkozik, ezért az elektrongerjesztéses és a részecske indukált röntgenfluoreszcens mikroanalízis csak röviden kerül bemutatásra.

#### **2.8.1.1. Elektrongerjesztéses röntgenfluoreszcens mikroanalízis**

A pásztázó elektronmikroszkópok (Scanning Electron Microscope=SEM) és a transzmissziós pásztázó elektronmikroszkópok (Scanning Transmission Electron Microscope=STEM) gyakran energiadiszipatív detektorral rendelkeznek, ami lehetővé teszi az elektronsugaras mikroanalízist (Electron Probe Microanalysis, EPMA) fagyasztott vagy fagyasztva-száritott minták esetében. Mivel ezen mérés technikák egyetlen műszeren belül is kombinálhatók, egy olyan rendszert kapunk, mellyel a sejtek, illetve sejtkompartmentek elemtartalma, az elemek eloszlása, a sejt morfológiája

és finomsztruktúrája egyszerre vizsgálható. Ha 5 és 30 keV energiájú elektronok fókuszált sugárnyalábját használjuk a gerjesztéshez, akkor a minta roncsolásmentesen vizsgálható és főkomponens-összetétele a kapott röntgenemissziós spektrumból könnyen meghatározható.

Az elektronsugár átmérője 1-10 nm között van általában. Amikor a beérkező elektron sugárnyaláb eléri a mintát sokféle kölcsönhatás jön létre a héjelektronokkal és a kristályráccsal, mely folyamatokat együttesen rugalmatlan szóródásnak nevezzük. Függetlenül az ezen kölcsönhatások során bekövetkező kis energiavesztésektől az elektronok karakterisztikus röntgensugárzás kialakulását idézik elő és csak fokozatosan lassulnak le a behatolási mélység függvényében. Mindemellett az emittált fotonok szabad úthossza sokkal nagyobb, mint a beeső elektronoké, ami megnöveli az esélyét, hogy elhagyják a mintát és elérjenek a detektorig. Emiatt az EPMA módszer esetében a gerjesztett mintatér fogat sokkal nagyobb, mint a beeső elektron sugárnyaláb mérete, a térbeli felbontóképessége pedig szignifikánsan kisebb, mint a SEM esetében. A technika alkalmas a mintában lévő szénnél nagyobb rendszámú elemek szimultán detektálására 30-40 nm-es maximális felbontóképességgel. Az EPMA módszer kimutatási határa elemtől függően a 100-1000 µg/g koncentrációtartományban van. Megfelelő standardminták és mátrixkorrekció esetén 3-5%-os pontosság érhető el. A kis érzékenysége ellenére a módszert használják Na, Mg, K, Ca, Cl meghatározására biológiai mintákban. A mintaelőkészítés során az eredeti fiziológias elemeloszlás megőrzése érdekében először gyors immerziós fagyasztást, majd fagyasztva szárítást alkalmaznak. A víz eltávolítása a mintákból nemcsak a sugárzás mintakárosító hatását csökkenti, hanem növeli az elem/mintatömeg arányt és ezzel az érzékenységet is.

EPMA módszerrel az irodalomban többféle sejtvonal elemtartalmát is meghatározták: patkány májsejtek [42, 43, 44, 45], leukémia sejtvonalak [46, 47], egér méhepítelsejtek [48], vastagbélrákos sejtek [49, 50], prosztatatarák sejtek [51, 52, 53]. A sejtekben meghatározott elemekről a 2. táblázat nyújt tájékoztatást.

## **2.8.1.2. Részecske indukált röntgenfluoreszcens spektrometria [54]**

### **2.8.1.2.1. Részecske Indukált Röntgen Emisszió (Particle-induced X-ray emission, PIXE)**

A PIXE módszer alkalmazásánál az analizálandó mintát egy magfizikai gyorsítóban előállított 2-3 MeV energiájú töltött részecske-nyalábbal, például protonokkal

besugározzuk. A protonok, az elektronokhoz hasonlóan a minta valamelyik atomját ionizálják, annak egy belső héjáról kiütnek egy elektront. A visszamaradó lyuk ezután betöltődik az atom valamely külső elektronhéjáról származó elektronnal. A két állapot közötti energiakülönbség elektromágneses sugárzás, karakterisztikus röntgensugárzás formájában távozik. A röntgensugárzás energiája és a kibocsátó elem rendszáma közötti egyértelmű kapcsolat miatt a karakterisztikus röntgensugárzások energiájának analizálásával a mintát alkotó elemek azonosíthatók.

A PIXE egy multielemes analitikai módszer, mely nagy érzékenységet biztosít a 20 és 35, valamint a 75 és 85 közötti rendszámmal rendelkező elemek esetében. Ezen tartományokban találhatóak a biológiai szempontból esszenciális nyomelemek (pl.: Mn, Fe, Cu, Zn, Se), toxikus nehézfémek (Hg, Pb, stb.), valamint a farmakológiai szempontból fontos Pt is.

A kimutatási határ a választott elemtől, a minta természetétől, a kísérleti elrendezéstől, az analitikai paraméterektől függően változik, általában a  $\mu\text{g/g}$  tartományban mozog.

A PIXE módszer fő előnye az elektronsugaras mikroanalízishez képest a nagyobb érzékenysége. A PIXE technikánál nagyobb az ionizációs határfok és kisebb a háttérből eredő jelintenzitás, mint az elektronsugaras mikroanalízis esetében. A PIXE további előnye a röntgenes mikroanalitikai technikákhoz képest, hogy “teljes mértékben” kvantitatív eredményeket kapunk a nyomelemek meghatározására alkalmas PIXE és a minta tömegének meghatározására alkalmas proton BS (backscattering spectrometry) és STIM (scanning transmission ion microscopy) párhuzamos használatával. A “teljes mértékben” kvantitatív kifejezés arra utal, hogy a PIXE/BS/STIM módszerek kombinációjával a minta tömege és annak nyomelemtartalma is pontosan megadható, valamint az elemek eloszlása is nyomon követhető a hidrogéntől egészen a nagy rendszámú nehézfémekig.

#### **2.8.1.2.2. Visszaszórásos spektrometria (Backscattering spectrometry, BS)**

A BS spektrometria a céltárgy atommagjain szóródott részecskék energiájának mérésén alapuló módszer. A mintába csapódó monoenergiás részecskék a mintával való ütközéskor és a mintában megtett útjuk során veszítenek energiájukból. A detektált energia ezért mind a minta atomjairól, mind vastagságáról hordoz információt. Ezzel a technikával minden olyan elem meghatározható, melynek atommagja nehezebb a

becsapódó részecskénél. Biológiai minták esetében például a minta szervesanyag tartalmának összetétele meghatározható, melyet 90%-ban a C, N, O atomok alkotnak. Ez a tulajdonság a BS spektrometriát a PIXE kiegészítő technikájává teszi, mivel a C, N és O meghatározása PIXE módszerrel nem könnyű feladat. A visszaszórásos spektrometriát a bejövő nyalábáram monitorozására is használják (mérve az analízis során “elhalt” töltéseket) a PIXE normalizációs eljárás során. Ebben az esetben a BS és PIXE méréseket párhuzamosan kell elvégezni.

### **2.8.1.2.3. Pásztázó Transzmissziós Ionmikroszkópia (Scanning Transmission Ion Microscopy, STIM)**

A STIM egy olyan roncsolásmentes, háromdimenziós analitikai módszer, amely alkalmas vékony minták sűrűségeloszlásának megjelenítésére. Elméleti háttere: a legtöbb minta esetén az elegendően nagy energiájú részecskenyaláb áthalad a mintán, miközben az elektronokkal való ütközések következtében veszít energiájából. Ezt az energiavesztés mértékét mérve információkat kaphatunk a minta vastagságáról és sűrűségéről.

A pásztázó transzmissziós ionmikroszkópia csak vékony minták esetében alkalmazható, biológiai mintáknál ez azt jelenti, hogy a minta vastagsága nem haladhatja meg MeV energiájú alfa részecskékkal való besugárzás esetében a néhány mikrométert, a MeV energiájú protonokkal való besugárzás esetében a néhányszor tíz mikrométert.

STIM módszer esetében a detektort a sugárnyaláb útjában helyezzük el közvetlenül (nagyon kis távolságra) a minta után. Ez a geometria megnöveli a detektálás hatékonyságát, mely lehetővé teszi a nyalábáram drasztikus csökkentését egészen a pár száz részecske/másodperc nagyságrendig. Mindezek eredményeképpen a minta nagy felbontású 3D-s sűrűségterképe készíthető el. Ezen körülmények között tömegvesztés nem lép fel a mintában és kiszámolható az adott területegységre jutó mintatömeg.

Ha a mintáról különböző irányokban készülnek STIM leképezések, azt STIM tomográfiának nevezzük. A STIM módszer egyik előnye, hogy nem átlátszó tárgyakat is lehet vele tanulmányozni, azonban élő organizmusokat nem lehet vizsgálni, mivel a minta vákuumban van.

A STIM, a PIXE és a BS módszerek együttes használata kiváló kombinációját adja a képalkotó és elemző technikáknak, mely számos tudományterületen felhasználható.

PIXE módszer segítségével megvalósítható a nyomelemanalízis, BS módszerrel a töltésmonitorozás és a biológiai minták szerves anyagösszetételének felderítése, a STIM segítségével pedig a tömeg meghatározás. Így biológiai minták esetében sejtszinten megvalósítható a minta teljesen kvantitatív analízise, az eredményeket pedig tömegarányokban kapjuk (adott elem tömege/ szerves mátrix tömege). A STIM továbbá lehetővé teszi a hidrogéntartalom meghatározását, valamint egyetlen sejt ultrastruktúrájának feltérképezését nanoszinten, mely a továbbiakban összekapcsolható a nanoszintű elemanalízissel PIXE/BS technikával.

A PIXE módszert gyakran használják a Pt tartalom meghatározására a sejtekben ciszplatinnal történő kezelést követően [55, 56, 57, 58, 59]. Valamint sok tanulmány nyújt adatokat a sejtek elemtartalmára vonatkozó adatokat a PIXE, STIM, BS módszerek kombinációjával [60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73]. A sejtekben meghatározott elemekről a 2. táblázat nyújt tájékoztatást.

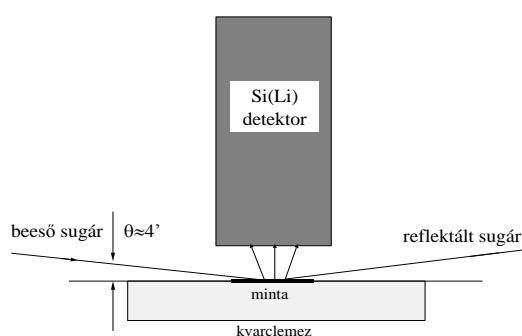
### **2.8.1.3. Nagyenergiájú fotonokkal végzett gerjesztésen alapuló módszerek**

#### **2.8.1.3.1. Totálreflexiós Röntgenfluoreszcens spektrometria (TXRF) [74]**

1895-ben Röntgen egy addig ismeretlen sugárzást fedezett fel, amit róla Röntgensugaraknak neveztek el [75]. Ezt követően 1913-ban Moseley felismerte a karakterisztikus röntgensugarak hullámhossza és az őket emittáló elemek rendszáma közötti összefüggést, ami a kvalitatív röntgenfluoreszcens analízis alapját képezi. Az 1940-es évek közepétől kezdtek gyártani az első hullámhossz-diszperzív röntgenspektrométereket. A klasszikus XRF azonban nem alkalmas nyomelem-analízisre, ráadásul a mátrixeffektus szisztematikus hibákhoz vezethet. Bizonyos mintaelőkészítési lépésekkel ki lehet ugyan küszöbölni ezeket a hibákat, pl. mátrixhígítási eljárásokkal, vékony mintaréteg kialakításával, vagy matematikai korrekciók segítségével, a megoldást azonban egy új optikai atomspektroszkópiai módszer jelentette, mely sok szempontból felülmúlta a hagyományos röntgenfluoreszcens technikát.

A totálreflexió jelenségét Compton már 1923-ban felfedezte [76]. Azt tapasztalta, hogy sima felületen egy bizonyos értéknél ( $\approx 0,1^\circ$ ) kisebb szög alatt beeső sugárzás esetén a reflektivitás nagymértékben megnő. Ezen ismeretek alapján fejlesztették ki a totálreflexiós röntgenfluoreszcens spektrometriai módszert, melyről 1971-ben Yoneda és Horiuchi számolt be [77]. Módszerüknél a primer, gerjesztő röntgensugárzást súrlódó beeséssel ( $< 0,1^\circ$ ) bocsátották egy polírozott felületű kvarclapra vékony rétegben

(<1 $\mu$ m) felvitt mintára (3. ábra). Ez a kísérleti elrendezés azzal az előnnyel járt, hogy a minta vékony rétegének köszönhetően a mátrixeffektus gyakorlatilag elhanyagolhatóvá vált, ugyanakkor a minta atomjainak gerjesztésében mind az elsődleges, mind pedig a reflektált röntgenfotonok is részt vettek. További előnyt jelent, hogy a „felesleges”, a mintával kölcsönhatásba nem lépett primer röntgenfotonok nem jutnak a detektorba, így a jel/háttér arány jelentősen megnő a klasszikus elrendezésű XRF berendezésekhez viszonyítva.



3. ábra: A totálreflexiós röntgenfluoreszcens spektrométer sematikus felépítése.

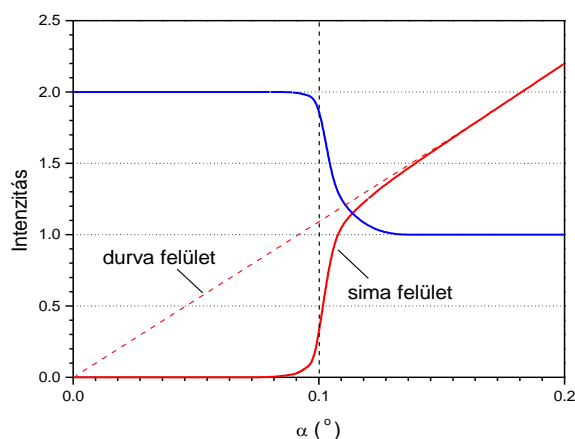
#### A totálreflexió jelentősége

A röntgensugarak mind visszaverődnek, mind megtörnek két különböző fázis határán, éppúgy, mint a fény. E két jelenséget a refrakciós index ( $n$ ) jellemzi:

$$n = 1 - \delta - i\beta,$$

ahol a valós  $\delta$  jelenti a szóródást, az imaginárius  $\beta$  pedig a gyengülést. Ebben az összefüggésben a  $\delta$  elsősorban a sűrűségtől, a  $\beta$  pedig az anyag tömegabszorpciós együtthatójától függ, valamint mindkettő az alkalmazott hullámhossztól. Röntgensugárzásra mindkettő igen kis érték (<10<sup>-6</sup>). Következésképp az  $n$  értéke alig kisebb, mint 1. A teljes visszaverődés határszögénél nagyobb szögben érkező primer röntgensugárzás mélyebben behatol a minta és mintatartó anyagába, ezzel megnövelve a háttérintenzitást (4. ábra).





4.ábra: A háttér- (—) és vonalintenzitás (—) változása a beesési szög függvényében.

A TXRF esetében (a teljes visszaverődés/totálreflexió érdekében) a beesési szögnek kisebbnek kell lennie a határszögnél ( $\alpha_c$ ), mely a Snellius-Descartes törvényből kiindulva a  $\alpha_c = \sqrt{2\delta}$  képlet alapján számítható. Ez a szög 10 keV energiájú fotonokra  $0,1^\circ$  körüli érték.

#### A mintaelőkészítés lépései és a standardizáció

A TXRF technika olyan mikroanalitikai módszer, mellyel kis mennyiségű szilárd-, illetve oldatfázisú minták vizsgálhatók, előbbinél néhány mikrogramm, utóbbinál néhány mikroliter (5-50  $\mu\text{L}$ ) a szükséges mennyiség.

A megfelelően előkészített, oldatfázisú minta adott térfogatát pipettával visszük fel a mintatartóra, amit előzőleg, természetesen, megtisztítottunk. Geometriáját tekintve a  $14 \text{ mm} \times 0,04 \text{ mm}$  röntgensugárnyaláb a 30 mm átmérőjű mintatartó közepére fókuszálva a kritikus szög alatt éri a hordozó felületét, ami azt jelenti, hogy a mérendő mintát a mintatartó közepére kell felvinni. Ez elsősorban oldatok szempontjából jelenthet gondot, ha a mintatartó felülete nem kellően hidrofób. Ezért minden egyes mérés alkalmával  $2\mu\text{L}$  szilikonoldatot cseppentünk a kvarclap közepére, majd ezt követően történhet a minta felvitele és - oldatfázisú minták esetében - annak beszárítása. A szárazmaradék tömege ng- $\mu\text{g}$  nagyságrendű, ahol a kialakult vékony rétegnek köszönhetően a mátrixeffektus gyakorlatilag elhanyagolható. Ezért a mennyiségi meghatározás egyszerűen, belső standard addicionálásával megvalósítható. A belső standardként használt elem kiválasztása úgy történik, hogy felveszünk az adott mintáról

egy kvalitatív spektrumot, mely spektrum a mintát alkotó elemek karakterisztikus vonalaiból áll. Ez alapján kiválasztható egy olyan elem, amely a kimutatási határnál kisebb koncentrációban van jelen a mintában, és vonalai a spektrum azon tartományába esnek, ahol nem fed át más elem vonalával. A belső standardként kiválasztott elemet ezek után ismert mennyiségben a mintához adjuk vagy a mintaelőkészítés során, vagy pedig standard nélkül rámérjük a mintát a mintatartóra és a beszárítást követően a száraz maradékra rétegezzük rá az adott térfogatú standardoldatot.

#### Kvantitatív analízis

A mennyiségi kiértékelés az alábbi összefüggés alapján történik:

$$c_x = \frac{N_x S_{is}}{N_{is} S_x} c_{is},$$

ahol  $c$  a koncentráció,  $N$  a nettó intenzitás,  $S$  a relatív érzékenység,  $x$  jelenti a meghatározandó elemet,  $is$  pedig a belső standardot. A nettó intenzitás értékek az adott elem legintenzívebb vonalára vonatkoznak. A csúcs alatti területből ki kell vonni a háttérintenzitást, és ha van, a szomszédos csúcs átfedését is korrekcióba kell venni. Egy vizsgált elem intenzitása és koncentrációja között lineáris kapcsolat van, melyre az alábbi összefüggés érvényes:

$$N_x = B_x c_x.$$

A mért nettó intenzitás a koncentráció függvényében ábrázolva tehát egy egyenest ad, melynek meredekségét nevezzük abszolút érzékenységnek ( $B_x$ ). Különböző elemekre különböző a kalibrációs egyenesek meredeksége. Egy kiválasztott elemre vonatkoztatott abszolút érzékenységek hányadosa jelenti a relatív érzékenységet ( $S$ ), mely függ a gerjesztés módjától, az alkalmazott feszültségtől, a szűrőtől és a készülék egyes részeinek geometriai elrendezésétől, de teljesen független a minta összetételétől, mátrixától vagy a bemérés nagyságától. Éppen ezért ezen érzékenységek meghatározását elég csak a készülék üzembe helyezését követően elvégezni, a későbbiekben pedig csak olyan javítások után, ahol megváltozhatnak az előbb említett körülmények.

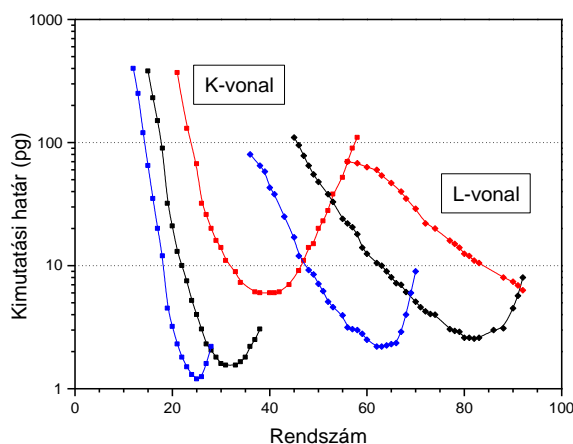
#### Kimutatási határ

A kimutatási határok a IUPAC szabályai szerint határozhatók meg. A minimálisan kimutatható mennyiség ( $m_{min}$ ) az alábbi összefüggés alapján számolható:

$$m_{\min} = k \frac{s_{\text{h\u00e1tt\u00e9r}}}{B},$$

ahol  $k$  faktort általában 3-nak veszik, az  $s_{\text{h\u00e1tt\u00e9r}}$  a h\u00e1tt\u00e9r\u00e9rt\u00e9k sz\u00f3r\u00e1s\u00e1t,  $B$  pedig a meghat\u00e1rozand\u00f3 elem abszol\u00fct \u00e9rz\u00e9kenys\u00e9g\u00e9t jelenti. A spektrumb\u00f3l leolvashat\u00f3 intenzit\u00e1sokkal kifejezve teh\u00e1t a minim\u00e1lisan kimutathat\u00f3 t\u00f6megr\u00e9 az al\u00e1bbi formula \u00e9rv\u00e9nyes:

$$m_{\min} = 3 \frac{m}{N_{\text{net}}} \sqrt{2N_{\text{h\u00e1tt\u00e9r}}}.$$



*5. \u00e1bra:* Kimutat\u00e1si hat\u00e1rok az elemek rendsz\u00e1m\u00e1nak f\u00fcggv\u00e9ny\u00e9ben. Az alkalmazott gerjeszt\u00e9si m\u00f3dok: W-cs\u0151 (f\u00e9kez\u00e9si sug\u00e1rz\u00e1s), 50kV (—); Mo-cs\u0151 ( $K\alpha$ ), 50kV (—); W-cs\u0151 ( $L\alpha$ ), 25kV (—); A bal oldali h\u00e1rom g\u00f6rbe esetén az elemek detekt\u00e1l\u00e1sa K-vonaluk, m\u00edg a jobb oldali h\u00e1rom g\u00f6rbe eset\u00e9ben az L-vonaluk szerint t\u00f6rt\u00e9nt.

Ahogy az abszol\u00fct \u00e9rz\u00e9kenys\u00e9gek is elemr\u0151l elemre v\u00e1ltoznak, \u00fagy a kimutat\u00e1si hat\u00e1r is m\u00e1s a k\u00fcl\u00f6nb\u0151z\u0151 elemek eset\u00e9ben, s\u0151t, ez f\u00fcgg a gerjeszt\u00e9shez alkalmazott r\u00f3ntgens\u0151t\u0151l is. Az *5. \u00e1bra* g\u00f6rb\u00e9i h\u00e1rom k\u00fcl\u00f6nb\u0151z\u0151 gerjeszt\u00e9si m\u00f3dban el\u00e9rhet\u0151 kimutat\u00e1si hat\u00e1rokat \u00e1br\u00e1zolnak a rendsz\u00e1m f\u00fcggv\u00e9ny\u00e9ben, mely \u00e9rt\u00e9keket vizes standardoldatok besz\u00e1r\u00edt\u00e1s ut\u00e1n felvett spektrumaik alapj\u00e1n hat\u00e1roztak meg. A  $Z \geq 11$  rendsz\u00e1m\u00fa elemek mindegyike detekt\u00e1lhat\u00f3 vagy a K-, vagy pedig az L-vonalaik alapj\u00e1n. Az \u00e1br\u00e1r\u00f3l leolvashat\u00f3, hogy a legt\u00f6bb elem eset\u00e9ben v\u00e1laszthat\u00f3 olyan gerjeszt\u00e9si m\u00f3d, ahol az elm\u00e9leti kimutat\u00e1si hat\u00e1r 1-10 pg k\u00f6z\u00e9 esik.

#### 2.8.1.3.1.1. Kisrendsz\u00e1m\u00fa elemek TXRF meghat\u00e1roz\u00e1sa

A TXRF spektrometria egy szimult\u00e1n m\u00f3dszer, mely viszonylag alacsony kimutat\u00e1si hat\u00e1rokat biztos\u00edt, bels\u0151 standardiz\u00e1ci\u00f3val pedig a mennyis\u00e9gi meghat\u00e1roz\u00e1s is egyszer\u00fa

[78]. A módszer legnagyobb hátránya egészen az utóbbi évekig az volt, hogy a  $Z < 13$  rendszámú elemek meghatározására nem lehetett használni, ugyanis a rendszám csökkenésével csökken a fluoreszcens foton energiája, vagyis párhuzamosan nő az önabszorpció jelentősége (a minta maga elnyeli a fluoreszcens fotonokat) [79]. Egy következő korlátozó tényező, hogy a klasszikus TXRF spektrométerben levegő atmoszférában folynak a mérések, a levegő pedig elnyeli a kisrendszámú elemek által emittált kis energiájú fluoreszcens fotonokat [80]. A kisrendszámú elemek TXRF meghatározásánál figyelembe kell venni, hogy a fluoreszcenciahozam ( $\omega$ ) ezen elemekre sokkal kisebb, az Auger effektus valószínűsége pedig jóval nagyobb ( $1 - \omega$ ). A fluoreszcenciahozam az alábbi képlettel számítható:

$$\omega = \frac{Z^4}{A + Z^4}$$

ahol  $Z$  az elem rendszáma,  $A$  pedig egy konstans (a K vonalak esetében  $A = 9 \times 10^5$ ) [81].

Bár ezek a problémák nem küszöbölhetőek ki teljesen, de nagy előrelépést jelent a Streltsov és munkatársai által tervezett, speciálisan kisrendszámú elemek ( $Z \leq 23$ ) TXRF meghatározására alkalmas spektrométer: Cr anódú röntgensővel és vákuumkamrával [82]. Biológiai minták kisrendszámú elemtartalmának meghatározására igen kevés tanulmányt találunk, ezért is foglalkozik a disszertáció első fejezete a „lowZ TXRF” technika alkalmazhatóságával biológiai minták esetében.

#### **2.8.1.3.1.2. Fe, Cu, Zn meghatározása sejtekben TXRF technika segítségével**

Mivel munkánk során a TXRF technikát alkalmaztuk a rákos sejtek Fe, Cu, Zn tartalmának meghatározására, ezért az ilyen témájú irodalmak részletesebben is bemutatásra kerülnek.

González többféle sejtvonal (HepG2 hepatoblasztóma, Caco-2 humán kolonkarcinóma, HeLa méhnyakrák, NIH 3T3 embrionális egér fibroblaszt, N2A neuroblasztóma, B12 glioblasztóma sejtvonal) Fe, Cu, Zn, Ca és S tartalmát határozta meg TXRF módszerrel. A HepG2 sejtek esetében vizsgálták az elemek subcelluláris eloszlását is (kétféle frakciót szeparáltak: citoszol és pellet). A Cu, Zn és a Ca alapvetően a citoszol frakcióban volt jelen, a S pedig a pellet frakcióban. A B12 sejtek esetében vizsgálták a rézkezelés (Cu-hisztidin 1:10 arányú komplexével végezték a kezeléseket) hatását is a sejtek nyomelemtartalmára. A sejtek réztartalma 28-szorosára

nőtt, cinktartalma 1,3-szorosára, vastartalma 2,2-szeresére 45 napos 100  $\mu\text{M}$ -os Cu-His kezelést követően [83]. Egy másik munkájukban a különböző koncentrációjú  $^{64}\text{Cu}$ -His kezelés hatását vizsgálták a Caco-2 sejtek Fe, Cu, Zn tartalmára TXRF módszerrel, valamint a  $^{64}\text{Cu}$  aktivitásának mérésével követték a réz felvételét és transzportját is. A 20,2  $\mu\text{M}$ -os 14 napos  $^{64}\text{Cu}$ -His kezelés hatására a sejtek réztartalma 21,6-szorosára változott, viszont a vas és cinktartalmuk nem mutatott szignifikáns eltérést [84]. Tapia vezetésével egy újabb tanulmányukban 8 féle sejtvonal (HepG2, Caco-2, HeLa, NIH 3T3, N2A, B12, F805, NRK) Fe, Cu, Zn tartalmát hasonlították össze. A HepG2, Caco-2, F805 sejtek vas, réz és cink tartalmát mérték meg 48 órás, 100  $\mu\text{M}$ -os Cu-His kezelést követően. A HepG2 sejtek esetében meghatározták a 3 elem mennyiségét nemcsak a teljes sejtmintában, hanem az abból nyert oldható és szemcsés frakcióban is [ 85 ]. Ugyanezen a sejtvonalon vizsgálták a rézkezelés hatását a vas és réz metabolizmusra, valamint a két elem homeosztázisának kapcsolódási pontjait is. Az 50  $\mu\text{M}$ -nál nagyobb rézkoncentrációval (Cu-His) történt kezelés során 8-szorosára nőtt a citoszol metallotionein tartalma, a DMT1 protein mennyisége pedig 35%-kal csökkent és csökkent a sejtek vastartalma is. Ezen eredmények a vas és réz homeosztázis erős kapcsoltságára utalnak [86]. Szoboszlai és munkatársai HCA-7 és HT-29 sejtek Fe, Cu, Zn tartalmát határozták meg TXRF módszerrel. Munkájukban olyan mintaelőkészítési módszert dolgoztak ki, melyben a sejteket közvetlenül a TXRF módszernél használt kvarclapokra centrifugálták, tömegállandóságig szárították, majd gőzfázisú savas feltárást alkalmaztak (speciális kvarcháromlábra helyezték a kvarclapokat a feltárási bombában) [87].

#### **2.8.1.3.1.3. Pt meghatározása sejtmintákban TXRF módszerrel**

TXRF módszerrel nemcsak a Fe, Cu és Zn meghatározását végezték el kutatók, hanem a rákos elváltozások terápiájában széleskörűen használt platina tartalmú szerek kapcsán a sejtek Pt tartalmának analizálása is az érdeklődés középpontjába került.

Fernández Ruiz munkatársaival a DNS Pt tartalmát határozta meg 3 különböző Pt tartalmú szerrel (Pt-berenil, ciszplatin,  $\text{K}_2\text{PtCl}_4$ ) kezelt HeLa sejtek esetében. Munkájukban bizonyították a TXRF módszer hatékonyságát és alkalmazhatóságát ilyen típusú biológiai problémák esetében [ 88 ]. González munkatársaival 2 féle platinakomplex (Pt-berenil, ciszplatin) DNS-hez való kötődési sajátságait hasonlította össze ugyanezen a sejtvonalon. A DNS Pt tartalmát TXRF módszerrel határozták meg

[89]. Pérez egy új Pt-tartalmú rákellenes szer farmakológiai tulajdonságait vizsgálta A2780/A2780cisR, CH1/CH1cisR és 41M/41McisR petefészekrák sejt vonalakon. A sejtek teljes Pt és a DNS Pt tartalmának meghatározására TXRF módszert használt [90].

#### **2.8.1.3.2. Szinkrotron sugárzást alkalmazó röntgenfluoreszcens spektrometria (Synchrotron radiation X-ray fluorescence, SR-XRF) [54]**

Ha nagyon kis mennyiségű mintából származó fluoreszcens röntgensugárzást akarjuk detektálni kiváló gerjesztőforrás a szinkrotron sugárzás. Az XRF alapelve is a nagyobb energiájú röntgensugárzással gerjesztett minta atomjai által emittált fluoreszcens fotonok detektálása. Az XRF analízis egy multieleemes, kvantitatív technika: a fluoreszcens jel intenzitása arányos a mintában található elem koncentrációjával. Nem kell számolni a röntgensugárzás abszorpciójával vékony biológiai minták esetében, ha a mátrix kisrendszámú elemekből áll és nagyrendszámú elemek kvantitatív analízisére szeretnénk megvalósítani.  $Z < 17$  rendszámú elemek kvantitatív meghatározása esetén viszont már figyelembe kell venni a röntgensugárzás abszorpcióját. A harmadik generációs szinkrotron sugárforrások már képesek nagy fluxusú mikrosugárnyalábok előállítására, melyekkel a nyomelemek sejtszintű eloszlása vizsgálható és ezen elemek mennyiségi analízise is kivitelezhető.

Az SR-XRF módszer térbeli felbontóképessége egészen az utóbbi évekig  $1 \mu\text{m}$  körül volt. Az utóbbi években került sor a kemény röntgensugárzás (nagyobb, mint  $1 \text{ keV}$  energiájú sugárzás) fókuszálására képes optikák fejlesztésére. Az APS (Advanced Photon Source) és az ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) laboratóriumaiban az elmúlt években fejlesztettek olyan kísérleti elrendezéseket, melyekkel sikerült a keV energiájú foton sugárnyalábokat  $100 \text{ nm}$  méretűre fókuszálniuk. Például: az ESRF szinkrotron ID22NI sugárnyalábjánál  $80 \text{ nm}$  térbeli felbontású kémiai elemanalízis érhető el a fejlesztések eredményeképpen. Ez a nagyságrendű térbeli felbontás lehetővé teszi a különböző sejt szervecskék térbeli nyomelemanalízisét. Nagy érzékenységének köszönhetően a kimutatási határ az attogram tartományban van, és nagy előny még, hogy a mérések levegő atmoszférában végezhetőek. A kemény röntgensugárzás nagy behatolási mélységének köszönhetően nincsen szükség a minták metszésére, a sejteket a természetes, hidratált állapotukhoz hasonló (mélyhűtött=cryogenic) formában lehet vizsgálni és nincs szükség semmilyen festékanyag használatára sem.

Az SR-XRF felhasználási területei hasonlóak a részecske indukált röntgenfluoreszcens spektrometriához: a szervesen összetevők mennyiségi analízise kemoterápiás kezelésekkel összefüggésben, fémek neurotoxicitásának, nyomelemek fiziológiájának vizsgálata.

Több tanulmányban a Pt intracelluláris mennyiségének és eloszlásának meghatározására használnak SR-XRF módszert [91, 92, 93], míg más szerzők a sejtek elemtartalmának feltérképezésére használják ezt az igen érzékeny technikát [94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108]. A sejtekben meghatározott elemekről a 2. táblázat nyújt tájékoztatást.

### **2.8.2. Tömegspektrometriás módszerek [4]**

### **2.8.3. Szekunder ionemissziós tömegspektroszkópia (Secondary Ion Mass Spectrometry, SIMS)**

A SIMS lényege a mintafelület primer ionnyalábbal történő bombázása, majd a felületről porlasztott szekunder ionok tömegspektroszkópiai azonosítása. A bombázás nyomán a felületről egy- és többatomos részecskék, primer ionok, elektronok és fotonok távoznak. A szekunder részecskék pozitív, negatív vagy semleges töltésűek és igen változó mozgási energiájúak lehetnek. Primer bombázó ionokként főleg Cs<sup>+</sup>, O<sup>2+</sup>, Ar<sup>+</sup>, Xe<sup>+</sup> vagy Ga<sup>+</sup> ionokat alkalmaznak. Energiájuk 1 - 30 keV. A primer ionok energiájuktól és a minta tulajdonságától függően 1 - 10 nm mélységbe hatolnak be. A porlasztott szekunder ionok azonosítása tömegspektrometriával történik. A SIMS készülékeket leggyakrabban kvadrupól vagy repülési idő (Time-of-Flight, TOF) tömeganalizátorral kombinálják [109].

A SIMS módszer jól alkalmazható sejtek elemanalízisére, izotópösszetételének megállapítására és 2D elemtartalmának leképezésére [110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129], mivel a módszer kimutatási határa: 0,1-1 µg/g, a térbeli felbontóképessége pedig körülbelül 50 nm. A sejtekben meghatározott elemekről a 2. táblázat nyújt tájékoztatást. A SIMS módszerrel végzett analíziseket alapvetően két nagy csoportra lehet osztani: dinamikus és statikus. A dinamikus módszer esetében nagy primer ion áramsűrűséggel rétegről rétegre leporlasztjuk a minta felületét az analízis során, így vehetők fel szilárd minták mélységi koncentrációs profiljai. A dinamikus módszer esetében a leggyakrabban ionok és ionclusterek keletkeznek a primerionnyalábbal történő bombázás során. A dinamikus

SIMS módszer kvantitatív, a minta szervesanyag tartalma meghatározható. A statikus vagy molekuláris SIMS esetében a felület bombázását kis primer ion áramsűrűséggel végzik és az analízis többnyire véget ér mielőtt a felületről a primer ionnyaláb egyetlen monolayert is leporlasztana. Így a statikus SIMS a megfelelő módszer felület- és felületközeli analízisek esetében, míg a dinamikus SIMS-sel mélységi (és mennyiségi) információk nyerhetők [130].

A SIMS módszer biológiai alkalmazásainál fontos megemlíteni Chandra munkásságát. Átfogó képet nyújt a dinamikus SIMS felhasználási lehetőségeiről biológiai minták esetében: sejtek, szövetek analízise, iontranszportfolyamatok, rákellenes gyógyszerek nyomon követése (elterjedten használt a BNCT=boron neutron capture therapy terápia esetében a bór nyomon követésére a sejtekben, szervekben), izotóppal jelölt molekulák sejtbeli lokalizációjának feltérképezése. Leírja a mintaelőkészítés módszerét sejt kultúrák, szövetek esetében és kiemeli, hogy mennyire fontos a sejtben lévő ioneloszlás, valamint a sejtek intaktságának megőrzése a mintakezelés során (ennek ellenőrzésére a  $K^+/Na^+$  arányt és a  $Ca^{2+}$  mennyiségét használja) [131].

### **2.8.3.1. Induktív csatolású plazma tömegspektrometria (ICP-MS)**

Az induktív csatolású plazma ionforrás alapvetően egy koaxiális elrendezésű hármaskvarccsőből és egy azt körülvevő indukciós tekercsből áll. Az indukciós tekercsbe nagyfrekvenciás (27-40 MHz) áramot vezetnek, amelynek elektromágneses tere másodpercenként ezen frekvenciának megfelelően előjelet vált és minden töltéssel bíró részecskének ily módon energiát ad át. A skin-effektus következtében gyűrű alakú plazma jön létre, amely lehetővé teszi a mintából előállított nedves vagy száraz aeroszol jó hatásfokú plazmába juttatását. A működés során nemesgázt, legtöbbször argon gázt használnak. Az elektron örvényáram tartományban közel 10000 K, míg az analitikai csatornában mintegy 6000-6500 K hőmérséklet uralkodik. Ezen hőmérsékletnél a vizsgálandó minta alkotóinak disszociációja, atomizációja és ionizációja jó hatásfokkal megvalósítható. Ezen ionforrásnak egy tömegspektrométerrel való összekapcsolása lehetővé teszi mintegy 75 elem izotópjainak szimultán meghatározását. A dinamikus tartomány pedig 7-8 koncentráció nagyságrendet fog át. A kimutatási határok ng/ml – pg/ml koncentráció tartományba esnek.



A sejtminták ICP-MS meghatározása esetében a kritikus pont az ICP-MS rendszerbe való mintabevitel. Az irodalomban a mintabevitelhez használt technikák: flow injection rendszer [132,133,134,135,136,137,138], flow injection (FI) rendszerhez kapcsolt nagyhatékonyságú közvetlen porlasztásos technikát (high efficiency direct injection nebulizer, DIHEN) [139], flow injection (FI) rendszerhez kapcsolt ún. nagyfuratú DIHEN porlasztó (large bore-DIHEN) [140]. Előfordul az ICP-MS rendszer HPLC-hez [132, 138], valamint elektrotermikus párologtatóhoz való kapcsolása is sejtminták analizisénél [141]. A sejtekben meghatározott elemekről a 2. táblázat nyújt tájékoztatást.

#### **2.8.4. Atomabszorpciós spektrometria**

##### **2.8.4.1. Grafitkemencés/Elektrotermikus Atomabszorpciós Spektrometria (graphite furnace/electrothermal atomic absorption spectrometry, GF-AAS/ET-AAS) [142]**

Az atomabszorpciós spektrum analitikai felhasználásának lehetőségét 1955-ben Walsh [143] jegyezte le, majd L'vov [144] és Massmann [145] tervei alapján készültek el az első kvantitatív célra is használható grafitkemencék a 60-as években.

Az atomizáló küvetta igen fontos része a készülékeknek. Anyagának számos kritériumnak kell megfelelnie: jó elektromos vezetőképesség; magas olvadáspont, hogy a nehezen párolgó elemek is atomizálódjanak; a gyors fűtéssel és a mintából származó reaktív anyagokkal szembeni rezisztencia; impermeábilisnak kell lennie a mintából származó gázhalmazállapotú anyagokra, hogy a mérendő anyag megfelelő ideig maradjon a fényútban; nagy tisztaság és a kis költséggel történő egyszerű előállíthatóság. Az atomizálók többsége különböző technikával előállított grafitból készül. A grafit felületét magas hőmérsékleten (2500 °C) szénhidrogénnel, általában metánnal kezelik, így ún. pirolitikus réteget hoznak létre, mely a grafitcső élettartamát nagymértékben megnöveli [146]. Az eljárás jelentősen csökkenti a küvetta felületi reaktivitását, porozitását, és a mérés során fellépő karbidképződést.

A grafitcső, mint elektrotermikus atomizáló (ETA) jellemzésére használják, hogy hogyan változik a hőmérséklet a grafitcsőben a különböző fűtési szakaszokban (szárítás, hamvasztás, atomizálás) [147]. Főként ezek a paraméterek határozzák meg az atomizáció hatékonyságát, ezzel a mérés érzékenységét, a háttérabszorbanciát, illetve a lehetséges zavaró hatások mértékét. A térbeli és időbeni hőmérséklet-eloszlások

vizsgálata alapvető az atomizálók fejlesztéséhez. Az atomizálók fűtése általában elektromos árammal történik. Az áramerősség függ a feszültségtől, a fűtendő cső hosszától, a keresztmetszet felületétől, és az anyagi minőségtől. A szükséges áramerősség 500 A is lehet az 1000 °C/s fűtési ráta eléréséhez. Nagy hőmérsékleti állapotban a fűtőegységnek ellensúlyoznia kell a hőmérsékleti sugárzásból és a hővezetésből származó hőveszteséget. E faktoroknak, melyek az atomizáló fűtésének dinamikáját meghatározzák, mind saját hőmérsékletfüggésük van, ezért még az egyszerű geometriával rendelkező atomizálók hőmérsékletprofilja is igen komplex.

Kezdetben a két grafitkónusz, amelyeken keresztül az áramvezetés történik a grafitcsövek két végére került, ezeket a csöveket „végein fűtött grafitcső”-nek – „end-heated” - nevezzük. Egyszerű felépítésük miatt ezeket a csöveket gyakran ma is használják. Az ilyen típusú csövek fő problémája, hogy az előkezelési és az atomizációs hőmérsékleten hőmérsékleti gradiens lép fel a cső hosszirányában. A cső különböző részein lévő alacsonyabb hőmérsékletek az elpárolgott anyag kondenzálódását, illetve adszorpcióját okozzák. Ha az atomizációt hosszan tartó magas hőmérsékletű előhevítés előzi meg, és a minta atomizációja egy növekvő hőmérsékletű térben valósul meg, az abszorbancia nem lesz arányos a mintában levő meghatározandó elem mennyiségével. Ennek a problémának az áthidalására L'vov egy grafitlapnak, az ún. „platform”-nak a használatát javasolta [148]. A platformot a csőben helyezik el, a két széle hozzáér a cső falához, de tulajdonképpen a gáztérben foglal helyet, s erre injektálják a mérendő anyagot. A platformos cső hőmérsékleti tulajdonságai nem különböznek jelentősen a platform nélkülitől, viszont a platform hőmérséklete csak lassan követi a grafitcső hőmérsékletét, mivel maga a cső fűti. A csőfalhoz képest a platformról történő párolgás időben lassabban történik magasabb hőmérsékleten. Mivel a platform és a belső gáz hőmérséklete közel azonos, időben izoterm állapotról beszélhetünk, viszont a csőben fellépő hőmérsékletgradiens megmarad, így térben nem izoterm az állapot. Többféle platformtípust próbáltak ki, újabban a csőprofilhoz illeszkedő ún. integrált platformok használata terjedt el, melyeket a csővel együtt gyártanak és pirolitikus grafitréteggel vonnak be. Az így készült platformok homogén felülettel, kiemelkedő rezisztenciával és jó fűtési tulajdonságokkal jellemezhetőek.

A Slavin dolgozta ki a GF-AAS optimális működéséhez szükséges feltételeket, megalkotva az STPF (Stabilized Temperature Platform Furnace) koncepcióját [149]. Az

optimális működés kritériumai: pirolitikus bevonattal ellátott grafitcső, pirolitikus L'vov platform, szabályozott argon öblítés, gyors felfűtés, az integrált abszorbancia mérése, a megfelelő háttérkorrekció és a kémiai módosítók használata, valamint a gyors digitális jelfeldolgozás.

Ediger vezette be 1975-ben a kémiai módosítók (chemical modifier-matrix modifier) használatát [150]. Kémiai módosítónak nevezzük azt az anyagot, melyet a mintához (és a standardokhoz) adagolva a mérésnél fellépő zavaró hatást vagy hatásokat csökkenti vagy megszünteti. A módosítók lehetnek szervetlen sók, szerves anyagok, fémek szerves komplexei, gázok, oxidatív és redukív, savas és bázikus természetű anyagok. Hatásukat a mérendő elemre és/vagy a mátrixra fejtik ki. Leggyakrabban a mérendő elem termikus stabilizálása a cél, ilyenkor lehetőség nyílik hosszabb ideig tartó előhevítési lépcső beiktatásával a zavaró anyagok elpárologtatására, ilyen hatást fejtenek ki a Pd- és a Mg-sók [151, 152]. Ritkábban a módosító a mérendő anyag párolgási tulajdonságait javítja, ilyen módosítóknak a karbidképző és a nehezen párolgó elemek esetén van jelentősége. A másik lehetőség, hogy a módosító a mátrixot befolyásolja. Amennyiben csökkenti a mátrix párolgási hőmérsékletét, a bontás során távoznak a zavaró anyagok a rendszerből, erre klasszikus példa az  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  [153]. További lehetőség, hogy a módosító megváltoztatja a mátrix kémiai szerkezetét, s így olyan vegyület jön létre, amely által okozott interferencia lényegesen kisebb.

A hőmérséklet térbeli egyenlőtlenségeinek kiküszöbölésére dolgozták ki a „keresztben fűtött” (side-heated) grafitcsöveket, ahol a fő problémát az elektromos érintkezés megvalósítása jelentette. A Frech [154] által készített integrált kontaktussal ellátott grafitcső (integrated contact cuvette - ICC) jelentett áttörést 1986-ban, amely kereskedelmi forgalomba is került, némi módosítás után a Perkin Elmer cég gyártja integrált platformmal: keresztben fűtött grafit atomizáló (transverse heated graphite atomizer - THGA) néven. Ennél a megoldásnál a gáz és a platform hőmérséklete gyorsabban követi a cső falának hőmérsékletét, ezáltal jelentősen tovább csökkentve a zavaró hatásokat. Mivel a cső teljes hosszában – kivéve a csővégeken - közel izoterm, lecsökkennek a kondenzációból származó interferenciák és a nehezen párolgó elemeknél tapasztalt memóriaeffektus. Frech és L'vov módosították a THGA csövet oly módon, hogy peremmel látták el a cső végét (end cap) [155]. Ezzel növelték a cső végeinek hőmérsékletét, ami további közelítést jelent a térben egyenletes hőmérséklet-

eloszlás eléréséhez. A perem ezenkívül megakadályozza a mérendő elem diffúzióját a csővégeken, s így növeli az érzékenységet és csökkenti a kimutatási határt.

A GF-AAS módszer kezdetben egyszerre csak egy elem mérésére volt alkalmas. Az első kiterjedt vizsgálatok, melyek több elem egyidejű mérését szolgálták Harnly nevéhez fűződnek [156]. Harnly az abszorbanciacsúcsok és a görbe alatti területek függését tanulmányozta különböző atomizációs és bontási hőmérsékleteknél. Kilenc elemet vizsgálva (Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, V, Zn) azt találta, hogy a megengedhető maximális bontási hőmérséklet a Zn mérésénél 500 °C, míg a minimális atomizációs hőmérséklet a Mo és a V mérésénél 2700 °C. Összehasonlítva a Zn mérésnél ideális paraméterekkel, ezen körülmények között a Zn abszorbanciája 50%-ra csökkent platform alkalmazásával, míg csőfalról történő atomizálás esetén 5%-ra. A vizsgálatokból kiderült, hogy a végein fűtött csövek nem megfelelőek sokelemes mérések kivitelezésére. A THGA megjelenése után, a detektor [157] és az optikai rendszer fejlesztésével készült el az első, egyszerre 6 elemet mérni képes atomabszorpciós készülék [158].

Kiterjedt kutatások folynak napjainkban is az atomabszorpciós fényforrások fejlesztésére. A lézersugárzás kiváló spektroszkópai tulajdonságait már a 80-as években igazolták [159], de az akkori technikák magas költsége és veszélyessége megakadályozta elterjedésüket. A dióda lézerek (DL) megjelenésével és tömeges ipari elterjedésével új lehetőség nyílt felhasználásukra. Az eddig használt fényforrásokkal szemben (vájtkatódlámpa - hollow cathod lamp - HCL, elektród nélküli kisülési cső - electrodeless discharge lamp - EDL), a DL számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik [160].

A fejlesztések másik iránya, ahol az utóbbi időben jelentős előrelépés történt a folytonos spektrumot sugárzó lámpák (continuum source CS) fényforrásként való alkalmazása. A klasszikus AAS műszerekben használatos monokromátorok gyenge felbontóképességük miatt alkalmatlanok CS-AAS mérés kivitelezésére. Becker-Ross és Florek munkái alapján készült nagy felbontású monokromátor (double-échelle monochromator - DEMON) [161, 162] és detektor (charge coupled device - CCD) nagy felbontása nyitotta meg az utat a CS-AAS fejlődése felé. A technika lehetővé teszi az abszorpciós vonal szélein történő mérést, így a GF-AAS dinamikus tartománya 5-6 nagyságrendre növelhető, s ezáltal kiküszöbölődik a GF-AAS módszer fő hátránya,

valamint csökkennek a kimutatási határok. A detektor részletes információt szolgáltat az analitikai vonal környezetéről, mely az eddigiéknél pontosabb és megbízhatóbb háttérkorrekciós eljárás kidolgozását teszi lehetővé.

#### **2.8.4.2. Sejtminták elemtartalmának meghatározása GF-AAS módszerrel**

Zödl a cinkkezelés ( $\text{ZnSO}_4$ ) károsító hatásait vizsgálta Caco-2 sejteken. Mérté a különböző enzimek (laktát-dehidrogenáz, szuperoxid diszmutáz, glutation peroxidáz) mennyiségének változását, a sejtproliferáció alakulását, a differenciációs markerek (alkalikus foszfatáz, aminopeptidáz N) mennyiségét és a sejtek Zn-felvételét [163]. Egy következő munkájában különböző vas-sókkal ( $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{FeSO}_4$ ) és komplexekkel ( $\text{FeCl}_3$ /nitrilotriecetsav 1:2,  $\text{FeCl}_3$ /citromsav 1:2) kezelte a Caco-2 sejteket és megfigyelte a toxicitás és felvételbeli különbségeket. A legtöbb vasat a  $\text{FeCl}_3$ /nitrilotriecetsav (1:2) –val és a  $\text{FeCl}_3$  –dal kezelt sejtek vették fel [164]. A vas grafitkemencés meghatározásához kidolgozott módszert (mintaelőkészítés, hőmérsékleti program, analitikai paraméterek) részletesen egy másik cikkükben mutatják be [165].

Borella és munkatársai a természetes ölüsejtek (natural killer, NK-sejtek) citolitikus aktivitását tanulmányozták. A célsejteket  $\text{Na}_2\text{CrO}_4$ -tal kezelték, majd az NK sejtek különböző mennyiségeivel együtt inkubálták és ezután mérték a médiumban a Cr mennyiségét (mely az NK sejtek citolitikus aktivitásának következményeként szabadult fel) [166].

Ott és munkatársai módszert dolgozott ki rákos sejtek Au tartalmának meghatározására [167]. A módszert alkalmazták HT-29 kolorektális karcinóma sejtek analizésére auranofinnal történt kezelést követően. Ugyanez a kutatócsoport a kidolgozott módszerrel vizsgálta különböző aranytartalmú rákellenes szerek citotoxicitását, sejtbé, illetve sejtmagba való felvételét HT-29 kolorektális karcinóma és MCF-7 emlőkarcinóma sejteken. A sejtek Au tartalmát GF-AAS módszerrel határozta meg. Az összes aranykomplex szignifikáns antiproliferatív hatást mutatott, a celluláris és magi Au tartalom viszont eltérő volt [168].

Verhaegh és munkatársai a pirrolidin-ditiokarbamát (PDTC) hatását vizsgálták a MCF-7 emlőkarcinóma, valamint Epstein-Barr vírussal immortalizált GM3189 és IARC1104 limfoblasztoid sejtek p53 enzimszintjére. A PDTC kelátképző tulajdonsággal is rendelkezik, így a Fe, Cu és Zn mennyiségét is mérték a sejtekben GF-AAS módszerrel. Az MCF-7 sejtek esetében a PDTC kezelés hatására a sejtek

réztartalma 2,5-szörösére nőtt, a Zn és Fe tartalom nem változott. A réztartalom növekedésének magyarázata lehet, hogy a PDTC olyan komplexet képez a rézzel, ami könnyen átjut a plazmamebránon és a réz akkumulációját indukálja [169]. Menkes-szindrómás betegektől származó, tenyésztett bőrfibroblaszt sejtek Cu tartalmát Goka és munkatársai vizsgálták [170]. A kontroll fibroblasztokhoz képest magasabb Cu-tartalmat mértek a Menkes-szindrómás betegektől származó sejtekben.

Wills a felvett Cd mennyiségét határozta meg tenyésztett retina pigment epitélissejtekben (retinal pigment epithelium, RPE) GF-AAS módszerrel. Vizsgálta a sejtek morfológiáját, túlélésüket, a szabad gyökök szintjét (ROS) és a membránintegritást a kezeléseik során [171]. Dillon és munkatársai Cr(III) komplexek és Cr(V) analógok permeabilitását és genotoxicitását vizsgálta V79 kínai hörcsög tüdősejteken. A sejtek által felvett Cr mennyiségét grafitkemencés módszerrel határozták meg [172]. Pt(II)-dendrimer konjugátumok citotoxicitását, intracelluláris eloszlását, DNS-hez, fehérjékhez való kötődését vizsgálta Kapp MCF-7 emlőkarcinóma sejteken. A sejtek Pt-tartalmának meghatározása GF-AAS módszerrel történt [173]. A ruténium(III)-komplex, metasztázisgátló NAMI-A szérumpoteinekhez való kötődésének a szer biológiai hatékonyságára gyakorolt hatását vizsgálta Bergamo munkatársaival. A kísérleteiket KB sejtvonalon végezték, a Ru sejtbeli mennyiségét grafitkemencés módszerrel mérték. Tanulmányuk alapján a NAMI-A szérumpoteinekhez való kötődése drasztikusan csökkenti a szer sejtekbe való bejutását, biohasznosíthatóságát, hatását [174]. Bonnitcha az A2780 humán ovárium karcinóma sejtek Co tartalmát Co(III) és Co(II) komplexekkel való kezelést követően vizsgálta [175]. Harris az A549 sejtek Cr tartalmát különböző ideig tartó  $\text{Na}_2\text{CrO}_4$  kezelést követően tanulmányozta [176].

2. táblázat: Sejtminták elemtartalmának meghatározására alkalmazott analitikai módszerek.

Analitikai módszer	Vizsgált sejtvonal	Vizsgált elemek	Eredménymegadás módja	Hiv.
EPMA	patkány májsejtek	Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca	mmol/kg száraz tömeg	[42]
EPMA	patkány májsejtek	Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca	mmol/kg száraz tömeg	[43]
EPMA	patkány májsejtek	Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca	mmol/kg víztartalom	[44]
EPMA	patkány májsejtek	Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca		[45]
EPMA	HL60 mieloid leukémia sejtvonal	Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca	mmol/kg száraz tömeg	[46]
EPMA	U937 humán monocita leukémia sejtvonal	Na, Mg, P, Cl, K, Ca	mmol/kg száraz tömeg	[47]
EPMA	PC3, DU145 prosztatarák sejtek	Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca	mmol/kg száraz tömeg	[52]
EPMA	PC3 prosztatarák sejtek	Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca	mmol/kg száraz tömeg	[51]
EPMA	LNCaP prosztatarák sejtek	Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca	mmol/kg száraz tömeg	[53]
EPMA	egér méhepítelsejtek	Na, Cl, K	mmol/kg száraz tömeg	[48]
EPMA	Colo 205, HT29, T84 vastagbélrák sejtek	Na, Cl, K		[49]
EPMA	HT29 vastagbélrák sejtek	Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca	mmol/kg száraz tömeg	[50]
PIXE	TE-2, TE-13 nyelősőrak sejtvonalak	Pt		[55]
PIXE	A549 humán tüdősejtvonal	Pt		[56]
PIXE	IGROV1-p és IGROV1-DPP petefészekrák sejtvonalak	Pt, Mn, Fe, Cu, Zn	µg/g	[57]
PIXE	IGROV1 és IGROV1-DPP petefészekrák sejtvonalak	Pt, Mn, Fe, Cu, Zn		[58]
PIXE, STIM	UV5P3 kínai hörcsög petefészek sejtvonal	Pt, Cu	µg/g	[59]
PIXE, RBS	CHO AA8 kínai hörcsög petefészek sejtvonal és IGROV1 humán petefészekrák sejtek	Cr, Pb, Fe	mmol/kg	[60]
PIXE, RBS	IMR-32, IGR-N-91, SK-N-SH humán neuroblasztóma sejtvonal	Fe, Cu, Zn, Mn	µg/g (száraz tömegre)	[61]
PIXE, RBS	IMR-32, IGR-N-91, SK-N-SH humán neuroblasztóma sejtvonalak	Fe, Cu, Zn, Mn	µg/g (száraz tömegre), arányok	[62]
PIXE, RBS	IMR-32, IGR-N-91, SK-N-SH humán neuroblasztóma sejtvonal	Fe, Cu, Zn	µg/g protein	[63]
PIXE, RBS, STIM	IGROV1 és IGROV1-DPP petefészekrák sejtek	Fe, Cu, Zn, Mn, I	µg/g (szerves szárazanyagra)	[66]
PIXE, RBS	IGROV1 és IGROV1-DPP petefészekrák sejtek	Fe, Cu, Zn, Mn	µg/g (száraz tömegre)	[64]
PIXE, RBS	IGROV1 petefészekrák sejtek	Fe, Cu, Zn, Mn, I	µg/g (szerves szárazanyagra)	[65]
PIXE, RBS	IGROV1 petefészekrák sejtek	Fe, Cu, Zn, Mn, Ga	µg/g (szerves szárazanyagra)	[67]
PIXE, RBS, STIM	humán Chang májsejtek, egérből származó vörösvérsejtek	V, P, S, Ca, Fe, Cu, Zn	ppm (száraz tömegre)	[69]
PIXE	6 humán rákos és 2 normál sejtvonal	Sr, Ca, Fe, Zn, As, P, K, Cu		[72]
PIXE, RBS, STIM	HaCaT humán keratinocita sejtvonal	Co, Mg, Al, P, S, K, Ca, Fe, Zn	µg/g (szerves szárazanyagra)	[68]
PIXE	patkány Sertoli sejtek	Cd, P, Br, Fe, Zn	nem kvantitatív csak eloszlásvizsgálat (2D)	[70]

<b>Analitikai módszer</b>	<b>Vizsgált sejtvonal</b>	<b>Vizsgált elemek</b>	<b>Eredménymegadás módja</b>	<b>Hiv.</b>
<b>PIXE, RBS, STIM</b>	PC12 patkány phaeochromocytoma sejtek	K, Fe, Zn	µg/g (száraz tömegre)	[71]
<b>PIXE</b>	9L glioszarkóma sejtek	<sup>10</sup> B, <sup>157</sup> Gd		[73]
<b>TXRF</b>	HepG2 hepatoblasztóma, Caco-2 humán kolonkarcinóma, HeLa méhnyakrák, NIH 3T3 embrionális egér fibroblaszt, N2A neuroblasztóma, B12 glioblasztóma sejtvonal	Cu, Fe, Zn, Ca, S	nmol/mg protein	[83]
<b>TXRF</b>	Caco-2 humán kolonkarcinóma sejtvonal	Fe, Cu, Zn	nmol/mg protein	[84]
<b>TXRF</b>	HepG2 hepatoblasztóma, Caco-2 humán kolonkarcinóma, HeLa méhnyakrák, NIH 3T3 embrionális egér fibroblaszt, N2A neuroblasztóma, B12 glioblasztóma sejtvonal, F805 immortalizált egér embriósejtek, NRK patkány vese fibroblaszt sejtek	Fe, Cu, Zn	nmol/mg protein	[85]
<b>TXRF</b>	HepG2 hepatoblasztóma	Fe, Cu, Zn	nmol/mg protein	[86]
<b>TXRF</b>	HeLa méhnyakrák sejtvonal (DNS)	Pt	ng/ ng DNS	[88]
<b>TXRF</b>	HeLa méhnyakrák sejtvonal (DNS)	Pt	%	[89]
<b>TXRF</b>	A2780/A2780cisR, CH1/CH1 cisR, 41M/41McisR petefészekrák sejtvonalak (sejt, DNS)	Pt	µM/ 2x10 <sup>6</sup> sejt	[90]
<b>TXRF</b>	HT-29, HCA-7 kolorektális adenokarcinóma sejtvonalak	Fe, Cu, Zn	µg/ g száraz tömeg, ng/mg protein	[87]
<b>SRXRF</b>	2008, 2008/CDDP humán petefészekrák sejtek	Pt	fg/sejt	[91]
<b>mikro-SRIXE</b>	A2780 petefészekrák sejtvonal	Pt, Cl, Ca, Cu, Zn, K	félkvantitatív	[92]
<b>mikro-SRIXE</b>	A2780 petefészekrák sejtvonal	Br, P, Pt	félkvantitatív	[93]
<b>mikro-XRF</b>	3T3 egér fibroblaszt sejtek	Cu	Intenzitás/sejt	[94]
<b>XFM</b>	HMVEC humán mikrovaszkuláris eredetű, immortalizált endotél sejtek, SH-SY5Y neuroblasztóma sejtek, SK-MEL-131 melanóma sejtek	P, S, Ca, Fe, Cu, Zn	µg/cm <sup>2</sup>	[95]
<b>SRXRF</b>	PC12 patkány phaeochromocytoma sejtek	Fe, Cu, Zn, Pb		[96]
<b>SRXRF</b>	PC12 patkány phaeochromocytoma sejtek	K, Fe, Zn	ng/cm <sup>2</sup>	[97]
<b>SRXRF</b>	SH-SY5Y neuroblasztóma sejtek	P, Ca, Fe, Cu, Zn, S, Mn	ng/cm <sup>2</sup>	[100]
<b>XFM</b>	C57BL/6 egér spermium	Se, Fe, Cu, Zn, P	fg/sejt	[101]
<b>SRXRF</b>	egysejtű protiszták, kovamoszat (diatom, tenyésztett)	Si, Mn, Fe, Ni, Zn	ng/cm <sup>2</sup>	[102]
<b>XFM</b>	MCF-7/WS8 humán mellrák sejtek, PC12 patkány phaeochromocytoma sejtek, PC3 humán prosztatarák sejtvonal	P, S, Ca, Ti, Zn	/Zn arány	[103]
<b>SRXRF</b>	NIH/3T3 egér fibroblaszt sejtek	P, Gd, S	µg/cm <sup>2</sup>	[106]



Analitikai módszer	Vizsgált sejtvonal	Vizsgált elemek	Eredménymegadás módja	Hiv.
SRXRF	MCF-7/W8/WS8 humán mellrák sejtek, PC3-M prosztatatarák sejtek	P, S, K, Ca, Ti, Mn, Cu, Zn, Gd	$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	[107]
Mikro-XRF	egér makrofágok	P, K, Ca, Fe		[108]
SXRM	IGROV1 petefészekrák sejtvonal	P, S, Cl, K, Fe, Zn		[99]
SIMS	Indian Muntjac (IM) szarvas fibroblaszt sejtvonal, BV173 humán leukémia T/B progenitor sejtvonal	$^{23}\text{Na}$ , $^{24}\text{Mg}$ , $^{39}\text{K}$ , $^{40}\text{Ca}$	mM	[110]
SIMS	Indian Muntjac (IM) szarvas fibroblaszt sejtvonal, HDF-P4 humán dermifibroblaszt sejtvonal	$^{40}\text{Ca}$	arányok	[111]
SIMS	Indian Muntjac (IM) szarvas fibroblaszt sejtvonal, vérből szeparált limfociták	$^{40}\text{Ca}$ , $^{24}\text{Mg}$	beütésszám/pixel	[112]
SIMS	Indian Muntjac (IM) szarvas fibroblaszt sejtvonal	$^{40}\text{Ca}$ , $^{24}\text{Mg}$	beütésszám/pixel	[113]
SIMS	Indian Muntjac (IM) szarvas fibroblaszt sejtvonal	$^{40}\text{Ca}$ , $^{24}\text{Mg}$	beütésszám/pixel	[114]
SIMS	Indian Muntjac (IM) szarvas fibroblaszt sejtvonal	$^{23}\text{Na}$ , $^{24}\text{Mg}$ , $^{39}\text{K}$ , $^{40}\text{Ca}$	beütésszám/pixel	[115]
SIMS	LLC-PK <sub>1</sub> disznó veseepítél sejtek	$^{12}\text{C}$ , $^{23}\text{Na}$ , $^{24}\text{Mg}$ , $^{39}\text{K}$ , $^{40}\text{Ca}$ , $^{31}\text{P}$ , $^{35}\text{Cl}$	% száraz tömegre, mM nedves tömegre*	[116]
SIMS	LLC-PK <sub>1</sub> disznó veseepítél sejtek	$^{12}\text{C}$ , $^{23}\text{Na}$ , $^{24}\text{Mg}$ , $^{39}\text{K}$ , $^{40}\text{Ca}$	% száraz tömegre, mM nedves tömegre *	[117]
SIMS (TOF)	MeWo emberi melanóma sejtvonal, borjú oszteoblasztok primer tenyészet	$^{39}\text{K}$ , $^{23}\text{Na}$ , $^{40}\text{Ca}$	arányok (K/Na)	[119]
SIMS (TOF)	MDCKII epitelsejtek	$^{23}\text{Na}$		[120]
SIMS (TOF)	SW1736 anaplasztikus pajzsmirigyarák sejtvonal	$^{23}\text{Na}$ , $^{39}\text{K}$		[121]
SIMS (TOF)	MeWo emberi melanóma sejtvonal	$^{10}\text{B}$ , $^{23}\text{Na}$ , $^{39}\text{K}$	arányok (K/Na), B: ppm	[123]
SIMS (TOF)	MeWo emberi melanóma sejtvonal	$^{10}\text{B}$ , $^{23}\text{Na}$ , $^{39}\text{K}$	arányok (K/Na)	[124]
SIMS	LLC-PK <sub>1</sub> disznó veseepítelsejt-sejtvonal, GM3348 emberi bőrfibroblaszt sejtek, T98G humán glioblasztóma sejtek	$^{12}\text{C}$ , $^{23}\text{Na}$ , $^{39}\text{K}$ , $^{40}\text{Ca}$ , $^{10}\text{B}$	$\mu\text{g B/g}$ nedves tömeg	[125]
SIMS	T98G humán glioblasztóma sejtek	$^{12}\text{C}$ , $^{23}\text{Na}$ , $^{39}\text{K}$ , $^{40}\text{Ca}$ , $^{10}\text{B}$	mM (Na, K), ppm (B) nedves tömegre *	[126]
SIMS	T98G humán glioblasztóma sejtek	$^{12}\text{C}$ , $^{23}\text{Na}$ , $^{39}\text{K}$ , $^{40}\text{Ca}$ , $^{10}\text{B}$	mM (Na, K), ppm (B) nedves tömegre *	[127]
SIMS	T98G humán glioblasztóma sejtek	$^{12}\text{C}$ , $^{23}\text{Na}$ , $^{39}\text{K}$ , $^{40}\text{Ca}$ , $^{152}$ , $^{154}$ - $^{158}$ , $^{160}\text{Gd}$		[129]
SIMS	T98G humán glioblasztóma sejtek	$^{10}\text{B}$ , $^{11}\text{B}$		[128]
SIMS	MCF-10A emlőepítelsejtek (normál sejtvonal), MCF-7 emlőrák eredetű epitelsejtek	$^{23}\text{Na}$ , $^{39}\text{K}$ , $^{40}\text{Ca}$		[118]

Analitikai módszer	Vizsgált sejtvonal	Vizsgált elemek	Eredménymegadás módja	Hiv.
ICP-MS	LL 24 HLF humán tüdőfibroblaszt sejtek (DNS)	<sup>53</sup> Cr	ppb	[139]
ICP-MS	T-175 nyúl hámsejtek	<sup>27</sup> Al, <sup>53</sup> Cr, <sup>55</sup> Mn, <sup>57</sup> Fe, <sup>59</sup> Co, <sup>60</sup> Ni, <sup>63</sup> Cu, <sup>66</sup> Zn, <sup>75</sup> As, <sup>107</sup> Ag, <sup>111</sup> Cd, <sup>202</sup> Hg, <sup>209</sup> Pb	ng/g	[132]
ICP-MS	MSTO-211H, NCI-H226, NCI-H2052, NCI-H2452, ACC-MESO-1 humán mezotelióma sejtvonal, MeT-5A humán mezotel sejtvonal	<sup>55</sup> Mn, <sup>63</sup> Cu, <sup>66</sup> Zn	/10 <sup>6</sup> sejt (sejtszám másik plateból meghatározva), arányok másik sejtvonalra vonatkoztatva	[133]
ICP-MS	MCF-7 emlőkarcinóma	<sup>195</sup> Pt	ng Pt/mg protein	[134]
ICP-MS	MCF-7 emlőkarcinóma (sejt, DNS)	<sup>195</sup> Pt	ng Pt/mg protein	[135]
ICP-MS	2008 petefészekráksejtek, T289 melanómasejtek (exoszóma, DNS)	<sup>195</sup> Pt	pg/ µg DNS	[136]
ICP-MS	A549, PC-3, RERF-LC-MS, RERF-LC-OK, VMRC-LCD, EBC-1, LK-2, PC-10 kissejtes tüdőrák sejtvonalak	<sup>201</sup> Tl, <sup>195</sup> Pt	ng/mg protein	[137]
HPLC-ICP-MS	DHL-4 humán limfóma sejtek	<sup>82</sup> Se		[138]
ICP-MS	HLF humán tüdőfibroblaszt sejtek	<sup>50</sup> Cr		[140]
GF-AAS	Caco-2 humán kolonkarcinóma	Zn	µg/g	[163]
GF-AAS	Caco-2 humán kolonkarcinóma	Fe	µg/g	[164]
GF-AAS	Caco-2 humán kolonkarcinóma	Fe	µg/g	[165]
GF-AAS	K562 humán eritroleukémia sejtvonal	Cr	ng/ 10 <sup>4</sup> sejt	[166]
GF-AAS	HT-29 kolorektális karcinóma sejtvonal, MCF-7 emlőkarcinóma sejtek (sejt, sejtmag)	Au	nmol/ g protein	[168]
GF-AAS	HT-29 kolorektális karcinóma sejtvonal	Au		[167]
GF-AAS	MCF-7 emlőkarcinóma, GM3189, IARC 1104 immortalizált limfoblasztoid sejtek	Fe, Cu, Zn	µg/g protein	[169]
GF-AAS	tenyésztett bőr fibroblaszt sejtek	Cu	ng/mg protein	[170]
GF-AAS	tenyésztett retina pigment epitelsejtek	Cd	pM/mg protein	[171]
GF-AAS	V79 kínai hörcsög tüdősejtvonal	Cr	g/sejt	[172]
GF-AAS	MCF-7 emlőkarcinóma (sejt, sejtmag, DNS)	Pt	kontroll %-ában, ng/mg protein, pg/ug DNS	[173]
GF-AAS	KB emberi szájüregirák sejtvonalon	Ru	µg/ 10 <sup>6</sup> sejt	[174]
GF-AAS	A2780 humán ovárium karcinóma sejtek	Co	nmol/mg protein	[175]
GF-AAS	A549	Cr	g/sejt	[176]

\*száraz tömegből átszámolva, a sejt 85%-át víznek tekintik

## 2.9. Sejtminták speciációjára alkalmas analitikai módszerek

### 2.9.1. Elemspeciáció

A fémek nyomanalízise ma már nagyon alacsony koncentrációban lehetséges, ez azonban önmagában az elemek biológiai hatásának jellemzésére elégtelen adat. Egyre több kutatási eredmény igazolja, hogy egy elem toxikus vagy jótékony hatása valójában az elem kémiai formájához köthető, ezért az ide vonatkozó vizsgálatoknak (környezetvédelem, humánbiológiai) ilyen analitikai információkra is szüksége van. Érdekesség, hogy míg az arzénnek a szerves formái, addig pl. a Hg, Pb és Sn szerves (metilezett, alkilezett) kémiai formái a toxikusabbak. Különleges a Cr(III) és Cr(VI) esete is: míg az előbbi az élő szervezetek számára esszenciális, addig a Cr(VI) karcinogén hatású. Ez az információ igény hívta életre a *speciációs analitikat*, ami a kémiai elemformák (izotópösszetétel, elektronszerkezeti vagy oxidációs állapot, molekuláris szerkezet, stb. szerinti specifikus forma) vizsgálatával foglalkozik. A *speciáció* (elemspeciáció) egy mintában egy elem megoszlása meghatározott kémiai formák között [130].

### 2.9.2. Elemspeciációs módszerek

Az összes rendelkezésre álló elemspeciációs technika részletes bemutatására jelen dolgozat keretein belül nincsen mód, így csak felsorolásszerűen említjük meg a rendelkezésre álló módszereket. Oldatban lévő minták közvetlen, nondestruktív analizálására alkalmas módszerek: NMR (mágneses rezonanciaspektroszkópia), ES-MS (elektrospray ionizációs tömegspektrometria), MALDI (mátrixszal segített lézer deszorpció/ionizáció), optikai spektrometria (UV-VIS, FTIR, cirkuláris dikroizmus, elektronspin-rezonancia, Raman), XAS (röntgenabszorpciós spektroszkópia), EELS (elektron energiaveszteségi spektroszkópia). A kapcsolt technikák esetében az elválasztásra valamilyen kromatográfias módszert vagy elektroforézist alkalmaznak, majd a detektálásra tömegspektrometriával kerül sor (ICP-MS), az azonosításra pedig MALDI-MS, ES-MS technikákkal [130].

#### 2.9.2.1. XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure)

Munkánk során a vas speciációjához XANES módszert alkalmaztunk, ennek elméleti háttere és alkalmazásai sejtminták esetében kerül az alábbiakban bemutatásra.

XAFS (X-ray Absorption Fine Structure) [177] kialakulásakor az atom a belső elektronhéján lévő elektronok energiájának megfelelő vagy annál nagyobb energiájú

röntgensugárzást nyel el. Pontosabban az XAFS az adott atom röntgensugárzást elnyelő képességének egyfajta leképezése, mely tulajdonságot alapvetően befolyásolja az atom kémiai és fizikai „állapota”. Az XAFS spektrum különösen érzékeny a kiválasztott elem oxidációs állapotára, térbeli elhelyezkedésére, az atomok közti távolságokra és a koordinációs számra. Ennek köszönhetően a XAFS egy praktikus, viszonylag egyszerű lehetőséget nyújt a kiválasztott elem speciációjának és atomi léptékű környezetének feltárására. Az XAFS alkalmazhatósága széleskörű: rutinszerűen alkalmazzák biológiai, környezetkémiai, katalizátorkémiai és anyagtudományi területeken.

Mivel XAFS egy atomi szintű vizsgálódást jelent a mintaválasztásnak viszonylag kevés korlátja van. Minden atom rendelkezik belső elektronhéjjal/törzselektronokkal, tehát gyakorlatilag a periódusos rendszer minden eleme mérhető. Fontos kiemelni, hogy a XAFS mérésekhez nincs szükség kristály formában lévő mintára, ami lehetővé teszi oldat fázisban lévő minták vizsgálatát is. Mivel a röntgensugarak behatolnak a minta mélyebb rétegeibe is, így a XAFS nem kifejezetten felület érzékeny módszer, de megfelelő mérési technikával ez a tulajdonsága hangsúlyosabbá tehető. Az XAFS egy kivételes technika, melynek segítségével közvetlenül mérhetőek oldat fázisú mintákban is a nagyon kis mennyiségben előforduló nyomelemek kémiai és fizikai tulajdonságai.

A röntgensugárzás abszorpcióján alapuló mérések viszonylag egyszerűen kivitelezhetőek, mindössze egy széles energiatartományban finoman hangolható röntgen sugárforrás szükséges. A gyakorlatban ez általában szinkrotron alkalmazását jelenti, amit mi sem igazol jobban, minthogy az XAFS története és fejlődése szorosan kapcsolódik a szinkrotron sugárzáshoz. Sokféle kísérleti elrendezés lehetséges: kémiai folyamatok in situ vizsgálata nagyon gyors mérésekkel, nagy térbeli felbontás, extrém hőmérséklet és nyomás paraméterek. Mivel a szinkrotron forrás karakterisztikája és a mérési hely kialakítása meghatározza az energiatartományt, a sugárnyaláb méretét és intenzitását, így ez – bár az XAFS technikának önmagában nem sok korlátja van – gyakorlati határokat szab az XAFS vizsgálatoknak.

Az abszorpciós spektrumot két tartományra oszthatjuk: XANES és EXAFS. Az él körüli kb. 50 eV-os tartomány, a XANES (X-ray Absorption Near-Edge Structure). Az abszorpciós él fölött, az ionizáció tartományában intenzitás-oszcilláció tapasztalható; ennek oka a távozó és a környező atomokról visszaverődő elektron(hullám) interferenciája [178]. Ez a tartomány az EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine

Structure ). A XANES és EXAFS spektrum alapjául ugyanaz a fizikai jelenség szolgál, mégis a kiértékelés szempontjából hasznos ez a megkülönböztetés. A XANES spektrum érzékenyebb az abszorbeáló atom oxidációs állapotára és annak koordinációs kémiájára (pl.: oktagonális, tetragonális elrendeződés), míg az EXFAS spektrumot inkább távolságok, koordinációs szám meghatározására és az abszorbeáló atom szomszédainak speciációjára használják.

#### **2.9.2.1.1. XANES spektroszkópia felhasználása sejtminták esetében (X-ray Absorption Near Edge Structure )**

Számos tanulmány foglalkozik különböző elemek oxidációs állapotának meghatározásával biológiai minták esetében. Legtöbbször szövetmintákat vizsgálnak, ritkábban kerül sor sejt kultúrák vagy önálló sejtek vizsgálatára. Ebben a fejezetben a sejt alkalmazások bemutatása következik.

Kwiatek és munkatársai a Zn K abszorpciós élét vizsgálták prosztatarák sejtekben (DU-145, PC-3 és LNCaP). A XANES meghatározásokat fluoreszcens módban, szobahőmérsékleten, levegő atmoszférában végezték el. A sejt vonalak XANES spektrumai alapján megállapítható, hogy a különböző sejt vonalak azonos oxidációs állapotú cinket tartalmaznak (2+), de a cink atomok kémiai környezete eltérő volt [179, 180]. Wellenreuther makrofágok (RAW264,7 eger makrofágsejtek) Zn homeosztázisát vizsgálta. Ezekben a sejtekben a Zn vezikulákban, ún. cinkoszómákban tárolódik. A tárolt Zn speciációját végezték el mikro-XANES módszerrel. A mikro-EXAFS analízisek alapján a cink nem szabadon található a vezikulákban, hanem S tartalmú komplexek formájában [181]. Kwiatek és kutatócsoportja egy másik munkájukban különböző fixáló módszerek hatását vizsgálták ugyanezen sejtek kén XANES spektrumaira. A méréseket transzmissziós módban végezték el és nem találtak eltérést a S K abszorpciós élének helyzetében a fixáló módszertől függően [182].

Hall és munkatársai Pt(IV) komplexek redukcióját követték XANES módszer segítségével A2780 humán ovárium karcinóma sejteken. A sejteket 2, illetve 24 óráig kezelték Pt(II) vagy Pt(IV) komplexekkel (50  $\mu$ M koncentrációban) és -261 °C -on rögzítették a sejtek XANES (Pt L3 abszorpciós él) spektrumát. Megállapították, hogy a sejtekbe bekerülő Pt(IV) 24 óra elteltével teljes egészében Pt(II)-vé redukálódott [183]. Egy másik munkájukban ugyanezen sejt vonalon micro-XANES analízist végeztek. A Pt

oxidációs állapotát határozták meg a sejtekben ciszplatinnal és Pt(IV)-komplexekkel való kezelés után [92].

Harris és munkatársai Cr(VI)-tal kezeltek különböző rákos sejteket (A549 humán tüdő adenokarcinóma, HepG2 humán hepatóma, V79 kínai hörcsög tüdőfibroblaszt, C2C12 egér mioblaszt sejt vonal) és meghatározták a Cr oxidációs állapotát és koordinációs környezetét a sejtekben és a subcelluláris frakciókban (kis és nagy molekulású frakciókat különítették el). Megállapították, hogy a króm a kezelést követően Cr(III) komplexek formájában van jelen a sejtekben. Nagyrészt aminosavak karboxilát, amin és imidazol reziduumaival képez komplexet, ritkán fordulnak elő hidroxó- és aqualigandumok [184]. Ugyanez a kutatócsoport az A549 sejteken a Cr mikro-XANES analízisét is elvégezte. Ezen kísérletben a sejteket 100  $\mu\text{M}$  Cr(VI)-tal kezelték 20 percig, illetve 4 óráig és vizsgálták a Cr(VI) redukcióját Cr(III)-má, a Cr(III) komplexálódását a sejtekbe való bejutást követően [176]. Ugyancsak a Cr oxidációs állapotát vizsgálta a sejtekben Ortega munkatársaival. IGROV1 humán petefészekráksejteket és CHO-AA8 kínai hörcsög petefészeksejteket kezeltek jó és rossz oldékonyságú Cr(VI) komponensekkel és meghatározták a króm oxidációs állapotát mikro-XANES technikával. A jó oldékonyságú  $\text{Na}_2\text{CrO}_4$  esetében azt tapasztalták, hogy a sejtekbe jutó Cr(VI) teljes egészében Cr(III)-má redukálódott és homogéne oszlott el a sejtben, a sejtmagba is bejutva. Míg a rosszul oldódó  $\text{PbCrO}_4$  esetében az intracelluláris és intranukleáris Cr(III) mellett Cr(VI) szemcséket is megfigyeltek a sejtek perinukleáris részén [185]. Bonnichia a Co oxidációs állapotát és koordinációs környezetét vizsgálta A2780 humán ovárium karcinóma sejteken Co(III) és Co(II) komplexekkel való kezelést követően [175].

Fe speciációjára vonatkozó XANES tanulmányokat igen keveset találunk sejt minták esetében. Ortega és munkatársai IG-ROV-1 humán ovárium karcinóma sejteket kezeltek 25  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$ -tal (20 h), majd 2  $\mu\text{M}$  doxorubicinnel (2h) vagy iododoxorubicinnel és felvették a sejtek Fe XANES spektrumait. A doxorubicin és a iododoxorubicin antraciklin antibiotikum típusú rákellenes szerek, hatásmechanizmusuk máig nem tisztázott teljes egészében. Kémiai tanulmányok szerint erős vaskelátorok. A vas-antraciklin komplex kialakulását és a komplex reaktív szabad gyök-képző képességét teszik felelőssé a doxorubicin kardiotoxikus mellékhatásáért, de rákellenes szerként való hatékonyságáért is. A terápiás doxorubicin-koncentráció mellett azonban

a komplex kialakulása a sejten belül kétséges. Ortega tanulmánya sem tudta ezt megerősíteni, mivel nem találtak különbséget a doxorubicinnal kezelt és a kontroll sejtek Fe XANES spektruma között [186].

Bacquart mikro-XANES vizsgálatokat végzett vaskezelt PC-12 patkány pheochromocytoma sejteken és arzén-trioxiddal kezelt IGROV1 humán petefészekrák sejteken. Kétféle mintaelőkészítést is alkalmaztak (fagyasztva szárítás és fagyasztás – amikor megmarad a sejtek hidratált állapota). Vizsgálták a kísérleti elrendezés nyújtotta térbeli felbontóképességet, kimutatási határt, reprodukálhatóságot és ismételhetőséget és a sugárzás okozta mintakárosodást is. Fe, illetve As XANES felvételeket készítettek a sejtek magi, citoszol és mitokondrium részeiről. Megállapították, hogy a vas 3+ állapotban van jelen a sejt-kompartimentekben [187]. A kidolgozott mintaelőkészítést és mérési módszert használták fel következő munkájukban is, amikor az arzén oxidációs állapotát határozták meg a IGROV1 (humán petefészekrák sejt-vonal) és HepG2 (humán májkarcinóma sejt-vonal) sejtek különböző sejtorganelumaiban. Az elvégzett mikro-XANES analízisek szerint az  $As_2O_3$ -dal kezelt IGROV1 sejtekben az  $As(OH)_3$  az uralkodó arzénforma mind a sejt-magban, mind a citoszolban, mind a mitokondriumban. Az  $As(OH)_3$ -dal kezelt HepG2 sejtekben is az As(III) formák voltak az uralkodók, de sejt-maghoz tartozó abszorpciós spektrumokon szervesen As(V) jelenlétét is igazolták [188]. Munro és munkatársai arzenittal és arzenáttal kezelt HepG2 sejteken végzett XANES és EXAFS analízisei ezzel szemben As-S tartalmú specieszek létét feltételezik [189]. A két tanulmány közti fő különbség a mintaelőkészítésben van: Munro fagyasztva szárított sejteket, Bacquart hidratált állapotukban fagyasztott sejteket vizsgált.

Yang és munkatársai micro-XRF technika segítségével ellenőrizték az általuk kifejlesztett Cu(I)-szelektív fluoreszcens szenzor szelektivitását. 3T3 egér fibroblaszt sejteket kezeltek rézzel, majd feltérképezték a réz eloszlását a sejtekben. A sejtek több pontjáról mikro-XANES felvételeket készítettek a sejtben található réz oxidációs állapotának meghatározására. Kísérleteik szerint a rézzel kezelt sejtekben található Cu jelentős része Cu(I) állapotban található. [94].

Összefoglalóul megállapítható, hogy a 15-50  $\mu m$  átmérőjű sejtekben a Zn, Fe, S, Cu, Pt, As, Co oxidációs állapotának feltárására a XANES és mikro-XANES technikát sikerrel alkalmazták.

### 3. Célkitűzések

#### 3.1. Kisrendszámú elemek ( $Z \leq 23$ ) meghatározása TXRF módszerrel („lowZ TXRF”)

Munkánk során a következő kérdésekre kívántunk választ adni:

- alkalmas-e a „lowZ TXRF” mérés technika biológiai minták kisrendszámú elemtartalmának meghatározására?
- melyik a leghatékonyabb feltérési módszer ezen biológiai anyagok esetében a „lowZ TXRF” vizsgálatokhoz történő mintaelőkészítésére?
- meghatározható-e a rákos sejtek kéntartalma „lowZ TXRF” technikával, valamint alkalmazható-e a sejtek kéntartalma belső referenciaértékként?

Ezen célok megvalósításához egy folyékony (humán szérum) és három szilárd biológiai referenciaanyagban (marhamáj, antarktisi rák, spenót) a visszanyerési értékek (Na, Mg, P, S, K, Ca) meghatározását végeztük el különböző feltérési módszereket követően. Az eltérő szerves és szervetlenanyag-tartalommal rendelkező referenciaanyagokat feltérás nélkül (a folyékony halmazállapotú referenciaanyagot), valamint kistérfogató, klasszikus és gőzfázisú kvarclapon történő feltérás után is analizáltuk „lowZ TXRF” spektrométerrel. Vizsgáltuk továbbá a sejtszám és a sejtekben mérhető S tartalom közti kapcsolatot.

#### 3.2. Fe, Cu, Zn meghatározása TXRF és GF-AAS módszerrel HT-29 sejtekben

Munkánk során továbbá célul tűztük ki rákos sejtek (HT-29 kolorektális karcinómasejtek) Fe, Cu, Zn tartalmának meghatározását TXRF módszerrel és az ehhez szükséges analitikai mintaelőkészítés kidolgozását. Hitelesített sejtreferenciaanyag hiányában további célnak tekintettük a TXRF módszerrel kapott eredmények más fizikai elven alapuló mérés technikával (GF-AAS) való megerősítését is.

A kidolgozott módszerrel célként jelöltük meg a HT-29 sejtek Fe, Cu, Zn tartalmának meghatározását a vas különböző vegyületeivel ( $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{FeCl}_3$ , Fe(III)-citrát, Fe(III)-transzferrin), illetve kelátorokkal (Dp44mT, EDTA) való kezelést követően.



### **3.3. Rákos sejtek SR-TXRF-XANES analízise**

A hamburgi szinkrotronnál végzett kísérleteinknél célul tűztük ki a rákos sejtekben a vas oxidációs állapotának meghatározását SR-TXRF-XANES módszerrel és az ehhez szükséges analitikai mintaelőkészítés kidolgozását. Célunk volt különböző rákos sejtvonalak (ZR-75-1, HT-29, MDA-MB-231, HCA-7), eltérő növekedési fázisban (lag, log, plateau) lévő sejtek, valamint különböző vegyszerekkel ( $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ , antimycin A, 5-fluorouracil) és vasvegyületekkel ( $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{FeCl}_3$ , Fe(III)-citrát, Fe(III)-transzferrin) kezelt sejtek Fe K abszorpciós élének XANES vizsgálata.

## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1. A sejtenyésztéshez használt anyagok és módszerek

#### 4.1.1. Tumorsejtvonalak tenyésztése

A HCA-7 colony 29 és HT-29 humán kolorektális adenokarcinóma sejtvonalakat az európai sejtbankból (ECACC, Salisbury, Anglia), a ZR-75-1 humán emlőrák, valamint a HT-1080 humán fibroszarkóma sejtvonalat a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetéből (Budapest, Magyarország), az MDA-MB-231 humán emlőrák sejtvonalat pedig az Országos Onkológiai Intézet Tumor Progressziós Osztályáról szereztük be. A HCA-7 és MDA-MB-231 sejteket DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 4500 mg/L glükóztartalommal), a HT-29, ZR-75-1, HT-1080 sejteket RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) tápfolyadékban tenyésztettük 10% FCS (fetal calf serum) hozzáadásával, 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> atmoszférában. A sejtenyésztéshez használt anyagok a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) termékei. A sejtek életképességét 0,04%-os tripánkék kizárási teszttel ellenőriztük. A sejtenyésztéshez kapcsolódó valamennyi tevékenységet az Országos Onkológiai Intézet Klinikai Kísérleti Laboratóriumi Osztályán (Budapest) végeztük.

### 4.2. A kisrendszámú elemek ( $Z \leq 23$ ) TXRF meghatározásához használt anyagok és módszerek

#### 4.2.1. Referenciaanyagok

Vizsgálataink során négy referenciaanyagot használtuk: SERONORM<sup>TM</sup> Trace Elements Serum Level 1 – *humán szérum* (SERO AS, Billingstad, Norvégia), NIST 1577a Bovine Liver - *marhamáj* (National Institute of Standards and Technology), MURST-ISS-A2 Antarctic krill - *antarktiszi rák* (Istituto Superiore di Sanita, Róma), IAEA-331 Spinach - *spenót* (International Atomic Energy Agency).

#### 4.2.2. Reagensek

A feltárásokhoz nagy tisztaságú (suprapur) 65%-os salétromsavat használtunk (Merck, Darmstadt, Németország). Az 50 mg/L koncentrációjú Ti belső standard oldat, valamint a kalibráló oldatok elkészítéséhez is egyelemes standardoldatokat alkalmaztunk (Merck, Darmstadt, Németország). A kalibrációs oldatok elkészítéséhez és a feltárt minták hígításához is 18 MΩcm fajlagos ellenállású desztillált és ionmentes vizet használtunk (Milli-Q Plus, Millipore, Molsheim, Franciaország). A boroszilikát

üvegből készült mérőlombikokat (5, 10, 25, 50 ml térfogatú, A jelű) az EPA (Environmental Protection Agency) szabványnak megfelelően, 1:1 arányú HNO<sub>3</sub> és víz, illetve HCl (Merck suprapur) és víz elegyekkel, majd nagytisztaságú vízzel tisztítottuk.

#### **4.2.3. A kalibrációs faktorok meghatározásához használt oldatok**

A kalibrációs faktorok meghatározására 1, 10, 100, 1000, 5000 mg/L koncentrációjú Na, Mg, P, S, Ca oldatokat készítettünk. Az oldatok Ti koncentrációja minden esetben 10 mg/L volt.

#### **4.2.4. A kimutatási és meghatározási határértékek megállapítása**

A kimutatási és meghatározási határértékek kiszámítása (LOD=limit of detection, LOQ= limit of quantification) a Klockenkämper könyvében leírtak szerint történt [190]. Ehhez 10 mg/L koncentrációjú Na, Mg, P, S, Ca és Ti standard oldatokból (1%-os salétromsavas oldatban) háromszor 2 µL-t cseppentettünk a kvarclapokra és a beszáradást követően 500 másodpercig vettük fel spektrumaikat.

#### **4.2.5. Műszerek**

A mikrohullámú feltárásokhoz Ethos 1 feltáró berendezést használtunk (Milestone, Sorisole, Italy). A minták analízisét Wobistrax „lowZ TXRF” spektrométerrel (Atomintitut, Vienna, Austria) [191] végeztük el, mely Cr anódú röntgensővel rendelkezik. A mérés során a röntgensőre kapcsolt feszültség: 30kV, áramerősség: 5-30mA volt. A készülék Ni/C multilayer monokromátorral (5,4 keV), 10 mm<sup>2</sup> aktív területű KETEK szilikon drift detektorral, ultravékony ablakkal és az ablak körül elektroncsapdával rendelkezik, mely befogja az Auger elektronokat. A spektrumokat 500 másodpercig vettük fel. A mintákból 3 párhuzamost készítettünk és mindegyik kvarclapot 4 pozícióban mértünk meg (90°-kal mindig elforgatva őket).

Az analízis során hordozóként mindvégig kvarclapokat használtunk, melyek tisztaságvizsgálatát használat előtt mindig elvégeztük.

#### **4.2.6. Feltérési módszerek**

A szérumminta feltérás nélküli analízisével kapcsolatban meg kell említenünk, hogy a beszárítást követően 3 µL cc. HNO<sub>3</sub> segítségével alakítottunk ki megfelelő geometriájú réteget a kvarclapon.

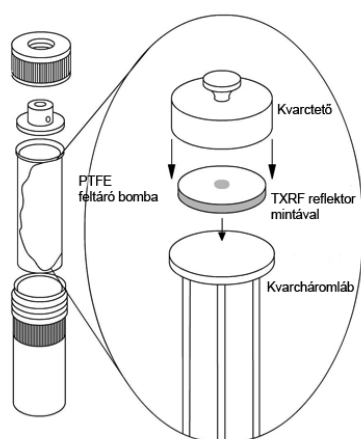
Három különböző feltérési módszert hasonlítottunk össze.

1. „Klasszikus” módszer: körülbelül 0,05-0,1 g referenciaanyagot tártunk fel 2 ml tömény salétromsav segítségével PTFE (politetrafluoretilén) edényekben. A feltérás

időtartama 20 perc volt a maximális hőmérséklet pedig 220 °C. A hűtést követően 10 µl, 1000 mg/L Ti belső standard oldatot adtunk a mintákhoz, és a PTFE edények tartalmát 25 ml-es mérőlombikokba mostuk és jelre állítottuk. Az így kapott oldatból 5 µl került a TXRF mérésekhez használt kvarclapokra. A „klasszikus” módszert mind a négy referenciaanyag esetében alkalmaztuk.

2. A SERONORM minta esetében kis térfogatú feltárást is alkalmaztunk. A módszert részletesen bemutatja a [192] cikk, melyben nagyon kis tömegű (kb. 1mg) biopsziás minták feltáráására használták. A kis térfogatú feltáráshoz 1,5 ml térfogatú, jól záródó PTFE mikroedényeket (Savillex, Eden Prairie, MN, USA) használtunk. A szérumminta 50 µl-éhez 200 µl tömény salétromsavat adtunk. A feltárást 120 °C-on 20 percig laboratóriumi kerámia főzőlapon (Cole Palmer, USA) végeztük. A feltárást után 5 µl, 50 mg/L Ti belső standard oldatot adtunk a mintákhoz. Az így kapott oldatból - további hígítás nélkül - 5 µl került a TXRF mérésekhez használt kvarclapokra.

3. A SERONORM minta esetében közvetlen, kvarclapon történő feltárást is kipróbáltuk. A PTFE edényekbe kvarc háromlábát helyeztünk és erre tettük a kvarclapot, melyre a mintát korábban felcseppentettük. A minta védelme érdekében kvarcfedőt is használtunk (6. ábra). Kis mintamennyiségek esetében nagyon hasznos a gőzfázisú feltárást [87]. A PTFE edényekbe tömény salétromsavat tettünk, a feltárást gőzfázisban került sor 160 °C és 200 °C hőmérsékleteken, 20 percig.



6. ábra: A kisrendszámú elemek meghatározásakor a kvarclapon való feltáráshoz használt kvarceszközök sematikus rajza és fotója.

### **4.3. A Fe, Cu és Zn TXRF meghatározásához használt anyagok és módszerek**

#### **4.3.1. Reagensek**

Kísérleteinkhez 18 M $\Omega$ cm fajlagos ellenállású desztillált és ionmentes vizet (Milli-Q Plus, Millipore, Molsheim, Franciaország), analitikai tisztaságú vegyszereket és reagenseket használtunk. Az 1000 mg/L koncentrációjú Ga, Cu, Fe és Zn standardoldatokat a Mercktől szereztük be (Darmstadt, Németország). A feltárásokhoz 65%-os, tömény salétromsavat és 30%-os hidrogén-peroxidot használtunk, melyek suprapur tisztaságúak voltak (Sigma Aldrich, Magyarország és Merck). A kezelésekhez használt vas(II)-szulfát, vas(III)-citrát, vas(III)-klorid, vas(III)-transzferrin és etiléndiamintetraecetsav (EDTA) a Sigma Aldrich (Magyarország) termékei, a 2,2'-dipiridil-N,N-dimetilszemikarbazon (Dp44mT) a Merck (Darmstadt, Németország) terméke.

A sejtek mosásához használt foszfát pufferelt sóoldatot (PBS, phosphate buffered saline) minden alkalommal felhasználás előtt frissen készítettük.

A boroszilikát üvegből készült mérőlombikokat (5, 10, 25, 50 ml térfogatú, A jelű) az EPA (Environmental Protection Agency) szabványnak megfelelően, 1:1 arányú HNO<sub>3</sub> és víz, illetve HCl (Merck suprapur) és víz elegyekkel, majd nagy tisztaságú vízzel tisztítottuk.

#### **4.3.2. Műszerek**

##### **4.3.2.1. GF-AAS (Grafitkemencés atomabszorpciós spektrometria)**

A Fe és a Cu szimultán meghatározását Perkin Elmer SIMAA 6000 típusú grafitkemencés atomabszorpciós spektrométerrel végeztük. Perkin Elmer THGA (transversely heated graphite atomizer), végein peremezett (end capped) keresztfűtésű grafitcsöveket használtunk, melyek integrált L'vov platformot tartalmaztak (Perkin Elmer B3000653). A készüléket optikai rendszere (Tetrahedral Echelle Polychromator, fókusztávolság 0,5 m) és detektora (Solid-state Detector, diódasoros 60 dióda) multielemes mérésre teszi alkalmassá, egyszerre hat elem mérhető. Fényforrásként Cu és Fe vájtkatódlámpákat használtunk (Perkin Elmer), melyekre a mérés során 15 mA-es áramerősséget kapcsolunk. Az inert körülményeket – külső gázként – argon (500 ml/min áramlási sebességgel) biztosította. A háttérabszorbancia kiküszöbölésére a műszerbe beépített Zeeman longitudinális háttérkorrektort alkalmaztuk. Az oldatokat

Perkin Elmer AS-72 (Überlingen, Németország) típusú automatikus mintaadagolóval juttattuk a grafitcsőbe.

A GF-AAS mérésekhez  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ -ot használtunk kémiai módosítóként. 5  $\mu\text{g}$  Pd-ot  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  formájában adtunk 10  $\mu\text{L}$  mintamennyiséghez a grafitcsőbe való bemérés előtt. A kvantitatív meghatározáshoz a Cu 324,8 nm –es és a Fe 305,9 nm –es vonalát használtuk. A Zeeman-háttérkorrekcióval kiigazított abszorpciós jelet 5 s –ig vettük fel. A táblázatokban és ábrákon megjelenített eredmények minden esetben 3 párhuzamos mérés átlagai. A kvantitatív analízishez külső kalibrációs módszert használtunk. A Cu meghatározáshoz használt kalibráló oldatok 10-100 ng/ml, a Fe esetében pedig 100-1000 ng/ml koncentrációjúak voltak.

#### **4.3.2.2. TXRF (Totálreflexiós röntgenfluoreszcens spektrometria)**

A TXRF meghatározásokhoz TXRF 8030C (Atomika Instruments GmbH, Oberschleissheim, Németország) spektrométert használtunk. A készülék Mo/W anódú, 2,5 kW teljesítményű röntgensóvel, dupla W/C multilayer monokromátorral rendelkezik. A Mo cső esetében a gerjesztési energia 17,4 keV (Mo  $K\alpha$ ). A mintában lévő elemek karakterisztikus röntgensugárzását egy 80 mm<sup>2</sup> aktív területű, 150 eV felbontású Si(Li) detektor analizálja. A röntgensőre 50 kV feszültséget kapcsoltunk a mérések során, az áramerősséget a műszer pedig automatikusan változtatta a detektor holtidejének (dead time) és a teljes analízisidőnek a figyelembevételével. A mérési idő 500 s volt. Belső standardként Ga –ot használtunk. A mintából 10  $\mu\text{L}$ -t cseppentettünk a TXRF mérésekhez használt tisztított és ellenőrzött kvarclapokra, és a cseppet laboratóriumi kerámia főzőlapon (Cole Palmer, USA) beszárítottuk (80 °C). A Fe, Cu, és Zn és a belső standard Ga meghatározására 6,403 keV, 8,047 keV, 8,638 keV, 9,251 keV energiájú  $K\alpha$  vonalaikat használtuk fel.

#### **4.3.3. A sejtek vassal történő kezelése és mintaelőkészítése**

A HT-29 sejteket az *4.1.1. fejezetben* leírtak szerint tenyésztettük 6 lyukú tenyésztő lemezekben ( $10^6$  sejt/ lyuk) 80%-os konfluencia szintig. A sejteket különböző koncentrációjú (10, 20, 50, 100  $\mu\text{mol/L}$  kezelési koncentráció) és típusú (vas(II)-szulfát, vas(III)-citrát, vas(III)-klorid és vas(III)-transzferrin) vasvegyületekkel kezeltük 4 órán át. A kezeléseket elvégeztük 10% FCS (fetal calf serum) –t tartalmazó és FCS-mentes médiumban is. Minden kísérlethez kontrollként kezeletlen (csak a médiumban tenyésztő) sejteket használtunk.

A kezelési idő letelte után a sejteket tripszin-EDTA segítségével (5,0 g/L sertéstripszin és 2,0 g/L EDTA·4Na, 0,9 v/v % -os NaCl oldatban, Sigma) vettük fel. Az emésztést/tripszinezést PBS-sel való hígítással állítottuk le, majd a sejteket Eppendorf csövekbe pipettáztuk. Kétszer mostuk a sejteket 1-1 ml PBS-sel (centrifugálás: 20 000g, 15 perc, 4 °C, J2-21 Beckman centrifuga). A sejszámolást a 2. centrifugálás előtt Bürker kamra segítségével végeztük el. (A sejtek életképességét 0,04%-os tripánkék kizárási teszttel ellenőriztük.) A 2. centrifugálást követően, a mosóoldat eltávolítása után a sejtekhez 20 µl 30%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ot, 80 µl 65%-os HNO<sub>3</sub>-at és 15 µl 10 µg/ml koncentrációjú Ga oldatot adtunk és az oldatokat 24 órán át szobahőmérsékleten állni hagytuk (részleges feltárás). Az így nyert mintából 10 µl került a TXRF analízisekhez használt kvarclapokra (kerámia főzőlapon beszárítás: 80 °C, 10 perc), illetve a GF-AAS mérés esetében közvetlenül a grafitcsőbe.

#### **4.3.4. A sejtek kelátorokkal történő kezelése és mintaelőkészítése**

A kezeléseket FCS mentes médiumban végeztük el 4 és 8 órás időtartamokig.

A 4 órás kísérletben egyszerre adtuk a HT-29 sejtek tápoldatához a FeSO<sub>4</sub>-ot (20 µM), illetve a Dp44mT vagy EDTA kelátorokat (50 µM), valamint elvégeztük a kísérletet úgy is, hogy csak a kelátorokat adtuk a médiumhoz.

A 8 órás kezeléseket kétszer 4 órás részekre bonthatóak. Az első 4 órában a sejteket FeSO<sub>4</sub>-tal kezeltük (20 µM) vagy csak az FCS mentes tápoldatban hagytuk állni őket. A második 4 órában kapták a Dp44mT vagy EDTA kelátorkezeléseket (50 µM) a sejtek. A két 4 órás blokk között a sejteket FCS mentes tápoldattal lemostuk.

A HT-29 sejtek tenyésztése és mintaelőkészítése a többi ponton megegyezik az előző fejezetben leírtakkal.

#### **4.3.5. A kvarclapokon kialakult réteg ellenőrzése pásztázó elektronmikroszkópiával (scanning electron microscopy, SEM) és atomerő mikroszkópiával (atomic force microscopy, AFM)**

A kvarclapokra szárított minták felszínét pásztázó elektronmikroszkópiával (AMRAY 1830, Amray Inc., Bedford, MA vakuum: 10<sup>-4</sup> mbar, 20 kV gyorsítófeszültség, 0,1 nA áramerősség) térképeztük fel. A vizsgálat során a kvarclapokon lévő mintára vákuumpárológatóval vékony szénréteget párológattunk, majd a mintákról 3-4 ponton, többféle nagyítással SEM felvételeket készítettünk.

A kvarclapon lévő minta rétegvastagságát atomerő mikroszkópiával (XE-100, PSIA

Inc., Dél-Korea) vizsgáltuk. Az AFM mérésekre szobahőmérsékleten, szilárd/levegő határfelületen, nem-kontakt módban került sor. A méréshez NSC15 (MikroMasch) típusú, Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> anyagú, hátoldalán alumíniumreflektáló felülettel borított, átlagosan 40 N/m rugóállandójú, pásztázó tűt használtunk. A mérések 3-4 véletlenszerű módon kiválasztott helyen történtek. A mintákról 4,5 µm x 4,5 µm-es felvételek készültek. A mérési eredményeket a XEI 1.6 (PSIA Inc., Dél-Korea) programmal értékeltük ki.

#### **4.3.6. Statisztikai analízis**

A statisztikai számításokat (párosított t-próba, Tukey post hoc teszt) NCSS szoftverrel végeztük el (Kaysville, Utah, USA). Statisztikailag akkor tekintettük szignifikánsnak a különbséget, ha  $p < 0,05$ .

### **4.4. Az elemspeciációs analízishez használt anyagok és módszerek**

#### **4.4.1. Reagensek, vegyszerek**

A XANES (X-ray absorption near edge structure) meghatározások során standardként használt anyagok: Fe(II)-citrát, Fe(II)- $\alpha, \alpha'$ -dipyridyl, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, Fe(III)-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, Fe(III)-citrát, Fe(III)-EDTA és a ferritin a Sigma-Aldrich (Sigma, Magyarország) és a Reanal (Magyarország) termékei. A standardoldatok elkészítéséhez 18 MΩcm fajlagos ellenállású ionmentes vizet használtunk (Milli-Q Plus, Millipore, Molsheim, Franciaország).

A sejtek kezeléséhez használt anyagok: NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, antimycin A, 5-fluorouracil, vas(II)-szulfát, vas(III)-citrát, vas(III)-klorid, vas(III)-transzferrin a Sigma-Aldrich és a TEVA Magyarország termékei. A sejtek kezelésénél médiumként használt foszfát pufferelt sóoldatot (PBS, phosphate buffered saline) minden alkalommal felhasználás előtt frissen készítettük és szűrővel sterilizáltuk.

#### **4.4.2. Standardoldatok**

A vas oxidációs számát, a ligandumok típusát és a koordinációs környezetet figyelembe véve különböző vastartalmú vegyületeket választottunk standardként: Fe(II)-citrát, Fe(II)- $\alpha, \alpha'$ -dipyridyl, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, Fe(III)-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, Fe(III)-citrát, Fe(III)-EDTA és a ferritin. A standard mintákból 10 ppm koncentrációjú oldatokat készítettünk ionmentes víz segítségével. Az oldatokból 1 µL-t (10 ng Fe) cseppentettünk közvetlenül a kvarclapokra.



#### 4.4.3. A sejtek kezelése, mintaelőkészítés

Kísérleteink során  $10^5$ -  $2 \times 10^5$  sejtet kezeltünk 80%-os benőttégi szintnél 6 lyukú tenyésztő lemezekben steril PBS-ben. A kezelés időtartama 20 perc, illetve 4 óra volt. A kezelési koncentrációk a következők voltak: 1 mM  $\text{NiCl}_2$ , 2,4 és 57,6 mM  $\text{CoCl}_2$ , 10 mM  $\text{MgSO}_4$ , 25 és 300  $\mu\text{M}$  antimycin A, 130  $\mu\text{M}$  5-fluorouracil.

A különböző vasformákkal történt kezeléseket FCS mentes tápoldatban végeztük el, a kezelés időtartama 4 óra volt. A vas(II)-szulfát, vas(III)-citrát, vas(III)-klorid, vas(III)-transzferrin kezelési koncentrációja pedig 50  $\mu\text{M}$  volt.

A mintelőkészítésnél 2 különböző protokollt használtunk:

(1) A TXRF mérésekhez használt kvarclapokat sterilizáltuk (96%-os alkohollal), 6 lyukú tenyésztő lemezekbe helyeztük, majd 1 órán át inkubáltuk (a) 10% FCS-t tartalmazó médiummal B) fibronektinnel (Sigma, koncentráció: 50  $\mu\text{g/ml}$ ) c) kollagénnel (IV típusú kollagén, Sigma, koncentráció: 50  $\mu\text{g/ml}$ ). Az inkubálást követően a sejteket közvetlenül a kvarclapokra növesztettük *4.1.1 fejezetben* leírt körülmények között. A kezeléseket követően a kvarclapokat óvatosan lemostuk izotóniás sóoldattal és a lapokat azonnal argonnal töltött tárolóedényekbe helyeztük.

(2) A 6 lyukú tenyésztő lemezben elvégzett kezeléseket követően a sejteket tripszin segítségével felvettük, kétszer mostuk izotóniás sóoldat segítségével, majd lecentrifugáltuk őket (20.000 g, 4 °C, 15 perc). A sejtszámot Bürker kamra (MOM, Magyarország) segítségével állapítottuk meg. A 2. centrifugálást követően a sejteket 10  $\mu\text{l}$  izotóniás sóoldatban szuszpendáltuk, majd ebből 5  $\mu\text{l}$ -t pipettáztunk a kvarclapokra. A becsült sejtkoncentráció a szuszpenzióban:  $10^4$ - $2 \times 10^4$  sejt/ $\mu\text{L}$  volt. Az izotóniás sóoldat feleslegét pipettával távolítottuk el. A sejtekből így kialakult monolayeret mikroszkóppal (Olympus CKX41, Olympus, Tokió, Japán) ellenőriztük és szobahőmérsékleten beszárítottuk. A lapokat argonnal töltött tárolóedényekbe helyeztük, melyeket a HASYLAB laboratóriumába való szállításhoz is használtunk.

Ezt a mintaelőkészítési módszert alkalmaztuk a vas oxidációs állapotának meghatározására különböző növekedési fázisban lévő HT-29 sejtek estében is. Ezen kísérleteknél a sejtek szaporodását a megfelelő növekedési fázisban állítottuk le (lag, log, plateau) tripszinezéssel, a mintaelőkészítés többi lépése megegyezik a 2) pontban leírtakkal.

#### 4.4.4. Az SR-TXRF-XANES (X-ray absorption near edge structure) mérések kivitelezése

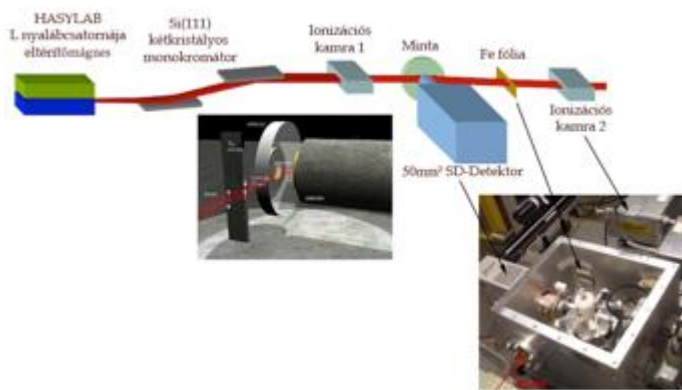
A sejtekben a Fe oxidációs állapotát fluoreszcens módú XANES (X-Ray Absorption Near-Edge Structure - a röntgenabszorpciós spektrumélközeli szerkezete) spektroszkópiával határoztuk meg. Az abszorpciós méréseket a HASYLAB (DESY, Hamburg) L nyalábsatornáján, vákuumban, súrlódó beesési szögél, a vas K abszorpciós élénél végeztük el [193, 194]. Az eltérítómágnes (1,2 Tesla) fehér sugárzásából Si(111) kétkristályos monokromátor állított elő hangolható monokromatikus nyalábot. A nyaláb fókuszálása (100  $\mu\text{m}$  x 2300  $\mu\text{m}$ , vízszintes x függőleges) keresztezett résrendszer segítségével történt. A beeső sugárzás intenzitását egy ionizációs kamrával mértük. A kísérleti elrendezés sematikus rajzát a 7. ábra mutatja be.

A mérés során a gerjesztési energiát különböző lépésközökben változtattuk a vas 7112 eV-nál lévő abszorpciós éle körül (15, 10, 5 és 1 eV az él előtti és utáni szakaszokon, 0,5 eV közvetlenül az él körül). A 6995 eV és 7395 eV közti energiatartományt vizsgáltuk a következő szakaszokban és lépésközökkel (start-stop/lépésköz): 6995-7045/10, 7045-7085/5, 7085-7095/1, 7095-7145/0,5, 7145-7195/1, 7195-7305/5, 7305-7395/10. A fluoreszcens röntgenfotonok detektálása SDD (Silicon Drift Detector, VORTEX 50 mm<sup>2</sup>, Radiant Detector Technologies) detektorral történt [195]. A mintatartó (kvarclap) és az SDD detektor közti távolság 1 mm volt [193]. A spektrumokat 1-15 s –ig vettük fel attól függően, hogy milyen volt a jel/zaj arány. Egy-egy scan 210 különálló fluoreszcens spektrumból állt össze a 7015-7500 eV energiatartományban. A detektor rövid jelformálási idővel működött a nagyobb jelátvitel érdekében, amely beállításnál a tipikus energiafelbontás a Fe K $\alpha$  vonalra 190 eV (félértékszélesség). Minden scannél párhuzamosan egy Fe fólia abszorpciós spektruma is rögzítésre került transzmissziós módban. Az így felvett abszorpciós spektrum első deriváltját tekintettük minden mérés esetében 7112 eV-nak ( vas K abszorpciós élének).

A totálreflexióhoz szükséges kritikus szög kissé (<0,3 mrad) változik a gerjesztési energiától függően. Ezért a mérések során a röntgen sugárnyaláb beesési szögét jóval a kritikus szög alá állítottuk be (4,18 mrad szilícium mintatartó esetében 7500 eV gerjesztési energiánál), tehát a XANES mérések során nem jelentett problémát a

kritikus szög gerjesztési energiafüggő változása. A mérések során kvarc mintatartókat alkalmaztunk, melyek tisztaságát felhasználás előtt ellenőriztük.

Az abszorpciós spektrumokat az IFFEFIT software csomagban lévő ATHENA programmal értékeltük ki [196,197]. A scanek normalizációja és az energiaskála korrekciója is a Fe K abszorpciós éle alapján történt. Az ugyanarról a mintáról készült scanek egyesítésekor az ugyanannál az energiánál mért értékek átlagolását végeztük el.



7. ábra: A XANES meghatározásokhoz használt kísérleti elrendezés a HASYLAB L nyalábsatornáján.

#### 4.4.5. A kvarclapokon kialakult mintafelszín vizsgálata pásztázó elektronmikroszkópiával (scanning electron microscopy, SEM)

A kvarclapokra növesztett sejtek, illetve a felcseppentett sejtszuszpenzióból kialakult minta felszínét pásztázó elektronmikroszkópiával (AMRAY 1830, Amray Inc., Bedford, MA vákuum:  $10^{-4}$  mbar, 20 kV gyorsítófeszültség, 0,1 nA áramerősség) térképeztük fel. A vizsgálat során a kvarclapokon lévő mintára vákuumpárológatóval vékony szénréteget párológtattunk, majd a mintákról 3-4 ponton, többféle nagyítással SEM felvételeket készítettünk.

## 5. Eredmények

### 5.1. Kisrendszámú elemek ( $Z \leq 23$ ) meghatározása TXRF módszerrel

Munkánk során vizsgáltuk a „lowZ TXRF” technika alkalmazhatóságát biológiai minták esetében. Erre a célra egy folyékony (SERONORM humán szérum) és három szilárd biológiai referenciaanyagot (NIST 1577a marhamáj, MURST-ISS-A2 antarktisi rák, IAEA-331 spenót) választottunk és meghatároztuk a Na, Mg, P, S, K, Ca elemekre vonatkozó visszanyerési adatokat a minták különböző módszerekkel végzett feltárását követően. A referenciaanyagokat eltérő szerves és szervetlen anyagtartalmuk alapján választottuk ki. A referenciaanyagok Na, Mg, P, S, K, Ca koncentrációi alapján számolt szerves és szervetlen anyag tartalma: 2,4%, 2,5%, 6,3%, 8,1%. Az eltérő mennyiségű szerves és szervetlen alkotókat tartalmazó referenciaanyagokat feltárás nélkül, valamint kistérfogatú, klasszikus és gőzfázisú, kvarclapon végzett feltárás után is analizáltuk „lowZ TXRF” spektrométerrel. Vizsgáltuk a különböző feltárási módszerek hatását a visszanyerés mértékére.

#### 5.1.1. Kalibrációs faktorok meghatározása

A kisrendszámú elemek TXRF meghatározása esetében a legnagyobb probléma a minta önabszorpciója és ennek hatása a meghatározni kívánt elemek dinamikus tartományára. Ezért az első kísérletben a Ti-ra vonatkoztatott kalibrációs faktorok változását vizsgáltuk a Na, Mg, P, S, K, Ca esetében különböző koncentrációtartományokban. Az általunk mért kalibrációs faktor-értékek és az irodalmi adatokkal [198] történő összehasonlításuk a 3. táblázatban található. A kalibrációs faktorokat az adott elem Ti belső standardra vonatkoztatott relatív érzékenysége alapján számítottuk ki.

3. táblázat: Az irodalomban [198] közölt és az általunk különböző koncentrációtartományokban meghatározott, Ti-ra vonatkoztatott kalibrációs faktorok. A \*-gal jelölt értékeket nem használtuk a későbbiekben a referenciaanyagok alkotóinak mennyiségi meghatározásánál, mivel ezen kalibrációs faktorok a koncentráció növekedésével drasztikusan csökkennek.

	Na	Mg	P	S	K	Ca
[198]	0,0059	0,0120	0,130	0,170	0,430	0,460
1000 mg/L	0,0030 ± 0,0010*	0,0067 ± 0,0013*	0,025 ± 0,010*	0,050 ± 0,010*	0,270 ± 0,019	0,422 ± 0,052
100 mg/L	0,0036 ± 0,0006*	0,0150 ± 0,0030*	0,072 ± 0,029*	0,110 ± 0,022*	0,350 ± 0,025	0,493 ± 0,038
10 mg/L	0,0126 ± 0,0016	0,0250 ± 0,0012	0,130 ± 0,008	0,200 ± 0,008	0,450 ± 0,050	0,619 ± 0,055
1 mg/L	0,0162 ± 0,0069	0,0260 ± 0,0062	0,130 ± 0,042	0,200 ± 0,022	0,470 ± 0,031	0,637 ± 0,067

A K és a Ca esetében a kalibrációs faktorok nem változnak jelentősen a vizsgált koncentrációtartományban. Ez a jelenség a nagyobb energiájú (> 3keV) fluoreszcens fotonok csökkent mértékű elnyelésére vezethető vissza (K K $\alpha$ : 3,313 keV, Ca K $\alpha$ : 3,691 keV) [82]. A Na, Mg, P, S esetén minél kisebb az elem rendszáma, annál kisebb az a koncentrációérték, ahol az önabszorpció már jelentősen befolyásolja a kalibrációs faktor értékét. Az irodalmi adatoktól [198] való eltérés pedig a detektorablak eltérő átteresztőképességével magyarázható. Ezért a más TXRF spektrométeren kimért kalibrációs faktorok csak akkor alkalmazhatóak, ha a detektor típusa és a detektorablak is teljesen azonos. (Ez az állítás igaz minden TXRF berendezésre, de főképpen a kisrendszámú elemek mérésére készített készülékeknél, ahol a mért kalibrációs faktorok különbsége jelentős).

A későbbiekben munkánk során a referenciaanyagok elemtartalmának meghatározásához mindig a mintában található elemek koncentráció-nagyságrendjének megfelelő kalibrációs faktorokat alkalmaztuk.

### 5.1.2. Kimutatási és meghatározási határ

A meghatározott kimutatási és meghatározási határértékek (LOD=limit of detection, LOQ= limit of quantification) a 4. táblázatban láthatóak, mind a vizsgált elem abszolút

tömegében, mind koncentrációban (5 µL mintában) kifejezve. Az elvárásoknak megfelelően a rendszám (Z) növekedtével jelentősen csökken a LOD és az LOQ értéke. A Na kimutatási határa nagyságrendileg megegyezik a F-ra ezen a műszeren közölt 5 mg/L –es kimutatási határértékkel [199].

4. táblázat: Híg salétromsavas mátrixban meghatározott kimutatási és meghatározási határértékek (LOD=limit of detection, LOQ= limit of quantification).

Elem	Na	Mg	P	S	K	Ca	Ti
LOD (ng)	9,8	6,5	3,1	1,9	0,63	0,52	0,36
LOD (mg/L) 5 µl-ben	2,0	1,3	0,61	0,38	0,13	0,10	0,072
LOQ (mg/L) 5 µl-ben	6,5	4,3	2,0	1,3	0,42	0,35	0,24

### 5.1.3. A SERONORM referenciaanyaggal végzett kísérletek és eredményeik

A 5. táblázat foglalja össze a SERONORM szérumszám referenciaanyagban található, általunk vizsgált elemek hiteles értékeit és az elfogadható koncentráció-tartományt.

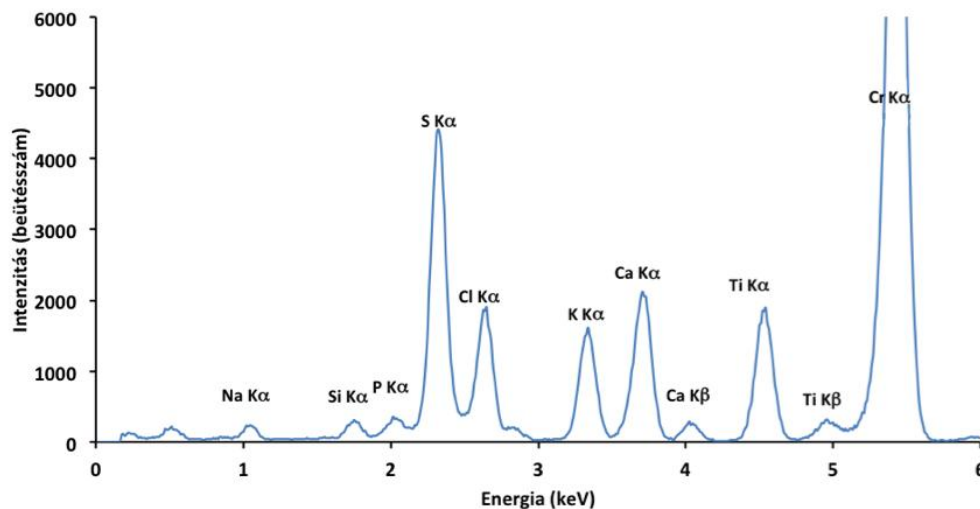
5. táblázat: a SERONORM szérumszám referenciaanyagban található, általunk vizsgált elemek hitelesített és elfogadható koncentrációi µg/g –ban kifejezve.

Elem	Na	Mg	P	S	K	Ca
Hitelesített koncentráció	3062-3450	18-22	81-89	970-1214	142-168	98-112
Elfogadható tartomány	2868-3644	16-24	77-93	848-1336	129-181	91-119

A szérumszám közvetlen (feltárás nélküli) analízisének eredményei rávilágítottak, hogy legnagyobb mértékben, az általunk vizsgált legkisebb rendszámú Na és a Mg meghatározását nehezíti az önabszorpció jelensége. A Mg, a kisebb koncentrációja miatt is egyáltalán nem volt detektálható, a Na visszanyerése pedig 12% volt (6. táblázat). Ez magyarázható azzal, hogy a jelentős szárazanyagtartalommal rendelkező szérumszám mintából a szárítást követően egy szemmel láthatóan vastag mintaréteg alakult ki a kvarclapokon, amely felelős az önabszorpcióért. Viszont a visszanyerési adatokból látható az is, hogy a rendszám növekedésével az önabszorpció már egyre kevésbé jelentős: a P, S, K, Ca esetében a visszanyerés 61-87 % volt (6. táblázat). A feltárás nélkül analizált szérumszám minták „lowZ TXRF” spektrumát mutatja a 8. ábra.

6. táblázat: A SERONORM minta közvetlen analizésének eredményei. A standard deviáció értékeket három független mérés adatai alapján számítottuk ki.

Elem	Na	Mg	P	S	K	Ca
<b>Mért koncentráció (µg/g)</b>	400 ± 460	Nem detektálható	58 ± 10	670 ± 180	135 ± 22	91 ± 8
<b>Visszanyerés (%)</b>	12	-	68	61	87	87



8. ábra: A feltárás nélkül analizált szérumminta „lowZ TXRF” spektruma.

A szérum vizsgálatát értékelve elmondható, hogy a közvetlen, feltárás nélküli meghatározás csak a  $Z \geq 15$  (P-tól kezdve) elemek esetében ajánlható, megbízható eredményeket pedig csak a  $Z \geq 19$  (K-tól) nyerhetünk vele. A  $Z < 15$  rendszámú elemek kvantitatív meghatározásához a közvetlen, feltárás nélküli módszer nem ajánlott ilyen típusú biológiai minták esetében. Mivel az emberi szérum mátrixa nagyjából állandó összetételű, így a S és P meghatározása megoldható a jellemző mátrixra készített kalibrációs faktorok használatával. A nagy szárazanyag tartalmú minták esetében a kiindulási minta hígítása javasolható.

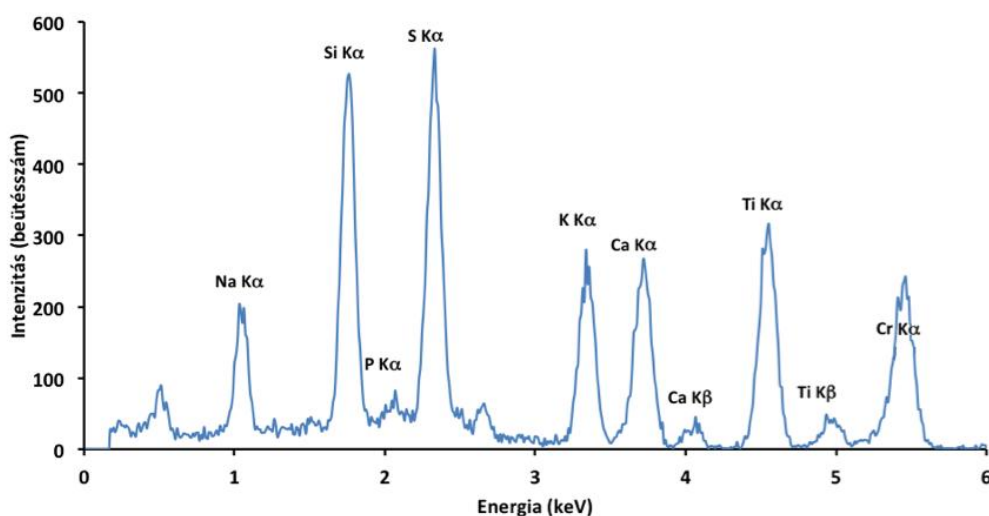
A „klasszikus” feltárási módszer alkalmazásánál a szerves mátrix sikeres eltávolításának köszönhetően a Mg detektálhatóvá vált, de a jelintenzitás még mindig nagyon alacsony volt, hasonlóan a foszforhoz. Mindkét elem (Mg, P) esetében a visszanyerések kívül estek az elfogadható tartományon (7. táblázat). (A Mg nagyon kis mennyiségben van jelen a mintában, a tapasztalt 305%-os visszanyerés esetében a

szennyezés sem kizárható.) Ugyanakkor az RSD értékek (relatív standard deviáció, RSD%) 50% körül változtak, ami egyértelműen a nagy mintahígítás (250x) rovására írható. A szerves mátrix eltávolítása és a minta hígítása viszont nagymértékben elősegítette a Na meghatározását 96%-os visszanyerést eredményezve (a feltáratlan szérumminta esetében ez az érték 12% volt). A S, K, Ca esetében 82-97%-os visszanyerési értékeket sikerült elérni ezzel a módszerrel. A „klasszikus” feltárási módszerrel kapcsolatban tehát megállapítható, hogy alkalmas az ilyen típusú minták (nagy szerves és szervetlen anyagtartalom) előkészítésére kisrendszámú elemek TXRF analíziséhez, de a kimutatási határok nőnek a nagyfokú hígítás következtében.

A “klasszikus” módszerrel feltárt szérumminta „lowZ TXRF” spektrumát mutatja a 9. ábra.

7. táblázat: A “klasszikus” módszerrel, normál térfogatú feltárásedényzetben, mikrohullámú készülékben feltárt SERONORM mintákban mért elemkoncentrációk. A standard deviáció értékeket három független mérés adatai alapján számítottuk ki.

Elem	Na	Mg	P	S	K	Ca
Mért koncentráció (µg/g)	3120 ± 370	61 ± 28	29 ± 16	900 ± 100	134 ± 14	102 ± 14
Visszanyerés (%)	96	305	35	82	86	97



9. ábra: A “klasszikus” módszerrel feltárt szérumminta „lowZ TXRF” spektruma.



A kistérfogatú feltárástól azt vártuk, hogy megoldja azt a problémát, mely a “klasszikus” módszer esetében lépett fel: nagy kimutatási határok a nagyfokú hígítás következtében. A kistérfogatú feltárást követő analízis eredményei láthatóak a 8. táblázatban. A Na, Mg, P, S esetében mért visszanyerések továbbra is elfogadhatatlanok voltak, míg a K és Ca esetében ezek az értékek az elfogadható tartományba estek. A hígítási fok ennél a módszernél 5x volt, ami jelentős önabszorpciós hatást eredményezett a kisrendszámú elemek esetében. A K és Ca kivételével a többi elem esetében elég szerény eredményeket kaptunk, ami a jelentős önabszorpción kívül a minta magas szerves anyagtartalmával is magyarázható. Ez a mintaelőkészítési módszer sem ajánlott magas szerves és szerves anyagtartalommal rendelkező minták esetében.

8. táblázat: A SERONORM minták kistérfogatú feltárást követő analízisének eredményei. A becsült tapasztalati szórás (standard deviáció, SD) értékeket három független mérésből számítottuk ki.

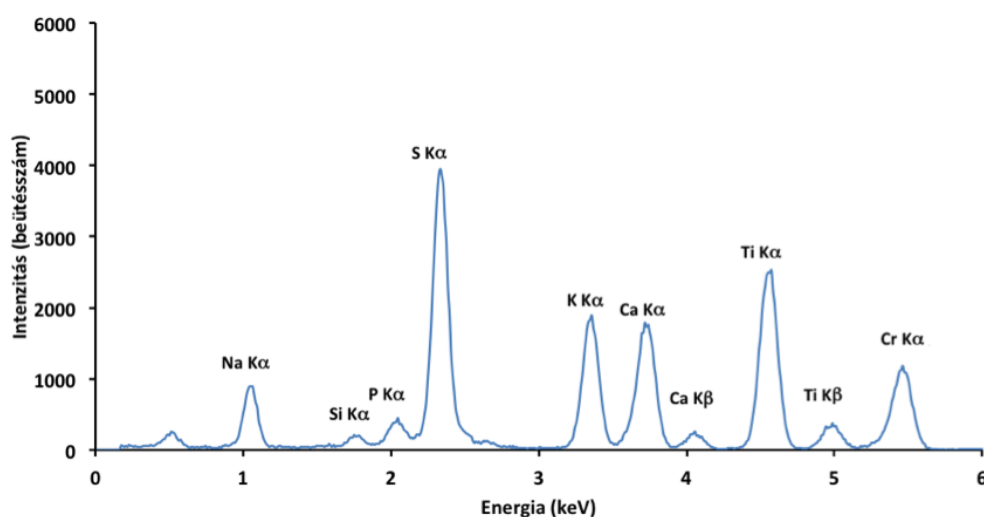
<b>Elem</b>	<b>Na</b>	<b>Mg</b>	<b>P</b>	<b>S</b>	<b>K</b>	<b>Ca</b>
<b>Mért koncentráció (µg/g)</b>	1190 ± 250	30 ± 7	51 ± 11	740 ± 180	156 ± 40	110 ± 25
<b>Visszanyerés (%)</b>	37	150	60	68	101	105

A kvarclapra cseppentett minta közvetlen gőzfázisú feltárása járna a minta legkisebb hígításával, illetve itt lenne a legkisebb a szennyeződés veszélye is, de az ily módon feltárt minták esetében az analitikai eredmények elfogadhatatlanok (9. táblázat). Az igen szerény visszanyerési adatok egyrészt a minta lemosódásával (kondenzált savgőzök), másrészt a megmaradó szerves anyagtartalommal magyarázhatóak. A két különböző feltárási hőmérsékletet összehasonlítva a hőmérséklet növekedésével együtt nő a mintaveszteség; magasabb hőmérsékleten jelentősebb a savkondenzálás és az ezt követő mintalemosódás. Mindemellett a relatív standard deviáció (RSD%) az alacsonyabb hőmérsékleten feltárt mintáknál nagyobb, ami arra utal, hogy ezen a hőmérsékleten nem sikerült a szerves mátrixot sem teljes egészében eltávolítani. Ezt a mintaelőkészítési módszert egyáltalán nem ajánljuk a továbbiakban alkalmazásra semmilyen mintatípus esetében. (Az irodalomban [87] a lapon feltárási módszerének

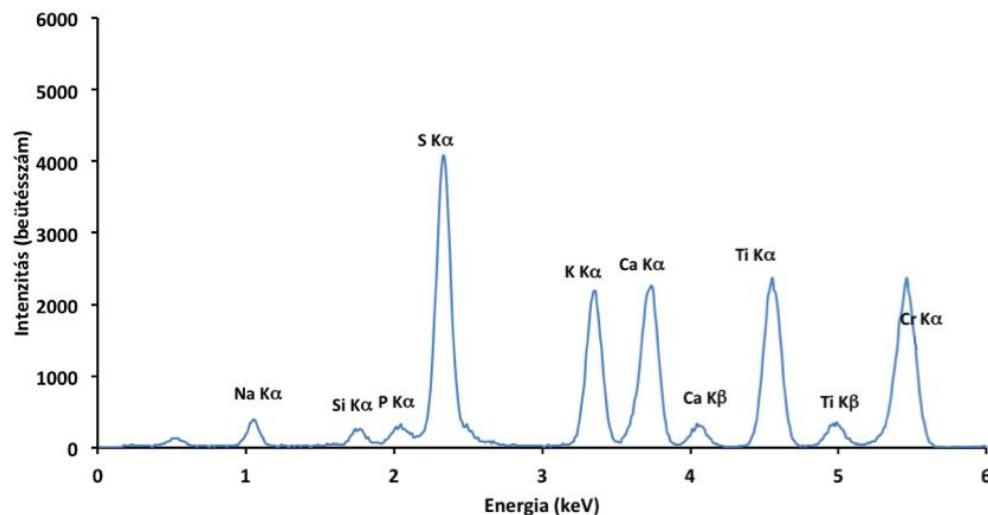
sikeres alkalmazását említik, ami azért lehetséges, mert alacsonyabb nyomást és hőmérsékletet alkalmaztak, mely paraméterek mellett a minta lemosódása nem lépett fel, illetve nem kisrendszámú elemek méréséről volt szó.) A kvarclapra cseppentett SERONORM minta közvetlen gőzfázisú feltárását (160 °C és 200 °C) követően felvett „lowZ TXRF” spektrumokat mutatja a 10. ábra és a 11. ábra.

9. táblázat: A kvarclapra cseppentett SERONORM minta közvetlen gőzfázisú feltárását követő analízis eredményei. A feltárásokat két hőmérsékleten végeztük el: (160 °C és 200 °C). A standard deviáció értékeket három független mérés adatai alapján számítottuk ki.

Elem	Feltárási hőmérséklet	Na	Mg	P	S	K	Ca
Mért koncentráció (µg/g)	160 °C	950 ± 790	0,3 ± 0,2	77 ± 40	640 ± 520	190 ± 150	95 ± 75
Visszanyerés (%)		29	1	90	58	123	90
Mért koncentráció (µg/g)	200 °C	570 ± 100	0,3 ± 0,1	64 ± 12	620 ± 130	142 ± 19	80 ± 16
Visszanyerés (%)		18	2	75	57	92	77



10. ábra: A kvarclapra cseppentett SERONORM minta közvetlen gőzfázisú feltárását követően felvett „lowZ TXRF” spektruma. A folyadékfázis hőmérséklete 160 °C.



11. ábra: A kvarclapra cseppentett SERONORM minta közvetlen gőzfázisú feltárását követően felvett „lowZ TXRF” spektruma. A folyadékfázis hőmérséklete 200 °C.

#### 5.1.4. MURST-ISS-A2 antarktisi rák referenciaanyag

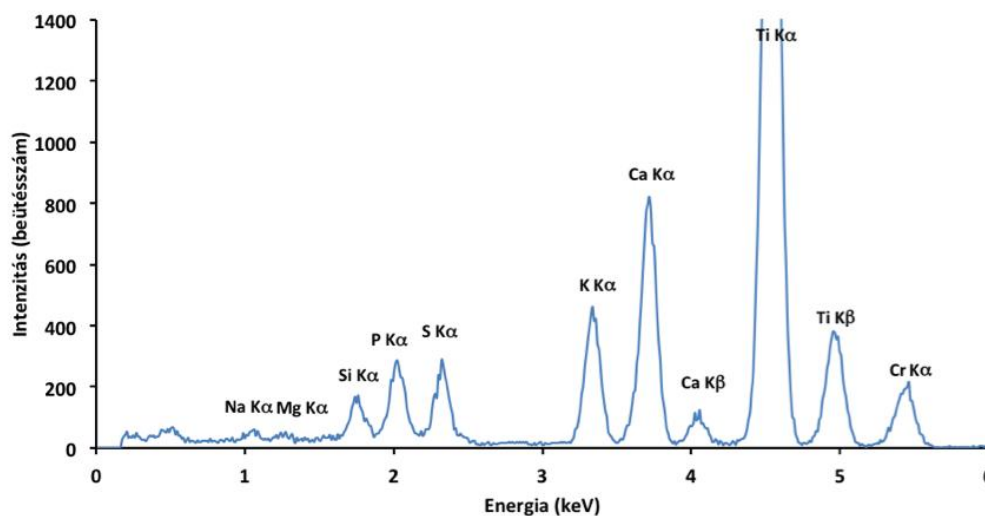
A 10. táblázatban láthatóak a MURST-ISS-A2 referenciaanyag hitelesített és az általunk mért koncentrációi (feltárás: 1. „Klasszikus” módszer). Az analitikai tanúsítványban a P-ra és S-re nincsen referenciaérték, a Mg esetében pedig csak egy elég széles informatív/tájékoztató koncentráció-intervallumot találunk. A Mg-ra vonatkozó, általunk mért koncentrációérték az informatív tartomány közepén található. A másik három elem esetében a visszanyerés értékek 70 és 119% körül alakultak. Három független mérés alapján számított reprodukálhatóság 2 és 13% között alakult, mely értékek elfogadhatóak.

A MURST-ISS-A2 antarktisi rák referenciaanyag „klasszikus” feltárást követő „lowZ TXRF” spektrumát a 12. ábra mutatja be.

10. táblázat: MURST-ISS-A2 antarktiszi rák referenciaanyagban hitelesített elemtartalmak és az általunk a „klasszikus” feltárás után mért koncentrációk és visszanyerések. A becült tapasztalati szórás (standard deviáció, SD) értékeket három független mérésből számítottuk ki.

\*informatív tartomány

Elem	Na	Mg	P	S	K	Ca
<b>Hitelesített koncentráció (µg/g)</b>	29400 ± 200	3200-5100*	Nincs adat	Nincs adat	14800 ± 300	14500 ± 400
<b>Mért koncentráció (µg/g)</b>	34900 ± 3400	4050 ± 300	13100 ± 200	10400 ± 400	10300 ± 1100	14400 ± 1800
<b>Visszanyerés (%)</b>	119	Informatív tartományon belül	-	-	70	99



12. ábra: A MURST-ISS-A2 antarktiszi rák referenciaanyag „lowZ TXRF” spektruma „klasszikus” feltárást követően.

### 5.1.5. NIST 1577a marhamáj referenciaanyag

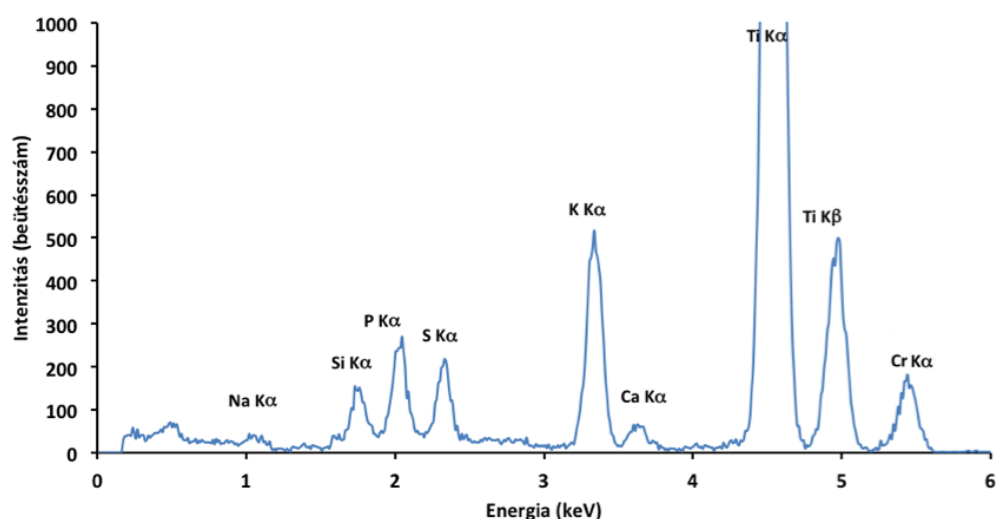
A 11. táblázatban láthatóak a NIST 1577a marhamáj referenciaanyagban hitelesített elemtartalmak és az általunk mért koncentrációk (feltárás: 1. „Klasszikus” módszer). A Mg a minta nagyfokú hígítása miatt nem volt mérhető. A Ca esetében pedig a mintára

vonatkoztatott meghatározási határ (200  $\mu\text{g/g}$ ) alatt volt a Ca értéke a mintában. A többi elem esetében a visszanyerések 98-110% között alakultak, a relatív standard deviáció pedig kisebb volt, mint 9%. Általánosságban a NIST 1577a referenciaanyag esetében elmondható, hogy a „klasszikus” feltárást követő analitikai meghatározás eredményei kielégítőek, az egyetlen korlátja a módszernek – hasonlóan a SERONORM minta esetében tapasztaltakhoz – a minta nagyfokú hígítása.

A 13. ábra a „klasszikus” módszerrel feltárt NIST 1577a referenciaanyag „lowZ” spektrumát szemlélteti.

11. táblázat: A NIST 1577a marhamáj referenciaanyag hitelesített és az általunk a „klasszikus” feltárást után mért koncentrációi és a visszanyerések. A becsült tapasztalati szórás (standard deviáció, SD) értékeket három független mérésből számítottuk ki.

Elem	Na	Mg	P	S	K	Ca
<b>Hitelesített koncentráció (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>	2430 $\pm$ 100	600 $\pm$ 15	11100 $\pm$ 400	7800 $\pm$ 100	9960 $\pm$ 70	120 $\pm$ 7
<b>Mért koncentráció (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>	2410 $\pm$ 90	Nem detektálható	12100 $\pm$ 300	7680 $\pm$ 360	9700 $\pm$ 800	<200
<b>Visszanyerés (%)</b>	98	-	110	98	97	-



13. ábra: A NIST 1577a marhamáj referenciaanyag „klasszikus” feltárást követően felvett „lowZ TXRF” spektruma.

### 5.1.6. IAEA-331 spenót referenciaanyag

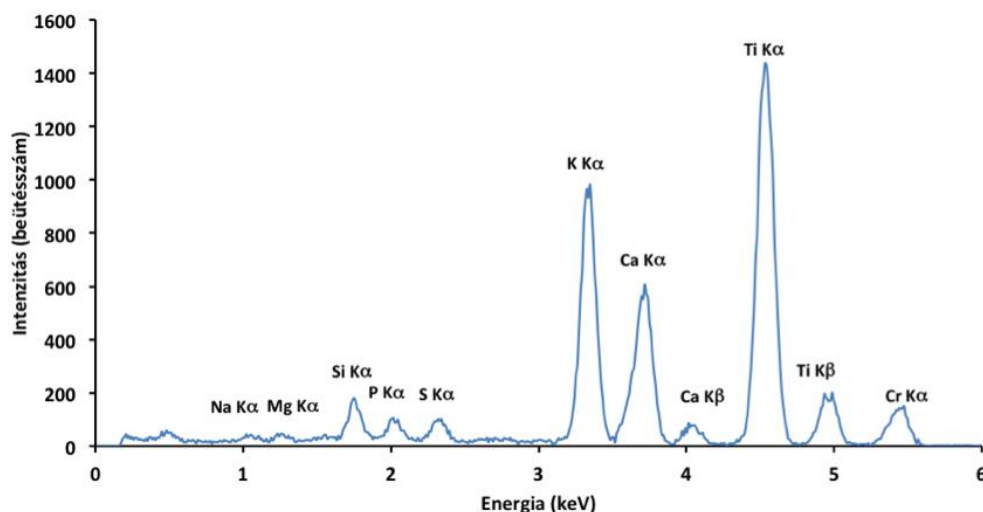
A 12. táblázat tünteti fel az IAEA-331 spenót referenciaanyag hitelesített és az általunk mért koncentrációértékeit (feltárás: 1. „Klasszikus” módszer). A visszanyerési adatok a vizsgált elemekre 75 és 123% között alakultak. A relatív standard deviáció 4 és 19% között változott. A nagyfokú hígítás ellenére mind a hat elem detektálható volt, de a visszanyerés a Mg és Ca esetében még javítandó.

A 14. ábra a „klasszikus” módszerrel feltárt IAEA-331 spenót referenciaanyag „lowZ TXRF” spektrumát mutatja be.

12. táblázat: Az IAEA-331 spenót referenciaanyag hitelesített és az általunk a „klasszikus” feltárás után mért koncentrációi és a visszanyerések. A becsült tapasztalati szórás (standard deviáció, SD) értékeket három független mérésből számítottuk ki.

\* informatív érték

Elem	Na	Mg	P	S	K	Ca
Hitelesített koncentráció (µg/g)	18200 ± 400	8900*	5180 ± 110	4600*	29000 ± 500	15300 ± 400
Mért koncentráció (µg/g)	21100 ± 4000	6700 ± 600	5520 ± 230	4790 ± 300	35800 ± 4600	13300 ± 1900
Visszanyerés (%)	116	75	107	104	123	87



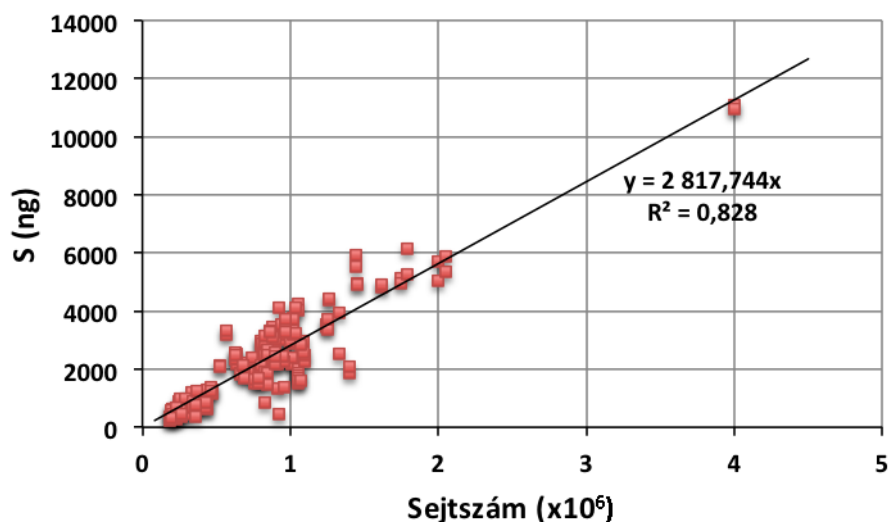
14. ábra: A IAEA-331 spenót referenciaanyag „lowZ TXRF” spektruma „klasszikus” feltárást követően.

## 5.1.7. Rákos sejtek S tartalmának meghatározása „lowZ TXRF” spektrométerrel

### 5.1.7.1. Sejtszám és a fehérjetartalom közötti összefüggés

A HT-29 sejt minták esetében végeztünk több „lowZ TXRF” elemzést is. Ezekhez a meghatározásokhoz a 4.3.3 fejezetben leírtak szerint készített mintákat használtuk fel, Ti belső standarddal való megcseppentés után.

Mivel a sejtek mosásához használt PBS mosóoldat tartalmaz: Na, P, K, Cl kisrendszámú elemeket, így gyakorlatilag csak a Ca és S kiértékelésének volt értelme. A Ca tartalom a sejtekben nagyon nagy változékonyságot mutatott (40-390 ng/10<sup>6</sup> sejt), míg a S esetében összefüggést találtunk a sejtszám és a sejtek S tartalma között (15. ábra). A mért S tartalmak jó egyezést mutattak az ATOMIKA 8030C műszerrel mértekkel. A kiszámított S-sejtszám összefüggést a későbbiekben a sejtszám visszaellenőrzésére is felhasználtuk.



15. ábra: HT-29 sejtek S tartalma és a sejtszám közötti összefüggés. (n=185, meghatározás: ATI WOBISTRAX „lowZ TXRF” spektrométerrel).

A szérumban referenciagyógyszer esetében elmondható, hogy a K és Ca közvetlen analízissel is (feltárás nélkül) meghatározható. A kisebb rendszámú elemeknél az önabszorpció megakadályozza a pontos kvantitatív analízist, ezért a P és S meghatározásánál a mátrixnak megfelelő kalibrációs faktorok használata javasolható.

A „klasszikus” feltárás nagyon hatékony módszer a jelentős szárazanyag tartalommal bíró biológiai minták esetében akkor, ha a hígítás után kapott oldatban a meghatározandó komponensek koncentrációja meghaladja a meghatározási határt. A

növényi referenciaanyag, illetve az antarktisi rákminta eredményei jelentősen elmaradnak a humán és állati referenciaanyagok visszanyerés-értékeitől, ennek valószínű oka a két előbb említett minta nagy szervesanyag-tartalma.

A kistérfogatú feltárás esetében a minta szerves anyag tartalma nem távolítható el kielégítően, a szerves mátrix hígítása túl kisfokú, így nagyobb lesz a háttér és a fluoreszcens sugárzás önabszorpciója is, ami rontja az analitikai teljesítményt.

A gőzfázisú feltárás esetében a szerves komponensek hígítatlan jelenléte és a minta részleges lemosódása a kvarclapról (a kondenzált savcseppek miatt) egyáltalán nem teszi lehetővé a kvantitatív meghatározást.

A fentiek figyelembevételére alapján kijelenthető, hogy biológiai mintákban lévő kisrendszámú elemek meghatározásához elsődlegesen a klasszikus feltárási módszer ajánlható.

## **5.2. Fe, Cu, Zn meghatározása TXRF és GF-AAS módszerrel HT-29 sejtekben**

### **5.2.1. Módszerfejlesztés Fe, Cu, Zn meghatározására TXRF technika esetében**

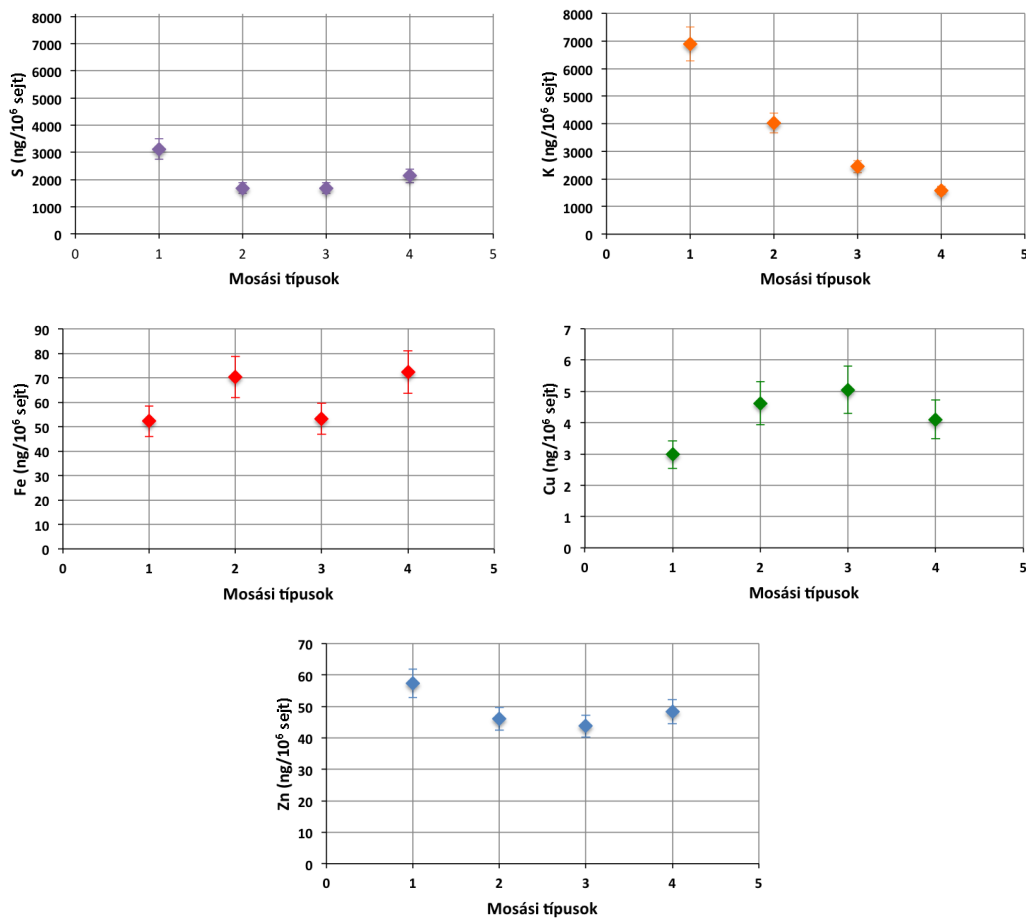
Gonzalez és munkatársai [200, 201, 202, 203] a 90-es évek végén több munkájukban is bemutatták, hogy a TXRF módszer alkalmas (humán) sejtek intracelluláris elemkoncentrációinak meghatározására. A minta előkészítés során savas feltárást alkalmaztak 48 órán át szobahőmérsékleten. Méréseik során úgy találták, hogy legalább  $1-2 \times 10^6$  sejt szükséges ahhoz, hogy megbízható analitikai eredmények szülessenek a teljes sejtanalíziskor; míg a citoszol/pellet frakciókban való elemeloszlás vizsgálatához  $4-6 \times 10^6$  sejtől indultak ki. Munkánk során így  $1 \times 10^6$  sejtől indultunk ki, mely sejtszám minimálisan szükséges ahhoz, hogy megbízható analitikai eredményeket kapjunk. A módszerfejlesztés során nem a kiindulási sejtmennyiség csökkentése, hanem a keresztszennyeződés és a vak értékek csökkentése volt a célunk. Ennek elérésére Suprapur reagenseket és ionmentes vizet használtunk a feltárás és a belső standard oldat készítése során, valamint törekedtünk a minta és a levegő közötti kontaktus minimalizálására. A korábbiakban említett követelmények teljesítésére a minta előkészítés minden lépése ugyanabban az Eppendorf csőben történt: sejtek centrifugálása, PBS-sel való mosása, mikrofeltárása (tömény salétromsav és hidrogén-



peroxid elegyével, ami már tartalmazta a TXRF mérésekhez szükséges belső standardot is).

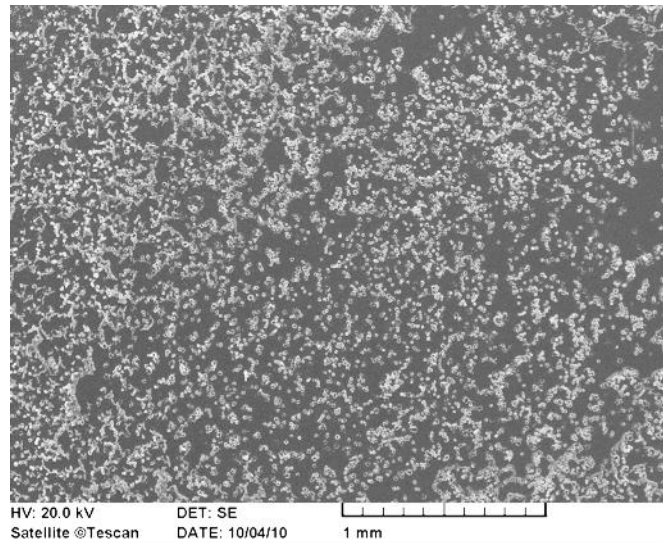
A sejtek felszedéséhez legelterjedtebben tripszin-EDTA-t használnak a biológusok. Mivel az EDTA komplexet tud képezni a vassal, a rézzel és a cinkkel is, így előkísérleteinkben vizsgáltuk a tripszin-EDTA hatását a sejtek Fe, Cu, Zn tartalmára. A kísérleteket elvégeztük tripszinnel is. A sejtek Fe, Cu, Zn tartalmában nem volt különbség a sejtfelszedési módtól függően, így végül a tripszin-EDTA mellett döntöttünk, mellyel gyorsabban, könnyebben és minimális sejtvesztéssel lehetett a sejtek letapadását megszüntetni.

A tripszin hatásának leállítását kétféleképpen is elvégeztük: 1. FCS-es tápoldattal, 2. PBS-sel való hígítással, továbbá igyekeztünk meghatározni a sejtek mosásának optimális számát is. Ezen kísérleteknél az volt a kérdés, hogy okoz-e eltérést a kétféle tripszin működését leállító módszer, illetve a mosások száma a sejtek Fe, Cu, Zn tartalmában? Ezen kísérletek eredményeit a *16. ábra* mutatja. Az ábrán a vízszintes tengely számai különböző protokollokat jelölnek: 1.: tripszinezés FCS-es tápoldattal leállítva, mosás: nincs; 2.: tripszinezés FCS-es tápoldattal leállítva, mosás 2ml PBS-sel; 3. tripszinezés PBS-sel leállítva, mosás 2 ml PBS-sel; 4. tripszinezés PBS-sel leállítva, mosás 2x2 ml PBS-sel. Munkánk további részében a 4. módszert alkalmaztuk. (A mosási idő minden módszernél 15 perc volt.)

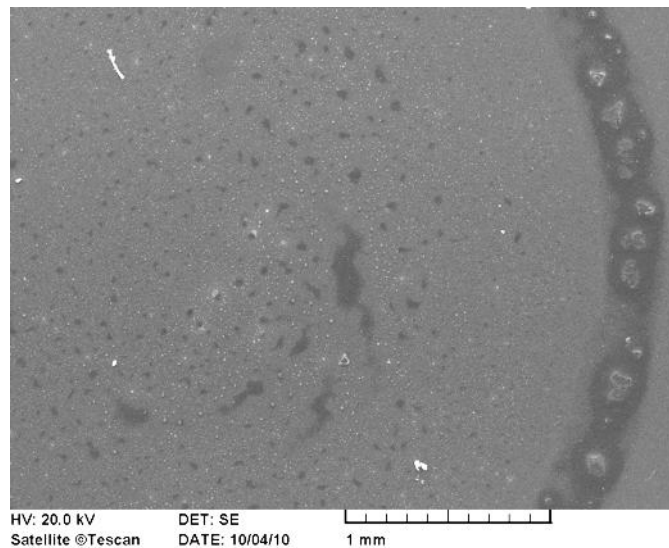


16. ábra: Különböző tripszínhatást felfüggesztő és mosási módszerek hatása a HT-29 sejtek elemtartalmára. (a vízszintes tengelyen a számok jelentései: 1.: tripszinezés FCS-es tápoldattal leállítva, mosás: nincs; 2.: tripszinezés FCS-es tápoldattal leállítva, mosás 2ml PBS-sel; 3. tripszinezés PBS-sel leállítva, mosás 2 ml PBS-sel; 4. tripszinezés PBS-sel leállítva, mosás 2x2 ml PBS-sel. A mosási idő minden esetben 15 perc volt. Munkánk további részében a 4. módszert alkalmaztuk.)

A mintaelőkészítés hatékonyságának ellenőrzésére SEM felvételeket készítettünk a feltáratlan (17. ábra) és a kidolgozott módszerrel feltárt és kvarcra feleseppentett mintákról (18. ábra). A SEM felvételek alapján megállapítható, hogy a 24 órás szobahőmérsékleten végzett feltárás elegendő volt a sejtstruktúra szétroncsolásához. A 18. ábra jól mutatja, hogy már nem kivehetőek a sejtek külön-külön, de látszik az is, hogy maradtak feltáratlan szerves anyagok (sötét foltok) és szervesetlen sók (fehér kristályok) is a mintában.



17. ábra: Feltáratlan HT-29 sejtek SEM felvétele. (AMRAY 1830, Amray Inc., Bedford, MA vakuum:  $10^{-4}$  mbar, 20 kV gyorsítófeszültség, 0,1 nA áramerősség).



18. ábra: A kidolgozott módszerrel feltárt HT-29 sejtek SEM felvétele. (AMRAY 1830, Amray Inc., Bedford, MA vakuum:  $10^{-4}$  mbar, 20 kV gyorsítófeszültség, 0,1 nA áramerősség).

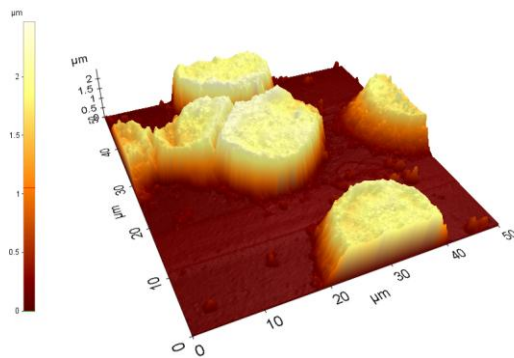
A TXRF méréseknél fontos a kvarclapon szárítást követően kialakult mintaréteg vastagsága, ami szerves mátrix esetében sem lehet több mint  $5\ \mu\text{m}$ , amennyiben a kvantifikálásra belső standardizációt alkalmazunk [204]. Ennek ellenőrzésére AFM mikroszkópiával mértük meg a feltáratlan és a bemutatott módszerrel feltárt minták kvarclapon kialakult rétegvastagságát (13. táblázat). A táblázat jól mutatja, hogy a feltáratlan minta rétegvastagsága éppen csak alatta van az  $5\ \mu\text{m}$ -es határnak, míg a feltárt minta esetében a rétegvastagság a tizedére csökken. A 3D AFM felvételeken jól

látszik a különbség a feltárt és feltáratlan minta között: 19. ábra a) részén jól kivehetőek a különálló sejtek, míg a b) esetben a feltárt mintában sejteket már nem lehet felfedezni, de azért láthatóak felületi egyenetlenségek, mivel nem teljes feltárásról van szó.

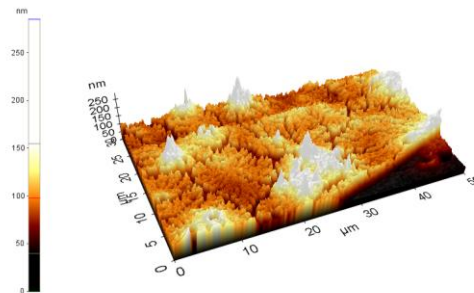
13. táblázat: Az AFM mikroszkópiával meghatározott rétegvastagságok a különböző mintaelőkészítésekénél.

Mintaelőkészítés típusa	Rétegvastagság (nm)
Ránövesztett	1849 ± 430
Cseppentett	4629 ± 145
Feltárt (saját módszer)	468 ± 288

a)



b)



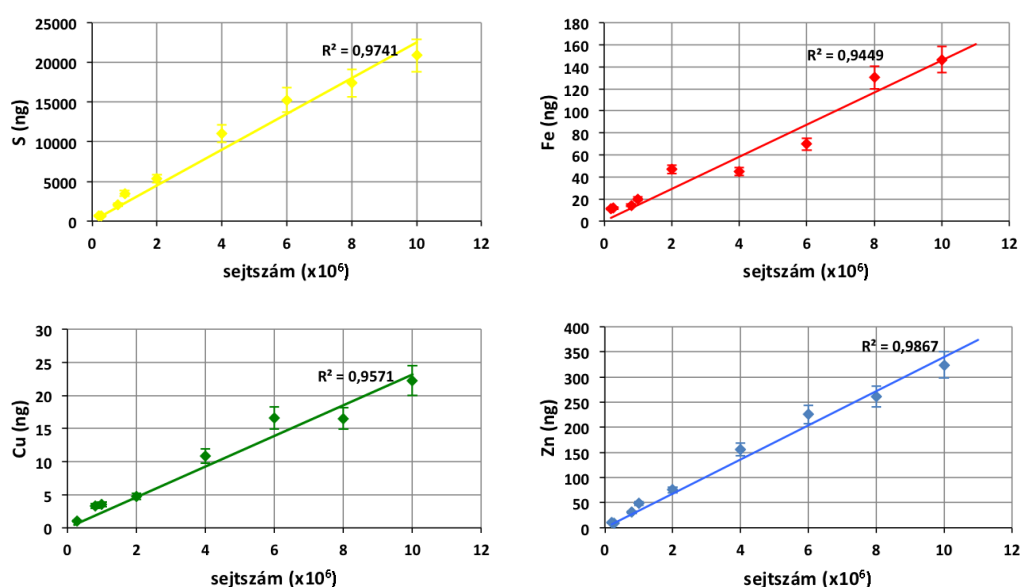
19. ábra: AFM mikroszkópiás 3D felvételek a kvarclapon kialakult rétegekről. Az a) ábrán a kvarclapra ránövesztett sejtek, a b) ábrán az általunk kidolgozott módszerrel feltárt minta AFM felvétele látható.

A kidolgozott módszer feltárási hatékonysága elegendő volt a sejtek Fe, Cu, Zn tartalmának megbízható meghatározására. Ezt három különböző kísérlettel igazoltuk: homogenitás-, linearitás- és visszanyerésvizsgálatokkal. A 14. táblázatban a kvarclapok négyszeri elforgatásával nyert relatív standard deviációk (RSD%) láthatóak, ezzel igazolást nyert a réteg homogenitása.

14. táblázat: A TXRF meghatározások ismételtetősége. A táblázatban a kvarclapok négyszeri elforgatásával ( $4 \times 90^\circ$ ) nyert relatív standard deviációk (RSD%) láthatóak 10 minta esetében ( $n = 10$ ).

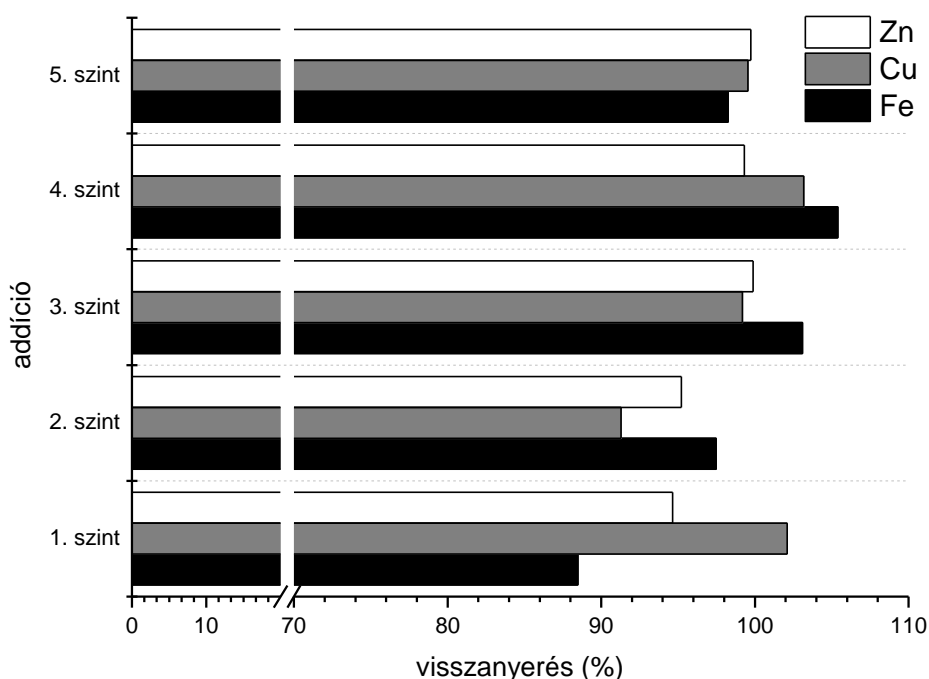
Minta száma	RSD (%) Cu	RSD (%) Fe	RSD (%) Zn
1	5,6	1,5	1,0
2	5,1	3,9	1,3
3	4,1	2,4	1,6
4	6,9	4,8	1,4
5	2,4	2,2	0,9
6	3,3	2,0	1,0
7	3,2	2,9	1,3
8	2,4	2,2	0,8
9	5,4	3,7	1,5
10	4,2	3,1	1,8
<b>Átlag</b>	<b>4,3</b>	<b>2,9</b>	<b>1,3</b>

A módszer alkalmazhatóságának ellenőrzésére linearitás-vizsgálatot is végeztünk.  $0,2-10 \times 10^6$  HT-29 sejtet tártunk fel a bemutatott módszerrel. Meghatároztuk a minták Fe, Cu, Zn és S tartalmát. Mind a 4 elemnél megfelelőnek találtuk az illesztési paramétereket (20. ábra). Ezen adatok alapján kijelenthető, hogy a módszer alkalmas  $0,2-10 \times 10^6$  sejt előkészítésére és a sejtek Fe, Cu, Zn és S tartalma TXRF módszerrel meghatározható ebben a sejtszám-tartományban.



20. ábra: Linearitás-vizsgálat. Különböző számú HT-29 sejtet tártunk fel a bemutatott módszerrel és meghatároztuk a minták, Fe, Cu, Zn és S tartalmát. ( $n=6$ )

A 10% FCS-t tartalmazó tápoldatban tenyésztett HT-29 sejtekben mért átlagos Cu, Fe és Zn tartalom a következő volt:  $4,55 \pm 0,27$ ;  $10,57 \pm 0,97$ ;  $41,33 \pm 3,07$  ng/  $10^6$  sejt. A visszanyerést is vizsgáltuk mindhárom elem esetében: 5 lépésben addicionáltuk a mintákat Fe, Cu, Zn standardoldatokkal, az első lépcsőt úgy választva meg, hogy a minta elemtartalmát megduplázza. Tehát a Fe és a Zn esetében 2, 5, 10, 50 és 100 ng vassal és cinkkel végeztük el az addíciónálást, míg a Cu esetében tized ekkora mennyiségekkel. A mért visszanyerés értékek 87 és 105% között alakultak. A legjobb eredményeket a Zn esetében mértük, de ez várható is volt, mivel ez az elem nagyobb mennyiségben fordul elő a mintákban, mint a Cu és a Fe. Azon mintáknál, melyek nagyobb kiindulási vastartalommal rendelkeztek kiváló visszanyerés-értékeket sikerült produkálni: 95-105% (21. ábra). Tehát azon sejt mintáknál, melyek a kezelése során több vasat vettek fel, a TXRF ideális módszernek bizonyult a vas pontos kvantitatív meghatározására, míg a GF-AAS módszer estében ezen mintáknál erőteljes hígítást kellett alkalmazni.

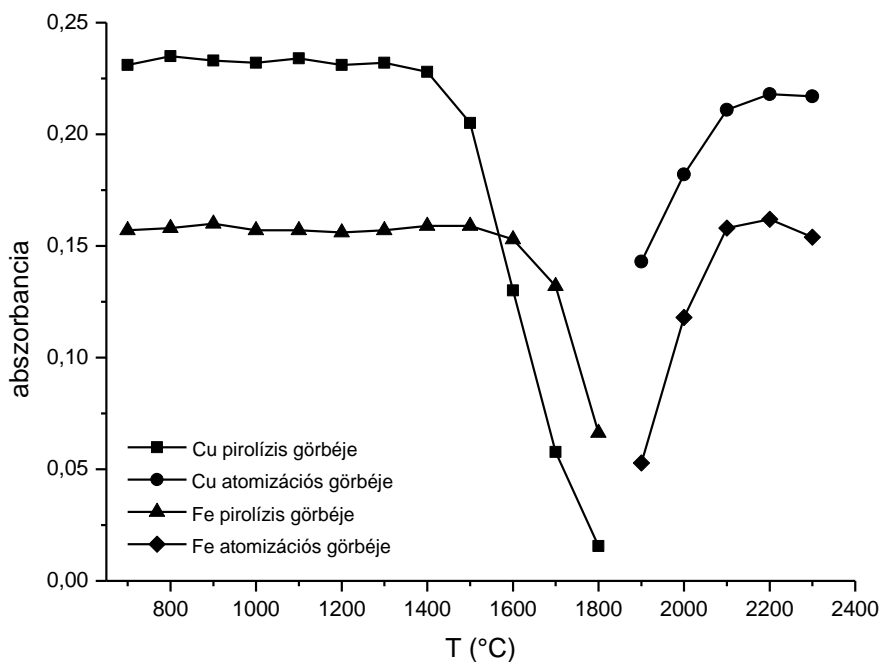


21. ábra: HT-29 sejtek vizsgálatánál TXRF módszerrel mért visszanyerés értékek öt különböző mértékű addíciónálást követően. (A minták spikolására 5 szinten került sor: az 1. szint: 2 ng, a 2. szint: 5 ng, a 3. szint: 10 ng, a 4. szint: 50 ng, az 5. szint: 100 ng Fe és Zn hozzáadását jelentette. A rézből minden szinten tized annyi került a mintára, mint a Fe és Zn esetében. n=3)

### 5.2.2. Módszerfejlesztés Fe, Cu, Zn meghatározására GF-AAS technika esetében

Mivel a sejtminták analízisére kidolgozott TXRF módszer pontosságának megítéléséhez nem állt rendelkezésre referenciaanyag, a feltárt minták analízisét egy másik, eltérő fizikai elven alapuló analitikai technikával, GF-AAS módszerrel is elvégeztük, mely kiváló kimutatási határokkal rendelkezik és kicsi a mintaigénye is. Az általunk használt GF-AAS készülék tovább lehetővé tette a Cu és a Fe szimultán meghatározását, ami tovább csökkentette a mérés technika mintaigényét. A Zn másik két elemmel történő egyidejű meghatározására nem kerülhetett sor a GF-AAS mérés technikának a Zn rezonáns vonalán történő mérésénél ismert nagy érzékenysége miatt. Ez ugyanis jelentős vakérték detektálását eredményezte, még a legalaposabb minta előkészítés esetén is. Alapvetően hasonló helyzet áll fenn a Fe meghatározásánál, de ennél az elemnél lehetőség van kevésbé érzékeny másik elemző vonal (305,9 nm) használatára. A GF-AAS módszerrel meghatározható Fe koncentrációtartomány: 0,1-1 µg/ml volt, a Cu esetében pedig ennek a tizede. Szerencsére a sejtmintákban a réz mennyisége mindig alacsonyabb, mint a vasé, és mindkét elem mennyisége szigorú szabályozás alatt áll.

A GF-AAS módszer kidolgozása során a grafitkemencés hőmérsékleti program (előhevítés/pirolízis/bontás/atomizáció hőmérsékleti lépések) felépítése kritikus lépés. Figyelembe kellett venni a részlegesen feltárt minta szerves tartalmát, valamint a benne még fellelhető szerves anyagmaradványokat; valamint kompromisszumot kellett találni a Fe és Cu szimultán meghatározásához is, mivel e két elem eltérő illékonysággal és atomizációs tulajdonságokkal rendelkezik. Ezenkívül a kémiai módosító befolyásolja a mért elemek párolgási és atomizációs tulajdonságait is. A módszer optimalizálása során azt találtuk, hogy megbízható analitikai eredményekhez az 1400 °C-os előhevítési/pirolízis és a 2300 °C-os atomizációs hőmérséklet vezetett, valamint kémiai módosítót is használtunk: 5 µg Pd-ot, Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> formájában (22. ábra).



22. ábra: Az optimalizált szimultán GF-AAS módszer előhevítés és atomizációs görbéje. (kémiai módosítóként 5  $\mu\text{g}$  Pd-ot használtunk,  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  formájában).

A grafitkemencés meghatározáshoz használt hőmérsékleti programban (15. táblázat) a második szárítási lépcső szokatlanul hosszú ideig tart. Erre a minta nagy salétromsav tartalma miatt volt szükség. A minta maradék szervesanyag tartalmának eltávolítására 20 s-os előkezelési lépcsőt alkalmaztunk 400 °C-on. Az egyes lépésekhez tartozó felfűtési időket úgy határoztuk meg, hogy elkerüljük a minta szétfröccsenését a grafitcsőben. A visszanyerés értékeket 5  $\mu\text{L}$  500 ng/L Fe és 50 ng/L Cu koncentrációjú oldatoknak a mintához való hozzáadásával határoztuk meg.

15. táblázat: Fe és Cu szimultán grafitkemencés meghatározásánál használt hőmérsékleti program (5  $\mu\text{g}$  Pd –ot használtunk kémiai módosítóként  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  formájában).

Lépések	Hőmérséklet °C	Felfűtési idő (s)	Tartási idő (s)
<b>Szárítás 1.</b>	110	1	30
<b>Szárítás 2.</b>	130	15	40
<b>Hamvasztás</b>	400	10	20
<b>Előhevítés</b>	1400	10	20
<b>Atomizáció</b>	2300	0	5
<b>Kiizzítás</b>	2450	1	3



### 5.2.3. A kidolgozott TXRF és GF-AAS módszer összehasonlítása

A fejlesztett TXRF és GF-AAS módszer analitikai teljesítményparamétereit (analízis ideje, kalibráció, ismételhetőség, reprodukálhatóság, visszanyerés, kimutatási határ) a 16. táblázat foglalja össze.

16. táblázat: A fejlesztett TXRF és GF-AAS módszer analitikai teljesítményparamétereit. (LOD = limit of detection)

<b>Analitikai paraméter</b>	<b>TXRF</b>	<b>GF-AAS</b>
<b>Minimális mintaigény(μL)</b>	2	5
<b>Analízis ideje (s)</b>	100-500	cca. 100
<b>Kalibráció</b>	belső standard (Ga)	Külső kalibráció
<b>Precizitás</b>		
<b>- ismételhetőség<sup>a</sup></b>	< 5%	< 2%
<b>- reprodukálhatóság<sup>b</sup></b>	< 10%	< 5%
<b>Visszanyerés (%)<sup>c</sup></b>	87 - 105	98 - 101
<b>LOD (ng/ml)</b>		
<b>Cu</b>	10,3	0,7
<b>Fe</b>	14,5	9,7
<b>Zn</b>	9,8	-

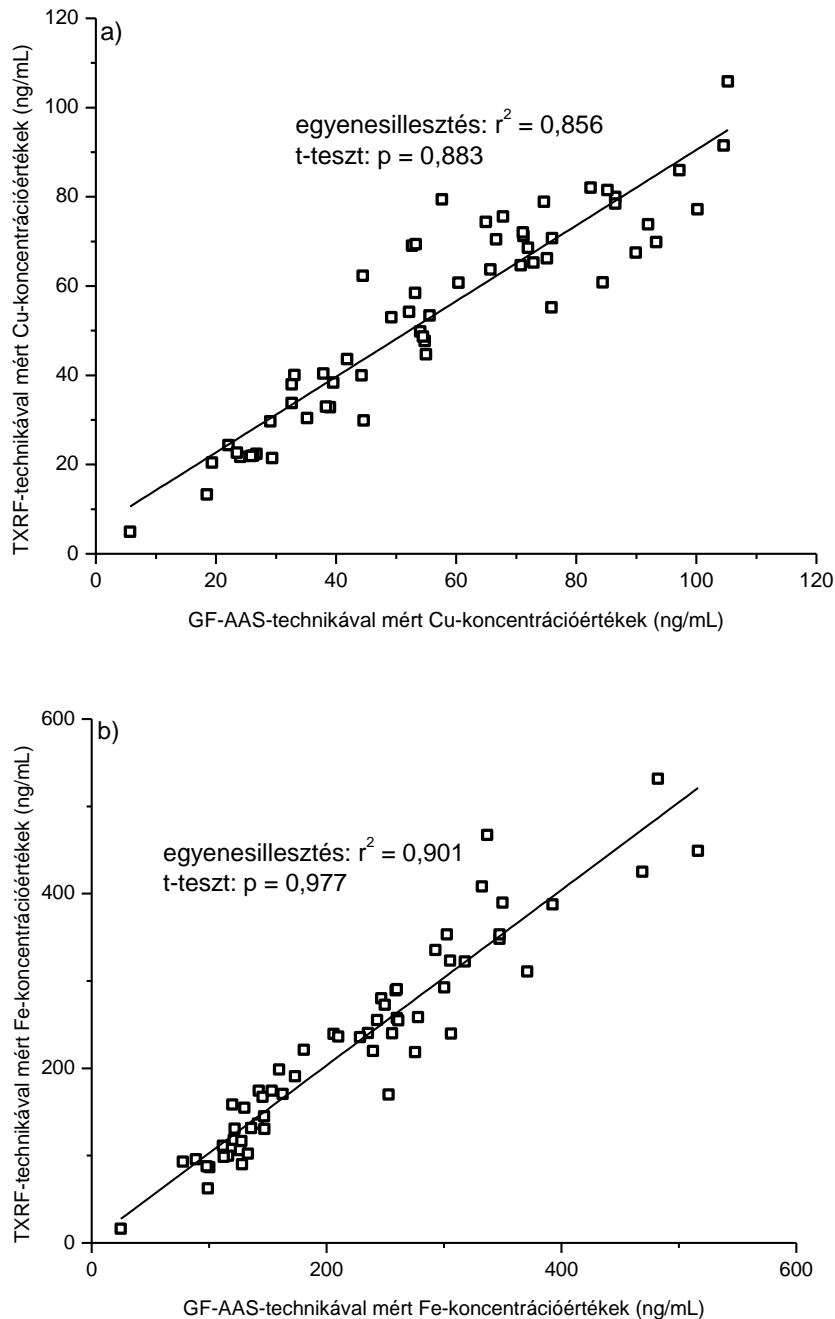
<sup>a</sup> azon mérések relatív standard deviációja (RSD%), melyet ugyanaz a kezelő, ugyanazon a műszeren 3 különböző napon határozott meg

<sup>b</sup> 3 független mérés relatív standard deviációja (RSD%)

<sup>c</sup> 3 különböző koncentrációsinten standardoldatokkal való addíciónálással nyert eredmények

A 16. táblázatban foglaltakat értékelve megállapítható, hogy a GF-AAS módszer analitikai paramétereit (precizitás, kimutatási határ, visszanyerés) jobbak, de a TXRF számos elemről információt adó multielemes technika nagy dinamikus tartománnyal; például a nagy vastartalmú mintákat csak a TXRF-fel lehetett meghatározni. Méréseink során a két módszerrel elemzett minták Cu és Fe tartalma (ahol a vas benne volt a GF-AAS módszer kalibrációs tartományában) jó egyezést mutatott. A Cu és Fe adatpárokat koordinátarendszerben ábrázoltuk és erre egyenest illesztve (23. ábra) a lineáris

regressziós paraméterek megfelelőek voltak ( $r^2 = 0,856$  a Cu esetében;  $r^2 = 0,901$  a Fe esetében). Az adatpárokat kétmintás t-próbával is összehasonlítottuk, mely nem mutatott ki szignifikáns különbséget a két módszerrel nyert adatok között ( $p = 0,883$  a Cu esetében és  $p = 0,977$  a Fe esetében, mintaszám:  $n = 64$ ).



23. ábra: A kezelt és kezeletlen HT-29 sejtekben GF-AAS és TXRF módszerrel mért Cu (a) és Fe (b) koncentrációk közti korreláció ( $n=64$ ).

#### 5.2.4. HT-29 sejtek vasfelvételének vizsgálata a kidolgozott analitikai módszerekkel.

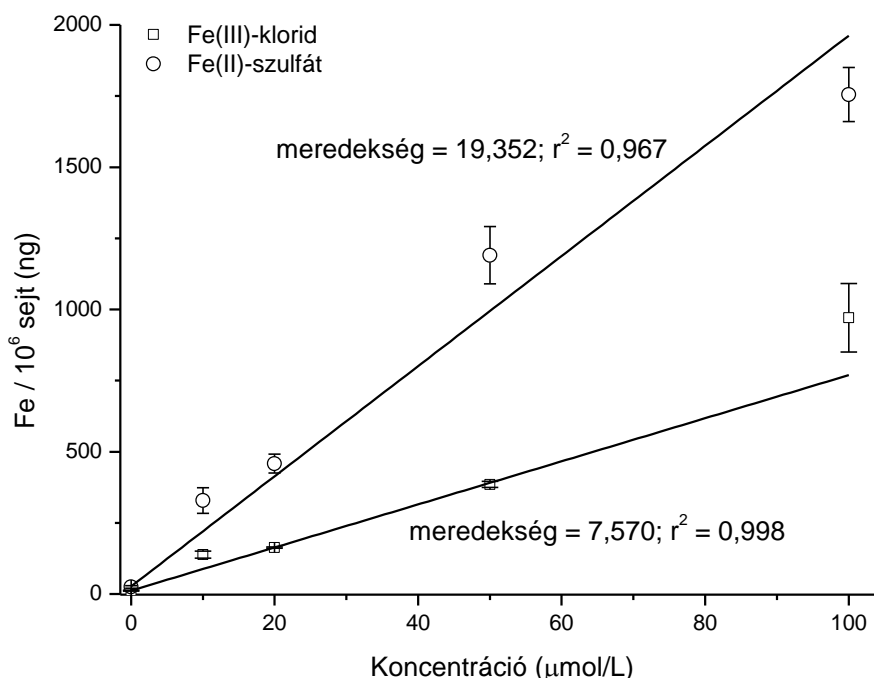
A HT-29 sejtek vasfelvételét 2 szempontból vizsgáltuk:

1. Szervetlen Fe(II) és Fe(III) tartalmú sók ( $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{FeCl}_3$ ) vasfelvételének vizsgálata.
2. Komplex vas(III) vegyületek vasfelvételének vizsgálata (Fe(III)-citrát, Fe(III)-transzferrin).

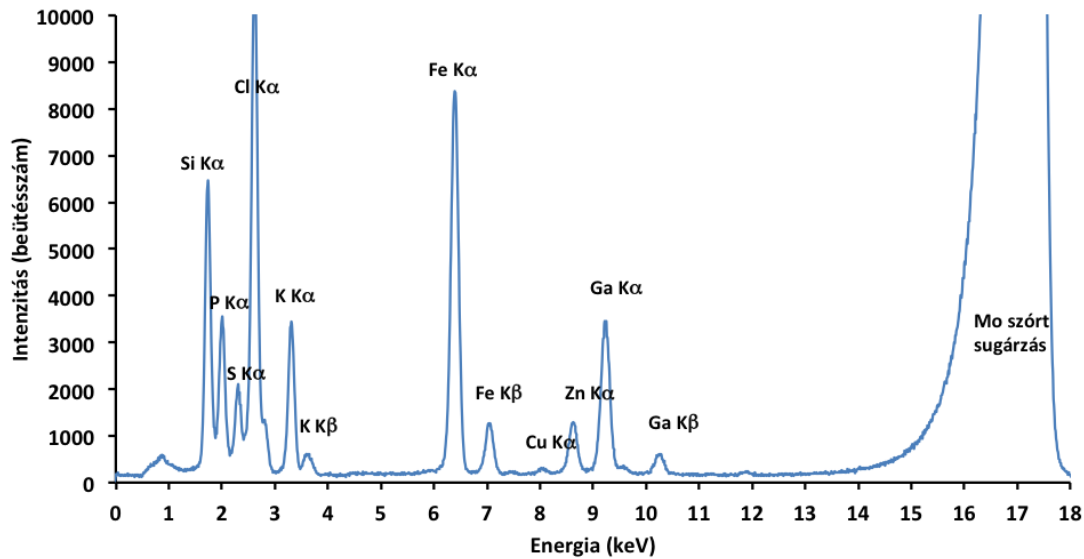
A kezeléseket FCS-t tartalmazó és attól mentes tápoldatokban is elvégeztük. Az FCS a sejttenyésztésben széleskörűen alkalmazott, a tápoldatok kiegészítésére használt szérum, mely növekedési faktorokat, citokineket, szteroid- és peptidhormonokat, enzimeket, adhéziós molekulákat tartalmaz, melyek elősegítik a sejtek szaporodását.

A szervetlen vassók esetében a vasfelvétel lineáris mintázatot mutatott a 10-100  $\mu\text{mol/L}$  koncentrációtartományban FCS-mentes tápoldatban (24. ábra). A legjelentősebb vasfelvételt a  $\text{FeSO}_4$ -tal végzett 4 órás kezelést követően figyeltük meg, mely arra enged következtetni, hogy a sejtek a vasat +2-es oxidációs állapotban veszik fel.

A vas(III)-kloriddal kezelt sejtek TXRF spektrumát a 25. ábra szemlélteti.



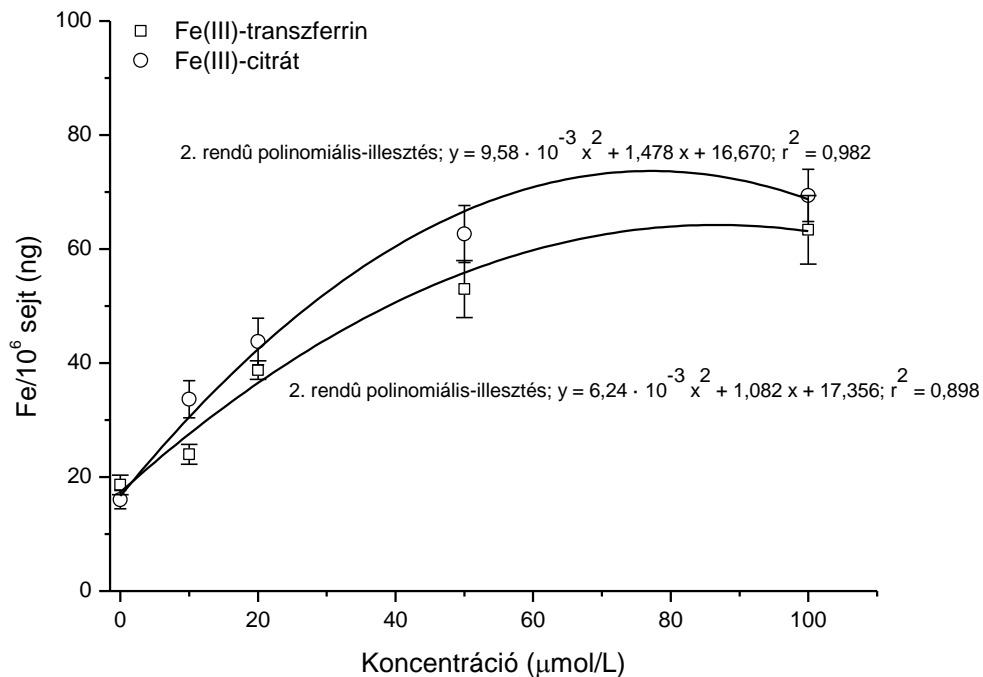
24. ábra: Fe(II)-szulfáttal és Fe(III)-kloriddal 4 óráig FCS mentes tápoldatban kezelt HT-29 sejtek vasfelvételi görbéi.



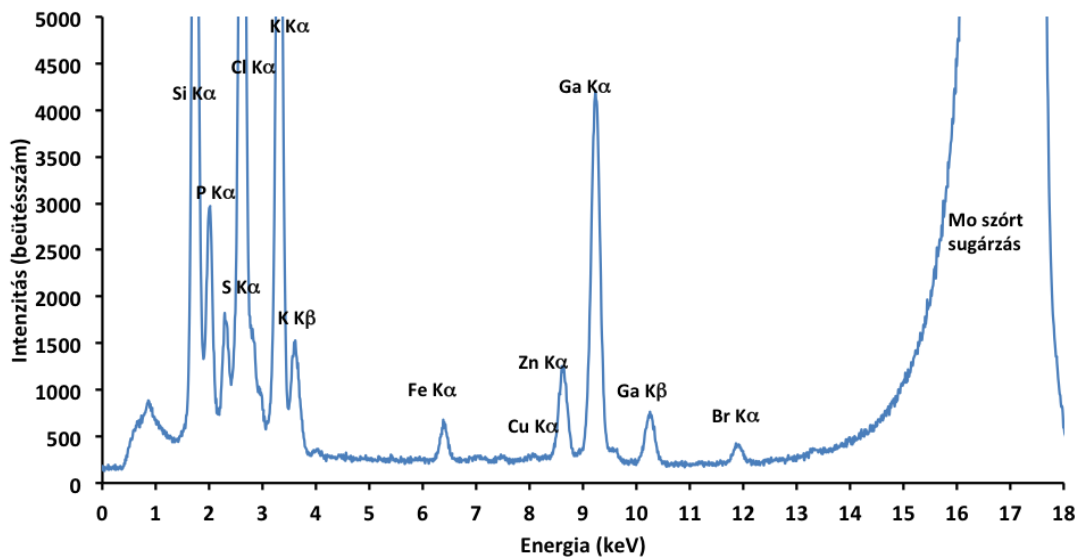
25. ábra: Az FCS mentes tápoldatban  $\text{FeCl}_3$ -dal ( $100 \mu\text{M}$ , 4 óra) kezelt HT-29 sejtek ( $1,92 \times 10^6$  sejt) TXRF spektruma.

Amikor komplex vas(III) vegyületekkel kezeltük a sejteket FCS mentes médiumban a sejtek vasfelvétele mérsékeltebb volt (26. ábra). A vasfelvételt bemutató görbe pontjaira egy másodfokú polinomiális függvényt lehetett illeszteni. A jelenség oka valószínűleg a sejtbeli különböző vasfelvételi mechanizmusokban kereshető. Érdekes adat az is, hogy az FCS-t tartalmazó tápoldatban végzett vasfelvételi kísérleteknél nem találtunk ilyen jelenséget, hasonló mértékben vették fel a sejtek a  $\text{FeSO}_4$  -ból,  $\text{FeCl}_3$  -ből és a Fe(III)-citrátból származó vasat.

A vas(III)-transzferrinnel kezelt sejtek TXRF spektrumát mutatja a 27. ábra.



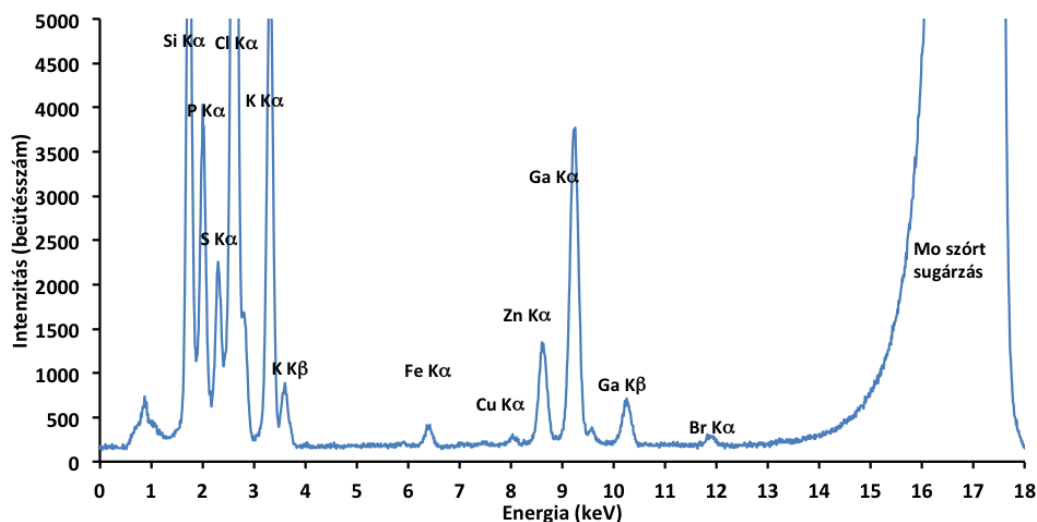
26. ábra: Fe(III)-citráttal és Fe(III)-transzferrinnel 4 óráig FCS mentes tápoldatban kezelt HT-29 sejtek vasfelvételei görbéi.



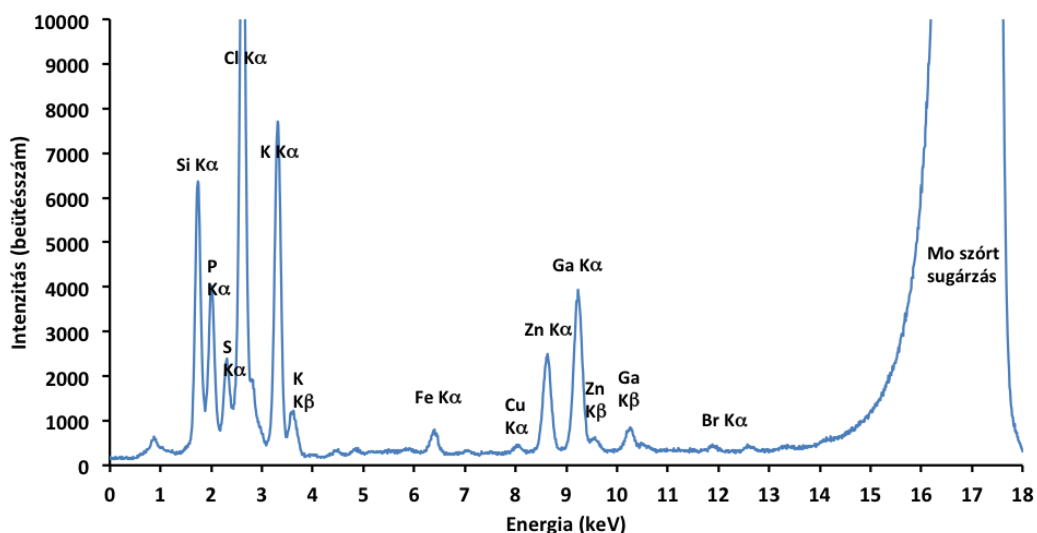
27. ábra: Az FCS mentes tápoldatban Fe(III)-transzferrinnel (100 μM, 4 óra) kezelt HT-29 sejtek ( $0,625 \times 10^6$  sejt) TXRF spektruma.

Az FCS-es tápoldatban végzett kísérletek alapján készített vasfelvételi egyenesek meredekségei a következők voltak: 0,145 (FeSO<sub>4</sub>), 0,204 (FeCl<sub>3</sub>), 0,107 (Fe(III)-citrát). A legkevesebb vasat a Fe(III)-transzferrinnel kezelt sejtek vették fel FCS-es tápoldatból (az egyenes meredeksége: 0,04 volt). Az FCS-es tápoldatban FeSO<sub>4</sub>-tal és Fe(III)-citráttal kezelt sejtek TXRF spektrumait a 28. ábra és a 29. ábra mutatja be.

Az FCS-t tartalmazó, illetve mentes tápoldatban végzett vasfelvételi kísérletek összehasonlításakor elmondható, hogy a vasforrástól függetlenül FCS mentes környezetben a sejtek 5-50-szer több vasat vettek fel.



28. ábra: Az FCS-es tápoldatban  $\text{FeSO}_4$ -tal ( $100 \mu\text{M}$ , 4 óra) kezelt HT-29 sejtek ( $0,858 \times 10^6$  sejt) TXRF spektruma.



29. ábra: Az FCS-es tápoldatban Fe(III)-citráttal ( $100 \mu\text{M}$ , 4 óra) kezelt HT-29 sejtek ( $0,716 \times 10^6$  sejt) TXRF spektruma.

### 5.2.5. HT-29 sejtek kezelése kelátorokkal

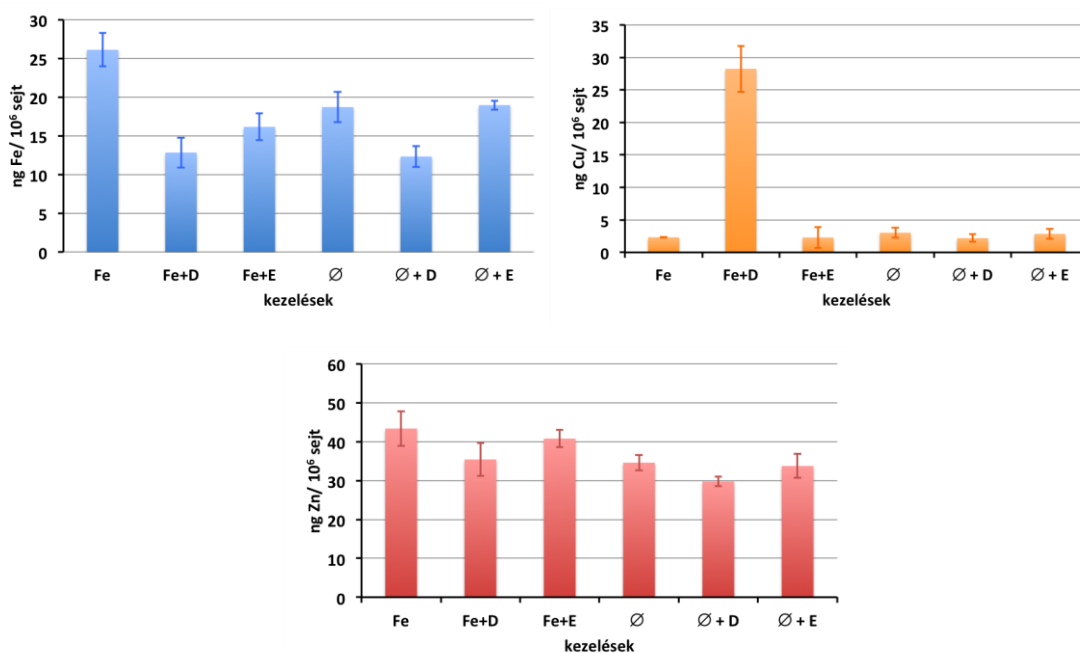
A bevezetésben bemutattuk a rákellenes szerek egy lehetséges új generációját: a vaskelátorokat. Ezen vegyületek hatásmechanizmusa intenzív kutatás tárgya és a legígéretesebb molekulákkal már fázis I és II vizsgálatok folynak. A vaskelátorokkal

follyó kísérletekben sokféle sejtbiológiai paramétert mérnek a kutatók és a tanulmányok többségében a sejtek vastartalmának változását  $^{59}\text{Fe}$  izotóppal követik nyomon. Ezen irodalmak tanulmányozásakor vetődött fel a kérdés, hogy vajon ezen kelátorok nem befolyásolják-e a sejtek Cu és Zn tartalmát is?

Kísérleteinkhez kelátorként: a Dp44mT és EDTA vegyületeket választottuk. A Dp44mT az újonnan fejlesztett vaskelátorok egyik leghatékonyabb vegyülete, az EDTA pedig régóta ismert fémkelátor. A kelátorok hatékonyságát vizsgáltuk  $\text{FeSO}_4$ -tal előkezelt, illetve kezeletlen sejteken is 4 és 8 órás kísérletekben.

A sejtek Fe, Cu és Zn tartalmát az előző fejezetekben bemutatott mintaelőkészítés után a kifejlesztett TXRF és GF-AAS módszerekkel határoztuk meg.

### 5.2.5.1. 4 órás kezelések



30. ábra: HT-29 sejtek Fe, Cu és Zn tartalma 4 órás, FCS mentes médiumban végzett kezeléseket követően. (Fe= 20  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$ , D= 50  $\mu\text{M}$  Dp44mT, E= 50  $\mu\text{M}$  EDTA, Ø=FCS mentes médium).

Ebben a kísérletben egyszerre adtuk a HT-29 sejtek tápoldatához a  $\text{FeSO}_4$ -ot (20  $\mu\text{M}$ ), illetve a kelátorokat (50  $\mu\text{M}$ ), valamint elvégeztük a kísérletet úgy is, hogy csak a kelátorokat adtuk a médiumhoz. A kezeléseket FCS-mentes tápoldatban végeztük, időtartama 4 óra volt. A sejtek kezeléseket után mért Fe, Cu és Zn tartalmát a 30. ábra mutatja be.

A 4 órás vaskezelés hatására a sejtek vastartalma 39,5%-kal, cinktartalma 25,4%-kal nőtt meg, réztartalma pedig 23,4%-kal csökkent a nem kezelt sejtek elemtartalmához viszonyítva ( $\emptyset$ ). A  $\text{FeSO}_4$  és a Dp44mT (Fe+D) együttes adása során a sejtek vastartalma felére (50,84%-kal), cinktartalma 18,3%-kal csökkent, réztartalma pedig több mint tízszeresére nőtt a csak vasszulfáttal kezelt sejtek elemtartalmához képest (Fe). A  $\text{FeSO}_4$  és az EDTA (Fe+E) együttes adásakor a sejtek vastartalma 38,13%-kal csökkent, cink- és réztartalma pedig gyakorlatilag nem változott a csak vasszulfáttal kezelt sejtek elemtartalmához képest (Fe). Amikor a médiumhoz csak Dp44mT-t ( $\emptyset$ +D) adtunk, akkor a sejtek vastartalma 34,1%-kal, cinktartalma 27,7%-kal, réztartalma 14%-kal csökkent a nem kezelt sejtek elemtartalmához viszonyítva ( $\emptyset$ ). Az FCS mentes médiumban végzett EDTA kezelések ( $\emptyset$ +E) hatására a sejtek Fe, Cu és cinktartalma gyakorlatilag nem változott jelentősen a nem kezelt sejtek elemtartalmához viszonyítva ( $\emptyset$ ).

A Dp44mT tehát jelentősen csökkenti a vassal kezelt és nem kezelt sejtek Fe tartalmát, és a sejtek cinktartalma is csökken a Dp44mT kezelés hatására, de kisebb mértékben. A Fe esetében a Fe+D kísérletekben lehetséges, hogy már a tápoldatban kelatizálja vasat, míg a  $\emptyset + D$  kísérletek a sejtek vastartalmának (és cinktartalmának) kivonását igazolják.

A Dp44mT hatása a réztartalomra attól függ, hogy a vassal együtt vagy anélkül adjuk. Vassal közös kezelésben óriási mértékben megnövekedett a sejtek réztartalma, míg a  $\emptyset + D$  kísérletben gyakorlatilag nem változott az intracelluláris Cu mennyisége.

Az EDTA a vas bejutását a sejtekbe jó hatásfokkal akadályozta meg, de az intracelluláris vas és cink kelatizálásában már kevésbé volt hatékony. A sejtek réztartalmára pedig gyakorlatilag nem volt hatással.

A kezelések hatására kialakult Fe, Cu és Zn tartalmak közötti szignifikáns ( $p < 0,05$ , táblázatban + jellel jelölve) és nem szignifikáns (-) különbségeket a mutatja be a 17. táblázat Tukey post hoc teszt eredményei alapján.



17. táblázat: Tukey post hoc teszt alapján szignifikáns ( $p < 0,05$ , táblázatban + jellel jelölve) és nem szignifikáns (-) különbségek HT-29 sejtek Fe (a), Cu (b) és Zn (c) tartalmai között 4 órás, FCS mentes médiumban végzett kezeléseket követően. (Fe= 20  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$ , D= 50  $\mu\text{M}$  Dp44mT, E= 50  $\mu\text{M}$  EDTA,  $\emptyset$ =FCS mentes médium).

a)

<b>Fe</b>	<b>Fe</b>	<b>Fe+D</b>	<b>Fe+E</b>	$\emptyset$	$\emptyset$ +D	$\emptyset$ +E
<b>Fe</b>		+	+	+	+	+
<b>Fe+D</b>	+		-	+	-	+
<b>Fe+E</b>	+	-		-	-	-
$\emptyset$	+	+	-		+	-
$\emptyset$ +D	+	-	-	+		+
$\emptyset$ +E	+	+	-	-	+	

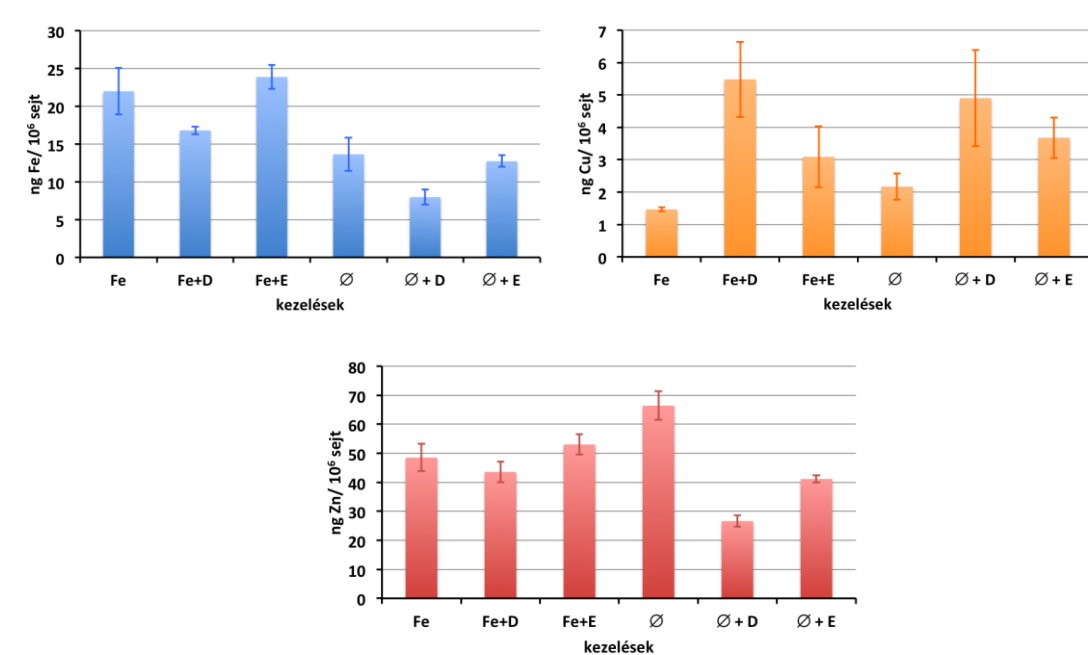
b)

<b>Cu</b>	<b>Fe</b>	<b>Fe+D</b>	<b>Fe+E</b>	$\emptyset$	$\emptyset$ +D	$\emptyset$ +E
<b>Fe</b>		+	-	-	-	-
<b>Fe+D</b>	+		+	+	+	+
<b>Fe+E</b>	-	+		-	-	-
$\emptyset$	-	+	-		-	-
$\emptyset$ +D	-	+	-	-		-
$\emptyset$ +E	-	+	-	-	-	

c)

<b>Zn</b>	<b>Fe</b>	<b>Fe+D</b>	<b>Fe+E</b>	$\emptyset$	$\emptyset$ +D	$\emptyset$ +E
<b>Fe</b>		+	-	+	+	+
<b>Fe+D</b>	+		-	-	-	-
<b>Fe+E</b>	-	-		-	+	-
$\emptyset$	+	-	-		-	-
$\emptyset$ +D	+	-	+	-		-
$\emptyset$ +E	+	-	-	-	-	

### 5.2.5.2. 8 órás kezelések



31. ábra: HT-29 sejtek Fe, Cu és Zn tartalma 8 órás, FCS mentes médiumban végzett kezeléseket követően. (Fe= 20  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>, D= 50  $\mu$ M Dp44mT, E= 50  $\mu$ M EDTA, Ø=FCS mentes médium).

Ezekben a kísérletekben kétszer 4 órás kezeléseket végeztünk el. Az első 4 órában a sejteket FeSO<sub>4</sub>-tal kezeltük (20  $\mu$ M) vagy csak az FCS mentes tápoldatban hagytuk állni őket. A második 4 órában kapták a kelátorkezeléseket (50  $\mu$ M) a sejtek, vagy FCS mentes tápoldatban álltak. A két 4 órás blokk között a sejteket FCS mentes tápoldattal lemostuk. A sejtek kezelése után mért Fe, Cu és Zn tartalmát a 31. ábra mutatja be.

A 4 órás vaskezelés (Fe) hatására a sejtek vastartalma 61,1%-kal nőtt meg, cinktartalma 27%-kal, réztartalma pedig 32,3%-kal csökkent a nem kezelt sejtek elemtartalmához viszonyítva (Ø).

A FeSO<sub>4</sub> kezelést követő Dp44mT (Fe+D) kezelés hatására a sejtek vastartalma 23,57%-kal csökkent, réztartalma pedig több mint háromszorosára nőtt, cinktartalma nem változott jelentősen a csak vasszulfáttal kezelt sejtek elemtartalmához képest (Fe). A FeSO<sub>4</sub> kezelést követő EDTA (Fe+E) kezeléskor a sejtek vas- és cinktartalma nem változott szignifikánsan, míg a réztartalom több mint duplájára nőtt a csak vasszulfáttal kezelt sejtek elemtartalmához képest (Fe). (A sejtek réztartalmára kapott eredmények értelmezni nehéz, mivel ez az elem nagyon kis mennyiségben van jelen a sejtben. Az

analitikai mérés során kapott érték kis szennyezés hatására is könnyen a duplájára növekedhet, a vak érték változása ugyanabban a nagyságrendbe esik, mint a kezelés során tapasztalt változások.)

Amikor a 4 órán át FCS mentes médiumban tartott sejteket Dp44mT-vel kezeltük ( $\emptyset$ +D), a sejtek vastartalma 41,6%-kal, cinktartalma 59,9%-kal csökkent, réztartalma pedig több mint duplájára nőtt a nem kezelt sejtek elemtartalmához viszonyítva ( $\emptyset$ ). A 4 órán át médiumban tartott sejtek vastartalma nem változott szignifikánsan, réztartalma 69,6%-kal nőtt, cinktartalma 38%-kal csökkent az EDTA kezelés ( $\emptyset$ +E) hatására a nem kezelt sejtek elemtartalmához viszonyítva ( $\emptyset$ ).

Összességében megállapítható, hogy a sejtek réztartalma a kelátorkezelések hatására minden esetben emelkedett (megvizsgáltuk a Dp44mT oldatát, de annak Cu tartalma a kimutatási határ alatt volt). A Dp44mT kezelése hatására a sejtek vastartalma csökkent a 4 órán át vaskezelést, illetve a 4 órán át médiumban tartott sejtek esetében is. A Dp44mT a sejtek cinktartalmát csak a 4 órán át médiumban tartott sejtek esetében csökkentette szignifikánsan. Az EDTA hatására a sejtek réztartalma nőtt, vastartalma gyakorlatilag nem változott, cinktartalma pedig csak a  $\emptyset$ +E kezelés esetében csökkent jelentősen.

A kezelése hatására kialakult Fe, Cu és Zn tartalmak közötti szignifikáns ( $p < 0,05$ , táblázatban + jellel jelölve) és nem szignifikáns (-) különbségeket a

18. *táblázat* mutatja be a Tukey post hoc teszt eredményei alapján.

18. *táblázat*: Tukey post hoc teszt alapján szignifikáns ( $p < 0,05$ , táblázatban + jellel jelölve) és nem szignifikáns (-) különbségek HT-29 sejtek Fe (a), Cu (b) és Zn (c) tartalmi között 8 órás, FCS mentes médiumban végzett kezeléseket követően. (Fe= 20  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>, D= 50  $\mu$ M Dp44mT, E= 50  $\mu$ M EDTA,  $\emptyset$ =FCS mentes médium).

a)

Fe	Fe	Fe+D	Fe+E	$\emptyset$	$\emptyset$ +D	$\emptyset$ +E
Fe		-	-	+	+	+
Fe+D	-		+	-	+	-
Fe+E	-	+		+	+	+
$\emptyset$	+	-	+		+	-
$\emptyset$ +D	+	+	+	+		+
$\emptyset$ +E	+	-	+	-	+	

b)

<b>Cu</b>	<b>Fe</b>	<b>Fe+D</b>	<b>Fe+E</b>	<b>∅</b>	<b>∅+D</b>	<b>∅+E</b>
<b>Fe</b>		+	-	-	+	-
<b>Fe+D</b>	+		+	+	-	-
<b>Fe+E</b>	-	+		-	-	-
<b>∅</b>	-	+	-		+	-
<b>∅+D</b>	+	-	-	+		-
<b>∅+E</b>	-	-	-	-	-	

c)

<b>Zn</b>	<b>Fe</b>	<b>Fe+D</b>	<b>Fe+E</b>	<b>∅</b>	<b>∅+D</b>	<b>∅+E</b>
<b>Fe</b>		-	-	+	+	-
<b>Fe+D</b>	-		-	+	+	-
<b>Fe+E</b>	-	-		+	+	+
<b>∅</b>	+	+	+		+	+
<b>∅+D</b>	+	+	+	+		+
<b>∅+E</b>	-	-	+	+	+	

A bemutatott multielemes TXRF és szimultán GF-AAS módszer alkalmas a különböző vasvegyületekkel (FeSO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub>, (Fe(III)-citrát, Fe(III)-transzferrin)) kezelt HT-29 sejtek Fe és Cu tartalmának meghatározására. A sejtek mintaelőkészítésére használt módszer egyszerű: 24 órán át a sejteket a centrifugálásukhoz is használt Eppendorf csövekben tárjuk fel 65%-os salétromsav és 30%-os hidrogén-peroxid elegyében. Bár a módszerrel teljes feltárás nem érhető el, a TXRF és GF-AAS módszerrel pontos analitikai meghatározásokat lehetett elérni ilyen biológiai mintamátrixban is. A kontamináció veszélyét pedig minimálisra csökkentettük ezzel a mintaelőkészítéssel. A TXRF és GF-AAS módszerrel mért Cu és Fe adatok jó egyezést mutattak. A nagyobb Fe koncentrációkat, valamint a sejtek Zn tartalmát csak TXRF módszerrel lehetett meghatározni.

A vasfelvételi kísérletekkel kapcsolatban megállapítható, hogy FCS mentes környezetben a sejtek 5-50-szer több vasat vettek fel, mint az FCS-t tartalmazó

tápanyagból, valamint különbségeket lehetett megfigyelni a különböző típusú vasvegyületek felvétele között is.

A kidolgozott módszerekkel lehetségessé vált a rákos sejtek Fe, Cu, Zn tartalmának követése, melyet a vaskelátorokkal végzett kísérleteinknél is felhasználtunk.

### 5.3. Az SR-TXRF XANES mérések eredményei

Mint az irodalmi bevezetésben már bemutattuk a vas alapvető fontosságú elem az emberi szervezetben: részt vesz többek között a DNS szintézis folyamatában, az elektrontranszportban, a vérvégzésben. A vas Fe(II) és Fe(III) oxidációs állapotokban fordul elő a biomolekulákban és e két állapot közti elektrontranszport teszi lehetővé, hogy biológiai folyamatokban kiemelten fontos elemmé váljon. Azonban ez a tulajdonság teszi veszélyessé is, mivel képes ily módon szabad gyökök képzésére is.

A sejtekbe bekerülő vas először a „labile iron pool” (LIP) része lesz, a „felesleges” vas pedig ferritinben tárolódik Fe(III)-oxi-hidroxil formában. A LIP a sejt vastartalmának csak 3-5%-át adja, azonban ez a kis mennyiség felelős a sejt redox „státuszáért”, mivel a LIP-ban a vas jórészt Fe(II) állapotban van.

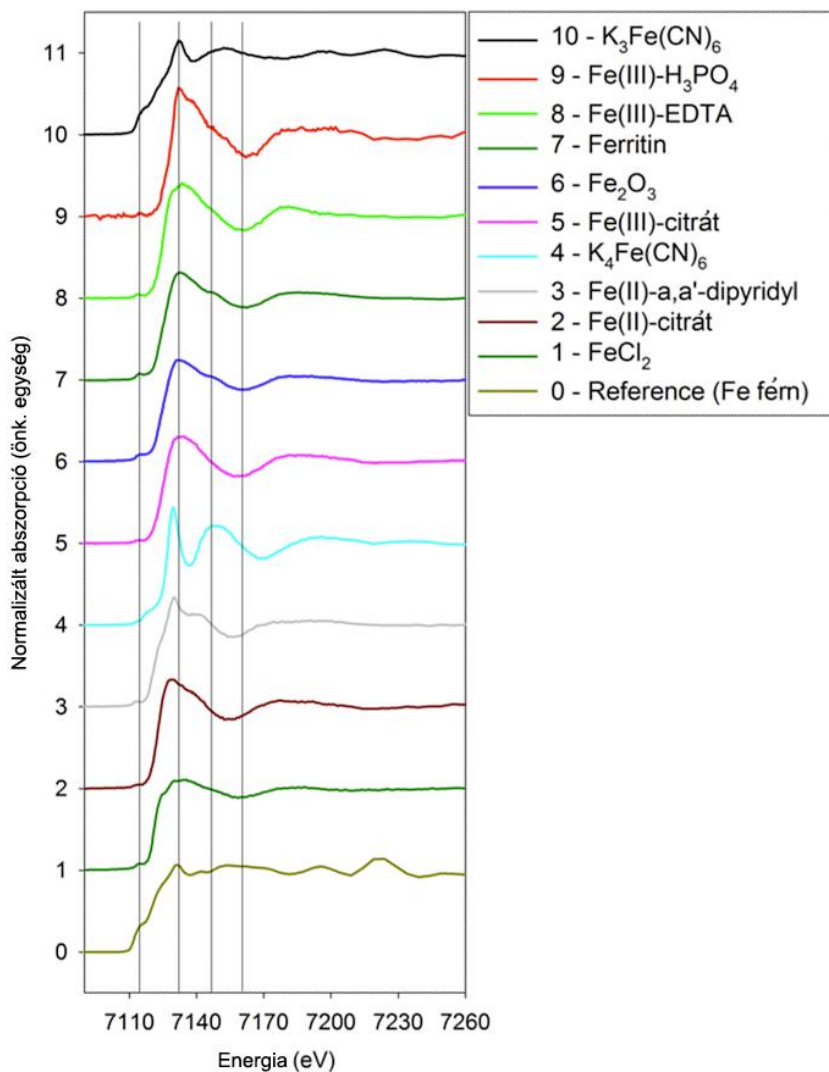
A XANES módszer segítségével lehetőségünk nyílt a sejtekben a vas oxidációs állapotának és koordinációs környezetének vizsgálatára. Munkánk során először megfelelő mintaelőkészítési módszert dolgoztunk ki rákos sejtek SR-TXRF-XANES analíziséhez, majd a kidolgozott módszert használtuk különböző rákos sejtvonalak (ZR-75-1, HT-29, MDA-MB-231, HCA-7), valamint eltérő növekedési fázisban (lag, log, plateau) lévő sejtek analíziséhez.

Az irodalomban több tanulmány is foglalkozik az oxidatív stressz és hipoxiás állapot vasmetabolizmusra gyakorolt hatásával. Ezen tanulmányok alapján választottuk ki a sejtek kezeléséhez használt szerek egy részét:  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$  [205, 206, 207, 208] (hipoxia mimikálása),  $\text{MgSO}_4$  [209] (Co(II), 5-fluorouracil hatásának felfüggesztése), antimycin A [210] (elektron transzportlánc gátlása), 5-fluorouracil [211] (oxidatív stressz előidézése) és vizsgáltuk, hogy van-e hatásuk ezen kezelésekre a vas oxidációs állapotára és koordinációs környezetére.

Vizsgáltuk továbbá a különböző vasformákkal való kezelés ( $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{FeCl}_3$ , Fe(III)-citrát, Fe(III)-transzferrin) hatását is a sejtbeli vas oxidációs állapotára és koordinációs környezetére.

### 5.3.1. A különböző Fe standardok összehasonlítása

Az általunk megmért összes standard, valamint a [212] tanulmányban már publikált  $\text{FeCl}_2$  és  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  XANES spektrumait mutatja az 32. ábra.



32. ábra: Az általunk megmért vas standardok, valamint a [212] tanulmányban már közölt  $\text{FeCl}_2$  és  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  XANES spektrumai. A szürke vonalak a ferritin XANES spektrumának jellegzetes energiahelyeit jelzik (élelőtti csúcs, fehér vonal, váll és első minimumérték), elősegítve a standardok közti energiaeltolódás felismerését.

A jobb összehasonlíthatóság érdekében a ferritin XANES spektrumának jellegzetes pontjait 4 függőleges vonallal jelöltük meg: 1) élelőtti csúcs, 2) fehér vonal, 3) váll 4) az első minimumérték. Jól elkülöníthetők a 2+ és 3+ oxidációs állapotú vasat tartalmazó standardok. A Fe(III)-at tartalmazó vegyületek abszorpciós éle egybeesik a  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -ével,

a Fe(II)-citráté pedig a FeCl<sub>2</sub>-ével mutat hasonlóságot. A Fe(III)-EDTA komplex abszorpciós éle közel azonos energiánál található, mint a Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-é, de a spektrumok lefutása különbözik, köszönhetően a Fe eltérő koordinációs környezetének. A hasonló koordinációs geometriával rendelkező citrát és EDTA komplexek XANES spektrumai nagyfokú hasonlóságot mutatnak.

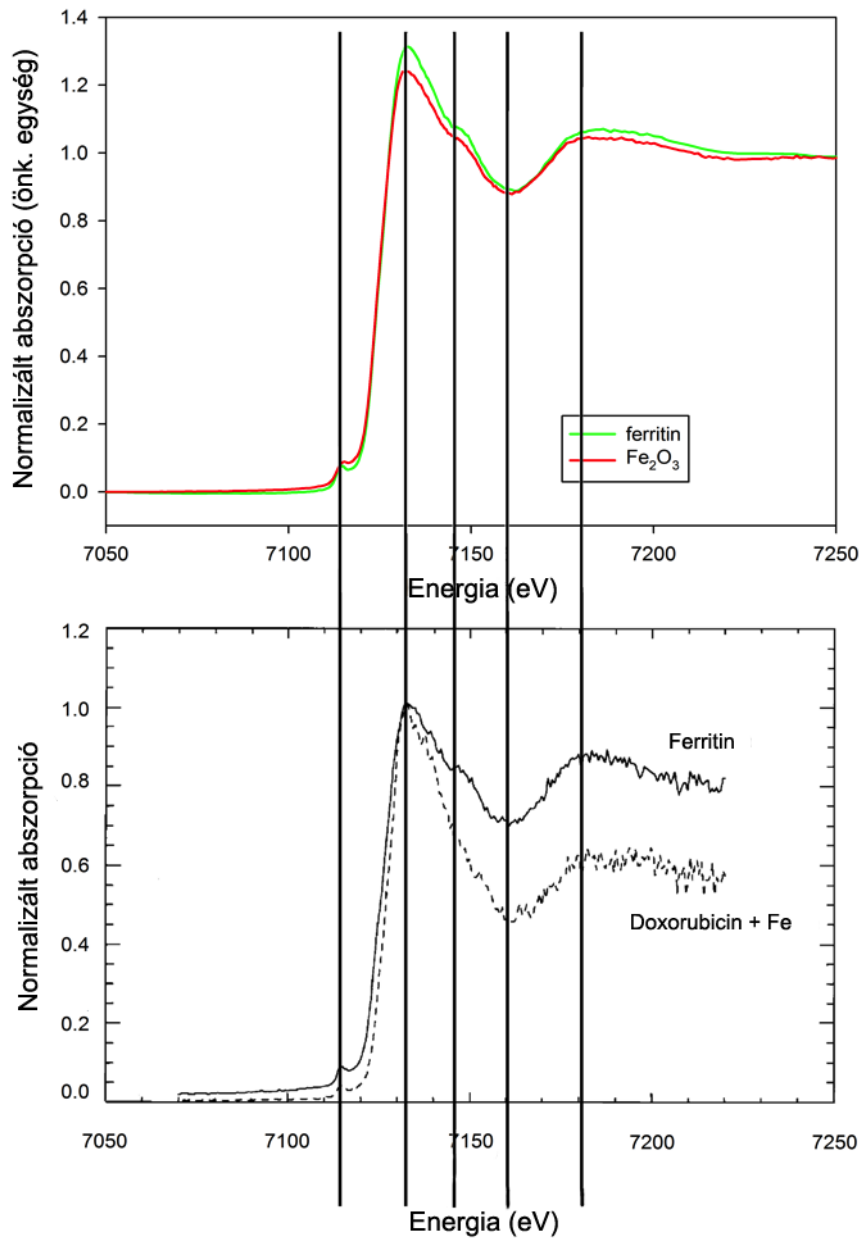
A Fe(II)- $\alpha,\alpha'$ -dipyridyl és a K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> standardok spektrumait is összehasonlítottuk a FeCl<sub>2</sub>-ével és a Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-ével. A Fe(II)- $\alpha,\alpha'$ -dipyridyl abszorpciós éle egybeesik a FeCl<sub>2</sub>-ével. A K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> spektrumának irodalmi adatokkal való összevetése [213] azt mutatja, hogy a spektrumok fő jellegzetességei azonosak (köszönhetően a ciano csoportok oktahedrális Fe körüli elhelyezkedésének), de az abszorpciós él helyének/energiájának pontos összehasonlítása azért nem lehetséges, mert nem azonos vegyületekről van szó.

A Fe(III)-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> standard spektrumának esetében az abszorpciós él magasabb energiák felé való eltolódása figyelhető meg.

Ezek a jelenségek jól mutatják mennyire érzékeny a XANES spektrum a Fe oxidációs számán kívül annak koordinációs környezetére is.

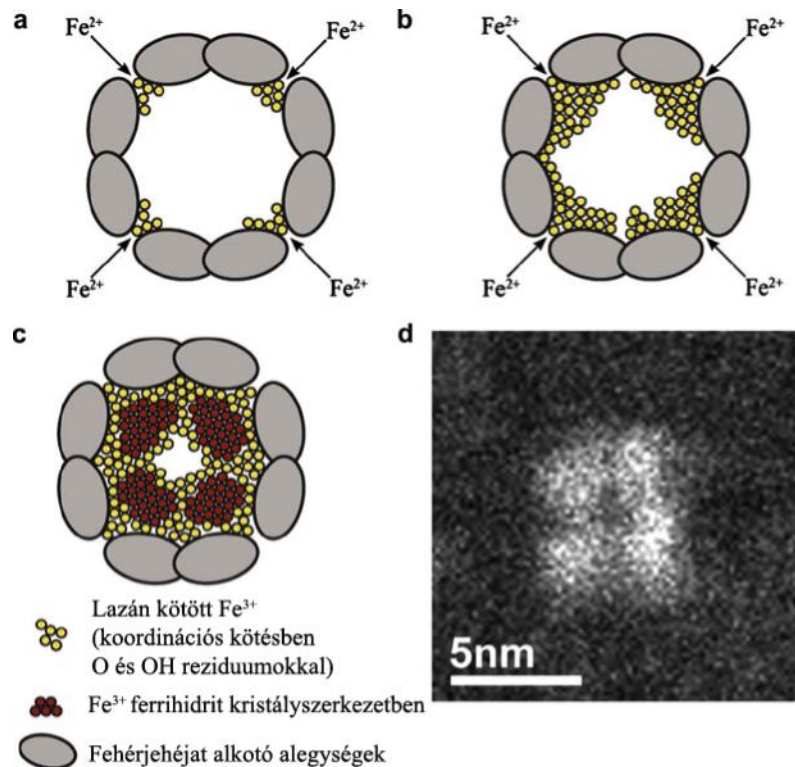
### 5.3.2. A különböző Fe standardok ferritinnel való összehasonlítása

A 33. ábra a ferritin és a Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> XANES spektrumát mutatja. Az abszorpciós élek helyzete nagyon hasonló. A ferritin általunk felvett spektruma jó egyezést mutat az irodalmi adatokkal [214], bár az Ortega által használt normalizáció eltér a mi kiértékelésünkkel alkalmazottól. A ferritin és a Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> spektrumának nagyon hasonló lefutása a vas-centrum hasonló környezetére utal a két vegyületben. A ferritin szerkezete egy üreges (fehérje)gömbre emlékeztet: az üregben a vas 3+ oxidációs állapotban tárolódik (34. ábra). Az üregben lévő vas ferrihidrit [FeO(OH)]<sub>8</sub>[FeO(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)] jelleget mutat, ami az üreg belső falához kapcsolódik. Amikor a ferritinből vas felszabadulásra van szükség, akkor a Fe(III)-at előbb Fe(II)-vé kell redukálni. Az általunk felvett ferritin spektrumát más irodalmi adatokkal is összevetve valószínűsíthető, hogy a vas ferrihidrit formában van jelen a ferritinben [215]. (A [215] referenciában az abszorpciós él eltérő energiánál való jelentkezése a különböző energiakalibrációnak köszönhető.)



33. ábra: A ferritin és a Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> XANES spektrumának összehasonlítása irodalmi adatokkal [214].





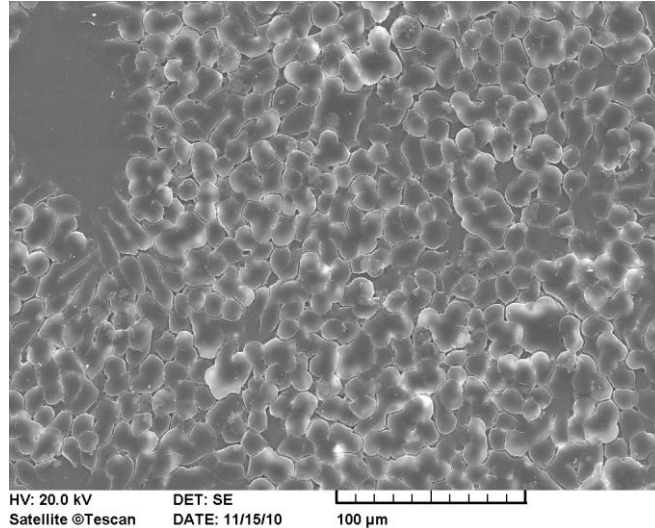
34. ábra: A ferritin vázlatos szerkezete [216]. a-c: a vas bekerülése és felhalmozódása a ferritinben, a belső struktúra kialakulása. a) A  $\text{Fe}^{2+}$  vasbeviteli csatornákon keresztül kerül be a ferritin belső üregébe, ahol aztán  $\text{Fe}^{3+}$ -má oxidálódik. b) Ahogy nő a sejtben a  $\text{Fe}^{2+}$  koncentrációja, egyre több  $\text{Fe}^{2+}$  kerül be a ferritinbe, ahol oxidálódik és kezd kialakulni a belső struktúra. c) További  $\text{Fe}^{2+}$  bekerülése és oxidációja az üreg belsejében lévő  $\text{Fe}^{3+}$  tömörebb, ferridrit kristályszerkezetbe való rendeződését idézi elő. d) A ferritin HAADF-STEM (High Angle Annular Dark Field Scanning Transmission Electron Microscopy) képe haemochromatosisban szenvedő beteg biopsziás májmintájában.

### 5.3.3. A különböző mintaelőkészítési technikák hatása a kvarclapon kialakuló mintarétegre

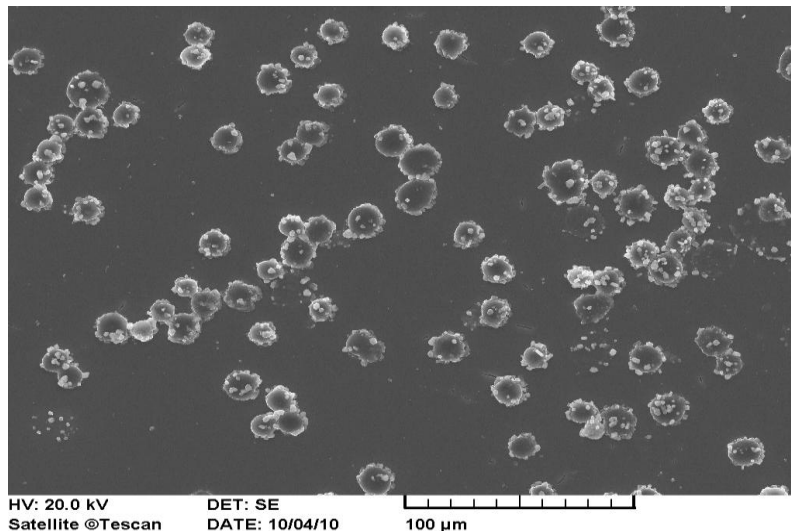
Két különböző mintaelőkészítési módszert vizsgáltunk. Az egyiknél a kvarclapokat sterilizáltuk, majd különböző extracelluláris mátrixkomponensekkel vontuk be (kollagén, fibronectin, 4.4.3. fejezet). A sejteket az így előkészített kvarclapokon tenyésztettük. A másik mintaelőkészítésnél a sejtszuspenziót cseppentettük közvetlenül a kvarclapokra (4.4.3. fejezet). A felületbevonásra használt anyagtól függetlenül az első módszer használatakor konfluens, többszörös sejtréteget kaptunk a kvarclapon, amelyet semmiképpen nem lehetett monolayernek tekinteni. Ezen mintaelőkészítés másik hátránya, hogy sejtszámot a kvarclapon csak durva becsléssel lehet megállapítani: csak

egy másik, azonos körülmények között előkészített lapról lehet lemosni a sejteket és megszámolni. Bár a második protokoll több energiát és odafigyelést igényel, a lapon kialakuló réteg, monolayernek tekinthető (35. *ábra*) és a sejtszám is pontosan megadható.

a) protokoll (1); kvarclapon tenyésztett sejtek.



b) protokoll (2): kvarclapra cseppentett sejtuszpenzió.



35. *ábra*: A XANES mérésekhez előkészített HT-29 sejtek SEM felvételei. (SEM: vakuum:  $10^{-4}$  mbar, 20 kV gyorsítófeszültség, 0,1 nA áramerősség).

A SEM felvételeken látható fehér pontok NaCl kristályok, mivel izotóniás sóoldatot használtunk a sejtek mosásához. A ránövesztéssel előkészített minta is ugyanannyi sókristályt tartalmaz, mint a felcseppentett, csak az első esetben a kialakult több

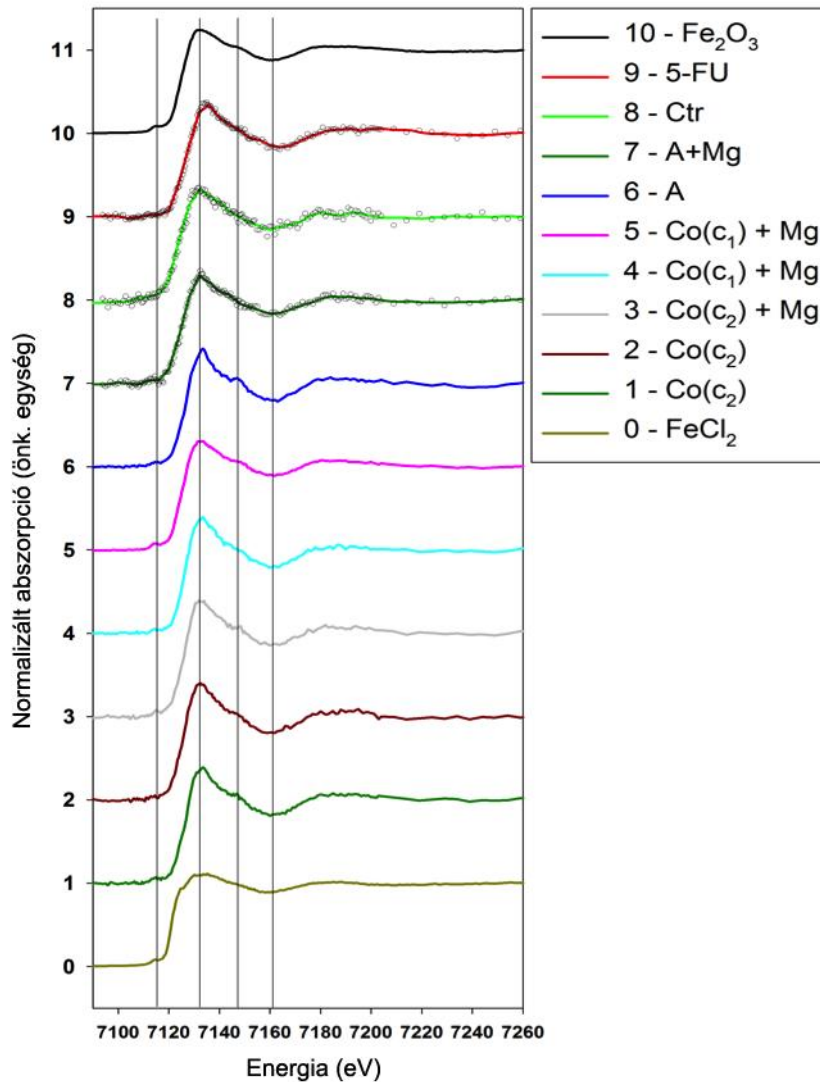
sejtréteg és a szorosan egymás mellett lévő sejtek miatt azok kevésbé látszanak. (35. *ábra* a) és b) képe).

A 35. *ábra* b) felvétele jól mutatja, hogy a sejtuszpenzió felcseppentésével nyert minta monolayer eredményezett a kvarclapon. Ez a módszer továbbá sokkal reprodukálhatóbb eredményeket adott, így az összes többi minta esetében ezt a mintaelőkészítést használtuk.

#### **5.3.4. A vas oxidációs állapotának meghatározása kezelt és kezeletlen sejtekben, XANES spektrumuk standardokhoz való hasonlítása útján.**

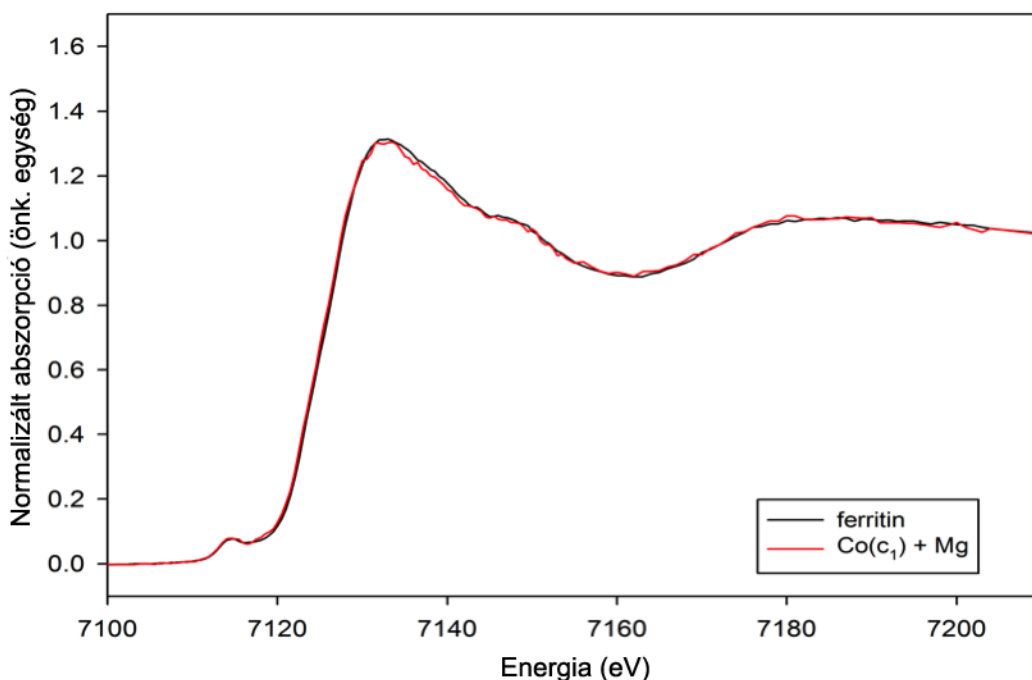
A ZR-75 sejteken különböző kezeléseket végeztünk: hipoxiás állapot mimikálása (Co(II), Ni(II)), oxidatív stressz előidézése (5-FU), a Co(II) és 5-FU hatásának megszüntetése (MgSO<sub>4</sub>), az elektron transzportlánc gátlása (antimycin A). A 36. *ábra* kezelt és kezeletlen ZR-75-1 sejtek XANES spektrumainak összehasonlítását mutatja Fe(II) és Fe(III) standardekével. Feltűnő, hogy a sejtek spektrumai majdnem teljesen egyformák, ami arra utal, hogy a Fe oxidációs állapota a sejtekben is nagyon hasonló. A spektrumok jó egyezést mutatnak a ferritin spektrumával is (32. *ábra*): a XANES spektrumok fő jellegzetességei majdhogynem teljesen egyformák. Jóllehet a sejtek spektrumai nagyon hasonlítanak a ferritinéhez, de a Fe(III)-EDTA és Fe(III)-citrát spektrumai is hasonló jellegzetességeket mutatnak.

A kobalt-kloriddal és magnézium-szulfáttal (Co(II) + Mg(II)) kezelt ZR-75-1 sejt minta spektruma majdnem teljesen megegyezik a ferritinével (37. *ábra*). Csak az 5-fluorouracillal és az antimycin A-val kezelt sejtek XANES spektrumaiban találunk eltérést a ferritinétől. Az 5-fluorouracil esetében az abszorpciós él nagyobb energiák felé tolódott (ami a Fe magasabb oxidációs állapotára utal). Az antimycin A kezelés hatással volt a spektrum lefutására, mely az Fe(II)- $\alpha,\alpha'$ -dipyridyl standard spektrumára hasonlít a legjobban. Viszont az abszorpciós él az antimycin A mintánál nagyobb energiánál található, mint az Fe(II)- $\alpha,\alpha'$ -dipyridyl standard esetében.



36. ábra: Kezelt és kezeletlen ZR-75-1 sejtek XANES spektrumainak összehasonlítása  $\text{FeCl}_2$  és  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  standardok spektrumával. A szürke vonalak a ferritin XANES spektrumának jellegzetes energiahelyeinél húzódnak (élelőtti csúcs, fehér vonal, váll és első minimumérték), elősegítve az energiaeltolódás felismerését.

5-FU = 130  $\mu\text{M}$  5-fluorouracil; Ctr = kontroll; A+Mg = 25  $\mu\text{M}$  antimycin A + 10 mM  $\text{MgSO}_4$ ; A = 25  $\mu\text{M}$  antimycin A;  $\text{Co}(c_1) + \text{Mg}$  = 2,4 mM  $\text{CoCl}_2$  + 10 mM  $\text{MgSO}_4$ ;  $\text{Co}(c_1) + \text{Mg}$  = 2,4 mM  $\text{CoCl}_2$  + 10 mM  $\text{MgSO}_4$ ;  $\text{Co}(c_2) + \text{Mg}$  = 57,6 mM  $\text{CoCl}_2$  + 10 mM  $\text{MgSO}_4$ ;  $\text{Co}(c_2)$  = 57,6 mM  $\text{CoCl}_2$ . A kezeléseket 20 percig végeztük.



37. ábra: Egy kezelt ZR-75-1 sejt minta XANES spektrumának összehasonlítása a ferritinével.  $\text{Co}(c_1) + \text{Mg} = 2,4 \text{ mM CoCl}_2 + 10 \text{ mM MgSO}_4$ .

A kezeletlen minták és a Co- vagy Ni-, vagy Co- és Mg-kezelt minták spektrumainak összehasonlításakor a hasonlóság szembetűnő (36. ábra). Az kezeletlen minták abszorpciós élének helyzete nem különbözik számottevően a kezeltékétől ( $\Delta \sim 0,5 \text{ eV}$ ). Tehát a  $\text{CoCl}_2$ -dal, illetve  $\text{NiCl}_2$ -dal végzett kezelések nem okoztak jelentős változást a XANES spektrumokban, bár meg kell jegyezni, hogy a kezelések csak 20 percig tartottak.

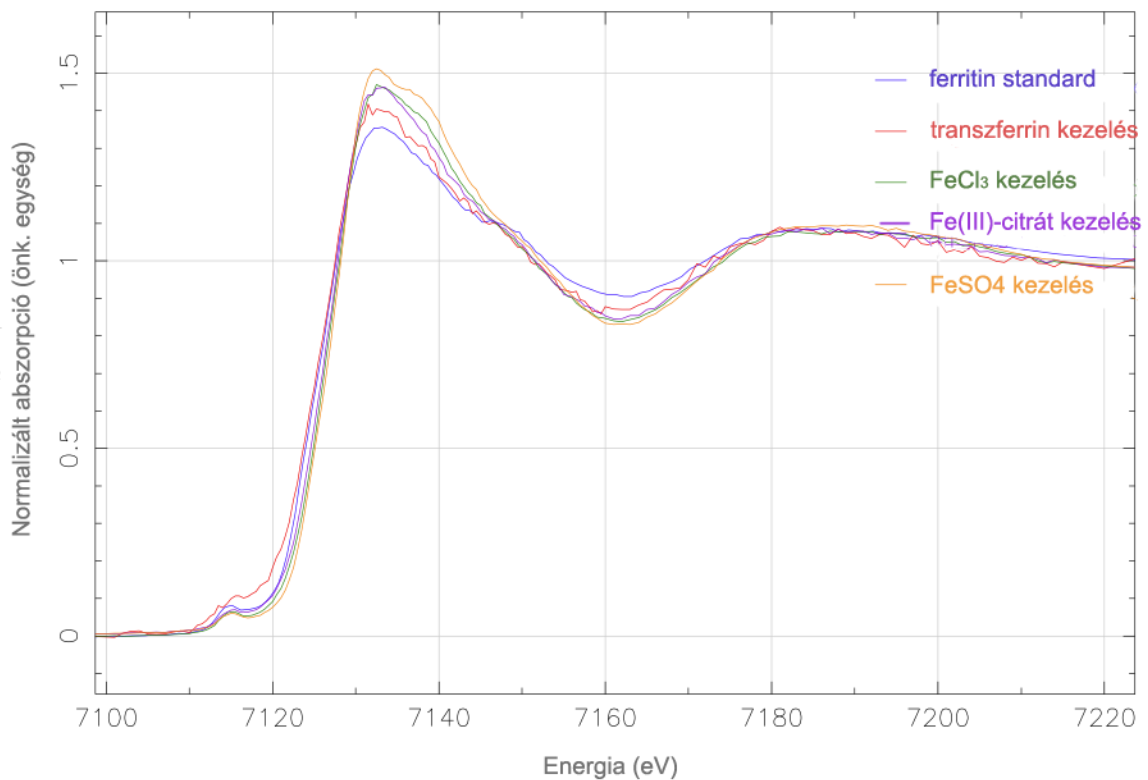
### 5.3.5. A különböző sejt vonalak, valamint a sejtek különböző növekedési fázisainak összehasonlítása

A sejtek növekedési görbéje különböző szakaszokra osztható: lag fázis, log fázis és plateau fázis. A lag fázisban a sejtek egy látens, növekedésmentes periódusban vannak. Ez a szakasz 12-24 óráig tart, mely alatt sejtek magukhoz térnek a tripszinizáció után, újjáépítik a citoszkeletonjukat, a letapadáshoz szükséges mátrixkomponenseket szekretálnak, eloszlanak a hordozófelületen. Ezután következik az exponenciális növekedés fázisa, a log fázis, mely során a sejtpopuláció egy meghatározott idő alatt megduplázódik. Ez a sejtszám megkétszereződéséhez szükséges idő jellemző az adott sejt vonalra. A következő periódus (plateau fázis) akkor következik be, amikor a

sejtenyészet túlszűfoltta válik, elfogy a tápoldatból a tápanyag, a sejtek kilépnek a sejtciklusból. Ebben a szakaszban gyakorlatilag már nincs sejtnövekedés, illetve sejtszaporodás.

Három adenokarcinóma (HT-29, ZR-75-1, MDA-MB231) és egy fibroszarkóma (HT-1080) sejtvonalat vizsgáltunk és összehasonlítottuk XANES spektrumaikat. A HT-29 sejtek esetében a különböző növekedési fázisok (lag, log, plateau) XANES spektrumait is felvettük. Az elvégzett XANES analízisek alapján megállapítható, hogy a vas molekuláris szintű környezete ugyanaz maradt a különböző fázisokban, valamint a vizsgált sejtvonalak között sem találtunk szignifikáns különbséget.

### 5.3.6. Vaskezelések hatása a HT-29 sejtek XANES spektrumaira



38. ábra: Különböző vasformákkal kezelt HT-29 sejtek XANES spektrumai.

HT-29 sejteket különböző vasformák ( $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{Fe(III)-citrát}$ ,  $\text{Fe(III)-transzferrin}$ )  $50 \mu\text{M}$  –os oldataival kezeltük 4 órán át FCS mentes tápoldatban, majd rögzítettük XANES spektrumaikat (38. ábra).

A  $\text{FeSO}_4$ -tal kezelt sejtek XANES spektrumában egy határozott vállrész látható az abszorpció él után. A  $\text{FeCl}_3$ -dal kezelt sejtek esetében sokkal kisebb vállrészt figyelhetünk meg, míg a  $\text{Fe}^{3+}$ -citráttal kezelteknél már egyáltalán nem lehet ilyen szakaszt felfedezni a spektrumon.

A kezelt sejtek spektrumai közül a transferrinnel kezelt sejtek XANES felvétele hasonlít leginkább a ferritin standardéhoz, de e két spektrum is jelentős különbségeket mutat. A transferrinnel kezelt sejtek vastartalma volt a legkisebb, így ez a spektrum a legzajosabb.

A XANES spektrumokból megállapítható, hogy az összes kezelt sejtben a vas +3 oxidációs állapotban található. Az 19. táblázat azt tartalmazza, hogy a különböző vasformákkal kezelt sejtek XANES spektrumai hogyan (milyen százalékos arányban) alakíthatóak ki a ferritin és a  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  standard XANES spektrumainak lineáris kombinációjával. A  $\text{FeSO}_4$ -tal kezelt sejtek spektruma a  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  standard spektrumával mutatott egyezést. (Természetesen a sejtekben nem lehetnek  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  kristályok, de a kezelt sejtek spektruma a Fe(III)-szulfát standard spektrumával közelíthető a legjobban.) A transferrinnel kezelt sejtek spektruma pedig a ferritin standardéval mutat nagy hasonlóságot.

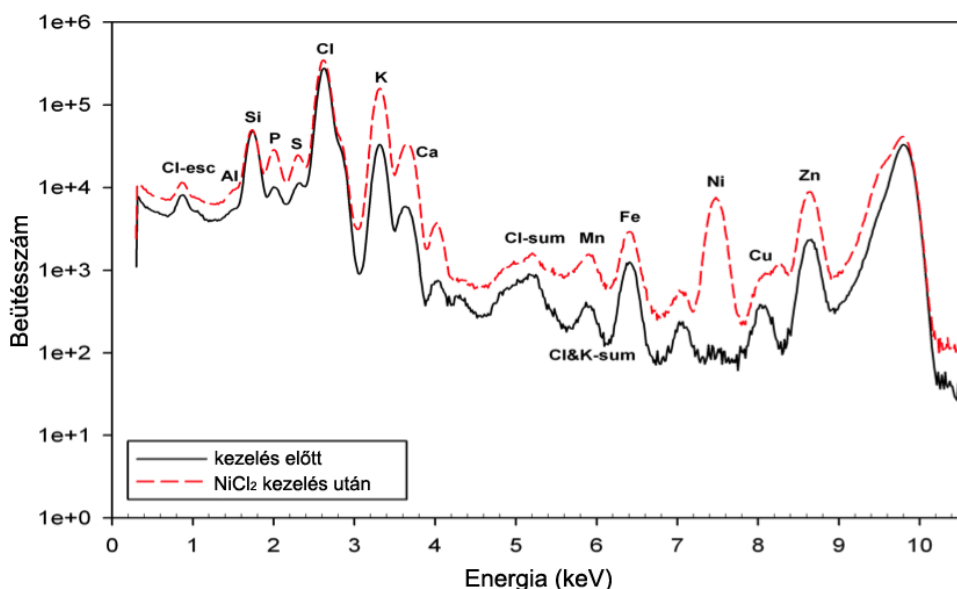
*19. táblázat:* A különböző vasformákkal kezelt sejtek XANES spektrumainak kialakítása a ferritin és a  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  standard XANES spektrumainak lineáris kombinációjával.

XANES spektrum	Ferritin standard	$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ standard
$\text{FeSO}_4$ kezelés	0%	100%
$\text{FeCl}_3$ kezelés	23%	77%
$\text{Fe}^{3+}$ -citrát kezelés	41%	59%
Transzferrin kezelés	91%	8%

### 5.3.7. A sejtek elemanalízise TXRF technikával

A bemutatott módszer és kísérleti elrendezés lehetővé teszi ugyanarról a mintáról XANES és TXRF spektrum felvételét is. Igen fontos a TXRF spektrum felvétele a XANES analízis előtt, mivel egyrészt a TXRF-fel ki lehet szűrni az esetlegesen szennyezett mintákat, másrészt a különböző fémekkel végzett kezelések könnyen

követhetővé válnak: az elemarányokat minden további analízis nélkül meg lehet állapítani. Ha mennyiségi meghatározást szeretnénk végezni, a S vagy a Zn használható belső standardként. A 39. ábra mutatja a NiCl<sub>2</sub>-dal kezelt HT-29 sejtek TXRF spektrumát a kezelés előtt és után. A kezeletlen sejtek spektrumában nincsen Ni csúcs, míg a kezelés után megjelenik a spektrumban. A különböző teljes beütésszám a kvarclapon lévő eltérő sejtszámmal magyarázható. A sejtekben található elemek pontos mennyiségi meghatározása ennél a módszernél nem volt munkánk célja. A kvantifikáció megvalósítható a minta egy másik részének feltárásával és megfelelő belső standard alkalmazásával. Ugyanakkor hangsúlyozni kell, hogy a lapra felvitt sejtmennyiség egy nagyságrenddel csökkenthető, ha nincs szükség XANES analízisre csak elemanalízisre.



39. ábra: HT-29 sejtek TXRF spektruma 4 órás, 1mM NiCl<sub>2</sub> kezelés előtt (—) és után (---).

Munkánk során bemutattuk, hogy az SR-TXRF-XANES geometriai elrendezés alkalmas a sejtekben lévő vas oxidációs állapotának meghatározására, valamint a félkvantitatív elemösszetétel megállapítására is. A módszer egyszerű, viszonylag gyors, a kontamináció veszélye minimális, köszönhetően a mintaelőkészítés kevés számú lépésének. A technika hátránya, hogy a felcseppentett sejtréteget mikroszkóposan ellenőrizni kell és a mintaréteg vastagsága nem lehet több mint egy sejtréteg (monolayer). A módszer alkalmas más elemek specieszeinek tanulmányozására is: Cr, Co, Ni, Cu, Zn.



## 6. Megbeszélés

### 6.1. Kisrendszámú elemek meghatározása biológiai mintákban „lowZ TXRF” technikával

A TXRF spektrometriát már több mint tíz éve alkalmazzák biológiai minták elemanalízisére is [217, 218, 219, 220]. Az azóta eltelt időben elfogadott analitikai módszerré vált és egyre szélesebb körben alkalmazzák [221, 222, 223, 224]. A módszer legnagyobb előnye, hogy csak kis mintamennyiségekre van szükség, valamint a biológiai minták közvetlen analízisére is alkalmazható [217, 221, 224]. A TXRF spektrometria továbbá egy szimultán módszer, mely viszonylag kis kimutatási határokat biztosít, belső standardizációval pedig a mennyiségi meghatározás is egyszerű [78]. A módszer legnagyobb hátránya egészen az utóbbi évekig az volt, hogy a  $Z < 13$  rendszámú elemek meghatározására nem lehetett használni, ugyanis a rendszám csökkenésével csökken a fluoreszcens foton energiája, vagyis párhuzamosan nő az önabszorpció jelentősége (a minta maga elnyeli a fluoreszcens fotonokat) [79]. Egy következő korlátozó tényező, hogy a klasszikus TXRF spektrométerben levegő atmoszférában folynak a mérések, a levegő pedig elnyeli a kisrendszámú elemek által emittált kis energiájú fluoreszcens fotonokat [80]. Bár ezek a problémák nem küszöbölhetőek ki teljesen, de nagy előrelépést jelent a Streltsov és munkatársai által tervezett, speciálisan kisrendszámú elemek TXRF meghatározására alkalmas spektrométer: Cr anódú röntgensóvel és vákuumkamrával [82].

A kis mennyiségű biológiai minták ( $\mu\text{g}$  tartomány) mintaelőkészítésével kapcsolatban már több tanulmány is megjelent. Bizonyos esetekben a mintákat közvetlenül a TXRF meghatározásoknál alkalmazott (kvarc)lapokra vitték fel [217, 225]. Ez a fajta mintaelőkészítés elég vastag mintaréteget eredményez. Mivel az önabszorpció okozta jelvesztés mértéke növekszik a rendszám csökkenésével, a közvetlen a reflektorokra történő mintaelőkészítés nem megfelelő a kisrendszámú elemek analízisére [226]. Ha a minta vastagságát szeretnénk csökkenteni, akkor a minta szervesanyag tartalmát kell eltávolítanunk. A kvarclapokon lévő minta közvetlen feltárását megvalósíthatjuk hideg plazmás hamvasztással [225] vagy atmoszférikus nyomáson történő savas feltárással. A savas feltárás hatékonysága növelhető mikrohullám és zárt feltáróbombák alkalmazásával. A minta hígulása és kontaminációja elkerülhető, ha a minta nem kerül közvetlen kapcsolatba a savval, vagyis gőzfázisú feltárást alkalmazunk [227, 228].

Munkánk során vizsgáltuk a „lowZ TXRF” technika alkalmazhatóságát biológiai minták esetében. Elvégeztük egy folyékony (humán szérum) és három szilárd biológiai referenciaanyagban (marhamáj, antarktisi rák, spenót) a visszanyerési értékek (Na, Mg, P, S, K, Ca) meghatározását különböző feltárási módszereket követően. Az eltérő szerves és szervetlenanyag-tartalommal rendelkező referenciaanyagokat feltárással, valamint kistérfogató, klasszikus és gőzfázisú [87], kvarclapon történő feltárást követően is analizáltuk „lowZ TXRF” spektrométerrel. Vizsgáltuk a különböző feltárási módszerek hatását a visszanyerésekre. Megállapítottuk, hogy nemcsak a szerves, hanem a szervetlenanyag tartalom is nehezíti az analízist.

Eredményeink más irodalmi adatokkal való összevetése nem könnyű, mivel a WOBISTRAX vákuumkamrás TXRF spektrométer 2004-es [229] bemutatása óta csak néhány tanulmány jelent meg biológiai minták kisrendszámú elemeinek analíziséről. Hoefler munkatársaival többféle környezeti és biológiai mintát is vizsgált [226]. NIST 1643e hitelesített vízmintát használták a kalibrációs görbe lineáris szakaszának meghatározására és azt találták, hogy a C esetében 600 ng/ teljes mintatömegig, a Na és a nagyobb rendszámú elemek esetében pedig 1000 ng/ teljes mintatömegig lineáris a kalibrációs görbe (Azonban csak a C, Na, Mg kalibrációs görbéit közlik). (1-10  $\mu$ L hitelesített vízmintát cseppentettek a kvarclapokra, beszárították és mérték. Ti belső standardot alkalmaztak.) Visszanyerési adatokat a hitelesített vízminta esetében nem közöl a tanulmány. A linearitásvizsgálatokhoz amyotróphiás lateral sclerosisban (ALS) szenvedő betegek cerebrospinális folyadékmintáit is felhasználták. A mintákat teflon bombákban 180 °C fokon, 4 órán át tárták fel. A mennyiségi meghatározáshoz Ti belső standardot használtak. A Mg, P, S lineáris analitikai görbéit közlik és leszögezik, hogy ez a lineáris kapcsolat a mintamennyiség és a beütésszám között fennáll az összes Mg-nál nagyobb rendszámú elem esetében. Közvetlenül a kvarclapokra növesztett biofilm mintákat is analizáltak. Ebben az esetben Ag volt a belső standard, mivel maga a minta is tartalmazott Ti-t. A C, Na, Mg, P, S, Cl, Ti esetében adnak meg kvantitatív eredményeket  $\text{ng}/\text{cm}^2$ -ben kifejezve. A vonatkoztatás oka, hogy a detektor kb. 1  $\text{cm}^2$  területet „lát”, viszont a biofilm az egész kvarclapot benőtte. A biofilmréteg inhomogenitása erősen megkérdőjelezi a különböző időtartamokig gyűjtött minták elemtartalmának összehasonlíthatóságát. A C esetében a kalibrációs görbe (víz alapú!)

600 ng/ teljes mintatömegig lineáris, viszont a bemutatott legtöbb minta esetében a teljes anyagtartalom az 1 cm<sup>2</sup>-es analizált területen is meghaladja a 600 ng-ot.

Ostachowicz és munkatársai ALS-ben szenvedő betegek szérum és cerebrospinális folyadékmintáit vizsgálták TXRF módszerrel [230]. A Na és Mg meghatározását „lowZ TXRF” spektrométerrel végezték el, míg a Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn, Br mennyiségét ATOMIKA EXTRA Ila spektrométerrel mérték meg. A mérési módszer hitelesítéséhez SRM Serum MIO 181 hitelesített szérum referenciaanyagot használtak, de a visszanyerési értékeket csak az ATOMIKA EXTRA Ila-val mért elemekre közlik, a Na és Mg esetében nem. A bevezetésben kiemelik, hogy a betegekből vett mintákat közvetlenül, mintaelőkészítés nélkül analizálják. A kísérleti részből viszont kiderül, hogy hígított salétromsavat adtak a mintákhoz, ami nem elhanyagolható momentum, mivel tapasztalataink szerint a szérumminta közvetlen a kvarclapra való felcseppentése bizonytalan geometriájú réteget eredményez.

Óvári és munkatársai biofilmek széntartalmát határozták meg ATI „lowZ TXRF” spektrométerrel [231]. A biofilmmintákat fagyasztva szárították, majd homogenizálták. A minták egy részét feltárták és természetes Ti tartalmukat ATOMIKA EXTRA Ila spektrométerrel Ga belső standard mellett meghatározták, majd a szuszpendált minták széntartalmát a minták természetes Ti tartalmára vonatkoztatták. A minták teljes széntartalmát MULTI N/C 2100 S típusú, Analytik Jena gyártmányú TOC/TN mérő készülékkel is meghatározták, a két módszerrel kapott eredmények közti eltérés 10% körül alakult (visszanyerés 91±8%). Vizsgálták a C tartalom „lowZ TXRF” meghatározásának linearitását, valamint a módszer reprodukálhatóságát is (5 egymást követő mérés relatív standard deviációja 9%-nak adódott). Nem találunk adatot a biofilmek egyéb kisrendszámú elemtartalmáról, az analizált minta összanyagtartalmáról sem, ami lehetlenné teszi az általunk analizált 4 féle referenciaanyag bármelyikével történő összehasonlítást.

A bemutatott tanulmányokból látható, hogy mennyire hiánypótlóak voltak az általunk elvégzett kísérletek, melyekkel 4 féle referenciaanyag és 3 féle feltárási módszer segítségével a biológiai minták szempontjából próbáltuk alaposan felmérni a „lowZ TXRF” spektrometriában rejlő lehetőségeket és annak korlátait.

Az általunk elvégzett munka tükrében elmondható, hogy a szérum referenciaanyagban a K és Ca meghatározható közvetlen analízissal is. A kisebb

rendszerű elemek esetében (P és S) a meghatározáshoz mátrixra illesztett kalibrációs faktorok használata javasolható. Elvileg mátrix-illesztett faktor bármely mintára alkalmazható, amennyiben a szórás nem haladja meg az egyébként elfogadott maximális 10%-os értéket, vagyis a mérés reprodukálható. Ehhez a gyakorlatban a minta nagyfokú homogenitása szükséges.

A "klasszikus" feltárás nagyon hatékony módszer nagy szerves és szervesetlen anyagtartalommal rendelkező minták esetében akkor, ha a hígítás után kapott oldatban a meghatározandó komponensek koncentrációja meghaladja a meghatározási határt.

A kistérfogatú feltárás esetében a minta szerves anyag tartalma nem távolítható el kielégítően, a szervesetlen mátrix hígítása túl kisfokú, így nagyobb lesz a háttér és a fluoreszcens sugárzás önabszorpciója is, ami rontja az analitikai teljesítményt.

A gőzfázisú feltárás esetében a szervesetlen komponensek hígítatlan jelenléte és a minta részleges lemosódása a kvarclapról (a kondenzált savcseppek miatt) egyáltalán nem teszi lehetővé a kvantitatív meghatározást.

A HT-29 sejtekben WOBISTRAX „lowZ TXRF” és ATOMIKA 8030C TXRF spektrométerrel is megmért S tartalom korrelációt mutatott a sejt számmal, melyet a későbbiekben a sejt szám ellenőrzésére is felhasználtunk.

## **6.2. Eredmények vonatkoztatása sejt minták esetében**

A sejt minták elem tartalmára kapott eredmények irodalmi adatokkal való összevetése több szempontból sem könnyű. Egyrészt a sejtek elem tartalma erősen függhet attól, hogy a sejt populáció a növekedési görbe mely szakaszán található a kísérlet elvégzésekor. Más a sejt metabolizmusa a lag, a log és a plató fázisban, más-más fehérjék termelődnek az egyes szakaszokban, és ez meghatározza, milyen nyomelemeket vesz fel vagy éppen ad le a sejt. Ez a probléma kiküszöbölhető oly módon, hogy a legtöbb biológiai kísérletet a log fázisban, 60-80%-os benőttégi szinten végzik, a sejteket pedig nem tartják fenn 10 passzáznál tovább. (Minden egyes passzázzsal nő a mutációk valószínűsége, mely megváltoztathatja a sejtek alapvető tulajdonságait: pl. morfológia, metabolizmus). Az irodalomban széles körben elfogadott, hogy a kísérleteket a 80%-os benőttégi szintnél végzik, ezt alkalmaztuk saját vizsgálatainknál is.

A következő nehézség az analitikai eredmények vonatkoztatása. A 2. táblázatban látható, hogy nagyon sokféle referenciát használnak a kutatók. Gyakori a sejtek fehérjetartalmára ( $\mu\text{g}$ ) és a száraz vagy nedves tömegre való vonatkoztatás, előfordul a DNS tartalom és a sejtszám, mint referencia, de van olyan tanulmány melyben egy másik sejtvonalra [133] vonatkoztatják eredményeiket. A tanulmányokban előfordul az is, hogy az elemarányokat mutatják be, elkerülve ezzel a referenciaválasztást, vagy egy olyan elemet választanak vonatkoztatási alapul, melyet állandónak tekintenek a sejtekben (Zn: [103, 62], S).

A száraz és nedves tömeg értékeket át lehet számítani egymásba, sejtminták esetében egyes tanulmányok a minta 85%-át [116, 117], míg mások 75%-át [43] tekintik víznek. (Természetesen csak megközelítő értékeket kapunk így.) A tömeg meghatározása már sokkal nagyobb gondot jelent. A tanulmányok nagy része nem is közli hogyan határozták meg a vonatkoztatási alapul szolgáló tömegértéket [125]. A száraz tömegre és fehérjetartalomra is megadja eredményeit Szoboszlai, valamint közli a sejtszám és fehérjetartalom közti összefüggést is [87]. A száraz tömeg meghatározását minden egyes mintánál külön elvégzi (a mintaelőkészítéskor a TXRF méréshez használt kvarclapra centrifugálja a sejteket, a kvarclap tömegét leméri előtte, illetve a 80 °C, 20 perc beszárítást követően is). A módszer pontos eredményt ad, de igen időigényes, nagyszámú minta esetében nem alkalmazható.

Az EPMA módszer esetében a száraz tömeget a STEM felvételek sötét területeinek intenzitásából számolják. (Mivel a fagyasztva-szárított minták szárazanyagtartalma és víztartalma lineáris összefüggést mutat az elasztikusan szórt elektronok intenzitásával, amelyet a STEM esetében a sötétmező intenzitásából számítanak ki.) [42, 44, 43]. Ez a módszer csak félkvantitatív meghatározást tesz lehetővé [4].

A PIXE módszer alkalmazásánál az eredmények vonatkoztatása többnyire száraz szervesanyagtartalomra/tömegre történik. Önmagában a PIXE technika nem ad teljes mértékben kvantitatív eredményeket. RBS módszerrel kombinálják ehhez, mely alkalmas a biológiai minták szerves anyagösszetételének felderítésére. Gyakran kapcsolják e két technikához a STIM analízist is, mellyel a minta sűrűségértéke készíthető el és a minta vastagsága határozható meg (2. táblázat).

Az SRXRF módszernél a  $\text{ng}/\text{cm}^2$  vonatkoztatáshoz vékony film standardokkal (NBS-1832, NBS-1833, Micromatter 4016) készített kalibrációt használnak. A SIMS esetében

a beütésszám/pixel vonatkoztatás gyakori, amit Strick és munkatársai referenciaanyag (nagy tisztaságú agaróz gélbe keverték a meghatározandó elemek ismert mennyiségét és így vették fel a kalibrációs görbét) segítségével számítottak át mM koncentrációba [110].

A sejtszám megadásánál is találunk vitatható módszereket. Hasegawa egy referencia tenyésztő lemezben (plate) meghatározott sejtszám alapján vonatkoztatja eredményeit  $/10^6$  sejtre [133]. Tehát az aktuális tenyésztő lemez-lyukban nem kerül sor sejtszám-meghatározásra, ami igen komoly hibalehetőséget hordoz magában. (Ugyanannyi sejtől kiindulva, azonos körülményeket alkalmazva sem lesz azonos sejtszám 1 tenyésztő lemezen belül sem. Két különböző tenyésztő lemez esetében pedig pl. csak a termosztátban való különböző elhelyezés okozta hőmérséklet-különbség,  $\text{CO}_2$  eltérés okozhat eltérést a sejtszámban.)

Kísérleteink során eleinte a fehérjetartalmat is meghatároztuk a sejtszám mellett, mint vonatkoztatási alapot. (Az összfehérje mennyiségét Bio-Rad Protein assay kittel határoztuk meg (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)). A sejtek fehérjetartalma viszont olyan mértékű bizonytalanságot mutatott, hogy végül a sejtszám mellett döntöttünk, mint referencia. (HT-29 sejtek esetében 30 független fehérjemeghatározást végeztünk kezeletlen, 80%-os benőttégi szintű sejtminiből. Az átlagos fehérjetartalom:  $219,79 \pm 83,92 \mu\text{g} / 10^6$  sejt volt. A tapasztalt 38,18 %-os szórást nem tartottuk elfogadhatónak, így a sejtszámot vagy a sejtek kéntartalmát – ami összefüggésben van a fehérjetartalommal - választottuk vonatkoztatási alapnak.)

A rákos sejtek esetében kapott eredmények értelmezésekor felmerül az igény „normál”, nem rákos sejtekkel való összehasonlításra. A nem rákos sejtekkel kapcsolatban alapvető probléma, hogy azokat nem lehet folyamatosan, hosszú időn át fenntartani, mivel nem szaporíthatók korlátlanul. Ha egy „normál” vagy nem rákos sejt vonal korlátlanul passzálható, az már azt jelenti, hogy valamilyen transzformált vagy transzfektált sejt vonalról van szó. Az irodalomban nincs olyan nem rákos sejt vonal, melyet széleskörűen elfogadnának, mint referencia normál sejt vonal. Kozubika és munkatársai a főtális vastagbélnyálkahártya (fetal colon mucosa) eredetű FHC (fetal human cells) sejt vonal részletes karakterizálását végezték el, valamint a spontán megszerzett immortalitás mechanizmusát vizsgálták. Vizsgálataik szerint a spontán bekövetkezett immortalizáció (így a folyamatos fenntarthatóság) a malignus

transzformáció egy korai fázisát mutatja be [232]. Tehát szó sincsen a hagyományos értelemben normál, nem rákos sejtvonalról.

### **6.3. Fe, Cu, Zn meghatározása TXRF és GF-AAS módszerrel HT-29 sejtekben**

Nagyon fontos a különböző klinikai kísérletek során a nyomelemek meghatározása a biológiai mintákban, de ez sok esetben igazi kihívást jelent az analitikusoknak. A különböző nemesfém-tartalmú (Pt, Rh) szerekkel végzett kezelések során ezen elemek nyommonkövetése nem jelent különösebb gondot, mivel a megfelelően érzékeny analitikai módszert nem befolyásolja a mintaelőkészítés során (savas mikrohullámú feltárás, majd vízzel hígítás) egy esetleges keresztszennyezés. A nehézségek azon elemek meghatározásánál kezdődnek, melyeknél a mintaelőkészítés során már sokkal nehezebb elkerülni a szennyezést. Ez az eset áll fenn a Fe, Cu, Zn meghatározásánál is, mivel a HT-29 sejtekben ezen elemek mennyisége: 10-20 ng/10<sup>6</sup> sejt (Fe), 4-8 ng/10<sup>6</sup> sejt (Cu), 40-80 ng/10<sup>6</sup> sejt (Zn). A meghatározandó elemek kis mennyisége miatt a mintaelőkészítés során a minta nagyfokú hígítása lehetlenné tenné a mikroanalitikai analízist, nem beszélve a desztillált vízben és a feltáráshoz használt savban mérhető vak értékekről. Az ilyen típusú minták esetében csak olyan analitikai módszerek jöhetnek szóba, melyek mintagénye csekély, de érzékenyséjük nagy: flow injection induktív csatolású plazma-tömegspektrometria (FI-ICP-MS), grafitkemencés atomabszorpciós spektrometria (GF-AAS), totálreflexiós röntgenfluoreszcens spektrometria (TXRF). Ezen három módszer felhasználását sejtminták analízisére az Analitikai módszerek fejezetben már bemutattuk (2. táblázat).

A kezeletlen HT-29 sejtek Fe, Cu, Zn tartalmára nyert adatokat nehéz irodalmi adatokkal összevetni. Szoboszlai és munkatársai határozták meg TXRF módszerrel ezen sejtvonal Fe, Cu, Zn tartalmát [87]. Azonban ez a tanulmány az eredményeket a szárazanyag, illetve fehérjetartalomra vonatkoztatja (Fe: 61,2 ± 15,4 µg/g, 115,2 ± 56,1 ng/mg protein, Cu: 8,2 ± 2,9 µg/g, 13,8 ± 0,8 ng/mg protein, Zn: 62,3 ± 3,0 µg/g, 118,3 ± 45,9 ng/mg protein). A cikkben megtalálható a sejtek átlagos fehérjetartalma is: 187 ± 39 µg/10<sup>6</sup> sejt. Ezen adat felhasználásával kiszámítottuk a sejtek Fe, Cu, Zn tartalmát 10<sup>6</sup> sejtre vonatkoztatva (20. táblázat). Jelentős az eltérés az eredmények között, bár Szoboszlai tanulmányában leírja, hogy a HT-29 sejtvonal esetében a fehérjetartalom, mint vonatkoztatási alap igen bizonytalan volt (több mint 20%-os volt a sejtek

fehérjetartalmának szórása) és ezért nem javasolja a fehérjetartalmat, mint referenciát ennél a sejtvonalnál.

20. táblázat: HT-29 sejtek Fe, Cu és Zn tartalma. Méréseink összevetése irodalmi adatokkal.

ng/ 10 <sup>6</sup> sejt	Fe	Cu	Zn
[87]	21,54 ± 10,49	2,58 ± 0,15	22,12 ± 8,58
Saját mérések	10,57 ± 0,97	4,55 ± 0,27	41,33 ± 3,07

A HT-29 sejtek fehérjetartalma hasonló tartományban van a két kísérletben. Szoboszlai kísérleteiben  $187 \pm 39 \mu\text{g}/10^6$  sejt, saját kísérleteinkben pedig  $219,79 \pm 83,92 \mu\text{g}/10^6$  sejt volt. Szoboszlai kísérleteiben a fehérjetartalom szórása 20% körül alakult, míg saját kísérleteinkben ennek közel dupláját tapasztaltuk (38,18 %), amit nem tartottuk elfogadhatónak, így a sejtszámot választottuk vonatkoztatási alpnak. A Zn/Cu és Zn/Fe arányokat vizsgálva a Zn/Cu arányban nincs jelentősebb eltérés (8,57 vs. 9,08), míg a Zn/Fe arány igen különböző volt (1,03 vs. 3,91).

A 2. táblázatban látható, hogy mely tanulmányokban határozták meg sejtek Fe, Cu, Zn tartalmát. Azonban ezen kísérletekben nem HT-29 sejtvonalalal dolgoztak, a vonatkoztatási alap pedig vagy a fehérjetartalom, vagy a tömeg, vagy a szervesanyagtartalom volt. Mindenezek alapján kvantitatív eredményeink ezen irodalmi adatokkal való összevetését teljesen értelmetlennek tartjuk.

Vizsgáltuk a kelátorkezelések hatását is a sejtek nyomelemtartalmára. Eredményeink alapján megállapítható, hogy az újgenerációs vaskelátorok vizsgálatakor nem elegendő a vas homeosztázisának nyomonkövetése, mivel a Dp44mT molekula esetében a HT-29 sejtek Cu és Zn tartalmának változását is igazoltuk. A <sup>59</sup>Fe izotóppal végzett vizsgálatok [23, 233] a többi kelatizálható fém mennyiségének alakulását nem követik, pedig ezeknek a változásoknak is lehet szerepe a végső, a sejtek szaporodását gátló hatásban, valamint ezen három elem homeosztázisa több ponton is összekapcsolódik (2.3.-2.7. fejezet).

#### 6.4. Mintaelőkészítés XANES technikához rákos sejtek esetében

A XANES meghatározások esetében a kísérleti elrendezés mellett a mintaelőkészítés a legfontosabb paraméter. A mintaelőkészítés során a sejteket fel kell vinni egy



hordozóra, mely kompatibilis a mérőhely kísérleti felépítésével, valamint biztosítanunk kell, hogy az általunk vizsgált elem oxidációs állapota ne változzon meg a mintaelőkészítés során.

Tenyésztett sejtek XANES analízisével mindössze egy tucatnyi tanulmány foglalkozik, az ezekben alkalmazott mintaelőkészítéseket vesszük sorra a következőkben.

Podgórczyk többféle mintaelőkészítést is alkalmazott kísérleteiben [180]. XANES spektrumokat vettek fel a Zn K abszorpciós élénél háromféle prosztatarák sejtvonal esetében. A sejteket nem kezelték előzetesen Zn-tartalmú sókkal. A sejteket tripszinezéssel vették fel a tenyésztő flaskákból, majd négyszer mosták őket PBS-sel. A PBS-t az utolsó centrifugálás után eltávolították, majd a sejteket 30 percig szobahőmérsékleten, ezt követően pedig 2 órán át 4 °C-on 2%-os fixálóoldatban (paraformaldehid vagy glutáraldehid PBS-ben) tartották. A fixálóoldat eltávolítása után a sejtszuszpenzióból 20 µL-es cseppeket tettek Mylar fóliára, majd beszárították. Referenciaként fixálatlan sejteket (csak PBS-ben szuszpendált) is felvittek fóliára. (A 2D imaging vizsgálatokhoz pedig közvetlenül a Mylar fóliára növesztették a sejteket, majd fixálták őket). Első kísérleteikben 1x, 2x vagy 3x20 µL-es sejtszuszpenzió-cseppeket tettek Mylar fóliára, hogy kiválasszák, melyik mintaelőkészítés biztosítja a legnagyobb jel/zaj arányt. Az eredmények fejezetben nem találunk összehasonlítást a fixált és nem fixált sejtpreparációval kapcsolatban. Nem derül ki az sem, hogy a 20 µL-es sejtszuszpenzió nagyságrendileg mennyi sejtet tartalmazhatott. (A cikk egyedül azt említi meg, hogy a ránövesztéses technika esetében túl kicsi volt a cink-jel ahhoz, hogy jól kiértékelhető 2D felvételeket készítsenek a sejtekről.) A mérésekhez 3x20 µL sejtszuszpenziót cseppentettek Mylar fóliára. Ennél a mintamennyiségnél már felmerül a kérdés, hogy mekkora lehetett az így keletkező réteg vastagsága, de a tanulmány ezzel a kérdéssel sem foglalkozik. Valószínűleg azért volt szükség ekkora mintamennyiség alkalmazására, mert a sejteket előzetesen nem kezelték Zn tartalmú sókkal, így azok Zn tartalma alacsony lehetett. Ugyanezt a mintaelőkészítést használták egy másik munkájukban, amikor S speciációját vizsgálták prosztatarákos sejteken [182]. Ebben a tanulmányukban vizsgálták a fixáló módszer (2%-os paraformaldehid vagy glutáraldehid oldata PBS-sel készítve, vagy PBS önmagában) hatását a kén XANES spektrumokra. Nem találtak különbséget a K abszorpciós él helyzetében a fixáló

módszertől függően. A sejtszuspenzióból kétszer 50  $\mu\text{L}$ -t cseppentettek a Mylar fóliára az analízishez. A mintaelőkészítési fejezet itt sem tesz említést arról, hogy mennyi sejtből indultak ki, illetve a fóliára cseppentett 50  $\mu\text{L}$ -nyi sejtszuspenzió nagyságrendileg mennyi sejtet tartalmazott.

Munro fagyasztva-szárított mintákat analizált [189]. Az arzenittel való kezelést követően a HepG2 sejteket kétszer mosták PBS-sel, a sejtfelülethez kötődött As eltávolítására. Ezután tripszinnel felvették őket, újabb kétszeri PBS-es mosás következett, majd a sejt-pelleteket folyékony nitrogénben lefagyasztották és abban tárolták. Analízis előtt 24-48 órán át fagyasztva szárították a mintákat és analízisig deszikkátorban tartották. Az analíziseket fluoreszcens módban 10 K ( $-263,15\text{ }^\circ\text{C}$ ) hőmérsékleten végezték el. Bonnitca [175] is fagyasztva-szárított sejteket analizált, de a tripszinezéssel felvett sejteket nemcsak PBS-sel mosta, hanem az egyik centrifugálási lépcsőben ammónium-acetátot, a következőben 70%-os etanolt használt és az így keletkezett sejt-pelletet liofilizálta. A fagyasztva szárított mintákat polikarbonát hordozóra helyezték és a Co XANES spektrumokat fluoreszcens módban 10 K-en ( $-263,15\text{ }^\circ\text{C}$ ) vették fel. A kobalttal nem kezelt sejtekről az elégtelen jelintenzitás miatt nem tudtak XANES felvételeket készíteni. Ez a tanulmány sem tesz említést a kiindulási, illetve analízisre kerülő sejtek számáról.

Harris és munkatársai is fagyasztva szárított mintákat használtak mikro-XANES és XANES analíziseikhez is [176, 184]. A mikro-XANES analízishez a feltripszinezett sejteket PBS-sel, illetve ammónium-acetáttal mosták, majd ammónium-acetátban reszuszpendálták. A szuszpenzióból öt 1  $\mu\text{L}$ -es cseppet (100-200 sejt/1  $\mu\text{L}$ ) Formvar filmre helyeztek és 48 órán át  $-56\text{ }^\circ\text{C}$ -on fagyasztva szárították. A főtömeg XANES analízishez kb. 17 millió sejtből készítettek pelletet 70%-os etanol segítségével és fagyasztva szárították  $-56\text{ }^\circ\text{C}$ -on 15 órán át. A mintákat analízis előtt 0,5 mm-es pelletekké préselték össze. A XANES spektrumokat 295 K-en ( $-21,85\text{ }^\circ\text{C}$ ) fluoreszcens módban vették fel. Egymás után több felvételt is készítettek ugyanarról a mintáról, hogy a sugárzás esetleges károsító hatását ellenőrizzék. Nem találtak eltolódást az abszorpciós él energiájában az egymás utáni scanek esetében.

Ortega is fagyasztva-szárított sejteket analizált fluoreszcens módban [186]. A tanulmány leírása szerint körülbelül 200 sejtben lévő vasmennyiség adott elegendő jelet ahhoz, hogy megfelelő Fe XANES felvételeket lehessen készíteni. Egy következő

munkájukban a sejteket közvetlenül a polikarbonát vagy Formvar filmre tenyésztették. A kezelést követően a sejteket PBS-sel mosták és kétféle mintaelőkészítést is alkalmaztak. Az egyik esetben a sejteket 20 másodpercre  $-164\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on kriofixálták, majd folyékony nitrogénben tárolták az analízisig. A másik esetben a sejteket  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on fagyasztva szárították és deszikkátorban tartották az analízisig. A Cr XANES analíziseket szobahőmérsékleten levegő atmoszférában, valamint 170 K-en ( $-103,15\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on) nitrogénáramban is elvégezték. Azt tapasztalták, hogy a fagyasztva szárítás nem befolyásolta a sejtekben található króm oxidációs állapotát.

Hall is fagyasztva-szárított sejtek Pt (L3 él) XANES analízisét végezte el 12 K-en ( $-261,15\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on) [183].

Wellenreuther a Zn mikro-XANES analízisek elvégzéséhez Kapton fóliára növesztett sejteket használt. A hirtelen, folyékony nitrogénben lefagyasztott sejteket analizálták [181].

Bacquart [187] a sejteket a tápoldatba helyezett 2%-os zselatin géllal kezelt  $2\text{ }\mu\text{m}$  vastagságú polikarbonát filmre növesztette, illetve kezelte vas-szulfáttal vagy arzén-trioxiddal. Kezelést követően fiziológiás pufferrel mosta le a sejtekről az aspecifikusan kötődött vasat, illetve arzént. Ezután a mintákat kriofixálta  $-160\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, majd vagy  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on fagyasztva szárította és szobahőmérsékleten tárolta, illetve analizálta, vagy a kriofixálást követően a sejteket folyékony nitrogénben tárolta és  $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on analizálta (fagyasztott-hidratált állapotban). Fe és As mikro-XANES analíziseket végzett az így előkészített sejteken. A szobahőmérsékleten, a fagyasztva szárított mintákról készített As XANES felvételek esetében azt tapasztalta, hogy a jelintenzitás a 3. felvétel alatt drasztikusan lecsökkent (kb. 18 perc analízis idő után), míg a fagyasztott-hidratált állapotban lévő sejtek  $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történő analízisekor a fluoreszcens jel a 6. felvétel készítésekor (kb. 36 perc analízisidő után) is kellően nagy volt. A Fe abszorpciós spektrumában, az abszorpciós él helyzetében viszont nem találtak eltérést a mintaelőkészítéstől függően (fagyasztva-szárítás, analízis szobahőmérsékleten vs. fagyasztott-hidratált sejtek analízise  $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on). A szerzők szerint fagyasztott-hidratált állapotban lévő sejtek  $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on való analízise ajánlott, ha a mikro-XANES analízisre kiválasztott elem koncentrációja a speciációs határérték közelében van (limit of detection itt limit of speciation), tehát hosszú besugárzási idő szükséges a felvételek elkészítésére, mely során a sugárzás károsító hatása és ezzel a jelintenzitás drasztikus

csökkenése várható. Fagyasztva-szárított sejtminták mikro-XANES analízise kivitelezhető szobahőmérsékleten (amennyiben a mintát a röntgensugár nem roncsolja), ha a vizsgált elem kellően nagy koncentrációban van jelen a sejtben (legalább ötszöröse a speciációs határnak), így a felvételek elkészítéséhez szükséges besugárzási idő rövid. Bacquart [188] egy másik mikro-XANES tanulmányában is az előzőekben bemutatott mintaelőkészítést használta: a kriofixálást követően a sejteket folyékony nitrogénben tárolta és 150 K-en analizálta fagyasztott-hidratált állapotban.

Az általunk kidolgozott mintaelőkészítési módszert használva 5 egymás utáni Fe XANES felvétel esetében sem csökkent a jelintenzitás, valamint a Fe abszorpciós élének helye sem változott. Tehát esetünkben a sugárzás nem károsította a mintát és nem befolyásolta a Fe speciációját, mivel az általunk alkalmazott nagyobb átmérőjű sugárnyaláb felületegységként kisebb energiasűrűséget eredményez, mint a mikro-XANES analíziseknél alkalmazott igen kis átmérőjű sugárnyaláb. Az Eredmények fejezetben közöltük, hogy a sejtekben található vas legnagyobb része Fe(III) állapotban található, mely eredmény jó egyezést mutat az irodalmi adatokkal [187, 186], bizonyítva ezzel, hogy a Fe XANES analíziséhez nem feltétlen szükséges a sejtek fagyasztott-hidratált állapotban tartása, valamint az analízis  $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on való kivitelezése.

## 7. Következtetések

### 7.1. Kisrendszámú elemek ( $Z \leq 23$ ) TXRF meghatározása

A kisrendszámú elemek TXRF meghatározása esetében a legnagyobb probléma a minta önabszorpciója és ennek hatása a meghatározni kívánt elemek dinamikus tartományára. Ezért az első kísérletben a Ti-ra vonatkoztatott kalibrációs faktorok változását vizsgáltuk a Na, Mg, P, S, K, Ca esetében különböző koncentrációtartományokban. A későbbiekben munkánk során a referenciaanyagok elemtartalmának meghatározásához mindig a mintában található elemek koncentrációjának megfelelő kalibrációs faktorokat alkalmaztuk.

Munkánk további részében vizsgáltuk a „lowZ TXRF” technika alkalmazhatóságát biológiai minták esetében. Elvégeztük egy folyékony (SERONORM humán szérum) és három szilárd biológiai referenciaanyagban (NIST 1577a marhamáj, MURST-ISS-A2 antarktisi rák, IAEA-331 spenót) a visszanyerési értékek (Na, Mg, P, S, K, Ca) meghatározását különböző feltárási módszereket követően. Az eltérő szerves és szervetlenanyag-tartalommal rendelkező referenciaanyagokat feltárással nélkül, valamint kistérfogatú, klasszikus és kvarclapon végzett gőzfázisú feltárással is vizsgáltuk „lowZ TXRF” spektrométerrel. Vizsgáltuk a különböző feltárási módszerek hatását a visszanyerésekre.

A szérum referenciaanyag esetében elmondható, hogy a K és Ca meghatározható a mintában közvetlen analízissel is (feltárással nélkül). A kisebb rendszámú elemek esetében az önabszorpció megakadályozza a pontos kvantitatív analízist; a P és S esetében a meghatározáshoz a mátrixnak megfelelő kalibrációs faktorok használata javasolható.

A „klasszikus” feltárási hatékony módszer nagy szerves és szervetlen anyag-tartalommal rendelkező minták esetében akkor, ha a hígítás után kapott oldatban a meghatározandó komponensek koncentrációja meghaladja a meghatározási határt.

A kistérfogatú feltárással esetében a minta szerves anyag-tartalma nem távolítható el kielégítően, a szervetlen mátrix hígítása túl kisfokú, így nagyobb lesz a háttér és a fluoreszcens sugárzás önabszorpciója is, ami rontja az analitikai teljesítményt.

A gőzfázisú feltárással esetében a szervetlen komponensek hígíthatatlan jelenléte és a minta részleges lemosódása a kvarclapról (a kondenzált savcseppek miatt) egyáltalán nem teszi lehetővé a kvantitatív meghatározást.

A HT-29 sejtekben WOBISTRAX „lowZ TXRF” és ATOMIKA 8030C TXRF spektrométerrel is megmért S tartalom korrelációt mutatott a sejtszámmal, melyet a későbbiekben a sejtszám ellenőrzésére is felhasználtunk.

## **7.2. Fe, Cu, Zn meghatározása TXRF és GF-AAS módszerrel HT-29 sejtekben**

Az eredmények fejezetben bemutatott multieleemes TXRF és szimultán GF-AAS módszer alkalmas a különböző vasvegyületekkel (FeSO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub>, (Fe(III)-citrát, Fe(III)-transzferrin)) kezelt HT-29 sejtek Fe és Cu tartalmának meghatározására. A sejtek mintaelőkészítésére használt módszer egyszerű: 24 órán át a sejteket a centrifugálásukhoz is használt Eppendorf csövekben tárjuk fel 65%-os salétromsav és 30%-os hidrogén-peroxid elegyében. Bár a módszerrel teljes feltárás nem érhető el, a TXRF és GF-AAS módszerrel pontos analitikai meghatározásokat lehetett elérni ilyen biológiai mintamátrixban is. A kontamináció veszélyét pedig minimálisra csökkentettük ezzel a mintaelőkészítéssel. A TXRF és GF-AAS módszerrel mért Cu és Fe adatok jó egyezést mutattak. A nagyobb Fe koncentrációkat, valamint a sejtek Zn tartalmát csak TXRF módszerrel lehetett meghatározni.

A vasszámítások kapcsolatban megállapítható, hogy FCS mentes környezetben a sejtek 5-50-szer több vasat vettek fel, mint FCS-es tápoldatból, illetve különbségeket lehetett megfigyelni a különböző típusú vasvegyületek felvétele között is.

A kidolgozott módszerekkel lehetséges a rákos sejtek Fe, Cu, Zn tartalmának követése, melyet a vaskelátorokkal végzett kísérleteinknél is felhasználtunk. A HT-29 sejteken az újgenerációs vaskelátor Dp44mT-vel végzett kísérletek alapján megállapítható, hogy ez a vegyület nemcsak a sejtek vas-, hanem réz- és cinkhomeosztázisát is befolyásolja.

Az legújabb, antiproliferatív hatással rendelkező vaskelátorok hatásmechanizmusa intenzív kutatás tárgya és a legígéretesebb molekulákkal már klinikai fázis I és II vizsgálatok folynak. A vaskelátorokkal folyó kísérletekben sokféle sejtbiológiai paramétert mérnek a kutatók és a tanulmányok nagytöbbségében a sejtek vastartalmának változását <sup>59</sup>Fe izotóppal követik nyomon. Eredményeink alapján javasolható a vaskelátorokkal végzett kísérletek esetében a réz- és cinktartalom

nyomonkövetése is, mely elemek koncentrációváltozásának is szerepe lehet az antiproliferatív hatás kialakulásában.

### 7.3. SR-TXRF-XANES

A XANES módszer segítségével lehetőségünk nyílt a rákos sejtekben a vas oxidációs állapotának és koordinációs környezetének vizsgálatára. Munkánk során először megfelelő mintaelőkészítési módszert dolgoztunk ki rákos sejtek SR-TXRF-XANES analíziséhez, majd a kidolgozott módszert használtuk különböző rákos sejtvonalak (ZR-75-1, HT-29, MDA-MB-231, HCA-7), valamint eltérő növekedési fázisban (lag, log, plateau) lévő sejtek analíziséhez. Vizsgáltuk továbbá a különböző vegyszerekkel ( $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ , 5-fluorouracil, antimycin A) és vasformákkal való ( $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{FeCl}_3$ , Fe(III)-citrát, Fe(III)-transzferrin) kezelés hatását a vas oxidációs állapotára és koordinációs környezetére a sejtekben.

Munkánkkal bemutattuk, hogy a kidolgozott mintaelőkészítési módszer (a sejtuszpenzió kvarclapra való felcseppentése) és a SR-TXRF-XANES geometriai elrendezés alkalmas a sejtekben lévő vas oxidációs állapotának meghatározására, valamint a félkvantitatív elemösszetétel megállapítására is. A módszer egyszerű, viszonylag gyors, a kontamináció veszélye minimális köszönhetően a mintaelőkészítés kevés számú lépésének. A technika hátránya, hogy a felcseppentett sejtréteget mikroszkóposan ellenőrizni kell és a mintaréteg vastagsága nem lehet több mint egy sejtréteg (monolayer). A módszer alkalmas lehet más elemek tanulmányozására is: Cr, Co, Ni, Cu, Zn.

Az elvégzett sejt-XANES analízisek alapján megállapítható, hogy a vas molekuláris szintű környezete ugyanaz maradt a különböző növekedési fázisokban, valamint a vizsgált sejtvonalak között sem találtunk szignifikáns különbséget.

A  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ , kezelések után a Fe oxidációs állapota a sejtekben gyakorlatilag változatlan. A kezelt sejtek spektrumai jó egyezést mutattak a ferritin spektrumával. Az 5-fluorouracil és antimycin A kezelések esetében azonban eltérést tapasztaltunk az abszorpciós él helyzetében a ferritin spektrumához viszonyítva (az 5-fluorouracil esetében az abszorpciós él nagyobb energiák felé tolódott, ami a Fe magasabb oxidációs állapotára utal; az antimycin A kezelés pedig hatással volt a spektrum lefutására).

A sejtek különböző vasformákkal való kezelése után felvett XANES spektrumok lefutásában találunk eltéréseket, de ezeknek értelmezése még további kísérleteket igényel.



## 8. Összefoglalás

A disszertáció három részre tagolható. **Az első részben** biológiai mintákban lévő kisrendszámú elemek ( $Z \leq 23$ ) meghatározásának lehetőségét vizsgáltuk totálreflexiós röntgenfluoreszcens spektrometriai (TXRF) módszerrel. Humán szérum, marhamáj, antarktisi rák és spenót referenciaanyagokat elemeztünk kistérfogató, klasszikus és gőzfázisú, kvarclapon történő feltárást követően. Kísérleteink alapján a biológiai mintákban lévő kisrendszámú elemek meghatározásához elsődlegesen a klasszikus feltárási módszer ajánlható. **A második részben** HT-29 sejtek Fe, Cu, Zn tartalmát határoztuk meg TXRF módszerrel és kidolgoztuk az ehhez szükséges mintaelőkészítés lépéseit. Hitelesített sejtreferenciaanyag hiányában a TXRF módszerrel kapott eredményeket grafítkemencés atomabszorpciós spektrometriával (GF-AAS) ellenőriztük. A kidolgozott módszerrel a vas különböző vegyületeivel ( $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{FeCl}_3$ , Fe(III)-citrát, Fe(III)-transzferrin), illetve kelátorokkal (Dp44mT, EDTA) kezelt HT-29 sejtek Fe, Cu és Zn tartalmát mértük. A kidolgozott mintaelőkészítési módszer alkalmas  $0,2-10 \times 10^6$  sejt Fe, Cu és Zn tartalmának meghatározására TXRF, illetve GF-AAS módszerrel. A vasfelvételi kísérletekkel kapcsolatban megállapítható, hogy FCS (fetal calf serum) mentes környezetben a sejtek 5-50-szer több vasat vettek fel, mint FCS-es tápoldatból, valamint különbségeket lehetett megfigyelni a különböző típusú vasvegyületek felvétele között is. A HT-29 sejteken az újgenerációs vaskelátor Dp44mT-vel végzett kísérletekkel igazoltuk, hogy ez a vegyület nemcsak a sejtek vas-, hanem réz- és cinkhomeosztázisát is befolyásolja. Munkánk **harmadik részében** mintaelőkészítési módszert dolgoztunk ki SR-TXRF-XANES (synchrotron radiation induced total reflection X-ray fluorescence/X-ray absorption near edge structure) elemzésekhez a vas oxidációs állapotának meghatározására rákos sejtekben. A kidolgozott mintaelőkészítési módszer és a SR-TXRF-XANES geometriai elrendezés alkalmas a sejtekben lévő vas oxidációs állapotának meghatározására, valamint a félkvantitatív elemösszetétel megállapítására is. A  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$  vegyületekkel való kezeléseket után a Fe oxidációs állapota a sejtekben gyakorlatilag változatlan. A kezelt sejtek spektrumai jó egyezést mutattak a ferritin spektrumával. Az 5-fluorouracil és antimycin A kezeléseket esetében azonban eltérést tapasztaltunk az abszorpciós él helyzetében a ferritin spektrumához viszonyítva.

## 9. Summary

The thesis can be divided in three parts. **The first section** is devoted to the determination of the „low Z” elements ( $Z \leq 23$ ) in different biological matrices by total reflection X-ray fluorescence (TXRF) method. Human serum, bovine liver, Antarctic krill and spinach certified reference materials were analyzed after microwave assisted acid digestion in conventional and micro-vessels, as well as vapor-phase acid digestion performed directly on the TXRF carrier plates. On the basis of the results, the conventional acid digestion can be primarily recommended for the determination of „low Z” elements in biological matrices. **The second part** deals with the microanalytical method development for Fe, Cu and Zn determination in HT-29 colorectal cancer cells. In the lack of certified reference materials, the accuracy of the results was checked by performing measurements with GF-AAS. The developed microanalytical methods were used for the determination of Fe, Cu and Zn in HT-29 cells treated with different iron compounds (Fe(II) sulfate, Fe(III) chloride, Fe(III) citrate and Fe(III) transferrin) and iron chelators (Dp44mT, EDTA). The developed sample preparation method is suitable for the TXRF or GF-AAS determination of Fe, Cu, Zn in  $0,2 - 10 \times 10^6$  cells. Concerning the experiments aiming at iron uptake it could be established that iron uptake by HT-29 cells incubated in FCS-free medium was cca. 5–50 times higher compared to cells cultured in FCS supplemented medium and significant differences in the iron uptake compared to the iron supply were observed. On the basis of the experiments using the novel iron chelator Dp44mT it can be concluded that this chelator influences not only Fe but also Cu and Zn homeostasis of cancer cells. **The third part** of the thesis deals with development of a sample preparation procedure to determine the oxidation state of Fe in human cancer cells by using X-ray absorption near edge structure (XANES) analysis in combination with synchrotron radiation (SR) induced TXRF acquisition. The developed sample preparation method and the SR-TXRF-XANES geometric arrangement were suitable for XANES studies of iron in cells and for semiquantitative determination of elemental composition. The oxidation state of iron in cells treated with  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$  was practically unchanged and their XANES spectra were very similar to that of ferritin. However, differences in the position of the absorption edge were observed in XANES spectra of cells treated with 5-fluorouracil and antimycin A.

## 10. Irodalomjegyzék

- 
- [1] Gergely P, Erdődi F, Vereb Gy. Általános és bioszervetlen kémia. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2005: 226.
- [2] Garcia JS, Schmidt de Magalhaes C, Arruda MAZ. (2006) Trends in metal-binding and metalloprotein analysis. *Talanta* 69: 1-15.
- [3] La Calle Guntinas MB, Bordin G, Rodriguez AR. (2002) Identification, characterization and determination of metal-binding proteins by liquid chromatography. A review. *Anal Bioanal Chem.* 374: 369-378.
- [4] McRae R, Bagchi P, Sumalekshmy S, Fahrni CJ. In Situ Imaging of Metals in Cells and Tissues. (2009) *Chem Rev.* 109: 4780-4827.
- [5] Gergely P, Erdődi F, Vereb Gy. Általános és bioszervetlen kémia. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2005: 237-274.
- [6] Arredondo M, Núñez MT. (2005) Iron and copper metabolism. *Mol Aspects Med,* 26:313-327.
- [7] Richardson DR, Kalinowski DS, Lau S, Jansson PJ, Lovejoy DB. (2009) Cancer cell iron metabolism and the development of potent iron chelators as antitumor agents. *Biochim Biophys Acta,* 1790: 702-717.
- [8] Kalinowski DS, Richardson DR. (2005) The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacol Rev.* 57: 547-583.
- [9] Buss JL, Torti FM, Torti SV. (2003) The role of iron chelation in cancer therapy. *Curr Med Chem.* 10: 1021-1034.
- [10] Kalinowski DS, Richardson DR. (2007) Future of toxicology – iron chelators and differing modes of action and toxicity: the changing face of iron chelation therapy. *Chem Res Toxicol.* 20: 715-720.
- [11] Richardson DR. (2005) Molecular mechanisms of iron uptake by cells and the use of iron chelators for the treatment of cancer. *Curr Med Chem.* 12: 2711-2729.
- [12] Blatt J. (1994) Deferoxamine in children with recurrent neuroblastoma. *Anticancer Res.* 14: 2109-2112.

- 
- [13] Selig RA, White L, Gramacho C, Sterling-Levis K, Frase IW, Naidoo D. (1998) Failure of iron chelators to reduce tumor growth in human neuroblastoma xenografts. *Cancer Res.* 58: 473-478.
- [14] Yu Y, Wong J, Lovejoy DB, Kalinowski DS, Richardson DR. (2006) Chelators of the cancer coalface:desferrioxamine to triapine and beyond. *Clin Cancer Res.* 12: 6876-6883.
- [15] Olivieri NF, Brittenham GM. (1997) Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia. *Blood* 89: 739-761.
- [16] Samuni AM, Krishna MC, DeGraff W, Russo A, Planalp RP, Brechbiel MW, Mitchell JB. (2002) Mechanisms underlying the cytotoxic effects of Tachpyr – a novel metal chelator. *Biochim Biophys Acta* 1571: 211-218.
- [17] Torti SV, Torti FM, Whitman SP, Brechbiel MW, Park G, Planalp RP. (1998) Tumor cell cytotoxicity of a novel metal chelator. *Blood* 92: 1384-1389.
- [18] Abeysinghe RD, Greene BT, Haynes R, Willingham MC, Turner J, Planalp RP, Brechbiel MW, Torti FM, Torti SV. (2001) p53-independent apoptosis mediated by tachpyridine, an anti-cancer iron chelator. *Carcinogenesis* 22: 1607–1614.
- [19] Chantrel-Groussard K, Gaboriau F, Padeloup N, Havouis R, Nick H, Pierre JL, Brissot P, Lescoat G. (2006) The new orally active iron chelator ICL670A exhibits a higher antiproliferative effect in human hepatocyte cultures than O-trensox. *Eur J Pharmacol.* 541: 129–137.
- [20] Lescoat G, Chantrel-Groussard K, Padeloup N, Nick H, Brissot P, Gaboriau F. (2007) Antiproliferative and apoptotic effects in rat and human hepatoma cell cultures of the orally active iron chelator ICL670 compared to CP20: a possible relationship with polyamine metabolism. *Cell Prolif.* 40: 755–767.
- [21] Richardson DR, Ponka P. (1994) The iron metabolism of the human neuroblastoma cell: lack of relationship between the efficacy of iron chelation and the inhibition of DNA synthesis. *J Lab Clin Med.* 124: 660–671.
- [22] Richardson DR, Tran EH, Ponka P. (1995) The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents, *Blood* 86: 4295–4306.
- [23] Richardson DR, Milnes K. (1997) The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents II: the mechanism of

---

action of ligands derived from salicylaldehyde benzoyl hydrazone and 2-hydroxy-1-naphthylaldehyde benzoyl hydrazone. *Blood* 89: 3025–3038.

[24] Chaston TB, Richardson DR. (2003) Interactions of the pyridine-2-carboxaldehyde isonicotinoyl hydrazone class of chelators with iron and DNA: implications for toxicity in the treatment of iron overload disease. *J Biol Inorg Chem*. 8: 427–438.

[25] Green DA, Antholine WE, Wong SJ, Richardson DR, Chitambar CR. (2001) Inhibition of malignant cell growth by 311, a novel iron chelator of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class: effect on the R2 subunit of ribonucleotide reductase. *Clin Cancer Res*. 7: 3574–3579.

[26] Bernhardt PV, Caldwell LM, Chaston TB, Chin P, Richardson DR. (2003) Cytotoxic iron chelators: characterization of the structure, solution chemistry and redox activity of ligands and iron complexes of the di-2-pyridyl ketone isonicotinoyl hydrazone (HPKIH) analogues, *J Biol Inorg Chem*. 8: 866–880.

[27] Agrawal KC, Sartorelli AC. (1978) The chemistry and biological activity of alpha-(N)-heterocyclic carboxaldehyde thiosemicarbazones. *Prog Med Chem*. 15: 321–356.

[28] Antholine W, Knight J, Whelan H, Petering DH. (1977) Studies of the reaction of 2-formylpyridine thiosemicarbazone and its iron and copper complexes with biological systems. *Mol Pharmacol*. 13: 89–98.

[29] Sartorelli AC, Agrawal KC, Moore EC. (1971) Mechanism of inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by alpha-(N)-heterocyclic aldehyde thiosemicarbazones. *Biochem Pharmacol*. 20: 3119–3123.

[30] Sartorelli AC, Booth BA. (1967) Inhibition of the growth of sarcoma 180 ascites cells by combinations of inhibitors of nucleic acid biosynthesis and the cupric chelate of kethoxal bis-(thiosemicarbazone). *Cancer Res*. 27: 1614–1619.

[31] Chaston TB, Lovejoy DB, Watts RN, Richardson DR. (2003) Examination of the antiproliferative activity of iron chelators: multiple cellular targets and the different mechanism of action of triapine compared with desferrioxamine and the potent pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogue 311. *Clin Cancer Res*. 9: 402–414.

[32] Shao J, Zhou B, Di Bilio AJ, Zhu L, Wang T, Qi C, Shih J, Yen Y. (2006) A ferrous-triapine complex mediates formation of reactive oxygen species that inactivate human ribonucleotide reductase. *Mol Cancer Ther*. 5: 586–592.

- 
- [33] Knox JJ, Hotte SJ, C Kollmannsberger, E Winqvist, B Fisher, EA Eisenhauer. (2007) Phase II study of triapine(R) in patients with metastatic renal cell carcinoma: a trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (NCICIND.161). *Inv New Drugs*. 25: 471-477.
- [34] Gojo I, Tidwell ML, Greer J, Takebe N, Seiter K, Pochron MF, Johnson B, Sznol M, Karp JE. (2007) Phase I and pharmacokinetic study of triapine, a potent ribonucleotide reductase inhibitor, in adults with advanced hematologic malignancies. *Leuk Res*. 31: 1165–1173.
- [35] Mackenzie MJ, Saltman D, Hirte H, Low J, Johnson C, Pond G, Moore MJ. (2007) A Phase II study of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) and gemcitabine in advanced pancreatic carcinoma. A trial of the Princess Margaret hospital Phase II consortium. *Inv New Drugs*. 25: 553–558.
- [36] Lovejoy DB, Richardson DR. (2002) Novel "hybrid" iron chelators derived from aroylhydrazones and thiosemicarbazones demonstrate high anti-proliferative activity that is selective for tumor cells. *Blood* 100: 666–676.
- [37] Kalinowski DS, Yu Y, Sharpe PC, Islam M, Liao YT, Lovejoy DB, Kumar N, Bernhardt PV, Richardson DR. (2007) Design, Synthesis, and Characterization of Novel Iron Chelators: Structure-Activity Relationships of the 2-Benzoylpyridine Thiosemicarbazone Series and Their 3-Nitrobenzoyl Analogues as Potent Antitumor Agents. *J Med Chem*. 50: 3716-3729.
- [38] Yuan J, Lovejoy DB, Richardson DR. (2004) Novel di-2-pyridyl-derived iron chelators with marked and selective antitumor activity: in vitro and in vivo assessment. *Blood* 104: 1450–1458.
- [39] Whitnall M, Howard J, Ponka P, Richardson DR. (2006) A class of iron chelators with a wide spectrum of potent antitumor activity that overcomes resistance to chemotherapeutics. *Proc Natl Acad Sci. U. S. A.* 103: 14901–14906.
- [40] Richardson DR, Sharpe PC, Lovejoy DB, Senaratne D, Kalinowski DS, Islam M, Bernhardt PV. (2006) Dipyriddy thiosemicarbazone chelators with potent and selective antitumor activity form iron complexes with redox activity. *J Med Chem*. 49: 6510–6521.
- [41] Kozłowski H, Janicka-Kłos A, Brasun J, Gaggelli E, Valensin D, Valensin G. (2009) *Coord Chem Rev*. 253: 2665-2685.

- 
- [42] Zierold K. (1997) Effects of Cadmium on Electrolyte Ions in Cultured Rat Hepatocytes Studied by X-Ray Microanalysis of Cryosections. *Toxicol Appl Pharmacol* 144: 70-76.
- [43] Zierold K. (2000) Heavy metal cytotoxicity studied by electron probe X-ray microanalysis of cultured rat hepatocytes. *Toxicol In Vitro*. 14: 557-563.
- [44] Bolkent S, Zierold K. (2002) Effects of the ionophores valinomycin, ionomycin and gramicidin A on the element compartmentation in cultured rat hepatocytes. *Toxicol In Vitro*. 16: 159-165.
- [45] Zierold K, Michel J, Terryn C, Balossier G. (2005) The distribution of light elements in biological cells measured by electron probe X-ray microanalysis of cryosections. *Microsc Microanal*. 11: 2: 138-145.
- [46] Francesco AD, Desnoyer RW, Covacci V, Wolf FI, Romani A, Cittadini A, Bond M. Changes in Magnesium Content and Subcellular Distribution during Retinoic Acid-Induced Differentiation of HL60 Cells. *Arch Biochem Biophys*. 360: 2: 149-157.
- [47] Fernandez-Segura E, Canizares FJ, Cubero MA, Warley A, Campos A. (1999) Changes in Elemental Content During Apoptotic Cell Death Studied by Electron Probe X-Ray Microanalysis. *Exp Cell Res*. 253: 454-462.
- [48] Jin Z, Roomans GM. (1997) X-ray Microanalysis of Uterine Epithelial Cells in Culture. *Micron*. 6: 453-457.
- [49] Von Euler A, Roomans GM. (1992) Ion transport in colon cancer cell cultures studied by X-ray microanalysis. *Cell Biol Int*. 16: 4: 293-306.
- [50] Zhang W, Roomans GM. (1999) Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-27 (PACAP) and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on chloride in HT29 cells studied by X-ray microanalysis. *Acta Physiol Scand*. 165: 1: 95-101.
- [51] Salido M, Vilches J, López A, Roomans GM. (2001) X-ray microanalysis of etoposide-induced apoptosis in the PC-3 prostatic cancer cell. *Cell Biol Int*. 25: 6: 499-508.
- [52] Salido M, Vilches J, López A, Roomans GM. (2002) Neuropeptides Bombesin and Calcitonin Inhibit Apoptosis-Related Elemental Changes in Prostate Carcinoma Cell Lines. *Cancer*. 94: 2: 368-377.

- 
- [53] Salido M, Vilches J, Roomans GM. (2004) Changes in elemental concentrations in LNCaP cells are associated with a protective effect of neuropeptides on etoposide-induced apoptosis. *Cell Biol Int.* 28: 397-402.
- [54] Ortega R, Deves G, Carmona A. (2009) Bio-metals imaging and speciation in cells using proton and synchrotron radiation X-ray microspectroscopy. *J R Soc Interface*, 6: 649-658.
- [55] Tanaka N, Faired A, Sakai M, Sano A, Inose T, Sohda M, Okada K, Nakijama M, Miyazaki T, Fukuchi M, Kato H, Asao T, Kuwano H, Satoh T, Oikawa M, Kamiya T, Arakawa K. (2010) Quantitative analysis of cisplatin sensitivity of human esophageal squamous cancer cell lines using in-air micro-PIXE. *Cancer Sci*, 101: 6: 1487-1492.
- [56] Sakurai H, Okamoto M, Hasegawa M, Satoh T, Oikawa M, Kamiya T, Arakawa K, Nakano T. (2008) Direct visualization and quantification of the anticancer agent, cis-diamminedichloro-platinum(II), in human lung cancer cells using in-air microparticle-induced X-ray emission analysis. *Cancer Sci*, 99: 5: 901-904.
- [57] Moretto Ph, Ortega R, Llabador Y, Simonoff M, Benard J. (1995) Nuclear microanalysis of platinum and trace elements in cisplatin-resistant human adenocarcinoma cells. *Nucl Instrum Methods Phys Res B*, 104: 292-298.
- [58] Ortega R, Moretto Ph, Fajac A, Benard J, Llabador Y, Simonoff M. (1996) Quantitative mapping of platinum and essential trace metal in cisplatin resistant and sensitive human adenocarcinoma cells. *Cell Mol Biol.* 42: 1: 77-88.
- [59] Mauthe RJ, Sideras-Haddad E, Turteltaub KW, Bench G. (1998) Quantitative imaging microscopy for the sensitive detection of administered metal containing drugs in single cells and tissue slices - a demonstration using platinum based chemotherapeutic agents. *J Pharm Biomed Anal.* 17: 651-663.
- [60] Ortega R, Deves G, Fayard B, Salome M, Susini J. (2003) Combination of synchrotron radiation X-ray microprobe and nuclear microprobe for chromium and chromium oxidation states quantitative mapping in single cells. *Nucl Instrum Methods Phys Res B*, 210: 325-329.
- [61] Gouget B, Sergeant C, Llabador Y, Deves G, Vesvres MH, Simonoff M, Bénard J. (2001) Trace metals and cancer: The case of neuroblastoma. *Nucl Instrum Methods Phys Res B*, 181: 465-469.



- 
- [62] Ortega R, Gouget B, Moretto Ph, Michelet C, Bénard J, Sergeant C, Llabador Y, Simonoff M. (1997) Trace metal content in distinct genotypes of human neuroblastoma cells: Preliminary results. *Nucl Instrum Methods Phys Res B*, 130: 449-453.
- [63] Gouget B, Sergeant C, Bénard J, Llabador Y, Simonoff M. (2000) N-myc oncogene amplification is correlated to trace metal concentrations in neuroblastoma cultured cells. *Nucl Instrum Methods Phys Res B*, 170: 432-442.
- [64] Ortega R, Goncalves P, Llabador Y, Simonoff M. (1999) Extracellular matrix and culture substratum effects on trace metal content of epithelial cancer cells. *Nucl Instrum Methods Phys Res B*, 158: 375-379.
- [65] Ortega R, Deves G, Bohic S, Simionovici A, Ménez B, Bonnin-Mosbah M. (2001) Iron distribution in cancer cells following doxorubicin exposure using proton and X-ray synchrotron radiation microprobes. *Nucl Instrum Methods Phys Res B*, 181: 480-484.
- [66] Ortega R, Moretto Ph, Llabador Y, Simonoff M. (1997) Nuclear microprobe analysis of iodine and iron distributions in tumor cells exposed to the anthracycline 4'-iodo-4'-deoxydoxorubicin. *Nucl Instrum Methods Phys Res B*, 130: 426-430.
- [67] Ortega R, Suda A, Deves G. (2003) Nuclear microprobe imaging of gallium nitrate in cancer cells. *Nucl Instrum Methods Phys Res B*, 210: 364-367.
- [68] Ortega R, Bresson C, Fraysse A, Sandre C, Devès G, Gombert C, Tabarant M, Bleuët P, Sez nec H, Simionovici A, Moretto Ph, Moulin Ch. (2009) Cobalt distribution in keratinocyte cells indicates nuclear and perinuclear accumulation and interaction with magnesium and zinc homeostasis. *Toxicol Lett*, 188: 26-32.
- [69] Ren MQ, Thong PSP, Kara U, Watt F. (1999) Single cell elemental analysis using nuclear microscopy. *Nucl Instrum Methods Phys Res B*, 150: 179-184.
- [70] Kusakabe T, Nakajima K, Nakazato K, Suzuki K, Takada H, Satoh T, Oikawa M, Arakawa K, Nagamine T. (2008) Changes of heavy metal, metallothionein and heat shock proteins in Sertoli cells induced by cadmium exposure. *Toxicol In Vitro*, 22: 1469-1475.
- [71] Carmona A, Devès G, Ortega R. (2008) Quantitative micro-analysis of metal ions in subcellular compartments of cultured dopaminergic cells by combination of three ion beam techniques. *Anal Bioanal Chem*, 390: 1585-1594.

- 
- [72] Tong YP, Zhang YP, Xu YL, Rui JY, Li MQ, Shen CY, Xiao ZM, Hong JX. (1991) Determination of 8 elements in 6 human cancer cell-lines and 2 human normal-cell lines by PIXE. *Biol Trace Elem Res*, 29: 1: 31-34.
- [73] Endo K, Yamamoto T, Shibata Y, Tsuboi K, Matsumara A, Kumada H, Yamamoto K, Sakai T, Sato T, Oikawa M, Ohara Y, Ishii K. (2006) Demonstration of inter- and intracellular distribution of boron and gadolinium using micro-proton-induced X-ray emission (Micro-PIXE). *Oncol Res*, 16: 2: 57-65.
- [74] Osán J, Kurunczi S, Török Sz, Varga I. Röntgenfluoreszcens spektrometria. In Zárar Gy. (szerk.) *Az elemanalitika korszerű módszerei*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 2006: 390-405.
- [75] WC Röntgen. (1896) On a new kind of rays. *Nature* 53: 274-276.
- [76] Compton AH. (1923) A Quantum Theory of the Scattering of X-Rays by Light Elements. *Phys Rev*. 21: 483-502.
- [77] Yoneda Y, Horiuchi T. (1971) Optical Flats for Use in X-Ray Spectrochemical Microanalysis. *Rev Sci Instrum*. 42:1069-1070.
- [78] Klockenkämper R. *Total Reflection X-ray Fluorescence Analysis*, Wiley, New York. 1997: 151-158, 175-177.
- [79] Strelí C. (1997) Total reflection X-ray fluorescence analysis of light elements. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc*. 52: 281-293.
- [80] Strelí C, Wobrauschek P, Unfried E, Aiginger H. (1993) A new spectrometer for total-reflection X-ray fluorescence analysis of light elements. *Nucl Instrum Methods Phys Res B*. 334: 2-3: 425-429.
- [81] Klockenkämper R. *Total Reflection X-ray Fluorescence Analysis*, Wiley, New York. 1997: 12, 224.
- [82] Strelí C, Wobrauschek P, Bauer V, Kregsamer P, Görgl R, Pianetta P, Ryon R, Pahlke S, Fabry L. (1997) Total reflection X-ray fluorescence analysis of light elements with synchrotron radiation and special X-ray tubes. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc*. 52: 861-872.
- [83] Gonzalez M, Tapia L, Alvarado M, Tornero JD, Fernandez R. (1999) Intracellular determination of elements in mammalian cultured cells by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *J Anal At Spectrom*. 14: 885-888.

- 
- [84] Arredondo M, Uauy R, González M. (2000) Regulation of copper uptake transport in intestinal cell monolayers by acute and chronic copper exposure. *Biochim Biophys Acta.* 1474: 169-176.
- [85] Tapia L, Suazo M, Hödar C, Cambiazo V, González M. (2003) Copper exposure modifies the content and distribution of trace metals in mammalian cultured cells. *Biometals.* 16: 169-174.
- [86] Arredondo M, Cambiazo V, Tapia L, Gonzalez-Agüero M, Nunez MT, Uauy R, Gonzalez M. (2004) Copper overload affects copper and iron metabolism in Hep-G2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 287: G27-G32.
- [87] Szoboszlai N, Réti A, Budai B, Szabó Zs, Kralovánszky J, Zárny Gy. (2008) Direct elemental analysis of cancer cell lines by total reflection X-ray fluorescence. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc.* 63: 1480-1484.
- [88] Fernandez Ruiz R, Tornero JD, Gonzalez VM, Alonso C. (1999) Quantification of Pt bound to DNA using total-reflection X-ray fluorescence (TXRF). *Analyst.* 124: 583-585.
- [89] Gonzalez VM, Fuertes MA, Jimenez-Ruiz A, Alonso C, Perez JM. (1999) The Formation of DNA Interstrand Cross-Links by a Novel Bis-[Pt<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>(diminazene acetate)<sub>2</sub>]Cl<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O Complex Inhibits the B to Z Transition. *Mol Pharmacol.* 55: 770-777.
- [90] Pérez JM, Kelland LR, Montero EI, Boxall FE, Fuertes MA, Alonso C, Navarro-Ranninger C. (2003) Antitumor and Cellular Pharmacological Properties of a Novel Platinum(IV) Complex: trans-[PtCl<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>(Dimethylamine) (Isopropylamine)]. *Mol Pharmacol.* 63: 933-944.
- [91] Ilinski P, Lai B, Cai Z, Zun W, Legnini D, Talarico T, Cholewa M, Webster LK, Deacon GB, Rainone S, Phillips DR, Stampfl PJ. (2003) The Direct Mapping of the Uptake of Platinum Anticancer Agents in Individual Human Ovarian Adenocarcinoma Cells Using a Hard X-ray Microprobe. *Cancer Res.* 63: 1776-1779.
- [92] Hall MD, Dillon CT, Beale MZP, Cai Z, Lai B, Stampfl APJ, Hambley TW. (2003) The cellular distribution and oxidation state of platinum(II) and platinum(IV) antitumour complexes in cancer cells. *J Biol Inorg Chem.* 8: 726-732.

- 
- [93] Hall MD, Alderden RA, Zhang M, Beale MZP, Cai Z, Lai B, Stampfl APJ, Hambley TW. (2006) The fate of platinum(II) and platinum(IV) anti-cancer agents in cancer cells and tumors. *J Struct Biol.* 155: 38–44.
- [94] Yang L, McRae R, Henary MM, Patel R, Lai B, Vogt S, Fahrni CJ. (2005) Imaging of the intracellular topography of copper with a fluorescent sensor and by synchrotron x-ray fluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 32: 11179-11184.
- [95] Finney L, Mandava S, Ursos L, Zhang W, Rodi D, Stefan Vogt S, Daniel Legnini D, Maser J, Ikpatt F, Olopade OI, Glesne D. (2007) X-ray fluorescence microscopy reveals large-scale relocalization and extracellular translocation of cellular copper during angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104: 7: 2247-2252.
- [96] Carmona A, Clotens P, Devès G, Bohic S, Ortega R. (2008) Nano-imaging of trace metals by synchrotron X-ray fluorescence into dopaminergic single cells and neurite-like processes. *J Anal At Spectrom.* 23: 8: 1083-1088.
- [97] Ortega R, Clotens P, Devès G, Carmona A, Bohic S. (2007) Iron Storage within Dopamine Neurovesicles Revealed by Chemical Nano-Imaging. *PloS ONE* 9: e925.
- [98] Carmona A, Devès G, Roudeau S, Clotens P, Bohic S, Ortega R. (2010) Manganese Accumulates within Golgi Apparatus in Dopaminergic Cells as Revealed by Synchrotron X-ray Fluorescence Nanoimaging. *ACS Chem Neurosci.* 1: 3: 194-203.
- [99] Ortega R, Bohic S, Tucoulou R, Somogyi A, Devès G. (2004) Microchemical Element Imaging of Yeast and Human Cells Using Synchrotron X-ray Microprobe with Kirkpatrick-Baez Optics. *Anal Chem.* 76: 309-314.
- [100] Duong TTH, Witting PK, Antao ST, Parry SN, Kennerson M, Lai B, Vogt S, Lay PA, Harris HH. (2009) Multiple protective activities of neuroglobin in cultured neuronal cells exposed to hypoxia re-oxygenation injury. *J Neurochem.* 108: 1143-1154.
- [101] Kehr S, Malinouski M, Finney L, Vogt S, Labunskyy VM, Kasaikina M, Carlson BA, Zhou Y, Hatfield DL, Gladyshev VN. (2009) X-Ray Fluorescence Microscopy Reveals the Role of Selenium in Spermatogenesis. *J Mol Biol.* 389: 808-818.
- [102] Twining BS, Baines SB, Fisher NS, Maser J, Vogt S, Jacobsen C, Tovar-Sanchez A, Sanudo-Wilhelmy SA. (2003) Quantifying Trace Elements in Individual Aquatic Protist Cells with a Synchrotron X-ray Fluorescence Microprobe. *Anal Chem.* 75: 3806-3816.

- 
- [103] Paunesku T, Vogt S, Lai B, Maser J, Stojicevic N, Thurn KT, Osipo C, Liu H, Legnini D, Wang Z, Lee C, Woloschak GE. (2007) Intracellular Distribution of TiO<sub>2</sub>-DNA Oligonucleotide Nanoconjugates Directed to Nucleolus and Mitochondria Indicates Sequence Specificity. *Nano Lett.* 7: 3: 596-601.
- [104] Paunesku T, Rajh T, Wiederrecht G, Maser J, Vogt S, Stojicevic N, Protic M, Lai B, Oryhon J, Thurnauer M, Woloschak GE. (2003) Biology of TiO<sub>2</sub>-oligonucleotide nanocomposites. *Nat Mater.* 2: 343-346.
- [105] Thurn K, Paunesku T, Wu AG, Brown EMB, Lai B, Vogt S, Maser J, Aslam M, Dravid V, Bergan R, Woloschak GE. (2009) Labeling TiO<sub>2</sub> Nanoparticles with Dyes for Optical Fluorescence Microscopy and Determination of TiO<sub>2</sub>-DNA Nanoconjugate Stability. *SMALL* 5: 11: 1318-1325.
- [106] Endres PJ, MacRenaris KW, Stefan Vogt S, Meade TJ. (2008) Cell-Permeable MR Contrast Agents with Increased Intracellular Retention. *Bioconjug Chem.* 19: 2049-2059.
- [107] Paunesku T, Ke T, Dharmakumar R, Mascheri N, Wu A, Lai B, Vogt S, Maser J, Thurn K, Szolc-Kowalska B, Larson A, Bergan RC, Omary R, Li D, Lu ZR, Woloschak GE. (2008) Gadolinium-conjugated TiO<sub>2</sub>-DNA oligonucleotide nanoconjugates show prolonged intracellular retention period and T<sub>1</sub>-weighted contrast enhancement in magnetic resonance images. *Nanomedicine.* 4: 201-207.
- [108] Bussy C, Cambedouzou J, Lanone S, Leccia E, Heresanu V, Pinault M, Mayne-l'Hermite M, Brun N, Mory C, Cotte M, Doucet J, Boczkowski J, Launois P. (2008) Carbon Nanotubes in Macrophages: Imaging and Chemical Analysis by X-ray Fluorescence Microscopy. *Nano Lett.* 8: 9: 2659-2663.
- [109] <http://www.kfki.hu/elftvakuum/pub/wplazma/plaz623.htm>
- [110] Strick R, Strissel PL, Gavrilo K, Levi-Setti R. (2001) Cation-chromatin binding as shown by ion microscopy is essential for the structural integrity of chromosomes. *J Cell Biol.* 155: 6: 899-910.
- [111] Levi-Setti R, Gavrilo KL, Strissel PL, Strick R. (2004) Ion microprobe imaging of <sup>44</sup>Ca-labeled mammalian chromosomes. *Appl Surf Sci.* 231-232: 479-484.
- [112] Strissel PL, Strick R, Gavrilo KL, Levi-Setti R. (2004) Specific Mg<sup>2+</sup> binding at human and Indian muntjac chromosomal Giemsa bands. *Appl Surf Sci.* 231-232: 485-489.

- 
- [113] Strissel PL, Strick R, Gavrilov KL, Levi-Setti R. (2006) Specific Mg<sup>2+</sup> binding to AT-rich regions of chromatin in the evolution of eukaryotes. *Appl Surf Sci.* 252: 6770-6773.
- [114] Levi-Setti R, Gavrilov KL, Neilly ME, Strick R, Strissel PL. (2006) High resolution SIMS imaging of cations in mammalian cell mitosis, and in *Drosophila* polytene chromosomes. *Appl Surf Sci.* 252: 6907-6916.
- [115] Levi-Setti R, Gavrilov KL, Neilly ME. (2006) Cations in mammalian cells and chromosomes: Sample preparation protocols affect elemental abundances by SIMS. *Appl Surf Sci.* 252: 6765-6769.
- [116] Chandra S. (2001) Studies of cell division (mitosis and cytokinesis) by dynamic secondary ion mass spectrometry ion microscopy: LLC-PK1 epithelial cells as a model for subcellular isotopic imaging. *J Microsc.* 204: 150-165.
- [117] Chandra S. (2005) Quantitative imaging of subcellular calcium stores in mammalian LLC-PK1 epithelial cells undergoing mitosis by SIMS ion microscopy. *Eur J Cell Biol.* 84: 783-797.
- [118] Chandra S, Lorey DR. (2001) SIMS ion microscopy in cancer research: Single cell isotopic imaging for chemical composition, cytotoxicity and cell cycle recognition. *Cell Mol Biol.* 47: 3: 503-518.
- [119] Fartmann M, Dambach S, Kriegeskotte C, Lipinsky D, Wiesmann HP, Wittig A, Sauerwein W, Arlinghaus HF. (2003) Subcellular imaging of freeze-fractured cell cultures by TOF-SIMS and Laser-SNMS. *Appl Surf Sci.* 203-204: 726-729.
- [120] Breitenstein D, Rommel CE, Stolwijk J, Wegener J, Hagenhoff B. (2008) The chemical composition of animal cells reconstructed from 2D and 3D ToF-SIMS analysis. *Appl Surf Sci.* 255: 1249-1256.
- [121] Nygren H, Hagenhoff B, Malmberg P, Nilsson M, Richter K. (2007) Bioimaging TOF-SIMS: High Resolution 3D Imaging of Single Cells. *Microsc Res Tech.* 70: 969-974.
- [122] Barth RF, Heikki J. (2007) Boron neutron capture therapy for the treatment of glioblastomas and extracranial tumours: As effective, more effective or less effective than photon irradiation? *Radiother Oncol.* 82: 119-122.

- 
- [123] Fartmann M, Kriegeskotte C, Dambach S, Wittig A, Sauerwein W, Arlinghaus HF. (2004) Quantitative imaging of atomic and molecular species in cancer cell cultures with TOF-SIMS and Laser-SNMS. *Appl Surf Sci.* 231-232: 428-431.
- [124] Arlinghaus HF, Kriegeskotte C, Fartmann M, Wittig A, Sauerwein W, Lipinsky D. (2006) Mass spectrometric characterization of elements and molecules in cell cultures and tissues. *Appl Surf Sci.* 252: 6941-6948.
- [125] Lorey DR, Morrison GH, Chandra S. (2001) Dynamic Secondary Ion Mass Spectrometry Analysis of Boron from Boron Neutron Capture Therapy Drugs in Co-Cultures: Single-Cell Imaging of Two Different Cell Types within the Same Ion Microscopy Field of Imaging. *Anal Chem.* 73: 3947-3953.
- [126] Chandra S, Tjarks W, Lorey DR, Barth RF. (2008) Quantitative subcellular imaging of boron compounds in individual mitotic and interphase human glioblastoma cells with imaging secondary ion mass spectrometry (SIMS). *J Microsc.* 229: 92-103.
- [ 127 ] Chandra S, Lorey DR. (2007) SIMS ion microscopy imaging of boronophenylalanine (BPA) and  $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -labeled phenylalanine in human glioblastoma cells: Relevance of subcellular scale observations to BPA-mediated boron neutron capture therapy of cancer. *Int J Mass Spectrom.* 260: 90-101.
- [128] Chandra S, Lorey DR, Smith DR. (2002) Quantitative subcellular secondary ion mass spectrometry (SIMS) imaging of boron-10 and boron-11 isotopes in the same cell delivered by two combined BNCT drugs: In vitro studies on human glioblastoma T98G cells. *Radiat Res.* 157: 6: 700-710.
- [ 129 ] Smith DR, Lorey DR, Chandra S. (2004) Subcellular SIMS imaging of gadolinium isotopes in human glioblastoma cells treated with a gadolinium containing MRI agent. *Appl Surf Sci.* 231-232: 457-461.
- [130] Lobinski R, Moulin C, Ortega R. (2006) Imaging and speciation of trace elements in biological environment. *Biochimie.* 88: 1591-1604.
- [131] Chandra S, Smith DR, Morrison GH. (2000) A Subcellular Imaging by Dynamic SIMS Ion Microscopy. By imaging isotopes, the transport of ions, molecules, and therapeutic drugs can be studied in single cells. *Anal Chem.* 72: 3: 104A-114A.
- [ 132 ] DeNicola Cafferky K, Thompson RL, Richardson DD, Caruso JA. (2007) Determination, by inductively coupled plasma mass spectrometry, of changes in cellular

---

metal content resulting from herpes simplex virus-1 (HSV-1) infection. *Anal Bioanal Chem.* 387: 2037-2043.

[133] Hasegawa S, Koshikawa M, Takahashi I, Hachiya M, Furukawa T, Akashi M, Yoshida S, Saga T. (2008) Alterations in manganese, copper, and zinc contents, and intracellular status of the metal-containing superoxide dismutase in human mesothelioma cells. *J Trace Elem Med Biol.* 22: 248-255.

[134] Ghezzi AR, Aceto M, Cassino C, Gabano E, Osella D. (2004) Uptake of antitumor platinum(II)-complexes by cancer cells, assayed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *J Inorg Biochem.* 98: 73-78.

[135] Gabano E, Colangelo D, Ghezzi AR, Osella D. (2008) The influence of temperature on antiproliferative effects, cellular uptake and DNA platination of the clinically employed Pt(II)-drugs. *J Inorg Biochem.* 102: 629-635.

[136] Björn E, Nygren Y, Nguyen TTTN, Ericson C, Nöjd M, Naredi P. (2007) Determination of platinum in human subcellular microsamples by inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal Biochem.* 363: 135-142.

[137] Hanada T, Isobe H, Saito T, Ogura S, Takekawa H, Yamazaki K, Tokuchi Y, Kawakami Y. (1998) Intracellular Accumulation of Thallium as a Marker of Cisplatin Cytotoxicity in Nonsmall Cell Lung Carcinoma. *Cancer.* 83: 5: 930-935.

[138] Infante HG, Joel SP, Warburton E, Hopley C, Hearn R, Juliger S. (2007) Investigation of the selenium species distribution in a human B-cell lymphoma line by HPLC- and GC-ICP-MS in combination with HPLCESIMS/MS and GC-TOFMS after incubation with methylseleninic acid. *J Anal At Spectrom.* 22: 8: 888-896.

[139] Singh J, McLean JA, Pritchard DE, Montaser A, Patierno SR. (1998) Sensitive Quantitation of Chromium-DNA Adducts by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry with a Direct Injection High-Efficiency Nebulizer. *Toxicol Sci.* 46: 260-265.

[140] McLean JA, Acon BW, Montaser A, Singh J, Pritchard DE, Patierno SR. (2000) Determination of chromium in human lung fibroblast cells using a large bore-direct injection high-efficiency nebulizer with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Appl Spectrosc.* 54: 5: 659-663.

[141] Chen BB, Heng SJ, Peng HY, Hu B, Yu X, Zhang ZL, Pang DW, Yue X, Zhu Y. (2010) Magnetic solid phase microextraction on a microchip combined with



---

electrothermal vaporization-inductively coupled plasma mass spectrometry for determination of Cd, Hg and Pb in cells. *J Anal At Spectrom.* 25:12: 1931-1938.

[142] Szoboszlai N. (2002) Kadmium, ólom, szelén és ón meghatározása emberi agymintákból grafitkemencés atomabszorpciós módszerrel. Doktori disszertáció:13-19.

[143] Walsh A. (1955) The application of atomic absorption spectra to chemical analysis. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc.* 7: 108-117.

[144] L'vov BV. (1961) An investigation of atomic absorption spectra by complete vaporization of substance in a graphite cell. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc.* 17B: 761-768.

[145] Massmann H. (1968) Comparison of atomic absorption and atomic fluorescence in graphite cuvettes. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc.* 23B: 215-226.

[146] Huettner W, Busche C. (1986) Structure and reactivity of carbon materials used in atomization furnaces. *Fresenius J Anal Chem.* 323: 674-680.

[147] Frech W. (1996) Recent developments in atomizers for electrothermal atomic absorption spectrometry. *Fresenius J Anal Chem.* 355: 475-486.

[148] L'vov BV. (1978) Electrothermal atomization – the way toward absolute methods of atomic absorption analysis. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc.* 33B: 153-193.

[149] Slavin W, Manning DC, Carnrick GR. (1981) The stabilized temperature platform furnace. *Atomic Spectroscopy.* 2: 137-145.

[150] Ediger RD. (1975) Atomic absorption analysis with the graphite furnace using matrix modification. *Atomic Absorption Newsletter.* 14: 127-130.

[151] Zhe-ming N, Xiao-quan S. (1987) The reduction and elimination of matrix interferences in graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc.* 42B 937-949.

[152] Slavin W, Manning DC, Carnrick GR. (1982) Magnesium nitrate as a matrix modifier in the stabilized temperature platform furnace. *Anal Chem.* 54: 621-624.

[153] Ebdon L, Lechotycki A. (1987) The determination of cadmium in environmental samples by slurry atomization graphite furnace atomic absorption spectrometry using platform and matrix modification. *Microchem J.* 36: 207-215.

[154] Frech W, Baxter DC, Hütsch B. (1986) Spatially isothermal graphite furnace for atomic absorption spectrometer using side-heated cuvettes with integrated contacts. *Anal Chem.* 58: 1973-1977.

- 
- [155] Frech W, L'vov BV. (1993) Matrix vapours and physical interference effects in graphite furnace atomic absorption spectrometry II. Side-heated tubes. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc.* 48B: 1371-1379.
- [156] Harnly JM, Kane JS. (1984) Optimization of electrothermal atomization parameters for simultaneous multielement atomic absorption spectrometry. *Anal Chem.* 56: 48-54.
- [157] Radziuk B, Rödel G, Zeiher M, Mizuno S, Yamamoto K. (1995) Solid state detector for simultaneous multi-element electrothermal atomic absorption spectrometry with Zeeman-effect background correction. *J Anal At Spectrom.* 10: 415-422.
- [158] Radziuk B, Rödel G, Stenz H, Becker-Ross H, Florek S. (1995) Spectrometer system for simultaneous multi-element electrothermal atomic absorption spectrometry using line sources and Zeeman-effect background correction. *J Anal At Spectrom.* 10: 127-136.
- [159] Falk H. (1980) Analytical capabilities of atomic spectrometric methods using tunable lasers: a theoretical approach. *Prog Anal Spectrosc.* 3: 181-208.
- [160] Niemax K, Zybin A, Schnürer-Patschan C, Groll H. (1996) Semiconductor diode lasers in atomic spectrometry. *Anal Chem.* 68 351-356.
- [161] Florek S, Becker-Ross H. (1995) High-resolution spectrometer for atomic spectrometry. *J Anal At Spectrom.* 10: 145-147.
- [162] Becker-Ross H, Florek S. (1997) Echelle spectrometers and charge-coupled devices. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc.* 52B: 1367-1376.
- [163] Zödl B, Zeiner M, Sargazi M, Roberts NB, Marktl W, Steffan I, Ekmekcioglu C. (2003) Toxic and biochemical effects of zinc in Caco-2 cells. *J Inorg Biochem.* 97: 324-330.
- [164] Zödl B, Zeiner M, Paukovits P, Steffan I, Marktl W, Ekmekcioglu C. (2005) Iron uptake and toxicity in Caco-2 cells. *Microchem J.* 79: 393-397.
- [165] Zeiner M, Zödl B, Steffan I, Marktl W, Ekmekcioglu C. (2005) Determination of Iron in Caco-2 cells by ET-AAS. *Anal Bioanal Chem.* 382: 239-242.
- [166] Borella P, Bargellini A, Salvioli S, Cossarizza A. (1996) Use of flameless atomic absorption spectroscopy in immune cytotoxicity for nonradioactive determination of killer cell activity. *Clin Chem.* 42: 2: 319-325.

- 
- [167] Ott I, Scheffler H, Gust R. (2007) Development of a Method for the Quantification of the Molar Gold Concentration in Tumour Cells Exposed to Gold-Containing Drugs. *ChemMedChem*. 2: 5: 702-707.
- [168] Scheffler H, You Y, Ott I. (2010) Comparative studies on the cytotoxicity, cellular and nuclear uptake of a series of chloro gold(I) phosphine complexes. *Polyhedron*. 29: 66-69.
- [169] Verhaegh GW, Richard MJ, Hainaut P. (1997) Regulation of p53 by Metal Ions and by Antioxidants: Dithiocarbamate Down-Regulates p53 DNA-Binding Activity by Increasing the Intracellular Level of Copper. *Mol Cell Biol*. 17: 5699-5706.
- [170] Goka TJ, Stevenson RE, Hefferan PM, Howell RR. (1976) Menkes disease: A biochemical abnormality in cultured human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 73: 2: 604-606.
- [171] Wills NK, Sadagopa Ramanujam VM, Chang J, Kalariya N, Lewis JR, Weng TX, van Kuijk FJGM. (2008) Cadmium accumulation in the human retina: Effects of age, gender, and cellular toxicity. *Exp Eye Res*. 86: 41-51.
- [172] Dillon CT, Lay PA, Bonin AM, Cholewa M, Legge GJF. (2000) Permeability, Cytotoxicity, and Genotoxicity of Cr(III) Complexes and Some Cr(V) Analogues in V79 Chinese Hamster Lung Cells. *Chem. Res. Toxicol*. 13: 742-748.
- [173] Kapp T, Dullin A, Gust R. (2010) Platinum(II)-Dendrimer Conjugates: Synthesis and Investigations on Cytotoxicity, Cellular Distribution, Platinum Release, DNA, and Protein Binding. *Bioconjug Chem*. 21: 328-337.
- [174] Bergamo A, Messori L, Piccioli F, Cocchietto M, Sava G. (2003) Biological role of adduct formation of the ruthenium(III) complex NAMI-A with serum albumin and serum transferrin. *Invest New Drugs*. 21: 401-411.
- [175] Bonnitcho PD, Hall MD, Underwood CK, Foran GJ, Zhang M, Beale PJ, Hambley TW. (2006) XANES investigation of the Co oxidation state in solution and in cancer cells treated with Co(III) complexes, *J Inorg Biochem*. 100: 963-971.
- [176] Harris HH, Levina A, Dillon CT, Mulyani I, Lai B, Cai Z, Lay PA. (2005) Time-dependent uptake, distribution and biotransformation of chromium(VI) in individual and bulk human lung cells: application of synchrotron radiation techniques. *J Biol Inorg Chem*. 10 105-118.
- [177] Newville M. (2008) Fundamentals of XAFS. [xafs.org/Tutorials](http://xafs.org/Tutorials)

- 
- [178] Vankó Gy. A szinkrotronsugárzás újszerű kémiai alkalmazásai: nagyfelbontású röntgenspektroszkópia. In: A kémia újabb eredményei. Akadémiai Kiadó, Budapest, 2008: 133-240.
- [179] Kwiatek WM, Podgórczyk M, Dulińska-Litewka J, Laidler PM, Welter E. Zn K-edge XANES on prostate cancer cells. HASYLAB Annual Report 2007  
hasyweb.desy.de/science/annual\_reports/2007\_report/part1/contrib/47/21316.pdf
- [180] Podgorczyk M, Kwiatek WM, Zajac WM, Dulinska-Litewka J, Welter E, Grolimund D. (2009) Zinc in native tissues and cultured cell lines of human prostate studied by SR-XRF and XANES. *X-ray spectrometry*. 38: 6: 557-562.
- [181] Wellenreuther G, Cianci M, Tucoulou R, Meyer-Klaucke W, Haase H. (2009) The ligand environment of zinc stored in vesicles. *Biochem Biophys Res Commun*. 380: 198-203
- [182] Kwiatek WM, Podgórczyk M, Paluszkiewicz Cz, Balerna A, Kisiel A. Sulphur XANES analysis of cultured human prostate cancer cells. (2008) *Acta Physica Polonica A*. 114: 463-470.
- [183] Hall MD, Foran GJ, Zhang M, Beale PJ, Hambley TW. (2003) XANES determination of the platinum oxidation state distribution in cancer cells treated with platinum(IV) anticancer agents. *J Am Chem Soc*. 125: 7524-7525.
- [184] Levina A, Harris HH, Lay PA. X-ray absorption and EPR spectroscopic studies of the biotransformations of chromium(VI) in mammalian cells. (2007) Is chromodulin an artifact of isolation methods? *J Am Chem Soc*. 129: 1065-1075.
- [185] Ortega R, Fayard B, Salome M, Deves G, Susini J. (2005) Chromium oxidation state imaging in mammalian cells exposed in vitro to soluble or particulate chromate compounds. *Chem Res Toxicol*. 18: 10: 1512-1519.
- [186] Ortega R, Deves G, Bohic S, Simionovici A, Menez B, Bonnin-Mosbah M. (2001) Iron distribution in cancer cells following doxorubicin exposure using proton and X-ray synchrotron radiation microprobes. *Nucl Instrum Methods Phys Res B*. 181: 480-484.
- [187] Bacquart T, Deves G, Carmona A, Tucoulou R, Bohic S, Ortega R. (2007) Subcellular speciation analysis of trace element oxidation states using synchrotron radiation micro-X-ray absorption near-edge structure, *Anal Chem*. 79: 7353-7359.

- 
- [188] Bacquart T, Deves G, Ortega R. (2010) Direct speciation analysis of arsenic in sub-cellular compartments using micro-X-ray absorption spectroscopy. *Environ Res.* 110: 413-416.
- [189] Munro KL, Mariana A, Klavins AI, Foster AJ, Lai B, Vogo S, Cai Z, Harris HH, Dillon CT. (2008) Microprobe XRF mapping and XAS investigations of the intracellular metabolism of arsenic for understanding arsenic-induced toxicity. *Chem Res Toxicol.* 21: 9: 1760-1769.
- [190] Klockenkämper R. *Total Reflection X-ray Fluorescence Analysis*, Wiley, New York. 1997:176.
- [191] Strelcić C, Wobrauschek P, Pepponi G, Zoeger N. (2004) A new total reflection X-ray fluorescence vacuum chamber with sample changer analysis using a silicon drift detector for chemical analysis. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc.* 59: 1199-1203.
- [192] Varga I, Szebeni Á, Szoboszlai N, Kovács B. (2005) Determination of trace elements in human liver biopsy samples by ICP-MS and TXRF: hepatic steatosis and nickel accumulation. *Anal Bioanal Chem.* 383: 476–482.
- [193] Strelcić C, Pepponi G, Wobrauschek P, Jokubonis C, Falkenberg G, Zárny G. (2005) A new SR-TXRF vacuum chamber for ultra-trace analysis at HASYLAB, Beamline L. *X-ray Spectrom.* 34: 451-455.
- [194] Strelcić C, Pepponi G, Wobrauschek P, Jokubonis C, Falkenberg G, Zárny G, Broekaert J, Fittschen U, Peschel B. (2006) Recent results of synchrotron radiation induced total reflection X-ray fluorescence analysis at HASYLAB, beamline L. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc.* 61: 1129-1134.
- [195] Falkenberg G. (2005) Characterization of a Radiant Vortex Silicon Multi-Cathode X-ray Spectrometer for (total reflection) X-ray fluorescence applications. Hasylab Internal Report 2004.
- [196] Newville M. (2001) IFEFFIT: interactive XAFS analysis and FEFF fitting. *J Synchrotron Radiat.* 8: 322-324.
- [197] Ravel B, Newville M. (2005) ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. *J Synchrotron Radiat.* 12: 537-541.

- 
- [198] Höfler HA. (2005) Totalreflexions-Röntgenfluoreszenz Analyse von leichten Elementen im Umweltproben, Diploma thesis, Atominstiute der Österreichischen Universitäten, Vienna.
- [199] Tarsoly G, Óvári M, Zárny Gy. (2010) Determination of fluorine by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc.* 65: 287-290.
- [200] Gonzalez M, Tapia L, Alvarado M, Tornero JD, Fernandez R. (1999) Intracellular determination of elements in mammalian cultured cells by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *J Anal At Spectrom.* 14: 885-888.
- [201] Arredondo M, Uauy R, González M. (2000) Regulation of copper uptake transport in intestinal cell monolayers by acute and chronic copper exposure. *Biochim Biophys Acta.* 1474: 169-176.
- [202] Tapia L, Suazo M, Hödar C, Cambiazo V, González M. (2003) Copper exposure modifies the content and distribution of trace metals in mammalian cultured cells. *Biometals.* 16: 169-174.
- [203] Arredondo M, Cambiazo V, Tapia L, Gonzalez-Agüero M, Nunez MT, Uauy R, Gonzalez M. (2004) Copper overload affects copper and iron metabolism in Hep-G2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 287: G27-G32.
- [204] Klockenkämper R. Total-reflection X-ray fluorescence analysis. John Wiley & Sons, Inc., New York 1997: 156.
- [205 ] Chen H, Davidson T, Singleton S, Garrick MD, Costa M. (2005) Nickel decreases cellular iron level and converts cytosolic aconitase to iron-regulatory protein 1 in A549 cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 206: 275–287.
- [206] Li Q, Chen H, Huang X, Costa M. (2006) Effects of 12 metal ions on iron regulatory protein 1 (IRP-1) and hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ) and HIF-regulated genes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 213: 245–255.
- [207] Yang WW, Shu B, Zhu Y, Yang HT. (2008) E2F6 inhibits cobalt chloride-mimetic hypoxia-induced apoptosis through E2F1. *Mol Biol Cell.* 19: 3691-3700.
- [208] Ardyanto TD, Osaki M, Tokuyasu N, Nagahama Y, Ito H. (2006) CoCl<sub>2</sub>-induced HIF-1 $\alpha$  expression correlates with proliferation and apoptosis in MKN-1 cells: A possible role for the PI3K/Akt pathway. *Int J Oncol.* 29: 549-555.

- 
- [209] Rochelson B, Dowling O, Schwartz N, Metz CN. (2007) Magnesium sulfate suppresses inflammatory responses by human umbilical vein endothelial cells (HuVECs) through the NF $\kappa$ B pathway. *J Reproductive Immunol.* 73: 101-107.
- [210] Sturm B, Twaroch T, Knapitsch B, Czingraber S, Ternes N, Goldenberg H, Scheiber-Mojdehkar B. (2006) Differential response of iron metabolism to oxidative stress generated by antimycin A and nitrofurantoin. *Biochimie* 88: 575-581.
- [211] Réti A, Barna G, Pap E, Adleff V, Komlósi VL, Jeney A, Kralovánszky J, Budai B. (2009) Enhancement of 5-Fluorouracil Efficacy on High COX-2 Expressing HCA-7 Cells by Low Dose Indomethacin and NS-398 but not on Low COX-2 Expressing HT-29 Cells. *Pathol Oncol Res.* 15: 335-44.
- [212] Fittschen UEA, Meirer F, Strelt C, Wobrauschek P, Thiele J, Falkenberg G, Peponi G. (2008) Characterization of atmospheric aerosols using Synchrotron radiation total reflection X-ray fluorescence and Fe K-edge total reflection X-ray fluorescence-X-ray absorption near-edge structure. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc.* 63: 1489-1495.
- [213] Hallmeier KH, Sauter S, Szargan R. (2001) XANES and EXAFS investigations of bonding and structure of Ni and Co derivatives from Prussian Blue coordination compounds, *Inorg Chem Commun.* 4: 153-156.
- [214] Ortega R, Deves G, Bohic S, Simionovici A, Menez B, Bonnin-Mosbah M. (2001) Iron distribution in cancer cells following doxorubicin exposure using proton and X-ray synchrotron radiation microprobes. *Nucl Instrum Methods Phys Res B.* 181: 480-484.
- [215] Wilke M, Farges F, Petit PE, Brown GE, Martin F. (2001) Oxidation state and coordination of Fe in minerals: An FeK-XANES spectroscopic study. *Am Mineral.* 86: 714-730.
- [216] Pan YH, Sader K, Powell JJ, Bleloch A, Gass, M, Trinick J, Warley A, Li A, Brydson R, Brown A. (2009) 3D morphology of the human hepatic ferritin mineral core: New evidence for a subunit structure revealed by single particle analysis of HAADF-STEM images. *J Struct Biol.* 166:1: 22-31.
- [217] Pettersson RP. (1998) A method for trace element determination of marine periphyton communities on discs of float glass (without sample preparation) using total-

---

reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc.* 53: 101-115.

[218] Günther K, von Bohlen A, Strompen C. (1995) Element determination by total-reflection X-ray fluorescence spectrometry at the initial step of element speciation in biological matrices. *Anal Chim Acta.* 309: 327-332.

[219] Suzuki T, Sasaki A, Nakai I. (2001) Total reflection X-ray fluorescence analysis of cisplatin platinum in human cancerous tissues obtained by biopsy. *J Trace Microprobe Tech.* 19: 547-561.

[220] Mihucz VG, Tatár E, Varga A, Záráy G, Cseh E. (2001) Application of total-reflection X-ray fluorescence spectrometry and high-performance liquid chromatography for the chemical characterization of xylem saps of nickel contaminated cucumber plants. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc.* 56: 2235-2246.

[221] Mages M, Woelfl S, von Tuempling W. (2001) A method for trace element determination of single *Daphnia* specimens using total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc.* 56: 2209-2217.

[222] Kröpfl K, Záráy G, Vladár P, Mages M, Ács É. (2003) Study of biofilm formation by total-reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Microchem J.* 75: 133-137.

[223] Óvári M, Mages M, Woelfl S, von Tuempling W, Kröpfl K, Záráy G. (2004) Total reflection X-ray fluorescence spectrometric determination of element inlets from mining activities at the upper Tisza catchment area, Hungary. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc.* 59: 1173-1181.

[224] Szoboszlai N, Polgári Z, Mihucz VG, Záráy G. (2009) Recent trends in total reflection X-ray fluorescence spectrometry for biological applications. *Anal Chim Acta.* 633: 1-18.

[225] Woelfl S, Mages M, Encina F. (2003) Cold plasma ashing improves the trace element detection of single *Daphnia* specimens by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc.* 58: 2157-2168.

[226] Hoefler H, Strelí C, Wobrauschek P, Óvári M, Záráy G. (2006) Analysis of low Z elements in various environmental samples with total reflection X-ray fluorescence (TXRF) spectrometry. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc.* 61: 1135-1140.



- 
- [227] Matusiewicz H, Sturgeon RE, Berman SS. (1991) Vapor-phase acid digestion of inorganic and organic matrices for trace-element analysis using a microwave heated bomb. *J Anal At Spectrom.* 6: 4: 283-287.
- [228] Czégény Zs, Berente B, Óvári M, Tapia MG, Zárny Gy. (1998) Microwave-Assisted Vapor-Phase Acid Digestion of Cellulose Nitrate Filters for Elemental Analysis of Airborne Dust Samples. *Microchem J.* 59: 100-106.
- [229] Strelí C, Wobrauschek P, Pepponi G, Zoeger N. (2004) A new total reflection X-ray fluorescence vacuum chamber with sample changer analysis using a silicon drift detector for chemical analysis. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc.* 59: 1199-1203.
- [230] Ostachowicz B, Lankosz M, Tomik B, Adamek D, Wobrauschek P, Strelí C, Kregsamer P. (2006) Analysis of some chosen elements of cerebrospinal fluid and serum in amyotrophic lateral sclerosis patients by total reflection X-ray fluorescence. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc.* 61: 1210-1213.
- [231] Óvári M, Strelí C, Wobrauschek P, Zárny G. (2009) Determination of carbon in natural freshwater biofilms with total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc.* 64: 802-804.
- [232] Soucek K, Gajduskova P, Brazdova M, Hyzdalova M, Kocí L, Vydra D, Trojanec R, Pernicova Z, Lentvorska L, Hajduch M, Hofmanova J, Kozubíka A. (2010) Fetal colon cell line FHC exhibits tumorigenic phenotype, complex karyotype, and TP53 gene mutation. *Cancer Genet Cytogenet.* 197: 107-116.
- [233] Xu X, Sutak R, Richardson DR. (2008) Iron Chelation by Clinically Relevant Anthracyclines: Alteration in Expression of Iron-Regulated Genes and Atypical Changes in Intracellular Iron Distribution and Trafficking. *Mol Pharmacol.* 73: 833-844.

---

## 11. Saját publikációk jegyzéke

1. Szoboszlai N, Polgári Z, Mihucz VG, Záray G. (2009) Recent trends in total reflection X-ray fluorescence spectrometry for biological applications. *Anal Chim Acta* 633: 1-18.  
*IF: 3,757*
2. Polgári Z, Meirer F, Sasamori S, Ingerle D, Pepponi G, Strelci C, Rickers K, Réti A, Budai B, Szoboszlai N, Záray G. (2011) Iron speciation in human cancer cells by K-edge total reflection X-ray fluorescence-X-ray absorption near edge structure analysis. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc.* 66: 274-279.  
*IF: 3,549*
3. Polgári Z, Szoboszlai N, Óvári M, Záray G. (2011) Possibilities and limitations of the total reflection X-ray fluorescence spectrometry for the determination of low Z elements in biological samples. *Microchem J.* DOI: [10.1016/j.microc.2011.06.002](https://doi.org/10.1016/j.microc.2011.06.002)  
*IF: 2,48*
4. Polgári Z, Ajtony Z, Kregsamer P, Strelci C, Mihucz VG, Réti A, Budai B, Kralovánszky J, Záray G, Szoboszlai N. (2011) Microanalytical method development for Fe, Cu and Zn determination in colorectal cancer cells. *Talanta* DOI:[10.1016/j.talanta.2011.07.015](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.07.015)  
*IF: 3,722*

---

## 12. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek **prof. Dr. Záray Gyulának**, hogy munkámat irányította, annak feltételeit megteremtette és értékes tanácsokkal látott el a doktori disszertációm tartalmi és formai összeállításában.

Köszönöm a Gyógyszertudományok Doktori Iskola elnökének, **Dr. Szőke Évának** a lehetőséget, hogy a Ph.D. tanulmányaimat elvégezhettem, továbbá a Semmelweis Egyetem Doktori Iskolának a nekem ítelt predoktori ösztöndíjat.

Köszönöm **Dr. Szoboszlai Norbert** konzulensemnek, hogy doktori munkám során mindig számíthattam rá a kísérletek megtervezésétől kezdve azok kiértékeléséig és értelmezéséig. **Dr. Óvári Mihály** egyetemi adjunktust köszönet illeti a „lowZ TXRF” méréseknél nyújtott segítségével. **Dr. Mihucz Viktor Gábor** egyetemi adjunktusnak köszönöm önzetlen segítőkészségét és biztatását doktori munkám során.

Köszönöm **Dr. Kralovánszky Juditnak**, az Országos Onkológiai Intézet Klinikai Kísérleti Laboratóriumi Osztály vezetőjének, hogy osztályán a sejttenyésztéshez kapcsolódó feladatokat elvégezhettem, segítőkészségét és mindig őszinte érdeklődését. **Dr. Budai Barna** tudományos munkatársnak köszönöm a statisztikai kiértékelésekben nyújtott segítséget és értékes észrevételeit. **Dr. Réti Andreának** köszönöm, hogy bevezetett a sejttenyésztés rejtjelmeibe és baráti biztatását.

Köszönettel tartozom **Christina Strel**i professzorasszonynak, **Peter Wobrauschek** professzornak, **Peter Kregsamernek**, hogy folyamatosan biztosították számomra a mérési lehetőséget a bécsi Atomintitutumban, a nyugodt, baráti légkört, amiben laboratóriumukban mindig dolgozhattam. **Florian Meirernek** köszönöm a XANES mérések kiértékelését, kérdéseimre adott lelkes és nagyon részletes válaszait.

Köszönetemet fejezem ki **Dr. Ajtony Zsolt** egyetemi docensnek, hogy a GF-AAS méréseket tanszékén lehetővé tette és segítségét a mérések során.

Köszönet illeti **Bendő Zsoltot** a SEM felvételek elkészítéséért, **Pénzes Csanádot** pedig az AFM mérésekért.

*Végül köszönöm Szüleimnek szeretetüket és támogatásukat, Bálintnak pedig kitartó türelmét és a mindennapi békés háttérét.*