

Szegedi Tudományegyetem
Kémiai Tanszékcsoport

SZAKDOLGOZAT

Tasi Domonkos Attila

2015



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Alkalmazott és Környezeti Kémiai Tanszék

SZAKDOLGOZAT

**Fémionok citotoxicitásának tanulmányozása
magnetit nanorészecskék jelenlétében**

KÉSZÍTETTE:

Tasi Domonkos Attila

Kémia BSc szak

TÉMAVEZETŐK:

Dr. Kónya Zoltán

Tanszékvezető egyetemi tanár

Dr. Kiricsi Mónika

Egyetemi adjunktus

Szabó Mária

PhD hallgató

Szeged

2015

Tartalmi összefoglalás és kulcsszavak

Különböző méretű magnetit nanorészecskéket szintetizáltunk koprecipitációs módszerrel. Citotoxikológiai méréseket végeztünk MTT esszével öt fémionra: Cu(II), Zn(II), Pb(II), Mn(II) és Co(II). Ezekhez a mérésekhez humán MCF-7 és Colo-320 sejteket használtunk. A fémionok közül egyedül csak a Cu(II) ion toxikusságát tudtuk kísérletileg tanulmányozni magnetit nanorészecskék jelenlétében. Ezeknél a méréseknél a magnetit nanorészecskék koncentrációját állandó értéken tartottuk, és a Cu(II) ionok koncentrációját változtattuk.

A magnetit nanorészecskék méretének meghatározására XRD (MiniFlex II röntgendiffraktométer) és TEM (FEI Tecnai G² 20 x-Twin HRTEM) módszereket alkalmaztunk. Az egyik minta átlagos mérete 6 nm-nek, a másiké 14 nm-nek adódott. Az MTT méréseket 96 lyukú mikrotiter plate-en végeztük SPECTROstar^{nano} spektrofotométerrel.

Az MTT mérések alapján az ionok toxikusságának mértékére a következő sorrend adódott: Cu(II) → Zn(II) → Pb(II) → Co(II) → Mn(II), és a 14 nm-es magnetit nanorészecskék nem bizonyultak toxikusnak az alkalmazott koncentrációtartományban.

A Cu(II) ion toxikusságának magnetit nanorészecskék jelenlétében való tanulmányozásakor a korábbihoz képest – amikor nem volt jelen magnetit – kisebb LC50 értéket kaptunk. A két LC50 érték közötti különbség tökéletes összhangban van az irodalomban mások által közölt adszorpciós értékkel. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a magnetit nanorészecskék kompetitív adszorpcióval meg tudják kötni a sejtekben, illetve a sejtek felszínén és a növesztő médiumban lévő Cu(II) ionok egy részét, csökkentve azok mérgező hatását.

A toxikológiai kísérleti adatok kiértékelésére felállítottunk egy exponenciális modellfüggvényt, aminek egyetlen paraméterét lineáris és nemlineáris regresszióval egyaránt meghatároztuk az adatokra való illesztéssel. A modellfüggvény becsült paramétereiből kiszámítottuk az egyes fémionokra vonatkozó 50%-os halálozási koncentrációkat (LC50).

Kulcsszavak: magnetit, nanorészecske, fémionok, Colo-320, citotoxicitás, LC50

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés	2
1.1 Magnetit.....	3
1.2 Fémionok adszorpciója magnetiten	4
1.3 Sejthalál fémionok hatására	4
1.4 Kísérleti módszerek	5
1.4.1 Röntgendiffrakciós analízis (XRD)	5
1.4.2 Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM).....	6
1.4.3 MTT vizsgálat.....	7
1.5 Paraméterbecslés a legkisebb négyzetek módszerével	7
2. Célkitűzés.....	10
3. Kísérleti rész	11
3.1 Vegyszerek	11
3.2 Magnetit nanorészecskék előállítása	11
3.3 Alkalmazott műszerek, berendezések, eszközök és mérési módszerek	12
3.4 A TEM és az MTT mérési adatok kiértékelése	14
4. Az eredmények ismertetése	17
4.1 A magnetit nanorészecskék mérete	17
4.1.1 Röntgendiffrakciós analízis	17
4.1.2 Transzmissziós elektronmikroszkópia.....	17
4.2 A fémionok citotoxicitásának mérése.....	20
4.3 A magnetit citotoxicitásának mérése	24
4.4 A magnetit és a fémionok citotoxicitásának együttes mérése	25
5. Összefoglalás	28
Irodalomjegyzék	29
Köszönetnyilvánítás.....	31
Nyilatkozat.....	32

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

A klasszikus fizika törvényei szerint működő makrovilág és a kvantumfizika szerint működő mikrovilág között helyezkedik el a nanovilág. A kvantumfizika határesetben azonban tartalmazza a klasszikus fizikát, így a kvantumfizika alkalmas a nanovilág fizikai-kémiai leírására. A nanovilág olyan része a térnek, melyben az élettelen vagy élő anyag atomokból önszerveződéssel jön létre úgy, hogy az alkotóknak (részecskéknél) legalább az egyik dimenziójuk, azaz a méretük 100 nm vagy ennél kisebb [1,2].

Napjainkban széleskörűen alkalmaznak különböző nanoanyagokat (nanorészecskék, nanocsövek, nanoszálak, nanotűk, stb.) a mindennapi életben. Köszönhetően a nanoanyagok speciális mágneses, elektromos, optikai, termikus és kémiai tulajdonságainak, az alkalmazási lehetőségek tárháza gyorsan növekszik. A nanoipari forradalom azonban súlyos problémákkal is járhat: oda kell figyelni a nanoanyagok esetleges toxikus hatására [3,4].

A mágneses és arany nanorészecskéket kontraszt- illetve jelzőanyagként szokták alkalmazni. A szerves alapú nanorészecskék biológiai jelentőséggel bírnak: a gyógyszeriparban hatóanyag hordozókként terjedtek el. A szénnanocsöveket az elektronikai iparban alkalmazzák mikrochipekben, LCD panelekben, nanohőmérőkben, sőt még szerkezeti anyagként is. Fémoxid nanorészecskék felhasználásra kerülnek a kozmetikai iparban, a textiliparban, a gyógyászatban és öntisztító bevonatokat is készítenek belőlük. Továbbá, alkalmazzák őket víztisztító berendezésekben [5], napelemekben és autóipari katalitikus konverterekben. Nemrég azonban kimutatták, hogy a kérdéses oxidok nanorészecskéi – eltérően a makro és a mikro változatoktól – toxikusak néhány organizmusra [6].

A mindennapi életben használt nanoanyagok száma gyorsan növekszik, így szükséges gyors módszerek kifejlesztése toxikusságuk és környezetre való kockázatuk becslésére. A toxicitás elméleti (*in silico*) előrejelzése az utóbbi évtizedekben egyre nagyobb jelentőségre tett szert, s általában szerkezet-aktivitás összefüggést (SAR) vagy kvantitatív szerkezet-aktivitás összefüggést (QSAR) alkalmaznak a toxicitás modellezésére [7]. Az utóbbi esetben a kapcsolat konkrét matematikai formában is meg van fogalmazva.

Legtágabb értelemben a számítógépes toxikológia matematikai és számítógépes modellek alkalmazásával segíti felbecsülni anyagok veszélyességét és kockázatát az

emberi életre és a környezetre [8]. Legegyszerűbb esetben az anyagok kémiai szerkezetéből próbálunk következtetni azok toxikusságára. Állatkísérletekkel és egyéb *in vitro* kísérletekkel szemben ez a közelítés jelenti a legkisebb pénz- és időráfordítást. Továbbá, azzal az előnnyel is jár, hogy új anyagok esetén – még azok tényleges szintézise előtt – tudunk már valamit mondani az esetleges toxikusságukról.

Mostanában publikáltak egy nano-QSAR módszert fémoxid nanorészecskék toxikusságának a becslésére [9]. A cikkben 17 fémoxid szerkezete és kólibaktériumokra való toxicitása között állapítottak meg kapcsolatot. A kólibaktériumok különösen jó kísérleti alanyok, mivel a baktériumok a természetben fontos szerepet játszanak szerves anyagok lebontásában. Másrészt a fémoxid nanorészecskéket tartalmazó fogkrémeknek antibakteriális hatással is kell rendelkezniük. A nano-QSAR eredmények azt mutatták, hogy a fémoxid nanorészecskékből az oldatba kerülő fémionok felelősek a toxicitásért: a tanulmányozott 12 kvantumkémiai deskriptor közül egyedül a fémionok sztenderd képződéshője mutatkoztak megfelelőnek.

1.1 Magnetit [10,11,12,13]

A magnetit (mágnésvasérc, mágnésvaskö) egy Fe_3O_4 összegképletű vas-oxid: az elemi cellában egy Fe(II) ion és két Fe(III) ion található. A természetben előfordul, de szintetizálható is. Fekete, kemény, csillogó, ferrimágneses tulajdonságú ásvány. A magnetit Curie-hőmérséklete kb. $585\text{ }^\circ\text{C}$, azaz e fölött a mágnes már nem vonzza. Visszahűtve azonban visszanyeri ferrimágneses tulajdonságát. Gyakran fordul elő különböző magmás, metamorf és üledékes kőzetekben, jellemzően kis mennyiségben, szemcsés kristályok formájában. Egyes földrajzi helyeken (pl. Svédország) különösen tiszta állapotban található. Szintetikus magnetitet általában akkor állítanak elő, ha nanorészecskékre van szükség tudományos kísérletekhez vagy speciális alkalmazásokhoz az orvostudomány és a biotechnológia területén [14,15,16,17].

Ha $300\text{ }^\circ\text{C}$ fölé hevítjük, akkor a szintetikus nano magnetit átalakul maghemitté ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), majd hematitté ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$). A természetes magnetit azonban sokkal stabilabb: valójában metastabilis állapotban van közönséges körülmények között. Néhány mikronos méretű magnetit részecskék mechanikus energia befektetésével, azaz golyós malomban átalakíthatók hematitté. Ez is alátámasztja azt az általános megfigyelést, hogy a finomabb részecskék általában kevésbé stabilak.

A magnetit amfoter tulajdonságú, azaz savként és bázisként is viselkedhet a felületen található hidroxil-csoportoknak köszönhetően. Egyes mérések 5 OH-csoport per négyzetnanométer sűrűségről számolnak be. A tiszta magnetit nem toxikus, sőt sok élőlényben megtalálható (pl. denevérek, madarak, baktériumok, stb.). Az ilyen biogenetikus magnetitnek fontos szerepe van az élőlények tájékozódásában.

1.2 Fémionok adszorpciója magnetiten [12]

Adszorpciós eljárásokat széleskörűen alkalmaznak szennyező anyagok eltávolítására gázokból és folyadékokból. Itt csak a nano magnetittel, mint adszorbenssel, s fémionoknak vizes közegből, adszorpcióval való eltávolítását említjük [15,18,19].

Giraldo és mtsai 8 nm-es átlagos méretű magnetit nanorészecskéket állítottak elő ko-precitációs módszerrel, majd tanulmányozták a magnetit nanorészecskék adszorpciós képességét Pb(II), Cu(II), Zn(II) és Mn(II) fémionok megkötése szempontjából [15]. Az eredmények azt mutatták, hogy a magnetit nanorészecskék legerősebben az Pb(II) ionokat, leggyengébben pedig az Mn(II) ionokat kötik meg. Azt feltételezték, hogy az adszorpciós kölcsönhatás erőssége a pozitív fémion és a negatív töltésű adszorpciós centrum közötti elektrosztatikus kölcsönhatás erősségétől függ. Tanulmányozták a pH, a hőmérséklet és a tartózkodási idő hatását is az adszorpciós eljárás optimalizálása érdekében.

1.3 Sejthalál fémionok hatására [20]

A sejthalál természetes formáit már a 19. században feljegyezték szövettani szakértők. Akkoriban a biológusok érdeklődése elsősorban a sejtek életének és szaporodásának megértése felé irányult, csak később, az 1960-as évektől kezdve került az érdeklődés középpontjába a sejthalál jelensége. Az aktív módon lejátszódó, szabályozott molekuláris folyamatok által „programozott” sejtelhalást – amely gyakorlatilag egy időzített önmegsemmisítés – nevezzük apoptózisnak. Ez és egyéb alternatív formái mind energiát igénylő, relatíve lassú folyamatok. Ezzel szemben a nekrozis ártalmas mechanikai és kémiai hatások által bekövetkező, általában egész sejtcsoportokat érintő masszív sejtelhalás. Ez minden esetben egy energiát nem igénylő, passzív folyamat. A sejthártya felszakad, kontrollálatlan anyagcsere következik be a külső- és belső celluláris tér közt, melynek végkifejleteként a sejtet az őt ért külső hatás megöli. A

dolgozatban a vizsgálat tárgyát képező fémionok (Zn(II), Mn(II), Pb(II), Cu(II), Co(II)) okozta sejtelhalás valószínűleg a nekrozis következménye.

Különböző anyagok toxikusságát – kvantitatív módon – az 50%-os halálozási koncentrációjukkal (LC50) jellemezhetjük. Ez megadja azt a koncentrációértéket, melynél a kiindulási sejtállomány fele elhalt. Egyéb jelölések is használatosak a szakirodalomban: LD50, EC50, stb.

A kísérleti tapasztalatok azt mutatják, hogy 150 nm-nél nagyobb magnetit nanorészecskék nem képesek átjutni a sejtmembránon az intracelluláris térbe [21]. Az intracelluláris térbe való kerülés diffúzió, endocitózis, ioncsatornák és transzporter fehérjék révén lehetséges. Ezek a folyamatok általában nagy mértékben függenek a nanorészecskék összetételétől, méretétől, morfológiájától és töltésétől [22]. A nanorészecskék toxikussága függ a részecskék méretétől, koncentrációjától és a borítottságától [23].

1.4. Kísérleti módszerek [12,13]

1.4.1 Röntgendiffrakciós analízis (XRD)

A röntgensugarak elektromágneses hullámok (energiájuk 100 eV és 100 keV közé esik), melyek szilárd anyaggal való kölcsönhatásuk során úgy szóródnak, hogy abból következtetni tudunk az anyag szerkezetére, kémiai összetételére és fizikai tulajdonságaira. A röntgendiffrakciós analízis révén meghatározhatjuk az adott anyag kristályszerkezetét és a krisztallitok méretének illetve alakjának a sztatikus adatait.

Rézatomok ionizációja révén állítunk elő monokromatikus röntgensugárzást: a nagyenergiájú elektronok kilökik a belső héjról az elektront, és egy külső pályán lévő nagyobb energiájú elektron elfoglalja annak helyét. Ez a $2p \rightarrow 1s$ átmenet (melyet K_{α} -nak is neveznek) kvantált, hullámhossza 1,54 Å.

A röntgensugarak elsősorban az atomok elektronjaival lépnek kölcsönhatásba. A sugárzást alkotó fotonok ütköznek az elektronokkal és eltérülnek az eredeti irányuktól. Így az atom elektronfelhője a tér minden irányába sugározza a röntgenfotonokat. Ezt a jelenséget nevezzük röntgenszórásnak. Ha a röntgensugarak nem veszítenek energiájukból a folyamatot Thompson- vagy rugalmas szórásnak, ha veszítenek, akkor Compton- vagy rugalmatlan szórásnak nevezzük.

A diffraktogramokon a detektor által mért röntgensugarak intenzitását ábrázoljuk az ún. 2Θ szög függvényében, ahol Θ a kristálysík és a beesési sugár által bezárt szög. A diffraktogram maximumai a kristályrác geometriáját adják meg, az intenzitásuk a tömegpontok helyzetétől függ. A kristályokon létrejövő diffrakciós kép legkorábbi elemzésében a kristály rácssíkjait tükröknek tekintették, a kristályt pedig egymástól adott távolságra lévő, visszaverő síkok együtteseként fogták fel. A kristályrácot felépítő szomszédos rétegek közötti távolság a Bragg-egyenlet segítségével határozható meg. A polikristályos minták (például a magnetit nanorészecskék) kristallitjainak szemcsemérete befolyásolja a röntgendiffraktogram csúcsainak kiszélesedését. Az átlagos szemcseméret (D) a Scherrer-egyenlet segítségével számítható:

$$D = \frac{k\lambda}{\beta \cos \Theta}, \quad (1)$$

ahol β a mintára meghatározott vonalszélesség (a csúcs félértékszélessége és az anyagra meghatározott vonalszélesség különbségével számítható), λ a röntgensugár hullámhossza, k a Scherrer állandó ($k=0,94$) és Θ a csúcs maximumához tartozó beesési szög.

1.4.2 Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM)

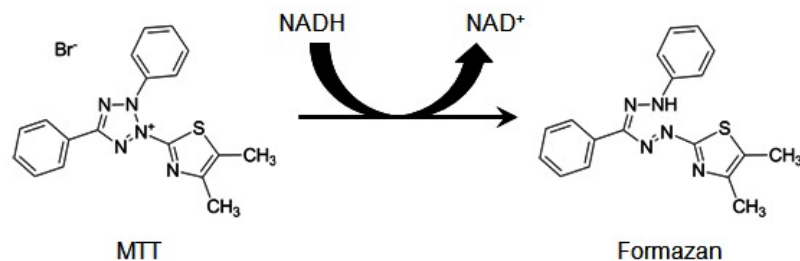
A transzmissziós elektronmikroszkóp elektronsugaras anyagvizsgáló eszköz, mely 4-5 pm hullámhosszúságú és 50 keV-nál nagyobb energiájú elektronhullámot használ. E módszer segítségével vizsgálhatjuk kristályos anyagok szerkezetét, kémiai és biológiai minták összetételét is. A transzmissziós elektronmikroszkópiai vizsgálatok során, ellentétben a hagyományos mikroszkóppal, elektronsugarak segítségével az adott mintáról atomi felbontású képet alkotunk. A sugárforrásnak két fajtáját különböztetjük meg: lehet termoemissziós, ahol az árammal fűtött katód anyagából lépnek ki az elektronok, vagy lehet téremissziós, ahol az elektromos tér segítségével szakítjuk ki az elektronokat. A létrejött elektronnyalábokat elektromos térrel gyorsítjuk, amelyet megfelelő elektromágneses lencsék segítségével fókuszáltatunk a mintánkra. Az elektronok a szilárd minta atommagjaival való kölcsönhatás révén szóródnak és elhajlanak. Az objektívlencse a diffrakciós síkban a diffraktált elektronnyalábokat, a képsíkban pedig a minta képét fókuszálja. Vetítő lencserendszer segítségével tovább nagyítjuk az így előállított képet. Elkészíthetjük a minta valós képét vagy a diffrakciós

képet, attól függően, hogy melyik síkot képezzük le a lencserendszerrel. Egy fluoreszcens ernyőn (vagy más detektorok segítségével) tesszük láthatóvá a képet, melynek a legkényelmesebb rögzítése CCD-kamerával lehetséges.

1.4.3 MTT vizsgálat

Az MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromid) redukciójának vizsgálata egy olyan széles körben alkalmazott és elfogadott módszer, amely sokféle vegyület egyidejű vizsgálatát teszi lehetővé a sejtek viabilitására vonatkozóan.

Működése azon alapul, hogy az életképes sejtek aktív metabolizmusuk révén a vízben oldható MTT-t lila színű, vízben oldhatatlan formazán kristállyá alakítják, melynek az elnyelési maximuma kb. 570 nm, így mennyisége spektrofotometriás úton meghatározható. Mivel a sejthalál bekövetkezte után a sejtek már nem képesek az MTT-t formazánná alakítani, ennek következtében a színváltozás alkalmas, könnyen felismerhető jellemzője a sejtek életképességének. Az MTT redukciója során végbemenő sejtbiológiai mechanizmusról nincsen teljes képünk, de valószínűleg NADH vagy egyéb redukáló molekulák elektronokat adnak át az MTT-nek (lásd az 1. ábrát).



1.ábra. MTT átalakulása formazán kristállyá

1.5 Paraméterbecslés a legkisebb négyzetek módszerével [8,24,25]

Tekintsünk m darab (X_i, Y_i) kísérleti adatpárt, ahol Y_i a függő és X_i a független változó mért értéke. Legyen adott egy $f(x, \mathbf{p})$ függvénnyel megadott matematikai modell, ahol x a független változó pontos értéke és \mathbf{p} pedig az n darab meghatározandó paramétert tartalmazó vektor. Feltételezzük a következő összefüggések fennállását:

$$X_i = x_i + \varepsilon_{xi} \quad (2)$$

$$Y_i = y_i + \varepsilon_{yi} \quad (3)$$

$$y_i = f(x_i; \mathbf{p}), \quad (4)$$

ahol x_i és y_i az X_i és az Y_i mérési adatok pontos értéke, ε_{xi} és ε_{yi} valószínűségi változók pedig kísérleti adatok hibái. A legkisebb négyzetek (LS) módszerének alkalmazásakor általában feltételezzük, hogy az ε_{xi} és ε_{yi} hibák Gauss-eloszlásúak és korrelálatlanok.

Az optimális paraméterek meghatározásához – első közelítésben – az alábbi célfüggvényt minimalizáljuk:

$$S(\mathbf{p}) = \sum_{i=1}^m w_i \varepsilon_{yi}^2(\mathbf{p}) = \sum_{i=1}^m w_i (Y_i - f(X_i, \mathbf{p}))^2, \quad (5)$$

ahol a w_i súlyfaktorok következőképpen számítandók, ha az X_i értékekben kicsi a hiba:

$$w_i = \frac{1}{\sigma_{Y_i}^2 + \left(\frac{\partial f(x, \mathbf{p})}{\partial x} \Big|_{x_i} \right)^2 \sigma_{X_i}^2}. \quad (6)$$

Azt a paraméterbecslési eljárást, mely az előbbi célfüggvényt használja, általános legkisebb négyzetek módszerének (GLS) nevezzük. A súlyozott legkisebb négyzetek módszeréhez (WLS) a $w_i = \sigma_{Y_i}^{-2}$ súlyfaktorok szükségesek. Abban az esetben, ha sem a függő (Y), sem a független változó (X) hibája nem ismert, w_i -t 1-nek választjuk (közönséges legkisebb négyzetek módszere, OLS).

Tegyük fel, hogy $\hat{\mathbf{p}}$ az optimális paramétervektor, azaz ahol az $S(\mathbf{p})$ függvénynek globális minimuma van a paraméterek (fizikai) értelmezési tartományán. Ebben az esetben a az illesztés jóságára jellemző reziduális variancia (s_{r2}) következőképpen adható meg:

$$s_{r2} = \frac{S(\hat{\mathbf{p}})}{m-n}. \quad (7)$$

A \mathbf{V} variancia-kovariancia mátrix szükséges a becsült paraméterek sztenderd hibájának és korreláltságának a számításához:

$$\mathbf{V} = 2s_{r2} \mathbf{H}^{-1}(\hat{\mathbf{p}}), \quad (8)$$

ahol $\mathbf{H}^{-1}(\hat{\mathbf{p}})$ a $\hat{\mathbf{p}}$ globális minimumban számított Hesse-mátrix inverze. Ha $\mathbf{V} = \{v_{ij}\}$, akkor a p_i paraméter $SE(p_i)$ standard hibáját következőképpen kaphatjuk meg:

$$SE(p_i) \approx 2\sqrt{v_{ii}}. \quad (9)$$

Ez jól megfelel a 95%-os szignifikancia-szinten számított konfidencia-intervallumnak.

A paraméterbecsléshez szükségünk van egy jó minimalizáló módszerre, a \mathbf{H} mátrixra és inverzére. A minimalizálást simplex-módszerrel, az első és a második deriváltak számítását centrális differencia formulákkal, az invertálást pedig LU-faktorizációval oldottuk meg.

Ha az F mennyiség a $\hat{\mathbf{p}}$ függvénye, azaz $F = \varphi(\hat{\mathbf{p}})$, akkor F szórása következőképpen számítható:

$$SE(F) = \sqrt{(\text{grad } F)^T \cdot \mathbf{V} \cdot \text{grad } F} \quad (10)$$

Ezzel a formulával kezelhető a hibaterjedés, azaz a hibás mennyiségekből származtatott mennyiségek hibáinak a számítása.

2. Célkitűzés

A ferrimágneses tulajdonságú magnetit nanorészecskék ipari és gyógyászati alkalmazása széleskörű. A tiszta magnetit nanorészecskék – megfelelő koncentráció-tartományban – nem citotoxikusak, így hordozóanyagok és nano adszorbensek lehetnek a sejten belüli anyagforgalomban.

A jelen munka célja – egy nagyobb projekt keretén belül – néhány fémion citotoxicitásának és adszorpcióval történő esetleges megkötésének a tanulmányozása. Különböző ipari szennyvizekben több-kevesebb nehézfémion található, melyek adszorpcióval történő eltávolítása környezetvédelmi szempontból is fontos feladat. Számos cikkben tanulmányozták fémionok adszorpcióját magnetit nanorészecskéken.

Először is különböző méretű magnetit nanorészecskék szintézisét határoztuk el megvalósítani ko-precitációs módszerrel. A kapott nanorészecskék jellemzésére szerkezetvizsgáló módszerek széles skálája áll rendelkezésünkre a tanszéken, melyet maximális mértékben szeretnénk volna kihasználni.

A toxikológiai és adszorpciós méréseket a következő fémionokra terveztük végrehajtani: Cu(II), Zn(II), Pb(II), Mn(II) és Co(II). Az irodalommal való összehasonlítás szempontjából lényeges, hogy ezek a fémionok korábbi adszorpciós tanulmányokban már szerepeltek. Természetesen, annak érdekében, hogy megfelelő QSAR modellt állítsunk fel a fémionok citotoxicitásának a leírására, a tanulmányozott fémionok számát a későbbiekben növelnünk kell.

Úgy gondoltuk, hogy MCF-7 és Colo-320 sejt kultúrák megfelelők lesznek a citotoxikológiai tanulmányokhoz. A sejtek elhalásának követésére az MTT technika kiválóan bevált a gyakorlatban, így mi is ezt terveztük alkalmazni. A toxikológiai kísérletek szigorú tisztasági feltételeket követelnek mind az alkalmazott vegyszerekkel, mind a laboratóriumi körülményekkel szemben. Ezek betartásának szükségessége – a hagyományos kémiai kísérletektől eltérően – jelentősen megnehezíti a toxikológia kísérletek reprodukálhatóságát. Reméltük, hogy elegendő sejtállomány fog rendelkezésünkre állni a kísérletek végrehajtásához.

Az egyedi fémionok toxikológiai tanulmányozása után, előzetesen magnetit nanorészecskéket terveztünk bevinni a sejtekbe. Feltételeztük, hogy a sejtekbe előzetesen bevitt magnetit nanorészecskék kompetitív adszorpció révén megkötik a fémionok jelentős részét, így a mérgező hatásuk csökken.

3. Kísérleti rész

3.1 Vegyszerek

A felhasznált vegyszerek specifikumai az 1. táblázatban láthatók.

1. táblázat. Az alkalmazott vegyszerek gyártója és a tisztasága

Vegyület neve	Gyártó	Tisztaság
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	<i>Sigma-Aldrich</i>	min. 97%
$\text{FeCl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	<i>Sigma-Aldrich</i>	min. 99,0%
NaOH	<i>Molar Chemicals Kft.</i>	min. 99%
NH_3 -oldat	<i>Molar Chemicals Kft.</i>	min. 99%
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	<i>Spektrum-3D Kft.</i>	min 99,0%
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	<i>VWR BDH PROLABO</i>	min. 98%
MnCl_2	<i>VWR BDH PROLABO</i>	min. 99,5%
ZnCl_2	<i>VWR BDH PROLABO</i>	min. 98%
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	<i>Spektrum-3D Kft.</i>	min. 99,5%

3.2 Magnetit nanorészecskék előállítása

Munkánk során két különböző magnetit nanorészecske szintézist hajtottunk végre. Mindkét esetben a koprecipitációs módszert alkalmaztuk [14,15,16].

Az első szintézisnél 27,024 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -t, 10,934 g $\text{FeCl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ -t és 16,402 g NaOH-t oldottunk fel 20-20 mL desztillált vízben, majd összekevertük a két vasoldatot. Ezután 40 mL desztillált vízhez üvegkeverővel való intenzív keverés közben hozzáadtunk 0,04 mL-t az előzőleg elkészített vasoldatból, majd néhány csepp NaOH-oldattal kicsapattuk, aminek következtében az oldatunk sárgás, zavaros lett. Egy kis idő elteltével egyszerre hozzáadtuk a vasoldat teljes mennyiségét, majd lassan csepegtetve

adagoltuk a NaOH-oldat mennyiségének a felét. A lúgoldat másik felét egyszerre öntöttük hozzá, majd rövid ideig kevertettük a már fekete csapadékot. A körülbelül 10 percnyi kevertetés után, a mintánkat desztillált vízzel mostuk többször is semleges pH-ig. Ezután cc. sósavval savanyítottuk pH~2-ig, majd újra mostuk többször desztillált vízzel. Mosás után a mintánkat 45 °C-os szárítószekrénybe helyeztük egy órára. Miután letelt az egy óra, megvártuk míg visszahül szobahőmérsékletre és egyszeri desztillált vízzel történő mosást követően körülbelül egy órára ultrahangos kádba tettük. Ezután 4 °C-on tároltuk légmentesen a további mérésekhez.

A második szintézishez kimértünk 20,009 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -t és 5,996 g $\text{FeCl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ -t és feloldottuk 400 mL desztillált vízben. Majd ezt a vasoldatot zárt üvegreaktorban nitrogéngáz buborékolatása mellett üvegkeverővel intenzíven kevertettük. Keverés közben cseppenként adagoltunk hozzá 20 mL 25 m/m%-os NH_3 -oldatot, majd ugyanennyit adtunk hozzá egyszerre és kevertettük még további 30 percig. Ezután többször mostuk desztillált vízzel semleges pH-ig, majd 60 °C-os szárítószekrénybe helyeztük egy órára és újból mostuk desztillált vízzel. A további kísérletekhez a mintánkat légmentesen 4 °C-on tároltuk.

Az így elkészített magnetit nanorészecskék koncentrációját szárazanyagának tömegmérése alapján határoztuk meg.

3.3 Alkalmazott műszerek, berendezések, eszközök és mérési módszerek

Az előállított magnetit nanorészecskék méretét és alakját FEI Tecnai G² 20 x-Twin HRTEM transzmissziós elektronmikroszkóp segítségével határoztuk meg. A mintáinkat etanollal hígítva egy polimer és szénréteggel fedett kisméretű gridre (rézhálóra) cseppentettük, majd száradás után lefényképeztük őket. A részecskék méretét az ImageJ program segítségével mértük meg.

A második szintézissel előállított magnetit nanorészecskék méretét megmértük röntgendiffrakciós módszerrel is. A mintánk 3-4 cseppjét üveglapon körülbelül 80 °C-os szárítószekrénybe helyeztük. A méréseket MiniFlex II röntgendiffraktométerrel végeztük el a $2\Theta \in [20^\circ, 80^\circ]$ tartományban, Cu-K_α sugárforrást alkalmazva. Mérést követően a Scherrer-egyenlet segítségével, a $2\Theta \approx 30,2^\circ$ -hoz tartozó csúcs alapján határoztam meg a részecskeméretet.

Az MTT méréseket 96 lyukú mikrotiter plate-en végeztük humán emlőtumor eredetű MCF-7 és vastagbélrákos Colo-320 sejteken. Az MCF-7 sejteket 10% borjú szérumot (FBS), 4 mM glutamint és 0,005% ampicillin továbbá 0,01% sztreptomycin antibiotikumokat tartalmazó Roswell Park Memorial Institute (RPMI) médiumban növesztettük, 37 °C hőmérsékletű termosztátban, 5%-os CO₂ koncentráció mellett. A Colo-320 vastagbél adenokarcinoma sejteket 1 g/L glükózt tartalmazó Dulbecco Modified Eagle (DMEM) médiumban növesztettük. A tápoldatot 10% FBS-el, 4 mM glutaminnal, 0,005% ampicillinnel és 0,01% sztreptomiccinnel egészítettük ki. A sejteket 37 °C-on, párás környezetben, 5% CO₂ koncentráció mellett inkubátorban növeltük.

A mérés során keletkező formazán mennyiségét, amely egyenesen arányos az élő sejtek számával, SPECTROstar^{nano} spektrofotométerrel mértük 570 nm-es referencia hullámhosszon. A formazánt az abszorbancia mérése előtt oldható formába kell hozni, továbbá érdemes stabilizálni a szint, és csökkenteni a tápoldatban található fenolvörös zavaró hatását. A kristályok oldását és mindezeket a feltételeket a DMSO (dimetil-szulfoxid) alkalmazásával tudtuk elérni. Az MTT konverzióját a tápoldat pH-ja és tápanyagok hiánya is befolyásolja. Fontos szempont az is, hogy a vizsgált sejt kultúra a növekedés logaritmikus fázisában legyen, mert a mért abszorbancia csak ekkor tekinthető egyenesen arányosnak a kultúra viabilitásával.

Méréseink alkalmával wellenként 10.000 sejttel dolgoztunk, amit hemocitóméter segítségével számoltunk meg. Az eljárás során, a protokoll szerint haladva, az első napon 96 lyukú mikrotiter plate-be osztottuk ki a sejteket. Következő napon végeztük a megfelelő kezeléseket: a nanorészecskéket, az ionokat, illetve ezeket a komponenseket együtt, egy órával egymásután – különböző koncentrációkban, médiumban hígítva – hozzáadtuk a sejtekhez. 4 párhuzamos mérést végeztünk minden kezelésre. 24 óra elteltével a médiumokat leszívtuk a sejtekről, majd az MTT reagenst 5 mg/ml koncentrációban, tápoldatban hígítva a sejt kultúrához adtuk, mellyel 1 órán keresztül inkubáltuk a kultúrákat. Majd a reagenst eltávolítottuk és a keletkezett kristályokat DMSO-ban oldottuk, és megmértük a mikrotiter plate welljeiben lévő oldatok abszorbanciáját. Az abszorbancia értékekből kivontuk a csak DMSO-ra mért elnyelést, majd megállapítottuk az egyes kezeléseknél alkalmazott nanorészecske/ion koncentrációkhoz tartozó sejttúlélést.

3.4 A TEM és az MTT mérési adatok kiértékelése [8,24,25]

A TEM képekről meghatározott részecskeméreteket először növekvő sorrendbe rendeztük ($x_i: i = 1, 2, \dots, m$):

$$x_1 \leq x_2 \leq \dots \leq x_m \quad (11)$$

Az x részecskeméret egy valószínűségi változónak tekinthető. Legyen m_i azon részecskék száma, melyre $x \leq x_i$ teljesül! Annak a p_i valószínűsége, hogy $x \leq x_i$:

$$p_i \approx \frac{m_i}{m} \quad (12)$$

Tegyük fel, hogy a részecskeméret normális eloszlású μ várható értékkel és σ szórással, azaz $x \in N[\mu, \sigma]$. Ekkor az előbbi valószínűségekre az elméleti, azaz a számított érték:

$$P_i(\mu, \sigma) = \int_{-\infty}^{x_i} f(x; \mu, \sigma) dx, \quad (13)$$

ahol $f(x; \mu, \sigma)$ a normális eloszlás valószínűségi sűrűségfüggvénye:

$$f(x; \mu, \sigma) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left\{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}\right\} \quad (14)$$

Az OLS célfüggvény pedig:

$$S(\mu, \sigma) = \sum_{i=1}^m (p_i - P_i(\mu, \sigma))^2 \quad (15)$$

A numerikus integrálás elkerülése érdekében át kell alakítanunk $P_i(\mu, \sigma)$ kifejezését olyan alakúra, mely az *erf* hibafüggvényt tartalmazza, ugyanis az *erf* a *derf()* FORTRAN könyvtári függvény segítségével már könnyen számítható. Behelyettesítve az $f(x; \mu, \sigma)$ függvényt $P_i(\mu, \sigma)$ -be, kapjuk, hogy

$$P_i(\mu, \sigma) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{x_i} \exp\left\{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}\right\} dx \quad (16)$$

Bevezetve a $t = (x-\mu)/\sigma$ változót ($dt = dx/\sigma$), $P_i(\mu, \sigma)$ -ra a következő összefüggés adódik:

$$P_i(\mu, \sigma) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{(x_i-\mu)/\sigma} \exp\left\{-\frac{t^2}{2}\right\} \sigma dt = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{(x_i-\mu)/\sigma} \exp\left\{-\frac{t^2}{2}\right\} dt = \frac{1}{2} \left(1 + \operatorname{erf}\left(\frac{x_i - \mu}{\sigma\sqrt{2}}\right)\right) \quad (17)$$

Ezt behelyettesítve az OLS célfüggvénybe, a következő formula adódik:

$$S(\mu, \sigma) = \sum_{i=1}^m \left(p_i - \frac{1}{2} \left(1 + \operatorname{erf} \left(\frac{x_i - \mu}{\sigma \sqrt{2}} \right) \right) \right)^2. \quad (18)$$

Ahhoz, hogy a $\hat{\mu}$ és $\hat{\sigma}$ paraméterekre becslést kapjunk, meg kell keresnünk az adott célfüggvény (globális) minimumát. A $(\hat{\mu}, \hat{\sigma})$ pont akkor minimum, ha a parciális deriváltak eltűnnek:

$$\begin{aligned} \left(\frac{\partial S}{\partial \mu} \right)_{(\hat{\mu}, \hat{\sigma})} &= 0 \\ \left(\frac{\partial S}{\partial \sigma} \right)_{(\hat{\mu}, \hat{\sigma})} &= 0 \end{aligned} \quad (19)$$

A globális minimum meghatározására egy FORTRAN programot készítettünk. Ez meghatározza a nanorészecskék átlagos méretét és annak szórását.

Az MTT mérés során kapott intenzitások adatsorainak kiugró pontjait adott szignifikancia-szinten a PRESS- és az R-Student statisztika segítségével határoztuk meg. Helyesebb azonban további tesztek alkalmazni erre a feladatra, és csak akkor eltávolítani a kiugró pontokat, ha több teszt egyöntetűen erre az eredményre vezet. A továbbiakban csak az R-Student statisztikát mutatjuk be a potenciálisan kiugró pontok meghatározására.

Jelöljük a kontrolintenzitásokat $I_{c,i}$ -vel ($i=1,2,\dots,N$), ahol N a kontrolminták száma! Legyen $\bar{I}_c = N^{-1} \left(\sum_{i=1}^N I_{c,i} \right)$, valamint $S(\bar{I}_c) = \sum_{i=1}^N (I_{c,i} - \bar{I}_c)^2$! Meg kell határozni az $e_{i,-i} = I_{c,i} - \bar{I}_{c,-i}$ különbségeket, ahol:

$$\bar{I}_{c,-i} = \frac{1}{N-1} \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^N I_{c,j}. \quad (20)$$

Az i -ik pontban számítsuk a következő mennyiséget:

$$t_i = \frac{e_{i,-i}}{s_{-i}}, \quad (21)$$

ahol $s_{-i} = \sqrt{(S(\bar{I}_c) - e_{i,-i}^2) / (N-2)}$. Ha $|t_i| > t_{p/2, N-2}$, akkor az azt jelenti, hogy $I_{c,i}$ kiugró pont. Ennek megfelelően egy FORTRAN programot készítettünk, mely megadja egy tetszőleges adatsor kiugrópontjait.

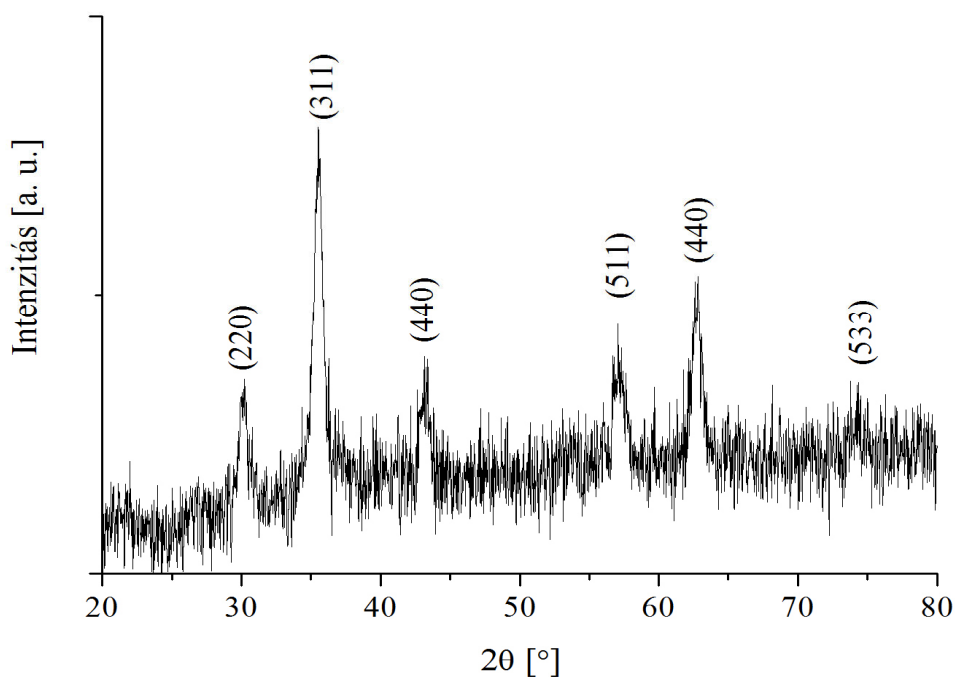
A kiugró pontok meghatározása és eltávolítása után, a modellfüggvényben szereplő paraméterek meghatározása érdekében általában egyszerű lineáris vagy súlyozott lineáris regressziót végeztünk. Ezekben az esetekben a globális minimum egyértelmű, így nincs szükség a szimplex módszer alkalmazására.

4. Az eredmények ismertetése

4.1 A magnetit nanorészecskék mérete

4.1.1 Röntgendiffrakciós analízis

A 2. ábra a második szintézissel előállított magnetit röntgendiffraktogramját mutatja.

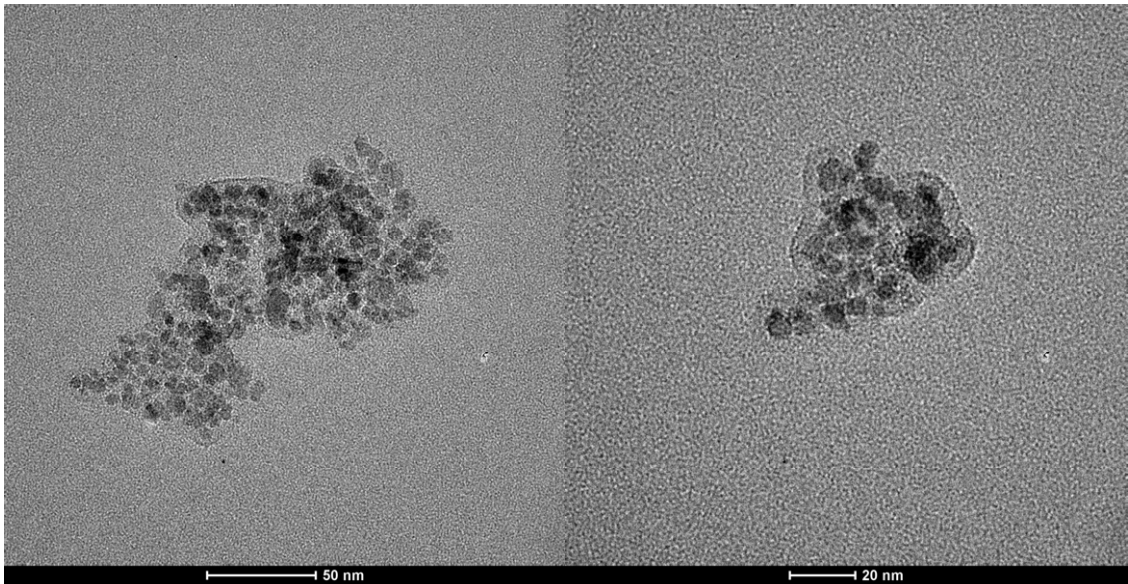


2. ábra: A második szintézissel előállított magnetit röntgendiffraktogramja

Az általunk előállított magnetit nanorészecskék röntgendiffraktogramját összehasonlítva az irodalomban közölt diffraktogrammal [26], megállapítható, hogy tiszta magnetitet sikerült szintetizálnunk. A $2\Theta \approx 30,2^\circ$ -hoz tartozó csúcsból, a Scherrer-egyenlet alapján a részecskeméretre $\sim 11,7$ nm adódott.

4.1.2 Transzmissziós elektronmikroszkópia

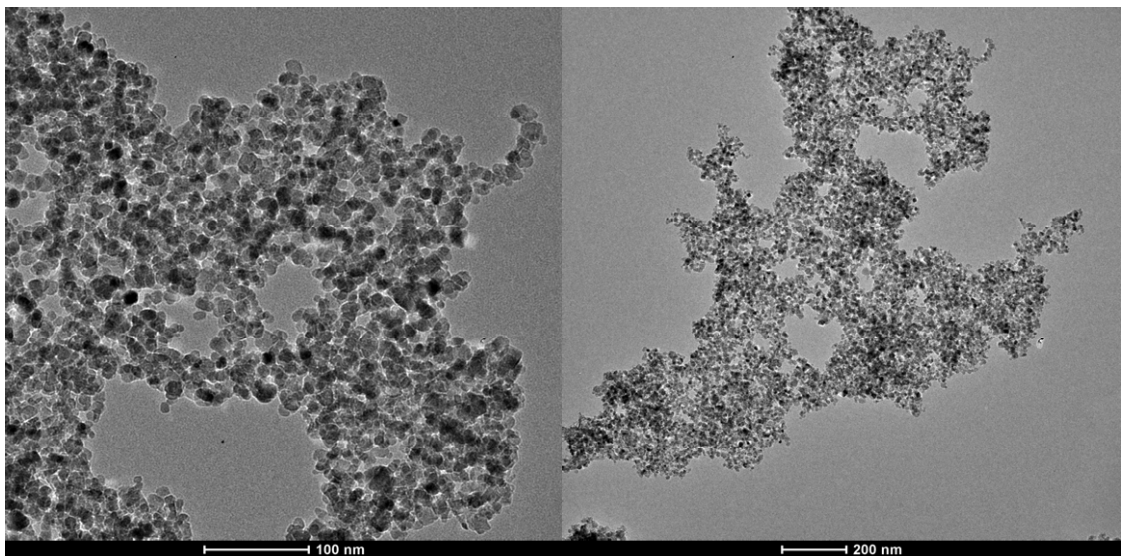
Az első szintézissel kapott magnetit mintáról készített TEM képek (3. ábra) azt mutatják, hogy monodiszperz és egységes morfológiájú nanorészecskéket sikerült előállítanunk.



3. ábra: Az első szintézissel kapott magnetit nanorészecskék TEM képei

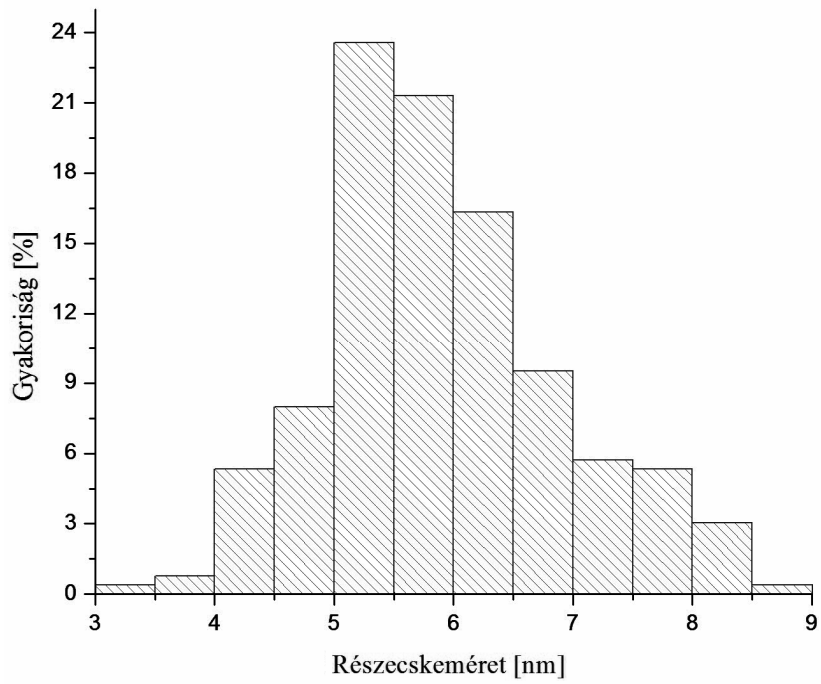
A számítógépes kiértékelés szerint a nanorészecskék átlagos mérete: $5,8 \pm 0,9$ nm.

A második szintézissel előállított magnetit nanorészecskék (4. ábra) átlagos mérete ennek több mint a kétszerese: $13,9 \pm 1,9$ nm-t kaptunk.

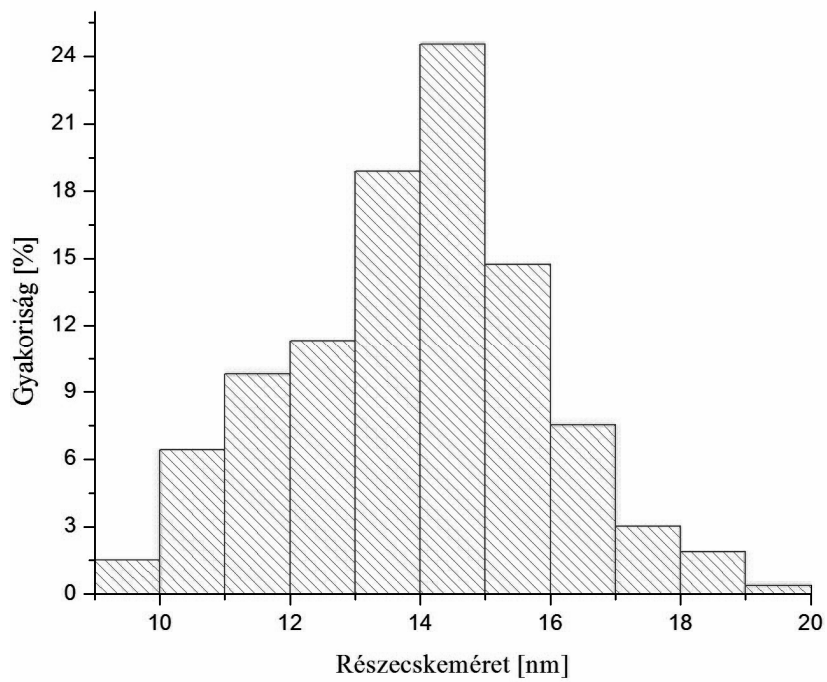


4. ábra: A második szintézissel kapott magnetit nanorészecskék TEM képei

Az 5. és a 6. ábrákon bemutatjuk a kísérleti adatokból a részecskék méreteloszlására kapott hisztogramokat. Az ábrák azt mutatják, hogy a méreteloszlások jó közelítéssel normálisak, így az átlagos részecskeméret meghatározására alkalmazott paraméterbecslő eljárásunk alapfeltevése már első ránézésre teljesül.



5. ábra: Az első szintézissel kapott magnetit nanorészecskék méreteloszlása

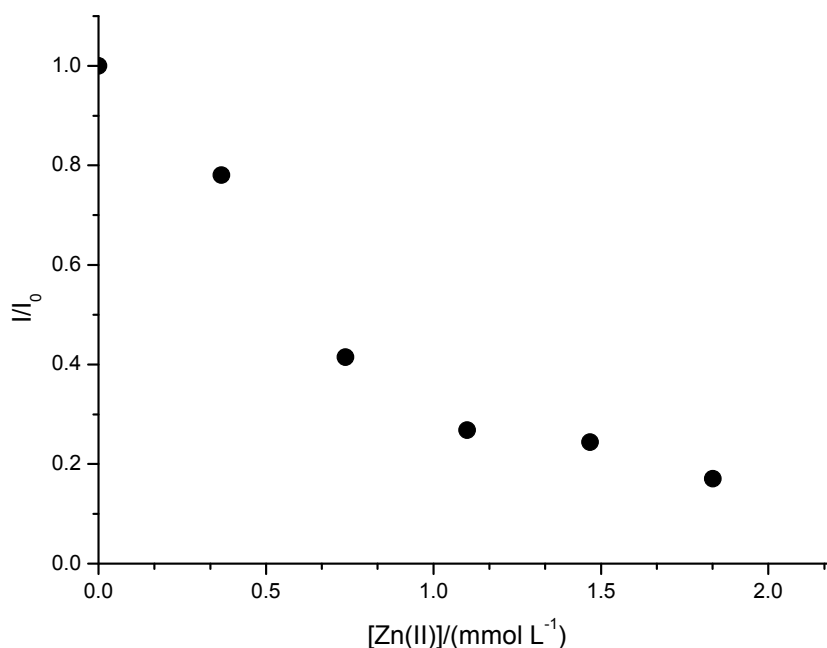


6. ábra: A második szintézissel kapott magnetit nanorészecskék méreteloszlása

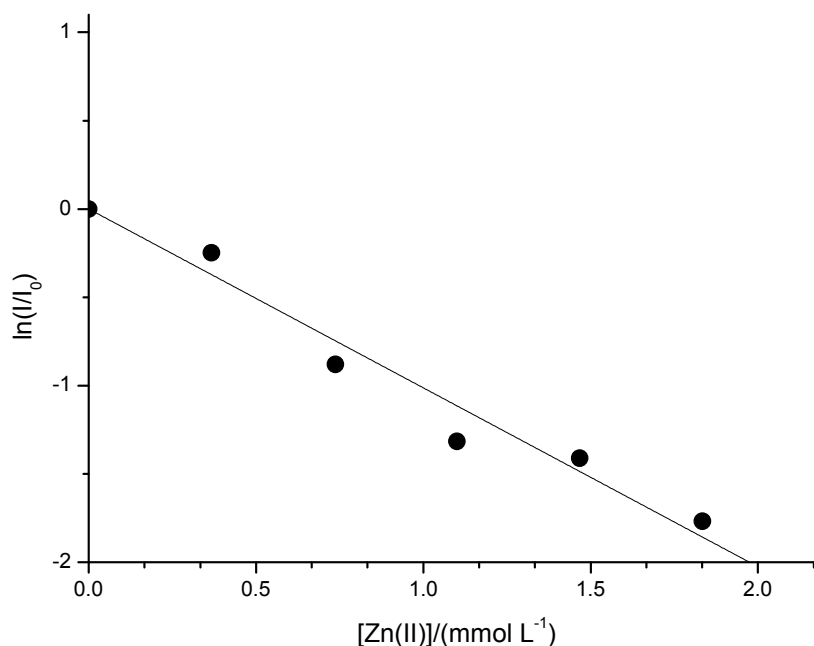
4.2 Fémionok citotoxicitásának mérése

Először 500 mg/L koncentrációjú fémoldatokat készítettünk. A fém sókból bemértünk 10 mg-ot, majd feloldottuk őket 20-20 cm³ sterilizált vízben. Sterilizálás céljából az oldatokat 0,22 µm-es szűrővel szűrtük, és UV-kezelést hajtottunk végre rajtuk. A fém sóoldatokból 50, 100, 150, 200 és 250 mg/L-es koncentrációjú oldatokat készítve, – MTT mérést alkalmazva – megmértük a különböző fémionok citotoxicitását.

A biokémiai MTT kísérleti adatok vizsgálata azt sugallja, hogy a fémionok hatására bekövetkező sejtelhalás – jó közelítéssel – exponenciálisan függ a fémionok koncentrációjától. Ennek illusztrálására a 7. ábrán bemutatjuk a Zn(II) ionok hatására bekövetkező sejtelhalást az ionkoncentráció függvényében. A 8. ábrán ugyanezt ábrázoljuk linearizált összefüggésnek megfelelően.



7. ábra: A Zn(II) ionok hatására bekövetkező sejtelhalás a koncentráció függvényében



8. ábra: A 7. ábra adatainak linearizált ábrázolása

A kiértékelésnél figyelembe kell venni, hogy a biokémiai kísérleti adatok szórása jóval nagyobb, mint a hagyományos fizikai-kémiai kísérleteké, s a kiugró pontok azonosítására pedig nagyobb figyelmet kell fordítani.

A kiértékelés során alkalmazott modellfüggvényünk a következő volt:

$$I = I_0 \exp(-\alpha [M(\text{II})]), \quad (22)$$

ahol I a fémionok jelenlétében és I_0 a fémionok hozzáadása nélkül mért (referencia) abszorbancia. Bemutatjuk a (22) összefüggés linearizált változatát is, amit a 8. ábra esetén alkalmaztunk:

$$\ln \frac{I}{I_0} = -\alpha [M(\text{II})]. \quad (23)$$

Az α paraméter értékének regresszióval történő becslése után, az LC50 könnyen számítható:

$$\text{LC } 50 = \frac{\ln 2}{\alpha}. \quad (24)$$

A linearizált (23)-as összefüggés alkalmazásánál a linearizálás torzító hatását megfelelő súlyfaktorok alkalmazásával ki lehet küszöbölni [27]. A 2. táblázat a paraméterbecsléssel meghatározott LC50 koncentrációkat tartalmazza MCF-7 sejtek esetén. A Colo-320 sejtekre kapott értékek a 3. táblázatban láthatók. Mivel a

sejtállományok gyakran elfertőződtek, s elpusztultak, ezért a kiértékeléshez kevés, egymástól független mérés állt rendelkezésünkre. Mindenképpen szükséges további mérések végzése a higiénias feltételek szigorú betartása mellett.

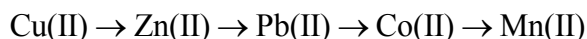
2. táblázat. A tanulmányozott fémionok 50%-os halálozási koncentrációja MCF-7 sejtekre

Ion	α	LC50/(mmol L ⁻¹)	-lgLC50
Zn(II)	0,93 ± 0,02	0,745	3,12
Mn(II)	0,96 ± 0,07	0,722	3,14
Cu(II)	2,22 ± 0,65	0,315	3,50
Pb(II)	–	–	–
Co(II)	–	–	–

3. táblázat. A tanulmányozott fémionok 50%-os halálozási koncentrációja Colo-320 sejtekre

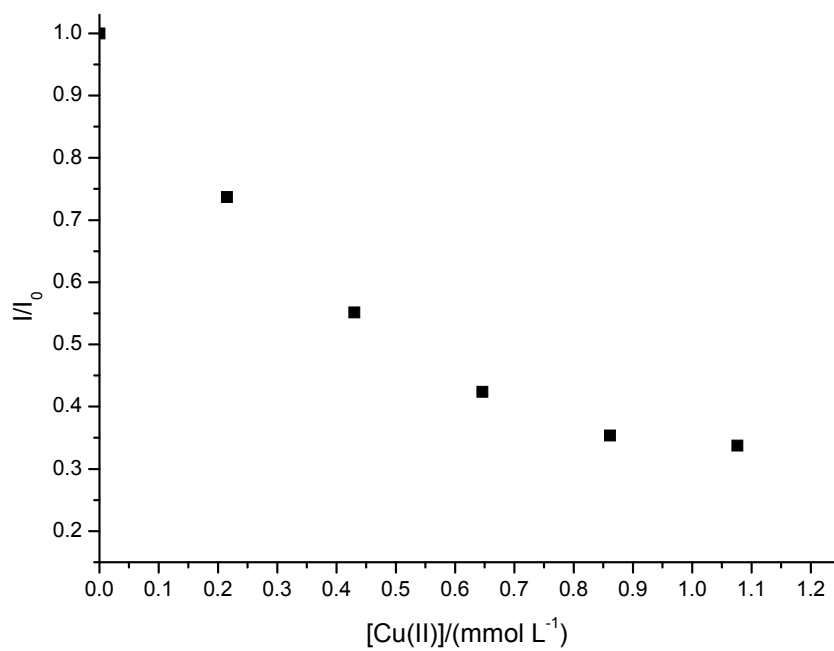
Ion	α	LC50/(mmol L ⁻¹)	-lgLC50
Zn(II)	1,02 ± 0,26	0,68	3,16
Mn(II)	0,17 ± 0,04	4,08	2,38
Cu(II)	1,50 ± 0,11	0,46	3,34
Pb(II)	0,87 ± 0,12	0,80	3,09
Co(II)	0,57 ± 0,12	1,22	2,91

A 3. táblázat adatai szerint a tanulmányozott fémionok citotoxicitása a Colo-320 sejtekre a következő sorrendben csökken:

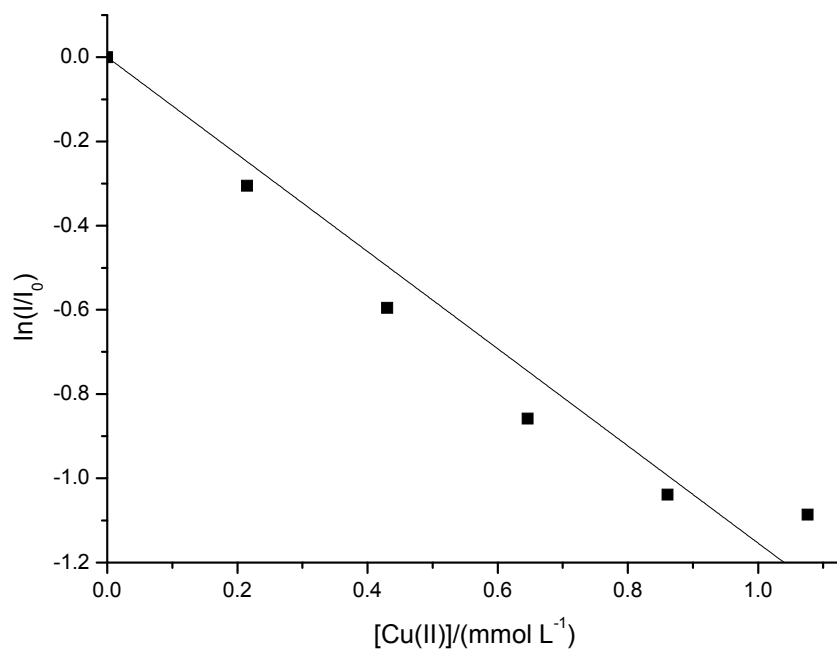


Az MCF-7 sejtek esetén is a Cu(II) volt a legtoxikusabb. Az ólomra vonatkozó MCF-7 kísérleti adatokat nem lehetett kiértékelni: az illesztések nem voltak statisztikailag szignifikánsak. További méréseket nem tudtunk végezni MCF-7 sejteken, mivel nem állt rendelkezésünkre elegendő sejtállomány a kísérletekhez, ezért hiányos a 2. táblázat.

Bemutatunk egy kísérletet Colo-320 sejtekre is. A Cu(II) ionok hatására bekövetkező sejtelhalást a Colo-320 sejtekre vonatkozóan a 9. és a 10. ábrák mutatják. Az MCF-7 sejtek esetén tapasztaltakhoz hasonló jellegzetességek figyelhetők meg a görbék lefutásán.



9. ábra: A Cu(II) ionok hatására bekövetkező sejtelhalás a koncentráció függvényében

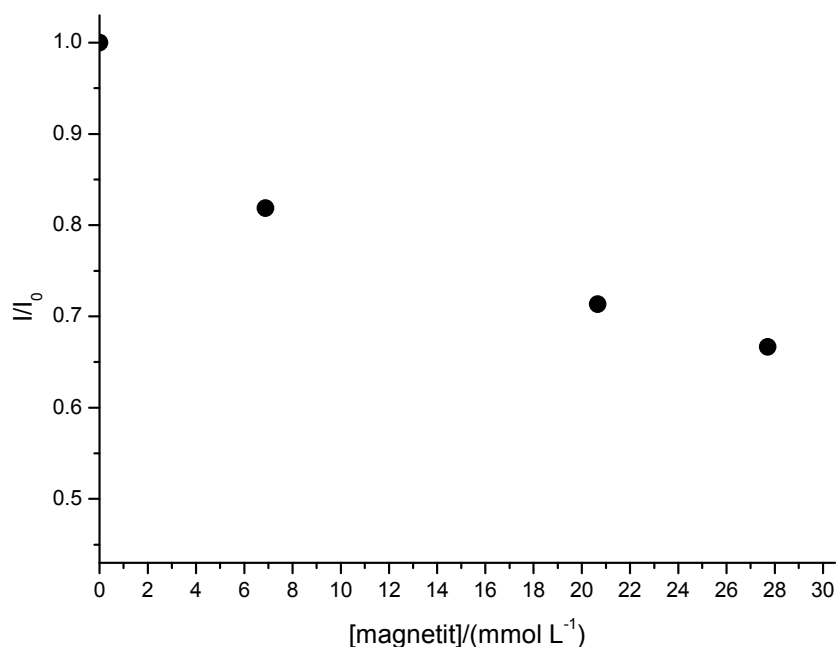


10. ábra: A 9. ábra adatainak linearizált ábrázolása

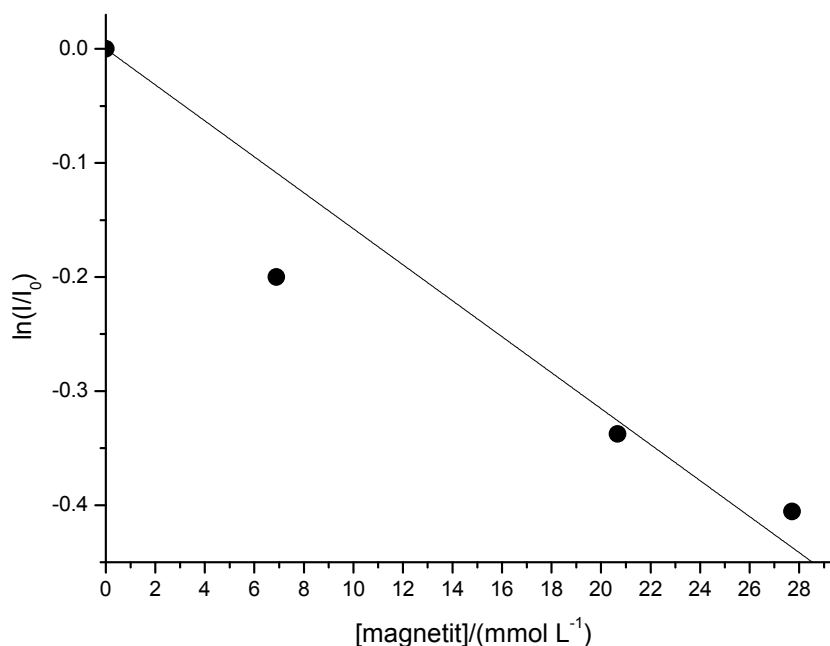
4.3 A magnetit citotoxicitásának mérése

A magnetit nanorészecskékre vonatkozó citotoxicitási méréseket ugyanúgy hajtottuk végre és értékeltük ki, mint a fémionokra vonatkozókat (lásd 4.2 pontot). A 11. és a 12. ábrákon az átlagosan 14 nm-es magnetit nanorészecskékre kapott kísérleti adatokat mutatjuk be MCF-7 sejtek esetén. Látható, hogy nem értük el az 50%-os halálozási koncentrációt, így azt mondhatjuk, hogy a 14 nm-es magnetit nanorészecske az alkalmazott koncentrációtartományban nem rendelkezik LC50 értékkel. A párhuzamos kísérletek esetén is ugyanez volt a helyzet. Természetesen, extrapolációt végre tudnánk hajtani az LC50 értékének meghatározása érdekében. Ezt azonban – a szakirodalom tükrében – nem tartottuk lényegesnek.

Sajnos, az előzőeket nem jelenthetjük ki a 6 nm-es magnetit nanorészecskékkel kapcsolatban: az összes mérésnél, a koncentráció függvényében 50%-nál alacsonyabb viabilitást tapasztaltunk. Mindezek azt mutatják, hogy a 6 nm-es magnetit nanorészecske esetén további kísérletek szükségesek egyértelmű következtetések levonásához.



11. ábra: A 14 nm-es magnetit nanorészecskék hatására bekövetkező sejtelhalás a koncentráció függvényében



12. ábra: A 11. ábra adatainak linearizált ábrázolása

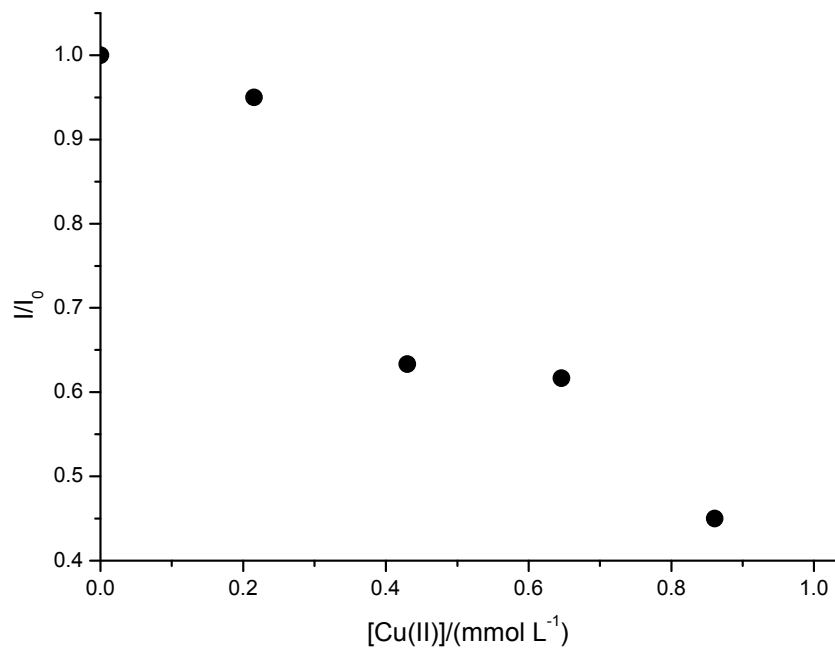
4.4 A magnetit és a fémionok citotoxicitásának együttes mérése

A magnetit nanorészecskékre és a fémionokra vonatkozó, együttes MTT méréseket a 4.2 és a 4.3 pontokban leírtak szerint hajtottuk végre. A magnetit nanorészecskék koncentrációja minden kísérletnél ugyanannyi volt: 0,831 g/L.

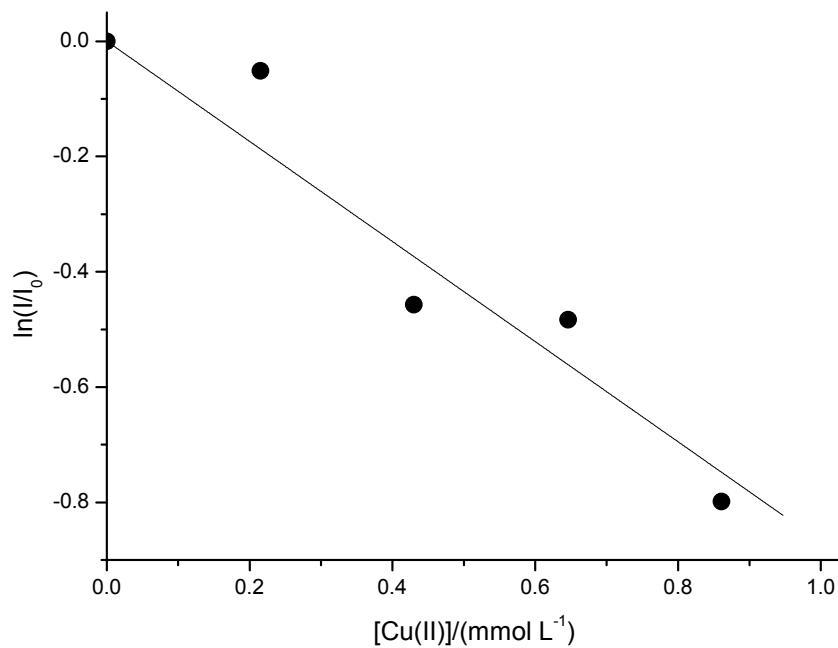
Először a magnetit nanorészecskéket mértük a sejteket tartalmazó welllekbe, majd 1 óra inkubálást követően hozzáadtuk a fémsóoldatot is. Ezeket a méréseket 14 nm-es nanorészecskékkel végeztük. Sajnos, csak a Cu(II) ion esetén tudtuk körültekintően végrehajtani a méréseket. A többi ionnal való kísérletet későbbre kellett halasztanunk. Egy tipikus kísérlet eredményét láthatjuk a 13. és a 14. ábrákon.

A súlyozott legkisebb négyzetek módszerével, a 13. ábra adataira végrehajtott lineáris regresszió eredménye: $\alpha = 0,87 \pm 0,16$. Ebből a (24) összefüggés alapján $LC50 = 0.80$ mmol/L adódik, azaz $-\lg LC50 = 3,10$. Ha összevetjük ezt az értéket a 3. táblázatban feltüntetett 3,34 értékkel, ami magnetit nanorészecskék nélkül lett meghatározva, akkor levonhatjuk azt a következtetést, hogy a Cu(II) ionok toxikus hatását a magnetit nanorészecskék – valószínűleg adszorpció révén – jelentősen csökkentették. Határozzuk meg, hogy a két LC50 érték közötti különbség mekkora adszorbeált anyagmennyiségnek felel meg Cu(II)-re vonatkozóan, és az hogyan

viszonyul a magnetit nanorészecskék vizes oldatban meghatározott adszorpciós kapacitásához [15]!



13. ábra: A Cu(II) ionok, 14 nm-es magnetit nanorészecskék jelenlétében, hatására bekövetkező sejtelhalás (Colo-320) a koncentráció függvényében



14. ábra: A 13. ábra adatainak linearizált ábrázolása

Az előzőek szerint a Colo-320 sejtekre vonatkozó LC50 értéke a Cu(II) ionoknak 0,46 mmol/L (3. táblázat). Egy well térfogata 100 μ L, így az LC50 alapján számított anyagmennyiség 46 μ mol. Magnetit nanorészecskék jelenlétében meghatározott LC50 érték 0,8 mmol/l, ami egy wellre vonatkozóan 80 μ mol anyagmennyiségnek felel meg. A két érték különbségét (80 – 46 = 34 μ L) – első közelítésben – úgy tekinthetjük, hogy azt az egy wellben levő magnetit nanorészecskék adszorbeálják. Ismerve a magnetit nanorészecskék tömegét wellenként (83.1 μ g), a Cu(II) ionokra vonatkozó fajlagos adszorbeált anyagmennyiség 0.41 mmol/g.

Giraldo és mtsai meghatározták 8 nm-es magnetit nanorészecskék maximális fajlagos adszorpciós kapacitását Cu(II) ionokra vonatkozóan, vizes közegben [15]. Az általuk kapott érték 0.170 mmol/g.

A mi magnetit nanorészecskéink átlagos mérete jelen esetben 14 nm volt. Mivel a fémionokkal való adszorpciós kölcsönhatás a magnetit nanorészecskék felületén található OH-csoportokkal jön létre, ezért feltételezhető, hogy az adszorpció mértéke a felület mértékével, azaz a felszínnel egyenesen arányos. Ennek megfelelően Giraldo és mtsai 8 nm-es átlagos részecskeméretre vonatkozó maximális adszorpció kapacitását extrapolálni tudjuk 14 nm-es részecskeméretre:

$$\frac{14^2}{8^2} 0,17 = 0,52 \frac{\text{mmol}}{\text{g}}.$$

Az általunk kapott értéknek ennél kisebbnek kell lenni. Ez pedig teljesül, hiszen $0,41 < 0,52$.

Konklúzióként megállapíthatjuk tehát, hogy a magnetit nanorészecskék kompetitív adszorpcióval meg tudják kötni a sejtben levő Cu(II) ionokat.

5. Összefoglalás

Különböző méretű magnetit nanorészecskék szintézisét valósítottuk meg koprecipitációs módszerrel. Mintáink méretének meghatározására XRD és TEM módszereket alkalmaztunk. Az egyik minta átlagos mérete 6 nm-nek, a másiké 14 nm-nek adódott a TEM vizsgálatok alapján. A méretek meghatározása paraméterbecsléssel történt, normális eloszlást feltételezve a részecskék méreteloszlására.

MTT citotoxikológiai méréseket végeztünk öt fémionra: Cu(II), Zn(II), Pb(II), Mn(II) és Co(II). A toxikológiai mérésekhez MCF-7 és Colo-320 sejteket használtunk. A toxikológiai kísérleti adatok kiértékelésére felállítottunk egy exponenciális modellfüggvényt, aminek egyetlen paraméterét lineáris és nemlineáris regresszióval egyaránt meghatároztuk az adatokra való illesztéssel. A modellfüggvény becsült paramétereiből kiszámítottuk az egyes fémionokra vonatkozó 50%-os halálozási koncentrációkat (LC50). Legtoxikusabbnak a Cu(II), legkevésbé toxikusnak a Mn(II) ion mutatkozott. Az ionok csökkenő toxikusságának mértékére a következő sorrend adódott: Cu(II) → Zn(II) → Pb(II) → Co(II) → Mn(II) .

A 14 nm-es magnetit nanorészecskék az alkalmazott koncentrációtartományban nem bizonyultak toxikusnak az MTT mérések alapján. Sajnos, a 6 nm-es részecskék esetén a kísérleti adatok nagyon szórtak, így ezek nem voltak kiértékelhetők.

A fémionok közül egyedül csak a Cu(II) ion toxikusságát tudtuk kísérletileg tanulmányozni magnetit nanorészecskék jelenlétében. Ezeknél a méréseknél a 14 nm-es magnetit nanorészecskék koncentrációját állandó értéken tartottuk, s a Cu(II) ionok koncentrációját változtattuk. A kísérleti adatok kiértékelése ebben az esetben kisebb LC50 értéket adott a Cu(II) ionokra a korábban kapott értéknél, amit magnetit nanorészecskék jelenléte nélkül határoztunk meg. A két LC50 érték közötti különbség tökéletes összhangban van az irodalomban közölt adszorpciós értékkel. Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a magnetit nanorészecskék kompetitív adszorpcióval meg tudják kötni a sejtekben lévő Cu(II) ionokat, így csökkentve azok mérgező hatását. Természetesen szükség lenne a jövőben ilyen vizsgálatokat végezni a többi fémionra is. A projekt több fémionra való kiterjesztésével pedig talán lehetőség lenne egy általános QSAR-modell felállítására, ami minden fémionra alkalmazható.

A tapasztalatok azt mutatják, hogy nagyon tiszta vegyületek és szigorú higiénias laboratóriumi körülmények szükségesek a magnetit nanorészecskék szintéziséhez illetve a toxikológiai vizsgálatokhoz.

Irodalomjegyzék

- [1] Shevchenko, V. Y., Madison, A. E., Shudegov, V. E.: "*The Structural Diversity of the Nanoworld.*" *Glass Physics and Chemistry*, 29, 577 (2003).
- [2] Shevchenko, V. Y.: "*Structural chemistry of the nanoworld - A new page of inorganic chemistry.*" *Glass Physics and Chemistry*, 37, 467 (2011).
- [3] Hou, W.-C., Westerhoff, P., Posner, J. D.: "*Biological accumulation of engineered nanomaterials: a review of current knowledge.*" *Environmental Science: Processes & Impacts*, 15, 103 (2013).
- [4] Luyts, K., Napierska, D., Nemery, B., Hoet, P. H. M.: "*How physico-chemical characteristics of nanoparticles cause their toxicity: complex and unresolved interrelations.*" *Environmental Science: Processes & Impacts*, 15, 23 (2013).
- [5] Yang, Y., Zhang, C., Hu, Z.: "*Impact of metallic and metal oxide nanoparticles on wastewater treatment and anaerobic digestion.*" *Environmental Science: Processes & Impacts*, 15, 39 (2013).
- [6] Dreher, K. L.: "*Health and Environmental Impact of Nanotechnology: Toxicological Assessment of Manufactured Nanoparticles.*" *Toxicological Sciences*, 77, 3 (2004).
- [7] Cronin, M. T. D., Madden, J. C., Eds.: *In Silico Toxicology: Principles and Applications*. Cambridge, The Royal Society of Chemistry (2010).
- [8] Tasi, G.: *Számítógépes toxikológia*. Szeged, JATEPress (2014).
- [9] Puzyn, T., Rasulev, B., Gajewicz, A., Hu, X., Dasari, T. P., Michalkova, A., Hwang, H.-M., Toropov, A., Leszczynska, D., Leszczynski, J.: "*Using nano-QSAR to predict the cytotoxicity of metal oxide nanoparticles.*" *Nature Nanotechnology*, 6, 175 (2011).
- [10] Palsule, S., DeArmitt, C. (2014). *Magnetite*. *Encyclopedia of Polymers and Composites*, Springer Berlin Heidelberg: 1.
- [11] Ward, J., Ed. *Magnetite : synthesis, uses and biological occurrences*. New York, Nova Science Publishers (2014).
- [12] Cornell, R. M., Schwertmann, U.: *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurences and Uses*. Weinheim, Wley-VCH Verlag (2003).
- [13] Schwertmann, U., Cornell, R. M.: *Iron Oxides in the Laboratory: Preparation and Characterization*. Weinheim, WILEY-VCH Verlag (2000).

- [14] Elmore, W. C.: "*Ferromagnetic Colloid for Studying Magnetic Structures.*" Phys. Rev., 54, 309 (1938).
- [15] Giraldo, L., Erto, A., Moreno-Piraján, J.: "*Magnetite nanoparticles for removal of heavy metals from aqueous solutions: synthesis and characterization.*" Adsorption, 19, 465 (2013).
- [16] Petcharoen, K., Sirivat, A.: "*Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles via the chemical co-precipitation method.*" Materials Science and Engineering: B, 177, 421 (2012).
- [17] Shen, Y. F., Tang, J., Nie, Z. H., Wang, Y. D., Ren, Y., Zuo, L.: "*Preparation and application of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles for wastewater purification.*" Separation and Purification Technology, 68, 312 (2009).
- [18] Dave, P. N., Chopda, L. V.: "*Application of iron oxide nanomaterials for the removal of heavy metals.*" Journal of Nanotechnology, 2014 (2014).
- [19] Nassar, N. N.: "*Kinetics, equilibrium and thermodynamic studies on the adsorptive removal of nickel, cadmium and cobalt from wastewater by superparamagnetic iron oxide nanoadsorbents.*" The Canadian Journal of Chemical Engineering, 90, 1231 (2011).
- [20] Szabó, G., Ed. *Sejtbiológia*. Budapest, Medicina Könyvkiadó (2009).
- [21] Berry, C. C.: "*Progress in functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine.*" J. Phys. D: Appl. Phys., 42, 224003 (2009).
- [22] Rappoport, J., Preece, J., Chipman, K., Argatov, I., Davies, A., Dyson, L., Dyson, R., Lang, G., Johnson, A., Mayaud, L. (2011). How do manufactured nanoparticles enter cells?, Report on a problem studied at the UK Mathematics-in-Medicine Study Group. Reading.
- [23] Mahmoudi, Morteza et al.: "*Effect of nanoparticles on the cell life cycle.*" Chemical reviews, 111, 3407 (2011).
- [24] Tasi, G.: *Matematikai kémia*. Szeged, JATEPress (2014).
- [25] Tasi, G.: *Számítógépes kémia*. Szeged, JATEPress (2010).
- [26] Wang, Y., Li, B., Zhou, Y., Jia, D.: "*In situ mineralization of magnetite nanoparticles in chitosan hydrogel.*" Nanoscale research letters, 4, 1041 (2009).
- [27] Barna, D., Gyevi-Nagy, L., Tasi, G.: "*Linearizálni vagy nem linearizálni: paraméterek hibaterjedésének analitikus és numerikus számítása.*" Magyar. Kem. Lapja, 46, 383 (2011).

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm megtisztelő segítségét Dr. Kónya Zoltán professzor úrnak, hogy lehetővé tette számomra, és irányította az AKKT nanolaborjában való munkámat. Hálás köszönetet mondok Dr. Kiricsi Mónika tanárnőnek is, hogy magas szakmai hozzáértéssel irányította toxikológiai munkámat. Köszönetet szeretnék mondani Szabó Mária PhD hallgatónőnek, Igaz Nóra hallgatónőnek és Tóbiás Roland PhD hallgatónak az általuk nyújtott segítségért.

Nyilatkozat

Alulírott Tasi Domonkos Attila, BSc szakos hallgató kijelentem, hogy szakdolgozatomat a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Karának, az Alkalmazott és Környezeti Kémiai Tanszékén készítettem, a Kémia BSc diploma megszerzése érdekében.

Kijelentem, hogy a dolgozatot más szakon korábban nem védtem meg, saját munkám eredménye, és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, eszközök, stb.) használtam fel.

Tudomásul veszem, hogy szakdolgozatomat a Szegedi Tudományegyetem könyvtárában, a kölcsönözhető könyvek között helyezik el.

2015. 05. 16.

.....

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar