

**INSTYTUT FIZYKI JĄDROWEJ**  
**im. Henryka Niewodniczańskiego**  
**Polskiej Akademii Nauk**  
ul. Radzikowskiego 152, 31-342 Kraków, Poland.

[www.ifj.edu.pl/reports/2003.html](http://www.ifj.edu.pl/reports/2003.html)  
Kraków, październik 2003

---

**RAPORT NR 1928/PL**

**ANALIZA MATERIAŁÓW BIOMEDYCZNYCH**  
**WYBRANYMI METODAMI SPEKTROSKOPOWYMI**

**Wojciech M. Kwiatek**

**(rozprawa habilitacyjna)**

WYDANO NAKŁADEM  
INSTYTUTU FIZYKI JĄDROWEJ  
IM. HENRYKA NIEWODNICZAŃSKIEGO  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
UL. RADZIKOWSKIEGO 152, 31-342 KRAKÓW

Kopię kserograficzną wykonano w IFJ PAN Kraków

---

## Spis treści

Wykaz skrótów i pojęć .....	5
Wstęp .....	7
I.     Material biomedyczny i jego preparatyka .....	11
II.    Charakterystyka metod badawczych .....	15
III.   Rola pierwiastków śladowych w organizmie człowieka z uwzględnieniem różnych stopni ich utlenienia .....	21
IV.    Wybrane schorzenia układu moczowego .....	25
V.     Wyniki badań .....	28
VI.    Podsumowanie .....	40
VII.   Wykaz literatury .....	43
VIII.  Kserokopie oryginalnych prac .....	47

## **Podziękowania**

*Gorące podziękowania pragnę przekazać Kierownikowi Zakładu Spektroskopii Jądrowej Panu Profesorowi Janowi Stycznioniowi za okazane wsparcie, wyrozumiałość oraz udzielenie mi wielu życzliwych rad.*

*Szczególne podziękowania składam mojemu Mistrzowi Panu Profesorowi Andrzejowi Z. Hrynkiewiczowi, za przekazanie mi pasji poznawania mikroświata, czas poświęcony wspólnym rozważaniom oraz inspirację naukową w dziedzinie zastosowań metod fizyki jądrowej w biologii i medycynie.*

*Pragnę też szczególnie podziękować Panu Profesorowi Tadeuszowi Cichockiemu za życzliwość, opiekę, niezliczone dyskusje, pomoc w przygotowaniu materiału badawczego i wsparcie w poznawaniu tajników wiedzy medycznej.*

*Serdeczne podziękowania należą się również Panu Profesorowi Jerzemu Stachurze, za okazaną pomoc w dokonywaniu oceny histopatologicznej badanych preparatów oraz liczne konsultacje.*

*Dziękuję Wszystkim Koleżankom i Kolegom, Współpracownikom uczestniczącym w prowadzonych przeze mnie badaniach naukowych, w wyniku których powstało niniejsze opracowanie, za ich życzliwość i ofiarną pomoc.*

*Gorąco dziękuję mojej Rodzinie, a zwłaszcza Rodzicom, za stały doping, wiarę i wyrozumiałość, co w istotny sposób przyczyniło się do powstania tej pracy, którą właśnie Im dedykuję.*

*Autor*

## Wykaz skrótów i pojęć

Termin	Objaśnienie
angiogeneza	wytwarzanie nowych naczyń krwionośnych
anionorodnik nadadtlenkowy	cząsteczka tlenu która przyłączyła jeden elektron, $O_2^{-*}$
choroba nowotworowa	nieprawidłowy i nadmierny rozrost tkanki ustroju
cytostatyki	leki przeciwnowotworowe, zakłócają zdolności podziału i mnożenia się komórek nowotworowych
deoksyhemoglobina	zredukowana forma hemoglobiny
dialdehyd malonowy	produkt rozpadu reszt wielonasyconych kwasów tłuszczowych, $COH-CH_2-COH$
DPcX ENTELLAN	związek służący do syntetycznego zamykania wybarwianych preparatów,
dysmutaza nadttlenowa (SOD)	enzym (białko) biorący udział w reakcjach chroniących organizmy korzystające z dwutlenu przed szkodliwymi produktami ubocznymi metabolizmu $O_2$
enzym	białko biokatalizator przeprowadzający reakcje chemiczne w organizmach żywych
eozyrna	tetrabromofluoresceina $C_{20}H_8Br_4O_5$ , odczynnik do wybarwiania preparatów
etiologia	nauka o przyczynach chorób
fayalit	$Fe_2SiO_4$ , minerał, krzemian żelaza
formvar	polimer organiczny - zmodyfikowany poliwinyl formaliny,
FTIR	Fourier Transform InfraRed – spektroskopia furierowska w podczerwieni
glutation (GSH)	$(C_{10}H_{17}O_6N_3S)$ , glutamylcysteinyloglicyna)-tripeptyd, składający się z reszt aminokwasowych kwasu glutaminowego, cysteiny i glicyny
hematoksylina	barwnik cytologiczny
hematyt	żelaziak czerwony, $Fe_2O_3$ , minerał, tlenek żelaza,
inhibitor	substancja powodująca zmniejszenie szybkości lub niekiedy całkowite zatrzymanie reakcji chemicznej
katalaza (CAT)	enzym rozkładający toksyczny nadttlenek wodoru powstających w procesach utleniania biologicznego
ksylen	rozpuszczalnik; dwumetylobenzen - $C_6H_4(CH_3)_2$
magnetyt	żelaziak magnetyczny, $Fe_3O_4$ lub $FeO \cdot Fe_2O_3$ tlenek dwużelaza(III) i żelaza(II)
MDL	Minimum Detectable Limit
metalotionina	substancja chemiczna, jedna z odtrutek swoistych, stosowana w wielu zatruciach różnymi związkami chemicznymi
mineralizacja	chemiczny rozkład substancji organicznych na proste substancje nieorganiczne

<b>oksyhemoglobina</b>	HbO <sub>2</sub> , utlenowana forma hemoglobiny
<b>peroksydaza glutationowa</b>	enzym ochronny umożliwiający zajście reakcji utleniania glutationu w wyniku czego nadtlenek wodoru może być usunięty z komórek
<b>PIXE</b>	Proton Induced X-ray Emission – protonowa analiza fluorescencyjna promieni X
<b>prolifracja</b>	rozmnażanie się, rozprzestrzenianie się, odradzanie się komórek
<b>promotor</b>	substancja dodana do katalizatora przyspiesza reakcję chemiczną, sama nie ma na nią wpływu
<b>PSA</b>	prostate specific antigen, enzym glikoproteinowy
<b>R(E)BS</b>	Rutherford (Elastic) BackScattering – rutherfordowskie (elastyczne) wsteczne rozpraszanie
<b>rodnik wodorotlenowy</b>	cząsteczka <sup>*</sup> OH powstała na skutek rozpadu cząsteczki wody (oderwaniu się atomu wodoru) – nie jest to anion wodorotlenowy OH <sup>-</sup>
<b>rodnik wodorowy</b>	atom wodoru <sup>*</sup> H, posiada jeden niesparowany elektron
<b>SRIXE</b>	Synchrotron Radiation Induced X-ray Emission – synchrotronowa analiza fluorescencyjna promieni X
<b>stopień Gleasona</b>	liczba określająca stopień złośliwości guza w skali 2 - 10
<b>stres oksydacyjny</b>	stres tlenowy występujący w komórkach żywego organizmu
<b>TNM</b>	Tumor (guz), Nodules (węzły chłonne), Metastases (przerzuty odległe)
<b>trójglicerydy</b>	cząsteczki tłuszczu zbudowane z długich łańcuchów kwasów tłuszczowych i glicerolu,
<b>TRXRF</b>	Total Reflection X-Ray Fluorescence – fluorescencja całkowitego odbicia promieni X
<b>wolne rodniki</b>	atomy lub cząsteczki posiadające na zewnętrznej powłoce pojedynczy lub dwa niesparowane elektrony
<b>XANES</b>	X-ray Absorption Near Edge Structure – struktura absorpcji promieniowania X w pobliżu progu
<b>XRF</b>	X-Ray Fluorescence – fluorescencja promieniowania X

## Wstęp

Rozwój analitycznych metod fizycznych wykorzystujących cząstki naładowane oraz promieniowanie synchrotronowe pozwolił na zastosowanie ich w wielu dziedzinach nauki, a w szczególności w biologii i medycynie. Zastosowanie tych metod umożliwia prowadzenie badań w mikro obszarach tkanek, a nawet w pojedynczych komórkach. Z końcem dwudziestego wieku nastąpił znaczny rozwój metod, dzięki którym można prowadzić jednoczesną analizę składu pierwiastkowego oraz stopnia utlenienia metali występujących w materiałach biologicznych na poziomie śladowym.

Ciągła potrzeba prowadzenia prac badawczych z zakresu diagnostyki medycznej staje się inspiracją do rozwoju metod, za pomocą których będzie można odpowiedzieć na nurtujące środowisko medyczne pytania dotyczące: etiologii powstawania chorób, możliwości ich wczesnego diagnozowania, zapobiegania i leczenia. Aby móc udzielić odpowiedzi na wiele pytań z tego zakresu wciąż jeszcze muszą być prowadzone prace badawcze przez wiele środowisk naukowych współpracujących ze sobą. W pracach tych szczególne znaczenia przypada właśnie fizyce, która dysponuje specyficznymi metodami pozwalającymi na prowadzenie badań w mikro a nawet nano obszarach.

Pierwiastki śladowe odgrywające ważną rolę w organizmie człowieka są częstym obiektem badań. Istotnym jest poznanie składu chemicznego oraz stężeń pierwiastków śladowych występujących w poszczególnych narządach, tkankach, i komórkach. Przedstawiona rozprawa habilitacyjna dotyczy badań materiałów biomedycznych pobranych od pacjentów ze schorzeniami układu moczowego. Badany materiał to: kamienie nerkowe, tkanki nerek i prostaty. Zaprezentowane wyniki pomiarowe dotyczą stosowania różnorodnych fizycznych metod analitycznych, do których można zaliczyć: PIXE (Proton Induced X-ray Emission), AAS (Atomic Absorption Spectroscopy), R(E)BS (Rutherford (Elastic) BackScattering), XRF (X-Ray Fluorescence), TRXRF (Total Reflection X-Ray Fluorescence), SRIXE (Synchrotron Radiation Induced X-ray Emission), FTIR (Fourier Transform InfraRed), oraz XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure).

Niektóre metody fizyczne stały się konkurencyjnymi do metod chemicznych z uwagi na możliwość prowadzenia badań i analiz materiałów biologicznych nie powodując ich destrukcji. Możliwość jednoczesnego pomiaru badanych związków i zachowania struktury tkanek stanowi główną zaletę wielu metod fizycznych i daje szereg możliwości przeprowadzania różnorodnych analiz na tym samym materiale

badawczym. Ważnym aspektem tych możliwości jest wzajemne wspieranie rozwijających się metod diagnostycznych wynikami badań podstawowych jakie oferują te metody.

Rozprawa habilitacyjna obejmuje 9 wybranych publikacji powstałych w okresie 1992 – 2003, opublikowanych w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym [H1 – H9]\*. Przedstawione w rozprawie habilitacyjnej prace dotyczą głównie analiz składu pierwiastków występujących w tkankach nerek, prostaty oraz w złogach mineralnych (kamieniach nerkowych i kamieniach żółciowych). Badając skład pierwiastkowy złogów mineralnych należało zwrócić szczególną uwagę na poprawną interpretację danych eksperymentalnych z uwagi na występujący efekt matrycy. Wykorzystanie metod PIXE, R(E)BS i FTIR pozwoliło na dogłębną analizę tego efektu i opracowanie procedury jego korekcji.

W celu dokonania analiz składu pierwiastkowego wykorzystano metody SRIXE oraz PIXE nie tylko do określenia uśrednionego składu, ale także, przy pomocy układów mikrowiązkowych, dokonano analizy rozkładu przestrzennego stężeń tych pierwiastków. Wskazano na poszczególne struktury tkankowe, w których stężenia pierwiastków istotnie różnią się między sobą. Wskazano na występowanie korelacji pomiędzy rozkładem stężenia pierwiastków śladowych a charakterem badanych tkanek.

Z punktu widzenia współczesnej medycyny posiadanie tylko informacji o stężeniach pierwiastków śladowych nie jest wystarczające. Wykonanie dodatkowych badań określających stopień utlenienia wybranych pierwiastków jak też skład chemiczny badanej próbki daje pełniejszy obraz o zachodzących w niej procesach. Dlatego też, w tej pracy przedstawiono zastosowanie metody XANES w celu określenia stopnia utlenienia żelaza występującego w badanych próbkach. Natomiast inna metoda badawcza jaką jest FTIR posłużyła do określenia związków i konfiguracji wiązań grup typu CH, OH, CO występujących w złogach mineralnych i tkankach.

Cele prac miały charakter poznawczy oraz metodyczny z oczywistymi implikacjami potencjalnych zastosowań praktycznych w zakresie diagnostyki i terapii nowotworów. Obejmują one:

- a. Opracowanie procedur przygotowania tkanek tak, by pomiary można było prowadzić na zachowanych strukturach tkankowych, umożliwiającym mapowanie,

---

\* Prace oznaczone symbolami H1 – H9 pochodzą z listy kserokopii oryginalnych prac (Rozdział VIII).



- b. Wzbogacenie informacji o zmianach nowotworowych, mogących stanowić przyczynę do poznania etiopatogenezy zjawiska nowotworzenia poprzez określenie:
- składu pierwiastkowego tkanek zdrowych i nowotworowych metodami mikro-PIXE i mikro-SRIXE,
  - stopnia utlenienia żelaza w tkankach metodą XANES, pierwiastka będącego jednym z katalizatorów reakcji Fentona.

Powyższe analizy pozwolą określić metale mogące wspomagać reakcję Fentona, w wyniku której powstają wolne rodniki będące związkami silnie karcenogennymi.

Nowatorstwem prowadzonych prac, jak się wydaje, jest pionierskie zastosowanie metody micro-XANES w układzie fluorescencyjnym do badań tkanek nowotworowych i zdrowych. Spotykane w literaturze prace badawcze dotyczyły głównie analiz hodowli komórkowych, a nie tkanek pochodzących od pacjentów leczonych z powodu chorób nowotworowych. Wydaje się też, że określenie zróżnicowanego stopnia utlenienia żelaza, występującego w niewielkich stężeniach w tkankach zdrowych i nowotworowych pozwoliło na zbadanie reakcji Fentona jak też potwierdziło występowanie zjawisk angiogenezy. Przedstawione wyniki prac niewątpliwie wytyczać będą nowe kierunki i możliwości badań nad poważnym zagrożeniem XXI wieku jakim są wciąż rozwijające się choroby nowotworowe.

Olbrzymie znaczenie w prowadzonych pracach badawczych miał bezpośredni dostęp do odpowiednich preparatów dzięki współpracy z Zakładem i Katedrą Histologii oraz Katedrą Patomorfologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego i Oddziałem Urologii Szpitala Miejskiego im. Gabriela Narutowicza skąd pobierany był materiał badawczy.

Rozprawa składa się z wstępu, sześciu rozdziałów, spisu literatury oraz kserokopii oryginalnych. W celu zdefiniowania oraz pełniejszej oceny materiału biomedycznego, rozdział I poświęcono szczegółowemu omówieniu metod jego preparatyki, natomiast rozdział II pokrótce omawia schorzenia układu moczowego, którym poświęcono omawiane w rozprawie badania. Z uwagi na rolę jaką odgrywiają pierwiastki śladowe w organizmie człowieka dokonano jej charakterystyki w rozdziale III. Rozdział IV został poświęcony krótkiej charakterystyce metod analitycznych ze szczególnym uwzględnieniem metody XANES, która dopiero w ostatnich latach została zastosowana jako narzędzie badań materiałów biomedycznych. Główne miejsce rozprawy zajmuje rozdział V, w którym przedstawiono zastosowania opisanych metod do badań wybranych schorzeń. Rozprawę zamyka rozdział VI będący podsumowaniem, prezentujący wnioski jakie można wyciągnąć na bazie przedstawionych wyników pomiarowych.



## I. Materiał biomedyczny i jego preparatyka.

Przez materiał biomedyczny należy rozumieć każdy materiał badawczy pochodzenia roślinnego, zwierzęcego lub ludzkiego. Do materiałów tych zaliczamy: tkanki roślin znajdujących zastosowanie w naukach medycznych (np. zioła), tkanki zwierzęcych lub ludzkich mięśni, organów, kości i płynów ustrojowych. W tej pracy omówione są jedynie tkanki kości [H1], płynów ustrojowych (krwi i osocza) [H4, H7], oraz nerki [H2, H3, H6, H8] i prostaty [H9]. Ponadto badanym materiałem biomedycznym były złogi mineralne (kamienie nerkowe i żółciowe) pochodzenia ludzkiego [H4, H5].

Wielokrotnie użyte w tej pracy określenie „próbka” oznacza pobrany materiał badawczy, natomiast „tarcza pomiarowa” jest tym fragmentem próbki, który podlega bezpośredniej analizie.

Technika preparatyki tarcz pomiarowych odgrywa istotną rolę w analizie składu pierwiastkowego badanego materiału. Powtarzalność i dokładność otrzymanych wyników pomiarowych jak również osiągnięcie niskich wartości czynnika MDL (Minimum Detectable Limit) [1] zależy od wybranej techniki. Dlatego też właściwy dobór techniki przygotowania materiału badawczego do analiz jest bardzo istotny [H7]. Tak więc, w zależności od postawionego problemu badawczego oraz wyboru metody analitycznej próbka poddawana jest różnorodnym procesom przygotowawczym [H7, 2]. Tarcze pomiarowe, generalnie, możemy podzielić na dwa rodzaje: grube i cienkie. Klasyfikacja tarcz na grube i cienkie nie jest jednoznaczna i zależy m.in. od wybranej metody analitycznej. W przypadku promieniowania synchrotronowego klasyfikacja tarcz w dużym stopniu zależy od energii padającego promieniowania (dla wiązek monochromatycznych) oraz od składu pierwiastkowego badanego materiału, włączając w to skład matrycy [2]. Jak pokazano w pracy [3] dla metody PIXE łatwo wyróżnić wspomniane kategorie typów tarcz.

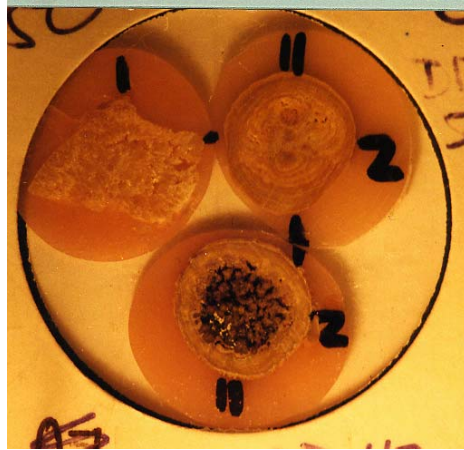
Doborowi procedury preparatyki tarcz pomiarowych poświęcono pracę [H7], w której zestawiono wyniki analiz metodami XRF, PIXE, TRXRF.

W celu obniżenia wartości MDL dla analiz typu „bulk”, próbka poddawana jest procesowi mineralizacji, który opisano w pracach [3, 4]. Ze zmineralizowanych próbek przygotowuje się zwykle tarcze cienkie do analiz z użyciem wiązki jonów czy promieniowania synchrotronowego. Należy jednak pamiętać, że proces mineralizacji powoduje całkowite zniszczenie struktury materiału badawczego.

Analiza składu pierwiastków zawartych w próbce wymaga uwzględnienia szeregu efektów [5] w tym efektu samoabsorbpcji charakterystycznego promieniowania X w materiale matrycy. Wpływ efektów matrycowych na analizę składu pierwiastkowego

przedstawiono w pracach [H1, H4, H5] w których opisano procedury kalkulacyjne i korekcyjne uwzględniające te efekty do obliczeń stężeń pierwiastków śladowych.

Natomiast chcąc analizować rozkład pierwiastków śladowych w różnych strukturach materiału badawczego, tarcze pomiarowe przygotowano w formie pastylek [H5] lub np. dysku wyciętego z próbki w przypadku złogów mineralnych. Rozcięty kamień nerkowy po wypolerowaniu powierzchni doskonale uwidacznia swoją strukturę wewnętrzną. Przykład próbek kamieni nerkowych przeznaczonych do analizy składu pierwiastkowego pokazany jest na rys. 1.



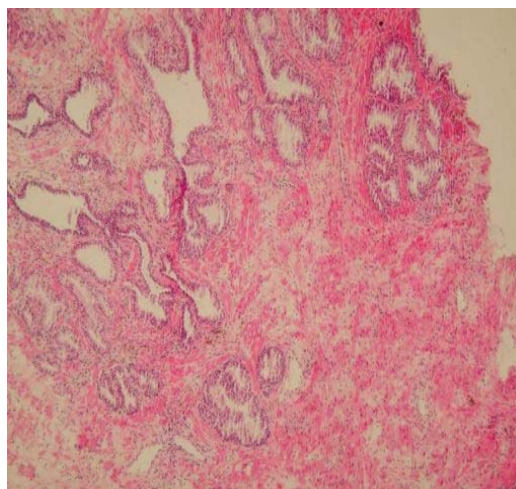
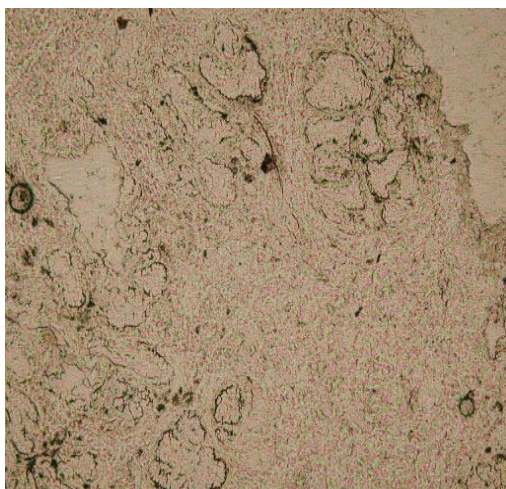
Rys. 1. Przykład próbek kamieni nerkowych przeznaczonych do analizy składu pierwiastkowego.

Widoczne różne fazy narastania złogu (zwłaszcza w tarczach oznaczonych lit. Z) związane są ze zmiennym środowiskiem (dieta pacjenta), w którym następuje jego wzrost.

Również, tarcze przygotowano ze skrawków ciętych w mikrotomie. W przypadku tkanek, skrawki pochodzą z tzw. „mrożaków” uzyskanych z wcześniej zamrożonych próbek bez dodawania płynów utrwalających [H2]. W zależności od czasu jaki upływa od zabiegu operacyjnego do przygotowania tarcz, próbki są zamrażane zwykle w ciekłym azocie na szybko odprowadzających ciepło metalowych podkładkach. Zaletą „szybkiego” mrożenia jest zachowanie struktury oraz zatrzymanie procesów kinetycznych zachodzących w tkankach co pozwala na analizę określonego, aktualnego stanu procesów zachodzących w komórkach. Jednakże skrawanie odbywa się zwykle w temperaturze ok. 253 K (– 20 °C). „Szybkie zamrażanie” jakim wydaje się być zamrażanie w ciekłym azocie ma też swoje ujemne strony z uwagi na występowanie zjawiska wytwarzania otoczki gazowej wokół preparatu tzw. efektu Leidenfrosta [6], co utrudnia – spowalnia – proces mrożenia oraz stwarza możliwość mechanicznego uszkodzenia tkanek powodując ich pękanie.

Grubość skrawków przeznaczonych do analiz składu pierwiastkowego zwykle zawiera się w przedziale od 10  $\mu\text{m}$  do 20  $\mu\text{m}$ . Skrawki nanoszone były na podkładki z folii Mylarowych<sup>TM</sup> o grubości 2,5  $\mu\text{m}$ , bądź na podkładki formvarowe (Formvar<sup>TM</sup> – poliwinyln formaliny). Formvar rozpuszcza się w chloroformie i w postaci ciekłego roztworu nanosi się go na powierzchnię wody aby po odparowaniu chloroformu cienką błonką nanieść na ramkę. Tarcze pomiarowe przygotowane w formie skrawków nie podlegają żadnej obróbce chemicznej ani mechanicznej. W takiej formie tkanki poddawane były naświetlaniom wiązką promieniowania synchrotronowego bądź mikrowiązką protonową. Natomiast po wykonaniu analiz tkanki zwykle były wybarwiane w celu identyfikacji analizowanych obszarów. Wybarwienie ich umożliwia dokonanie zobrazowania histologicznego struktur i komórek tkankowych.

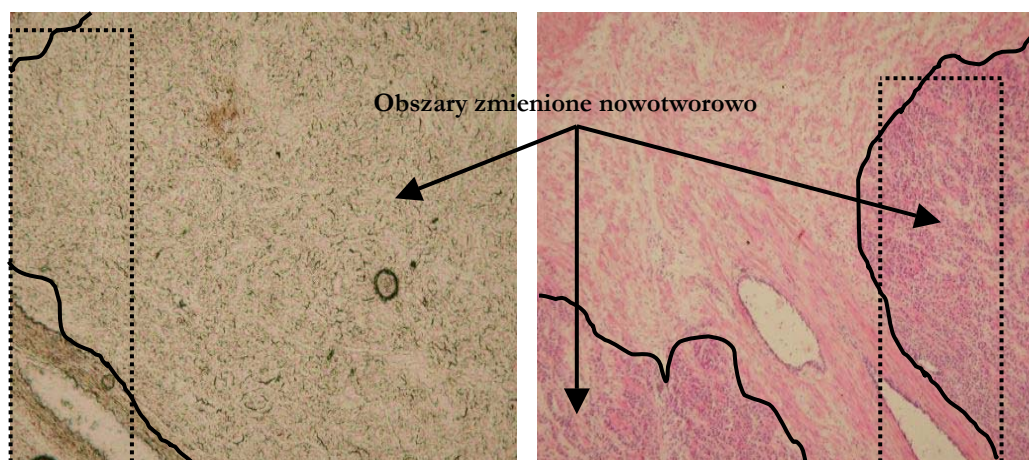
Proces wybarwienia preparatu polega na poddaniu skrawków obróbce chemicznej [7]. Skrawki umieszczone na szkiełku mikroskopowym bądź podkładce Mylarowej wkładane są do 4% roztworu formaliny na okres 5 min. Następnie przepłukiwane są wodą destylowaną i nakrapiane hematoksyliną. Po upływie 7 minut ponownie przepłukiwane są wodą destylowaną następnie zanurzane na 5 sekund w eozynie i znów przepłukiwane wodą destylowaną. Po przepłukaniu preparat podlega odwodnieniu poprzez zanurzenie go w 96% roztworze alkoholu etylowego na okres 1 minuty, a następnie w 100% alkoholu etylowym również na okres 1 minuty. Tak przygotowany preparat jest zanurzany na okres 4 minut w ksylenie, po czym zamykany syntetycznym DPcX - ENTELLAN [8] i nakrywany szkiełkiem nakrywkowym. Poniższy rysunek przedstawia przykładowe zdjęcia preparatów nie wybarwionych przeznaczonych do pomiaru i wybarwionych przed pomiarem sąsiednich skrawków tych preparatów. Wybarwione, sąsiadujące skrawki służyły do identyfikacji obszarów przeznaczonych do późniejszych analiz prowadzonych przy użyciu wiązki promieniowania synchrotronowego.



a)

b)

Rys. 2 a, b. Preparaty prostaty nie objętej guzem a) preparat przeznaczony do pomiaru, b) sąsiedni skrawek wybarwiony przed pomiarami SRIXE i XANES.



c)

d)

Rys. 2 c, d. Preparat prostaty objętej guzem a) preparat przeznaczony do pomiaru, b) sąsiedni skrawek wybarwiony przed pomiarem. Na zdjęciach c i d zaznaczono odpowiadające sobie obszary objęte kropkowanym prostokątem. Granice zmian nowotworowych w preparatach zaznaczone są liniami ciągłymi.

Przeprowadzenie analiz preparatów przedstawionych na rys. 2 a i c oraz późniejsza weryfikacja miejsc pomiarowych nie byłaby możliwa bez wcześniej przygotowanych i wybarwionych preparatów, prezentowanych na rys. 2 b i d, poddanych ocenie histopatologicznej.

## II. Charakterystyka metod badawczych

W światowej literaturze naukowej [9 – 17] oraz moich opracowaniach zawartych np. w pracach [H1, 2, 5, 18 – 23] poświęcono wiele miejsca charakterystyce metod badawczych wykorzystywanych do badań materiałów biomedycznych. Do metod tych można zaliczyć:

- 1) SRIXE - Synchrotron Radiation Induced X-ray Emission
- 2) TRXRF - Total Reflection X-Ray Fluorescence
- 3) PIXE - Proton Induced X-ray Emission
- 4) PIGE - Proton Induced Gamma-ray Emission
- 5) R(E)BS - Rutherford (Elastic) Backscattering
- 6) FTIR - Fourier Transform InfraRed

Dlatego też w tym rozdziale ograniczam się jedynie do krótkiego ich opisu, a bardziej szczegółowo omówię metodę XANES z uwagi na pewnego rodzaju *novum* jakim stała się ta metoda w badaniach biomedycznych.

Wspólną cechą fluorescencyjnych metod: **SRIXE**, **TRXRF** i **PIXE** jest możliwość dokonywania analiz składu pierwiastkowego opartych na analizie fluorescencyjnej, dla pierwiastków o liczbach atomowych  $Z \geq 12$ . Analiza fluorescencyjna polega na rejestracji charakterystycznego promieniowania X emitowanego z atomów na skutek ich wzbudzenia. W zależności od sposobu wzbudzenia atomu, mamy do czynienia z metodami:

- SRIXE – w tym przypadku wzbudzenia dokonuje promieniowanie synchrotronowe (synonimem nazwy tej metody jest SR-XRF - Synchrotron Radiation X-ray Fluorescence),

- TRXRF – wzbudzenie atomu następuje fotonami pochodzącymi z lampy rentgenowskiej lub promieniowaniem synchrotronowym skierowanym na tarczę pomiarową pod bardzo małym kątem w stosunku do powierzchni próbki,

oraz

- PIXE – emisja charakterystycznego promieniowania X następuje pod wpływem bombardowania atomu, cząstkami naładowanymi - zwykle protonami.

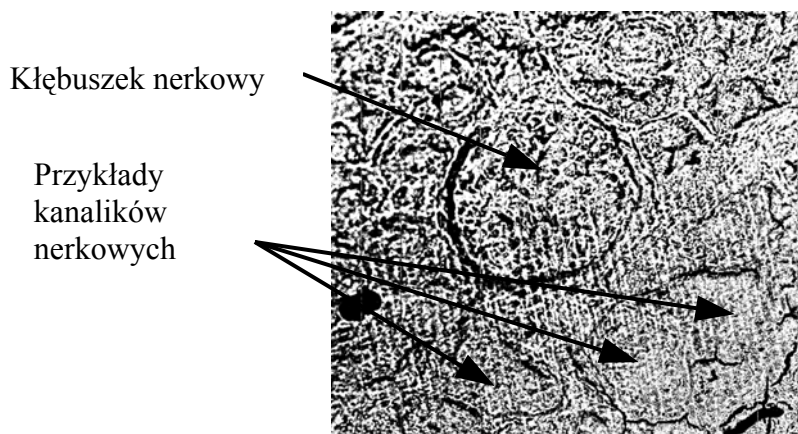
Wzbudzony atom dąży do osiągnięcia minimum energii przez niemal natychmiastowe (po czasie ok.  $10^{-15}$  s) zapelnianie pustych stanów elektronowych, powstałych wskutek jonizacji wewnętrznych powłok, przez elektrony znajdujące się w wyższych stanach energetycznych. Przy przejściu elektronów z wyższych stanów energetycznych towarzyszy im np. emisja kwantu X o energii równej różnicy energii wiązania na poszczególnych powłokach pomiędzy którymi zachodzi przejście. Każdy atom posiada ściśle określone poziomy energetyczne dostępne do obsadzenia przez

elektrony. Możliwe energie emitowanych kwantów X, zgodnie z regułami wyboru dla których:  $\Delta n \neq 0$ ,  $|\Delta l| = 1$ ,  $|\Delta j| = 0, 1$  (przejścia dipolowe), są dla tych atomów charakterystyczne. To widmo promieniowania charakterystycznego X stanowi podstawę analizy składu pierwiastkowego badanych materiałów. Istotnymi zaletami tych metod wyróżniającymi je z pośród innych metod analitycznych są:

- bardzo krótki czas analiz,
- nieniszczący charakter analizy (szczególnie metoda TRXRF),
- możliwość analiz w mikroobszarach (nie dotyczy metody TRXRF),
- możliwość analizy wielopierwiastkowej w dowolnej atmosferze,
- możliwość analizy przy pomocy wiązki białej lub monochromatycznej (dotyczy zastosowania promieniowania X),
- bardzo dobra wykrywalność, nawet poniżej 10 ppb (szczególnie metoda TRXRF).

Dodatkową zaletą metody TRXRF jest rejestracja niemal beztłowego widma promieniowania charakterystycznego X z uwagi na jego rejestrację detektorem ustawionym prostopadle do płaszczyzny próbki (kierunku padania wiązki).

Przeprowadzając eksperymenty z wiązką promieniowania synchrotronowego należy pamiętać, że skolimowana wiązka promieniowania synchrotronowego niesie ze sobą dużą porcję energii, której depozycja nawet przez krótki czas w tarczy pomiarowej może spowodować jej uszkodzenia. Uszkodzenia takie udało się zaobserwować prowadząc analizy cienkich skrawków tkanek położonych na podkładkach mylarowych. Przykład widocznych zmian obrazu tkanki spowodowanych wiązką przedstawiono na poniższym rysunku zaczerpniętym z pracy [H6].



Rys. 3. Tkanka nerki prawidłowej (nie zmienionej nowotworowo). Widoczny kłębuszek nerkowy wraz z kanalikami proksymalnymi i dystalnymi. W dolnej części zdjęcia widoczne są ukośne linie będące śladem pozostawionym przez skolimowaną wiązkę białą promieniowania synchrotronowego.

Naświetlając próbkę jonami (w przypadku tej pracy protonami), oprócz zjawiska fluorescencji możemy obserwować emisję promieniowania gamma i wtedy mówimy



o metodzie **PIGE**, bądź rejestrować widmo wstecznie rozproszonych jonów i wtedy mamy do czynienia z metodą R(E)BS.

Rejestrowane promieniowanie gamma jest skutkiem oddziaływania elektromagnetycznego wiązki protonów z jądrami atomów tarczy pomiarowej powodując wzbudzenie tych jąder – wzbudzenie kulombowskie. Przejściu jądra do stanu podstawowego towarzyszy emisja promieniowania gamma co można zapisać  $(p, p'\gamma)$ . Jądra atomów mogą ulec wzbudzeniu również poprzez reakcje jądrowe – reakcje rezonansowe typu:  $(p, \gamma)$ ,  $(p, \alpha\gamma)$  oraz  $(p, n\gamma)$ .

Główną zaletą metody PIGE jest jej komplementarność do metody PIXE i możliwość prowadzenia jednoczesnych analiz. Próbka nie wymaga dodatkowej obróbki podobnie jak i tarcza pomiarowa. Metoda służy do oznaczania stężeń lekkich pierwiastków, głównie Li, F, Na, Mg i Al. Jednakże w tej pracy metoda ta nie była stosowana.

Metoda **R(E)BS** stosowana jest do badań składu pierwiastkowego ciał stałych, układów wielowarstwowych, stopów, materiałów geologicznych i substancji organicznych. Bombardujący tarczę proton czy cząstka alfa wnikając do badanej próbki oddziałuje z elektronami stopniowo tracąc energię i ulega elastycznemu rozproszeniu na jądrze pierwiastka. Dzięki znajomości kinematycznego współczynnika rozpraszania i przekrojów czynnych na rozpraszanie można z widma energetycznego wstecznie rozproszonych cząstek wyznaczyć masę rozpraszającego jądra a tym samym pierwiastek wchodzący w skład badanej próbki oraz rozkład głębokościowy stężenia atomów. Z uwagi na czułość tej metody (wykrywalne minimalne stężenia pierwiastków są na poziomie 1 %), metoda ta stosowana była w tej pracy do określenia składu matrycy materiału organicznego poprzez określenie stężeń głównie: wodoru, węgla, azotu i tlenu. Podobnie jak PIGE metoda R(E)BS jest komplementarną do metody PIXE i może być wraz z nią stosowana podczas tego samego naświetlania tarczy pomiarowej. Tak więc, podobnie jak w przypadku metody PIGE, ani próbka ani tarcza nie wymaga dodatkowej obróbki i przygotowania. Przykładowe widma R(E)BS zamieszczono w pracach [**H1**, **H4**, **H5**].

Omawiane dotychczas metody pozwalały na określenie składu pierwiastkowego badanej próbki nie mówiąc nic o wzajemnych wiązaniach atomów poszczególnych pierwiastków, czyli związkach w jakich występują. Informacje o strukturach molekularnych dostarcza metoda spektroskopii w podczerwieni. Szczególną jej odmianą jest metoda **FTIR** pozwalająca na prowadzenie pomiarów w powietrzu.

Metoda spektroskopii w podczerwieni polega na rejestracji promieniowania elektromagnetycznego z zakresu podczerwieni (podczerwień bliska mieści się w

zakresie 0,75  $\mu\text{m}$  – 2,5  $\mu\text{m}$ ; średnia 2,5  $\mu\text{m}$  – 50  $\mu\text{m}$ ; daleka 50  $\mu\text{m}$  – 1000  $\mu\text{m}$ ) emitowanego lub zaabsorbowanego przez cząsteczkę na skutek przejść między stanami rotacyjnymi lub oscylacyjno-rotacyjnymi cząsteczki. Poszczególne molekuly, a tym samym poszczególne wiązania atomów, opisane są ściśle określonymi częstościami drgań charakterystycznych. W ten sposób można, dzięki analizie widma promieniowania podczerwonego, określić skład chemiczny badanych próbek poprzez analizę pasm charakterystycznych dla drgań występujących w cząsteczkach. Dodatkowo można wyznaczyć stężenia obserwowanych cząsteczek poprzez analizę natężenia odpowiednich pasm. Przykładowe widma z analiz FTIR zamieszczono w pracach [H1, H4, H5].

Metoda **XANES - X-ray Absorption Near-Edge Structure** stosowana jest od wielu lat na wiązkach promieniowania synchrotronowego zarówno w układzie pomiarowym transmisyjnym jak też fluorescencyjnym [24, 25]. Z uwagi na prowadzenie analiz składu pierwiastkowego tkanek metodą SRIXE, dla celów tej pracy, wykorzystywano ten sam układ pomiarowy do analiz XANES. W tym przypadku zmieniany był jedynie zakres energetyczny padających fotonów w celu uzyskania widm obrazujących strukturę progu absorpcji.

Struktura progu absorpcji opisana jest funkcją zależności współczynnika absorpcji od energii padającego promieniowania rentgenowskiego  $\mu(E)$ , wyrażonego przez tzw. złotą regułę Fermiego:

$$\mu(E) = |M_{fi}|^2 \rho(E)$$

gdzie:

$M_{fi} = \langle \Psi_f | e^{i \mathbf{k} \cdot \mathbf{r}} | \Psi_i \rangle$  jest elementem macierzowym przejścia elektronu z głębokiego stanu rdzeniowego do niezajętego stanu pasma przewodnictwa,  $\rho(E)$  jest funkcją gęstości stanów energetycznych pasma przewodnictwa.

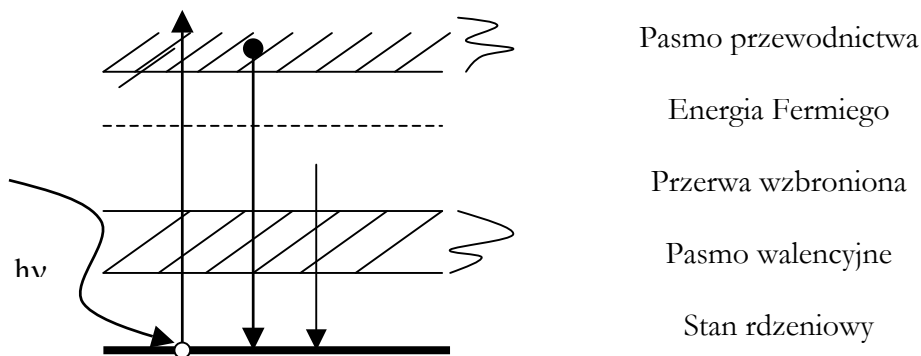
Przejściom elektronu towarzyszą reguły wyboru określone dla elektrycznych dipolowych przejść elektronowych poprzez  $|\Delta l| = 1$ ,  $|\Delta j| = 0, 1$ .

Współczynnik absorpcji zależy od energii padającego promieniowania rentgenowskiego i w tak zwanym obszarze Kossela jego wartość raptownie wzrasta wraz ze wzrostem energii tego promieniowania tworząc ostrą krawędź absorpcji rentgenowskiej. Powstanie tej krawędzi jest wynikiem rezonansowego wzbudzenia elektronów rdzeniowych do niskich stanów pasma przewodnictwa, natomiast obserwowana struktura tuż powyżej krawędzi absorpcji (przyjmuje się, że obszar Kossela sięga około 50 eV powyżej progu absorpcji) odzwierciedla rozkład gęstości

stanów energetycznych pasma przewodnictwa,  $\rho(E)$  tzw. rzutowanych gęstości stanów pasma przewodnictwa.

Funkcja opisująca zależność współczynnika absorpcji od energii promieniowania rentgenowskiego odzwierciedlona może być poprzez pomiar natężenia fluorescencyjnej linii emisyjnej (charakterystycznego promieniowania X) badanego materiału w zależności od energii monochromatycznego promieniowania rentgenowskiego [25].

W tej pracy analizy XANES przeprowadzano w oparciu o krawędź K. Energia padającego kwantu promieniowania synchrotronowego absorbowana jest przez elektron z powłoki K, co umożliwia mu przejście w wyższy stan energetyczny. Jak wiadomo, atom nie pozostaje w tym stanie energetycznym zbyt długo i zwykle po czasie ok.  $10^{-15}$  s następuje reemisja i zapelnienie powłoki K [2]. Zmieniając energię padającego promieniowania X powodujemy wybite elektronów z powłoki K i nadanie im określonej energii pozwalając zająć odpowiednie stany energetyczne w paśmie przewodnictwa (odpowiada to przejściu elektronu ze stanu  $1s^2$  do stanów typu p w paśmie przewodnictwa). Stąd też, możliwym jest odzwierciedlenie struktury stanów związanych w strukturze pasm energetycznych atomu czy molekuly.



Rys. 4. Schemat wzbudzenia atomu i reemisji do stanów rdzeniowych atomu.

Położenie krawędzi absorpcji w widmie XANES zależne jest od stopnia utlenienia badanego atomu oraz struktury krystalicznej. Przesunięcie krawędzi w stronę wyższych energii związane jest ze zmianą (wzrostem) energii wiązania elektronu  $1s$  na skutek przesunięcia ładunku od badanego atomu w stronę tworzących molekulę innych atomów co w materiale biologicznym (widma XANES dla Fe w oksy- i deoxy-hemoglobinie) zaobserwowano już w 1977 roku [24]. W

widmach XANES, często obserwuje się występowanie piku przed-krawędziowego. Pojawienie się tego piku tłumaczy się istnieniem stanu energetycznego elektronów 3d w paśmie wzbronionym [26].

### III. Rola pierwiastków śladowych w organizmie człowieka z uwzględnieniem różnych stopni ich utlenienia.

Pierwiastki śladowe odgrywają ważną rolę w organizmie człowieka, uczestnicząc w wielu jego funkcjach życiowych i procesach metabolicznych. Są składnikami enzymów [27], odgrywają rolę inhibitorów bądź promotorów procesów życiowych [28]. Określony, tzw. poziom fizjologiczny stężenia pierwiastków w różnych tkankach człowieka nie jest ściśle określony, zmienia się od człowieka do człowieka. Można jedynie podać przybliżone wartości stężeń, określone na podstawie analiz przeprowadzonych na dużej populacji. Wyniki takich analiz zamieszczone są m.in. w pracy [29], gdzie można znaleźć wartości średnie stężeń, bądź przedziały minimalnych i maksymalnych wartości określonych dla danego pierwiastka.

Odstępstwa od średnich poziomów stężeń pierwiastków uznanych za poziomy fizjologiczny mogą świadczyć o stanach chorobowych badanego pacjenta. Oczywiście niedobór bądź nadmiar jakiegoś pierwiastka nie może być jedyną przesłanką pozwalającą na stwierdzenie stanu chorobowego. Nie mniej jednak, w wielu przypadkach może stanowić poważną wskazówkę i być sygnałem ostrzegawczym we wczesnym diagnozowaniu.

Z uwagi na występowanie chorób nowotworowych dla wyjaśnienia ewentualnego działania karcinogennego pierwiastków śladowych u ludzi Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem [30] w 1993 roku zestawiała dane z badań epidemiologicznych i doświadczeń na zwierzętach, które zawierają klasyfikację pierwiastków ze względu na ich działania karcinogenne, niektóre z nich zestawione są w poniższej tabeli.

Tab. 2 Klasyfikacja dokonana przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem ze względu na działanie karcinogenne niektórych pierwiastków [30]:

- 1 - Pierwiastek /związek karcinogeny dla ludzi
- 2A - Pierwiastek/związek prawdopodobnie karcinogeny dla ludzi
- 2B - Pierwiastek/związek, który może być także karcinogeny dla ludzi
- 3 - Pierwiastek/związek nie klasyfikowany obecnie jako karcinogeny dla ludzi

Pierwiastek śladowy	Związek chemiczny	Klasyfikacja
Cr	Związki chromu 6+	1
	Związki chromu 3+	3
	Chrom metaliczny	3
Co	Kobalt i związki kobaltu	2B
Fe	Tlenki żelaza	3

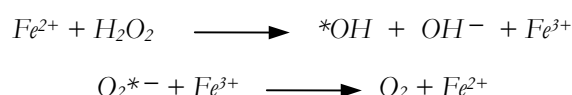
Pb	Nieorganiczne związki ołowiu	2B
	Organiczne związki ołowiu	3
Hg	Metylowe pochodne rtęci	2B
	Rtęć metaliczna	3
	Nieorganiczne związki rtęci	3
Ni	Związki niklu	1
	Nikiel metaliczny	2B
Se	Selen i jego związki	3
Ti	Tlenki tytanu	3

Szczególnie intrygującym jest nie całkiem zrozumiała rola pierwiastków śladowych. Związki zawierające w swoich centrach aktywnych metale – metalotioniny – znalazły zastosowanie w chemioterapii nowotworów [31]. Istotnym lekiem jest *cis-Platyna* (*cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]). Związki te hamują wzrost i proliferację komórek nowotworowych *in vitro* oraz *in vivo*. Właściwości takie przejawiają też kompleksy metali głównych grup układu okresowego, np. galu, germanu, cyny, a także wielu metali przejściowych, np. tytanu, wanadu, żelaza, kobaltu i miedzi. Związki te działają przede wszystkim jako cytostatyki [32]. Dodatkowo wspomagają układ odpornościowy organizmu. Wiele pierwiastków śladowych ma istotne znaczenie w regulacji metabolizmu komórkowego w układach naturalnych, będąc centrami aktywnymi wielu enzymów lub białek biorących czynny udział w procesach przenoszenia jonów, elektronów lub energii, np. żelazo, mangan, cynk, selen, miedź [33, 34, 35]. Jednocześnie zwiększona ich koncentracja w organizmie jak i zmiana ich stopnia utlenienia powoduje, że mogą wspomagać rozwój nowotworów lub wręcz być bezpośrednią przyczyną nowotworzenia komórek. Na przykład takie działanie karcinogenne wykazują niektóre związki: tytanu, wanadu, chromu, manganu, żelaza i kadmu.

Chrom jest niezbędny dla normalnego rozwoju organizmu człowieka i organizmów zwierzęcych. Chociaż występuje w tkankach w wyjątkowo małych ilościach, odgrywa ważną rolę [36]. Między innymi reguluje poziom cukru we krwi poprzez stymulację działania insuliny oraz zwiększa tolerancję na glukozę, obniża poziom cholesterolu i trójglicerydów w naczyniach krwionośnych, stymuluje przemiany energetyczne i syntezę kwasów tłuszczowych, pobudza transport aminokwasów do komórek. Chrom występuje głównie na trzech stopniach utlenienia (0, +3, +6). Okazało się jednak, że związki chromu Cr<sup>+6</sup> wykazują działania karcinogenne [30].

Żelazo jest dość specyficznym pierwiastkiem śladowym z uwagi na funkcje jakie pełni w organizmie człowieka [32]. Bierze on udział w wielu procesach metabolicznych, syntezie DNA, łańcuchu oddechowym oraz procesach, które

prowadzą do uszkodzeń komórek na skutek stresu oksydacyjnego [37]. Fizjologiczna rola żelaza w przyłączaniu tlenu przez hemoglobinę (przenoszenie tlenu przez krew) jak i udział jego w licznych procesach redokswych warunkujących czynność katalityczną ważnych enzymów jest dobrze poznana. Jednakże, można go uznać nie tylko za pierwiastek niezbędny dla organizmu w celu zabezpieczenia jego funkcji życiowych ale także jako pierwiastek toksyczny [38]. Toksyczne właściwości żelaza ujawniają się w jego funkcji jako katalizatora reakcji Fentona [39].



Jony metali mogą występować na różnych stopniach utlenienia co warunkuje ich udział w reakcjach wolnorodnikowych.

Reakcja Fentona opisuje powstawanie wolnych rodników  $*OH$ ,  $O_2^{*-}$  (atomów lub cząsteczek mających jeden lub więcej niesparowanych elektronów). Wolne rodniki [57], będące reaktywne chemicznie, powodują utlenianie układów białkowo lipidowych (głównie LDL – low density lipoproteins), których formy utlenione są silnie cytotoksyczne. Szczególnie aktywny jest w tych procesach rodnik hydroksylowy, który poza innymi efektami toksycznymi wywołuje pęknięcie nici DNA [32].

Szybkość reakcji Fentona zależy od dostępności jonów żelaza. Jak potwierdzają dotychczasowe obserwacje wzrost guzów nowotworowych jest szybszy w środowisku bogatym w ten pierwiastek. Podobna reakcja może zachodzić także przy udziale chromu.

Badania wskazują, że istnieje antagonizm w fizjologicznym działaniu kadmu i cynku [40]. Stwierdzono natomiast współdziałanie między kadmem, żelazem oraz miedzią [41]. Zatrucia kadmem powodują zniekształcenie kości, zaburzenie wzrostu, niepłodność oraz nowotwory [42]. Kadm zaburza czynności gruczołu krokowego u mężczyzn, gromadzi się w nerkach, zaburzając ich czynność hormonalną i wydalniczą, wypiera cynk ze ścian tętnic przez co zmniejsza ich elastyczność i przyspiesza rozwój miażdżycy oraz prowadzi do nadciśnienia. Kadm może być także katalizatorem reakcji Fentona.

Bardzo ważnym czynnikiem w powstawaniu nowotworów jest angiogeneza (proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych) [43]. Zjawisko to zachodzące powszechnie w warunkach fizjologicznych (szczególnie intensywnie w czasie rozwoju embrionalnego), staje się ważnym czynnikiem w patogenezie wielu chorób.

W chorobach nowotworowych proces angiogenezy stwarza odpowiednie warunki dla rozwoju, wzrostu i przerzutów guza. Powstawanie nowych naczyń krwionośnych jest uzależnione od wielu czynników. Miedź jest jednym z czynników nieorganicznych regulującym białka, które są znane jako czynniki wzrostu stymulujące angiogenezę. Według ostatnich badań stężenie miedzi w obszarach nowotworowych jest o wiele wyższe niż w nienowotworowych. Z drugiej jednak strony wiadomo, że miedź i cynk są centrami aktywnymi dysmutazy nadtlenowej [44], Cu, Zn – SOD, (obecne są też dysmutazy typu Mn-SOD, Fe-SOD), która pełni rolę ochronną przed utleniającym działaniem wolnych rodników. Podobne funkcje antyoksydacyjne, chroniące komórki przed zgubnym działaniem wolnych rodników pełni selen [45, 46]. Jednocześnie jest on zaliczany do inhibitorów angiogenezy [47].

Inne pierwiastki śladowe nie zmieniają stopnia utlenienia, a zastępując jednocześnie w reakcjach żelazo chronią komórkę przed nadmiernym stresem oksydacyjnym. Do najbardziej znanych pierwiastków tej grupy należy cynk [48] oraz selen [49].



#### IV. Wybrane schorzenia układu moczowego.

Układ moczowy jest miejscem częstych zmian chorobowych. Do najczęściej spotykanych schorzeń tego układu zaliczana jest kamica nerkowa [50] oraz zmiany nowotworowe nerki [51] i prostaty [52] (w przypadku mężczyzn).

Etiopatogeneza kamicy nerkowej nie jest w pełni zjawiskiem dobrze poznanym. Przypuszcza się, że dieta jak i uwarunkowania genetyczne mają istotny wpływ na powstanie procesu odkładania się złożeń mineralnych w nerkach [53] i dalszych drogach moczowych [54, 55]. Uważa się, że kamica może być jedną z przyczyn powstawania nowotworów nerki [56].

Z pośród wielu przyczyn powstawania chorób nowotworowych wymienia się nadmierną produkcję wolnych rodników w organizmie człowieka [57]. Wolny rodnik – atom (cząsteczka) zdolny do samodzielnego istnienia mający jeden lub więcej niesparowanych elektronów na orbicie walencyjnej. Wolne rodniki dążą do sparowania elektronu poprzez przyłączenie elektronu od innego atomu (cząsteczki) lub poprzez oddanie tego elektronu. Proces powstawania wolnych rodników zachodzi w organizmie człowieka w naturalny sposób oraz na skutek wielu czynników zewnętrznych (np. zanieczyszczenie środowiska, dym papierosowy, promieniowanie jonizujące). W organizmie (w komórkach) w naturalny sposób powstaje anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{*-}$ ) na skutek niepełnej redukcji tlenu biorącego udział w procesach energetycznych. Jednoelektronowa redukcja niektórych cząsteczek tlenu prowadzi właśnie do powstania tego wolnego rodnika. Powstające wolne rodniki w organizmie człowieka powodują m.in. utlenienie hemoglobiny, uszkodzenia nici DNA, uszkodzenia chromosomów, zaburzenia cytoszkieletu, powstawanie mutacji komórkowych, a w efekcie może prowadzić do transformacji nowotworowej [58]. Do najbardziej aktywnych wolnych rodników zaliczany jest rodnik wodorotlenowy ( $OH^*$ ) powstający na skutek rozpadu cząsteczki wody pod wpływem dostarczenia jej energii np. w postaci kwantu promieniowania słonecznego. W reakcji tej powstaje również rodnik wodorowy ( $H^*$ ) [32].

Prawidłowo funkcjonujący organizm broni się przed nadmiernym powstawaniem wolnych rodników produkując enzymy tzw. „zmiatacze wolnych rodników”, do których zalicza się m. in. dymutazę ponadtlenkową (SOD) [32], która rozkłada anionorodnik ponadtlenkowy, katalazę (CAT), będącą żelazoporfiryną oraz peroksydazę glutationową. Dodatkowo, zmiataczem wolnych rodników jest trójpeptyd o nazwie glutation (gamma Glu-Cys-Gly) [59] oraz kwas askorbinowy (witamina C) [60]. Jednakże, nie zawsze zmiatacze wolnych rodników usuwają ich

nadmiar, co prowadzi do zaburzeń, czego konsekwencją może być choroba nowotworowa.

Do najczęściej spotykanych nowotworów nerki zaliczany jest rak jasnokomórkowy (*carcinoma claro cellulare*) [61] oraz guz będący tłuszczakomięśniakiem naczyniowym (*angiomyolipoma*) [62].

U mężczyzn, zwłaszcza w wieku powyżej 40 roku życia, obserwuje się powiększenie gruczołu krokowego - prostaty. Zachodzące zmiany w komórkach często są początkiem choroby nowotworowej [63].

Rozwój choroby nowotworowej jest zwykle procesem długotrwałym i początkowo niezauważalnym przez pacjenta. Dopiero w późniejszych etapach swego rozwoju guz zaczyna być wykrywalny i u pacjenta stwierdza się objawy kliniczne. W przypadku raka prostaty stosuje się m. in system klasyfikacji TNM [64] w celu określenia stopnia rozwoju nowotworu, gdzie T – (*tumor*) guz, N – (*lymph nodes*) węzły chłonne, M – (*metastases*) przerzuty odległe. Do każdego stopnia od T1 do T4 przypisano podgrupy. Poniższa tabela obrazuje stopnie i podgrupy systemu.

Tab. 1. Stopnie rozwoju raka prostaty w systemie TNM.

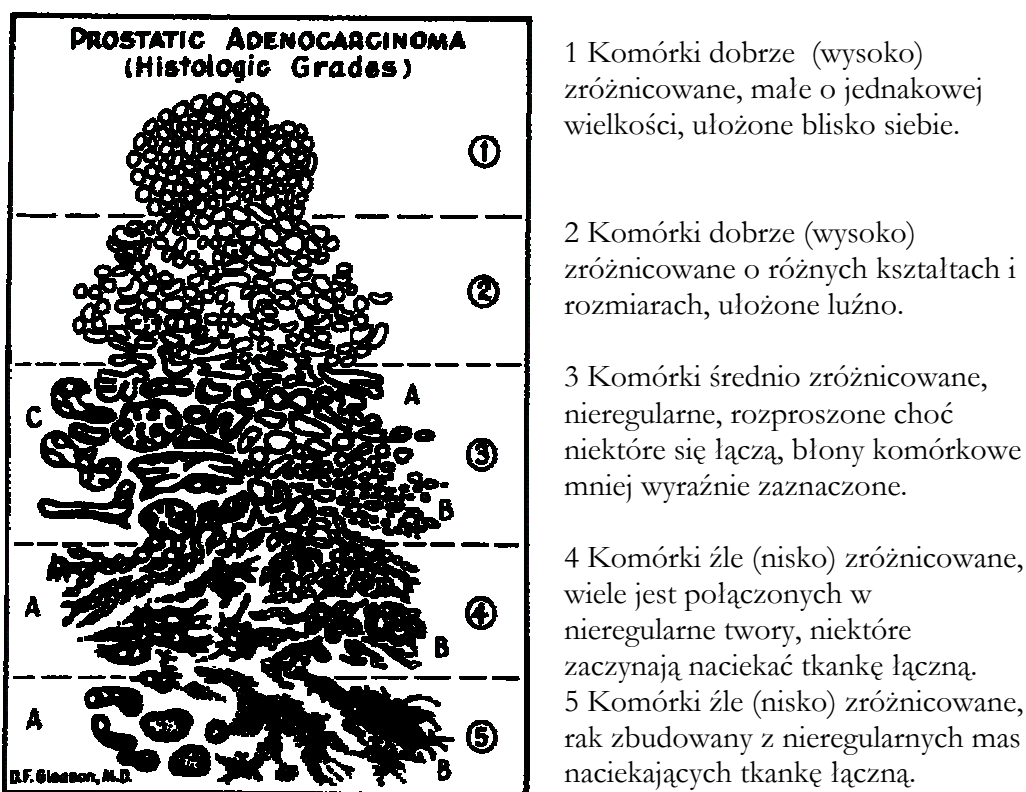
Stopień	Opis	Podgrupa	Opis
T1	guz mikroskopowy ograniczony do prostaty, nie wyczuwalny palpacyjnie	T1a	Guz znaleziony z tkankach prostaty usuniętych z przyczyn innych niż nowotwór; zajmuje mniej niż 5% usuniętej tkanki
		T1b	Guz znaleziony z tkankach prostaty usuniętych z przyczyn innych niż nowotwór; zajmuje więcej niż 5% usuniętej tkanki
		T1c	Nowotwór w materiale z biopsji wykonanej z powodu podwyższonego poziomu PSA lub nieprawidłowego obrazu USG
T2	guz wyczuwalny palpacyjnie ograniczony do prostaty	T2a	Guz zajmujący mniej niż połowę jednego płata gruczołu
		T2b	Guz zajmujący więcej niż połowę jednego płata gruczołu
		T2c	Guz zajmujący oba płaty gruczołu
T3	guz przechodzący poza torebkę gruczołu krokowego	T3a	Guz przechodzący poza prostatę
		T3b	Guz atakujący pęcherzyki nasienne
T4	Guz naciekający sąsiednie narządy		

Pacjent poddawany jest badaniu krwi polegającym na określeniu poziomu stężenia *specyficznego antygenu prostaty* (PSA) [65]. Poziom stężenia PSA i jego zmiany (wzrost) jest zwykle jednym z pierwszych sygnałów podejrzenia o chorobę

nowotworową prostaty. Przyjmuje się, że fizjologiczny poziom tego antygenu waha się z wiekiem mężczyzny i wynosi [66]:

Wiek	Stężenie PSA ng/ml
40 – 49	0 – 2,5
50 – 59	0 – 3,5
60 – 69	0 – 4,9
70 – 79	0 – 5,8

Każdy preparat pochodzący z usuniętego na skutek zabiegu operacyjnego gruczołu poddawany jest ocenie histopatologicznej. Tkance przypisuje się stopień Gleason'a [67] w skali od 2 do 10 będący sumą wartości liczbowych w skali od 1 do 5 przypisanych dwóm obszarom guza. Każdy płat poddawany jest ocenie i w zależności od wielkości, kształtu i ułożenia komórek raka gruczołu klasyfikuje się jego złośliwość. Poniższy rysunek obrazuje skalę Gleason'a.



Rys. 5. Schemat zaczerpnięty z pracy [68]

## V. Wyniki badań.

Metody (PIXE, oraz SRIXE) zastosowane były do badań składu pierwiastkowego różnych struktur kamieni nerkowych [H1, H4, H5]. Badane kamienie nerkowe zaliczane były do różnych grup ze względu na skład chemiczny określany przy zastosowaniu techniki FTIR. W zasadzie, można było wyróżnić trzy podstawowe grupy: szczawianową, fosforanową oraz kwasu moczowego. Kamienie rzadko składały się tylko z jednego typu związku, często obserwowano mieszaniny. Do najczęściej występujących związków zaliczyć można było: szczawian wapnia jedno- i dwu-wodny ( $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), fosforan wapnia ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ), fosforan amonowo-magnezowy sześciowodny ( $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), kwas moczowy  $\text{C}_5\text{N}_4\text{O}_3\text{H}_4$ , oraz dowolne mieszaniny wymienionych związków.

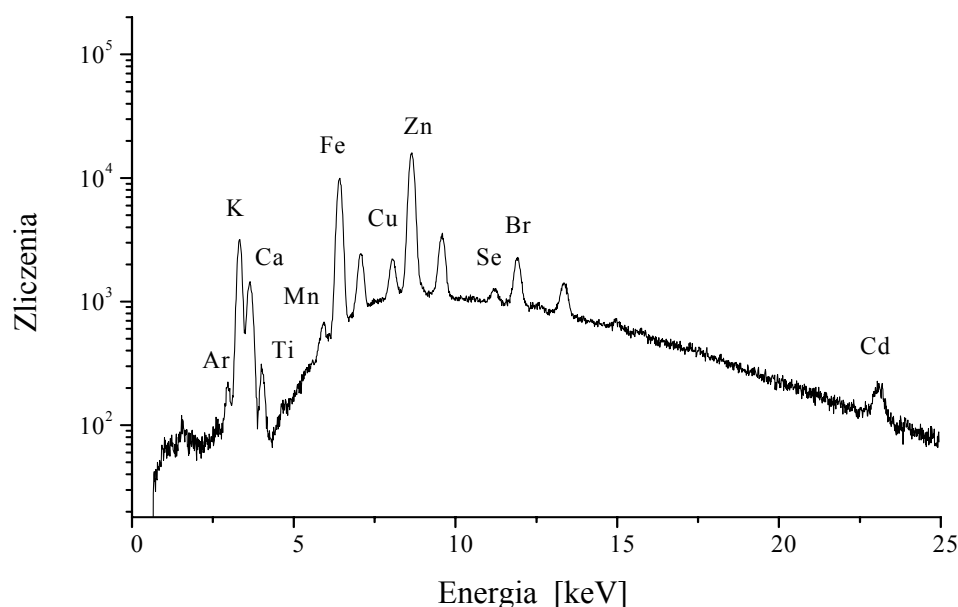
W zależności od składu chemicznego kamienia, zawierał on różny skład pierwiastków śladowych występujących w różnych stężeniach. Do najczęściej występujących pierwiastków można było zaliczyć: Fe, Cu, Zn, Br i Sr. W celu określenia metodą PIXE, poziomu stężenia tych pierwiastków należało określić skład matrycy badanych próbek. W tym celu zastosowano metodę R(E)BS, która pozwoliła na określenie stechiometrii występujących związków w badanych próbkach, przyczyniając się tym samym do umożliwienia uwzględnienia efektów matrycowych w obliczeniach stężeń analizowanych pierwiastków śladowych. Analiza grubych tarcz pomiarowych, do jakich zaliczono próbki kamieni nerkowych, oparta była o technikę standardu zewnętrznego. Z uwagi na duże podobieństwo składu pierwiastkowego matrycy kamieni nerkowych do składu matrycy kości (dotyczy to kamieni zawierających wapń w postaci szczawianów, a zwłaszcza fosforanów), do określenia ilościowego stężeń pierwiastków śladowych posłużono się standardem IAEA H-5 (animal bone).

Jak pokazano w pracy [H1] długie naświetlanie tarcz pomiarowych prowadzi w miejscu naświetlania do zmian struktury wynikających z powstawania defektów i uszkodzeń, co ma istotny wpływ na oznaczenie stężenia pierwiastków śladowych. Symulację efektu depozycji energii w grubej tarczy pomiarowej przeprowadzono poprzez wygrzewanie tarcz pomiarowych. W tym celu dla lepszej kontroli zachodzącego procesu posłużono się standardami IAEA H-5 [H1] oraz IAEA H-8 (horse kidney) i IAEA A-13 (animal blood) [H4]. We wszystkich przypadkach zaobserwowano istotne zmiany matrycy analizowanych standardów co pociągało za sobą zmiany stężeń zawartych w standardach pierwiastków śladowych. Zastosowanie opracowanej procedury i wykorzystanie metod FTIR, PIXE, oraz R(E)BS pokazano na przykładzie próbek kamieni nerkowych w pracach [H5] i [20].

Bazując na wynikach prac [H1] i [H4] z łatwością można było też zastosować tam opracowane procedury oraz metody analityczne FTIR, PIXE, AAS do analiz składu pierwiastkowego kamieni żółciowych [21]. Kamienie żółciowe składają się głównie ze związków organicznych jakimi jest cholesterol czy bilirubina. Analiza grubych tarcz pomiarowych tych próbek, ze względu na ich organiczny skład, wymaga szczególnej ostrożności z uwagi na łatwość zmian matrycy tarczy pomiarowej podczas naświetlania jej wiązką protonów. Dlatego też opracowano procedurę korekty efektu matrycowego.

Analizom składu pierwiastkowego poddawane były nie tylko tarcze grube ale także i cienkie za jakie można uważać cienkie skrawki (10 – 20  $\mu\text{m}$ ) tkanek nerek czy prostaty.

Poniższy rysunek przedstawia przykładowe widmo SRIXE otrzymane z tkanki nowotworowej nerki.



Rys. 6. Przykładowe widmo SRIXE tkanki nowotworowej. Czas akwizycji widma wyniósł 180 s, wiązką białą o rozmiarach 100  $\mu\text{m}$  x 100  $\mu\text{m}$  [H8].

W zależności od pacjenta stężenie pierwiastków śladowych zarejestrowanych w badanych próbkach nerek zmieniało się co do swej wartości. Jednakże tendencja i relacje zachodzące pomiędzy stężeniami tych samych pierwiastków występujących w tkankach nerek nie objętych nowotworem a tkankach objętych nowotworem, pozostawała niezmienna. Poniższa tabela przedstawia przykładowe średnie stężenia niektórych pierwiastków, dla których zaobserwowano istotne różnice w zależności od badanej tkanki.

Tabela 3. Wyniki składu pierwiastkowego w tkance nerki i wartości średnie stężeń tych pierwiastków obliczone z grupy 34 przebadanych pacjentów [H8].

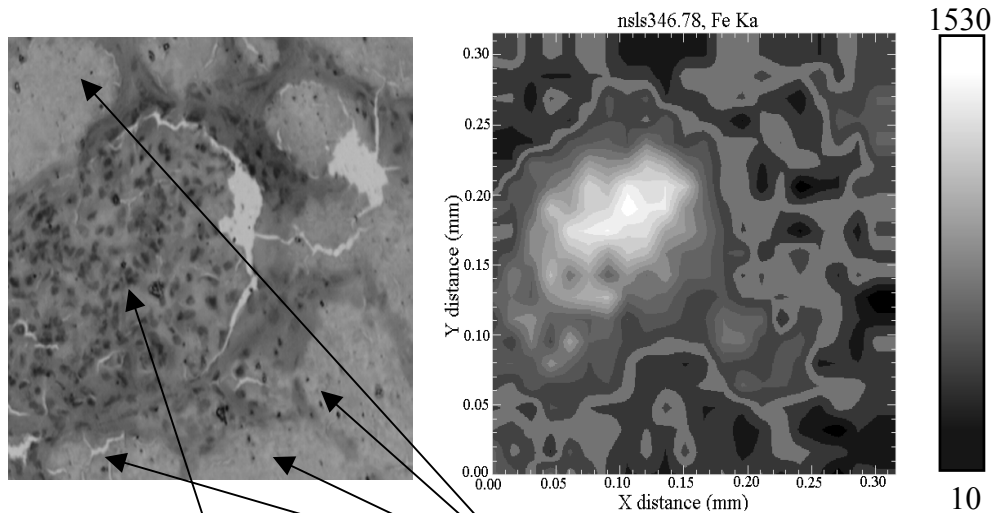
Pierwiastek	Tkanka nowotworowa [µg/g]	Tkanka nienowotworowa [µg/g]
V	3,0 ± 0,7	9,8 ± 6,3
Cr	0,7 ± 0,1	2,6 ± 0,7
Mn	3,7 ± 0,5	3,0 ± 0,4
<b>Fe</b>	<b>440 ± 64</b>	<b>198 ± 59</b>
Cu	5,4 ± 0,6	10,0 ± 1,8
<b>Zn</b>	<b>53 ± 4</b>	<b>184 ± 34</b>
Se	1,2 ± 0,5	1,6 ± 0,4
<b>Cd</b>	<b>15,6 ± 0,9</b>	<b>181 ± 44</b>

Przeprowadzone analizy wskazują (jak widać w powyższej tabeli) na znaczne różnice w stężeniach żelaza, którego w tkance nowotworowej jest dwukrotnie więcej niż w tkance nie objętej nowotworem. Przeciwną relację obserwuje się dla wanadu, chromu, cynku i kadmu. W składzie pierwiastkowym tkanki zdrowej i nowotworowej nie obserwowano żadnych różnic. Należy zauważyć, że niektóre badania wskazywały na istotne różnice stężeń dla miedzi, której stężenie w tkankach nowotworowych było kilkakrotnie wyższe niż w tkankach nie objętych nowotworem.

Dodatkowymi analizami tkanek były analizy biochemiczne [H3] mające na celu określenie stężeń: zredukowanego glutationu (GSH) i utlenowanego glutationu (GSSG), witaminy C (kwasu l-askorbinowego), oraz dialdehydu malonowego. Określenie stężenia GSH i GSSG wykonane było zgodnie z procedurą opisaną przez Hissina i Hilfa [69], stężenia witaminy C wykonano metodą Goneta [70], natomiast dialdehydu malonowego (MDA) metodą Uchiyama i Michara [71]. Zredukowany glutation wspólnie z witaminą C zabezpiecza organizm przeciwko toksycznym działaniu wolnych rodników [72]. Analizy biochemiczne pokazały istotnie wyższe stężenia MDA i GSSG w tkankach nowotworowych, natomiast stężenia GSH i vit.-C, choć nieznacznie wyższe w tkankach nowotworowych, nie wykazywały statystycznie znaczących różnic. Podniesiony poziom stężenia GSSG może wskazywać na zmieniony proces utleniania i redukcji (procesy redox) w tkankach nowotworowych. Natomiast brak zmian w stężeniach GSH i vit. C mógł być spowodowany właściwą

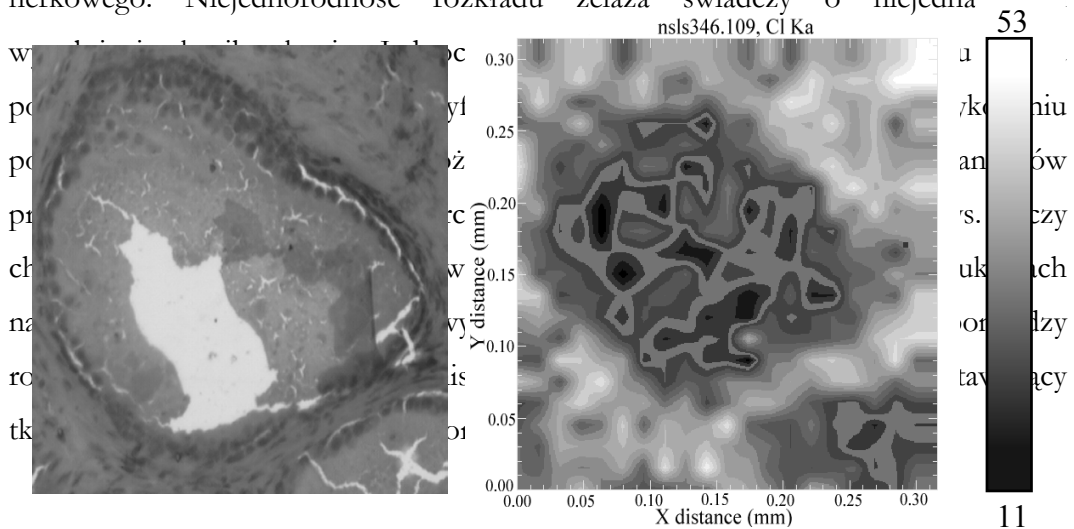
renowacją GSH podczas gdy podniesiony poziom stężenia MDA w tkankach nowotworowych może wskazywać na utlenianie lipidów (lipid preoxidation) [73].

Dzięki możliwości zogniskowania wiązki promieniowania synchrotronowego można było wykonać analizy rozkładów pierwiastków w tkankach. Przykładowo rozkład żelaza w zdrowej nienowotworowej części narządu przedstawiono na rysunku 7 w zestawieniu z obrazem histologicznym badanej części tkanki.



Rys. 7. Po lewej obraz histologiczny obszaru nerki nie objętej nowotworem (widoczny kłębuszek nerkowy i kanaliki proksymalne wokół kłębuszka. Po prawej rozkład stężenia żelaza w badanym fragmencie tkanki [H6].

Żelazo, lokalizuje się głównie w kłębuszku nerkowym, co w tym przypadku związane jest z obecnością krwi w licznych kanalikach kapilarnych kłębuszka nerkowego. Niejednorodność rozkładu żelaza świadczy o niejedna'

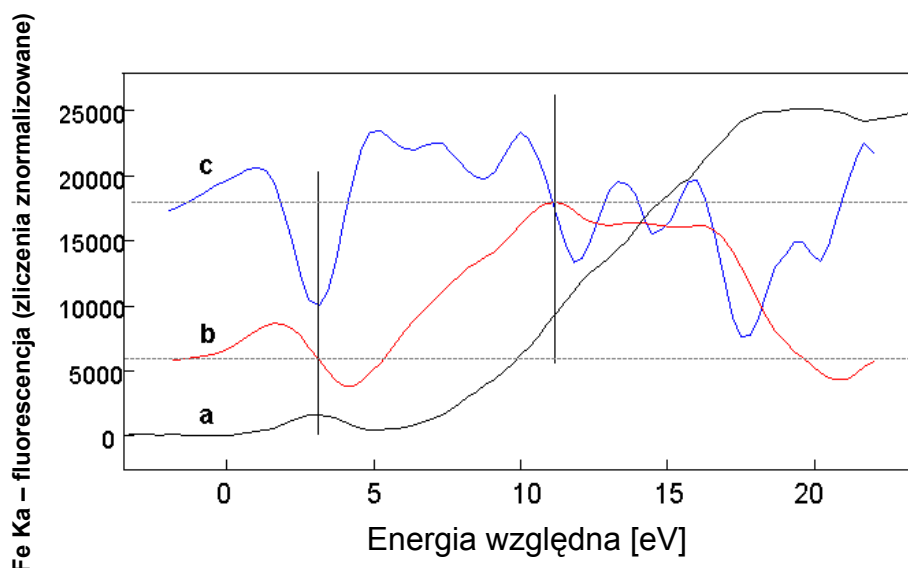


Rys. 8. Po lewej obraz histologiczny tkanki prostaty nie objętej nowotworem (widoczny przekrój przez gruczoł prostaty). Po prawej, rozkład stężenia chloru w badanym fragmencie tkanki. (Na zdjęciu (po lewej) obrazu histologicznego tkanki prostaty widoczny jest przesunięty w prawo fragment tkanki – oderwany od pozostałej części tkanki. Jest to skutek mechanicznego uszkodzenia tkanki podczas wybarwiania preparatu po pomiarze SRIXE i XANES) [H9].

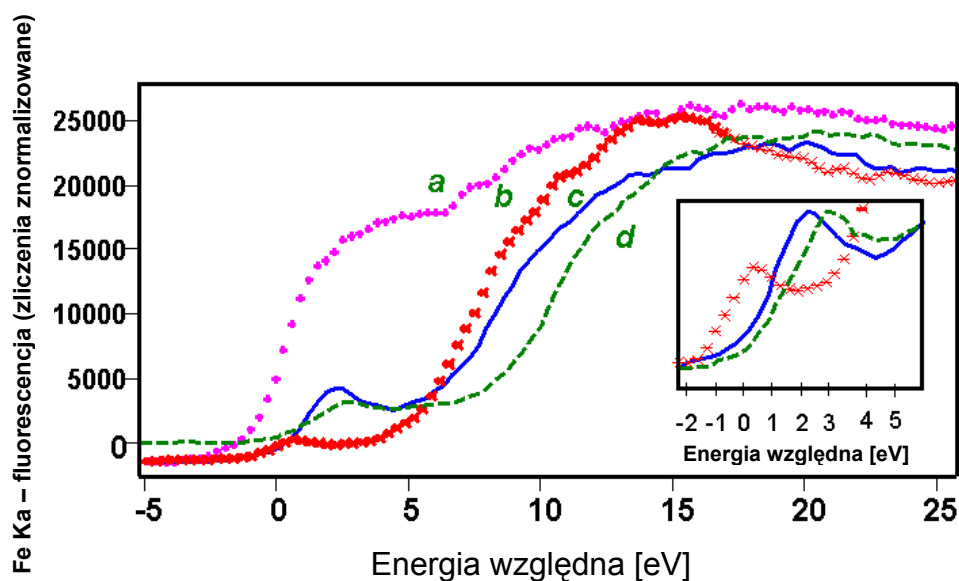
Mikrowiązkowe pomiary składu i rozkładu pierwiastkowego pozwoliły precyzyjnie określić miejsca wysokich stężeń żelaza. W tych miejscach, wykorzystując ten sam układ pomiarowy, przeprowadzono analizy XANES mające na celu zbadanie stopnia utlenienia żelaza [H9].

W tej pracy, analiza widm XANES polegała na określeniu położenia pików przed-krawędziowego (jeśli występuje w widmie), położeniu krawędzi absorpcji względem umownie przyjętej pozycji „zero”. Pozycję „zero” przyjmowano dla położenia krawędzi absorpcji otrzymanej z pomiaru krawędzi absorpcji żelaza metalicznego. Kalibracja energetyczna [H6] wykonywana była w oparciu o pomiar dobrze zdefiniowanych związków, w których żelazo występowało odpowiednio na II lub III stopniu utlenienia. Związkami tymi były: dla żelaza II – Fayalit, dla żelaza III – Hematyt natomiast, dodatkowo dokonano pomiaru Magnetytu w którym żelazo występuje zarówno w formie Fe(II) jak i Fe(III) w stosunku 1:2. Fayalit ( $\text{Fe}_2\text{SiO}_4$ ), Hematyt ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) jak i Magnetyt ( $\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) są naturalnie występującymi minerałami o znanych strukturach krystalograficznych. Rysunek 9 przedstawia analizę położenia pików przed-krawędziowego oraz krawędzi absorpcji na podstawie obliczenia pierwszej i drugiej pochodnej, natomiast rys. 10 przedstawia typowe widma XANES a) dla Fe(0), b) dla Fe(II), c) dla Fe(II):Fe(III) = 1:2, oraz d) dla Fe(III). W celu lepszego zobrazowania występujących w widmach pików przed-krawędziowych piki te przedstawiono w powiększeniu na rys. 10.





Rys.9. a) Widmo XANES prostaty nowotworowej po odjęciu tła, b) pierwsza pochodna funkcji opisującej krawędź absorpcji, c) druga pochodna funkcji opisującej krawędź absorpcji. Linie poziome określają wartość zero dla poszczególnych pochodnych.

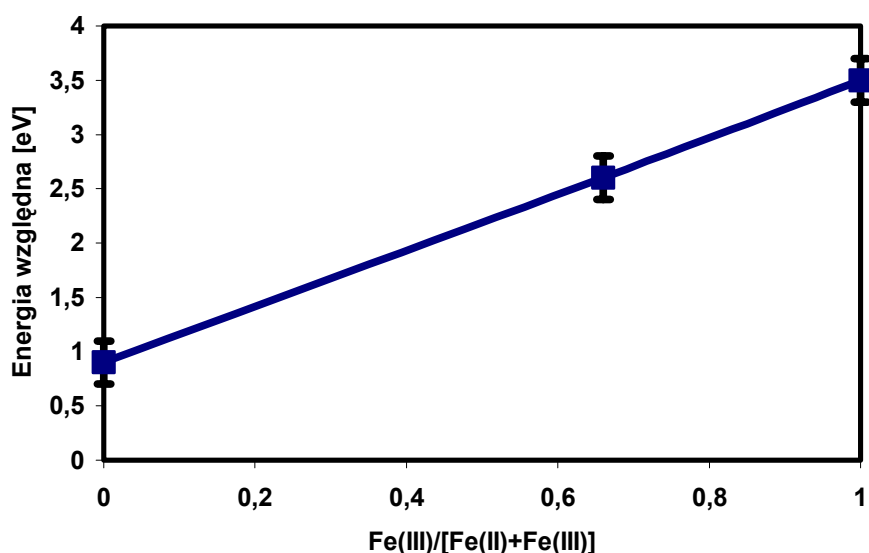


Rys. 10. Widma XANES: a) Fe(0), b) Fe(II) – Fayalit, c) Fe(II):Fe(II) = 1:2 – Hematyt, d) Fe(III) – Magnetyt [H9].

Na podstawie otrzymanych widm, przedstawionych na rys. 10, można było sporządzić krzywą kalibracyjną przedstawiającą zależność położenia piku przed-krawędziowego od stopnia utlenienia żelaza. Położenie piku przed-krawędziowego w widmie XANES otrzymane dla standardów, określone jest względem położenia

krawędzi absorpcji dla próbki żelaza – Fe(0), które zostało określone jako położenie 0 eV. Odpowiednia krzywa przedstawiona jest na rys. 11 gdzie stopień utlenienia żelaza wyrażony jest stosunkiem liczby atomów żelaza będących w stanie +3 do sumy liczby atomów będących w stanie +2 i +3, przy czym stosunek o wartości zero oznacza obecność tylko atomów żelaza będących w stanie +2.

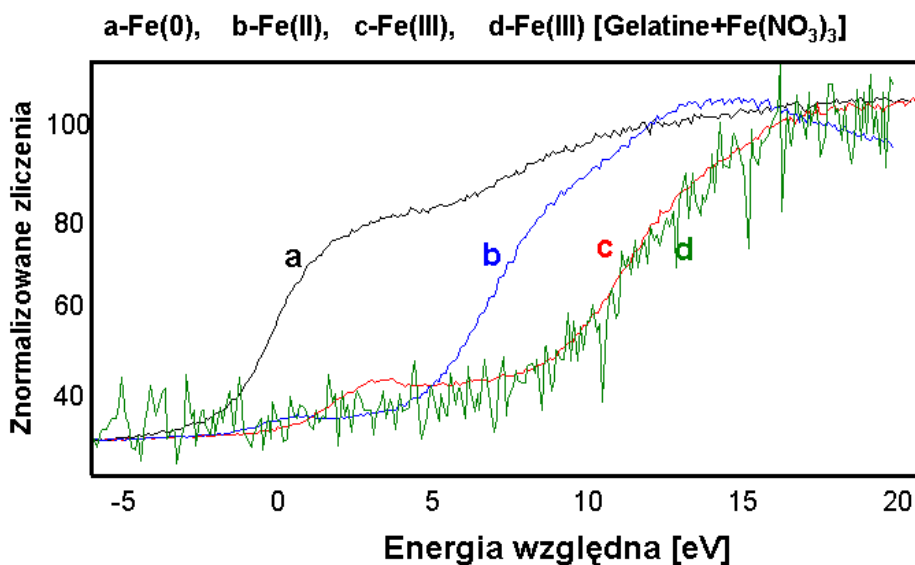
Pik przed-krawędziowy w widmie Fayalitu (Fe(II)) przesunięty jest względem krawędzi absorpcji Fe(0) o  $+0,9 \text{ eV} \pm 0,2 \text{ eV}$ , co na rys. 11 odpowiada stosunkowi  $\text{Fe(III)}/[\text{Fe(II)}+\text{Fe(III)}]$  równemu 0, natomiast pik przed-krawędziowy w widmie Hematytu (co odpowiada stosunkowi  $\text{Fe(III)}/[\text{Fe(II)}+\text{Fe(III)}]$  równemu 0,66) przesunięty jest o  $+2,6 \text{ eV} \pm 0,2 \text{ eV}$ , natomiast pik przed-krawędziowy w widmie Magnetytu (co odpowiada stosunkowi  $\text{Fe(III)}/[\text{Fe(II)}+\text{Fe(III)}]$  równemu 1) przesunięty jest o  $+3,5 \text{ eV} \pm 0,2 \text{ eV}$ .



Rys. 11. Krzywa kalibracyjna zależności przesunięcia piku przed-krawędziowego względem położenia krawędzi absorpcji dla żelaza Fe(0) od stopnia utlenienia żelaza [H6].

Struktury tkanek biologicznych odbiegają swą budową od struktur krystalicznych i dlatego też chcąc posługiwać się prezentowaną na rys. 11 krzywą kalibracyjną należało sprawdzić położenie piku przed-krawędziowego jak i samej krawędzi absorpcji w widmie XANES otrzymanym z pomiaru materiału biologicznego. W tym celu wykonano standard żelatynowy zawierający jony żelaza Fe(III). Do roztworu żelatyny cz.d.a. dodano wodny roztwór azotanu żelaza ( $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ ) [H9]. Żelatyna jako związek organiczny o średniej wartości liczby atomowej  $Z \approx 6$  posłużyła jako fantom tkanki. Widmo XANES otrzymane w tych samych warunkach eksperymentalnych co widma standardów mineralogicznych porównano z widmem

Hematytu. Rysunek 12 przedstawia nałożone widmo żelatyny na prezentowane na rysunku 10 widma standardów.



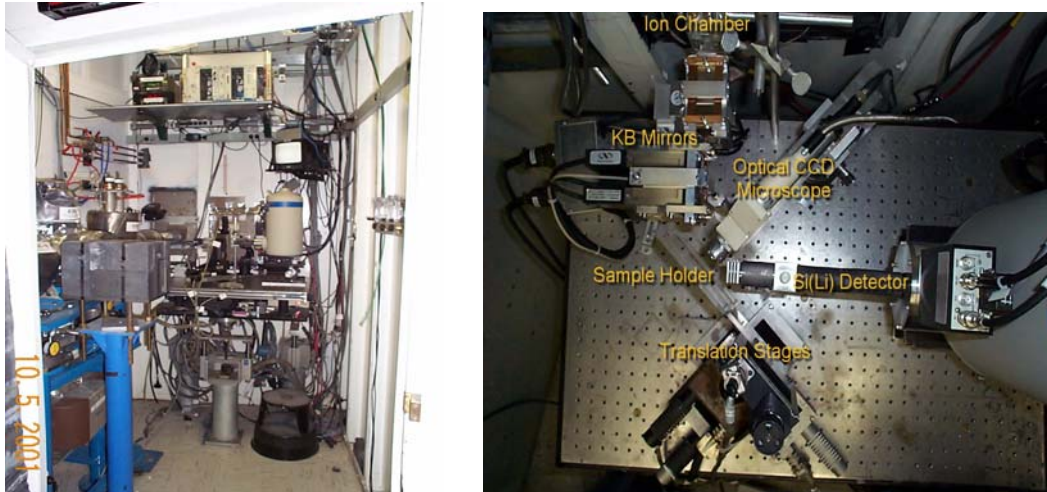
Rys. 12. Widma XANES dla: a) Fe(0), b) Fe(II) – zawarty w Fayalicie, c) Fe(III) – zawarty w Hematycie, d) Fe(III) – zawarty w żelatynie [H6].

Widmo odpowiadające krawędzi absorpcji żelaza zawartego w żelatynie pokrywa się z widmem dla Hematytu. Brak gładkości widma wynika z niskiej statystyki, która podyktowana była niskim stężeniem żelaza – 100 µg/g – zawartym w żelatynie. Na podstawie otrzymanego wyniku, wielokrotnie potwierdzonego podczas pomiarów stwierdzono, że położenie krawędzi absorpcji i pików przed-krawędziowych dla żelaza występującego na trzecim stopniu utlenienia w żelatynie i hematycie z dokładnością do niepewności pomiarowej jest identyczne i dlatego też krzywa kalibracyjna przedstawiona na rys. 11 może być stosowana do oznaczania stopnia utlenienia żelaza występującego w badanych tkankach [H6].

Analizy XANES wykonane były w Brookhaven National Laboratory, USA na synchrotronie NSLS (National Synchrotron Light Source) oraz w niemieckim ośrodku badawczym HASYLAB (Hamburg Synchrotron Laboratory) na synchrotronie DORIS-II (Deutsches Research Synchrotron). Układ pomiarowy w obydwu tych laboratoriach jest zasadniczo podobny, a różnica polega na sposobie ogniskowania wiązki.

W stacji pomiarowej X-26A w NSLS, BNL, USA biała wiązka promieniowania synchrotronowego po opuszczeniu źródła pada na monochromator krzemowy wycięty wzdłuż płaszczyzn <111>, a następnie na eliptyczne zwierciadło

wielowarstwowe wykonane z krystalu krzemu, które pokryte jest cienką warstwą platyny. Zadaniem warstwy platynowej jest redukcja trzeciej i wyższych harmonicznych promieniowania X, które przedostały się przez monochromator. Natomiast zadaniem zwierciadła jest ogniskowanie wiązki, która pada na układ przesłon tantalowych ostatecznie definiujących rozmiary wiązki [H9]. Rysunek 13 przedstawia zdjęcia prezentujące widok na stanowisko pomiarowe oraz układ pomiarowy widziany z „lotu ptaka”.

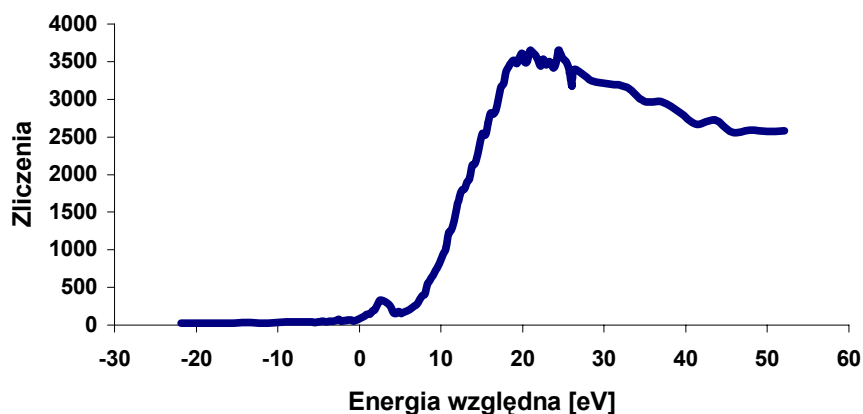


a)

b)

Rys. 13. a) Zdjęcia stanowiska pomiarowego X26A w NSLS, Brookhaven National Laboratory [74], b) widok układu z „lotu ptaka”.

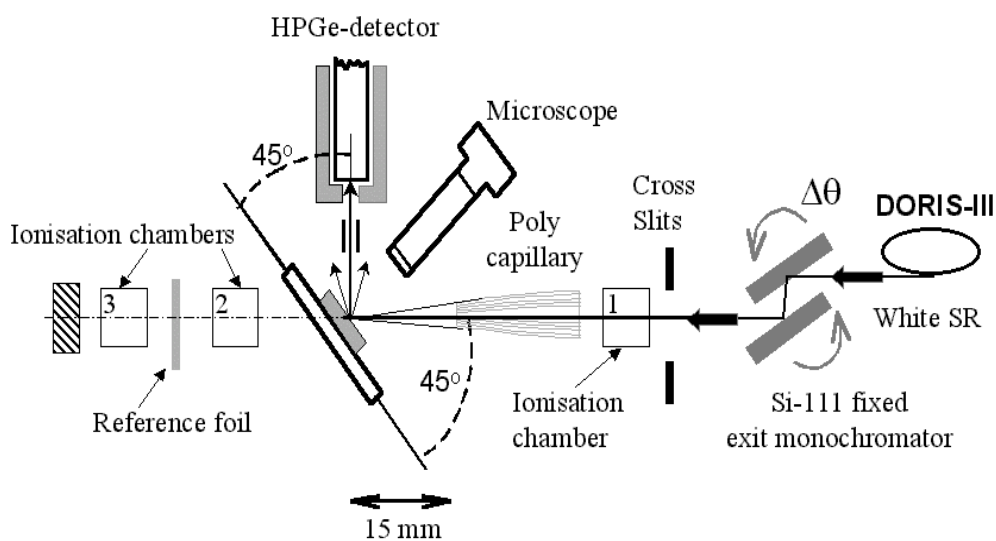
Zwykle, pomiary XANES przeprowadzane były z wiązką monochromatyczną o wymiarach  $16 \mu\text{m} \times 14 \mu\text{m}$  i energii zmieniającej się w zakresie od 7080 eV do 7150 eV co 0.3 eV w obszarze pików przed-krawędziowego oraz krawędzi absorpcji [H6, H9]. Rysunek 14 przedstawia typowe widmo XANES otrzymane z pomiaru tkanki prostaty objętej nowotworem.



Rys. 14. Typowe widmo XANES otrzymane z tkanki nowotworowej prostaty.

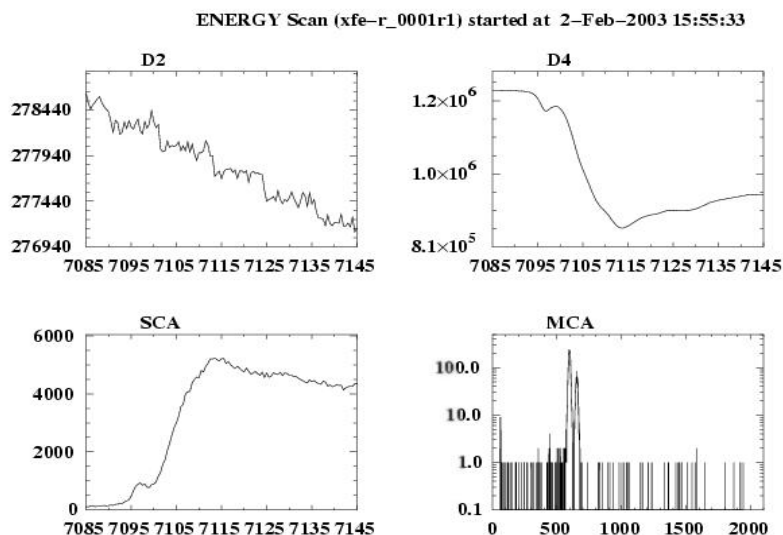
W widmie obserwowany jest pik przed-krawędziowy. Położenie tego piku jak również położenie krawędzi absorpcji pozwala na identyfikację stanu walencyjnego badanego pierwiastka. Z uwagi na dobrze zdefiniowany pik przed-krawędziowy występujący w widmach badanych próbek oraz wykonaną krzywą kalibracyjną przedstawiają na rysunku 11, analiza stopnia utlenienia żelaza oparta była na położeniu tego piku w widmie.

Pomiary prowadzone były również na linii pomiarowej L w DORIS-II, HASYLAB, Niemcy. Układ eksperymentalny tam zainstalowany zamiast przesłon tantalowych posiada kapilarę, której zadaniem jest zmniejszenie rozmiarów wiązki niemal bez utraty jej intensywności. Rysunek 15 przedstawia schemat układu pomiarowego linii L.



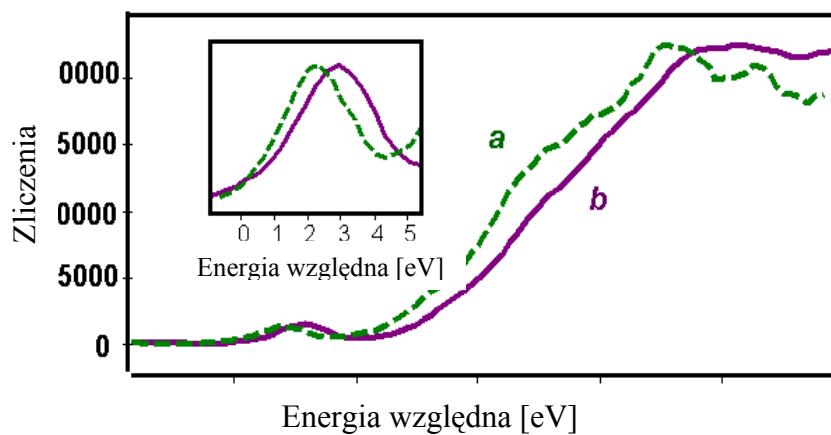
Rys. 15. Schemat układu pomiarowego stosowanego na linii L synchrotronu DORIS II w DESY, Hamburg Niemcy [75].

Za pomocą przedstawionego na rys. 15. układu otrzymuje się widma przedstawione na rys. 16 będącym zdjęciem ekranu komputera widocznym w czasie pomiarów.



Rys. 16 Widma otrzymane za pomocą układu pomiarowego linii L synchrotronu DORIS II.

Widmo XANES rejestrowane jest w oknie SCA, widmo charakterystycznego promieniowania X w oknie MCA, widmo absorpcyjne w oknie D4 oraz widmo padających fotonów w oknie D2.



Rys. 17. Widma XANES dla żelaza a) tkanka nie nowotworowa, b) tkanka nowotworowa

Rys. 17 przedstawia przykładowe dwa znormalizowane widma XANES dla krawędzi żelaza, zarejestrowane w dwóch obszarach tkanki prostaty.

Wybrane punkty naświetlane były wiązką monochromatyczną promieniowania synchrotronowego, skolimowanego do rozmiarów 16  $\mu\text{m}$  x 14  $\mu\text{m}$ . Energia zmieniana była z krokiem co 0,3 eV w przedziale od 7080 eV do 7150 eV. Czas akwizycji danych wynosił 10 s dla każdej wartości energii padającego promieniowania synchrotronowego [H9]. Widmo oznaczone literą a) pochodzi z obszaru nie objętego nowotworem, natomiast widmo oznaczone literą b) pochodzi z obszaru nowotworowego. W widmie odpowiadającym tkance nowotworowej zarówno pik przed-krawędziowy jak i sama krawędź absorpcji przesunięte są względem odpowiadającym im pikowi przed-krawędziowemu i krawędzi absorpcji odpowiadającej obszarowi nie objętym nowotworem w kierunku wyższych energii. Zarówno różnica położenia pików przed-krawędziowych i krawędzi absorpcji odpowiada przesunięciu zarejestrowanemu dla widm pochodzących z analiz XANES dla żelaza występującego w Magnetycie i Hematycie. Położenie widma b) pokrywa się z położeniem widma żelaza zawartego w przygotowanym standardzie żelatynowym co świadczy o tym, że żelazo w tkankach nowotworowych prostaty występuje na +3 stopniu utlenienia, natomiast w tkankach nie objętych nowotworem stopień utlenienia żelaza przyjmuje wartość niższą.

## VI. Podsumowanie

Przedstawione prace w oparciu o które powstało niniejsze opracowanie wskazują na szerokie możliwości eksperymentalne jakie dają metody fizyki w zastosowaniach bio-medycznych. Istotą prezentowanych badań w pracach [H1, H4, H5] była analiza efektu matrycowego występującego w tarczach grubych poddawanych analizom PIXE oraz opracowanie metody uwzględniającej ten efekt przy obliczaniu stężeń pierwiastków śladowych. Dzięki przeprowadzonym badaniom można było opracować metodę uwzględniającą efekt matrycy i pozwalającą na dokonywanie obliczeń stężeń pierwiastków śladowych zawartych w próbkach poddawanych analizom PIXE. Prawidłowe oznaczenie składu pierwiastkowego i stężeń tych pierwiastków występujących w materiale biomedycznym jest kluczowym zagadnieniem przy analizie tych materiałów. Należy bowiem pamiętać, że każde odstępstwo stężenia pierwiastków śladowych od poziomu fizjologicznego określonego dla danej tkanki może być wskaźnikiem stanu chorobowego osoby, od której pobrano materiał badawczy. Przeprowadzone badania wskazały na potrzebę stosowania wzajemnie uzupełniających się technik pomiarowych, a zwłaszcza tych które mogą być stosowane podczas jednego pomiaru jak np. PIXE, R(E)BS, PIGE. W pracach zwrócono szczególną uwagę na efekty temperaturowe podczas naświetlania materiały badawczego, które mają istotny wpływ na zmianę matrycy, zwłaszcza materiału bio-medycznego, a przez to na zmianę stężenia badanych pierwiastków. Dodatkowo prowadzone były prace mające na celu doboru prawidłowej procedury preparatyki tarcz pomiarowych, czego dotyczyła praca [H7], w której przedstawiono wyniki analiz różnego typu próbek stosując różnorodne techniki pomiarowe. W pracy tej przedstawiono szczegółową procedurę mineralizacji próbek.

Wzbogacenie informacji mogących stanowić istotny przyczynek do poznania etiopatogenezy zjawiska nowotworzenia nastąpiło poprzez przeprowadzenie badań dotyczących analiz składu pierwiastkowego tkanek nowotworowych jak i nie objętych guzem, co przedstawiono w pracach [H2, H3, H8]. Na bazie otrzymanych wyników stwierdzono istotne różnice pomiędzy składem pierwiastkowym obszarów nerki z rakiem jasnokomórkowym (carcinoma clarocellulare), z tłuszczako-mięśniakiem naczyniowym (angiomyolipoma) a tkankami tego narządu nie objętymi zmianami patologicznymi. Podobnie, istotne różnice w stężeniach pierwiastków śladowych w różnych strukturach tkankowych zaobserwowano pomiędzy tkankami prostaty objętej nowotworem i nie objętych zmianami nowotworowymi [H9].



W tej pracy przedstawiono też szczegółowy opis opracowanego standardu żelatynowego [H9] zawierającego wodne roztwory głównie azotanów różnych metali. Standard służył do oznaczania stężeń pierwiastków w tkankach. Opracowanie takiego standardu podyktowane było brakiem jego odpowiednika w zestawie oferowanych przez Międzynarodową Agencję Energii Atomowej materiałów referencyjnych.

Wybrane metody analityczne zastosowane do materiałów biomedycznych pozwoliły na wzbogacenie wiedzy na temat zawartości pierwiastków śladowych, oraz korelacji ich stężeń z określonym typem schorzenia. Badania wskazały na występowanie związku pomiędzy stężeniami wybranych pierwiastków a występującymi w obrazie histologicznym strukturami tkankowymi. Rozkład niektórych pierwiastków, jak np. chloru, odzwierciedlał obraz histologiczny tkanki. Jednakże wysoce precyzyjna lokalizacja pierwiastków występujących w formie wolnej (jonowej) nie związanej z matrycą organiczną tkanki podlega ograniczeniu ponieważ pierwiastki te mają wybitną zdolność do dyfuzji w trakcie zamrażania i suszenia oraz krystalizacji, głównie podczas suszenia.

Podjęcie próby potwierdzenia występowania zmian stopnia utlenienia metali przejściowych w procesach nowotworowych, związane było z zastosowaniem metody XANES. Badania przedstawione w pracach [H6, H9] dotyczyły analiz zmiany stopnia utlenienia żelaza. Analizy przeprowadzono w oparciu o położenie piku przed-krawędziowego, którego intensywność zależy od stężenia żelaza [H6]. W celu określenia zmian stopnia utlenienia żelaza konieczne było zastosowanie standardów zawierających ten pierwiastek na różnych stopniach utlenienia. Standardami tymi były substancje mineralne jednakże wyniki badań zawarte w pracy [H6] pokazały, że do tego celu można użyć standard żelatynowy będący fantomem tkanki. Zgodność otrzymanych wyników miała istotne znaczenie w interpretacji widm XANES otrzymanych z pomiaru położenia piku przed-krawędziowego oraz krawędzi absorpcji żelaza zawartego w tkankach nowotworowych i częściach nie objętych guzem.

Pierwiastki śladowe w tkankach nowotworowych występują zwykle w niższych stężeniach niż w częściach tkanek nie objętych zmianami nowotworowymi podczas gdy Fe występuje w znacznie wyższym stężeniu w częściach tkanek zmienionych nowotworowo. Wykazano również, że żelazo w tkankach nowotworowych częściej występuje w formie  $Fe^{+3}$ , co sugerowałoby wzmożenie reakcji Fentona w tym obszarze, podczas gdy w częściach nie-nowotworowych występuje jako  $Fe^{+2}$  bądź mieszanina stopni utlenienia  $Fe^{+3}$  i  $Fe^{+2}$  [H9].

Zastosowanie w badaniach techniki micro-XANES do analiz tkanek, otwiera nowy rozdział w badaniach strukturalnych i rozkładu stężenia metali przejściowych występujących na różnych stopniach utlenienia, odgrywających istotną rolę w procesach nowotworzenia.

Należy mocno podkreślić, że techniki wykorzystujące promieniowanie synchrotronowe, jak pokazałem w swoich pracach, są wspaniałymi narzędziami do:

- analiz składu pierwiastkowego tkanek (zwłaszcza pierwiastków śladowych),
- analiz rozkładu pierwiastków w tkankach,
- określenia składu chemicznego tkanek,
- określenia stopnia utlenienia metali oraz
- określenia struktur chemicznych występujących w tkankach.

## VII. Wykaz literatury

- [1]. L.A. Curie - "Limits for qualitative detection and quantitative determination", *Anal. Chemistry* 40 (1968) 586.
- [2]. W. M. Kwiatek, rozdział pt. "Analiza fluorescencyjna" w „Fizyczne metody badań w biologii, medycynie i ochronie środowiska” Praca zbiorowa pod red. A.Z. Hrynkiwicz i E. Rokity, PWN, Warszawa 1999
- [3]. Kubica B., Kwiatek W.M., Dutkiewicz E., Lekka M, - "Sample preparation procedure for PIXE elemental analysis on soft tissues", *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 223 (1997).
- [4]. Kwiatek W.M., Kubica B., Gryboś R., Krośniak M., Dutkiewicz E.M., Hajduk R., "Determination of vanadium in animal tissues by PIXE and AAS", *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry Vol. 247 no.1* (2001) 175-178.
- [5]. W.M. Kwiatek - Trace Element Analysis Using Synchrotron Radiation, IFJ - rozprawa doktorska, Kraków 1989.
- [6] Leidenfrost, Johann Gottlob – On the fixation of water in diverse fire, *Int. J. of Heat and Mass Transfer* Vol. 9 (1966) 1153-1166
- [7] R. D. Lillie – Stains and staining (chapter 5, pp73-92) in Histopathologic Technique and Practical Histochemistry, *Blakiston Co. Inc. 1954*
- [8] <http://www.emsdiasum.com/ems/techdata/22.html>
- [9] C. Kunz - "Synchrotron radiation - Techniques and applications" Springer-Verlag, New York 1979.
- [10] E\_E Koch - "Handbook of Synchrotron radiation" , North -Holland Publishing Co. 1983.
- [11] K.W. Jones, Synchr. Rad. Ind. X-ray Emis. w Handbook of X-ray Spectrometry ed. R.E. Van Grieken, A.A. Markowicz, Marcel Dekker, Inc. New York (1992).
- [12]. A. Rindby at al. - "Microbeam Technique for Energy Dispersive X-ray Fluorescence", *X-ray Spectrometry* 18 (1989) 109.
- [13]. G. Deconninck - "Quantitative analysis by (p, X) and (p,  $\gamma$ ) reactions at low energies, *Journal of Radioanalytical Chemistry* Vol. 12 (1972) 157.
- [14]. G. Deconninck, G. Demortier - "Quantitative analysis of Aluminium by prompt nuclear reactions, *Journal of Radioanalytical Chemistry* Vol. 12 (1972) 189.
- [15]. G. Demortier, Ph. Delsate - "Analysis of magnesium by prompt gamma rays induced by protons, *Radiochemical and Radioanalytical Letters* 21(3-4) (1975) 219.
- [16]. Choi IS: Trace elements determinations in cancerous and noncancerous human tissues using instrumental neutron activation analysis. *Georgia Inst. of Technology Dis. Abstr Int* 1990; 50(12):5853
- [17]. Tong YP, Zhang YP, Xu YL, Rui JY, Li MQ, Shen CY, Xiao ZM, Hong JX: Determination of eight elements in six human cancer cell lines and two human normal cell lines by PIXE. *Biol Trace Elem Res* 1991; 29(1):31-4
- [18]. Kwiatek, W. M., - Synchrotron Radiation Induced X-ray Emission - SRIXE, *Acta Physica Polonica A Vol.82* (1992) 263 - 271.
- [19]. Kwiatek W.M., "Bio-medical Applications of Synchrotron X-ray Fluorescence", *Acta Physica Polonica A Vol.86* (1994) 695-703.

- [20]. Paluszkiwicz C., Galka M., Kwiatek W.M., Parczewski A., Walas S., "Renal Stones Studies Using Vibrational Spectroscopy and Trace Element Analysis", *Biospectroscopy Vol.3 Issue 5 (1997) 403-407*.
- [21]. Paluszkiwicz C., Kwiatek W.M., Galka M., Sobieraj D., and Wentrup-Byrne E., "FTIRaman, FTIR Spectroscopy, and PIXE Analysis Applied to Gallstones Specimens." *Cellular and Molecular Biology 44 (1998) 65-74*.
- [22]. Paluszkiwicz C., Kwiatek W.M., „Analysis of human cancer prostate tissues using FTIR microscopy and SRIXE techniques”, *Journal of Molecular Structure 565-566 (2001) 329-334*.
- [23]. Banaś A., Kwiatek W.M., Zając W., „Trace element analysis of tissue section by means of synchrotron radiation: the use of GNUPLLOT for SRIXE spectra analysis”, *Journal of Alloys and Compounds 328 (2001) 135-138*.
- [24] Yuen C., Weissbluth W., Labhardt A.M., SSRF Report 77/06, Stanford University, California 1997
- [25] Sobczak E., - Metoda EXAFS I jej zastosowanie do badań strukturalnych białek, *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Jagiellońskiego DCCLXII (1984) 57 - 74*
- [26] Petiau J. and Calas G., - XANES of 3d Elements: Effects of Local Symmetry Evidenced Using High-Resolution Spectra, in "EXAFS and Near Edge Structure" Eds. A. Bianconi, L. Incoccia, S. Stipcich, *Springer-Verlag*, Berlin, Heidelberg, 1983
- [27] J. Prochaska, *Physiological Rev.* 67, 858 (1987)
- [28] R. Scott, B.W. East, J. Janczysyn, K. Boddy, A.J. Yates - *Urolog. Res.* 8, 167 (1980)
- [29] G.V. Iyengar, W.E. Kollmer, H.J.M. Bowen, - "The Elemental Composition of Human Tissues and Body Fluids", *Verlag, Chemie, Weinheim* 1978.
- [30]. Boffetta P: Carcinogenicity of trace elements with reference to evaluations made by the International Agency for Research on Cancer. *Scand J Work Environ Health* 1993; 19 Suppl 1:67-70
- [31] Doz F, Roosen N, Rosenblum ML - Metallothionein and anticancer agents: the role of metallothionein in cancer chemotherapy, *Journal of Neurooncology* 17(2) (1993) 123-129.
- [32] G.Bartosz – Druga twarz tlenu, *PWN Warszawa* 1995
- [33] Moyer TP. Toxic metals. In Tietz textbook of clinical chemistry, 3rd ed. CA Burtis and ER Ashwood, eds. 1999; Philadelphia: W.B. Saunders Company, 982-996.
- [34] Milne DB. Trace elements. In Tietz textbook of clinical chemistry, 3rd ed. CA Burtis and ER Ashwood, eds. 1999; Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1029-1055.
- [35] Seiler HG, et al, eds. Handbook on metals in clinical and analytical chemistry. 1994; New York: Marcel Dekker, Inc
- [36] IARC Chromium and chromium compounds. Lyon: IARC 1990: 49-256. (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; vol 49)
- [37] Yoshida S., Ide-Ektessabi A., Fujisawa S., - Application of synchrotron radiation in neuromicrobiology: role of iron in Parkinson's disease, *Structural Chemistry* 14(1) (2003) 85-95.
- [38] Toyokuni S., - Iron-induced carcinogenesis: the role of redox regulation, *Free Radic. Biol. Med.* 20(4) (1996) 553 – 566.
- [39] Stephen J. Lippard, Jeremy M. Berg, - Podstawy chemii bionieorganicznej, *PWN 1998*

- [40] Staessen A., Lauwerys W., Robert R., - Renal function and historical environmental cadmium pollution from zinc smelters, *Lancet* 343(8912) (1994) 1523-1527
- [41] Goyer R.A., Toxic and essential metal interaction, *Annu. Rev. Nutr.* 17 (1997) 37 - 50
- [42] Nordberg G, Alessio L, Herber RFM: Cadmium in human environment: toxicity and carcinogenicity. Lyon: IARC, 1992 (IARC scientific publication; no 118)
- [43] Szala S., Radzikowski C. – Podłoże molekularne angiogenezy nowotworów., *Nowotwory*, 47 (1997) 1-19
- [44] Rotilio G. (red) – Superoxide and Superoxide Dismutase in Chemistry, Biology and Medicine, *Elsevier*, Amsterdam 1996
- [45] Stone S.F., Bernasconi G., Haselberger, Markiewicz M., Ogris R., Wobruschek P., and Zeisler R., - Detection and Determination of Selenoproteins by Nuclear Techniques, *Biological Trace Element Research*, Ed. G.N. Schrauzer 1994, Humana Press Inc. pp.299 - 307
- [46] IARC: Selenium and selenium compounds, Lyon IARC 1975 245-60 vol 9
- [47] Malonne H. i wsp.: Mechanisms of tumor angiogenesis and therapeutic implications: angiogenesis inhibitors. *Clin. Exper. Metastasis*. 1999, 17: 1-14.
- [48] Powell S.R., Tortolani A.J., *Journal of Surgical Research* 53 (1992) 417 - 429
- [49] Opieńska-Blauth J., Dobrowolski J., Grzebuła S., Bartosz G., *Post. Hig. Med. Dośw.* 34 (1980) 491 - 524
- [50] Schneider H.J., Urolithiasis, Handbook of Urology Vol 17/I *Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-Tokio* 1995
- [51] Nowotwory i torbiele nerek pod red. Andrzeja Borkowskiego i Macieja Czaplickiego Warszawa: *Wydaw. Lekarskie PZWL*; 2002 Biblioteka Chirurga i Anestezjologa [Nr 47]
- [52] Sata F. Umemura T. Kishi R. – The epidemiology of prostate cancer--recent trends in prostate cancer incidence and mortality, *Japanese Journal of Cancer & Chemotherapy* 28(2) (2001) 184-8
- [53] Yazaki, T., Umeyama, T., Kaneko, S., Kiriyama, I., Ishikawa, H., Koiso, K., - Multielement analysis of kidney tissue with renal calculi, *Urology* 38 (3) (1991), 290-293.
- [54] Schneider H.J., - Urolithiasis (Handbook of Urology) Vol. 17 *Springer-Verlag* (1985) 1-135
- [55] Domański P. - Kamica układu moczowego, "*Żyjmy dłużej*", Styczeń 1997
- [56] Michael Whitehouse, Maurice Slevin, *Choroba nowotworowa* (Cancer the Facts - Tłumaczenie: Bożena Walewska-Zielecka) 1998
- Mclaughlin, J.K., Schumann L.M. (1983) Epidemiology of renal cell carcinoma. In: Lilienfeldt A., ed. *Reviews in cancer epidemiology*, New York, 170-209
- [57]. Sun Y: Free radicals, Antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Radical Biol Med* 1990; 8: 583-599
- [58]. Inoue S, Kawanishi S: Hydroksyl radical production and human DNA damage induced by ferric nitrioltriacetate and hydrogen peroxide. *Cancer Res* 1987; 47: 6522-6527.
- [59] Riche JP: The role of glutathione in aging and cancer. *Exp Gerontol* 27 (1992) 615-626

- [60] Block G: Vitamin C and cancer prevention : the epidemiological evidence. *American J Clin Nutr* 1991; 53 Suppl:270S-282S.
- [61] The Kidney: physiology and pathophysiology. Vol. 1-2; Ed. Donald W. Seldin, Gerhard Giebisch Philadelphia, Baltimore: *Lippincott Williams & Wilkins*,
- [62] Rafael E. Jimenez, et al. Concurrent Angiomyolipoma and Renal Cell Neoplasia: A Study of 36 Cases *Mod Pathol* 2001;14:157-163
- [63] Kirby R. S., McConnell J. D. *Łagodny rozrost gruczołu krokowego* Via Medica 2003 Wydanie I
- [64] Husiatyński W., - TNM classification 1997, *Przegląd Urologiczny* 2 (2000) 50
- [65] Gann PH, Stampfer MJ et al. – *A Prospective Evaluation of Plasma Prostate-Specific Antigen for Detection of Prostatic Cancer. JAMA*, (1995) Vol 273, No 4
- [66] Anderson JR, Zweiback E et al. : Age-Specific Reference Ranges for Serum Prostate-Specific Antigen. *Urology* 46 (1), 1995
- [67] Jafari-Khouzani K, Soltanian-Zadeh H Multiwavelet grading of pathological images of prostate. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2003 ;50(6):697-704
- [68] [http://aztec.asu.edu/azustoo/Gleason%20Grading\\_files/Gleason%20Grading.htm](http://aztec.asu.edu/azustoo/Gleason%20Grading_files/Gleason%20Grading.htm)
- [69] Hissin P.J., Hilf R., *Analytical Biochemistry* 5 (1976) 214
- [70] Gonet B. *Diagnostic Laboratory* 29 (1993) 157
- [71] Uchiyama M. and Michara M. *Analytical Biochemistry* 86 (1988) 271
- [72] Ketterer B: Protective role of glutathione and glutathione transferases in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 1988; 202:343-361
- [73] Masotti L, Casali E, Galeotti: Lipid peroxidation in tumor cells. *Free Rad. Biol. Med* 1988; 4:377-386
- [74] <http://www.bnl.gov/x26a/>
- [75] G. Falkenberg and K.Rickers, - Pink-beam and monochromatic micro-X-ray Fluorescence analysis at the beamline L, *HASYLAB Annual Report* 2002, 88-95

## VIII. Kserokopie oryginalnych prac

Lista publikacji umieszczonych w recenzowanych czasopismach po otrzymaniu stopnia doktora nauk fizycznych, które składają się na rozprawę habilitacyjną.

- H1. **Kwiatek, W. M.**, Lekki, J., Paluszkiewicz, C., Preikschas, N. - Application of FTIR, PIXE, and RBS for Trace Element Analysis in Biological Samples, *Nucl. Instr. and Meth. B* 64 (1992) 512-516.
- H2. **Kwiatek, W. M.**, Cichocki, T., Galka, M., Paluszkiewicz, C. - Microanalysis Using Synchrotron Radiation, *Nucl. Instr. and Meth B* 68 (1992) 122-124.
- H3. **Kwiatek W.M.**, T. Drewniak, M. Lekka, A. Wajdowicz, -"Investigation of Trace Elements in Cancer Kidney Tissues by SRIXE and PIXE", *Nucl. Instr. and Meth. in Phys. Res. B* 109/110 (1996) 284-288.
- H4. **Kwiatek W.M.**, Lekki J., Dutkiewicz E., and Paluszkiewicz C., -"Importance of matrix changes in PIXE elemental analysis", *Nucl. Instr. and Meth. in Phys. Res. B* 114 (1996) 345-349.
- H5. **Kwiatek W.M.**, Lekki J., Dutkiewicz E., Nowak T., and Paluszkiewicz C., - "Matrix effects in PIXE elemental analysis on thick calculi targets", *American Institute of Physics Journal* 392 (1997) 531-534.
- H6. **Kwiatek W.M.**, Galka M., Hanson A.L., Paluszkiewicz C., Cichocki T., „XANES as a tool for iron oxidation state determination in tissues”, *Journal of Alloys and Compounds* 328 (2001) 276-282.
- H7. **Kwiatek W.M.**, Kubica B., Paluszkiewicz C., Galka M., „Trace element analysis by means of synchrotron radiation, XRF, and PIXE: selection of sample preparation procedure”, *Journal of Alloys and Compounds* 328 (2001) 283-288.
- H8. **Kwiatek W.M.**, Drewniak T, Gajda M., Galka M. Hanson A.L. and Cichocki T., „Preliminary study of selected elements distribution in kidney cancerous and non-cancerous tissues”, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 16,3 (2002) 155-160.
- H9. **Kwiatek W.M.**, Hanson A.L., Paluszkiewicz C., Galka M., Gajda M., Cichocki T., „ SRIXE and XANES application to iron oxidation state determination in prostate tissue sections”. *Journal of Alloys and Compounds* 362 (1,2) (2003) 83-87.