

Platina(II) komplexek felvételének vizsgálata egyedi sejt induktív csatolású plazma tömegspektrometriával egészséges és rákos sejtvonalakban

Analysis of platinum(II) complex uptake by single cell inductively coupled plasma mass spectrometry in healthy and cancerous cell lines

Szabó Julianna Flóra^a, Andócs Gábor^b, Kóvágó Csaba^c, Berlinger Balázs^d

^aÁllatorvostudományi Egyetem, Állathigiéniai, Állomány-egészségtani Tanszék és Mobilklinika, állatorvos hallgató

^bÁllatorvostudományi Egyetem, Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék, tudományos munkatárs

^cÁllatorvostudományi Egyetem, Gyógyszertani és Méregtani Tanszék, tudományos munkatárs

^dÁllatorvostudományi Egyetem, Állathigiéniai, Állomány-egészségtani Tanszék és Mobilklinika, tudományos főmunkatárs, berlinger.balazs@univet.hu

Kulcsszavak

C26,
4T1,
rákos sejtvonalak,
MDCK,
sejtfragmentáció

Keywords

C26,
4T1,
carcinoma cell lines,
MDCK,
cell fragmentation

Absztrakt

Az SC ICP-MS mérési módszer új lehetőségeket biztosít a daganatellenes hatású platinaszármazékok sejtfelvételének vizsgálatában. Kísérleteinkben három sejtvonalat exponáltunk különböző koncentrációjú ciszplatinnal és karboplatinral 24 órán keresztül, majd egy Perkin Elmer NexION2000 ICP-MS készülékkel mértük a fémkomplexek sejtek általi felvételét és a sejtek közötti eloszlását. Eredményeink azt mutatták, hogy a különböző sejtvonalak különböző mértékben vették fel a platint azonos ciszplatin koncentrációnak való kitettség esetén. Emellett a ciszplatin koncentrációjának növelése következetesen nagyobb platinafelvételt eredményezett a sejtekben. Amikor az expozíció meghaladott egy bizonyos szintet, minden ciszplatinnal kezelt sejtkultúrában jelentős sejthalál következett be, ami sejtfragmentációhoz vezetett. A karboplatinral végzett kísérletek eredményei ellentmondásosak voltak, ezért további kísérletekre van szükség karboplatin nagyobb koncentrációinak alkalmazásával. Eredményeink több korábbi tanulmányt megerősítenek, és rávilágítanak az SC ICP-MS módszerben rejlő lehetőségekre a rákkutatásban.

Abstract

The SC ICP-MS measurement method is a novel approach for investigating the cellular uptake of platinum derivatives with antitumor activity. In our experiments, we exposed three cell lines to various concentrations of cisplatin and carboplatin for 24 hours. We used a Perkin Elmer NexION2000 ICP-MS instrument to measure the uptake of these metal complexes by the cells and their distribution among the cells. Our findings revealed that different cell lines absorbed platinum at varying levels when exposed to the same concentration of cisplatin. Additionally, increasing the concentration of cisplatin consistently resulted in higher platinum uptake by the cells. However, when the exposure exceeded a certain level, all cell cultures treated with cisplatin exhibited significant cell death, which led to cell fragmentation. The results from experiments involving carboplatin have been inconsistent, indicating that further experiments with higher concentrations of carboplatin are necessary. Our findings corroborate several previous studies and underscore the potential of the SC ICP-MS method in cancer research.

1. Bevezetés

Az alábbi két alfejezetben az ICP-MS és SC ICP-MS technikákat mutatjuk be egy kicsit nagyobb terjedelemben, mint ami egy ilyen cikknél szokásos, igyekezve kielégíteni a mérési technikák részletei iránt jobban érdeklődő olvasók igényeit is.

1.1 Az ICP-MS-ről

Az induktív csatolású plazma tömegspektrometria (angolul inductively coupled plasma mass spectrometry – ICP-MS) napjaink egyik leggyakrabban használt elemanalitikai technikája. Alkalmazása kiterjed az élelmiszer és környezeti analitikára; félvezető, nukleáris, petrokémiai és gyógyszeriparra; klinikai és törvényszéki gyakorlatra, valamint geológiai kutatásra. Az ICP-MS technika lényege, hogy induktív csatolású plazmával (ICP) – mint nagy hőmérsékletű ionforrással – ionokat állítunk elő a tömegspektrométer (MS) számára. Számos előnnyel rendelkezik, akár más elemanalitikai technikákkal összehasonlítva is. Sok elem egyidejű meghatározását teszi lehetővé, kiváló kimutatási határokkal rendelkezik (ppt és ppq tartományokról beszélhetünk), információt szolgáltat az izotóp-összetételről, továbbá nagyon széles lineáris tartománnyal rendelkezik (egyes gyártók 12 nagyságtrendről nyilatkoznak), ami fő- és nyomelemek egyidejű meghatározását is lehetővé teszi. Természetesen vannak kihívásai is. Kihívást jelenthet a minta összes oldott anyag tartalma. A hígítás erre ugyanakkor a legtöbb esetben megoldást jelent, miután a kiváló kimutatási határoknak köszönhetően

nem romlik jelentősen a módszer teljesítőképessége. A mai készülékekben már a generált aeroszol argon gázzal történő on-line hígításra is lehetőség van, mielőtt az még elérné a plazmát. A mátrix-hatás hígítással, belső standard elemek alkalmazásával, a mérendő elem(ek) vagy a mátrix elválasztásával, esetleg alternatív mintabeviteli módszerekkel (pl. hidrid generálás) minimálisra csökkenthető. Szintén kihívást jelenthet, hogy bizonyos elemek ionizációja a plazmában nem teljes, amit bizonyos nagy mennyiségben jelenlévő mátrix elemek tovább csökkenthetnek. Az arzén és szelén ionizációs hatásfokát például úgy növelhetjük, hogy az oldatainkhoz (a kalibráló, vak és referencia oldatokat is beleértve) széntartalmú vegyületet, leggyakrabban valamilyen alkoholt adagolunk (pl. etanol). Erre a célra használhatunk a ködkamrába bejuttatott metán-argon keveréket vagy széndioxid-argon keveréket is. A viszonylag nagy mennyiségben adagolt széntartalom aztán kiegyenlíti a különböző mintákban jelenlévő széntartalmak közötti különbségeket is, így az arzén és szelén már minden mintában közel azonos hatásfokkal ionizálódik [1-3].

A legnagyobb kihívást a spektrális interferenciák jelentik, amik jellemzően izobárok, poliatomos ionok és kettős töltésű ionok formájában jelentkeznek. Az ICP-MS technikában a spektrális zavarások csökkentésére számos lehetőség kínálkozik. Alternatív mintabeviteli módszerek és az analit/mátrix szeparáció megoldást jelenthetnek. Ezek ugyanakkor időigényesek, sokszor nagyon összetett mintaelőkészítést igényelnek és drasztikusan csökkenthetik a meghatározható elemek számát. Alkalmazhatunk

matematikai korrekciókat, amik bizonyos zavarások csökkentésére kiválóan alkalmasak lehetnek, ugyanakkor másokat egyáltalán nem vesznek figyelembe. Kettős fókuszálású ICP-MS készülékekkel elég nagy felbontást érhetünk el, de nagyobb felbontás esetén (akár két nagyságrenddel) is csökken az érzékenység, másrészt bizonyos spektrális átfedések elválasztására (ilyen például a MoO^+ a Cd^+ -on) még a legnagyobb elérhető felbontás sem alkalmas. A kétezres évek elejétől terjedtek el az ütközési és/vagy reakciócellás készülékek. Az ütközési cellánál a kvadrupól tömeganalizátor előtti cellába (ami lehet oktapól, hexapól vagy kvadrupól is) hélium gázt vezetünk. A hélium molekulák a nagyobb méretű poliatomos ionokkal nagyobb valószínűséggel ütköznek, azokat jobban lelassítják, mint a mérendő elem ionjait, így azok a kisebb kinetikus energiájuk alapján jórészt elválaszthatók. Ebben a folyamatban ugyanakkor a mérendő elem ionjainak jó része sem jut tovább a tömeganalizátorba, ezért érzékenység csökkenéssel kell számolnunk. A reakciócellába vezetett gáz – amely leggyakrabban hidrogén, oxigén vagy ammónia – vagy az interferáló ionnal reagál, és így a mérendő ion az eredeti tömegénél detektálható, vagy a mérendő ionnal reagál és a keletkező új ion tömegénél történhet a detektálás. A reakciók ugyanakkor bonyolultak és viszonylag nehezen kontrollálhatók [1-3].

1.2 Az SC ICP-MS-ről

Az egyedi sejt (single cell – SC) ICP-MS technika az egyedi részecske (single particle – SP) ICP-MS technikából fejlődött ki, amely alkalmas fémalapú részecskék gyors kimutatására a legkülönbözőbb mátrixokban és alkalmazási területeken. Az SP ICP-MS legfontosabb jellemzője, hogy lehetővé teszi a pozitív töltésű ionok diszkrét impulzusainak időfelbontású detektálását és mérését mikroszekundumos (μs) adatgyűjtési sebességgel. Amikor egy nanorészecske belép a plazmába, teljesen ionizálódik, ionkitörés keletkezik, amely ICP-MS-sel detektálható. Míg a hagyományos ICP-MS folyamatos jelet mér, az SP ICP-MS diszkrét jeleket vizsgál: egy nanorészecske egy ionkitörést eredményez, a keletkező jel intenzitása a részecske méretével (nm), az impulzusok száma pedig a részecskekoncentrációval (részecske/ml) függ össze. Az SP ICP-MS kulcsa a gyors, folyamatos mérés, amely a lehető legkisebbre csökkenti annak esélyét, hogy egynél több részecske egyszerre kerüljön kimutatásra és biztosítja, hogy a részecskék mindegyike megszámlálásra kerüljön. Ezeket a feladatokat olyan ICP-MS készülékekkel lehet elvégezni, amelyek gyors elektronikát tartalmaznak és kiküszöbölik a mérések között a kvadrupól tömeganalizátor stabilizációs idejét. A következők megfontolása elengedhetetlen a pontos elemzésekhez: a nem folyamatos detektálás "kihagy" részecskéket; míg hosszú mintavételi időkkel több részecske ionjait érzékeli a rendszer ugyanabban a mérési ablakban. Mindkettő pontatlan részecskeméret és részecskeszám eredményekhez vezet. Egy másik fontos tényező a mintában jelenlévő részecskekoncentráció. A részecskekoncentráció növekedésével nő annak az esélye, hogy több részecske egyidejűleg ionizálódik. Az így

létrejött ionkitörés több részecskéből keletkezik, és nem lesz reprezentatív a részecskeméretre nézve, mivel a kapott részecskekoncentráció a valóságosnál kisebb, a részecskeméret pedig nagyobb lesz. Nagy részecskekoncentrációjú mintákban a hígítás a legjobb módja annak, hogy minimalizáljuk annak esélyét, hogy több részecske egyszerre érkezzon a plazmába [4].

A sejtsuszpenziót az SP ICP-MS-hez hasonlóan egy arra célzottan kifejlesztett SC ICP-MS mintabeviteli rendszeren keresztül porlasztják a plazmába: ahogy egy sejt belép a plazmába, a benne lévő fémtartalom ionizálódik és a keletkező ionkitörést az ICP-MS detektálja, a korábban leírt adatgyűjtési koncepciót alkalmazva. Az SC ICP-MS-elemzés során minden egyes sejtet egyedi egységnek vagy részecskének tekintünk, amely saját ionkitörést hoz létre. Az SP ICP-MS-hez hasonlóan az optimális eredmények elérése érdekében bizonyos feltételeket figyelembe kell venni a sejtek és a tápközegben oldott anyagok koncentrációját illetően. A sejtkoncentrációk esetében előnyös, ha az 100 000 sejt/ml körül van, így minimalizálható az esélye, hogy több sejt egyidejűleg kerüljön detektálásra. Bizonyos esetekben, például amikor a tápközegben nagy a mérendő elem koncentrációja, abban szuszpendált nanorészecskék vannak jelen, vagy sok komponensű a tápoldat; szükséges lehet, hogy a sejteket elkülönítsük a tápoldattól, és friss médiumban, vagy olyan izotóniás oldatban szuszpendáljuk újra, amely nem tartalmazza a mérendő elemet. Ez segít elkerülni a magas oldott háttérkoncentrációt, az interferenciákat vagy a felesleges részecskéket, amelyek elfedhetik az egyes sejtek által generált jelet [4].

Fontos megjegyezni, hogy a kvadrupól tömeganalizátorral rendelkező ICP-MS készülékek esetén a nagyon gyors detektálás mellett is csak egyetlen elem mérésére van lehetőség minden egyes részecskéből vagy sejtből. Több elem egyidejű mérését csak még gyorsabb detektálásra képes repülési idő tömeganalizátorral (angolul time of flight – TOF) rendelkező ICP-MS készülékekkel lehet megoldani.

1.3 A kutatás célja és előzményei

A jelen cikkben bemutatott kutatásban az elsődleges célunk az volt, hogy SC ICP-MS módszer segítségével vizsgáljuk különböző sejtek platina komplex (ciszplatín és karboplatin) felvételét. Olyan sejtvonalakat használtunk, amelyek jól lemodellezik a platinavegyületekre érzékeny ráksejtek (C26, 4T1), valamint a platina komplexek toxicitásnak legjobban kitett egészséges vesehámszövetek (MDCK) viselkedését. Ez a tanulmány jelenti az SC ICP-MS módszer első alkalmazását az állatgyógyászati onkológiában, és – reményeink szerint – megalapozza a humán terápiában egyre inkább elterjedt egyéb Pt-komplexek, valamint a közelmúltban kifejlesztett tumor-ellenes fémkomplexek állatgyógyászati szempontból történő vizsgálatát.

A különböző daganatos betegségek nem csak a humán gyógyászatban, hanem az állatorvoslásban is egyre nagyobb jelentőséggel bírnak, különösen társállatok

esetében, ahol a vezető halálokok közé sorolhatók [5]. Idős állatokban a rák előfordulásának gyakorisága gyakran az emberekét is felülmúlja: epidemiológiai kutatások szerint a 10 év feletti kutyák 40-50%-a ilyen jellegű betegség miatt pusztul el [6]. A daganatos betegségek felülreprezentáltsága a társállatokban részben magyarázható azok kiugróan magas élettartamával vadon élő rokonaikhoz képest. A szelektív tenyésztés hatása világosan látszik: egyes fajták esetében egyértelmű genetikai hajlam figyelhető meg valamely daganattípusra, pl. berni pásztor – szisztémás és malignus hisztiocitózis, ír farkaskutya – osteosarcoma, boxer – mastocytoma [7]. Nem tekinthetünk el az emberekre és társállataikra egyidejűleg ható külső tényezőktől sem, pl. légszennyezés, növényvédőszeres és egyéb karcinogén behatások [8]. Ezek ismeretében nem meglepő, hogy a kutyákat érintő rákbetegségek nemcsak az emberi rákbetegségekhez hasonló változatosságot mutatnak, de gyakran ugyanazok a genetikai mutációk vezetnek a kialakulásukhoz és tovább fejlődésükhöz, valamint hasonlóan reagálnak az egyes kemoterapeutikumokra is [9].

A ciszplatint az állati szervezetben az egyik legaktívabb daganatellenes szer, amellyel kiemelkedik az egyéb platinaszármazékok közül. Kutyában osteosarcoma, húgyhólyag átmeneti sejtes karcinómája, laphámrák, melanoma, mesothelioma, carcinomatosis és csírasejtes daganatok ellen is hatásosnak bizonyult. Macskában a standard dózis hirtelen jelentkező, súlyos tüdőviznyőhöz és fulladáshoz vezethet, ezért náluk a szer erősen ellenjavalt. Lógyógyászatban közvetlenül az érintett szövetbe juttatva alkalmazzák laphámrák és szarkoidok kezelésére [10].

A karboplatint a ciszplatintól fejlesztették ki azzal a céllal, hogy kiküszöböljék annak számos mellékhatását hasonló tumorellenes aktivitás mellett. Csökkent toxicitása és viszonylagos költséghatékonyasága miatt szélesebb körben használt szer, mint az elődje. Az American Animal Hospital Association (AAHA) legfrissebb (2016-os) onkológiai irányelvei már csak a karboplatint javasolják, mint rákellenes platinavegyületet. A ciszplatinhoz hasonlóan hatásos osteosarcoma, melanoma, valamint számos szarkóma és karcinóma ellen, beleértve az emésztőtraktus, a bűzmirigy és a prosztatata karcinómáit [11].

A platinaszármazékok az atipikus alkilálószeresek közé tartoznak. Tumornövekedést gátló és citotoxikus hatásuk elsősorban a DNS-szintézis gátlása által valósul meg. A ciszplatint a citoplazmába való bejutásakor aktiválódik azáltal, hogy a klorid-csoportjait vízmolekulákra cseréli ki. Az így keletkező molekula erősen elektrofil, így affinitással rendelkezik a fehérjék szulfhidril-csoportjaihoz és a nukleinsavak nitrogén-donor atomjaihoz. Mivel két kötőhellyel is rendelkezik, egy-egy ciszplatint molekula egyszerre két purinbázist köt meg, amellyel szálon belüli és szálak közötti keresztkötéseket alakít ki a DNS-ben. A DNS térbeli konformációja ettől megváltozik, amely akadályozza a genetikai információ másolását, és végül apoptózishoz (mely a programozott sejthalál egyik változata) vezet [12]. A ciszplatint terápiás használata során számos mellékhatással kell számolnunk, amelyek közül

vesekárosító hatása különösen komoly klinikai problémát jelent. Ezt mai tudásunk szerint elsősorban a ciszplatint vesetubulus hámsejtekben való akkumulációja váltja ki, amely megzavarhatja új erek képződését a vesében és a proximális tubulusok károsodásához vezethet, elsősorban oxidatív stressz indukciója és a pro-inflammatorikus faktorkok túltermelése által. A sejtekben való felhalmozódásban kiemelt szerepet játszik a szerves kationok aktív elválasztásáért felelős OCT2 transzporter ciszplatinhoz való affinitása, amely serkenti annak felvételét [13]. A karboplatinban a két klorid-csoport helyét egy ciklobután-dikarboxilát csoport veszi át, amely nagyobb kémiai stabilitást kölcsönöz a molekulának vizes közegben. A ciszplatinnal ellentétben nem lép kölcsönhatásba a vesetubulus-hámsejtek OCT2 receptoraival, így nem jut be nagy mennyiségben a tubulushámsejtekbe. Ez jelentősen csökkenti a vesekárosító hatását a ciszplatinhoz képest. Ugyanezen farmakokinetikai tulajdonságok miatt viszont a szervezetből való ürülése szinte kizárólag a glomeruláris filtrációs rátán, vagyis a páciens vesefunkciójának épségén múlik, ami felveti a felhalmozódás miatti toxikózis veszélyét. A helyzetet súlyosbítja, hogy a karboplatin ciszplatinnal nagyobb kémiai stabilitása csökkenti annak affinitását a DNS nukleofil kötőhelyeihez, ami nagyobb dózisok alkalmazását teszi szükségessé [14].

Sejtek Pt komplex felvételének mennyiségi meghatározása régóta fontos kérdés a tudományos közösségben. A hagyományos módszer szerint a Pt-vegyülettel kezelt sejteket egy bizonyos inkubációs időszakot követően enzimatisz emésztésnek vagy savas feltárásnak vetették alá. Ezután valamilyen elemanalitikai technikákat alkalmaztak [pl. atomabszorpciós spektroszkópiát (AAS), induktív csatolású plazma atomemissziós spektrometriát (ICP-AES) vagy ICP-MS-t], hogy meghatározzák a Pt-koncentrációt a teljes sejtkultúrában. Ezzel a módszerrel azonban lehetetlen megmérni az egyes sejtek által felvett Pt mennyiségét, és a sejtek közötti Pt-koncentráció jelentős eltéréseit sem lehet kimutatni. A közelmúltbeli fejlesztések eredményeként a kereskedelmi forgalomban is megjelentek olyan SC ICP-MS készülékek, amelyekkel lehetséges fémkoncentrációk mérése az egyes sejtek szintjén [4]. Az SC ICP-MS technikát már korábban sikeresen alkalmazták különböző típusú és eredetű egysejtű rendszerek, például emberi [15-17] vagy más emlős sejtvonalak [18], baktériumok [19,20], élesztők [21,22] vagy egysejtű algák [23-26] elemzésére: azok ásványi elemtartalmának és eloszlásának meghatározására [15], ezüst nanorészecskék [16] felvételének, króm specicszek [17] eloszlásának, kvantumpontok [18], nyomelemek [21] és szelén [22] koncentrációjának, arany nanorészecskék [24], valamint rézalapú algacidokkal [25] történő kezelést követően a réz koncentrációjának meghatározására.

Stephan és munkatársai SC ICP-MS-t alkalmaztak ciszplatint felvételének mérésére ciszplatint érzékeny A2780, valamint ciszplatint-rezisztens A2780/CP70 petefészekrák sejtvonalakban. A sejteket 30 µM ciszplatint koncentrációnak tették ki 1, 2, 4 és 8 óráig keresztül. A várákázásoknak megfelelően a ciszplatint-érzékeny A2780 sejtek idővel

fokozott ciszplatinfelvételt mutattak a ciszplatin-rezisztens A2780/CP70 sejtekhez képest [27]. Corte Rodríguez és munkatársai 2017-es tanulmányukban ugyan ezeken a sejteken azt vizsgálták, hogy különböző ciszplatin-koncentrációk hogyan befolyásolják a sejtválaszt [28]. Lim és munkatársai 2022-es tanulmányukban tovább vizsgálták a ciszplatin, a karboplatin és az oxaliplatin különböző sejtek általi felvételét [29]. Galé és munkatársai elsőként használták a módszert ciszplatinfelvétel mérésére nem csak teljes sejtekben, hanem izolált sejtmagokban is [30].

2. Anyag és módszer

2.1 Használt sejtvonalak, azok tenyésztése és előkészítése a mérésekhez

A C26 egér colorectális karcinóma egy évtizedek óta használt sejtvonal, amelynek 1975-ös megalkotása fontos mérföldkő volt a karcinogén-indukált daganatok kutatásában. Jelenleg elsősorban a daganatos betegségekkel járó senyveség, valamint a colorectális karcinómák terjedésének mechanizmusait vizsgálják ennek a sejtvonalnak a segítségével, de szintén kiváló modell az egyes tumor-ellenes szerek teszteléséhez. Több in vivo kísérlet igazolja a C26 platinavegyületekkel szembeni érzékenységet [31], amely ideális tesztalannyá teszi a jelen kutatásban.

A 4T1 egér emlőkarcinóma sejtvonal figyelemre méltó tumorigenitással és invazivitással rendelkezik, és képes spontán áttétet képezni az emlőmirigyben lévő elsődleges tumorból, többek között nyirokcsomókba, vérbe, májba, tüdőbe, agyba és csontba. Jelenleg a tripla-negatív emlőrák legfontosabb kísérleti modellje; a daganatok proliferációja, az áttétképzés, de még a sejtek molekuláris jellemzői is nagyfokú hasonlóságot mutatnak a humán tripla negatív emlőkarcinómával [32]. Ezen kívül bizonyítottan jól reagál a ciszplatinra és a karboplatinra, amelyeknek módosított formáit is tesztelték már ezen a sejtvonalon [32, 33].

Az MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) sejtvonal egy spániai vesetubulus-sejtjeiből származik, és kulcsfontosságú in vitro modellként szolgál különböző gyógyszerészeti tanulmányokban. Az MDCK-sejtek képesek szoros, polarizált hámrétegek kialakítására, így kiválóan alkalmasak az epithelium által alkotott védelmi vonal és a sejtpolaritás tanulmányozására, ami nélkülözhetetlen a hámsejtek metabolikus és transzportfolyamatainak megértéséhez. Ezen kívül a bélhámsejtekhez hasonló felszívó képességgel rendelkeznek, így megbízhatónak bizonyultak a gyógyszer-transzport mechanizmusok vizsgálatában is [34]. Az eredetükből adódóan a platinavegyületek toxicitásának vizsgálatában is fontos szerepet kaptak az évek során: több kutatócsoport vizsgálta ezeken a sejteken a ciszplatin vesekárosító hatásának mechanizmusait.

A sejtenyésztés során sejtfenntartó médiumként Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose táptalajt (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) és 10%-os borjúsavót (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Németország) használtunk, amelyhez 1%-nyi antibiotikum-antimikotikum oldatot (Corning, Glendale, AZ, USA) adagoltunk. A mérések előtt a sejteket 25 cm²-es standard

sejtenyésztő flaskában (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Svájc) tartottuk, majd standard hatlyukú lemezekre (Sarstedt, Nümbrecht, Németország) helyeztük át és 24 órán át inkubáltuk. Ezután ciszplatin 1 mg/ml és karboplatin 10 mg/mL infúzióval (Accord Healthcare Inc., Raleigh, NC, USA) exponáltuk a sejteket 24 órán keresztül, 10, 20 és 40 μ M koncentrációszinteken. A letapadt kultúrákat tripszin-EDTA (0,25 % tripszin – 2,21 mM EDTA) oldattal (Corning, Glendale, AZ, USA) oldottuk le a lemez aljáról, majd friss sejtfenntartó médiumban szuszpendáltuk, végül 1000 rpm sebességgel 2 percig centrifugáltuk Hermle Z3000K standard laboratóriumi centrifugával (Hermle LaborTechnik GmbH, Németország). A leülepedett sejteket ezután 10 ml PBS (phosphate buffered saline) oldatban reszuszpendáltuk, amelyet Purite Select Fusion 160 BP víztisztító berendezés (SUEZ Water Technologies & Solutions, Treviso, PA, USA) által előállított nagytisztaságú vízből (18,2 M Ω /cm), valamint nátrium-klorid (NaCl), kálium-klorid (KCl), kálium-dihidrogén-foszfát (KH₂PO₄) és nátrium-dihidrogén-foszfát (Na₂HPO₄) (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) sókból állítottuk össze; majd ismét centrifugáltuk. Az SC ICP-MS mérések előtt PBS hozzáadásával nagyságrendileg 100 000 sejt/ml koncentrációt állítottunk be. Az SC ICP-MS mérések során a sejtek fragmentálódásának megakadályozására irányuló kísérletben a sejteket glutáraldehiddel fixáltuk, miután ciszplatinnal exponáltuk őket. A glutáraldehidet 0,75 tömegszázalékos koncentrációban adtuk a sejtsuszpenzióhoz a második PBS-ben történő reszuszpendálás során [35]. Ezt követően egy további centrifugálási és reszuszpendálási lépést végeztünk.

2.2 Mikroszkópos elemzés, sejtszámlálás és SC ICP-MS mérés

Az exponált tenyészetek morfológiai jellemzőit Olympus gyártmányú, IX70 típusú inverz fáziskontraszt-mikroszkóppal vizsgáltuk, s a sejtekről Euromax CMax Pro kamerával képeket készítettünk. A sejtszámot az első kísérletek során Bürker-kamrával, a későbbiekben egy Merck gyártmányú Scepter™ 3.0 típusú kézi sejtszámlálóval monitoroztuk.

A sejtek platina(II) komplex-felvételét és a komplex sejtek közötti megoszlását PerkinElmer NexION2000 (PerkinElmer, Shelton, USA) ICP-MS-sel mértük, amelyet egyedi sejt meghatározáshoz alkalmas mintabeviteli rendszerrel (CytoNeb porlasztó, kvarc Single Cell ködkamra), valamint mérő- és értékelő szoftverrel (Syngistix) szereltünk fel. Erről további részletek az 1. táblázatban találhatóak. A készüléket a mérések előtt 0, 1, 2, 4 ng/ml koncentrációkban platínát tartalmazó PBS oldatokkal kalibráltuk, amelyeket 1000 mg/l-es platina standard oldatból (VWR Chemicals, Radnor, PA, USA) állítottunk elő. A mintabeviteli hatékonyság ellenőrzéséhez és a sejtkoncentráció kalibrációjához arany nanorészecskék 1,1 x 10⁷ részecske/ml koncentrációjú kolloid oldatából (PerkinElmer, Shelton, USA) 100-szoros hígítással készült PBS oldatot használtuk. A mintabevitel során a mintákat 50 ml-es üveg főzőpoharakba töltöttük ki és ESP típusú mágneses keverővel (VELP Scientifica Srl, Usmate, Olaszország) kevertük.

Minden előkészített sejtszuszpenzió esetén három párhuzamos SC ICP-MS mérést végeztünk.

1. táblázat: Az SC ICP-MS mérőkészülék alapbeállításai és az SC ICP-MS mérési módszer főbb paraméterei

Paraméter	Érték
Mintabevitel térfogatára	10 µL/min
RF teljesítmény	1600 W
Porlasztó gáz (argon) térfogatára*	0,3 – 0,35 L/min
Porlasztási segédgáz (argon) térfogatára	0,7 L/min
Monitorozott platina izotóp	195Pt
Integrációs ablak (az egyes sejtek platina tartalma által generált analitikai jel „gyűjtésének” időtartama)	50 µs
Mérési idő (amедig a platina csúcsokat „gyűjtjük”)	60 s
Mintabeviteli hatékonyság**	35 – 50%
Kimutatási határ**	8 – 21 ag*** Pt/ részecske vagy sejt

* Mérési naponként változott a készülék optimalizálásától függően.

** Mérési naponként változott, elsősorban a készülék érzékenységétől és a háttértől függően.

*** ag: attogram, 10⁻¹⁸ gramm

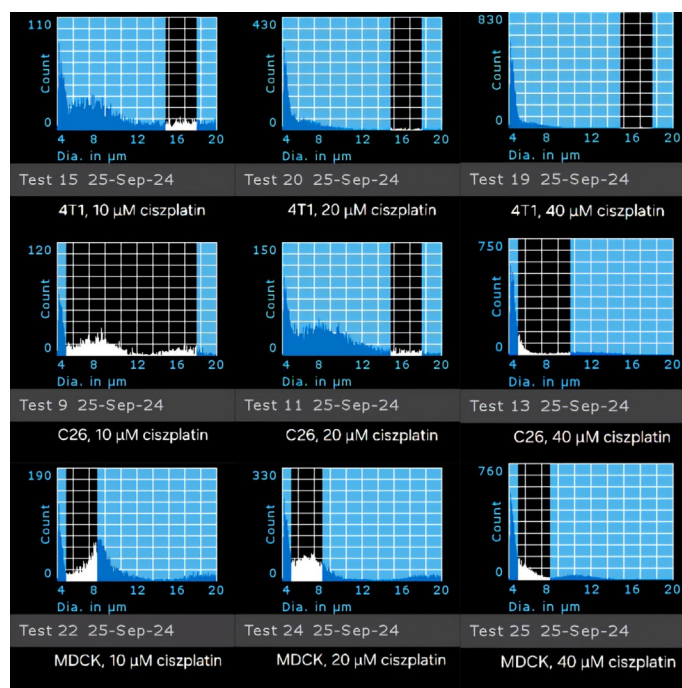
3. Eredmények és értékelésük

3.1 Az SC ICP-MS módszer alkalmazhatósága állati sejtvonalak platina-komplex felvételének mérésében

A ciszplatinnal végzett kezdeti kísérletek mérési eredményeinek áttekintésekor nyilvánvalóvá vált, hogy az SC ICP-MS növekvő ciszplatin expozícióknál növekvő sejtkoncentrációkat észlelt. Ez a jelenség részben magyarázható a nagyobb expozíciós szintekkel, amelyek következtében több sejtben éri el a felvett Pt mennyisége a Pt kimutatási határát. A szoftver által számított sejtszámok azonban gyakran irreálisan nagyok voltak, különösen a 40 µM ciszplatinnal kezelt kultúrák esetében. A kontrollmintákon végzett Bürker-kamrás sejtszámlálás megerősítette, hogy az SC ICP-MS által meghatározott koncentrációk pontatlanok voltak a nagyobb expozíciós szinteknél.

A készülék működési elvének ismeretében arra a következtetésre jutottunk, hogy a sejtfragmentáció a legvalószínűbb magyarázat a fenti megfigyelésekre. Annak érdekében, hogy megakadályozzuk a sejtek szétesését az SC ICP-MS mintabevitel során, a sejtkultúrákat glutáraldehiddel fixáltuk az irodalmi ajánlásokat követve [35]. Ebben az ellenőrző kísérletben nem találtunk jelentős különbséget a mért sejtszámokban az azonos ciszplatin koncentrációnak kitett, közel azonos számú sejtet tartalmazó minták között. Ez arra utal, hogy a fragmentáció valószínűleg már a Pt-vegyületekkel történt expozíció során bekövetkezett. A mikroszkopos vizsgálatok később

megerősítették ezt a feltételezést. A sejtek számának SC ICP-MS-sel mért látszólagos növekedése a Pt citotoxikus hatásának tulajdonítható. Így a mért sejtszám az ép sejtek és a sejtfragmentumok összegét jelenti. Az utolsó kísérleteinkben Scepter™ 3.0 kézi sejtszámlálót használtuk az intakt sejtek és a sejtfragmentumok megkülönböztetésére. Ez a készülék különböző mérettartományokban számolja a részecskéket, és hisztogramok segítségével megjeleníti az egyes méretfrakciókban lévő részecskék számát (1. ábra).



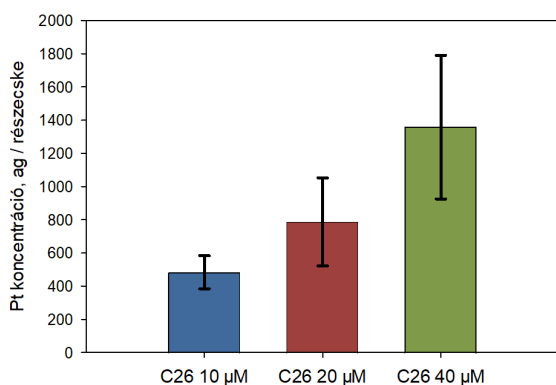
1. ábra: Ciszplatinnal kezelt sejtkultúrák sejtszámlálási eredményei hisztogramokon ábrázolva

A ciszplatin C26 sejtek általi felvételét három különböző koncentráció szinten, teljesen független kísérletekben vizsgáltuk úgy, hogy minden kísérletet friss sejtkultúrával kezdtünk. Egy esetben, amikor a sejteket fixáltuk, a minta előkészítése is eltért. A független kísérletek eredményeit a 2. táblázatban foglaltuk össze.

2. táblázat: SC ICP-MS mérések eredményei (n=3), ciszplatin felvétele C26 sejtek által független kísérleti napokon

Ciszplatin koncentráció	Kísérleti nap	Leggyakoribb tömeg, ag Pt/sejt	Átlag tömeg, ag Pt/sejt	Medián tömeg, ag Pt/sejt	Kimutatási határ, ag Pt/sejt	Sejt-koncentráció (részecske/ml)
10 µM	1. nap	110	372 ± 63	210	10	6,2E+04 ± 7,8E+03
	2. nap*	8	521 ± 34	208	8	1,5E+05 ± 1,7E+04
	3. nap	115	559 ± 29	315	15	3,5E+04 ± 1,9E+03
20 µM	1. nap	210	583 ± 34	310	10	2,3E+05 ± 1,7E+04
	2. nap*	208	1087 ± 25	408	8	4,2E+05 ± 2,0E+04
	3. nap	315	692 ± 45	415	15	1,5E+05 ± 8,6E+03
40 µM	4. nap	318	924 ± 43	418	18	5,3E+05 ± 1,8E+04
	2. nap*	208	1789 ± 35	408	8	5,1E+05 ± 4,1E+04
	3. nap	415	1363 ± 134	515	15	4,1E+05 ± 4,6E+04

* A sejteket glutáraldehiddel fixáltuk



2. ábra: C26 sejtek által átlagosan felvett Pt mennyiségek és azok szórása különböző mérési napokon (n=3)

A független kísérletek során gyűjtött adatokat alapos elemzésnek vetettük alá különböző statisztikai módszerek alkalmazásával. Ezeket az elemzéseket azonban korlátozta a kis mintanagyság, ami inkonzisztens következtetésekhez vezetett. Végül az adatok kiértékelésekor egyszerű összehasonlításokat végeztünk. Eredményeink egyértelmű kapcsolatot mutatnak a ciszplatin expozíció és a Pt felvétel nagysága között a C26 sejtekben. A nagyobb ciszplatin koncentrációk következtében a Pt sejtekben való mennyiségének megnövekedését eredményezték minden egyes kísérleti napon. Amikor kétszeres platina-expozíció hatásait vizsgáltuk, azt figyeltük meg, hogy a sejtekben – valamint a sejtfragmentumokban 20 µM vagy nagyobb ciszplatin-expozíció esetén – a platina mennyisége megduplázódott, ami erős dózis-válasz kapcsolatra utal. A kimutatott sejtek számában azonban jelentős eltérés volt tapasztalható, amit elsősorban a sejtek fragmentálódása eredményezett. Az ugyanazon a kísérleti napon SC ICP-MS-sel végzett párhuzamos kísérletek eredményei jó egyezést mutattak, a relatív szórás (RSD) jellemzően 10 % alatt maradt. A különböző mérési napokon azonban jelentősebb különbségeket figyeltünk meg az eredményekben, az RSD értékek 20 % és 35 % között változtak (2. ábra). Ez a változékonyság összhangban van a szakirodalomban [28,29] közölt eredményekkel, és megszokottnak tekinthető in vitro kísérletekben. A bemutatott szórás értékekből arra következtethetünk, hogy az SC ICP-MS mérési módszer reprodukálhatóságát – legalább is az általunk elvégzett kísérletekben – a sejtkultúrákkal végzett különböző műveletek (úgy, mint passzálás, tripszinezés, sejtek újrafelvétele és mosása), melyek a minta-előkészítés lépéseinek tekinthetők az adott analitikai munkafolyamatban, nagyobb mértékben befolyásolják, mint a nagyműszeres elemzés. Ez utóbbinak a reprodukálhatósága kissé rosszabb, mint a „hagyományos” ICP-MS-sel

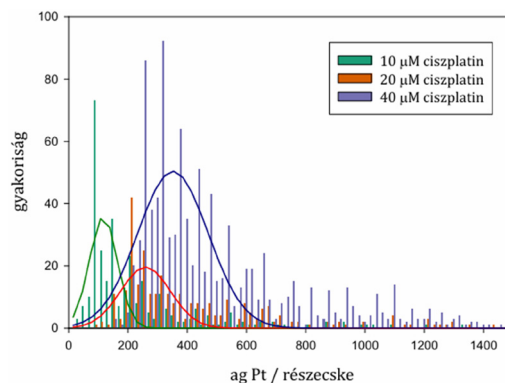
3. táblázat: SC ICP-MS mérések eredményei (n=3), ciszplatin felvétele C26 sejtek által független kísérleti napokon

Sejtvonal	Ciszplatin koncentráció	Leggyakoribb tömeg, ag Pt/sejt	Átlag tömeg, ag Pt/sejt	Medián tömeg, ag Pt/sejt	Sejtkoncentráció (részecske/ml)
4T1	10 µM	15	318 ± 68	115	5,8E+04 ± 6,2E+03
	20 µM	215	632 ± 56	315	6,5E+04 ± 1,2E+03
	40 µM	315	732 ± 85	415	1,8E+05 ± 2,7E+04
C26	10 µM	115	559 ± 29	315	3,5E+04 ± 1,9E+03
	20 µM	315	692 ± 45	415	1,5E+05 ± 8,6E+03
	40 µM	415	1363 ± 134	515	4,1E+05 ± 4,6E+04
MDCK	10 µM	15	425 ± 31	215	4,1E+04 ± 8,3E+03
	20 µM	215	834 ± 45	415	3,4E+04 ± 9,1E+02
	40 µM	515	1846 ± 140	715	4,4E+05 ± 3,2E+04

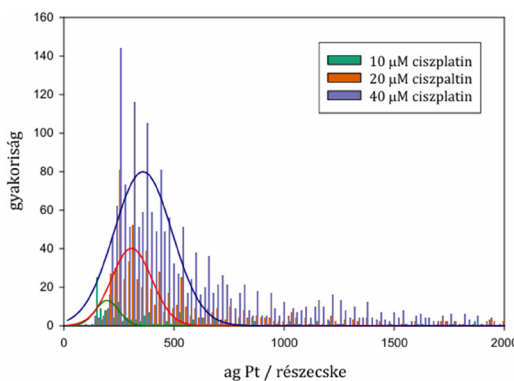
történő elemkoncentráció meghatározásoké (ami természetesen mindig mátrix függő is), ugyanakkor teljesíti a hasonló módszerektől elvártakat. A különböző kísérleti napokon a medián tömegben csak kisebb különbségeket tapasztaltunk.

3.2 A ciszplatin felvétele különböző sejtvonalak által

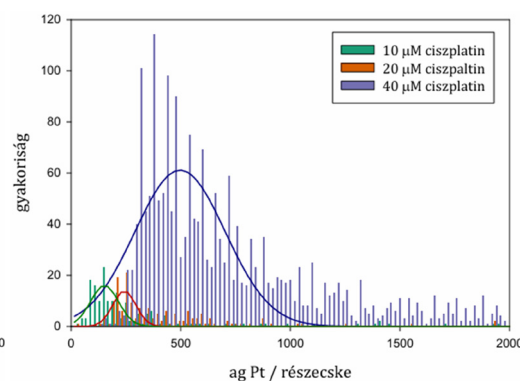
A 3-6. ábrákon a ciszplatinnal kezelt sejtek Pt-felvételét hisztogramokkal szemléltetjük, az adatokra 3 paraméteres Gauss-görbét illesztettünk. A különböző sejtvonalak Pt-felvételének grafikus összehasonlításához csak a 10 µM ciszplatin kezelés eredményeit használtuk, mivel ez



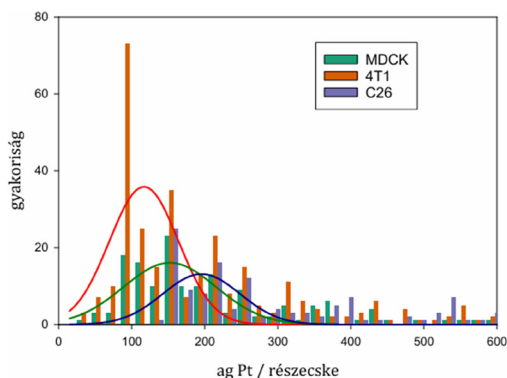
3. ábra: Platina eloszlása 4T1 sejtekben 24 órás ciszplatin kezelést követően



4. ábra: Platina eloszlása C26 sejtekben 24 órás ciszplatin kezelést követően

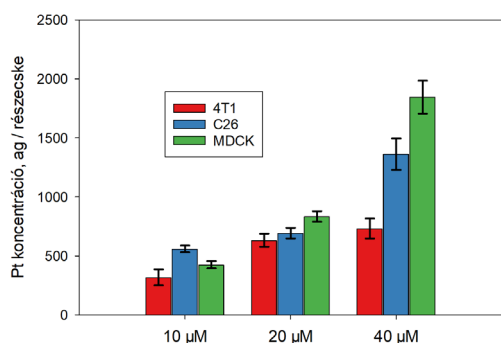


5. ábra: Platina eloszlása MDCK sejtekben 24 órás ciszplatin kezelést követően



6. ábra: A platina eloszlása különböző sejtvonalakban 10 µM ciszplatin koncentrációval történt 24 órás kezelést követően

volt az egyetlen olyan kezelés, amely egyik sejtvonalban sem eredményezett fragmentációt (6. ábra). A 3. táblázat tartalmazza az SC ICP-MS mérésekből nyert legfontosabb információkat a sejtek Pt-felvételére vonatkozóan, beleértve a leggyakrabban rögzített, átlagos és medián tömegeket. A különböző sejtvonalak által átlagosan felvett Pt mennyiségeket és azok szórását oszlopdiagrammon is szemléltetjük (7. ábra).



7. ábra: Különböző sejtvonalak által átlagosan felvett Pt mennyiségek és azok szórása (n=3)

Az azonos ciszplatin-koncentrációnak kitett azonos sejtvonalon végzett három párhuzamos SC ICP-MS mérés eredményei minimális eltérést mutattak. A sejtek által felvett átlagos Pt-tömegek átlagának és a sejtkoncentrációknak a relatív szórásai általában 10 %-nál kisebbek voltak. A várakozásoknak megfelelően a sejtekben lévő Pt mennyisége nagyobb ciszplatin expozíció esetén nőtt, valamint a különböző sejtvonalak különböző mértékű platinafelvételt mutattak különböző expozíciós szinteken (3-5. ábra). A különböző sejttípusok átlagos Pt-tömegének különbségei általában kicsik voltak. Figyelemre méltó, hogy a 4T1 sejtek minden expozíciós szinten kisebb átlagos Pt-tartalmat mutattak a másik két sejttípushoz képest.

A legtöbb esetben eltérés volt az SC ICP-MS módszerrel mért és a sejtszámlálóval számolt sejtek száma között. Az SC ICP-MS módszerrel kapott kisebb sejtkoncentrációk egyik oka az, hogy a szoftver nem vette figyelembe azokat a sejteket, amelyek a kimutatási határ alatt vették

fel a platinát. A 4T1 és az MDCK sejtvonalakban a sejtkoncentráció hirtelen növekedése 40 µM ciszplatin expozíció esetén volt megfigyelhető, míg a C26 sejtvonalban ez a növekedés már 20 µM expozíció esetén bekövetkezett. Ez a jelenség a ciszplatin citotoxikus hatásának tulajdonítható, amely sejtfragmentációhoz vezethet. A mérőrendszer a sejtfragmentumokat egyedi részecskékként detektálta. A sejtszámláló által az 5 µm alatti tartományban azonosított részecskék számának jelentős növekedése a növekvő ciszplatin expozícióval együtt alátámasztja a fragmentációs hipotézist (1. ábra). Ugyanakkor ésszerű az a feltételezés, hogy a sejtfragmentumok kevesebb platinát tartalmaztak, mint a még ép sejtek. Ez a feltételezés különösen nyilvánvaló a 4T1 és a C26 sejtvonalak esetében, ahol a látszólagos sejtkoncentráció hirtelen növekedése nem állt arányban az átlagos Pt-felvétel mérsékeltebb növekedésével.

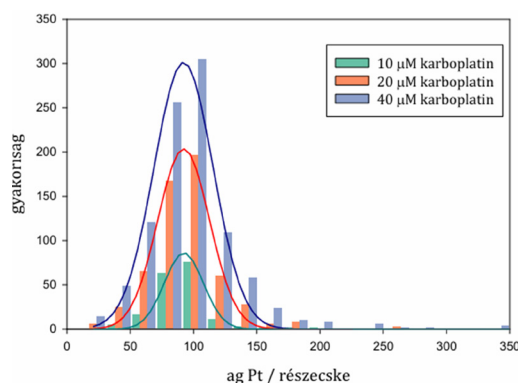
A 4T1 sejtvonal esetében a ciszplatin expozíció 10 µM-ről 20 µM-ra történő növelése a ciszplatin felvételének egyenesen arányos növekedését eredményezte. A 10 és 20 µM-nál mért közel azonos sejtkoncentrációk, amelyek nem különböztek jelentősen a sejtszámláló által rögzítetektől, arra utalnak, hogy ezeken a szinteken még nem következett be a sejtek fragmentációja. Ezzel szemben a C26 és MDCK sejtekben megfigyelt átlagos intracelluláris platina koncentráció lineáris növekedése magasabb ciszplatin expozíciók esetén – figyelembe véve a sejtfragmentációt is – arra utal, hogy ezek a sejtek szinte kontrollálatlanul vehették fel a ciszplatint ilyen koncentrációknál. Ez a viselkedés a sérült sejtek transzportmechanizmusainak zavarai magyarázható, amelyek megakadályozzák, hogy a sejt az intracelluláris platinát aktív transzporttal hatékonyan eltávolítsa.

3.3 A karboplatin felvétele különböző sejtvonalak által

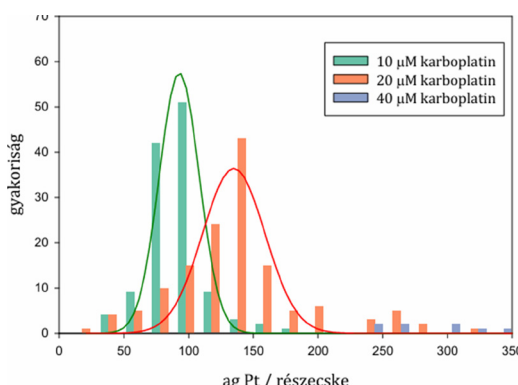
A 8-11. ábrákon a karboplatinval kezelt sejtek Pt-felvételét hisztogramokkal szemléltetjük, az adatokra 3 paraméteres Gauss-görbét illesztettünk. A különböző sejtvonalak Pt-felvételének grafikus összehasonlításához a 20 µM karboplatin kezelés eredményeit használtuk (11. ábra). A 4. táblázat tartalmazza az SC ICP-MS mérésekből

4. táblázat: SC ICP-MS mérések eredményei (n=3), ciszplatin felvétele C26 sejtek által független kísérleti napokon

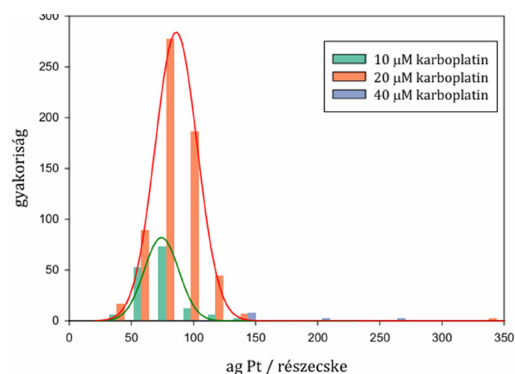
Sejtvonal	Karboplatin koncentráció	Leggyakoribb tömeg, ag Pt/sejt	Átlag tömeg, ag Pt/sejt	Medián tömeg, ag Pt/sejt	Sejtkoncentráció (részecske/ml)
4T1	10 µM	21	112 ± 9	121	4,4E+04 ± 6,3E+02
	20 µM	21	110 ± 5	121	1,4E+05 ± 8,6E+03
	40 µM	21	119 ± 7	121	2,3E+05 ± 7,9E+03
C26	10 µM	21	126 ± 11	121	3,1E+04 ± 1,9E+03
	20 µM	21	220 ± 44	121	3,7E+04 ± 3,9E+03
	40 µM	321	700 ± 9	521	6,9E+03 ± 1,1E+03
MDCK	10 µM	21	161 ± 105	121	1,7E+04 ± 1,8E+04
	20 µM	21	108 ± 2	121	1,5E+05 ± 4,4E+03
	40 µM	21	646 ± 302	321	5,6E+03 ± 2,2E+03



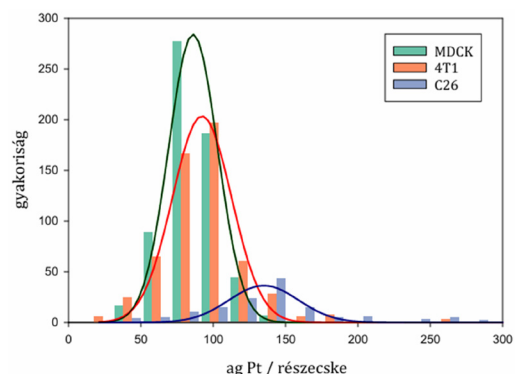
8. ábra: Platina eloszlása 4T1 sejtekben 24 órás karboplatin kezelést követően



9. ábra: Platina eloszlása C26 sejtekben 24 órás karboplatin kezelést követően



10. ábra: Platina eloszlása MDCK sejtekben 24 órás karboplatin kezelést követően

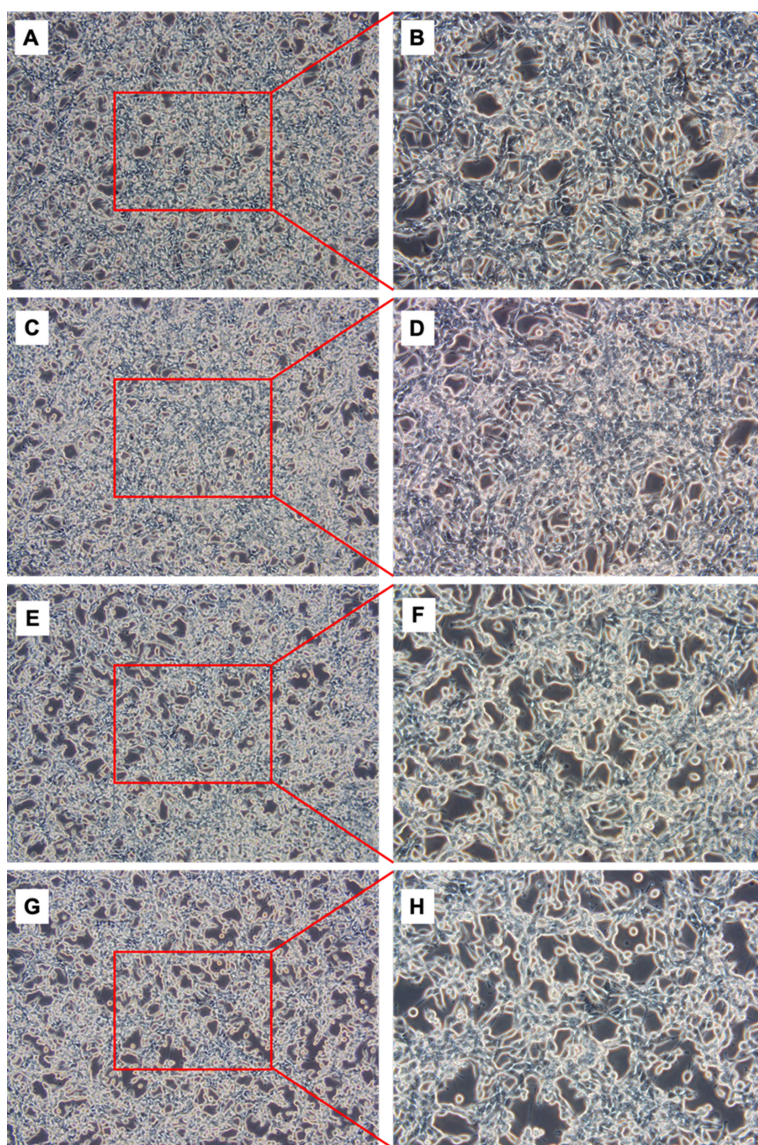


11. ábra: A platina eloszlása különböző sejtvonalakban 20 µM karboplatin koncentrációval történt 24 órás kezelést követően

nyert legfontosabb információkat a sejtek Pt-felvételére vonatkozóan, beleértve a leggyakrabban rögzített, átlagos és medián tömegeket.

A karboplatinosis kísérletek eredményei nem mutattak ugyan olyan konzisztenciát, mint a ciszplatinnal végzetek. Bár több esetben tapasztaltunk egyértelmű növekedést a felvett platina mennyiségében növekvő karboplatin expozíció hatására, ezt a megfigyelést a sejtkoncentrációk alakulása nagyban árnyalta.

A karboplatinosisal kezelt 4T1 sejtekben a leggyakrabban mért platinatömeg, az átlag és a medián is stagnált a 10, 20 és 40 µM-os expozícióknál, míg az SC ICP-MS által kimutatott részecskeszám nőtt. Bár a tenyészetek mikroszkópos képe (12. ábra) nem mutatott jelentős sejthalált, a sejtszámlálóval mért részecske koncentrációk és a hígítás alapján várt értékekhez képest jóval nagyobb részecskeszám arra utal, hogy itt is történt bizonyos mértékű fragmentáció. A C26 sejtek platinafelvétele 10 és



12. ábra: C26 sejtek morfológiai képe karboplatin kezelés hatására, 24 órás expozíció után, 100X és 200X-os nagyításban (A, B: kezeletlen kontroll, C, D: 10 µM karboplatin, E, F: 20 µM karboplatin, G, H: 40 µM karboplatin)

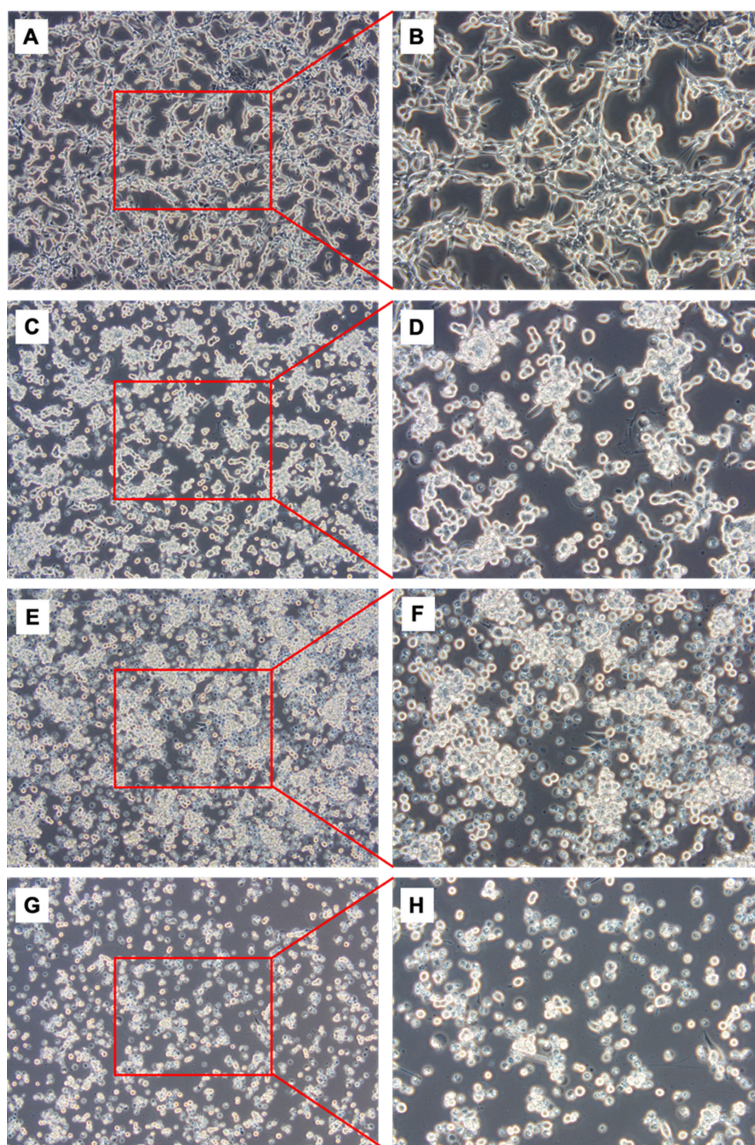
20 μM között csak kis mértékben nőtt, 20 és 40 μM között minden mutató szerint jelentős növekedés történt. Az SC ICP-MS által mért sejtszám eközben 10 és 20 μM között stagnált, majd 40 μM -nál hirtelen töredékére csökkent. Ez ellentmond mind a mikroszkópos vizsgálattal kapott, szinte sejtpusztulás-mentes képnek, mind a sejtszámlálás eredményének. Hasonló jelenséget figyeltünk meg az MDCK sejtvonalban. Az MDCK sejtek platinafelvétele közel azonos volt 10 és 20 μM -os karboplatin expozíciónál, miközben a kimutatási határ feletti mennyiségű platint felvett sejtek száma jelentősen nőtt. 40 μM -nál azonban váratlan csökkentést tapasztaltunk az SC ICP-MS által érzékelt beütések számában, ami nagyon kis sejtszámot eredményezett. A mérőkészülék hibájának (pl. a porlasztó eltömődése) kizárását követően egy lehetséges magyarázat, hogy a karboplatinval kezelt sejtek alacsonyabb platinafelvételéből adódóan a fragmentáció során keletkezett részecskék többsége nem tartalmazott mérhető mennyiséget, s ehhez a ciszplatinos mérésekhez képest valamivel nagyobb kimutatási határ (21 ag) is hozzájárulhatott. A sejtvonalak közötti különbségek és a kézi sejtszámláló által mutatott adatok alapján az is elképzelhető, hogy egy, nagyobb környezeti platina-koncentrációk mellett fellépő rezisztenciamechanizmussal állunk szemben. Az bizonyos, hogy további kísérletek – ugyan ekkora és nagyobb karboplatin expozíciók alkalmazásával – szükségesek annak érdekében, hogy egyértelműen meghatározzuk a karboplatin különböző koncentrációinak kitett sejtek Pt felvételét és a sejtekre gyakorolt hatását.

3.4 A mérési eredmények összevetése a szakirodalommal és a mikroszkópos megfigyelések tapasztalataival

Az SC ICP-MS-sel mért adatok és a hisztogramok alapján valamennyi sejtvonalnál megállapítható, hogy a fokozott expozíció vagy a mérhető mennyiségű platint felvő sejtek nagyobb számát, vagy az egyes sejtek által felvett nagyobb platina mennyiséget, vagy mindkettőt eredményezte. Eredményeink megerősítik korábbi tanulmányok eredményeit, a sejtek által felvett platina átlagos mennyisége hasonló nagyságrendű volt a mi kísérleteinkben, mint a korábbiakban [28-30]. Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy a korábbi kísérletekben más sejtvonalakat használtak. SC ICP-MS-t még nem alkalmaztak az általunk használt sejtvonalak platina-komplexek felvételének vizsgálatára. A hisztogramok alapján nem dönthető el egyértelműen, hogy a sejtek platinafelvétele normális vagy lognormális eloszlást követ-e; a Gauss-görbék azonban megfelelően illeszkednek az eloszlásokra. Figyelemre méltó, hogy minden esetben egyes sejtek vagy sejtrészek – annak ellenére, hogy elhanyagolható mennyiségben voltak jelen – az átlagnál lényegesen nagyobb platinafelvételt mutattak. A sejteken belül felhalmozódott Pt mennyisége prediktív értékű volt tenyészetben fellépő sejthalálra nézve, amely

jól szemlélteti, hogy a platinavegyületek citotoxikus hatása erősen függ a sejtekbe való bejutás hatékonyságától [12]. Továbbá, egyértelműen kirajzolódott a karboplatin és a ciszplatin hatáserőssége közötti különbség. A karboplatinval kezelt sejtek azonos koncentrációszinteken kisebb platina mennyiségeket vettek fel, sok esetben a kimutatási határ alatt. A mikroszkópos vizsgálatok eredményei ennél is markánsabb eltéréseket mutattak (12, 13. ábra).

A mikroszkópos felvételeken látható, hogy a kezeletlen C26 sejtek a lemez alá tapadnak, orsó alakúak, egysejtes, egy sejtrétegű kultúrát nem képeznek. Ciszplatin kezelés hatására a sejtek a koncentrációtól függő mértékben lekerekednek és felválnak az aljzattól, a médiumban lebegő gömb formában jelennek meg. A 40 μM ciszplatinnal exponált sejtenyészetekben jelentős sejtpusztulás figyelhető meg, amelynek következményeként túlnyomórészt fényes, apoptotikus sejteket, valamint a sejteknél kisebb törmelékcszemcséket látunk (13. ábra).



13. ábra: C26 sejtek morfológiai képe ciszplatin kezelés hatására, 24 órás expozíció után, 100X és 200X-os nagyításban (A, B: kezeletlen kontroll, C, D: 10 μM ciszplatin, E, F: 20 μM ciszplatin, G, H: 40 μM ciszplatin)

A karboplatinval kezelt sejtek morfológiája ezzel szemben alig változik a kezeletlen kontrollhoz képest, még a 40 µM-os expozíciónál vizsgált tenyészetben is. Az apoptotikus alakok és a látható sejttörmelék mennyisége a ciszplatinnal kezelt tenyészetekéhez képest elenyésző (12. ábra).

A mikroszkópos vizsgálatok és az SC ICP-MS mérési eredmények alapján kutatásunk alátámasztja a szakirodalomban és a klinikumban egyaránt ismert tény, miszerint azonos koncentrációk és expozíciós idők mellett a ciszplatinnal citotoxikus hatása messze meghaladja a karboplatinét [14]. Tekintettel arra, hogy a karboplatint általában a ciszplatinhoz képest tízszeres dózisban alkalmazzák, valamint, hogy a karboplatinval exponált sejteken végzett kísérletek több esetben ellentmondásos eredményeket adtak, mindenképp érdemes a továbbiakban nagyobb karboplatin-koncentrációk mellett is megismételni a kísérleteket.

Az eredmények részletes értékelésének korlátot szab, hogy az SC ICP-MS csak az egyes sejtvonalak platinafelvétele közötti különbség kimutatására alkalmas, a különbség okának felderítésére nem. Különböző transzportmechanizmusok [36] és a sejtmembrán strukturális változásai [37] fontos szerepet játszanak a platinafelvételben csakúgy, mint a sejtkárosodásban és a rezisztencia esetleges kialakulásában, de ezekkel kapcsolatban az SC ICP-MS mérési eredményekből nem kapunk információt.

4. Összefoglalás

Az egyes sejtvonalak kétféle platina komplex felvételének vizsgálata során a következőket tapasztaltuk:

1. Az SC ICP-MS technika hatékony a platina komplexek sejtek általi felvételének és sejtek közötti eloszlásának tanulmányozására, és számos előnyt kínál a hagyományos módszerekhez képest. Az eredmények értékeléséhez azonban más technikákra, például mikroszkópiára és sejt számlálásra is szükség van.
2. A különböző sejtvonalak azonos platina komplex expozíciók esetén különböző mértékben vették fel a komplexeket, melyet a sejtekben mért különböző platina mennyiségek igazoltak.
3. Nagyobb platina komplex koncentrációknak kitett sejtek nagyobb mértékben vették fel a citosztatikumokat. Több sejtvonal esetén az összefüggés egyenesen arányos volt bizonyos koncentráció tartományokban.
4. Ciszplatinnal expozíció esetén adott koncentráció szint felett nagymértékű sejt elhalást tapasztaltunk minden sejtvonalnál, mely nagymértékű fragmentációhoz, ez utóbbi pedig az SC-ICP-MS módszer által a valódinál nagyobb számú sejt észleléséhez vezetett.
5. A ciszplatinnal mindegyik sejtvonal nagyobb mértékben vette fel, mint a karboplatint.

A fenti tapasztalatokat a korábban mások által publikált eredmények általában jól alátámasztották. Bár a tapasztalt összefüggések sejtszintű folyamatokkal történő magyarázatát az alkalmazott vizsgálati módszerekkel nyert eredmények nem teszik lehetővé, az elvégzett kutatás, és hasonló – más fémkomplexek felvételének vizsgálataira irányuló kutatások – számszerűsíthető eredményei a

gyakorlatban is hozzájárulhatnak fémkomplexeket alkalmazó rákterápiás eljárások további fejlesztéséhez.

A cikk Szabó Julianna Flóra 2024-es Tudományos Diákköri dolgozatának felhasználásával készült.

Köszönetnyilvánítás

A tanulmány az Állatorvostudományi Egyetem stratégiai kutatási alapja (SRF-001 sz. támogatás) támogatásával készült. Ez a cikk a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj támogatásával készült. Köszönjük a PerkinElmer vállalat és a Per-Form Hungária Kft. munkatársainak segítségét a technikai kihívások megoldásában.

Felhasznált irodalom

- [1] The 30-Minute Guide to ICP-MS, Technical Note, PerkinElmer, Inc.: https://resources.perkinelmer.com/corporate/pdfs/downloads/tch_icpmsthirtyminuteguide.pdf
- [2] Berlinger, B.: Induktív csatolású plazma tömegspektrometriás analitikai módszer kidolgozása fémek meghatározására vizeletből (diplomamunka), Budapest, Eötvös Loránd Tudományegyetem Kémiai Technológia és Környezetkémiai Tanszék, 2003.
- [3] Bertalan, É.: Induktív csatolású plazma tömegspektrometria (ICP-MS), Az elemanalitika korszerű módszereiben, szerkesztő: Záray Gyula, Budapest, Akadémiai kiadó, 225-283 oldal, 2006.
- [4] Amable, L., Stephan, C., Smith, S., Merrifield, R. B.: An Introduction to Single Cell ICP-MS Analysis. PerkinElmer USA, 2016: 3-39.
- [5] Albert, R. E., Benjamin, S. A., Shukla, R.: Life span and cancer mortality in the beagle dog and humans. Mech Ageing Dev 1994; 74: 149-159. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(94\)90086-8](https://doi.org/10.1016/0047-6374(94)90086-8)
- [6] Bonnett, B., Egenval, A., Hedhammar, A., Olson, P.: Mortality in over 350,000 insured Swedish dogs from 1995-2000: I. Breed-, gender-, age- and cause-specific rates. Acta Vet Scand 2005; 46: 105-120. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-46-105>
- [7] Dobson JM. Breed-Predispositions to Cancer in pedigree dogs. ISRN Vet Sci 2013; 2013: 1-23. <https://doi.org/10.1155/2013/941275>
- [8] Hahn, K.A., Bravo, L., Adams, W. H., Frazier, D. L.: Naturally occurring tumors in dogs as comparative models for cancer therapy research. In vivo, 1994; 8: 133-143.
- [9] Paoloni, M. C., Khanna, C.: Comparative Oncology Today. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2007; 37: 1023-1032. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2007.08.003>
- [10] Makovec, T.: Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. Radiol Oncol 2019; 53: 148-158. <https://doi.org/10.2478/raon-2019-0018>
- [11] Biller, B., Berg, J., Garrett, L., et al.: 2016 AAHA Oncology Guidelines for Dogs and Cats. J Am Anim Hosp Assoc 2016; 52: 181-204. <https://doi.org/10.5326/jaaha-ms-6570>
- [12] Kopacz-Bednarska, A., Król, T.: Cisplatin – properties and clinical application. Onc Clin Pract 2022; 18: 166-176. <https://doi.org/10.5603/ocp.2022.0020>
- [13] Ciarimboli, G., Deuster, D., Knief, A., et al.: Organic cation transporter 2 mediates cisplatin-induced oto- and nephrotoxicity and is a target for protective interventions. Am J Pathol 2010; 176: 1169-1180.
- [14] Vermorken, J. B., ten Bokkel Huinink, W. W., Einhauser, E. A., et

- al.: Advanced ovarian cancer. Carboplatin versus cisplatin. *Ann Oncol* 1993; 4: 41-48.
- [15] Wang, H., Wang, B., Wang, M., et al.: Time resolved ICP-MS analysis of mineral element contents and distribution patterns in single cells. *Analyst* 2015; 140: 523-531. <https://doi.org/10.1039/c4an01610f>
- [16] Lopez-Serrano Oliver, A., Baumgart, S., Bremser, W., et al.: Quantification of silver nanoparticles taken up by single cells using inductively coupled plasma mass spectrometry in the single cell measurement mode. *J Anal At Spectrom* 2018; 33: 1256-1263. <https://doi.org/10.1039/c7ja00395a>
- [17] Wei, X., Hu, L. L., Chen, M. L., Yang, T., Wang, J. H.: Analysis of the distribution pattern of chromium species in single cells. *Anal Chem* 2016; 88: 12437-12444. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b03810
- [18] Zheng, L. N., Wang, M., Wang, B.: Determination of quantum dots in single cells by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta* 2013; 116: 782-787. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.07.075>
- [19] Li, F., Armstrong, D.W., Houk, R. S.: Behavior of bacteria in the inductively coupled plasma: Atomization and production of atomic ions for mass spectrometry. *Anal Chem* 2005; 77: 1407-1413. <https://doi.org/10.1021/ac049188l>
- [20] Miyashita, S., Groombridge, A. S., Fujii, S., et al.: Highly efficient single-cell analysis of microbial cells by time-resolved inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal At Spectrom* 2014; 29: 1598-1606. <https://doi.org/10.1039/c4ja00040d>
- [21] Liu, Z., Xue, A., Chen, H., Li, S.: Quantitative determination of trace metals in single yeast cells by time-resolved ICP-MS using dissolved standards for calibration. *Appl Microbiol Biotechnol* 2019; 103: 1475-1483. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-09587-w>
- [22] Shigeta, K., Koellensperger, G., Rampler, E., et al.: Sample introduction of single selenized yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) by micro droplet generation into an ICP-sector field mass spectrometer for label-free detection of trace elements. *Anal At Spectrom* 2013; 28: 637-645. <https://doi.org/10.1039/c3ja30370e>
- [23] Miyashita, S., Groombridge, A. S., Fujii, S., et al.: Highly efficient single-cell analysis of microbial cells by time-resolved inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal At Spectrom* 2014; 29: 1598-1606. <https://doi.org/10.1039/c4ja00040d>
- [24] Merrifield, R. C., Stephan, C., Lead, J. R.: Quantification of Au nanoparticle biouptake and distribution to freshwater algae using single cell-ICP-MS, *Environ Sci Technol* 2018; 52: 2271-2277. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b04968>
- [25] Shen, X., Zhang, H., He, X., et al.: Evaluating the treatment effectiveness of copper-based algacides on toxic algae *Microcystis aeruginosa* using single cell-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2019; 411: 5531-5543. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01933-9>
- [26] Ho, K. S., Chan, W. T.: Time-resolved ICP-MS measurement for single-cell analysis and on-line cytometry. *J Anal At. Spectrom* 2010; 25: 1114-1122. <https://doi.org/10.1039/c002272a>
- [27] Stephan, C., Amable, L., Merrifield, R. B.: Single-cell ICP-MS Analysis: Quantifying the metal concentration of unicellular organisms at the cellular level. *Spectroscopy* 2018; 33: 33-39.
- [28] Corte Rodríguez, M., Álvarez-Fernández García R., Blanco, E., Bettmer, J., Montes-Bayón, M.: Quantitative evaluation of cisplatin uptake in sensitive and resistant individual cells by Single-Cell ICP-MS (SC-ICP-MS). *Anal Chem* 2017; 89: 11491-11497. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02746>
- [29] Lim, S. Y., Low, Z. E., Tan, R. P. W., et al.: Single-cell and bulk ICP-MS investigation of accumulation patterns of Pt-based metallodrugs in cisplatin-sensitive and -resistant cell models. *Metallomics* 2022; 14: mfac085. <https://doi.org/10.1093/mtomcs/mfac085>
- [30] Galé, A., Hofmann, L., Lüdi, N., et al.: Beyond Single-Cell Analysis of Metallodrugs by ICP-MS: Targeting Cellular Substructures. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 9468. <https://doi.org/10.3390/ijms22179468>
- [31] Rose, W. C., Schurig, J. E.: Preclinical antitumor and toxicologic profile of carboplatin. *Cancer Treat Rev* 1985; 12: 1-19. [https://doi.org/10.1016/0305-7372\(85\)90014-3](https://doi.org/10.1016/0305-7372(85)90014-3)
- [32] De Souza, C. M., de Oliveira Gamba, A., de Campos, C. B., et al. Carboplatin delays mammary cancer 4T1 growth in mice. *Pathol Res Pract* 2012; 209: 24-29. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2012.10.003>
- [33] Li, Q., Tian, Y., Li, D., et al.: The effect of lipocisplatin on cisplatin efficacy and nephrotoxicity in malignant breast cancer treatment. *Biomaterials* 2014; 35: 6462-6472. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.04.023>
- [34] Irvine, J. D., Takahashi, L., Lockhart, K., et al.: MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) Cells: a tool for membrane permeability screening. *J Pharm Sci* 1999; 88: 28-33. <https://doi.org/10.1021/js9803205>
- [35] Abay, A., Simionato, G., Chachanidze, R., et al. Glutaraldehyde – A Subtle Tool in the Investigation of Healthy and Pathologic Red Blood Cells. *Front Physiol* 2019; 10: 514. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00514>
- [36] Ciarimboli, G., Ludwig, T., Lang, D., et al.: Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. *Am J Pathol* 2005; 167: 1477-1484.
- [37] Liang, X., Huang, Y.: Alteration of membrane lipid biophysical properties and resistance of human lung adenocarcinoma A549 cells to cisplatin. *Sci China Life Sci* 2001; 44: 25-32. <https://doi.org/10.1007/bf02882069>



XIV. RONCSOLÁSMENTES ANYAGVIZSGÁLÓ KONFERENCIA ÉS KIÁLLÍTÁS

Az anyagvizsgáló tanúsítványok kredit pontokkal is meghosszabbíthatók!

Kreditpont **szakmai rendezvényen való részvételért** is kapható. Az MSZ EN ISO 9712 szabvány C1 táblázata szerint szakmai konferencián való részvételért napi 1 kreditpont, de évente legfeljebb 2 pont, öt év alatt max. 10 pont gyűjthető.

Szakmai konferencián poszterrel vagy előadással való megjelenésért prezentációnként 1 pont, de évente legfeljebb 3 pont, öt év alatt max. 15 pont gyűjthető.

Az igazolást a konferencia alatt a MAROVISZ adja ki!