

Mikroanalitikai módszerfejlesztések és elemspeciáció biológiai rendszerek vizsgálatára

Doktori tézisek

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

I. 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, a minta esetleges 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 spektrometria (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}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 a Fe(II) és Fe(III) állapotok közötti 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.

II. Célkitűzések

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 „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 hiteles 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 szervetlen anyagtartalommal rendelkező hiteles 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.

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

Munkánk ezen részében célul tűztük ki 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 (FeSO₄, FeCl₃, Fe(III)-citrát, Fe(III)-

transzferrin), illetve kelátorokkal (Dp44mT, EDTA) való kezelést követően.

3. Rákos sejtek SR-TXRF-XANES analízise

A hamburgi szinkrotronnál (HASYLAB, DORIS III, beamline L) 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 rákos sejtek valamint különböző vegyszerekkel (CoCl_2 , NiCl_2 , MgSO_4 , antimycin A, 5-fluorouracil) és vasvegyületekkel (FeSO_4 , FeCl_3 , Fe(III)-citrát, Fe(III)-transzferrin) kezelt rákos sejtek Fe K abszorpciós élének XANES vizsgálata és ezen keresztül a vas oxidációs állapotának és sejtbeli környezetében beállt változásoknak a feltárása.

III. Anyagok és módszerek

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

Vizsgálataink során négyféle referenciaanyagot használtuk: SERONORMTM Trace Elements Serum Level 1 humán szérum, NIST 1577a Bovine Liver marhamáj, MURST-ISS-A2 Antartic krill antarktisi rák és IAEA-331 Spinach spenót.

A mikrohullámú feltárásokhoz Milestone gyártmányú Ethos 1 típusú feltáró berendezést alkalmaztunk. A minták analizését Wobistrax „lowZ TXRF” spektrométerrel végeztük el.

Három különböző feltárási módszert hasonlítottunk össze.

- **„Klasszikus” módszer:** körülbelül 0,05-0,1 g referenciaanyagot tártunk fel 2 ml tömény salétromsav segítségével PTFE (politetrafluoretilén) edényekben (20 perc, 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 jelreállítottuk. Az így kapott oldatból 5 µl került a TXRF mérésekhez használt kvarclapokra. A „klasszikus” módszert mind a négy referenciaanyag esetében alkalmaztuk.

- A SERONORM minta esetében **kis térfogatú feltárást** is alkalmaztunk. Jól záródó, 1,5 ml térfogatú PTFE mikroedényekben a szérumminta 50 µl-éhez 200 µl tömény salétromsavat adtunk. A feltárást 120 °C-on 20 percig laboratóriumi kerámia főzőlapon 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.

- A SERONORM minta esetében **közvetlen, kvarclapon történő feltárást** is alkalmaztunk. A PTFE edényekbe kvarc

háromlábat helyeztünk és erre tettük a kvarcclapot, melyre a mintát korábban felcseppentettük. A minta védelme érdekében kvarcfedőt is használtunk. A PTFE edényekbe tömény salétromsavat tettünk, a feltárássra gőzfázisban került sor 160 °C és 200 °C hőmérsékleteken, 20 percig.

2. A Fe, Cu, Zn meghatározásához használt anyagok és módszerek

A Fe és a Cu szimultán GF-AAS meghatározását Perkin Elmer SIMAA 6000 típusú grafitkemencés atomabszorpciós spektrométerrel végeztük. A GF-AAS mérésekhez $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ -ot használtunk kémiai módosítóként. A kvantitatív meghatározáshoz a Cu 324,8 nm –es és a Fe 305,9 nm –es vonalát használtuk. A kvantitatív analízishez külső kalibrációs módszert alkalmaztunk.

A TXRF vizsgálatokat ATOMIKA gyártmányú TXRF 8030C spektrométerrel végeztük el. Belső standardként Ga–ot használtunk. A Fe, Cu, Zn és a belső standard Ga meghatározására a 6,403 keV, 8,047 keV, 8,638 keV, 9,251 keV energiájú $K\alpha$ vonalaikat használtuk fel.

A sejtek kezelése és mintaelőkészítése

A sejttenyésztéshez kapcsolódó valamennyi tevékenységet az Országos Onkológiai Intézet Klinikai Kísérleti Laboratóriumi Osztályán (Budapest) végeztük.

A HT-29 kolorektális adenokarcinóma sejteket 6 lyukú tenyésztő lemezekben (10^6 sejt/ lyuk) tenyésztettük 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 tenyésző) sejteket használtunk. A kelátoros kísérletek esetében alkalmazott kezelési koncentrációk: FeSO_4 (20 μM), Dp44mT vagy EDTA (50 μM).

A kezelési idő letelte után a sejteket tripszin-EDTA segítségével vettük fel. A tripszinezést PBS-sel való hígítással állítottuk le, majd a sejteket Eppendorf csövekbe pipettáztuk. Kétszer mostuk a sejteket 1-1 ml PBS-sel. A sejtszámolást a 2. centrifugálás előtt Bürker kamra segítségével végeztük el. A 2. centrifugálást követően, a mosóoldat eltávolítása után a sejtekhez 20 μl 30%-os H_2O_2 -ot, 80 μl 65%-os HNO_3 -at és 15 μl 10 $\mu\text{g/ml}$ 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.

3. Az elemspeciációs analízishez használt anyagok és módszerek

A sejtekben a Fe oxidációs állapotának vizsgálatához fluoreszcens módú XANES spektroszkópai módszert alkalmaztunk. Az abszorpciós méréseket a HASYLAB (DESY, Hamburg) DORIS III L nyalábszatóján, vákuumban, súrlódó beesési szög nélkül, a vas *K* abszorpciós élénél végeztük el.

A sejtek kezelése, mintaelőkészítés

Kísérleteink során 10^5 - 2×10^5 sejtet (HT-29 sejtek, ZR-75-1 humán emlőrák, HT-1080 humán fibroszarkóma és MDA-MB-231 humán emlőrák sejtek) kezeltünk 80%-os benőtttségi 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 NiCl_2 , 2,4 és 57,6 mM CoCl_2 , 10 mM MgSO_4 , 25 és 300 μM antimycin A, 130 μM 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 μM volt.

A kezeléseket követően a sejteket tripszin segítségével felvettük, izotóniás sóoldattal kétszer mostuk, majd lecentrifugáltuk őket (20.000 g, 4 °C, 15 perc). A sejszámot Bürker kamra segítségével állapítottuk meg. A 2. centrifugálást követően a sejteket 10 µl izotóniás sóoldatban szuszpendáltuk, majd ebből 5 µl-t pipettáztunk a kvarclapokra. A becsült sejt koncentráció a szuszpenzióban: $10^4 - 2 \times 10^4$ sejt/µl volt. Az izotóniás sóoldat feleslegét pipettával távolítottuk el. A sejtekből így kialakult monolayer mikroszkóppal ellenőriztük és szobahőmérsékleten beszárítottuk. A lapokat argonnal töltött tárolóedényekbe helyeztük, melyeket a HASYLAB laboratóriumába való szállításhoz is használtunk.

IV. Eredmények

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

A szérum referenciaanyag 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 kistérfogató 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 hígíthatatlan 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.

A Wobistrax „lowZ TXRF” spektrométerrel a HT-29 sejtekben meghatározott S tartalom jó egyezést mutatott az ATOMIKA 8030C műszeren kapott eredményekkel. A S tartalom és a sejtszám között lineáris összefüggést találtunk, mely

összefüggést a későbbiekben a sejtszám ellenőrzésére használtuk.

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

A kifejlesztett multielemes TXRF és szimultán GF-AAS módszer alkalmas a különböző vasvegyületekkel (FeSO₄, FeCl₃, (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 tájuk 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 a kidolgozott 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 kifejlesztett mintaelőkészítési módszer alkalmas $0,2-10 \times 10^6$ sejt Fe, Cu, Zn tartalmának meghatározására TXRF illetve GF-AAS módszerrel.

A vasfelvételi kísérletekkel kapcsolatban megállapítható, hogy FCS 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 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 kijelenthető, hogy ez a vegyület nemcsak a sejtek vas-, hanem réz- és cinkhomeosztázisát is befolyásolja.

Eredményeink alapján javasolható a vaskelátorokkal végzett kísérletek esetében a réz- és cinktartalom meghatározása is rákos sejtekben, mely elemek koncentrációváltozásának is szerepe lehet az antiproliferatív hatás kialakulásában.

3. Rákos sejtek SR-TXRF- XANES analízise

A kidolgozott mintaelőkészítési módszer (a sejtszuszpenzió 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 szennyezés 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 specieszeinek 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 CoCl_2 , NiCl_2 , 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 tapasztaltunk eltérést az abszorpciós él helyzetében a ferritin spektrumától (az 5-fluorouracil esetében az abszorpciós él nagyobb energiák felé tolódott, 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.

V. Következtetések, új megállapítások

1. A biológiai mintákban lévő kisrendszámú elemek (Na, Mg, P, S, K, Ca) TXRF meghatározásához elsődlegesen a klasszikus feltérési módszer ajánlható.
2. Kísérleteink alapján a maximális analitikai pontosság érdekében biológiai minták kisrendszámú elemtartalmának TXRF analíziséhez a mátrixnak megfelelő kalibrációs faktorok meghatározása és alkalmazása javasolható.
3. A kidolgozott mintaelőkészítési módszer alkalmas $0,2-10 \times 10^6$ HT-29 sejt Fe, Cu, Zn tartalmának meghatározására TXRF, illetve GF-AAS módszerrel.
4. A HT-29 sejtek Fe, Cu és Zn tartalmának meghatározására kidolgozott TXRF és GF-AAS módszerek legfontosabb analitikai teljesítményparaméterei:

	TXRF	GF-AAS
Reprodukálhatóság	<10 %	<5 %
Visszanyerés	87-105 %	98-101 %
Kimutatási határ		
Cu	10,3 ng/ml	0,7 ng/ml
Fe	14,5 ng/ml	9,7 ng/ml
Zn	9,8 ng/ml	-

5. A HT-29 sejtek FCS mentes környezetben 5-50-szer több vasat vettek fel, mint FCS-es tápoldatból, valamint különbségeket lehetett megfigyelni a különböző típusú vasvegyületek felvétele között is.

6. 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, mely elemtartalmak változásának ugyancsak szerepe lehet a vaskelátor hatásának kialakulásában.

7. A kidolgozott mintaelőkészítési módszer (a sejtuszuspenzió kvarclapra való felcseppentése) és a SR-TXRF-XANES geometriai elrendezés alkalmas a sejtekben lévő vas oxidációs állapotának meghatározására valamint a félkvantitatív elemösszetétel megállapítására is.

8. Az SR-TXRF-XANES analízisek alapján a vas molekuláris szintű környezete ugyanaz maradt a különböző növekedési fázisokban, valamint a vizsgált sejtvonalak között sem találtunk szignifikáns különbséget.

9. A CoCl_2 , NiCl_2 , 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.

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

VI. 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*
1. 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*
2. 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*

VII. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek **prof. Dr. Zárny 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 PhD tanulmányaimat elvégezhettem, továbbá a Semmelweis Egyetem Doktori Iskolának a nekem ítélt predoktori ösztöndíjat.

Köszönöm **Dr. Szoboszlai Norbert** konzulensemnek, hogy doktori munkám során mindig számíhattam rá a kísérletek megtervezésétől kezdve azok kiértékeléséig és értelmezéséig. **Dr. Óvári Mihály** egyetemi adjunktust köszönet illeti a „lowZ TXRF” méréseknél nyújtott segítségéért. **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 sejtenyésztéshez 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 Streli** professzorasszonynak, **Peter Wobrauschek** professzornak, **Peter Kregssamernek**, hogy folyamatosan biztosították számomra a mérési lehetőséget a bécsi Atominstitutban, 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 **Bendó 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.