



1949

**HUMÁN VÉRSZÉRUMMINTÁK DIAGNOSZTIKAI
ELEMZÉSE ATOMSPEKTROMETRIÁVAL**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Tóth Csilla Noémi

témavezető: Prof. Dr. Fábián István, egyetemi tanár

DEBRECENI EGYETEM
Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács
Kémia Doktori Iskola
Debrecen, 2020

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács Kémia Doktori Iskola K/2 programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Nyilatkozom arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Debrecen, 2020.

a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy Tóth Csilla Noémi doktorjelölt 2014-2017 között a fent megnevezett Doktori Iskola K/2 programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Nyilatkozom továbbá arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2020.

a témavezető aláírása

Humán vérszérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a Kémia tudományágban

Írta: **Tóth Csilla Noémi** okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Kémia doktori iskolája
(K/2 programja) keretében

Témavezető: **Prof. Dr. Fábián István**

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr. Várnagy Katalin

tagok: Dr. Gáspár Attila

Dr. Galbács Gábor

A doktori szigorlat időpontja: 2017. december 5.

Az értekezés bírálói:

Dr.

Dr.

Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.

tagok: Dr.

Dr.

Dr.

Dr.

Az értekezés védésének időpontja:

Tartalom

Bevezetés és célkitűzés.....	1
2. Irodalmi áttekintés.....	4
2.1. A humán vér nyomelemtartalma.....	4
2.2. Humán vérszérumminták mintavétele, tárolása és előkészítése	6
2.3. A humán vérszérum elválasztása	6
2.4. Elemanalízis.....	8
2.5. A vérszérumminták elemanalízisére alkalmazott módszerek.....	12
2.6. Az atomspektrometriában fellépő zavaróhatások	15
2.7. Autoimmun betegségek: SLE és SS.....	18
2.8. A Gd ³⁺ -alapú MRI kontrasztanyagok hatása a humán szervezetre.....	20
3. Anyag és módszer.....	25
3.1. Modelloldatok összeállítása.....	25
3.2. Az MP-AES robusztusság vizsgálata.....	26
3.3. Humán vérszérumminták mátrixhatás vizsgálatának kísérleti terve...	27
3.4. Humán vérszérumminták modell-mintaadatainak elemanalízise MIP-AES módszerrel.....	30
3.5. Seronorm [®] liofilizált vérszérum minta-előkészítése és elemanalízise MIP-AES módszerrel.....	30
3.6. Humán vérszérumminták mintavétele, tárolása és minta-előkészítése	31
3.6.1. A humán vérszérumminták minta-előkészítése.....	31
3.6.2. A frakcionált vérszérumminták minta-előkészítése.....	33
3.7. Autoimmun beteg és kontroll humán vérszérumminták elemanalízise MIP-AES módszerrel.....	37
3.8. Frakcionált humán vérszérumminták elemanalízise MIP-AES és GFAAS módszerrel.....	37
3.9. Omniscan [®] [Gd(DTPA-BMA)] kontrasztanyagot tartalmazó humán vérszérumminták minta-előkészítése és elemanalízise	38
3.10. A kísérletek során alkalmazott statisztikai módszerek.....	41

4. Eredmények	42
4.1. Az MP-AES mérési paramétereinek optimalizálása	42
4.2. Humán vérszérumminták mátrixhatásvizsgálata MIP-AES technikánál	46
4.3. Autoimmun beteg és kontroll humán vérszérumminták elemanalízise MIP-AES módszerrel.....	58
4.4. A frakcionált vérszérumminták elemanalízise.....	62
4.4.1. A frakciók elemanalízisének optimalizálása	64
4.4.2. A frakcionált kontroll humán vérszérumminták elemanalízise....	67
4.5. Omniscan [Gd(DTPA-BMA)] kontrasztanyagot tartalmazó humán vérszérumminták elemanalízisének eredménye	75
5. Összefoglalás.....	83
6. Summary	90
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	95
7. Irodalomjegyzék	98
8. Függelék.....	106

Az értekezésben előforduló rövidítések

MIP-AES:	mikrohullámú plazma atomemissziós spektrometria
ICP-OES:	induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrometria
GFAAS:	grafitkemencés atomabszorpciós spektrometria
FAAS:	lángatomabszorpciós spektrometria
ICP-MS:	induktív csatolású plazma tömegspektrometria
SLE:	szisztémás lupus erythematosus
SS:	Sjögren szindróma
DTPA-BMA:	dietiléntriamin-N,N,N',N'',N'''-pentaecetsav-biszmethylamid
MRI:	mágneses rezonanciás képalkotás
IgG:	Immunoglobulin G
Trf:	transzferrin
Alb:	albumin
Cp:	cöruoloplazmin
Tris:	Trisz- (hidroxi-metil)-amino-metán $(\text{OH-CH}_2)_3\text{-C-NH}_2$
NSF:	Nephrogén Szisztémás Fibrózis
HSA:	humán szérum albumin

Bevezetés és célkitűzés

A humán vérszérumok elemtartalmának meghatározása jelentőséggel bír az orvosi diagnosztikában, hiszen az emberi test különböző szervetlen vegyületeket, köztük ásványi anyagokat használ fel biológiai folyamatai során. A vér teljes elemösszetétele információt nyújthat a szervezet tápláltságáról, így a szállítási folyamatokat szabályozó homeosztatisz mechanizmusok működéséről, a fázisreakciókról és az oxidatív károsodás elleni védelemről, mindezek alapján pedig a diagnosztikai eredmények akut vagy krónikus elváltozásokra utalhatnak. A szérumban található fehérjék képesek megkötni a nyomelemeket, ezáltal meghatározó szerepet töltenek be a transzportfolyamataikban. Az egyes fehérjékhez kötődő nyomelemek vizsgálatával szélesebb képet kaphatunk a szervezet normál, valamint betegségek esetén fellépő nyomelem-státuszáról, amely segítheti a kórkép felállítását egyes nehezen felismerhető degeneratív elváltozások esetében.

A vér rutin laboratóriumi vizsgálata során csak néhány elem (Na, K, Mg, Fe, Cu) meghatározását végzik többnyire elektrokémiai módszerekkel, azonban a vérben található esszenciális és toxikus elemek vizsgálatára manapság számos elemanalitikai eszköz is rendelkezésünkre áll. A leggyakoribb alkalmazott módszerek az atomspektrometriai technikák: a lángatomabszorpciós spektrometria (FAAS), a grafitkemencés atomabszorpciós spektrometria (GFAAS), az induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrometria (ICP-OES) és az induktív csatolású plazma tömegspektrometria (ICP-MS). A nyomelemek fiziológiai funkciói az emberi szervezetben a különböző fehérjékhez való kötődésüktől függenek. Ezért fontos meghatározni nemcsak a teljes elemkoncentrációt, hanem a különböző fehérjék elemeinek eloszlását, hogy feltérképezzük a szervezet élettani folyamatait és a kóros folyamatok során bekövetkező változásokat. Emellett megbízható analitikai módszerek kifejlesztése is alapvető fontosságú ahhoz,

hogy az ásványi anyagok és a betegségek közötti kapcsolat megértéséhez szükséges biológiai modelleket alakítsunk ki. Az úgynevezett fehérje-speciációs analízis alkalmazása során először el kell választanunk a vérérszékben található fehérjéket, amihez napjainkban már számtalan elválasztástechnikai módszert használhatunk (pl. különböző kromatográfiás módszereket). A frakcionált minták elemzésére szolgáló mérőrendszereket *off-line* és *online* módon is működtethetjük, azonban ezek nagyműszeres eljárások, amelyek csupán korlátozott mértékben elérhetőek és megfelelő szakképzettséget is igényelnek. További problémát jelenthet, hogy a vér egy bonyolult, nagy szervesanyag-tartalmú minta, amely esetleges zavaróhatásokat okozhat az ismert atomspektrometriai módszerek használata során, melyek kiküszöbölésére számos technika alkalmazására van lehetőség. Tehát az említett atomspektrometriai és fehérjeelválasztási módszerek ismerete elengedhetetlen a vér analízise során.

Jelen munkánkkal célul tűztük ki, hogy költséghatékonyabb módszereket dolgozzunk ki a humán szérumminták elemösszetételének mennyiségi elemzésére és valós analitikai feladatok megoldásában teszteljük azokat. Ehhez egy új elemanalitikai eszköz, a mikrohullámú plazma atomemissziós spektrométer (MP-AES) optimalizálását tűztük ki célul a vérminták elemtartalmának meghatározására, továbbá alkalmazhatóságának vizsgálatát a plazma mátrixérzékenységének függvényében. Modelloldatokkal terveztük tanulmányozni a szérumban viszonylag nagy koncentrációban megtalálható, könnyen ionizálódó elemek hatását a vizsgálni kívánt elemek analitikai jelére, a választott analitikai módszert Seronorm[®] liofilizált vérérszék minta visszamérésével terveztük ellenőrizni. A végső cél az optimalizált módszerek alkalmazhatóságának megállapítása volt autoimmun betegektől származó vérérszék nyomelemösszetételének meghatározására.

Humán vérszérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával

További terveink között szerepelt egy egyszerűen alkalmazható és költséghatékony oszlopkromatográfiás technika (anioncserélő gyanta) finomhangolása a szérumminták legfontosabb extracelluláris transzportfehérjéinek elválasztására és az egyes fehérjékhez kötődő esszenciális elemtartalom meghatározása atomspektrometriai módszerek, többek között a már említett MIP-AES technika, *off-line* alkalmazásával.

Anioncserés kromatográfiás módszer hatékonyságának további vizsgálatai során a [Gd(DTPA-BMA)]-komplex (Seronom[®]) humán vérszérumban lejátszódó disszociációjával felszabaduló Gd³⁺-ionok és fehérjefrakciók közötti kölcsönhatások kialakulását és megoszlásának meghatározását is terveztük ICP-OES módszerrel.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A humán vér nyomelemtartalma

A sejt minden élő szervezet építőeleme, összetétele állandó, számtalan adottsággal rendelkezik és dinamikus kölcsönös viszonyban van környezetével. Az emberi test speciális nedve a vér, amely a szervezetben lévő különféle anyagokat állandóan keringve szállítja a test szervei között, legfontosabb feladatai a keringéshez és a folyamatos áramláshoz kötődnek. A sejtek legalapvetőbb összetevője a fehérje, amelyek szállítását a vér biztosítja. A fehérjék anyagcseréjében a vér szerepét több tényező is szabályozza [1], [2]. Az emberi vérszérum számos, különböző életfunkciókért felelős plazmafehérjét tartalmaz, amiknek fontos szerepük van a hozzájuk kötődő nyomelemek transzportfolyamataiban. A nagy molekulatömegű fehérjék közel 99%-át teszik ki a vér fehérjetartalmának. Az öt immunglobulin osztály közül az immunglobulin G (IgG) a leggyakoribb a humán szérumban [3]. A transferrin (Trf) egy monomer glikoprotein, amely fenntartja a szabad vasszintet a testfolyadékokban [4], [5]. Az emberi szérumalbumin (Alb) a keringési rendszer egyik fő fehérjéje, amely a vér szérumfehérjéinek több, mint felét teszi ki. Az Alb részt vesz zsírsavak és metabolitok, valamint különböző gyógyszerek és nyomelemek szállításában [6], [7]. A cöruoplazmin (Cp) egy olyan glükoprotein, amely a vérszérumban a réz fő hordozója, aminoszén, ferroxid és szuperoxid-dizmutáz aktivitása van [8].

Az emberi szervezetben az esszenciálisan létfontosságú makroelemek (Na, K, Mg, Ca) a test tömegének közel 1 %-át teszik ki, míg a mikroelemek (Fe, Zn, Mn, Mo, Cu) kevesebb, mint 0,01 %-át adják. Biológiai szerepüket különféleképpen vizsgálva mégis a mikroelemek kerültek a kutatások előterébe, mivel az alkáli- és alkáliföldfém-kationok elenyésző komplexképző tulajdonsága, valamint limitált spektroszkópiai érzékelhetőségük hátráltatta a funkciók felkutatását. Az alkálifémionok kevés stabilis komplexet alkotnak az

Humán vérszérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával

ismert szervetlen vagy szerves komplexképzőkkel. A biológiai szereppel rendelkező átmeneti fémek a mikroelemek közé tartoznak és metalloproteinek formájában stabilizálják a fehérjék szerkezetét [9]. A kationok megoszlása a sejten belüli és kívüli tér között a termodinamikai egyensúlyi állapotnak nem felel meg.

Az emberi vér nyomelem-eloszlásának vizsgálata évtizedek óta alkalmazott módszer a klinikai diagnosztikában, amire nagy figyelmet fordítanak [10]–[13]. A klinikai gyakorlatban a vérben lévő esszenciális elemek mennyiségi meghatározása zömében elektrokémiai módszerekkel történik, számos létfontosságú nyomelem, valamint egyes toxikus elemek vizsgálata viszont nem képezi a kórházi rutinvizsgálatok részét [14]–[16]. A nyomelemek biokémiai szerepet tölthetnek be egyes betegségek kialakulásában, ugyanis mindig dinamikus egyensúly van a számos metabolikus és fiziológiai folyamatért felelős nyomelemek és a biológiai rendszerek között. Azonban ezek a kapcsolatok meglehetősen bonyolultak, így ahhoz, hogy megbízhatóan feltételezhessük az adott betegség kialakulását, megfelelő matematikai és statisztikai modellt kell felállítanunk az egészséges és beteg egyének megkülönböztetésére [10], [13], [17]–[23]. A plazmafehérjék analízise amellet, hogy az egyik legfontosabb klinikai vizsgáló módszerré fejlődött, az utóbbi években újra széleskörű kutatások tárgyát képezi. A speciációs analitika módszerei kiemelt jelentőséggel bírnak az elemek komplex biokémiai szerepének megértésében. Napjainkban egyértelművé vált ugyanis, hogy nem mindig elég a teljes vér elemkoncentrációjának meghatározása. Az adott fehérjéhez kötődő elemek mennyiségének megállapítása és összehasonlító vizsgálata többlet információval szolgálhat egyes diagnózisok felállításában [22], [24].

2.2. Humán vérszérumminták mintavétele, tárolása és előkészítése

A kémiai analízis lépései során azon túl, hogy a kitűzött célt alaposan megtervezzük, a mintavétel és a minta-előkészítés az egyik legalapvetőbb feltétele a helyes elemzésnek. A műszeres elemanalítika elengedhetetlen lépése a minta-előkészítő művelet, amely során a vizsgálandó mintát az analízishez megfelelő állapotba hozzuk. Csak abban az esetben fognak a mintához kapcsolódó adatok a vizsgálandó anyag összességével korrelálni, ha a mintavétel reprodukálható és a teljes mintára vonatkozik. Emellett a tárolás és a kezelés is nagyon fontos, hiszen befolyásolhatja az eredményeket. A vér mintavétele során, ha elemanalitikai vizsgálatokat szeretnénk végezni, a bekövetkező nyomelemszennyeződéssel is számolnunk kell. Így ebben az esetben szilikon bevonatú kanült célszerű alkalmazni, a rozsdamentes acélból készült vérvételi tűk helyett [25], [26]. Az analízis során nem alkalmazható olyan eszköz, amely elszennyezheti a mintát, illetve kölcsönhatásba tud lépni vele [27]. A natív vérvétel után a vérminták 2-8 °C-on hűtőszekrényben 1-2 napig, míg a vérszérum -70 °C-on fagyasztóban több napig is eltartható.

A legtöbb elemanalitikai meghatározás oldatból történik, így szükség van a minták minta-előkészítésére: a szerves komponenseket eltávolítjuk (oxidáció) és a mintából homogén oldatot készítünk. A vérszérum nagy szervesanyagtartalommal rendelkezik, ezért szükséges az elemanalízis előtti minta-előkészítése. A feltáráshoz több módszer is alkalmazható, mint például száraz és nedves hamvasztás vagy saveleggyel történő roncsolás nyílt és zárt rendszerben (atmoszférikus nyomáson történő és mikrohullámú feltárás) [28], [29].

2.3. A humán vérszérum elválasztása

Egy adott elem különböző kémiai formákban lehet jelen a mintában és ezen formák azonosítását, valamint koncentrációjuk meghatározását nevezzük

Humán vérszérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával

speciációanalízisnek. A vizsgálat tárgya lehet az elem izotópeloszlása, a különböző oxidációs állapotok aránya, vagy például a vérszérumban található fehérjékhez kötődő elemek megállapítása. Ezért az egyes kémiai anyagok azonosítása és mennyiségi meghatározása, valamint a minta mátrixon belüli eloszlása szükségessé teszi az analitikai és klinikai kémiai vizsgálatok elvégzését [30].

A fehérjék elválasztására és azonosítására számos analitikai technika használható, a leggyakrabban kromatográfias módszereket alkalmaznak. Azonban, ha az elválasztást követően elemanalitikai vizsgálatokat szeretnénk végezni, úgy a választott kromatográfias eljárásnak különböző feltételeknek kell megfelelnie. A fehérjék degradációját el kell kerülnünk, ezáltal megőrizve eredeti konformációjukat, továbbá a fehérje-fém kötődést is fenn kell tartani. A fémszennyezés elkerülése érdekében nagy jelentőségű az alkalmazott reagensek és pufferek tisztasága és a szeparálás során nem hígulhat a minta koncentrációja a választott elemanalitikai módszer mérési határa alá [68]. Azzal a ténnyel is számolnunk kell továbbá, hogy megfelelő mennyiségű mintára van szükség, mind a minta-előkészítéshez, mind az elemanalízishez, ezáltal a kis térfogatú eljárások ebben az esetben nem lesznek alkalmasak. Ennek következtében több kromatográfias rutin eljárás nem hasznosítható elemspeciációs kutatásokhoz. Az elmúlt évtizedekben egyszerű analitikai technikák továbbfejlesztésével létrehoztak olyan módszereket, amelyek akár nyomelemek esetében is alkalmasak speciációanalízisre. Léteznek *on-line* kapcsolt technikák, például számos speciációs módszerben az ICP-MS rutinszerűen kapcsolódik egy kromatográfias elválasztáshoz (HPLC), ami gyors, szelektív meghatározást tesz lehetővé. Hátránya azonban, hogy magasfokú szakértelmet kíván, és a beszerzési, valamint az üzemeltetési költségei is jelentősek [23], [30]–[36].

2.4. Elemanalízis

Az atomspektrometria területéről egy kívánt analitikai feladat végrehajtása szempontjából számos elemanalitikai módszer közül tudjuk kiválasztani a legmegfelelőbbet. Az ide tartozó műszeres analitikai eszközök az 1950-es évektől kezdve napjainkig folyamatosan fejlődnek [37]–[40]. Az atomabszorpciós eljárások fejlesztése során alakult ki a grafitkemencés atomabszorpciós spektrometria (GFAAS), ahol akár pikogramm-femtogramm mennyiségben határozható meg a mintákban található nyomelemek mennyisége, ezáltal az egyik legérzékenyebb elemanalitikai módszer. A minta egészen kis térfogatát (10-20 μ l) egy automata mintaadagoló segítségével reprodukálhatóan adagoljuk az atomizáló térbe, ami egy magas hőmérsékletre fűthető grafitcső [41], [42].

Az 1970-es években alakult ki a ma is legelterjedtebben alkalmazott emissziós technika, az induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrometria (ICP-OES). Ennél a módszernél egy közel 10 000 K hőmérsékletű plazmát alkalmazunk atomizálásra és gerjesztésre, amit argon gáz segítségével, rádiófrekvenciás energiával hozunk létre és tartunk fent folyamatosan. Ezzel a technikával megközelíthető a ppb koncentrációjú elemtartalom meghatározása.

A mikrohullámú energiaközléssel előállított plazmákat évtizedek óta vizsgálják az induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrometria (ICP-OES) opcionális helyettesítő módszereként [43]–[46]. Számos közlemény jelent meg a mikrohullámmal előállított plazma kialakításának kísérleteiről [47]–[50]. A mikrohullámmal indukált plazmák gázárama és elektromos kapacitásának működése egy nagyságrenddel alacsonyabb az induktívan csatolt plazmához képest. Ebben az esetben kisebb fáklyákat alkalmaznak, általában kevesebb a gázfogyasztás, valamint kevésbé költséges gázokkal, mint például nitrogénnel is működtethető. Az első légköri nyomású MIP-

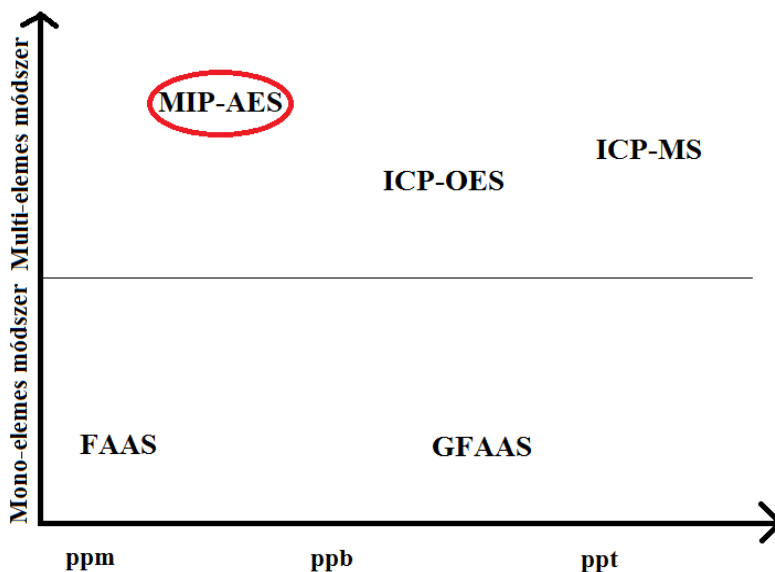
Humán vérszérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával

fáklyáról 1951-ben *Cobine és Wilbur* számolt be [51]. 1965-ben *McCormack és munkatársai* szerves vegyületek kimutatására gázkromatográfiás elválasztást követően 2,45 GHz-es mikrohullámú kisülésű gerjesztési forrást alkalmaztak [52]. *Beenakker* 1976-ban fejlesztette ki készülékét, a rezonátor egy 92,5 mm-es hengeres üregből áll, ami a legismertebb üreg a mikrohullámú plazma gerjesztéséhez. Alacsonyabb teljesítménnyel (<150 W) 2,450 GHz-es mikrohullámú energiával atmoszférikus nyomáson lehetőség volt hatékony plazmát képezni száraz, nedves argonnal vagy héliummal, valamint folyékony aeroszol beporlasztásával fémek elemanalízisét is sikerült elvégezni a létrehozott argon plazmában [53], [54]. A korai MIP-OES műszereket viszonylag kisebb teljesítmény mellett működtették (500 W-ig), ami kevesebb energiát tett szükségessé a minta beporlasztásához, valamint az atomizálásához és gerjesztéséhez. Az alacsonyabb hőmérséklet, a nem-torroid plazma és a folyékony minta aeroszolok közötti rossz kölcsönhatás voltak azok a fő tényezők, amik a korai MIP-rendszereknél megfigyelt viszonylag kisebb érzékenységet eredményeztek. Ez az 1990-es évek elejéig jelentett problémát [55]–[58]. 1991-ben *Jin és munkatársai* kifejlesztettek egy olyan mikrohullámú fáklyát, amely az argon mellett képes He vagy N₂ gázzal is létrehozni a plazmát. A plazma láng alakú, és központi csatornát képezve megkönnyíti a minta bevezetését és fokozza a minta és a plazma közötti kölcsönhatást [59]. *Okamoto és munkatársai* számos közleményükben viszonylag nagy teljesítményű (> 1 kW) mikrohullámú plazma fáklyákat írtak le, amik magasabb hőmérsékletet és jobb plazma / folyadék minta kölcsönhatást tettek lehetővé [60], [61].

Az említett MIP-AES eszközöknek az analitikai teljesítménye nem éri el az indukciós csatolt plazmáét. E módszer mátrixérzékenysége nagyobb, bizonyult, illetve a mintabevitel kis mennyisége instabilitást eredményezett. Így a limitált felhasználási lehetőségei miatt nem is terjedt el az

atomspektrometriás eszközök piacán, azonban az érdeklődés e módszer iránt mai napig megmaradt. A hátrányok ellenére a mikrohullámú plazma fejlesztése tovább folytatódott, mivel egy olcsóbb és könnyen működtethető technikát kívántak kidolgozni [49], [62]–[68]. 2008-ban *Hammer* beszámolt egy nagy teljesítményű légköri nyomású mikrohullámú plazma fejlesztéséről, levegő vagy N_2 gáz felhasználásával, azzal a céllal, hogy leküzdje a korábbi MIP-típusok bizonyos korlátait. *Hammer* megközelítése olyan plazmát eredményezett, amely a különböző minták esetében (mind a vizes, mind a szerves bázisú minták) nagy stabilitással és robusztussággal rendelkezik. Javított a kimutatási határértékeken az eddigi MIP-típusokhoz képest, valamint lehetővé tette az ICP típusú fáklya, ködkamra és porlasztó alkalmazását. Néhány elem esetében a kimutatási határok elérték az ICP-OES értékét [68].

2011-ben *Hammer* terveit alkalmazva, amik kiküszöbölték a mikrohullámú plazma sugárforrás kis termikus kapacitásából és csekély plazmatérfogatából származó hátrányait, kereskedelmi forgalomba helyezték az első mikrohullám plazma atomemissziós spektrométer készüléket, amely az MP-AES elnevezést kapta. A *1. ábra* az új módszer helyét szemlélteti az atomspektrometriában alkalmazott műszeres technikák között.



1. ábra A mikrohullámú plazma atomemissziós spektrometria (MIP-AES) elhelyezkedése az atomspektrometriában alkalmazott műszeres technikák között

A mikrohullámú plazma atomemissziós spektrométer (MP-AES) egy olyan új elemanalitikai eszköz, ami számtalan előnnyel rendelkezik az eddig ismert lángatomabszorpciós spektrométerekkel szemben (2. ábra), és alkalmazási lehetőségeit tekintve versenyben van az induktív csatolású plazmával. Plazmagázként nagy tisztaságú nitrogént alkalmaz, amelyet egy generátor segítségével tud előállítani sűrített levegőből, valamit gázpalackkal is működtethető, így a gáz szelepeken keresztül egyenesen a plazmaégőbe jut. A magnetron 2,5 GHz frekvencián generál elektromágneses hullámokat, a keletkező mágneses mező axiális térben fókuszálódik a torch (plazmaégő) köré, ahol torroid alakú plazma képződik, aminek hőmérséklete alacsonyabb a hagyományos induktívan csatolt plazmákhoz képest (5000-6000 K). A készülékben a megfigyelés axiálisan történik, a plazma viszont radiális irányú, a plazmaégő függőleges állású. Az optikai rendszer Czerny-Turner típusú

monokromátorral van felszerelve, a detektálás CCD detektor segítségével történik.



2. ábra A mikrohullámú plazma atomemissziós spektrométer (MP-AES, 4200 Agilent Technologies)

2.5. A vérszérumminták elemanalizésére alkalmazott módszerek

Napjainkban a vérszérumminták elemanalizésére számtalan atomspektrometriai eszköz alkalmazható, azonban a kutatások nagyobb hangsúlyt fektetnek a különböző betegségekre vonatkozó következtetések levonására, mint a nyomelemek meghatározására alkalmas módszerek értékelésére. Egyre több klinikai laboratórium választja az FAAS, GFAAS, illetve az ICP-OES módszerek helyett az ICP-MS technikát, a friss publikációk is gyakrabban ezt az eljárást említik [12], [69]–[74]. Sok laboratóriumban a vizsgálat előtt a műszeres technika megválasztása során három tényezőt vesznek alapul: a meghatározandó elemet vagy elemeket, az elemzendő minta mátrixát és a vizsgálandó elemek várható koncentrációját az adott mátrixban [75]. Az 1. táblázatban összefoglaltuk a ma alkalmazható atomspektrometriai technikák legfótosabbnak tartott előnyeit és hátrányait.

Humán vérszérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával

1. táblázat A vérszérumminták meghatározására szolgáló atomspektrometriai módszerek jellemzői [76]

Technika	előny	hátrány
ICP-MS	<p>képes izotópok mérésére</p> <p>kedvező kimutatási határ (ppb)</p> <p>egyszerű minta-előkészítés</p> <p>nagy teljesítmény</p> <p>multielemes technika</p>	<p>kevésbé tolerálja a szerves és nagy sótartalmú mintákat</p> <p>mátrixhatások</p> <p>költséges</p>
ICP-OES	<p>multielems technika</p> <p>gyors</p> <p>tolerálja a nagy sótartalmú mintákat</p> <p>széles mérési tartomány (1 ppb-1000 ppm)</p> <p>jó lineáris dinamikus tartomány (10^6 - 10^9)</p>	<p>viszonylag rossz a kimutatási határ</p> <p>zavaróhatások</p> <p>minta fogyasztása sok (1-5 ml)</p> <p>minta-előkészítést igényel</p>
AAS	<p>nagy érzékenység</p> <p>könnyen kezelhető</p> <p>olcsó</p> <p>gyors</p> <p>rövid mérési idő</p> <p>mérési tartomány:</p> <p>FAA 50 ppb - 500 ppm</p> <p>GFA 10 ppt - 100 ppb</p>	<p>nem multielemes technika</p> <p>minden elem elemzéséhez külön üreghatólámpa szükséges</p> <p>kicsi pontosság (GF-AAS 1-5%, FA-AAS 0,1-1%)</p> <p>viszonylag nagy mintamennyiséget igényel</p> <p>probléma a nehezen atomizálható elemekkel</p> <p>mátrixhatások</p>

A 2. táblázatban a közelmúltban megjelent publikációk alapján mutatjuk be a vérminták elemzésére alkalmazott elemanalitikai technikákat.

2. táblázat Vérszérumminták elemtartalmának meghatározására alkalmazott atomspektrometriai eszközök napjainkban

Technika	Vizsgált elem	Vizsgálat célja
ICP-MS	Cr, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se, Zn, As, Cd, Sb, Sn, V	Huntington-kór[69]
	As, Cd, Cr, Hg, Ni, Pb, Co, Cu, Mn, Se and Zn	biomonitorozás terhesség alatt[70]
	Pb, Cd, Al, Hg, Mn, Fe, Cu, Zn, Se, Mg, Ca	Amiotrófiás laterálszklerózis[72] magzati szívhibák kapcsolatának vizsgálata[74]
	Pb, Cd, Cr, Cu, Hg, Se	emberi vér és szérum ásványianyagtartalom meghatározásának módszerkidolgozása[73]
ICP-OES	Ca, K Mg, Fe, Na	emberi vér és szérum ásványianyagtartalom meghatározásának módszerkidolgozása[73]
	Mg, Zn, Cu, Fe	SLE[77]
FAAS	Zn, Cu, Se	reumás arthritisz [78]
	Zn, Cu, Se	SLE [79]
GFAAS	Li	Li meghatározás módszerfejlesztés[80]
	Ca	Ca meghatározás módszerfejlesztés[81]
	Hg	szerves és szervetlen Hg meghatározás módszerfejlesztés[82]

Az itt felsorolt eljárásokkal csak minta-előkészítés után tudják a vérmintákat analizálni, azonban egyre nagyobb az igény a direkt, roncsolásmentes

Humán vérszérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával

módszerek alkalmazására. A vérszérumminták direkt elemzésére ismert egy eljárás, ahol lúgos hígítás után elvégezhető az elemanalízis, azonban a nagyfokú hígulás (ng/l a vizsgálandó elemek koncentrációja) miatt egyelőre ezt csak ICP-MS módszerrel alkalmazzák. Bár ez az előkészítési mód hatékony, hátránya, hogy eltömítheti a készülék alkatrészeit és csökkentheti a mérés pontosságát [83]. Ezáltal továbbra is a különböző roncsolási technikákkal előkészített szérumminták elemanalízisét tartják a legmegfelelőbbnek [84], [85].

A vérszérumminták közvetlen vizsgálata a közelmúltban kifejlesztett MP-AES készülék esetében még nagy hígítás után és oxigénbevezetés mellett is nehézkes. Ugyanis, ahogyan ez már említésre került, a lúgos hígítás olyan mértékű, hogy a vizsgálandó elemek koncentrációja a készülék kimutatási határértéke alá esik. Továbbá, a nagy szerves-anyagtartalom miatt számolni kell a készülék mintabeviteli rendszerének tömítődésével is. Ennél a technikánál is a roncsolt minta alkalmazása mellett lehet megbízhatóan elvégezni a vérszérumminták analízisét.

2.6. Az atomspektrometriában fellépő zavaróhatások

Az atomspektrometria kidolgozásának elején azt vallották, hogy nem kell zavaróhatásokkal számolnunk egy mérés során, napjainkban viszont amellet, hogy felfedezésre kerültek ezen hatások, kiküszöbölésükre számos technika is ismertté vált [42], [86], [87].

Az atomspektrometriában fellépő zavaróhatásokat többféleképpen is osztályozták, de alapvetően két típusát különböztethetjük meg az IUPAC által elfogadott besorolás szerint: spektrális és nem spektrális zavaróhatásokat.

Spektrális zavaróhatásoknak nevezzük, amikor nem tudjuk elkülöníteni az analizálandó anyag emisszióját egyéb emisszióktól, ide soroljuk például az atomvonalak egybeesését. Az atomspektrometriában ismert technikák közül az

ICP-OES az, amelyben a legkevesebb zavaróhatás jelenik meg egy mérés során. Ennél a módszernél a legtöbb hibát a spektrális zavaróhatások okozhatják, amelyeket több módon is tudunk csökkenteni, úgy, mint nagyfelbontású spektrométerek alkalmazásával, a kifejlesztett háttérkorrekciós technikák használatával, továbbá azzal, hogy egy elem esetében több elemzővonalat alkalmazunk egy analízis során [43]–[46], [88]. Az induktív csatolású plazma – tömegspektrometria esetében (ICP-MS) spektrális zavarást okoznak az olyan ionok, amik egy vagy több atomból állnak, illetve a tömeg/töltés értékük megegyezik a meghatározandó izotóp tömeg/töltés hányadosával [89].

Nem spektrális zavaróhatásoknak nevezzük a szabad atomok képződéséhez rendelhető hatásokat. Más néven mátrixhatásoknak is nevezik ezeket, amelynek két fajtája van: a fizikai és a kémiai mátrixhatás. A fizikai hatás a minta fizikai tulajdonságaitól függ, míg a kémiai hatás akkor jön létre, ha egy vagy több elem jelenléte befolyásolja a mérendő komponens emissziós jellemzőit a mintában [90].

A plazma emissziós spektrometriás vizsgálatok során különös figyelmet kell fordítani a könnyen ionizálódó elemek hatására, a gerjesztési körülményekre és a meghatározások eredményére. A könnyen ionizálódó elemeket széles körben tanulmányozzák az ICP-OES területén, ugyanis a plazmába történő bejutása során megváltoztathatja a gerjesztési hőmérsékletet és az elektronsűrűséget, továbbá módosíthatja az atom- és ion térbeli eloszlását, és befolyásolhatja a meghatározott elemek gerjesztési mechanizmusát. Az induktívan csatolt plazmákba a könnyen ionizálódó elemek mátrixhatásának kialakulására vonatkozóan számos mechanizmust állapítottak meg: ionizációs eltolódás, párolgási hatás, ambipoláris diffúzió - de egyértelmű, domináns konstrukcióról nincs egyetértés [91]. Emellett figyelembe kell venni a nagy sókoncentráció fontosságát is, valamint a

Humán vérszérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával

porlasztás és a minta bejutásának hatékonyságát a plazmába. Általánosságban elmondható, hogy a kísérletek eredményeit nem lehet egyetlen gerjesztési mechanizmussal magyarázni, ami azt jelzi, hogy a különböző tényezők alapvetően és együttesen befolyásolják a mért jelet [92].

A plazmafeltételek jelentősen meghatározzák a nyomelem elemzés eredményeinek megbízhatóságát. Az alacsonyabb hőmérséklet, az összetett mátrixok alkalmazása, valamint a gerjesztési és ionizációs egyensúllyal kapcsolatos kérdések veszélyeztethetik a mérés alaposságát és pontosságát. A hőmérséklet mellett a plazmakémia másik fontos paramétere az elektronszám-sűrűség. Nyilvánvalóan központi szerepet játszik az összes plazmaionizációs folyamatban, de alapvető az ütközéses gerjesztésben, a folytonos háttérjel intenzitásában, a helyi termikus egyensúlyban és a plazmahéj mélységében. Az elektronszám-sűrűség ismerete a plazma különböző régióiban megkönnyítheti az atomok és ionok meghatározását, és hozzájárulhat a könnyen ionizálható elemek miatti interferenciák minimalizálásához [68], [93], [94].

A mintában nagy koncentrációban jelenlévő, könnyen ionizálódó elemek ionizációjának kiküszöbölésére ionizációs pufferként alkalmazható egy hasonlóan könnyen ionizálódó elem szintén nagy koncentrációban történő hozzáadása. *Morishige és munkatársai* megállapították, hogy a Cs rendelkezik a legnagyobb ionizáció visszaszorító tulajdonsággal a Na és a Ba mellett. Eredményeik alapján azt javasolják, hogy az ionizációs puffert (Cs) a mintában jelenlévő könnyen ionizálódó elemek koncentrációjához képest ötszörös mennyiségben szükséges hozzáadni, hogy a leghatékonyabban nyomja vissza és stabilizálja az ionizáció mértékét a nagy hőmérsékletű térben [95].

Goncalves és munkatársai 2016-ban az új MP-AES készüléken végzett kísérleteik során a Boltzmann ábrázolást, a Saha-egyenletet és a MgII/MgI arányt alkalmazták a N₂ MIP hőmérséklet, elektronszám-sűrűség és robusztussági profilok generálására különböző porlasztási, valamint áramlási

sebességeknél és plazma megfigyelési pozícióknál. A vizsgálataik során leírt plazmahőmérséklet, elektronszám-sűrűség és robusztussági profilok általános útmutatóként használhatóak, és hozzájárulhatnak a MIP-OES alkalmazások kisebb mátrixhatásaihoz, valamint jobb érzékenységet biztosítanak. További tanulmányokat végeztek, ahol ezzel a műszerrel számított kimutatási határ értékeik vetekednek az ICP-OES-ével, ahol a legjobb eredményeket a szoftverre optimalizált körülmények között és a nagy elektronszámsűrűségű régiókban történő meghatározásoknál figyeltek meg [94].

Chalyavi és munkatársai 2017-es kísérletei alapján az Agilent 4200 MP-AES készülék olyan analitikai plazmát hoz létre, amely közel áll a helyi termodinamikai egyensúlyhoz: vizsgálatuk során a mért gerjesztési hőmérsékleten alapuló plazmaösszetétel-számítások a Thomson-szórás kísérletekkel meghatározott plazma-elektron-sűrűséggel jó egyezést mutattak. Ez az egyensúly azt is jelenti, hogy az analit-emissziós spektrumok, valamint az ion-atom intenzitási arányok kiszámíthatóak, a modellek és a mért teljes pásztázott spektrumok között jó egyezést kaptak [96].

A környezetben szinte bárhol megtalálható nátrium a vérérszumban is nagy koncentrációban (3000-5000 mg/l) jelenik meg. Mivel ionizációs potenciálja alacsony, így a könnyen ionizálódó elemek csoportjába sorolják, ezért szem előtt kell tartanunk az esetleges mátrixhatását a mikrohullámú plazmában is [97].

2.7. Autoimmun betegségek: SLE és SS

Rengeteg olyan betegség létezik, amelyek az esszenciális ásványi anyagok növekvő vagy csökkenő szintjéhez kapcsolódnak. Ezért a szervezetben az ásványi anyagok kölcsönhatásának megértése segíthet a betegségek diagnosztizálásában és kezelésében.

Humán vérszérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával

Az autoimmun betegségek körében több, mint száz fajta betegséget különböztethetünk meg, melyek mindegyike olyan állapotot jelent, amikor az immunrendszer tévesen támadja meg a szabályosan működő testet. Az immunrendszer normál esetben véd a kórokozók, mint a baktériumok és vírusok ellen azért, hogy érzékeli az idegen behatolókat a szervezetben és meg tudja különböztetni azokat a saját sejtjeitől. Az autoimmun betegségek során a szervezet a saját sejtjeit tekinti idegennek, ezáltal felszabadítva az autoantitesteknek nevezett fehérjéket, amelyek az egészséges szerveket, szervrendszereket, szöveteket stb. támadják meg. Ennek következtében vannak olyan típusú megbetegedések, ahol csak egy szerv vagy szövet károsodik, ilyen például az 1-es típusú cukorbetegség, ami a hasnyálmirigyet támadja meg. Egyéb szisztémás betegségek, mint például a lupusz, az egész szervezetre, testre hatással vannak. Ezek a betegségek a lakosság mintegy 5%-át érintik. Kialakulásuk pontos okai eddig ismeretlenek, de a különböző genetikai eltérések, a környezeti tényezők, az életkor, illetve fertőzések és bizonyos gyógyszerek is szerepet játszhatnak keletkezésükben. [98], [99].

A szisztémás lupus erythematosus (SLE) egy krónikus gyulladással járó autoimmun betegség, amelyben az immunrendszer tévesen támadja meg az egészséges szöveteket a test számos területén. Gyakori tünetei közé tartoznak a fájdalmas és duzzadt ízületek, a láz, a mellkasi fájdalom, a hajhullás, a szájfekélyek, a duzzadt nyirokcsomók, a fáradtság és a vörös kiütések, amik leggyakrabban az arcon találhatók és napfény, D-vitamin hiány, dohányzás hatására jelentkezhetnek és erősödhetnek. Elsősorban a fiatal, reprodukív korban lévő nőknél fordul elő. A betegségnek több időszakát különböztethetjük meg: a fellángoló időszakot, amikor a tünetek felerősödnek, illetve van az úgynevezett remissziós időszak, amikor a tünetek nem jelentkeznek. Az SLE betegségre egyelőre nincs gyógymód, gyógyszeres

kezelésekkel növelhető a betegek élethossza és javítható az életminőség [100], [101].

A Sjögren-szindróma (SS) olyan szisztémás autoimmun betegség, amely az egész testre hatással van. Tünetei elsősorban a szem- és szájszárazság, de más súlyos problémák is jellemzik, mint a fáradtság, a krónikus fájdalom, az idegrendszer károsodása, zavara és a nyirokrendszer megbetegedése. A betegség bármilyen korban kialakulhat, de a legtöbb esetben 40-50 év közötti nők körében jelentkezik. Mivel az SS más betegségek tüneteit is mutathatja, a diagnózis felismerése közel 3 évet is igénybe vehet. A tünetek általában stabilak lehetnek, illetve romolhatnak, de ritkán jutnak el a remissziós állapotba. Nagyon fontos a korai diagnózis és a megfelelő kezelés, amivel megakadályozható a szövődmények kialakulása és nagymértékben javítható a beteg életminősége [102]–[104].

Az egyes nyomelemek koncentrációjának változását összefüggésbe hozták az autoimmun betegségek kialakulásával [105]. Az SLE-ben szenvedő betegeknél néhány nyomelem koncentrációja eltérést mutatott az egészséges szérumban található koncentrációval szemben, valamint a Trf, Alb és Cp szintek is eltérőnek bizonyultak [77]. A szérum nyomelemeinek változását megfigyelték a reumás ízületi gyulladás esetén is, ami köztudottan egy autoimmun eredetű betegség [78], [106]–[109]. *Yilmaz és munkatársai* autoimmun betegséggel foglalkozó tanulmányai arra tesznek javaslatot, hogy további vizsgálatok szükségesek az antioxidáns fehérjék és a vérszérumok nyomelemei közötti kapcsolat részletesebb feltérképezésére [77].

2.8. A Gd³⁺-alapú MRI kontrasztanyagok hatása a humán szervezetre

Az esszenciális elemek mellett számos fémiont alkalmaznak különleges optikai, mágneses és radiokémiai sajátosságuknak köszönhetően az orvosi diagnosztika különböző területein és terápiás kezelésekben [9], [110]–[113].

Humán vérszérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával

A nem esszenciális ionokat tartalmazó anyagok *in vivo* felhasználásához számos kritériumnak kell megfelelniük, többek között ne váltsanak ki klinikai tüneteket, hosszú ideig alkalmazhatók legyenek és az élő szervezettel összeférhetőnek kell lenniük. Nem elegendő, hogy a szervezetre nem toxikus az adott anyag, a felületi biokompatibilitásnak is teljesülnie kell [114], [115].

Mivel a szabad, nem esszenciális fémionok általában toxikusak, ezért diagnosztikai vizsgálatokban és terápiás kezelésekben történő alkalmazásuk csak stabilis komplexek formájában lehetséges [116]. Nagy stabilitású komplexeket például a nyíltláncú és makrociklusos poliamino-polikarboxilát ligandumokkal képeznek, ami az ilyen típusú komplexek kémiája iránti érdeklődés nagymértékű növekedését eredményezte. A komplexek orvosi diagnosztikai alkalmazásának egyik főbb területe a Mágneses Rezonanciás Képzéskészítés (MRI), ahol Gd^{3+} -komplexeket alkalmaznak [117]–[119].

Napjainkban a klinikai vizsgálatok során főként a vízprotonok longitudinális relaxációs idejét (T_1) csökkentő MRI kontrasztanyagokat használnak. A legnagyobb mértékű csökkenést az S alaptermű, viszonylag hosszú relaxációs idejű, párosítatlan elektronokkal rendelkező paramágneses fémionok (Mn^{2+} , Fe^{3+} , Eu^{2+} , Gd^{3+}) eredményezik. A legnagyobb hatást a Gd^{3+} -ion okozza, mivel 7 párosítatlan elektronja, ezáltal nagy mágneses momentuma és kellően hosszú elektron relaxációs ideje (10^{-9} s) van. A szerves Gd^{3+} -só-oldatok nagyon toxikusak az élő szervezet számára, ($LD_{50}=0,2-0,5$ mmol/kg) [120], így csak stabilis komplexeik alkalmazhatók MRI kontrasztanyagként. Komplexképzők közül a nyíltláncú dietiléntriamin- N,N,N',N'',N''' -pentaecetsav (DTPA), a makrociklusos 1,4,7,10-tetraazaciklododekán-1,4,7,10-tetraecetsav (DOTA) és származékaik felhasználása terjedt el. Az orvosi diagnosztikai vizsgálatokban elsőként alkalmazott kontrasztanyag a $Gd(DTPA)^{2-}$ (Magnevist[®]) [121], [122], ami

1988 óta klinikai alkalmazásban áll. A nyíltláncú $\text{Gd}(\text{DTPA})^{2-}$ kifejlesztését követően a jóval nagyobb kinetikai inertségű $\text{Gd}(\text{DOTA})^{-}$ (Dotarem[®]) került bevezetésre [123]. Az ozmotikus terhelés csökkentése érdekében az alkalmazásban lévő két Gd^{3+} -komplex ($\text{Gd}(\text{DTPA})^{2-}$ és $\text{Gd}(\text{DOTA})^{-}$) semleges változatait fejlesztették ki ($\text{Gd}(\text{DTPA-BMA})$ (Omniscan[®]), $\text{Gd}(\text{DTPA-BMEA})$ (Optimark[®]), $\text{Gd}(\text{HP-DO3A})$ (ProHance[®]) és a $\text{Gd}(\text{BT-DO3A})$ (Gadovist[®])), amelyekben a ligandum 1 vagy 2 acetátcsoportját semleges alkoholos hidroxil- vagy amidcsoportokkal helyettesítették [124]–[126]. 0,1-0,3 mmol / testsúly kg dózist alkalmaznak, ami alapján egy 70 kg-os beteg esetén 7 és 21 mmol GdL komplexet fecskendeznek be. Mivel a készítmények 0,5 mol/l koncentrációjúak, általában 14 - 42 ml terméket injektálnak be intravénásan.

A Gd^{3+} -komplexek *in vivo* stabilitásának, illetve disszociáció-sebességének az ismerete a legutóbbi években különösen fontossá vált, mivel felismertek egy új, súlyos vesebetegség esetében előforduló betegséget (Nephrogen Szisztémás Fibrózis - NSF), amit a Gd^{3+} -tartalmú kontrasztanyagokkal hoztak kapcsolatba [127]–[129]. A Gd^{3+} -tartalmú kontrasztanyagokkal vizsgált súlyos vesebetegség esetében a Gd^{3+} -komplex kiürülése a szervezetből lassú ($t_{1/2}=30 - 40$ óra). A hosszú idő alatt a Gd^{3+} -komplexnek jelentékeny része disszociálhat a szervezetben a fémioncsere reakciók során és a szabaddá váló Gd^{3+} hozzájárulhat az NSF kialakulásához, mint annak egyik rizikófaktora. Az NSF betegek többségét egy nyíltláncú ligandum (90%-ban DTPA-BMA) Gd^{3+} -komplexével vizsgálták, melyek disszociáció sebessége lényegesen nagyobb, mint amit a makrociklusos DOTA és származékai Gd^{3+} -komplexei esetében megfigyeltek [130]. Az NSF kialakulásának az okai még nem közismertek és ezek feltárásához meg kell ismerni, hogy a különböző Gd^{3+} -tartalmú

Humán vérszérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával

kontrasztanyagokból milyen mennyiségben és milyen sebességgel szabadul fel a Gd^{3+} -ion, majd az milyen formában kerül a testfolyadékokba.

A Gd^{3+} -komplexek intravénás injektálásukat követően viszonylag gyorsan eloszlanak az extracelluláris testfolyadékokban. A testfolyadékok rendkívül összetettek, számos fémiont és ligandumot tartalmaznak, amelyek kicserélődési reakcióba léphetnek a Gd^{3+} -komplexekkel. Az NSF kialakulása során az esszenciális fémionok (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} és Fe^{3+}) és ligandumok (CO_3^{2-} , PO_4^{3-} , citrát, transferrin) helyettesíthetik a Gd^{3+} -iont és a Gd^{3+} -komplexekben található amino-polikarbonsav ligandumot fémioncsere és ligandumcsere reakciókon keresztül [131]. A Gd^{3+} -komplexek *in vivo* fémioncsere és ligandumcsere reakcióit lényegesen befolyásolhatja a Gd^{3+} -komplexek egyensúlyi viselkedése, kinetikai inertsége és farmakokinetikai sajátosságai. A Gd^{3+} -komplexek élő szervezetben való egyensúlyi viselkedését (Gd^{3+} -komplexek disszociációjának mértéke, a „szabad” Gd^{3+} megoszlása a testfolyadékokban, stb.) közvetlen módszerekkel nem lehet tanulmányozni a különböző testfolyadékok bonyolult összetétele és a Gd^{3+} -komplexek lassú disszociációja miatt. A Gd^{3+} -komplexek *in vivo* egyensúlyi viselkedését egyensúlyi számításokkal vizsgálták egyszerűsített plazmamodellekben. *Cacheris és Jackson* a $[Gd(DTPA-BMA)]$ és $[Gd(DTPA)]$ komplexekből vérplazmában felszabaduló Gd^{3+} mennyiségét számították [125], [132]. Azonban az általuk vizsgált rendszerben nem vették figyelembe a $Gd(PO_4)$ csapadék képződését, amelyet számos *in vitro* kísérletben kimutattak [133]. *Baranyai és munkatársai* 2015-ben a fontosabb esszenciális fémionok (Ca^{2+} , Zn^{2+} és Cu^{2+}) és ligandumok (alanin, cisztein, glutamin, glicin, hisztidin, lizin, citrát, laktát, szukcinát, karbonát, foszfát, albumin és transferrin), valamint a Gd^{3+} -komplexek MR vizsgálatoknál kialakuló fiziológiás koncentrációját és az általuk meghatározott, illetve az irodalomban fellelhető egyensúlyi állapotokat felhasználva egy egyszerűsített plazma modellt készítettek (20

komponens és 350 részecske, amelyek közül 8 rosszul oldódik (pl. $\text{Gd}(\text{PO}_4)$, $\text{Gd}_2(\text{CO}_3)_3$). Számításaik alapján fiziológiához közeli feltételek mellett bekövetkezhet a Omniscan 18%-os disszociációja főként a $\text{Gd}(\text{PO}_4)$ csapadék nagyon kis oldékonysága miatt, míg a felszabaduló DTPA-BMA ligandum Ca^{2+} , Zn^{2+} és Cu^{2+} -komplexeket képez [134]. Modellszámításaik eredményei alapján a $[\text{Gd}(\text{DTPA-BMA})]$ disszociációjával felszabaduló ligandum főként a jelen lévő Ca^{2+} -ionnal $\text{Ca}(\text{DTPA-BMA})$ komplexet képez a vérplazmában, amelyet Micelláris Elektrokinetikus Kapilláris Kromatográfiás (MEKC) mérésekkel igazoltak. A megfelelő Fe^{3+} -komplexek képződését nem tapasztalták, amit a nagy stabilitású $\text{Fe}(\text{Transzferrin})$ komplexek képződésével értelmeztek. A Gd^{3+} és Fe^{3+} -ionok hasonló fizikai-kémiai sajátosságai és a $\text{Gd}(\text{Transzferrin})$ komplexek nagy stabilitása ellenére [135], sem a modellszámítások, sem a kapilláris elektroforetikus vizsgálatok eredményei nem támasztották alá Gd^{3+} -fehérje komplexek képződését humán vérplazmában.

3. Anyag és módszer

3.1. Modelloldatok összeállítása

Az emberi vérszérumban viszonylag nagy koncentrációban (3000-5000 mg/l) van jelen a nátrium. Egy mintában mátrixként jelenlévő nátrium könnyen ionizálódó elem révén a nem spektrális zavaróhatások közül ionizációs zavaróhatást okozhat az atomemissziós módszerekkel történő mennyiségi analízis során. Az MP-AES készülék egy olyan új eszköz, mely zavaróhatásainak mértékére kevés szakirodalmi anyag áll rendelkezésre. Emellett az induktív csatolású plazmákhoz képest kisebb hőmérsékletű plazmáról van szó. Ezért célunk volt, hogy a mikrohullámú nitrogén plazmában felderítsük a vérszérumminták természetes nátriumtartama okozta zavaróhatásokat.

Előkísérleteink alapján arra a megállapításra jutottunk, hogy a roncsolt vérszérumminták maximum tízszeres hígításban alkalmazhatóak az MP-AES eszközzel végzett analízisre, ugyanis a vizsgálandó mikroelemek így még a készülék kimutatási határértékén belüli koncentrációban vannak jelen a feltárt mintában. Egy egészséges embertől származó humán vérszérum nátriumkoncentrációja 3000-5000 mg/l között változhat, az előkészítés utáni hígítást követően tehát 300-500 mg/l koncentrációban van jelen a mintában. A modelloldatokat mindezekből kiindulva három különböző nátriumkoncentráció mellett minimum, centrum, és maximum (300-400-500 mg/l) készítettük el. A hat (K, Ca, Mg, Cu, Zn, Fe) vérszérumban esszenciálisan megtalálható elem koncentrációját a modell oldatokban is a szakirodalmi, egészséges emberre jellemző koncentrációtartománynak és a tízszeres hígításnak megfelelően állítottuk be.

Vizsgálataink során minden mintát háromszor készítettünk el, így három független ismétlést végeztünk, továbbá ezen mintákból három

párhuzamos mérést végzett a készülék, melyeknek átlagértékét használtuk fel a kiértékelés során.

A modelloldatok elkészítésekor a nátrium mátrixhoz reagens minőségű szilárd nátrium-kloridot használtunk, emellett a többi elem koncentrációját 1000 mg/l kereskedelmi forgalomban kapható monoelemes spektroszkópiai standard oldatokból hígítottuk.

3.2. Az MP-AES robusztusság vizsgálata

Első lépésként a mikrohullámú plazma robusztusság-vizsgálatát végeztük el. Ezt az eljárást már régóta alkalmazzák az induktív csatolású plazmáknál, ahol a magnézium atom- és ionvonalának (MgII 280,271 nm / MgI 285,213 nm) tesztelésével vizsgáljuk meg, hogy a műszer alkalmas-e az általunk kiválasztott feladatra, ha a mérés körülményeit kis mértékben változtatjuk [136]–[138].

Előkísérleteink alapján a tízszeresre hígított roncsolt vérszérummintákban a várható átlag magnéziumkoncentráció 3 mg/l. A modelloldatokat mindezekből kiindulva három különböző nátriumkoncentráció (300-400-500 mg/l) mellett készítettük el (3. táblázat).

3. táblázat A robusztusság vizsgálatához készített modelloldatok

Minta	Na (mg/l)	Mg (mg/l)
1	0,00	0,00
2	0,00	3,00
3	400,00	0,00
4	300,00	3,00
5	400,00	3,00
6	500,00	3,00

A minták analízisét a magnézium két elemző vonalán végeztük el (MgII 280,271 nm / MgI 285,213 nm), a mérés során az MP-AES MP Expert

Humán vérszérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával

nevű szoftverében két paramétert tudunk állítani elemenként: a kiolvasási időt és a porlasztógáz nyomását. A szoftver hétféle kiolvasási időt (1-2-3-5-10-20-30 mp) ajánl fel a felhasználó számára, a porlasztógáz nyomását pedig 80 és 240 kPa között engedi változtatni. Ezeket alapul véve a hét kiolvasási idő mellett hét porlasztógáz nyomást (80-100-120-160-180-200-240 kPa) beállítva végeztük el a modelloldatok vizsgálatát és meghatároztuk a legjobb MgII 280,271 nm / MgI 285,213 nm-es intenzitásarányt. A mikrohullámú plazma a hagyományos induktívan csatolt plazmákhoz képest viszonylag szűk tartományban biztosít stabilitást, ezért a két változtatható beállításon kívül a többi mérési paraméter (pl.: a teljesítmény és a gázáramlás) gyárilag beállított érték. Az említettekén túl a felszívási, a stabilitási és az öblítési időt, továbbá a párhuzamos ismétlések számát tudjuk állítani (Függelék *I. táblázat*).

3.3. Humán vérszérumminták mátrixhatás vizsgálatának kísérleti terve

Kutatásunkat a nitrogén plazmában esetlegesen lejátszódó mátrixhatások felderítésével folytattuk vérszérumminták esetében.

Először az analízis nátrium tűrését határoztuk meg. A nátriumra, mint zavaróelemre vonatkozó tűrés koncentráció megállapítására *Varbanova és munkatársainak* [139] vizsgálatát vettük alapul. Szintén modelloldatokat készítettünk 300-400-500 mg/l nátrium koncentrációval a robusztussági kísérlethez hasonló módon. A vizsgálat során elvégeztük a vérben esszenciálisan megtalálható hat elem analízisét (K, Ca, Mg, Cu, Zn és Fe) a nátrium modelloldatokat felhasználva. Tehát a modelladataink nem tartalmazták a mérendő elemeket, csak a mátrixként hozzáadott nátriumot. A tűrésérték kiszámításához (*3.2.1. egyenlet*) az alkalmazott Na koncentrációját szorozzuk a vak minták intenzitására kapott szórásának háromszorosával, amelyet a vizsgált elemre (K, Ca, Mg, Cu, Zn és Fe) adott hullámhosszon kapott jellel osztunk:

$$C_{\text{tűrés}} = \frac{3 SD_{\text{vak}} \cdot C_{\text{Na}}}{Sig_{\text{Al}}}, \quad 3.2.1.$$

SD_{vak} : a vak minták szórás értéke

C_{Na} : a nátrium, mint zavaróelem koncentrációja

Sig_{Al} : a mért elem (K, Ca, Mg, Cu, Zn vagy Fe) adott hullámhosszon kapott intenzitás értéke

Ezután két modellkísérletet állítottunk be a vérszérummintákban lévő nagy nátriumkoncentráció K, Ca, Mg, Cu, Zn és Fe intenzitására gyakorolt hatásának vizsgálatára.

Az első kísérletben teljes faktoriális terv alapján állítottuk össze a modell oldatokat. Az előző kísérleteknél említett, hígított minták nátriumkoncentráció tartományának alsó (300 mg/l) és felső (500 mg/l) határát használtuk a modellmintákban „minimum” és „maximum” mátrix koncentrációként, valamint alkalmaztunk egy „centrum” (400 mg/l) mátrix koncentrációt is. A modellmintákban a vizsgált elemek koncentrációi a szakirodalomban egészséges páciensből származó vérszérumban található legkisebb és legnagyobb koncentráció tartománynak feleltek meg, az előkészítést követő tízszeres hígításban. Az elemek és a mátrixként alkalmazott nátrium koncentrációját a „minimum”, „maximum” és „centrum” esetben az Függelék 2. táblázat tartalmazza, a 4. táblázatban pedig a faktoriális vizsgálat során alkalmazott kísérleti elrendezés összefoglalása látható.

4. táblázat A faktoriális terv kísérleti elrendezésének mátrix táblázata

Minta oldatok	Elemek	Na
1.	min	min
2.	min	max
3.	max	min
4.	max	max
5.	centrum	centrum

Humán vérszérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával

A második kísérletnél a növekvő nátriumkoncentráció hatását vizsgáltuk a vérszérumból mérendő elemek (K, Ca, Mg, Cu, Zn és Fe) jelintenzitására. Az elkészített modellminták növekvő koncentrációban tartalmazták a nátrium mátrixot, a vizsgálandó elemek esetében pedig az elemek „centrum” koncentrációját alkalmaztuk (Függelék 3. táblázat). Tanulmányoztuk a nátrium növekvő koncentrációjának hatását az ICP-OES technika esetében is, ahol a második MP-AES kísérlethez készített modelloldatokat alkalmaztuk. Az ICP-OES mérések során használt paramétereket a Függelék 4. táblázat tartalmazza.

Vizsgálatokat végeztünk a nátrium és kálium egymás relatív intenzitására gyakorolt hatására vonatkozóan a mikrohullámú plazmában, ahol a két elem modell oldatait azonos koncentráció mellett állítottuk be. Ezzel összhangban egy négyzintes kísérleti tervet dolgoztunk ki, amit az 5. táblázatban foglaltunk össze.

5. táblázat A négyzintes kísérleti terv Na- és K-koncentrációja

Modelloldat	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.
Na (mg/l)	0	0	0	0	5	5	5	5	10	10	10	10	15	15	15	15
K (mg/l)	0	5	10	15	0	5	10	15	0	5	10	15	0	5	10	15

A 3. táblázatban található modelloldatokat öt különböző koncentrációjú (0,0-0,1-0,5-1,0-2,0 g/l CsCl) ionizációs puffer mellett készítettük el. A pufferoldatot analitikai tisztaságú szilárd vegyszerből állítottuk elő, majd a megfelelő mennyiséget a modelloldatokhoz pipettáztuk.

3.4. Humán vérszérumminták modell-mintaadatainak elemanalizise MIP-AES módszerrel

Mindkét mátrixhatás vizsgálat mintaadatainak Ca, K, Mg, Cu, Zn és Fe koncentrációjának meghatározása MIP-AES módszerrel történt. Az analízis során a vegyszereink tisztaságát háttér minták (vakminták) mérésével ellenőriztük. Nagy sótartalmú mintákra specializált univerzális porlasztót (OneNeb) alkalmaztunk, aminek a porlasztótest teljes hosszán keresztül állandó belső átmérője van. A mintaoldatok mérése automata mintaadagoló robot segítségével, véletlenszerű sorrendben történt (Agilent Technologies SPS 4). A legfontosabb mérési paramétereket a Függelék 5. táblázat foglalja össze. Ahogy már említettük a robusztussági vizsgálatnál, a mikrohullámú plazma szoftverében két paraméter változtatható, a többi mérési paraméter gyárilag beállított érték. Az optimalizálási vizsgálatok alapján kiválasztottuk a megfelelő paramétereket és azokat alkalmaztuk a mátrixhatás kísérleténél, valamint a nátrium és kálium egymásra gyakorolt hatásának elemzésénél.

3.5. Seronorm[®] liofilizált vérszérum minta-előkészítése és elemanalizise MIP-AES módszerrel

Seronorm[®] (Human LOT 1512606) minőségtanúsított liofilizált vérszérumminta 5 ml térfogatából 1 ml-t tártunk fel három párhuzamos ismétlésben atmoszférikus nyomáson, ahol 80 °C-ra fűthető teflon lapot használtunk. A mintát beszárítottuk, majd 2 ml 65 (m/m) %-os HNO₃-at adagolva szárazra pároltuk. Kihűlés után 0,2 ml 30 (m/m) %-os H₂O₂ oldatot adtunk a mintához, majd beszárítottuk és kihűlés után 10 ml térfogatra töltöttük háromszor ioncserélt vízzel. A hat elem (Ca, K, Mg, Cu, Zn, Fe) analízisét MP-AES készülékkel végeztük el, a mérés paramétereit a Függelék 5. táblázata alapján állítottuk be. Az analízis során a Függelék 6. táblázatában szereplő kalibrációt alkalmaztuk, amit Na mátrix mellett (400 mg/l)

készítettünk el, illetve egy másik sorozatot is hígítottunk a mátrix alkalmazása nélkül.

3.6. Humán vérszérumminták mintavétele, tárolása és minta-előkészítése

A kísérletekhez szükséges egészséges, valamint az autoimmun beteg vérszérumminták a Belgyógyászati Intézet (DE ÁOK) III. sz. Belgyógyászati Klinika munkatársaitól származnak. A vérvétel natív vérvételi csővel történt, majd centrifugálást követően kaptuk meg a vérszérummintákat. A kontroll minták olyan önkéntesektől származtak, akik saját bevallásuk szerint nem dohányoznak, illetve a laboratóriumi vizsgálat során kóros elváltozást nem mutattak. Az autoimmun minták az ambuláns szakrendelésen megjelent betegektől származtak, akik beleegyezésüket adták a mintavételhez. A kísérleteket a Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottság (Debreceni Egyetem) hagyta jóvá a Helsinki Nyilatkozatnak megfelelően. Az Eppendorf csövekben érkezett mintákat $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a minta-előkészítés megkezdéséig.

Az 6. táblázat a csoportokba (kontroll, SS, SLE) tartozó páciensek életkorát tartalmazza.

6. táblázat Az alkalmazott csoportok átlagéletkora

Csoportok	Átlagéletkor
Kontroll	$35,2 \pm 6,3$ év
SLE	$43,8 \pm 10,3$ év
SS	$58,7 \pm 14,2$ év

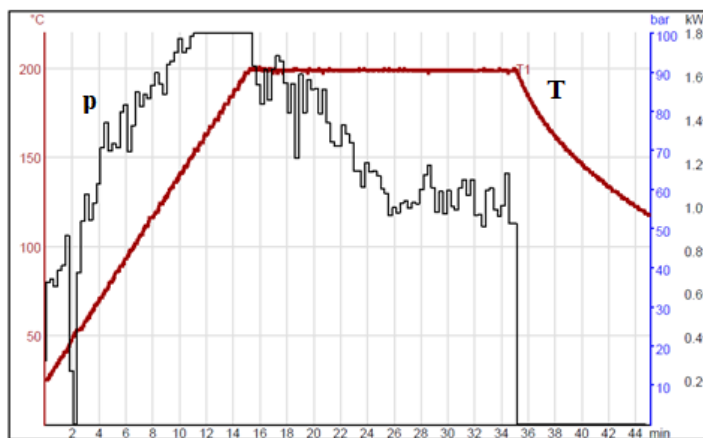
3.6.1. A humán vérszérumminták minta-előkészítése

A vérszérumminták minta-előkészítése során, az orvosi etika szabályait betartva, minden esetben átlagmintákat használtunk az analízishez, összesen 60 független átlagmintát vizsgáltunk (csoportonként 20 minta: kontroll, SLE,

SS). A hígítatlan szérummintákból analitikai mérlegen 0,5000 g-ot mértünk be a roncsoláshoz, amit mikrohullámú egységben, teflon edényekben végeztünk. A zárt rendszerben végzett roncsolás során egy lépésben adtuk a minta bemérése után a 2 ml 65 (m/m) %-os HNO_3 -at és a 0,2 ml 30 (m/m) %-os H_2O_2 -ot. A teflon edényeket lezárást követően a feltáró egységbe helyeztük (Milestone Ethos UP, 3. ábra) és a roncsolást a 4. ábrán látható szabályozott felfűtési programon végeztük. A teflonbombákat szobahőmérsékletre hűtöttük, a mintákat ioncserélt vízzel (Millipore-MilliQ A10 víztisztító berendezés) 10 ml-es mérőlombikokba maradékmentesen átmostuk és jelre töltöttük. Minden mintából három párhuzamos roncsolás történt, a párhuzamos ismétlések során mért elemkoncentrációkat átlagoltuk.



3. ábra Milestone Ethos UP mikrohullámú feltáró készülék



4. ábra A mikrohullámú roncsolás során alkalmazott program, amely a beállított hőmérsékletet és a hozzá tartozó nyomást a roncsolási idő függvényében ábrázolja 1800 W teljesítményen

3.6.2. A frakcionált vérszérumminták minta-előkészítése

A következő vizsgálat során egy kontroll, egy SLE és egy SS csoporttól származó vérszérummintát ioncserélő oszlopon frakcionáltunk. Az elválasztásra DEAE Trisakryl[®] M anioncserélő gyantát alkalmaztunk, amely minőségi adatait a 7. táblázat szemlélteti.

7. táblázat A DEAE Trisakryl[®] M anioncserélő jellemzői

Forma	vizes-etanol
részecskeméret	40-80 µm
ionos csoportok mennyisége	320-370 µEq/mL
ionos csoportok természete	dietilaminoetil
ionos csoportok pK értéke	6,2; 10,7
Kötési kapacitás (mg/ml)	>75 (BSA)
pH	1-11
tárolási hőmérséklet	2-8 °C

A DEAE Trisakryl[®] M gyantát speciálisan fehérjék ioncserélő kromatográfiájára fejlesztették ki, melyek gömb alakú, félig merev mikroszkópikus akril kopolimerek. A polimer szerkezet szerves részét képező,

erősen kötődő ioncserélő csoportok a gyanta háromdimenziós szerkezetében találhatóak meg. A biokompatibilitást a gyanta polimer minden részegységében megjelenő hidrofil csoportok biztosítják és megakadályozzák a nem-specifikus adszorpciót is. Az ioncserélő gyanta makropórusos szerkezetű és nagy kapacitást biztosít a fehérjék kinyeréséhez, és minden általánosan használt oldószerben oldhatatlan. Szerves és szervetlen (1 M HCl) savaknak ellenáll, viszont a lúgok (NaOH) alkalmazását el kell kerülni. Az ioncserélő gyanta alkalmazásával az IgG kiváló hozammal és tisztasággal kinyerhető.

Az üveg oszlopkromatográfiánál alkalmazható 2 cm átmérőjű oszlopot 10 cm magasan töltöttük meg a gyantával. A vérszérumok érzékenysége miatt a különböző koncentrációjú NaCl eluenseket Trisz-(hidroxi-metil)-amino-metán (HO-CH₂)₃ C-NH₂ 0,025 M koncentrációjú oldatával készítettük el az esetleges fehérje-kicsapódás elkerülése érdekében. Ezen 100 ml-es térfogatú oldatok pH-ját 1:1 HCl oldattal állítottuk be a 8. táblázat-ban foglalt módon.

8. táblázat Az alkalmazott pufferek hígítási sora és pH-ja

Puffer	Koncentráció (M)	pH
1. 0,025M Tris-HCl+NaCl	0,035	8,8
2. 0,025M Tris-HCl+NaCl	0,075	8,5
3. 0,025M Tris-HCl+NaCl	0,150	7,5
4. 0,025M Tris-HCl+NaCl	1,000	8,8

Az újonnan vásárolt gyantát etanolos közegben tárolják, amit az első használat előtt folyamatos dekantálással puffer oldatra cserélünk és a gyantát gázmentesítjük. Erre 1 M-os NaCl puffer oldatot használtunk, amely beállítja az oszlop anioncserélő kapacitását. A regeneráláshoz 1 M NaCl oldatot alkalmaztunk, ehhez 100 ml térfogatot engedtünk át az oszlopon, ezután a tömény NaCl oldatot 100 ml 0,035 M-os NaCl puffer oldat segítségével mostuk le az oszlopról.

Humán vérszérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával

A regenerálás után a vérszérumot már rávihettük az oszlopra. A kapott minták tömegét pontosan lemértük analitikai mérlegen, ezután teljes egészében az oszlopra pipettáztuk. A 0,035 M NaCl puffer oldattal kezdtük az elúciót, sorban haladva a leghígabbtól a legtöményebb oldatig (6. táblázat). A frakciókat 5 ml-es térfogatban kalibrált kémcsövekbe gyűjtöttük. Mintánként körülbelül 70 frakciót szedtünk, majd UV-látható spektrofotometria segítségével 280 nm-en meghatároztuk, hogy mely frakciók tartalmaztak fehérjét. A kapott abszorbanciákat a fogyott puffer térfogatok függvényében ábrázoltuk és a későbbi elemzéseket a fehérjéket tartalmazó frakciókból végeztük.

A nagy szervesanyag-tartalmú fracionált vérszérummintákat háromféle roncsolási technika segítségével tártuk fel. Így össze is hasonlítottuk, hogy melyik módszer a leghatékonyabb erre a mintára nézve. Ahhoz, hogy ellenőrizzük, hogy a roncsolás által nem történik anyagveszteség és tényleg hatékonyan járunk el, belső standardot alkalmaztunk. A lítiumra esett a választásunk, mivel az egészséges vérszérum csekély mennyiségben tartalmazza ezt az elemet. Mind a három technikánál azonos mennyiségeket alkalmaztunk a mintákból és a feltáró szerekből, amit a 9. táblázat tartalmaz.

9. táblázat Roncsolási paraméterek

	minta (μ l)	1000 mg/l Li (μ l)	65% HNO ₃ (ml)	30% H ₂ O ₂ (ml)	hígítás (ml)
roncsolás	600	25	3	1	12

Az atmoszférikus nyomáson történő roncsolás esetében fűtött teflonlapot alkalmaztunk, 80 °C-ra hevítve. A mintákat Erlenmeyer lombikokba mértük, amikhez Li standard oldatból (1000 mg/l Scharlau) ismert térfogatot pipettáztunk. A mintákat száradásig melegítettük, majd 65%-os

salétromsav hozzáadása után újra szárazra pároltuk. Kihűlést követően 30%-os hidrogén-peroxid oldatot adagoltunk a mintákhoz és száradásig a teflon lapra helyeztük azokat. A száraz, kihűlt mintákat háromszor ioncserélt vízzel maradékmentesen átmostuk és jelre állítottuk 12 ml térfogatra és az elemanalízisig hűtve tároltuk (9. táblázat).

A visszafolyó hűtővel ellátott, vérminták előkészítésére gyakran alkalmazott, szabályozottan fűthető blokkban (*block therm digestion*) történő roncsolás esetében kevesebb mintával tudunk egyszerre dolgozni, de a fokozatosan állított hőmérséklet az érzékeny szérumminták számára kedvezőbb körülményt biztosít. Először 104 °C-ra fűtöttük és 30 percen keresztül ezen a hőmérsékleten tartottuk a mintát, amihez hozzáadtuk a Li standardot, majd 65%-os salétromsav hozzáadása után 80 °C-on 60 percig melegítettük. A kihűlt mintákhoz 30%-os hidrogén-peroxidot adtunk és további 30 percig melegítettük 104 °C-on. Ezek után hagytuk kihűlni a kémcsöveket, majd háromszor ioncserélt vízzel átmostuk és jelre állítottuk az ideális térfogatra a mintákat, mellyel előkészítettük az elemanalízisre (9. táblázat).

A harmadik roncsolási technikaként nagy nyomású mikrohullámú feltárást alkalmaztunk teflonbombában. Itt már egy teljesen zárt rendszerben végeztük el a roncsolást, illetve egy lépésben történt a minta kimérése és a feltárási szerek (a 65 %-os HNO_3 és az 30 %-os H_2O_2) és a Li standard (9. táblázat) hozzáadása. A teflonedényeket lezárás követően behelyeztük a Milestone Ethos Up mikrohullámú roncsoló berendezés reakcióterébe (3. ábra, 4. ábra). A feltárást követően a szobahőmérsékletűre hűlt teflonbombákat felnyitottuk, háromszor ioncserélt vízzel átmostuk az edényeket és a megfelelő térfogatra töltöttük, amivel előkészítettük az elemanalízisre.

3.7. Autoimmun beteg és kontroll humán vérszérumminták elemanalizise MIP-AES módszerrel

A két autoimmun betegcsoport, valamint a kontroll csoport mintáiból a mikrohullámú roncsolást követően MIP-AES módszerrel mértük a K, Ca, Mg, Zn, Cu és Fe elemek koncentrációját, ahol az optimalizálás során beállított paraméterekkel végeztük el az MP-AES műszerrel az elemanalízist (Függelék 5. táblázat).

Az analízis során kalibráló oldatokat alkalmaztunk, amiket analitikai tisztaságú spektrometriai törzsoldatokból készítettünk (1000 mg/l Ca, K, Mg, Fe, Cu, Zn Merck) (Függelék 6. táblázat). A vegyszereink tisztaságát vak mintával ellenőriztük.

3.8. Frakcionált humán vérszérumminták elemanalizise MIP-AES és GFAAS módszerrel

A kontroll, az SLE és az SS csoportoktól származó frakcionált szérumminták elemanalízisét MIP-AES technikával végeztük, ahol a K, Ca és Mg koncentrációját tudtuk meghatározni. Itt is kalibráló oldatokat alkalmaztunk (Függelék 7. táblázat). A vegyszereink tisztaságát vak mintával ellenőriztük.

A nagyfokú hígulás miatt nem tudtuk MIP-AES módszerrel a Cu és Zn koncentrációját meghatározni. Így grafitkemencés atomabszorpciós spektrometriás módszerrel (GFAAS) (Agilent Technologies 200 Series AA, GTA 120 Graphite Tube Atomizer) állapítottuk meg azokat. Az egyes mintákból 20 µl-t cseppentettünk be a grafitkemencébe, mely védésére argon gázt használtunk a mérés során, a rendszer hűtésére pedig vizet alkalmaztunk. A kalibráló oldatokat háromszor ioncserélt vízzel készítettük. A Függelék 8. táblázat a GFAAS mérés során alkalmazott felfűtési programot szemlélteti.

3.9. Omniscan[®] [Gd(DTPA-BMA)] kontrasztanyagot tartalmazó humán vérszérumminták minta-előkészítése és elemanalízise

Az Omniscan[®] MRI kontrasztanyag vérszérumban bekövetkező disszociációját és a szabaddá váló Gd³⁺-ion szérumfehérjével kialakított kölcsönhatását humán vérszérumban (Seronorm[®] SERO, 5 ml 0,025 M NaHCO₃, pH=7,4) tanulmányoztuk. Vizsgálataink során 2x5 ml szérumot készítettünk (inkubálás nélküli és 19 órás 37 °C-os inkubált), amihez adtunk 10-10 µL Omniscan[®] ([Gd(DTPA-BMA)]=0,5 M, [Ca(DTPA-BMA)]=25 mM). Az első minta 1 ml részét DEAE Trisakryl[®] anioncserélő gyantán elválasztottuk. A frakciókat előre 5 ml-re bekalibrált kémcsövekbe szedtük, összesen 72 darabot. UV-látható spektrofotometria segítségével 280 nm-en meghatároztuk azokat a frakciókat, amelyek tartalmaztak fehérjét. Ezután a frakciókat minta-előkészítettük atmoszférikus roncsolási technikával, ahol a mintákból 2,5 ml mennyiséget tártunk fel és 10 ml térfogatra töltöttünk föl háromszor ioncserélt vízzel. A másik mintát az anioncserés elválasztás előtt 19 órán át 37 °C-on inkubáltuk. Ezt követően végeztük el ugyanúgy az elválasztást és minta-előkészítést, mint az előző mintánál. A két kísérlet során kapott mintaoldatokból a gadolínium-koncentrációját ICP-OES készülékkel határoztuk meg.

Az Agilent Technologies ICP-OES 5100 (5. ábra) készülékével lehetővé válik az egyidejű axiális és radiális megfigyelésű mérés. A vertikális torch egy mozdulattal ki és behelyezhető. A készülék vízhűtéses interfészt tartalmaz, amelyhez egy külső, recirkulációs hűtő egység tartozik. A szimultán mérés érdekében az optikai rendszer a fény felbontására Echelle típusú polikromátort alkalmaz, míg a detektálás töltéscsatolt (CCD) detektorral történik. A polikromátor üzemi hőmérséklete 35 °C, a detektoré pedig -40 °C, mely hőmérsékletének szabályozását Peltier modul végzi [140], [141].



5. ábra Az induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrométer (ICP-OES 5100, Agilent Technologies)

A mintabevitel automata mintaadagoló robot (SPS4 Agilent Technologies) alkalmazásával történt. Egy nagy sótartalmú mintákra specializált univerzális porlasztót (OneNeb) alkalmaztunk, amely a porlasztótest teljes hosszán állandó belső átmérőjű, az aeroszol cseppek méret szerinti szétválogatásához pedig koncentrikus ködkamrát használtunk. Az elemanalízis során alkalmazott standard oldatot mátrix illetve állítottuk össze a Függelék 9. táblázat szerint,

4 sorozatot készítettünk az elválasztás során alkalmazott pufferek felhasználásával.

A mérés során alkalmazott paramétereket a Függelék 10. táblázat tartalmazza.

Az analízis során SVDV megfigyelési módot alkalmaztunk, ami azt jelenti, hogy egyszerre történik a radiális és axiális irányból érkező fény megfigyelése. A készülékben található egy úgynevezett dichronikus lencse, amely az axiális irányból érkező kisebb hullámhosszúságú fényre nézve fényvisszaverő, míg a nagyobb hullámhosszúságú radiális irányból érkező fotonokat átereszt. Így mindkét irányból egyszerre a detektorba juttatjuk a gerjesztődés során kibocsátott, majd felbontott fényt. A rendszer álló helyzetben lévő plazmaégőt használ. A mérések során mintánként három párhuzamos ismétlést végeztünk, vegyszereink tisztaságát háttér minták mérésével ellenőriztük.

A Gd^{3+} -ion és szérumfehérjék között kialakuló kölcsönhatást ultraszűrési vizsgálatokkal is igazoltuk. Ebben a kísérletben 1,0 mM humán szérum albumin (Sigma Aldrich) oldatot készítettünk (2 ml, (pH=7,4; 0,025M $NaHCO_3$; 0,15 M $NaCl$, 25°C), amelyhez növekvő koncentrációban adagoltunk $GdCl_3$ oldatot (10. táblázat).

10. táblázat Az albuminhoz adagolt Gd-koncentrációja

Minta	Gd c (mM)
1	Vak
2	0,2000
3	0,4000
4	0,6000
5	1,0000
6	1,5000
7	2,0000

Humán vérszérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával

2 mL mintát Amicon® Ultra-2 (MERCK) ultraszűrővel szűrtük (3000 rpm, 4 °C) és centrifugálást követően <10 kD frakcióban meghatároztuk a Gd³⁺-ion koncentrációját ICP-OES technikával. A centrifugálást rövid ideig alkalmaztuk (1,5 perc), mivel az így nyert szűrlet (20 µL) elválasztásával gyakorlatilag nem befolyásoltuk az eredeti minta összetételét. Az elemzés során ugyanazon mérési paramétereket alkalmaztuk, mint az előző kísérletben, azonban a kalibrációs sorot változtattuk (*Függelék 11. táblázat*).

3.10. A kísérletek során alkalmazott statisztikai módszerek

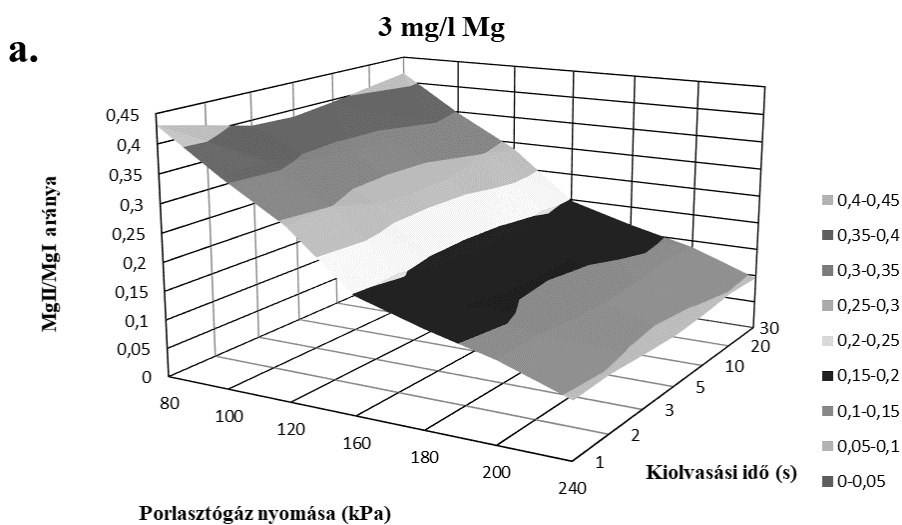
A kísérletek során kapott eredményeket statisztikai módszerek alkalmazásával értékeltük ki. A teljes 2ⁿ faktoriális terv mátrixhatás vizsgálatok válaszfüggvényének grafikus kiértékelésére Statgraphics Centurion XVII. szoftver segítségével történt. A hatások vizsgálatát szórásanalízissel (varianciaanalízis, ANOVA) végeztük. A nátrium és kálium egymás intenzitására való befolyását kéttényezős varianciaanalízis (ANOVA, General Linear Model - GLM) segítségével értékeltük ki, valamint grafikus ábrázolása szintén Statgraphics Centurion XVII. szoftverrel történt.

A valós minták (egészséges és autoimmun humán vérszérumok) elemkoncentrációját egyutas varianciaanalízis (One-way ANOVA) segítségével hasonlítottuk össze SpSS IBM 22 for Windows programcsomag alkalmazásával. Az adatok transzformációja után a homogenitást Levene's teszttel ellenőriztük. A szignifikáns különbségeket Tukey teszttel értékeltük.

4. Eredmények

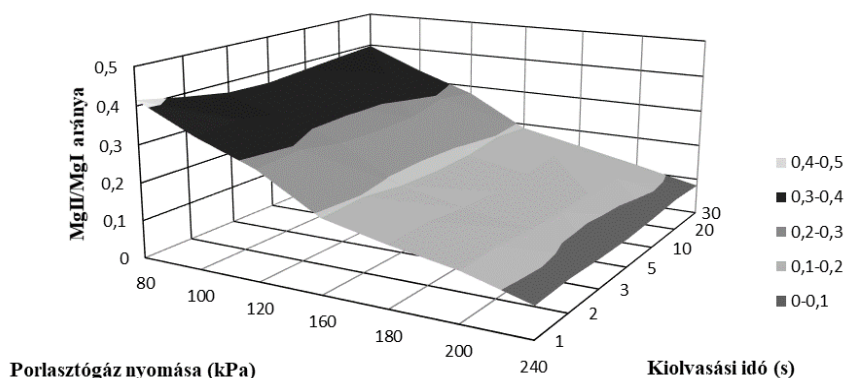
4.1. Az MP-AES mérési paramétereinek optimalizálása

A MP-AES robusztusságát az induktív csatolású plazmáknál alkalmazott magnézium atom- és ionvonalának (MgII 280,271 nm / MgI 285,213 nm) tesztelésével vizsgáltuk. A robusztusság kifejezés arra utal, hogy a plazmaforrás képes-e a környezeti tényezőkből, működési feltételekből vagy mátrixhatásokból eredő változások ellensúlyozására anélkül, hogy jelentős mérési hibát okozna. Az ICP-OES robusztussága akkor érhető el, ha a Mg (MgII 280,271 nm / MgI 285,213 nm) atom- és ionvonalára kapott jelek aránya nagyobb, mint 6. A technika analitikai teljesítménye javítható, ha a mérési folyamatot befolyásoló változókat a legmegfelelőbbre állítjuk be egy optimalizálási terv segítségével. A rendelkezésre álló MP-AES készüléken beállítható két paramétert (kiolvasási idő és a porlasztógáz nyomása) hét különböző módon konfiguráltuk és meghatároztuk a magnézium atom- és ionvonalának (MgII 280,271 nm / MgI 285,213 nm) legjobb intenzitásarányát. A kapott eredményeket a 6. ábra szemlélteti.



b.

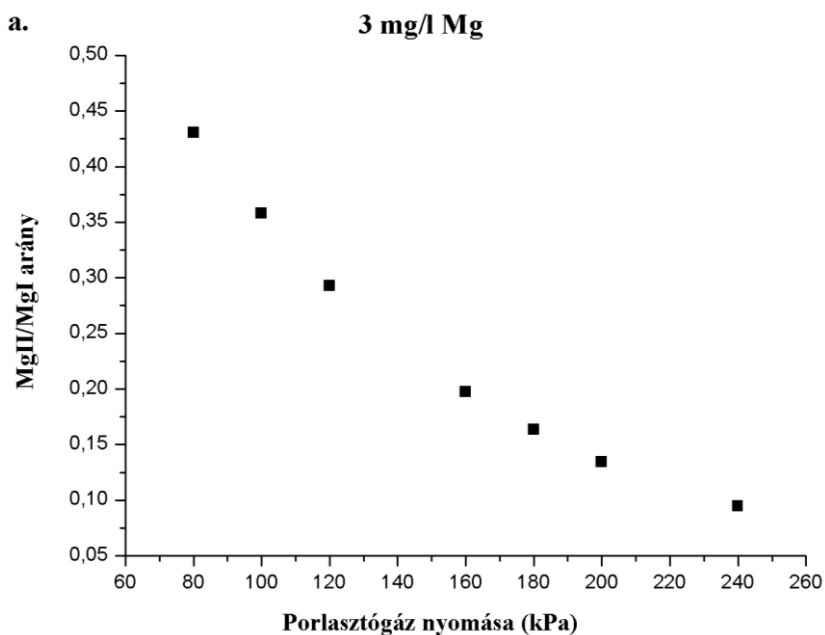
400 mg/l Na + 3 mg/l Mg

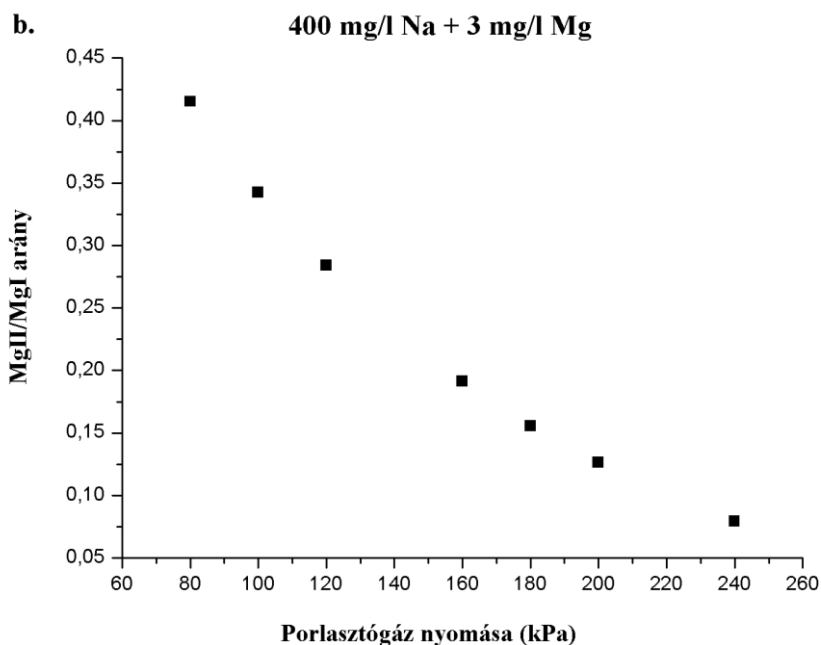


6. ábra A magnézium ion- és atomvonalának aránya, a: mátrix nélkül 3 mg/l magnéziumkoncentráció mellett és b: 400 mg/l nátriumkoncentráció és 3 mg/l magnéziumkoncentráció esetén az alkalmazott hét kiolvasási idő és hét porlasztógáz nyomás mellett

A 6. ábrán 3 mg/l magnéziumkoncentrációt alkalmazva a nátrium mátrix nélkül (6a), és 400 mg/l nátriumkoncentráció mellett (6b) kapott eredmények láthatóak. Szakirodalom szerint a 280,271 nm és 285,213 nm hullámhossztartományban az intenzitás lassan növekszik, ezért az atom és ionvonal (MgII 280,271 nm / MgI 285,213 nm) aránya kicsi lesz így megszorozva az 1,15-ös faktoral, amit korábban *Chalyavi és munkatársai* határoztak meg, kapjuk meg a spektrométer hatékonyságának változását [94], [96], [142]. Megfigyeltük, hogy a kiolvasási idő nem befolyásolja a mérési eredményeket, viszont a porlasztógáz nyomása a legnagyobb szoftverben állítható értéken, 240 kPa-on a legmegfelelőbb. Az összes általunk összeállított modelloldat-koncentráció mellett ugyanezt az eredményt kaptuk. Így a további mérések során ezeket a beállítási paramétereket alkalmaztuk: 1s kiolvasási idő és 240 kPa porlasztógáz nyomás Mg nézve.

A 3 mg/l magnéziumkoncentrációjú és 400 mg/l nátriumot tartalmazó oldatban a két hullámhossznál (MgII 280,271 nm / MgI 285,213 nm) kapott intenzitásokat a porlasztógáz nyomás függvényében ábrázoltuk egy másodperc kiolvasási időnél (7. ábra). Ez alapján is a legnagyobb porlasztógáz nyomás a megfelelő és a kiolvasási idő nem befolyásolja a mérést. Fontos megemlíteni, hogy az ICP-OES technikák vizsgálatánál ez az intenzitásarány a 8-14 tartományba, míg a MP-AES-nél 0,1-0,5 közé esik. Ennek oka az, hogy az ICP-OES technikákhoz képest a MP-AES plazma hőmérséklete és elektronsűrűsége eltérő, ezáltal nem mérhető össze a MP robusztusság arányának konkrét értéktartománya az ICP-OES módszernél várttal [96], [138].





7. ábra A magnézium atom (MgI 285,213 nm) - és ionvonalának (MgII 280,271 nm) mátrix nélkül (a) és 400 mg/l nátriumkoncentráció mátrix mellett (b) kapott intenzitásaránya a porlasztógáz nyomás függvényében 1s kiolvasási időnél.

Vizsgáltuk a nátrium nagy koncentrációjának hatását a vérszérumban esszenciálisan megtalálható hat elem (K, Ca, Mg, Cu, Zn és Fe) intenzitására nézve. A kísérletet *Varbanova és munkatársai* [139] MP-AES készülékre alkalmazott módszere alapján végeztük el.

11. táblázat A Ca, Cu, Fe, K, Mg, Zn elemek emissziós vonalainak tűrése a zavaró nátrium mellett

	Hullámhossz (nm)	Na 300 (mg/l)	Na 400 (mg/l)	Na 500 (mg/l)
Ca	430,253	196	232	261
Cu	324,395	136	136	152
Fe	371,993	546	438	479
K	766,491	13,4	12,8	12,5
Mg	285,213	-	-	-
Zn	213,857	-	-	-

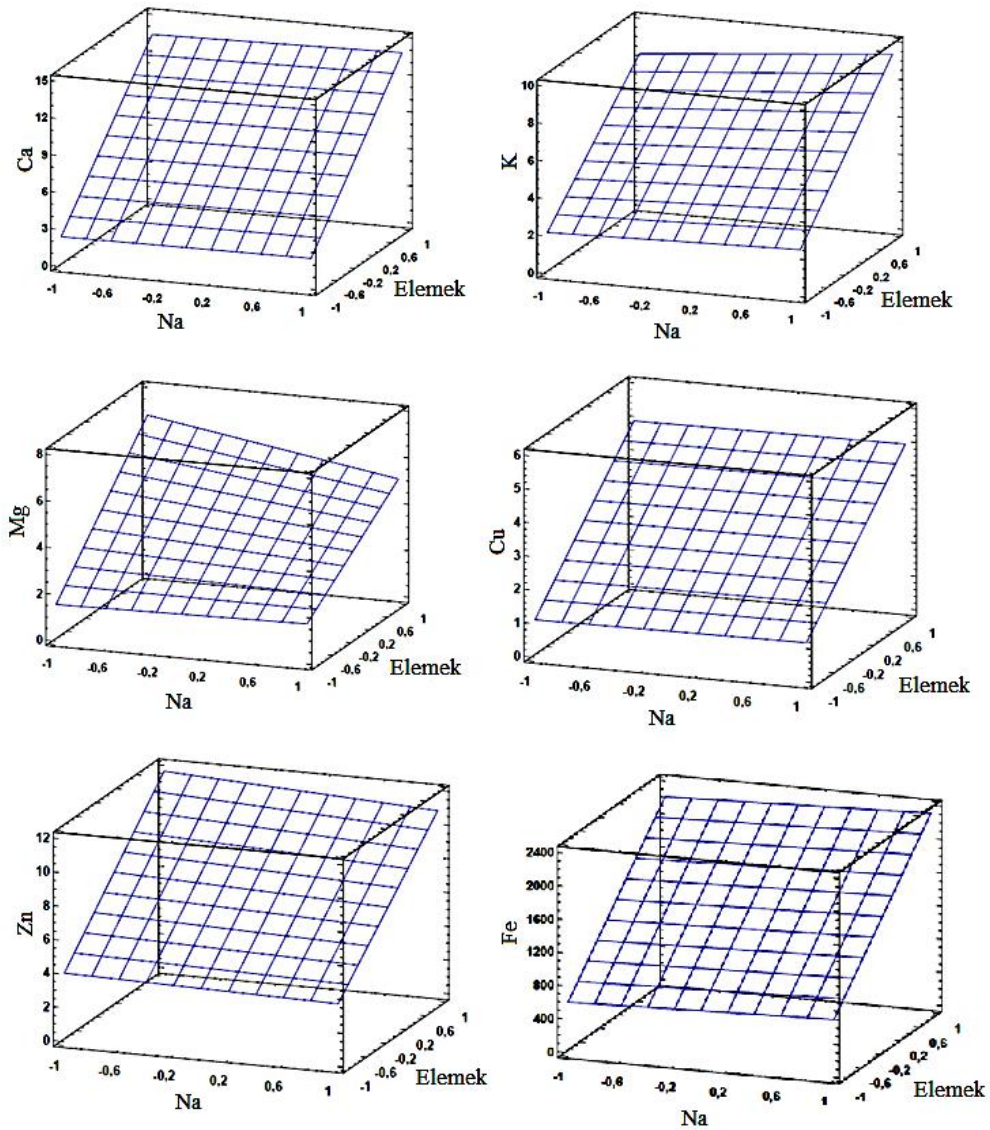
A 11. táblázat a

$$C_{\text{tűrés}} = \frac{3 SD_{\text{vak}} \cdot C_{\text{Na}}}{Sig_{\text{Al}}}, \quad 3.2.1.$$

képlet alapján számolt tűrés értéket mutatja be a hat elem kiválasztott hullámhosszára növekvő nátrium mátrixkoncentráció mellett. Megállapítható, hogy a Mg és a Zn esetében a Na mátrixhatásával ebben a tartományban nem kell számolni, a többi elem esetében viszont statisztikailag megkülönböztethető jelet generálhat a nátrium.

4.2. Humán vérszérumminták mátrixhatásvizsgálata MIP-AES technikánál

A nitrogén plazmában az előkészített szérumminták elemzése során Na jelenlétében esetlegesen lejátszódó mátrixhatások felderítése érdekében először egy teljes faktoriális tervet készítettünk. A hatást a vérszérumban esszenciálisan megtalálható és diagnosztikai céllal gyakran mennyiségileg meghatározott elemekre (K, Ca, Mg, Cu, Zn és Fe) tekintettel vizsgáltuk. A teljes faktoriális terv során lehetőség van több, független tényező kollektív befolyását vizsgálni. A vizsgálat eredményeire hatást gyakorló tényezőket faktoroknak nevezzük, ezek kombinációit pedig szinteknek. A véletlenszerű sorrendben mért modelloldatok intenzitásainak statisztikai értékelése során elemenként térben ábrázoltuk a faktoriális terv eredményét, amely könnyebben megfigyelhetővé teszi a valódi folyamatot és annak jellemzőit.

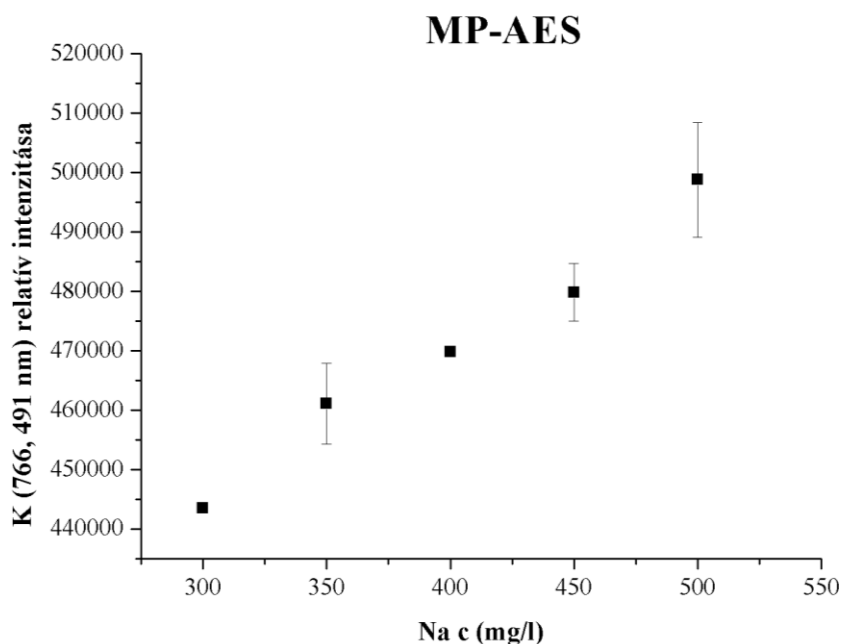


8. ábra A teljes faktoriális terv eredményeinek grafikus kiértékelése

A 8. ábra szemlélteti az egyes faktorok (x tengely: a nátriummátrix faktora, y tengely: az adott elem faktora, z tengely: az összes elem faktora) közötti kölcsönhatásokat, ahol láthatjuk, hogy a nátriumkoncentráció minden elemre hatással volt, ugyanis abban az esetben nem figyelhető meg semmilyen hatás, ha teljesen illeszkedik a térháló a kocka belsejébe [143]–[145]. Ez

alapján a kalcium, réz és vas esetében szignifikáns hatást figyelhetünk meg, míg a cink, magnézium és kálium elemeknél kereszthatás is jelentkezett.

A második modellkísérlet során hatásvizsgálatot végeztünk, ahol a nátrium növekvő koncentrációjának befolyását analizáltuk szintén a választott elemek (K, Ca, Mg, Cu, Zn és Fe) relatív intenzitására nézve. A növekvő Na-koncentráció függvényében ábrázoltuk az elemekre kapott intenzitásokat, amit a K példáján a 9. ábra szemléltet. Látható, hogy a mintákban növekvő koncentrációban jelen lévő nátrium szignifikáns jelnövekedést eredményez a mérendő elemekre kapott intenzitásokban, ami alátámasztja a teljes faktoriális kísérlet eredményét.



9. ábra A kálium (766,491 nm) relatív intenzitása a nátriumkoncentráció függvényében

Ezen jelek növekedésének mértékét számszerűsítettük úgy, hogy a vizsgálat során alkalmazott „centrum” (400 mg/l) nátriumkoncentrációnál kapott jelintenzitáshoz viszonyítottuk a többi nátriumkoncentrációnál kapott

Humán vérszérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával

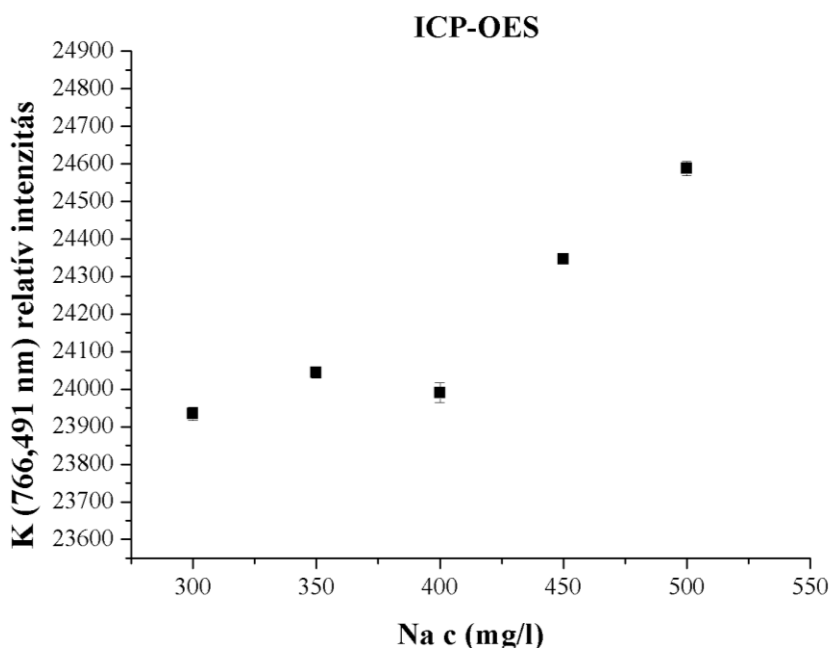
intenzitásokat minden egyes elem esetében. Az emberi vér normál nátriumtartalma viszonylag széles koncentrációtartományban van megadva (3000-5000 mg/l), viszont a minta-előkészítés után tízszeres hígításban tartalmazza (300-500 mg/l), ezáltal a centrum Na-koncentrációja alapján kiszámítottuk az intenzitások eltolódásának százalékos különbségeit (12. táblázat). Ezen eredmények alapján a vérszérum elemanalízise során ehhez a centrumkoncentrációhoz viszonyított eltérésekkel korrigálhatóak a vizsgált elemek (K, Ca, Mg, Cu, Zn, Fe) koncentráció értékei.

12. táblázat A hígított vérszérummintákban az egyes elemekre meghatározott koncentráció százalékos eltérése a centrum nátriumkoncentrációnál (400 mg/l) kapott eredményhez viszonyítva

	%					
Na (mg/l)	K	Ca	Mg	Cu	Zn	Fe
300	-5,5	-2,8	-7,8	-1,7	0,7	-2,6
400	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
500	5,5	2,8	7,8	1,7	-0,7	2,6

A legnagyobb megfigyelhető különbség a Mg esetében volt, azonban megállapítható, hogy a relatív különbség meglehetősen kicsi (<10%), továbbá a tûrés és a faktoriális terv eredményei is arra utalnak, hogy ez a hatás csekély mértékű.

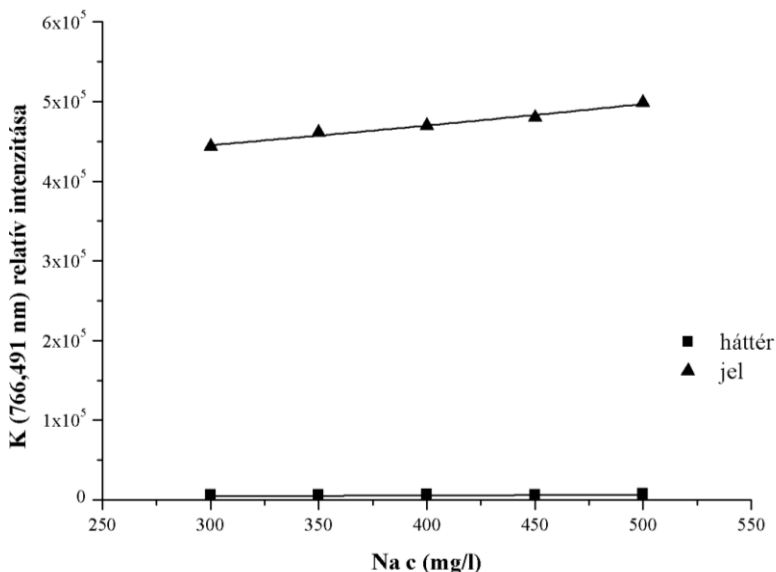
Összehasonlításképpen tanulmányoztuk a nátrium növekvő koncentrációjának hatását a hat elem (K, Ca, Mg, Cu, Zn, és Fe) intenzitására nézve ICP-OES technikával is, amit szintén a kálium esetében mutatunk be a 10. ábrán.



10. ábra A kálium (766,491 nm) relatív intenzitása a nátriumkoncentráció függvényében ICP-OES technikánál

Ahogy az MP-AES esetében is, a kapott intenzitásértékek szignifikáns jelnövekedését tapasztaltuk az ICP-OES technikánál is, azonban ez kisebb mértékű, mint a mikrohullámú plazmánál (Függelék 12. táblázat).

A modelloldatok analízise során mind a hat elem mérésére sor került, tehát minden elemre kaptunk intenzitást abban az esetben is, amikor a minta nem tartalmazta az adott elemet. Így nagy mennyiségű adat állt rendelkezésre, hogy megfigyeljük a háttérrel. A 11. ábra szemlélteti, hogy a háttér értéke a teljes analízis során állandónak bizonyult, amit a kálium példáján mutatunk be. Az ábra a káliumot tartalmazó, valamint a káliumot nem tartalmazó mintákban mért intenzitásokat szemlélteti. A további öt elem vizsgálata során felvett háttérben sem mutatkozott statisztikai eltérés, tehát a nátrium mátrix nem volt hatással a mikrohullámú plazma stabilitására.



11. ábra A káliumot tartalmazó (jel) és nem tartalmazó (hátter) mintákra kapott intenzitás a nátriumkoncentráció függvényében

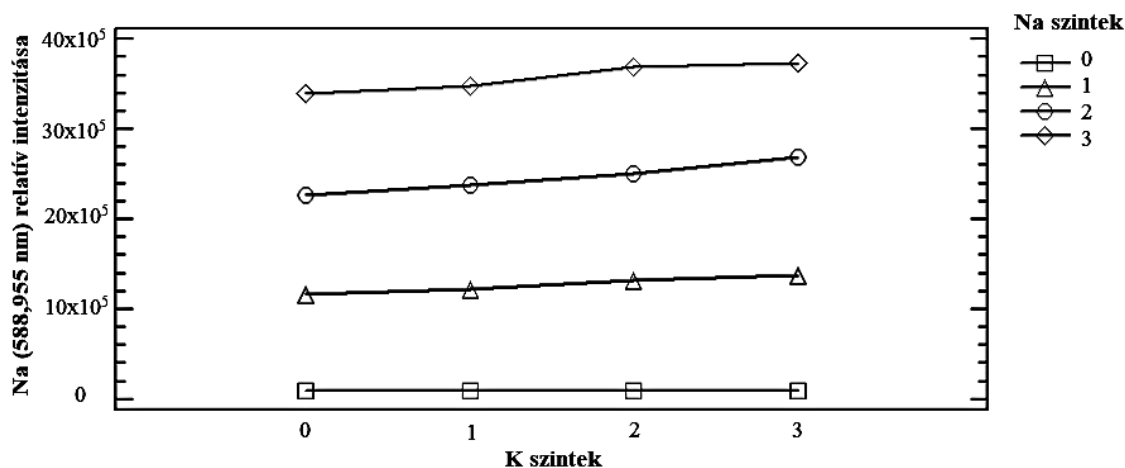
A szokványos kimutatási határérték (LOD) meghatározásán túl a nagy mennyiségű mintahalmazból kapott háttér intenzitások lehetőségét adnak arra is, hogy a kimutatási határokat a háttér intenzitások varianciaanalízise során kapott átlag és szórás értékek alapján számoljuk. Így pontosabban tudtuk meghatározni az adott mintamátrixban lévő elemek kimutatási határait. Emellett a méréseket elvégeztük mátrix alkalmazása nélkül is, a kapott eredményeket összehasonlítottunk az MP-AES gyártó által megadott LOD értékekkel. Továbbá ICP-OES készülékre is meghatároztuk mátrix nélkül a kimutatási határ értékeit és összevetettük az irodalmi, valamint az MP-AES esetén meghatározott LOD értékekkel, amit elemenként a 13. táblázat tartalmaz.

13. táblázat A vizsgált hat elem (K, Ca, Mg, Zn, Cu) kimutatási határ értékeinek (LOD) összehasonlító táblázta

Mért elemek	Hullámhossz (nm)	LOD MP-AES ($\mu\text{g/l}$)			LOD ICP-OES ($\mu\text{g/l}$)	
		mátrix	mátrix nélkül	irodalmi	mátrix nélkül	irodalmi
K	766,491	5,00	0,27	0,65	15,28	3,20
Ca	430,253	28,0	0,07	0,10	0,22	2,00
Mg	285,213	10,0	0,08	0,12	0,02	0,01
Zn	213,857	4,00	3,52	4,50	0,07	0,10
Cu	324,754	2,00	0,41	0,70	0,11	0,15
Fe	371,993	11,0	0,86	1,70	0,13	0,10

Azt tapasztaltuk, hogy az általunk MP-AES készüléknél meghatározott kimutatási határok mátrix nélküli közegben jobbnak bizonyultak az irodalmi adatoknál és néhány esetben vetekszenek az ICP-OES értékeivel.

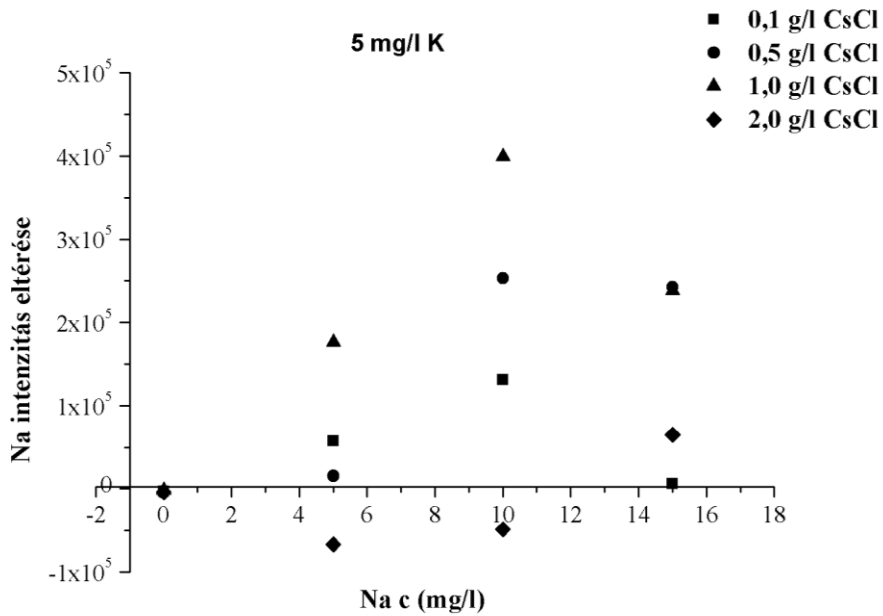
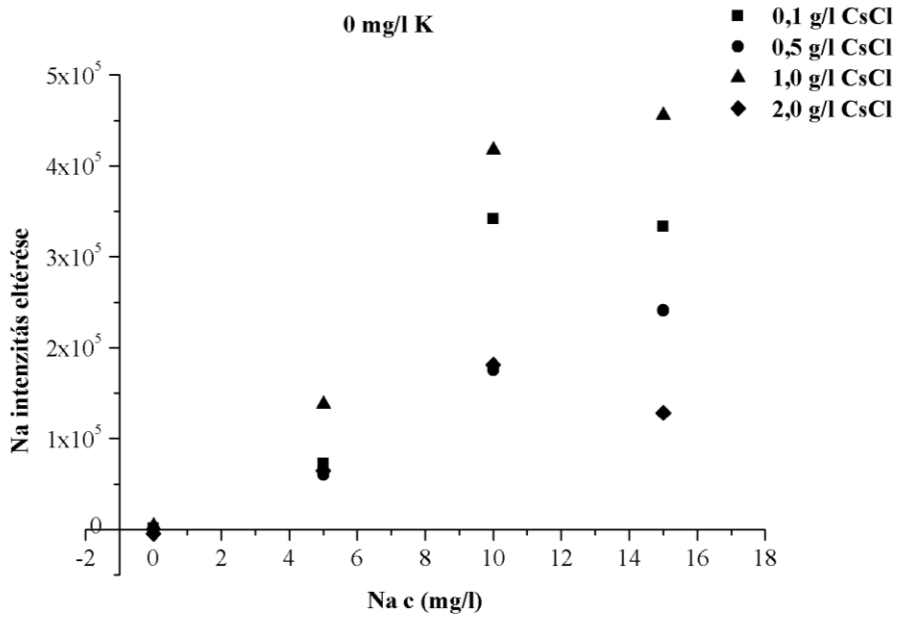
A mátrixhatásvizsgálatok további alátámasztása érdekében kísérleteket végeztünk arra vonatkozóan, hogy a nátrium és kálium hogyan befolyásolja egymás relatív intenzitását, ahol egyforma koncentrációban állítottuk be a két elem modelladatait. Egy négyszintes kísérleti tervet készítettünk, ahol a faktorok a nátrium és a kálium intenzitásai, az eltérő szintek pedig a két elem (Na, K) különböző koncentráció értékei. A különböző koncentrációjú modelladatok eredményeire számított kettényezős varianciaanalízis alapján a két elemre kapott relatív intenzitások különbségei minden esetben szignifikánsnak bizonyultak ($p=0,000$). A négyszintes kísérleti tervet a Na (588,995 nm) példáján ismertetjük (12. ábra). Megfigyelhető, hogy a K szintjei a Na szintjeitől függően változnak, ugyanis akkor nem tapasztalánk hatást, ha egymással párhuzamos vízszintes vonalakat kapnánk. Amennyiben ez bármerre megváltozik a szintek között hatás, keresztthatás lép föl. Ezek alapján a Na hatással van a K intenzitására és visszafelé, viszont ez az interakció, vagyis keresztthatás elenyésző.



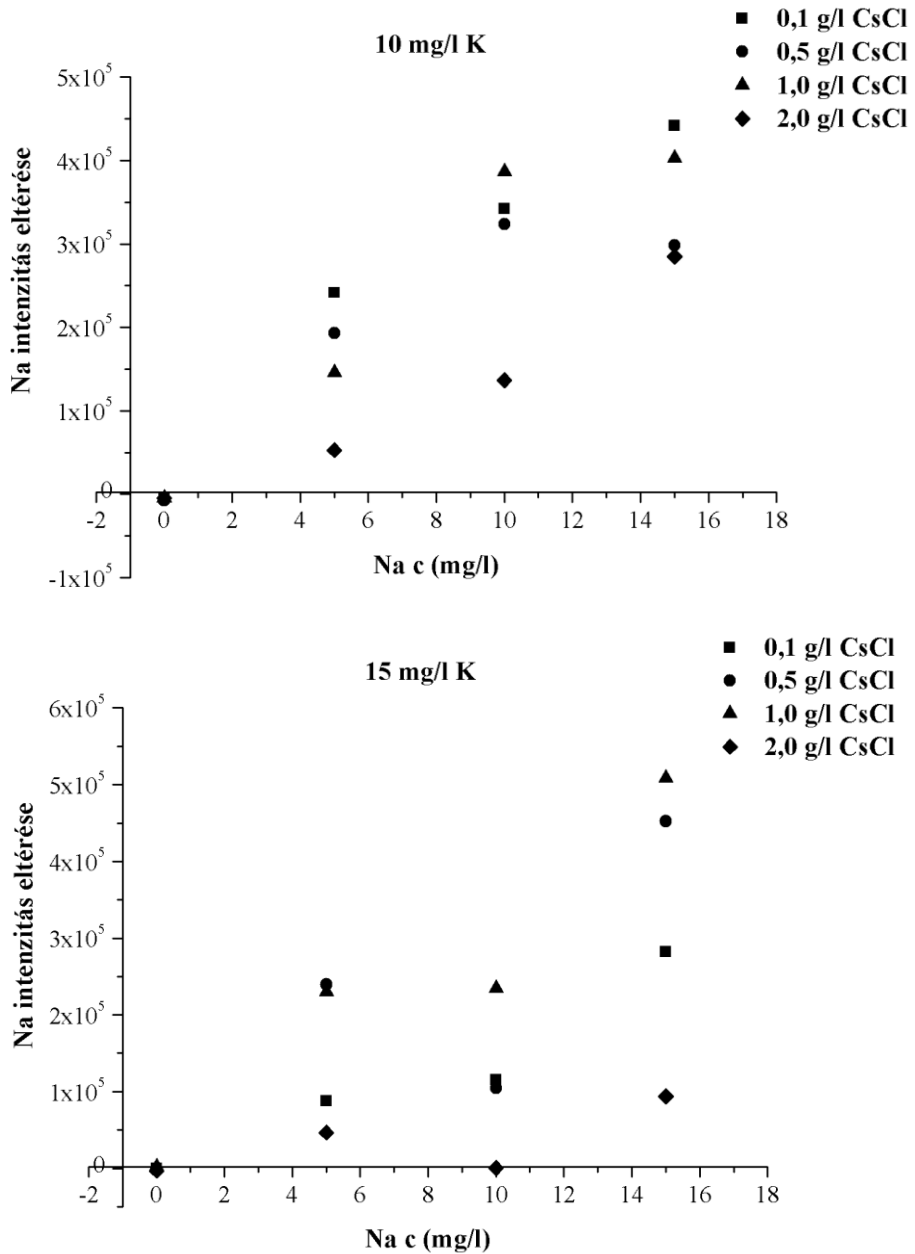
12. ábra A Na (588,95 nm) kapott relatív intenzitásokra gyakorolt K és Na szintek interakciós diagramja

Ahogy már az irodalmi bevezetőben említettük, az ionizációs puffer szerepe az, hogy a nagy koncentrációban lévő könnyen ionizálódó elem ionizációját visszaszorítsa, stabilizálva az ionizáció mértékét. A céziumnak tehát a kibocsátási tartományban rengeteg elektront kell szolgáltatnia, ezáltal pufferelve más elektronforrásokat (Na, K). Kísérletekkel meghatároztuk, hogy különböző koncentrációban a modelloldatokhoz adagolt ionizációs puffer (CsCl) hogyan befolyásolja a mért relatív intenzitásokat, ezáltal az elemek mennyiségi meghatározását. A 13. ábra a különböző koncentrációkban adagolt cézium-klorid esetében mutatja meg a növekvő káliumkoncentrációk mellett észlelt intenzitás eltéréseket a nátrium 588,995 nm-es elemző vonalán. Az intenzitás eltérés ebben az esetben azt jelenti, hogy a 0,10-0,50-1,00-2,00 g/l cézium-klorid tartalmú oldatok nátriumra mért intenzitásokból kivontuk a 0,00 g/l cézium-klorid tartalmú oldatokra kapott intenzitásokat. Ábrázolva az így kapott különbségeket a nátriumkoncentráció függvényében megfigyelhetővé válik, hogyan változik a mért jel az ionizációs puffer koncentrációjának hatására, növekvő káliumkoncentráció mellett. A 13. ábrán a növekvő

koncentrációjú kálium mellett látható, hogy a káliumkoncentráció és a cézium-klorid is hat a nátrium mért jelére és megfigyelhető, hogy ez a hatás koncentrációfüggést mutat a káliumkoncentráció növelésével.

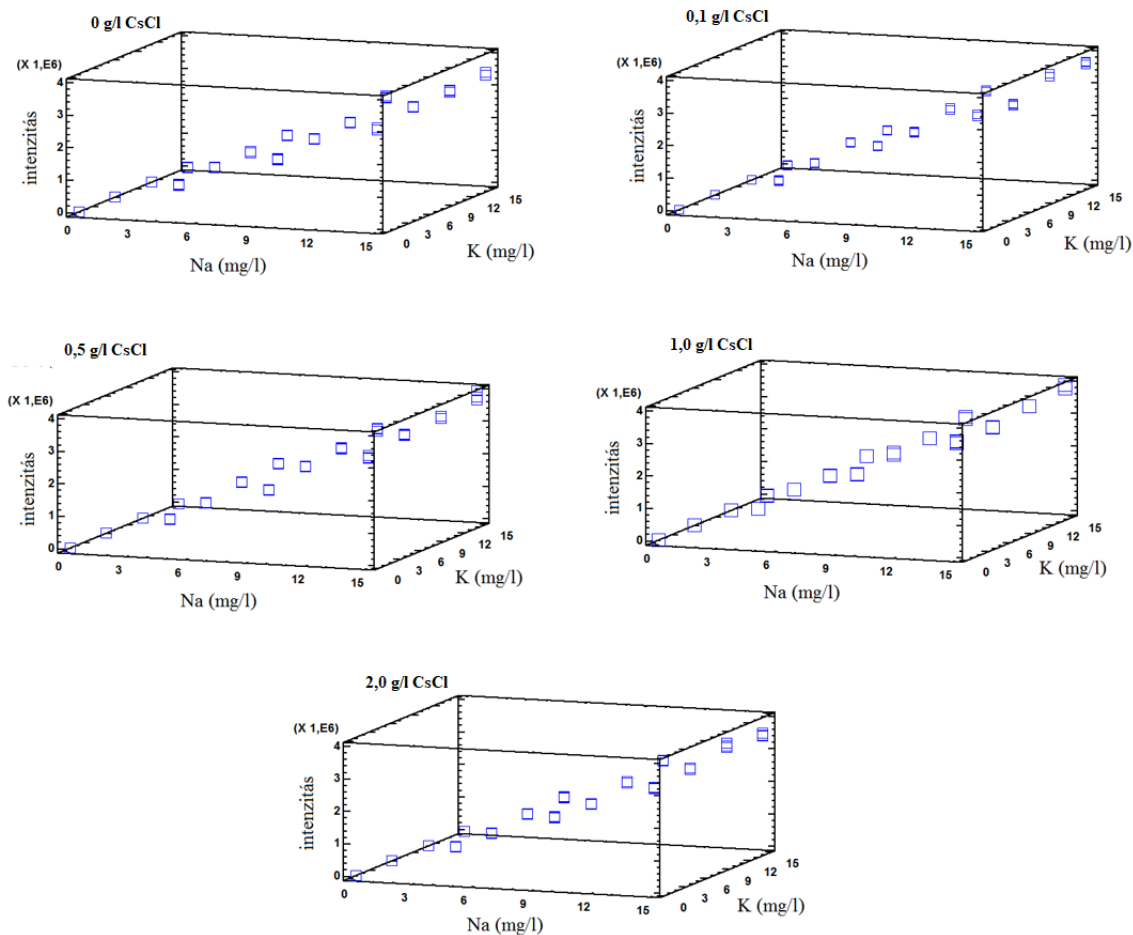


Humán vérérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával



13. ábra A Na relatív intenzitásának változása az ionizációs puffer koncentrációjának hatására különböző K-koncentrációk mellett

A 14. ábrán a Na és K négyszintes kísérletének háromdimenziós ábrázolása tanulmányozható, ahol a két elem faktorának beállított szintjei nem külön-külön vannak hatással, hanem kölcsönös viszony mutatkozik közöttük.



14. ábra Nátrium és kálium faktorának beállított szintjeinek háromdimenziós ábrázolása

A kísérlet során bebizonyítottuk, hogy a két elem egymás melletti jelenléte kölcsönösen hatást gyakorol a vizsgált analitikai jelekre, azonban minimális keresztthatás tapasztalható. Az ionizációs puffer alkalmazása során a mikrohullámú plazmában azt tapasztaltuk, hogy az 1,0 és 2,0 g/l CsCl

Humán vérérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával

koncentráció megterhelte a nitrogén plazmát, így 0,1 g/l CsCl alkalmazása célszerű, amennyiben indokolt.

Összevetettük a kísérletek során alkalmazott mátrixillesztett standard sor intenzitását a nátrium nélkül alkalmazotthoz képest, ahol a Fe, Mg és Zn esetén nem tapasztaltunk jelentős változást, míg a Cu intenzitása 10 %-al, a Ca és a K intenzitása 20 %-al növekedett (Függelék 13. táblázat).

Az MP-AES készülék alkalmazhatóságát humán vérérumminták elemanalízisére Seronorm[®] (Human LOT 1512606) minőségtanúsított liofilizált vérérummal is ellenőriztük. A Seronorm[®] liofilizált emberi alapú kontrollszérum, amelyet önkéntes véradóktól származó vérből állítanak elő. Az egyes mintákat tesztekkel külön-külön ellenőrzik, hogy HBs antigén, HIV p24 antigén, HIV I, II és HCV ellenanyagok szempontjából negatív e. Mivel azonban egyetlen módszer sem zárhatja ki teljesen a fertőző kórokozók jelenlétét, ezt az anyagot minden esetben betegmintaként kell kezelni. A Seronorm[®] tartósítószermentes, stabilizátorok nélküli minőségtanúsítvánnyal rendelkező referencia anyag, melyet a laboratóriumi mérési eljárások pontosságának és minőségének ellenőrzésére fejlesztettek ki.

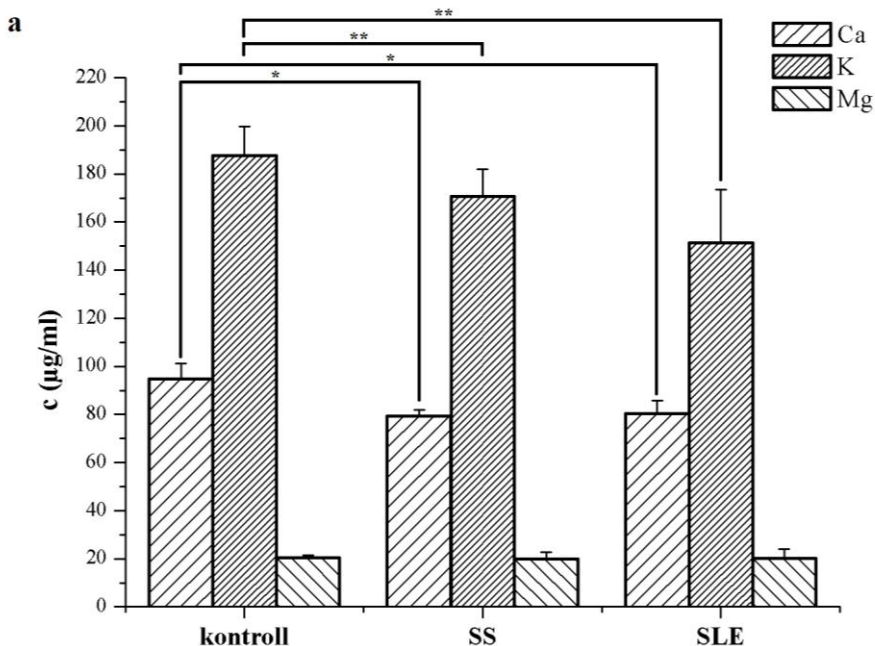
A hat elem: Ca-, K-, Mg-, Cu-, Zn- és Fe-koncentrációjának visszanyerését mátrixillesztett kalibrálással és anélkül is elvégeztük, amit a 14. táblázat tartalmaz. A kapott eredmények jó egyezést mutatnak a referenciaminta minőségtanúsítványában megadott értékekkel.

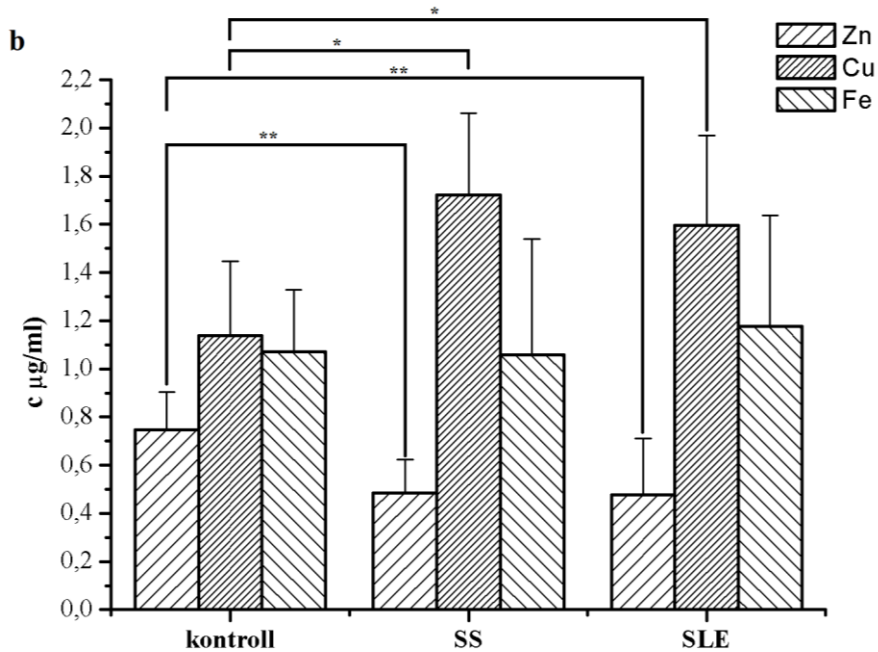
14. táblázat Seronorm[®] liofilizált vérérumminta visszanyerése mátrixillesztett kalibrálása mellett és anélkül

elemek (nm)	mátrix-illesztéssel (mg/l)	mátrix-illesztés nélkül (mg/l)	irodalmi (mg/l)
Ca 445,478	102	99	89
Cu 324,754	1,33	1,33	1,31
Fe 371,993	1,47	1,4	1,07
K 766,491	159	164	150
Mg 285,213	22,5	23,5	20
Zn 213,857	1,58	1,86	1,88

4.3. Autoimmun beteg és kontroll humán vérérumminták elemanalízise MIP-AES módszerrel

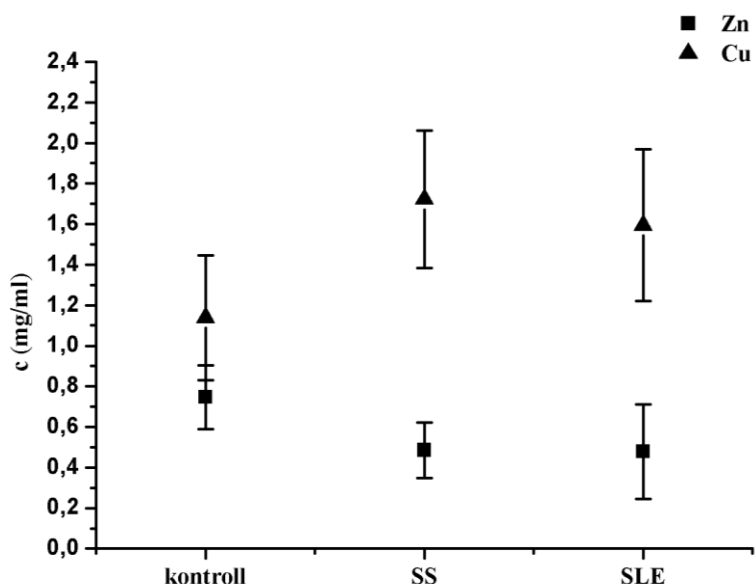
A mátrixhatás vizsgálatokra kapott eredmények alapján végeztük el a valós minták elemanalízisét, ahol autoimmun betegektől származó vérérummintákból szintén a Ca-, K-, Mg-, Cu-, Zn- és Fe-koncentrációját határoztuk meg. Összesen hatvan darab átlagminta elemzését valósítottuk meg, csoportonként (kontroll, SS, SLE) húsz darab mikrohullámú egységben roncsolt mintát vizsgáltunk. Az egyes csoportok elemtartalmának koncentráció értékeit a 15. ábra szemlélteti, ahol az átlagkoncentrációkat a szórás értékekkel együtt tüntettük fel.





15. ábra A makro- (a) és mikroelemek (b) koncentrációja a vizsgált csoportokban (kontroll, SS, SLE) (* $p < 0,001$; ** $p < 0,05$)

Az autoimmun beteg minták nem mutattak szignifikáns különbséget a kontroll csoporthoz képest a magnézium- és vaskoncentráció esetében. Ugyanakkor a kalcium szignifikánsan kisebb értékű volt, mind az SS és a SLE minták esetében a kontroll csoport mintáihoz képest ($p < 0,001$), valamint a káliumkoncentráció értékei is statisztikailag kisebbnek bizonyultak a betegek mintáiban ($p < 0,05$) a kontroll mintákhoz képest. A Zn-tartalom szignifikánsan csökkent ($p < 0,05$), míg a Cu-tartalom szignifikánsan nőtt ($p < 0,001$) az SS és SLE mintákban a kontroll csoporthoz képest. A Zn és Cu szignifikáns eltérését a kontroll mintáktól a 16. ábra szemlélteti.



16. ábra A Zn- és Cu-koncentráció a vizsgált csoportokban

A megnövekedett Cu-koncentráció statisztikailag kisebb Zn-koncentrációt eredményezett. A két nyomelem között a farmakológiából ismert kompetitív antagonizmus jelentkezett, ahol egy agonista és egy antagonist „vetélkedik” a primer vagy ortoszterikus kötőhelyért [107], [146]. Ebben az esetben a betegségrcsoportokban megfigyelt cinkkoncentráció értékének csökkenése és a réz koncentrációjának növekedése között összefüggést figyeltünk meg a vizsgált betegségrcsoportok esetében, amely jelenséget más autoimmun betegségeknél (reumás artritisz, SLE, juvenilis krónikus artritisz) már korábbi publikációkban közöltek [107], [108], [146], azonban SS esetében erre vonatkozó szakirodalmi utalást nem találtunk. A reumás ízületi gyulladás esetében folytatott tanulmányokban megfigyelték, hogy a nyomelem mennyiségi értékei a plazmában függetlenek a táplálkozástól, így összefüggésbe hozható a krónikus gyulladás folyamatával [109]. *Sahebari és munkatársai* közleményében jelent meg, hogy a Zn-koncentráció értéke lecsökkent az SLE betegségben szenvedők

Humán vérszérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával

vérszérumában. Ezt az eredményt az oxidatív stresszel magyarázzák, ami szerint az SLE-ben fellépő diszreguláció vagyis a Zn hiány a T-sejtek működését is befolyásolja [79]. Egy másik kutatócsoport vizsgálata megállapította, hogy a vérszérumban megnövekedett Cu-koncentráció összefüggésben van a betegség aktivitásával [147].

Az általunk SS és SLE mintákra kapott eredmények a két mikroelem esetében nem csak az egészséges csoporttól mutatnak szignifikáns eltérést, hanem a szakirodalomban meghatározott normál koncentrációtartománytól is (15. táblázat) [148]–[150].

15. táblázat A réz- és cink-koncentrációja: az irodalomban közölt normál tartomány, és az általunk vizsgált csoportok (kontroll, SS, SLE) esetében kapott eredmények

	Cu (µg/ml)	Zn (µg/ml)
Normál	0,787-1,308	0,620-1,214
Kontroll	1,14 ± 0,31	0,75 ± 0,16
SS	1,72 ± 0,34	0,49 ± 0,14
SLE	1,6 ± 0,37	0,47 ± 0,23

A cink és a réz a szervezet normál immunműködésében fontos szerepet játszik. A koncentrációjukban bekövetkező változás befolyásolhatja a szuperoxid dizmutáz enzim aktivitását, ezáltal elősegítheti az oxidatív stressz kialakulását [151].

A három csoport koncentráció értékeit összevetettük *Yilmaz és munkatársai* eredményeivel [77]. Ez a kutatócsoport szisztémás lupus erythematosusban (SLE) szenvedő betegek vérszérumában a Mg, Zn, Cu és Fe mennyiségét vizsgálták ICP-OES módszerrel. A 16. táblázatban mutatjuk be eredményinket, melyek jó korrelációt mutatnak az említett irodalmi adatokkal.

16. táblázat Az SLE szérummintákra kapott eredményeink összehasonlítása
Yilmaz és munkatársai közleményével

	Saját eredmények		Yilmaz és munkatársai [77]	
	Kontroll	SLE	Kontroll	SLE
n	20	20	20	27
Mg (µg/ml)	20,41 ± 1,19	20,26 ± 3,65	20,00 ± 2,00	19,00 ± 2,00
Zn (µg/ml)	0,75 ± 0,16	0,47 ± 0,23*	0,99 ± 0,22	0,88 ± 0,20*
Cu (µg/ml)	1,14 ± 0,31	1,60 ± 0,37**	0,94 ± 0,20	1,33 ± 0,23**
Fe (µg/ml)	1,07 ± 0,26	1,18 ± 0,46	1,04 ± 0,30	0,96 ± 0,29

*p<0,05, ** p<0,001 a kontroll csoporthoz képest

Ezen vizsgálati eredmények megerősítik az előzőekben közölt állításainkat, miszerint a Mg- és a Fe-koncentrációi között nem volt szignifikáns különbség, míg a Zn-koncentráció statisztikailag csökkent és a Cu koncentrációja pedig szignifikánsan nőtt az SLE csoportnál a kontrollhoz képest.

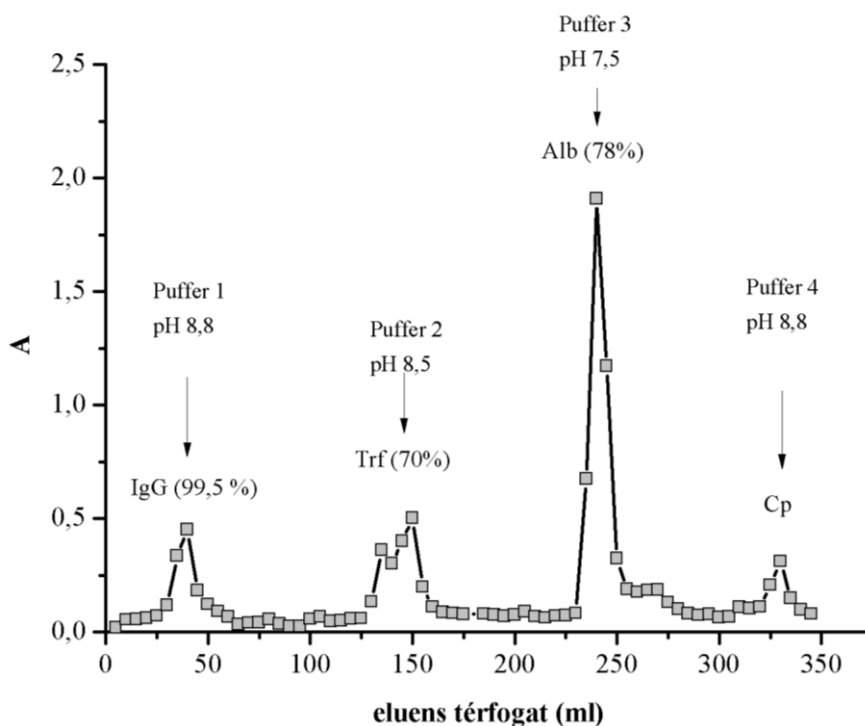
Az elemzést egy másik autoimmun betegségre (SS) kiterjesztve azt találtuk, hogy a vérszérum nyomelemeinek szintje hasonlóan változik, mint ahogy az SLE esetében megfigyeltük. Eredményeink szerint sem az SS, sem az SLE csoportok nem mutattak szignifikáns különbséget a Mg- és Fe-koncentráció értékeiben a kontrollhoz képest, míg a Zn-koncentráció értékeinél csökkenést, a Cu-koncentráció értékeinél pedig növekedést figyeltünk meg a beteg csoportoknál a kontrollhoz képest.

4.4. A frakcionált vérszérumminták elemanalizise

Yilmaz és munkatársai eredményei szerint az egyes extracelluláris fehérjék szintje az autoimmun betegségben szenvedő személyek vérszérummintáiban eltérést mutat a kontroll csoportokhoz képest. Ezen fehérjék részt vesznek a normál immunműködésben antioxidáns tulajdonságaik révén, továbbá az esszenciális nyomelemek transzportfolyamataihoz is hozzájárulnak [4]–[6],

[152]. A fehérjék szintjének autoimmun betegségek során fellépő változása tehát biokémiai folyamatok révén befolyásolhatja a nyomelemek kötés- és -szállító tevékenységét is, amely akár oka, akár következménye lehet az autoimmun elváltozásnak. Speciációs analitikai technikákkal lehetőség nyílik az előzőekben vázolt biokémiai folyamatok tanulmányozására azáltal, hogy elválasztjuk a betegségekben fontos szerepet játszó szállító és antioxidáns fehérjéket, majd meghatározzuk a nyomelem-eloszlásukat.

A vérszérumminták elemtartalmának meghatározása mellett célunk volt az is, hogy megállapítsuk az egyes elemek mely, a vérszérumban található fehérjéhez kötődnek. Ezért egy speciálisan fehérjék elválasztására alkalmazható anioncserélő oszlopon az előző kísérletnél alkalmazott csoportok (kontroll, SS, SLE) közül egy-egy mintát elválasztottunk. Az eluált frakciók fehérjetartalmát UV spektrofotometriával kapott abszorbancia értékek alapján azonosítottuk a DEAE-Trisacryl® M termékismertetőjében megadott elválasztási profil alapján. Az abszorbanciákat a fogyott puffer térfogat függvényében ábrázoltuk, amit a *17. ábra* mutat be.

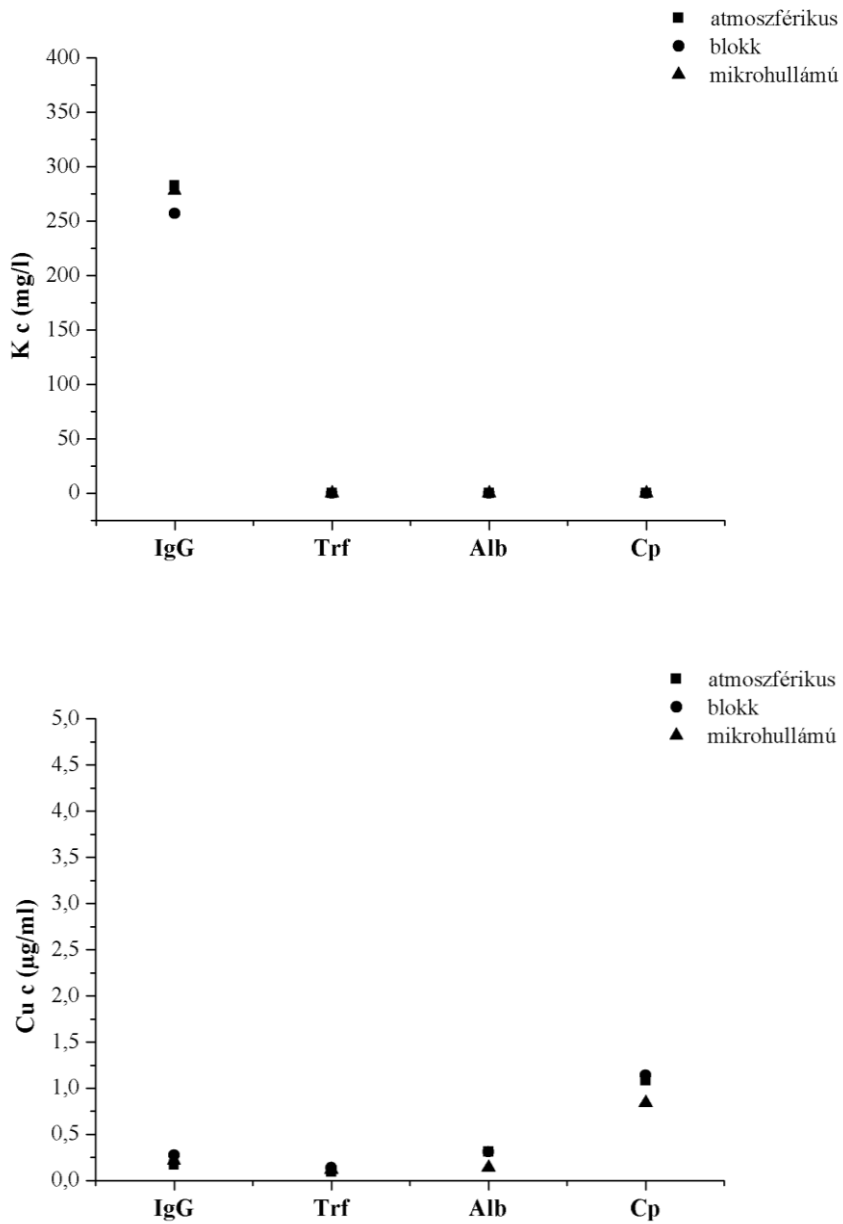


17. ábra Az elválasztott fehérjefrakciók egy kontroll mintában az alkalmazott eluensek térfogatának függvényében

4.4.1. A frakciók elemanalízisének optimalizálása

A kapott frakciókat ezután előkészítettük az elemanalízisre. Mivel a vérszérum nagy szervesanyagtartalmát és a puffer mátrixának hatását nem ismertük, háromféle roncsolási technikát összehasonlítva választottuk ki a legmegfelelőbbet a vérszérumminták minta-előkészítésére. Mind a három roncsolási technikánál az egyes fehérjefrakciók elemtartalmára kapott eredményeket kéttényezős varianciaanalízissel értékeltük ki. A három módszer elemkoncentrációi között nem volt szignifikáns eltérés ($p > 0,05$), amit a 18. ábrán mutatunk be a K és Cu példáján.

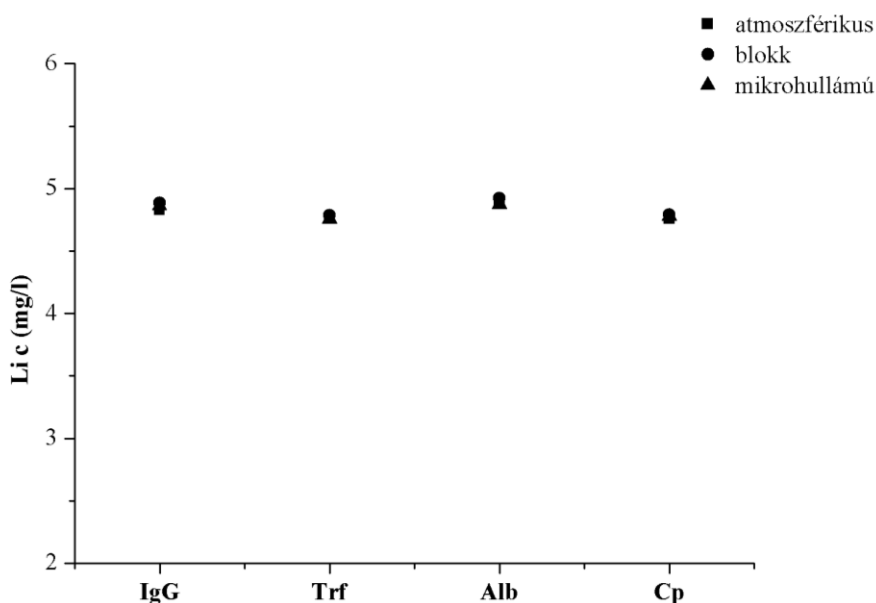
Humán vérszérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával



18. ábra Az elválasztott négy fehérjére kapott elemek átlagkoncentrációja a roncsolási technikák függvényében a K és Cu esetében

A 18. ábrán megfigyelhető, hogy a különböző feltárási technikák az egyes elemek átlagkoncentrációjának függvényében jól korrelálnak egymással, tehát a kipróbált minta-előkészítési módszerekkel kapott eredmények között nem volt szignifikáns különbség. Mindhárom előkészítés egyformán hatékonynak bizonyult.

Továbbá a minta-előkészítés hatékonyságát belső standarddal is alátámasztottuk. Minden egyes frakciókhoz belső standardként 5 mg/l lítiumot adtunk. Ennek mennyiségét a lítium visszamérésével ellenőriztük le (19. ábra).



19. ábra A kontroll minták visszamért Li-koncentrációja a három különböző típusú feltárási során

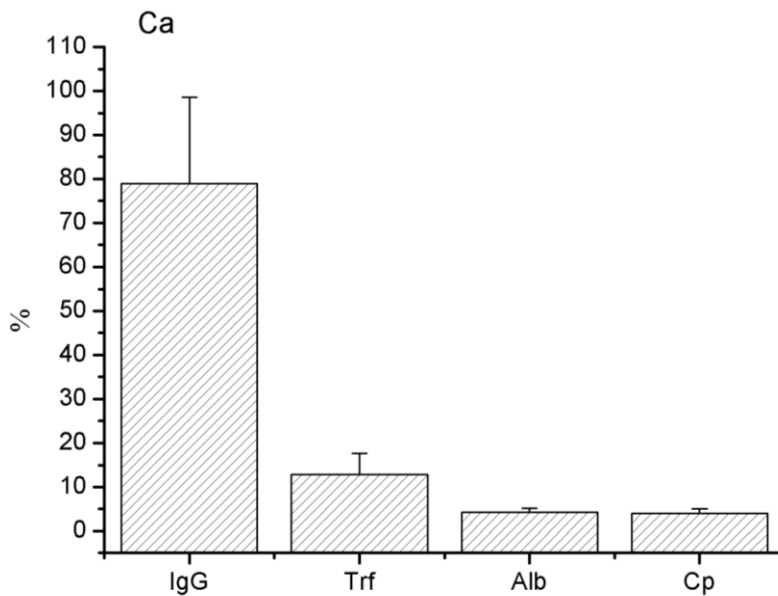
Az ábrán jól látható, hogy az egyes frakciókhoz hozzáadott térfogatnak megfelelő Li-koncentrációt kaptuk vissza az MP-AES elemzéssel az egyes roncsolási technikák alkalmazása után. Ez a kísérlet alátámasztotta, hogy egyik technikánál sem kell elemveszteséggel számolnunk. Vizsgálataink igazolják, hogy a háromféle roncsolás között alapvető hatékonysági különbség nincs. A

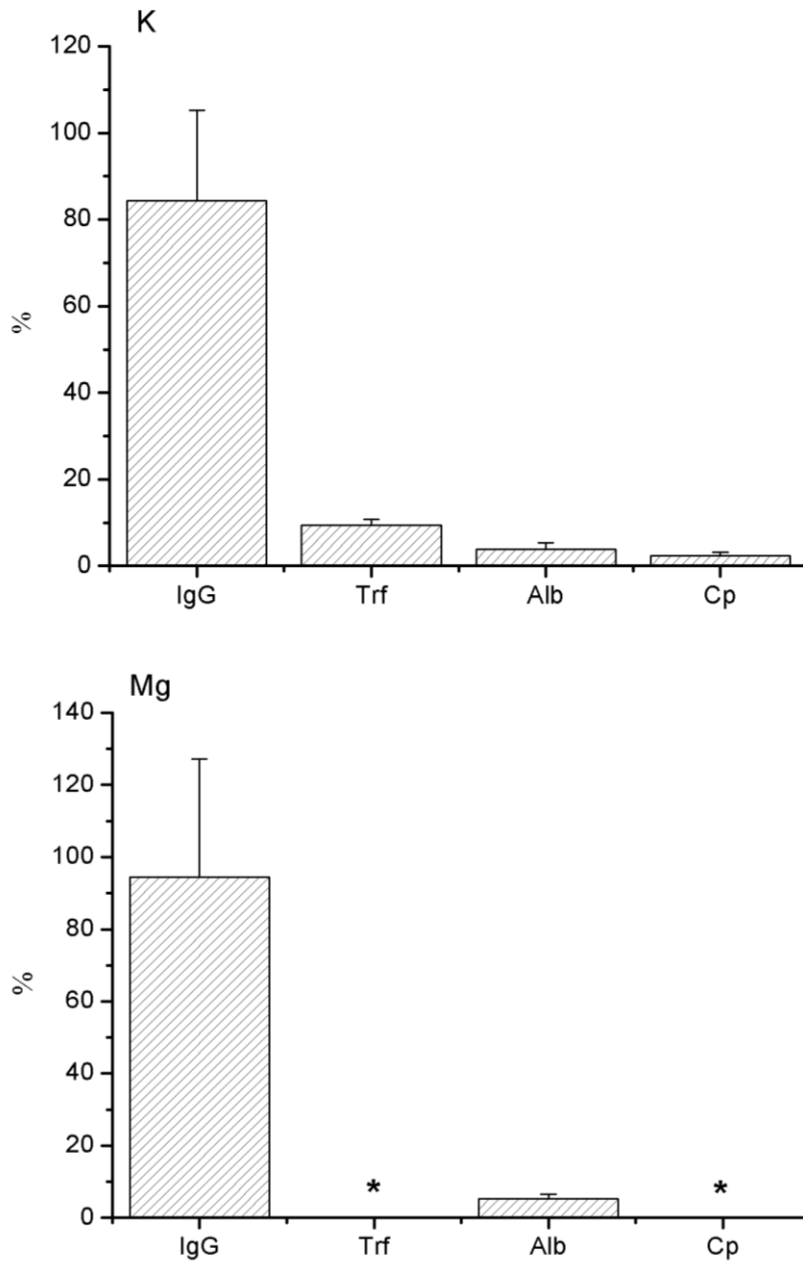
Humán vérszérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával

későbbi vérszérum vizsgálatok során bármelyik feltárást alkalmazhatjuk az elemanalitikai vizsgálatokhoz.

4.4.2. A frakcionált kontroll humán vérszérumminták elemanalízise

A háromféle roncsolási módszerrel kapott minták elemanalízisét MIP-AES technikával végeztük el. Minden esetben vak és puffer minta mérésére is sor került, majd korrigáltuk a kapott eredményeket. A 20. ábra szemlélteti a frakcionált fehérjék összes makroelem-tartalmának frakciókénti százalékos eloszlását.





20. ábra A kalcium-, kálium- és magnézium százalékos eloszlása a vészérum elválasztott fehérjeiben

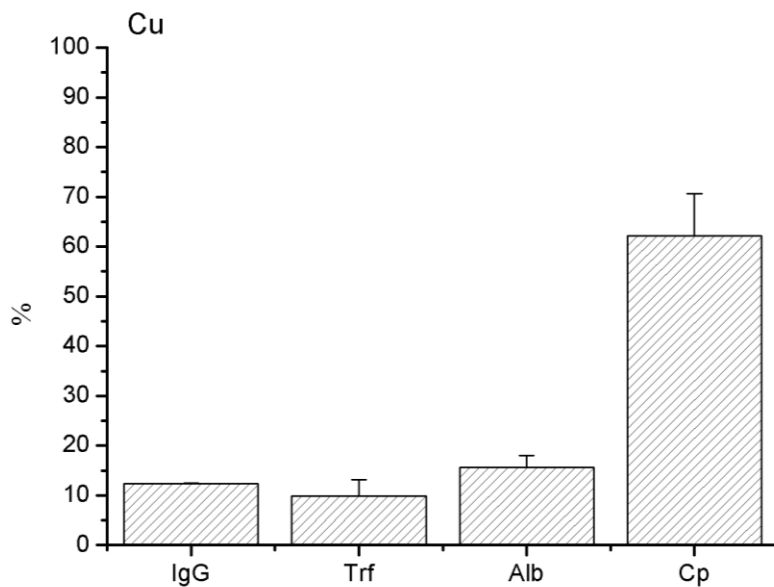
*<LOD

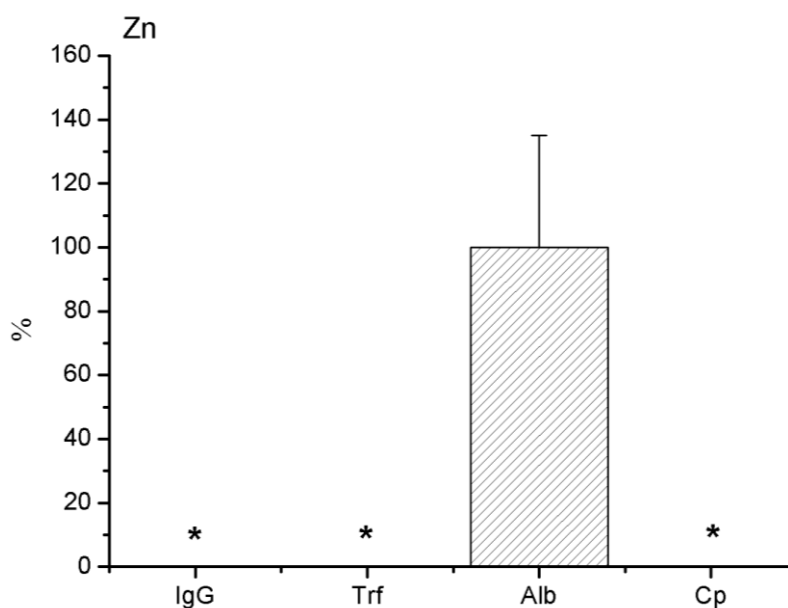
Humán vérszérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával

A makroelemek esetén látható, hogy a kalcium és a kálium minden fehérjében megtalálható, viszont legnagyobb mennyiségben az IgG fehérjében dúsul. A magnézium szintén az IgG-ben található a legnagyobb mennyiségben, ezenkívül pedig az albuminban is összemérhető koncentrációban van jelen.

A réz- és cinkkoncentráció értékét a frakcionálásból következő hígulásból nem tudtuk MIP-AES technikával meghatározni, így GFAAS módszerrel állapítottuk meg ennek a két elemnek a koncentrációját.

A kontroll csoportra kapott Zn és Cu összkoncentráció százalékos eloszlását a vérszérum elválasztott fehérjeiben a 21. ábra mutatja be.

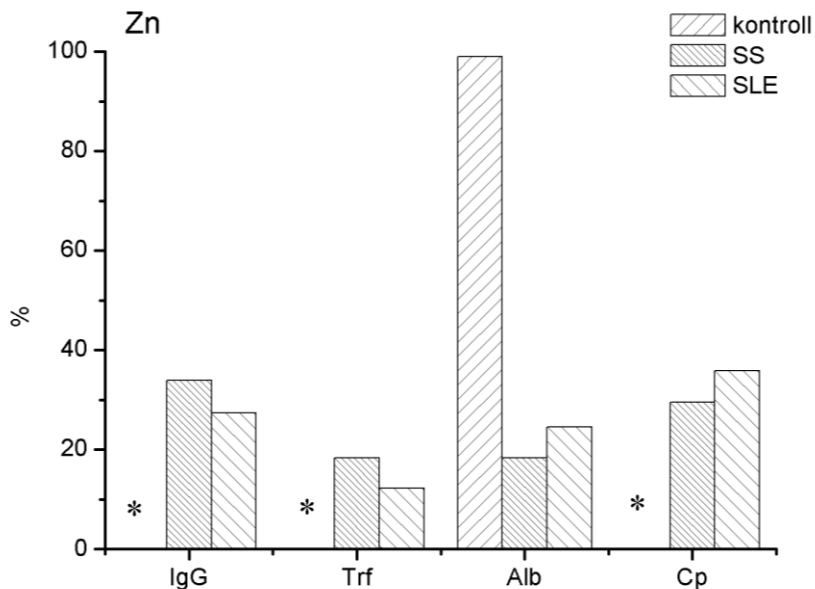




21. ábra A réz- és cink százalékos eloszlása a kontroll vérszérum elválasztott fehérjében
* < LOD

A mikroelemek esetén a réz minden fehérjében mérhető koncentrációban van jelen, legnagyobb mennyiségben a Cp fehérjében dúsul, ami a szakirodalom alapján a réz szállításáért felelős fehérje. Míg a cink csak az albuminhoz kötődik, az irodalom szerint pedig a cink fő hordozója az Alb fehérje, így elmondható, hogy eredményeink jó egyezést mutatnak a szakirodalommal [9], [151], [153].

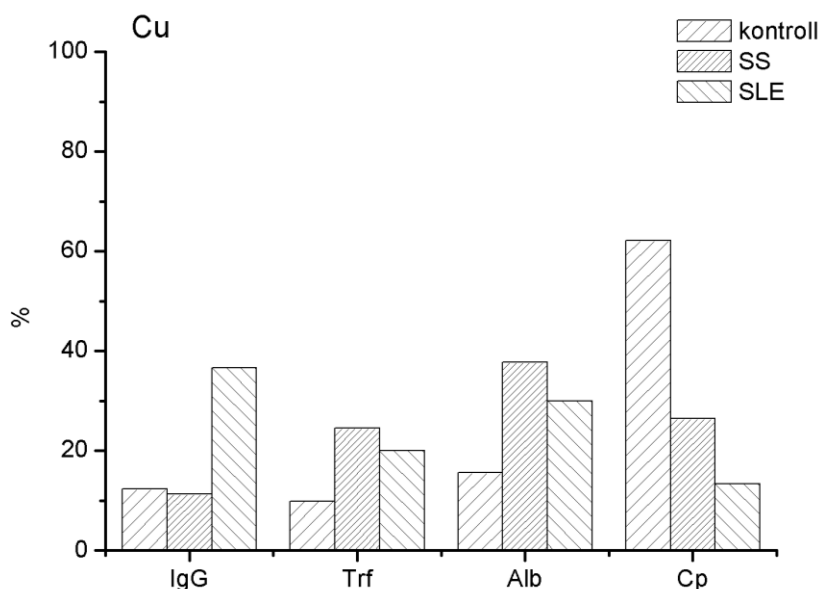
Elsődleges célunk az elemspeciáció során annak megállapítása volt, hogy a három csoport (SLE, SS, kontroll) vérszérum mintáiból elválasztott négy fehérje melyikéhez kötődik a réz és a cink a vizsgált elemek közül. Ugyanis a vérszérumminták elemanalizise során a kontroll és a két autoimmun betegségben szenvedő csoport között a cink és a réz koncentrációjában eltérést tapasztaltunk. A 22. ábra a cink eloszlását mutatja be a három csoport között.



22. ábra A cink százalékos eloszlása a vizsgált három csoport vérérummintáinak elválasztott fehérjéiben
* < LOD

Az előzőekben már megfigyeltük, hogy a kontroll csoport esetén a cink csak az albumin fehérjéhez kötődik, viszont az SS és az SLE csoportoknál tapasztaltunk változást. Az ábrán látható, hogy az összes fehérjében megjelenik, az IgG és Cp fehérjékben megnövekszik, ezzel arányosan pedig az Alb fehérjében csökken a cink mennyisége.

A következő ábrán (23. ábra) a réz eloszlását mutatjuk be a három vizsgált csoport fehérjefrakcióiban.

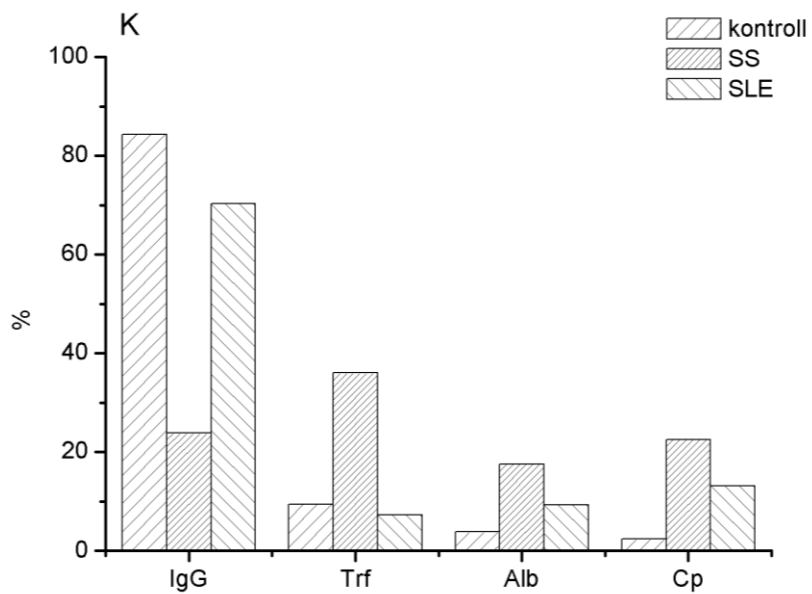
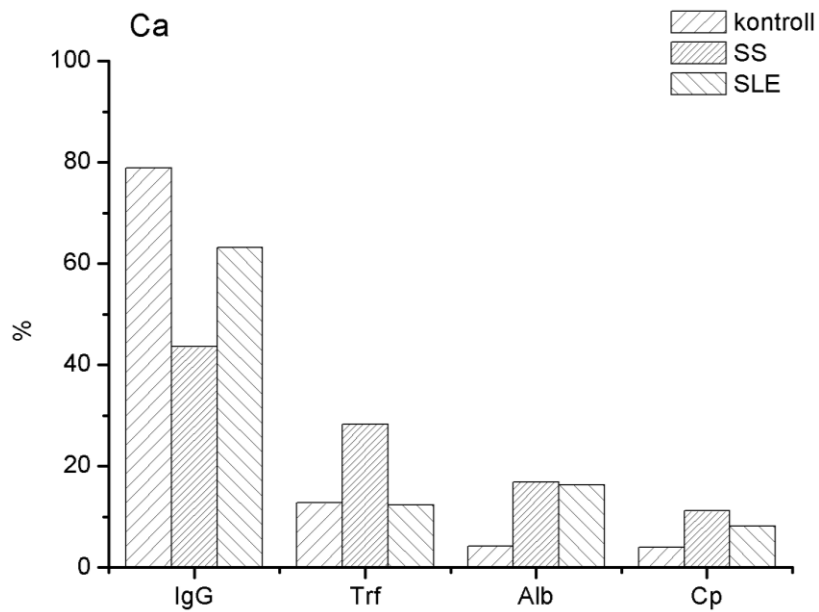


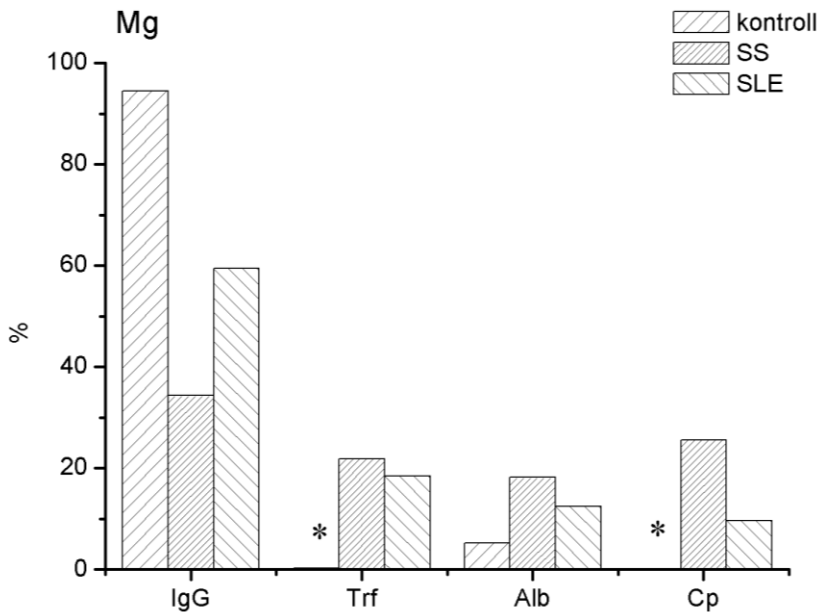
23. ábra A réz százalékos eloszlása a vizsgált három csoport vérszérummintáinak elválasztott fehérjeiben
* < LOD

A réz a kontroll csoportban a legnagyobb mennyiségben a Cp fehérjéhez kötődött, viszont az SS és SLE minták Cp frakciójában koncentráció csökkenést tapasztaltunk, míg az Alb fehérjefrakciókban megnőtt a réz mennyisége. A szakirodalomban már beszámoltak arról, hogy az albuminnak vannak rézkötő tulajdonsága is, tapasztalataink alapján arra következtethetünk, hogy az SS és a SLE vérszérummintákban az albumin cinktartalmának csökkenése a réz koncentrációjának növekedésével jár. Mindez az irodalmi adatokkal összhangban alátámasztja a cink-réz cseréjének folyamatát [154].

A makroelemek eloszlását a vizsgált három csoport (kontroll, SS, SLE) esetében a az elválasztott fehérjék között a 24. ábrán mutatjuk be.

Humán vérszérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával





24. ábra A kalcium-, kálium- és magnéziumkoncentráció eloszlása a vizsgált három csoport vérérszermintáinak elválasztott fehérjeiben

*<LOD

A 24. ábra alapján a magnézium koncentrációjában nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a kontroll és a két autoimmun beteg csoport között. A kontroll csoportnál már említettük, hogy a legnagyobb mennyiségben az IgG fehérjefrakció tartalmaz magnéziumot. Az SS és SLE mintákban még mindig megmaradt az IgG frakcióban a legnagyobb mennyisége, viszont összemérhető koncentrációban megjelent a Trf és Cp fehérje frakcióban is. Ehhez az elemhez hasonlóan az előző kísérletek alapján elmondhatjuk, hogy a kálium és kalcium legnagyobb mennyiségben szintén az IgG frakcióban van jelen a kontroll csoportban. Az SS és SLE csoportoknál a kalciummal kapcsolatban hasonló eredményeket figyeltünk meg, mint a magnézium esetében. A káliumkoncentrációnál szignifikáns eltérést tapasztaltunk az SS és a kontroll csoportok között. Az SS Trf fehérjefrakciója nagyobb koncentrációban tartalmazza a káliumot, a kontroll csoporthoz képest.

Humán vérszérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával

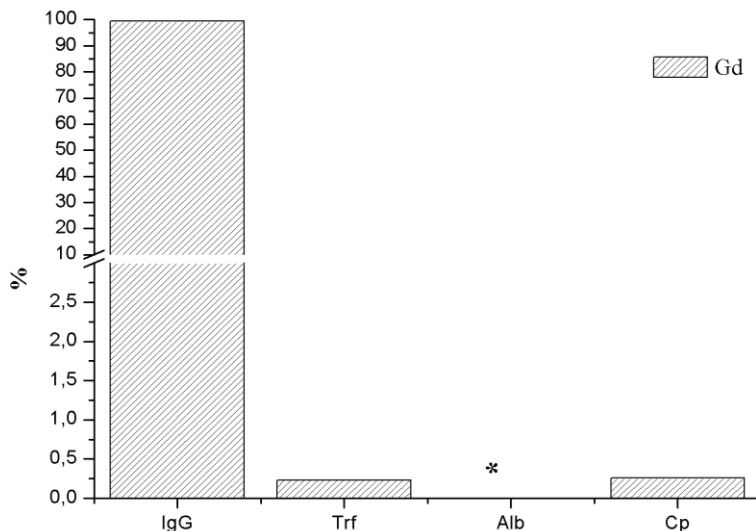
Ugyanezt az SLE mintáknál nem tapasztaltuk. A kapott eredmények alátámasztják és kiegészítik a már szakirodalomban is autoimmun betegségeknél megjelent tapasztalatokat [77]–[79].

4.5. Omniscan [Gd(DTPA-BMA)] kontrasztanyagot tartalmazó humán vérszérumminták elemanalízisének eredménye

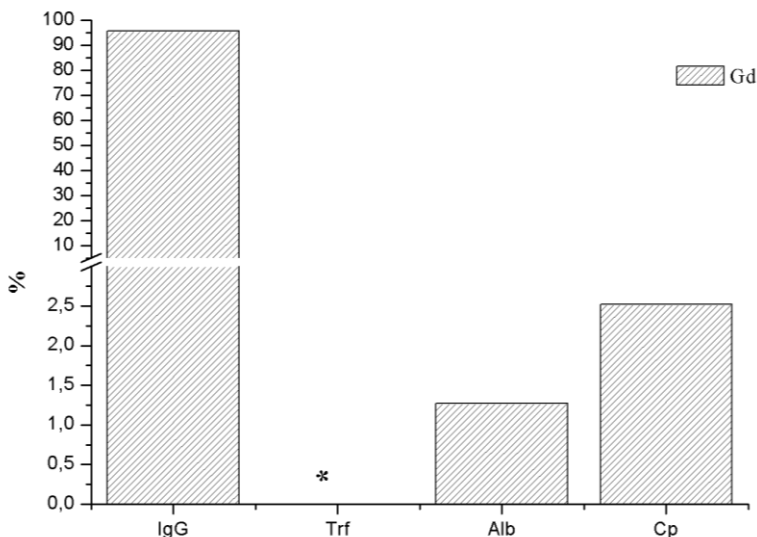
Az irodalmi bevezetőben már utaltunk arra, hogy *Baranyai és munkatársai* 2015-ben részletesen tanulmányozták számos Gd^{3+} -alapú MRI kontrasztanyag egyensúlyi és kinetikai sajátosságait fiziológiához közeli feltételek mellett. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a vizsgált MRI kontrasztanyagok közül a legkisebb stabilitási állandóval ($\log K_{[Gd(DTPA-BMA)]} = 16,85$; 0,15 M NaCl, 37 °C) és kinetikai inertséggel ($t_{1/2} = 9,3$ óra, pH=7,4, 0,15 M NaCl, 37 °C) rendelkező [Gd(DTPA-BMA)] (Omniscan[®]) disszociációja közel 18%-ban lejátszódhat egyensúlyban fiziológias feltételek mellett. A disszociációs reakciók során a szabaddá váló Gd^{3+} -ion főként a $Gd(PO_4)$ oldhatatlan csapadék formájában van jelen, míg a felszabaduló DTPA-BMA ligandum a megfelelő Zn^{2+} -, Cu^{2+} - és Ca^{2+} -komplexekben található [134]. A közelmúltban *Silvio Aime és munkatársai* ICP-MS és UPLC-MS vizsgálatokkal tanulmányozták az Omniscan[®] és ProHance[®] MRI kontrasztanyagok alkalmazása során az élő szervezetben maradó Gd^{3+} -ion szervi megoszlását és speciációját. Az állatkísérletekben ismételt 0,6 mmol/kg dózisú injektálások után 8 héttel három Gd tartalmú részecskét tudtak megkülönböztetni agyszövetekben: *i)* intakt Gd^{3+} -komplex, *ii)* oldhatatlan Gd-tartalmú részecske és *iii)* makromolekuláris Gd-tartalmú részecske. Az eredmények alapján feltételezhető, hogy az oldhatatlan Gd-tartalmú részecske fő összetevője $Gd(PO_4)$, míg a makromolekuláris részecskében különböző fehérjék alakíthatnak ki kölcsönhatást Gd^{3+} -ionnal [155]. Ezen eredmények alapján mi is tanulmányoztuk az [Gd(DTPA-BMA)] (Omniscan[®]) komplexből felszabaduló szabad Gd^{3+} -ionok és a vérszérumban található fehérjék között

kialakuló kölcsönhatásokat. Mivel a [Gd(DTPA-BMA)] komplex disszociációja csak részlegesen játszódik le (~18%) egyensúlyban fiziológias feltételek mellett, vizsgálataink során figyelembe kell vennünk a viszonylag nagy mennyiségű intakt [[Gd(DTPA-BMA)]] komplex jelenlétét. A [Gd(DTPA-BMA)]-komplex disszociációja során felszabaduló Gd^{3+} -ionok és szérumfehérjék között kialakuló kölcsönhatások vizsgálatokhoz 2×5 ml (19 órán keresztül $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubált és inkubálás nélküli) Seronorm[®] (5 ml $0,025\text{ M NaHCO}_3$, $\text{pH}=7,4$) mintát készítettünk, amelyek 1 mM Omniscan-t ($1\text{ mM [Gd(DTPA-BMA)]}$ és $50\text{ }\mu\text{M Ca(DTPA-BMA)}$) tartalmaztak. Az első minta elkészítését követően az oldatban lévő szérumfehérjéket DEAE Trisakryl[®] anioncserélő gyantán UV spektrofotometriás követéssel (16. ábra) elválasztottuk. Ezzel szemben a második minta szérumfehérjéinek anioncserés elválasztására 19 óras $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történő inkubálás után került sor. A frakcionálás után a feltárt minták Gd-tartalmát ICP-OES módszerrel határoztuk meg. Az elválasztás során 4 különböző koncentrációjú puffert használtunk, így az elemanalízishez 4 mátrixillesztett kalibrációs sort készítettünk, úgy, hogy a kalibráló oldatokat a 7. táblázatban szereplő pufferekkel töltöttük fel, így 4 kalibrálás történt a mérés során. A Gd^{3+} elválasztott fehérjefrakciók közötti megoszlását az azonnal frakcionált és a 19 órán keresztül $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubált minták esetében a 25. és 26. ábrán tüntettük fel.

Humán vérszérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával



25. ábra A Gd³⁺ százalékos eloszlása az Omniscant[®] [Gd(DTPA-BMA)] tartalmazó vérszérum elválasztása során kapott fehérjefrakciókban inkubálás nélküli mintában * <math>< LOD</math>



26. ábra A Gd³⁺ százalékos eloszlása az Omniscan[®] [Gd(DTPA-BMA)] kontrasztanyaggal 19 órán és 37 °C-on inkubált vérszérum elválasztása során kapott fehérjefrakciókban * <math>< LOD</math>

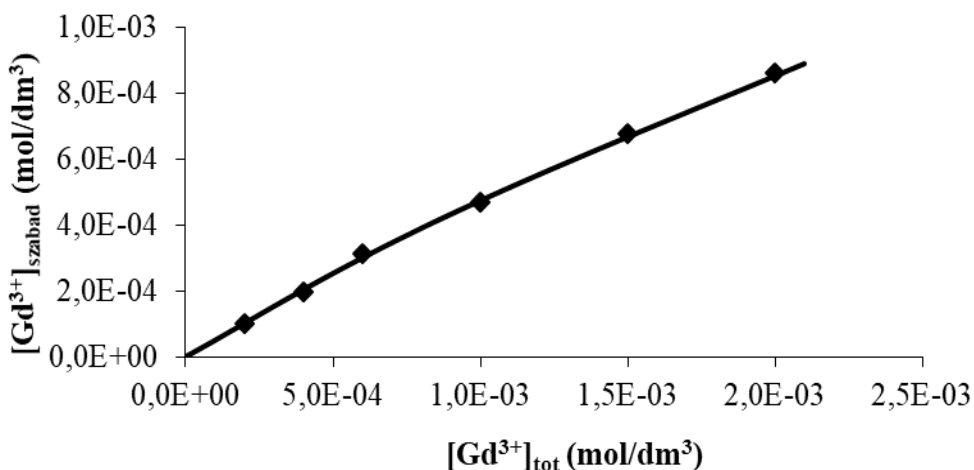
Az azonnal frakcionált minta esetében a Gd^{3+} -t szinte kizárólag az IgG fehérjefrakcióban figyeltük meg, míg a Trf, Alb és Cp frakcióban a Gd^{3+} mennyisége elhanyagolható volt. Ezzel szemben a 19 órán keresztül $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubált minta frakcionált szérumfehérjéinek elemvizelését követően azt tapasztaltuk, hogy a Gd^{3+} az IgG fehérjefrakcióban található a legnagyobb mennyiségben, míg az Alb és Cp frakciók Gd^{3+} -tartalma lényegesen meghaladja a nem inkubált minta azonos fehérje frakcióiban talált Gd^{3+} arányokat. Mivel a $[Gd(DTPA-BMA)]$ -komplex semleges fiziológiás feltételek mellett, a nagy mennyiségű Gd^{3+} az IgG frakcióban az intakt $[Gd(DTPA-BMA)]$ komplex és az IgG közös elúciójával értelmezhető a DEAE Trisakryl[®] anioncserélő gyanta és a neutrális $[Gd(DTPA-BMA)]$ komplex, valamint az IgG közötti gyenge (gyakorlatilag elhanyagolható) kölcsönhatásnak köszönhetően. Az első minta frakcionálása az elkészítését követően gyakorlatilag azonnal megtörtént, így a $[Gd(DTPA-BMA)]$ disszociációja nem jelentős a Gd^{3+} -komplex 9,3 órás disszociációs felezési idejének köszönhetően. Ezzel szemben a 19 órán keresztül $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on inkubált mintában a részecskeeloszlás egyensúlyi állapothoz közeli, ami jelentős mennyiségű $[Gd(DTPA-BMA)]$ disszociációjával jár együtt. Az inkubált mintában 19 óra elteltével csapadék képződését figyeltünk meg, amely feltételezhetően a *Baranyai és munkatársai* által korábban a $[Gd(DTPA-BMA)]$ viselkedését vizsgálva tapasztalt $Gd(PO_4)$ csapadék. Az inkubált minta frakcionálása során az Alb és Cp fehérje frakciókban talált Gd^{3+} mennyisége lényegesen meghaladja a nem inkubált minta azonos fehérjékben lévő Gd^{3+} mennyiségét, ami a $[Gd(DTPA-BMA)]$ disszociációjával keletkező Gd^{3+} -ionok és Alb, valamint Cp fehérjékkel kialakított kölcsönhatásával értelmezhető.

A $[Gd(DTPA-BMA)]$ disszociációjával felszabaduló Gd^{3+} -ionok és szérumfehérjék közötti kölcsönhatások vizsgálati rámutattak, hogy a vizsgált

Humán vérszérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával

fehérjék közül a Trf, Alb és Cp vehet részt a szabad Gd^{3+} koordinációjában. Az előzőleg bemutatott fehérjék és Gd^{3+} -ion közötti kölcsönhatás kialakulására vonatkozó adataink alátámasztására tanulmányoztuk a Gd^{3+} és a Humán Szérum Albumin (HSA) közötti kölcsönhatást.

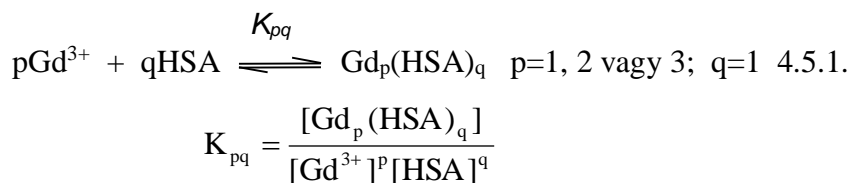
Vizsgálataink során 2 mL 1 mM HSA oldatot (pH=7,4; 0,025M $NaHCO_3$; 0,15 M $NaCl$, 25 °C) titráltuk 0,05 M $GdCl_3$ oldattal. A mintát Amicon® Ultra-2 (MERCK) ultraszűrővel szűrtük (3000 rpm, 4 °C) és centrifugálást követően <10 kD frakcióban meghatároztuk a fehérjéhez nem kötődő Gd^{3+} -ion koncentrációját ICP-OES technikával. A centrifugálást rövid ideig alkalmaztuk (1,5 perc), mivel az így nyert szűrlet (20 μ L) elválasztásával gyakorlatilag nem befolyásoltuk az eredeti minta összetételét. A minták <10 kD frakciójában ICP-OES módszerrel meghatározott szabad Gd^{3+} -ion koncentrációját a hozzáadott Gd^{3+} -ion koncentrációjának függvényében a 27. ábrán tüntettük fel.



27. ábra A szabad Gd^{3+} koncentrációja (\blacklozenge) a $[Gd^{3+}]_{tot}$ függvényében HSA jelenlétében. A szimbólumok és a görbe a mért és a számolt pontokat jelöli $Gd(HSA)$ és $Gd_3(HSA)$ komplexek képződésének feltételezésével.

[HSA]=1,0 mM, pH= 7,4; 0,025M $NaHCO_3$; 0,15 M $NaCl$,
25 °C)

A szabad Gd^{3+} -ion koncentrációja enyhe telítési görbe szerint változik a hozzáadott Gd^{3+} -koncentrációjának a függvényében. A $[Gd^{3+}]_{szabad}$ telítési görbe szerinti változása különböző összetételű $Gd_p(HSA)_q$ -komplexek képződésével értelmezhető. *Fogh-Andersen* közleményében beszámolt a $Ca(HSA)$ -komplexek képződéséről, amely alapján az albumin három Ca^{2+} -ionnal tud kölcsönhatást kialakítani, amelyek közül egy erősebben, míg kettő gyengébben kötődik a $Ca(HSA)$ -komplexek stabilitási állandói alapján ($Ca(HSA)$: $K_1=920 M^{-1}$; $Ca_2(HSA)$: $K_2=83 M^{-1}$; $Ca_3(HSA)$: $K_3=17 M^{-1}$) [156]. Ez alapján a kísérleti adatok értelmezéséhez három komplex lehetséges képződését feltételezzük. A $(Gd(HSA))$ -, $Gd_2(HSA)$ - és $Gd_3(HSA)$ -komplexek látszólagos stabilitási állandóit a 4.5.1 általános egyenlettel adhatjuk meg:



Figyelembe véve a $Gd(HSA)$ -, $Gd_2(HSA)$ - és $Gd_3(HSA)$ -komplexek képződését, a Gd^{3+} és HSA teljes koncentrációja a következő egyenletekkel adható meg:

$$[Gd^{3+}]_{tot} = [Gd^{3+}] + K_{11}[Gd^{3+}][HSA] + 2 \times \beta_{21}[Gd^{3+}]^2[HSA] + 3 \times \beta_{31}[Gd^{3+}]^3[HSA] \quad 4.5.2.$$

$$[HSA]_{tot} = [HSA] + K_{11}[Gd^{3+}][HSA] + \beta_{21}[Gd^{3+}]^2[HSA] + \beta_{31}[Gd^{3+}]^3[HSA] \quad 4.5.3.$$

$$[HSA] = [HSA]_{tot} / (1 + K_{11}[Gd^{3+}] + \beta_{21}[Gd^{3+}]^2 + \beta_{31}[Gd^{3+}]^3)$$

ahol $\beta_{21}=K_{11} \times K_{21}$, $\beta_{31}=K_{11} \times K_{21} \times K_{31}$, míg a $[Gd^{3+}]$ és $[HSA]$ a szabad Gd^{3+} -ion és HSA koncentrációját jelöli. A 4.5.2 és 4.5.3 egyenletek egyesítésével a 4.5.4 egyenlethez jutunk.

Humán vérszérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával

$$[\text{Gd}^{3+}]_{\text{tot}} = [\text{Gd}^{3+}] + \frac{(\text{K}_{11}[\text{Gd}^{3+}] + 2\beta_{21}[\text{Gd}^{3+}]^2 + 3\beta_{31}[\text{Gd}^{3+}]^3)[\text{HSA}]_{\text{tot}}}{1 + \text{K}_{11}[\text{Gd}^{3+}] + \beta_{21}[\text{Gd}^{3+}]^2 + \beta_{31}[\text{Gd}^{3+}]^3}$$

4.5.4.

A mérési adatokat (26. ábra) a 4.5.4 egyenlethez illesztve kísérletet tettünk a Gd(HSA)-, Gd₂(HSA)- és Gd₃(HSA)-komplexek látszólagos stabilitási állandóinak meghatározására (17. táblázat).

17. táblázat Gd(HSA)-, Gd₂(HSA)- és Gd₃(HSA)-komplexek látszólagos stabilitási állandóinak értékei

	$K_{11} (\text{M}^{-1})$	$\beta_{21} (\text{M}^{-2})$	$\beta_{31} (\text{M}^{-3})$	Szórásnégyzet
1	$(3\pm 1)\times 10^3$	-	-	2,88E-07
2	$(2\pm 2)\times 10^2$	$(1,6\pm 0,1)\times 10^3$	-	1,02E-08
3	$(1,04\pm 0,07)\times 10^3$	-	$(1,06\pm 0,03)\times 10^9$	1,40E-09
4	$(1,0\pm 0,2)\times 10^3$	$(6\pm 39)\times 10^4$	$(1,0\pm 0,3)\times 10^9$	1,39E-09

A modellszámítások során különböző kombinációkban becsültük meg a stabilitási állandók értékét. Ha csak az 1:1 komplex látszólagos stabilitási állandóját (K_{11}) illesztettük (17. táblázat 1. sor), akkor a szórásnégyzet értéke túl nagyknak bizonyult, valamint a mért és számított adatokban szisztematikus eltérés mutatkozott. Ennek alapján feltételezhető további Gd³⁺-ion(ok) kötődése a HSA molekulához. Ha a 2:1 komplexet is figyelembe vettük (17. táblázat 2. sor) az illesztések során akkor azt tapasztaltuk, hogy a szórásnégyzet értéke javult, de az 1:1 komplexre jellemző stabilitási állandó értéke összemérhető volt a hibájával ($(K_{11}=2\pm 2)\times 10^2$). Azonban, ha az 1:1 és 3:1 komplex jelenlétével számoltunk (17. táblázat 3. sor), akkor a szórás értéke tovább javult és az így kapott adatoknak (K_{11} és a β_{31}) már elfogadható a hibája. Tehát statisztikailag ez tekinthető a legjobb modellnek az ICP-OES technikával meghatározott adatok leírására. Mind a három állandó együttesen

történő illesztésével szintén csak K_{11} és a β_{31} állandót sikerült számolnunk, mivel a β_{21} látszólagos stabilitási szorzat hibája rendkívül nagyra adódott (17. táblázat 4. sor). Nem zárható ki, hogy csakis 1:1 és 3:1 összetételű Gd – HSA komplexek képződnek, ennek igazolása azonban a rendszer más módszerekkel történő részletes vizsgálatát teszi szükségessé, ami nem képezi jelen értekezés tárgyát.

Vizsgálataink eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy a Gd^{3+} -ion kölcsönhatást alakíthat ki szérumfehérjékkal. Ennek megfelelően az MRI kontrasztanyagként alkalmazott Gd^{3+} -komplexek disszociációjával szabaddá váló Gd^{3+} -ionok komplexet képezhetnek szérumfehérjékkal, amelyek aktív és passzív transzport folyamatok keresztül felhalmozódhatnak különböző szövetekben (máj, lép, vese és agy). Azonban a Gd^{3+} -fehérje komplexek klinikai jelentőségét és toxicitását továbbra is vitatják és további vizsgálatokat javasolnak a Gd^{3+} -ionok agyban és más szövetekben történő felhalmozódásának megállapítására [157], [158].

5. Összefoglalás

Doktori munkám során humán vérszérumminták elemösszetételének mennyiségi meghatározására dolgoztunk ki költséghatékony módszereket. Ehhez egy új elemanalitikai eszköz, a mikrohullámú plazma atomemissziós spektrométer optimalizálását végeztük el humán vérszérum elemösszetételének meghatározására modell oldatok felhasználásával, figyelembe véve a mintában lévő Na-koncentráció esetleges zavaró hatását. Ezen eredményeket felhasználva valós autoimmunbeteg (SLE, SS) vérszérumminták elemtartalmát vizsgáltuk kontroll szérummintákkal összehasonlítva, mely eredmények alapján fehérjespeciációs kísérletet készítettünk a fehérje-fém kötés megismerésére az SLE, SS és kontroll csoportok között egy speciális fehérjeelválasztó gyanta DEAE-Trisacryl[®] M segítségével. Egy, a Mágneses Rezonancia Képkalkotásban használt kontrasztanyag viselkedését is tanulmányoztuk humán vérszérumban (Seronom[®]), ahol a [Gd(DTPA-BMA)]-komplex disszociációja során felszabaduló Gd³⁺-ion fehérjefrakciók közötti megoszlását vizsgáltuk ICP-OES módszerrel.

A MP-AES készülék optimalizálása során elvégeztük a MgII 280,271 nm / MgI 285,213 nm atom- és ionvonalára a robusztusság vizsgálatát. Ezzel az eljárással teszteljük, hogy az adott műszer alkalmas-e az általunk kiválasztott feladatra, ha a mérés körülményeit kis mértékben változtatjuk. Az MP-expert szoftverben két paraméter (porlasztógáz nyomása és a kiolvasási idő) állítható, így ezek változtatásával határoztuk meg a robusztusságot. Azt tapasztaltuk, hogy a kiolvasási idő nem befolyásolja a mérést, míg a porlasztógáz nyomása a szoftverben beállítható legnagyobb 240 kPa értéknél a legmegfelelőbb. A nátriumot tartalmazó és nem tartalmazó minták esetében kapott MgII 280,271 nm / MgI 285,213 nm arány statisztikailag nem különbözött egymástól. A MgII 280,271 nm / MgI 285,213 nm arány ICP-OES technika robusztusság

vizsgálata során 8-14 tartományba esik, ezzel ellentétben a kísérleteink során MP-AES-nél 0,5-1,0 közötti tartományba eső értéket kaptunk Ennek oka az, hogy az ICP-OES technikákhoz képest a MP-AES plazma hőmérséklete és elektronsűrűsége eltérő, ezáltal nem mérhető össze a MP robusztusság arányának konkrét értéktartománya az ICP-OES módszernél várttal.

A könnyen ionizálódó elemek mátrixhatását már évtizedekkel ezelőtt felfedezték az atomspektrometria területén, azonban az új mikrohullámú plazma készüléknél még ez nem teljesen ismert. Ezért optimalizálási kísérleteket végeztünk hat, a vérérszumban található esszenciális elemre (K, Ca, Mg, Cu, Zn és Fe), ahol nagy nátriumkoncentráció mellett tanulmányoztuk a mért analitikai jel változását *Varbanova és munkatársai* által kidolgozott tűrési módszere alapján. A vizsgálat során azt tapasztaltuk, hogy a Mg és Zn esetében nem kell számolnunk a Na mátrixhatásával, viszont a másik négy elem jelére statisztikailag megkülönböztethető hatással volt a nagy koncentrációban jelenlévő nátrium.

Mátrixhatás vizsgálatokat végeztünk a könnyen ionizálódó nátriumra nézve. Egy teljes faktoriális tervet készítettünk, ahol modelloldatok segítségével a vérérszumbmintákban jelenlévő Na-koncentráció hatását tanulmányoztuk szintén hat, a szérumban esszenciálisan megtalálható elemre (K, Ca, Mg, Cu, Zn és Fe) nézve. A kalcium, réz és vas esetében szignifikáns különbséget, míg a cinkre, magnéziumra és káliumra vonatkozólag kereszthatást állapítottunk meg. Ezt követően egy hatásvizsgálatot készítettünk, ahol a nátrium növekvő koncentrációjának befolyását tanulmányoztuk szintén a hat elem analitikai jelére nézve, mellyel az előző kísérlet eredményeit sikerült alátámasztanunk. A vizsgált elemek különböző Na-koncentráció mellett mért intenzitásainak a százalékos eltolódását határoztuk meg a centrum Na-koncentráció (400 mg/l) mellett kapott

Humán vérszérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával

intenzitásukhoz képest. Megállapítottuk, hogy a relatív különbség kisebb, mint 10%-nak adódott a hat elemnél.

Összehasonlító elemzést végeztünk ICP-OES készülékkel, vizsgáltuk a nátrium növekvő koncentrációjának hatását szintén a hat elem jelére nézve. Ekkor is szignifikáns jelnövekedést tapasztaltunk, azonban ez kisebb mértékű, mint a mikrohullámú plazmánál kapott eltérés.

A modelloldatok mérése során a háttérrel is meghatároztuk, ami a teljes elemzésnél mind a hat elemnél állandónak bizonyult. A két vizsgálat (teljes faktoriális terv, hatásvizsgálat) alátámasztására egy nátrium-kálium zavaróhatás kísérletet is elvégeztünk, ahol két elem egymás analitikai jelére gyakorolt hatását térképeztük fel azonos koncentráció mellett. A mérésekből azt a következtetést vontuk le, hogy a két elem kismértékű hatással van egymás intenzitására. A könnyen ionizálódó elemek mátrixhatásának kiküszöbölésére CsCl ionizációs puffert adagoltunk különböző koncentrációban a modelloldatokhoz és azt tapasztaltuk, hogy az 1,0 és 2,0 g/l koncentráció megterhelte a nitrogén plazmát, így 0,1 g/l CsCl alkalmazása a megfelelő.

Összevetettük a kísérletek során alkalmazott mátrixillesztett standardsor intenzitását az illesztés nélkülihez képest, ahol azt tapasztaltuk, hogy a Fe, Mg és Zn esetén nem változott, a Cu intenzitása 10 %-al, a Ca és a K intenzitása 20 %-al növekedett.

Az MP-AES készülék alkalmazhatóságát humán vérszérumminták elemanalízisére Seronorm[®] (Human LOT 1512606) liofilizált vérszérummal is ellenőriztük. A hat elem: Ca-, K-, Mg-, Cu-, Zn- és Fe-koncentrációjának visszanyerését mátrixillesztett kalibrálással és anélkül is elvégeztük, mindkét esetben jó egyezést tapasztaltunk az irodalmi értékekkel.

A modellkísérlet eredményeit figyelembe véve autoimmun betegektől származó vérszérumminták Ca, K, Mg, Cu, Zn és Fe elemzése során nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a kontroll csoporthoz képest a Mg- és

Fe-koncentrációk esetében. Ugyanakkor a Ca-koncentráció és a K-koncentráció szignifikánsan csökkent a betegek esetében a kontroll csoporthoz képest. A Zn-tartalom szignifikánsan csökkent, míg a Cu-tartalom szignifikánsan nőtt az autoimmun beteg mintákban. Az SLE és SS betegségek között a cinkkoncentráció értékének csökkenése és a réz koncentrációjának növekedése között összefüggést találtunk. A két nyomelem között a farmakológiából ismert kompetitív antagonizmus jelentkezett [107], [108], [146]. Továbbá a három csoport (SLE, SS, kontroll) koncentráció értékeit összevetettük *Yilmaz és munkatársai* eredményeivel, ahol az általuk vizsgált négy elemre vonatkozóan (Mg, Fe, Cu, Zn) jó egyezést kaptunk.

További kísérleteket végeztünk a hat elem fehérje-fém kötődésének tanulmányozására. Egy fehérjék elválasztására alkalmazható anioncserélő oszlopon kontroll mintákkal háromféle roncsolási technikát vetettünk össze, hogy kiválasszuk a legmegfelelőbb minta-előkészítést. Kéttényezős varianciaanalízis során nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a három technika között. Valamint tovább ellenőriztük a roncsolások hatékonyságát Li belső standardot használva, ahol sikerült a hozzáadott Li mennyiséget minden egyes frakcióban elfogadási kritériumon belül visszamérnünk. Így ez a kísérlet is alátámasztotta, hogy a háromféle roncsolás között alapvető különbség nincs, ebből kifolyólag a minták nagy száma miatt az atmoszférikus roncsolást alkalmaztuk.

A kontroll, SLE és SS csoportok frakcionált fehérjéinek 3 makro- (Ca, K, Mg) és 2 mikroelemtartalmát (Cu, Zn) határoztuk meg. A Mg megoszlásában a fehérje frakciók között kis eltérést tapasztaltunk a három csoport között. A kontroll csoportban főleg az IgG-ben dúsul és kisebb mennyiségben található az Alb-ban. Az SS és SLE mintákban az IgG frakcióban a legnagyobb a mennyisége, viszont megjelent a Trf és Cp fehérje frakcióban is ez az elem. A K és Ca legnagyobb mennyiségben szintén az IgG

Humán vérszérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával

frakcióban van jelen a kontroll csoportban. Azonban a K-koncentrációban szignifikáns eltérés tapasztalható az SS és a kontroll csoport között. Az SS Trf fehérjefrakciója nagyobb mennyiségben tartalmazza a káliumot a kontroll csoporthoz képest, ugyanezt az SLE mintáknál nem tapasztaltuk. A kontroll csoport esetén a cink csak az albumin fehérjéhez kötődik, viszont az SS és az SLE csoportoknál tapasztaltuk, hogy az IgG és Cp fehérjékben nőtt, ezzel párhuzamosan az albuminban csökkent a koncentrációja ennek az elemnek. A réz a kontroll csoportban a legnagyobb mennyiségben a Cp fehérjéhez kötődött, viszont az SS és SLE minták Cp frakcióban koncentráció csökkenést tapasztaltunk, míg az Alb fehérjefrakciókban megnőtt a réz mennyisége. A szakirodalomban már beszámoltak arról, hogy az albuminnak vannak réz kötő tulajdonságai is, ezért tapasztalataink alapján arra következtethetünk, hogy az SS és SLE vérszérummintákban az albumin cinktartalmának csökkenése a réz koncentrációjának növekedésével jár. Mindez az irodalmi adatokkal összhangban alátámasztja a cink-réz cseréjét a két autoimmun betegség esetén.

A [Gd(DTPA-BMA)] (Omniscan[®]) komplexből disszociációval felszabaduló Gd³⁺-ionok és a vérszérumban található fehérjék között kialakuló kölcsönhatások tanulmányozása során két kísérletet végeztünk. Az azonnal frakcionált minta esetében a Gd³⁺-iont szinte kizárólag az IgG fehérjefrakcióban figyeltük meg, míg a Trf, Alb és Cp frakcióban a Gd³⁺ mennyisége elhanyagolható volt. Ezzel szemben a 19 órán keresztül 37°C-on inkubált minta frakcionált szérumfehérjéinek elemvizelését követően azt tapasztaltuk, hogy a Gd³⁺ az IgG fehérjefrakcióban található a legnagyobb mennyiségben, míg az Alb és Cp frakciók Gd³⁺-tartalma lényegesen meghaladja a nem inkubált minta azonos fehérje frakcióiban talált Gd³⁺ mennyiségét. Mivel a [Gd(DTPA-BMA)]-komplex semleges töltésű fiziológiás feltételek mellett, így a nagy mennyiségű Gd³⁺ az IgG frakcióban az intakt [Gd(DTPA-BMA)] komplex és az IgG közös elúciójával

értelmezhető a DEAE Trisakryl® anioncserélő gyanta és a semleges töltésű [Gd(DTPA-BMA)] komplex, valamint IgG közötti gyenge (gyakorlatilag elhanyagolható) kölcsönhatásnak köszönhetően. Az inkubált minta frakcionálása során az Alb és Cp fehérje frakciókban talált Gd³⁺ mennyisége lényegesen meghaladja a nem inkubált minta azonos fehérjékben lévő Gd³⁺ mennyiségét, ami a [Gd(DTPA-BMA)] disszociációjával keletkező Gd³⁺-ionok és Alb, valamint Cp fehérjével kialakított kölcsönhatásával értelmezhető.

A Gd³⁺-ion és HSA között kialakuló kölcsönhatást ultraszűrési vizsgálatokkal tanulmányoztuk. A kapott adatokat alapján feltételezhető a Gd(HSA)-, Gd₂(HSA)- és Gd₃(HSA)-komplexek képződése, amelyek lépcsőzetesen alakulnak ki az első, a második és harmadik Gd³⁺-ion HSA-hoz való koordinációjával. A mérési adatokat illesztve számítottuk Gd(HSA)-, Gd₂(HSA)- és Gd₃(HSA)-komplexek látszólagos stabilitási állandóit (pH=7,4, 0,025 M NaHCO₃, 0,15 M NaCl, 25°C). Modell számításokkal igazoltuk, hogy statisztikailag az 1:1 és 3:1 komplex feltételezésével sikerült legjobban leírunk az ICP-OES technikával kapott adatokat, míg a 2:1 komplex látszólagos stabilitási szorzatát nem tudtuk meghatározni. A Gd(HSA)- és Gd₃(HSA)-komplexek számított látszólagos stabilitási állandója és szorzata $K_{11}=1040\pm 70 \text{ M}^{-1}$, $\beta_{31}=(1,06\pm 0,03)\times 10^9 \text{ M}^{-3}$ adódott. Vizsgálataink eredményei alátámasztják a Gd³⁺-ion és szérumfehérjék között kialakuló kölcsönhatásokat. Továbbá ezek alapján következtethetünk arra, hogy a Gd³⁺-komplexek disszociációjával szabaddá váló Gd³⁺-ionok komplexet képezhetnek szérumfehérjékkel, amelyek aktív és passzív transzport folyamatokon keresztül felhalmozódhatnak különböző szövetekben.

A dolgozatomban foglalt alapkutatási eredmények az elemanalitikai vizsgálatok fontosságát bizonyítják az orvosdiagnosztikai tanulmányokban, és

Humán vérszérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával

költséghatékony alternatívákat mutatnak be, melyek könnyen adaptálhatóak leíró és összehasonlító jellegű kísérletes munkákhoz.

6. Summary

In my thesis, we developed cost-effective methods for quantifying the elemental composition of human blood serum samples. For this purpose, a new elemental analysis device, the microwave plasma atomic emission spectrometer was used to determine the elemental composition of human blood serum using model solutions, taking into account the potential interference of high Na concentrations in the sample. Using these results, we further analyzed the elemental content of real autoimmune disease (SLE, SS) serum samples in comparison to control serum samples, which resulted in a protein-specific binding assay for SLE, SS and control groups using a special protein-separating resin DEAE-Trisacryl® M. The behaviour of a contrast agent used in Magnetic Resonance Imaging in human blood serum (Seronorm®) was also studied, and the distribution of Gd³⁺-ion protein fractions released during the dissociation of the [Gd(DTPA-BMA)] complex was investigated by ICP-OES.

During the optimization of the MP-AES device, the robustness test was performed for the atomic and ionic lines of MgII 280.271 nm / MgI 285.213 nm. This procedure is used to test whether a given instrument is suitable for the selected task if the measurement conditions are changed slightly. In the MP-expert software two parameters can be adjusted (nebulizer pressure and read time) so by changing these we determined the robustness. It has been found that the read time does not affect the measurement, while the nebulizer pressure is most suitable at the maximum setting of 240 kPa in the software. The ratio of MgII 280.271 nm / MgI 285.213 nm obtained for the samples with and without sodium was not statistically different. The MgII 280.271 nm / MgI 285.213 nm ratio ranges from 8 to 14 in the ICP-OES robustness assay, in contrast to the MP-AES range of 0.5 to 1.0. The reason for this is the different plasma temperature and electron density compared to the ICP-OES method.

The matrix effect of easy ionization elements has been discovered for decades in the field of atomic spectrometry, but this is not fully described in the new microwave plasma devices, therefore optimization experiments have been performed on the six essential elements (K, Ca, Mg, Cu, Zn and Fe). At high sodium concentrations, we studied the change in the analytical signal measured using the tolerance method developed by Varbanova et al. During the examination we found that in the case of Mg and Zn, we did not have to take into account the matrix effect of Na, but the high concentration of sodium was statistically distinguishable for the other four elements.

Matrix effect studies were performed on the easily ionized elements EIEs (sodium). A complete factorial design was made where model solutions were investigated, and the effect of high Na concentration was explored on the six essential elements (K, Ca, Mg, Cu, Zn and Fe) in the serum. Significant differences were found for calcium, copper and iron, while interaction was found for zinc, magnesium and potassium. Subsequently, an impact study was performed where the effect of increasing sodium concentration was also studied on the analytical signal of the six elements. This study supported the results of the previous experiments. The offsets of the intensity of the test elements at different Na concentrations were determined relative to the intensities obtained at the center Na concentration (400 mg L^{-1}). The relative difference was found to be less than 10% for the six elements. During the measurement of the model solutions the background was also determined which proved to be constant for all six elements throughout the analysis. To support the two studies (complete factorial design, impact study) we also performed a sodium-potassium interference study where the effect of two elements on each other's analytical signal was mapped at the same concentration. From the measurements we concluded that the two elements have a small effect on each other's intensity. To eliminate the matrix effect of

the easy ionization element, CsCl ionization buffer was added at various concentrations to the model solutions and it was found that concentrations of 1.0 and 2.0 g L⁻¹ loaded the nitrogen plasma thus 0.1 g L⁻¹ CsCl proved to be appropriate.

Considering the results of the model experiment the Ca, K, Mg, Cu, Zn and Fe analysis of serum samples from autoimmune patients showed no significant difference in the Mg and Fe concentrations compared to the control group. However, Ca and K concentrations were significantly reduced in patients compared to controls. The Zn content decreased while the Cu content increased significantly in autoimmune patient samples. There was a correlation between the decrease in zinc concentration and the increase in copper concentration in SLE and SS diseases: a competitive antagonism was found between the two trace elements known from pharmacology. Furthermore, the concentration values of the three groups (SLE, SS, control) were compared with the results of Yilmaz et al. and good agreement was found for the four elements (Mg, Fe, Cu, Zn) they tested.

Further experiments were carried out to study the protein-metal binding of the six elements. The proteins were separated on anion exchange columns using control samples. Three types of digestion techniques were compared to select the most appropriate sample preparation method. In the two-factor analysis of variance no significant difference was found between the three techniques. Furthermore, the efficiency of the digestions was further tested using the Li internal standard where we were able to measure the added amount of Li in each fraction.

So, this experiment also confirmed that there is no fundamental difference between the three types of digestion and because of the large number of samples the atmospheric digestion was used. Fractional proteins of the control, SLE and SS groups were determined with 3 macro (Ca, K, Mg)

and 2 trace elements (Cu, Zn). There was a slight difference in the distribution of Mg between the protein fractions of the three groups. In the control group, this element is predominantly enriched in IgG and to a lesser extent in Alb. In the SS and SLE samples the highest amount was found in the IgG fraction but it was also present in the Trf and Cp protein fractions. K and Ca are also present in the highest proportions in the IgG fraction in the control group. However, there was a significant difference in the K concentrations between the SS and the control group. The protein fraction of SS Trf contains higher amounts of potassium compared to the control group which was not the case in SLE samples. In the control group zinc only binds to albumin protein whereas in the SS and SLE groups it was found to be increased in IgG and Cp with a parallel decrease in albumin. Copper binds to Cp protein in the control group but SS and SLE samples showed decreased concentration in Cp whereas Alb protein fractions increased copper. It has already been reported in the literature that albumin also has copper binding properties and our experience suggests that decreasing the zinc content of albumin in serum samples of SS and SLE results in an increase in copper concentration. In line with the literature, this supports the exchange of zinc-copper in the two autoimmune diseases.

Two experiments were performed to study the interaction between the Gd^{3+} ions released from the [Gd (DTPA-BMA)] (Omniscan[®]) complex and the proteins in the serum. In the immediately fractionated sample, the Gd^{3+} ion was observed almost exclusively in the IgG protein fraction whereas the amount of Gd^{3+} was negligible in the Trf, Alb and Cp fractions. In contrast, it was found to be the highest in the IgG protein fraction of fractionated serum proteins incubated for 19 hours at 37 °C, whereas Gd^{3+} concentration was significantly higher in the Alb and Cp fractions than in the same protein fractions of the unincubated sample. Since the charge of the [Gd(DTPA-BMA)] complex is neutral under physiological conditions the combined elution of the large

amount of Gd^{3+} in the IgG fraction with the intact [Gd(DTPA-BMA)] complex and IgG can interpret the DEAE Trisakryl[®] anion exchange resin as well as due to the weak interaction (virtually negligible) between the neutral charged [Gd(DTPA-BMA)] complex and IgG. During fractionation of the incubated sample, the amount of Gd^{3+} found in the Alb and Cp protein fractions is significantly higher than in the same proteins of the unincubated sample.

The interaction between Gd^{3+} ion and HSA was studied by using ultrafiltration assays. Based on the results, the stepwise formation of Gd(HSA), Gd_2 (HSA) and Gd_3 (HSA) complexes with HSA is assumed. The apparent stability constants of the Gd(HSA) -, Gd_2 (HSA) - and Gd_3 (HSA) complexes (pH 7.4, 0.025 M $NaHCO_3$, 0.15 M $NaCl$, 25 °C) were calculated by fitting the experimental data. According to the model calculations, the model postulating the formation the 1:1 and 3:1 complexes gave statistically the best interpretation of the data obtained by the ICP-OES technique. The apparent stability product of the 2:1 complex could not be determined. The calculated apparent stability constant and product of the Gd(HSA) and Gd_3 (HSA) complexes were $K_{11}=1040\pm 70 M^{-1}$, $\beta_{31}=(1,06\pm 0,03)\times 10^9 M^{-3}$. The results of our study support the interaction between Gd^{3+} and serum proteins.

Furthermore, it can be concluded that Gd^{3+} ions released by dissociation of diagnostic Gd^{3+} complexes may complex with serum proteins, which may accumulate in different tissues through active and passive transport processes.

The basic research results presented in my dissertation prove the importance of elemental analysis in medical diagnostic studies and present cost-effective alternatives that are easily adaptable to descriptive and comparative experimental work.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek *Dr. Fábíán István professzor úrnak* a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék volt vezetőjének és egyetemi tanárának, hogy értékes, minőségi és sokoldalú szakmai segítséget nyújtott illetve, hogy a kutatásomhoz a szükséges feltételeket biztosította.

Köszönetet mondok *Dr. Baranyai Edinának*, a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék adjunktusának, a Novo-Lab Partnerlabor vezetőjének, hogy BSc korom óta kísérte és segítette pályafutásomat, hozzájárult ahhoz, hogy az alkalmazott módszereket elsajátíthattam, továbbá köszönöm türelmét és támogatását, melyet munkám során mindvégig nyújtott.

Köszönöm *Dr. Zeher Margit[†]* egyetemi tanárnak, a Debreceni Egyetem Klinikai Immunológiai Tanszék volt tanszékvezetőjének, *Dr. Tarr Tünde* a Debreceni Egyetem Klinikai Immunológiai Tanszék adjunktusának és *Dr. Csípő István* a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézet tudományos főmunkatársának, valamint az egészséges és a betegséget hordozó személyeknek a kutatásom alapjául szolgáló vérszérumminták rendelkezésemre bocsájtását.

Köszönetet mondok *Dr. Posta József professzor úrnak* volt témavezetőmnek, aki elindított ezen a pályán és segítette szakmai előre haladásomat.

Köszönet illeti *Dr. Baranyai Zsoltot* a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék adjunktusát, aki által lehetőségem volt megismerni és beletanulni a Ritka(föld)fém kutatócsoport munkájába. Itt szeretnék továbbá köszönetet mondani *Dr. Vágner Adriennek* és *Dr. Forgács Attilának* a kontrasztanyagok kísérletsorozatban nyújtott segítségükért.

Köszönöm *Dr. Gáspár Attila* a Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék tanszékvezetőjének és egyetemi tanárának, az Analitikai Csoport vezetőjének, szakmai segítségét.

Köszönettel tartozom *Dr. Braun Mihálynak* a Hertelendi Ede Környezetanalitikai Laboratórium tudományos főmunkatársának a statisztikában nyújtott segítségéért.

Köszönetemet fejezem ki a Novo-Lab Kft. volt ügyvezetőjének, *Dr. Gáspár Istvánnak* és mostani ügyvezetőjének *Radvánszky Katalinnak*, hogy a partnerlabor munkatársaként a munkám során alkalmazott készülékeket a rendelkezésemre bocsájtották. Továbbá köszönöm a cég valamennyi munkatársának a szakmai segítségnyújtást.

Köszönettel tartozom *Nagyné Dombi Gizellának*, hogy a doktori ügyeim szervezésével és egyéb adminisztratív ügyekkel kapcsolatban mindig fordulhattam hozzá.

Köszönet illeti továbbá a D423-as Novo-Lab Partnerlabor valamennyi volt és jelenlegi dolgozóját. Különös tekintettel szeretném megköszönni *Harangi Sándornak* és *Vári Juditnak* türelmüket, szakmai és baráti támogatásukat.

Köszönöm a gyakorlati munkában való segítségüket a *szakdolgozó* és *diplomamunkás hallgatóknak* valamint *Herman Petra* és *Sajtos Zsófi PhD hallgatóknak*.

Végül, de nem utolsó sorban rendkívül hálás vagyok *Szüleimnek*, *Testvéremnek* és *Páromnak*, akik az évek során lelki támogatásukkal és végtelen türelemmel mindvégig mellettem álltak. Bízgatásuk nélkül jelen dolgozat nem készülhetett volna el.

„A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú „Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program” című

Humán vérszérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával

kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.”

A kutatás a GINOP-2.3.2-15-2016-00008 számú projekt keretében, az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.

7. Irodalomjegyzék

- [1] B. Alberts, Ed., *Molecular biology of the cell*, 4th ed. New York: Garland Science, 2002.
- [2] S. M. Rapoport, *A vér*. Budapest: Medicina Könyvkiadó, 1966.
- [3] G. Vidarsson, G. Dekkers, and T. Rispen, "IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions," *Front. Immunol.*, vol. 5, Oct. 2014.
- [4] L. Wu, J. Wu, J. Zhang, Y. Zhou, G. Ren, and Y. Hu, "A simple method for obtaining transferrins from human plasma and porcine serum: Preparations and properties," *J. Chromatogr. B*, vol. 867, no. 1, pp. 62–68, May 2008.
- [5] Z. M. Qian, H. Li, H. Sun, and K. Ho, "Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway," *Pharmacol. Rev.*, vol. 54, no. 4, pp. 561–587, Dec. 2002.
- [6] X. M. He and D. C. Carter, "Atomic structure and chemistry of human serum albumin," *Nature*, vol. 358, no. 6383, pp. 209–215, Jul. 1992.
- [7] A. Almogren, P. B. Furtado, Z. Sun, S. J. Perkins, and M. A. Kerr, "Purification, Properties and Extended Solution Structure of the Complex Formed between Human Immunoglobulin A1 and Human Serum Albumin by Scattering and Ultracentrifugation," *J. Mol. Biol.*, vol. 356, no. 2, pp. 413–431, Feb. 2006.
- [8] A. Senra Varela, J. J. Lopez Saez, and D. Quintela Senra, "Serum ceruloplasmin as a diagnostic marker of cancer," *Cancer Lett.*, vol. 121, no. 2, pp. 139–145, Dec. 1997.
- [9] P. Gergely, F. Erdődi, and G. Vereb, *Általános és bioszervetlen kémia: egyetemi tankönyv*. Budapest: Semmelweis Kiadó, 2005.
- [10] E. Altekin, C. Çoker, A. R. Şişman, B. Önvural, F. Kuralay, and Ö. Kırımlı, "The relationship between trace elements and cardiac markers in acute coronary syndromes," *J. Trace Elem. Med. Biol.*, vol. 18, no. 3, pp. 235–242, May 2005.
- [11] A. Reunanen, P. Knekt, J. Marniemi, J. Mäki, J. Maatela, and A. Aromaa, "Serum calcium, magnesium, copper and zinc and risk of cardiovascular death," *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 50, no. 7, pp. 431–437, Jul. 1996.
- [12] Q. Pasha, S. A. Malik, N. Shaheen, and M. H. Shah, "Investigation of trace metals in the blood plasma and scalp hair of gastrointestinal cancer patients in comparison with controls," *Clin. Chim. Acta*, vol. 411, no. 7–8, pp. 531–539, Apr. 2010.
- [13] E. A. Hernández-Caraballo and L. M. Marcó-Parra, "Direct analysis of blood serum by total reflection X-ray fluorescence spectrometry and application of an artificial neural network approach for cancer diagnosis," *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, vol. 58, no. 12, pp. 2205–2213, Dec. 2003.
- [14] L. J. Beilin, G. J. Knight, A. D. Munro-Faure, and J. Anderson, "The measurement of sodium concentration in human red blood cells," *J. Gen. Physiol.*, vol. 50, no. 1, pp. 61–74, Sep. 1966.
- [15] G. Lippi, G. Luca Salvagno, M. Montagnana, G. Brocco, and G. Cesare Guidi, "Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing," *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM*, vol. 44, no. 3, Jan. 2006.
- [16] Y. Imafuku *et al.*, "The effect of EDTA contaminated in sera on laboratory data," *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.*, vol. 325, no. 1–2, pp. 105–111, Nov. 2002.
- [17] P. Frisk, P. Ola Darnerud, G. Friman, J. Blomberg, and N.-G. Ilbäck, "Sequential trace element changes in serum and blood during a common viral infection in mice," *J. Trace Elem. Med. Biol.*, vol. 21, no. 1, pp. 29–36, Mar. 2007.
- [18] R. Witholt, R. H. Gwiazda, and D. R. Smith, "The neurobehavioral effects of subchronic manganese exposure in the presence and absence of pre-parkinsonism," *Neurotoxicol. Teratol.*, vol. 22, no. 6, pp. 851–861, Dec. 2000.
- [19] M. N. Rashed, "The role of trace elements on hepatitis virus infections: A review," *J. Trace Elem. Med. Biol.*, vol. 25, no. 3, pp. 181–187, Jul. 2011.
- [20] M. Molaschi, M. Ponzetto, B. Bertacna, E. Berrino, and E. Ferrario, "Determination of selected trace elements in patients affected by dementia," *Arch. Gerontol. Geriatr.*, vol. 22, pp. 39–42, Jan. 1996.
- [21] S. Urushidate *et al.*, "Association between concentration of trace elements in serum and bronchial asthma among Japanese general population," *J. Trace Elem. Med. Biol.*, vol. 24, no. 4, pp. 236–242, Oct. 2010.

Humán vérszérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával

- [22] A.-N. Richarz and P. Brätter, "Speciation analysis of trace elements in the brains of individuals with Alzheimer's disease with special emphasis on metallothioneins," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 372, no. 3, pp. 412–417, Feb. 2002.
- [23] K. Gellein *et al.*, "Separation of proteins including metallothionein in cerebrospinal fluid by size exclusion HPLC and determination of trace elements by HR-ICP-MS," *Brain Res.*, vol. 1174, pp. 136–142, Oct. 2007.
- [24] H. Zhai, X. Chen, and Z. Hu, "Study on the relationship between intake of trace elements and breast cancer mortality with chemometric methods," *Comput. Biol. Chem.*, vol. 27, no. 6, pp. 581–586, Dec. 2003.
- [25] J. Versieck and R. Cornelis, *Trace elements in human plasma or serum*. Boca Raton, Fla: CRC Press, 1989.
- [26] Burger Kálmán and Dombi András, *Az analitikai kémia alapjai kémiai és műszeres elemzés*. Budapest: Alliter Kiadói és oktatásfejlesztő Alapítvány, 2002.
- [27] J. Versieck, F. Barbier, R. Cornelis, and J. Hoste, "Sample contamination as a source of error in trace-element analysis of biological samples," *Talanta*, vol. 29, no. 11 Pt 2, pp. 973–984, Nov. 1982.
- [28] S. Mitra, Ed., *Sample preparation techniques in analytical chemistry*. Hoboken, N.J: J. Wiley, 2003.
- [29] J. Borda, "Műszeres Analitika jegyzet." Debreceni Egyetem, Kémia Intézet, 2010.
- [30] J. Delafiori, G. Ring, and A. Furey, "Clinical applications of HPLC–ICP-MS element speciation: A review," *Talanta*, vol. 153, pp. 306–331, Jun. 2016.
- [31] J. S. Garcia, C. S. de Magalhães, and M. A. Z. Arruda, "Trends in metal-binding and metalloprotein analysis," *Talanta*, vol. 69, no. 1, pp. 1–15, Mar. 2006.
- [32] G. S. Hall, X. Zhu, and E. G. Martin, "Determination of Pb-bound ligands in human amniotic fluid by HPSEC-ICP-MS," *Anal. Commun.*, vol. 36, no. 3, pp. 93–95, 1999.
- [33] Y. Dong *et al.*, "Quantification of Trace Elements in Protein Bands Using Synchrotron Radiation X-ray Fluorescence after Electrophoretic Separation," *Chin. J. Anal. Chem.*, vol. 34, no. 4, pp. 443–446, Apr. 2006.
- [34] D. Schaumlöffel, "New ways in qualitative and quantitative protein analysis: Nano chromatography coupled to element mass spectrometry," *J. Trace Elem. Med. Biol.*, vol. 21, pp. 18–22, Dec. 2007.
- [35] M. Malavolta *et al.*, "Speciation of trace elements in human serum by micro anion exchange chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry," *Anal. Biochem.*, vol. 421, no. 1, pp. 16–25, Feb. 2012.
- [36] M. H. Nagaoka and T. Maitani, "Binding affinity of aluminium to human serum transferrin and effects of carbohydrate chain modification as studied by HPLC/high-resolution ICP-MS," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 99, no. 9, pp. 1887–1894, Sep. 2005.
- [37] S. J. Hill, "ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY | Flame," in *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, Elsevier, 2013.
- [38] Y. Toya, T. Itagaki, and K. Wagatsuma, "Correlation between the Gas Temperature and the Atomization Behavior of Analyte Elements in Flame Atomic Absorption Spectrometry Estimated with a Continuum-light-source Spectrometer System," *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, vol. 125, pp. 146–151, Nov. 2016.
- [39] Y. Arslan, E. Kendüzler, and O. Y. Ataman, "Indium determination using slotted quartz tube-atom trap-flame atomic absorption spectrometry and interference studies," *Talanta*, vol. 85, no. 4, pp. 1786–1791, Sep. 2011.
- [40] Z. Kowalewska, H. Laskowska, and M. Gzylewski, "Application of high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry to reveal, evaluate and overcome certain spectral effects in Pb determination of unleaded gasoline," *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, vol. 132, pp. 26–36, Jun. 2017.
- [41] D. L. G. Borges and J. A. Holcombe, "Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry," in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R. A. Meyers, Ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2017, pp. 1–20.

- [42] J. Posta, *Atomabszorpciós spektrometria*. Debreceni Egyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék: Hallgatói Információs központ, 2008.
- [43] B. Feist and B. Mikula, "Preconcentration of heavy metals on activated carbon and their determination in fruits by inductively coupled plasma optical emission spectrometry," *Food Chem.*, vol. 147, pp. 302–306, Mar. 2014.
- [44] B. Deng, X. Xu, Y. Xiao, P. Zhu, and Y. Wang, "Understanding the effects of potassium ferricyanide on lead hydride formation in tetrahydroborate system and its application for determination of lead in milk using hydride generation inductively coupled plasma optical emission spectrometry," *Anal. Chim. Acta*, vol. 853, pp. 179–186, Jan. 2015.
- [45] C. J. Hardaway *et al.*, "Study of selected metal concentrations in sediments by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry from a metropolitan and more pristine bayou in Southwest Louisiana, United States," *Microchem. J.*, vol. 127, pp. 213–219, Jul. 2016.
- [46] S. P. Patole, F. Simões, T. F. Yapici, B. H. Warsama, D. H. Anjum, and P. M. F. J. Costa, "An evaluation of microwave-assisted fusion and microwave-assisted acid digestion methods for determining elemental impurities in carbon nanostructures using inductively coupled plasma optical emission spectrometry," *Talanta*, vol. 148, pp. 94–100, Feb. 2016.
- [47] N. S. Ham and A. Walsh, "Microwave-powered Raman sources," *Spectrochim. Acta*, vol. 12, no. 1, pp. 88–93, Mar. 1958.
- [48] J. A. C. Broekaert and U. Engel, "Microwave-Induced Plasma Systems in Atomic Spectroscopy," in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R. A. Meyers, Ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2000.
- [49] J. A. C. Broekaert and V. Siemens, "Recent trends in atomic spectrometry with microwave-induced plasmas," *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, vol. 59, no. 12, pp. 1823–1839, Dec. 2004.
- [50] S. Greenfield, H. McD. Mcgeachin, and P. B. Smith, "Plasma emission sources in analytical spectroscopy—I," *Talanta*, vol. 22, no. 1, pp. III–IV, Jan. 1975.
- [51] J. D. Cobine and D. A. Wilbur, "The Electronic Torch and Related High Frequency Phenomena," *J. Appl. Phys.*, vol. 22, no. 6, pp. 835–841, Jun. 1951.
- [52] A. J. McCormack, S. C. Tong, and W. D. Cooke, "Sensitive Selective Gas Chromatography Detector Based on Emission Spectrometry of Organic Compounds.," *Anal. Chem.*, vol. 37, no. 12, pp. 1470–1476, Nov. 1965.
- [53] C. I. M. Beenakker, "A cavity for microwave-induced plasmas operated in helium and argon at atmospheric pressure," *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, vol. 31, no. 8–9, pp. 483–486, Dec. 1976.
- [54] J. Sneddon, *Advances in atomic spectroscopy. . Vol. 2, 1995 Vol. 2, 1995*. Greenwich, Conn.: JAI Press, 1995.
- [55] R. D. Deutsch and G. M. Hieftje, "Identification of Limiting Noise Sources in the Microwave-Induced Nitrogen Discharge at Atmospheric Pressure," *Appl. Spectrosc.*, vol. 39, no. 1, pp. 19–24, Jan. 1985.
- [56] R. D. Deutsch, J. P. Keilsohn, and G. M. Hieftje, "Analytical Characteristics of the Microwave-Induced Nitrogen Discharge at Atmospheric Pressure (MINDAP)," *Appl. Spectrosc.*, vol. 39, no. 3, pp. 531–534, May 1985.
- [57] M. Selby and G. M. Hieftje, "Taming the surfatron," *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, vol. 42, no. 1–2, pp. 285–298, Jan. 1987.
- [58] M. Selby, R. Rezaaiyaan, and G. M. Hieftje, "Spatial Emission Properties of a Surface-Wave-Sustained Plasma (Surfatron) in Helium," *Appl. Spectrosc.*, vol. 41, no. 5, pp. 749–761, Jul. 1987.
- [59] Q. Jin, C. Zhu, M. W. Border, and G. M. Hieftje, "A microwave plasma torch assembly for atomic emission spectrometry," *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, vol. 46, no. 3, pp. 417–430, Jan. 1991.
- [60] Y. Okamoto, "Annular-shaped microwave-induced nitrogen plasma at atmospheric pressure for emission spectrometry of solutions.," *Anal. Sci.*, vol. 7, no. 2, pp. 283–288, 1991.
- [61] Y. Okamoto, "High-sensitivity microwave-induced plasma mass spectrometry for trace element analysis," *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 9, no. 7, p. 745, 1994.

Humán vérszérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával

- [62] H. P. Broida and M. W. Chapman, "Stable Nitrogen Isotope Analysis by Optical Spectroscopy," *Anal. Chem.*, vol. 30, no. 12, pp. 2049–2055, Dec. 1958.
- [63] D. Beauchemin, J. C. Yves Le Blanc, G. R. Peters, and A. T. Persaud, "Plasma emission spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 66, no. 12, pp. 462R–499R, Jun. 1994.
- [64] G. Niu, Q. Shi, X. Yuan, J. Wang, X. Wang, and Y. Duan, "Combination of support vector regression (SVR) and microwave plasma atomic emission spectrometry (MWP-AES) for quantitative elemental analysis in solid samples using the continuous direct solid sampling (CDSS) technique," *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 33, no. 11, pp. 1954–1961, 2018.
- [65] X. Xiong *et al.*, "The study of bismuth ions in drinking water at ultratrace levels by a microwave plasma torch coupled with linear ion trap mass spectrometry," *Anal. Methods*, vol. 10, no. 11, pp. 1346–1352, 2018.
- [66] D. Zhu *et al.*, "Investigation of self-ignition characteristics of the microwave plasma torch," *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 32, no. 8, pp. 1595–1600, 2017.
- [67] H. Ahmad, A. A. Jalil, and S. Triwahyono, "Dispersive solid phase extraction of gold with magnetite-graphene oxide prior to its determination via microwave plasma-atomic emission spectrometry," *RSC Adv.*, vol. 6, no. 91, pp. 88110–88116, 2016.
- [68] M. R. Hammer, "A magnetically excited microwave plasma source for atomic emission spectroscopy with performance approaching that of the inductively coupled plasma," *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, vol. 63, no. 4, pp. 456–464, Apr. 2008.
- [69] S. Squadrone, P. Brizio, M. C. Abete, and A. Brusco, "Trace elements profile in the blood of Huntington' disease patients," *J. Trace Elem. Med. Biol.*, vol. 57, pp. 18–20, Jan. 2020.
- [70] B. Bocca *et al.*, "Human biomonitoring to evaluate exposure to toxic and essential trace elements during pregnancy. Part A. concentrations in maternal blood, urine and cord blood.," *Environ. Res.*, vol. 177, p. 108599, Oct. 2019.
- [71] T. L. Peters *et al.*, "Blood levels of trace metals and amyotrophic lateral sclerosis," *NeuroToxicology*, vol. 54, pp. 119–126, May 2016.
- [72] R. Oggiano *et al.*, "Trace elements in ALS patients and their relationships with clinical severity," *Chemosphere*, vol. 197, pp. 457–466, Apr. 2018.
- [73] J. M. Harrington, D. J. Young, A. S. Essader, S. J. Sumner, and K. E. Levine, "Analysis of Human Serum and Whole Blood for Mineral Content by ICP-MS and ICP-OES: Development of a Mineralomics Method," *Biol. Trace Elem. Res.*, vol. 160, no. 1, pp. 132–142, Jul. 2014.
- [74] Y. Ou *et al.*, "Associations between toxic and essential trace elements in maternal blood and fetal congenital heart defects," *Environ. Int.*, vol. 106, pp. 127–134, Sep. 2017.
- [75] P. J. Parsons and F. Barbosa, "Atomic spectrometry and trends in clinical laboratory medicine," *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, vol. 62, no. 9, pp. 992–1003, Sep. 2007.
- [76] P. Gątarek, M. Pawełczyk, K. Jastrzębski, A. Głąbiński, and J. Kałużna-Czaplińska, "Analytical methods used in the study of Parkinson's disease," *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 118, pp. 292–302, Sep. 2019.
- [77] A. Yilmaz, R. A. Sari, M. Gundogdu, N. Kose, and E. Dag, "Trace elements and some extracellular antioxidant proteins levels in serum of patients with systemic lupus erythematosus," *Clin. Rheumatol.*, vol. 24, no. 4, pp. 331–335, Aug. 2005.
- [78] M. Sahebari *et al.*, "Serum Trace Element Concentrations in Rheumatoid Arthritis," *Biol. Trace Elem. Res.*, vol. 171, no. 2, pp. 237–245, Jun. 2016.
- [79] M. Sahebari *et al.*, "Association between serum trace element concentrations and the disease activity of systemic lupus erythematosus," *Lupus*, vol. 23, no. 8, pp. 793–801, Jul. 2014.
- [80] J. Zhao, P. Gao, S. Wu, and D. Zhu, "Superiority of nitric acid for deproteinization in the determination of trace lithium in serum by graphite furnace atomic absorption spectrometry," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 50, no. 5, pp. 1075–1079, Dec. 2009.
- [81] B. Gómez-Nieto, M. J. Gismera, M. T. Sevilla, J. Satrústegui, and J. R. Procopio, "Micro-sampling method based on high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for calcium determination in blood and mitochondrial suspensions," *Talanta*, vol. 170, pp. 15–21, Aug. 2017.

- [82] R. Akramipour, M. R. Golpayegani, S. Gheini, and N. Fattahi, "Speciation of organic/inorganic mercury and total mercury in blood samples using vortex assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on the freezing of deep eutectic solvent followed by GFAAS," *Talanta*, vol. 186, pp. 17–23, Aug. 2018.
- [83] E. Barany, I. A. Bergdahl, A. Schütz, S. Skerfving, and A. Oskarsson, "Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for Direct Multi-element Analysis of Diluted Human Blood and Serum," *J Anal Spectrom*, vol. 12, no. 9, pp. 1005–1009, 1997.
- [84] Y. Lu *et al.*, "Alkali dilution of blood samples for high throughput ICP-MS analysis—comparison with acid digestion," *Clin. Biochem.*, vol. 48, no. 3, pp. 140–147, Feb. 2015.
- [85] D. Luna, M. Miranda, A. H. H. Minervino, V. Piñeiro, C. Herrero-Latorre, and M. López-Alonso, "Validation of a simple sample preparation method for multielement analysis of bovine serum," *PLOS ONE*, vol. 14, no. 2, p. e0211859, Feb. 2019.
- [86] H. Koizumi and K. Yasuda, "An application of the Zeeman effect to atomic absorption spectrometry: a new method for background correction," *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, vol. 31, no. 5, pp. 237–255, Jan. 1976.
- [87] S. B. Smith and G. M. Hieftje, "A New Background-Correction Method for Atomic Absorption Spectrometry," *Appl. Spectrosc.*, vol. 37, no. 5, pp. 419–424, Sep. 1983.
- [88] G. Galbács, A. Felinger, and B. Csóka, *Illusztrált segédanyag a modern műszeres analitikai kémia oktatásához*. Szegedi Tudományegyetem; Pécsi Tudományegyetem, 2012.
- [89] M. Rehkämper and K. Mezger, "Investigation of matrix effects for Pb isotope ratio measurements by multiple collector ICP-MS: verification and application of optimized analytical protocols," *J Anal Spectrom*, vol. 15, no. 11, pp. 1451–1460, 2000.
- [90] E. Tatár and G. Záray, *Környezetminősítés*. Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest: Typotex Kiadó, 2012.
- [91] G. C.-Y. Chan, W.-T. Chan, X. Mao, and R. E. Russo, "Investigation of matrix effects in inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy using laser ablation and solution nebulization — effect of second ionization potential," *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, vol. 56, no. 1, pp. 77–92, Jan. 2001.
- [92] K. Jankowski and M. Dreger, "Study of an effect of easily ionizable elements on the excitation of 35 elements in an Ar-MIP system coupled with solution nebulization," *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 15, no. 3, pp. 269–274, 2000.
- [93] K. M. Green, M. C. Borrás, P. P. Woskov, G. J. Flores, K. Hadidi, and P. Thomas, "Electronic excitation temperature profiles in an air microwave plasma torch," *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 29, no. 2, pp. 399–406, Apr. 2001.
- [94] D. A. Goncalves, T. McSweeney, and G. L. Donati, "Characteristics of a resonant iris microwave-induced nitrogen plasma," *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 31, no. 5, pp. 1097–1104, 2016.
- [95] Y. Morishige and A. Kimura, "Ionization Interference in Inductively Coupled Plasma- Optical Emission Spectroscopy," *SEI TECHNICAL REVIEW*, no. NUMBER 66, p. 107 Table 1., 2008.
- [96] N. Chalyavi, P. S. Doidge, R. J. S. Morrison, and G. B. Partridge, "Fundamental studies of an atmospheric-pressure microwave plasma sustained in nitrogen for atomic emission spectrometry," *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 32, no. 10, pp. 1988–2002, 2017.
- [97] M. W. Blades and G. Horlick, "Interference from easily ionizable element matrices in inductively coupled plasma emission spectrometry—a spatial study," *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, vol. 36, no. 9, pp. 881–900, Jan. 1981.
- [98] S. O'Neill and R. Cervera, "Systemic lupus erythematosus," *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, vol. 24, no. 6, pp. 841–855, Dec. 2010.
- [99] J. A. Chiorini, D. Cihakova, C. E. Ouellette, and P. Caturegli, "Sjögren syndrome: Advances in the pathogenesis from animal models," *J. Autoimmun.*, vol. 33, no. 3–4, pp. 190–196, Nov. 2009.
- [100] B. Griffiths, M. Mosca, and C. Gordon, "Assessment of patients with systemic lupus erythematosus and the use of lupus disease activity indices," *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, vol. 19, no. 5, pp. 685–708, Oct. 2005.

Humán vérszérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával

- [101] Y. Pan and A. H. Sawalha, "Epigenetic regulation and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus," *Transl. Res.*, vol. 153, no. 1, pp. 4–10, Jan. 2009.
- [102] A. G. Tzioufas and M. Voulgarelis, "Update on Sjögren's syndrome autoimmune epithelitis: from classification to increased neoplasias," *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, vol. 21, no. 6, pp. 989–1010, Dec. 2007.
- [103] C. Baldini, R. Talarico, A. G. Tzioufas, and S. Bombardieri, "Classification criteria for Sjogren's syndrome: A critical review," *J. Autoimmun.*, vol. 39, no. 1–2, pp. 9–14, Aug. 2012.
- [104] P. Venables, "Sjögren's syndrome," *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, vol. 18, no. 3, pp. 313–329, Jun. 2004.
- [105] E. Silbergeld, I. Silva, and J. Nyland, "Mercury and autoimmunity: implications for occupational and environmental health," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 207, no. 2, pp. 282–292, Sep. 2005.
- [106] S. Tuncer, A. Kamanli, E. AkÇil, G. özelÇi Kavas, B. SeÇkin, and M. B. Atay, "Trace element and magnesium levels and superoxide dismutase activity in rheumatoid arthritis," *Biol. Trace Elem. Res.*, vol. 68, no. 2, pp. 137–142, May 1999.
- [107] V. Honkanen, P. Pelkonen, H. Mussalo-Rauhamaa, J. Lehto, and T. Westermarck, "Serum trace elements in juvenile chronic arthritis," *Clin. Rheumatol.*, vol. 8, no. 1, pp. 64–70, Mar. 1989.
- [108] A. Zoli *et al.*, "Serum zinc and copper in active rheumatoid arthritis: correlation with interleukin 1 beta and tumour necrosis factor alpha," *Clin. Rheumatol.*, vol. 17, no. 5, pp. 378–382, 1998.
- [109] S. Taysi, I. Gulcin, R. A. Sari, S. Kuskay, and N. Bakan, "Trace elements and disease activity score in patients with rheumatoid arthritis," *Pain Clin.*, vol. 15, no. 4, pp. 435–439, Dec. 2003.
- [110] T. Kiss, T. Gajda, and B. Gyurcsik, *Bevezetés a bioszervetlen kémiába: [felsőoktatási tankönyv]*. Budapest: Nemzeti Tankönyvkiadó, 2007.
- [111] I. Dr. Huber, *Gyógyszerészi Bioszervetlen Kémiai Ismeretek*, 2014th ed. Pécs: PTE ÁOK Gyógyszerészi Kémiai Tanszék.
- [112] H. E. Koschwanez and W. M. Reichert, "In vitro, in vivo and post explantation testing of glucose-detecting biosensors: Current methods and recommendations," *Biomaterials*, vol. 28, no. 25, pp. 3687–3703, Sep. 2007.
- [113] A. J. Salgado, O. P. Coutinho, and R. L. Reis, "Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends," *Macromol. Biosci.*, vol. 4, no. 8, pp. 743–765, Aug. 2004.
- [114] J. M. Anderson, A. Rodriguez, and D. T. Chang, "Foreign body reaction to biomaterials," *Semin. Immunol.*, vol. 20, no. 2, pp. 86–100, Apr. 2008.
- [115] J. M. Morais, F. Papadimitrakopoulos, and D. J. Burgess, "Biomaterials/Tissue Interactions: Possible Solutions to Overcome Foreign Body Response," *AAPS J.*, vol. 12, no. 2, pp. 188–196, Jun. 2010.
- [116] E. Brücher, "Kinetic Stabilities of Gadolinium(III) Chelates Used as MRI Contrast Agents," in *Contrast Agents I*, vol. 221, W. Krause, Ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2002, pp. 103–122.
- [117] A. Merbach, L. Helm, and É. Tóth, Eds., *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging: Helm/The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013.
- [118] E. Brücher, G. Tircsó, Z. Baranyai, Z. Kovács, and A. D. Sherry, "Stability and Toxicity of Contrast Agents," in *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, A. Merbach, L. Helm, and É. Tóth, Eds. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013, pp. 157–208.
- [119] Éva Tóth, L. Helm, and A. Merbach, "Relaxivity of Gadolinium(III) Complexes: Theory and Mechanism," in *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, A. Merbach, L. Helm, and É. Tóth, Eds. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013, pp. 25–81.
- [120] R. B. Lauffer, "Paramagnetic metal complexes as water proton relaxation agents for NMR imaging: theory and design," *Chem. Rev.*, vol. 87, no. 5, pp. 901–927, Oct. 1987.
- [121] H. Weinmann, R. Brasch, W. Press, and G. Wesbey, "Characteristics of gadolinium-DTPA complex: a potential NMR contrast agent," *Am. J. Roentgenol.*, vol. 142, no. 3, pp. 619–624, Mar. 1984.

Tóth Csilla Noémi doktori (PhD) értekezése

- [122] H. Gries and H. Miklautz, "Some physicochemical properties of the gadolinium-DTPA complex, a contrast agent for MRI," *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR*, vol. 16, no. 2, pp. 105–112, 1984.
- [123] J. F. Desreux and P. P. Barthélemy, "Highly stable lanthanide macrocyclic complexes: in search of new contrast agents for NMR imaging," *Int. J. Rad. Appl. Instrum. B*, vol. 15, no. 1, pp. 9–15, Jan. 1988.
- [124] E. N. Rizkalla, G. R. Choppin, and W. Cacheris, "Thermodynamics, proton NMR, and fluorescence studies for the complexation of trivalent lanthanides, calcium(2+), copper(2+), and zinc(2+) by diethylenetriaminepentaacetic acid bis(methylamide)," *Inorg. Chem.*, vol. 32, no. 5, pp. 582–586, Mar. 1993.
- [125] W. P. Cacheris, S. C. Quay, and S. M. Rocklage, "The relationship between thermodynamics and the toxicity of gadolinium complexes," *Magn. Reson. Imaging*, vol. 8, no. 4, pp. 467–481, Jan. 1990.
- [126] K. Kumar, C. A. Chang, and M. F. Tweedle, "Equilibrium and kinetic studies of lanthanide complexes of macrocyclic polyamino carboxylates," *Inorg. Chem.*, vol. 32, no. 5, pp. 587–593, Mar. 1993.
- [127] M. Port, J.-M. Idée, C. Medina, C. Robic, M. Sabatou, and C. Corot, "Efficiency, thermodynamic and kinetic stability of marketed gadolinium chelates and their possible clinical consequences: a critical review," *BioMetals*, vol. 21, no. 4, pp. 469–490, Aug. 2008.
- [128] P. Marckmann, "Nephrogenic Systemic Fibrosis: Suspected Causative Role of Gadodiamide Used for Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 17, no. 9, pp. 2359–2362, Aug. 2006.
- [129] S. K. Morcos, "Nephrogenic systemic fibrosis following the administration of extracellular gadolinium based contrast agents: is the stability of the contrast agent molecule an important factor in the pathogenesis of this condition?," *Br. J. Radiol.*, vol. 80, no. 950, pp. 73–76, Feb. 2007.
- [130] E. Brücher, Zs. Baranyai, and Gy. Tircsó, "Chapter 5.2. The Future of Biomedical Imaging: Synthesis and Chemical Properties of the DTPA and DOTA Derivative Ligands and Their Complexes," in *Drug Discovery*, M. Braddock, Ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2011, pp. 208–260.
- [131] T. Grobner, "Gadolinium – a specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermopathy and nephrogenic systemic fibrosis?," *Nephrol. Dial. Transplant.*, vol. 21, no. 4, pp. 1104–1108, Apr. 2006.
- [132] G. E. Jackson, S. Wynchank, and M. Woudenberg, "Gadolinium(III) complex equilibria: the implications for Gd(III) MRI contrast agents," *Magn. Reson. Med.*, vol. 16, no. 1, pp. 57–66, Oct. 1990.
- [133] T. Frenzel, P. Lengersfeld, H. Schirmer, J. Hütter, and H.-J. Weinmann, "Stability of Gadolinium-Based Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents in Human Serum at 37°C," *Invest. Radiol.*, vol. 43, no. 12, pp. 817–828, Dec. 2008.
- [134] Z. Baranyai *et al.*, "The Role of Equilibrium and Kinetic Properties in the Dissociation of Gd[DTPA-bis(methylamide)] (Omniscan) at near to Physiological Conditions," *Chem. - Eur. J.*, vol. 21, no. 12, pp. 4789–4799, Mar. 2015.
- [135] O. Zak and P. Aisen, "Spectroscopic and thermodynamic studies on the binding of gadolinium(III) to human serum transferrin," *Biochemistry*, vol. 27, no. 3, pp. 1075–1080, Feb. 1988.
- [136] C. Dubuisson, E. Poussel, J. L. Todoli, and J. M. Mermet, "Effect of sodium during the aerosol transport and filtering in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry," *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, vol. 53, no. 4, pp. 593–600, Apr. 1998.
- [137] A. K. Guimarães-Silva, J. C. de Lena, R. E. S. Froes, L. M. Costa, and C. C. Nascentes, "Evaluation of signal-to-background and Mg II/Mg I ratios as response for the optimization of rare earth elements determination by inductively coupled plasma optical emission spectrometry," *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 23, no. 4, pp. 753–762, Apr. 2012.
- [138] J. M. Mermet, "Use of magnesium as a test element for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry diagnostics," *Anal. Chim. Acta*, vol. 250, pp. 85–94, Oct. 1991.
- [139] E. Varbanova and V. Stefanova, "A COMPARATIVE STUDY OF INDUCTIVELY COUPLED PLASMA OPTICAL EMISSION SPECTROMETRY AND MICROWAVE PLASMA ATOMIC EMISSION SPECTROMETRY FOR THE DIRECT DETERMINATION OF

Humán vérszérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával

LANTHANIDES IN WATER AND ENVIRONMENTAL SAMPLES,” *Ecology & Safety*, vol. 9, pp. 362–374, May 2015.

[140] S. Đurović *et al.*, “Chemical composition of stinging nettle leaves obtained by different analytical approaches,” *J. Funct. Foods*, vol. 32, pp. 18–26, May 2017.

[141] M. F. Gazulla, M. Rodrigo, M. Orduña, M. J. Ventura, and C. Andreu, “High precision measurement of silicon in naphthas by ICP-OES using isoootane as diluent,” *Talanta*, vol. 164, pp. 563–569, Mar. 2017.

[142] C. B. Williams, B. T. Jones, and G. L. Donati, “Naturally occurring molecular species used for plasma diagnostics and signal correction in microwave-induced plasma optical emission spectrometry,” *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 33, no. 7, pp. 1224–1232, 2018.

[143] J. Antony, “Full Factorial Designs,” in *Design of Experiments for Engineers and Scientists*, Elsevier, 2014, pp. 63–85.

[144] A. K. Das and S. Dewanjee, “Optimization of Extraction Using Mathematical Models and Computation,” in *Computational Phytochemistry*, Elsevier, 2018, pp. 75–106.

[145] S. Taghizadegan, “Design for Lean/Kaizen Six Sigma,” in *Essentials of Lean Six Sigma*, Elsevier, 2006, pp. 59–101.

[146] R. Milanino *et al.*, “Copper and zinc status in rheumatoid arthritis: studies of plasma, erythrocytes, and urine, and their relationship to disease activity markers and pharmacological treatment,” *Clin. Exp. Rheumatol.*, vol. 11, no. 3, pp. 271–281, Jun. 1993.

[147] M. C. Hochberg, “Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus,” *Arthritis Rheum.*, vol. 40, no. 9, p. 1725, Sep. 1997.

[148] W. F. Ganong, *Az orvosi élettan alapjai*. Budapest: Medicina, 1994.

[149] J. Szentágothai and M. Réthelyi, *Funkcionális Anatómia*. Budapest: Medicina Könyvkiadó, 2013.

[150] I. Went, *Élettan*. Budapest: Medicina Könyvkiadó, 1962.

[151] H. Vural, K. Uzun, E. Uz, A. Koçyigit, A. Çigli, and ö. Akyol, “Concentrations of copper, zinc and various elements in serum of patients with bronchial asthma,” *J. Trace Elem. Med. Biol.*, vol. 14, no. 2, pp. 88–91, Jun. 2000.

[152] I. S. Young and J. V. Woodside, “Antioxidants in health and disease,” *J. Clin. Pathol.*, vol. 54, no. 3, pp. 176–186, Mar. 2001.

[153] M. S. Willis *et al.*, “Zinc-Induced Copper Deficiency: A Report of Three Cases Initially Recognized on Bone Marrow Examination,” *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 123, no. 1, pp. 125–131, Jan. 2005.

[154] J. Osredkar, “Copper and Zinc, Biological Role and Significance of Copper/Zinc Imbalance,” *J. Clin. Toxicol.*, vol. s3, no. 01, 2011.

[155] E. Gianolio *et al.*, “Gadolinium Retention in the Rat Brain: Assessment of the Amounts of Insoluble Gadolinium-containing Species and Intact Gadolinium Complexes after Repeated Administration of Gadolinium-based Contrast Agents,” *Radiology*, vol. 285, no. 3, pp. 839–849, Dec. 2017.

[156] N. Fogh-Andersen, “Albumin/calcium association at different pH, as determined by potentiometry,” *Clin. Chem.*, vol. 23, no. 11, pp. 2122–2126, 0 1977.

[157] T. Frenzel, C. Apte, G. Jost, L. Schöckel, J. Lohrke, and H. Pietsch, “Quantification and Assessment of the Chemical Form of Residual Gadolinium in the Brain After Repeated Administration of Gadolinium-Based Contrast Agents: Comparative Study in Rats,” *Invest. Radiol.*, vol. 52, no. 7, pp. 396–404, Jul. 2017.

[158] C. Olchowoy *et al.*, “The presence of the gadolinium-based contrast agent depositions in the brain and symptoms of gadolinium neurotoxicity - A systematic review,” *PLOS ONE*, vol. 12, no. 2, p. e0171704, Feb. 2017.

8. Függelék

1. táblázat Az MP expert szoftver mintára vonatkozó beállítási paraméterei

Ismétlések száma	Felszívási idő (s)	Öblítési idő (s)	Stabilizációs idő (s)
3	15	30	15

2. táblázat A faktoriális kísérleti tervben szereplő modelloldatok összetétele

Elemek	min koncentráció	max koncentráció	centrum koncentráció
Na (mg/l)	300,00	500,00	400,00
K (mg/l)	5,00	25,00	15,00
Ca (mg/l)	2,50	15,00	7,50
Mg (mg/l)	1,00	5,00	3,00
Cu (mg/l)	0,10	0,50	0,30
Zn (mg/l)	0,10	0,50	0,30
Fe (mg/l)	0,10	0,50	0,30

3. táblázat A növekvő nátriumkoncentráció hatásának vizsgálata során alkalmazott modelloldatok összetétele

Minta oldat	Na (mg/l)	Elem	Koncentráció (mg/l)
1.	300,00	Ca	7,50
2.	300,00	K	15,00
3.	300,00	Mg	3,00
4.	300,00	Cu	0,30
5.	300,00	Zn	0,30
6.	300,00	Fe	0,30
7.	350,00	Ca	7,50
8.	350,00	K	15,00
9.	350,00	Mg	3,00
10.	350,00	Cu	0,30
11.	350,00	Zn	0,30
12.	350,00	Fe	0,30
13.	400,00	Ca	7,50
14.	400,00	K	15,00
15.	400,00	Mg	3,00
16.	400,00	Cu	0,30
17.	400,00	Zn	0,30
18.	400,00	Fe	0,30
19.	450,00	Ca	7,50
20.	450,00	K	15,00
21.	450,00	Mg	3,00
22.	450,00	Cu	0,30
23.	450,00	Zn	0,30
24.	450,00	Fe	0,30
25.	500,00	Ca	7,50
26.	500,00	K	15,00
27.	500,00	Mg	3,00
28.	500,00	Cu	0,30
29.	500,00	Zn	0,30
30.	500,00	Fe	0,30

4. táblázat Az ICP-OES készülék mérési paraméterei

mérendő elem	hullámhossz (nm)	kiolvasási idő (s)	felszívási idő (s)	stabilizációs idő (s)	öblítési idő (s)
K	766,491	5	15	8	30
Ca	430,253	5	15	8	30
Mg	285,213	5	15	8	30
Zn	213,857	5	15	8	30
Cu	324,754	5	15	8	30
Fe	238,204	5	15	8	30

5. táblázat Az MP-AES készülék mérési paraméterei

mérendő elem	hullámhossz (nm)	kiolvasási idő (s)	porlasztógáz nyomása (kPa)
K	766,491	5	240
Ca	430,253	5	140
Mg	285,213	5	240
Zn	213,857	20	140
Cu	324,754	10	240
Fe	371,993	20	120

6. táblázat Az elemek kalibráló oldatsorozatának koncentrációi a modell oldatminták, a Seronorm[®] és a teljes vérszérumminták esetén

Elemek	Kalibráló sorok					
K (mg/l)	0,00	5,00	10,0	15,0	20,0	25,0
Mg (mg/l)	0,00	1,00	2,00	3,00	4,00	5,00
Ca (mg/l)	0,00	2,50	5,00	7,50	10,00	15,00
Zn (mg/l)	0,00	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50
Cu (mg/l)	0,00	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50
Fe (mg/l)	0,00	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50

7. táblázat Az elemek kalibráló oldatsorozatának koncentrációi a frakcionált vérszérumminták esetén

Elemek	Kalibráló sorok			
K (mg/l)	0,00	1,00	2,00	3,00
Mg (mg/l)	0,00	0,10	0,20	0,50
Ca (mg/l)	0,00	1,00	2,00	5,00
Zn (mg/l)	0,00	0,10	0,20	0,50
Cu (µg/l)	0,00	50,00	100,00	150,00

8. táblázat A grafitkemence felfűtési programja

Lépés	Program	Hőmérséklet (°C)	Idő (sec)
1.	Szárítás	120	40-60
2.	Hamvasztás	900	20
3.	Atomizáció	2300	5
4.	Tisztítás	2600	3

9. táblázat A Gd kalibráló oldatsorozatának koncentrációi

Elem	Kalibráló sor			
Gd (mg/l)	0,00	0,05	0,25	0,50

10. táblázat Az ICP-OES készülék mérési paramétere

mérendő elem	hullámhossz (nm)	kiolvasási idő (s)	felszívási idő (s)	stabilizációs idő (s)	öblítési idő (s)
Gd	336,224	5	15	8	30

11. táblázat Az ultraszűrésnél alkalmazott Gd kalibráló oldatok

Gd kalibráló oldatok ($\mu\text{g/l}$)
0,00
1,00
3,00
5,00
10,00
15,00
500,00
1000,00
3000,00

12. táblázat A hígított vérszérummintákban az egyes elemekre meghatározott koncentráció százalékos eltérése a centrum nátriumkoncentrációnál (400 mg/l) kapott eredményhez viszonyítva ICP-OES technikánál

	%					
Na (mg/l)	K	Ca	Mg	Cu	Zn	Fe
300	-0,23	-0,26	1,06	-0,42	0,96	1,43
400	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
500	0,23	0,26	-1,06	0,42	-0,96	-1,43

Humán vérérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával

13. táblázat A kísérlet során Na mátrixtal illesztett és illesztés nélküli kalibráló sorok intenzitás értéke

	Mátrix illesztett kalibrálás											
	Ca 430,253 mg/l	Intenzitás	Cu 324,754 mg/l	Intenzitás	Fe 371,993 mg/l	Intenzitás	K 766,491 mg/l	Intenzitás	Mg 285,213 mg/l	Intenzitás	Zn 213,857 mg/l	Intenzitás
Blank	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Standard 1	2,50	4689,03	0,10	10098,39	0,10	1351,06	5,00	645454,15	1,00	198069,51	0,10	782,31
Standard 2	7,50	14272,44	0,30	29220,58	0,30	3911,70	15,00	1688779,02	3,00	523869,18	0,30	3255,99
Standard 3	15,00	29513,09	0,50	47666,72	0,50	6490,62	25,00	2560719,94	5,00	726630,06	0,50	5482,98
	Illesztés nélküli kalibrálás											
	Ca 430,253 mg/l	Intenzitás	Cu 324,754 mg/l	Intenzitás	Fe 371,993 mg/l	Intenzitás	K 766,491 mg/l	Intenzitás	Mg 285,213 mg/l	Intenzitás	Zn 213,857 mg/l	Intenzitás
Blank	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Standard 1	2,50	3622,42	0,10	8748,35	0,10	1230,91	5,00	478613,73	1,00	208265,10	0,10	2670,90
Standard 2	7,50	10985,79	0,30	25034,32	0,30	3674,43	15,00	1224493,62	3,00	516626,49	0,30	7008,05
Standard 3	15,00	22248,75	0,50	40719,94	0,50	6033,07	25,00	1832241,46	5,00	730081,35	0,50	11345,69

Humán vészérumminták diagnosztikai elemzése atomspektrometriával