

Autoimmun betegektől származó vészérum minták elemanalitikai vizsgálata mikrohullámú plazma atomemissziós spektrometriával

Tóth Csilla Noémi

Vegyész MSc

II. évfolyam



Témavezető:

Prof. Dr. Posta József
egyetemi tanár
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

Fehérné Baranyai Edina
egyetemi tanársegéd
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék

Debreceni Egyetem
Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék
2013

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés	3
2.	Szakirodalmi áttekintés	4
2.1.	Az emberi vér összetétele és a vérérszérúm	4
2.2.	A vérérszérúmiban található legfontosabb makroelemek	4
2.2.1.	Kálium (K)	4
2.2.2.	Kalcium (Ca)	5
2.2.3.	Magnézium (Mg)	5
2.3.	A vérérszérúmiban található legfontosabb mikroelemek	5
2.3.1.	Cink (Zn)	5
2.3.2.	Réz (Cu)	6
2.3.3.	Vas (Fe)	6
2.4.	Autoimmun betegségek: Szisztémás lupus erythematosus és Sjögren-szindróma	6
2.5.	Humán vérérszérúm minták előkészítése és elemanalízise	7
2.5.1.	Mintavétel, tárolás és előkészítés	7
2.5.2.	Elemanalízis	8
3.	Anyag és módszer	11
3.1.	Felhasznált anyagok	11
3.2.	Alkalmazott eszközök és műszerek	11
3.3.	Mátrixhatás vizsgálat kísérleti terve	11
3.4.	Mintavétel és tárolás	15
3.5.	Minta előkészítése	15
3.6.	Mintaoldatok elemanalízise MP-AES módszerrel	16
3.6.1.	Autoimmun szérumminták elemanalízise MP-AES módszerrel	17
3.6.2.	Statisztikai analízis	17
4.	Eredmények és azok kiértékelése	18
4.1.	Modellkísérletek a vérérszérúm minták analízisekor fellépő mátrixhatások felderítésére	18
4.2.	Autoimmun betegek szérummintáinak elemanalízise	22
5.	Következtetések	24
6.	Összefoglalás	26
7.	Irodalomjegyzék	27
8.	Köszönetnyilvánítás	32

1. Bevezetés

Az emberi vérrel kapcsolatos kutatások már évtizedek óta segítik az orvostudományt. A biológiai, mikrobiológiai és kémiai vizsgálatok révén egyre többet tudunk meg ennek a bonyolult mátrixú anyagnak az összetételéről, valamint a szervezetben betöltött biokémiai szerepéről. A vér elemanalitikai vizsgálata nagy jelentőséggel bír a fehérjékhez kötődő esszenciális és toxikus nyomelemek transzportfolyamatainak feltérképezésében, amely fontos diagnosztikai információt hordozhat.

A klinikai gyakorlatban a vérben lévő esszenciális elemek mennyiségi meghatározása általában elektrokémiai módszerekkel történik, számos létfontosságú nyomelem mérése azonban nem képezi a klinikai rutinanalitika részét. A mikrohullámú plazma atomemissziós spektrometria (MP-AES) egy olyan új emissziós technika, amely gerjesztő forrásként nitrogén gáz segítségével létrehozott plazmát alkalmaz. A módszer előnye a költséghatékonyság, hiszen a plazma fenntartásához szükséges nitrogén gázt egy generátor a laboratórium levegőjéből állítja elő. A technikát megjelenése óta (2011) számos applikációra és mintatípusra alkalmazzák, a biológiai eredetű mintákkal kapcsolatos szakirodalma azonban minimális.

A vészérum minták elemanalitikai vizsgálatának szűk keresztmetszetét a magas szervesanyag-tartalom, a rendelkezésre álló sokszor csekély mintamennyiség, valamint a mérendő komponensek kis koncentrációja jelenti. Az atomspektroszkópiai módszereknél számolnunk kell továbbá a bonyolult mintamátrixok okozta zavaróhatásokkal is.

Az MP-AES magnetron generált gerjesztő forrást alkalmaz, a mérések során lejátszódó kémiai zavaró hatások egyelőre nem teljesen ismertek. Vizsgálatunk célja, hogy a vészérum minták elemanalízisére reprodukálható mérési eredményeket biztosító módszert dolgozzunk ki MP-AES technikával. Ennek érdekében kísérletsorozatunk első részében modell minták segítségével tanulmányoztuk a humán vészérum minták magas nátrium koncentrációjának makro- és mikroelemek intenzitására gyakorolt hatását. A mátrixhatás vizsgálat során kapott eredményeink felhasználásával autoimmun betegektől származó szérumminták nyomelem-tartalmának meghatározását végeztük szintén MP-AES módszer segítségével.

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1. Az emberi vér összetétele és a vérszérum

A vér folyékony és speciális sejt-közötti állománnyal rendelkező szövet. Testünk szállítószerve, a különböző anyagokat állandó keringésben egyik helyről a másikra szállítja. A vér legfontosabb feladatai a keringéshez és a folyamatos áramláshoz kapcsolódnak. Ha a kibocsátott vért állni hagyjuk, megalvasás után két részre válik: vérleplenyre és vérsavóra. A vérlepleny sötétbarnás-vörös színű, sűrű, rostos szerkezetű anyag, amely fibrintömegében a vér mikroszkóposan látható alakos elemei, a vörösvérsejtek találhatók. A vérsavó ezzel szemben egy sárgás színű, átlátszó folyadék, amelyet vérszérumnak is nevezünk [1; 2]. A vérszérum fajsúlya 1,0261-1,0292 közé eső érték, a kémhatása gyengén lúgos. Az emberi vérsavóban a rostanyag kiválása után visszamaradó fehérjék 7-8 %-ot tesznek ki, amely döntő tömegét a szérumglobulin (3 %) és a szérumalbumin (4,5 %) adja [3].

Az emberi vérszérum tehát számos, különböző életfunkciókért felelős plazmafehérjét tartalmaz, amelyek esszenciális szerepet töltenek be a hozzájuk kötődő nyomelemek transzportfolyamataiban. Egészséges embereknél a vérszérum mennyiségi és minőségi összetétele állandó. Az emberi vér nyomelem-eloszlásának vizsgálata évtizedek óta alkalmazott módszer a klinikai diagnosztikában. A nyomelemek biokémiai szerepet tölthetnek be egyes betegségek kialakulásában [4; 5; 6; 7], illetve a biológiai rendszerekben a fehérje-fém interakciók biomarkerként is szolgálhatnak rendellenes folyamatok feltérképezésében [8; 9; 10; 11; 12; 13]. Az emberi szervezetben az esszenciálisan létfontosságú makroelemek a test tömegének kb. 1 %-át teszik ki (Na, K, Mg, Ca), míg a mikroelemek kevesebb, mint 0,01 %-át (Fe, Zn, Mn, Mo, Cu) adják. Biológiai szerepüket sokoldalúan vizsgálva mégis a mikroelemek kerültek a kutatások előterébe, mivel az alkálifém- és alkáliföldfém-kationok elenyésző komplexképző sajátosságuk révén gátolták az egyes funkciók felderítését. A kation megoszlása a sejten belüli és kívüli tér között a termodinamikai egyensúlyi állapotnak nem felel meg. Az alkálifémionok kevés és stabilis komplexet alkotnak az ismert szervetlen vagy szerves komplexképzőkkel. A biológiai szereppel rendelkező átmeneti fémek a mikroelemek közé tartoznak és metalloproteinek formájában stabilizálják a fehérjék szerkezetét [14].

2.2. A vérszérumban található legfontosabb makroelemek

2.2.1. Kálium (K)

Egy 70 kg testtömegű felnőttben körülbelül 170 g kálium található. Az emberi vörösvértestekben a $K^+ : Na^+$ mól aránya 105:10, míg a vérplazmában ugyanez az arány 5:143.

A kapcsolt aktív transzportfolyamatért felelős $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pumpa valamennyi állati sejt plazmamembránjában megtalálható, amely Na^+ -ot „szállít ki” a sejt intercelluláris teréből és K^+ -ot „hoz be” az extracelluláris térbe. Fontos szerepe van az izom- és idegműködésben, aminek nélkülözhetetlen feltétele a termodinamikai nyitottság. A vérplazma K^+ koncentrációjának növekedése fokozza a mellékvese aldoszteron szekrécióját, míg az aldoszteron K^+ szekréciót idéz elő a vesében [14].

2.2.2. Kalcium (Ca)

Az emberi szervezetben átlagosan 1250 g kalcium található, ami oldatlan állapotban a csontokban és a fogakban fordul elő. Étkezés során naponta 1200 mg kerül a szervezetbe elsősorban zöldségek, tej és tejtermékek fogyasztásával. A plazma Ca^{2+} koncentrációja 2,1-2,6 mmol/dm³, melynek közel fele ionos állapotban, a másik fele pedig fehérjékhez kötötten található az emberi testben. A kalcium kulcsfontosságú szerepet tölt be számos enzimkatalizált reakcióban, az izom összehúzódásában, a véralvadásban, a neurotranszmitterek felszabadulásában, valamint „másodlagos hírvivőként” a legkülönbözőbb sejten belüli folyamatokban. A sejt felszínéhez érkező különböző ingereket továbbítja és intracelluláris biológiai változásokká alakítja át [14].

2.2.3. Magnézium (Mg)

Egy felnőtt szervezetben körülbelül 20-25 g magnézium található, amely a negyedik leggyakrabban előforduló kation a testünkben és elsődlegesen foszfátsoportokkal alkotott komplexek formájában van jelen. A magnézium mennyiségének 50-60 %-a a csontokban, 20 %-a a vázizomban és csupán 1 %-a található az extracelluláris térben. A plazmában lévő Mg^{2+} koncentrációja 0,8-1,2 mmol/dm³. A felvételét és kiválasztását elsősorban a kalciumra vonatkozó folyamataival lehet összefüggésbe hozni, viszont a vesében szabályozása inkább a káliuméra hasonlít [14].

2.3. A vészsérumban található legfontosabb mikroelemek

2.3.1. Cink (Zn)

A cink mennyisége egy 70 kg-os felnőtt szervezetben körülbelül 2 g, a második legnagyobb mennyiségben előforduló elem. Döntő hányada fehérjékhez kötött állapotban található meg. A cink létfontosságú és szinte minden élő szervezet számára nélkülözhetetlen elem, hatással van többek között az emlősök normális növekedésére és fejlődésére. A cink napi átlagos szükséglete 15 mg, amely felszívódásáért a vékonybél felel. Számottevő cinket tartalmaz szerveink közül a hasnyálmirigy, valamint az izom- és csontrendszer is [14].

2.3.2. Réz (Cu)

Egy felnőtt emberi szervezetben körülbelül 100-150 mg réz található. A táplálékkal felvett réz az epe által választódik ki, majd a szérumalbuminhoz kötődve transzportálódik. Az emberi test rézben leggazdagabb szerve a máj, ahol a cöruoplazmin felelős a rézionok megkötéséért és vérkeringésen keresztüli szállításáért. Létfontosságú enzimek alkotórészeként központi szerepet játszott a biológiai evolúcióban is [14].

2.3.3. Vas (Fe)

A vas az emberi szervezetben legnagyobb mennyiségben előforduló átmeneti fém, felnőttekben átlagosan 4-5 g található. A szervezetben Fe^{3+} és Fe^{2+} ionként vizes oldatban van jelen, napi szükséglete 20 mg. A vékonybél első szakaszában ionként szabadul fel, majd vagy beépül egy vastartalmú fehérjébe, vagy ferritin formájában raktározódik. Az emberi szervek közül a máj raktározza/tartalmazza a legnagyobb mennyiségű vasat [14].

2.4. Autoimmun betegségek: Szisztémás lupus erythematosus és Sjögren-szindróma

Az autoimmun betegségek degeneratív elváltozások, kialakulásukat számos tényező befolyásolja. A világon minden huszadik ember érintett valamilyen szerv specifikus vagy szisztémás autoimmun elváltozásban. A legtöbb autoimmun zavar hasonló patogenezisben nyilvánul meg, a tünetek eltérő manifesztációja azonban összetett kórképeket eredményez. Kialakulásukra genetikai eltérések, autoantitestek jelenléte, környezeti tényezők illetve az életkor is hatással lehet [15; 16].

A Szisztémás lupus erythematosus (SLE) egy krónikus gyulladásos autoimmun betegség, amely többnyire a fiatal reprodukív korban lévő nőknél fordul elő. Az elváltozások több szervet is érinthetnek, mint a bőr, az ízületek, a tüdő, a vese és az agy. Kezdeti tünetei a gyengeség, hőemelkedés, láz, fogyás, rossz közérzet, amelyek a legtöbb betegnél napfény hatására jelentkeznek és erősödhetnek [17; 18, 19].

A Sjögren-szindróma (SS) a poliszisztémás autoimmun betegségek közé tartozik, amelyet a szem- és szájszárazság jellemez. A betegség a 40-50 év közötti nők körében alakul ki. A betegség multifunkcionális folyamat eredménye, az autoimmun gyulladás hatására szöveti károsodás következhet be [20, 21, 22, 23].

2.5. Humán vészérum minták előkészítése és elemanalízise

2.5.1. Mintavétel, tárolás és előkészítés

A műszeres elemanalitika elengedhetetlen lépése a minta-előkészítő művelet, amely során a vizsgálandó mintánkat az analízishez megfelelő állapotba hozzuk. A minta-előkészítés gondos tervezése és precíz végrehajtása a megbízható elemanalízis egyik alapvető feltétele. A mintavételnek reprodukálhatónak kell lennie és az egészre vonatkoznia. A minta adatai csak akkor vonatkoznak a vizsgált anyag összességére, ha gondoskodunk arról, hogy az analitikai minta összetétele ténylegesen megegyezzen a teljes vizsgálandó anyagmennyiség összetételével, mivel a minta és az anyag tömegének összetétele közti különbség több tényezőtől tevődik össze. Vérminták esetében fontos már a mintavételnél figyelni az esetleges nyomelem szennyezőkre, így a rozsdamentes acélból készült vérvételi tűk helyett lehetőség szerint szilikon bevonatú kanült alkalmazni [24,25] a kioldódó mangán, vas és króm szennyezés elkerülése érdekében.

A helyes mintavétel mellett a minta helyes kezelése és tárolása is befolyásolja az analízis eredményét. Nem használható az analízis során olyan anyagból készült eszköz, amely a mintát szennyezi vagy kölcsönhatásba lép vele. A vérminták tárolására szolgáló edények anyagából fontos, hogy ne oldódjon ki szennyező anyag és az elemek ne kötődjenek meg az edény falán. A minta tárolásáról valamint tartósításáról a későbbi analízisnek megfelelően kell gondoskodni [26]. A levett natív vérminták 2-8 °C-on hűtőszekrényben 1-2 napig, míg a vérsavó -70 °C-on fagyasztva tovább tárolható.

Az analitikai eljárás kiválasztásánál fontos szempont a várható koncentráció, a pontosság, a költséghatékonyság valamint a rendelkezésre álló minta mennyisége. Minden esetben az analízis célja határozza meg a megfelelő analitikai módszer kiválasztását [19]. Az elemek mennyiségi meghatározáshoz azonban szükség van a mintába lévő szerves anyag mineralizációjára is. A szerves molekulák elemtartalmuk szerint jellemezhetők, ilyenek az oxigén, a hidrogén és a szén mellett a kén, a foszfor, a nitrogén valamint a fémek. A mineralizálás történhet az anyag elégetésével, nedves úton savak elegyével vagy olvadékban [27].

Az elemanalitikai vizsgálatokhoz szükséges minta-előkészítő eljárások közül a hamvasztás magában foglalja az illékony vegyületek miatt bekövetkező elemvesztés, a hagyományos atmoszférikus nyomáson történő nedves roncsolás pedig az elszennyeződés veszélyét. A mikrohullámú roncsoló egységben a minta előkészítése zárható teflon edényekben történik, így kiküszöbölve a nyílt rendszerű roncsolásból adódó hátrányokat. A

nagy nyomás és magas hőmérséklet még a magas szerves anyag tartalmú biológiai eredetű minták esetében is megbízható feltárást nyújt. A viszonylag rövid előkészítési (20-25 perc), illetve hűtési idő (10-15 perc) lehetővé teszi a minták gyors oldatba vitelét [28]. A fokozott nyomás- és hőállóságot az ellenálló, úgynevezett poli-éter-éter-keton (PEEK) műanyagból készült köpenyek biztosítják. A mikrohullámú roncsolási módszernél gyártótól függően 6 vagy 8 mintát tudunk egyszerre a feltáró egység rotorjába helyezni. A roncsolási folyamat előre programozható, a lépések számítógépes vezérlés mellett történnek. A folyamat során a mikrohullámú térben a dipólus molekulák rezgő mozgást végeznek és ütköznek egymással, ami hatására maga az elegy gyorsan felmelegszik, a tároló edények azonban nem [26]. A mikrohullámú feltárás során leggyakrabban koncentrált salétromsav és hidrogén-peroxid elegyét használjuk az oxidációhoz.

2.5.2. Elemanalízis

A biológiai minták elemkoncentrációjának meghatározása történhet roncsolást nem igénylő és roncsolást igénylő technikák segítségével. A roncsolás-mentes mérési módszerek sokszor rossz kimutatási határokkal és hosszú mérési idővel jellemezhetőek, így a műszeres analitikában elterjedtebbek a feltárással járó elemanalitikai technikák [29].

Az atomspektroszkópiai módszereken belül az atomabszorpciós spektrometria az 1950-es évektől dinamikusán fejlődő műszeres elemanalitikai módszer család, amely a mai napig fontos helyet foglal el az elemanalízisben. Lényege, hogy a vizsgált elemet alapállapotú szabad atommá alakítjuk és az elemre jellemző hullámhosszágú fényt bocsátunk keresztül rajta, miközben mérjük az atomok koncentrációjával kapcsolatban álló fényintenzitás csökkenését. A fényintenzitás csökkenésének jellemzésére szolgáló mérési adatot abszorbanciának nevezzük, amely a következő matematikai művelet eredménye: $A = \lg I_0 / I$. Az abszorbania és a vizsgált elem koncentrációja közötti összefüggést a Lambert-Beer törvény adja meg: $A = l * c * \epsilon$.

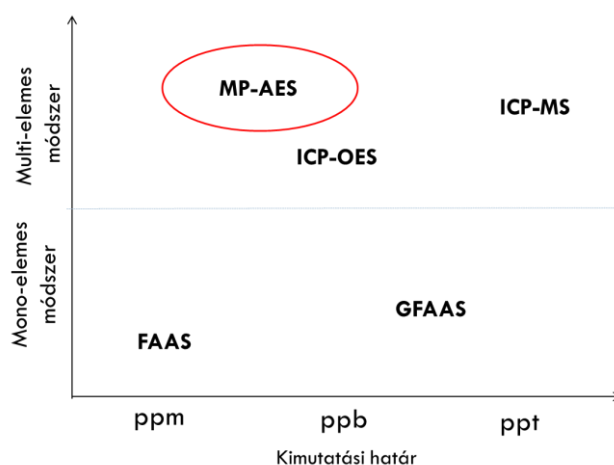
A lángatomabszorpciós spektrometria (FAAS) esetében magas hőmérsékletű, általában acetilén-levegő előkevert lángot alkalmaznak, amelybe a minta aeroszolt beporlasztják. Ez a módszer jelenleg az egyik leggyorsabb elemanalízist biztosító technika, alig 5-6 másodperc alatt nyújt lehetőséget egy elem koncentrációjának oldatból történő mennyiségi meghatározására. A grafitkemencés atomabszorpciós spektrometria (GFAAS) esetében az atomizáló tér egy magas hőmérsékletre fűthető grafitcső, amelybe automata mintaadagoló segítségével reprodukálhatóan lehet kis (10-20 μ l) térfogatú mintaoldatot cseppenteni. A

GFAAS az egyik legérzékenyebb elemanalitikai módszer, amely lehetőséget ad a vizsgált elemek pikogramm - femtogramm mennyiségben történő kvantitatív meghatározására [30].

Az emissziós sugárforrásokat alkalmazó elemanalitikai módszerek közül az induktív csatolású plazma optikai emissziós spektrometria (ICP-OES) a legszélesebb körben használt műszeres technika oldatos minták elemzésére. Az akár 10 000 K hőmérsékletű plazmát általában argon gáz segítségével rádiófrekvenciás energia hozza létre és tartja fenn folyamatosan [31]. Az utóbbi években elterjedtebbek a szimultán optikai rendszerrel rendelkező készülékek és a detektálás is dinamikus fejlődésen ment keresztül (töltéscsatolt és töltésátviteli eszközök).

A mikrohullámú energiaközléssel (MIP-AES) előállított plazmák atomemissziós alkalmazási lehetőségeivel számos hazai és külföldi tanulmány foglalkozott, amely módszer az induktív csatolású plazma (ICP-AES) technikához képest kisebb elektromos teljesítményen és gázáramon működik. A MIP-AES elérhető analitikai teljesítőképessége a sugárforrás mátrixérzékenységének köszönhetően elmarad az induktívan csatolt plazmától, így a módszer korlátozott alkalmazási lehetőségei miatt nem terjedt el a spektrometriás technikák piacán [32; 33; 34; 35; 36; 37].

A mikrohullámú plazma sugárforrások fejlesztésében áttörést egyetlen gyártó cég ért el 2011-ben, amikor megjelent a kereskedelmi forgalomban kapható első, olyan mikrohullámú rendszerű spektrométer, amely kiküszöbölte a módszer kis plazmatérfogatból és csekély termikus kapacitásból származó hátrányait. A 1. ábra az új módszer helyét szemlélteti az atomspektrometriában alkalmazott műszeres technikák között.



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

A mikrohullámú plazma atomemissziós spektrometria (MP-AES) tehát egy új elemanalitikai technika, amely a lángfotometriás módszerekkel szemben számos előnnyel rendelkezik (2. ábra). A magnetron 2,5 GHz frekvencián generál elektromágneses hullámokat, a keletkező mágneses mező axiális térben fókuszálódik a plazmaégő köré. A plazmagázként funkcionáló nagy tisztaságú nitrogént egy generátor a laboratórium levegőjéből állítja elő, amely szelepeken keresztül közvetlenül a plazmaégőbe jut. A kialakuló torroid alakú plazma hőmérséklete alacsonyabb a hagyományos induktívan csatolt plazmákhoz képest (5000-6000K). Az általunk alkalmazott MP-AES 4100-as készülékben a plazma radiális irányú, a megfigyelés azonban axiális. Az optikai rendszer Czerny-Turner típusú monokromátorral van felszerelve, a detektálás CCD detektor segítségével történik [38].



2. ábra A mikrohullámú plazma atomemissziós spektrométer (MP-AES, 4100 Agilent Technologies)

3. Anyag és módszer

3.1. Felhasznált anyagok

- 65 (m/m) % salétromsav (VWR)
- 30 (m/m) % hidrogén-peroxid (reagent grade, Scharlau)
- ioncserélt víz (Millipore-MilliQ A10 víztisztító berendezés)
- nátrium-klorid (AnalaR NORMAPUR, VWR)
- kálium, magnézium, kalcium, réz, cink és vas 1000 mg/L törzsoldata (Scharlau, AAS standard)

3.2. Alkalmazott eszközök és műszerek

- csavaros kupakkal ellátott műanyag kémcső (PP edény PE kupakkal, 15 ml)
- automata pipetta (Biohit proline)
- mikrohullámú roncsoló berendezés (Milestone MLS-1200 Mega)
- mikrohullámú plazma atomemissziós spektrométer (MP-AES 4100, Agilent Technologies)

3.3. Mátrixhatás vizsgálat kísérleti terve

Az atomspektrometriás elemanalízis során a vizsgálandó elem spektroszkópiái jelének nagyságát a mátrixhatásoknak két típusa befolyásolhatja: a fizikai és a kémiai mátrixhatás. A fizikai hatás a minta fizikai tulajdonságaitól függ, míg a kémiai hatás akkor jön létre, ha egy vagy több elem jelenléte gyakorol hatást a mérendő komponens emissziós jellemzőire a mintában [30].

A vészérumban található természetesen magas nátrium koncentráció könnyen ionizálódó elem révén zavarhatja az atomspektrometriás módszerekkel történő mennyiségi analízist. A mikrohullámú plazma egy olyan új gerjesztő forrás, amelyben a lejátszódó zavaró hatások mértéke egyelőre nem teljesen ismert. Ezért kutatásainkat a nitrogén plazmában esetlegesen lejátszódó mátrixhatások felderítésével kezdtük. Két modell kísérletet állítottunk be a mintákban lévő nátrium koncentráció K, Ca, Mg, Cu, Zn és Fe intenzitására gyakorolt hatásának vizsgálatára.

Az első kísérletben faktoriális terv alapján állítottuk össze analitikai tisztaságú spektroszkópiás standard oldatokból (Scharlau) a vizsgálandó elemeket tartalmazó mintaoldatokat. Előkísérleteink alapján a roncsolt vészérum minták maximum tízszeres hígításban alkalmazhatóak MP-AES analízisre annak érdekében, hogy a mikroelemek is

kimutatható koncentrációban legyenek. A nátrium normál koncentráció tartománya a humán vésérúmban 135-145 mmol/l [39, 40, 41], tehát a hígított mintákban (bemért szezúrm térfogattól függően) akár 300-500 mg/l is lehet a nátrium koncentrációja. A hígított minták nátrium koncentráció tartományának alsó (300 mg/l) és felső (500 mg/l) határát alkalmaztuk a modell mintákban „minimum” és „maximum” mátrix koncentrációként, valamint beállítottunk egy „centrum” (400 mg/l) mátrix koncentrációt is. A mátrix koncentráció beállítását a modell oldatokban analitikai tisztaságú NaCl szilárd bemérésével végeztük (VWR). A modell mintákban a vizsgált elemek koncentrációi a kalibráló oldatsorozat legkisebb és legnagyobb tagjainak feleltek meg. Az elemek és a mátrixként alkalmazott nátrium koncentrációját a „minimum”, „maximum” és „centrum” esetben az 1. táblázat tartalmazza, a 2. táblázatban pedig a faktoriális vizsgálat során alkalmazott kísérleti elrendezés mátrix táblázata látható.

1. táblázat A faktoriális kísérleti tervben meghatározott modell oldatok összetétele

Elemek	minimum koncentráció	maximum koncentráció	centrum koncentráció
Na (mg/l)	300	500	400
K (mg/l)	5	25	15
Ca (mg/l)	2,5	15	7,5
Mg (mg/l)	1	5	3
Cu (mg/l)	0,1	0,5	0,3
Zn (mg/l)	0,1	0,5	0,3
Fe (mg/l)	0,1	0,5	0,3

2. táblázat A faktoriális terv kísérleti elrendezésének mátrix táblázata

Minta oldatok	Elemek	Na
1.	minimum	minimum
2.	minimum	maximum
3.	maximum	minimum
4.	maximum	maximum
5.	centrum	centrum

A második kísérletnél a növekvő nátriumkoncentráció hatását vizsgáltuk a vésérumból mérendő elemek (K, Ca, Mg, Cu, Zn és Fe) intenzitás értékeire. Az elkészített modell minták tehát növekvő koncentrációban tartalmazták a nátrium mátrixot, a vizsgálandó elemek esetében pedig a kalibráló oldatsorozat „centrum” koncentrációját alkalmaztuk. A mintaoldatok készítésekor az első kísérletben alkalmazott vegyszereket használtuk. Az így elkészített oldatok összetételét az 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat A növekvő nátrium koncentráció hatásának vizsgálata során alkalmazott modell oldatok összetétele

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

3.4. Mintavétel és tárolás

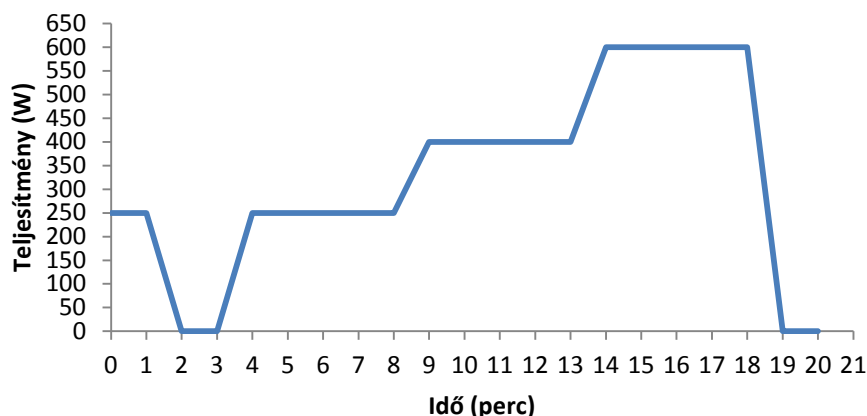
A Belgyógyászati Intézet (DE OEC ÁOK) III. sz. Belgyógyászati Klinika ambuláns szakrendelésén megjelent autoimmun betegektől natív vérvételi csővel gyűjtötték a klinika munkatársai a vérmintákat, amely sэрúm frakcióját centrifugálás után a rendelkezésünkre bocsátották. A kutatásainkhoz szükséges egészséges sэрúm minták az I. sz. Belklinikáról származtak. A kontroll csoportba tartozó minták fiatal, saját bevallásuk alapján nemdohányzó önkéntesektől származtak, akik laboratóriumi vizsgálati eredményei kóros elváltozást nem mutattak. Az Eppendorf csövekben tárolt mintákat -70 °C-on fagyasztva tartottuk a feldolgozás megkezdéséig.

3.5. Minta előkészítése

Az orvosi etika érdekében minden esetben átlagmintákat használtunk az analízishez, összesen 60 független átlagmintát vizsgáltunk (csoportonként 20 minta). A hígítatlan sэрúm mintákból analitikai mérlegen 0,5000 g-ot mértünk be a roncsoláshoz, amelyet mikrohullámú egységben teflon edényekben végeztünk. A zárt rendszerben végzett roncsolás során egy lépésben adtuk a mintához a 2 ml 65 (m/m) %-os HNO_3 -at és a 0,2 ml 30 (m/m) %-os H_2O_2 -ot. A teflon edényeket a rotor lezárása után a feltáró egységbe helyeztük (Milestone MLS-1200 Mega, 3. ábra) és a roncsolást a 4. ábrán látható szabályozott felfűtési programon végeztük. A rotort átfolyó csapvizet rendszerben szobahőmérsékletűre hűtöttük, a mintákat ioncserélt vízzel (Millipore-MilliQ A10 víztisztító berendezés) 10 ml-es mérőlombikokba maradékmentesen átmottuk és jelre töltöttük. Minden mintából három párhuzamos roncsolást végeztünk, a párhuzamos ismétlésekre mért elemkoncentrációkat átlagoltuk.



3. ábra Milestone MLS-1200 Mega mikrohullámú feltáró készülék



4. ábra A mikrohullámú roncsolás során alkalmazott program, amely a beállított teljesítményt a roncsolási idő függvényében ábrázolja

3.6. Mintaoldatok elemanalízise MP-AES módszerrel

Mindkét mátrixhatás vizsgálat mintaadatainak Ca, K, Mg, Cu, Zn és Fe koncentrációjának meghatározása MP-AES módszerrel történt. A mintákat három ismétlésben készítettük el, az elemanalízis során ismétlésenként további három párhuzamos mérést végeztünk. Az analízis során a vegyszereink tisztaságát háttér minták (vakminták) mérésével ellenőriztük. Magas sótartalmú mintákra specializált univerzális porlasztót (OneNeb) alkalmaztunk, amely a porlasztótest teljes hosszán állandó belső átmérővel rendelkezik. A mintaoldatok mérése automata mintaadagoló robot segítségével véletlenszerű sorrendben történt (Agilent Technologies SPS 3) (5. ábra).



5. ábra Az MP-AES készülékhez használt OneNeb porlasztó és SPS3 automata mintaadagoló

A legfontosabb mérési paramétereket a 4. táblázat foglalja össze. Fontos megjegyezni, hogy a mikrohullámú plazma a hagyományos induktívan csatolt plazmákhoz

képest viszonylag szűk tartományban biztosít stabilitást, így a táblázatban található változtatható értékeken kívül a többi mérési paraméter gyárilag beállított érték. Elővizsgálatokat végeztünk a minták koncentráció tartományának megfelelő érzékenyséű elemző vonalak kiválasztására, a 4. táblázatban az előzetes vizsgálataink alapján legérzékenyebbnek tűnő vonalak láthatóak.

4. táblázat Az MP-AES mérési paraméterei

mérendő elem	hullámhossz (nm)	kiolvasási idő (s)	porlasztónyomás (kPa)
K	766.491	5	240
Ca	430.253	5	140
Mg	285.213	5	240
Zn	213.857	20	140
Cu	324.754	10	240
Fe	371.993	20	120

3.6.1. Autoimmun szérumminták elemanalízise MP-AES módszerrel

A két autoimmun betegcsoport, valamint a kontroll csoport mintáiból a mikrohullámú roncsolást követően MP-AES módszerrel mértük a K, Ca, Mg, Zn, Cu és Fe elemek koncentrációját. A kalibráló oldatsorozatok, valamint az MP-AES műszeren beállított mérési paraméterek a mátrixhatás vizsgálatokhoz hasonló módon a 4. táblázat alapján történtek. Az analízis során kalibráló oldatokat alkalmaztunk, amit analitikai tisztaságú spektroszkópiai törzsoldatokból készítettük (Scharlau). A vegyszereink tisztaságát vak mintával ellenőriztük. Az elemanalízis során minden mintából 3 párhuzamos ismétlést végeztünk.

3.6.2. Statisztikai analízis

A vizsgálatok során kapott eredmények kiértékelése statisztikai módszerekkel történt.

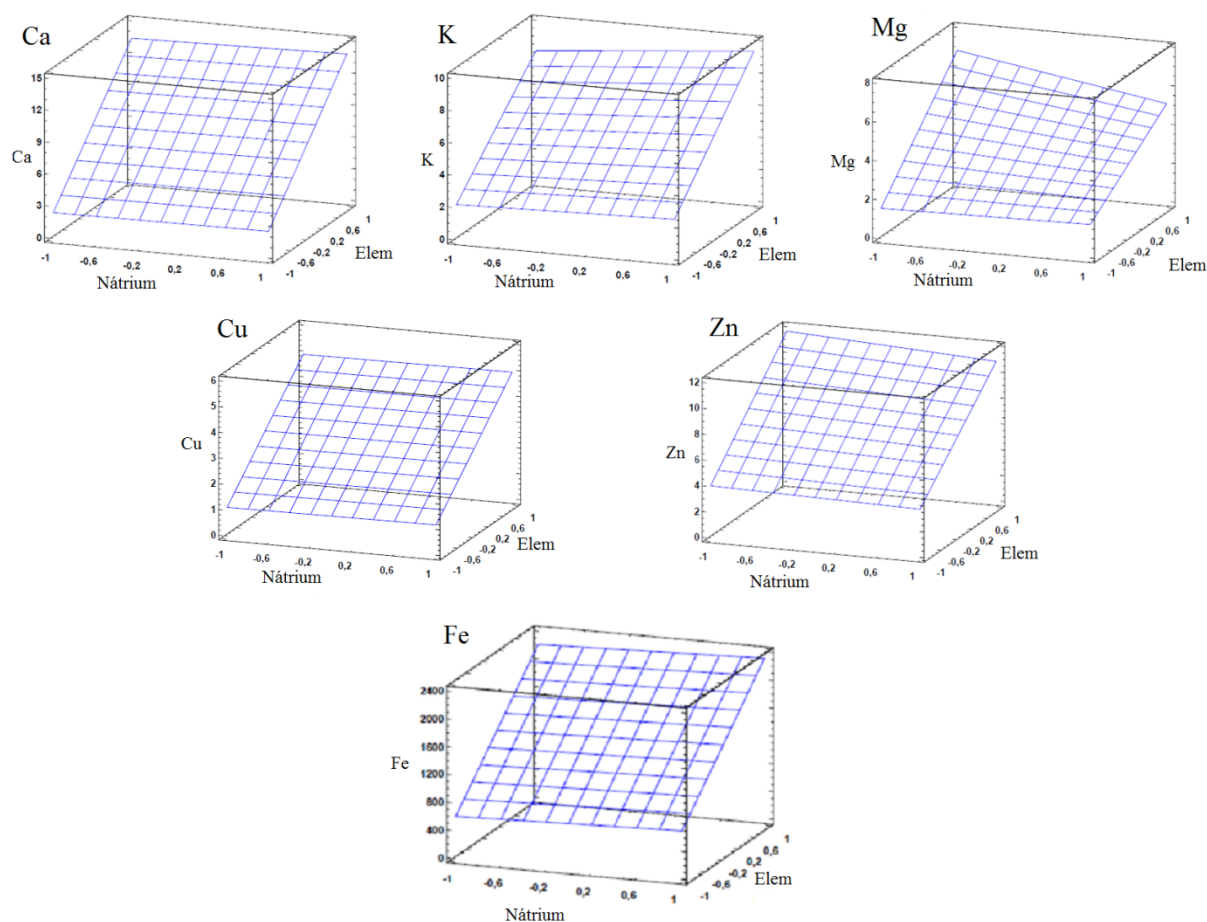
A mátrixhatás vizsgálatok első modell kísérlete egy 2^n faktoriális terv, amely válaszfüggvényének grafikus kiértékelésére Statgraphics Centurion szoftvert alkalmaztunk. A hatások vizsgálata szórásanalízissel (varianciaanalízis, ANOVA) történt.

A valós minták (egészséges és autoimmun vérérumok) elemkoncentrációját egy utas varianciaanalízis (One-way ANOVA) segítségével hasonlítottuk össze SpSS for Windows programcsomag alkalmazásával. Az adatok transzformációja után a homogenitást Levene teszttel ellenőriztük. A szignifikáns különbségeket Tukey teszttel értékeltük.

4. Eredmények és azok kiértékelése

4.1. Modellkísérletek a vészérum minták analízisekor fellépő mátrixhatások felderítésére

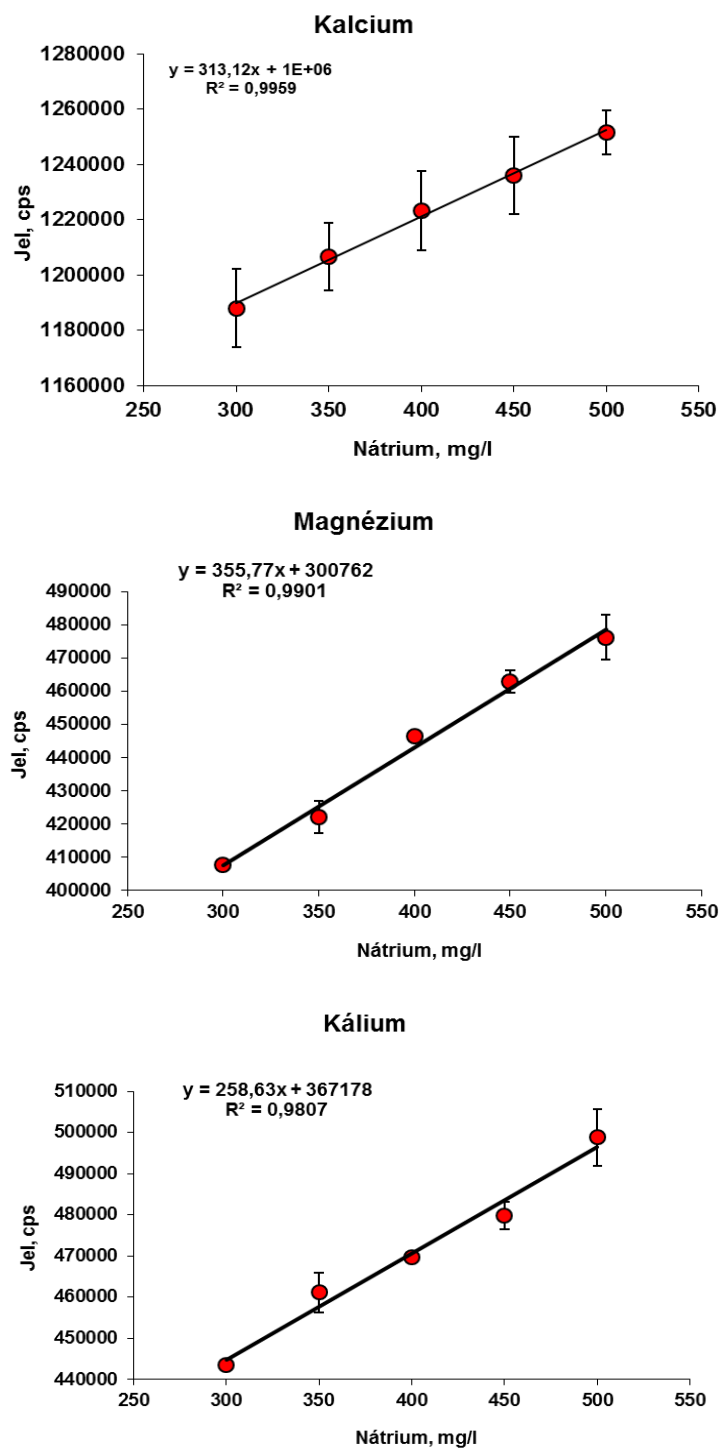
A teljes faktoriális kísérlet lehetőséget nyújt arra, hogy az egyes faktorok és azok együttes hatását vizsgáljuk a minőségi jellemzőkre vonatkozóan. Az úgynevezett főhatások az egyes faktorok beállításából származnak, míg a kölcsönhatásokat (interakciók) több faktor együttes beállítása eredményezi. A randomizált sorrendben mért minták intenzitásainak statisztikai értékelése során elemenként térben ábrázoltuk a faktoriális terv eredményét, amely könnyebben megfigyelhetővé teszi a valós folyamatot és annak tulajdonságait. A grafikus ábrázolás a 6. ábrán látható.



6. ábra A teljes faktoriális terv grafikus kiértékelése a kapott válaszfüggvények térbeli ábrázolásával

Az ábrák alapján jól látható, hogy a magas nátrium koncentráció minden elem esetében hatással volt a kapott jelintenzitásokra. A kalcium, réz és vas esetében volt hatása a nátrium koncentrációnak, míg a cink, magnézium és kálium esetében interakciót is tapasztaltunk.

A második modellkísérlet alátámasztotta a faktoriális terv eredményeit. A növekvő nátrium koncentráció függvényében ábrázoltuk az elemekre kapott jelintenzitásokat, amelyet a makroelemek példáján a 7. ábra szemléltet. Jól látható, hogy a mintákban növekvő koncentrációban jelen levő nátrium szignifikáns jelnövekedést eredményezett.



7. ábra A növekvő nátrium koncentráció (mg/l) függvényében ábrázolt intenzitás (cps) értékek a makroelemek esetében

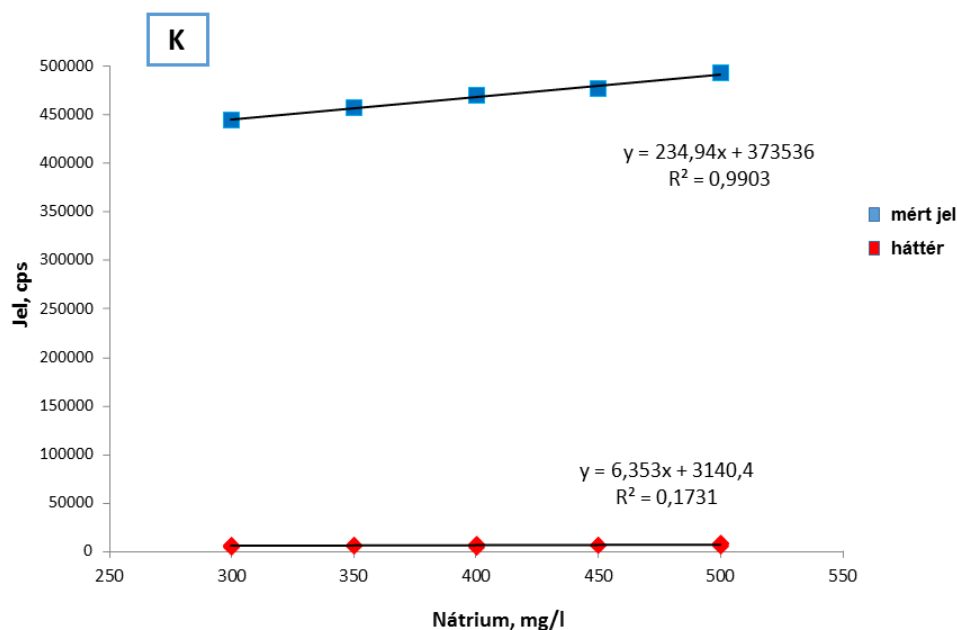
A jelnövekedések mértékét számszerűsítettük úgy, hogy a kísérlet során alkalmazott „centrum” nátrium koncentrációt vettük alapul (400 mg/l). Kiszámoltuk a hígított vészérum mintákban várható nátrium koncentráció tartomány alsó és felső határára vonatkoztatott százalékos hibákat, amely a vizsgált elemeknél a tapasztalt jelnövekedésből adódik (5. táblázat).

5. táblázat A jelnövekedésből adódó eltérések mértéke (%) a hígított vészérum mintákban várható nátrium koncentráció középértékéhez viszonyítva

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

A második mátrixhatás vizsgálat mérése során minden egyes mintaoldatból mind a hat elem intenzitását felvettük, tehát azon elemek mérése is megtörtént, amelyeket az adott minta nem tartalmazott. Így lehetőségünk volt nagy mennyiségű mintából meghatározni a háttér, amely az analízis során állandónak bizonyult. A felvett háttér a kálium példáján a 8. ábrán mutatom be, ahol ábrázoltuk a káliumra kapott intenzitásokat a nátrium mátrix koncentrációjának függvényében. A mért jel azon mintákban felvett kálium intenzitás értékek ábrázolását jelenti, amelyek tartalmaztak káliumot, a háttér jel pedig a káliumot nem tartalmazó mintákban mért intenzitás értékekre vonatkozik. A további öt elem mérése során felvett háttér nem különbözött szignifikánsan a kálium háttérétől, tehát állandónak bizonyult.

Autoimmun betegektől származó vészérum minták elemanalitikai vizsgálata mikrohullámú plazma atomemissziós spektrometriával



8. ábra A káliumot tartalmazó (mért jel) és a káliumot nem tartalmazó (háttér) modell minták intenzitás értékei (cps) a növekvő nátrium koncentráció (mg/l) függvényében

A nagy mennyiségű mintából felvett háttér intenzitás lehetőséget adott arra is, hogy a kimutatási határokat a háttér intenzitások varianciaanalízise során kapott átlag és szórás értékek alapján számoljuk. Így precízebben tudjuk meghatározni az adott mintamátrixban lévő elemek kimutatási határait (LoD), amelyet elemenként a 6. táblázat szemléltet.

6. táblázat Az elemző vonalak és a számolt kimutatási határok (LoD) értékei

Mért elemek	Hullámhossz (nm)	LoD (mg/l)
K	766.491	0,005
Ca	430.253	0,028
Mg	285.213	0,01
Zn	213.857	0,004
Cu	324.754	0,0019
Fe	371.993	0,011

Az MP-AES készülék MP-Expert elnevezésű szoftvere lehetőséget ad az esetlegesen fellépő spektrális zavaró hatások utólagos felderítésére azáltal, hogy az elemző vonalak környezetét is tárolja a spektrumban. Így a mérések alatt folyamatosan vizsgáltuk a kapott spektrumokat, de egyéb zavaró hatást nem észleltünk.

4.2. Autoimmun betegek sérúmmintáinak elemanalízise

A mátrixhatás vizsgálatokat követően autoimmun betegektől származó valós sérúm minták Ca, K, Mg, Cu, Zn és Fe tartalmát határoztuk meg. Összesen hatvan darab átlagminta elemzésére került sor, csoportonként (kontroll, SS, SLE) húsz darab mikrohullámú egységben roncsolt mintát vizsgáltunk. Az egyes csoportok jelölése és a csoportokba tartozó páciensek átlagéletkora a 7. táblázatban található.

7. táblázat Átlagéletkorok alakulása az egyes csoportokban

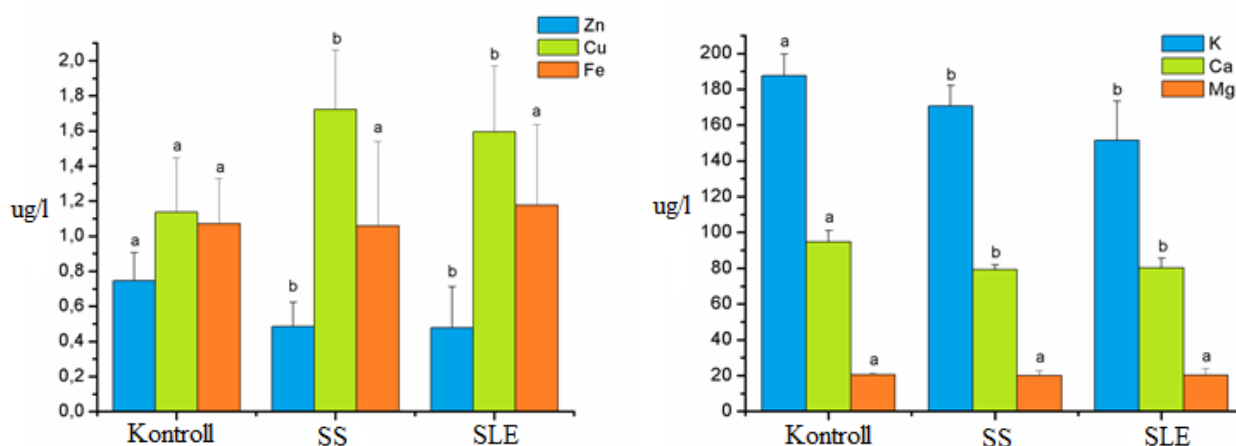
Csoportok	Átlagéletkor
Kontroll*	35,2 ± 6,3 év
SLE**	43,8 ± 10,3 év
SS***	58,7 ± 14,2 év

*Egészséges sérúmminták

** Szisztémás lupus erythematosus-os sérúmminták

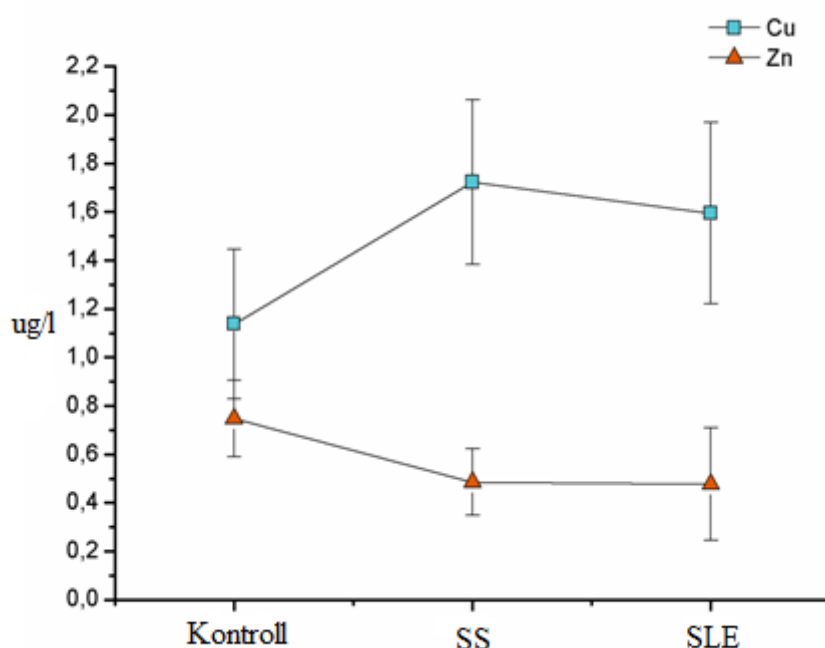
***Sjögren szindrómás sérúmminták

A valós mintákra kapott eredményeket a 9. ábra szemlélteti. A diagramokon a három különböző csoportban kapott elemkoncentrációk átlag értéke a szórással együtt van feltüntetve, a különböző betűk az oszlopdiagramok felett pedig szignifikáns különbségeket jelölnek.



9. ábra A makro- és mikroelemek koncentrációja a vizsgált csoportokban (a különböző betűk szignifikáns különbségeket jelölnek, $p < 0.05$)

A beteg mintákban a Mg és a Fe koncentrációban nem mutatkozott szignifikáns különbség. A Ca koncentrációja szignifikánsan alacsonyabb volt az SS és SLE csoportban a kontrollhoz képest ($p<0.001$), valamint a K koncentráció is statisztikailag alacsonyabb volt a beteg mintákban ($p<0.05$). A Zn tartalom szignifikánsan csökkent ($p<0.05$), míg a Cu tartalom szignifikánsan nőtt ($p<0.001$) a beteg mintákban a kontrollhoz képest. A Zn és Cu szignifikáns eltérését a kontroll mintáktól a 10. ábrán szemléltetem, ahol jól látszik, hogy a megnövekedett Cu koncentráció statisztikailag alacsonyabb Zn koncentrációt eredményezett.



10. ábra A Zn és Cu koncentráció alakulása a vizsgált csoportokban

5. Következtetések

A mikrohullámú plazma atomemissziós spektrometria egy olyan új gerjesztő forrást alkalmazó készülék, amelyben a lejátszódó zavaró hatások kevésbé ismertek, valamint kisszámú biológiai applikációt tartalmazó szakirodalom áll a rendelkezésünkre.

A vizsgálataink első lépésében modellkísérletek segítségével derítettük fel a vészérum minták magas nátrium koncentrációjának hatását a mérendő elemek intenzitás értékeinek meghatározására. Mind a két mátrixhatás vizsgálat alátámasztotta, hogy a vészérumban normál koncentráció tartományban előforduló nátrium hatást gyakorol a kalcium, magnézium, kálium, réz, cink és vas intenzitás jelére. Ez a hatás a magnézium és a kálium esetében tekinthető jelentősebbnek, de komoly torzulást az eredményekben nem okoz. A valós elemanalitikai vizsgálatok során alkalmazott, hígított szérumminta nátrium koncentráció tartományának alsó és felső határára számolt hibaszázalékok pedig lehetőséget adnak a későbbi mérések korrekcióba vételére.

Az autoimmun beteg szérummintáinkra kapott koncentráció értékeket összehasonlítottuk Yilmaz és munkatársai (2004) eredményeivel [42]. A török kutatók Szisztémás lupus erythematosusban (SLE) szenvedő betegek szérumában ICP-OES módszerrel vizsgálták a Mg, Zn, Cu és Fe mennyiségét. A hasonló mintaszámmal végzett kísérlet eredményei jó korrelációt mutatnak a saját vizsgálatunkkal: nem észleltek szignifikáns különbséget a Mg és Fe koncentrációjában az egészséges mintákhoz képest, azonban statisztikai eltérést figyeltek meg a Cu és Zn koncentrációjában (8. táblázat).

8. táblázat SLE beteg szérumminták összehasonlítása

	Saját eredmények		A. Yilmaz et al. /2004/**	
	Kontroll	SLE	Kontroll	SLE
n	20	20	20	27
Mg (µg/ml)	20.41 ± 1.19	20.26 ± 3.65	20.00 ± 2.00	19.00 ± 2.00
Zn (µg/ml)	0.75 ± 0.16	0.47 ± 0.23*	0.99 ± 0.22	0.88 ± 0.20*
Cu (µg/ml)	1.14 ± 0.31	1.60 ± 0.37**	0.94 ± 0.20	1.33 ± 0.23**
Fe (µg/ml)	1.07 ± 0.26	1.18 ± 0.46	1.04 ± 0.30	0.96 ± 0.29

*p<0.05, ** p<0.001 a kontroll csoporthoz képest

A jól ismert kompetitív antagonizmus jelentkezett a két nyomelem között, a betegségcsoportok esetén megfigyelt Zn hiány többlet Cu akkumulációval társult. A saját eredményeink ezt a megfigyelést alátámasztják, valamint egy másik autoimmun betegségcsoport esetében is (SS) igazolják. A két mikroelem koncentrációja pedig nem csupán az általunk egészségesnek tekintett kontroll csoporttól mutat szignifikáns eltérést, hanem a viszonylag tág, szakirodalomban meghatározott normál koncentráció tartománytól is (9. táblázat). A cink, a réz és a vas a szervezet normál immunműködésében fontos szerepet játszik. A koncentrációjukban bekövetkező változás befolyásolhatja a szuperoxid dizmutáz enzim aktivitását, ezáltal elősegítheti az oxidatív stressz kialakulását [43].

9. táblázat A normál és az általunk az egyes vizsgálati csoportokban mért réz és cink koncentrációk összehasonlítása

	Cu (µg/ml)	Zn (µg/ml)
Normál	0,787-1,308*	0,620-1,214*
Kontroll	1,14 ± 0,31	0,75 ± 0,16
SS	1,72 ± 0,34	0,49 ± 0,14
SLE	1,6 ± 0,37	0,47 ± 0,23
*[39, 40, 41]		

Yilmaz és munkatársai ugyanezen tanulmányukban felhívták a figyelmet arra, hogy az autoimmun betegek sérum mintái eltérést mutattak egyes extracelluláris fehérjék szintjében is. Mindamellet, hogy ezek a fehérjék antioxidáns tulajdonságaiknak köszönhetően nagymértékben járulnak hozzá a normál immunműködéshez, részt vesznek az esszenciális nyomelemek transzportfolyamataiban [44; 45; 46; 47]. A fehérjék szintjének autoimmun betegségek során fellépő változása tehát biokémiai folyamatok révén befolyásolhatja a nyomelem-kötő és szállító tevékenységet is, amely akár oka, akár következménye lehet az autoimmun elváltozásnak. Speciációs analitikai technikákkal lehetőség nyílik a fent vázolt biokémiai folyamatok tanulmányozására azáltal, hogy elválasztjuk a betegségekben fontos szerepet játszó szállító és antioxidáns fehérjét, majd meghatározzuk a nyomelem-eloszlásukat. Mindezek alapján a betegségek során a szervezet nyomelemstátuszában végbemenő folyamatok biokémiai háttere további vizsgálatokat igényel.

6. Összefoglalás

Tudományos diákköri munkám során mikrohullámú plazmában végeztem elemanalitikai vizsgálatokat humán vészérum minták makro- és mikroelem koncentrációjának megállapítására. Az első kereskedelmi forgalomban kapható mikrohullámú rendszerű spektrométer (mikrohullámú plazma atomemissziós spektrométer, MP-AES) jellegzetessége, hogy az alkalmazott nitrogén plazma hőmérséklete alacsonyabb, mint a hagyományos induktívan csatolt plazmáké. A speciális gerjesztő forrásban létrejövő zavaró hatások egyelőre kevésbé vizsgáltak.

Az emberi vér elemanalitikai vizsgálata több szempontból is összetett feladat, a magas szerves anyag tartalom okozta bonyolult mátrix mellett számolni kell a könnyen ionizálódó nátrium magas koncentrációjával. A vészérumban lévő nátrium zavaró hatásának vizsgálatára modell mintákból álló faktoriális kísérletsorozatot állítottunk össze. A mátrixhatás kísérlet eredményei alapján elmondható, hogy az elemanalízisre használt hígított vészérumban megtalálható nátrium koncentráció (300-500 mg/l) szignifikáns jelnövekedést eredményezett a mért kálium, kalcium, magnézium, réz, cink és vas esetében. Kiszámoltuk a szérummintákban a hígítás után várható nátrium koncentráció tartomány alsó és felső határa vonatkoztatott százalékos hibákat, amelyek az intenzitás értékek megnövekedéséből adódtak. A valós értéktől a magnézium esetében tapasztaltunk nagyobb eltérést. A teljes faktoriális kísérleti terv szerint végzett mátrixhatás vizsgálat a kalcium, réz és vas esetében hatást, míg a cink, magnézium és kálium esetében interakciót eredményezett.

Az MP-AES módszer tesztelését valós mintákkal folytatva autoimmun betegségben szenvedő páciensek (Sisztémás lupus erythematosus, SLE és Sjögren szindróma, SS) szérum mintáiban határoztuk meg a fent említett legfontosabb makro- és mikroelemek mennyiségét. A mikrohullámú egységben elroncsolt szérumok elemanalízise szignifikáns különbséget mutatott a kalcium és kálium koncentrációjában, mennyiségük statisztikailag alacsonyabbnak bizonyult a beteg mintákban a kontroll csoporthoz képest ($p < 0.001$). A vas és magnézium koncentrációjában nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget az egészséges és beteg vizsgálati csoportban, a cink és réz koncentrációja azonban szintén eltérést mutatott ($p < 0.05$). Az ismert antagonizmus jelentkezett a két mikroelem között, a betegcsoportokban a megnövekedett rézkoncentráció cink hiánnyal társult. A két autoimmun betegcsoport között nem mutatkozott azonban statisztikai különbség az elemkoncentrációk tekintetében.

7. Irodalomjegyzék

- [1] **Dr. Kiszely Gy.:** Az emberi vér, Művelt Nép kiadó, Budapest (1953) 6.o; 11.o
- [2] **S. M. Rapoport:** A vér, Medicina Könyvkiadó, Budapest (1966)
- [3] **Bránko-Bozsics:** A vér és az élet, Testvériség Egység könyvkiadó vállalat, Noviszd (1951) 8.o; 11.-12.o
- [4] **I. Rodushkin, F. Ödman:** Assessment of the contamination from devices used for sampling and storage of whole blood and serum for element analysis. J. Trace Elem. Med, Biol. Vol. 15, pp. 40-45 (2001)
- [5] **Q. Pashaa, S. A. Malika, N. Shaheenb, M. H. Shahb:** Investigation of trace metals in the bloodplasma and scalp hair of gastrointestinal cancer patients in comparison with controls. Clinica Chimica Acta, Vol. 411, pp. 531-539 (2010)
- [6] **E. A. Hernández-Caraballoa, L. M. Marcó-Parrab:** Direct analysis of blood serum by total reflection X-ray fluorescence spectrometry and application of an artificial neural network approach for cancer diagnosis. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, Vol. 58, Issue 12, pp. 2205-2213 (2003)
- [7] **R. Witholt, R. H. Gwiazda, D. R. Smith:** The neurobehavioral effects of subchronic manganese exposure in the presence and absence of pre-parkinsonism. Neurotoxicol. Teratol., Vol. 22, pp. 851–861.(2000)
- [8] **K. Gellein, P. M. Roos, L. Evje, O. Vesterberg, T. P. Flatén, M. Nordberg, T. Syversen:** Separation of proteins including metallothionein in cerebrospinal fluid by size exclusion HPLC and determination of trace elements by HR-ICP-MS. Brain Research, Vol. 1174, pp. 136-142 (2007)
- [9] **M. N. Rashed:** The role of traceelements on hepatitis virus infections: A review. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, Vol. 25, Issue 3, pp. 181-187 (2011)
- [10] **P. Friska, P. O. Darnerud, G. Friman, J. Blomberg, N. G. Ilbäck:** Sequential traceelement changes in serum and blood during a common viral infection in mice. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, Vol. 21, Issue 1, pp. 29-36 (2007)

- [11] **M. Molaschi**, M. Ponzetto, B. Bertacna, E. Berrino, E. Ferrario: Determination of selected traceelements in patients affected by dementia. Archives of Gerontology and Geriatrics, Vol. 22, Supplement 1, pp. 39-42 (1996)
- [12] **E. Altekin**, C. Çoker, A. R. Şişman, B. Önvural, F. Kuralay, Ö. Kırımlı: The relationship between traceelements and cardiac markers in acute coronary syndromes. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, Vol. 18, Issue 3, pp.235-242 (2005)
- [13] **S. Urushidate**, M. Matsuzaka, N. Okubo, H. Iwasaki, T. Hasebe, R. Tsuya, K. Iwane, R. Inoue, K. Yamai, K. Danjo, I. Takahashia, T. Umeda, S. Ando, K. Itai, S. Nakaji: Association between concentration of traceelements in serum and bronchial asthma among Japanese general population. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, Vol. 24, Issue 4, pp. 236-242 (2010)
- [14] **Gergely P. - Erdődi F. - Vereb Gy.**: Általános és Bioszervetlen Kémia, Semmelweis Kiadó, Budapest (2005) 228-234.o; 236-245.o; 246-249.o; 257.o; 259-267.o; 271-272.o
- [15] **Márka M.**: Sjögren szindrómában szerepet játszó genetikai faktorok vizsgálata, Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, III. sz. Belgyógyászati Klinika, Molekuláris Biológiai Kutató Laboratórium, Debrecen (2005) 2-4.o.
- [16] **MD Carlos A.** von Mühlen (Research Fellow), MD Eng M. Tan (Director) W. M. Keck: Autoantibodies in the diagnosis of systemicrheumatic diseases. Autoimmune Disease Center, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA Seminars in Arthritis and Rheumatism Vol 24, Issue 5, pp. 323–358 (1995)
- [17] **Dr. Brúgó B. Cs.**: A lupusz nephritis klinikai és immunológiai jellemzői, Debreceni Egyetem, Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola, Debrecen (2010) 2-4.o
- [18] **Kapitány A.**: A fő hisztokompatibilitási rendszer (MHC) polimorfizmusainak vizsgálata különböző autoimmun betegségekben, Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Debrecen (2009) 19.o
- [19] **DD Gladman**, CH Goldsmith, M Urowitz et al.: Damage Index for Systemic Lupus Erythematosus International Comparison J Rheumatol, The Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology (SLICC/ACR) 27 pp. 373–376 (2000)

- [20] **Dr. Papp G.:** Az immunregulációs zavarok vizsgálata szisztémás autoimmun kórképekben, Debreceni Egyetem, Petrányi Gyula Klinikai Immunológiai és Allergológiai Doktori Iskola, Debrecen (2012) 3-4.o
- [21] **N. Talal**, HM Moutsopoulos, SS Kassan (Eds.): Immunological abnormalities in Sjögren's syndrome. Sjögren's Syndrome, Clinical and Immunological Aspects, Springer-Verlag, Berlin, Germany pp. 258–265(1987)
- [22] **CW Parker** (Ed.): Sjögren's syndrome and associated diseases. Clinical Immunology, vol 1Saunders, Philadelphia, PA pp. 632–666 (1980)
- [23] **S. J. Rheumatol:** Salivary histopathology in diagnosis of Sjögren's syndrome 61 pp. 36–43 (suppl) (1986)
- [24] **J. Versieck**, R. Cornelis: Trace Elements in Human Plasma or Serum, CRC Press, Boca Ration (1989)
- [25] **K. Burger:** Az analitikai kémia alapjai, Alliter Kiadós és Oktatásfejlesztő Alapítvány, Budapest (2002) 21-28.o
- [26] **J. Versieck**, F. Barbier, R. Cornelis, J. H. Talanta: Sample contamination as a source of error in trace-element analysis of biological samples Vol 29, Issue 11, Part 2, Pages 973–984 (1982)
- [27] **Debreceni Egyetem Kémia intézet**, Műszeres Analitikai jegyzet, Debrecen (2010) 119-126.o; 131-134.o; 151-154.o; 165-175.o
- [28] **D. Bohrer**, P.C. do Nascimento, S.G. Pomblum: Deproteinization of blood serum by acid treatment and microwave irradiation for the determinationof aluminium by electrothermal atomicabsorption spectrometry. J. Anal. At. Spectrom., 13, 635-639 (1998)
- [29] **Dombovári J.:** Biológiai anyagok nyomelem analitikájának fejlesztés, Development of Trace Analytical Methods of Biological Samples Doktori (Ph.D.) értekezés Debreceni Egyetem Természettudományi Kar, Debrecen (2004) 5-17.o
- [30] **Posta J.:** Atomabszorpciós spektrometria digitális tankönyv, Debreceni Egyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, Debrecen (2008) 5-6.o; 8-10.o
- [31] **Pokol Gy. – Sztatisz J.:** Analitikai kémia I, Műegyetemi kiadó, Budapest (1999)

- [32] **Heltai Gy.**: Elemanalitikai és speciációs analitikai módszerek kifejlesztése és alkalmazása mezőgazdasági-környezetvédelmi célokra, Szent István Egyetem, Kémia és Biokémia Tanszék, Gödöllő (2005) 114-115.o
- [33] **J. P. Matousek**, B. J. Orr, M. Selby: Microwave-Induced Plasmas: Implementation and Application; in: Progr. analyt. atom. Spectrosc., 7, 275-314 (1984)
- [34] **N. S. Ham**, A. Walsh: Microwave-powered Raman sources, Spectrochim. Acta, 12, 88-93 (1958)
- [35] **H. P. Broida**, M. W. Chapman: Stable Nitrogen Isotope Analysis by Optical Spectroscopy, Anal. Chem., 30, 2049-2055 (1958)
- [36] **J. A. C. Broekaert**, V. Siemens: Recent trends in atomic spectrometry with microwave-induced plasmas, Spectrochim. Acta B, 59, 1823-1839 (2004)
- [37] **J. A. C. Broekaert**, U. Engel: Microwave-induced plasma systems in atomic spectroscopy. In: R.A. Meyers, Editors, Encyclopedia of Analytical Chemistry, Wiley, Chichester, 2000, 9613-9667 (2000)
- [38] http://www.novolab.hu/new/index.php?option=com_content&view=article&id=70:4100-mp-aes&catid=31:hirek&Itemid=80
- [39] **W. F. Ganong**: Az orvosi élettan alapjai Medicina Könyvkiadó, Budapest (1990)
- [40] **Szentágothai J.**, Réthelyi M.: Funkcionális anatómia Medicina Könyvkiadó, Budapest (1994)
- [41] **Went I.**: Élettan Medicina Könyvkiadó (1962)
- [42] **A. Yilmaz**, R. A. Sari, M. Gundogdu, N. Kose, E. Dag: Trace elements and some extracellular antioxidant proteins levels in serum of patients with systemic lupus erythematosus, Department of Biochemistry, Nenehatum Obstetrics and Gynecology Hospital, Ataturk University Erzurum, Vol 24, Issue 4, pp 331-335 (2005)
- [43] **H. Vural**, K. Uzun, U. Uz, A. Kocyigit, A. Cigli, Ö. Akyol: Concentrations of copper, zinc and various elements in serum of patients with bronchial asthma. J. Trace Elem. Med. Biol., Vol. 14, pp. 88-91 (2000)

- [44] **L. Wu**, J. Zhan, Y. Zhou, G. Ren, Y. Hu: A simple method for obtaining transferrins from human plasma and porcine serum: Preparations and properties, *Journal of Chromatography B*, Vol. 867, Issue. 1, pp 62-68 (2008)
- [45] **Z. M. Qian**, H. Li, H. Sun, K. Ho: Targeted drug delivery via the transferrin-receptor-mediated endocytosis pathway, *Pharmacol. Rev.*, Vol 54, pp 561 (2002)
- [46] **X. M. He**, D. C. Carter: Atomic structure and chemistry of human serum albumin *Nature*, Vol. 358, pp 209-215 (1992)
- [47] **I. S. Young**, J. V. Woodside: Antioxidants in health and disease, *J. Cli. Pathol*, Vol 54, pp 15-27 (2001)

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Prof. Dr. Fábián István tanszékvezető úrnak, hogy munkámat a Szervetlen és Analitikai Kémia tanszéken végezhettem.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Posta József témavezetőmnek, hogy értékes, minőségi és sokoldalú szakmai segítséget nyújtott.

Köszönöm Fehérné Baranyai Edina egyetemi tanársegédnek, hogy állandó figyelemmel követte munkámat és mindenben a segítségemre volt.

Köszönöm Keresiné Vári Judit vegyészteknikusnak, Dr. Braun Mihály egyetemi adjunktusnak, Nagy István vegyészmérnöknek, Harangi Sándor PhD hallgatónak a munkámban nyújtott segítségüket és támogatásukat.

Külön köszönöm Dr. Tarr Tündének, Dr. Csipő Istvánnak és Dr. Zeher Margitnak a kutatásainkhoz szükséges vészérum minták biztosítását.

Az elemanalitikai mérésekhez szükséges MP-AES készüléket az Agilent Technologies (Novo-Lab Kft.) bocsátotta a rendelkezésünkre.

„A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú „Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program” című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.”