

Szakmai zárójelentés a T 47047 nyilv. sz. OTKA kutatásról

**TXRF és ICP-MS mikroanalitikai módszerek
fejlesztése esszenciális és nyomelemek
meghatározására emberi biopsziás mintákban**

Készítette:

Dr. Varga Imre Péter témavezető
egyetemi docens

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar
Kémiai Intézet, Analitikai Kémiai Tanszék

Budapest 2007. február 25.

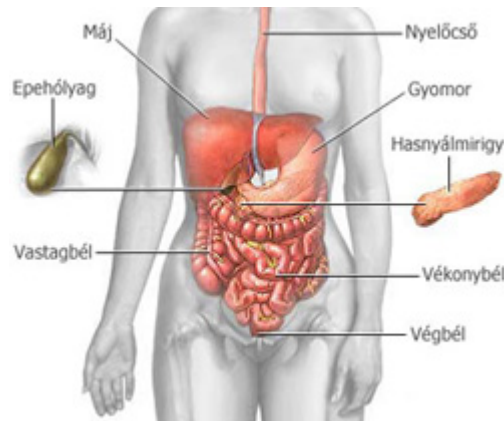
Tartalomjegyzék

I. A kutatás előzményei, háttere	3
1.1. A májbetegségek diagnosztizálásának módszerei	3
1.2. Májbiopszia	4
2. Biológiai eredetű minták elemösszetételének meghatározására alkalmazott módszerek ..	5
II. Kutatási eredmények	8
1. Mintaelőkészítés	8
2. Mikroanalitikai módszerek fejlesztése	8
2.1. Analitikai teljesítményjellemzők meghatározása	8
2.2. A mérési módszer hitelesítése	9
2.2.1. Független módszerrel való vizsgálat	9
2.2.2. Referenciaminta vizsgálata	9
3. Emberi májbiopszias minták elemzési eredményeinek értékelése	10
3.1. Normál csoport	10
3.2. Összehasonlítás a beteg csoportokkal	11
3.3. A steatosis és a nikkellakkumuláció közötti összefüggés	14
III. A kutatásban résztvevők személyében beállt változások és a költségtervtől történt eltérések indoklása	15
1. Személyi változások	15
2. Költségtervhez képest történt változások	15
IV. Összefoglalás	16
Irodalomjegyzék	17

I. A kutatás előzményei, háttere

1.1. A májbetegségek diagnosztizálásának módszerei

A máj a hasüreg jobb felső részében helyezkedik el, átlagtömege: 1500 gramm. Jobb, bal és kaudális lebenyre osztható. A lebenyek további funkcionális egységekre, összesen 8 szegmentre tagolhatók, ezeknek külön epeelvezetésük és vérellátásuk van.



- Fizikális vizsgálat

- A májszövet károsodásának kimutatását célzó laboratóriumi vizsgálatok

- A máj kiválasztó működésének zavarait jelző laboratóriumi vizsgálatok

- A máj szintetikus tevékenységének zavarait jelző laboratóriumi vizsgálatok

- Képkeltő eljárások, endoszkópia

Az újabb képkeltő eljárások egyre jobban kiszorítják a „hagyományos” radiológiai technikákat és az endoszkópiát a májbetegségek diagnosztikai módszerei közül. Manapság az endoszkópia elsősorban a műtéti beavatkozások területén, főleg az epeutakon végzett műtétekben kap egyre nagyobb jelentőséget.

Az ultrahang-diagnosztika a máj normális nagyságának, normális szerkezetének megítélésére, a zsírmáj, a cirrhosis, tehát a diffúz májbetegségek valószínűsítésére is alkalmas, de a legnagyobb jelentősége az ún. fokális májléziók felismerésében rejlik.

Szebeni Ágnes és munkatársai az ultrahang-csillapítás alapján krónikus diffúz májbetegségekben az ún. fényes máj két típusát különítették el: az alacsony (DI) és a magas (DII) csillapítású típust. Munkájuk során összefüggést kerestek a máj egyes hisztopatológiai paraméterei és a máj ultrahang csillapítása között.

A normál csoportban szövettanilag is ép képet mutatott a máj. Néhány esetben minimális lipidfelhalmozódás, ill. gyulladásosejtek előfordulása volt felfedezhető. A DI csoportban jelentős kollagén szaporulat és gyulladásosejtes reakció volt kimutatható. Egyes esetekben minimális lipidfelszaporodást is észleltek. A

DII csoportban minden esetben lipidfelhalmozódást találtak. Néhány esetben kismennyiségű kollagén szaporulat, illetve gyulladásra utaló sejtek is előfordultak. Megfigyeléseik és méréseik alapján arra következtettek, hogy normális csillapítású májakban patológiás elváltozás nem, vagy csak minimális mértékben fordul elő; alacsony csillapítású fényes májakban kötőszöveti dominancia; magas csillapításúakban lipid dominancia a jellemző [1].

Fokális léziók esetén az ultrahanggal detektált eltérést gyakran CT-vel, MRI-vel vizsgálják tovább, illetve célzott biopsziás mintát vesznek az elváltozás természetének pontosabb meghatározására.

A speciális angiográfiás vizsgálatok, a vérátáramlás mérésére szolgáló színes-Doppler UH tovább pontosíthatják a diagnózist.

1.2. Májbopszia

Az anamnézis adatai, a fizikális vizsgálatok, laboratóriumi és képalkotó eljárások alkalmazásával többnyire biztonsággal megállapítható, hogy van-e a betegnek májkárosodása, és ha igen, akkor ez diffúz, vagy gócos jellegű. Erről a pontról továbblépni azonban csak a májszövet morfológiai vizsgálatával lehet, mivel bár a nem-invazív eljárások számtalan közvetett információval szolgálnak, azonban a laboratóriumi leletek többnyire aspecifikusak vagy átfedő jellegűek.

A májbopszia bevezetése a 19. század végére nyúlik vissza. Döntő változást azonban az 1958-ban Menghini által bevezetett aspirációs tűbopszia hozta [2]. Ezt követően a májbopsziák száma jelentősen megnövekedett és alapvető volt számos májmegebetegedés felismerésében. Felesleges alkalmazását kerüljük, szükséges azonban minden olyan esetben, ahol a szerológiai és laboratóriumi adatok nem egyeznek, vagy a betegség progressziójának megállapítása szempontjából fontos meggyőződni a máj szöveti állapotáról, a megebetegedés stádiumáról [3].

A májbopszia fő módja napjainkban a vékony vagy vastag tű segítségével végzett aspirációs bopszia, korábban „vakon” végezték, manapság csaknem mindig „célzottan”, ultrahang vezérelt módon.

Egyéb tűbopsziás módszerek: true-cut, Wim-Silverman-tű; ezek alkalmazására akkor kerülhet sor, ha a szövet különösen kemény, és az aspiráció sikertelen.

a) vastagtű-bopszia

Az ún. vastag tű belső átmérője 1,4-2 mm, tehát a nyert szövethenger ennek megfelelő átmérőjű és 15-20 mm hosszúságú. Nemritkán előfordul, hogy az aspiráció csupán a lazább konzisztenciájú szöveteket, így a májsejteket „szippantja” ki, és a kötőszövet bennmarad. Erre elsősorban a máj jelentős kötőszövet-szaporulattal járó kórképeiben, főként cirrhosisban számíthatunk. Ilyen „törmelékes” biopsziátum esetén a cirrhosis gyanúja már a mintavétel során felmerülhet.

A vastagtű-bopsziát elsősorban a diffúz májmegebetegések diagnosztikájában alkalmazzák. A bopsziás hengernek legalább 5 portális traktust kell tartalmaznia a korrekt diagnózishoz. Lényeges, hogy a mintavétel után a szövet azonnal

fixálóba (leggyakrabban 8-10%-os pufferolt formalin) kerüljön, melyet paraffinba történő beágyazás követ. A 3-5 µm vastag metszeteken leggyakrabban alkalmazott hematoxin-eozin (HE) festés mellett több speciális hisztológiai, hisztokémiai, immunhisztokémiai eljárásra is gyakran szükség lehet a diagnózishoz. A mintákat elektronmikroszkópos, ill. molekuláris vizsgálatokra is fel lehet használni.

b) vékonytű-biopszia

Az igen kis kockázattal járó vékonytű-aspirációs technikát elsősorban a fokális májbetegségek differenciálására használják UH-CT asszisztált vagy vezérelt módon. A nyert minta többnyire nem alkalmas szövettani vizsgálatra, abból citológiai kenet készül.

2. Biológiai eredetű minták elemösszetételének meghatározására alkalmazott módszerek

A biológiai minták nyomelem-koncentrációinak meghatározása több szempontból is fontos. Fontos tudnunk az egészséges szövetekre jellemző normálérték-tartományokat, melyek alapul szolgálnak ahhoz, hogy a szignifikáns eltéréseket kimutathassuk különböző patológiás esetekben. Ezen eltérések újabb kutatások kiindulópontjai lehetnek, melyek egyes betegségek kiváltó okaira adhatnak magyarázatot. Számos esetben a mikroelemek pótlására szolgáló készítmények összetételének meghatározására alkalmas eljárások hiányosak, a mintaelőkészítés, a vizsgálni kívánt komponens elkülönítésre alkalmazott eljárás vagy az analitikai módszer további fejlesztésre szorul.

A tervezett, esszenciális és nyomelemtartalom meghatározások céljára a szakirodalomban számos módszert találunk: NAA (neutron-aktivációs analízis), AAS (atomabszorpciós spektrometria), AFS (atomfluoreszcens spektrometria), ICP-AES (induktív csatolású plazma atomemissziós spektrometria), PIXE (proton-indukált röntgenemissziós analízis), TXRF (totálreflexiós röntgenfluoreszcencia spektrometria), ICP-MS (induktív csatolású plazma tömegspektrometria), ASV (anódos stripping voltammetria); Kucera [4], Katoh [5], Tandon [6], Chen [7], Zeisler [8][9], Zhuang [10], Schnabel [11], Witkowska [12], Chen [13], Lievens [14], Behne [15], Zhang [16], Chai [17][18], Burguera [19], Reykdal [20], Faa [21], Rahil-Khazen [22][23], Caroli [24], Ochs [25], Ren [26], Milman [27], Carvalho [28][29], Czarnowski [30][31], Kubala-Kukus [32], Magalhaes [33], Wang [34].

Májminták elemtartalmának publikált értékeit hasonlítjuk össze az 1. táblázatban, amelyek legnagyobb hányadát elhunytakból származó szövetminták elemzésével állapították meg.

	Rahil-Khazen és mtsai	Caroli és és mtsai	Subramanian és mtsai		Schumacher és mtsai	Lyon és mtsai	Roider és mtsai
Al	0,35	1,4	—	—	—	0,19	0,39
Ba	0,004	0,06	—	—	—	—	—
Cd	1	0,8	1,8	1,5	1,2	—	—
Co	0,14	—	—	—	—	—	—
Cu	5,9	4,1	5,4	4,9	4,7	6,1	—
Fe	218	—	272	231	—	207	—
Mn	1,2	0,8	1,3	1,2	—	1,6	—
Sr	0,02	0,02	—	—	—	—	—
Zn	60	53	67	56	67	59	—

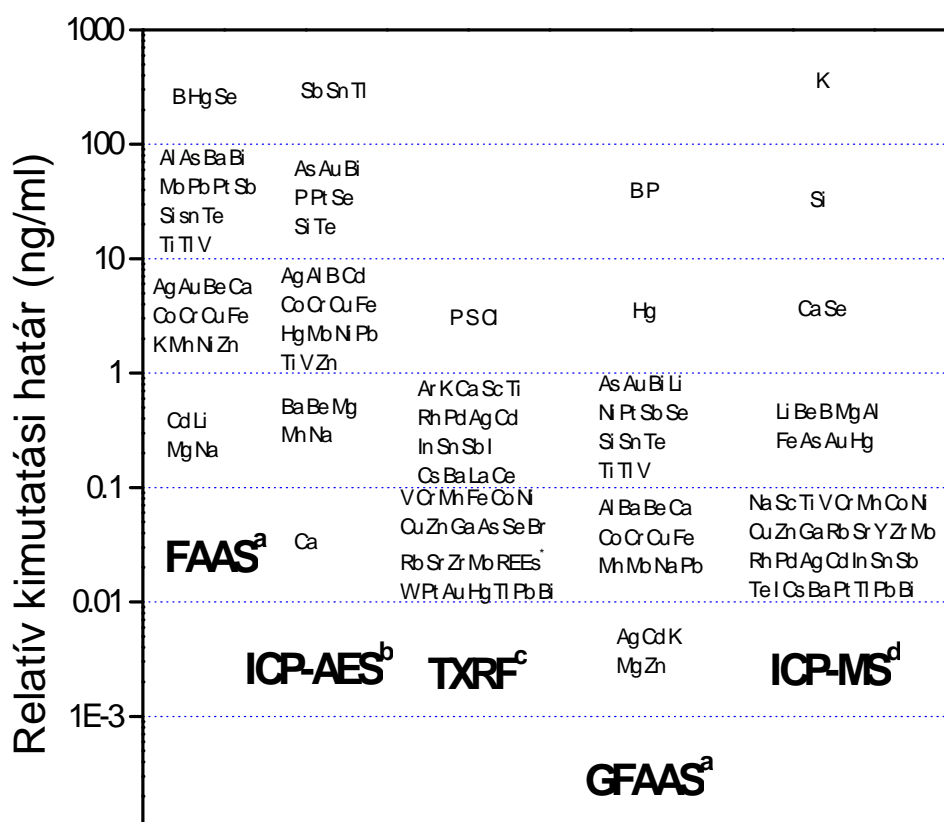
	Benes és mtsai	Shiraishi és mtsai	Schroeder és mtsai	Julshamm és mtsai	Saltzman és mtsai		Benedetti és mtsai
Al	0,66	—	—	—	—	—	—
Ba	0,15	0,009	<0,003	—	—	—	—
Cd	1,7	—	—	1,5	1,6	1,1	1,5
Co	—	—	—	—	—	—	—
Cu	5,8	—	—	—	5,4	6,5	—
Fe	—	—	—	157	—	—	—
Mn	1,4	—	—	—	—	—	—
Sr	0,05	—	0,02	—	—	—	—
Zn	58	—	—	62	37	65	—

	Orlowski és mtsai	Llobet és mtsai	Torra és mtsai	Tiran és mtsai	Xia és mtsai	Norheim és mtsai	Ringdal és mtsai
Al	—	—	—	—	—	—	—
Ba	—	—	—	—	—	—	—
Cd	2	0,8	1	0,9	1,6	—	—
Co	—	—	—	—	—	—	—
Cu	4,4	—	—	—	7,9	5,9	—
Fe	—	—	—	—	—	—	261
Mn	—	1,2	—	—	1,1	—	—
Sr	—	—	—	—	—	—	—
Zn	46	45	42	—	54	70	59

1. táblázat

Nyomelemek átlagkoncentrációja a májban
(mg/kg nedves anyagra vonatkoztatva) irodalmi adatok alapján
[23] [24] [35] [36] [37] [38] [39] [40] [41] [42] [43]
[44] [45] [46] [47] [48] [49] [50]

Az 1. ábra a különböző atomspektroszkópai módszerekkel elérhető relatív kimutatási határokat tartalmazza, adataiból következik, hogy a multielemes technikák közül csak az ICP-MS és TXRF módszer kínál a kitűzött feladat végrehajtásához elégséges kimutatási határokat. A résztvevő intézmények műszerparkjában hozzáférhető AAS készüléket (egyelemes kiépítésű), láng és elektrotermikus atomizálással, a mérési eredmények szűrőpróbaszerű ellenőrzésére használtuk fel.



1. ábra

A különböző atomspektroszkópai módszerekkel elérhető relatív kimutatási határok ng/ml-ben kifejezve

II. Kutatási eredmények

Kutatásunk három területet ölelt fel: megfelelő mintaelőkészítési eljárások kidolgozását, analitikai módszerfejlesztést és az eredmények értékelését.

1. Mintaelőkészítés

Az utóbbi évtizedben a totálreflexiós röntgenfluoreszcens spektrometria jelentősége nagymértékben megnövekedett az elemanalízist tekintve. Ez egy olyan multielemes módszer, mely alkalmas mikro- és nyomanalízisre folyadék és szilárdfázisú mintákból egyaránt. Számos előnye közül legfontosabbak a kis térfogatú illetve tömegű mintaigény, a kimutatási határ jelentős csökkenése más technikákhoz képest, valamint a mennyiségi meghatározást sokszor megnehezítő mátrixeffektus elhanyagolható volta.

A biopsziás mintavételre a BM Központi Kórházban került sor, melyhez Hepafix-Menghini egyszer használatos májbiopsziás szettet használtak. A mintavétel után a nyert minta egy részét szövettani elemzésre használták, a maradékot azonnal lemérték, majd fagyasztva szárították a kémiai analízis céljára.

A fagyasztva szárított minták tömege 0.5-2.0 mg közötti érték volt.

A mindennapi analitikai gyakorlatban megszokotthoz képest sokkal kisebb mintamennyiségek álltak rendelkezésünkre, így speciális eljárást alkalmaztunk a mintaelőkészítésre. Zárt rendszerű mikrohullámú feltárási módszert és mintaelőkészítési eljárást dolgoztunk ki mikromennyiségű (0,5-2 mg) szövetminták TXRF, ICP-MS és ET-AAS elemzéséhez. Feltárási módszereket és mintaelőkészítési eljárást dolgoztunk ki biológiai minták, különböző feldolgozottsági fokú barnaalga készítmények és kereskedelmi forgalomban kapható jódtartalmú étrend-kiegészítő termékek összes jódtartalmának TXRF és ICP-AES elemzéséhez. Eredményeink alapján a jódtartalom TXRF módszerrel történő meghatározásához ajánljuk az ammónia oldattal történő extrakciós mintaelőkészítést.

2. Mikroanalitikai módszerek fejlesztése

2.1. Analitikai teljesítményjellemzők meghatározása

Az élő betegekből diagnosztikai céllal vett biopsziás minták megismételhetetlenek és egyediek. Emiatt a módszerfejlesztéshez modellként sertésmájat alkalmaztunk. Kereskedelmi forgalomban kapható emberi fogyasztásra szánt sertésmájából készített preparátum segítségével határoztuk meg a néhány mg tömegű biopsziás minták feltárási javasolt körülményeit. Sertésmáj mintákat liofilizálás után homogenizáltunk és a homogenizátumból ismételt bemérések segítségével meghatároztuk a mérési módszereket jellemző

analitikai teljesítőképességet: kimutatási határok, reprodukálhatóság. A homogenizált minták elemzése során kapott értékeket a következőkben az egyedi minták elemzésének jellemzésére használtuk fel. A sertésmájat felhasználtuk az acél biopsziás tűből eredő esetleges szennyezés becslésére is, melyre azért volt szükség, mert a mintavételhez nem használható műanyagból készített eszköz. Ez esetben nem homogenizátumból indultunk ki hanem a +4°C-on tárolt májból a biopsziás tű segítségével néhány mg tömegű részmintákat vettünk. Tanulmányoztuk a tű és a szövet kontaktusidejének hatását a szennyeződésre. Kimutattuk, hogy a szokásos néhány perces kontaktus során módszereinkkel szennyezést nem tudunk meghatározni. Bár az orvosi gyakorlatban nem fordul elő a több órás kontaktus, kísérleteket végeztünk a tűt alkotó fémek oldódásának vizsgálatára 0,1-24 órás kontaktusidő tartományban, a szennyeződéstől mentesen alkalmazható maximális kontaktusidő meghatározása céljából. Elhunytak májának különböző szegmentumaiból származó, biopsziás tűvel vett minták felhasználásával megvizsgáltuk a különböző elemek májon belüli eloszlását jellemző értékeket és a mérések mintavételből eredő bizonytalanságát [51]. Tanulmányoztuk a különböző oldószerek hatását az ICP-MS intenzitásokra a következő elemek esetében: Cr, Ni, Co, Cu, Zn, As, Se, Cd, Hg és Pb. Vizsgáltuk a szerves oldószerek hatását a plazmában képződő molekula-ionok koncentrációjára ütközési cella alkalmazásával és alkalmazása nélkül. TXRF spektrometria alkalmazásával meghatároztuk, mikromól mennyiségben szintetizált, DTPA csoportot tartalmazó nociceptin derivátumok In^{3+} kötőképességét [52].

2.2. A mérési módszer hitelesítése

2.2.1. Független módszerrel való vizsgálat

Az összes májbiopsziás mintát megmértünk TXRF és ICP-MS módszerrel is: A két technikával nyert mérési adatok a mérés hibahatárán belül megegyeztek. Néhány elem esetében a vizsgálatot csak az egyik technikával lehetett elvégezni kimutatási határ közeli koncentrációk, illetve vonalkoincidencia miatt. A jódtartalom meghatározására alkalmas módszer kidolgozása során, a TXRF elemzés eredményeinek alapján felhívtuk a figyelmet a jódtartalom meghatározása során fellépő, a foszfor atomvonalával történő részleges vonalátfedésből adódó elemzési hiba lehetőségére [53].

2.2.2. Referenciaminta vizsgálata

A mérés pontosságának vizsgálata NIST 1577a Bovine Liver CRM, marhamájából készült hiteles referenciaminta analízisével történt. A mért értékek jó egyezést mutatnak a hitelesített értékekkel:

Koncentráció µg/g	Hitelesített érték	TXRF-fel mért	ICP-MS-sel mért
Na	2430	-	2280
Mg	600	-	595
Mn	9,9	11,8	9,6
Fe	194	193	188
Co	0,21	-	0,23
Cu	158	156	148
Zn	128	127	125
Mo	3,5	3,7	3,5

2. táblázat

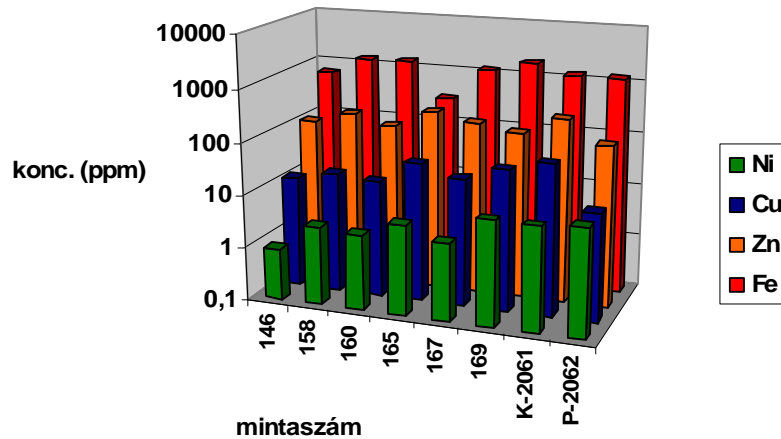
3. Emberi májbiopszias minták elemzési eredményeinek értékelése

Vizsgálatainkhoz 52 egyénből származó mintát kaptunk, a mintákat három csoportba osztottuk: egészséges (normál) és két beteg csoportba. A betegségek szempontjából nézve a különböző gyulladáshoz tartozó kórképek tartoznak a (DI) csoportba, valamint a cirrhosis (az alkoholos cirrhosis is beleértve), fibrosis, hepatitis C fertőzés okozta májkárosodás. A (DII) csoportban előforduló fő kórképek: hepatosteatososis, steatososis-cirrhosis.

3.1. Normál csoport

Az emberi szervezet számára esszenciális elemek (Cu, Fe, Zn, Mn, Se) esetében kis koncentrációbeli eltérések tapasztalhatóak, míg a nem esszenciális elemek (Ni, Pb, Cd, Sn, Sb) esetében a mért koncentrációértékek már sokkal szélesebb határok között mozognak. A mért Cu, Zn, Fe koncentrációk jó egyezést mutatnak az irodalmi adatokkal

A **2. ábrán** a Ni, Cu, Zn, Fe koncentrációértékeket láthatjuk a normál csoport mintáiban; az ordináta tengely logaritmikus beosztású.

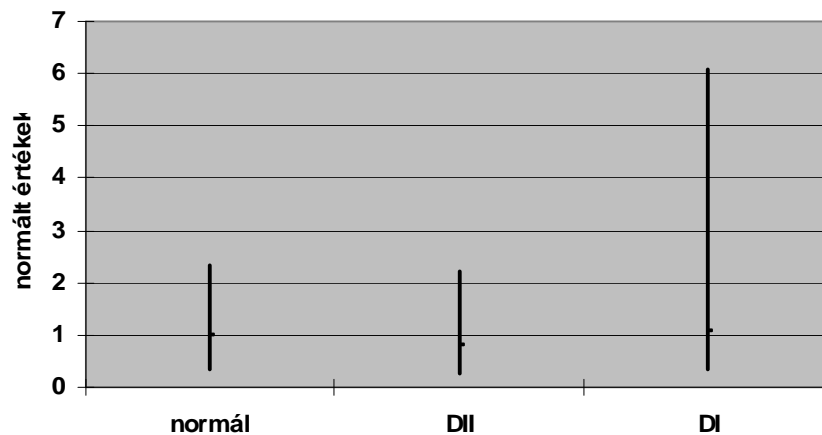


2. ábra

3.2. Összehasonlítás a beteg csoportokkal

A **3. ábrán** a három csoportban mért Cu koncentrációk eloszlása látszik. A koncentrációadatok a normál csoport átlagára normált értékek. Az átlagok: a normál csoportban 30,4 ppm, a DII-ben 24,0 ppm, a DI-ben 32,5 ppm.

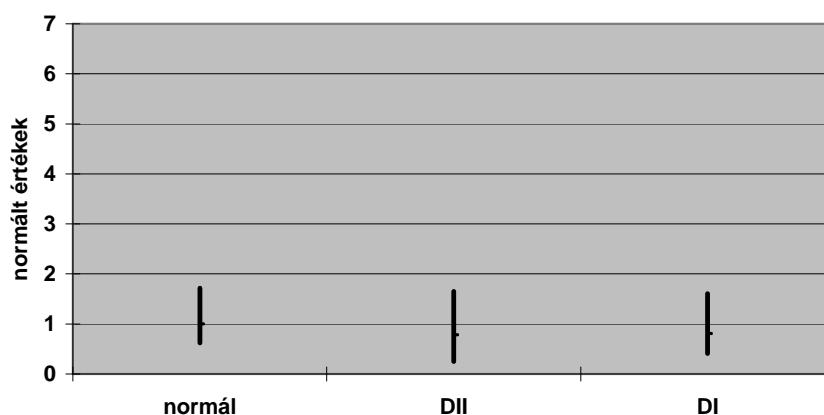
A DI csoportban mért Cu-koncentrációk átlaga jó egyezést mutat a többi csoportéval, s az irodalmi adatokkal, de nagy változékonyság észlelhető a csoporton belül az egyes minták Cu tartalmát illetően.



3. ábra

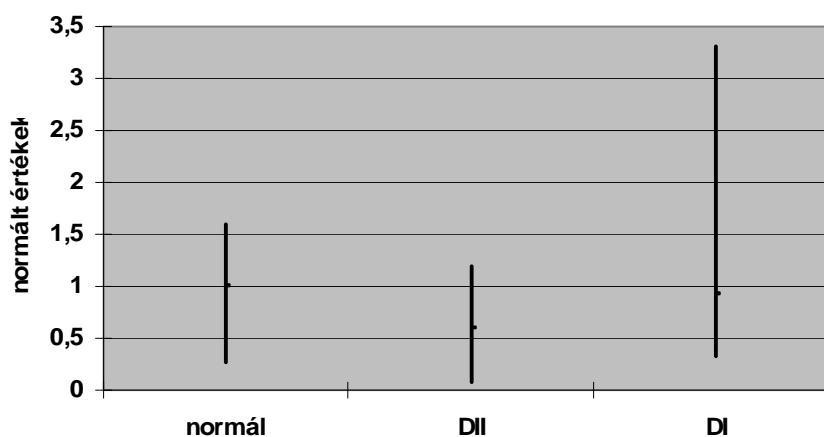
A **4. ábrán** a három csoportban mért Zn koncentrációk eloszlása látszik. A koncentrációadatok a normál csoport átlagára normált értékek. Az átlagok: a normál csoportban 169 ppm, a DII-ben 131 ppm, a DI-ben 136 ppm.

A három csoportban mért koncentrációértékek hasonlóak - bár a beteg csoportokban az átlag a normálnál alacsonyabb - és jó egyezést mutatnak az irodalmi adatokkal.



4. ábra

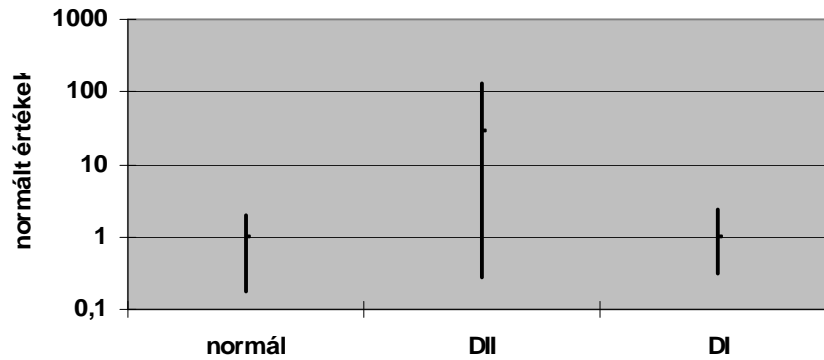
A **5. ábrán** a három csoportban mért Fe koncentrációk eloszlása látszik. A normál és DI csoportokban mért Fe átlagkoncentráció nagyon közel esik egymáshoz - és megegyezik az irodalmi adatokkal - de a DI csoportban az egyes minták Fe tartalma között jóval nagyobb eltérések tapasztalhatók. A DII csoport mintáinak Fe koncentrációja viszont jóval kisebb a másik két csoportban mért értékeknél.



5. ábra

A **6. ábrán** a három csoportban mért Ni koncentrációk eloszlása látszik. A koncentrációadatok a normál csoportra átlagára normált értékek. Az átlagok: a normál csoportban 5,4 ppm, a DII-ben 156,7 ppm, a DI-ben 5,4 ppm.

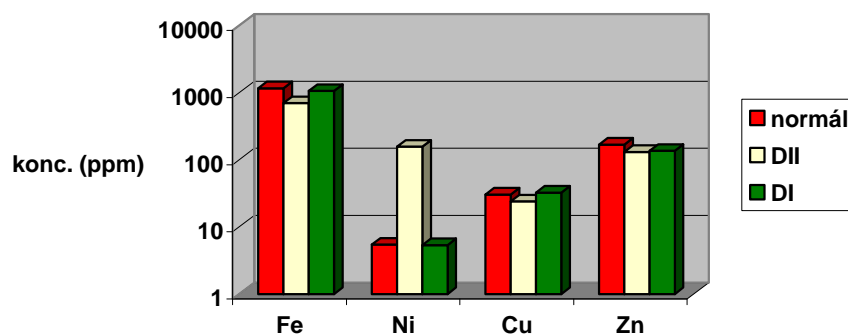
A normál és a DI csoportban mért Ni koncentrációk átlaga megegyezik. Ezzel szemben a DII csoportban mért értékek több esetben, akár két nagyságrenddel nagyobbak a másik két csoportbeli Ni koncentrációknál.



6. ábra

A 7. ábra a különböző csoportokban mért átlagos nyomelem-koncentrációkat mutatja be, az ordináta logaritmikus osztású.

A Cu és Zn koncentrációk átlagértékei gyakorlatilag megegyeznek a 3 csoportban és megfelelnek az irodalmi adatoknak is. A Fe és Ni koncentrációkat illetően, pedig a már feljebb is említett különbségeket láthatjuk.



7. ábra

3.3. A steatosis és a nikkell akkumuláció közötti összefüggés

Vizsgálataink elsődleges célja a nyomelemek meghatározása volt a biopsziával vett májmintákban, illetve lehetséges összefüggések keresése az egyes nyomelemek koncentrációja valamint az orvosi diagnózis között.

A betegeket a máj ultrahangos képe valamint a szövettani vizsgálat eredménye alapján három csoportba osztottuk: egészségesekre, valamint a krónikus diffúz májbetegségeken belül DI és DII csoportra. Minden – a hisztológiai eredmények alapján - steatosisos illetve steatosis-cirrhosisos beteg a DII csoportba került.

A többi mért elemmel ellentétben a Ni meglepően egyenlőtlen eloszlást mutatott a mintákban: A Ni és a Fe átlagkoncentrációja szignifikáns különbségeket mutatott a csoportok között. A Ni átlagkoncentrációja a DII csoportban több mint tízszer magasabb értékeket vett fel mint mind a normál, mind a DI csoportban. A Fe-tartalom éppen ellentétes mintázatot mutatott a csoportok között, A DII csoportban az átlagos Fe-koncentráció hozzávetőleg a fele volt a másik két csoportban meghatározott átlagértéknek. A többi elem esetében $p \leq 0,05$ szignifikancia-szintnél nem lehetett kimutatni különbséget a csoportok között.

A mérések legnagyobb bizonytalansági tényezője a biopsziás mintavétel során bekövetkező szennyezés lehetősége. Szakirodalmi ajánlások alapján rozsdamentes acél tűk alkalmazása vérvételkor például Cr-mal, Mn-nal, Fe-sal, Co-tal és Ni-lel szennyezheti a vérmintákat. Ezen elemek meghatározásakor megfelelő alternatíva lehet polipropilén intravénás kanülök alkalmazása a mintavételhez.

A mi esetünkben rozsdamentes acélból készült tűt használtak a biopsziához, s ezt nem lehetett polipropilén vagy teflon anyagúra kicserélni. Éppen ezért ellenőrző méréseket végeztünk az adatok torzításának elkerülése érdekében. A mintavételhez használt eszközöket (egyszer használatos biopsziás tű, szike), a felhasznált vegyszereket (cc.HNO₃, nagy tisztaságú H₂O) is analizáltuk. A szike krómaccélból készült, s egyáltalán nem tartalmazott Ni-t. A biopsziás tűk anyaga standard összetételű rozsdamentes acél volt (Cr:Fe:Ni 18:72:9 arányú ötvözet). Ez arra enged következtetni, hogy a mintavétel során bekövetkező szennyezés alkalmával a Ni mellett Cr előfordulása is „kötelező”.

Méréseink során magas Ni koncentrációt kizárólag a steatosisos mintákban mértünk. Sem az egészséges, sem a DI, DII csoportok esetében nem volt magas a minták Cr-tartalma (nem volt szignifikáns különbség az egészséges valamint a beteg minták Cr-tartalma között), ami arra enged következtetni, hogy nem történt jelentős Ni szennyezés a mintavétel, illetve mintaelőkészítés során. Valamint nem lehetett korrelációt kimutatni a minták Ni és Cr tartalma között ($r=0,1254$, $p=0,340$), ami ugyancsak a szennyezés lehetőségét zárja ki.

Ezen kísérletek alapján a zsíryanagcsere zavara és a Ni akkumuláció között összefüggés feltételezhető.

III. A kutatásban résztvevők személyében beállt változások és a költségtervtől történt eltérések indoklása

1. Személyi változások

A kutatási program tervezetéhez képest, a pályázatban még nem szerepelt két kutató kolléga csatlakozott a kutatáshoz: Kovács Béla egyetemi docens a Debreceni Egyetemről ICP-MS vizsgálatok végzésével (Ennek oka, hogy az eredetileg tervezett helyszínen a MÁFI laboratóriumában az ICP-MS készülék tartósan meghibásodott.), Bencs László tudományos munkatárs az MTA Szilárdtestfizikai Kutató Intézetéből atomabszorpciós mérések kivitelezésével a kutatás kezdetétől érdemben hozzájárultak a projekt végrehajtásához, elősegítették annak sikeres megvalósítását.

2. Költségtervhez képest történt változások

A támogatás folyósítása 2004. szeptemberében kezdődött a 2004. év elejére tervezetthez képest és 2005-ben az éves támogatás 10%-a került központi elvonásra. Részben emiatt, részben a projekt előrehaladása során felemrült igények és a személyi változások miatt átcsoportosítások történtek:

A személyi juttatások tervezett összegét nem használtuk fel (felhasználásunk a teljes támogatás kevesebb, mint 8%-a volt), a konferencia részvétel tervezett költségeit túlléptük. A személyi költségek és a konferenciák dologi költségei közötti átcsoportosítás indoka: A résztvevő kutatók a kutatói megbízás keretét nem használták fel, ehelyett konferencia részvételük támogatását kérték, utazási költség vagy napidíj és regisztrációs díj formájában. A konferencia részvétel költségek megemelkedését indokolta, hogy eredményeink élénk nemzetközi érdeklődést váltottak ki, és többek közt meghívást kaptunk a 5th ISTEH konferenciára, amelynek témaköre a nyomelemek eloszlása és szerepe az emberi szervezetben, kutatási témánkhoz messzemenően illeszkedett.

Az egyéb költségeket (3.3. rovat) túlléptük, a befektetett eszközökre tervezett összeget nem használtuk fel teljes egészében. Ennek oka, hogy a tervezés során nem tudtuk, a hazai konferenciák költségei az egyéb költségeket terhelik: a Budapesten megrendezett 2005 Winter Conference on Plasma Spectrochemistry és, a 11th TXRF (a szervező bizottság tagjaként vettem részt) konferencia részvételi költsége nem a tervezetben szereplő helyen, hanem a 3.3. alatt jelent meg. Fontosnak tartottuk, hogy az analitikai kémia szakmai fórumain túlmenően orvosi konferenciákon is ismertessük eredményünket. Dr. Szebeni Ágnes hazai konferenciákon, előadóként történő részvételének költségei jelentek meg többletként az egyéb költség rovatban. Továbbá az egyéb költségekhez hozzáadódott a kutatás megkezdéséhez és folyamatosságához feltétlenül szükséges (szintén előre, de nem a 3.3. alá tervezett), a kereskedelmi

forgalomban nem beszerezhető, csak egyedi megrendelésre legyártott, egyszer használatos TXRF plexi mintahordozó lapok gyártási költsége. A minták többszöri Debrecenbe szállítása és az ICP-MS mérésekben történő részvétel költségei nem voltak előre láthatóan tervezhetők, hiszen a budapesti helyszínen váratlanul, már a projekt megvalósítása közben hibásodott meg hosszabb időre az ICP-MS készülék.

IV. Összefoglalás

Kutatásunk során emberi májminták nyomelemanalízisét végeztük el és összefüggéseket kerestünk a mért elemkoncentrációk és a különböző kórképek között.

Munkánk szempontjából kiemelkedő fontosságú, hogy a mindennapi analitikai gyakorlatban megszokotthoz képest sokkal kisebb mintamennyiségek álltak rendelkezésünkre, így speciális eljárásokat dolgoztunk ki a mintaelőkészítésre. A biopsziás minták megismételhetlensége miatt sertésmájából készített preparátum segítségével határoztuk meg a néhány mg tömegű biopsziás minták feltárásának javasolt körülményeit. Meghatároztuk a mérési módszereket jellemző analitikai teljesítőképességet: kimutatási határok, reprodukálhatóság.

A Ni és a Fe átlagkoncentrációja szignifikáns különbségeket mutatott a csoportok között. A Ni átlagkoncentrációja a DII csoportban több mint tízszer magasabb értékeket vett fel, mint mind a normál, mind a DI csoportban. A Fe-tartalom éppen ellentétes mintázatot mutatott a csoportok között. A Fe átlagkoncentrációja a DII csoportban szignifikánsan kisebb volt a többi csoportban meghatározottnál. A többi elem esetében $p \leq 0,05$ szignifikancia-szintnél nem lehetett kimutatni különbséget a csoportok között.

Egyszeri, megismételhetetlen mintavételről van szó, ezért is került sor a különböző ellenőrző mérések elvégzésére az esetleges kontamináció elkerülése érdekében. Ennek során a mintavételhez használt eszközöket, a felhasznált vegyszereket is analizáltuk, valamint a feltáró rendszer memóriaeffektusait is megvizsgáltuk. Mindezen mérések alapján a mintavétel és a mintaelőkészítés során való Ni szennyezésre utaló nyomot nem találtunk.

Az élő betegekből diagnosztikai céllal vett biopsziás minták induktív csatolású plazma tömegspektrometria (ICP-MS) és totál-reflexiós röntgenfluoreszcens spektrometria (TXRF) alkalmazásával történő elemzési adatainak felhasználásával kimutattuk, hogy a vizsgált betegek közül kizárólag a steatosiban szenvedők csoportjában jelentősen megemelkedett májszöveti nikkell koncentráció mérhető, melyről elsőként közöltünk publikációt nemzetközi tudományos folyóiratban [54].

Az OTKA Iroda útmutatása szerint a tudományos eredményeket csak a legjelentősebb formában tüntettem fel: a közlemények feltöltött jegyzékéből töröltem a kutatás korábbi szakaszában megjelent konferencia publikációkat.

Irodalomjegyzék

- [1] Szebeni Á., Tolvaj Gy., Zalatnai A., A máj ultrahang attenuációja és egyes hisztopatológiai paraméterek közötti összefüggés vizsgálata, Hepatológia Konferencia 2004, Bükkfürdő 2004. február 12-14.
- [2] Menghini G., One-second needle biopsy of the liver, *Gastroenterology* 35:190-199, 1958
- [3] Schaff Zs., A májbiopszia jövője, Hepatológia Konferencia 2004, Bükkfürdő 2004. február 12-14.
- [4] Kucera J., Soukal L., Determination of As, Cd, Cu, Hg, Mo, Sb, and Se in biological reference materials by radiochemical neutron activation analysis, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry-Articles* 168 (1): 185-199, Feb 1993
- [5] Katoh Y., Sato T., Yamato Y., Determination of multielement concentrations in normal human organs from the Japanese, *Biological Trace Element Research* 90 (1-3): 57-70 Win 2002
- [6] Tandon L., Kasarskis EJ., Ehmann WD., Elemental imbalance studies by INAA on extraneural tissues from amyotrophic-lateral-sclerosis patients, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry-Articles* 195 (1): 13-19 Aug 1995
- [7] Chen CY., Lu XL., Zhang PQ., Hou XL., Chai ZF., Subcellular distribution patterns of twenty four elements in the human liver samples studied by molecular activation analysis, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 244 (1): 199-203 Apr 2000
- [8] Zeisler R., Ostapczuk P., Stone Sf., Stoeppler M., Effective tools for the trace-element characterization of tissues - neutron-activation analysis and voltammetry, *Science of the Total Environment* 140: 403-410 Nov 1993
- [9] Zeisler R., Greenberg RR., Determinations of subnanomole elemental levels by NAA and their possible impact on human health related issues, *Biological Trace Element Research* 71-2: 283-289 Win 1999
- [10] Zhuang GS., Cheng YD., Tan MG., Wang YS., Zhi M., Study of the correlation of trace-elements in human hair and internal organs by NAA, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry-Articles* 149 (2): 305-315 Jun 1991
- [11] Schnabel C., Herpers U., Michel R., Loer F., Buchhorn G., Willert HG., Changes of concentrations of the elements Co, Cr, Sb and S in tissues of persons with joint implants, *Biological Trace Element Research* 43-5: 389-395 Fal 1994
- [12] Witkowska E., Szczepaniak K., Biziuk M., Some applications of neutron activation analysis: A review, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 265 (1):141-150 Jun 2005
- [13] Chen CY., Zhao JJ., Gao YX., Chai ZF., Tissue contents and intracellular distribution of selenium and iodine in human tissues studied by neutron activation analysis, *Chemia Analytyczna* 50 (1):169-178 2005
- [14] Lievens P., Versieck J., Cornelis R., Hoste J., Distribution of trace-elements in normal human liver determined by semiautomated radiochemical neutron-activation analysis, *Journal of Radioanalytical Chemistry* 37 (1): 483-496 1977
- [15] Behne D., Jurgensen H., Determination of trace-elements in human-blood serum and in standard reference material bovine liver by instrumental neutron. activation analysis, *Journal of Radioanalytical Chemistry* 42 (2): 447-453 1978

-
- [16] Zhang PQ., Chen CY., Horvat M., Jacimovic R., Falnoga I., Logar M., Li B., Zhao JJ., Chai ZF., Element content and element correlations in Chinese human liver, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 380 (5-6): 773-781 Nov 2004
- [17] Chai ZF., Mao XY., Hu ZH., Zhang ZY., Chen CY., Feng WY., Hu SM., Hong OY., Overview of the methodology of nuclear analytical techniques for speciation studies of trace elements in the biological and environmental sciences, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 372 (3): 407-411 Feb 2002
- [18] Chai ZF., Zhang ZY., Feng WY., Chen CY., Xu DD., Hou XL., Study of chemical speciation of trace elements by molecular activation analysis and other nuclear techniques, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 19 (1): 26-33 Jan 2004
- [19] Burguera M., Burguera JL., Rondon C., Garcia MI., de Pena YP., Villasmil LM., Determination of bismuth in biological tissues by electrothermal atomic absorption spectrometry using platinum and tartaric acid as chemical modifier, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 16 (10): 1190-1195 2001
- [20] Reykdal O., Thorlacius A., Cadmium, mercury, iron, copper, manganese and zinc in the liver and kidney of the Icelandic lamb, *Food Additives and Contaminants* 18 (11): 960-969 Nov 2001
- [21] Faa G., Scioto R., Farci AMG., Callea F., Ambu R., Congiu T., Vaneyken P., Cappai G., Marras A., Costa V., Desmet VJ., Iron concentration and distribution in the newborn liver, *Liver* 14 (4): 193-199 Aug 1994
- [22] Rahil-khazen R., Bolann BJ., Ulvik RJ., correlations of trace element levels within and between different normal autopsy tissues analyzed by inductively coupled plasma emission spectrometry (ICP-AES), *Biometals* 15 (1): 87-98 2002
- [23] Rahil-Khazen R., Bolann BJ., Myking A., Ulvik RJ., Multi-element analysis of trace element levels in human autopsy tissues by using inductively coupled atomic emission spectrometry technique (ICP-AES), *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 16 (1):15-25 2002
- [24] Caroli S., Alimonti A., Dellefemmine P., Petrucci F., Senofonte O., Violante N., Menditto A., Morisi G., Menotti A., Falconieri P., Role of inductively coupled plasma atomic emission-spectrometry in the assessment of reference values for trace-elements in biological matrices, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 7 (6): 859-864 Sep 1992
- [25] Ochs A., Heck D., Kratt C., Maier KP., Proton-induced X-ray emission for trace-elements analysis in human-liver biopsies, *Gastrointestinal Endoscopy* 30 (2): 147-148 1984
- [26] Ren MQ., Thong PSP., Kara U., Watt F., Single cell elemental analysis using nuclear microscopy, *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms* 150 (1-4): 179-184 Apr 1999
- [27] Milman N., Laursen J., Podenphant J., Asnaes S., Trace elements in normal and cirrhotic human-liver tissue. 1. Iron, copper, zinc, selenium, manganese, titanium, and lead measured by X-ray-fluorescence spectrometry, *Liver* 6 (2): 111-117 Apr 1986
- [28] Carvalho ML., Brito J., Barreiros MA., Study of trace element concentrations in human tissues by EDXRF spectrometry, *X-ray Spectrometry* 27 (3): 198-204 May-Jun 1998
- [29] Carvalho ML., Marques AF., X-ray fluorescence spectrometry: applications in trace elements studies in human tissues from patients with cirrhosis, *X-ray Spectrometry* 30 (6): 397-402 Nov-Dec 2001
- [30] D. von Czarnowski, Denkhau E., Lemke K., Determination of trace element distribution in cancerous and normal human tissues by total reflection X-ray fluorescence analysis, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* V. 52 I. 7: 1047-1052, 1997

-
- [31] Benninghoff L., D. von Czarnowski, Denkhaus E., Lemke K., Analysis of human tissues by total reflection X-ray fluorescence. Application of chemometrics for diagnostic cancer recognition, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* V. 52 I. 7: 1039-1046, 1997
- [32] Kubala-Kukus A., Banas D., Braziewicz J., Majewska U., Mrówczyński S., Pajek M., Determination of concentration distribution of trace elements near the detection limit, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* V. 56 I. 11: 2037-2044, 2001
- [33] Magalhaes T., Bohlen von A., Carvalho ML., Trace elements in human cancerous and healthy tissues from the same individual: A comparative study by TXRF and EDXRF, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, article in press, 2006
- [34] Wang JY., Zhu HD., Ouyang L., Liu YQ., Wang XY., Huang Z., Wang NF., Liu HS, Determination of trace Cs, Th, U in ten kinds of human autopsy tissues by ICP-MS, *Spectroscopy and Spectral analysis* 24 (9): 1117-1120 Sep 2004
- [35] Schumacher M., Bosque M. A., Domingo JL., Corbella J., Lead and cadmium concentrations in autopsy tissues of inhabitants of Tarragona Province, Spain, *Trace Elem. Med.* 10: 115-119, 1993
- [36] Subramanian KS., Meranger JC., Burnett RT., Kidney and liver levels some major, minor and trace elements in two Ontario communities, *Sci. Total Environ.* 42: 223-235, 1985
- [37] Schumacher M., Domingo JL., Llobet JM., Corbella J., Determination of copper, chromium, and zinc in human autopsy tissues of inhabitants of northeast Spain, *J. Occup. Med. Toxicol.* 1: 361-369, 1992
- [38] Roeder G., Drasch G., Concentration of aluminium in human tissues-investigations on an occupationally non-exposed population in Southern Bavaria (Germany), *Trace Elem. Elect.*, 16: 77-86, 1999
- [39] Saltzman BE., Gross SB., Yeager DW., Meiners BG., Gartside PS., Total body burdens and tissue concentrations of lead, cadmium, copper, zinc, and ash in 55 human cadavers, *Environ. Res.* 52: 126-145, 1990
- [40] Julshman K., Andersen KJ., Svendsen E., Ringdal O., Egholm M., Trace elements intake in the Faroe islands III. Element concentrations in human organs in populations from Bergen (Norway) and the Faroe islands, *Sci. Total Environ.* 84: 25-33, 1989
- [41] Llobet JM., Granero S., Schumacher M., Corbella J., Domingo JL., Biological monitoring of environmental pollution and human exposure to metals in Tarragona, Spain II. Levels in autopsy tissues, *Trace Elem. Electr.* 15: 44-49, 1998
- [42] Ringdal O., Andersen KJ., Svendsen E., Julshman K., trace elements and myocardial infarction, an autopsy study from western Norway, *ActaPharmacol. Toxicol.* 59: 358-360, 1986
- [43] Torra M., To-Figueras J., Rodamilans M., Brunet M., Corbella J., Cadmium and zinc relationships in the liver and kidney of humans exposed to environmental cadmium, *Sci. Total Environ.* 170: 53-57, 1995
- [44] Orłowski C., Piotrowski JK., Kubow M., The levels of cadmium, zinc and copper in the renal cortex and liver of the inhabitants of the copper basin, *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 9: 225-263, 1996
- [45] Benes B., Jakubec K., Smid J., Spevackova V., Determination of thirty-two elements in human autopsy tissue, *Biol. Trace Elem. Res.* 75: 195-203, 2000
- [46] Xia L., Liang S., Zhou X., Xia Y., concentration of trace elements in human tissues in Hunan, China, and relation of ratios of mutual metals to human health, *Trace Elem. Med.* 6: 114-118, 1989
- [47] Shirashi K., McInroy JF., Simultaneous multi-element analysis of human tissues by inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Trace Elem. Exp. Med.* 4: 191-202, 1991

[48] Lyon TDB., Fell GS., Halls DJ., Clark J., McKenna F., Determination of Nine Inorganic Elements in Human Autopsy Tissue, *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 3: 108-118, 1989

[49] Schroeder Ha., Tipton IH., Nason AP., trace metals in man: Strontium and barium, *J. Chron. Dis.* 25: 491-517, 1972

[50] Norheim G., Aaseth J., Essential trace elements in human liver in Norway: Cu, Zn, Mo, Se, *J. Oslo City Hosp.* 30: 105-112, 1980

[51] Varga I., Assessment of the contamination problems resulting from the use of stainless steel needles in liver biopsies by total reflection X-ray fluorescence and inductively coupled plasma mass spectrometry, *Spectrochim. Acta PartB*, 61: 1201-1204, 2006

[52] Ligeti M., Gündüz Ö., Magyar A., Kató E., Rónai ZA., Vita C., Varga I., Hudecz F., Tóth G., Borsodi A., Benyhe S., Synthesis and biological studies of nociceptin derivatives containing the DTPA chelating group for further labeling with therapeutic radionuclides, *Peptides* 26: 116-159, 2005

[53] Varga I., Iodine determination in dietary supplement products by TXRF and ICP-AES spectrometry, *Microchem. J.* 85: 127-131, 2007

[54] Varga I., Szebeni Á., Szoboszlai N., Kovács B., Determination of trace elements in human liver biopsy samples by ICP-MS and TXRF: hepatic steatosis and nickel accumulation, *Anal. Bioanal. Chem.* 383: 476-482, 2005