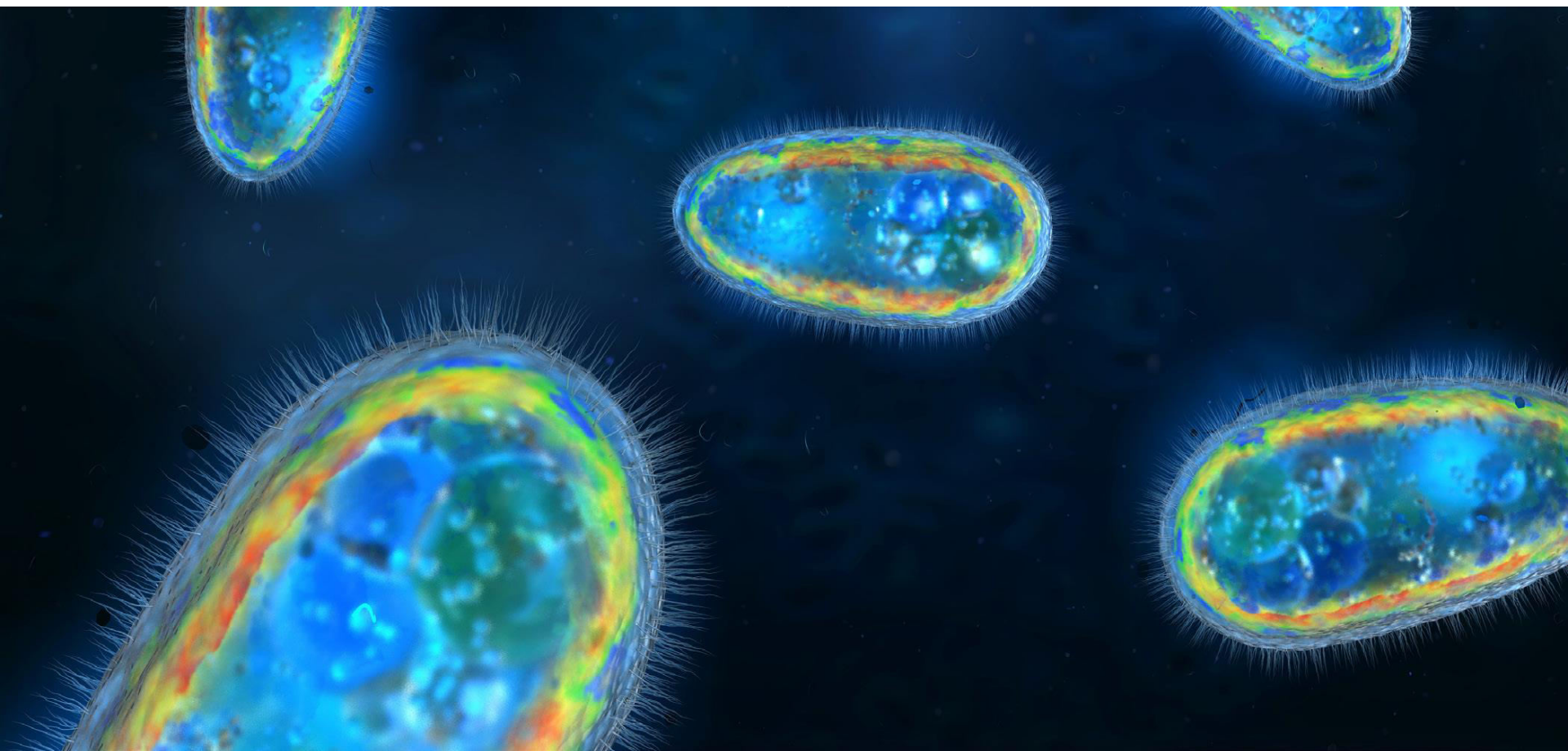


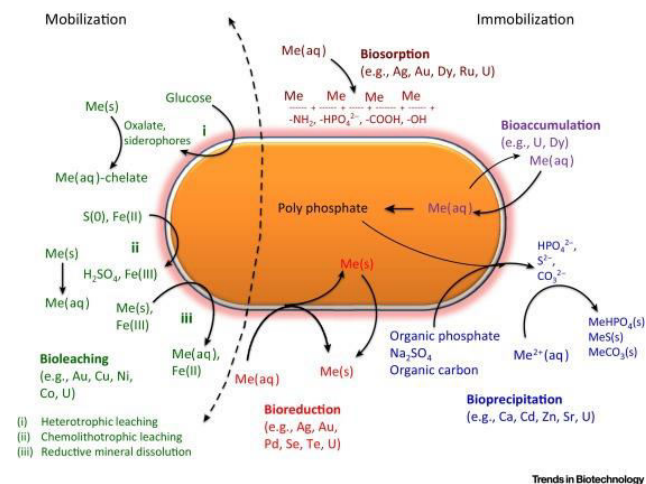
Single Cell - ICP-MS: Cisplatin felvétel és egyéb fémek mérése sejtekben

Dr. Béres István
2019. Június 13



Biológiailag jelentős fémek:

- A sejtben lévő fontosabb fémek, amelyek biológiai vagy patológiai folyamatokban vesznek részt
 - Átmeneti fémek (Zn, Cu, Fe...) ionjai fertőzésekben, rákos daganatokban és neurodegeneratív betegségeken
- Fémeket tartalmazó gyógyszerek felvétele sejtekben
 - Cisplatin ($\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$) a hatásos daganatellenes gyógyszerek csoportjának első képviselője
- Nanorészecskék/toxikus fémek felvétele a sejtekben

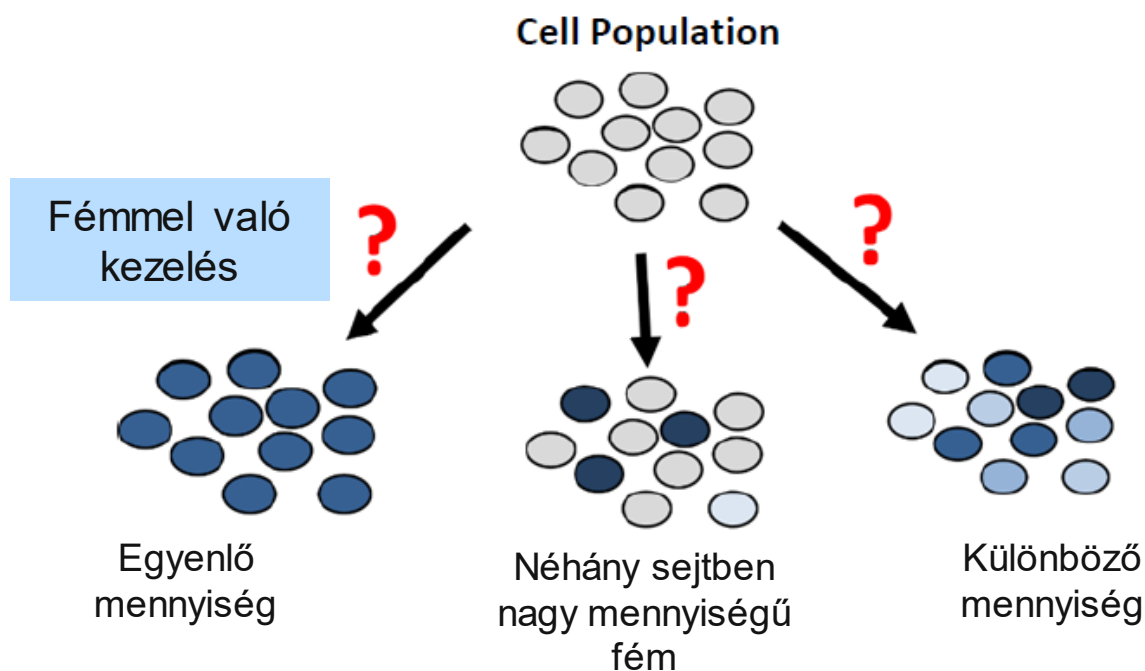


<http://www.nature.com/articles/nchembio0308-143>

Biodisztribúció, és bioakkumuláció

Single Cell ICP-MS

- A hagyományos ICP-MS sejtek egy populációjából határozza meg a fémtartalmat nem pedig egyetlen sejtből
 - Feltételezzük, hogy a fémek sejtek általi felvétele azonos



Single Cell ICP-MS

- A hagyományos ICP-MS sejtek egy populációjából határozza meg a fémtartalmat nem pedig egyetlen sejtből
 - Feltételezzük, hogy a fémek sejtek általi felvétele azonos
- Microszkóppal & fluoreszcens festéssel egyedi sejteket vizsgálunk
 - Időigényes
 - Korlátozott számú sejt vizsgálatára alkalmas
- Single Cell ICP-MS (SC-ICP-MS) kiküszöböli mind a 2 problémát
 - Egyedi sejteket vizsgál
 - Gyors, tehát nagy számú sejt vizsgálatát teszi lehetővé
 - Kvantitatív

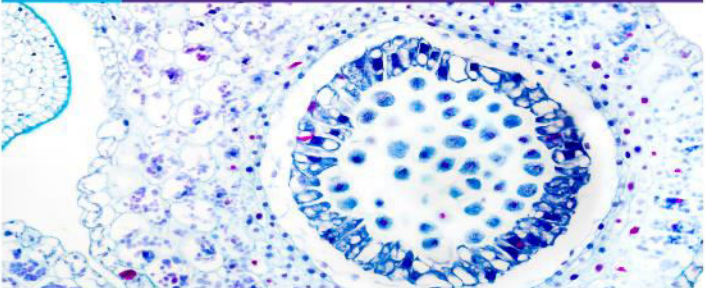
Mi a Single Cell ICP-MS?

A Single Cell - ICP-MS egy fejlődő technika, amely lehetővé teszi:

- A fémionok koncentrációjának meghatározását külön az egyes sejtekben és külön a tápoldatban, mindenféle mintaelőkészítés nélkül
- Fém- és nanorészecske tartalom monitorozása egyes sejtekben
 - Sejten belüli fémtartalom
 - Fémek felvétele a sejtek által
 - Nanorészecskék felvétele
 - Nanorészecskék száma a sejten belül
- A hagyományos módszerekkel ellentétben kis számú sejtek kezelését teszi lehetővé

WHITE PAPER

An Introduction to Single Cell ICP-MS Analysis



Introduction

The introduction and development of Single Particle ICP-MS (SP-ICP-MS) has opened a new area of research which allows the rapid detection and analysis of metal based particles in a variety of matrices and applications.^{1,2} The key feature of SP-ICP-MS is that it allows discrete pulses of positively charged ions to be detected and measured in a time resolved manner using microsecond (µs) data acquisition rates. This advance in data acquisition capabilities is opening up a number of new application areas. In this white paper, we will introduce the concept of Single Cell ICP-MS (SC-ICP-MS), where individual cells are rapidly analyzed for metal content. Before delving into SC-ICP-MS, let's briefly review the theory of SP-ICP-MS.

SP-ICP-MS: A Brief Review

Comprehensive descriptions of SP-ICP-MS are available,^{1,2} so only a brief review will be given here. When a nanoparticle enters the plasma, it is completely ionized, producing a burst of ions which can be detected with ICP-MS. While conventional ICP-MS looks at a continuous signal, the output from SP-ICP-MS looks at discrete signals; one nanoparticle yields one ion burst, with the intensity of the resulting signal being related to the size of a particle (nm) and the number of pulses being related to the particle concentration (part/mL).

The key to SP-ICP-MS is rapid, continuous measurement, which minimizes the chance of more than one particle being detected at the same time and ensures that particles are all counted. These tasks can be accomplished with ICP-MS instrumentation which contains fast electronics and eliminates the quadrupole.

Authors:

Lauren Amabile¹
Chadly Stephan²
Stan Satali²
Ruth Moxfield³

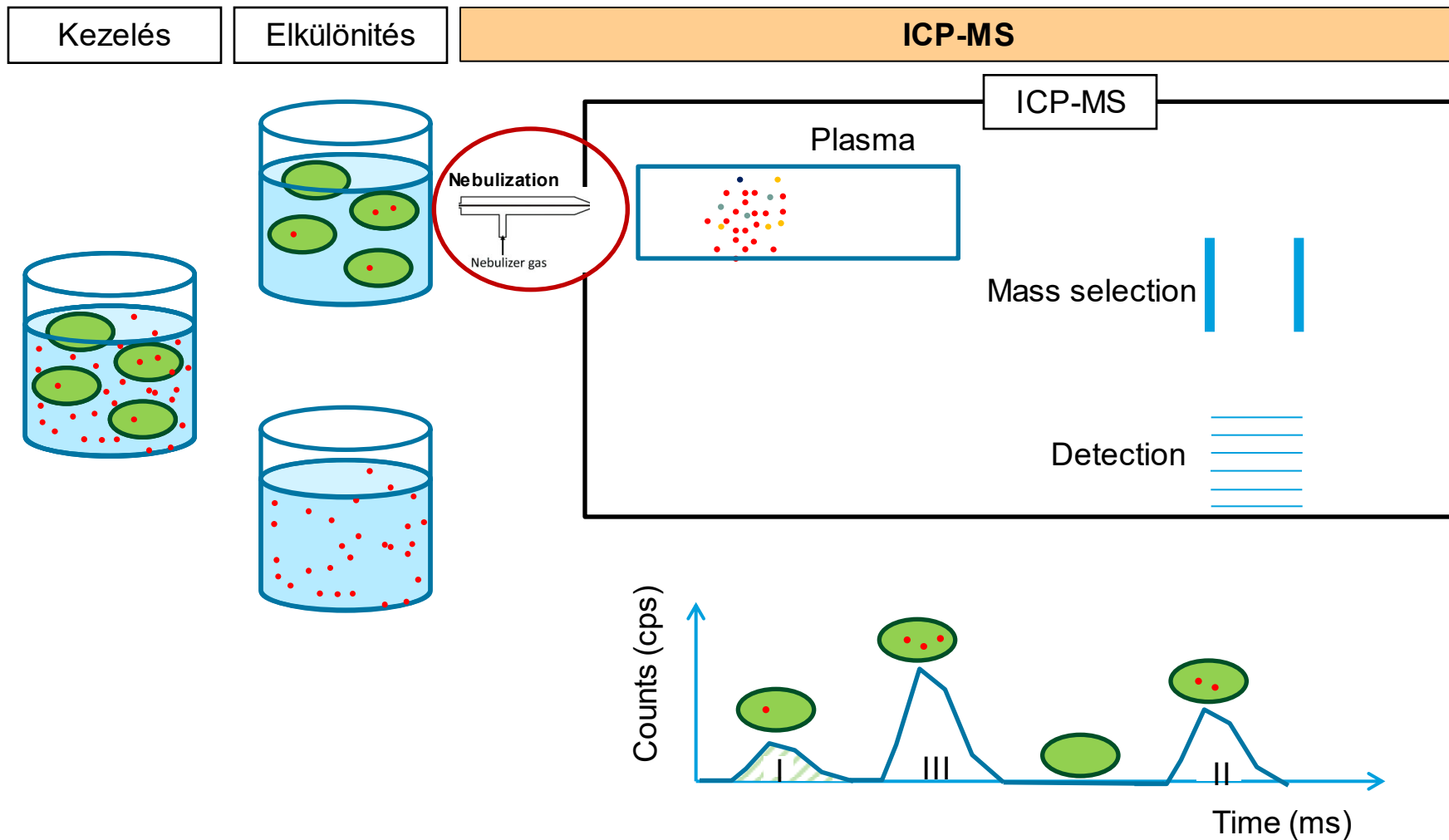
¹National Institute on Minority Health and Health Disparities, National Institute of Health, Bethesda, MD USA

²PerkinElmer Inc., Shelton, CT USA

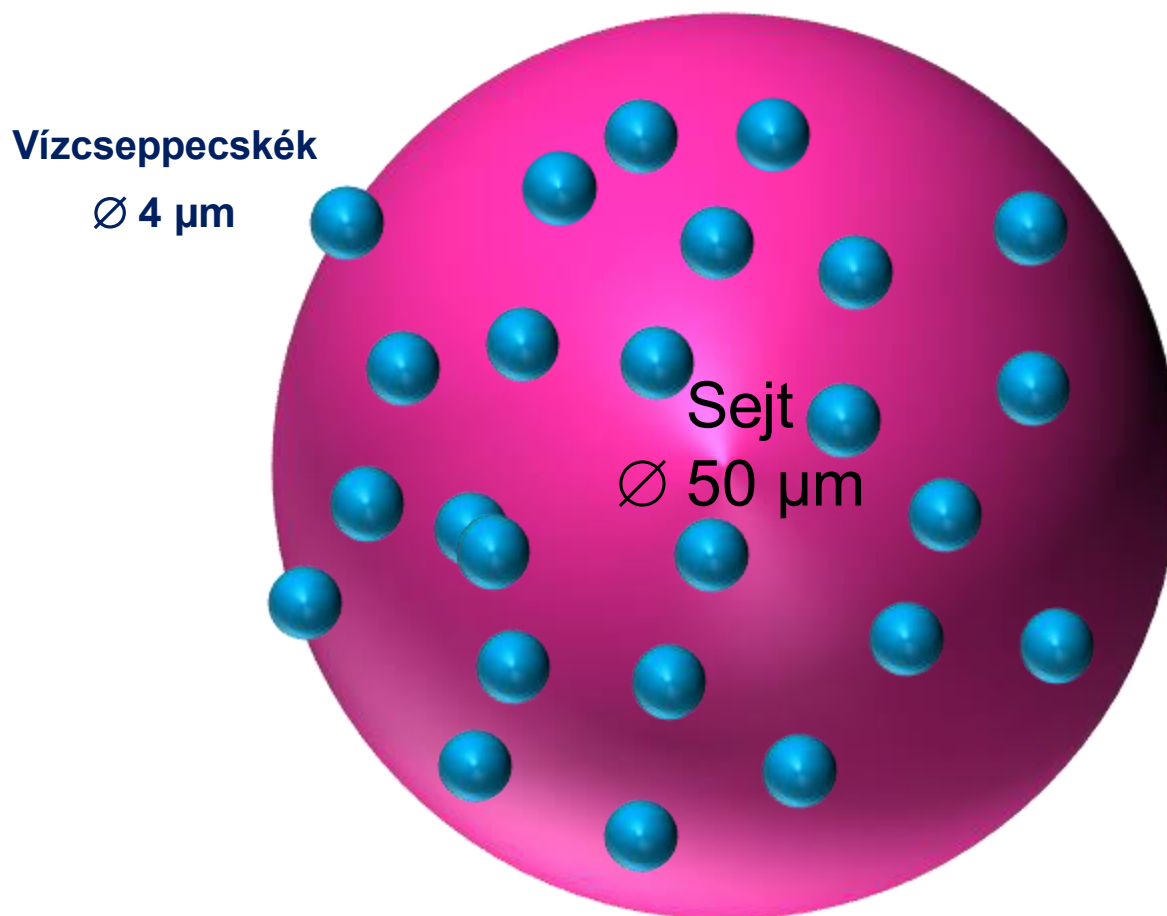
³Center for Environmental NanoScience and Risk (CENSR), Arnold School of Public Health, University of South Carolina, SC USA

 PerkinElmer
For the Better

Single Cell ICP-MS adatok



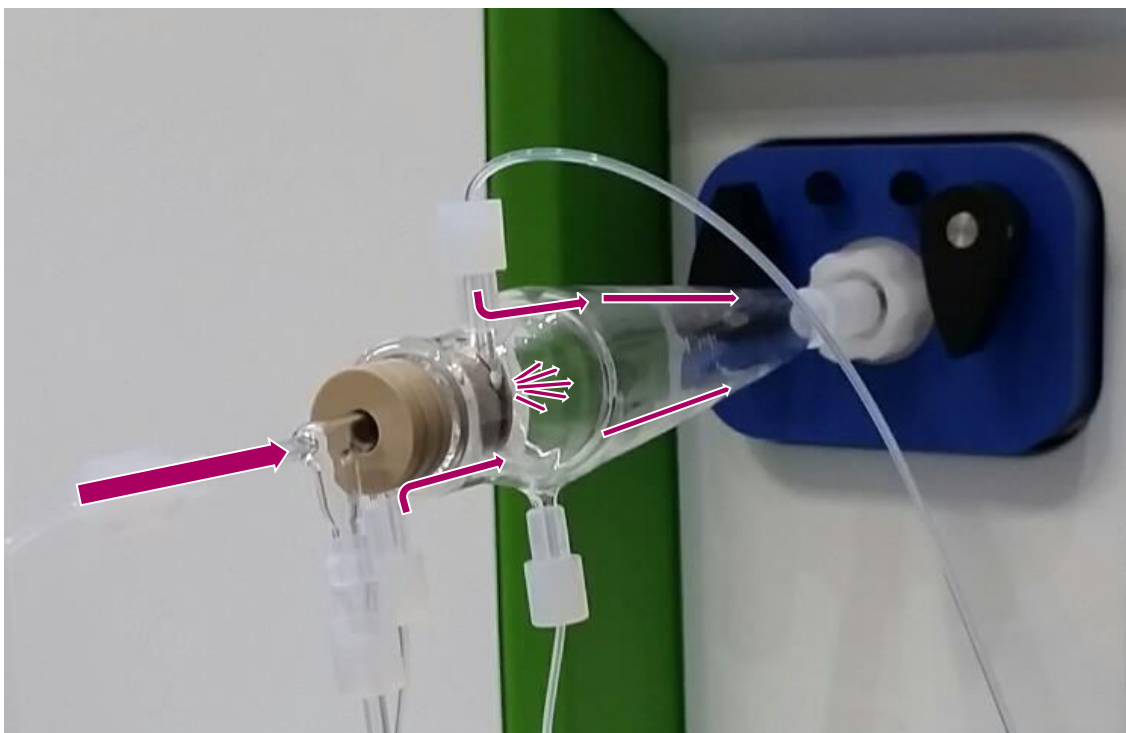
SC-ICP-MS: A porlasztás & bejuttatás a kulcs!



Hogyan tudjuk a sejteket hatékonyan bejuttatni a mintaoldatból a plazmába anélkül, hogy megsérülnének?

A porlasztás & bejuttatás a kulcs!

- HEN – porlasztó
 - Nagy hatékonyságú porlasztó
 - Nagyon alacsony nyomás
 - 10 től 40 μL /perc áramlás
- Asperon™ ködkamra
 - Lineáris áthaladás
 - Lamináris áramlás
 - PerkinElmer tervezés
- Arany 60 nm nanorészecske
 - A porlasztó és a ködkamra hatékonyságának mérésére alkalmas eszköz



Single Cell Applikációs Szoftvermodul

Módszer
Paraméterek

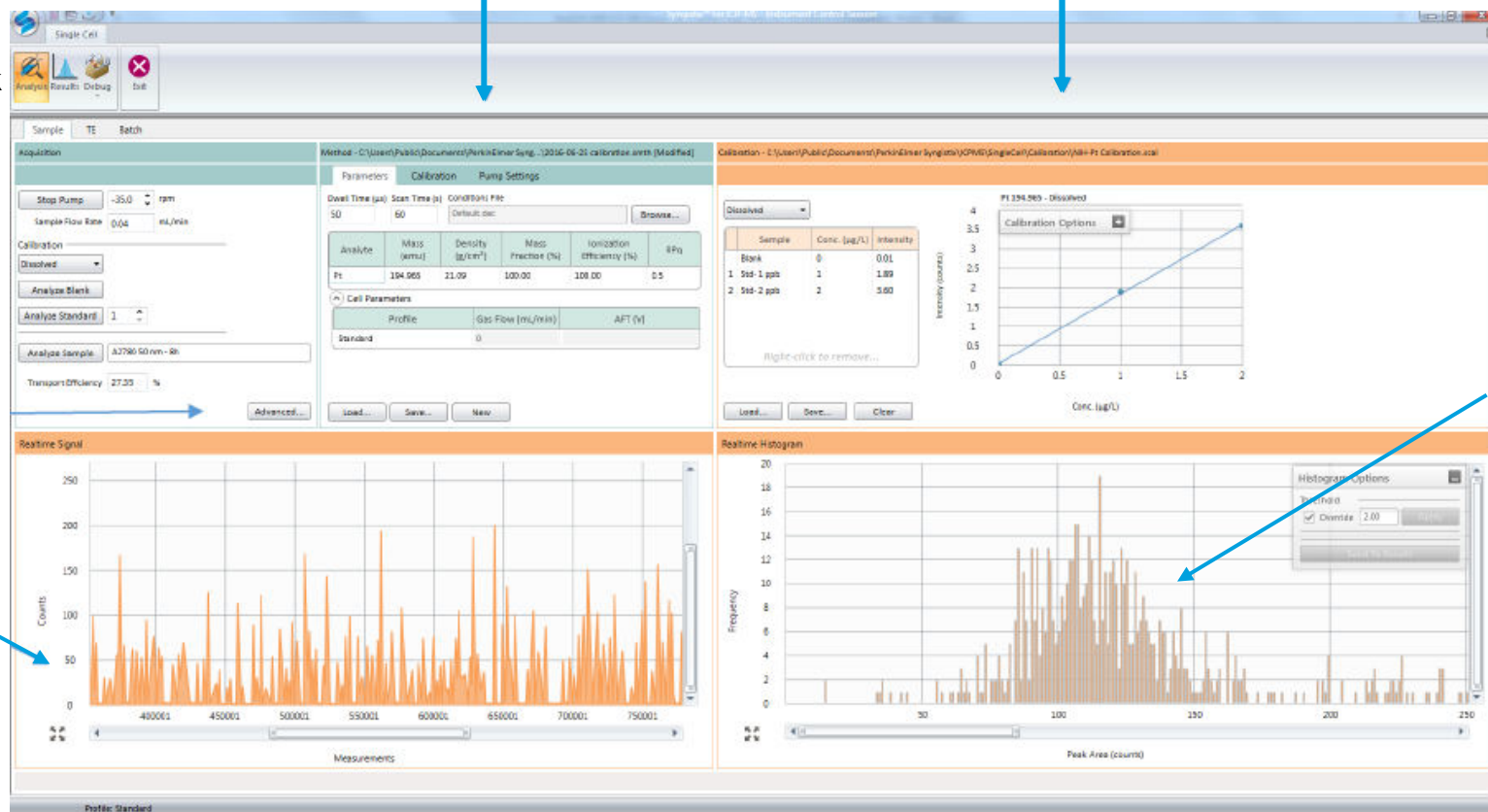
Kalibrációs
Paraméterek

Mérési
paraméterek

Opciók

Valós idejű
jel

Valós idejű
eloszlási
Hisztogram



Single Cell Applikációs Szoftvermodul

Módszer
Paraméterek

Oldott
anyag
Kalibráció

Ionos
Kalibráció

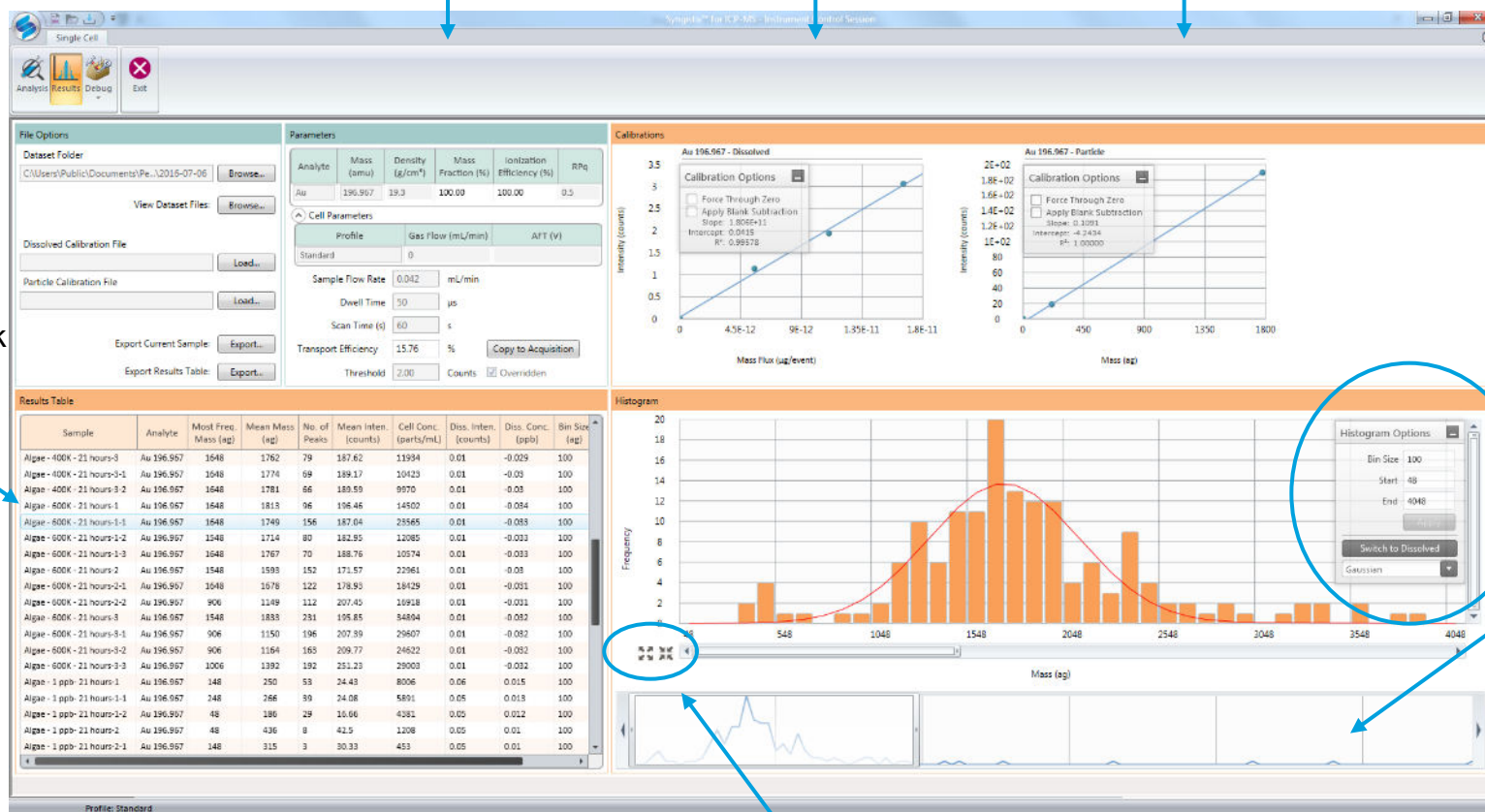
File
Információ

Az
eredmények
legördülő
listája

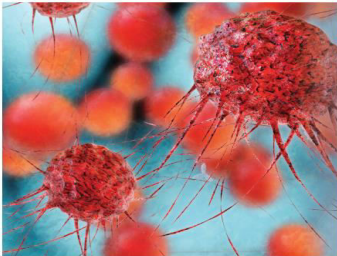
Állítható
méret

Állítható
integrációs
ablak

Nagyítás - kicsinyítés



A petefészekrákos sejtek cisplatin felvétele : NexION® 2000



APPLICATION NOTE

ICP - Mass Spectrometry

Authors:
 Lauren Amable
 National Institute on Minority Health and
 Health Disparities, National Institutes of Health
 Bethesda, MD

Stan Smith
 Chady Stephan
 PerkinElmer, Inc.
 Shelton, CT

**New Research Evaluating
Cisplatin Uptake in Ovarian
Cancer Cells by Single Cell ICP-MS**

Introduction
 Cisplatin, carboplatin, and
 oxaliplatin are the most
 widely used of platinum-
 based cancer chemotherapy drugs in the Western world. Cisplatin's effectiveness is due to
 its ability to bind to the DNA, resulting in DNA-platinum (Pt) adducts, which bend the
 DNA. The cells must then repair the DNA damage, otherwise DNA replication is blocked
 resulting in cell death¹.

Many cancers are initially sensitive to platinum-based treatment, but patients frequently
 relapse with tumors displaying resistance to further cisplatin therapy². Cisplatin drug resistance
 is due to three major molecular mechanisms: increased DNA repair, increased cytosolic
 inactivation, and altered cellular accumulation. Decreased cellular uptake or increased cellular
 export of cisplatin constitutes the mechanisms involved in altered cellular accumulation³.



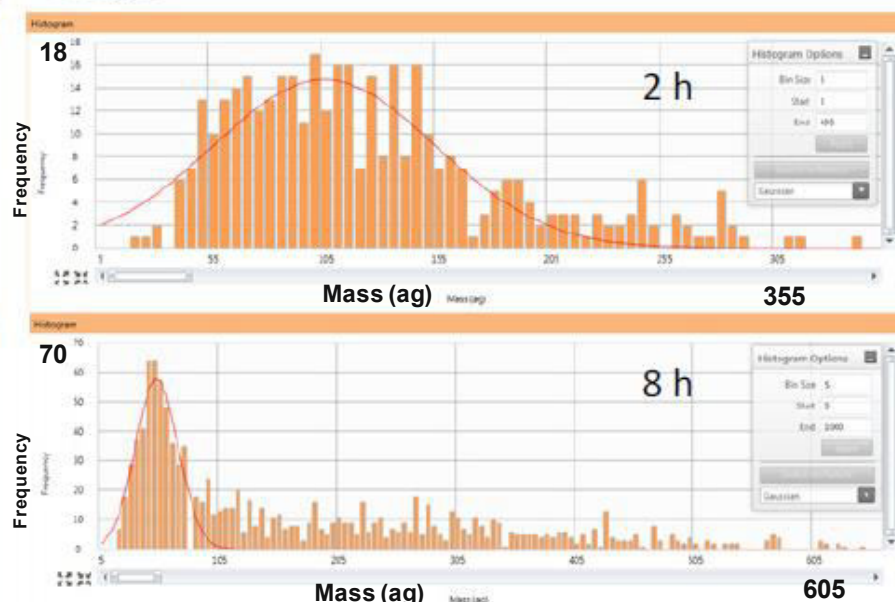
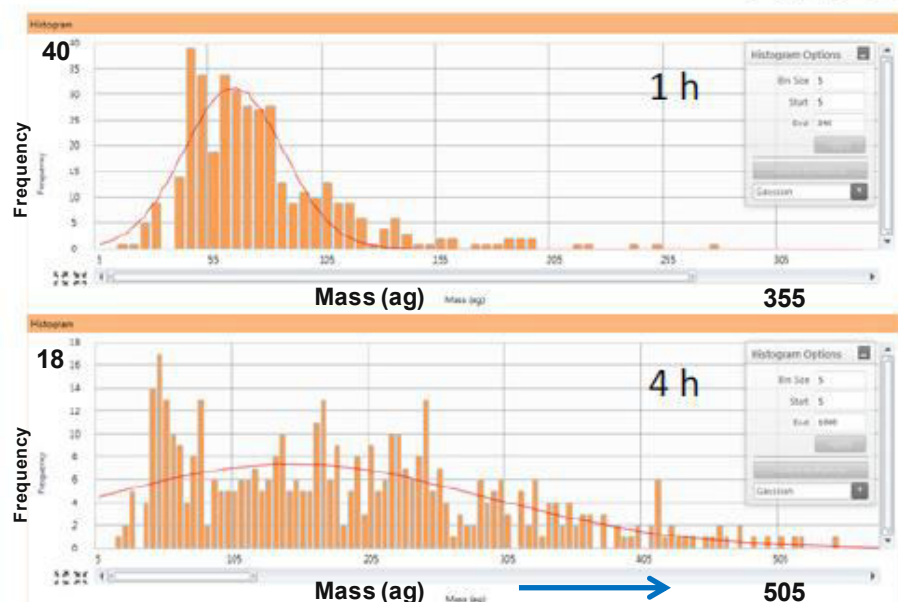
Table 1. ICP-MS Conditions.

Parameter	Value
Sample Uptake Rate	0.04 mL/min
Nebulizer	MEINHARD® HEN
Spray Chamber	Asperon
Injector	2.0 mm id Quartz
RF Power	1600 W
Neb Gas Flow	0.36 L/min
Makeup Gas Flow	0.7 L/min
Platinum Isotope	195 amu
Dwell Time	50 µs
Sample Analysis Time	60 s

Eredmények: a sejtek cisplatin felvétele

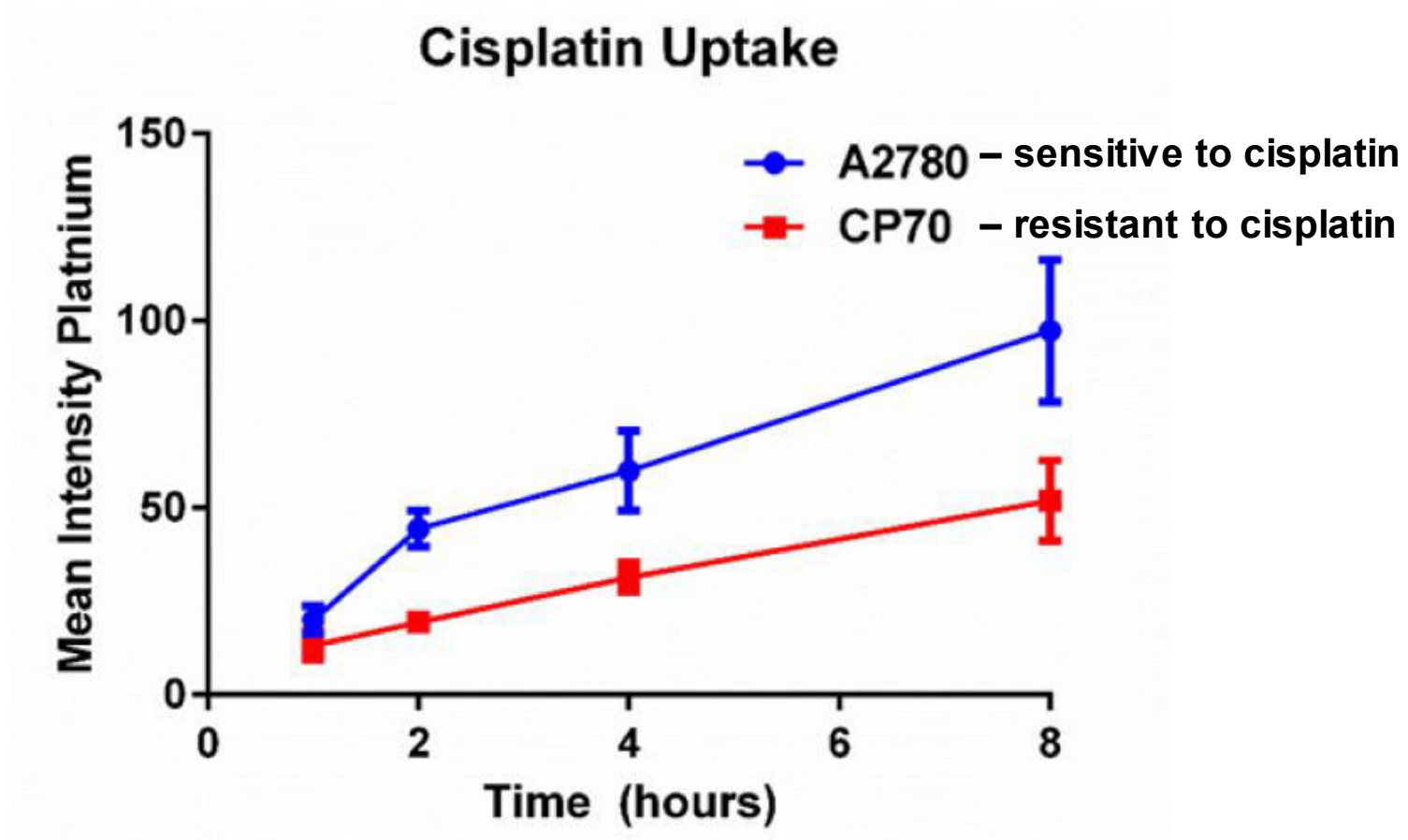
- A sejteket 30 μM cisplatin-nal kezeljük
- A sejteket 1, 2, 4, és 8 órával a kezelés után vizsgáljuk

A2780 Cells



A sejtek Pt tartalma idővel növekszik

Eredmények: A Cisplatin felvétel összehasonlítása különböző sejtvonalak esetén



Kevesebb Pt a CP70 sejtekben → cisplatin-rezisztens sejtek

Összefoglalás: Cisplatin felvétel petefészekrákos sejtekben

- Képesek vagyunk Pt-t mérni egyetlen sejtben
 - Cisplatin felvétel idővel növekszik
 - A Cisplatin-rezisztens sejtvonal kevesebb cisplatint vesz fel, mint a cisplatin-érzékeny sejtvonal
- Az SC-ICP-MS technika előtt nem volt lehetséges egyedi sejtek szintjén a betekintés

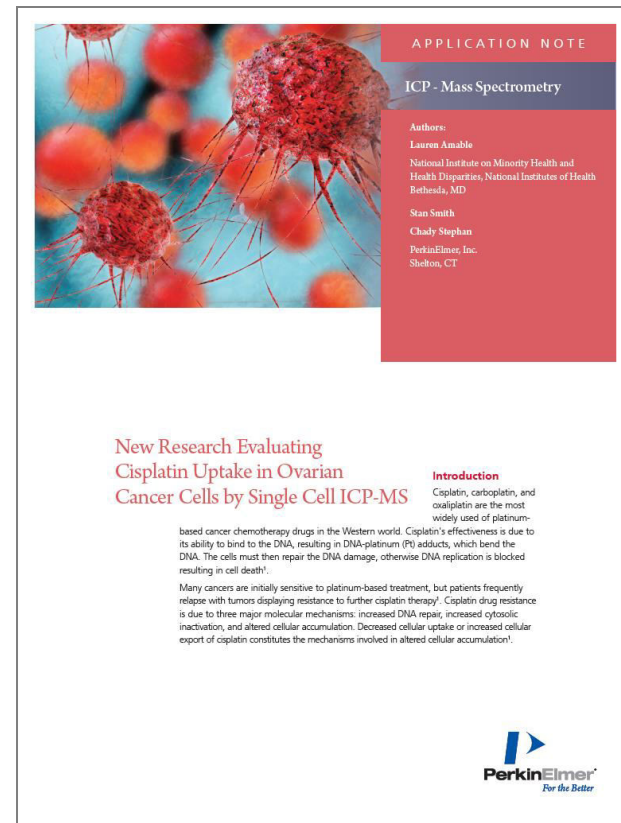


Figure 2 displays four rows of mass spectrometry histograms, each corresponding to a different time point (2 h, 29 h, 53 h, and 77 h). Each row contains three histograms labeled 1NP/1C, 2NP/1C, and 3NP/1C. The x-axis for all histograms is 'Mass (ag)' and the y-axis is 'Frequency'. The histograms show the distribution of mass values, with a red curve overlaid on the 1NP/1C data in each row. The 1NP/1C data shows a peak around 1600 ag, while the 2NP/1C and 3NP/1C data show peaks around 3200 ag and 4800 ag, respectively. The frequency of the peaks increases with time, particularly for the 1NP/1C data.

- [illegible]

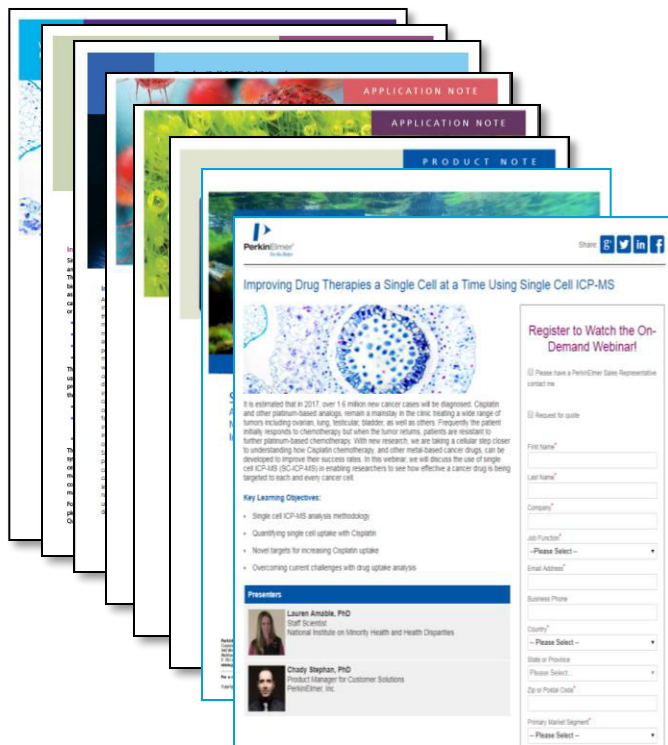


UNIVERSITY OF
SOUTH CAROLINA Ruth Merrifield, Ph.D.

SC-ICP-MS további alkalmazásai

- **Cu, Mn, V, Cd, Mo, Co, Zn és Fe** A459 sejtekben
- Egyrétegű fallal rendelkező karbon nanocsövecskéből származó **Au** és **Lu** felvétele J774 macrofágok által - nanomedicina
- Sejten belüli fémek lágyszövetdaganatos sejtekben

SC-ICP-MS Alkalmazási leírások



Alkalmazási leírások letöltése:
www.perkinelmer.com/nexion2000

Single Cell - ICP-MS lehetőségek:

- Fém- és nanorészecske tartalom monitorozása egyes sejtekben attogram per sejt szinten (ag/cell)
 - Sejten belüli fémtartalom
 - Fémek felvétele a sejtek által
 - Nanorészecskék felvétele
 - Nanorészecskék száma a sejten belül
- Alacsony számú sejt kezelése
 - Néhány ezer darab a hagyományos ICP-MS-ben szokásos néhány millióval szemben

Bármilyen típusú sejt vizsgálható

- Élesztő sejtek 2-10 μm
- Humán sejtek 5-100 μm
- Növényi sejtek 1-100 μm
- Baktérium sejtek

Együttműködő partnerek

Laboratóriumok

- BASF SE
- Bigelow Laboratory for Ocean Sciences
- Brookhaven National Laboratory
- Chinese Center for Disease Control and Prevention
- National Institute of Health

Akadémiai központok

- Uni of Birmingham
- Uni of Melbourne
- Uni of Nottingham
- Uni of Sydney
- Nanjing Agricultural University
- NanKai University
- Uni. of California, Los Angeles
- Uni. of Rochester
- Washington University in Saint Louis
- Uni of Colorado
- Uni de Montreal



Köszönöm figyelmüket és várom kérdéseiket