

Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τμήμα Χημείας

Γενικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

Ανάπτυξη μεθόδου φασματομετρίας μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος για τον προσδιορισμό μετάλλων σε μεμονωμένα κύτταρα με σκοπό τη μελέτη της πρόσληψης βαρέων μετάλλων (Pb, Cd, As) από τα *Chlamydomonas reinhardtii* κύτταρα.

Μαυράκης Εμμανουήλ

Επιβλέπων: Περγαντής Σπύρος

Ηράκλειο, 2018

University of Crete

Department of Chemistry

General Department of Post-Graduate Studies

Master of Science

Development of inductively coupled plasma mass spectrometry for
the determination of metals in individual cells for the purpose of
studying heavy metal (Pb, Cd, As) uptake by *Chlamydomonas*

reinhardtii cells

Mavrakis Emmanouil

Supervisor: Pergantis Spiros

Heraklion, 2018

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Περγαντής Σπύρος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Δημήτρης Άγγλος, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Νίκος Λυδάκης-Σημαντήρης, Καθηγητής Τμήματος Μηχανικών Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος, ΤΕΙ Κρήτης

Στην οικογένεια μου

Ευχαριστίες

Σε πρώτο επίπεδο, ευχαριστώ το Πανεπιστήμιο Κρήτης που μου παρείχε την ευκαιρία και την υλικοτεχνική υποδομή για να ξεκινήσω και να ολοκληρώσω το μεταπτυχιακό πρόγραμμα ειδίκευσης. Είναι σημαντικό για ένα ίδρυμα να σου προσφέρει την δυνατότητα να καταρτιστείς περαιτέρω ως επιστήμονας χωρίς την επιβολή διδάκτρων.

Μεγάλη εκτίμηση δείχνω στο πρόσωπο του επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Σπύρου Περγαντή ο οποίος με εμπιστεύτηκε στην προσπάθειά μου να φέρω εις πέρας μία εργασία σε ένα καινοτόμο και πολλά υποσχόμενο ερευνητικό πεδίο. Τον ευχαριστώ πολύ και για την αποδοχή μου στην ερευνητική του ομάδα ως μεταπτυχιακό φοιτητή, καθώς και για την προσωπική του ενασχόληση μαζί μου προς μετάδοση των γνώσεών του. Ταυτόχρονα ευχαριστώ και τα μέλη της ερευνητικής ομάδας του κ. Περγαντή για την πολύ καλή συνεργασία τους μαζί μου και για το ευχάριστο εργασιακό κλίμα που καταφέραμε να αναπτύξουμε. Επιπλέον, θα ήθελα να αναφερθώ στην άψογη συνεργασία που είχα με τον καθηγητή κ. Λυδάκη ο οποίος μου παρείχε συμβουλές και καθοδήγηση σχετικά με την διαχείριση των κυτταρικών δειγμάτων, καθώς και για την εκπόνηση της παρούσας διατριβής. Επίσης, δεν μπορώ να παραλείψω να αναφέρω την εξαιρετική συνεργασία που είχα με τον Θεοχάρη Νάζο, της ερευνητικής ομάδας του καθηγητή κ. Γανωτάκη, στις μετρήσεις ολικών χλωροφυλλών των κυττάρων, καθώς και τις επικοινωνιακές συζητήσεις που αναπτύξαμε σχετικά με την πρόοδο και τις προοπτικές της παρούσας εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να αναφέρω την τεράστια ηθική υποστήριξη της οικογένειάς μου, που από την αρχή των βημάτων μου στο πεδίο της χημείας έδειξαν την εμπιστοσύνη τους στις δυνατότητές μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη	10
Abstract	11
Κεφάλαιο 1	12
1.1 Σκοπός προσδιορισμού μεταλλικών στοιχείων σε κύτταρα	13
1.2 Τεχνικές προσδιορισμού μεταλλικών στοιχείων σε κύτταρα	14
1.3 Ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων μέσω φασματομετρίας μαζών επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (SC ICP-MS)	15
1.3.1 Αρχικές προσπάθειες κατανόησης της συμπεριφοράς των κυττάρων στο ICP	15
1.4 Φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS)	23
1.4.1 Ιστορική αναδρομή	23
1.4.2. Αρχή λειτουργίας	23
Κεφάλαιο 2	28
2.1 Ανάπτυξη κι επώαση κυττάρων σε βαρέα μέταλλα	28
2.2 Μέτρηση πληθυσμού κυττάρων και ολικής χλωροφύλλης	29
2.3 Διερεύνηση της διατήρησης της ακεραιότητας των <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> κατά την διαδικασία ανάλυσης	31
2.4 Προετοιμασία δειγμάτων κυττάρων <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> για ανάλυση με το ICP-MS .	32
2.5 Ανάλυση δειγμάτων καλλιιεργειών <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> επωασμένων σε Μόλυβδο (Pb)	33
2.5.1. Προσδιορισμός Pb σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard introduction system	33
2.5.2. Κατεργασία κυττάρων με χηλικό αντιδραστήριο (EDTA) και προσδιορισμός Pb με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard introduction system	38
2.5.3. Προσδιορισμός Ολικής Μάζας Pb με τη μέθοδο του συμβατικού ICP-MS (Conventional ICP-MS) και το Standard introduction system	39
2.6 Ανάλυση δειγμάτων καλλιιεργειών <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> επωασμένων σε As (III).....	40
2.6.1. Προσδιορισμός As (III) σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard introduction system	40
2.6.2. Προσδιορισμός Ολικής Μάζας As(III) με τη μέθοδο του Conventional ICP-MS και το Standard introduction system	40
2.6.3. Προσδιορισμός As (III) σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το υψηλής απόδοσης σύστημα εισαγωγής (High Efficiency Nebulization Introduction ή HEN).....	41
2.6.4. Προσδιορισμός Ολικής Μάζας As (III) με τη μέθοδο του Conventional ICP-MS και το HEN introduction system.....	43
2.7 Ανάλυση δειγμάτων καλλιιεργειών <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> επωασμένων σε As (V)	44
2.7.1. Προσδιορισμός As (V) σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard introduction system	44

2.7.2. Προσδιορισμός ολικής μάζας As (V) με τη μέθοδο του Conventional ICP-MS και το Standard introduction system	44
2.7.3. Προσδιορισμός As (V) σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το HEN introduction system.....	44
2.7.4. Προσδιορισμός ολικής μάζας As(V) με τη μέθοδο του Conventional ICP-MS και το HEN introduction system	45
2.8 Ανάλυση δειγμάτων καλλιιεργειών <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> επωασμένων σε Cd.....	45
2.8.1. Προσδιορισμός Cd σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard introduction system.....	45
2.8.2. Προσδιορισμός ολικής μάζας Cd με τη μέθοδο του Conventional ICP-MS και το Standard introduction system.....	46
2.8.3. Προσδιορισμός Cd σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το HEN introduction system.....	46
2.8.4. Προσδιορισμός ολικής μάζας Cd με τη μέθοδο του Conventional ICP-MS και το HEN introduction system.....	47
2.9 Ανάλυση δειγμάτων καλλιιεργειών <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> για Θείο (S) και Φώσφορο (P)	47
2.9.1. Προσδιορισμός S και P σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS με DRC και το Standard introduction system.....	48
2.9.2. Προσδιορισμό ολικής μάζας S και P με τη μέθοδο του Conventional ICP-MS με DRC και το standard introduction system.....	48
Κεφάλαιο 3	49
3.1 Εκτίμηση της ανάπτυξης των <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> παρουσία τοξικών μετάλλων.....	49
3.2 Αποτελέσματα μετρήσεων κυτταρικής αριθμητικής πυκνότητας κάθε δείγματος και ολικής χλωροφύλλης.....	52
3.3 Αποτελέσματα και συμπεράσματα από πειράματα με κυτταρομετρία ροής και μικροσκόπιο	55
3.4 Ανάλυση <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> επωασμένα σε Μόλυβδο (Pb)	57
3.4.1 Προσδιορισμός Pb σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard Introduction System.....	58
3.4.2 Προσδιορισμός Pb σε κύτταρα επωασμένα σε Pb μετά από κατεργασία με χηλικό αντιδραστήριο (EDTA) με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard introduction system.....	70
3.4.3 Σύγκριση κατανομών Pb σε κύτταρα επωασμένα σε Pb με και χωρίς κατεργασία με χηλικό αντιδραστήριο	71
3.4.4 Προσδιορισμός Ca σε μεμονωμένα κύτταρα επωασμένα σε Pb με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard introduction system.....	75
3.4.5 Προσδιορισμός Ca σε κύτταρα επωασμένα σε Pb με και χωρίς επώαση σε χηλικό αντιδραστήριο με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard Introduction System.....	80
3.4.6 Αποτελέσματα από τους υπολογισμούς ισοζυγίου μάζας για τον προσδιορισμό Pb και Ca σε πλυμένα με EDTA και μη κύτταρα επωασμένα σε Pb	84
3.5 Ανάλυση κυττάρων επωασμένα σε As (III) με το Standard Introduction System	86
3.5.1 Προσδιορισμός As(III) σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard Introduction System	86

3.5.2 Προσδιορισμός Ca σε μεμονωμένα κύτταρα επωασμένα σε As (III) με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard introduction system	91
3.5.3 Αποτελέσματα από τους υπολογισμούς ισοζυγίου μάζας για τον προσδιορισμό As στα κύτταρα επωασμένα σε As (III).....	96
3.6 Ανάλυση κυττάρων επωασμένα σε As (V) με το Standard Introduction System.....	98
3.6.1 Προσδιορισμός As (V) σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard Introduction System	98
3.6.2 Προσδιορισμός Ca σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard Introduction System.....	102
3.6.3 Σύγκριση αποτελεσμάτων As (III) και As (V) με το Standard Introduction System SC ICP-MS	105
3.6.4 Αποτελέσματα από τους υπολογισμούς ισοζυγίου μάζας για τον προσδιορισμό As και Ca σε κύτταρα επωασμένα σε As (V).....	108
3.7 Ανάλυση κυττάρων επωασμένα σε As (III) με το HEN Introduction System.....	109
3.7.1 Προσδιορισμός As (III) σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το HEN introduction system	109
3.7.2 Προσδιορισμός Ca σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το HEN introduction system	118
3.7.3 Αποτελέσματα από τους υπολογισμούς ισοζυγίου μάζας για τον προσδιορισμό As και Ca σε κύτταρα επωασμένα σε As (III) με το HEN introduction system.	123
3.8 Ανάλυση κυττάρων επωασμένα σε As (V) με το HEN Introduction System.....	124
3.8.1 Προσδιορισμός As(V) σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το HEN introduction system	124
3.8.2 Προσδιορισμός Ca σε μεμονωμένα κύτταρα σε κύτταρα επωασμένα σε As (V) με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το HEN Introduction System.....	131
3.8.3 Σύγκριση της πρόσληψης As (III) και As (V) με τη μέθοδο SC ICP-MS και το HEN Introduction System.....	135
3.8.4 Αποτελέσματα από τους υπολογισμούς ισοζυγίου μάζας για τον προσδιορισμό As και Ca σε κύτταρα επωασμένα σε As (V) με το HEN introduction system.	138
3.9 Ανάλυση κυττάρων επωασμένα σε Cd με το Standard Introduction System	139
3.9.1 Προσδιορισμός Cd σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard introduction system	139
3.9.2 Προσδιορισμός Ca σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard introduction system	144
3.9.3 Αποτελέσματα από τους υπολογισμούς ισοζυγίου μάζας για τον προσδιορισμό Cd και Ca σε κύτταρα επωασμένα σε Cd με το Standard introduction system.....	145
3.10 Ανάλυση κυττάρων επωασμένα σε Cd με το HEN Introduction System.....	146
3.10.1 Προσδιορισμός Cd σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το HEN introduction system.....	146
3.10.2 Προσδιορισμός Ca σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το HEN Introduction System.....	151
3.10.3 Αποτελέσματα από τους υπολογισμούς ισοζυγίου μάζας για τον προσδιορισμό Cd και Ca σε κύτταρα επωασμένα σε Cd με το HEN introduction system	158

3.11 Ανάλυση δειγμάτων καλλιιεργειών <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> για Θείο (S) και Φώσφορο (P) με DRC και Standard Introduction System	159
3.11.1 Προσδιορισμός S στα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS με DRC και Standard introduction system	159
3.11.2 Προσδιορισμός P στα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard introduction system	162
3.11.3 Αποτελέσματα από τους υπολογισμούς ισοζυγίου μάζας για τον προσδιορισμό S και P σε control κύτταρα με το Standard introduction system	165
Κεφάλαιο 4	166
Συμπεράσματα.....	166
Μελλοντικοί στόχοι	168
Βιβλιογραφία	169

Περίληψη

Για να κατανοήσουμε το ρόλο που διαδραματίζουν τα χημικά στοιχεία (κυρίως μέταλλα) ή την επίδραση των μεταβολών των συγκεντρώσεων αυτών σε ένα βιολογικό οργανισμό, είναι σημαντικό να μπορούμε να τα προσδιορίζουμε ποσοτικά στο επίπεδο ενός κυττάρου παρά στο επίπεδο ενός ιστού, αποτέλεσμα συνδυασμού διαφορετικών τύπων κυττάρων. Η συμβατική μέθοδος προσδιορισμού μετάλλων σε κυτταρικούς πληθυσμούς μέσω της φασματομετρίας μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS) περιλαμβάνει τη χώνευση ενός κυτταρικού δείγματος με πυκνά οξέα και προσδιορισμού της μέσης μάζας μετάλλου στον κυτταρικό πληθυσμό. Παρόλα αυτά, η δεδομένη μέση μάζα μετάλλου δεν μας δίνει ολοκληρωμένη εικόνα για την κατανομή του δεδομένου μετάλλου σε ένα κυτταρικό πληθυσμό. Κατά συνέπεια, δεν μπορεί να αποδοθεί μέσω των αναλυτικών αποτελεσμάτων κάποια πιθανή διαφοροποίηση στο μεταλλικό περιεχόμενο των κυττάρων.

Η ανάπτυξη της τεχνικής χαρακτηρισμού νανοσωματιδίων μετάλλου με το ICP-MS (SP ICP-MS) έθεσε τις βάσεις για την εκκίνηση της ανάπτυξης της τεχνικής προσδιορισμού μετάλλων σε μεμονωμένα κύτταρα με το ICP-MS (SC ICP-MS). Η λειτουργία της τεχνικής του SC ICP-MS περιλαμβάνει την εισαγωγή αραιών αιωρημάτων κυττάρων (10^4 - 10^5 κύτταρα στο mL) συνηθέστερα μέσω πνευματικής εκνέφωσης σε ένα υψηλής θερμοκρασίας πλάσμα Αργού (Ar). Όταν μία σταγόνα που εμπεριέχει ένα κύτταρο εισέλθει στο πλάσμα Ar, τότε θα υποστεί εξάτμιση του διαλύτη, ενώ το κύτταρο θα ατομοποιηθεί στα χημικά στοιχεία που το απαρτίζουν. Τα παραγόμενα άτομα και τα ισότοπά τους θα ιοντιστούν, και τα ιόντα τους θα ανιχνευθούν μετά το πέρασμά-διαχωρισμό τους από τον αναλυτή μαζών.

Ο αριθμός των κυττάρων που εισάγονται στο πλάσμα ανά μονάδα χρόνου, που εξαρτάται από την απόδοση μεταφοράς του συστήματος εισαγωγής και από την αριθμητική πυκνότητα των κυττάρων στο αναλυόμενο αιώρημα, και η γρήγορη καταγραφή (της τάξεως των μs) της έντασης του σήματος είναι στοιχειώδεις πειραματικοί στόχοι που χαρακτηρίζουν την επιτυχή εφαρμογή του SC ICP-MS. Η γρήγορη καταγραφή απαιτείται, καθώς το σήμα από ένα κύτταρο διαρκεί 150-500 μs . Επιπλέον, τα κύτταρα πρέπει να διατηρούνται άθικτα κατά την μεταφορά τους στο ICP.

Στην παρούσα εργασία επιδεικνύεται η ανάπτυξη κι εφαρμογή της μεθόδου SC ICP-MS στη μελέτη της πρόσληψης βαρέων μετάλλων, όπως μόλυβδος (Pb), κάδμιο (Cd) και αρσενικό (As) στη μορφή αρσενικωδών (AsO_3^{3-}) και αρσενικικών (AsO_4^{3-}) ανιόντων, από κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* επωασμένα σε συγκεντρώσεις των προαναφερθέντων στοιχείων, καθώς και στον προσδιορισμό ενός ενδογενούς για το κύτταρο μέταλλο όπως το ασβέστιο (Ca). Συμπληρωματικά με το συμβατικό σύστημα εισαγωγής στο ICP (Standard Introduction System), συναρμολογείτε ένα υψηλής απόδοσης σύστημα εισαγωγής (HEN Introduction System) με σκοπό την εφαρμογή του στο SC ICP-MS, ενώ τα

αποτελέσματα των αναλύσεων SC ICP-MS που εξάγονται με τα δύο συστήματα εισαγωγής συγκρίνονται μεταξύ τους. Ιστογράμματα μάζας μετάλλου ανά κύτταρο δείχνουν ότι η μέση πρόσληψη Cd και As προσδιορίζεται στα 1-3 fg ενώ η μέση πρόσληψη Pb προσδιορίζεται στα 12-17 fg για τις υψηλές συγκεντρώσεις επώασης των κυττάρων στα προαναφερθέντα στοιχεία. Τα αποτελέσματα της επώασης των κυττάρων σε αιθυλενοδιάμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) και ακόλουθης ανάλυσής τους με SC ICP-MS προτείνουν πως το Ca που εντοπίζεται στα κύτταρα βρίσκεται στο κυτταρικό περιβάλλον κι επηρεάζεται από τη συγκέντρωση του εξωκυττάρου Ca. Η τεχνική παρουσιάζει αξιοσημείωτη ευαισθησία, προσδιορίζοντας στοιχεία σε επίπεδο ag. Τα αποτελέσματα που εξάγονται με την τεχνική του SC ICP-MS συγκρίνονται με την συμβατική μέθοδο ανάλυσης (Conventional ICP-MS) μέσω υπολογισμού ισοζυγίων μάζας, και η καλή συμφωνία μεταξύ των δύο μεθόδων επιβεβαιώνει την αξιοπιστία του SC ICP-MS.

Abstract

In order to gain a better insight into the metallome of a biological organism and investigate the impact of changes in the concentration levels of elements on biochemical processes taking place in a given biological organism, it is important to quantitate metals in individual cells rather than at the level of a tissue, consisting of different types of cells. The conventional method for quantitating the metal content of a biological sample by using Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) is by digesting an ensemble of cells and analyzing the resulting digest in order to determine the average metal mass per cell. However, the given average value gives us only half the picture, as the average metal content may not reflect a possible metal content variation.

The development of the method for characterizing metallic nanoparticles through the use of the ICP-MS (SP ICP-MS) set the foundation for the development of a method for determining metals at the single cell level through the use of the ICP-MS (SC ICP-MS). The operation of SC ICP-MS involves the introduction of dilute cell suspensions, that is 10^4 - 10^5 cells/mL, via pneumatic aspiration into a high-temperature Ar plasma. Upon entering the plasma, each aerosol droplet that contains a cell is evaporated and the remaining single cell is atomized into its constituent elements. The resulting atoms and their isotopes are then ionized, separated by the mass analyzer and detected.

The number of cells entering the plasma per unit of time, depending on the transport efficiency of the introduction system and the cell number density in the suspension, and the fast (μ s scale) data acquisition are fundamental goals for the successive application of SC ICP-MS. The fast data acquisition is needed because a cell signal lasts between 150-500 μ s. Furthermore, cells should keep their integrity throughout their transport to the plasma.

This work demonstrates the development and application of SC ICP-MS to the study of heavy metal, such as lead (Pb), cadmium (Cd) and arsenic (As) in the form of arsenous (AsO_3^{3-}) and arsenic (AsO_4^{3-}) anions, uptake by *Chlamydomonas reinhardtii* cells upon incubation in concentrations of the given metals, as well as to the determination of endogenous metals such as calcium (Ca). A High Efficiency Introduction System (HEN Introduction System) is assembled for the purpose of SC ICP-MS, and the SC ICP-MS results taken with the two Introduction Systems are compared. Histograms depicting the metal amount per cell show that the mean Cd and As uptake is determined at 1-3 fg while the mean Pb uptake is determined at 12-17 fg for cells incubated in the highest metal concentrations. Results emerging from the SC ICP-MS analysis of the cells following their treatment with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) suggest that Ca is located on the cell wall and is affected by the concentration of the existing dissolved Ca outside the cell. The SC ICP-MS technique demonstrates great sensitivity, as it is in the position to measure ag amounts of metals in single cells. SC ICP-MS is compared with Conventional ICP-MS through mass balance calculations, and the agreement of the two techniques demonstrates the reliability of SC ICP-MS.

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή-Θεωρητικό υπόβαθρο

1.1 Σκοπός προσδιορισμού μεταλλικών στοιχείων σε κύτταρα

Τα μεταλλικά στοιχεία είναι αναγκαία για μία πληθώρα βασικών βιολογικών διεργασιών. Μέταλλα μετάπτωσης όπως ο Ψευδάργυρος (Zn), Χαλκός (Cu) και Σίδηρος (Fe) δεσμεύονται σε πρωτεΐνες δημιουργώντας σύμπλοκα (μεταλλοπρωτεΐνες) που δρουν ως καταλύτες σε βιοχημικές πορείες των κυττάρων και κατ' επέκταση των ιστών. Τα μεταλλικά στοιχεία όμως πρέπει να βρίσκονται σε καθορισμένα επίπεδα συγκέντρωσης για να εξασφαλιστεί η βιωσιμότητα του κυττάρου, καθώς μεταβολές στις ισορροπίες των συγκεντρώσεων αυτών των στοιχείων σε ένα κύτταρο μπορεί να επηρεάσει λειτουργίες του μέχρι και σε σημείο κυτταρικού θανάτου. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί ο Fe ο οποίος σε συνθήκες υπερφόρτωσης του κυττάρου αποτελεί απειλή δρώντας σαν καταλύτης στην παραγωγή ελευθέρων ριζών οι οποίες καταστρέφουν βασικά μέρη του κυττάρου και το οδηγούν σε θάνατο[1]. Ακόμη, μεταβολές στα επίπεδα ιχνοστοιχείων μπορεί να σχετίζονται με θάνατο των κυττάρων του νευρικού συστήματος σε διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως η νόσος του Πάρκινσον, το Alzheimer ή η Αμυοτροφική Πλάγια Σκλήρυνση με την προώθηση ελευθέρων ριζών[2]. Το τελευταίο έχει γίνει και αντικείμενο μελέτης κατά την οποία έγινε προσδιορισμός και διερεύνηση της χημικής κατάστασης αυτών των ιχνοστοιχείων στα κύτταρα με τη μέθοδο του φθορισμού μέσω ακτινών X (Synchrotron X-ray fluorescence) με σκοπό την κατανόηση του ρόλου αυτών των στοιχείων στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες.[3]

Γιατί όμως ο προσδιορισμός του μεταλλικού περιεχομένου ενός βιολογικού συστήματος να θα πρέπει να γίνεται σε επίπεδο κυττάρων? Το κύτταρο είναι η απλούστερη βιολογική μονάδα στην οποία μπορεί να λαμβάνουν χώρα οι διάφορες μεταβολές στις συγκεντρώσεις των ιχνοστοιχείων που εν δυνάμει μεταβάλλουν τις βιοχημικές πορείες. Οι πιθανότητες λοιπόν να κατανοήσει κάποιος την αιτία των μεταβαλλόμενων βιοχημικών διαδικασιών στο απλούστερο βιολογικό σύστημα του κυττάρου είναι περισσότερες σε σχέση με το επίπεδο ενός ιστού, αποτέλεσμα συνδυασμού διαφορετικών τύπων κυττάρων. Κι ακόμη κι αν το μεταλλικό περιεχόμενο δεν αντικατοπτρίζει κατ' ανάγκη τη βιοχημεία σε ένα κύτταρο, παρατηρούμενες μεταβολές στην ποσότητα των ιχνοστοιχείων μπορούν να δώσουν το έναυσμα και την ώθηση για μια πιο διεξοδική εξέταση των βιολογικών μοριακών διαδικασιών στο κύτταρο[4].

1.2 Τεχνικές προσδιορισμού μεταλλικών στοιχείων σε κύτταρα

Έως τώρα, οι δυνατότητες που υπάρχουν για προσδιορισμό μετάλλων σε μεμονωμένα κύτταρα είναι περιορισμένες, κυρίως λόγω ανεπαρκούς ευαισθησίας και επιλεκτικότητας που προσφέρουν οι μέχρι τώρα ανεπτυγμένες αναλυτικές τεχνικές. Στις τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί έως τώρα για την ανάλυση μετάλλων σε μεμονωμένα κύτταρα συμπεριλαμβάνονται το Synchrotron X-ray fluorescence, η εκρόφηση με λέιζερ συζευγμένη με φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (LA-ICP-MS) και η χρήση φθορίζοντων ουσιών επιλεκτικές για μέταλλα. Παρά το γεγονός ότι προσφέρουν αρκετά πλεονεκτήματα όπως η δυνατότητα χωρικής απεικόνισης των μετάλλων στα κύτταρα, η πολύπλοκη προετοιμασία του δείγματος, οι μεγάλοι χρόνοι ανάλυσης και οι παρεμποδίσεις από τη μήτρα των δειγμάτων αποτελούν περιορισμούς για την πιο εκτεταμένη χρήση τους ως τεχνικών ρουτίνας, και από επιστήμονες εκτός των αναλυτικών χημικών. Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, υπάρχει η ανάγκη για ανάπτυξη τεχνικών που θα παρέχουν τη δυνατότητα ευαίσθητης κι επιλεκτικής ανίχνευσης μετάλλων και μεταλλοειδών στο επίπεδο του κυττάρου ενώ ταυτόχρονα θα ξεπερνούν τους περιορισμούς των άλλων τεχνικών.

Μέχρι πρόσφατα, ο ποσοτικός προσδιορισμός μεταλλικών στοιχείων σε κυτταρικούς πληθυσμούς με την τεχνική του ICP-MS περιλάμβανε τη χώνευση του κυτταρικού αιωρήματος ή των καθιζανόντων μετά από φυγοκέντρηση κυττάρων με πυκνά οξέα για την οξείδωση του κυττάρου και πλήρη διαλυτοποίηση των στοιχείων που αυτό εμπεριείχε. Μετά την προαναφερθείσα κατεργασία του κυτταρικού αιωρήματος ακολουθούσε προσδιορισμός της συνολικής μάζας των στοιχείων ανά όγκο δείγματος[5], που εισάγεται στο ICP-MS ανά μονάδα χρόνου. Η συνολική μάζα του στοιχείου κανονικοποιείται ως μέση μάζα ανά κύτταρο, γνωρίζοντας τον αριθμό των κυττάρων που υπάρχουν ανά εισαγόμενο όγκο δείγματος. Αν κι αυτή η μέθοδος μπορεί να μας παρέχει τη μέση ποσότητα μετάλλου ανά κύτταρο, η αδυναμία της να προσδιορίσει την κατανομή του μετάλλου στον εκάστοτε κυτταρικό πληθυσμό και κατ' επέκταση να αποκαλύψει τις μικρές ή μεγάλες μεταβολές των επιπέδων του στοιχείου αυτού ανά κυτταρική μονάδα την καθιστά ανεπαρκή. Ας πάρουμε το παράδειγμα που μία καλλιέργεια κυττάρων υποβάλλεται σε αντικαρκινική θεραπεία με χορήγηση της ένωσης $\text{Cl}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{Pt}$ (Cis-Platin) και η μέση πρόσληψη Pt παρατηρείται να έχει διπλασιαστεί σε κάποια χρονική στιγμή της θεραπείας. Ο διπλασιασμένος μέσος όρος πρόσληψης οφείλεται στο γεγονός ότι όλα τα κύτταρα διπλασίασαν το περιεχόμενό τους σε Pt, ή στο ότι το 10% των κυττάρων εμφάνισε αύξηση της μάζας Pt κατά 11 φορές ενώ το υπόλοιπο 90% έμεινε αμετάβλητο? Επίσης, ο προκύπτων μέσος όρος δεν αντικατοπτρίζει αποκλειστικά τη μέση μάζα μετάλλου ανά κύτταρο αλλά περιλαμβάνει και τη συνεισφορά της μάζας του διαλυτού μετάλλου στο αιώρημα.

1.3 Ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων μέσω φασματομετρίας μαζών επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (SC ICP-MS)

1.3.1 Αρχικές προσπάθειες κατανόησης της συμπεριφοράς των κυττάρων στο ICP

Η 1η βιβλιογραφική αναφορά για εισαγωγή μεμονωμένων κυττάρων στο ICP-MS σημειώνεται από τον Li και τους συνεργάτες του[6]. Στόχος της εργασίας ήταν η διερεύνηση της συμπεριφοράς των κυττάρων στο πλάσμα από το στάδιο της εισαγωγής τους έως την ανίχνευσή τους, καθώς και της πιθανότητας ποσοτικού προσδιορισμού του μεταλλικού περιεχομένου του κυττάρου με τη χρήση προτύπων διαλυμάτων του μετάλλου προς προσδιορισμό.

Το κύτταρο-μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε είναι το βακτήριο *Bacillus subtilis*, καλλιέργεια του οποίου αναπτύχθηκε με προσθήκη 14 mg/L (ppm) διαλυτού Ουρανίου (U). Τα όργανο ICP-MS με το οποίο διεξήχθη η έρευνα ήταν τύπου μαγνητικού τομέα. Ανάλυση τύπου Time-Resolved ICP-MS (καταγραφή της έντασης ^{238}U συναρτήσει του χρόνου) επιτεύχθηκε με καταγραφή της έντασης ^{238}U κάθε 400 ms (τυπική καταγραφή) και κάθε 4 ms (γρήγορη καταγραφή).

Αποτελέσματα από την εφαρμογή χρωματογραφίας τύπου Perfusion[7], παραλλαγή της χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού, σε δείγματα ακέραιων κυττάρων, μερικώς λυμένων κυττάρων και σε 10 ng/mL (ppb) προτύπου διαλύματος U έδειξαν ξεχωριστή κατακράτηση για τα ακέραια κύτταρα, υποδηλώνοντας την ύπαρξη κυτταρικού U. Εφαρμόζοντας Time-Resolved ICP-MS με τη μέθοδο της γρήγορης καταγραφής (4 ms) για τα 10 ppb προτύπου διαλύματος U και για το αιώρημα των κυττάρων, του οποίου η κυτταρική αριθμητική πυκνότητα ήταν 10^8 cells/mL, παρατηρήθηκε πως το κυτταρικό αιώρημα επιδείκνυε παλμούς στο καταγραφόμενο σήμα ^{238}U . Αντιθέτως, το σήμα ^{238}U διατηρείτο σταθερό για τα 10 ppb προτύπου διαλύματος U. Το συγκεκριμένο εύρημα πρότεινε πως η συμπεριφορά των κυττάρων στο πλάσμα προσομοιάζει τη συμπεριφορά σωματιδίων μετάλλου στο επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP).

Η συμπεριφορά σωματιδίων μετάλλου είχε ήδη ξεκινήσει να μελετάται από τον Dziwiatkoski και τους συνεργάτες του[8]. Η μελέτη περιλάμβανε την εισαγωγή μεμονωμένων μονοδιάστατων σταγόνων από πρότυπο διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης (της τάξεως των ppm) του μετάλλου προς προσδιορισμό στο ICP. Η σχέση σταγόνας και σωματιδίου έγκειται στο γεγονός ότι μετά την εισαγωγή της στο ICP η σταγόνα μετατρέπεται σε στερεό σωματίδιο μετάλλου μέσω της εξάτμισης του διαλύτη. Μετά τις διεργασίες ατομοποίησης και ιοντισμού, το στερεό σωματίδιο θα αποδώσει ένα νέφος ιόντων του μετάλλου από το οποίο αποτελείται. Με την προϋπόθεση της γρήγορης καταγραφής (της τάξεως των μs) η ανίχνευση του νέφους των ιόντων του κάθε σωματιδίου θα αποδοθεί σαν παλμός στο καταγραφόμενο σήμα.

Προσπαθώντας να διερευνήσει κάποιον πιθανό τρόπο ποσοτικού προσδιορισμού του κυτταρικού μετάλλου, ο Li και οι συνεργάτες του προχώρησαν σε σύγκριση της έντασης σήματος ^{238}U για τα

ακέραια και λυμένα (μέσω υπερήχων) κύτταρα. Παρατηρήθηκε ότι η ένταση του U προερχόμενο από τα ακέραια κύτταρα ήταν χαμηλότερη κατά 31 % σε σχέση με αυτή που καταγράφηκε για τα λυμένα κύτταρα. Έτσι, ειπώθηκε πως η απόκλιση στην ένταση ^{238}U οφείλεται σε διαφορετική απόδοση των διεργασιών ατομοποίησης και ιοντισμού του μετάλλου όταν αυτό είναι κυτταρικό σε σχέση με την περίπτωση αυτό να υφίσταται στο διάλυμα (εξωκυττάριο). Επίσης, προτάθηκε πως η ποσοτικοποίηση του κυτταρικού μετάλλου είναι εν δυνάμει εφικτή με τη χρήση προτύπων διαλυμάτων με την προϋπόθεση ορισμού ενός συντελεστή διόρθωσης.

Αν και τα ευρήματα της εργασίας του Li και των συνεργατών του ήταν ενθαρρυντικά όσο αφορά την ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων με το ICP-MS, η εργασία άφησε γνωστικά κενά όπως ο τρόπος βαθμονόμησης για τον ακριβή προσδιορισμό του κυτταρικού κι εξωκυττάριου μετάλλου, καθώς και ο τρόπος εισαγωγής των κυττάρων στο ICP ώστε να αναλύεται ένα και μόνο κύτταρο στο δεδομένο χρόνο καταγραφής.

1.3.2. Εκκίνηση ανάπτυξης της τεχνικής του SC ICP-MS μέσω της ανάπτυξης του SP ICP-MS

Δεδομένου ότι τα κύτταρα συμπεριφέρονται σαν σωματίδια στο ICP η ανάπτυξη της τεχνικής του χαρακτηρισμού νανοσωματιδίων μετάλλου (NPs) με το ICP-MS (SP ICP-MS) έθεσε τις βάσεις για την ανάπτυξη του SC ICP-MS, εισάγοντας τις έννοιες της απόδοσης μεταφοράς μάζας μετάλλου στο ICP (Transport Efficiency, TE%) και της χρησιμοποίησης μικρού ($\leq 10\text{ms}$) dwell time (χρόνος σάρωσης συγκεκριμένου m/z από το τετράπολο) άρα και γρήγορης καταγραφής.

Σε αντίθεση με την συμβατική μέθοδο ανάλυσης με το ICP-MS (Conventional ICP-MS) που λειτουργεί με dwell time μεταξύ 100-300 ms, το SP ICP-MS λειτουργεί με αρκετά μικρότερα dwell time ($\leq 10\text{ms}$). Αν το αιώρημα των νανοσωματιδίων (NPs) περιέχει διαλυτό μέταλλο, τα ιόντα του μετάλλου θα είναι ομοιογενώς καταναμημένα στο διάλυμα και άρα η μάζα διαλυτού μετάλλου που θα εισέρχεται στο πλάσμα ανά μονάδα χρόνου θα είναι σταθερή δεδομένης της σταθερής ροής πρόσληψης δείγματος (sample uptake rate). Ο σταθερός ρυθμός εισαγωγής μάζας μετάλλου στο ICP συνεπάγεται σταθερό αριθμό προσέλευσης ατομικών ιόντων μετάλλου στον ανιχνευτή, κι άρα το καταγραφόμενο σήμα θα παραμένει σταθερό και θα αντιπροσωπεύει την ένταση του διαλυτού μετάλλου στο αιώρημα. Όσο αφορά την ανίχνευση NPs, από την εισαγωγή ενός NP στο ICP θα προκύψει ένα νέφος ιόντων λόγω της μεγάλης αριθμητικής πυκνότητας ατόμων μετάλλου ανά NP. Η παραγωγή παλμού, που δηλώνει ανίχνευση ενός NP, προκύπτει από το συνδυασμό της γρήγορης καταγραφής (dwell time $\leq 10\text{ms}$) και του μεγαλύτερου αριθμού ιόντων προερχόμενων από το NP που ανιχνεύονται ανά dwell time σε σχέση με τον αριθμό των ιόντων του διαλυτού μετάλλου. Η μείωση του dwell time (μείωση του χρόνου σάρωσης του συγκεκριμένου m/z από το τετράπολο) μειώνει την

ένταση του διαλυτού μετάλλου τόσο ώστε αυτή να είναι αμελητέα σε σχέση με αυτήν αντιστοιχεί σε NP.

Η θεμελιώδης υπόθεση πάνω στην οποία βασίζεται το SP ICP-MS είναι ο κάθε παλμός να αντιπροσωπεύει ένα NP. Αυτό ρυθμίζεται μέσω της εισαγωγής αιωρημάτων κατάλληλης αριθμητικής πυκνότητας NPs έτσι ώστε να αποφευχθεί η ανίχνευση πολλαπλών NPs. Εάν κάθε παλμός αντιπροσωπεύει ένα NP, τότε η συχνότητα των παλμών συσχετίζεται με την αριθμητική πυκνότητα των NPs στο αιώρημα ενώ η ένταση του κάθε παλμού (ύψος ή ολοκλήρωμα παλμού) συσχετίζεται μέσω βαθμονόμησης με τη μάζα μετάλλου που εμπεριέχει το κάθε NP[9].

Για τον προσδιορισμό της αριθμητικής πυκνότητας NPs σε ένα αιώρημα και την βαθμονόμηση (εισαγωγή προτύπων διαλυμάτων) προς προσδιορισμού της μάζας μετάλλου ανά NP, βασικής σημασίας κρίνεται ο προσδιορισμός της απόδοσης μεταφοράς (TE%). Η TE% ορίζεται ως ο λόγος της μάζας του αναλύτη που φτάνει στο ICP προς τη μάζα αναλύτη που εισάγεται μέσω του συστήματος εισαγωγής δείγματος του ICP-MS. Όσο αφορά τον προσδιορισμό της αριθμητικής πυκνότητας των NPs στο αιώρημα, η TE% αποδίδει τον όγκο αιωρήματος και άρα και τον αριθμό των NPs που φτάνουν στο πλάσμα σε σχέση με τον όγκο και τον αριθμό NPs που εισάγονται. Άρα, γνωρίζοντας την TE%, είμαστε σε θέση να εφαρμόσουμε SP ICP-MS για να προσδιορίσουμε την αριθμητική πυκνότητα των NPs σε ένα δείγμα. Η ανάγκη ενσωμάτωσής της TE% στην βαθμονόμηση έγκειται στο γεγονός ότι η μεταφορά της μάζας μετάλλου μέσω του συστήματος εισαγωγής προς το ICP διαφέρει όταν το μέταλλο υφίσταται ως NP ή όταν αυτό υφίσταται σε διαλυτή μορφή. Έτσι προσδιορίζοντας την TE% μέσω της εισαγωγής αιωρήματος μονοδιάστατων NPs με καθορισμένη αριθμητική πυκνότητα άρα και μάζα μετάλλου, γνωρίζουμε το ποσοστό της σωματιδιακής μάζας μετάλλου που μεταφέρεται προς το ICP. Έχει μάλιστα αποδειχθεί από την εργασία της Pace και των συνεργατών της[9] πως είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν NPs διαφορετικής σύστασης σε μέταλλο απ' ότι τα NPs στο άγνωστο δείγμα για τον προσδιορισμό της TE% και άρα και της συσχέτισης σήματος αγνώστου NP με τη μάζα που αυτό περιέχει.

Η μέθοδος του SP ICP-MS έχει εφαρμοστεί με το τυπικό σύστημα εισαγωγής (εκνεφωτής, θάλαμος εκνέφωσης) του ICP-MS, μέσω του οποίου έχουμε μαζική εισαγωγή σταγόνων στο ICP ανά μονάδα χρόνου, αλλά και με την εισαγωγή μεμονωμένων σταγόνων καθορισμένου μεγέθους και οι οποίες παράγονται με συγκεκριμένη συχνότητα. Στην δεύτερη περίπτωση, ο παράγοντας TE% δεν χρειάζεται να προσδιοριστεί για τις ανάγκες της βαθμονόμησης παρά μόνο για την εύρεση της αριθμητικής πυκνότητας NPs στο άγνωστο αιώρημα[10]. Εφόσον παράγονται σταγόνες καθορισμένου μεγέθους, είναι εύκολο να εισαχθούν σταγόνες από πρότυπα διαλύματα μετάλλου και να συσχετίσουμε άμεσα την ένταση σήματος με τη μάζα μετάλλου μέσω της σχέσης της πυκνότητας δεδομένου ότι οι

σταγόνες έχουν σφαιρικό σχήμα. Επομένως, είναι εφικτή η άμεση αντιστοίχιση της έντασης του παλμού ενός NP με τη μάζα μετάλλου που αυτό εμπεριέχει.

Οι τεχνικές του SC ICP-MS και του SP ICP-MS μοιράζονται την ίδια αρχή λειτουργίας (μεμονωμένα κύτταρα όπως και NPs παράγουν παλμούς στο καταγραφόμενο σήμα) κι εμφανίζουν κοινά στοιχεία, όπως η ανάγκη προσδιορισμού της TE% και η εισαγωγή αιωρημάτων κυττάρων κατάλληλης αριθμητικής πυκνότητας ώστε να αποφευχθεί η πιθανότητα ανίχνευσης πολλαπλών κυττάρων. Η υπάρχουσα βιβλιογραφία πάνω στην τεχνική του SC ICP-MS περιλαμβάνει την ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων μέσω εισαγωγής τους με το τυπικό σύστημα εισαγωγής (εκνεφωτής, θάλαμος εκνέφωσης), καθώς και με συστήματα εισαγωγής μεμονωμένων σταγόνων τύπου microdroplet dispenser.

1.3.3. Ανάπτυξη SC ICP-MS με τυπικό σύστημα εισαγωγής (εκνεφωτής, θάλαμος εκνέφωσης) κι εφαρμογή του στην ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων

Το 2010 γίνεται από τον Ho και τους συνεργάτες του[11] μία αναφορά πάνω στην εφαρμογή του SC ICP-MS στην ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων. Σκοπός της εργασίας ήταν η ανάπτυξη κι εφαρμογή του SC ICP-MS στον προσδιορισμό μαγνησίου (Mg) σε μεμονωμένα κύτταρα τύπου *Chlorella Vulgaris*, μονοκύτταρο φωτοσυνθετικό πράσινο άλγος με μέγεθος 1-6 μm, καθώς και στον κινητική μελέτη της πρόσληψης τρισθενούς χρωμίου (Cr⁺³) από τα προαναφερθέντα κύτταρα. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε καλλιέργεια, απομονώθηκαν και μετρήθηκε ο πληθυσμός τους με τη μέθοδο του αιμοκυτταρομέτρου τύπου Newbauer. Η αριθμητική πυκνότητα των κυττάρων στο αιώρημα που εισήχθη στο ICP-MS ήταν 10⁶ cells/mL. Κυτταρικά δείγματα αναλύθηκαν και με τη μέθοδο του Conventional ICP-MS μετά από χώνευση σε πυκνό νιτρικό οξύ (HNO₃) με σκοπό τη σύγκριση των τεχνικών Conventional και SC ICP-MS μέσω υπολογισμού ισοζυγίων μάζας. Η οργανολογία μέσω της οποίας εισήχθη το κυτταρικό δείγμα στο ICP-MS περιλάμβανε τη χρήση ενός συνδέσμου τύπου T ο οποίος συνέδεε τις ροές απιονισμένου νερού (0.36 mL/min) και του κυτταρικού δείγματος (0.04 mL/min) προς παραγωγή μίας τελικής ροής 0.40 mL/min, η οποία αποτελούσε και το ρυθμό πρόσληψης δείγματος προς το σύστημα εισαγωγής δείγματος του ICP-MS. Το σύστημα εισαγωγής δείγματος περιλάμβανε τη χρήση εκνεφωτή τύπου V-groove προσαρτημένο σε έναν υδρόψυκτο θάλαμο εκνέφωσης διπλής διαδρομής τύπου Scott, ενώ το ICP-MS χρησιμοποιήθηκε με τη μέθοδο Time-Resolved ICP-MS με γρήγορη καταγραφή της έντασης σήματος του ²⁵Mg (dwell time 10 ms). Οι συγγραφείς δεν αναφέρουν λεπτομέρειες για το dead time του ανιχνευτή, οπότε ο χρόνος καταγραφής ενδέχεται να είναι κατά εκατοντάδες μs μεγαλύτερος του dwell time. Εισάγοντας κυτταρικά αιωρήματα με κυτταρική αριθμητική πυκνότητα 3×10⁵-1.2×10⁶ cells/mL οι ερευνητές

αποδεικνύουν ότι υπάρχει γραμμική συσχέτιση μεταξύ αριθμητικής πυκνότητας και αριθμού ανιχνευόμενων παλμών, το οποίο σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η μέση ένταση των ανιχνευόμενων παλμών διατηρείται σταθερή συναρτήσει της κυτταρικής αριθμητικής πυκνότητας συνηγορεί στην ικανοποίηση των συνθηκών του SC ICP-MS. Πραγματοποιείται προσπάθεια σύγκρισης των κατανομών μεγέθους κυττάρων και έντασης ^{25}Mg ανά κύτταρο, και το μεγαλύτερο εύρος που επιδεικνύει η 2η κατανομή οφείλεται κατά τους ερευνητές στη διάχυση του νέφους των ιόντων μέσα στο πλάσμα. Βαθμονόμηση για συσχέτιση της έντασης ^{24}Mg με την μάζα Mg που ανιχνεύεται ανά κύτταρο γίνεται με 2 τρόπους, δηλαδή της εισαγωγής προτύπων διαλυμάτων Mg και ενσωμάτωση της TE% (1%, τυπική απόδοση μεταφοράς διαλυτού μετάλλου) στην καμπύλη βαθμονόμησης, καθώς και εισαγωγή αιωρήματος 100 nm MgO σωματιδίων. Κατά τον 2ο τρόπο βαθμονόμησης, το μέγεθος των σωματιδίων συσχετίζεται με τη μάζα Mg μέσω της σχέσης της πυκνότητας θεωρώντας ότι τα σωματίδια έχουν σφαιρικό σχήμα. Έτσι, η μέθοδος προσδιορίζει 4.47×10^8 και 1.09×10^8 άτομα Mg ανά κύτταρο για βαθμονόμηση με MgO σωματίδια και προτύπων διαλυμάτων Mg αντίστοιχα. Η μέθοδος βαθμονόμησης με MgO σωματίδια παρουσιάζει ιδιαίτερα καλή συμφωνία με το Conventional ICP-MS (4.20×10^8 άτομα Mg), ενώ η απόκλιση της βαθμονόμησης με πρότυπα διαλύματα Mg αποδίδεται στη διαφορά μεταφοράς του Mg όταν αυτό περιέχεται στο κύτταρο (ενδοκυτταρικό Mg^{+2}) σε σχέση με τη μεταφορά ομοιογενώς κατανεμημένων ιόντων Mg^{+2} από το διάλυμα (εξωκυτταρικό Mg^{+2}). Επιπλέον, διεξάχθηκαν και πειράματα μελέτης της κινητικής της πρόσληψης Cr^{+3} από τα άλγη με επώαση αυτών σε διάλυμα 1 ng/mL (ppb) Cr^{+3} . Η προσαρμογή των δεδομένων της μέσης μάζας Cr^{+3} ανά κύτταρο συναρτήσει του χρόνου επώασης προσομοιάζει κινητική 2ης τάξης.

Το 2011 γίνεται μία αναφορά [12] στην εφαρμογή του SC ICP-MS για τη διερεύνηση της πρόσληψης του κολλοειδούς υποκιτρικού Βισμούθιου (CBS), το οποίο χορηγείται σαν φάρμακο για την αντιμετώπιση της μόλυνσης στομάχου από το ελικοβακτήριο του πυλωρού, από τα κύτταρα τύπου *Helicobacter Pylori*. Τα κύτταρα (10^5 cells/mL) αναλύονται για Bi στο ICP-MS μετά από επώαση τους σε συγκεντρώσεις CBS. Με παρακολούθηση του ισότοπου ^{24}Mg (dwell time 10 ms, dead time δεν αναφέρεται) παρατηρείται ότι ο ρυθμός εμφάνισης κυτταρικών παλμών μειώνεται από 1 παλμό/s σε 0.7 παλμούς/s μετά από επώαση των κυττάρων σε 20 μg/mL CBS. Οι συγκρίσιμες κατανομές έντασης ^{209}Bi και ^{24}Mg ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 20 μg/mL CBS αναδεικνύουν συγκρίσιμα αποτελέσματα για τα 2 κύτταρα και υποδηλώνουν μία αξιοπιστία όσο αφορά τα αποτελέσματα για τη πρόσληψη Bi. Επίσης, η παρουσία συγκεντρώσεων τρισθενούς Fe επηρεάζει τη πρόσληψη Bi μειώνοντας τη μέση ένταση ^{209}Bi ανά κύτταρο ταυτόχρονα με τη μείωση της προόδου ανάπτυξης των κυττάρων (μέτρηση οπτικής πυκνότητας κυττάρων στα 600 nm). Όσο αφορά τη μελέτη πρόσληψης CBS μέσω της παρακολούθησης ^{209}Bi , προέκυψε ότι η μέση ένταση ^{209}Bi

ανά κύτταρο αυξάνεται μέχρι τις 8 ώρες επώασης της καλλιέργειας σε CBS κι έπειτα διατηρείται σταθερή. Αν και τα αποτελέσματα δεν είναι ποσοτικά, η αυξανόμενη ένταση ^{209}Bi δείχνει μία εικόνα της πρόσληψης Bi. Αναλύοντας κύτταρα επωασμένα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις επώασης σε CBS προέκυψε ότι η μέση ένταση ^{209}Bi αυξάνεται γραμμικά μέχρι τα 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CBS κι έπειτα διατηρείται σταθερή, ενώ η συχνότητα των κυτταρικών παλμών και η πρόοδος ανάπτυξης των κυττάρων πέφτουν σε συγκεντρώσεις επώασης $\geq 20 \mu\text{g}/\text{mL}$ CBS. Μέσω του Conventional ICP-MS προσδιορίστηκαν 9.8×10^5 άτομα Bi ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CBS. Παρόλα αυτά, οι συγγραφείς δεν δίδουν εξήγηση για το πώς ο δεδομένος αριθμός ατόμων Bi ανά κύτταρο αντιπροσωπεύει την πραγματική μέση πρόσληψη των κυττάρων σε Bi και δεν περιλαμβάνει τη συνεισφορά της μάζας του διαλυτού εξωκυττάρου Bi.

Το 2014 αναφέρεται από τον Miyashita και τους συνεργάτες του [13] η κατασκευή ενός βελτιωμένου συστήματος εισαγωγής κυττάρων στο ICP-MS συνοδευόμενο από μία χρονικά γρηγορότερη καταγραφή (μικρό dwell time έως 50 μs , μηδενικό dead time) της έντασης σήματος των στοιχείων. Η γρηγορότερη καταγραφή επιτυγχάνεται μέσω μίας εξωτερικής μονάδας καταγραφής των παλμών σήματος από τα ιόντα. Το βελτιωμένο σύστημα εισαγωγής δείγματος στο ICP-MS διατηρεί τη φιλοσοφία του τυπικού συστήματος εισαγωγής (εκνεφωτής, θάλαμος εκνέφωσης), αλλά περιλαμβάνει έναν υψηλής απόδοσης ομόκεντρο εκνεφωτή (High Performance Concentric Nebulizer) προσαρτημένο σε έναν γραμμικής διαδρομής θάλαμο εκνέφωσης με βοηθητική γραμμή αερίου Ar. Το βελτιωμένο σύστημα εισαγωγής (HECIS) δοκιμάστηκε στην ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων τύπου *S. cerevisiae*, *Synechocystis sp. PCC 6803*, *Cyanidioschyzon merolae 10D*, *Galdieria sulphuraria* και *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125 με παρακολούθηση διάφορων στοιχείων όπως ^{25}Mg , ^{27}Al , ^{31}P , ^{34}S , ^{39}K , ^{55}Mn . Έμφαση δόθηκε στην παρακολούθηση ^{31}P αφού με βάση τη συχνότητα των κυτταρικών παλμών που ανιχνεύθηκαν για το δεδομένο ισότοπο προσδιορίστηκε η TE% για κάθε κυτταρικό τύπο. Τα κύτταρα (8×10^4 cells/mL) εισήχθησαν μέσω εγχυτή δείγματος (injector) στον εκνεφωτή σε κινητή φάση 0.1% NaCl με sample uptake rate στα 0.01 mL/min. Δεδομένου ότι η πιθανότητα ανίχνευσης πολλαπλών κυτταρικών σημάτων ήταν 1% για dwell time 10 ms, η πιθανότητα πολλαπλών σημάτων εκμηδενίζεται για χρόνους καταγραφής της τάξεως των 50-100 μs . Παρατηρήθηκε ότι η TE% μειώνεται συναρτήσει του μεγέθους των κυττάρων; Επιτεύχθηκε TE% ίση με 86% για τα *Chlamydomonas reinhardtii*, τα μεγαλύτερα σε μέγεθος (6.4 μm) κύτταρα από τους προαναφερθέντες τύπους κυττάρων (το μέγεθος των υπόλοιπων κυτταρικών τύπων είναι 2-3 μm). Για τα μικρότερα μεγέθους κύτταρα επιτεύχθηκε σχεδόν απόλυτη ανάκτηση του αριθμού των κυττάρων που εισήχθησαν, αναδεικνύοντας την βελτιωμένη απόδοση του HECIS στο SC ICP-MS. Η γρηγορότερη καταγραφή (dwell time 50 μs) επέφερε αύξηση μέχρι και 22 φορές στο λόγο $\frac{\text{σήμα}}{\text{υπόβαθρο}}$ (S/B), με S την ένταση ενός κυτταρικού παλμού και B το σήμα του διαλυτού μετάλλου, σε σχέση με τον αντίστοιχο

λόγο για dwell time 10 ms. Η εργασία, βέβαια, δεν αναφέρει ποσοτικά αποτελέσματα ως προς τον προσδιορισμό P και των προαναφερθέντων μετάλλων στα κύτταρα.

Το 2015 ο Wang και οι συνεργάτες του[14] ανέπτυξε κι εφάρμοσε SC ICP-MS για προσδιορισμό Fe, Cu, Zn, Mn, P and S σε μεμονωμένα καρκινικά ανθρώπινα κύτταρα τύπου HeLa και A549, καθώς και σε υγιή επιθηλιακά κύτταρα τύπου 16HBE. Στόχος της εργασίας ήταν η διερεύνηση των μοτίβων κατανομής αυτών των μετάλλων στα κύτταρα. Για τον προσδιορισμό του Fe χρησιμοποιήθηκε η ενδιάμεση κυψελίδα πρόσκρουσης, που έφερε το συγκεκριμένο ICP-MS, στην οποία διοχετεύθηκε NH₃ για τη μείωση της έντασης του υποβάθρου σήματος που παρεμπόδιζε την ανίχνευση ⁵⁶Fe. Ανάλογη κίνηση έγινε για τον προσδιορισμό S και P, δηλαδή διοχετεύτηκε μοριακό O₂ στην κυψελίδα πρόσκρουσης προς παραγωγή των οξειδίων ⁴⁷PO, ⁴⁸SO αφού η ανίχνευση ³²S και ³¹P υποφέρει από παρεμποδίσεις με την τυπική μέθοδο ανίχνευσης. Το dwell time που επιλέχθηκε ήταν 5 ms, ενώ πληροφορίες για το dead time δεν αναφέρονται. Υποθέτουμε όμως ότι το dead time δεν είναι μηδενικό αφού ο αριθμός των κυτταρικών παλμών ⁵⁶Fe είναι μικρότερος για dwell time από 0.1-3 ms (μεγάλο dead time συνεπάγεται κατάλληλη διεύρυνση του dwell time για μείωση της πιθανότητας απώλειας κυτταρικών σημάτων). Το σύστημα εισαγωγής των κυττάρων περιλάμβανε έναν εκνεφωτή μικροροών (PFA-ST) προσαρτημένο σε ένα κυκλωνικό θάλαμο εκνέφωσης. Η απόδοση μεταφοράς των κυττάρων υπολογίστηκε στο 0.2% με βάση τους μετρούμενους κυτταρικούς παλμούς ⁵⁶Fe. Η βαθμονόμηση έγινε με πρότυπα διαλύματα από τα στοιχεία προς προσδιορισμό και χρησιμοποιώντας την απόδοση μεταφοράς του 1% (αναφερόμενη απόδοση προτύπων διαλυμάτων μετάλλων). Διαγράμματα τύπου Box plot επιδεικνύουν μεγαλύτερη μεταβλητότητα στην μέση μάζα στοιχείου ανά κύτταρο για τα HeLa σε σχέση με τα άλλα δύο είδη (A549, 16HBE cells). Τα υγιή κύτταρα (16HBE) εμφανίζουν χαμηλότερο περιεχόμενο σε στοιχεία (Zn, Cu, P, S) σε σχέση με τις 2 καρκινικές σειρές, καθώς επίσης και στενότερα εύρη μαζών στις κατανομές των δεδομένων στοιχείων. Το τελευταίο υποδηλώνει μια πιο ομοιογενή κατανομή των στοιχείων στα υγιή κύτταρα. Τα μέταλλα (Fe, Cu, Zn) προσδιορίζονται σε επίπεδα fg σε αντίθεση με τα στοιχεία (P, S) που προσδιορίζονται σε επίπεδα pg. Η σύγκριση SC ICP-MS με το Conventional ICP-MS δείχνει πολύ καλή συμφωνία μεταξύ των δύο μεθόδων.

1.3.4. Ανάπτυξη SC ICP-MS με σύστημα εισαγωγής μεμονωμένων σταγόνων κι εφαρμογή του στην ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων

Το 2013 η Shigeta και οι συνεργάτες της[15] αναπτύσσουν μέθοδο SC ICP-MS με παραγωγή μεμονωμένων σταγόνων από αιωρήματα κυττάρων και απευθείας εισαγωγή τους στο ICP-MS χωρίς την χρήση εκνεφωτή και θαλάμου εκνέφωσης. Βασικός σκοπός της εργασίας ήταν η εφαρμογή του

δεδομένου συστήματος εισαγωγής (micro droplet generator, μ DG) συζευγμένο με το ICP-MS στον προσδιορισμό στοιχείων (Cu, Zn, Mg, Na και Se) σε κύτταρα του τύπου *Saccharomyces cerevisiae* εμπλουτισμένα με Se, καθώς η δεδομένη οργανολογία είχε ήδη χρησιμοποιηθεί και βελτιστοποιηθεί στην απευθείας στοιχειακή ανάλυση μεμονωμένων σταγόνων παραγόμενες από πρότυπα διαλύματα μετάλλων. Το σύστημα εισαγωγής τύπου μ DG λειτουργεί με βάση έναν πιεζο-ηλεκτρικό κρύσταλλο ο οποίος αν του εφαρμοστεί παλμός δυναμικού επάγει την παραγωγή μεμονωμένων σταγόνων του διαλύματος που έχουμε εισάγει. Η συχνότητα και η διάμετρος των παραγόμενων σταγόνων εξαρτώνται από τις συνθήκες λειτουργίας (δυναμικό, διαστάσεις ακροφύσιου) του μ DG. Η σύζευξη του μ DG με το ICP-MS επιτυγχάνεται μέσω μίας σύνδεσης T τύπου Swagelok η οποία συνδέει τον σωλήνα αποδιαλύτωσης (προσαρτάται στο ακροφύσιο του μ DG) με μία παροχή Ar με κατεύθυνση τον εγχυτή δείγματος στο ICP (torch injector tube). Οι σταγόνες παράγονταν με συχνότητα 50 Hz, ενώ η διάμετρός τους ήταν 23 μ m. Κυτταρικά αιωρήματα αναλύθηκαν με SC και Conventional ICP-MS μετά από χώνευση των δειγμάτων για ολικό προσδιορισμό μετάλλων. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι ποσοτικά αποτελέσματα ανά κύτταρο δεν παρουσιάστηκαν με την τεχνική του SC αλλά μόνο με το Conventional ICP-MS. Στη δεύτερη περίπτωση η ολική μάζα μετάλλου κανονικοποιήθηκε ως μάζα μετάλλου ανά κύτταρο (0.91, 9.4, 5.9, 0.54, 1.2, 72 fg Na, Mg, Fe, Cu, Zn, Se αντίστοιχα), όμως δεν βλέπουμε πως ο δεδομένος μέσος όρος ανταποκρίνεται μόνο για τα κύτταρα κι όχι για το διαλυτό μέταλλο στο αιώρημα. Χρησιμοποιώντας dwell time 0.1 ms (δεν αναφέρεται το dead time) αποκαλύπτεται το προφίλ ενός κυτταρικού παλμού ^{63}Cu που αναφέρεται μεταξύ 400-500 μ s. Οι συγγραφείς υποστηρίζουν πως η δεδομένη διάρκεια είναι όμοια με τη διάρκεια του σήματος μίας σταγόνας διαλύματος υψηλής συγκέντρωσης Cu, γεγονός που υποδηλώνει ότι η διάρκεια δεν δίδει περαιτέρω πληροφορίες για τις ιδιότητες του κυττάρου παρά μόνο για τις φυσικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στο πλάσμα (εξάτμιση, ατομοποίηση, ιονισμός). Λόγω της χαμηλής αριθμητικής πυκνότητας των κυττάρων στο εισαγόμενο αιώρημα (5 κύτταρα ανά 100 σταγόνες), χρησιμοποιείται dwell 1 ms για εξαγωγή των ιστογραμμάτων έντασης στοιχείου ανά κύτταρο. Η επιλογή του μεγαλύτερου dwell time μάλλον οφείλεται στον τεράστιο όγκο δεδομένων που καταγράφονται ήδη με dwell time 1 ms (8×10^4 data points για 80 s καταγραφής) και στην έλλειψη κατάλληλου λογισμικού επεξεργασίας των δεδομένων. Τα ιστογράμματα έντασης ^{63}Cu και ^{65}Cu ανά κύτταρο επιδεικνύουν διαχωρισμό των εντάσεων των κυτταρικών σημάτων από το υπόβαθρο σήμα, καθώς επίσης με αφαίρεση του υπόβαθρου σήματος ο λόγος $^{63}\text{Cu}/^{65}\text{Cu}$ είναι σχεδόν ιδανικός (2.1 έναντι 2.24 που είναι η θεωρητική τιμή). Ανάλογη εικόνα έχουν και τα ιστογράμματα έντασης Zn και Se με λόγο $^{64}\text{Zn}/^{66}\text{Zn}$ και $^{77}\text{Se}/^{82}\text{Se}$ 1.7 και 0.8 σε σύγκριση με τις θεωρητικές τιμές που είναι 1.77 και 0.87 αντίστοιχα. Η τυπική απόκλιση των κατανομών είναι μεταξύ 58-69%, αλλά δεν μπορεί να αποδοθεί κατά τους συγγραφείς με βεβαιότητα στη ανομοιογένεια των κυττάρων. Όσο αφορά τα στοιχεία Na, Mg και Fe

η ανίχνευση των κυτταρικών σημάτων υπέφερε από το υψηλό σήμα του υποβάθρου. Η απόδοση μεταφοράς των κυττάρων είναι υψηλότερη του 100% και μάλλον οφείλεται σε κατακράτηση κυττάρων από το σύστημα εισαγωγής, τα οποία μεταφέρονται από δείγμα σε δείγμα (carry-over effect).

1.4 Φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS)

1.4.1 Ιστορική αναδρομή

Μία σημαντική δημοσίευση από τον Houk και τους συνεργάτες του [28] το 1980, που επιδείκνυε τις δυνατότητες της σύζευξης ενός επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος Αργού (Ar) με ένα τετραπολικό φασματόμετρο μάζας στον προσδιορισμό ιχνοστοιχείων σε διαλύματα, ήταν το έναυσμα για την ανάπτυξη του ICP-MS. Ενδιάμεσα της δεκαετίας του 80' κυκλοφόρησαν τα πρώτα εμπορικά διαθέσιμα όργανα ICP-MS. Αν και έφεραν αρκετά μειονεκτήματα όπως μεγάλο μέγεθος, κόστος, πολυπλοκότητα στη χρήση και αστάθεια στο καταγραφόμενο σήμα, τα εμφανή πλεονεκτήματα όπως ο πολυστοιχειακός προσδιορισμός συνοδευόμενος από τα χαμηλά όρια ανίχνευσης και τη δυνατότητα παρακολούθησης ισοτοπικών λόγων οδήγησαν στην αποδοχή του ICP-MS σε ερευνητικό επίπεδο και σε γεωλογικές εφαρμογές. Η χρήση του ICP-MS σε ερευνητικά εργαστήρια όπου η αξιοπιστία, σταθερότητα και αυτοματοποίηση αποτελούσαν μέγιστη προτεραιότητα, οδήγησε στην ραγδαία τεχνολογική ανάπτυξή του. Όργανα ICP-MS που έφεραν αναλυτές μάζας εκτός τετραπόλου, όπως χρόνου πτήσεως (TOF) και μαγνητικού τομέα, έγιναν εμπορικά διαθέσιμα, αλλά αυτά με τετραπολικό αναλυτή μαζών υπερίσχυαν. Το 1994 με συνεργασία της Hewlett-Packard και Yokogawa Electric εισήχθη στην αγορά το πρώτο όργανο ICP-MS ελεγχόμενο από ηλεκτρονικό υπολογιστή. Έκτοτε και λόγω των αυξανόμενων ερευνητικών αναγκών έχουν γίνει σημαντικές βελτιώσεις σε επίπεδο εισαγωγής δείγματος, μετάδοσης των ιόντων προς τον αναλυτή μαζών, απομάκρυνσης παρεμποδίσεων και δυναμικού εύρους γραμμικότητας του ανιχνευτή.

1.4.2. Αρχή λειτουργίας

Αν και προσαρμόστηκε αργότερα και για την ανάλυση στερεών δειγμάτων, το ICP-MS αναπτύχθηκε κυρίως για τον προσδιορισμό ιχνοστοιχείων σε διαλύματα. Για να κατανοηθούν οι διεργασίες που μεσολαβούν από την εισαγωγή του αναλύτη στο πλάσμα μέχρι την ανίχνευση του, βασικής σημασίας είναι η γνωριμία με τα επιμέρους τμήματα που συνιστούν την διάταξη του ICP-MS.

Σύστημα εισαγωγής δείγματος: Αποτελείται από τον εκνεφωτή και τον θάλαμο εκνέφωσης. Μετά την είσοδό του στον εκνεφωτή, το υγρό διασπάται σε σταγόνες μέσω της ανάμειξης του με το υψηλής ταχύτητας αέριο εκνέφωσης στο άκρο του εκνεφωτή. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι τύποι πνευματικών εκνεφωτών είναι ο concentric και microflow (HEN). Σχεδιάζονται από γυαλί ή quartz, ενώ λειτουργούν με ροές υγρού 0.5-1 mL/min και 0.05-0.2 mL/min για τον concentric και HEN αντίστοιχα. Ο ρόλος που διαδραματίζει ο θάλαμος εκνέφωσης είναι να απορρίπτει τις σταγόνες μεγάλης διαμέτρου από το να εισέλθουν στο πλάσμα Ar, καθώς το υψηλό φορτίο μάζας μειώνει την αποδοτικότητα του πλάσματος στην πραγματοποίηση των διεργασιών εξάτμισης του διαλύτη, ατομοποίησης και ιονισμού του αναλύτη. Δύο τύποι χρησιμοποιούνται στην εμπορικά διαθέσιμη οργανολογία, ο διπλής διαδρομής (double pass) και ο κυκλωνικός (cyclonic).

Πηγή πλάσματος Ar: Η διάταξη που χρησιμοποιείται για την δημιουργία του πλάσματος Ar αποτελείται από τον πυρσό, ένα πηνίο και μία γεννήτρια παραγωγής ρεύματος μέσω δυναμικού ραδιοσυχνοτήτων (RF). Ο πυρσός διαρρέεται από υψηλή ροή Ar (15-20 L/min), ενώ μία περιοχή του περιβάλλεται περιμετρικά από ένα πηνίο (loading coil). Το πηνίο διαρρέει ηλεκτρικό ρεύμα παραγόμενο από την γεννήτρια RF. Με την δημιουργία μίας ηλεκτρικής εκκένωσης επάγεται ο ιοντισμός των ατόμων Ar και κατά συνέπεια η παραγωγή ελεύθερων ηλεκτρονίων. Τα ελεύθερα ηλεκτρόνια επιταχύνονται από το επαγόμενο μαγνητικό πεδίο στην περιοχή του πηνίου και προσκρούουν σε άλλα άτομα Ar ιονίζοντάς τα. Έτσι δημιουργείται μία αλυσίδα κρούσεων και αντιδράσεων αφού ενέργεια RF μεταφέρεται στο πηνίο διαρκώς κι έτσι επιτυγχάνεται η διατήρηση του πλάσματος Ar μετά τη δημιουργία του. Οι διεργασίες που θα συμβούν μετά την εισαγωγή μίας σταγόνας, που εμπεριέχει τον αναλύτη, στο πλάσμα περιλαμβάνουν την εξάτμιση του διαλύτη κι έπειτα την ατομοποίηση του εναπομένου στερεού υπολείμματος της σταγόνας. Με την πρόσκρουση ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας επέρχεται ο ιοντισμός των ατόμων του αναλύτη, ενώ τα παραγόμενα ιόντα εξέρχονται από την περιοχή του πλάσματος και κατευθύνονται προς την είσοδο του φασματόμετρου μάζας.

Σύστημα εστίασης και καθοδήγησης των ιόντων: Αποτελείται από μία σειρά μεταλλικών πλακών, φακών και κυλίνδρων στους οποίους εφαρμόζεται δυναμικό. Ο ρόλος του συστήματος είναι η μεταφορά του μέγιστου αριθμού των ιόντων του αναλύτη που παραλαμβάνονται από την περιοχή ενδιάμεσης πίεσης των κώνων εισαγωγής (interface cones) προς τον αναλυτή μαζών και η απόρριψη των ιόντων που προέρχονται από την μήτρα του αναλύτη. Το δεδομένο σύστημα αποτελεί το πιο αδύναμο κομμάτι του ICP-MS λόγω της χαμηλής απόδοσης μετάδοσης των ιόντων. Σε αυτό συνεισφέρει η υψηλότερη συγκέντρωση των συστατικών της μήτρας σε σχέση με τον αναλύτη που αλλοιώνει τη μετάδοση της ιοντικής δέσμης.

Αναλυτής μαζών: Η πλειοψηφία των οργάνων ICP-MS φέρουν τετραπολικό αναλυτή μαζών. Αυτός αποτελείται από 2 ζεύγη κυλινδρικών μεταλλικών ράβδων, από ανοξείδωτο ατσάλι ή Μολυβδαίνιο, που βρίσκονται ανά 2 παράλληλες μεταξύ τους. Στο ένα ζεύγος εφαρμόζεται δυναμικό τύπου DC και στο άλλο εναλλασσόμενο τύπου RF. Τα ιόντα διαχωρίζονται ανάλογα με το λόγο m/z για συγκεκριμένα ζεύγη τιμών DC και RF. Κρίσιμες παράμετροι στην αποδοτικότητα διαχωρισμού των ιόντων είναι η διακριτική ικανότητα (resolving power) και η ευαισθησία αφθονίας (abundance sensitivity). Η διακριτική ικανότητα ορίζεται ως το πηλίκο της μάζας ως προς το πλάτος στο 10% της έντασης της κορυφής. Η συμβατική διακριτική ικανότητα με την οποία λειτουργούν τα τετράπολα είναι 400, ενώ μπορεί να φτάσει και ως 9000 με αντίτιμο την μείωση της έντασης της δεδομένης κορυφής. Αναλυτές μαζών όπως TOF και διπλής εστίασης αγγίζουν υψηλότερες τιμές διακριτικής ικανότητας στα 2000 και 10000 αντίστοιχα. Η ευαισθησία αφθονίας είναι σημαντική κατά την ανίχνευση μίας χαμηλής έντασης κορυφής που αλληλεπικαλύπτεται από την ουρά μίας υψηλής έντασης παρεμπόδισης.

Ανιχνευτής: Περνώντας από την χρήση του Faraday Cup και του ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή (channel electron multiplier), ο τύπος ανιχνευτή που κυριάρχησε στα πρώτα εμπορικά διαθέσιμα όργανα ICP-MS είναι ο ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής με ξεχωριστές δυνόδους (discrete dynode channel electron multiplier). Η φιλοσοφία του είναι όμοια με του channel electron multiplier, δηλαδή την παραγωγή καταρράκτη ηλεκτρονίων προς ενίσχυση του σήματος του αρχικού θετικού ιόντος που προσκρούει στον ανιχνευτή. Η διαφορά τους έγκειται στην χρησιμοποίηση διακριτών δυνόδων πρόσκρουσης του ιόντος και των παραγόμενων ηλεκτρονίων. Η βελτιωμένη έκδοση αυτών των ανιχνευτών, που χρησιμοποιούνται και στα τωρινά ICP-MS, είναι η επέκταση του δυναμικού τους εύρους από 5 σε 8 τάξεις μεγέθους. Αυτό έγινε εφικτό μέσω της ενσωμάτωσης δύο ηλεκτρονικών κυκλωμάτων (pulse & analog circuitry) στη μονάδα του ανιχνευτή. Ο ανιχνευτής μπορεί να εναλλάσσεται από pulse σε analog κατά την επεξεργασία του σήματος ανάλογα με το πλήθος των ιόντων που συλλέγει. Έτσι καθίσταται δυνατός ο προσδιορισμός χαμηλής και υψηλής συγκέντρωσης στοιχείων σε μία και μόνο σάρωση (dual-stage discrete dynode detector).

Στόχος διατριβής

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη μίας βελτιωμένης τεχνικής με βάση το ICP-MS η οποία θα καλύπτει το γνωστικό κενό που αφήνει η συμβατικού τύπου ανάλυση βιολογικών ιστών ή κυττάρων με το ICP-MS (Conventional ICP-MS). Η νέα τεχνική βασίζεται στην ιδέα της μεθόδου ανάλυσης νανοσωματιδίων (NPs) με το ICP-MS (Single-Particle ICP-MS), η οποία καθιστά εφικτό τον ποσοτικό προσδιορισμό μετάλλων ανά νανοσωματίδιο (NP). Βασικές προϋποθέσεις είναι η γρήγορη καταγραφή του σήματος του στοιχείου ανά μονάδα χρόνου (της τάξεως των μs) και η εισαγωγή αιωρημάτων NPs κατάλληλης αριθμητικής πυκνότητας ώστε κάθε παλμός σήματος να αντιστοιχεί σε 1 NP. Έτσι, χρησιμοποιώντας σαν οργανισμό μοντέλο κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* του στελέχους 1690, προχωρήσαμε στην ανάπτυξη της τεχνικής του Single-Cell ICP-MS και την εφαρμογή αυτής στον ποσοτικό προσδιορισμό μετάλλων και μεταλλοειδών σε μεμονωμένα κύτταρα. Τα κύτταρα που αναλύθηκαν προήλθαν από καλλιέργειες *Chlamydomonas reinhardtii* που είχαν αναπτυχθεί σε συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων όπως Μόλυβδος (Pb), Κάδμιο (Cd) και μεταλλοειδών όπως Αρσενικό (As), καθώς και από αναπτυσσόμενες καλλιέργειες χωρίς την προσθήκη μετάλλου (control cells). Κάθε κυτταρικό δείγμα αναλύθηκε για το περιεχόμενο του στο μέταλλο στο οποίο είχε επωαστεί αλλά και για το περιεχόμενο του σε ένα ενδογενές για το κύτταρο μέταλλο όπως το Ca. Για την πραγματοποίηση μίας επιτυχημένης SC ICP-MS ανάλυσης πραγματοποιήθηκαν βελτιστοποιήσεις σε 3 τομείς.

Ο 1^{ος} αφορά την προετοιμασία των κυτταρικών δειγμάτων πριν την εισαγωγή τους στο ICP-MS. Οι αραιώσεις για την μετάβαση στην κυτταρική αριθμητική πυκνότητα των 105 cells/mL, έγιναν σε διαλύτη 0.1% NaCl. Ο δεδομένος διαλύτης επιλέχθηκε λόγω διατήρησης της ωσμωτικής πίεσης και άρα της διατήρησης της ακεραιότητας των κυττάρων. Η σταθερή ωσμωτική πίεση λόγω επαρκούς ιοντικής ισχύος του διαλύτη διασφαλίζει ότι η μεταφορά των ιόντων του προσδιοριζόμενου μετάλλου εκτός του κυττάρου δεν είναι σημαντική για το χρονικό διάστημα της ανάλυσης. Η διασφάλιση της ακεραιότητας των κυττάρων σε 0.1% NaCl επιτεύχθηκε με παρακολούθηση αυτών κάτω από οπτικό μικροσκόπιο, ενώ η διερεύνηση της διάχυσης των ιόντων μετάλλου εκτός του κυττάρου έγινε με τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του μετάλλου στο διάλυμα (εξωτερικό περιβάλλον του κυττάρου) συναρτήσει του χρόνου.

Κρίσιμα σημεία στην διεκπεραίωση μίας SC ICP-MS ανάλυσης είναι η επιλογή κατάλληλου συστήματος εισαγωγής, dwell time κι αριθμητικής πυκνότητας κυττάρων στο δείγμα. Η βελτιστοποίηση των προαναφερθέντων 3 παραμέτρων αποτέλεσε το 2^ο τομέα βελτιστοποιήσεων. Δοκιμάστηκαν 2 συστήματα εισαγωγής, το Standard και το High-efficiency Nebulization (HEN) Introduction System. Η καταλληλότητα των συστημάτων εισαγωγής αξιολογήθηκε με βάση τη διατήρηση ή μη της ακεραιότητας των κυττάρων κατά τη διάρκεια της εκνέφωσης, τη διασφάλιση

της εισαγωγής των κυττάρων στο πλάσμα και την επίτευξη επαρκούς ευαισθησίας και σταθερότητας σήματος. Η διατήρηση της ακεραιότητας των κυττάρων κατά τη διάρκεια της εκνέφωσης διαπιστώθηκε μέσω κυτταρομετρίας ροής και οπτικής μικροσκοπίας, ενώ η ανίχνευση παλμών στο καταγραφόμενο ICP-MS σήμα μαρτυρά την ανίχνευση κυττάρων. Βελτιστοποίηση αναλυτικών παραμέτρων όπως η ροή εκνεφωτικού Ar (nebulizing gas) και η ροή Ar στην βοηθητική γραμμή (auxiliary gas) ήταν κρίσιμη για την επίτευξη υψηλής ευαισθησίας και σταθερότητας σήματος. Με χρήση του dwell time των 50 μs επιτεύχθηκε η μέγιστη χρονική διακριτική ικανότητα που προσφέρει το συγκεκριμένο όργανο, ενώ η αραιώση των δειγμάτων σε τελική κυτταρική αριθμητική πυκνότητα 10^5 cells/mL διατηρεί την πιθανότητα ανίχνευσης σημάτων από πολλαπλά κύτταρα μικρότερη του 0.1%.

Ο 3ος τομέας περιλαμβάνει την ανάπτυξη μεθόδων επεξεργασίας κι ερμηνείας των αποτελεσμάτων, κατανόηση της αρχής λειτουργίας του λογισμικού (Nano Syngistix, PE) καθώς και επικύρωση των αποτελεσμάτων του SC ICP-MS με μία ήδη υπάρχουσα μέθοδο. Έτσι, κατανοήθηκε ο στατιστικός τρόπος επεξεργασίας των υπέρογκων σετ δεδομένων (1.2×10^6 data points/min), κατά τον οποίο το λογισμικό υπολογίζει την ένταση του εξωκυττάρου διαλυτού στοιχείου στο αιώρημα καθώς και την ένταση των παλμών που αντιπροσωπεύουν το μέταλλο σε μεμονωμένα κύτταρα. Μέσω της βαθμονόμησης με πρότυπα διαλύματα διαλυτού στοιχείου καθώς και προσδιορισμού της απόδοσης μεταφοράς (TE) του συστήματος εισαγωγής με 60 nm Au NPs, παράχθηκαν τα ιστογράμματα μάζας στοιχείου ανά κύτταρο και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του εξωκυττάρου διαλυτού στοιχείου. Από τα ιστογράμματα μάζας μετάλλου ανά κύτταρο προέκυψαν συμπεράσματα για την πρόσληψη των δεδομένων μετάλλων από τα κύτταρα καθώς και για την παρουσία Ca σε αυτά. Τέλος, η εξέταση της εγκυρότητας της τεχνικής για τον προσδιορισμό των στοιχείων σε μεμονωμένα κύτταρα πραγματοποιήθηκε μέσω προσδιορισμού ισοζυγίων μάζας, όπως προέκυψαν από τη σύγκριση του SC ICP-MS με το Conventional ICP-MS.

Κεφάλαιο 2

Πειραματικό μέρος

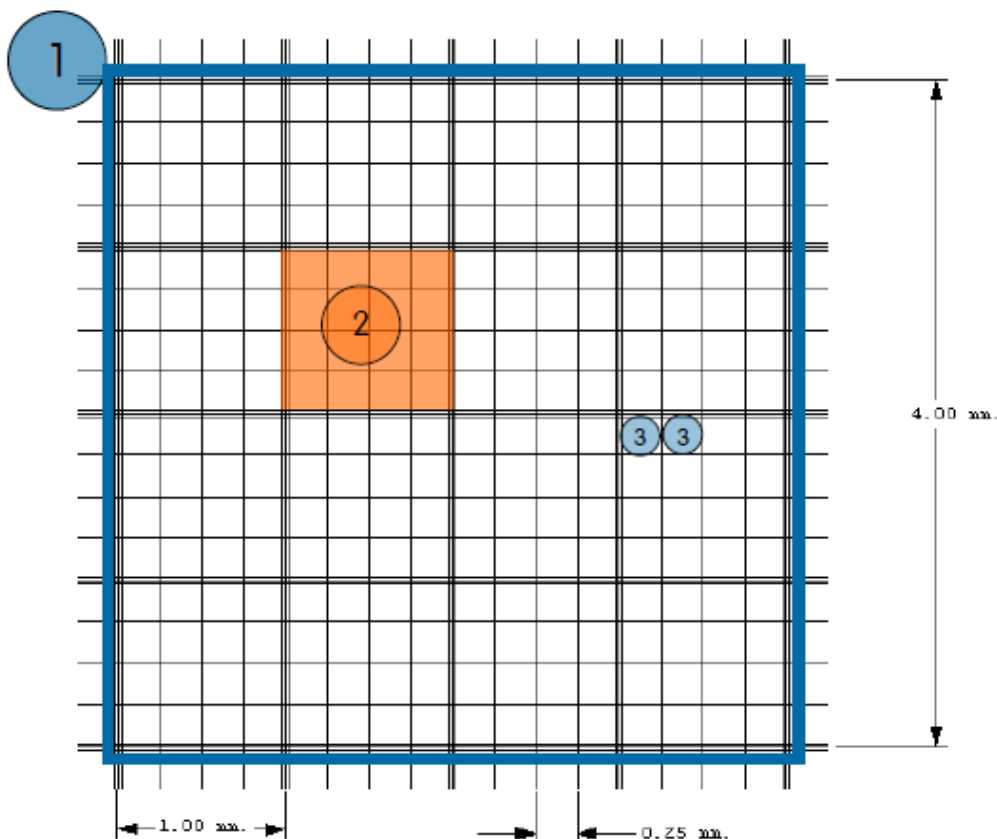
2.1 Ανάπτυξη κι επώαση κυττάρων σε βαρέα μέταλλα

Αναπτύχθηκαν 4 ομάδες καλλιεργείων κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* του στελέχους 1690 σε θρεπτικό διάλυμα (TAP medium) που περιείχε Tris-base ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$), φωσφορικά ανιόντα (PO_4^{3-}) και οξικά ανιόντα σε pH (7-7.2), υπό συνεχή ακτινοβολήση ορατού φωτός και θερμοκρασία 25°C. Η ταξινόμηση σε 4 ομάδες έγινε με βάση την παρουσία συγκεντρώσεων μετάλλων όπως Μόλυβδος (Pb), Κάδμιο (Cd) και Αρσενικό (As) στις εκάστοτε καλλιέργειες. Έτσι, προέκυψε η 1^η ομάδα κυτταρικών καλλιεργείων με παρουσία νιτρικού μόλυβδου ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) σε συγκεντρώσεις 0.63, 6 και 12.5 ppm (mg/L). Η 2^η ομάδα κυτταρικών καλλιεργείων αναπτύχθηκε με παρουσία καδμίου ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$) σε συγκεντρώσεις 0.36, 3.64 και 7.29 ppm. Η 3^η ομάδα αναπτύχθηκε με παρουσία αρσενικόδους νατρίου (NaAsO_2) ή As (III) σε συγκεντρώσεις 100, 200, 300 και 400 μM που αντιστοιχούν σε 12.99, 25.98, 38.97 και 51.96 ppm As αντίστοιχα. Η 4^η ομάδα αναπτύχθηκε με παρουσία αρσενικού νατρίου (Na_3AsO_4) ή As (V) σε συγκεντρώσεις 200, 300 και 400 μM που αντιστοιχούν σε 41.58, 62.37 και 83.16 ppm As αντίστοιχως. Φυσικά αναπτύχθηκαν και καλλιέργειες κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* χωρίς την προσθήκη τοξικών μετάλλων (control cells). Η μαζική παραγωγή κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο σταθερής κατάστασης υπό συνεχή φωτισμό, σε θερμοκρασία 25°C σε όγκους θρεπτικού διαλύματος 3 L, υπό συνεχή ανάδευση. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν στο τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξης, ξεπλύθηκαν με washing buffer (50 mM Tris-base) και διατηρήθηκαν σε ένα υψηλής συγκέντρωσης διάλυμα 0.8 M σουκρόζης, 50 mM Tris-base, pH 7.0 στους -80°C. Έτσι από την μαζική παραγωγή προέκυψαν τα πυκνά δείγματα κυττάρων (stock samples) που προορίζονταν για αναλύσεις στο ICP-MS ενώ σχεδιάστηκαν και πειράματα παραγωγής κυττάρων σε μικρότερη κλίμακα για την κατασκευή των καμπυλών ανάπτυξης.

Για την κατασκευή των καμπυλών ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκαν ειδικά κυλινδρικά φωτομετρικά δοχεία στα οποία αναπτύχθηκαν κύτταρα στις προαναφερθέντες συνθήκες αλλά σε μικρότερη κλίμακα παραγωγής (5 mL TAP medium). Έτσι προέκυψαν δείγματα κυττάρων με και χωρίς την παρουσία μετάλλου με σκοπό την διαπίστωση της ομαλής τους ανάπτυξης, δηλαδή κατά πόσο ο πολλαπλασιασμός-ανάπτυξη των κυττάρων παρεμποδίζεται από το τοξικό μέταλλο. Αυτό έγινε με την παρακολούθηση της κάθε καλλιέργειας φωτομετρικά κάθε 12 ώρες και καταγράφοντας την τιμή της απορρόφησης στο μήκος κύματος των 750 nm (οπτική πυκνότητα).

2.2 Μέτρηση πληθυσμού κυττάρων και ολικής χλωροφύλλης

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων από τις αναλύσεις με το ICP-MS, αναγκαία ήταν η μέτρηση του πληθυσμού των κυττάρων που περιείχαν τα δείγματα που συλλέχθηκαν. Η μέτρηση αρχικά περιελάμβανε την παρασκευή αιωρημάτων κυττάρων (cell suspension) με μία αραιώση 1/100 των πυκνών δειγμάτων που είχαν συλλεχθεί σε μικρά δοχεία τύπου Eppendorf. Πριν τη λήψη ποσότητας από τα stock samples, αυτά υπέστησαν έντονη ανάδευση (vortexing) έτσι ώστε η ομογενοποίηση των κυττάρων στο διάλυμα να είναι όσο το δυνατόν καλύτερη. Η μέτρηση του πληθυσμού των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου και αιμοκυτταρομέτρου τύπου Fuchs-Rosenthal Chamber. Το αιμοκυτταρόμετρο είναι ένα πλακίδιο, παρασκευασμένο από πυκνό γυαλί, που περιλαμβάνει 2 περιοχές μέτρησης κυττάρων. Το πλακίδιο έχει καθορισμένο ύψος, και κάθε περιοχή μέτρησης χαράσσεται από ένα laser με σκοπό τη δημιουργία υποπεριοχών καθορισμένου εμβαδού. Έτσι ο αναλυτής γνωρίζει τον όγκο δείγματος που εμπεριέχεται σε κάθε περιοχή μέτρησης. Παρακάτω παρατίθεται εικόνα της περιοχής μέτρησης του πλακιδίου.



Εικόνα 1. Απεικόνιση της περιοχής μέτρησης του αιμοκυτταρομέτρου Fuchs-Rosenthal Chamber [30]

Η περιοχή μέτρησης αποτελείται από ένα τετράγωνο πλευράς 4 mm (1). Αυτό υποδιαιρείται σε 16 μικρότερα τετράγωνα πλευράς 1 mm (2), καθένα από τα οποία υποδιαιρείται σε 16 μικρότερα

τετράγωνα πλευράς 0.25 mm (3). Πριν φορτώσουμε ποσότητα δείγματος στο αιμοκυτταρόμετρο, πραγματοποιούμε έντονη ανακίνηση του κυτταρικού αιωρήματος με σκοπό την ομοιογενή διασπορά των κυττάρων στο διάλυμα. Έπειτα φορτώνουμε 20 μL δείγματος στην περιοχή μέτρησης του πλακιδίου, η οποία καλύπτεται από ειδική γυάλινη καλυπτρίδα, και τοποθετούμε το πλακίδιο κάτω από τον φακό του οπτικού μικροσκοπίου. Εμπειρικά, επιθυμούμε σε κάθε 16° του 1 mm^2 να βρίσκονται το μέγιστο 50 κύτταρα καθώς στην περίπτωση που τα κύτταρα είναι περισσότερα η μέτρηση γίνεται επίπονη και χάνει σε αξιοπιστία. Αθροίζουμε τα κύτταρα που μετρούνται στα 16 υποτετράγωνα του 1 mm^2 . Με βάση τον όγκο του κάθε 16° του 1 mm^2 , υπολογίζεται η συγκέντρωση του δείγματος σε κύτταρα ανά mL (cells/mL). Κάθε 16° του τετραγώνου έχει επιφάνεια ίση με 0.0625 mm^2 , η οποία πολλαπλασιαζόμενη με το πάχος του πλακιδίου (η κάθετη απόσταση που απέχει η περιοχή μέτρησης από την κάτω επιφάνεια της καλυπτρίδας) μας δίνει τον όγκο του κάθε τετραγώνου, ίσος με $0,0625 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 6.25 \times 10^{-6} \text{ m}^3$. Ο τελικός τύπος διαμορφώνεται ως εξής: αριθμός κυττάρων ανά mL = $\left(\frac{\text{αριθμός κυττάρων}}{16}\right) \times 160000$. Πραγματοποιήθηκαν 2-3 μετρήσεις για κάθε δείγμα (replicates), δηλαδή μετρήσεις κυττάρων σε 2-3 περιοχές του 1 mm^2 . Τα αποτελέσματα μετρήσεων των πληθυσμών των κυττάρων σε κάθε πυκνό stock δείγμα παρουσιάζονται στο Κεφάλαιο 3. Η μέτρηση των κυττάρων με τη μέθοδο του αιμοκυτταρομέτρου είναι μία επίπονη διαδικασία και υπόκειται σε τυχαία σφάλματα. Για παράδειγμα, μπορεί να χαθεί ένας αριθμός κυττάρων στα τοιχώματα της πλαστικής μύτης του μικροσιφωνίου κατά την αραίωση με αποτέλεσμα η αναγωγή στον αριθμό των κυττάρων που βρίσκονται στον stock δείγμα να μην είναι απόλυτα σωστή. Ακόμη, η μέτρηση στο μικροσκόπιο υπόκειται πάντα στο οπτικό σφάλμα, δηλαδή υπάρχει πάντα πιθανότητα να μην μετρηθεί κάποιο κύτταρο (ή να διπλομετρηθεί). Για να ελαχιστοποιηθούν αυτά τα σφάλματα, θα έπρεπε κάποιος να κάνει πολλές επαναλήψεις ώστε ο μέσος όρος όλων των επαναλήψεων να αντικατοπτρίζει τον ακριβή αριθμό των κυττάρων. Πρακτικά αυτό είναι αδύνατο.

Γι' αυτό το λόγο επιλέχθηκε μία μέθοδος επαλήθευσης των μετρήσεων με το αιμοκυτταρόμετρο. Η μέθοδος περιλαμβάνει την μέτρηση ολικής χλωροφύλλης (Chlorophyll $\alpha + \beta$) των κυττάρων με τη μέτρηση της απορρόφησης (A) των δειγμάτων στα μήκη κύματος (λ) όπου απορροφούν οι χλωροφύλλες και ποσοτικοποίησής της σε $\mu\text{g/mL}$ μέσω του νόμου του Beer Lambert [16]. Τα βήματα της διαδικασίας ήταν τα εξής: 1) $25 \mu\text{L}$ από κάθε stock κυτταρικό δείγμα ανασυστάθηκαν σε τελικό όγκο 1 mL (80% ακετόνη-20% H_2O), 2) έντονη ανακίνηση (vortexing) στο σκοτάδι για την ολική εκχύλιση των χρωστικών και ακολούθως φυγοκέντρωση 3-5 λεπτά για την απομάκρυνση των στερεών από το διάλυμα. 3) συλλογή υπερκευμένου υγρού και μέτρηση της απορρόφησης με φασματοφωτόμετρο (UV-2700, Shimadzu). Η συνήθης αραίωση προτού εισάγουμε το δείγμα στην κυψελίδα γινόταν με αναλογία όγκων 1/2. Στις περιπτώσεις όπου η τιμή A ξεπερνούσε το 1, δηλαδή το A βρισκόταν εκτός του εύρους γραμμικότητας του νόμου Beer-Lambert εξαιτίας της υψηλής

συγκέντρωσης των ουσιών στο δείγμα, η αραιώση έφτανε και το 1/20. Μέσω των τύπων $C\alpha=12.25 \times A_{663.2} - 2.79 \times A_{646.8}$ και $C\beta=21.5 \times A_{646.8} - 5.1 \times A_{663.2}$ υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις των χλωροφυλλών α και β αντίστοιχα των οποίων το άθροισμα μας δίνει τη συνολική συγκέντρωση χλωροφύλλης στο κυτταρικό δείγμα. Όπως και στις μετρήσεις του πληθυσμού των κυττάρων, έτσι και στις μετρήσεις ολικής χλωροφύλλης πραγματοποιήθηκαν 2 επαναλήψεις για κάθε δείγμα. Οι τιμές που δίνονται στο Κεφάλαιο 3 είναι αποτέλεσμα του μέσου όρου των 2 επαναλήψεων. Εφόσον, είναι γνωστοί οι πληθυσμοί των κυττάρων σε κάθε δείγμα καθώς και η συγκέντρωση της χλωροφύλλης κάθε δείγματος, κατασκευάστηκε η καμπύλη που επιδεικνύει τη μεταξύ τους συσχέτιση. Δεδομένου ότι τα *Chlamydomonas reinhardtii* είναι κλασσικό παράδειγμα φωτοσυνθετικού οργανισμού, πρέπει να περιμένει κανείς η ποσότητα της χλωροφύλλης να συνδέεται γραμμικά με το πλήθος των κυττάρων. Τα αποτελέσματα της μεθόδου παρουσιάζονται στο Κεφάλαιο 3.

2.3 Διερεύνηση της διατήρησης της ακεραιότητας των *Chlamydomonas reinhardtii* κατά την διαδικασία ανάλυσης

Η κυτταρική λύση (cytolysis) είναι το φυσικό φαινόμενο κατά το οποίο ένα κύτταρο σκάει εξαιτίας μίας ωσμωτικής ανισορροπίας η οποία προκάλεσε την εισαγωγή περίσσειας διαλύτη στον εσωτερικό χώρο του κυττάρου. Πιο συγκεκριμένα, ο χώρος εντός του κυττάρου περιέχει πληθώρα ιόντων και χημικών ενώσεων τα οποία διασπείρονται σε μικρό όγκο υγρού σε σχέση με τον όγκο ενός υγρού που περιβάλλει εξωτερικά το κύτταρο. Έτσι, αν το κύτταρο βρεθεί σε έναν υποτονικό διαλύτη, δηλαδή διαλύτη χαμηλής ιοντικής ισχύος συγκριτικά με το κυτταρόπλασμα του κυττάρου, τότε λόγω του φαινομένου της ώσμωσης υπάρχει ο κίνδυνος να επέλθει λύση του κυττάρου. Αυτό το φαινόμενο είναι εντονότερο σε ζωικά κύτταρα που δεν περιέχουν κυτταρικό τοίχωμα σε σχέση με τα φυτικά όπως στην περίπτωση του δικού μας κυτταρικού μοντέλου. Παρόλα αυτά, ήταν σημαντικό για την ανάπτυξη του SC-ICP-MS να διερευνηθεί κατά πόσο τα κύτταρα διατηρούν την ακεραιότητά τους στον διαλύτη που τα διασπείραμε (0,1% w/v NaCl ή υπερκάθαρο H₂O) καθώς επίσης και μετά τη διαδικασία της εκνέφωσης κατά την εισαγωγή τους στο ICP-MS.

Γι' αυτό το σκοπό, σχεδιάστηκαν πειράματα τα οποία περιλάμβαναν την οπτική παρακολούθηση των κυττάρων, μετά τη διασπορά τους στους δεδομένους διαλύτες και κατόπιν εκνέφωσής τους, με τη βοήθεια οπτικού μικροσκοπίου (optical microscopy) και μικροσκοπίου ανίχνευσης φθορισμού (fluorescence microscopy), καθώς και αναλύσεις με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής (Flow Cytometry). Όσο αφορά την παρακολούθηση των κυττάρων με το μικροσκόπιο, παρασκευάστηκε αιώρημα κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* που περιείχε 10⁶–10⁷ κύτταρα ανά mL και τοποθετήθηκε ποσότητα από το αιώρημα πάνω στην πλάκα του μικροσκοπίου. Με τη χρήση κατάλληλου φακού σαρώθηκε η επιφάνεια της πλάκας για εύρεση τυχών θραυσμάτων κυττάρων. Παράλληλα, ποσότητα

από αυτό το κυτταρικό αιώρημα τοποθετήθηκε στην κυψελίδα του κυτταρομέτρου ροής (flow cytometer) για μέτρηση του πληθυσμού των κυττάρων.

Το δεύτερο σκέλος του πειράματος απαιτούσε την εκνέφωση των κυττάρων δηλαδή τη μετατροπή του υγρού κυτταρικού αιωρήματος σε αερόλυμα. Ο ψεκασμός-εκνέφωση έγινε με τη χρήση αερίου Ηλίου (He) ομοαξονικά του γυάλινου τριχοειδούς μέσα από το οποίο αναρροφάται το δείγμα στους πνευματικούς εκνεφωτές λόγω του φαινομένου Venturi. Ο ψεκασμός διήρκησε 3-4 λεπτά μέχρι να συλλεχθεί 2-3 mL δείγματος το οποίο συλλέχθηκε σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα για ανάλυση με το flow cytometer και σάρωση με το μικροσκόπιο. Επομένως, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από το flow cytometer για το κυτταρικό αιώρημα πριν την εκνέφωση και για το κυτταρικό αιώρημα που προέκυψε μετά την εκνέφωση, καθώς και φωτογραφίες που απεικονίζουν τα κύτταρα πριν τον ψεκασμό και μετά, μπορέσαμε να διαπιστώσουμε κατά πόσο τα κύτταρα διατηρούνται ακέραια κατά τη διάρκεια μίας SC ICP-MS ανάλυσης.

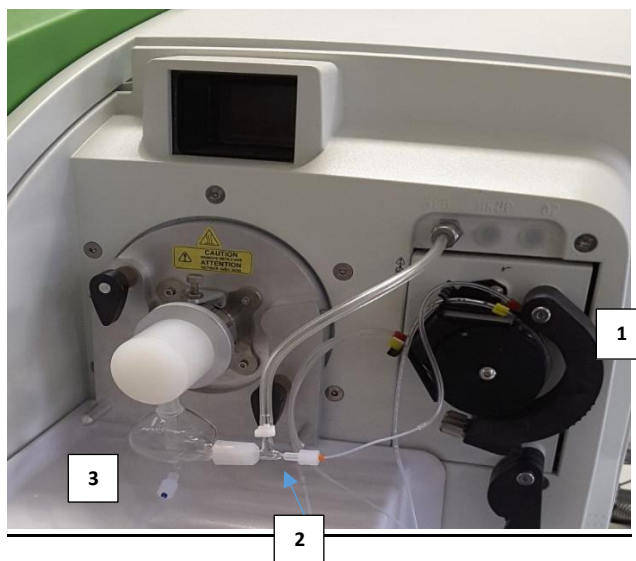
2.4 Προετοιμασία δειγμάτων κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* για ανάλυση με το ICP-MS

Η προετοιμασία των προς ανάλυση δειγμάτων περιελάμβανε τα εξής στάδια: γρήγορη επαναφορά κυττάρων σε ρευστή κατάσταση, έντονο vortexing 1 min για ομογενοποίηση του stock δείγματος και λήψη της υπολογιζόμενης ποσότητας για την παρασκευή του τελικού δείγματος της επιθυμητής κυτταρικής αριθμητικής πυκνότητας. Το γρήγορο ζέσταμα μέχρι να ρευστοποιηθεί το παγωμένο στερεό stock κυτταρικό αιώρημα γίνεται για να αποφευχθεί η πιθανότητα τυχόντες κρύσταλλοι από την μήτρα μέσα στην οποία υπάρχουν τα κύτταρα να τα πληγώσουν. Πιο συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν δείγματα αραιών κυτταρικών αιωρημάτων για την κάθε συγκέντρωση μετάλλου καθώς και για τα control cells. Όλα τα δείγματα παρασκευάστηκαν με λήψη κατάλληλης ποσότητας από τα stock και ανασύστασής της σε διάλυμα 0.1% NaCl (Assay \geq 99.5% Fluka) σε υπερκάθαρο νερό ($18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) με τελική κυτταρική αριθμητική πυκνότητα 10^5 cells/mL . Εξαιρούνται τα δείγματα των κυττάρων επωασμένα στις 2 ενώσεις του As, τα οποία παρασκευάστηκαν αποκλειστικά σε υπερκάθαρο νερό. Ο λόγος είναι η αποφυγή σχηματισμού της ισοβαρικής παρεμπόδισης ArCl^+ (m/z 75) στην ανίχνευση του ισότοπου του As (m/z 75).

2.5 Ανάλυση δειγμάτων καλλιιεργειών *Chlamydomonas reinhardtii* επωασμένων σε Μόλυβδο (Pb)

2.5.1. Προσδιορισμός Pb σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard introduction system

Σε αυτήν την περίπτωση, το σύστημα εισαγωγής δείγματος στο ICP-MS αποτελείται από έναν ομόκεντρο πνευματικό εκνεφωτή (Type C0.5 Glass, Meinhard), έναν κυκλωνικό θάλαμο (Glass Cyclonic, Perkin Elmer) και μία περισταλτική αντλία ενσωματωμένη στο ICP-MS (NeXION 300X, Perkin Elmer), όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 2.



Εικόνα 2. Φωτογραφία του Standard introduction system του NeXION 300X με το οποίο πραγματοποιήθηκε η παρούσα μελέτη. Οι αριθμοί 1,2 και 3 δείχνουν την περισταλτική αντλία, τον εκνεφωτή και τον κυκλωνικό θάλαμο εκνέφωσης, αντίστοιχα.

Σε κάθε τυπικό όργανο ICP-MS μεσολαβεί ένα χρονικό διάστημα μεταξύ 2 καταγραφών δεδομένων (data points). Αυτό το χρονικό διάστημα ονομάζεται νεκρός χρόνος (dead ή settling time) και περιλαμβάνει το χρόνο που μεσολαβεί μεταξύ 2 διαδοχικών σαρώσεων από το τετράπολο του ιδίου ή διαφορετικών m/z . Για το NexION 300 X το dead time αναφέρεται να είναι της τάξεως των εκατοντάδων μs (<200 μs)[17]. Στην δικιά μας περίπτωση, το NexION 300 X έχει αναβαθμιστεί (upgraded firmware), με αποτέλεσμα το dead time να έχει εκμηδενιστεί. Αυτό σε συνδυασμό με το λογισμικό (Syngistix Nano Application Module, Perkin Elmer) δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης ενός m/z συναρτήσει του χρόνου με dwell time (χρόνος σάρωσης συγκεκριμένου m/z από το τετράπολο) της τάξεως των 50 μs . Χωρίς την αναβάθμιση, το χαμηλότερο δυνατό dwell time θα ήταν 5 ή 10 ms. Το Syngistix Nano Application Module είναι εμπορικά διαθέσιμο και είναι λογισμικό που αναπτύχθηκε για τη μέθοδο του SP ICP-MS.

Εμπνευσμένο από το SP ICP-MS, η υπόθεση πάνω στην οποία βασίζεται η μέθοδος του SC ICP-MS είναι κάθε cell event (κύτταρο που εισέρχεται στο πλάσμα ατομοποιείται, τα στοιχεία από τα οποία αποτελείται ιονίζονται, και το νέφος των ιόντων του στοιχείου που παρακολουθείται ως συγκεκριμένο m/z παράγει έναν παλμό στο καταγραφόμενο σήμα) να αντιπροσωπεύει ένα και μόνο κύτταρο. Το κατά πόσο αυτό είναι εφικτό εξαρτάται από την επιλογή του κατάλληλου dwell time, αριθμού κυττάρων που εισάγονται στο πλάσμα ανά μονάδα χρόνου και της απόδοσης μεταφοράς (TE%) του συστήματος εισαγωγής δείγματος στο ICP. Όσο αφορά το dwell time, ο χρόνος των 50 μs είναι το υψηλότερο όριο χρονικής διακριτικής ικανότητας που μπορεί να επιτύχει το όργανο. Ο αριθμός των κυττάρων που θα εισαχθούν ανά μονάδα χρόνου προκύπτει από τον συνυπολογισμό του ρυθμού πρόσληψης δείγματος (sample uptake rate) και της αριθμητικής πυκνότητας των κυττάρων στο αιώρημα. Ο ανώτατος αριθμός κυττάρων που μπορούν να ανιχνευθούν μεμονωμένα σε ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, περιορίζεται από τη διάρκεια του cell event το οποίο παρατηρήθηκε να διαρκεί 150-500 μs . Ο Olesik και οι συνεργάτες του εφάρμοσαν στατιστική Poisson για τον υπολογισμό της πιθανότητας ανίχνευσης πολλαπλών σημάτων από νανοσωματίδια (NPs) των οποίων τα σήματα διαρκούν 500 μs [10]. Εργαζόμενοι ομοίως και υποθέτοντας το μέγιστο όριο χρονικής διάρκειας (500 μs) του cell event, εάν ένα κύτταρο ανιχνεύεται ανά 500 μs τότε ο μέγιστος αριθμός κυττάρων που μπορεί να ανιχνευθεί στο 1 s θα είναι 2000. Αν εισαχθεί μεγαλύτερος αριθμός κυττάρων, τότε η μέθοδος θα υποφέρει από πολλαπλά cell events (cell event overlapping). Η πιθανότητα cell event overlapping υπολογίζεται μέσω της κατανομής Poisson. Η κατανομή Poisson εκφράζει την πιθανότητα να συμβεί ένας δεδομένος αριθμός από γεγονότα σε ένα σταθερό διάστημα του χρόνου, όταν αυτά λαμβάνουν χώρα με ένα γνωστό μέσο ρυθμό και είναι ανεξάρτητα της εμφάνισης του προηγούμενου γεγονότος. Η εξίσωση Poisson είναι η εξής: $P(k \text{ events in an interval}) = e^{-\lambda} \frac{\lambda^k}{k!}$, όπου λ είναι ο μέσος ρυθμός εμφάνισης των γεγονότων (event rate) και k ενδεικτικό του αριθμού των γεγονότων που έχουν πιθανότητα να συμβούν στο επιλεγμένο χρονικό διάστημα. Για να αποδείξουμε ότι με sample uptake rate 1.1 mL/min και αριθμητική πυκνότητα κυττάρων $10^5/\text{mL}$ δεν υποφέρουμε από cell event overlapping, ελέγχουμε τη πιθανότητα να έχουμε διπλό cell event. Το λ για το διάστημα των 500 μs ή 0.5 ms υπολογίζεται ως εξής: $10^5 \frac{\text{cells}}{\text{mL}} \times 1.1 \frac{\text{mL}}{\text{min}} \times \frac{1}{6 \times 10^3} \frac{\text{min}}{\text{ms}} \times 0.5 \text{ ms} = 0.917$ κύτταρα στα 0.5 ms. Αυτό το λ θα ίσχυε αν ο θάλαμος εκνέφωσης επιτύγχανε Transport Efficiency (TE) ίση με 100%. Το Standard Introduction System επιτυγχάνει TE γύρω στο 3%. Επομένως το λ γίνεται $0.917 \times 0.03 = 0.0275$. Αντικαθιστώντας το στην εξίσωση Poisson υπολογίζουμε ότι το $P(k)\%$ είναι ίσο με 0.036%. Για το High Efficiency Introduction System με το οποίο επιτυγχάνονται TE γύρω στο 10% και με sample uptake rate στα 100 $\mu\text{L}/\text{min}$, το $P(k)\%$ είναι ίσο με 0.036. Αν συμπεριλάβουμε κάποια τυπική απόκλιση στη διάρκεια ενός cell event και ελέγξουμε τη διάρκεια του 1 ms μέσα στην οποία χωράνε cell events μεγαλύτερης διάρκειας, τότε τα $P(k)\%$ του

διπλού cell event για τα 2 συστήματα εκνέφωσης γίνονται 0.14% και 0.013% για το Standard και το HEN introduction system αντίστοιχα. Σε όλες τις περιπτώσεις, η πιθανότητα μίας κορυφής να αντιστοιχεί σε πολλαπλά κύτταρα είναι θεωρητικά αμελητέα. Προϋπόθεση όμως για να ισχύει ο ισχυρισμός που ειπώθηκε είναι τα κύτταρα να είναι ομοιογενώς κατανεμημένα στο αιώρημα. Ωστόσο, όσο ομοιογενώς και είναι κατανεμημένα τα κύτταρα η πιθανότητα κάποια να εισέλθουν στο ICP μαζί δεν εξαλείφεται ολοκληρωτικά, καθώς διαχειριζόμαστε αιώρημα και όχι διάλυμα. Για το SP ICP-MS, έχει αποδειχθεί ότι με τη χρήση dwell time κάτω των 100 μs, μπορεί να διαχωριστεί χρονικά μεγαλύτερος αριθμός νανοσωματιδίων (NPs) στο 1 s σε σχέση με μεγαλύτερα dwell time [18]. Βάση αυτού και θεωρώντας πως τα κύτταρα συμπεριφέρονται παρόμοια με τα νανοσωματίδια, η χρήση των 50 μs dwell time μας δίνει τη μέγιστη χρονική διακριτική ικανότητα για την διεξαγωγή μίας SC ICP-MS ανάλυσης.

Πριν από κάθε τύπου ανάλυση διεξάγεται ένα τεστ απόδοσης του οργάνου (standard performance check) για να διασφαλιστεί το υψηλό επίπεδο ευαισθησίας του και τα χαμηλά επίπεδα των οξειδίων. Το τεστ γίνεται με την εκνέφωση ενός υδατικού διαλύματος περιεκτικότητας 1% σε νιτρικό οξύ (HNO₃) το οποίο περιέχει τα στοιχεία Ίνδιο (In), Βηρύλλιο (Be), Δημήτριο (Ce), Μόλυβδο (Pb), Ουράνιο (U), Σίδηρο (Fe), Λίθιο (Li) και Μαγνήσιο (Mg) σε συγκέντρωση 1 μg/L. Ο ρυθμός πρόσληψης δείγματος (1 mL/min) καθορίζεται από την περισταλτική αντλία. Αυτή είναι η ροή αναφοράς κι έτσι οποιαδήποτε αλλαγή κι αν επιφέρουμε στο σύστημα εισαγωγής δείγματος μπορούμε ανά πάσα στιγμή να ελέγξουμε αν έχουμε συγκρίσιμη ευαισθησία. Οι στόχοι, που πρέπει να επιτευχθούν για να περαστεί επιτυχώς το τεστ, περιλαμβάνουν ένα κατώτερο όριο σήματος για το ¹¹⁴In (40 kcps), ⁹Be (20 kcps), ²³⁸U (30 kcps), ένα ανώτερο επιτρεπόμενο επίπεδο οξειδίων τα οποία προσδιορίζονται ως ο λόγος των οξειδίων του Δημητρίου (¹⁵⁶CeO) προς το ελεύθερο Δημήτριο (¹⁴⁰Ce) (¹⁵⁶CeO/¹⁴⁰Ce = 2.5%) κι ένα ανώτερο επιτρεπόμενο όριο διπλά φορτισμένων στοιχείων που εκφράζονται ως ⁷⁰Ce⁺⁺/¹⁴⁰Ce = 3%.

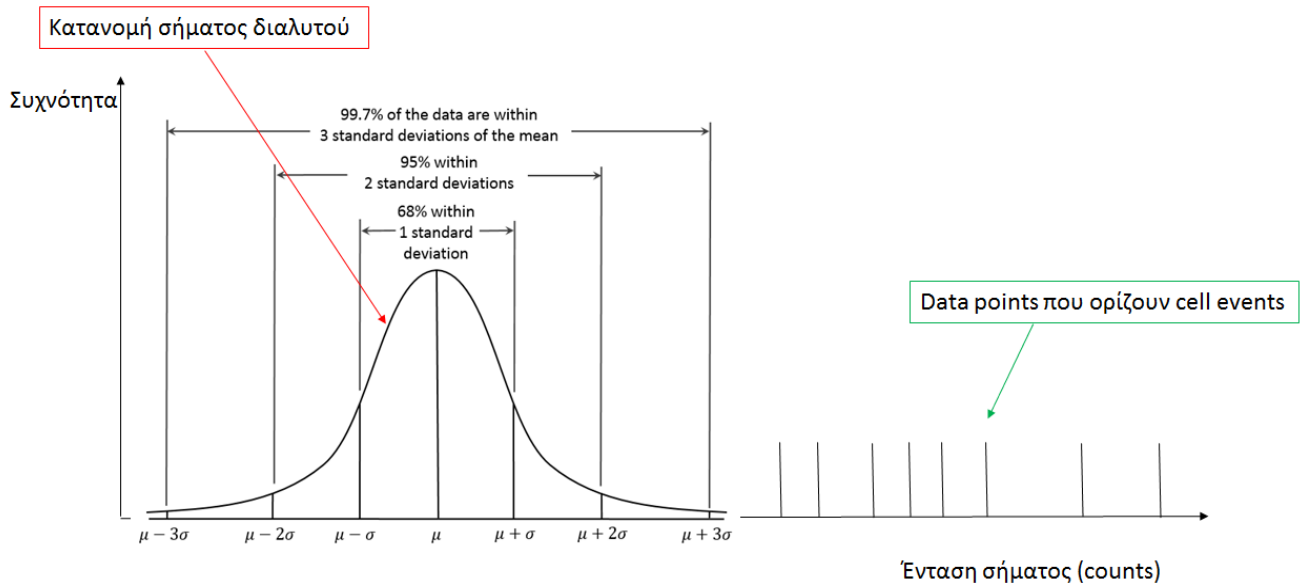
Η προετοιμασία των δειγμάτων για την SC ICP-MS ανάλυση αναφέρεται στην ενότητα 2.4. Το σετ των δειγμάτων που αναλύθηκαν ήταν η κυτταρική σειρά με τις συγκεντρώσεις επώασης των 0.63, 6.26, 12.5 ppm Pb και τα control cells. Οι πληροφορίες από τα δείγματα αυτά καταγράφηκαν κι επεξεργάστηκαν με τη χρήση του λογισμικού (Nano Syngistix, PE).

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα του SC ICP-MS είναι ο ταυτόχρονος προσδιορισμός της συγκέντρωσης του εξωκυττάριου διαλυτού στοιχείου που υπάρχει στο αιώρημα και της μάζας αυτού που εντοπίζεται στα κύτταρα. Αυτό συμβαίνει λόγω της χρησιμοποίησης μικρών dwell time τα οποία μειώνουν την ένταση του σήματος του διαλυτού στοιχείου αφού ο ανιχνευτής συγκεντρώνει λιγότερο αριθμό ιόντων σε σχέση με μεγαλύτερα dwell time. Το διαλυτό στοιχείο κατανέμεται ομοιογενώς στον όγκο του δείγματος που εισάγεται ανά min στο πλάσμα, κι έτσι ο ανιχνευτής θα βλέπει ένα

συνεχές σήμα από τον σταθερό αριθμό ιόντων που θα προκύπτουν ανά min. Αντίθετα, ο ιοντισμός ενός κυττάρου θα παράγει ένα πακέτο ιόντων λόγω της μεγάλης αριθμητικής πυκνότητας των ατόμων του στοιχείου στο κύτταρο. Αυτό το πακέτο ιόντων θα καταγραφεί ως παλμός στο καταγραφόμενο σήμα, του οποίου η ένταση θα αντιστοιχεί στον αριθμό ιόντων του στοιχείου που υπάρχει στο κάθε κύτταρο. Για κάθε data point (καταγραφή της έντασης του στοιχείου ανά 50 μ s) που θα λαμβάνεται, η ένταση του σήματος μπορεί να αντιστοιχεί στα ιόντα του εξωκυττάρου διαλυτού στοιχείου ή στο άθροισμα των προηγούμενων και των ιόντων προερχόμενων από το κύτταρο, που σημαίνει ότι πρέπει να οριστεί ένας τρόπος για να μπορούν τα 2 σήματα να διαχωρίζονται.

Η υπόθεση πάνω στον οποία βασίζεται η διαδικασία που εκτελεί αυτόματα το λογισμικό για να διαχωρίζει το σήμα του διαλυτού στοιχείου από αυτού που υπάρχει στα κύτταρα, είναι η κανονική κατανομή Gauss στην οποία υπακούουν οι τιμές της έντασης του εξωκυττάρου διαλυτού σήματος. Έτσι οι τιμές της έντασης του εξωκυττάρου διαλυτού στοιχείου (που λαμβάνονται ανά 50 μ s) συσσωρεύονται συμμετρικά γύρω από μία μέση τιμή (μ) και μπορούν να κυμαίνονται μεταξύ των διαστημάτων $\mu-3\sigma$ και $\mu+3\sigma$, όπου σ η τυπική απόκλιση (stdev). Αυτό είναι απόρροια των πηγών θορύβου, που επηρεάζουν το προσδιορισμό ενός αναλύτη στην ενόργανη ανάλυση. Έτσι, οποιαδήποτε τιμή έντασης βρίσκεται εκτός του εύρους της κανονικής κατανομής, θεωρείται ότι δεν αντιπροσωπεύει το σήμα του διαλυτού.

Ειδικότερα κατά την ανάλυση ενός δείγματος, το Syngistix Nano εκτελεί τις ακόλουθες διαδικασίες: 1) Καταγράφει την ένταση του σήματος του συγκεκριμένου ισοτόπου του στοιχείου που παρακολουθούμε συναρτήσει του χρόνου και κάθε 50 μ s λαμβάνει ένα data point. 2) Μετά το πέρας της καταγραφής, υπολογίζει το μέσο όρο (μ) και την τυπική απόκλιση (stdev) των data points όλου του data set. 3) Λαμβάνει όλα τα data points που είναι μεγαλύτερα (outliers) από την τιμή του $\text{mean}+3\text{stdev}$ και τα εξαιρεί από το αρχικό data set. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται για το αρχικό μειωμένο data set μέχρι να μην υπάρχει data point που να μπορεί να εξαιρεθεί. Ο μέσος όρος του τελικού μειωμένου data set αποτελεί τη μέση τιμή της έντασης του διαλυτού στοιχείου (mean dissolved intensity), ενώ όλα τα data points που εξαιρέθηκαν είναι outliers και δεν ανήκουν στο εύρος της κανονικής κατανομής $\text{mean}+3\text{stdev}$. 4) Εκτελεί ένα pre-scan για να εντοπίσει τις κορυφές που ορίζουν αυτά τα outlier data points. 5) Ολοκληρώνει την κάθε κορυφή το εμβαδόν της οποίας αντιπροσωπεύει την καθαρή αύξηση του σήματος σε counts και κατ' επέκταση το πλήθος των ιόντων του στοιχείου στο κύτταρο.



Εικόνα 3. Γραφική αναπαράσταση του διαχωρισμού του σήματος του διαλυτού στοιχείου από το σήμα των κυττάρων.

Για να γίνει εφικτή η συσχέτιση του εμβαδού της κάθε κορυφής με την μάζα του στοιχείου, πρέπει να προσδιοριστεί ο ρυθμός πρόσληψης δείγματος (sample uptake rate), η απόδοση μεταφοράς (TE%) και να γίνει βαθμονόμηση με πρότυπα διαλύματα διαλυτού στοιχείου. Το sample uptake rate υπολογίζεται από τη διαφορά στο βάρος ενός δοχείου με υπερκάθαρο νερό πριν και μετά την εκνέφωση. Η εκνέφωση χρονομετρείται για 2 min και η απώλεια βάρους μετατρέπεται σε ροή ανά λεπτό θεωρώντας την πυκνότητα του νερού 1 g/mL. Για τον προσδιορισμό της απόδοσης μεταφοράς (TE) χρησιμοποιήθηκαν νανοσωματίδια Χρυσού (Au NPs) διαμέτρου 60 nm (Reference Material 8013, NIST). Ειδικότερα, παρασκευάστηκε αραιό αιώρημα από τα NPs συγκέντρωσης 100 ng/L κι έγιναν 3 επαναλαμβανόμενες καταγραφές διάρκειας 1 min. Γνωρίζοντας την πυκνότητα του Au ($\rho=19.3 \text{ g/cm}^3$), το sample uptake, τη συγκέντρωση των Au NPs στο αιώρημα και τη μέση διάμετρο (60 nm) υπολογίζουμε από τη σχέση $m = \frac{4}{3} \times \pi \times r^3 \times \rho$ τη μάζα του ενός NP. Έτσι υπολογίζουμε την αριθμητική πυκνότητα των NPs στο αιώρημα και άρα και τον αριθμό NPs/min. Αφού γνωρίζουμε τον αριθμό των NPs που εισάγουμε ανά min και βασιζόμενοι στο ότι κάθε κορυφή αντιπροσωπεύει ένα NP, ο λόγος των κορυφών που καταγράφονται προς τα NPs που εισάγουμε μας δίνει την TE%. Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης, εισάγονται 3-4 διαφορετικές συγκεντρώσεις από διάλυμα με τη διαλυτή μορφή του στοιχείου που θέλουμε να προσδιορίσουμε. Τα πρότυπα διαλύματα που αναλύουμε προκύπτουν από πυκνά stock διαλύματα των στοιχείων σε συγκεντρώσεις της τάξεως των 10000 mg/L (ppm) σε υδατική μήτρα περιεκτικότητας 2-4% HNO_3 από τα οποία πραγματοποιούνται κατάλληλες αραιώσεις για να πετύχουμε τις επιθυμητές συγκεντρώσεις στα χαμηλά mg/L (ppb).

Πίνακας 1. Πληροφορίες πειράματος και παράμετροι χειρισμού του οργάνου με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard introduction system για την ανάλυση των κυττάρων επωασμένων σε Pb

Εγχυτής δείγματος (torch injector)	2.0 mm id Quartz
Ισχύς πλάσματος	1600 W
Ροή Αργού για το σχηματισμό πλάσματος (plasma gas)	18 L/min
Βοηθητική ροή Αργού για το σχηματισμό πλάσματος	1.2 L/min
Ροή Αργού για εκνέφωση	0.9 L/min
Ροή δείγματος	1.1 ml/min
Παρακολουθούμενα ισότοπα Pb, Ca	208, 44
Χρόνος σάρωσης m/z (Dwell time)	50 μ s
Χρόνος καταγραφής	60 s
Βαθμονόμηση με διαλυτό Pb και Ca σε 0.1% NaCl	0, 10, 50, 100 μ g/L (ppb)
% Απόδοση μεταφοράς (TE%)	2.1

Η παρασκευή των προτύπων έγινε σε 0.1 % NaCl έτσι ώστε η βαθμονόμηση να γίνει σε όμοια μήτρα με αυτή που διασπείραμε τα κύτταρα για να αποφύγουμε κάποια πιθανή διαφοροποίηση στην ευαισθησία. Σε άλλες όμως περιπτώσεις που θα αναφερθούν παρακάτω, αυτό δεν ήταν εφικτό καθώς στοιχεία όπως το As τείνουν να κολλάνε στα πλαστικά τοιχώματα των γραμμών αναρρόφησης δείγματος (uptake lines) οπότε η βαθμονόμηση γίνεται σε διαλύματα που περιέχουν 1-2% HNO₃. Μετά την κατασκευή της καμπύλης και με τη χρήση των τιμών του sample uptake rate και TE%, η καμπύλη συσχέτισης εντάσεως σήματος και συγκέντρωσης μετασχηματίζεται στην καμπύλη συσχέτισης εντάσεως σήματος με την απόλυτη μάζα στοιχείου που ανιχνεύεται ανά 50 μ s (mass flux / 50 μ s). Ακολουθεί ένας τυπικός τέτοιος μετασχηματισμός για την εισαγωγή 100 ng/mL (ppb).

$$100 \frac{ng}{mL} \times \frac{1.1mL}{min} \times \frac{1min}{6 \times 10^7 \mu s} \times 50 \mu s \times 0.021 \times \frac{10^{-3} \mu g}{ng} = 1.925 \times \frac{10^{-9} \mu g}{50 \mu s}$$

2.5.2. Κατεργασία κυττάρων με χηλικό αντιδραστήριο (EDTA) και προσδιορισμός Pb με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard introduction system

Για να εξετάσουμε την επίδραση του EDTA στα κύτταρα επωασμένα στις δεδομένες συγκεντρώσεις του Pb, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: 1) 100 μ L από το κάθε δείγμα και τοποθετήθηκαν σε Eppendorf vials. 2) Προστέθηκαν 200 μ L διαλύματος 1 mM αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA), 50 mM Trizma-Base και 40mM NaCl στο κάθε Eppendorf που περιείχε ποσότητα από το δείγμα. 3) Έντονο vortexing κι επώαση των κυττάρων στο δεδομένο διάλυμα για 10 min και σε πάγο. 4) Φυγοκέντρηση για 5 min στις 8000 rpm. 5) Συλλογή του ιζήματος που περιείχε τα κύτταρα και αναδιασπορά του σε 300 μ L διαλύματος 50mM Trizma-Base, 40 mM NaCl κι επαναληπτική φυγοκέντρηση όπως στο βήμα 4. 6) Συλλογή του ιζήματος κι αναδιασπορά τους σε 300 μ L 50mM Trizma-Base, 40 mM NaCl. Από το πυκνό αυτό δείγμα που προκύπτει, κάνοντας τις επιθυμητές αραιώσεις σε 0.1 % NaCl φτάνουμε στην δεδομένη κυτταρική αριθμητική πυκνότητα. Τα αιωρήματα εισήχθησαν στο όργανο και αναλύθηκαν με SC ICP-MS και με Conventional ICP-MS.

2.5.3. Προσδιορισμός Ολικής Μάζας Pb με τη μέθοδο του συμβατικού ICP-MS (Conventional ICP-MS) και το Standard introduction system

Τα δείγματα που αναλύθηκαν με το SC ICP-MS αναλύθηκαν και με τη συμβατική μέθοδο ανάλυσης με το ICP-MS (Conventional ICP-MS) με σκοπό την επαλήθευση των αποτελεσμάτων του SC ICP-MS για τον προσδιορισμό μετάλλου στα ίδια δείγματα. Πιο συγκεκριμένα, η συνολική μάζα του στοιχείου που μελετάμε στο κάθε κυτταρικό δείγμα και που προσδιορίζουμε με τη μέθοδο του SC ICP-MS πρέπει να συμφωνεί με τη συνολική μάζα που προσδιορίζουμε με conventional ICP-MS βασιζόμενοι στην αρχή διατήρησης της μάζας.

Πίνακας 2. Πληροφορίες πειράματος και παράμετροι λειτουργίας του οργάνου με τη μέθοδο του Conventional ICP-MS και το Standard introduction system για την ανάλυση κυττάρων επωασμένων σε Pb.

Εγχυτής δείγματος (torch injector)	2.0 mm id Quartz
Ισχύς πλάσματος	1600 W
Ροή Αργού για το σχηματισμό πλάσματος (plasma gas)	18 L/min
Βοηθητική ροή Αργού για το σχηματισμό πλάσματος	1.2 L/min
Ροή Αργού για εκνέφωση	0.9 L/min
Ροή δείγματος	1.1 ml/min
Παρακολουθούμενα ισότοπα Pb, Ca	208, 44
Χρόνος σάρωσης m/z (Dwell time)	100 ms
Βαθμονόμηση με διαλυτό Pb και Ca σε 0.1% NaCl	0, 10, 50, 100 µg/L (ppb)

Ο τρόπος με τον οποίο έγινε αυτή η ανάλυση ήταν με εισαγωγή του εκάστοτε δείγματος στο επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα όπως περιεγράφηκε και στην ενότητα 2.5.1 και με παρακολούθηση των ισοτόπων κάθε στοιχείου καταγράφοντας την ένταση του σήματος συναρτήσει του χρόνου. Μία τέτοια μέθοδος ονομάζεται Time-Resolved ICP-MS διότι λαμβάνουμε την ένταση του σήματος ενός δεδομένου m/z συναρτήσει του χρόνου. Με αυτόν τον τρόπο δεν αποφεύγεται το dead time, όμως το dwell time (100 ms) είναι κατά τρεις τάξεις μεγέθους μεγαλύτερο από αυτό που χρησιμοποιούσαμε στο SC ICP-MS. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι σε κάθε τέτοιο χρονικό διάστημα θα λαμβάνουμε την ένταση του σήματος του στοιχείου, στην οποία ένταση θα συνεισφέρει και η συγκέντρωση του εξωκυττάρου διαλυτού στοιχείου αλλά και το πλήθος των κυττάρων. Σε κάθε δείγμα καταγράφεται σε πραγματικό χρόνο το σήμα των επιλεγμένων m/z για 60-150 sec, μία διάρκεια που μας επιτρέπει να εξάγουμε ένα μέσο όρο έντασης σήματος αντιπροσωπευτικού της συγκέντρωσης του στοιχείου που εμπεριέχεται στο δείγμα και στα πρότυπα. Ο παράγοντας TE% δεν χρειάζεται αφού τα πρότυπα διαλύματα των στοιχείων έχουν την ίδια TE% με τα κυτταρικά δείγματα που αναλύονται για την συνολική μάζα των στοιχείων που εμπεριέχουν. Η επεξεργασία των δεδομένων για την ποσοτικοποίηση των στοιχείων γίνεται με υπολογιστικό πρόγραμμα (Excel 2013, Microsoft). Δεν υπάρχουν ξεχωριστές ενότητες στο Κεφάλαιο 3 για αναλύσεις των δειγμάτων με τη μέθοδο του Conventional ICP-MS. Τα αποτελέσματα της μεθόδου θα παρουσιάζονται ως η συνολική

μάζα του στοιχείου που εμπεριέχεται στον όγκο δείγματος που εισάγεται στο ICP ανά μονάδα χρόνου, και θα γίνεται σύγκριση με την συνολική μάζα που προκύπτει από το SC ICP-MS.

2.6 Ανάλυση δειγμάτων καλλιεργείων *Chlamydomonas reinhardtii* επωασμένων σε As (III)

2.6.1. Προσδιορισμός As (III) σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard introduction system

Η μέθοδος ανάλυσης περιεγράφηκε στην ενότητα 2.5.1 όπως και η προετοιμασία των δειγμάτων. Η διαφορά είναι η προσοχή που πρέπει να δείξουμε στην ισοβαρική παρεμπόδιση $ArCl^+$ όπως τονίστηκε και στην ενότητα 2.4. Γι' αυτό το λόγο, η αναδιασπορά των κυττάρων έγινε σε υπερκάθαρο νερό και ο χρόνος που μεσολάβησε μέχρι την ανάλυσή τους ήταν λιγότερος από 5 λεπτά για την αποφυγή εξώθησης μετάλλου εκτός των κυττάρων λόγω του ότι το περιβάλλον των κυττάρων είναι χαμηλότερης ιοντικής ισχύος από το κυτταρόπλασμα. Τα πρότυπα δείγματα για την βαθμονόμηση του As παρασκευάστηκαν σε υδατικό διαλύτη περιεκτικότητας 1% HNO_3 για την αποφυγή προσρόφησης As στα πλαστικά τοιχώματα των γραμμών και κατ' επέκταση μεταφοράς του από δείγμα σε δείγμα (carry-over).

Πίνακας 3. Πληροφορίες πειράματος και παράμετροι χειρισμού του οργάνου με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard introduction system για την ανάλυση κυττάρων επωασμένων σε As (III).

Εγχυτής δείγματος (torch injector)	2.0 mm id Quartz
Ισχύς πλάσματος	1600 W
Ροή Αργού για το σχηματισμό πλάσματος (plasma gas)	18 L/min
Βοηθητική ροή Αργού για το σχηματισμό πλάσματος	1.2 L/min
Ροή Αργού για εκνέφωση	0.9 L/min
Ροή δείγματος	1.03 mL/min
Παρακολουθούμενα ισότοπα As, Ca	75, 44
Χρόνος σάρωσης m/z (Dwell time)	50 μ s
Χρόνος καταγραφής	60 s
Βαθμονόμηση με διαλυτό As σε 1% HNO_3	0, 1, 10 μ g/L (ppb)
% Απόδοση μεταφοράς (TE %)	3.57

2.6.2. Προσδιορισμός Ολικής Μάζας As(III) με τη μέθοδο του Conventional ICP-MS και το Standard introduction system

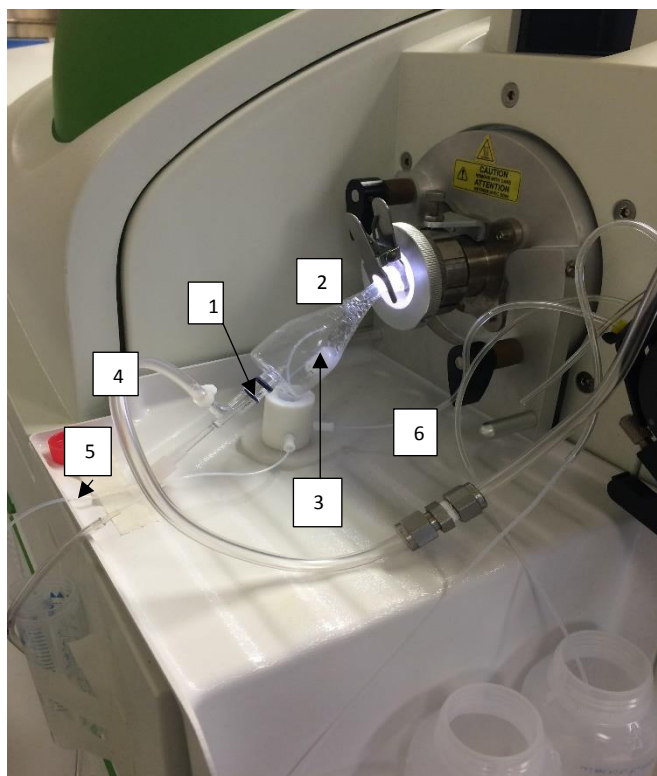
Η πειραματική πορεία είναι όμοια με αυτήν της ενότητας 2.5.3. Τα κυτταρικά δείγματα και τα πρότυπα διαλύματα που αναλύθηκαν με το SC ICP-MS αναλύθηκαν και με Conventional ICP-MS.

Πίνακας 4. Πληροφορίες πειράματος και παράμετροι λειτουργίας του οργάνου με τη μέθοδο του Conventional ICP-MS και το Standard introduction system για την ανάλυση κυττάρων επωασμένων σε As (III).

Εγχυτής δείγματος (torch injector)	2.0 mm id Quartz
Ισχύς πλάσματος	1600 W
Ροή Αργού για το σχηματισμό πλάσματος (plasma gas)	18 L/min
Βοηθητική ροή Αργού για το σχηματισμό πλάσματος	1.2 L/min
Ροή Αργού για εκνέφωση	0.9 L/min
Ροή δείγματος	1.03 mL/min
Παρακολουθούμενα ισότοπα As	75
Χρόνος σάρωσης m/z (Dwell time)	100 ms
Βαθμονόμηση με διαλυτό As σε 1% HNO ₃	0, 1, 10 µg/L (ppb)

2.6.3. Προσδιορισμός As (III) σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το υψηλής απόδοσης σύστημα εισαγωγής (High Efficiency Nebulization Introduction ή HEN)

Συναρμολογήθηκε ένα High Efficiency Nebulization Introduction Chamber (HENIC) (Εικόνα 4) το οποίο περιλάμβανε τη χρήση ενός εκνεφωτή (HEN-90-A.02, Meinhard), κατασκευασμένος για χαμηλές ροές και υψηλές αποδόσεις στην εκνέφωση δείγματος, και ενός θαλάμου εκνέφωσης τύπου πρόσκρουσης σε μπίλια (impact bead). Ο θάλαμος impact bead τροποποιήθηκε με αφαίρεση της γυάλινης μπίλιας στην οποία προσκρούανε κανονικά οι σταγόνες από το αερόλυμα που παράγει ο εκνεφωτής, έτσι ώστε τα κύτταρα να έχουν ελεύθερη διέλευση κατά την πορεία τους προς το πλάσμα. Ακόμη προσθέσαμε μία γραμμή αερίου η οποία θα βοηθούσε τα κύτταρα στην πορεία τους προς το πλάσμα. Η είσοδος του δείγματος στον εκνεφωτή έγινε με φυσική αναρρόφηση η οποία εξαρτάται άμεσα από τη ροή εκνεφωτικού Ar και το ιξώδες του δείγματος που εισάγουμε κάθε φορά. Η μέτρησή της έγινε κατά βάρος (σταθμικά) όπως και στην ενότητα 2.5.1. πριν την έναρξη της βελτιστοποίησης και μετά το πέρας της.



Εικόνα 4. Πραγματική λήψη εν ώρα λειτουργίας του HEN introduction system. Οι αριθμοί αντιπροσωπεύουν 1) τον εκνεφωτή HEN, 2) τον τροποποιημένο θάλαμο εκνέφωσης (HENIC), 3) τη βοηθητική γραμμή αερίου Ar 4) την κεντρική γραμμή του Ar εκνέφωσης, 5) την γραμμή εισόδου δείγματος, 6) την γραμμή αποβλήτων.

Η βελτιστοποίηση ενός τέτοιου συστήματος ως προς την ροή του Ar στη βοηθητική γραμμή, τη ροή Ar κατά την εκνέφωση και τις υπόλοιπες λειτουργικές παραμέτρους του ICP-MS όπως ισχύς πλάσματος (RF power) και συντεταγμένες θέσης πυρσού (x,y,z torch coordinates), έγινε χειροκίνητα με εκνέφωση του διαλύματος και παρακολουθώντας την ένταση του σήματος των στοιχείων σε πραγματικό χρόνο. Ένας συμβιβασμός για όλες τις παραπάνω παραμέτρους ήταν στο σημείο όπου η ευαισθησία για το 1 $\mu\text{g/L}$ In και το επίπεδο των οξειδίων ήταν συγκρίσιμα με τη ροή αναφοράς (1 mL/min) που είχαμε με το standard introduction system. Αν δηλαδή το 1 $\mu\text{g/L}$ In στο 1 mL/min έδινε σήμα 7×10^4 cps στο standard introduction system, τότε στο HEN στα 0.100 mL/min με σήμα 3.9×10^4 cps η ευαισθησία αναλογικά ήταν πολύ υψηλότερη. Η υψηλότερη ευαισθησία οφείλεται στο γεγονός ότι με το HENIC εισέρχεται σχεδόν όλο το αερόλυμα στο πλάσμα σε αντίθεση με το standard όπου ο κυκλωνικός θάλαμος εμποδίζει τις σταγόνες μεγάλης διαμέτρου να εισέλθουν.

Ο προσδιορισμός της TE% έγινε με τον τρόπο που περιεγράφηκε στην ενότητα 2.5.1 με τη διαφορά ότι η εισαγωγή του δείγματος στον εκνεφωτή έγινε με φυσική αναρρόφηση.

Πίνακας 5. Πληροφορίες πειράματος και παράμετροι λειτουργίας του οργάνου με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το HEN introduction system για την ανάλυση κυττάρων επωασμένων σε As (III).

Εγχυτής δείγματος (torch injector)	2.0 mm id Quartz
Ισχύς πλάσματος	1600 W
Ροή Αργού για το σχηματισμό πλάσματος (plasma gas)	18 L/min
Βοηθητική ροή Αργού για το σχηματισμό πλάσματος	1.2 L/min
Ροή Αργού για εκνέφωση	0.4 L/min
Βοηθητική ροή Ar για μετάβαση κυττάρων στο πλάσμα	0.9 L/min
Ροή δείγματος	0.101 mL/min
Παρακολουθούμενα ισότοπα As, Ca	75, 44
Χρόνος σάρωσης m/z (Dwell time)	50 μ s
Χρόνος καταγραφής	60-120 s
Βαθμονόμηση με διαλυτό As σε 1% HNO ₃ και Ca σε H ₂ O	0, 1, 10/0, 10, 20, 40 μ g/L (ppb)
% Απόδοση μεταφοράς (TE %)	11.58

2.6.4. Προσδιορισμός Ολικής Μάζας As (III) με τη μέθοδο του Conventional ICP-MS και το HEN introduction system

Τα δείγματα κυττάρων και τα πρότυπα διαλύματα που αναλύθηκαν με SC ICP-MS στην ενότητα 2.6.3 αναλύθηκαν και με Conventional ICP-MS, με την αναλυτική πορεία να είναι ίδια με αυτή που ακολουθήθηκε στην ενότητα 2.5.3.

Πίνακας 6. Πληροφορίες πειράματος και παράμετροι χειρισμού του οργάνου με τη μέθοδο του Conventional ICP-MS και το HEN introduction system για την ανάλυση κυττάρων επωασμένων σε As (III).

Εγχυτής δείγματος (torch injector)	2.0 mm id Quartz
Ισχύς πλάσματος	1600 W
Ροή Αργού για το σχηματισμό πλάσματος (plasma gas)	18 L/min
Βοηθητική ροή Αργού για το σχηματισμό πλάσματος	1.2 L/min
Ροή Αργού για εκνέφωση	0.4 L/min
Βοηθητική ροή Ar για μετάβαση κυττάρων στο πλάσμα	0.9 L/min
Ροή δείγματος	0.101 mL/min
Παρακολουθούμενα ισότοπα As, Ca	75, 44
Χρόνος σάρωσης m/z (Dwell time)	100 ms
Βαθμονόμηση με διαλυτό As σε 1% HNO ₃	0, 1, 10/0, 10, 20, 40 μ g/L (ppb)

2.7 Ανάλυση δειγμάτων καλλιεργείων *Chlamydomonas reinhardtii* επωασμένων σε As (V)

2.7.1. Προσδιορισμός As (V) σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard introduction system

Πίνακας 7. Πληροφορίες πειράματος και παράμετροι χειρισμού του οργάνου με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard introduction system για την ανάλυση κυττάρων επωασμένων σε As (V).

Εγχυτής δείγματος (torch injector)	2.0 mm id Quartz
Ισχύς πλάσματος	1600 W
Ροή Αργού για το σχηματισμό πλάσματος (plasma gas)	18 L/min
Βοηθητική ροή Αργού για το σχηματισμό πλάσματος	1.2 L/min
Ροή Αργού για εκνέφωση	0.9 L/min
Ροή δείγματος	1.055 mL/min
Παρακολουθούμενα ισότοπα As, Ca	75, 44
Χρόνος σάρωσης m/z (Dwell time)	50 μ s
Χρόνος καταγραφής	60 s
Βαθμονόμηση με διαλυτό As σε 1% HNO ₃ και Ca σε H ₂ O	0, 1, 5/ 0, 10, 20, 40 μ g/L (ppb)
% Απόδοση μεταφοράς (TE %)	4

2.7.2. Προσδιορισμός ολικής μάζας As (V) με τη μέθοδο του Conventional ICP-MS και το Standard introduction system

Πίνακας 8. Πληροφορίες πειράματος και παράμετροι χειρισμού του οργάνου με τη μέθοδο του Conventional ICP-MS και το Standard introduction system για την ανάλυση κυττάρων επωασμένων σε As (V).

Εγχυτής δείγματος (torch injector)	2.0 mm id Quartz
Ισχύς πλάσματος	1600 W
Ροή Αργού για το σχηματισμό πλάσματος (plasma gas)	18 L/min
Βοηθητική ροή Αργού για το σχηματισμό πλάσματος	1.2 L/min
Ροή Αργού για εκνέφωση	0.9 L/min
Ροή δείγματος	1.055 mL/min
Παρακολουθούμενα ισότοπα As, Ca	75, 44
Χρόνος σάρωσης m/z (Dwell time)	100 ms
Βαθμονόμηση με διαλυτό As σε 1% HNO ₃	0, 1, 5/0, 10, 20, 40 μ g/L (ppb)

2.7.3. Προσδιορισμός As (V) σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το HEN introduction system.

Πίνακας 9. Πληροφορίες πειράματος και παράμετροι λειτουργίας του οργάνου με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το HEN introduction system για την ανάλυση κυττάρων επωασμένων As (V).

Εγχυτής δείγματος (torch injector)	2.0 mm id Quartz
Ισχύς πλάσματος	1600 W
Ροή Αργού για το σχηματισμό πλάσματος (plasma gas)	18 L/min
Βοηθητική ροή Αργού για το σχηματισμό πλάσματος	1.2 L/min
Ροή Αργού για εκνέφωση	0.4 L/min
Βοηθητική ροή Ar για μετάβαση κυττάρων στο πλάσμα	0.9 L/min
Ροή δείγματος	0.0988 mL/min
Παρακολουθούμενα ισότοπα As, Ca	75, 44
Χρόνος σάρωσης m/z (Dwell time)	50 μ s
Χρόνος καταγραφής	60-120 s
Βαθμονόμηση με διαλυτό As σε 1% HNO ₃	0, 1, 5/0, 10, 20, 40 μ g/L (ppb)
% Απόδοση μεταφοράς TE	11.86

2.7.4. Προσδιορισμός ολικής μάζας As(V) με τη μέθοδο του Conventional ICP-MS και το HEN introduction system

Πίνακας 10. Πληροφορίες πειράματος και παράμετροι λειτουργίας του οργάνου με τη μέθοδο του Conventional ICP-MS και το HEN introduction system για την ανάλυση κυττάρων επωασμένων σε As (V).

Εγχυτής δείγματος (torch injector)	2.0 mm id Quartz
Ισχύς πλάσματος	1600 W
Ροή Αργού για το σχηματισμό πλάσματος (plasma gas)	18 L/min
Βοηθητική ροή Αργού για το σχηματισμό πλάσματος	1.2 L/min
Ροή Αργού για εκνέφωση	0.4 L/min
Βοηθητική ροή Ar για μετάβαση κυττάρων στο πλάσμα	0.9 L/min
Ροή δείγματος	0.101 ml/min
Παρακολουθούμενα ισότοπα As, Ca	75, 44
Χρόνος σάρωσης m/z (Dwell time)	100 ms
Βαθμονόμηση με διαλυτό As σε 1% HNO ₃	0, 1, 5/0, 10, 20, 40 μ g/L (ppb)

2.8 Ανάλυση δειγμάτων καλλιιεργειών *Chlamydomonas reinhardtii* επωασμένων σε Cd

2.8.1. Προσδιορισμός Cd σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard introduction system

Η αναλυτική πορεία που ακολουθήθηκε είναι ίδια με αυτήν που περιεγράφηκε στην ενότητα 2.5.1. Τα κυτταρικά δείγματα που αναλύθηκαν ήταν κύτταρα μετά από επώαση στις 3 συγκεντρώσεις του Cd και παρασκευάστηκαν όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 2.4.

Πίνακας 11. Πληροφορίες πειράματος και παράμετροι λειτουργίας του οργάνου με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard introduction system για την ανάλυση κυττάρων επωασμένων σε Cd.

Εγχυτής δείγματος (torch injector)	2.0 mm id Quartz
Ισχύς πλάσματος	1600 W
Ροή Αργού για το σχηματισμό πλάσματος (plasma gas)	18 L/min
Βοηθητική ροή Αργού για το σχηματισμό πλάσματος	1.2 L/min
Ροή Αργού για εκνέφωση	0.9 L/min
Ροή δείγματος	1.025 mL/min
Παρακολουθούμενα ισότοπα Cd, Ca	114, 44
Χρόνος σάρωσης m/z (Dwell time)	50 μ s
Χρόνος καταγραφής	60 s
Βαθμονόμηση με διαλυτό Cd σε 1% HNO ₃ και Ca σε H ₂ O	0, 5, 10, 20/ 0, 10, 20, 50 μ g/L (ppb)
% Απόδοση μεταφοράς (TE %)	3.37

2.8.2. Προσδιορισμός ολικής μάζας Cd με τη μέθοδο του Conventional ICP-MS και το Standard introduction system

Πίνακας 12. Πληροφορίες πειράματος και παράμετροι λειτουργίας του οργάνου με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard introduction system για την ανάλυση κυττάρων επωασμένων σε Cd

Εγχυτής δείγματος (torch injector)	2.0 mm id Quartz
Ισχύς πλάσματος	1600 W
Ροή Αργού για το σχηματισμό πλάσματος (plasma gas)	18 L/min
Βοηθητική ροή Αργού για το σχηματισμό πλάσματος	1.2 L/min
Ροή Αργού για εκνέφωση	0.9 L/min
Ροή δείγματος	1.025 mL/min
Παρακολουθούμενα ισότοπα Cd, Ca	114, 44
Χρόνος σάρωσης m/z (Dwell time)	100 ms
Βαθμονόμηση με διαλυτό Cd σε 1% HNO ₃ και Ca σε H ₂ O	0, 5, 10, 20/0, 10, 20, 50 μ g/L (ppb)

2.8.3. Προσδιορισμός Cd σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το HEN introduction system

Πίνακας 13. Πληροφορίες πειράματος και παράμετροι λειτουργίας του οργάνου με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το HEN introduction system για την ανάλυση κυττάρων επωασμένων σε Cd

Εγχυτής δείγματος (torch injector)	2.0 mm id Quartz
Ισχύς πλάσματος	1600 W
Ροή Αργού για το σχηματισμό πλάσματος (plasma gas)	18 L/min
Βοηθητική ροή Αργού για το σχηματισμό πλάσματος	1.2 L/min
Ροή Αργού για εκνέφωση	0.4 L/min
Βοηθητική ροή Ar για μετάβαση κυττάρων στο πλάσμα	0.4 L/min
Ροή δείγματος	0.089 mL/min
Παρακολουθούμενα ισότοπα Cd, Ca	114, 44
Χρόνος σάρωσης m/z (Dwell time)	50 μ s
Χρόνος καταγραφής	180 s
Βαθμονόμηση με διαλυτό Cd σε 1% HNO ₃ και Ca σε H ₂ O	0, 5, 10, 20/0, 10, 20, 50 μ g/L (ppb)
% Απόδοση μεταφοράς TE	13.37

2.8.4. Προσδιορισμός ολικής μάζας Cd με τη μέθοδο του Conventional ICP-MS και το HEN introduction system

Πίνακας 14. Πληροφορίες πειράματος και παράμετροι λειτουργίας του οργάνου με τη μέθοδο του Conventional ICP-MS και το HEN introduction system για την ανάλυση κυττάρων επωασμένων σε Cd.

Εγχυτής δείγματος (torch injector)	2.0 mm id Quartz
Ισχύς πλάσματος	1600 W
Ροή Αργού για το σχηματισμό πλάσματος (plasma gas)	18 L/min
Βοηθητική ροή Αργού για το σχηματισμό πλάσματος	1.2 L/min
Ροή Αργού για εκνέφωση	0.4 L/min
Βοηθητική ροή Ar για μετάβαση κυττάρων στο πλάσμα	0.4 L/min
Ροή δείγματος	0.0894 mL/min
Παρακολουθούμενα ισότοπα Cd, Ca	114, 44
Χρόνος σάρωσης m/z (Dwell time)	100 ms
Βαθμονόμηση με διαλυτό Cd σε 1% HNO ₃ και Ca σε H ₂ O	0, 5, 10, 20/0, 10, 20, 40 μg/L (ppb)

2.9 Ανάλυση δειγμάτων καλλιεργείων *Chlamydomonas reinhardtii* για Θείο (S) και Φώσφορο (P)

Το Conventional ICP-MS δεν είναι σε θέση να προσδιορίσει S ή P σε ένα δείγμα. Αυτό οφείλεται στις ισοβαρικές παρεμποδίσεις στα m/z 31 και 32 του P και S, αντίστοιχα. Οι κύριες παρεμποδίσεις είναι ¹⁵N¹⁶O⁺, ¹⁴N¹⁶OH⁺ για το ³¹P και ¹⁶O₂⁺ για το ³²S. Επειδή η αφθονία αυτών των ιόντων στο πλάσμα είναι υψηλή, κατά συνέπεια το υπόβαθρο σήμα κατά την παρακολούθηση αυτών των μαζών είναι τεράστιο με αποτέλεσμα να μην υπάρχει η ευαισθησία να προσδιοριστούν συγκεντρώσεις από αυτά τα στοιχεία. Εκμεταλλευόμενοι την ενδιάμεση κυψελίδα πρόσκρουσης (Dynamic Reaction Cell-DRC), που φέρει το συγκεκριμένο όργανο, μπορούμε να εισάγουμε μοριακό O₂ το οποίο θα αντιδράσει με ατομικά ιόντα ³²S και ³¹P μετά την είσοδό τους στην κυψελίδα σχηματίζοντας PO⁺ και SO⁺. Τα προϊόντα μοριακά ιόντα μπορούμε πλέον να τα ανιχνεύσουμε στα μετατοπισμένα m/z 47 και 48 αντιστοίχως.

Η βελτιστοποίηση αυτής της μεθόδου απαιτεί την εύρεση της βέλτιστης ροής O₂ στην κυψελίδα πρόσκρουσης και τα βέλτιστα δυναμικά ενός συγκεντρωτικού φακού ιόντων (RPq). Η διαδικασία αυτή έγινε με βελτιστοποίηση ως προς την ροή O₂ πρωτίστως εισάγοντας υδατικό διάλυμα 1% HNO₃ ως το τυφλό (blank) και διάλυμα συγκέντρωσης 50 μg/L διαλυτού S. Η βέλτιστη τιμή αερίου ήταν αυτή που μας έδινε τη μέγιστη τιμή του λόγου $\frac{\text{ένταση σήματος S}}{\text{ένταση σήματος τυφλού}}$. Εξετάστηκε το εύρος από 0.2-2 mL/min O₂.

Εφόσον προσδιορίστηκε η βέλτιστη τιμή ροής για το O₂, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία για τη βελτιστοποίηση του δυναμικού RPq. Το εύρος που εξετάστηκε ήταν από 0.1-0.6 (arbitrary units). Οι βέλτιστες τιμές ροής O₂ και RPq διατηρήθηκαν και κατά τον προσδιορισμό P.

2.9.1. Προσδιορισμός S και P σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS με DRC και το Standard introduction system

Η μέθοδος εφαρμόστηκε δοκιμαστικά για τον προσδιορισμό S και P σε δείγματα control cells. Η βαθμονόμηση έγινε με πρότυπα διαλύματα διαλυτού S και P των οποίων οι συγκεντρώσεις μαζί με τις υπόλοιπες παραμέτρους χειρισμού του οργάνου, φαίνονται στον Πίνακα 15.

Πίνακας 15. Πληροφορίες πειράματος και παράμετροι λειτουργίας του οργάνου με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard introduction system για την ανάλυση των control cells.

Εγχυτής δείγματος (torch injector)	2.0 mm id Quartz
Ισχύς πλάσματος	1600 W
Ροή Αργού για το σχηματισμό πλάσματος (plasma gas)	18 L/min
Βοηθητική ροή Αργού για το σχηματισμό πλάσματος	1.2 L/min
Ροή Αργού για εκνέφωση	0.9 L/min
Ροή O ₂ στην κυψελίδα πρόσκρουσης	1.5 mL/min
Δυναμικό φακού εστίασης (Rrq)	0.5
Ροή δείγματος	1.03 mL/min
Παρακολουθούμενα ισότοπα	47, 48
Χρόνος σάρωσης m/z (Dwell time)	50 μ s
Χρόνος καταγραφής	60 s
Βαθμονόμηση με διαλυτό S και P σε H ₂ O	0, 10, 50, 200, 10 ⁴ μ g/L (ppb)
% Απόδοση μεταφοράς (TE %)	4.73

2.9.2. Προσδιορισμό ολικής μάζας S και P με τη μέθοδο του Conventional ICP-MS με DRC και το standard introduction system

Πίνακας 16. Πληροφορίες πειράματος και παράμετροι λειτουργίας του οργάνου με τη μέθοδο του Conventional ICP-MS και το Standard introduction system για την ανάλυση των control cells.

Εγχυτής δείγματος (torch injector)	2.0 mm id Quartz
Ισχύς πλάσματος	1600 W
Ροή Αργού για το σχηματισμό πλάσματος (plasma gas)	18 L/min
Βοηθητική ροή Αργού για το σχηματισμό πλάσματος	1.2 L/min
Ροή Αργού για εκνέφωση	0.9 L/min
Ροή O ₂ στην κυψελίδα πρόσκρουσης	1.5 mL/min
Δυναμικό φακού εστίασης (Rrq)	0.5
Ροή δείγματος	1.03 mL/min
Παρακολουθούμενα ισότοπα	47, 48
Χρόνος σάρωσης m/z (Dwell time)	100 ms
Βαθμονόμηση με διαλυτό S και P σε H ₂ O	0, 10, 50, 200, 10 ⁴ μ g/L (ppb)

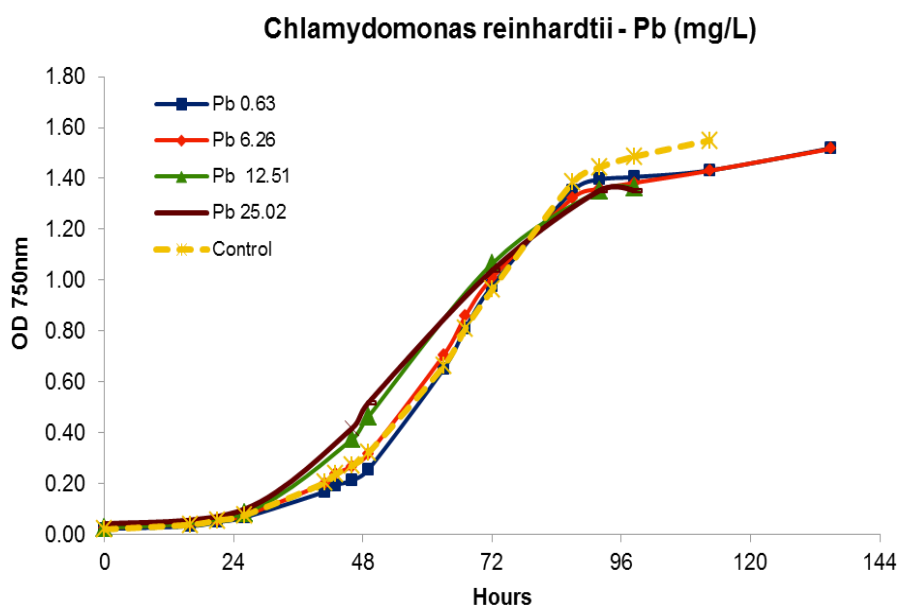
Κεφάλαιο 3

Αποτελέσματα και Συζήτηση

3.1 Εκτίμηση της ανάπτυξης των *Chlamydomonas reinhardtii* παρουσία βαρέων μετάλλων

Για να εξετασθεί η πρόοδος ανάπτυξης των κυττάρων στις συγκεντρώσεις των μετάλλων που προστέθηκαν, κατασκευάστηκαν οι ακόλουθες καμπύλες ανάπτυξης με τακτική (ανά 12 ώρες) καταγραφή της οπτικής πυκνότητας στα 750 nm. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Χημείας και Βιοχημικών Διεργασιών του Τμήματος Μηχανικών Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος, ΤΕΙ Κρήτης.

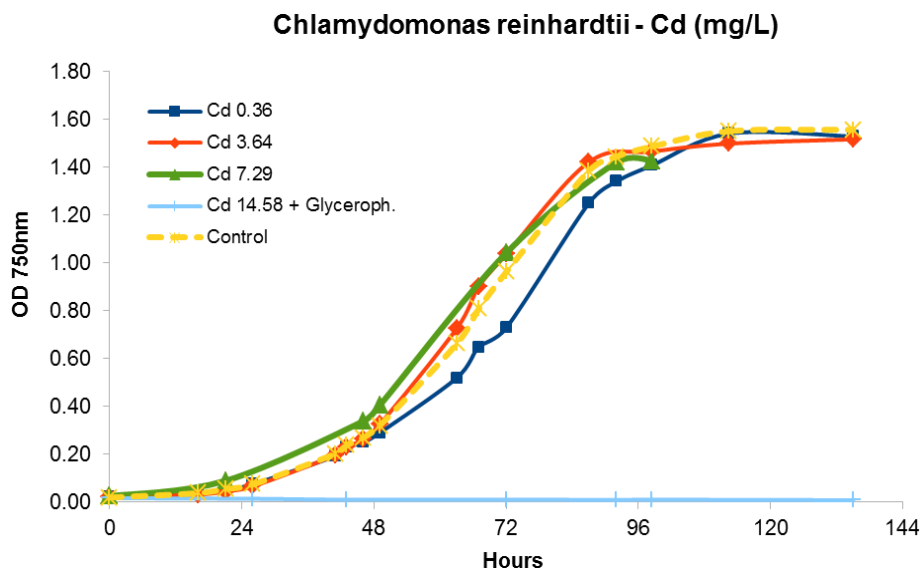
Από το Γράφημα 1 φαίνεται ότι η πορεία ανάπτυξης των κυττάρων επωασμένα σε 0.63, 6.26 και 12.5 mg/L (ppm) Pb (συγκεντρώσεις επώασης σε Pb που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία) είναι η ίδια με την πορεία των κυττάρων που αναπτύχθηκαν χωρίς την προσθήκη Pb (control cells). Παρόμοια εικόνα παρουσιάζουν και τα κύτταρα επωασμένα σε 25 ppm Pb, όμως δεν υπέστησαν ανάλυση με SC ICP-MS. Συμπερασματικά, οι συγκεντρώσεις Pb που εισήχθησαν, δεν είναι τοξικές για τα κύτταρα.



Γράφημα 1. Καμπύλη ανάπτυξης *Chlamydomonas reinhardtii* επωασμένα σε 0.63, 6.26 και 12.5 mg/L Pb συγκριτικά με τα control cells[31].

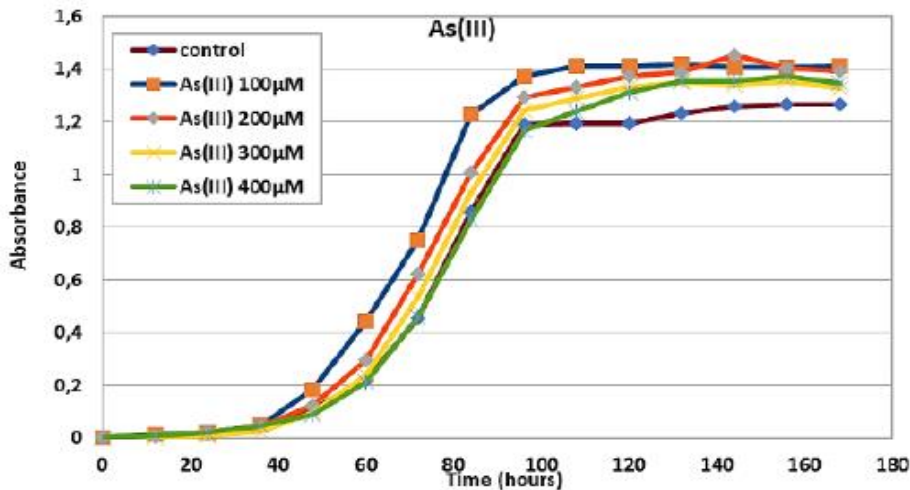
Η πορεία ανάπτυξης των κυττάρων επωασμένα σε 0.36, 3.64 και 7.29 ppm Cd (συγκεντρώσεις επώασης σε Cd που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη διατριβή) είναι παρόμοια με αυτήν των control

cells (Γράφημα 2). Η ανάπτυξη των κυττάρων επωασμένα σε 0.36 ppm Cd εμφανίζει μία καθυστέρηση στο χρονικό διάστημα μεταξύ 48 και 96 ωρών, όμως μετά το πέρας των 96 ωρών αγγίζει τις τιμές των control cells. Η συγκέντρωση επώασης των 14.6 ppm Cd στο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης της καλλιέργειας ήταν τοξική για τα κύτταρα. Το Glyceroph ανιπροσωπευεί την φωσφορική γλυκερόλη η οποία προστίθεται στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων, όταν αυτά επωάζονται σε υψηλές συγκεντρώσεις δυσδιάλυτων βαρέων μετάλλων όπως το Cd, για τον περιορισμό σχηματισμού ιζήματος.



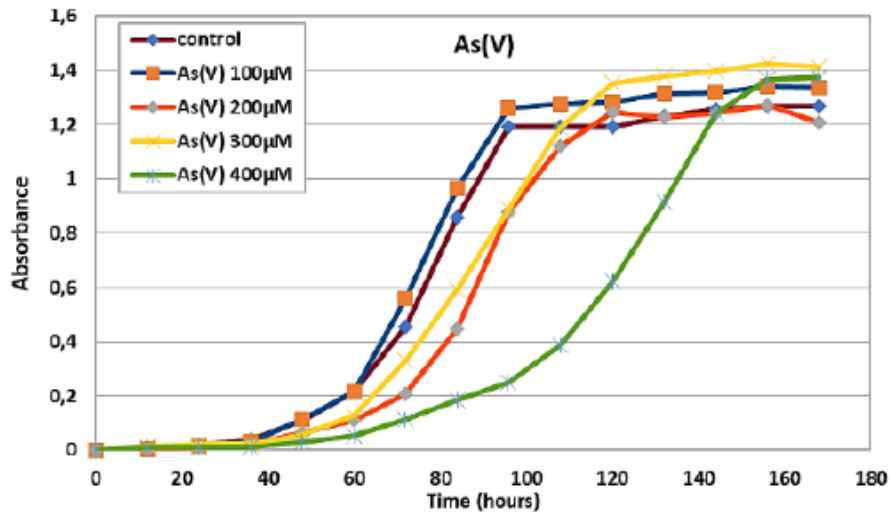
Γράφημα 2. Καμπύλη ανάπτυξης των *Chlamydomonas reinhardtii* σε 0.36, 3.64 και 7.29 mg/L Cd συγκριτικά με τα control cells[31].]

Για την ανάπτυξη των κυττάρων παρουσία των 4 συγκεντρώσεων As (III) (Γράφημα 3), παρατηρείται μία ελαφρώς γρηγορότερη ανάπτυξη μεταξύ των ωρών 50-90 για τη χαμηλότερη συγκέντρωση των 100 μ M. Επίσης μετά το σημείο των 100 ωρών όπου τελειώνει η εκθετική φάση ανάπτυξης και ξεκινά η στάσιμη φάση, οι τιμές της απορρόφησης για τα κύτταρα σε As (III) είναι υψηλότερες από αυτές των control. Παρόλα αυτά, οι διαφορές είναι μικρότερες από 20% κι άρα συμπεραίνουμε την ομαλή ανάπτυξη των κυττάρων.



Γράφημα 3. Καμπύλη ανάπτυξης των *Chlamydomonas reinhardtii* σε 100, 200, 300 και 400 μM As (III) συγκριτικά με τα control cells[32].

Οι καμπύλες ανάπτυξης για τα κύτταρα επωασμένα σε 100, 200 και 300 μM As (V) συμφωνούν με τη πορεία των control cells με μία καθυστέρηση για αυτά επωασμένα σε 200 και 300 μM στο διάστημα μεταξύ 60-100 ωρών της εκθετικής ανάπτυξης (Γράφημα 4). Ακόμη μεγαλύτερη καθυστέρηση παρατηρείται για τα κύτταρα επωασμένα στην υψηλότερη συγκέντρωση των 400 μM As (V) όπου η ανάπτυξη των κυττάρων αγγίζει αυτή των control μετά το πέρας των 140 ωρών. Αυτό το αποτέλεσμα είναι σε συμφωνία με μελέτη[19] για την έκθεση των *Chlamydomonas reinhardtii* σε ενώσεις του As, όπου παρατηρείται καθυστέρηση της ανάπτυξης των κυττάρων (έως 144 ώρες) για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 100 μM As (V) ακόμη και αν ανόργανα φωσφορικά υπάρχουν στο θρεπτικό μέσο[19]. Στο τέλος όμως τα κύτταρα φαίνεται από το διάγραμμα να καταφέρνουν να αναπτυχθούν αγγίζοντας τις τιμές απορρόφησης των control. Σημειώνεται ότι η συγκέντρωση των 100 μM As (V) δεν αναλύθηκε καθώς η καλλιέργεια υπέστη μόλυνση μετά την ανάπτυξή της.



Γράφημα 4. Καμπύλη ανάπτυξης των *Chlamydomonas reinhardtii* σε 100, 200, 300, 400 μM As (V) συγκριτικά με τα control cells[32].

3.2 Αποτελέσματα μετρήσεων κυτταρικής αριθμητικής πυκνότητας κάθε δείγματος και ολικής χλωροφύλλης

Παρατίθενται οι πληθυσμού κυττάρων στα πυκνά δείγματα (stock) με τη μέθοδο του αιμοκυτταρομέτρου κάτω από οπτικό μικροσκόπιο, συνοδευόμενοι από τις μετρήσεις ολικής χλωροφύλλης. Η επισήμανση για το control υποδεικνύει ότι κάθε σετ κυτταρικών δειγμάτων με προσθήκη μετάλλου αναλύθηκε συγκριτικά με control cells που προέρχονταν από stock διαφορετικής ημερομηνίας ανάπτυξης. Από αναλυτική σκοπιά, κάθε σετ κυτταρικών δειγμάτων με προσθήκη μετάλλου θα έπρεπε να αντιπαρατίθεται με το δείγμα των control cells τα οποία αναπτύχθηκαν και συλλέχθηκαν την ίδια χρονική στιγμή με τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν με προσθήκη μετάλλου. Έτσι, το ολοκληρωμένο σετ κυτταρικών δειγμάτων θα αποτελούνταν από δείγματα που θα είχαν παρασκευαστεί σε πανομοιότυπες συνθήκες. Καθώς οι συνθήκες ανάπτυξης είναι ίδιες για όλες τις καλλιέργειες κυττάρων και δεδομένου ότι η διαδικασία συλλογής κι αποθήκευσης των κυττάρων σαν stock δείγματα περιλαμβάνει την ανθρώπινη παρέμβαση ως παράγοντα τυχαίου σφάλματος, η σύγκριση μεταξύ κυτταρικών δειγμάτων διαφορετικής ημερομηνίας ανάπτυξης θεωρείται βάσιμη.

Πίνακας 17. Κυτταρικοί πληθυσμοί όπως προέκυψαν από τις μετρήσεις με τη μέθοδο του αιμοκυτταρομέτρου, και συγκεντρώσεις ολικής χλωροφύλλης στα δείγματα των control cells 28/3 και των κυττάρων επωασμένων σε 0.63, 6.26 και 12.5 ppm Pb.

Ταυτότητα δείγματος	Αριθμός κυττάρων (κύτταρα/mL)	Συγκέντρωση χλωροφύλλης (μg/mL)
Control 28/3	6.63E+07	130.3
0.63 ppm Pb	2.44E+08	972.1
6.26 ppm Pb	8.56E+08	2699.9
12.5 ppm Pb	6.48E+08	1135.5

Πίνακας 18. Κυτταρικοί πληθυσμοί όπως προέκυψαν από τις μετρήσεις με τη μέθοδο του αιμοκυτταρομέτρου, και συγκεντρώσεις ολικής χλωροφύλλης στα δείγματα των control cells 3/7 και των κυττάρων επωασμένων σε 100, 200, 300 και 400 μM As (III).

Ταυτότητα δείγματος	Αριθμός κυττάρων (κύτταρα/mL)	Συγκέντρωση χλωροφύλλης (μg/mL)
Control 3/7	1.24E+08	867.8
100 μM As (III)	4.67E+08	735.6
200 μM As (III)	7.4E+08	1249.6
300 μM As (III)	4.44E+08	724.2
400 μM As (III)	5.53E+08	895.7

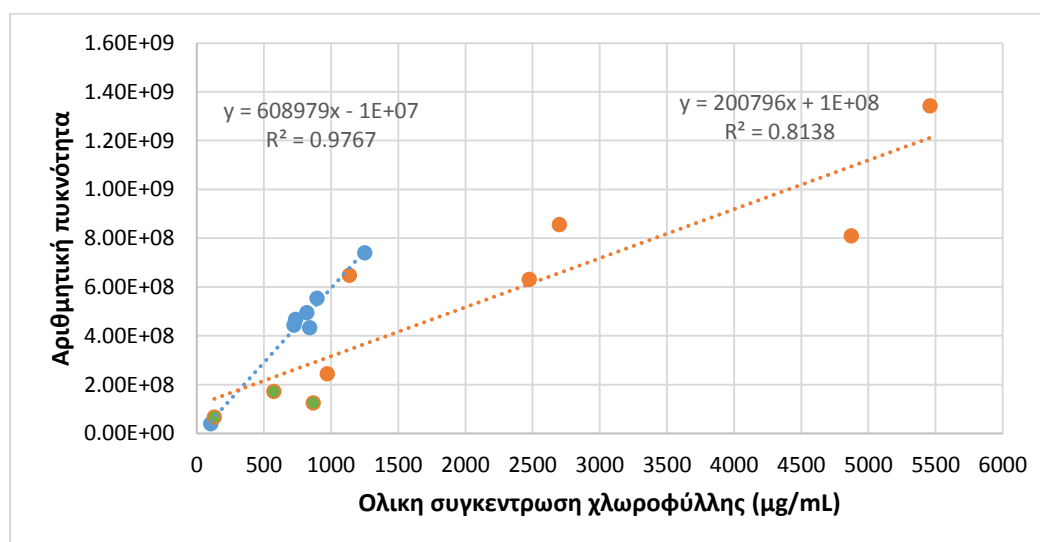
Πίνακας 19. Κυτταρικοί πληθυσμοί όπως προέκυψαν από τις μετρήσεις με τη μέθοδο του αιμοκυτταρομέτρου, και συγκεντρώσεις ολικής χλωροφύλλης στα δείγματα των control cells 3/7 και των κυττάρων 200, 300 και 400 μM As (V).

Ταυτότητα δείγματος	Αριθμός κυττάρων (κύτταρα/mL)	Συγκέντρωση χλωροφύλλης (μg/mL)
Control 3/7	1.24E+08	867.8
200 μM As (V)	4.34E+08	840.0
300 μM As (V)	4.94E+08	817.9
400 μM As (V)	3.94E+07	103.7

Πίνακας 20. Κυτταρικοί πληθυσμοί όπως προέκυψαν από τις μετρήσεις με τη μέθοδο του αιμοκυτταρομέτρου, και συγκεντρώσεις ολικής χλωροφύλλης στα δείγματα των control cells new και των κυττάρων επωασμένων σε 0.36, 3.64 και 7.29 ppm Cd.

Ταυτότητα δείγματος	Αριθμός κυττάρων (κύτταρα/mL)	Συγκέντρωση χλωροφύλλης (μg/mL)
Control new	1.72E+08	574.4
0.36 ppm Cd	8.1E+08	4873.8
3.64 ppm Cd	1.34E+09	5457.7
7.29 ppm Cd	6.31E+08	2475.8

Αν προσπαθήσουμε να απεικονίσουμε γραφικά τη συσχέτιση μεταξύ της ολικής χλωροφύλλης κάθε δείγματος και της κυτταρικής αριθμητικής πυκνότητας προκύπτει το παρακάτω γράφημα.



Γράφημα 5. Διάγραμμα συσχέτισης αριθμητικής πυκνότητας κυττάρων με τη συγκέντρωση χλωροφύλλης. Με μπλε χρώμα απεικονίζονται οι τιμές των κυτταρικών δειγμάτων με προσθήκη των 2 ενώσεων του As, με πορτοκαλί τα κυτταρικά δείγματα με προσθήκη συγκεντρώσεων Pb και Cd, ενώ με πράσινο τα control cells.

Παρατηρούνται δύο ξεχωριστές τάσεις για την ομάδα των δειγμάτων των δύο ενώσεων του As (μπλε σημεία) σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα των συγκεντρώσεων Cd και Pb και των 3 control (πορτοκαλί και πράσινα σημεία). Η σχέση αριθμού κυττάρων και συγκέντρωση χλωροφύλλης υπακούει σε μία ευθεία γραμμή και στις δύο περιπτώσεις, όμως για την ομάδα του As η κλίση της ευθείας είναι μεγαλύτερη. Αυτό υποδηλώνει μικρότερο αριθμό μορίων χλωροφύλλης ανά κύτταρο για τα δείγματα των κυττάρων επωασμένα σε As.

Για την παραγωγή του μορίου της χλωροφύλλης απαραίτητη είναι η ενσωμάτωση του δισθενούς Μαγνησίου (Mg^{2+}) στον πορφυρινικό δακτύλιο, και η διαδικασία της ενσωμάτωσης απαιτεί πληθώρα

αντιδράσεων εξαρτώμενες από ATP[20]. Επομένως, αν η παραγωγή του ATP μειώνεται λόγω της παρουσίας As, τότε θα περιμέναμε να καταστέλλεται και η διαδικασία παραγωγής χλωροφύλλης.

Ο μηχανισμός τοξικότητας των αρσενικικών ιόντων (AsO_4^{3-}) σε βιοχημικό επίπεδο έγκειται στην δομική ομοιότητα τους με τα φωσφορικά ιόντα (PO_4^{3-}). Έτσι, παρεμποδίζονται βασικές βιοχημικές πορείες όπως η γλυκόλυση κατά την οποία η αντικατάσταση των PO_4^{3-} από AsO_4^{3-} περιορίζει το σχηματισμό τριφωσφορικής αδενοσύνης (ATP)[21]. Επιπλέον, έρευνα που διεξήχθη πάνω στην επίδραση του As στην πρόσληψη και το μεταβολισμό φωσφόρου (P) του φυτοπλαγκτόν δείχνει ότι κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* που επώαστηκαν σε 35 μM AsO_4^{3-} παρουσίασαν στοιχεία ανεπάρκειας P κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης αλλά και μετά το πέρας της[22]. Τα δεδομένα που υποστηρίζουν αυτό το εύρημα είναι το συγκριτικά πολύ χαμηλότερο περιεχόμενο σε ATP και ολικό P των κυττάρων που επώαστηκαν σε As σε σχέση με των control.

Για τα αρσενικόδη ιόντα (AsO_3^{3-}) έχει αποδειχθεί ότι έχουν μεγάλη συγγένεια κι αντιδρούν εύκολα με πρωτεΐνες που φέρουν ομάδες θειόλης. Συγκεκριμένα, μπορούν να αναστείλουν την αφυδρογονάση του πυροσταφυλικού προσδεδεμένα στον συμπάραγοντα του ενζύμου, μία διθειόλη. Η αναστολή της λειτουργίας της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού καταστέλλει το κύκλο του κιτρικού οξέος και κατ' επέκταση την παραγωγή ATP[21].

Προφανώς, λόγω έλλειψης επιπλέον πειραματικών δεδομένων, τα παραπάνω αποτελούν υποθέσεις (πιθανόν μεταξύ και άλλων) προς διερεύνηση για την επιβεβαίωση ή την απόρριψή τους. Για την παρούσα ερευνητική εργασία είναι σημαντικό ότι υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ του αριθμού των κυττάρων που προσδιορίστηκαν με μέτρηση στο αιμοκυτταρόμετρο και της περιεκτικότητάς τους σε ολική χλωροφύλλη, όπως αυτή προσδιορίστηκε με μια διεθνώς καθιερωμένη μέθοδο [16].

3.3 Αποτελέσματα και συμπεράσματα από πειράματα με κυτταρομετρία ροής και μικροσκόπιο

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις αναλύσεις με Flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson), εστιάζοντας στη σύγκριση των τιμών Forward, Side Scatter και αριθμό ανιχνευθέντων κυττάρων μεταξύ του αιωρήματος των κυττάρων πριν και μετά την εκνέφωση. Σκοπός ήταν ο έλεγχος συμφωνίας των τιμών των προαναφερθέντων παραμέτρων μεταξύ των κυτταρικών αιωρημάτων πριν και μετά την εκνέφωση. Πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις για το κάθε δείγμα με καταγραφές του 1 min. Το κυτταρικό αιώρημα που αναλύθηκε πριν και μετά την εκνέφωση ήταν control cells.

Πίνακας 21. Μετρήσεις αιωρήματος control κυττάρων (10^6 cells/mL) πριν και μετά την εκνέφωση με Flow cytometry.

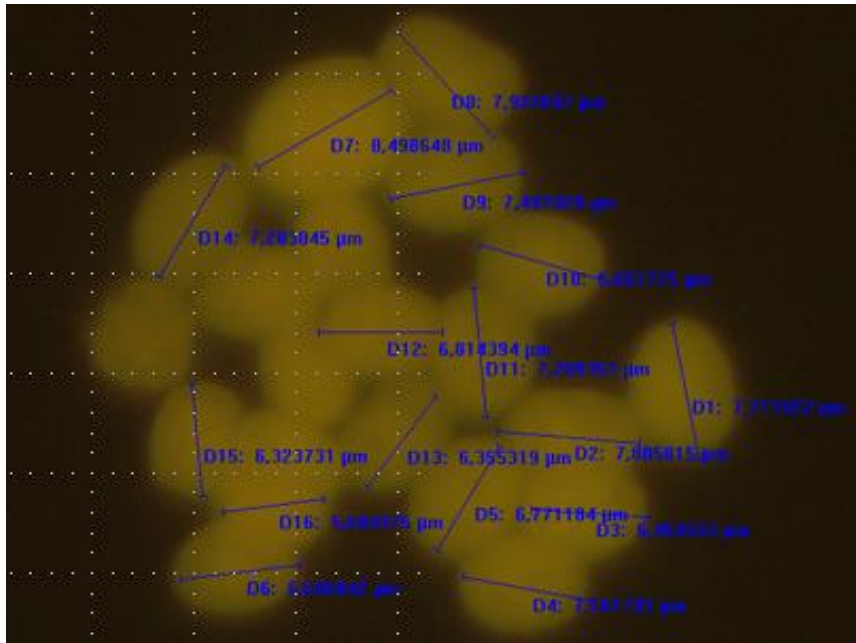
Ταυτότητα δείγματος	Ανίχνευση Forward Scatter	Ανίχνευση Side Scatter	Αριθμός κυττάρων
Κυτταρικό αιώρημα πριν την εκνέφωση (replicate #1)	573	1503	2200
Κυτταρικό αιώρημα πριν την εκνέφωση (replicate #2)	581	1513	2200
Κυτταρικό αιώρημα μετά την εκνέφωση (replicate #1)	569	1385	2000
Κυτταρικό αιώρημα μετά την εκνέφωση (replicate #2)	565	1376	1970

Παρατηρείται ιδιαίτερα καλή συμφωνία και για τις τρεις παραμέτρους μέτρησης μεταξύ των κυττάρων πριν και μετά την εκνέφωση. Οι δύο τύποι ανιχνεύσεως σκέδασης του φωτός είναι ενδεικτικοί παράμετροι ότι τα κύτταρα δεν έχουν υποστεί κάποια αλλαγή στην δομή τους, εφόσον σκεδάζουν το φως με τον ίδιο τρόπο. Ακόμη, ο κυτταρικός πληθυσμός που ανιχνεύεται διατηρείται σταθερός και στις δύο περιπτώσεις με ελάχιστη απόκλιση, του 10.8%. Σφάλματα τέτοιου ποσοστού μεταξύ κυτταρικών μετρήσεων είναι απολύτως αποδεκτά λόγω του ότι πρόκειται για κυτταρικό αιώρημα. Έτσι, όσο ομοιογενές και να είναι το αιώρημα, πάντα υπάρχει πιθανότητα τα κύτταρα να σχηματίσουν συσσωματώματα που θα ανιχνευθούν σαν 1 κύτταρο.

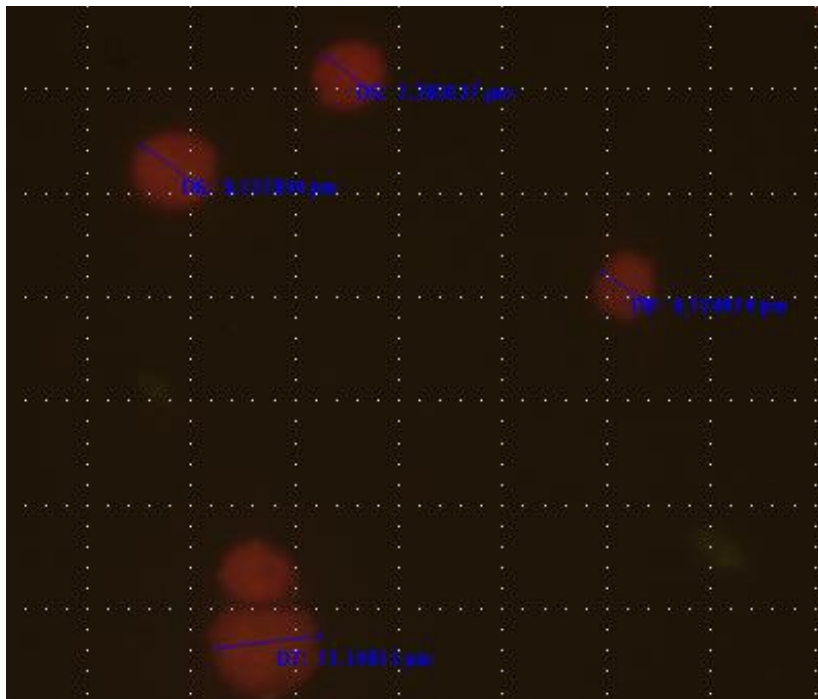
Μέσω τις μικροσκοπίας ανίχνευσης φθορισμού (BX60, Olympus), μπορέσαμε να σαρώσουμε την πλάκα του μικροσκοπίου πάνω στην οποία είχαμε διασπείρει κύτταρα από το δείγμα control πριν και μετά την εκνέφωση. Και στις δύο περιπτώσεις η εικόνα των κυττάρων ήταν η ίδια, δίδοντας μας ακόμη μία απόδειξη ότι η διαδικασία της εκνέφωσης δεν καταστρέφει τα κύτταρα.

Οι φωτογραφίες ελήφθησαν με την κάμερα του μικροσκοπίου ανίχνευσης φθορισμού και απεικονίζει τα *Clamydomonas reinhardtii* (Εικόνα 5,6). Αν και λόγω του φαινομένου φθορισμού τα κύτταρα θα έπρεπε να εικονίζονται κόκκινα και στις δύο περιπτώσεις εφόσον η διέγερση των χλωροφυλλών με ακτινοβολία υπεριώδους προκαλεί τον φθορισμό τους με 2 μέγιστα εκπομπής στα 690 και 730 nm[23], η ακτινοβολία των κυττάρων με τη λάμπα UV αποσυνθέτει τη χλωροφύλλη μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα προκαλώντας τον αποχρωματισμό των κυττάρων. Έτσι κατά την 1^η λήψη τα κύτταρα ακτινοβολήθηκαν με υπεριώδες φως για παραπάνω χρόνο σε σχέση με τη 2^η λήψη.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα από την κυτταρομετρία ροής και την μικροσκοπία συνηγορούν ότι τα κύτταρα διατηρούν την ακεραιότητά τους κατά τη διάρκεια της πνευματικής εκνέφωσης.



Εικόνα 5. Λήψη κυττάρων με την κάμερα του μικροσκοπίου ανίχνευσης φθορισμού. (Αποχρωματισμένα κύτταρα λόγω UV ακτινοβολίας)



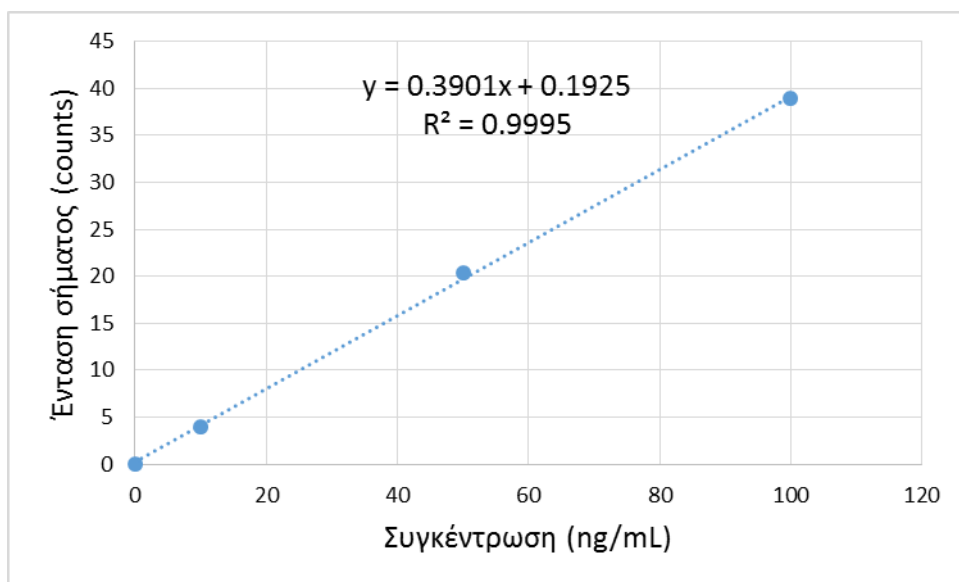
Εικόνα 6. Δεύτερη λήψη κυττάρων με την κάμερα του μικροσκοπίου ανίχνευσης φθορισμού. (Επιτυχής απεικόνιση του κόκκινου φθορισμού των χλωροφυλλών)

3.4 Ανάλυση *Chlamydomonas reinhardtii* επωασμένα σε Μόλυβδο (Pb)

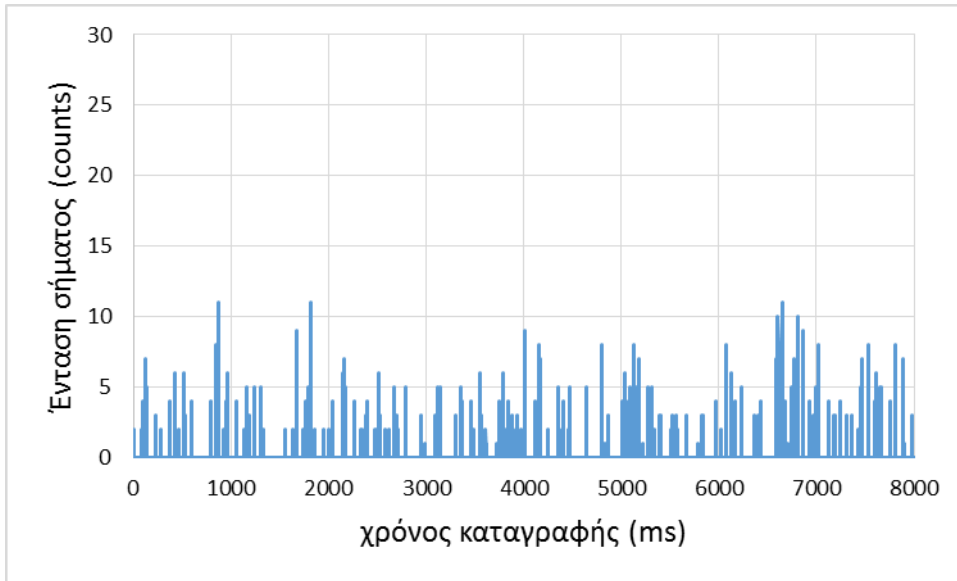
3.4.1 Προσδιορισμός Pb σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard Introduction System

Όπως δείχθηκε στην ενότητα 2.5.1, για την συσχέτιση της έντασης 1 cell event (κύτταρο που εισέρχεται στο πλάσμα ατομοποιείται, τα στοιχεία από τα οποία αποτελείται ιονίζονται, και το νέφος των ιόντων του στοιχείου που παρακολουθείται ως συγκεκριμένο m/z παράγει έναν παλμό στο καταγραφόμενο σήμα) με τη μάζα του στοιχείου, απαραίτητα βήματα είναι η βαθμονόμηση με διαφορετικές συγκεντρώσεις διαλυτής μορφής του στοιχείου (πρότυπα διαλύματα) και ο προσδιορισμός της TE% με 60 nm Au NPs.

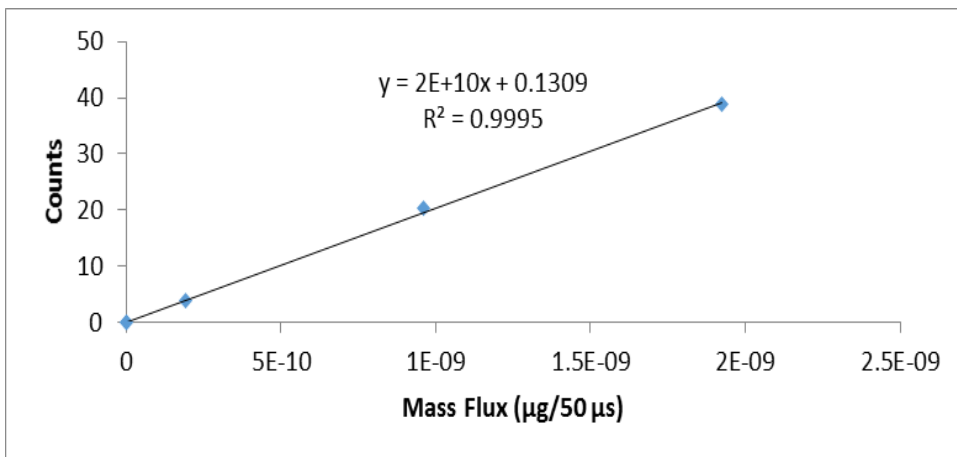
Από το συνδυασμό της βαθμονόμησης με διαλυτό Pb (Γράφημα 6) και της TE% (ο λόγος των NPs που καταγράφονται προς τα NPs που εισάγουμε) που προσδιορίστηκε με 60 nm Au NPs (Γράφημα 7), προκύπτει η παρακάτω ευθεία συσχέτισης της έντασης του σήματος με την απόλυτη μάζα Pb που εισέρχεται και ανιχνεύεται ανά 50 μs {mass flux Pb ($\mu\text{g}/50 \mu\text{s}$)} (Γράφημα 8). Έτσι, είναι πλέον εφικτή η συσχέτιση της έντασης του σήματος 1 cell event με τη μάζα του στοιχείου που αυτό περιέχει και άρα η μετατροπή ενός ιστογράμματος έντασης σήματος ανά κύτταρο σε ένα ιστογράμμα μάζας μετάλλου ανά κύτταρο. Ένα παράδειγμα μίας τέτοιας μετατροπής δίνεται στην Εικόνα 7.



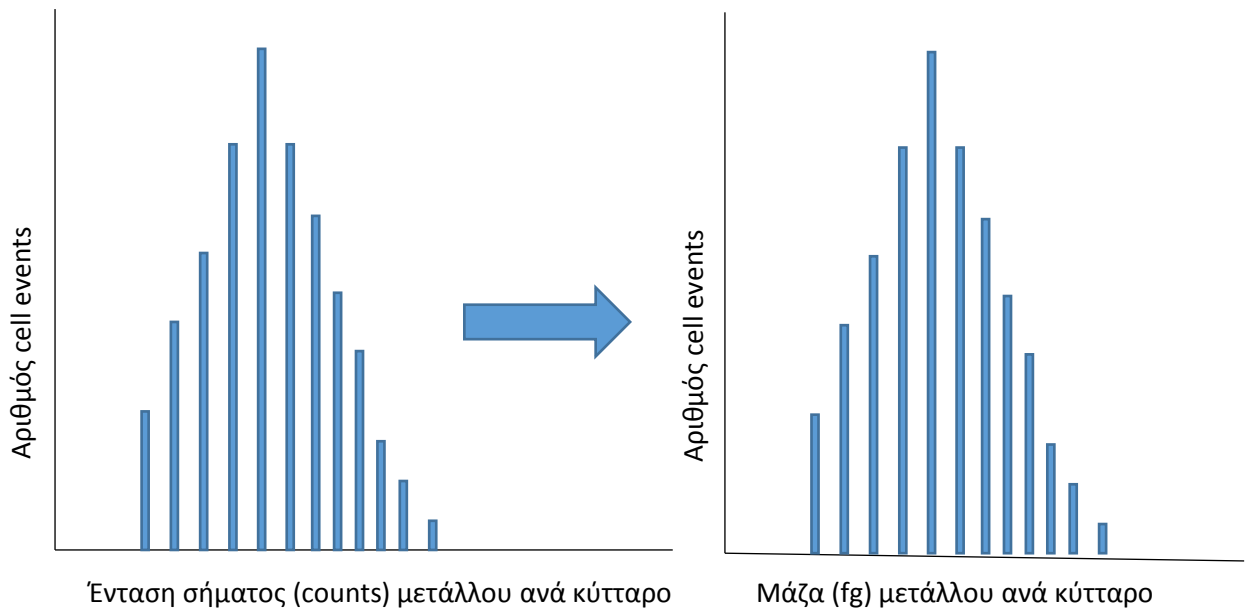
Γράφημα 6. Καμπύλη βαθμονόμησης διαλυτού Pb με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard Introduction System



Γράφημα 7. Καταγραφή της έντασης σήματος ^{197}Au για αιώρημα 60 nm Au NPs συγκέντρωσης 100 ng/L σε υπερκάθαρο νερό με Standard Introduction System SC ICP-MS. Στο γράφημα απεικονίζεται ένα τμήμα της καταγραφής για πάροδο 8s.

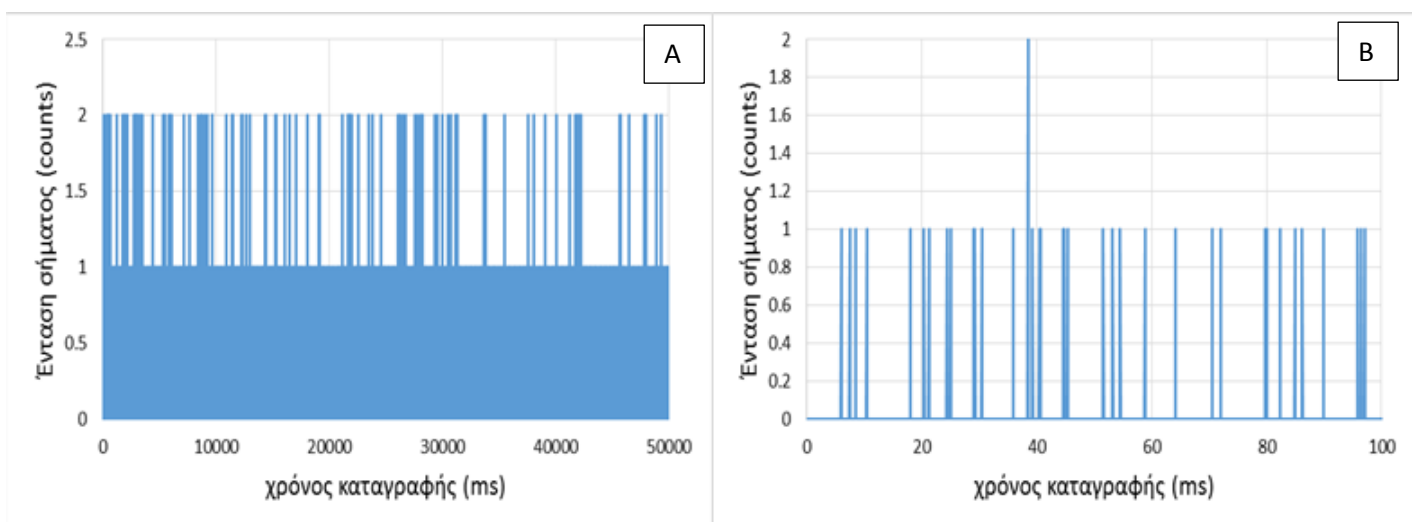


Γράφημα 8. Καμπύλη συσχέτισης της έντασης του σήματος (counts) ^{208}Pb με το mass flux ($\mu\text{g}/50 \mu\text{s}$) Pb με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard Introduction System.

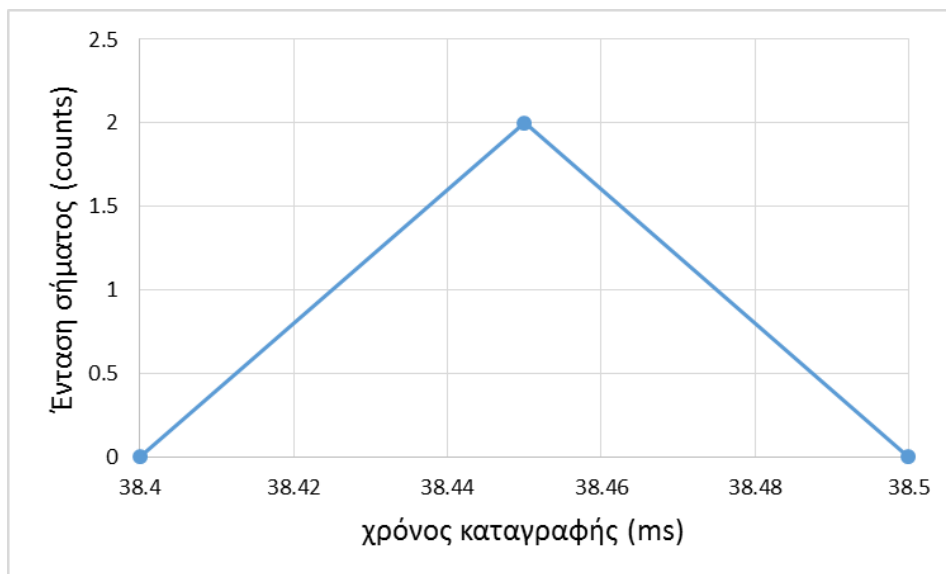


Εικόνα 7 Γραφική αναπαράσταση μετατροπής ενός ιστογράμματος έντασης σήματος (counts) μετάλλου ανά κύτταρο σε ένα ιστογράμμο μάζας (fg) μετάλλου ανά κύτταρο.

Περνώντας στην ανάλυση των κυτταρικών δειγμάτων για προσδιορισμό της κατανομής Pb σε αυτά, τα control cells 28/3 (*Chlamydomonas reinhardtii* χωρίς την προσθήκη Pb) δεν εμφάνισαν κάποια ένδειξη παρουσίας κυτταρικού ή διαλυτού εξωκυττάρου Pb. Οι εξαιρετικά χαμηλές τιμές της έντασης του σήματος (Γράφημα 9) οφείλονται στο σήμα του υποβάθρου για το m/z 208 και όχι στον κυτταρικό ή διαλυτό εξωκυττάρου Pb. Το ότι η ένταση του σήματος στα 1-2 counts δεν προέρχεται από cell events αποδεικνύεται στο Γράφημα 10 όπου φαίνεται το χρονικό προφίλ ενός σήματος των 2 counts. Εκεί φαίνεται ότι η διάρκειά του δεδομένου σήματος ορίζεται από 1 data point ($\leq 50 \mu\text{s}$), ενώ η τυπική διάρκεια ενός cell event αναμένεται να είναι μεγαλύτερη από 150 μs .



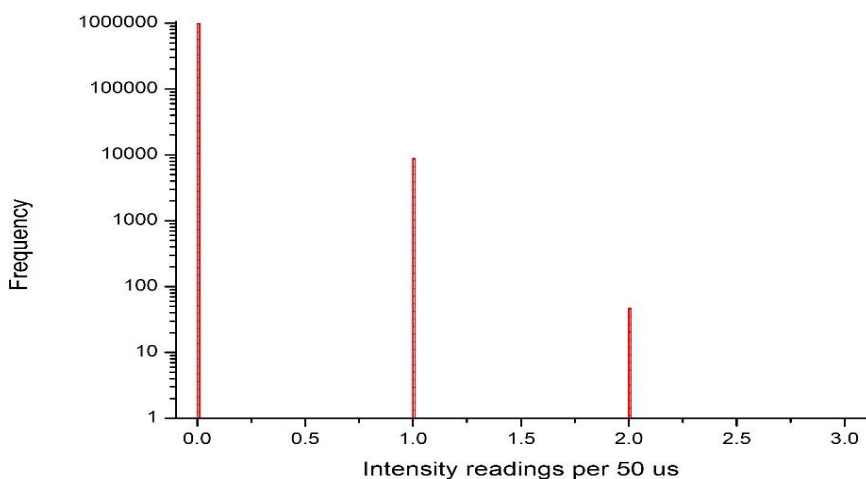
Γράφημα 9. Α) Καταγραφή έντασης ^{208}Pb για τα control cells 28/3 σε 0.1% NaCl με τη μέθοδο SC ICP-MS και το Standard Introduction System για πάροδο 50 s Β) Μεγέθυνση του Α στο χρονικό διάστημα των 0-100 ms.



Γράφημα 10. Μεγέθυνση Γραφήματος 9 στον άξονα χ για μία καταγραφή σήματος της τάξεως των 2 counts.

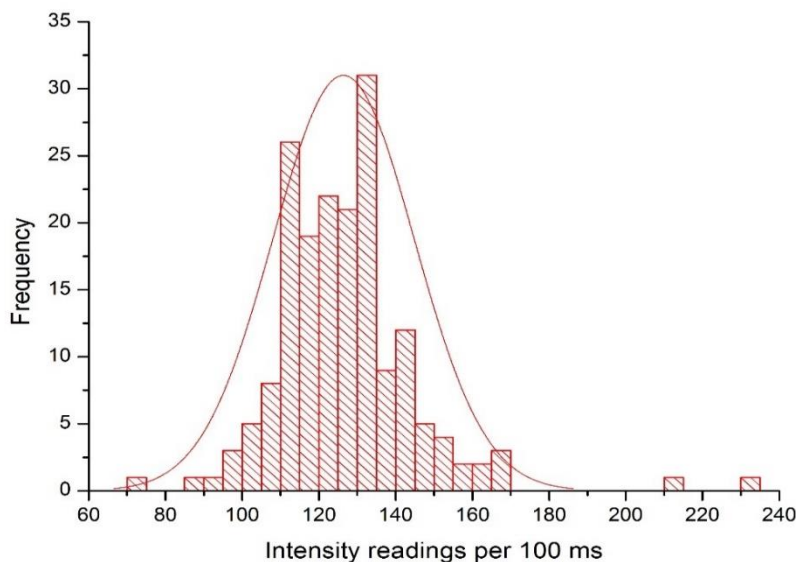
Το mean dissolved intensity (η μέση τιμή της έντασης του εξωκυττάριου διαλυτού Pb) που προκύπτει από την ανάλυση των control cells 28/3, και στην προκειμένη περίπτωση αποτελεί τη μέση τιμή της έντασης του σήματος του υποβάθρου καθώς ο εξωκυττάριος διαλυτός Pb ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης, υπολογίστηκε στα 0.01 counts. Η τυπική απόκλιση (stdev) της κατανομής της έντασης του υποβάθρου υπολογίστηκε στα 0.095 counts. Δεδομένης της στατιστικής μεθόδου ορισμού της baseline $\{\mu+3\sigma$, όπου μ το mean dissolved intensity και σ η τυπική απόκλιση (stdev)} η οποία είναι η μέγιστη τιμή έντασης εξωκυττάριου διαλυτού Pb, το όριο $\mu+3\sigma$ για τα control cells 28/3 είναι 0.295. Άρα οποιαδήποτε ένταση μεγαλύτερη του 0.295, όπως αυτή του Γραφήματος 10, υπολογίζεται ως cell event από το λογισμικό (Nano Syngistix, PE). Η προϋπόθεση αυτή όμως, από μόνη της, δεν είναι ικανή να αποκλείσει και διάφορα ψευδώς θετικά σήματα (false positive).

Δυστυχώς, το φαινόμενο των false positives αποτελεί μία αδυναμία του λογισμικού (Nano Syngistix, PE). Η παραπάνω αδυναμία προκύπτει από την υπόθεση ότι η κατανομή της έντασης σήματος του εξωκυττάριου διαλυτού μετάλλου είναι κανονική (Gauss), υπόθεση η οποία παύει να ισχύει όταν η ένταση του εξωκυττάριου διαλυτού μετάλλου βρίσκεται κοντά στα όρια ανίχνευσης του οργάνου. Διότι στα όρια ανίχνευσης του οργάνου κυριαρχεί η κατανομή της έντασης του σήματος του υποβάθρου, κι αυτή δεν υπακούει στην Gauss κατανομή για τις χαμηλές εντάσεις που λαμβάνονται ανά 50 μ s (Γράφημα 11).



Γράφημα 11. Ιστόγραμμα της έντασης (counts) ^{208}Pb που καταγράφηκε ανά 50 μs στο δείγμα των control cells σε 0.1% NaCl.

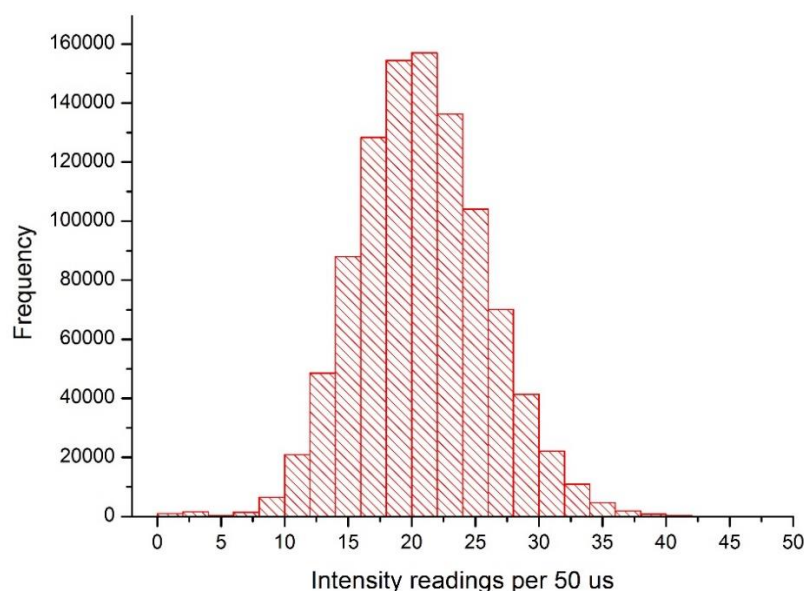
Η μη κανονική κατανομή της έντασης του υποβάθρου για το Pb δεν συναντάται για μεγαλύτερα dwell time (χρόνος σάρωσης ^{208}Pb από το τετράπολο) της τάξεως των 100 ms που χρησιμοποιούνται στο Conventional ICP-MS. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί το Γράφημα 12 από το οποίο προκύπτει ότι η κατανομή της έντασης του υποβάθρου για το Pb προσεγγίζει την κανονική κατανομή.



Γράφημα 12. Ιστόγραμμα της έντασης (counts) ^{208}Pb που καταγράφηκε με το Standard Introduction System Conventional ICP-MS ανά 100 ms για το διάλυμα 0.1 % NaCl.

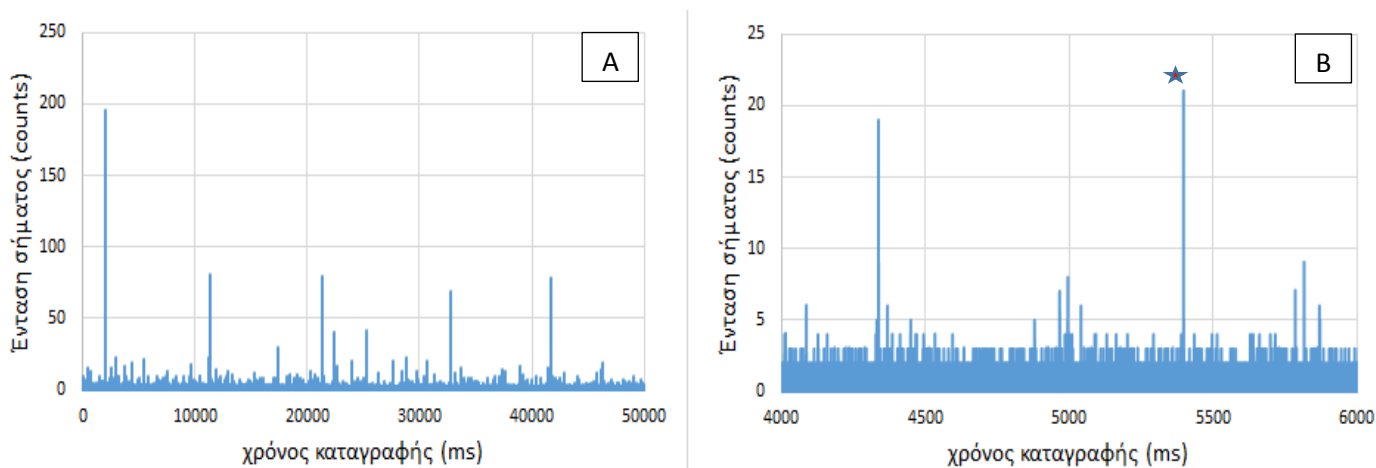
Ας πάρουμε 2 ακραίες τιμές της κατανομής του Γραφήματος 12, τα 100 και 160 counts. Στα 50 μs θα αντιστοιχούν αναλογικά 0.05 και 0.08 counts. Όμως το σύνολο των εντάσεων που καταγράφονται με dwell time των 50 μs (Γράφημα 11) περιλαμβάνουν μόνο 0, 1 και 2 counts. Συνεπώς, τιμές των 0.05, 0.08 counts ίσως μηδενίζονται κατά τη μετάδοση του σήματος από τον ανιχνευτή στον υπολογιστή του οργάνου κι έτσι εμφανίζονται μηδενικές με dwell time των 50 μs . Συνεπώς, το φαινόμενο της μη κανονικής κατανομής του σήματος του υποβάθρου συναντάται με τη χρήση dwell time των 50 μs όπου το υπόβαθρο σήμα εμφανίζει εξαιρετικά χαμηλές εντάσεις (counts).

Ο αριθμός των ιόντων που ο ανιχνευτής συλλέγει για ένα δεδομένο dwell time σε πάροδο ενός δεδομένου χρονικού διαστήματος καταγραφής υπακούει εξ' ορισμού στην κατανομή Poisson. Με την αύξηση των εντάσεων (μεγαλύτερος αριθμός ιόντων), η Poisson τείνει προς την Gauss κατανομή. Για ένα μέσο όρο έντασης υποβάθρου χαμηλότερο των 70 counts, το όριο του $\mu+3\sigma$ που προκύπτει από την υπόθεση της κανονικής κατανομής του σήματος του υποβάθρου υποτιμάει το πραγματικό ανώτερο όριο της έντασης του υποβάθρου (άρα και το όριο ανίχνευσης για τα κύτταρα) καθώς θα πρέπει να συμπεριληφθεί η στατιστική Poisson.[24,25] Έτσι, σε δείγματα όπου υπάρχει ανιχνεύσιμη ποσότητα εξωκυττάριου διαλυτού Pb, η πιθανότητα ανίχνευσης false positives μειώνεται σημαντικά καθώς τα counts υπακούουν σε κατανομή Gauss. Μία τέτοια απόδειξη αποτελεί το ιστόγραμμα της έντασης των 50 ng/mL (ppb) διαλυτού Pb (Γράφημα 13).



Γράφημα 13. Ιστόγραμμα της έντασης (counts) ^{208}Pb που καταγράφηκε με το Standard Introduction System SC ICP-MS ανά 50 μs για 50 ng/mL διαλυτού Pb σε 0.1 % NaCl

Στο Γράφημα 14 βλέπουμε την καταγραφή της έντασης ^{208}Pb για τα κύτταρα επωασμένα σε 0.63 ppm Pb. Το σχήμα και η διάρκεια της επιλεγμένης κορυφής του Γραφήματος 14B φαίνεται στο Γράφημα 15. Η κορυφή ορίζεται από 15 σημεία κι έχει χρονική διάρκεια 700 μs.



Γράφημα 14. A) Καταγραφή της έντασης ^{208}Pb για τα κύτταρα επωασμένα σε 0.63 ppm με το Standard Introduction System SC ICP-MS για πάροδο 50 s, B) μεγέθυνση της χρονικής περιοχής των 4-6 s και επιλογή 1 κορυφής (★).

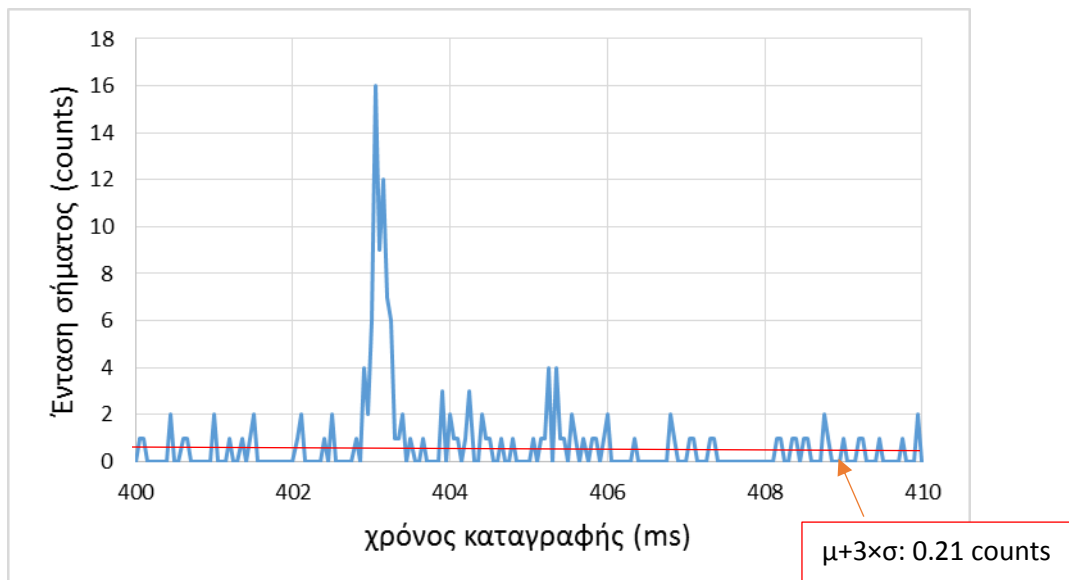


Γράφημα 15. Μεγέθυνση στη χρονική κλίμακα και εμφάνιση του χρονικού προφίλ της σημαδεμένης με αστεράκι κορυφής του γραφήματος 14B.

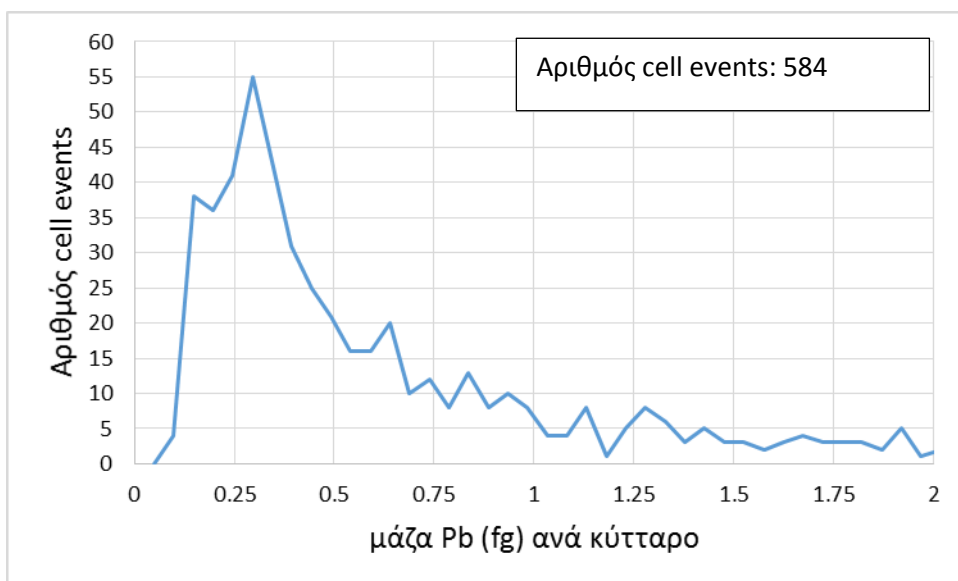
Αν κάθε κορυφή ολοκληρωθεί μετά την αφαίρεση της baseline ($\mu+3\sigma$, όπου μ το mean dissolved intensity και σ η τυπική απόκλιση (stdev)), λαμβάνουμε την ένταση του σήματος για τη χρονική διάρκεια της κάθε κορυφής που αντιστοιχεί σε ένα cell event. Έτσι, το λογισμικό μετά από αυτόματη ολοκλήρωση της κάθε κορυφής, μετρά τη συχνότητα εμφάνισης της και παράγει το ιστόγραμμα έντασης σήματος Pb ανά κύτταρο. Μέσω της σχετικής βαθμονόμησης παράγεται το ιστόγραμμα μάζας Pb ανά κύτταρο.

Μέσω της επεξεργασίας των δεδομένων και απεικόνισής τους σαν γράφημα έντασης σήματος Pb ως προς χρόνο καταγραφής παρατηρούμε ότι υπάρχουν και κορυφές (με πολλή μικρή διάρκεια $\ll 150$

μs) με ένταση υψηλότερη της baseline που ορίζεται από το $\mu+3\sigma$ (Γράφημα 16) και που δεν οφείλονται σε πραγματικά cell events αλλά αποτελούν false positives. Δυστυχώς τα σήματα αυτά (false positives) συνυπολογίζονται από το λογισμικό στον τελικό αριθμό των μετρούμενων κορυφών, μην έχοντας τη δυνατότητα να διαχωρίσει τα πραγματικά cell events από τα false positives. Δυστυχώς δεν υπήρχε τρόπος να επέμβουμε στο τρόπο ορισμού της baseline του λογισμικού, με βάση το οποίο ανίχνευε και ολοκλήρωνε τις κορυφές. Η ανίχνευση false positives μπορεί να επηρεάσει ένα ιστόγραμμα μάζας μετάλλου ανά κύτταρο μόνο αν ο αριθμός των false positives είναι στατιστικά σημαντικός σε σχέση με τον αριθμό των cell events, και κατά συνέπεια μόνο σε χαμηλές συγκεντρώσεις εξωκυττάριου διαλυτού μετάλλου στα όρια ανίχνευσης του οργάνου. Στην περίπτωση των κυττάρων επωασμένων σε 0.63 ppm Pb, το ιστόγραμμα μάζας Pb ανά κύτταρο (Γράφημα 17) επηρεάζεται καθώς το επίπεδο της baseline εξαιρεί εντάσεις των 1 και 2 counts που εμφάνιζε το υπόβαθρο για το Pb.

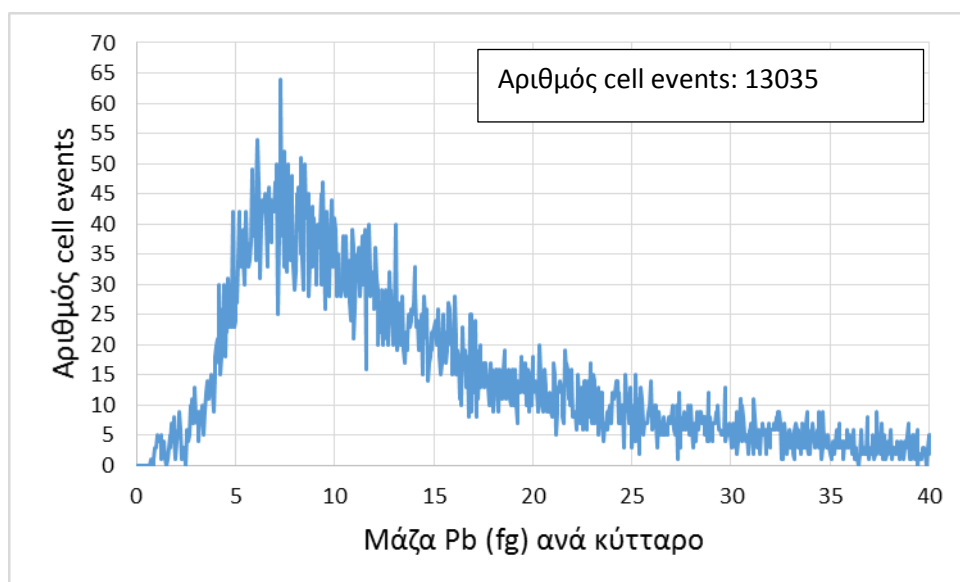


Γράφημα 16. Καταγραφή της έντασης ^{208}Pb για τα κύτταρα επωασμένα σε 0.63 ppm με το Standard Introduction System SC ICP-MS για πάροδο 10 ms. Η baseline $\mu+3\sigma$ αποτελεί το όριο πάνω από το οποίο βρίσκονται τα data points (counts/50 μs) που ορίζουν cell events.

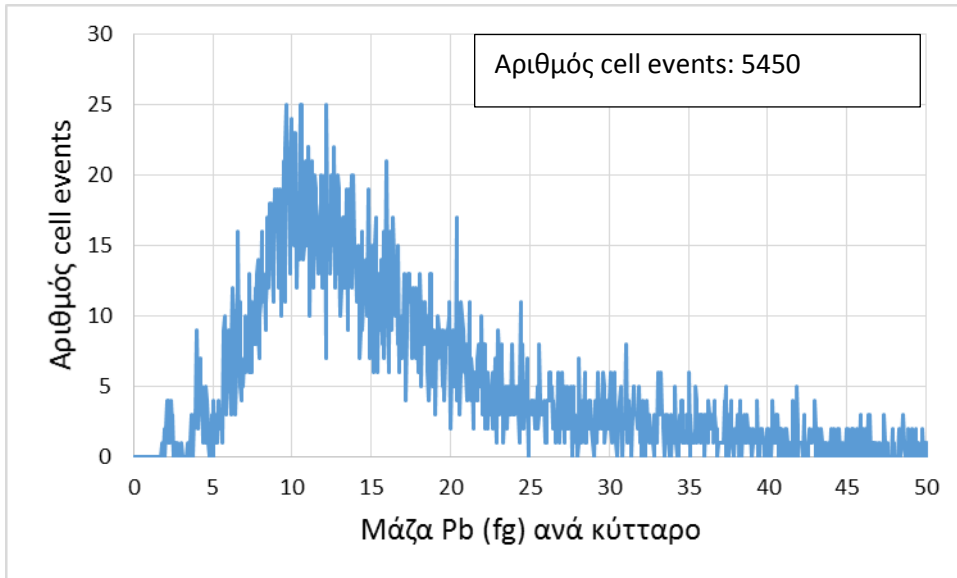


Γράφημα 17. Ιστογράμμο μάζας Pb ανά κύτταρο για το δείγμα κυττάρων επωασμένων σε 0.63 ppm Pb που αναλύθηκαν με το Standard introduction system SC ICP-MS.

Όπως προκύπτει από τα ιστογράμμοτα μάζας Pb ανά κύτταρο για τις συγκεντρώσεις επώασης των 6.26 και 12.5 ppm Pb (Γράφημα 18, 19), ο αριθμός των cell events είναι σημαντικά υψηλότερος σε σχέση με τη χαμηλότερη συγκέντρωση επώασης των 0.63 ppm.

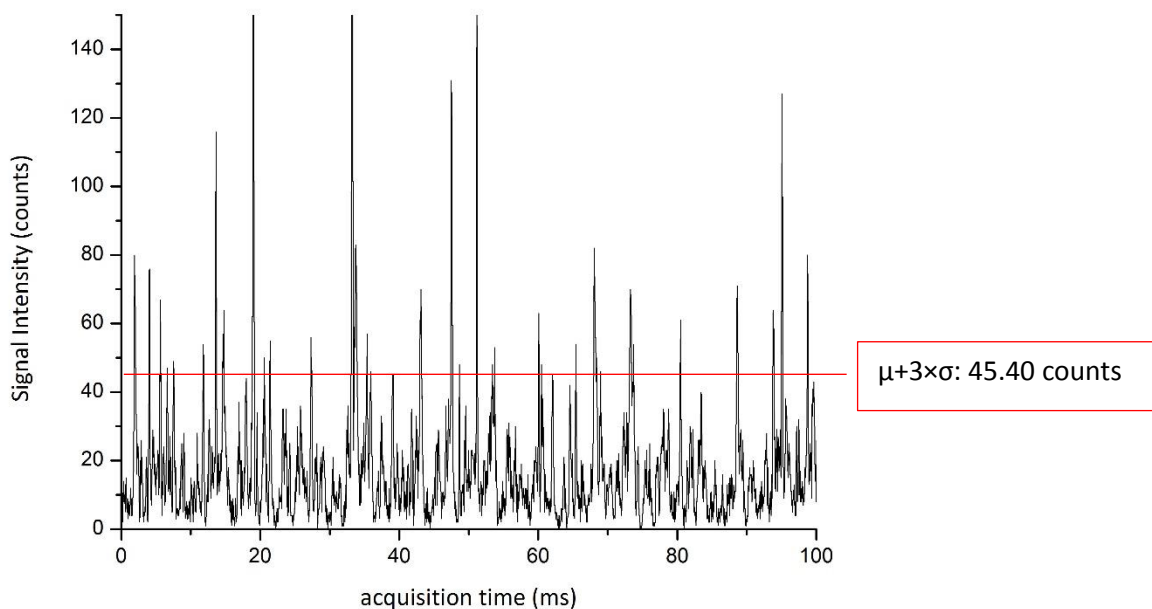


Γράφημα 18. Ιστογράμμο μάζας Pb ανά κύτταρο για το δείγμα κυττάρων επωασμένων σε 6.26 ppm Pb που αναλύθηκαν με το Standard Introduction System SC ICP-MS.



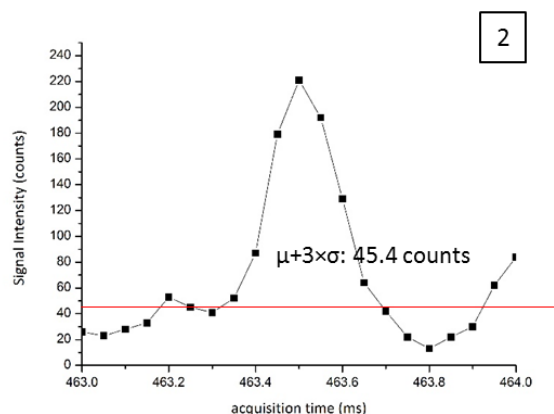
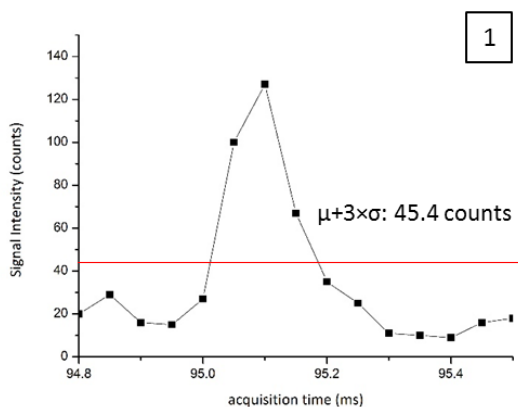
Γράφημα 19. Ιστόγραμμα μάζας Pb ανά κύτταρο για το δείγμα κυττάρων επωασμένων σε 12.5 ppm Pb που αναλύθηκαν με το Standard Introduction System SC ICP-MS.

Ας πάρουμε ως παράδειγμα την καταγραφή της έντασης ^{208}Pb για τα κύτταρα επωασμένα σε 12.5 ppm (Γράφημα 20). Τα υπολογιζόμενα από το λογισμικό cell events βρίσκονται άνω του ορίου της baseline ($\mu+3\sigma$).



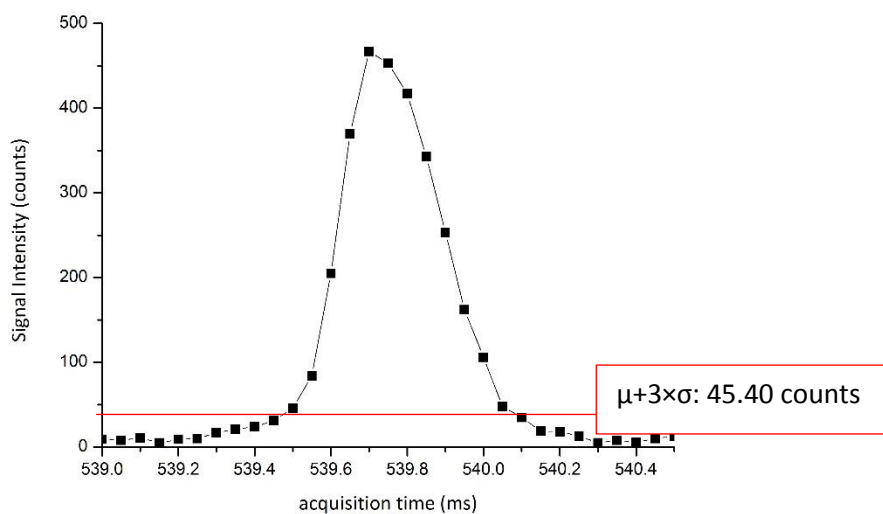
Γράφημα 20. Καταγραφή έντασης ^{208}Pb για τα κύτταρα επωασμένα σε 12.5 ppm Pb με το Standard introduction system SC ICP-MS για πάροδο 100 ms.

Εστιάζοντας σε μεμονωμένα cell events στην χρονική κλίμακα, μπορούμε να πάρουμε πληροφορία για τη χρονική τους διάρκεια.



Γράφημα 21. Προφίλ κορυφών που αντιστοιχούν σε cell event Pb με χρονική διάρκεια 200 μ s (1) και 350 μ s (2). Η baseline ($\mu+3\sigma$: 45.4 counts) αποτελεί το όριο πάνω από το οποίο βρίσκονται τα data points που ορίζουν cell events.

Τα Γραφήματα 21, 22 απεικονίζουν την μορφή και την διάρκεια αντιπροσωπευτικών κορυφών που το λογισμικό υπολογίζει σαν cell events. Πολλές κορυφές όπως η 1 του Γραφήματος 21 φαίνεται να έχουν μεγαλύτερη διάρκεια όμως το υψηλό όριο $\mu+3\sigma$ δεν επιτρέπει την εμφάνιση ολόκληρης της κορυφής. Για συγκέντρωση διαλυτού εξωκυττάριου Pb στα 40 ng/mL, όπως προσδιορίστηκε στα κύτταρα επωασμένα σε 12.5 ppm Pb, το όριο $\mu+3\sigma$ θα έπρεπε να είναι χαμηλότερα από 40 counts, όπου ορίζεται το όριο $\mu+3\sigma$ για 50 ng/mL διαλυτού Pb (Γράφημα 13). Η ανίχνευση όμως πολλών μικρότερων σε ένταση κορυφών κατώτερα της baseline, που μπορεί να μην αντιπροσωπεύουν κύτταρα αλλά σταγόνες διαλυτού Pb, αυξάνει στατιστικά το δεδομένο όριο κι έτσι υποτιμάται η διάρκεια κάποιων cell events.



Γράφημα 22. Προφίλ κορυφής που αντιστοιχεί cell event Pb με διάρκεια 550 μ s. Η baseline $\mu+3\sigma$ αποτελεί το όριο πάνω απ' το οποίο βρίσκονται τα data points που ορίζουν cell events.

Η δυνατότητα της χρήσης dwell time των 50 μ s για SC ICP-MS αναλύσεις συγκριτικά με μεγαλύτερα dwell time της τάξεως των ms δίνει το πλεονέκτημα της αποκάλυψης της μορφής και της διάρκειας των cell events, χαρακτηριστικών τα οποία δεν έχουν αξιοποιηθεί στην ανάπτυξη του SC ICP-MS με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Ίσως, οι μικρότερες διάρκειες κορυφές να μην αποτελούν κύτταρα αλλά σταγόνες διαλυτού Pb με ικανή αριθμητική πυκνότητα ιόντων Pb ώστε να παράγουν έναν μικρό παλμό ο οποίος θα υπολογιστεί από το λογισμικό ως cell event.

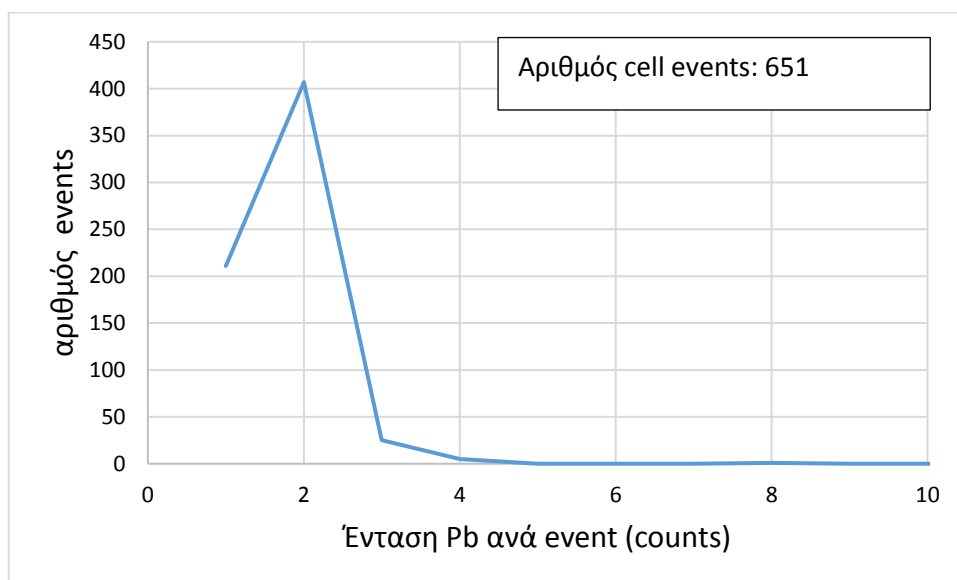
Για τα κύτταρα επωασμένα σε 6.26 ppm Pb, ο αριθμός των cell events είναι υψηλότερος από το διπλάσιο του αντίστοιχου αριθμού για αυτά επωασμένα σε 12.5 ppm. Η χαμηλότερη συγκέντρωση εξωκυττάριου διαλυτού Pb των 9.8 ppb που εμφάνισαν τα κύτταρα επωασμένα σε 6.26 ppm σε σχέση με τα 38.6 ppb που εμφάνισαν τα κύτταρα επωασμένα σε 12.5 ppm Pb σημαίνει ότι κορυφές χαμηλότερης έντασης, που μπορεί να μην αντιπροσωπεύουν cell events αλλά σταγόνες διαλυτού, είναι ευκολότερα ανιχνεύσιμες λόγω χαμηλότερης έντασης εξωκυττάριου διαλυτού Pb άρα και χαμηλότερων ορίων ανίχνευσης. Αν κι αυτό εξηγεί την εμφάνιση περισσότερων cell events στα χαμηλά fg, η υψηλότερη συχνότητα γεγονότων σε όλο το εύρος μαζών για το κυτταρικό δείγμα των 6.26 ppm Pb υποδηλώνει την παρουσία Pb σε περισσότερα κύτταρα σε σχέση με το κυτταρικό δείγμα των 12.5 ppm Pb. Το τελευταίο δεδομένο δεν μπορεί να ερμηνευθεί ακόμη.

3.4.2 Προσδιορισμός Pb σε κύτταρα επωασμένα σε Pb μετά από κατεργασία με χηλικό αντιδραστήριο (EDTA) με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard introduction system

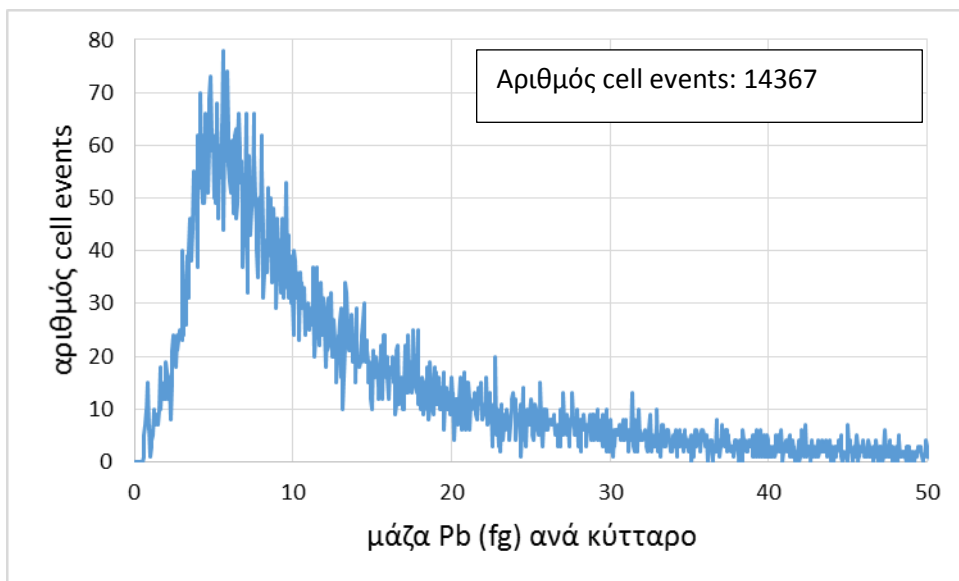
Τα κυτταρικά δείγματα επωασμένα σε 0.63, 6.26 και 12.5 ppm Pb που αναλύθηκαν για Pb στην ενότητα 3.4.1, υπέστησαν κατεργασία με EDTA (επίωση σε διάλυμα EDTA κι αναδιασπορά σε καθαρό διάλυμα 0.1% NaCl) κι έπειτα αναλύθηκαν με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard introduction system. Ακολουθούν τα ιστογράμματα μάζας Pb ανά κύτταρο για τα κυτταρικά δείγματα στις δεδομένες συγκεντρώσεις επίωσης σε Pb.

Τα control cells δεν εμφάνισαν κάποια ένδειξη παρουσίας κυτταρικού ή διαλυτού εξωκυττάρου Pb. Οι εξαιρετικά χαμηλές τιμές της έντασης του σήματος (Γράφημα 23) οφείλονται στο σήμα του υποβάθρου για το m/z 208 και όχι στον κυτταρικό ή διαλυτό εξωκυττάρου Pb. Ο αναγραφόμενος αριθμός cell events προκύπτει από τον υπολογισμό των false positives κορυφών ως cell events. Γι' αυτό το λόγο δεν παρουσιάζεται ιστογράμμο μάζας Pb ανά κύτταρο για τα control cells.

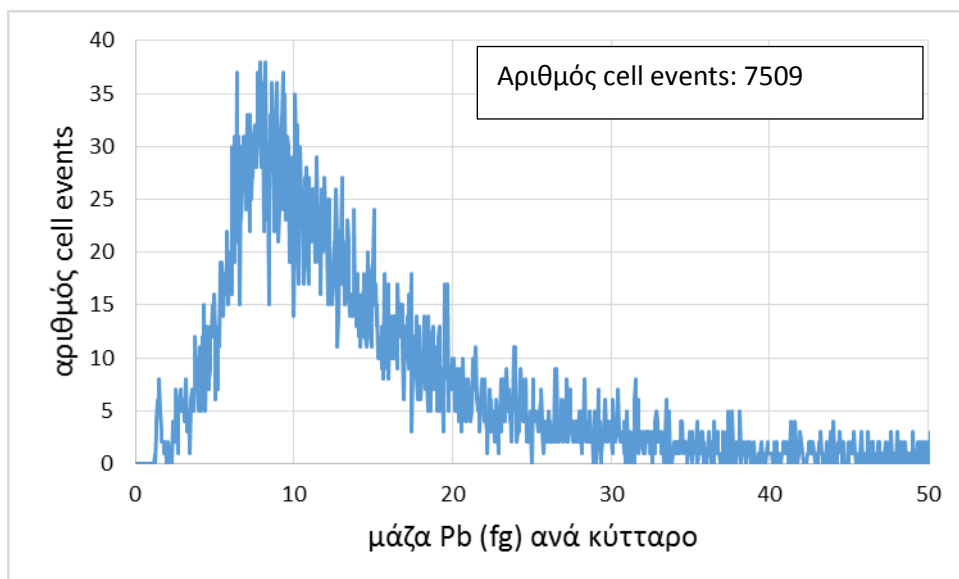
Τα Γραφήματα 24, 25 απεικονίζουν την κατανομή Pb στα κύτταρα επωασμένα σε 6.26 και 12.5 ppm Pb μετά από κατεργασία με EDTA.



Γράφημα 23. Κατανομή Pb ανά κύτταρο για το δείγμα των κυττάρων επωασμένων σε 0.63 ppm Pb μετά από επίωση σε EDTA με το Standard Introduction System SC ICP-MS.



Γράφημα 24. Ιστόγραμμα μάζας Pb ανά κύτταρο για το δείγμα των κυττάρων επωασμένων σε 6.26 ppm Pb μετά από επώαση σε EDTA με το Standard Introduction System SC ICP-MS.



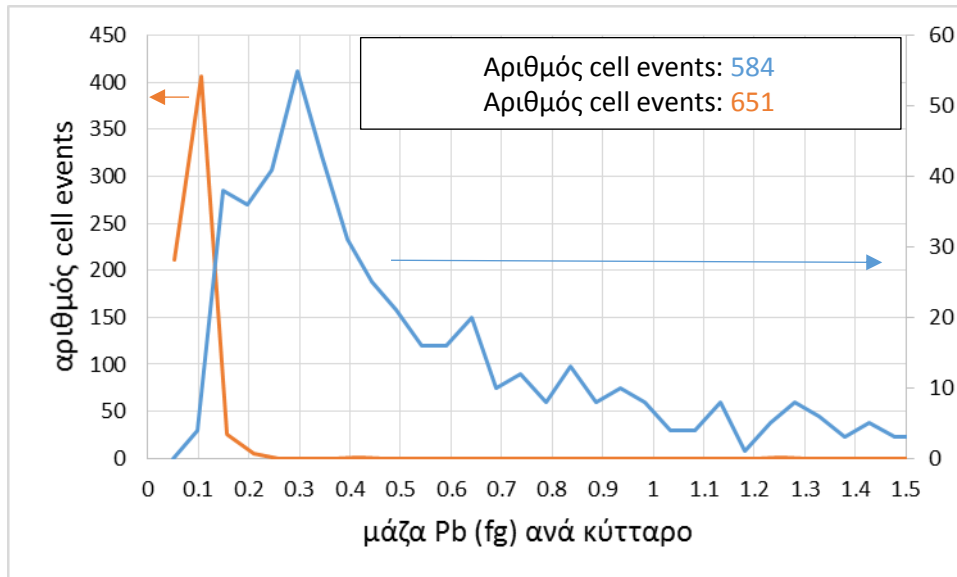
Γράφημα 25. Ιστόγραμμα μάζας Pb ανά κύτταρο για το δείγμα των κυττάρων επωασμένων σε 12.5 ppm Pb μετά από επώαση σε EDTA με το Standard Introduction System SC ICP-MS.

3.4.3 Σύγκριση κατανομών Pb σε κύτταρα επωασμένα σε Pb με και χωρίς κατεργασία με χηλικό αντιδραστήριο

Αν και με την τεχνική του SC ICP-MS μπορούμε να προσδιορίσουμε ποσοτικά το περιεχόμενο ενός κυττάρου σε Pb, δεν είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε αν η μάζα Pb που αντιστοιχεί σε κάθε κύτταρο αντιπροσωπεύει το Pb μόνο στο εσωτερικό του κυττάρου ή και αυτόν που είναι προσροφημένο στα κυτταρικά τοιχώματα αφού κατά τον προσδιορισμό δεν διαχωρίζονται τα δύο είδη Pb.

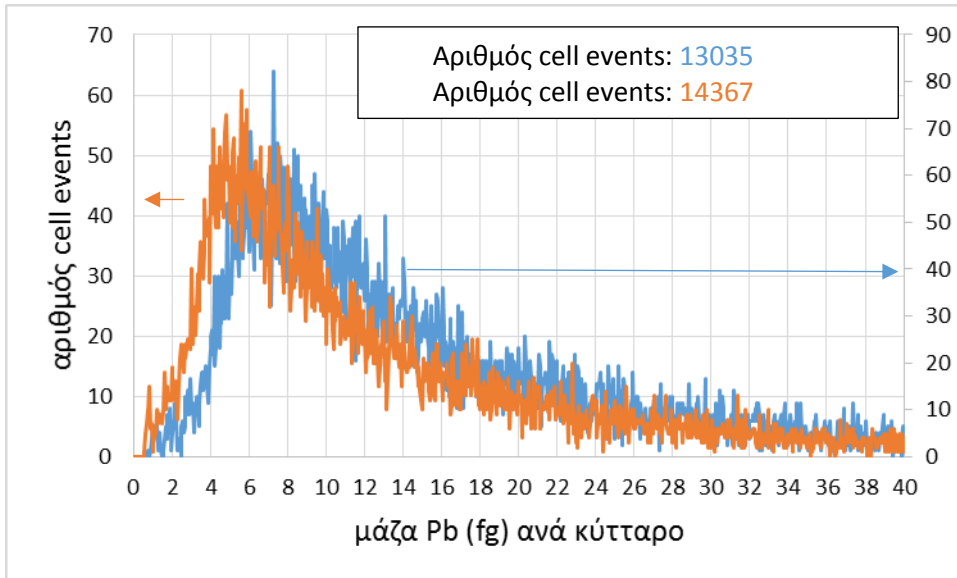
Για τα κύτταρα επωασμένα σε 0.63 ppm Pb, η επώαση σε διάλυμα με EDTA (1 mM) και επακόλουθη φυγοκέντριση και αναδιασπορά τους σε καθαρό διάλυμα («επωασμένα σε EDTA

κύτταρα») αφαίρεσε τα πραγματικά cell events που παρουσιάστηκαν για τα μη επωασμένα σε EDTA κύτταρα (δεν υπέστησαν τη παραπάνω κατεργασία), αφού ανιχνεύθηκαν μόνο false positive events (Γράφημα 26). Αυτό μάλλον υποδηλώνει ότι τα cell events Pb που ανιχνεύθηκαν στα μη επωασμένα σε EDTA κύτταρα οφείλονταν σε Pb προσροφημένο στα κυτταρικά τοιχώματα.



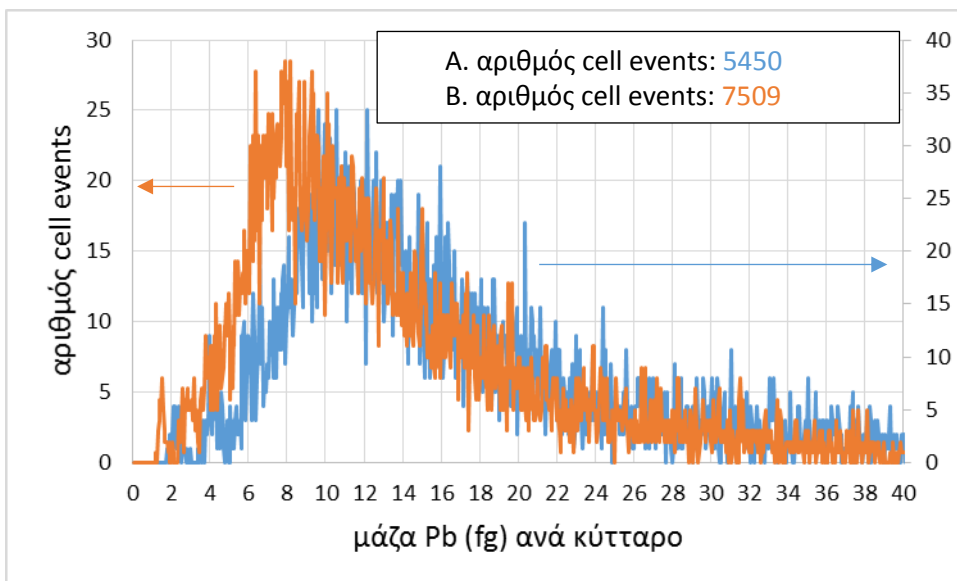
Γράφημα 26. Σύγκριση ιστογραμμάτων μάζας Pb ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 0.63 ppm Pb με και χωρίς επώαση σε EDTA. Με πορτοκαλί απεικονίζονται τα κύτταρα μετά από επώαση σε EDTA. Τα βέλη υποδεικνύουν το γ άξονα (αριθμός cell events) της κάθε κατανομής.

Για το κυτταρικό δείγμα της συγκέντρωσης επώασης των 6.26 ppm Pb, ο συνολικός αριθμός των cell events είναι κατά 10% υψηλότερος στην περίπτωση των επωασμένων σε EDTA κυττάρων καθώς επίσης η κατανομή τους είναι ελάχιστα μετατοπισμένη προς τα αριστερά αποκαλύπτοντας περισσότερα κύτταρα να έχουν προσλάβει από 1-5 fg Pb (Γράφημα 27). Και οι δύο κατανομές δείχνουν να έχουν ίδια μορφή, με την μέση μάζα Pb ανά κύτταρο να μετατοπίζεται στα 12.4 fg συγκριτικά με τα 14.96 fg που ήταν στα μη επωασμένα σε EDTA κύτταρα. Από τα παραπάνω στοιχεία προκύπτουν 2 συμπεράσματα. Η μικρή αύξηση στον συνολικό αριθμό των cell events μάλλον είναι απόρροια της μείωσης της συγκέντρωσης του εξωκυττάρου διαλυτού κι άρα μείωση του έντασης της baseline. Η μείωση της συγκέντρωσης του διαλυτού είναι απόρροια της συμπλοκοποίησης του Pb με το EDTA προς παραγωγή $\{Pb-EDTA\}^{2-}$. Τα παραγόμενο σύμπλοκο αφαιρείται από το διάλυμα λόγω της αφαίρεσης του υπερκείμενου διαλύματος και αναδιασποράς των κυττάρων σε νέο υδατικό διαλύτη (50 mM Trizma base, 40 mM NaCl). Το αποτέλεσμα της μείωσης του εξωκυττάρου διαλυτού Pb και άρα και του επιπέδου της baseline ($\mu+3\sigma$) είναι η μείωση των ορίων ανίχνευσης σε κύτταρα με χαμηλότερο περιεχόμενο σε Pb ή σε events μικρότερης διάρκειας όπως σταγόνες διαλυτού Pb. Επίσης, η μετατόπιση της κατανομής προς χαμηλότερα fg μάλλον οφείλεται στην αφαίρεση του προσροφημένου στα κυτταρικά τοιχώματα Pb μετά από την επώαση των κυττάρων σε EDTA.



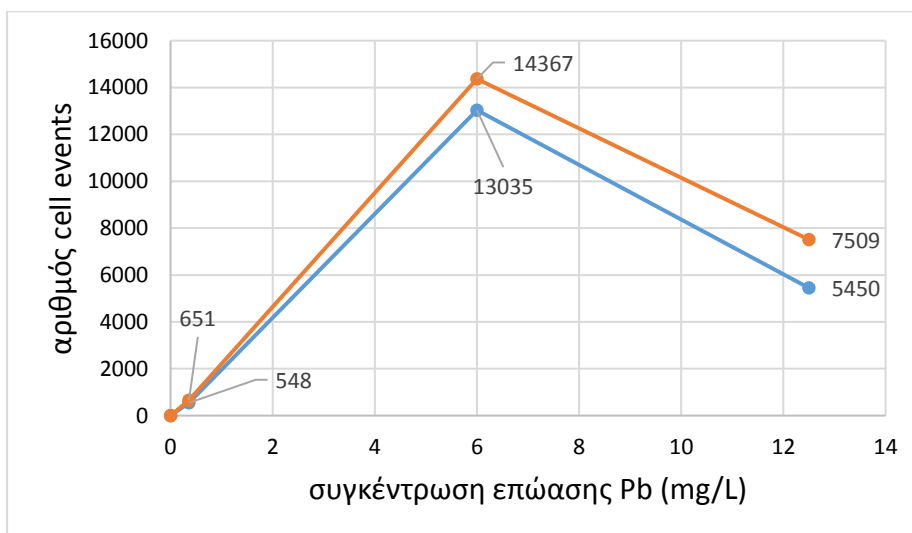
Γράφημα 27. Σύγκριση ιστογραμμάτων μάζας Pb ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 6.26 ppm Pb με και χωρίς επώαση σε EDTA. Με πορτοκαλί απεικονίζονται τα κύτταρα μετά από επώαση σε EDTA. Τα βέλη υποδεικνύουν το γ άξονα (αριθμός cell events) της κάθε κατανομής.

Όπως προκύπτει από το Γράφημα 28 για κύτταρα επωασμένα σε 12.5 ppm Pb, η κατανομή των επωασμένων σε EDTA κυττάρων μετατοπίζεται προς χαμηλότερα fg Pb, ενώ ο συνολικός αριθμός cell events επιδεικνύει 38% αύξηση για τα επωασμένα σε EDTA κύτταρα. Η μέση μάζα Pb ανά κύτταρο μετατοπίζεται από 17.3 σε 14.1 fg για τα επωασμένα σε EDTA κύτταρα, ενώ ταυτόχρονα περισσότερα κύτταρα αποκαλύπτονται να έχουν προσλάβει από 4-8 fg. Τα συμπεράσματα που προκύπτουν είναι όμοια με αυτά που εξήχθησαν για τα κύτταρα επωασμένα σε 6.26 ppm Pb.

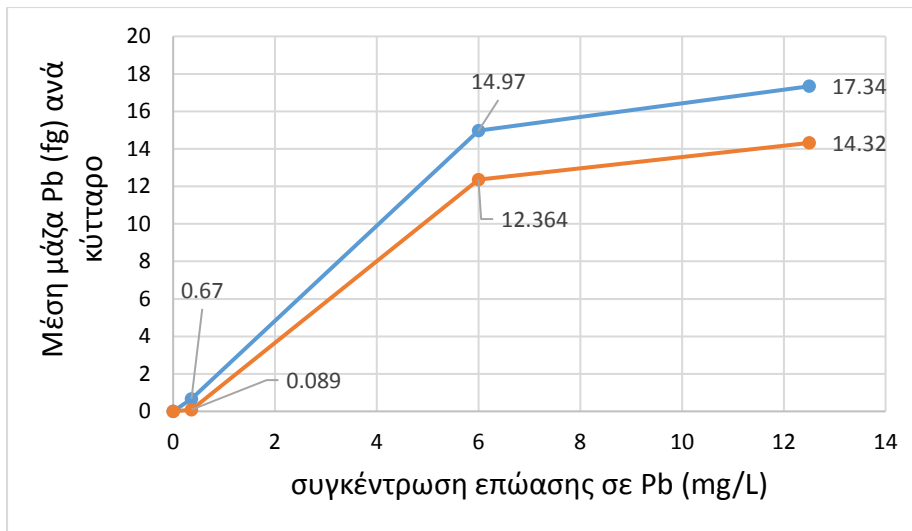


Γράφημα 28. Σύγκριση ιστογραμμάτων μάζας Pb ανά κύτταρο για για τα κύτταρα επωασμένα σε 12.5 ppm Pb με και χωρίς επώαση σε EDTA. Με πορτοκαλί απεικονίζονται τα κύτταρα μετά από επώαση σε EDTA. Τα βέλη υποδεικνύουν το γ άξονα (αριθμός cell events) της κάθε κατανομής.

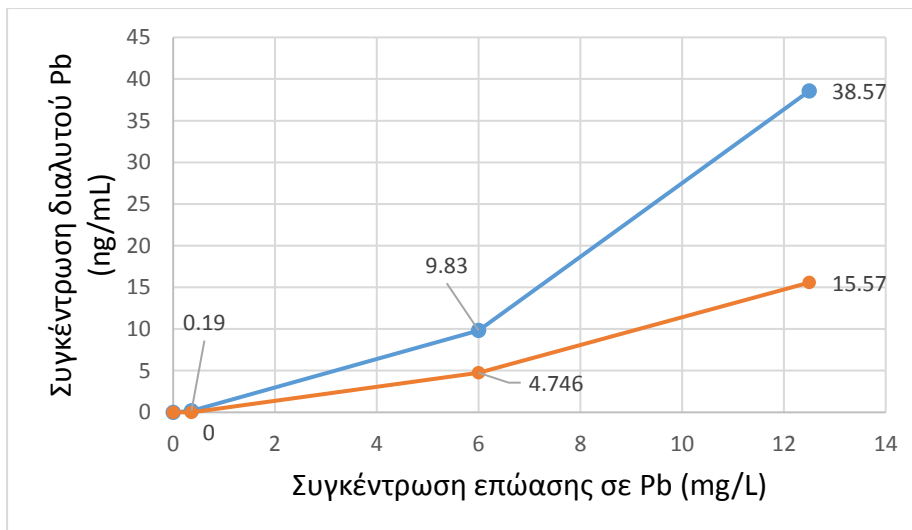
Με βάση την συνολική σύγκριση των επωασμένων και μη σε EDTA κυττάρων ως προς τον προσδιορισμό των κατανομών Pb σε αυτά, προκύπτουν τα παρακάτω συμπεράσματα. Και για τις 3 συγκεντρώσεις επώασης Pb παρατηρούμε ότι ο αριθμός των cell events αυξάνεται μετά την επώαση των κυττάρων σε EDTA (Γράφημα 29). Για την χαμηλή συγκέντρωση επώασης των 0.63 ppm, η επώαση σε EDTA αφαίρεσε τα πραγματικά cell events που παρουσιάστηκαν για τα μη επωασμένα σε EDTA κύτταρα αφού ανιχνεύθηκαν μόνο false positive events. Για τις υψηλότερες συγκεντρώσεις, η μείωση της baseline μπορεί είτε να μείωσε τα όρια ανίχνευσης σε κύτταρα που το περιεχόμενο τους σε Pb ήταν κάτω από το όριο της baseline, ή να αποκάλυψε περισσότερες μικρές κορυφές χαμηλότερης διάρκειας των οποίων η προέλευση δεν μπορεί να αποδειχθεί σε αυτή τη διατριβή. Όσο αφορά τη μέση μάζα Pb ανά κύτταρο (Γράφημα 30), αυτή είναι απόρροια της μετατόπισης των κατανομών προς χαμηλότερα fg εφόσον το EDTA αφαίρεσε ποσότητα Pb που είχε δεσμευτεί στα κυτταρικά τοιχώματα. Στο γράφημα 31 απεικονίζεται το αποτέλεσμα της επώασης των κυττάρων EDTA στην συγκέντρωση του εξωκυττάρου διαλυτού Pb στα κυτταρικά αιωρήματα.



Γράφημα 29. Συγκεντρωτικό γράφημα σύγκρισης επωασμένων σε EDTA (πορτοκαλί) και μη (μπλε) κυττάρων δείχνοντας πως μεταβάλλεται ο αριθμός των cell events στα κύτταρα επωασμένα σε 0.63, 6.26 και 12.5 ppm σε Pb. Οι ετικέτες δεδομένων διευκολύνουν στην ανάγνωση του άξονα y. Τοποθετούνται πάνω από τα σημεία για τα επωασμένα σε EDTA κύτταρα.



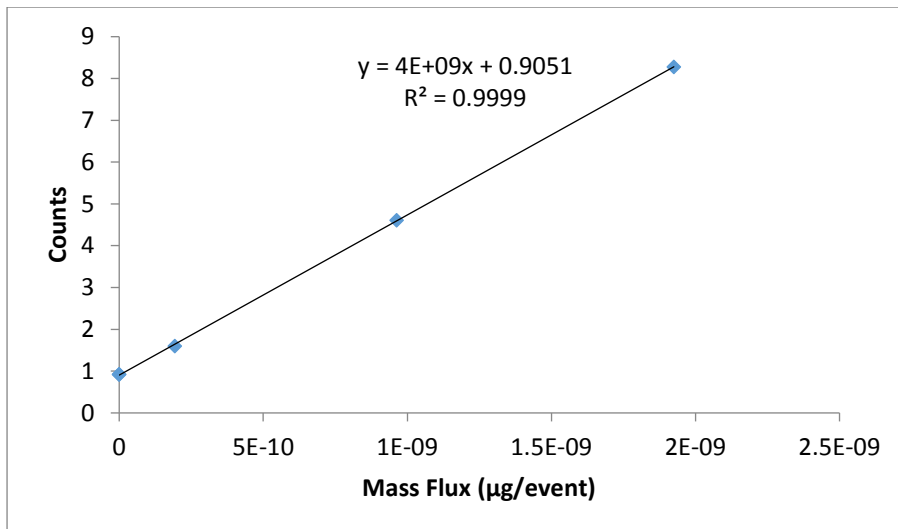
Γράφημα 30. Συγκεντρωτικό γράφημα σύγκρισης επωασμένων σε EDTA (πορτοκαλί) και μη (μπλε) κυττάρων δείχνοντας πως μεταβάλλεται η μέση μάζα Pb στα κύτταρα επωασμένα σε 0.63, 6.26 και 12.5 ppm σε Pb. Οι ετικέτες δεδομένων διευκολύνουν στην ανάγνωση του άξονα y. Τοποθετούνται κάτω από τα σημεία για τα επωασμένα σε EDTA κύτταρα.



Γράφημα 31. Συγκεντρωτικό γράφημα σύγκρισης επωασμένων σε EDTA (πορτοκαλί) και μη (μπλε) κυττάρων δείχνοντας πως μεταβάλλεται η συγκέντρωση του διαλυτού Pb στα κύτταρα επωασμένα σε 0.63, 6.26 και 12.5 ppm σε Pb. Οι ετικέτες δεδομένων διευκολύνουν στην ανάγνωση του άξονα y. Τοποθετούνται κάτω από τα σημεία για τα επωασμένα σε EDTA κύτταρα.

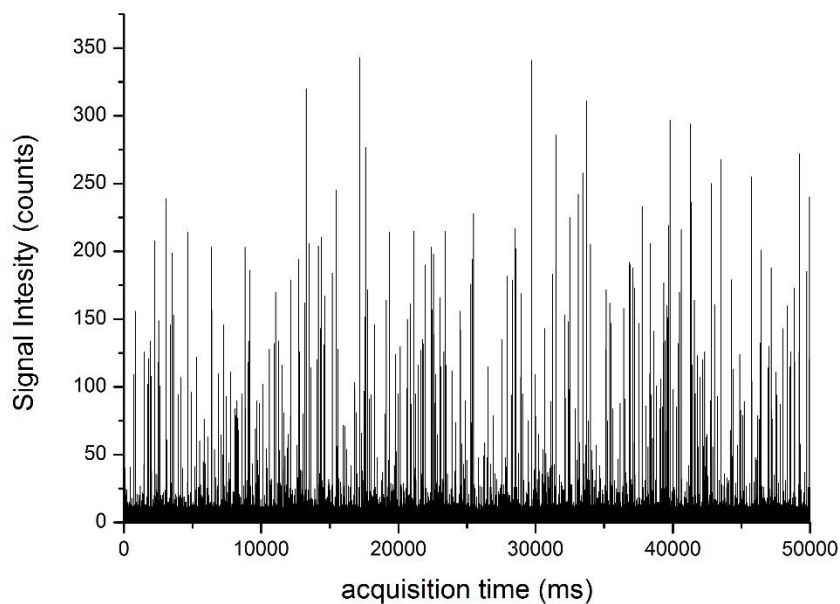
3.4.4 Προσδιορισμός Ca σε μεμονωμένα κύτταρα επωασμένα σε Pb με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard introduction system

Συνδυάζοντας την καμπύλη βαθμονόμησης για το διαλυτό Ca και της TE% που προσδιορίστηκε, προέκυψε η ευθεία συσχέτισης της έντασης του σήματος ^{44}Ca με την απόλυτη μάζα του Ca που εισέρχεται και ανιχνεύεται ανά 50 μs {mass flux Ca ($\mu\text{g}/50 \mu\text{s}$)} (Γράφημα 32).

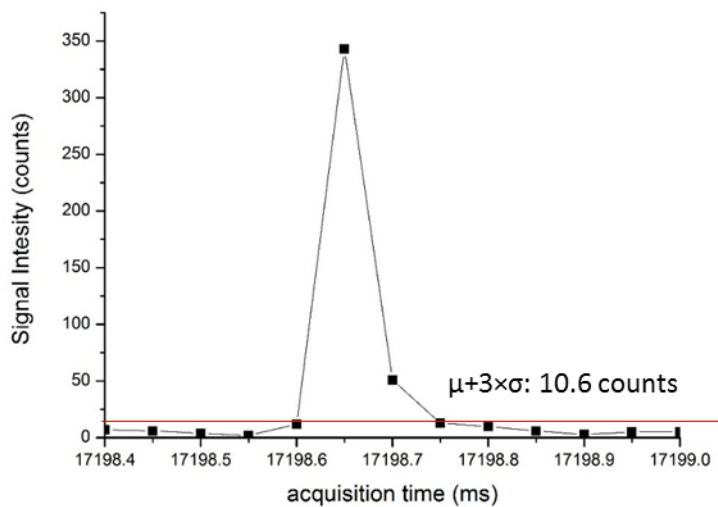


Γράφημα 32. Καμπύλη συσχέτισης της έντασης του σήματος (counts) με το Mass Flux (μg/event) Ca με το Standard Introduction System SC ICP-MS.

Στο Γράφημα 33 βλέπουμε την καταγραφή της έντασης του ^{44}Ca για τα control cells 28/3. Εστιάζοντας στη χρονική κλίμακα, μπορούμε να λάβουμε μία εικόνα της τυπικής διάρκειας ενός cell event Ca (Γράφημα 34). Η κορυφή του Γραφήματος 34, που αντιστοιχεί σε ένα τυπικό cell event Ca, ορίζεται από 4 σημεία κι έχει διάρκεια 150 μs.



Γράφημα 33. Καταγραφή της έντασης ^{44}Ca για τα control cells 28/3 με το Standard Introduction System SC ICP-MS για πάροδο 50 s

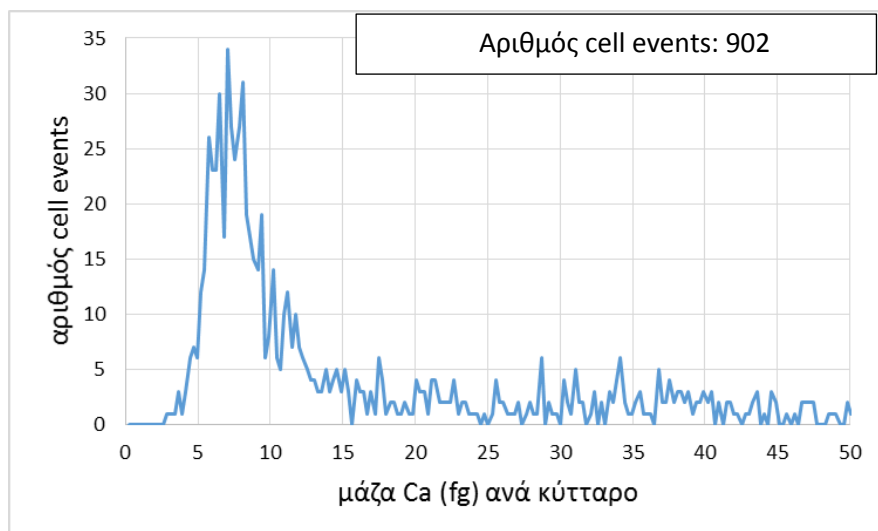


Γράφημα 34. Προφίλ κορυφής που αντιστοιχεί σε cell event Ca με διάρκεια 150 μ s. Η baseline ($\mu+3\sigma$: 10.6 counts) αποτελεί το όριο πάνω από το οποίο βρίσκονται τα data points που ορίζουν cell events

Συγκριτικά με τα cell events του Pb, η διάρκεια των cell events Ca είναι αρκετά μικρότερη. Κάθε κορυφή που αντιπροσωπεύει ένα cell event είναι αποτέλεσμα της καταγραφής του νέφους των ιόντων που παράγονται μετά την ατομοποίηση και ιοντισμό του στοιχείου που εμπεριέχεται σε κάθε κύτταρο. Η διάχυση των ιόντων στο πλάσμα είναι μάλλον αυτή που θα καθορίσει τη χρονική διάρκεια της κορυφής. Ερευνητικές εργασίες, στις οποίες χρησιμοποιείται Time-Resolved ICP-MS για την μελέτη του σήματος μεμονωμένων σταγόνων παραγόμενες από πολυστοιχειακά διαλύματα, προτείνουν πως η χρονική διάρκεια των παραγόμενων σημάτων από τις σταγόνες είναι διαφορετική για κάθε στοιχείο. Πιο συγκεκριμένα, ο Dziawatkoski και οι συνεργάτες του προτείνουν πως υπάρχει μία συσχέτιση της μορφής $\chi^{-1/2}$ μεταξύ του πλάτους της κορυφής που αντιπροσωπεύει το σήμα της σταγόνας και της ατομικής μάζας του στοιχείου που παρακολουθείται[8]. Δηλαδή ισότοπα χαμηλότερης ατομικής μάζας εμφανίζουν μεγαλύτερη εύρη κορυφών, συμπέρασμα που αντιτίθεται στις δικιές μας παρατηρήσεις. Η δεδομένη όμως μελέτη περιορίζεται στα στοιχεία ${}^7\text{Li}$, ${}^{24}\text{Mg}$, ${}^{55}\text{Mn}$ και ${}^{87}\text{Sr}$ αφού δεν μελετήθηκαν περισσότερα στοιχεία. Από μία πιο πρόσφατη εργασία της Borovinskaya και των συνεργατών της, κατά την οποία μελετήθηκαν περισσότερα στοιχεία, δεν παρατηρήθηκε εξάρτηση του πλάτους των κορυφών από την ατομική μάζα των στοιχείων[26]. Καθώς δεν υποστηρίζεται από την υπάρχουσα βιβλιογραφία, το ζήτημα της διαφορετικής διάρκειας των cell events θα διερευνηθεί μελλοντικά.

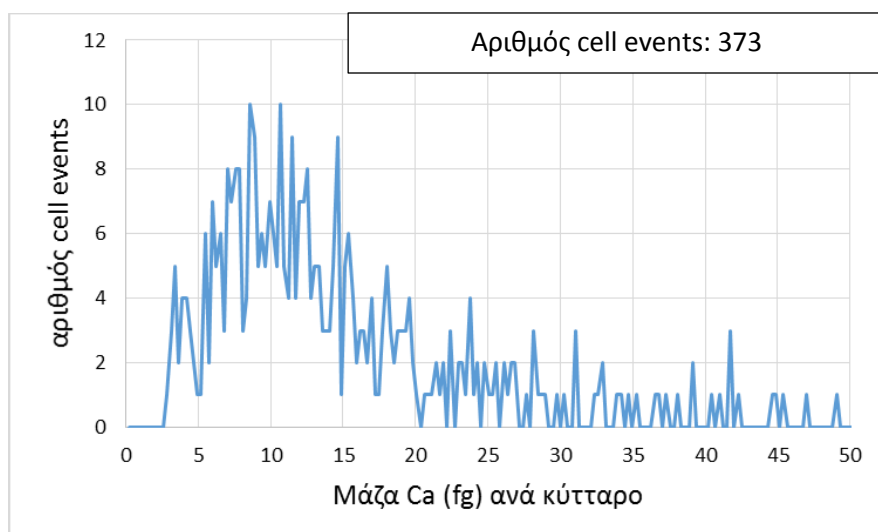
Από την εφαρμογή της σχετικής βαθμονόμησης (Γράφημα 32) προκύπτουν τα ιστογράμματα μάζας Ca ανά κύτταρο για τα control cells 28/3 και την κυτταρική σειρά επωασμένη στις 3 συγκεντρώσεις Pb. Το ιστόγραμμα μάζας Ca στα control cells (Γράφημα 35) είναι τύπου log-normal με μέση τιμή στα 17.5 fg, και τα περισσότερα κύτταρα να συσσωρεύονται στο εύρος των 5-10 fg Ca.

Πέρα από τα 15 fg Ca η κατανομή δεν φαίνεται να μηδενίζει, αποκαλύπτοντας λιγότερα events που περιλαμβάνουν από 20-50 fg Ca. Αυτά τα cell events μπορεί να οφείλονται σε συσσωματώματα κυττάρων που εισήλθαν τυχαία ή σε μεγαλύτερου μεγέθους κύτταρα.



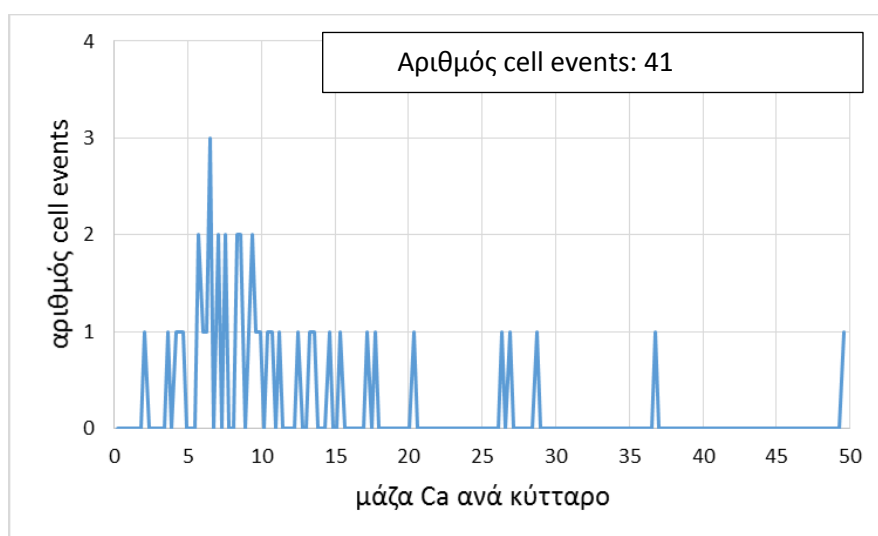
Γράφημα 35. Ιστόγραμμα μάζας Ca ανά κύτταρο για το δείγμα των control cells 28/3 με το Standard Introduction System SC ICP-MS.

Μελετώντας το ιστόγραμμα μάζας Ca ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 0.63 ppm Pb (Γράφημα 36), φαίνεται ότι το εύρος μάζας όπου συγκεντρώνονται τα περισσότερα κύτταρα παραμένει σχετικά σταθερό στα 3-15 fg Ca σε σχέση με το εύρος μάζας της κατανομής των control cells 28/3. Ο αριθμός cell events που ανιχνεύτηκε είναι χαμηλότερος κατά 2.5 φορές. Ακόμη η μέση μάζα Ca ανά κύτταρο μετατοπίζεται στα 13 fg.

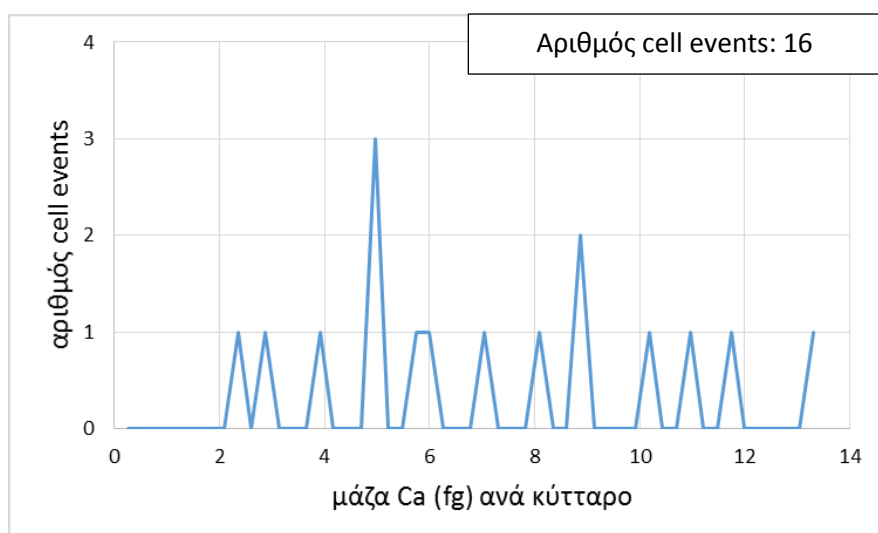


Γράφημα 36. Ιστόγραμμα μάζας Ca ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 0.63 ppm Pb με το Standard Introduction System SC ICP-MS

Όπως προκύπτει από την κατανομή Ca στα κύτταρα επωασμένα σε 6.26 ppm Pb (Γράφημα 37), ο αριθμός των 41 cell events υποδηλώνει ότι ο αριθμός των κυττάρων στα οποία εντοπίζεται Ca είναι πολύ χαμηλότερος σε σχέση με τα control cells 28/3 και τη χαμηλότερη συγκέντρωση επώασης σε Pb (0.63 ppm). Πλέον μερικές μονάδες κυττάρων εμφανίζονται να καλύπτουν το εύρος μάζας των 5-15 fg προτείνοντας μία αρνητική συσχέτιση μεταξύ επώασης κυττάρων σε Pb και επιπέδων Ca. Αυτή η αρνητική συσχέτιση συνεχίζεται και για τα κύτταρα επωασμένα σε 12.5 ppm Pb (Γράφημα 38).



Γράφημα 37. Ιστόγραμμα μάζας Ca ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 6.26 ppm Pb με το Standard Introduction System SC CP-MS



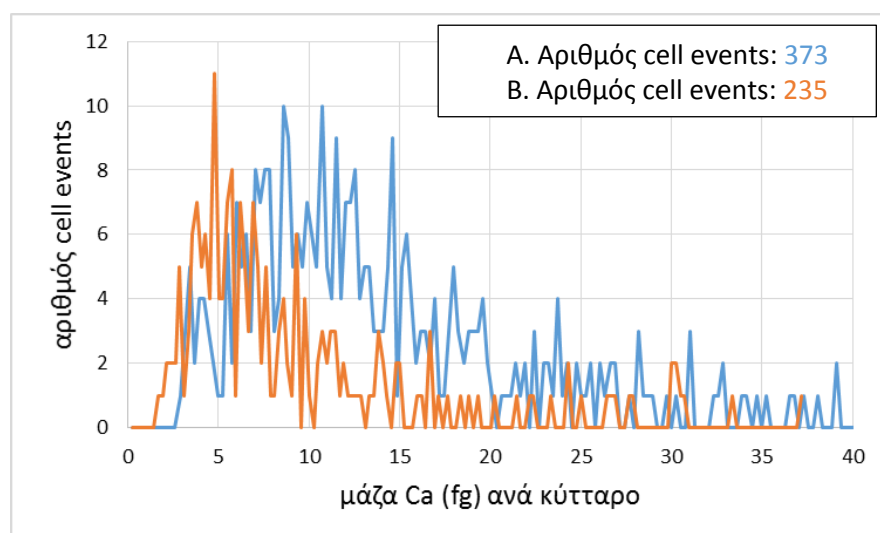
Γράφημα 38. Ιστόγραμμα μάζας Ca ανά κύτταρο για το δείγμα των 12.5 ppm Pb με το Standard Introduction System SC ICP-MS.

3.4.5 Προσδιορισμός Ca σε κύτταρα επωασμένα σε Pb με και χωρίς κατεργασία με χηλικό αντιδραστήριο με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard Introduction System

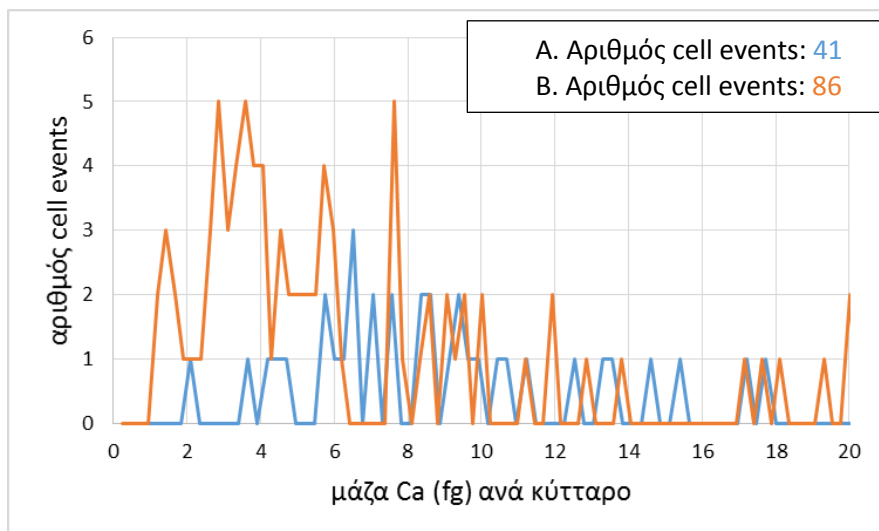
Όσο αφορά τα επωασμένα σε EDTA control cells 28/3, ανιχνεύτηκαν μόνο 4 cell events σε σχέση με τα 902 cell events που εμφάνισε το ίδιο δείγμα πριν την κατεργασία με το EDTA. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι το Ca που προσδιορίστηκε στα μη επωασμένα σε EDTA control cells 28/3 είναι κατά μεγαλύτερο ποσοστό προσροφημένο στο εξωτερικό περιβάλλον του κυττάρου και δεδομένου ότι τα κύτταρα υπέστησαν πλύσιμο με EDTA, τότε μάλλον το αποτέλεσμα δικαιολογείται. Το EDTA δέσμευσε το Ca^{2+} προς παραγωγή του συμπλόκου $[\text{Ca-EDTA}]^{2-}$, το οποίο απομακρύνθηκε μετά την διαδικασία της φυγοκέντρησης και της αναδιασποράς των κυττάρων σε νέο διαλύτη. Λόγω πολύ μικρού αριθμού cell events για τα επωασμένα σε EDTA control cells 28/3, σύγκριση ιστογραμμάτων μάζας Ca ανά κύτταρο μεταξύ επωασμένων και μη σε EDTA control cells 28/3 δεν παρουσιάζεται.

Ο συνολικός αριθμός cell events για τα κύτταρα επωασμένα σε 0.63 ppm Pb μετά την επώαση σε EDTA (Γράφημα 39) υπέστη μείωση κατά περίπου 60%, ενώ η μέση μάζα Ca ανά κύτταρο μετατοπίζεται στα 8.2 fg έναντι των 13 fg που ήταν για τα κύτταρα πριν την επώαση σε EDTA. Η μείωση του συνολικού αριθμού των cell events σε συνδυασμό με την απώλεια των cell events στα υψηλότερα fg δείχνουν πως το EDTA αφαιρεί ποσότητα προσροφημένου στα κυτταρικά τοιχώματα Ca, καθιστώντας κάποια κύτταρα μη ανιχνεύσιμα ενώ άλλα να εμφανίζονται σε χαμηλότερα fg.

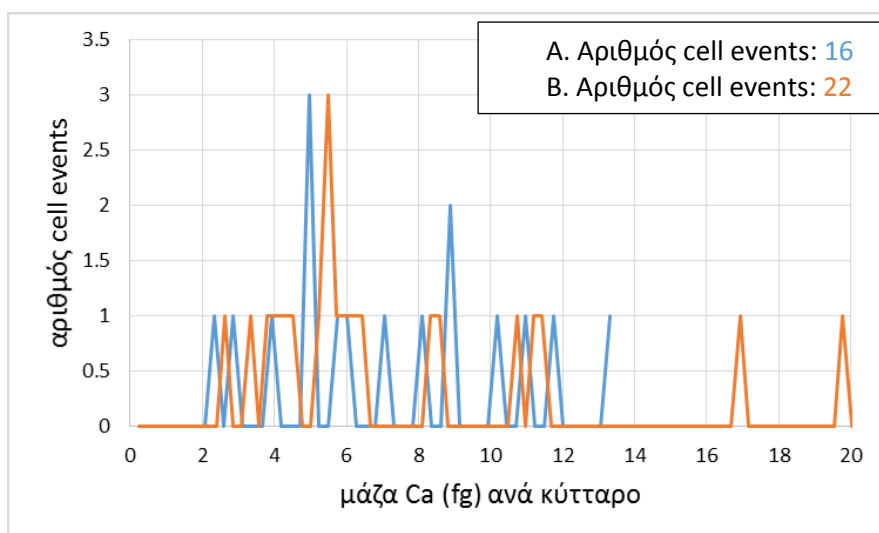
Για τα κύτταρα επωασμένα σε 6.26 και 12.5 ppm Pb (Γραφήματα 40, 41), η επώαση σε EDTA δεν επέφερε κάποιο αποτέλεσμα στην ανίχνευση Ca καθώς ήδη τα δεδομένα κυτταρικά δείγματα εμφάνισαν πολύ χαμηλό αριθμό cell events πριν την επώαση σε EDTA.



Γράφημα 39. Σύγκριση ιστογραμμάτων μάζας Ca ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 0.63 ppm Pb πριν και μετά την επώαση σε EDTA. Με πορτοκαλί απεικονίζονται τα κύτταρα μετά την επώαση σε EDTA.



Γράφημα 40. Σύγκριση ιστογραμμάτων μάζας Ca ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 6.26 ppm Pb πριν και μετά την επώαση σε EDTA. Με πορτοκαλί απεικονίζονται τα κύτταρα μετά την επώαση σε EDTA

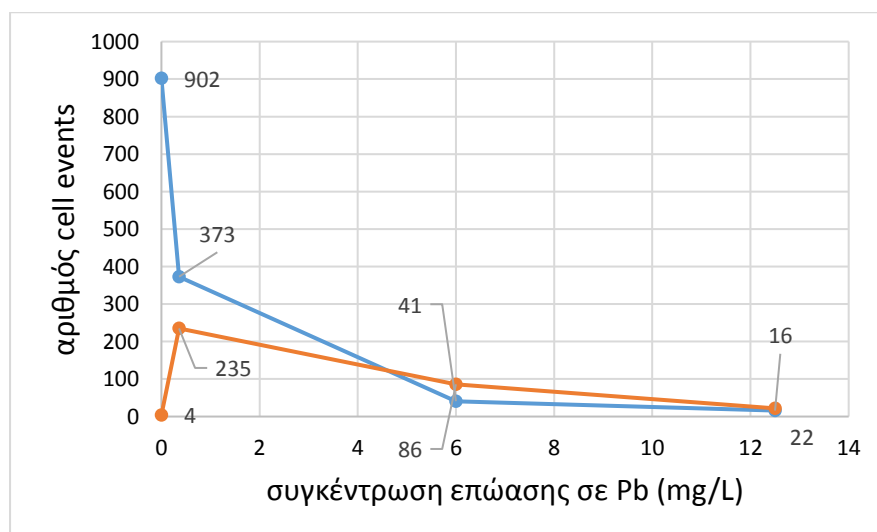


Γράφημα 41. Σύγκριση ιστογραμμάτων μάζας Ca ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 12.5 ppm Pb πριν και μετά την επώαση σε EDTA. Με πορτοκαλί απεικονίζονται τα κύτταρα μετά την επώαση σε EDTA

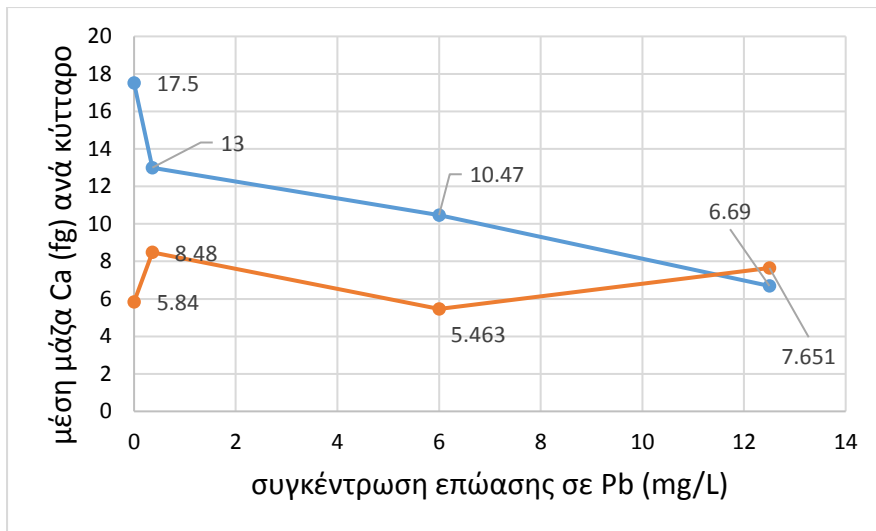
Με βάση την συνολική σύγκριση των επωασμένων σε EDTA και μη κυττάρων ως προς τον προσδιορισμό των κατανομών Ca σε αυτά, προκύπτουν τα παρακάτω συμπεράσματα. Απομονώνοντας τις παρατηρούμενες τάσεις του αριθμού cell events και μέσης μάζας Ca ανά κύτταρο για τα μη επωασμένα σε EDTA κύτταρα (Γραφήματα 42, 43), μπορεί να υποθεθεί μία αρνητική συσχέτιση μεταξύ επιπέδων Ca στα κύτταρα και συγκέντρωσης επώασης σε Pb. Σε αυτό συνηγορούν η μείωση του αριθμού των cell events και η μείωση της μέσης μάζας Ca ανά κύτταρο συναρτήσει της συγκέντρωσης επώασης σε Pb. Ίσως, τα ιόντα Pb^{2+} λειτουργούν ανταγωνιστικά με τα ιόντα Ca^{2+} και τα εξωθούν από το κύτταρο. Είναι γνωστό πως ο δισθενής Pb είναι αποτελεσματικός αντικαταστάτης του Ca σε 6 διαδικασίες στο ανθρώπινο σώμα που εξαρτώνται από την παρουσία του δισθενούς Ca όπως η συνθετάση του ATP στα ερυθροκύτταρα, φωσφοδιεστεράσες που επάγονται από την

καλμοδουλίνη (πρωτεΐνη που προσδένει Ca) ή εισαγωγή Ca στα μιτοχόνδρια [27]. Μελέτη της ανταγωνιστικής δράσης του Pb έναντι του Ca δεν έχει διεξαχθεί για τα *Chlamydomonas reinhardtii*.

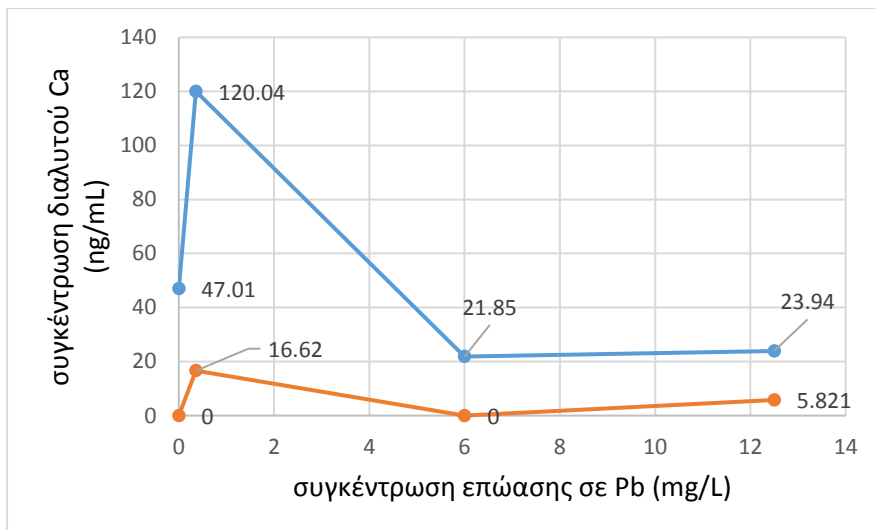
Αναφορικά με την κατεργασία των κυττάρων με EDTA, παρατηρήσαμε 2 αξιοσημείωτα φαινόμενα: 1) την εξάλειψη του αριθμού των cell events Ca και άρα ισοπέδωσης της κατανομής Ca που είχαν εμφανίσει τα control cells 28/3 πριν την επώαση σε EDTA, 2) τη σχετικά μικρή μείωση των cell events Ca και μετατόπιση της κατανομής Ca προς χαμηλότερα fg για τα κύτταρα επωασμένα σε 0.63 ppm Pb μετά την επώαση σε EDTA. Σχετικά με τα κύτταρα επωασμένα σε 6.26 και 12.5 ppm Pb η κατεργασία με EDTA δεν επέφερε αλλαγή στον προσδιορισμό Ca σε αυτά, διατηρώντας τον πολύ χαμηλό αριθμό cell events. Αν το Ca βρίσκεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στο κυτταρικό περίβλημα των κυττάρων και μετά το πλύσιμο με EDTA αυτό απομακρύνθηκε, τότε δικαιολογείται η εξάλειψη των cell events (4 cell events). για το δείγμα των control cells 28/3. Το ότι το Ca είναι κατά κύριο λόγο στο κυτταρικό τοίχωμα των κυττάρων επιβεβαιώνει η κοινή τάση που επιδεικνύει ο αριθμός των cell events (Γράφημα 42) με το διαλυτό εξωκυττάριο Ca (Γράφημα 43) για τα κύτταρα μετά την επώαση σε EDTA. Έτσι, η συγκέντρωση του εξωκυττάριου διαλυτού Ca μάλλον επηρεάζει τον αριθμό των ιόντων που θα προσροφηθούν στο κυτταρικό τοίχωμα των κυττάρων και άρα και τον αριθμό των cell events και μέσης μάζας Ca ανά κύτταρο (Γράφημα 43). Η δέσμευση του Ca^{2+} από το κυτταρικό τοίχωμα των κυττάρων μάλλον οφείλεται στο αρνητικό φορτίο που φέρουν οι φωσφορικές ομάδες των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης των *Chlamydomonas reinhardtii*. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μεγαλύτερη μείωση της συγκέντρωσης του εξωκυττάριου διαλυτού Ca (Γράφημα 31) σε σχέση με του Pb, αν λάβουμε υπόψη την μεγαλύτερη σταθερά σχηματισμού του συμπλόκου $[Pb-EDTA]^{2-}$ (10^{18}) σε σχέση με αυτήν του $[Ca-EDTA]^{2-}$ ($10^{10.65}$).



Γράφημα 42. Συγκεντρωτικό γράφημα σύγκρισης επωασμένων σε EDTA (πορτοκαλί) και μη (μπλε) κυττάρων δείχνοντας πως μεταβάλλεται ο αριθμός των cell events για το Ca στα κύτταρα επωασμένα σε 0.63, 6.26 και 12.5 ppm σε Pb. Οι ετικέτες δεδομένων διευκολύνουν στην ανάγνωση του άξονα y. Τοποθετούνται κάτω από τα σημεία για τα κύτταρα επωασμένα σε EDTA.



Γράφημα 43. Συγκεντρωτικό γράφημα σύγκρισης επωασμένων σε EDTA (πορτοκαλί) και μη (μπλε) κυττάρων δείχνοντας πως μεταβάλλεται η μέση μάζα Ca ανά κύτταρο στα κύτταρα επωασμένα σε 0.63, 6.26 και 12.5 ppm σε Pb. Οι ετικέτες δεδομένων διευκολύνουν στην ανάγνωση του άξονα y. Τοποθετούνται κάτω από τα σημεία για τα κύτταρα επωασμένα σε EDTA.



Γράφημα 44. Συγκεντρωτικό γράφημα σύγκρισης επωασμένων σε EDTA (πορτοκαλί) και μη (μπλε) κυττάρων δείχνοντας πως μεταβάλλεται η συγκέντρωση διαλυτού Ca στα δείγματα των 0.63, 6.26 και 12.5 ppm σε Pb. Οι ετικέτες δεδομένων διευκολύνουν στην ανάγνωση του άξονα y. Η τιμή 0 αντιπροσωπεύει τα δείγματα στα οποία το διαλυτό Ca ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης και η τιμή του ήταν αρνητική.

3.4.6 Αποτελέσματα από τους υπολογισμούς ισοζυγίου μάζας για τον προσδιορισμό Pb και Ca σε επωασμένα και μη σε χηλικό αντιδραστήριο (EDTA)

Η συνολική μάζα Pb ή Ca που προσδιορίζουμε στα κυτταρικά δείγματα με τη μέθοδο του SC ICP-MS είναι το άθροισμα της μάζας του στοιχείου στα κύτταρα και της μάζα του εξωκυττάριου διαλυτού στοιχείου. Το άθροισμα αυτό θα πρέπει να ισούται με την συνολική μάζα του στοιχείου που υπάρχει σε κάθε κυτταρικό αιώρημα και που προσδιορίζεται με το Conventional ICP-MS. Αν οι τιμές του SC ICP-MS και του Conventional ICP-MS συμφωνούν, τότε το ισοζύγιο μάζας διατηρείται. Έτσι, έχουμε στα χέρια μας έναν τρόπο επαλήθευσης μέρος των αποτελεσμάτων του SC ICP-MS. Παρακάτω, δείχνεται παραδειγματικά πως υπολογίζουμε το ισοζύγιο μάζας του Pb στο κυτταρικό δείγμα των 6.26 ppm Pb.

Η καταγραφή διήρκησε 1 min και το sample uptake ήταν 1.1 mL/min. Τα cell events που ανιχνεύθηκαν για Pb ήταν 5450, από τα οποία η μέση μάζα Pb ήταν 17.34 fg ανά cell event. Έχοντας προσδιορίσει το TE στα 2.1 %, μπορούμε να υπολογίσουμε τον αριθμό των κυττάρων που περιέχουν Pb στον όγκο δείγματος που εισάγουμε ανά min στο πλάσμα: $\frac{13035}{0.021} = 259524$. Το γινόμενο της μέσης μάζας Pb ανά κύτταρο και του αριθμού που μόλις προσδιορίσαμε μας δίνει τη συνολική μάζα Pb που υπάρχει στα κύτταρα που εισάγουμε ανά 1 min: $259524 \times 17.34 = 9291803 \text{ fg} = 4.50 \times 10^6 \text{ fg}$. Η συγκέντρωση του διαλυτού Pb στο κυτταρικό αιώρημα που προσδιορίστηκε με SC ICP-MS είναι 38.56 ng/mL. Δεδομένου του sample uptake, υπολογίζουμε την μάζα διαλυτού Pb ανά 1 min: $38.56 \times 1.1 = 38.32 \frac{\text{ng}}{\text{min}} = 4.24 \times 10^7$. Έτσι, το άθροισμα διαλυτού Pb κι αυτού στα κύτταρα είναι $4.69 \times 10^7 \text{ fg}$.

Η συγκέντρωση Pb που προσδιορίστηκε στο ίδιο δείγμα με Conventional ICP-MS είναι 10.298 ng/mL. Από τη συγκέντρωση και γνωρίζοντας το sample uptake, υπολογίζουμε τη μάζα Pb ανά min: $34.84 \times 1.1 = 38.32 \frac{\text{ng}}{\text{min}} = 3.83 \times 10^7 \text{ fg}$. Αν συγκρίνουμε τις τιμές της μάζας Pb από SC ICP-MS και Conventional ICP-MS κι εκφράσουμε τη σύγκριση ως % ανάκτηση (% recovery) του Single-Cell προς το Conventional ICP-MS, τότε έχουμε: $\frac{4.69 \times 10^7}{3.83 \times 10^7} \times 100\% = 122.43\%$. Το SC ICP-MS είναι μία μέθοδος που μας δίνει τη δυνατότητα να γνωρίσουμε επ' ακριβώς τη μάζα του στοιχείου ανά κύτταρο λόγω των μικρών dwell time (50 μs). Στο Conventional ICP-MS, λαμβάνουμε πληροφορία για την ένταση του σήματος του στοιχείου στο δείγμα κάθε 100 ms και υπολογίζουμε τον μέσο όρο της έντασης του σήματος. Από τον μέσο όρο και μέσω της καμπύλης βαθμονόμησης, υπολογίζουμε τη συγκέντρωση του στοιχείου. Παίρνοντας όμως τον μέσο όρο, υποτιμώνται κάποιες μεγάλες τιμές του σήματος που πιθανώς προέρχονται από σήματα πολλών κυττάρων που εισέρχονται μαζί δεδομένου ότι το dwell time είναι μεγαλύτερο .

Πίνακας 22. Υπολογισμοί ισοζυγίου μάζας Pb για τα *Chlamydomonas reinhardtii* επωασμένα σε 0.63, 6.26 και 12.5 ppm. Ο συμβολισμός – υποδηλώνει ότι η τιμή ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης, ενώ το n.d (not determined) ότι δεν προσδιορίστηκε.

<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> επωασμένα σε Pb (ppm)	SC ICP-MS			Conventional ICP-MS Ολικός Pb (fg)	Recovery %
	Ενδοκυττάριος Pb (fg)	Εξωκυττάριος Pb (fg)	Ολικός Pb (fg)		
0.63	1.75E+04	2.12E+05	2.29E+05	-	n.d
6.26	9.29E+06	1.08E+07	2.01E+07	1.13E+07	177.49
12.5	4.50E+06	4.24E+07	4.69E+07	3.83E+07	122.43

Πίνακας 23. Υπολογισμοί ισοζυγίου μάζας Ca για τα *Chlamydomonas reinhardtii* επωασμένα σε 0.63, 6.26 και 12.5 ppm καθώς και τα control.

<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> επωασμένα σε Pb (ppm)	SC-ICP-MS			Conventional ICP-MS Ολικό Ca (fg)	Recovery %
	Ενδοκυττάριο Ca (fg)	Εξωκυττάριο Ca (fg)	Ολικό Ca (fg)		
Control	7.52E+05	5.17E+07	5.25E+07	4.64E+07	113.10
0.63	2.35E+05	1.32E+08	1.32E+08	1.25E+08	105.84
6.26	2.04E+04	2.40E+07	2.41E+07	2.54E+07	94.73
12.5	5.09E+03	2.63E+07	2.63E+07	2.85E+07	92.50

Πίνακας 24. Υπολογισμοί ισοζυγίου μάζας Pb για τα *Chlamydomonas reinhardtii* επωασμένα σε 0.63, 6.26 και 12.5 ppm μετά από επώαση σε EDTA. Ο συμβολισμός – υποδηλώνει ότι η τιμή ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης, ενώ το n.d (not determined) ότι δεν προσδιορίστηκε.

<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> επωασμένα σε Pb (ppm)	SC-ICP-MS			Conventional ICP-MS Ολικός Pb (fg)	Recovery %
	Ενδοκυττάριος Pb (fg)	Εξωκυττάριος Pb (fg)	Ολικός Pb (fg)		
6.26	8.15E+06	6.22E+06	1.44E+07	1.13E+07	126.66
12.5	4.87E+06	2.04E+07	2.53E+07	1.92E+07	131.74

Πίνακας 25. Υπολογισμοί ισοζυγίου μάζας Ca για τα *Chlamydomonas reinhardtii* επωασμένα σε 0.63, 6.26 και 12.5 ppm μετά από επώαση σε EDTA. Ο συμβολισμός – υποδηλώνει ότι η τιμή ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης, ενώ το n.d (not determined) ότι δεν προσδιορίστηκε.

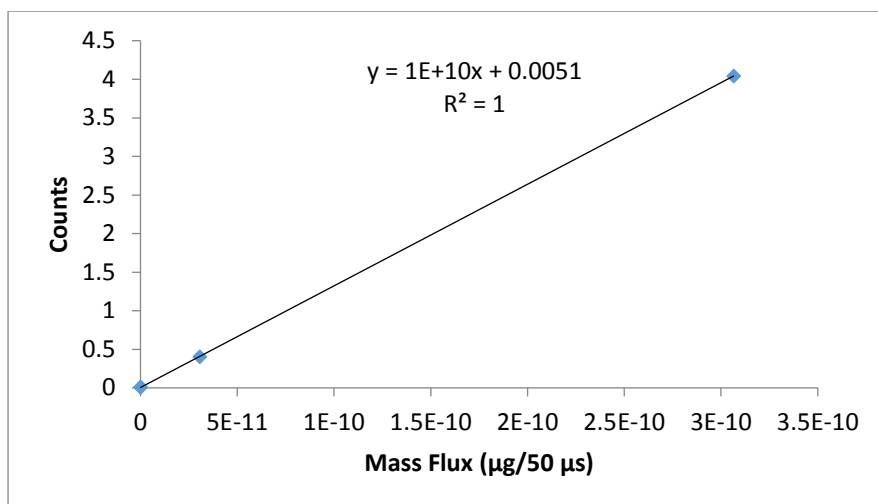
<i>Chlamydomonas Reinhardtii</i> επωασμένα σε Pb (ppm)	SC-ICP-MS			Conventional ICP-MS Ολικό Ca (fg)	Recovery %
	Ενδοκυττάριο Ca (fg)	Εξωκυττάριο Ca (fg)	Ολικό Ca (fg)		
0.63	9.14E+04	2.18E+07	2.19E+07	2.94E+07	74.31
6.26	2.16E+04	-	2.16E+04	5.00E+06	0.43
12.5	7.72E+03	7.63E+06	7.63E+06	1.17E+07	65.17

Τα control cells 28/3 δεν εμφανίζονται στους Πίνακες 22, 24 και 25 αφού οι τιμές του διαλυτού ήταν αρνητικές για το SC ICP-MS και το Conventional ICP-MS, καθώς επίσης δεν ανιχνεύθηκαν cell events. Επιπροσθέτως, δεν εμφάνισαν ένδειξη παρουσίας Pb (και με τις 2 τεχνικές) τα επωασμένα σε EDTA κύτταρα επωασμένα σε 0.63 ppm Pb. Η συμφωνία μεταξύ των 2 τεχνικών είναι πολύ καλή εκτός μίας αστοχίας για άγνωστο λόγο στο δείγμα των μη πλυμένων κυττάρων επωασμένων σε 6.26 ppm Pb. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει ο προσδιορισμός Pb στα κύτταρα επωασμένα σε 0.63 ppm Pb (Πίνακας 22), όπου το SC ICP-MS είναι σε θέση να ανιχνεύσει Pb εκεί που το Conventional ICP-MS αποτυγχάνει. Αυτό αποδίδεται στην αυξημένη ευαισθησία της μεθόδου του SC ICP-MS που μπορεί να προσδιορίσει χαμηλές ποσότητες Pb σε ένα κύτταρο λόγω των μικρών dwell time παραβλέποντας τη συνεισφορά του διαλυτού Pb στην ένταση του σήματος. Αντίθετα, τέτοιες χαμηλές μάζες Pb στα κύτταρα δεν μπορούν να φανούν, καθώς χάνονται κατά τον υπολογισμό του μέσου όρου της έντασης του σήματος στα μεγαλύτερα dwell time. Αυτό το φαινόμενο θα μπορούσε να αναφερθεί σαν cell dilution effect, δηλαδή κύτταρα με χαμηλό περιεχόμενο στο στοιχείο που παρακολουθούμε τείνουν να αραιώνονται στο ίδιο το δείγμα.

3.5 Ανάλυση κυττάρων επωασμένα σε As (III) με το Standard Introduction System

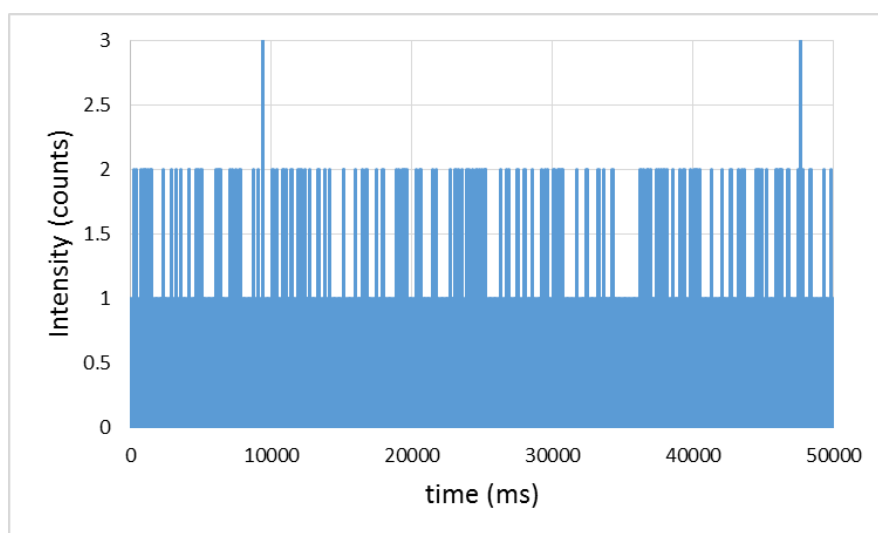
3.5.1 Προσδιορισμός As(III) σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard Introduction System

Συνδυάζοντας την καμπύλη βαθμονόμησης για το διαλυτό As και της TE% που προσδιορίστηκε, προέκυψε η ευθεία συσχέτισης της έντασης ^{75}As με την απόλυτη μάζα του As που εισέρχεται και ανιχνεύεται ανά 50 μs {mass flux As ($\mu\text{g}/50 \mu\text{s}$)} (Γράφημα 45).



Γράφημα 45. Καμπύλη συσχέτισης της έντασης του σήματος (counts) με το Mass Flux ($\mu\text{g}/50 \mu\text{s}$) As με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard Introduction System

Περνώντας στην ανάλυση των κυτταρικών δειγμάτων για προσδιορισμό της κατανομής As (III) σε αυτά, τα control cells 28/3 {*Chlamydomonas reinhardtii* χωρίς την προσθήκη As (III)} δεν εμφάνισαν κάποια ένδειξη παρουσίας κυτταρικού ή διαλυτού εξωκυττάρου As (III). Οι εξαιρετικά χαμηλές τιμές της έντασης του σήματος (Γράφημα 46) οφείλονται στο σήμα του υποβάθρου για το m/z 75 και όχι στον κυτταρικό ή διαλυτό εξωκυττάρου As (III). Εντάσεις των 1, 2 και 3 counts δεν αντιστοιχούν σε cell events καθώς έχουν διάρκεια 1 data point ($\leq 50 \mu\text{s}$). Έτσι αν και το λογισμικό (Nano Syngistix, PE) μετρά 452 κορυφές, αυτές δεν είναι τίποτε άλλο παρά false positives λόγω της μη κανονικής κατανομής του υποβάθρου σήματος.

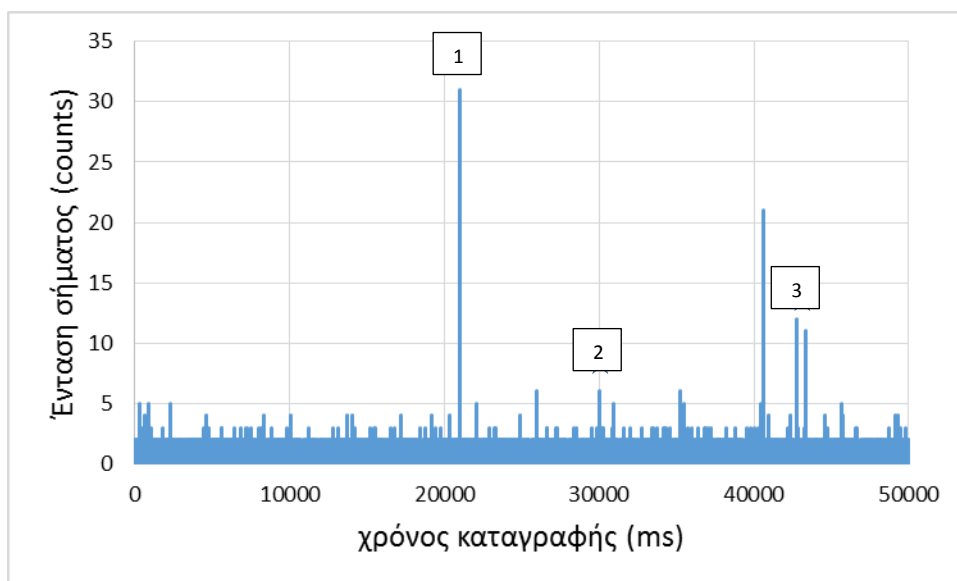


Γράφημα 46. Καταγραφή έντασης As(III) για τα control cells 28/3 σε υπερκάθαρο H_2O με το Standard Introduction System SC ICP-MS για πάροδο 50 s.

Σχετικά με την ανάλυση των κυτταρικών δειγμάτων της σειράς του As (III), η συγκέντρωση του εξωκυττάρου διαλυτού As προσδιορίζεται στα ίδια περίπου μg επίπεδα για όλα τα κυτταρικά

δείγματα των συγκεντρώσεων επώασης As (III). Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές προσδιορίζονται στα 0.12, 0.16, 0.14 και 0.15 ppb για τα κύτταρα επωασμένα σε 100, 200, 300 και 400 μM As (III). Αφού η συγκέντρωση εξωκυττάριου διαλυτού As (III) είναι ίδια για όλα τα κύτταρα της σειράς του As (III), αυτά θα έχουν και ίδια baseline. Υπολογίζοντας την baseline ($\mu+3\sigma$) για τα κύτταρα επωασμένα σε 400 μM As, το όριο βρίσκεται στα 0.88 counts. Αυτό σημαίνει πως ο συνολικός αριθμός των cell events για κάθε δείγμα κυττάρων επωασμένων στις 4 συγκεντρώσεις As (III) θα συμπεριλαμβάνει εκτός των πραγματικών cell events και αρκετά false positives (1, 2, 3 counts). Και δεδομένου του χαμηλού αριθμού των cell events, που ήταν 8, 42, 24 και 85 για τα κύτταρα επωασμένα σε 100, 200, 300 και 400 μM As (III) αντίστοιχα, θα επηρεάζονται σημαντικά και τα ιστογράμματα μάζας As (III) ανά κύτταρο που θα παρουσιαστούν παρακάτω.

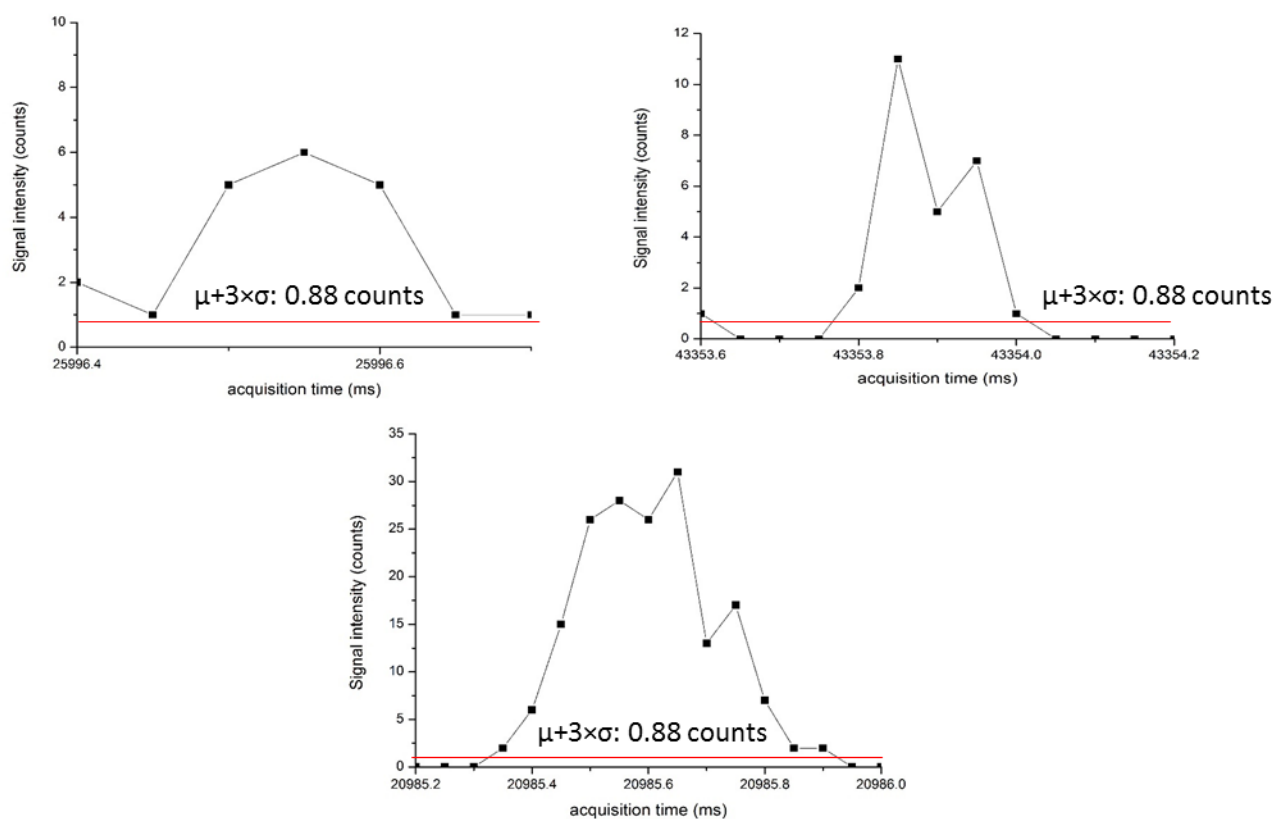
Για να αποκτήσουμε μία εικόνα της τυπικής χρονικής διάρκειας των cell events As (III), αποφασίζουμε να μελετήσουμε τη καταγραφή της έντασης ^{75}As για τα κύτταρα επωασμένα σε 400 μM As (Γράφημα 47). Ο λόγος είναι ότι η πιθανότητα τα cell events As να είναι πραγματικά θα είναι μεγαλύτερη για τα κύτταρα επωασμένα σε 400 μM As (III).



Γράφημα 47. Καταγραφή της έντασης ^{75}As για τα κύτταρα επωασμένα σε 400 μM As (III) με το Standard Introduction System SC ICP-MS για πάροδο 50 s. Επιλέγονται 3 κορυφές με υψηλή, μεσαία και χαμηλή ένταση.

Η τυπική διάρκεια των cell events κυμαίνεται κοντά στα 200 μs (κορυφές 1 και 2, Γράφημα 48). Η κορυφή 3 ίσως είναι και το μοναδικό παράδειγμα κορυφής με διάρκεια 600 μs . Εξαιτίας του ότι η

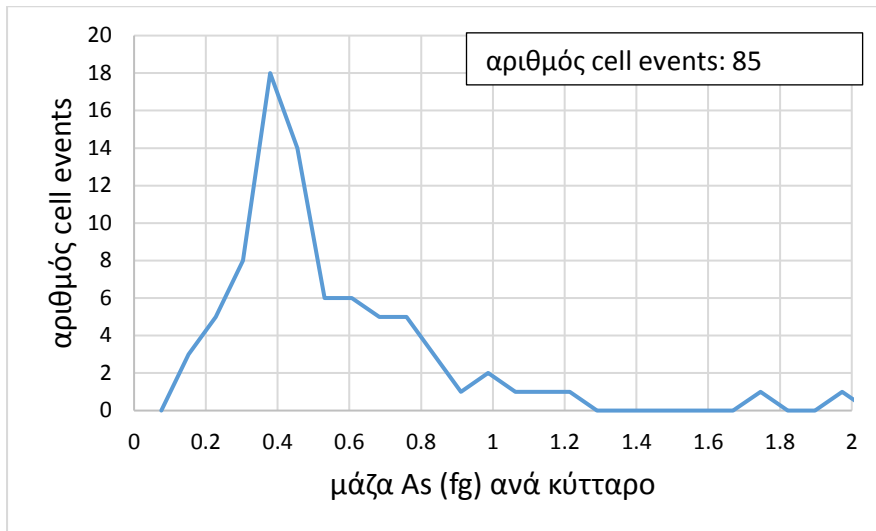
πλειοψηφία των cell events διαρκεί περίπου 200 μ s, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι μάλλον η κορυφή 3 αποτελεί κάποια κυτταρική συσσωμάτωση.



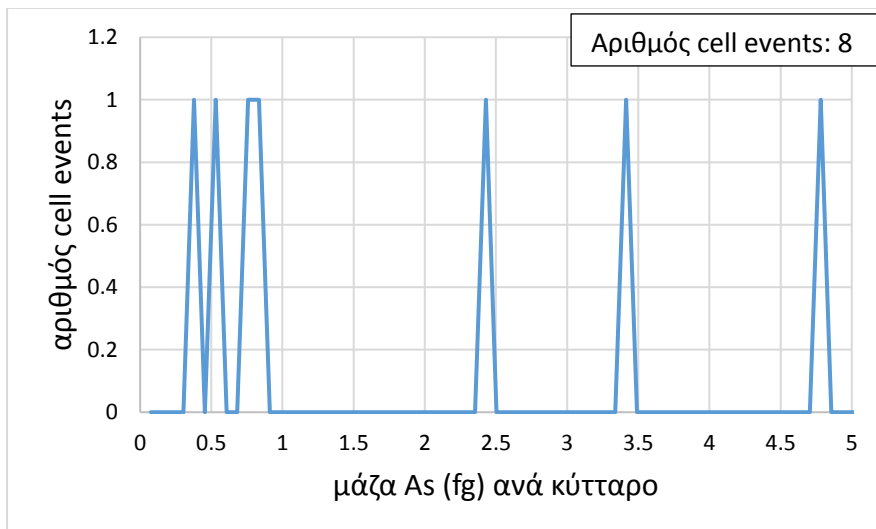
Γράφημα 48. Προφίλ κορυφών που αντιστοιχούν σε cell events As με διάρκεια 200 μ s (1,2) και 600 μ s (3). Η baseline ($\mu+3\sigma$: 0.88 counts) αποτελεί το όριο πάνω από το οποίο βρίσκονται τα data points που ορίζουν cell events.

Από την εφαρμογή της σχετικής βαθμονόμησης (Γράφημα 45) προκύπτουν τα ιστογράμματα μάζας As (III) ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 100, 200, 300 και 400 μ M As (III) (Γραφήματα 49, 50, 51, 52). Μελετώντας, αρχικά, το ιστόγραμμα μάζας As (III) ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 400 μ M As (III) (Γράφημα 48), τα περισσότερα cell events συγκεντρώνονται στα χαμηλά 0.1-0.8 fg As (III), ενώ σποραδικά cell events ξεχωρίζουν στην περιοχή των 1.5-2 fg. Ο αριθμός των cell events είναι ιδιαίτερα χαμηλός (85) συγκριτικά με τα cell events Pb (5450, 12.5 ppm Pb) των κυττάρων επωασμένων σε Pb. Επίσης το εύρος μάζας της κατανομής είναι πολύ στενό (0.1-0.8 fg) και

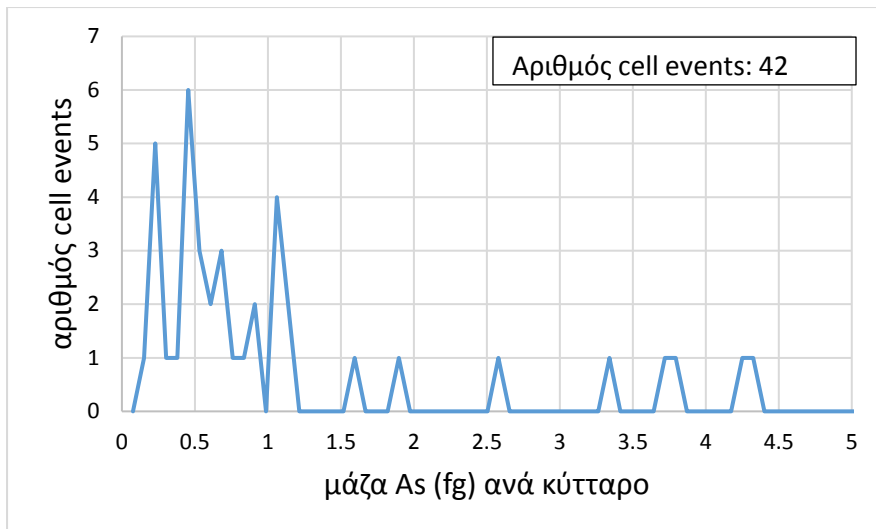
δεδομένου ότι false positives συμβάλουν στον τελικό αριθμό των cell events, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η πρόσληψη As (III) από τα κύτταρα συμβαίνει σε πολύ χαμηλές ποσότητες.



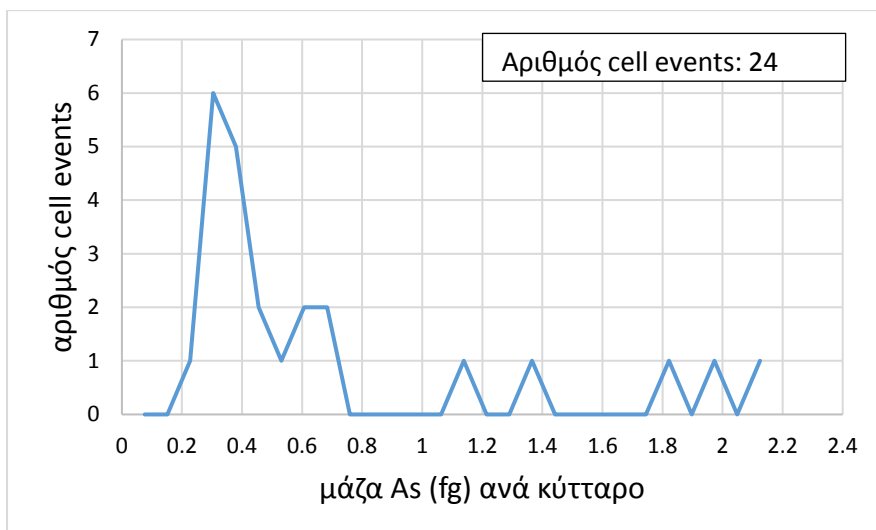
Γράφημα 49. Ιστόγραμμα μάζας As (III) ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 400 μM As (III) με το Standard Introduction System SC ICP-MS.



Γράφημα 50. Ιστόγραμμα μάζας As (III) ανά κύτταρο για το δείγμα των κυττάρων επωασμένα σε 100 μM As (III) με το Standard Introduction System SC ICP-MS.



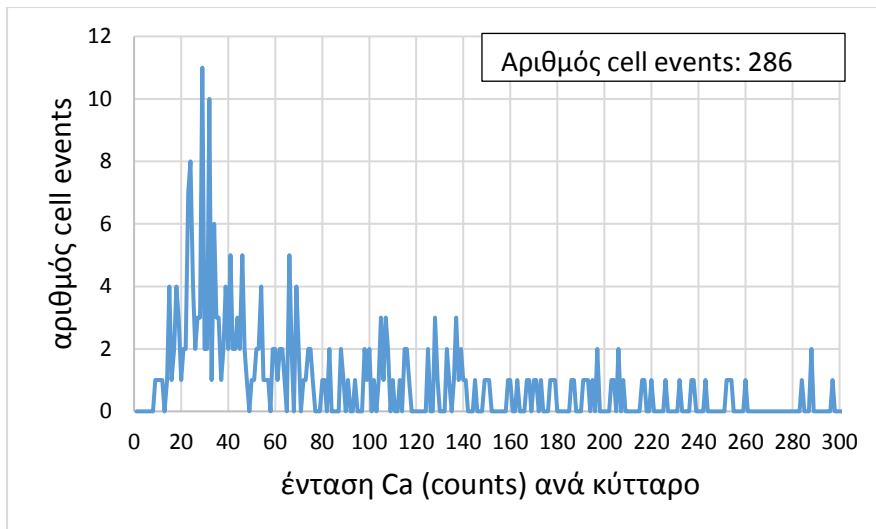
Γράφημα 51. Ιστόγραμμα μάζας As (III) ανά κύτταρο για το δείγμα των κυττάρων επωασμένα σε 200 μM As (III) με το Standard Introduction System SC ICP-MS.



Γράφημα 52. Ιστόγραμμα μάζας As (III) ανά κύτταρο για το δείγμα των κυττάρων επωασμένα σε 300 μM As (III) με το Standard Introduction System SC ICP-MS.

3.5.2 Προσδιορισμός Ca σε μεμονωμένα κύτταρα επωασμένα σε As (III) με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard introduction system

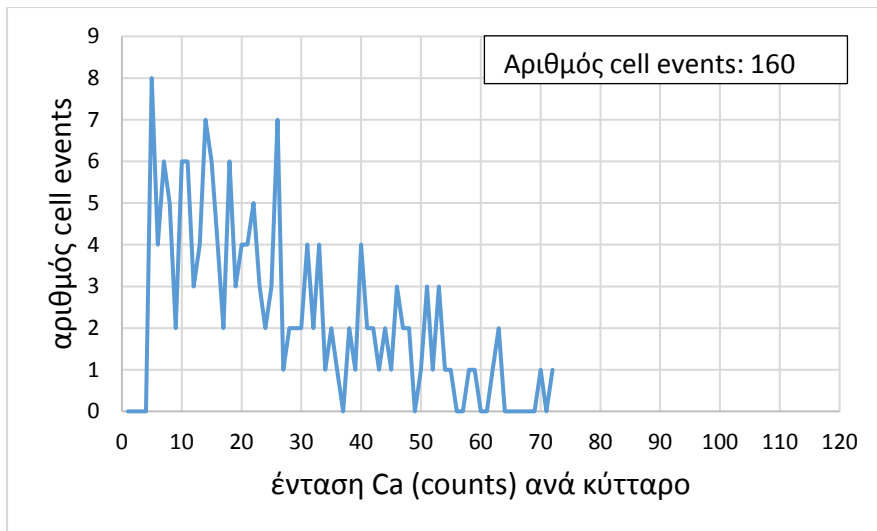
Βαθμονόμηση για να συσχετίσουμε την ένταση σήματος του σήματος Ca με την μάζα των cell events δεν πραγματοποιήθηκε. Έτσι, δεν έγινε προσδιορισμός της μάζας του Ca στα κυτταρικά δείγματα. Θα παρουσιαστούν κατανομές της έντασης του σήματος του ^{44}Ca ανά κύτταρο για τα δείγματα των 4 συγκεντρώσεων του As και τα control 28/3 cells, και θα γίνει προσπάθεια να εξαχθούν ποιοτικά συμπεράσματα από αυτά.



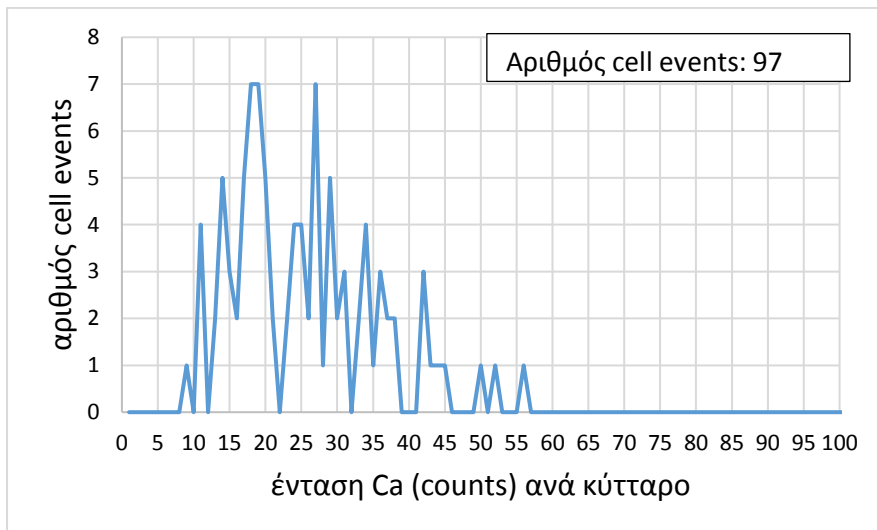
Γράφημα 53. Ιστόγραμμα έντασης Ca ανά κύτταρο για τα control cells 28/3 με το Standard Introduction System SC ICP-MS.

Αναφορικά με τα control cells 28/3 (Γράφημα 53), ο αριθμός των cell events έπεσε στα 286 σε σχέση με τα 902 που ήταν κατά την ανάλυση του ίδιου δείγματος στην ενότητα 3.4.4. Η μέση ένταση Ca ανά κύτταρο αυξήθηκε στα 109 counts από 89.4, που ήταν η μέση ένταση Ca ανά κύτταρο στην αντίστοιχη ανάλυση του δείγματος στην ενότητα 3.4.4. Μία τέτοια διαφορά σε ένταση σήματος ανά κύτταρο δεν μπορεί να συμβεί για κύτταρα που περιέχουν την ίδια μάζα Ca, υποθέτοντας ότι η αιτία της διαφοράς στην ένταση είναι η διαφορετική ευαισθησία του οργάνου μεταξύ των 2 αναλυτικών ημερών. Έτσι, η αύξηση σε ένταση σήματος είναι μία ποιοτική ένδειξη ότι πλέον εντοπίζεται περισσότερο Ca ανά κύτταρο.

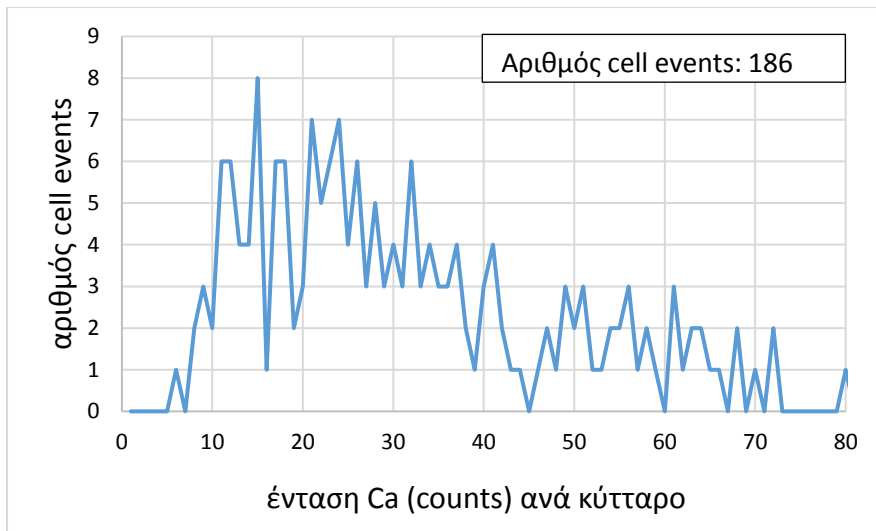
Όπως προκύπτει από τα Γραφήματα 54-57, ο αριθμός των cell events Ca παραμένει σταθερός αλλά το εύρος μαζών Ca στο οποίο διασπείρονται τα cell events μειώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης επώασης σε As (III).



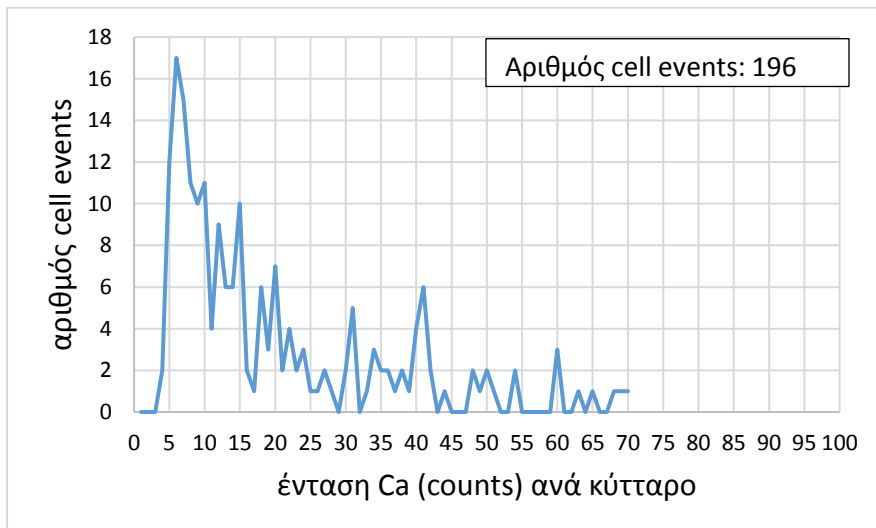
Γράφημα 54. Ιστόγραμμα έντασης Ca ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 100 μM As (III) με το Standard Introduction System SC ICP-MS.



Γράφημα 55. Ιστόγραμμα έντασης Ca ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 200 μM As (III) με το Standard Introduction System SC ICP-MS.

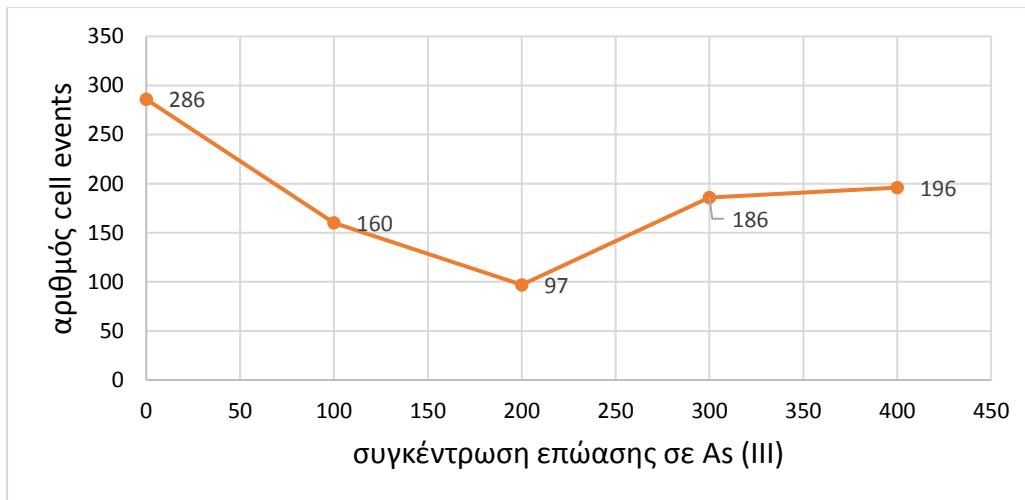


Γράφημα 56. Ιστόγραμμα έντασης Ca ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 300 μM As(III), με το Standard Introduction System SC ICP-MS.



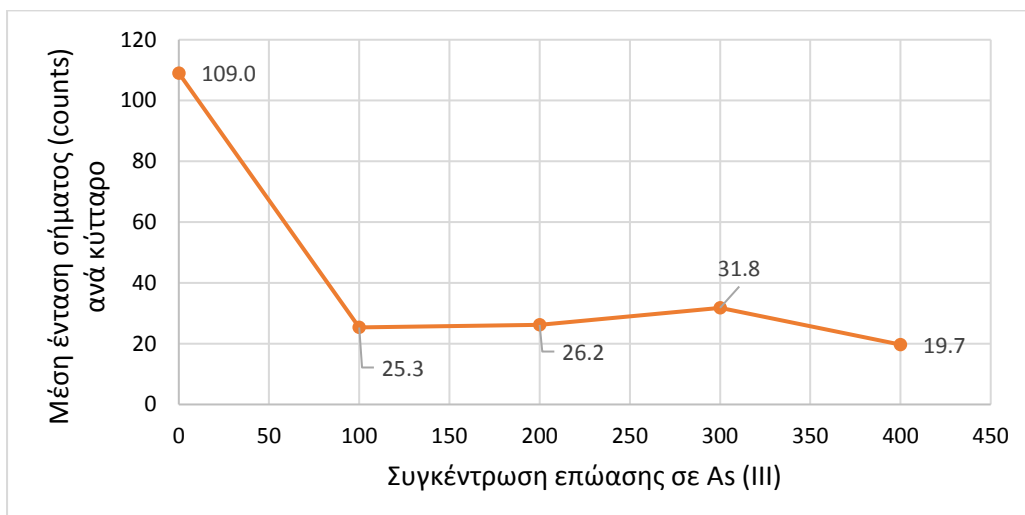
Γράφημα 57. Ιστόγραμμα έντασης Ca ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 400 μM As(III), με το Standard Introduction System SC ICP-MS.

Μελετώντας την τάση του αριθμού των cell events σε σχέση με την συγκέντρωση επώασης As (III) (Γράφημα 58), παρατηρείται μία πτώση στον αριθμό των cell events για κύτταρα που επώαστηκαν σε As (III) σε σχέση με τα control cells 28/3. Μεταξύ των κυτταρικών δειγμάτων των συγκεντρώσεων του As (III) δεν παρατηρείται κάποια τάση, καθώς ο αριθμός των cell events παραμένει σχετικά σταθερός.



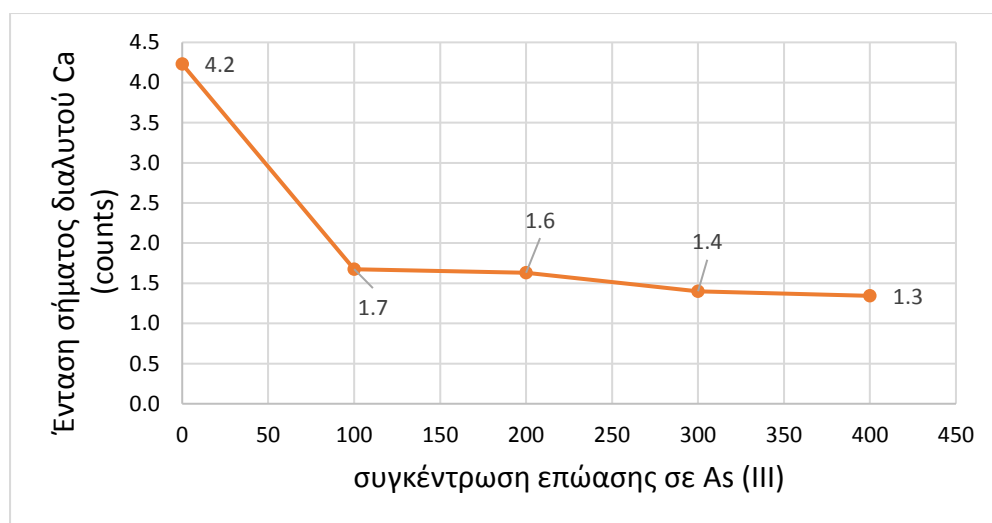
Γράφημα 58. Συγκεντρωτικό διάγραμμα που δείχνει πως μεταβάλλεται ο αριθμός των cell events Ca για τις 4 συγκεντρώσεις επώασης των κυττάρων σε As (III). Οι ετικέτες βοηθούν στην ανάγνωση του άξονα y.

Η μέση ένταση Ca ανά κύτταρο (Γράφημα 59) δείχνει να μεταβάλλεται με τον ίδιο τρόπο όπως και ο αριθμός των cell events. Αν και δεν πραγματοποιήθηκε βαθμονόμηση για τον προσδιορισμό της επακριβούς μάζας Ca που αντιστοιχεί σε κάθε κύτταρο, η ένταση του σήματος είναι χαρακτηριστική για τον αριθμό των ιόντων του Ca που υπάρχουν στο κύτταρο. Έτσι, η μεγαλύτερη μάζα Ca παρατηρείται για τα control cells, ενώ αυτή πέφτει σημαντικά για τα κύτταρα που επώαστηκαν σε As (III). Μεταξύ των κυττάρων του As (III) η μέση μάζα Ca φαίνεται να διατηρείται σταθερή, ενώ οι μικρές διαφοροποιήσεις είναι απόρροια των μεταβολών στα εύρη των ιστογραμμάτων έντασης Ca ανά κύτταρο.



Γράφημα 59. Συγκεντρωτικό διάγραμμα που δείχνει πως μεταβάλλεται η μέση ένταση σήματος Ca ανά κύτταρο για τις 4 συγκεντρώσεις επώασης των κυττάρων σε As (III). Οι ετικέτες βοηθούν στην ανάγνωση του άξονα y.

Στο Γράφημα 60, η ένταση είναι ενδεικτική της συγκέντρωσης του διαλυτού Ca στα κυτταρικά δείγματα. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση Ca καταγράφεται για τα control cells 28/3, ενώ για τα κύτταρα επωασμένα σε As (III) η συγκέντρωση Ca διατηρείται σταθερή αλλά χαμηλότερη από των control. Αν το μεγαλύτερο ποσοστό του Ca που εντοπίζεται στα κύτταρα προέρχεται από το προσροφημένο Ca στο κυτταρικό τοίχωμα των κυττάρων, τότε μεταβολές στην συγκέντρωση του εξωκυττάρου διαλυτού Ca επηρεάζουν και τον αριθμό των cell events. Υψηλότερες συγκεντρώσεις Ca στο διάλυμα που διασπείρονται τα κύτταρα αυξάνει τις πιθανότητες περισσότερα κύτταρα να δεσμεύσουν Ca στα τοιχώματά τους. Η υπόθεση ότι το μεγαλύτερο ποσοστό Ca είναι προσροφημένο στο κυτταρικό τοίχωμα βασίζεται στα αποτελέσματα των επωασμένων σε EDTA κυττάρων (ενότητα 3.4.5). Το πλύσιμο με EDTA σχεδόν εκμηδένισε τον αριθμό των cell events που είχαν μετρηθεί για τα μη επωασμένα σε EDTA control cells 28/3 ενώ παράλληλα μείωσε τη συγκέντρωση του εξωκυττάρου διαλυτού Ca σε επίπεδο που ήταν μη ανιχνεύσιμη. Και σε αυτήν την περίπτωση, η τάση της έντασης του εξωκυττάρου διαλυτού Ca συμβαδίζει με την τάση του αριθμού των cell events και της μέσης μάζας Ca ανά κύτταρο, επιβεβαιώνοντας περαιτέρω το παραπάνω συμπέρασμα.



Γράφημα 60. Συγκεντρωτικό διάγραμμα που δείχνει πως μεταβάλλεται η μέση ένταση σήματος διαλυτού Ca για τις 4 συγκεντρώσεις επώασης των κυττάρων σε As (III). Οι ετικέτες βοηθούν στην ανάγνωση του άξονα y.

3.5.3 Αποτελέσματα από τους υπολογισμούς ισοζυγίου μάζας για τον προσδιορισμό As στα κύτταρα επωασμένα σε As (III)

Παρουσιάζονται παρακάτω τα αποτελέσματα των υπολογισμών ισοζυγίου μάζας ως προς τον προσδιορισμό As (III) για τα κύτταρα επωασμένα σε As (III) και τα control cells 28/3. Υπολογισμοί για Ca δεν έγιναν, εφόσον δεν πραγματοποιήθηκε σχετική βαθμονόμηση.

Πίνακας 26. Υπολογισμοί ισοζυγίου μάζας του As για τα *Chlamydomonas reinhardtii* επωασμένα σε 100, 200, 300 και 400 μM καθώς και τα control cells 28/3.

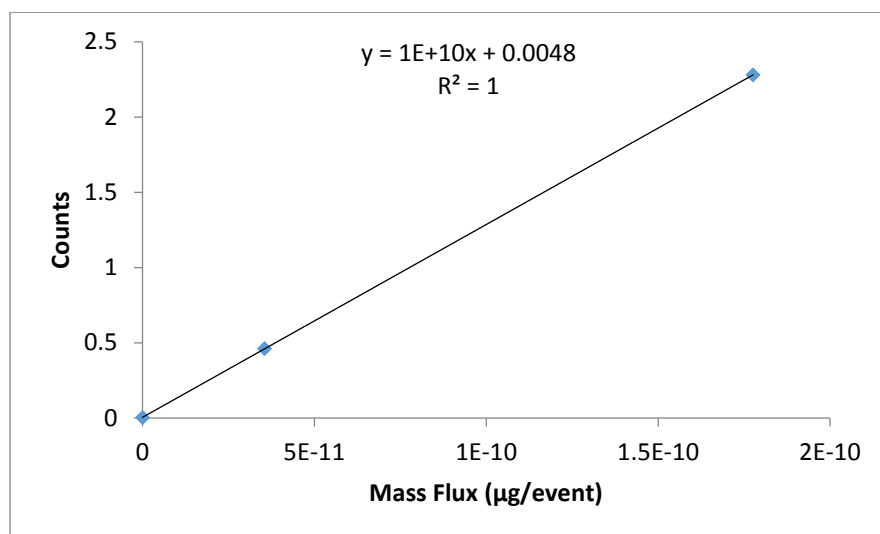
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> επωασμένα σε As (III) (μM)	SC-ICP-MS			Conventional ICP-MS Ολικό As (fg)	Recovery %
	Ενδοκυττάριο As (fg)	Εξωκυττάριο As (fg)	Ολικό As (fg)		
Control	1.76E+01	2.43E+04	2.43E+04	3.89E+04	62.5
100	4.49E+00	1.27E+05	1.27E+05	1.33E+05	95.9
200	8.27E+00	1.67E+05	1.67E+05	1.68E+05	99.0
300	3.88E+00	1.43E+05	1.43E+05	1.53E+05	93.2
400	1.37E+01	1.58E+05	1.58E+05	1.69E+05	93.3

Όπως φαίνεται, η μάζα του εξωκυττάριου As είναι αυτή που συνεισφέρει κατά κύριο λόγο στο ισοζύγιο μάζας, αφού η μάζα που προσδιορίζεται στα κύτταρα είναι αμελητέα. Ποσοστιαίες αποκλίσεις όπως στην περίπτωση των control cells είναι ίσως δικαιολογημένες όταν ανιχνεύονται χαμηλές μάζες κοντά στα όρια ανίχνευσης του οργάνου. Αν επιστρέψουμε από τις εκφράσεις μάζας στις συγκεντρώσεις, η συγκέντρωση του εξωκυττάριου διαλυτού As για τα control cells από SC ICP-MS είναι 0.024 ng/mL, ενώ η αντίστοιχη συνολική συγκέντρωση As από το Conventional ICP-MS είναι 0.038 ng/mL. Και οι 2 συγκεντρώσεις είναι στα χαμηλά μέρη ανά τρισεκατομμύριο (ppt) όπου μεταβολές στο σήμα λόγω του θορύβου του οργάνου έχουν μεγαλύτερη επίδραση στον ποσοτικό προσδιορισμό και επιπλέον έμμαστε κοντά στα όρια ανίχνευσης του οργάνου. Αυτό σημαίνει ότι η παρατηρούμενη ένταση σήματος As, από την οποία μέσω της βαθμονόμησης προκύπτει η συγκέντρωση του εξωκυττάριου διαλυτού As, συμπεριλαμβάνει κατά κύριο λόγο του σήμα του υποβάθρου του As (m/z 75). Επιπλέον, παρατηρείται η ολική μάζα As στα control cells να είναι υψηλότερη από τα κύτταρα που επώαστηκαν σε As. Αυτό είναι απόρροια του φαινομένου (false positive) λόγω της μη κανονικής καντανομής του υποβάθρου σήματος. Λόγω του υψηλού αριθμού των false positives συγκριτικά με τα πραγματικά cell events των κυττάρων επωασμένων σε As τα οποία ήταν και χαμηλής έντασης, η μέση μάζα As ανά κύτταρο στα control cells δεν διαφέρει σημαντικά από τις αντίστοιχες μέσες μάζες As των κυττάρων που επώαστηκαν σε As.

3.6 Ανάλυση κυττάρων επωασμένα σε As (V) με το Standard Introduction System

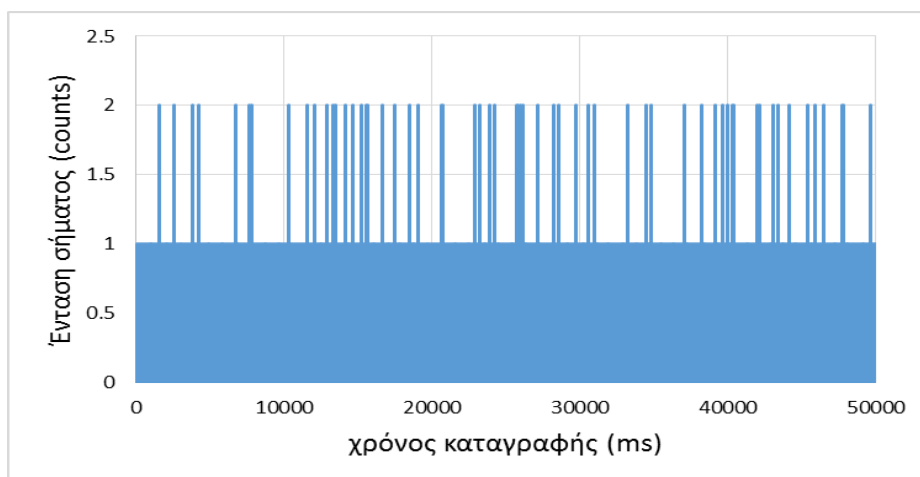
3.6.1 Προσδιορισμός As (V) σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard Introduction System

Συνδυάζοντας την καμπύλη βαθμονόμησης για το διαλυτό As και της TE% που προσδιορίστηκε, προέκυψε η ευθεία συσχέτισης της έντασης ^{75}As με την απόλυτη μάζα του As, που αντιστοιχεί στη μάζα As (V) και που εισέρχεται και ανιχνεύεται ανά 50 μs {mass flux As ($\mu\text{g}/50 \mu\text{s}$)} (Γράφημα 61).



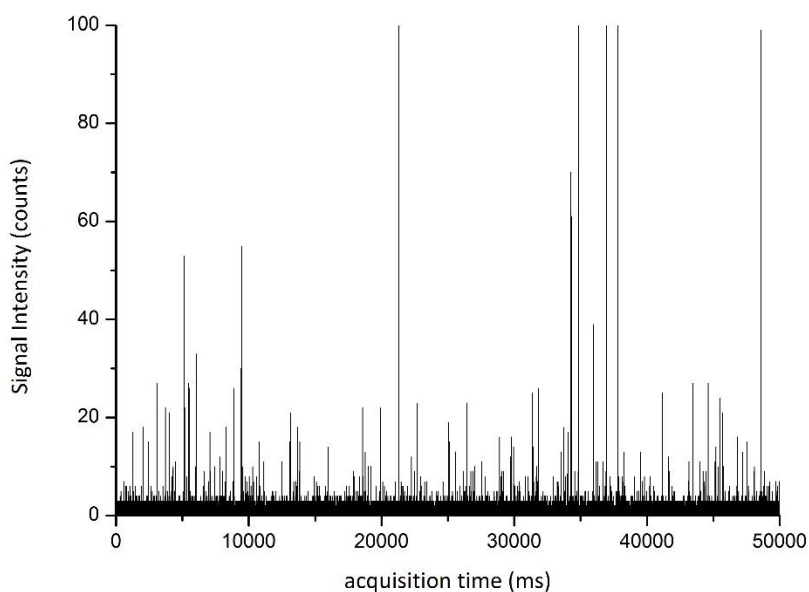
Γράφημα 61. Καμπύλη συσχέτισης της έντασης του σήματος (counts) με το Mass Flux ($\mu\text{g}/50 \mu\text{s}$) του As με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard Introduction System

Περνώντας στην ανάλυση των κυτταρικών δειγμάτων για προσδιορισμό της κατανομής As (V) σε αυτά, τα control cells 3/7 {*Chlamydomonas reinhardtii* χωρίς την προσθήκη As (V)} δεν εμφάνισαν κάποια ένδειξη παρουσίας κυτταρικού ή διαλυτού εξωκυττάρου As (V). Οι εξαιρετικά χαμηλές τιμές της έντασης του σήματος (Γράφημα 62) οφείλονται στο σήμα του υποβάθρου για το m/z 75 και όχι στον κυτταρικό ή διαλυτό εξωκυττάρου As (V). Εντάσεις των 1, 2 και 3 counts δεν αντιστοιχούν σε cell events καθώς έχουν διάρκεια 1 data point ($\leq 50 \mu\text{s}$). Έτσι αν και το λογισμικό (Nano Syngistix, PE) μετρά 6035 κορυφές, αυτές δεν είναι τίποτε άλλο παρά false positives λόγω της μη κανονικής κατανομής του υποβάθρου σήματος.

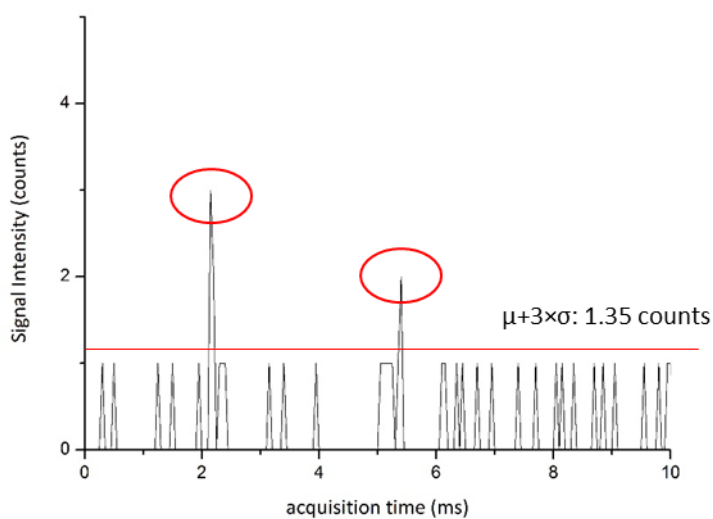


Γράφημα 62. Καταγραφή έντασης ^{75}As για control cells 3/7 σε υπερκάθαρο H_2O με το Standard Introduction System SC ICP-MS για πάροδο 50 s.

Αναφορικά με την ανάλυση των κυτταρικών δειγμάτων της σειράς του As (V), η συγκέντρωση του εξωκυττάριου διαλυτού As (V) προσδιορίζεται στα ίδια περίπου ppb επίπεδα για τα κύτταρα επωασμένα σε 200, 300 μM As(V) (0.14, 0.16 ppb), ενώ αυτή είναι λίγο υψηλότερη για τα κύτταρα επωασμένα σε 400 μM As (V) (0.41 ppb). Η baseline πάνω από την οποία βρίσκονται τα data points που ορίζουν cell events προσδιορίζεται στα 0.88 counts για τα κύτταρα επωασμένα σε 200, 300 μM As (V) και 1.35 counts γι' αυτά επωασμένα σε 400 μM As (V). Άρα για τις 2 χαμηλότερες συγκεντρώσεις επώασης του As (V) θα συνυπολογιστούν περισσότερα false positives στον τελικό αριθμό των cell events. Μελετώντας την καταγραφή της έντασης ^{75}As για τα κύτταρα επωασμένα σε 400 μM (Γράφημα 63), στην οποία καταγραφή η πιθανότητα εμφάνισης πραγματικών cell events είναι μεγαλύτερη λόγω της υψηλότερης συγκέντρωσης επώασης, παρατηρούμε ότι υπάρχουν εντάσεις διάρκειας 1 data point ($\leq 50 \mu\text{s}$). (Γράφημα 64). Η τυπική διάρκεια των cell events As (V) είναι 200 μs , όπως και η διάρκεια των cell events As (III), αφού κατά τον ιοντισμό των ενώσεων As (III) και As (V) προκύπτουν ιόντα ίδιου αναλύτη που είναι το $^{75}\text{As}^+$. Ίδιος αναλύτης και στις 2 περιπτώσεις σημαίνει ίδιες ταχύτητες διάχυσης των ιόντων στο πλάσμα άρα και ίδια χρονική διάρκεια μεταξύ cell events που προέρχονται από τον ιοντισμό As (III) και As (V).



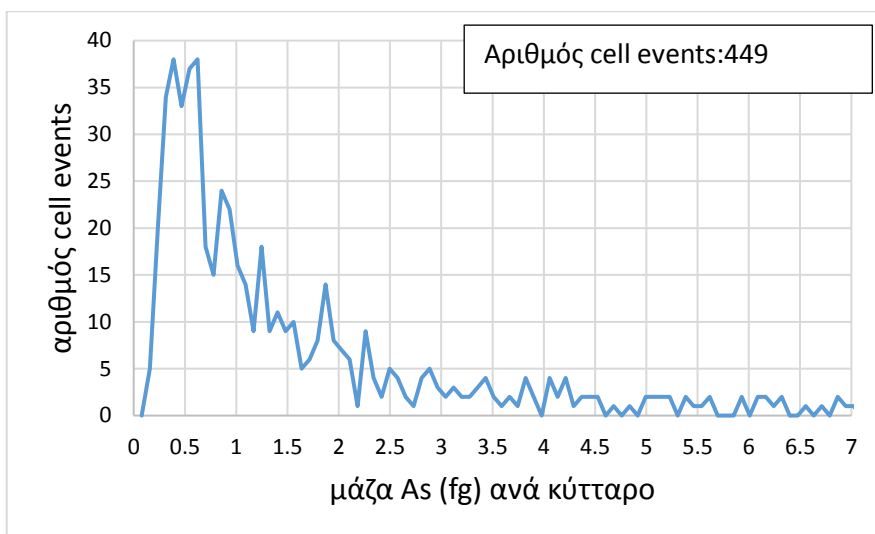
Γράφημα 63. Καταγραφή έντασης ^{75}As για το δείγμα των $400 \mu\text{M As (V)}$ σε υπερκάθαρο H_2O με το *Standard Introduction System SC ICP-MS* για πάροδο 50 s.



Γράφημα 64. Καταγραφή έντασης ^{75}As για το δείγμα των $400 \mu\text{M As (V)}$ σε υπερκάθαρο H_2O με το *Standard Introduction System SC ICP-MS* για πάροδο 10 ms.

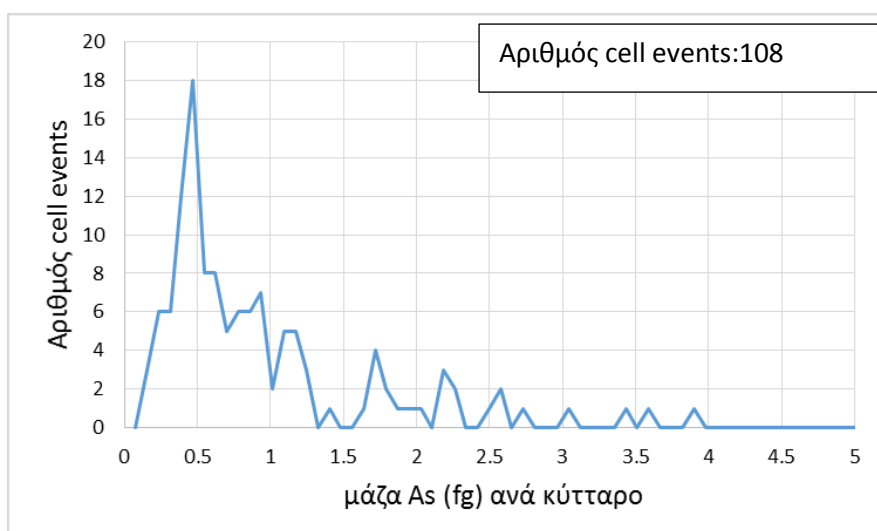
Από την εφαρμογή της σχετικής βαθμονόμησης (Γράφημα 61) προκύπτουν τα ιστογράμματα μάζας As (V) ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 200, 300 και $400 \mu\text{M As (V)}$ (Γραφήματα 65, 66, 67). Μελετώντας, αρχικά, το ιστογράμματα μάζας As (V) ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε $400 \mu\text{M As (V)}$ (Γράφημα 65), παρατηρούμε ότι η πλειοψηφία των κυττάρων έχει λάβει ποσότητες

0.1-2.5 fg As (V). Cell events ανιχνεύονται και σε υψηλότερα fg, και ίσως αντιπροσωπεύουν συσσωματώματα κυττάρων.

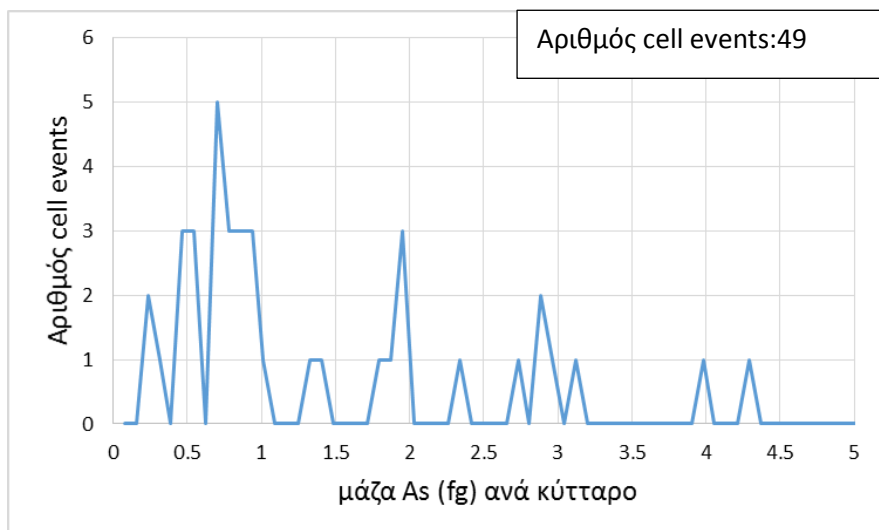


Γράφημα 65. Ιστόγραμμα μάζας As (V) ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 400 μM As (V) με το Standard Introduction system SC ICP-MS.

Όσο αφορά τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις επώασης σε As (V), κάποια εμφανής κατανομή αρχίζει να δημιουργείται για τα κύτταρα επωασμένα σε 300 μM (Γράφημα 66). Το σχήμα της προσομοιάζει αυτό της κατανομής των κυττάρων επωασμένων σε 400 μM As (V), με μικρότερο εύρος μάζας 0.1-0.8 fg και αριθμό cell events (108). Αναφορικά με τα κύτταρα επωασμένα σε 200 μM As (Γράφημα 67), ο αριθμός των cell events είναι αρκετά μικρότερος (49) και ανεπαρκής για τη δημιουργία κάποιου σχήματος κατανομής.



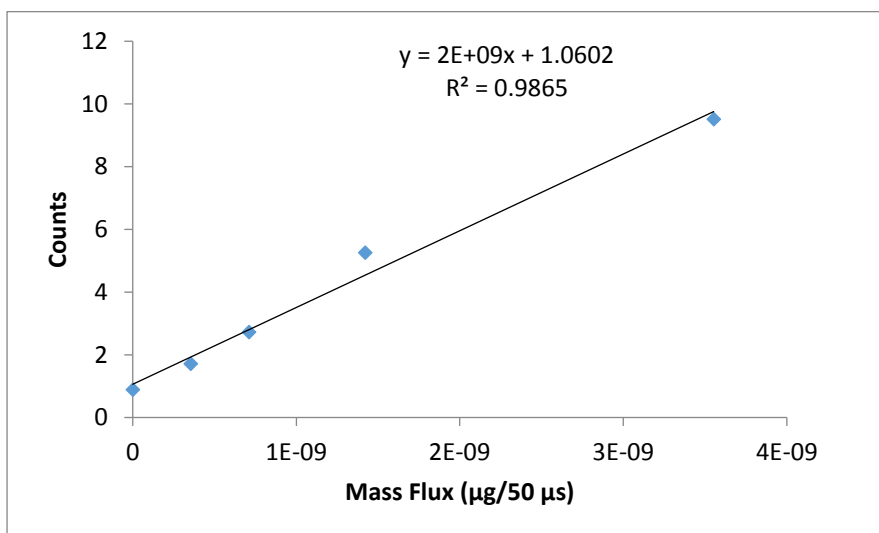
Γράφημα 66. Ιστόγραμμα μάζας As (V) ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 300 μM As (V) με το Standard Introduction system SC ICP-MS.



Γράφημα 67. Ιστόγραμμα μάζας As (V) ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 200 μM As (V) με το Standard Introduction system SC ICP-MS.

3.6.2 Προσδιορισμός Ca σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard Introduction System

Συνδυάζοντας την καμπύλη βαθμονόμησης για το διαλυτό Ca και της TE% που προσδιορίστηκε, προέκυψε η ευθεία συσχέτισης της έντασης ^{44}Ca με την απόλυτη μάζα του Ca που εισέρχεται και ανιχνεύεται ανά 50 μs {mass flux Ca ($\mu\text{g}/50 \mu\text{s}$)} (Γράφημα 68).

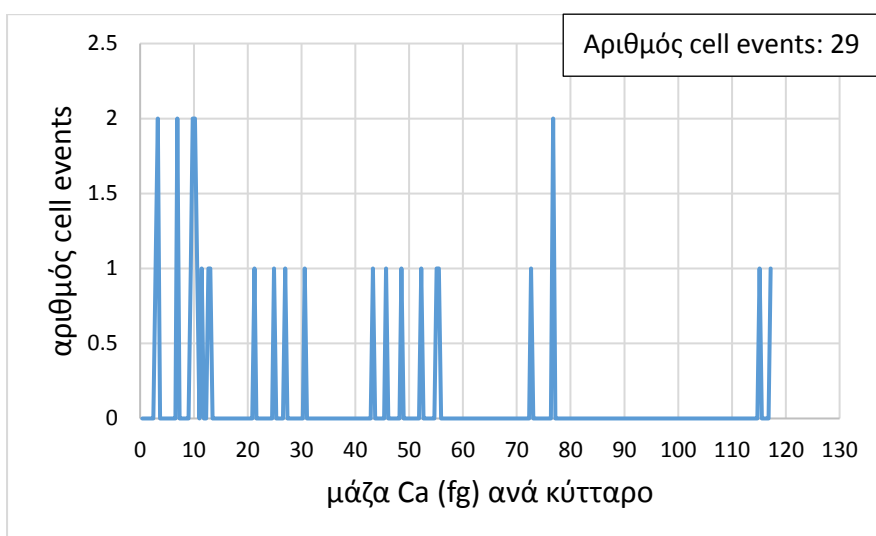


Γράφημα 68. Καμπύλη συσχέτισης της έντασης του σήματος (counts) με το Mass Flux ($\mu\text{g}/50 \mu\text{s}$) του ^{44}Ca με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard Introduction System.

Η γραμμικότητα που επιτεύχθηκε δεν ήταν η καλύτερη δυνατή λόγω απορρύθμισης του ανιχνευτή του οργάνου ως προς το cross-calibration. Ο ανιχνευτής του ICP-MS έχει 2 ηλεκτρικά κυκλώματα μέτρησης των σημάτων από τα ιόντα που προσκρούουν, το pulse και analog mode. Ανάλογα με το

πλήθος των ιόντων που φτάνουν στον ανιχνευτή, αυτός μπορεί να εναλλάσσεται από pulse σε analog mode αν η ένταση του σήματος των ιόντων ξεπερνά το όριο των 10^6 counts/s. Η εναλλαγή μεταξύ των 2 mode εκτείνει τη γραμμική απόκριση του ανιχνευτή από τις χαμηλές συγκεντρώσεις των ng/L μέχρι και 10 mg/L. Για να μπορεί όμως ο ανιχνευτής να αποκρίνεται γραμμικά από τις χαμηλές στις υψηλές συγκεντρώσεις, απαραίτητη διαδικασία είναι το cross-calibration. Με το cross-calibration θέτονται κάποιες παράμετροι μετατροπής που αφορούν τα κυκλώματα του pulse και του analog mode και προσδιορίζονται οι τιμές τους για κάθε στοιχείο. Μετά από κάποια περίοδο λειτουργίας, το cross-calibration πρέπει να επαναληφθεί και να επαναπροσδιοριστούν οι παράμετροι μετατροπής των εντάσεων. Η απόκλιση από την συνήθη ιδανική γραμμική συμπεριφορά για το Ca σε υψηλές συγκεντρώσεις μάλλον προτείνει ότι έπρεπε να επαναληφθεί το cross-calibration. Παρόλα αυτά η ποσοτικοποίηση με βάση αυτήν την καμπύλη δεν είναι απαγορευτική.

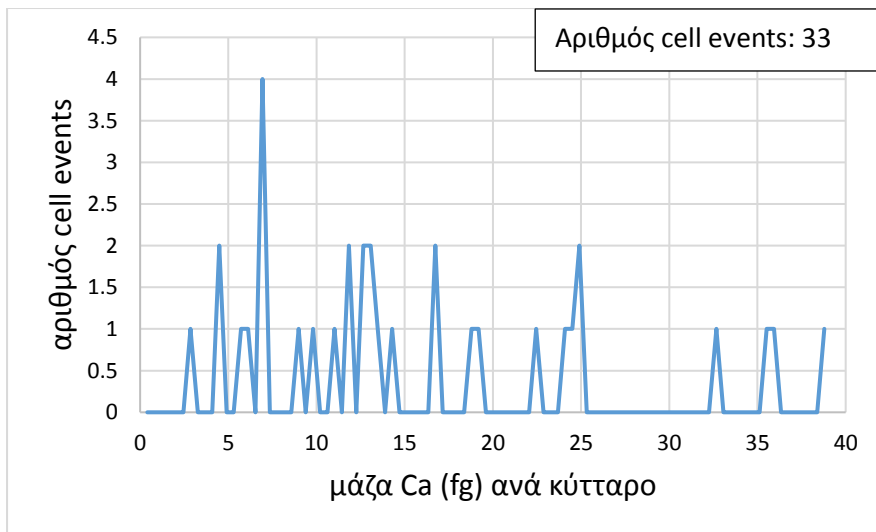
Για τον προσδιορισμό Ca στην κυτταρική σειρά των συγκεντρώσεων επώασης σε As (V) χρησιμοποιήθηκαν τα control cells 3/7. Από το ιστόγραμμα μάζας Ca ανά κύτταρο για τα control cells 3/7 (Γράφημα 69) παρατηρείται ότι ο αριθμός των cell events ήταν 29. Αυτός είναι κατά 2 τάξεις μεγέθους χαμηλότερος από αυτόν που είχε υπολογιστεί (286) για τα control cells 28/3. Συνεπώς τα cell events είναι αριθμητικά ανεπαρκή για το σχηματισμό κάποιας μορφής κατανομής. Η συγκέντρωση του εξωκυττάριου διαλυτού Ca ήταν χαμηλότερη στα 14.88 ng/mL συγκριτικά με τα 47 ng/mL που προσδιορίστηκε στα control cells 28/3. Η διαφοροποίηση στον αριθμό των cell events είναι μάλλον απόρροια της μειωμένης συγκέντρωσης του εξωκυττάριου διαλυτού Ca, επιβεβαιώνοντας περαιτέρω το συμπέρασμα ότι η συγκέντρωση του εξωκυττάριου διαλυτού Ca επηρεάζει τον αριθμό των cell events και κατ' επέκταση τη μάζα Ca που εντοπίζεται στα κύτταρα.



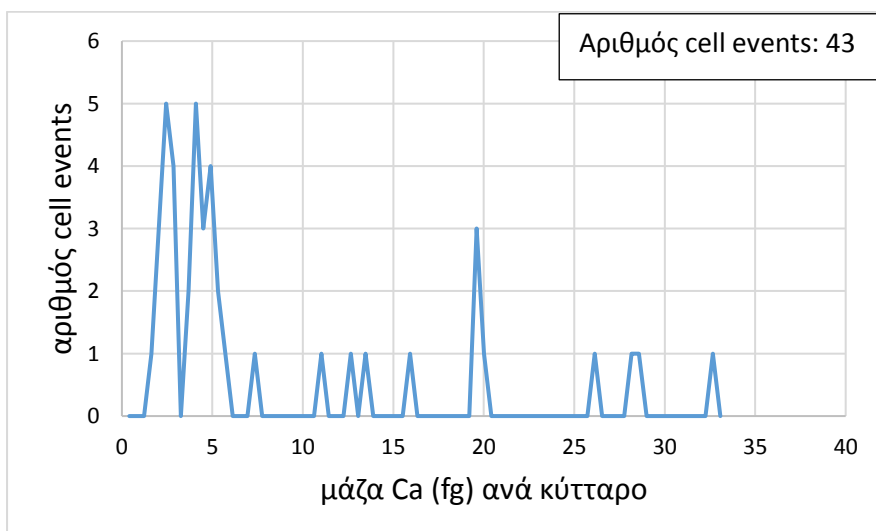
Γράφημα 69. Ιστόγραμμα μάζας Ca ανά κύτταρο για τα control cells 3/7. με Standard introduction system SC ICP-MS.

Αναφορικά με τα κύτταρα επωασμένα σε 200 και 300 μM As (V) (Γραφήματα 70, 71), ο αριθμός των cell events είναι χαμηλός και κατά συνέπεια δεν δημιουργείται κάποια μορφή κατανομής.

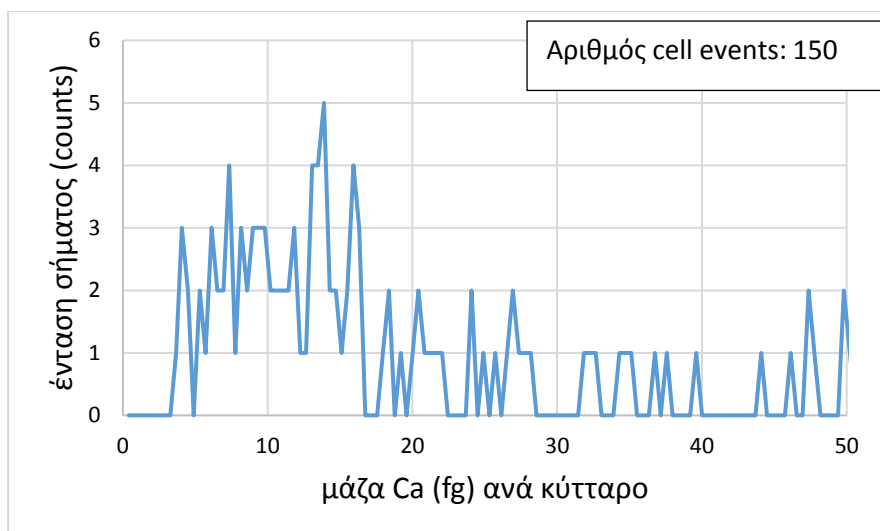
Αν ανατρέξουμε στο ιστόγραμμα μάζας Ca ανά κύτταρο για τα control cells 28/3 (Γράφημα 35) και συγκρίνουμε το δεδομένο ιστόγραμμα με το αντίστοιχο ιστόγραμμα των κυττάρων επωασμένων σε 400 μM As (V) (Γράφημα 72), συμπεραίνουμε ότι και οι δύο κατανομές εκτείνονται στο ίδιο εύρος μάζας (3-15 fg). Ο αριθμός των cell events είναι περίπου 9/1 για τα control cells 3/7 ως προς αυτά επωασμένα σε 400 μM As (V).



Γράφημα 70. Ιστόγραμμα μάζας Ca ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 200 μM As (V) με το Standard introduction system SC ICP-MS.



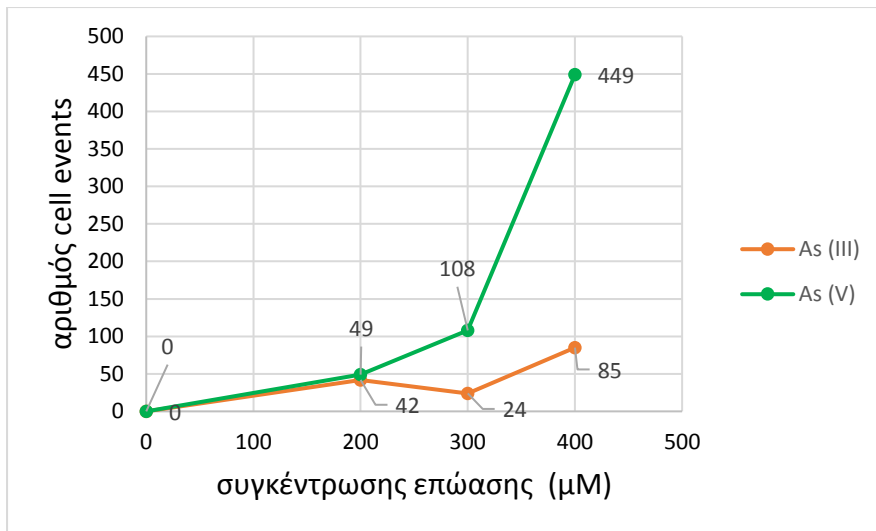
Γράφημα 71. Ιστόγραμμα μάζας Ca ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 300 μM As (V) με το Standard introduction system SC ICP-MS.



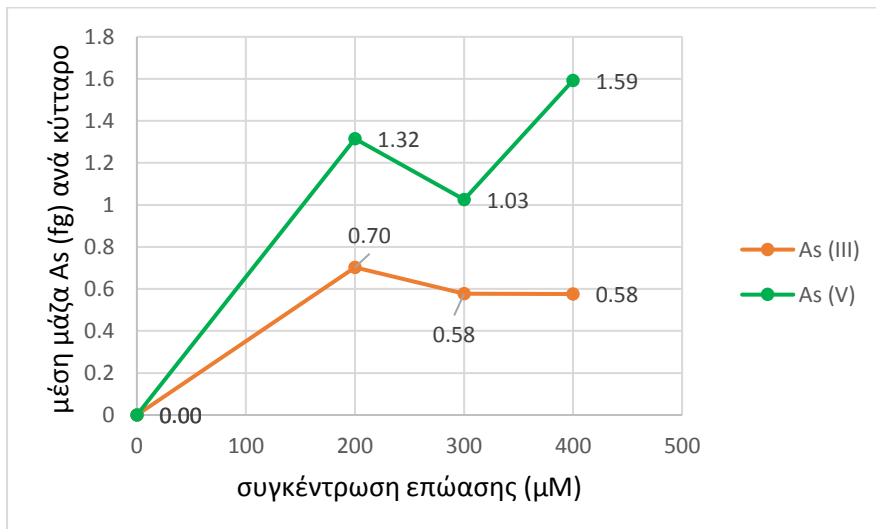
Γράφημα 72. Ιστόγραμμα μάζας Ca ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 400 μM As (V) με το Standard introduction system SC ICP-MS.

3.6.3 Σύγκριση αποτελεσμάτων As (III) και As (V) με το Standard Introduction System SC ICP-MS

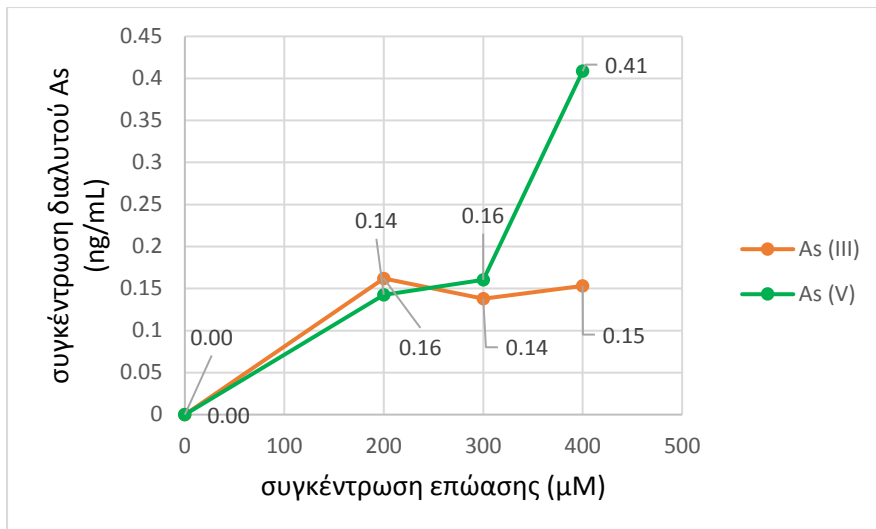
Ο υψηλότερος αριθμός των cell events της σειράς του As (V) σε σχέση με αυτήν του As (III) (Γράφημα 73) για κάθε συγκέντρωση επώασης είναι ενδεικτικός της μεγαλύτερης τάσης των κυττάρων να προσλαμβάνουν As (V) έναντι του As (III). Επιπλέον, η μέση μάζα As (Γράφημα 74) που εντοπίζεται στα κύτταρα αυξάνεται συνεχώς με την αύξηση της συγκέντρωσης επώασης σε As (V), ενώ η μέση πρόσληψη των κυττάρων σε As (III) δείχνει μία σταθερή τάση. Συγκρίνοντας τα δύο κυτταρικά δείγματα της συγκέντρωσης επώασης των 400 μM , η μέση μάζα As στα κύτταρα επωασμένα σε As (V) είναι κατά 2.7 φορές υψηλότερη σε σχέση με τη μέση μάζα As ανά κύτταρο που επιδεικνύουν τα κύτταρα επωασμένα σε 400 μM As (III). Παρόλλα αυτά, η πρόσληψη As (V) των κυττάρων παραμένει στα εξαιρετικά χαμηλά 1-2 fg. Η μεγαλύτερη προτίμηση των κυττάρων προς το As (V) ήταν αναμενόμενη με βάση το μηχανισμό τοξικότητας των αρσενικικών ιόντων στα κύτταρα όπως περιεγράφηκε στην ενότητα 3.2. Η περίπτωση το As (V) που εντοπίζεται στα κύτταρα να βρίσκεται και στο κυτταρικό τοίχωμα του κυττάρου δεν μπορεί να αποκλειστεί, αν και δεδομένου ότι και 2 μορφές As φέρουν αρνητικό φορτίο η πρόσδεσή τους στο τοίχωμα του κυττάρου φαντάζει απίθανη.



Γράφημα 73. Συγκεντρωτικό γράφημα σύγκρισης κυττάρων επωασμένων σε As (III) και As (V) δείχνοντας πως μεταβάλλεται ο αριθμός των cell events συναρτήσει της συγκέντρωσης επώασης. Οι ετικέτες δεδομένων διευκολύνουν στην ανάγνωση του άξονα γ.

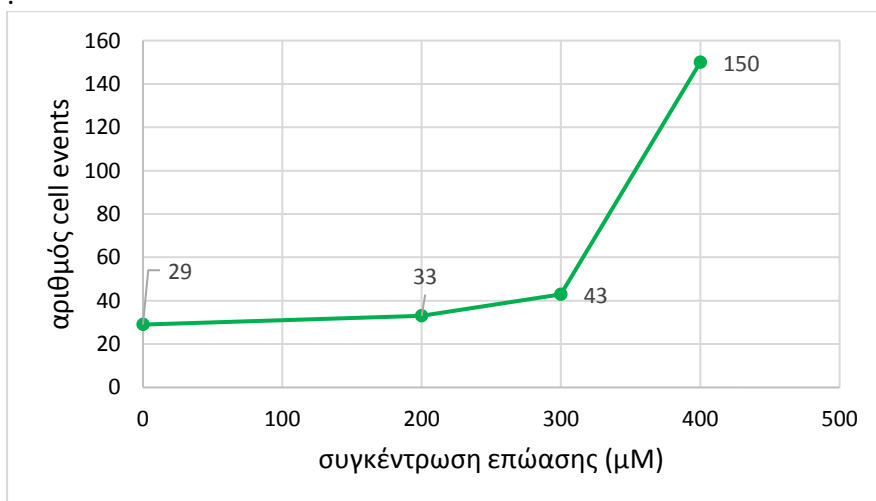


Γράφημα 74. Συγκεντρωτικό γράφημα σύγκρισης κυττάρων επωασμένων σε As (III) και As (V) δείχνοντας πως μεταβάλλεται η μέση μάζα As ανά κύτταρο συναρτήσει της συγκέντρωσης επώασης. Οι ετικέτες δεδομένων διευκολύνουν στην ανάγνωση του άξονα γ.

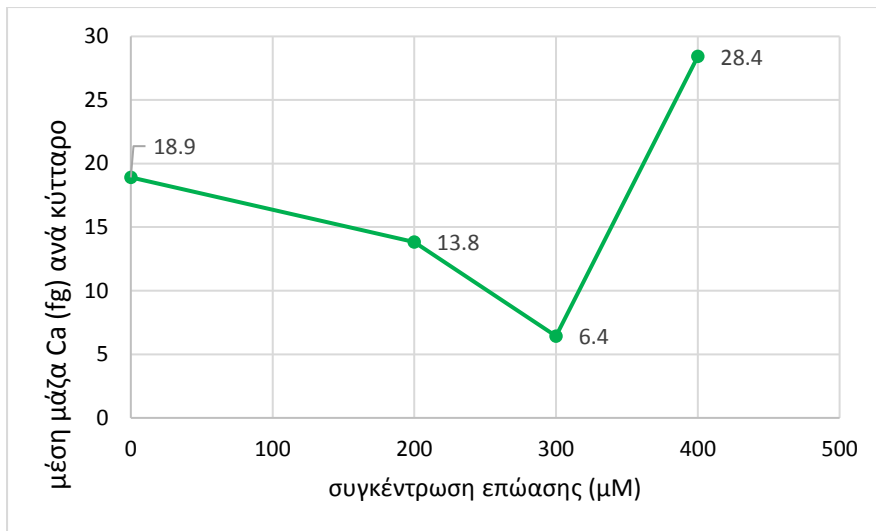


Γράφημα 75. Συγκεντρωτικό γράφημα σύγκρισης κυττάρων επωασμένων σε As (III) και As (V) δείχνοντας πως μεταβάλλεται η συγκέντρωση του διαλυτού As συναρτήσει της συγκέντρωσης επώασης. Οι ετικέτες δεδομένων διευκολύνουν στην ανάγνωση του άξονα γ. Τοποθετούνται κάτω από τα σημεία για τη σειρά του As (III) και πάνω από αυτά για τη σειρά του As (V).

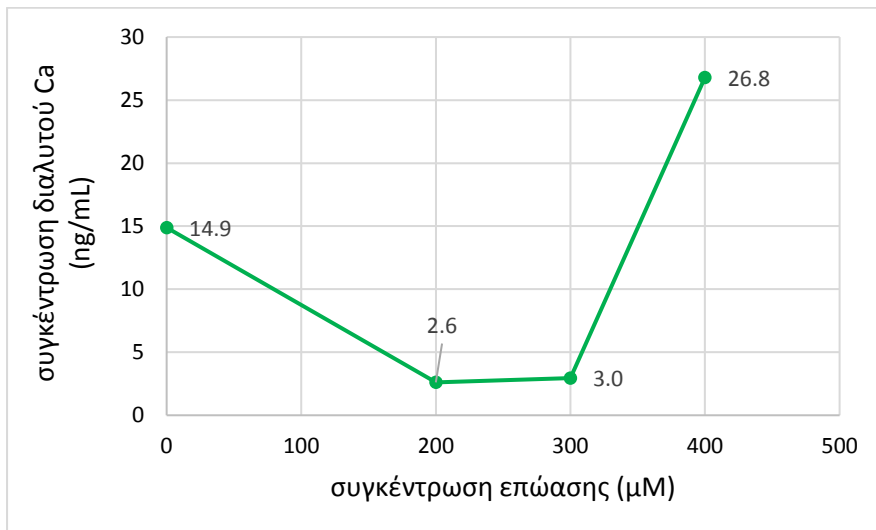
Όσο αφορά τον προσδιορισμό Ca στα κύτταρα επωασμένα σε As (V) (σύγκριση μεταξύ των 2 μορφών As δεν μπορεί να γίνει, λόγω έλλειψης ποσοτικών αποτελεσμάτων για το Ca στα κύτταρα επωασμένα σε As (III)), ο αριθμός των cell events (Γράφημα 76) και η μέση μάζα Ca ανά κύτταρο (Γράφημα 77) φαίνεται να επηρεάζεται αναλογικά από τις μεταβολές στη συγκέντρωση του εξωκυττάρου διαλυτού Ca στα κυτταρικά αιωρήματα (Γράφημα 78), ενισχύοντας περαιτέρω το συμπέρασμα ότι το Ca εντοπίζεται στο κυτταρικό τοίχωμα.



Γράφημα 76. Μεταβολή του αριθμού των cell events για Ca συναρτήσει της συγκέντρωσης επώασης για τα κύτταρα επωασμένα σε συγκεντρώσεις As (V). Οι ετικέτες δεδομένων διευκολύνουν στην ανάγνωση του άξονα γ.



Γράφημα 77. Μεταβολή της μέσης μάζας Ca ανά κύτταρο συναρτήσει της συγκέντρωσης επώασης για τα κύτταρα επωασμένα σε συγκεντρώσεις As (V). Οι ετικέτες δεδομένων διευκολύνουν στην ανάγνωση του άξονα y.



Γράφημα 78. Μεταβολή της συγκέντρωσης του εξωκυττάρου διαλυτού Ca συναρτήσει της συγκέντρωσης επώασης για τα κύτταρα επωασμένα σε συγκεντρώσεις As (V). Οι ετικέτες δεδομένων διευκολύνουν στην ανάγνωση του άξονα y.

3.6.4 Αποτελέσματα από τους υπολογισμούς ισοζυγίου μάζας για τον προσδιορισμό As και Ca σε κύτταρα επωασμένα σε As (V)

Παρουσιάζονται παρακάτω τα αποτελέσματα των υπολογισμών ισοζυγίου μάζας ως προς τον προσδιορισμό As (V) και Ca για τα κύτταρα επωασμένα σε As (V) και τα control cells 3/7.

Πίνακας 27. Υπολογισμοί ισοζυγίου μάζας As για τα *Chlamydomonas reinhardtii* επωασμένα σε 200, 300 και 400 μM As (V) και για τα control cells 3/7.

Chlamydomonas reinhardtii επωασμένα σε As (V) (μM)	SC-ICP-MS			Conventional ICP-MS Ολικό As (fg)	Recovery %
	Ενδοκυττάριο As (fg)	Εξωκυττάριο As (fg)	Ολικό As (fg)		
Control	1.19E+04	9.79E+02	1.29E+04	1.11E+04	116.1
200	1.61E+03	1.51E+05	1.52E+05	1.67E+05	91.0
300	2.77E+03	1.69E+05	1.72E+05	2.21E+05	77.8
400	1.79E+04	4.31E+05	4.49E+05	6.11E+05	73.5

Πίνακας 28. Υπολογισμοί ισοζυγίου μάζας Ca για τα *Chlamydomonas reinhardtii* επωασμένα σε 100, 200, 300, 400 μM As (V) και τα control cells.

Chlamydomonas reinhardtii επωασμένα σε As (III) (μM)	SC-ICP-MS			Conventional ICP-MS Ολικό Ca (fg)	Recovery %
	Ενδοκυττάριο Ca (fg)	Εξωκυττάριο Ca (fg)	Ολικό Ca (fg)		
Control	1.37E+04	1.57E+07	1.57E+07	2.49E+07	63.0
200	1.14E+04	2.75E+06	2.76E+06	8.14E+06	34.0
300	6.91E+03	3.12E+06	3.13E+06	6.52E+06	48.0
400	1.07E+05	2.83E+07	2.84E+07	2.66E+07	106.9

Τη μεγαλύτερη συνεισφορά στην ολική μάζα των στοιχείων που προσδιορίστηκε με το SC ICP-MS έχει η μάζα του εξωκυττάριου διαλυτού. Η υψηλότερη μάζα ολικού As στα control cells 3/7 σε σχέση με τα κύτταρα που επώαστηκαν σε As (V) (Πίνακας 27) είναι απόρροια του πολύ υψηλού αριθμού των false positive λόγω της μη κανονικής κατανομής του υποβάθρου για το As (m/z: 75). Επομένως, ο αριθμός είναι πλασματικός. Η μεγαλύτερη απόκλιση στο ισοζύγιο μάζας Ca για τα κύτταρα επωασμένα σε 200 και 300 μM As (V) (Πίνακας 28) ίσως είναι δικαιολογημένη εφόσον η συγκέντρωση του εξωκυττάριου διαλυτού Ca (2.6, 2.9 ppb αντίστοιχα) βρίσκεται κοντά στα όρια ανίχνευσης του οργάνου.

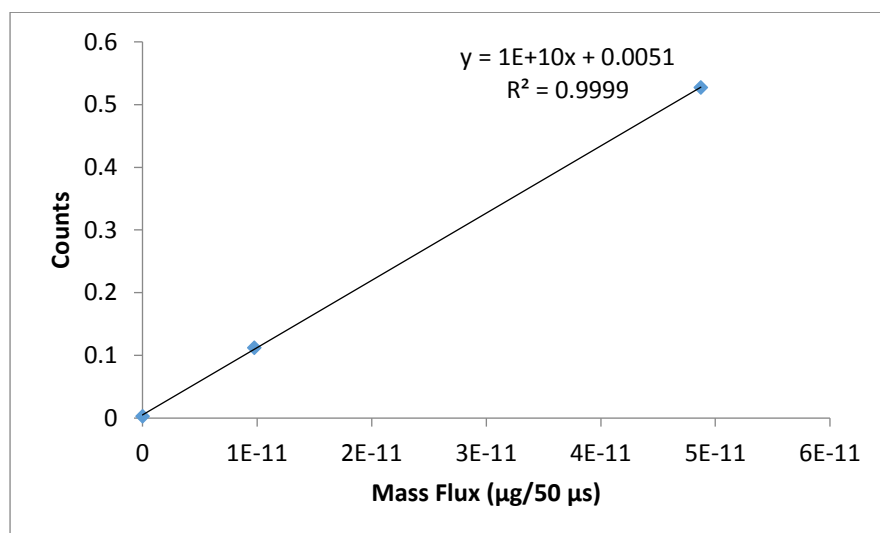
3.7 Ανάλυση κυττάρων επωασμένα σε As (III) με το HEN Introduction System

3.7.1 Προσδιορισμός As (III) σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το HEN introduction system

Η σειρά των κυτταρικών δειγμάτων του As (III), που αναλύθηκαν για το περιεχόμενό τους σε As και Ca με το Standard Introduction System (ενότητα 3.6), αναλύθηκε και με το σύστημα εκνέφωσης υψηλής απόδοσης (HEN). Για την κατασκευή της καμπύλης συσχέτισης της έντασης (counts) ^{75}As με την απόλυτη μάζα As που εισέρχεται και ανιχνεύεται ανά 50 μs (Γράφημα 79), απαραίτητη διαδικασία

ήταν η εισαγωγή συγκεντρώσεων διαλυτού As (πρότυπα διαλύματα) και ο προσδιορισμός της TE% με 60nm Au NPs . Η τιμή του TE% προσδιορίστηκε στο 11.58 %, υψηλότερη δηλαδή του 4 % που επιτεύχθηκε με το Standard Introduction System. Η υψηλότερη απόδοση οφείλεται στην κατασκευή του θαλάμου εκνέφωσης HENIC (High Efficiency Nebulization Introduction Chamber) η οποία επιτρέπει την είσοδο περισσότερων σταγόνων προς το πλάσμα. Αντίθετα, το Standard Introduction System αποκλείει την είσοδο των μεγάλων σταγόνων λόγω απομάκρυνσής τους μέσα στο θάλαμο εκνέφωσης. Βάση αυτού του σκεπτικού, περιμένουμε καλύτερη απόδοση ανίχνευσης κυττάρων με το HEN σε σχέση με το Standard introduction system.

Επιπλέον, η μέση ένταση ^{197}Au των Au NP events που ανιχνεύθηκαν ήταν 31.86 counts και 7.30 counts για το HEN και Standard Introduction system αντίστοιχα. Αυτό μάλλον υποδηλώνει πως το πλάσμα δουλεύει αποδοτικότερα με το HEN Introduction System σε ότι αφορά τις διεργασίες στις οποίες υπόκειται ο αναλύτης (μεγαλύτερη απόδοση ιοντισμού). Το sample uptake rate (ρυθμός πρόσληψης δείγματος) με το οποίο λειτουργεί το HEN είναι 0.100 mL/min σε σχέση με το 1 mL/min του Standard Introduction System, ενώ η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης διαλυτού As (εισαγωγή προτύπων διαλυμάτων As) είναι 0.1208 και 0.4551 για το HEN και Standard Introduction System. Λόγω της γραμμικής απόκρισης του ανιχνευτή, η αντίστοιχη ευαισθησία του HEN (κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης) στο 1 mL/min θα είναι 1.208 (>0.4551).

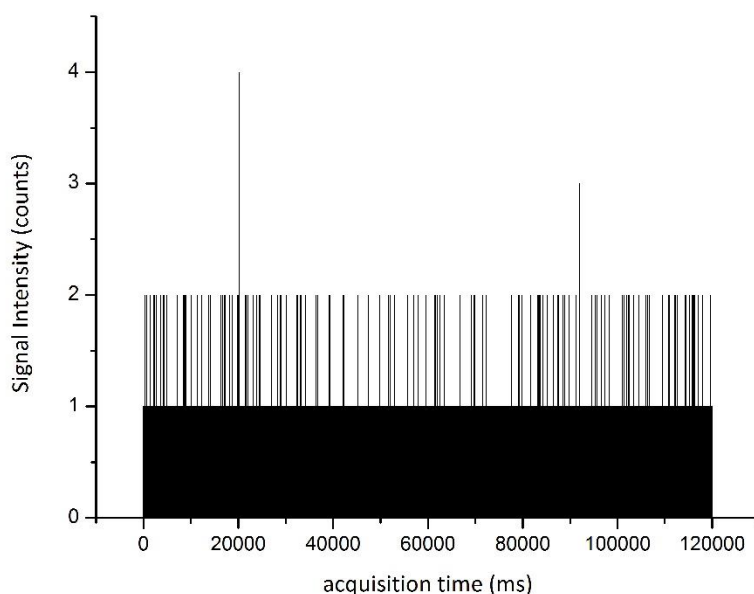


Γράφημα 79. Καμπύλη συσχέτισης της έντασης (counts) ^{75}As με το Mass Flux (μg/50 μs) As με το HEN introduction system. SC ICP-MS

Το HEN Introduction System περιλαμβάνει την χρήση βοηθητικής γραμμής αερίου Ar για τη διευκόλυνση της μετάβασης των κυττάρων στο ICP-MS. Λόγω του ότι αυτό το σύστημα εισαγωγής δείγματος δεν είναι εμπορικά διαθέσιμο αλλά κατασκευάστηκε στο εργαστήριο για δοκιμαστικούς σκοπούς πάνω στο πεδίο του Single-Cell, η αεροδυναμική που αναπτύσσεται από το συνδυασμό των ροών του εκνεφωτικού Ar και του βοηθητικού Ar δεν έχει μελετηθεί. Με τη σκέψη ότι μπορεί να

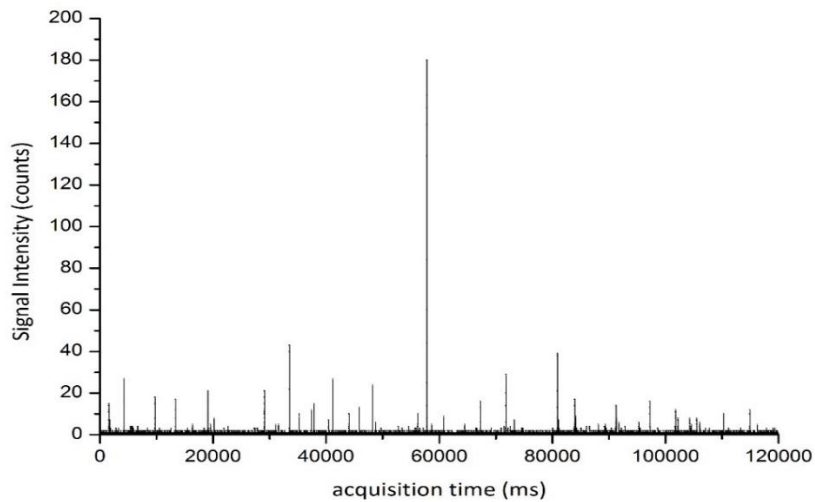
δημιουργήσει διακύμανση στο παρακολουθούμενο σήμα, ο χρόνος ανάλυσης κάθε δείγματος αυξήθηκε στα 2 min για αντιπροσωπευτικότερα στατιστικά. Αυξάνοντας το σύνολο τιμών των εντάσεων του σήματος που καταγράφεται, το mean dissolved intensity που εξάγεται είναι πιο αντιπροσωπευτικό της συγκέντρωσης του διαλυτού στοιχείου στο δείγμα.

Όπως και κατά τον προσδιορισμό As (III) στα control cells 28/3 με το Standard Introduction System, τα control cells 3/7 δεν εμφάνισαν κάποια ένδειξη παρουσίας κυτταρικού ή διαλυτού εξωκυττάρου As (III). Οι εξαιρετικά χαμηλές τιμές της έντασης του σήματος (Γράφημα 80) οφείλονται στο σήμα του υποβάθρου για το m/z 75 και όχι στον κυτταρικό ή διαλυτό εξωκυττάριο As (III). Εντάσεις των 1, 2, 3 και 4 counts δεν αντιστοιχούν σε cell events καθώς έχουν διάρκεια 1 data point ($\leq 50 \mu\text{s}$). Έτσι αν και το λογισμικό (Nano Syngistix, PE) μετρά 4511 κορυφές, αυτές δεν είναι τίποτε άλλο παρά false positives λόγω της μη κανονικής κατανομής του υποβάθρου σήματος.



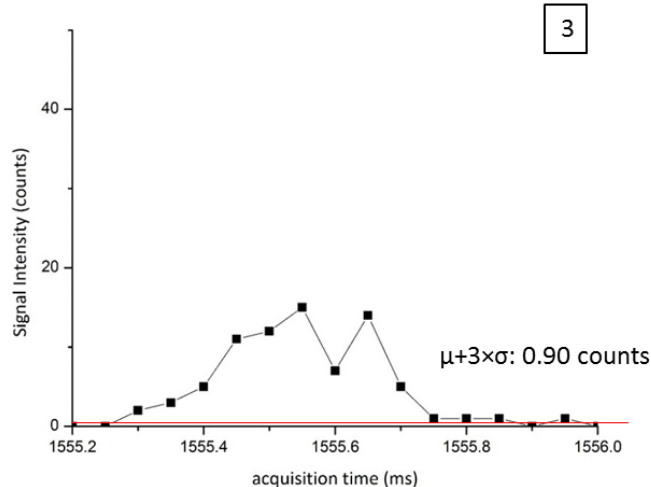
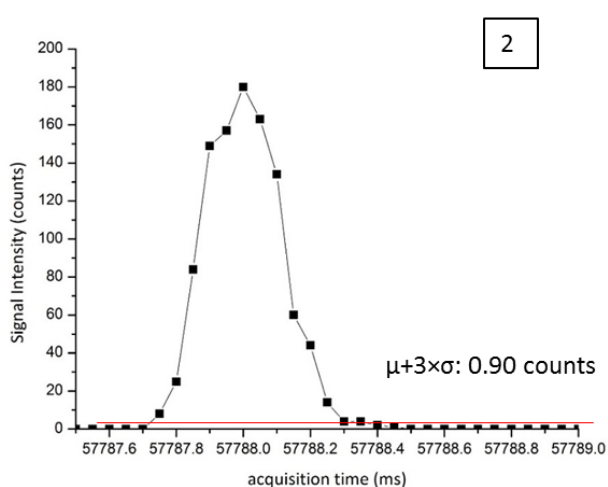
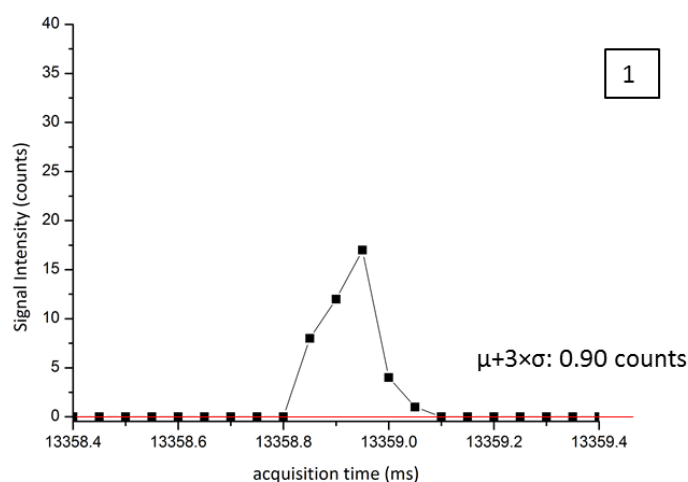
Γράφημα 80 Καταγραφή σήματος ^{75}As για το control 3/7 cells με το HEN Introduction System SC ICP-MS για πάροδο 120 s.

Προκειμένου να ελέγξουμε την διάρκεια των cell events As (III) με το HEN Introduction System εστιάζουμε σε μεμονωμένα cell events στην καταγραφή της έντασης ^{75}As για τα κύτταρα επωασμένα σε 400 μM As (III) (Γράφημα 81).



Γράφημα 81. Καταγραφή έντασης ^{75}As για τα κύτταρα επωασμένα σε $400 \mu\text{M As (III)}$ με το HEN Introduction System SC ICP-MS για πάροδο 120 s.

Η τυπική χρονική διάρκεια των cell events κυμαίνεται γύρω στα 200 μs (κορυφή 1, Γράφημα 82), όπως είχε παρατηρηθεί και με το Standard Introduction System (Γράφημα 48). Οι κορυφές 2, 3, με σημαντικά μεγαλύτερη χρονική διάρκεια (600 μs) και ένταση σήματος, μάλλον οφείλονται σε πολλαπλά cell events (cell event overlapping). Σαρώνοντας την χρονική κλίμακα, παρατηρούμε ότι η παρουσία κορυφών που μάλλον αντιστοιχούν σε πολλαπλά cell events είναι συχνότερη κατά την ανάλυση του δεδομένου κυτταρικού δείγματος με το HEN σύστημα εισαγωγής σε σχέση με το Standard.

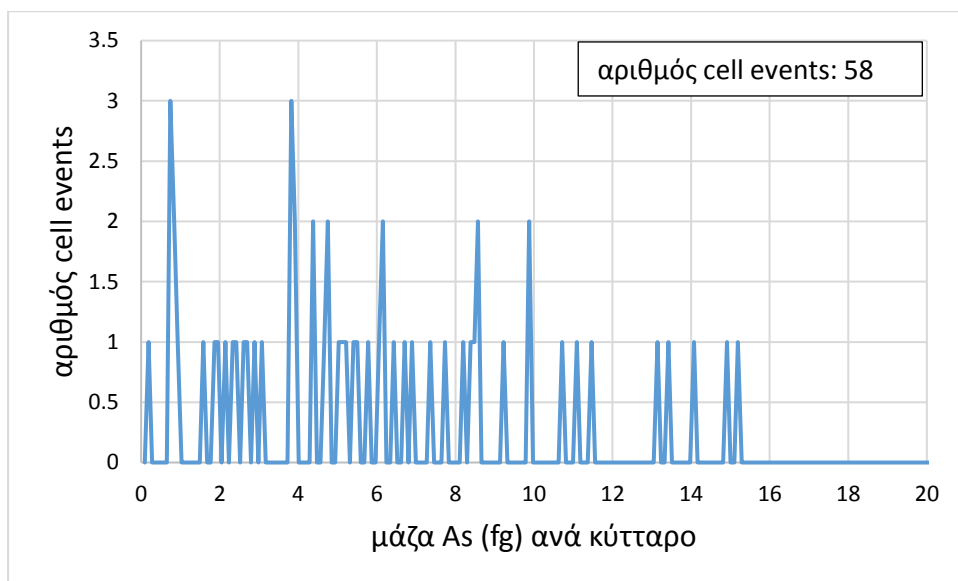


Γράφημα 82. Προφίλ κορυφών που αντιστοιχούν σε cell events As με διάρκεια 250 μ s (1) κα περίπου 600 μ s (2,3). Η baseline ($\mu+3\sigma$: 0.90 counts) αποτελεί το όριο πάνω από το οποίο βρίσκονται τα data points που ορίζουν cell events.

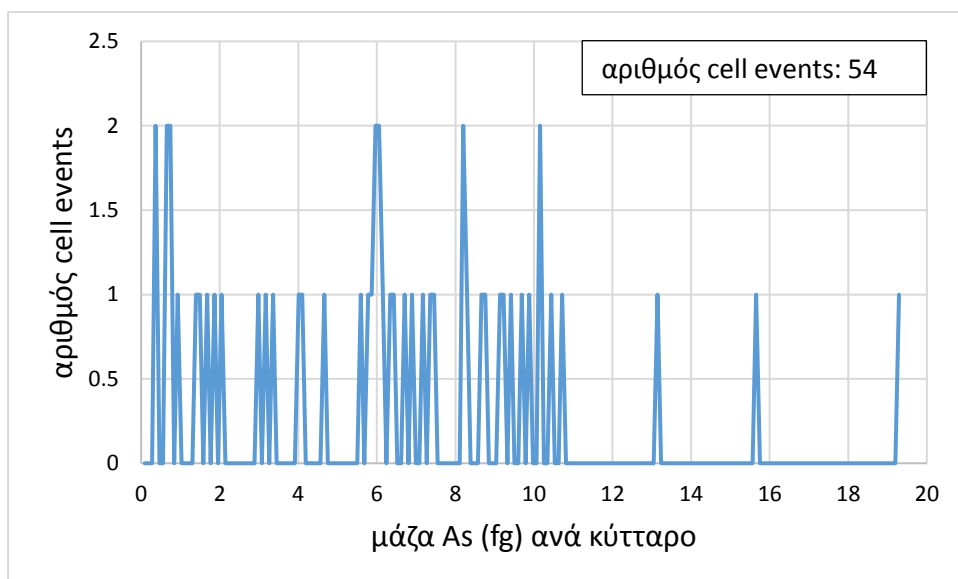
Από την εφαρμογή της σχετικής βαθμονόμησης (Γράφημα 79) προκύπτουν τα ιστογράμματα μάζας As (III) ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 100, 200, 300 και 400 μ M As (V) (Γραφήματα 83, 84, 85, 86). Λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης εξωκυττάριου διαλυτού As (III) (0.16 ppb) που επιδεικνύουν τα κύτταρα επωασμένα σε 400 μ M As (III) και κατά συνέπεια της χαμηλής έντασης της baseline (0.90 counts), false positives θα συνυπολογιστούν στον τελικό αριθμό των cell events. Παρόμοια ένταση επιδεικνύει η baseline για τα κύτταρα επωασμένα σε 100, 200 και 300 μ M As (III), αφού η συγκέντρωση του εξωκυττάριου διαλυτού προσδιορίστηκε 0.15, 0.19 και 0.133 ppb αντίστοιχα.

Ο αριθμός των cell events που υπολογίστηκε για τα κύτταρα επωασμένα σε 100 και 200 μ M As(III) είναι πολύ χαμηλός για το σχηματισμό κάποιας μορφής κατανομής (Γραφήματα 83, 84). Μεμονωμένα cell events διασπείρονται στο εύρος των 0.1-16 fg, των οποίων η μέση μάζα As εντοπίζεται στα 5 και 6 fg για τις συγκεντρώσεις επώασης των 100 και 200 μ M αντίστοιχα. Ο αριθμός

των cell events είναι χαμηλός για να αποφανθούμε για την πρόσληψη As (III) στις δεδομένες συγκεντρώσεις.



Γράφημα 83. Ιστογράμμο μάζας As (III) ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 100 μM As (III). Η καταγραφή διήρκεσε 2 min με το HEN Introduction System SC ICP-MS.

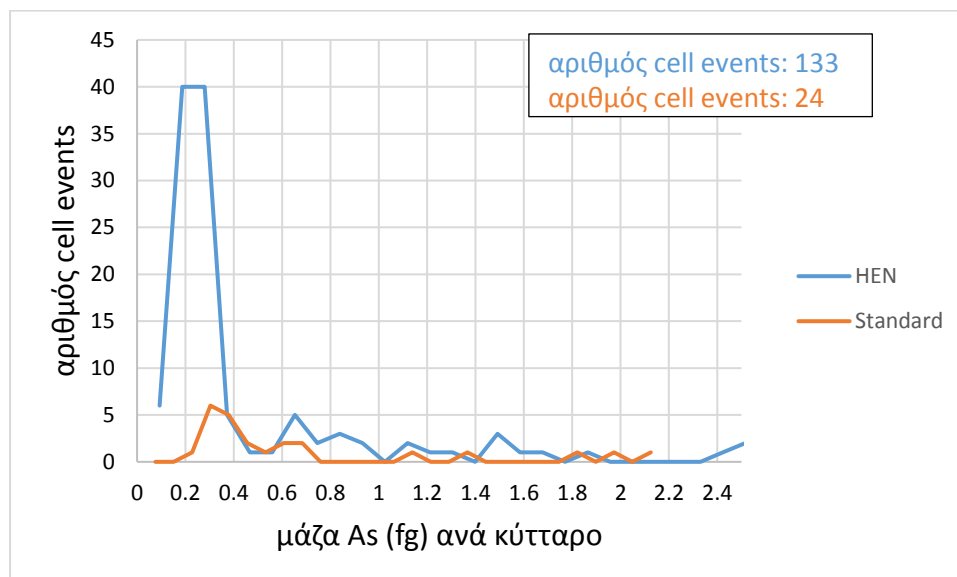


Γράφημα 84. Ιστογράμμο μάζας As (III) ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 200 μM As (III). Η καταγραφή διήρκεσε 2 min με το HEN Introduction System SC ICP-MS.

Τα κύτταρα επωασμένα σε 300 και 400 μM εμφανίζουν υψηλότερο αριθμό cell events τα οποία συγκεντρώνονται σε ένα συγκεκριμένο εύρος μαζών. (Γραφήματα 85, 86). Οι κατανομές τους παρουσιάζονται σε σύγκριση με αυτές που εξήχθησαν με το Standard introduction system.

Στο Γράφημα 85 γίνεται μία σύγκριση των ιστογραμμάτων μάζας As ανά κύτταρο όπως λήφθησαν με το HEN και το Standard Introduction System για τα κύτταρα επωασμένα σε 300 μM As. Οι

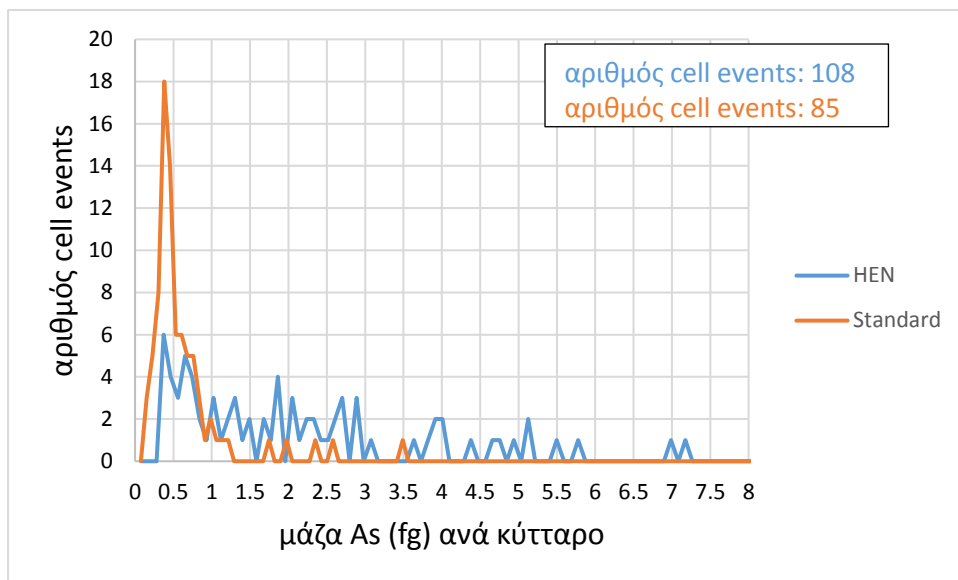
αναγραφόμενοι αριθμοί cell events δεν είναι κανονικοποιημένοι ως προς τον όγκο δείγματος που εισάγεται για τους δεδομένους χρόνους καταγραφής (1 min) αλλά αντιπροσωπεύουν τα cell events που σχηματίζουν την κατανομή As (III) για τους διαφορετικούς όγκους δείγματος που εισήχθη με το κάθε σύστημα εισαγωγής. Δεδομένου ότι με το HEN εισάγαμε 0.1 mL/min στο οποίο sample uptake rate αντιστοιχούν 133 cell events, ο αντίστοιχος αριθμός cell events για sample uptake rate 1 mL/min, με το οποίο λειτουργεί το Standard Introduction System, θα ήταν αναλογικά 1330 cell events. Ο υψηλότερος αριθμός οφείλεται στο υψηλότερο TE% που επιτυγχάνεται με το HEN Introduction System. Τα δύο ιστογράμματα μάζας σχετικά συμφωνούν σχηματικά, με τα περισσότερα events να εντοπίζονται στα 0.2-0.4 fg. Για το HEN, παρατηρούμε μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης σε cell events As (<0.2 fg), που μάλλον αποδίδεται στο περισσότερο θορυβώδες σήμα του υποβάθρου και κατά συνέπεια μεγαλύτερο αριθμό false positives. Η μέση μάζα As ανά κύτταρο υπολογίζεται στα 0.42 fg και 0.58 fg για το HEN και το Standard Introduction System αντίστοιχα.



Γράφημα 85. Ιστογράμματα μάζας As ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 300 μM As (III) με το HEN και Standard Introduction System SC ICP-MS. Ο χρόνος καταγραφής ήταν 1 min και με τα 2 συστήματα εισαγωγής. Οι αριθμοί cell events δεν είναι κανονικοποιημένοι και προκύπτουν με sample uptake rate 0.1 και 1 mL/min για το HEN και το Standard Introduction System αντίστοιχα.

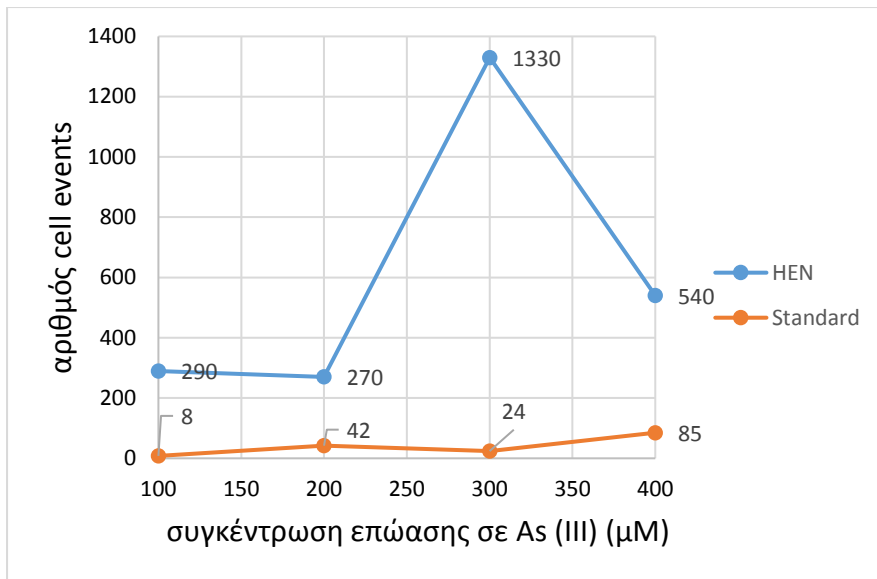
Στο Γράφημα 86 γίνεται μία σύγκριση των ιστογραμμάτων μάζας As (III) ανά κύτταρο όπως λήφθηκαν με το HEN και το Standard Introduction System για τα κύτταρα επωασμένα σε 400 μM As (III). Δεδομένου ότι με το HEN εισάγαμε 0.2 mL (0.1 mL/min \times 2 min) δείγματος στον οποίο όγκο αντιστοιχούν 108 cell events, ο αντίστοιχος αριθμός cell events για τον όγκο των 1 mL, ο οποίος εισήχθη με το Standard Introduction System (1 mL/min \times 1 min), θα ήταν αναλογικά 540 cell events. Και σε αυτήν την περίπτωση επιβεβαιώνεται το υψηλότερο TE% που επιτυγχάνεται με το HEN Introduction System. Τα δύο ιστογράμματα μάζας διαφέρουν ως προς το εύρος μάζας. Η κατανομή

του As (III) με το HEN καλύπτει το εύρος των 0.5-5 fg σε αντίθεση με αυτήν του Standard που περιορίζεται στα χαμηλά 0.2-2 fg. Η μέση μάζα η μέση μάζα As ανά κύτταρο προσδιορίζεται στα 1.66 fg και 0.58 fg για το HEN και το Standard Introduction System αντίστοιχα.

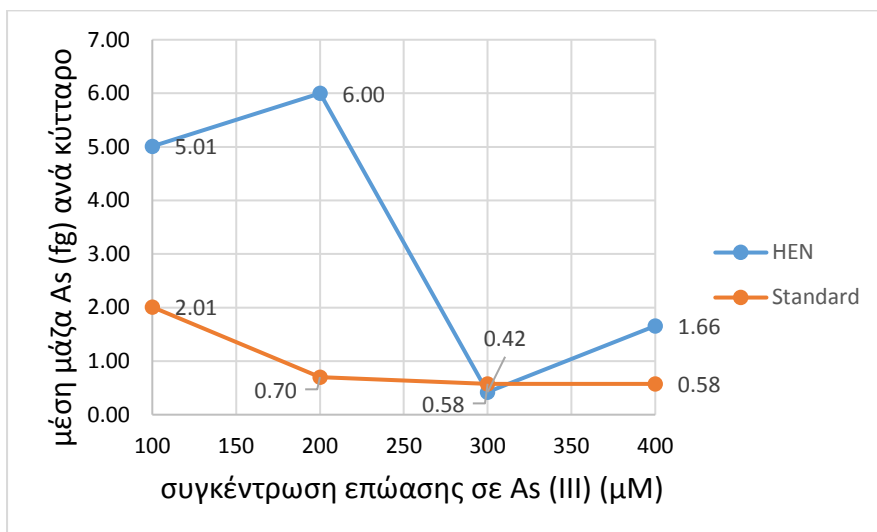


Γράφημα 86. Ιστόγραμμα μάζας As ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 400 μM As (III) με το HEN και Standard Introduction System SC ICP-MS. Ο χρόνος καταγραφής ήταν 1 και 2 min για το Standard και HEN αντίστοιχα. Οι αριθμοί cell events δεν είναι κανονικοποιημένοι και προκύπτουν με sample uptake rate 0.1 και 1 mL/min για το HEN και το Standard Introduction System αντίστοιχα.

Από την συνολική σύγκριση των συστημάτων HEN και Standard Introduction System ως προς τον προσδιορισμό As(III), παρατηρούμε τον υψηλότερο αριθμό cell events (Γράφημα 87) που επέδειξε η ανάλυση των κυττάρων με το HEN σύστημα για όλες τις συγκεντρώσεις επώασης As (III). Αν το HEN έχει απόδοση 11% και το Standard 4%, ιδανικά θα περιμέναμε ο λόγος των events του HEN ως προς Standard να είναι περίπου 2.75 για τους ίδιους όγκους εισαγωγής κυτταρικού αιωρήματος. Αυτό όμως δεν συμβαίνει καθώς αυτό θα προϋπέθετε ότι όλα τα κύτταρα που εισέρχονται εμπεριέχουν μέταλλο σε ανιχνεύσιμες ποσότητες. Η μεγαλύτερη μέση μάζα As(III) ανά κύτταρο που εμφανίζουν τα κύτταρα κατά την ανάλυση τους με το HEN (Γράφημα 88) ίσως να είναι ενδείξεις ότι το δεδομένο σύστημα εισαγωγής ευνοεί την ανίχνευση συσσωματωμάτων εάν αυτά υπάρχουν μέσα στο αιώρημα. Για τα κύτταρα επωασμένα σε 100 και 200 μM As η μέση μάζα ανά κύτταρο δεν είναι αντιπροσωπευτική της πρόσληψης As (III), αφού ο αριθμός των cell events ήταν πολύ χαμηλότερος σε σχέση με τις δύο υψηλότερες συγκεντρώσεις επώασης.

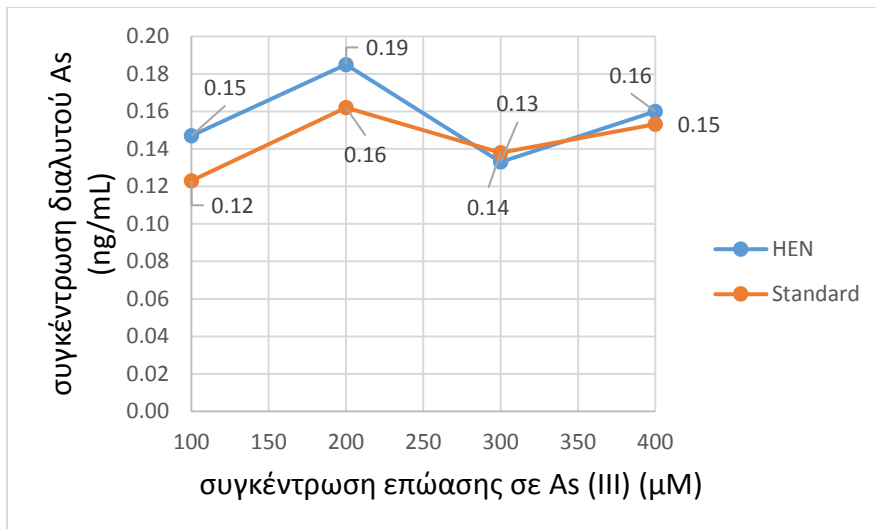


Γράφημα 87. Σύγκριση συστήματος HEN με Standard που δείχνει πως μεταβάλλεται ο αριθμός των cell events συναρτήσει της συγκέντρωσης επώασης σε As (III). Ο αριθμός των cell events έχει κανονικοποιηθεί για όγκο εισαγωγής 1 mL και με τα 2 συστήματα. Οι ετικέτες δεδομένων βοηθούν στην ανάγνωση του άξονα γ.



Γράφημα 88. Σύγκριση συστήματος HEN με Standard που δείχνει πως μεταβάλλεται η μέση μάζα As ανά κύτταρο συναρτήσει της συγκέντρωσης επώασης σε As (III). Οι ετικέτες δεδομένων βοηθούν στην ανάγνωση του άξονα γ. Βρίσκονται πάνω από τα σημεία για το HEN και κάτω από αυτά για το Standard.

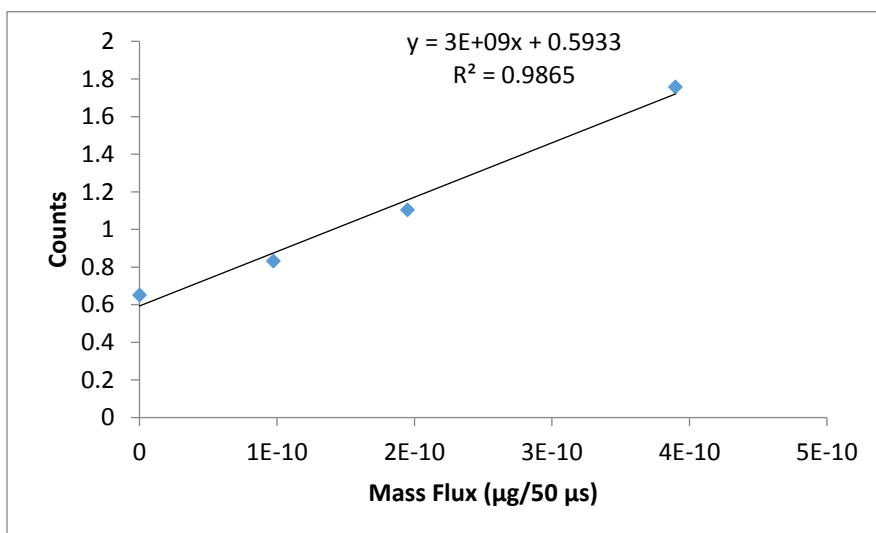
Παρατηρείται πολύ καλή συμφωνία ως προς τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του εξωκυττάριου διαλυτού As(III) μεταξύ του HEN και του Standard Introduction System (Γράφημα 89). Η καλή συμφωνία στον ποσοτικό προσδιορισμό προσδίδει αξιοπιστία στο σύστημα HEN συγκριτικά με το Standard σύστημα εισαγωγής το οποίο είναι το σύστημα αναφοράς στην παρούσα εργασία.



Γράφημα 89. Σύγκριση συστήματος HEN με Standard ως προς τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του διαλυτού As (III) στα κυτταρικά αιωρήματα. Οι ετικέτες δεδομένων βοηθούν στην ανάγνωση του άξονα y. Βρίσκονται πάνω από τα σημεία για το HEN και κάτω από αυτά για το Standard.

3.7.2 Προσδιορισμός Ca σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το HEN introduction system

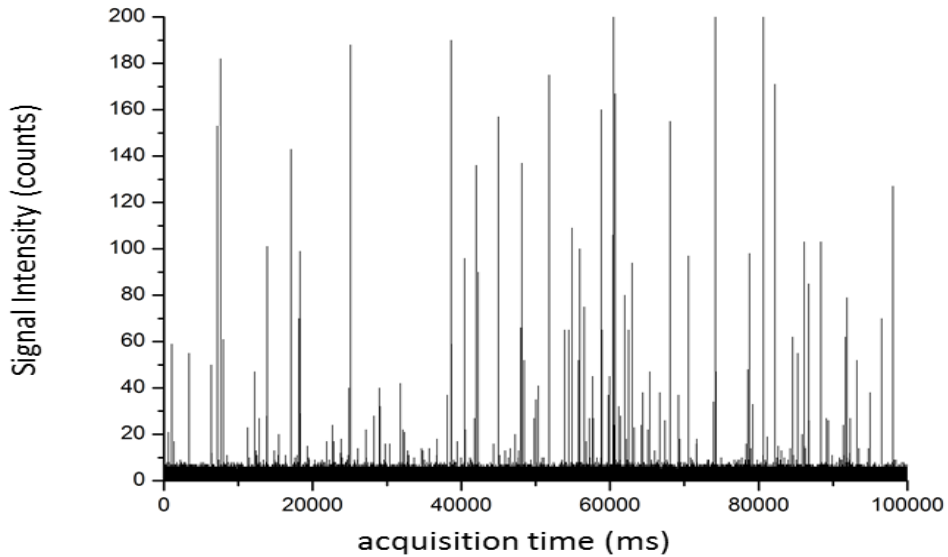
Συνδυάζοντας την καμπύλη βαθμονόμησης για το διαλυτό Ca και της TE% που προσδιορίστηκε, προέκυψε η ευθεία συσχέτισης της έντασης ^{44}Ca με την απόλυτη μάζα Ca που εισέρχεται και ανιχνεύεται ανά 50 μs {mass flux Ca ($\mu\text{g}/50 \mu\text{s}$)}. Η απόκλιση από την ιδανική γραμμική συμπεριφορά (Γράφημα 90) τέθηκε σαν θέμα στην ενότητα 3.6.2



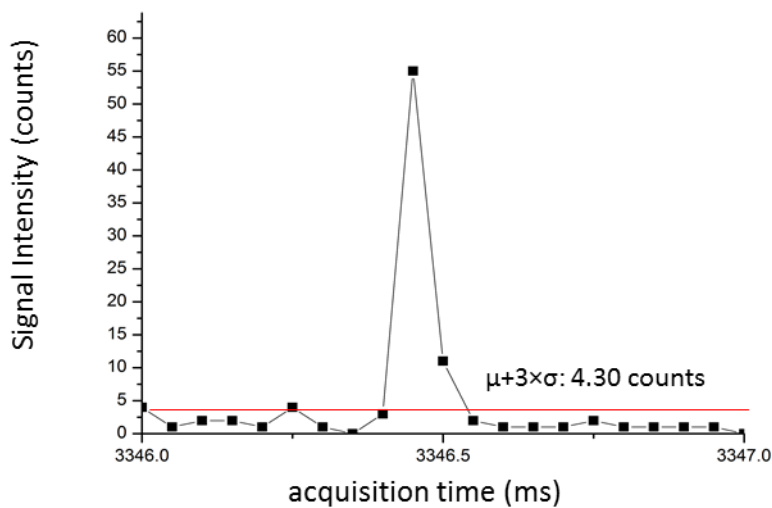
Γράφημα 90. Καμπύλη συσχέτισης της έντασης (counts) ^{44}Ca με το Mass Flux ($\mu\text{g}/50 \mu\text{s}$) Ca με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το HEN Introduction System.

Από την καταγραφή της έντασης του ^{44}Ca για τα control cells 3/7 με το HEN Introduction System (Γράφημα 91), εστιάζουμε σε μεμονωμένα cell events για να ελέγξουμε τη διάρκεια των cell events

Ca με το δεδομένο σύστημα εισαγωγής. Η τυπική διάρκεια είναι 150 μ s (Γράφημα 92) όπως είχε παρατηρηθεί για τα cell events Ca με το Standard Introduction System. (Γράφημα 34).



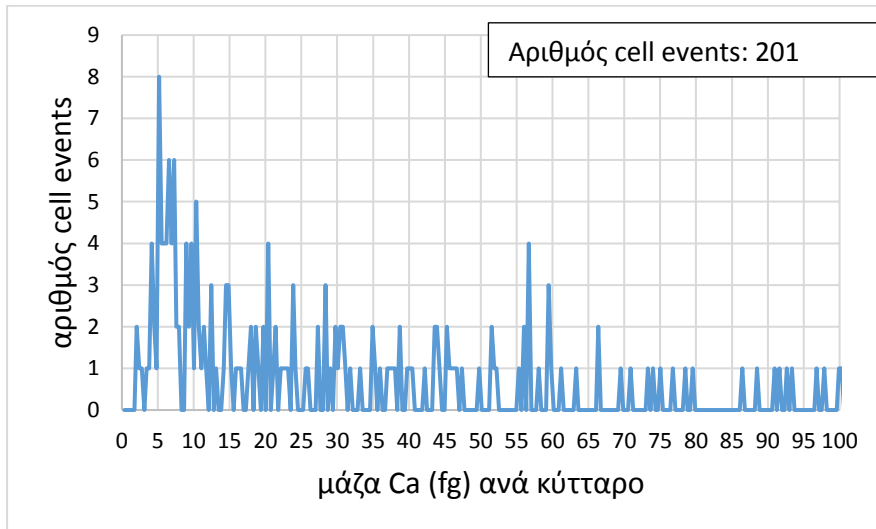
Γράφημα 91. Καταγραφή έντασης ^{44}Ca για το control cells 3/7 με το HEN Introduction System SC ICP-MS για πάροδο 100 s.



Γράφημα 92. Προφίλ κορυφής που αντιστοιχεί σε cell event Ca με διάρκεια 150 μ s. Η baseline ($\mu+3\sigma$: 4.30 counts) αποτελεί το όριο πάνω από το οποίο βρίσκονται τα data points που ορίζουν cell events

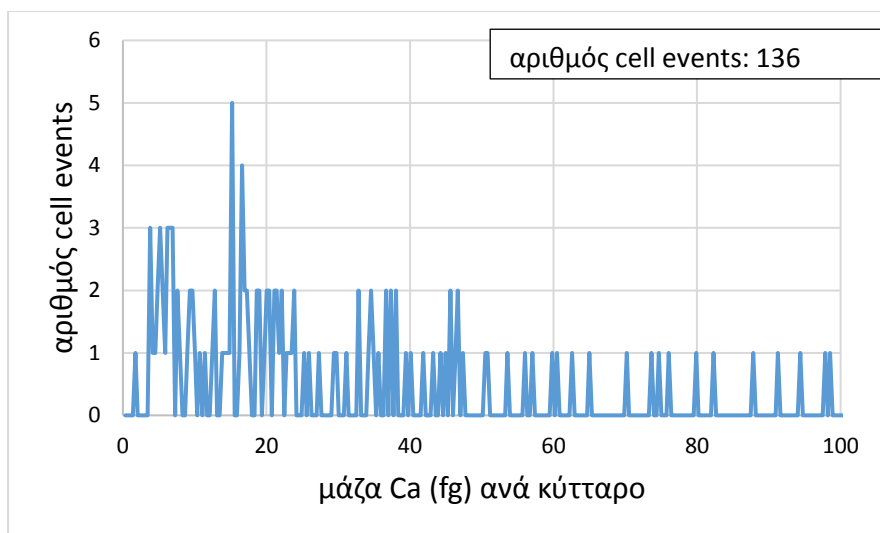
Αναφορικά με τον προσδιορισμό Ca στα κύτταρα επωασμένα σε συγκεντρώσεις As (III) με το HEN Introduction System αναλύθηκαν τα control cells 3/7 και το ιστόγραμμα μάζας Ca ανά κύτταρο παρουσιάζεται στο Γράφημα 93. Η κατανομή του Ca στα κύτταρα επιδεικνύει μεγάλο εύρος (5-100

fg). Επιπλέον, ο αριθμός των cell events είναι πολύ μεγαλύτερος του αριθμού που είχε υπολογιστεί κατά την ανάλυση των control cells 3/7 με το Standard Introduction System (Γράφημα 69), δεδομένου ότι οι όγκοι εισαγωγής για τους δεδομένους χρόνους καταγραφής είναι 0.2 mL με το HEN έναντι 1 mL με το. Standard Introduction System.

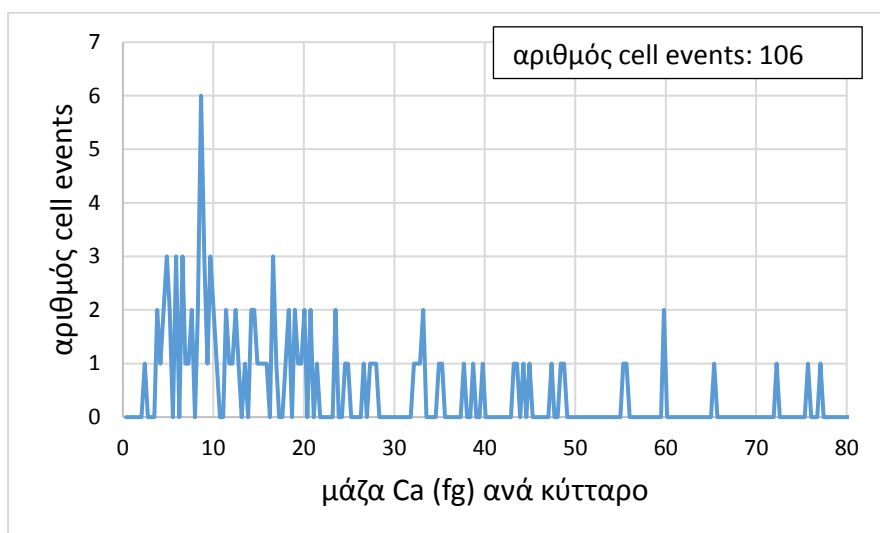


Γράφημα 93. Ιστόγραμμα μάζας Ca ανά κύτταρο για τα control cells 3/7 με HEN Introduction System SC ICP-MS. Ο χρόνος καταγραφής ήταν 2 min.

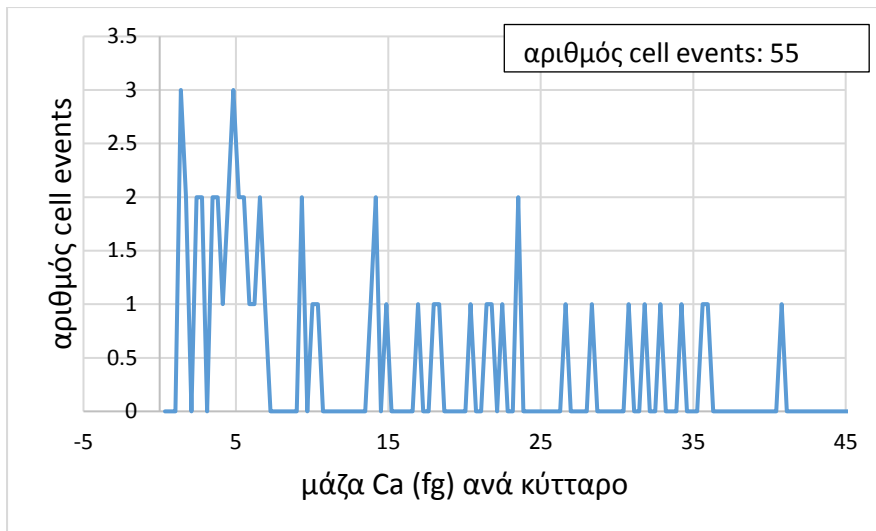
Μεταξύ των κυττάρων επωασμένων στις 4 συγκεντρώσεις As (III) (Γραφήματα 94, 95, 96, 97) ο αριθμός των cell events διαφέρει ελάχιστα. Η μόνη διαφορά εντοπίζεται στο μειούμενο εύρος μαζών που επιδεικνύουν οι κατανομές συναρτήσει της συγκέντρωσης επώασης. Η μείωση του εύρους μαζών έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της μέσης μάζας Ca ανά κύτταρο. Όπως θα φανεί και στα συγκεντρωτικά διαγράμματα που ακολουθούν σε επόμενη ενότητα, η μάζα του Ca στα κύτταρα μάλλον εξαρτάται από συγκέντρωση του διαλυτού Ca.



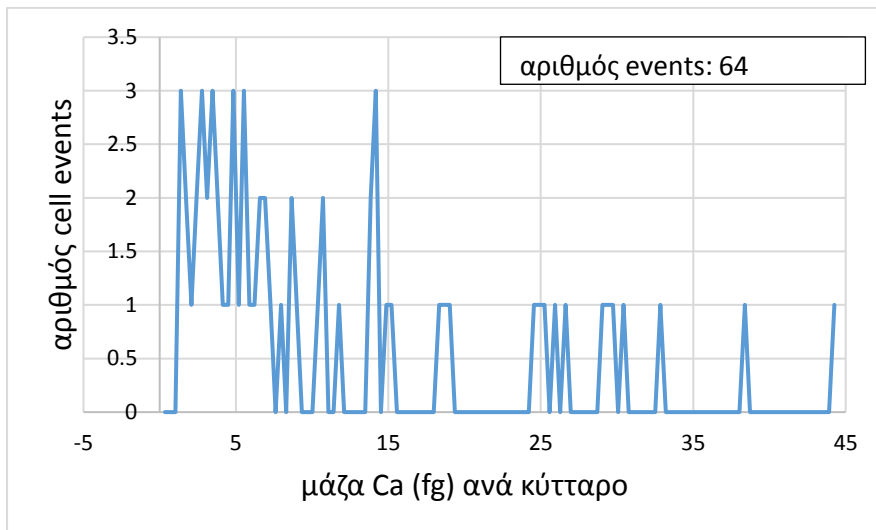
Γράφημα 94. Ιστόγραμμα μάζας Ca ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 100μM As (III) με HEN Introduction System.SC ICP-MS. Ο χρόνος καταγραφής ήταν 2 min.



Γράφημα 95. Ιστόγραμμα μάζας Ca ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 200 μM As (III) με το HEN Introduction System SC ICP-MS. Ο χρόνος καταγραφής ήταν 2 min.



Γράφημα 96. Ιστόγραμμα μάζας Ca ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 300 μM As (III) με HEN Introduction System. Ο χρόνος καταγραφής ήταν 1 min.



Γράφημα 97. Ιστόγραμμα μάζας Ca ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 400 μM As (III) με το HEN Introduction System SC ICP-MS. Ο χρόνος καταγραφής ήταν 1 min.

3.7.3 Αποτελέσματα από τους υπολογισμούς ισοζυγίου μάζας για τον προσδιορισμό As και Ca σε κύτταρα επωασμένα σε As (III) με το HEN introduction system.

Πίνακας 29. Υπολογισμοί ισοζυγίου μάζας As για τα *Chlamydomonas reinhardtii* επωασμένα σε 100, 200, 300 και 400 μM As(III) και για τα control cells 3/7. Ο συμβολισμός – υποδηλώνει ότι η τιμή ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης, ενώ το n.d (not determined) ότι δεν προσδιορίστηκε.

Chlamydomonas reinhardtii επωασμένα σε As (III) (μM)	SC-ICP-MS			Conventional ICP-MS Ολικό As(III) (fg)	Recovery %
	Ενδοκυττάριο As(III) (fg)	Εξωκυττάριο As(III) (fg)	Ολικό As(III) (fg)		
Control	3.68E+03	-	3.68E+03	-	n.d
100	1.46E+03	1.50E+04	1.65E+04	1.49E+04	110.8
200	1.28E+03	1.88E+04	2.01E+04	1.98E+04	101.6
300	4.85E+02	1.34E+04	1.39E+04	1.41E+04	98.7
400	6.12E+02	1.59E+04	1.65E+04	1.67E+04	99.0

Αν και στο Πίνακα 29 σημειώνεται υψηλότερη μάζα As για τα control cells 3/7 σε σχέση με τα κύτταρα που επώαστηκαν σε As (III), η μάζα As στα κύτταρα είναι απόρροια του υπολογισμού των false positive ως cell events. Παρατηρείται ακόμα ότι οι χαμηλές συγκεντρώσεις επώασης 100 και 200 μM παρουσιάζουν υψηλότερη μάζα As στα κύτταρα, κι αυτό οφείλεται στην πολύ υψηλότερη μέση μάζα As ανά κύτταρο (5, 6 fg για τα 100 και 200 μM As (III) αντίστοιχα) που προσδιορίστηκε για τις δεδομένες συγκεντρώσεις. Έχοντας μελετήσει όμως τα ιστογράμματα μάζας για τις δεδομένες συγκεντρώσεις, συμπαιρένουμε ότι τα cell events διασπείρονται στον άξονα μαζών χωρίς να δημιουργούν κάποια κατανομή. Άρα δεν αποδίδουν αντιπροσωπευτικά την πρόσληψη As(III) από τα κύτταρα για τις χαμηλές συγκεντρώσεις επώασης As (III).

Αναφορικά με το ισοζύγιο μάζας Ca για τα κύτταρα επωασμένα σε As (III) (Πίνακας 30), η συνολική μάζα Ca που προσδιορίζεται με SC ICP-MS αποκλίνει ποσοστιαία από την αντίστοιχη του Conventional. Η απόκλιση μπορεί να οφείλεται σε σφάλμα κατά την εισαγωγή δείγματος μέσω της φυσικής αναρρόφησης αφού αυτή εξαρτάται μόνο από την υποπίεση στο άκρο του εκνεφωτή λόγω φαινομένου venturi. Παροδικό μπλοκάρισμα του uptake line μέσω του οποίο μεταφέρεται το δείγμα ή του εσωτερικού τριχοειδή σωλήνα του εκνεφωτή μπορεί να μεταβάλλει τη ροή εισαγωγής του δείγματος στο πλάσμα (sample uptake rate) και άρα να προκαλέσει μεγαλύτερη διακύμανση στο καταγραφόμενο σήμα.

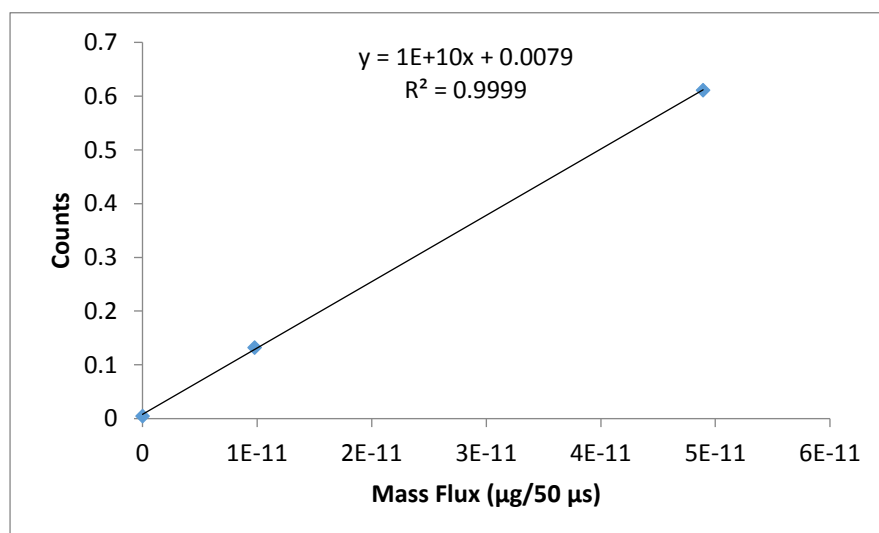
Πίνακας 30. Υπολογισμοί ισοζυγίου μάζας Ca για τα *Chlamydomonas reinhardtii* επωασμένα σε 100, 200, 300 και 400 μM As(III) και για τα control cells.

Chlamydomonas reinhardtii επωασμένα σε As (III) (μM)	Ενδοκυττάριο Ca (fg)	Εξωκυττάριο Ca (fg)	SC-ICP-MS Ολικό Ca (fg)	Conventional ICP-MS Ολικό Ca (fg)	Recovery %
Control	2.33E+04	2.04E+06	2.06E+06	2.63E+06	78.3
100	1.61E+04	6.11E+05	6.27E+05	4.80E+05	130.8
200	9.49E+03	4.69E+05	4.79E+05	2.17E+05	220.6
300	4.98E+03	2.94E+05	2.98E+05	8.68E+04	344.1
400	4.69E+03	3.47E+05	3.52E+05	1.90E+05	185.7

3.8 Ανάλυση κυττάρων επωασμένα σε As (V) με το HEN Introduction System

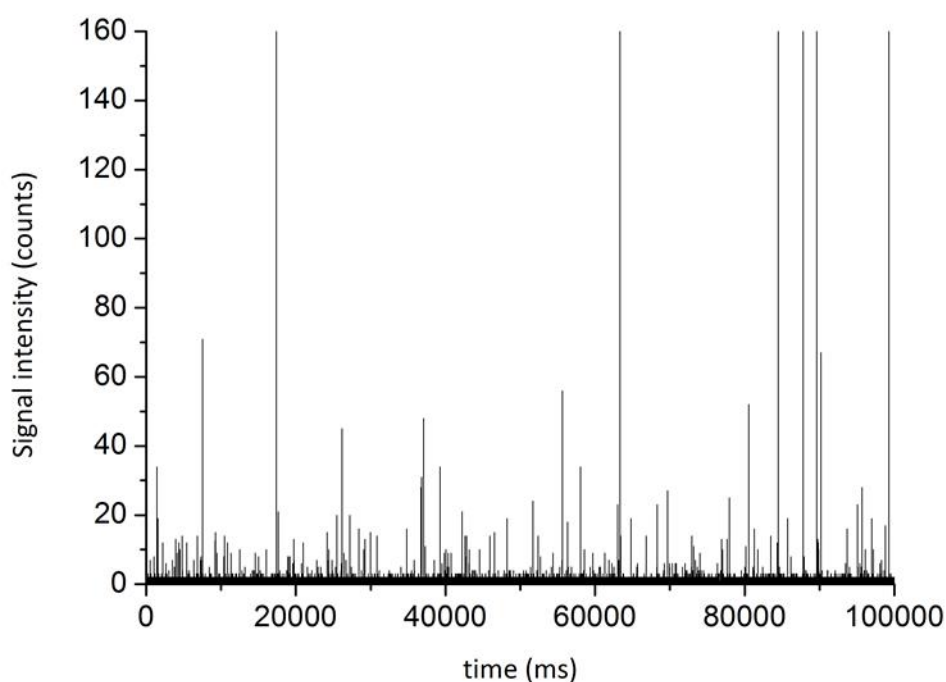
3.8.1 Προσδιορισμός As(V) σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το HEN introduction system

Συνδυάζοντας την καμπύλη βαθμονόμησης για το διαλυτό As και της TE% που προσδιορίστηκε, προέκυψε η ευθεία συσχέτισης της έντασης ^{75}As με την απόλυτη μάζα As που εισέρχεται και ανιχνεύεται ανά 50 μs {mass flux As ($\mu\text{g}/50 \mu\text{s}$)} (Γράφημα 98).



Γράφημα 98. Καμπύλη συσχέτισης της έντασης (counts) ^{75}As με το Mass Flux ($\mu\text{g}/50 \mu\text{s}$) As με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το HEN Introduction System.

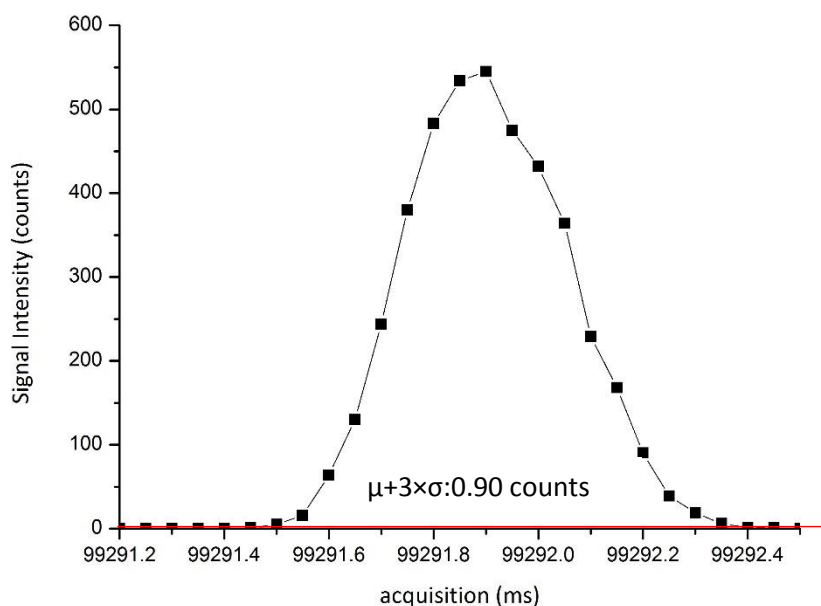
Ακολουθώντας το σκεπτικό που εφαρμόσαμε κατά τον προσδιορισμό As(V) στα κύτταρα επωασμένα σε συγκεντρώσεις As (V) με το Standard Introduction System SC ICP-MS, εξετάζουμε την καταγραφή της έντασης ^{75}As για τα κύτταρα επωασμένα σε 400 μM As(V) (Γράφημα 99) ώστε να λάβουμε μία αρχική εικόνα της πρόσληψης As (V) από τα κύτταρα.



Γράφημα 99. Καταγραφή της έντασης ^{75}As για τα κύτταρα επωασμένα σε $400 \mu\text{M As (V)}$ με το HEN Introduction System SC ICP-MS για πάροδο 100 s.

Η μέση ένταση ανά cell event είναι 63.9 counts, και είναι υψηλότερη από την αντίστοιχη μέση ένταση ανά cell event (30.2 counts) που προσδιορίστηκε με το Standard Introduction System. Αυτό αναδिकνύει την υψηλότερη ευαισθησία του HEN έναντι του Standard Introduction System.

Εστιάζοντας στην χρονική κλίμακα του Γραφήματος 99, μπορούμε να εξετάσουμε την διάρκεια των cell event As για τα κύτταρα επωασμένα σε As (V) που αναλύθηκαν με το HEN Introduction System. Η τυπική διάρκεια των cell events As (V) είναι 200 μs . Παρατηρούνται όμως και cell events μεγαλύτερης διάρκειας (Γράφημα 100) που έχουν υψηλή συχνότητα εμφάνισης και μάλλον οφείλονται σε συσσωματώματα κυττάρων.

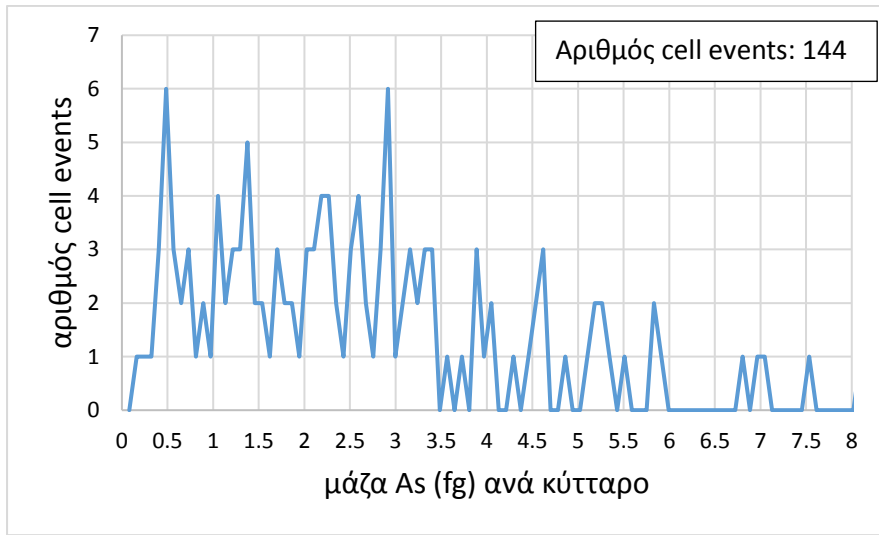


Γράφημα 100. Προφίλ ενός υψηλής έντασης event As κατά την ανάλυση των κυττάρων επωασμένων σε 400 μM As (V) με το HEN Introduction System SC ICP-MS. Η διάρκεια του είναι 900 μs . Η baseline (0.90 counts) είναι το όριο πάνω από το οποίο βρίσκονται τα data points που ορίζουν cell events.

Μέσω της σχετικής βαθμονόμησης προκύπτουν τα ιστογράμματα μάζας As (V) ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα στις 3 συγκεντρώσεις As (V) (Γραφήματα 101, 102, 103). Για τα κύτταρα επωασμένα σε 300 και 400 μM As (V) πραγματοποιείται σύγκριση των κατανομών που λήφθηκαν με το HEN και το Standard Introduction System. Λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης του εξωκυττάρου διαλυτού As(V) και άρα χαμηλής έντασης της baseline, ο συνυπολογισμός false positives στον τελικό αριθμό των cell events είναι αναπόφευκτος, όπως συνέβει και με το προσδιορισμό Pb και As στις προηγούμενες ενότητες. Η baseline για τα κύτταρα επωασμένα σε 400 μM As (V) προσδιορίζεται στα 0.90 counts για συγκέντρωση εξωκυττάρου διαλυτού As 0.56 ppb, ενώ για τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις 200 και 300 μM As αυτή θα είναι ακόμη χαμηλότερη (0.15 και 0.17 ppb εξωκυττάρου διαλυτού As(V) για τα 200 και 300 μM As αντίστοιχα).

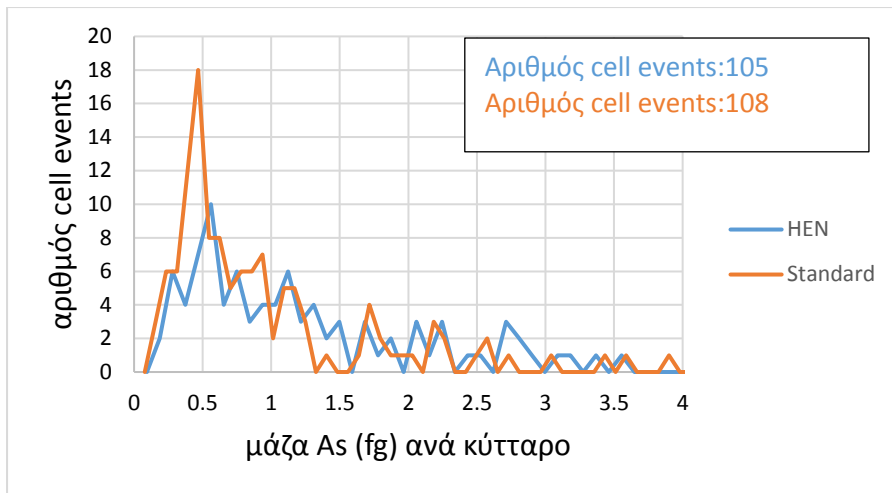
Στο Γράφημα 101 παρουσιάζεται το ιστόγραμμα μάζας As(V) ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 200 μM As (V). Λόγω του ότι κατά την ανάλυση του ίδιου κυτταρικού δείγματος με το Standard Introduction System τα προσδιοριζόμενα cell events δεν σχημάτισαν κάποια μορφή κατανομής, δεν πραγματοποιείται αντιπαράθεση μεταξύ του HEN και του Standard Introduction System για τα κύτταρα επωασμένα σε 200 μM As. Όπως προκύπτει από το Γράφημα 101, η πλειοψηφία των cell events συγκεντρώνεται στα 0.5-3.5 fg As(V). Αν ο αριθμός των cell events As (V) με το HEN Introduction System (144) αναχθεί στο 1 mL δείγματος που εισήχθησε με το Standard Introduction System τότε προκύπτουν 720 cell events (> 49 που μετρήθηκαν με το Standard

introduction system). Η κανονικοποίηση των cell events με το HEN σύστημα γίνεται πολλαπλασιάζοντας τον αριθμό των cell events με το λόγο των δύο όγκων εισαγωγής ($\frac{1 \text{ mL}}{0.2 \text{ mL}}$). Οι 2 όγκοι εισαγωγής προκύπτουν από το sample uptake rate (1, 0.1 mL/min για HEN και Standard αντίστοιχα) και το χρόνο καταγραφής (2 min και για τα 2 συστήματα).



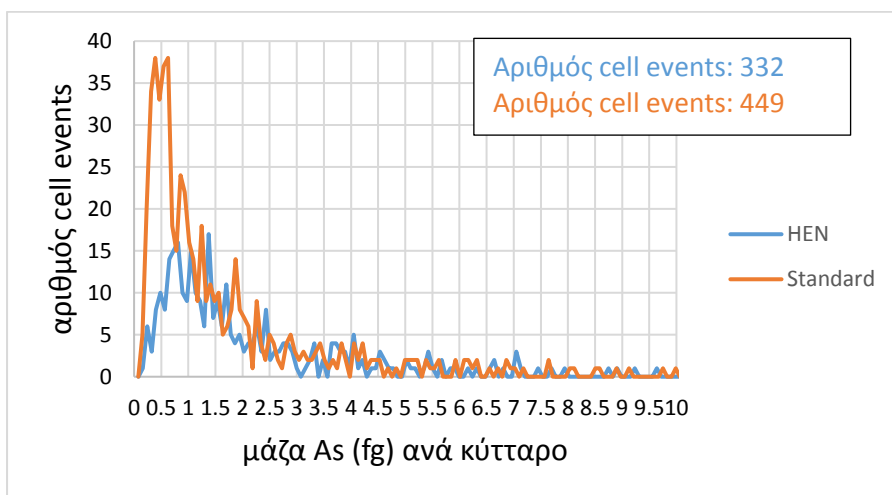
Γράφημα 101. Ιστόγραμμα μάζας As ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 200 μM As (V) με το HEN introduction system SC ICP-MS. Ο χρόνος καταγραφής ήταν 2 min.

Οι κατανομές As (V) στα κύτταρα επωασμένα σε 300 μM As (V) όπως εξήχθησαν με το HEN και το Standard Introduction System (Γράφημα 102) συμφωνούν σε σχήμα και εύρος μαζών. Αυτό πιστοποιεί και η συμφωνία στη μέση μάζα As (V) ανά κύτταρο που προσδιορίζεται 1.47 και 1.025 για το HEN και Standard Introduction System αντίστοιχα. Ως προς τον αριθμό των cell events As, αυτός είναι 10 φορές υψηλότερος για το HEN σύστημα (1050 cell events στο 1 mL εισαγωγής) σε σχέση με το Standard.



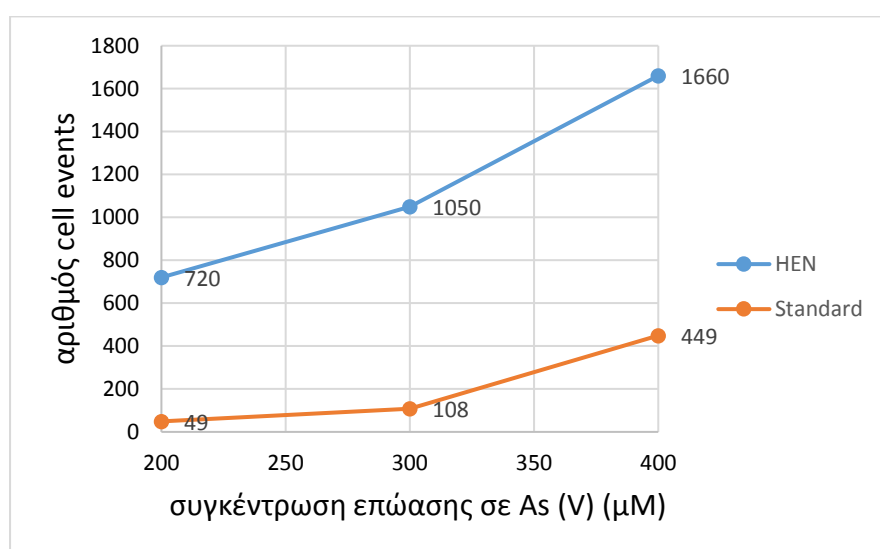
Γράφημα 102. Κατανομή As ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 300 μM As (V) με HEN και Standard Introduction System SC ICP-MS. Ο χρόνος καταγραφής ήταν 1 min και για τα 2 συστήματα εισαγωγής. Οι αριθμοί cell events δεν είναι κανονικοποιημένοι και προκύπτουν με sample uptake rate 0.1 και 1 mL/min για το HEN και το Standard Introduction System αντίστοιχα.

Το Γράφημα 103 παρουσιάζει τις κατανομές As(V) στα κύτταρα επωασμένα σε 400 μM As (V) όπως εξήχθησαν με το HEN και Standard Introduction System. Το ιστόγραμμα μάζας As ανά κύτταρο με το Standard introduction system εμφανίζει περισσότερα events στην περιοχή 0.5-1 fg. Η μέση μάζα As ανά κύτταρο είναι 2.2 και 1.59 fg για το HEN και το Standard Introduction System αντίστοιχα. Ακολουθώντας τον ίδιο τρόπο σύγκρισης των cell events που μετρήθηκαν με το κάθε σύστημα, ο αριθμός των cell events με το HEN (1660) είναι σχεδόν 3.5 φορές υψηλότερος από αυτόν του Standard Introduction System (449).



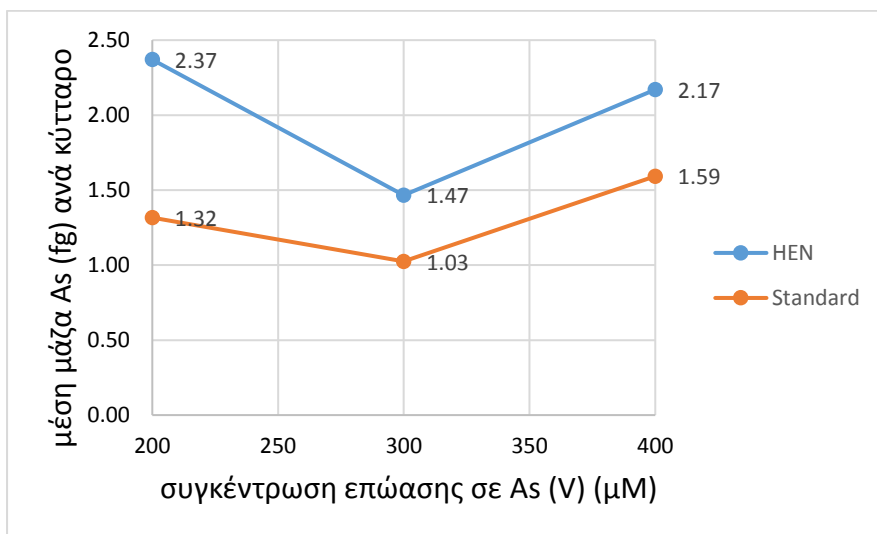
Γράφημα 103. Ιστόγραμμα μάζας As ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 400 μM As (V) με HEN και Standard Introduction System SC ICP-MS. Ο χρόνος καταγραφής ήταν 2 κι 1 min για το HEN και το Standard αντίστοιχα. Οι αριθμοί cell events δεν είναι κανονικοποιημένοι και προκύπτουν με sample uptake rate 0.1 και 1 mL/min για το HEN και το Standard Introduction System αντίστοιχα.

Από την συνολική σύγκριση των δύο συστημάτων εκνέφωσης ως προς τον αριθμό των cell events (Γράφημα 104), παρατηρούμε τον υψηλότερο αριθμό cell events As (V) που μετρούνται με το HEN Introduction System για τα κύτταρα όλων των συγκεντρώσεων επώασης σε As (V) λόγω του υψηλότερου TE%. Η σύγκριση του αριθμού των cell events γίνεται εφικτή με την κανονικοποίηση των cell events που ανιχνεύονται με το σύστημα HEN για όγκο εισαγωγής 1 mL (όγκος εισαγωγής με Standard Introduction System). Θετικό σημείο στη δεδομένη σύγκριση είναι κοινή ανοδική τάση που επιδεικνύει ο αριθμός των cell events συναρτήσει της συγκέντρωσης επώασης σε As (V), επιβεβαιώνοντας την αξιοπιστία του συστήματος HEN και την αυξανόμενη πρόσληψη As (V) από τα *Chlamydomonas reinhardtii* με την αύξηση της συγκέντρωσης As (V) στο περιβάλλον τους.



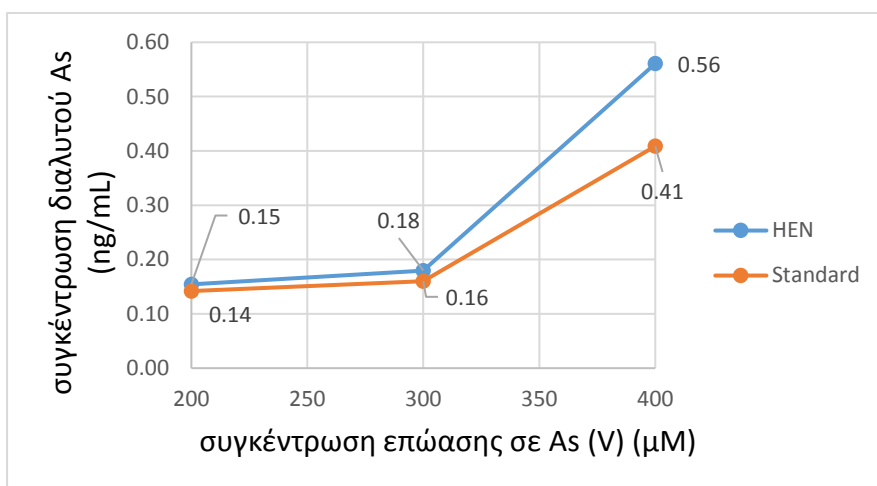
Γράφημα 104. Σύγκριση συστήματος HEN με Standard introduction system που δείχνει πως μεταβάλλεται ο αριθμός των cell events συναρτήσει της συγκέντρωσης επώασης σε As (V). Ο αριθμός των cell events για το HEN έχει κανονικοποιηθεί για όγκο εισαγωγής 1 mL και με τα 2 συστήματα. Οι ετικέτες δεδομένων βοηθούν στην ανάγνωση του άξονα y. Βρίσκονται πάνω από τα σημεία για τη σειρά του Standard και κάτω από αυτά για τη σειρά του HEN.

Κοινή ανοδική τάση επιδεικνύει και η μέση μάζα As (V) ανά κύτταρο (Γράφημα 105), όπως προσδιορίζεται με τα δύο συστήματα, αν εξαιρεθούν τα κύτταρα επωασμένα σε 200 μM As (V) τα οποία δεν σχημάτισαν κάποια μορφή κατανομής. Η μέση μάζα As (V) ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα 200 μM As (V) μάλλον διαμορφώνεται από την ανίχνευση κάποιων συσσωματωμάτων κυττάρων αφού τα μεμονωμένα κύτταρα δεν είχαν αρκετό As (V) ώστε να ανιχνευθούν και να συνεισφέρουν στη δεδομένη κατανομή. Σε γενικότερα πλαίσια, παρατηρούμε ότι η μέση μάζα As (V) ανά κύτταρο, όπως και η μέση μάζα As (III) που προσδιορίστηκε σε προηγούμενη ενότητα, προσδιορίζεται σε λίγο μεγαλύτερα fg με το HEN σύστημα εισαγωγής. Αυτό συμβαίνει διότι τα ιστογράμματα μάζας έχουν μεγαλύτερο εύρος λόγω της εισόδου περισσότερων συσσωματωμάτων κυττάρων με το HEN Introduction System.



Γράφημα 105. Σύγκριση συστήματος HEN με Standard introduction system που δείχνει πως μεταβάλλεται η μέση μάζα As(V) ανά κύτταρο συναρτήσει της συγκέντρωσης επώασης σε As (V). Οι ετικέτες δεδομένων βοηθούν στην ανάγνωση του άξονα y.

Όπως και στην ανάλυση της κυτταρικής σειράς του As (III), παρατηρείται πολύ καλή συμφωνία στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του διαλυτού εξωκυττάριου As (Γράφημα 106) μεταξύ HEN και Standard introduction system.

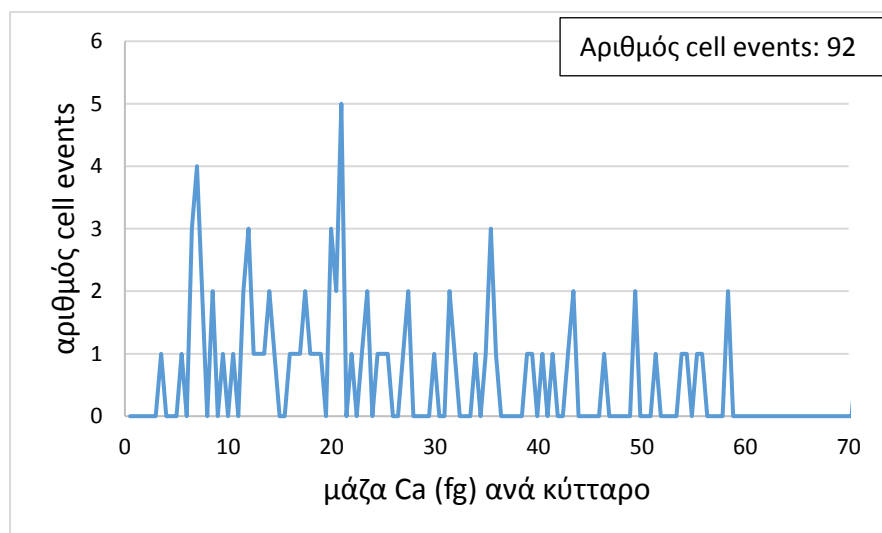


Γράφημα 106. Σύγκριση συστήματος HEN με Standard introduction system ως προς τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του διαλυτού As(V) στα κυτταρικά αιωρήματα. Οι ετικέτες δεδομένων βοηθούν στην ανάγνωση του άξονα y. Βρίσκονται πάνω από τα σημεία για το HEN και κάτω από αυτά για το Standard.

3.8.2 Προσδιορισμός Ca σε μεμονωμένα κύτταρα σε κύτταρα επωασμένα σε As (V) με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το HEN Introduction System

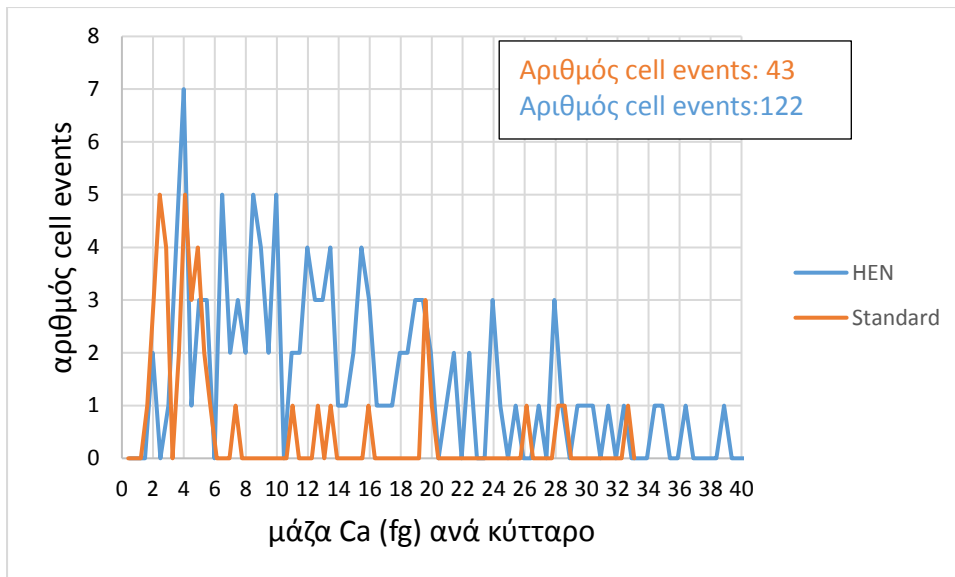
Για τον προσδιορισμό Ca στα κύτταρα επωασμένα σε As (V), σαν control cells αναλύθηκε το δείγμα 3/7. Το ιστόγραμμα μάζας Ca ανά κύτταρο για τα control cells 3/7 έχει παρουσιαστεί κατά τον προσδιορισμό Ca στα κύτταρα επωασμένα σε As (III), οπότε αποτελέσματα από την ανάλυση του δεδομένου δείγματος όπως ο αριθμός των cell events και η μέση μάζα Ca ανά κύτταρο θα σχολιαστούν σε συγκρίσεις που ακολουθούν.

Το ιστόγραμμα μάζας Ca ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 200 μM As (V) όπως εξήχθη με το HEN Introduction System (Γράφημα 107) δεν συγκρίνεται με αυτό που εξήχθη με το Standard, καθώς και στις δύο περιπτώσεις τα cell events δεν σχηματίζουν κάποια κατανομή.



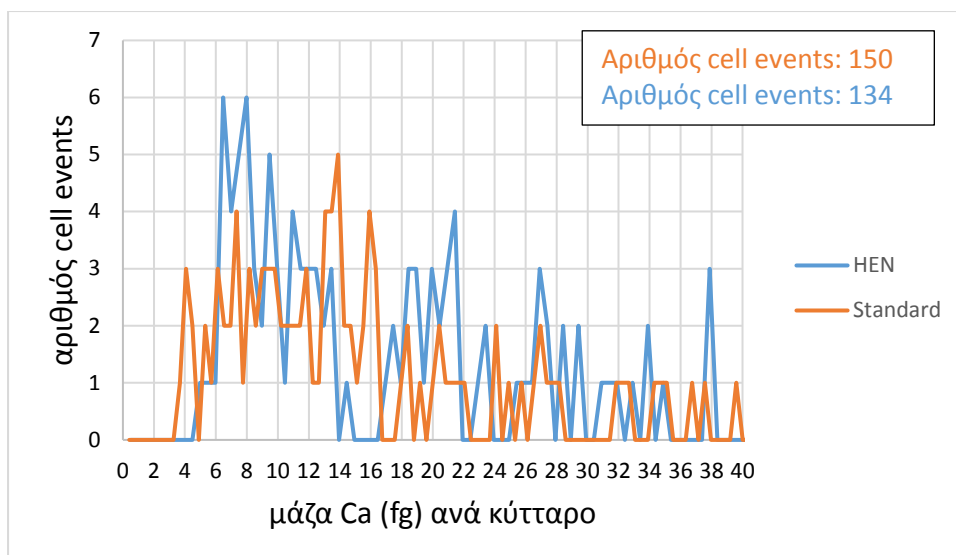
Γράφημα 107. Ιστόγραμμα μάζας Ca ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 200 μM As (V) με το HEN Introduction System SC ICP-MS. Η καταγραφή διήρκησε 1 min.

Στο Γράφημα 108 παρουσιάζεται η σύγκριση των ιστογραμμάτων μάζας Ca ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 300 μM As (V) όπως εξήχθησαν με το HEN και το Standard Introduction System. Ο αριθμός των cell events που υπολογίστηκαν με το HEN είναι πολύ υψηλότερος αυτού που υπολογίστηκε με το Standard Introduction System, αν ο πρώτος κανονικοποιηθεί για όγκο 1 mL εισαγωγής. Έτσι έχουμε 610 και 43 cell events για HEN και Standard Introduction System αντίστοιχα. Αν και δεν σχηματίζεται κάποια κατανομή Ca με το Standard Introduction System, παρατηρούμε από το ιστόγραμμα μάζας, που εξήχθη με το HEN, ότι η πλειοψηφία των κυττάρων συσπειρώνονται σε ένα εύρος μάζας από 2-20 fg.



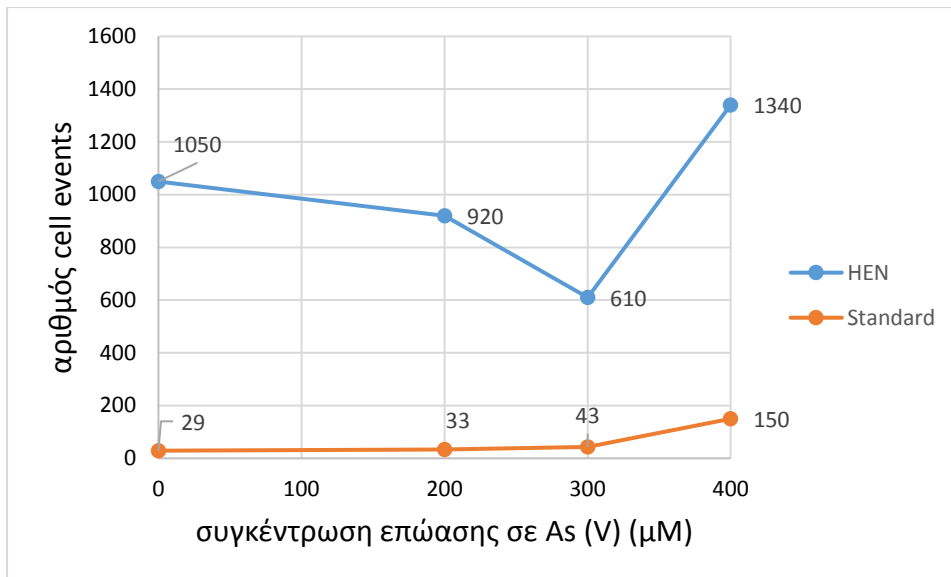
Γράφημα 108. Ιστόγραμμα μάζας Ca ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 300 μM As (V) με HEN και Standard Introduction System SC ICP-MS. Ο χρόνος καταγραφής ήταν 1 και 2 min για το Standard και HEN αντίστοιχα. Οι αριθμοί cell events δεν είναι κανονικοποιημένοι και προκύπτουν με sample uptake rate 0.1 και 1 mL/min για το HEN και το Standard Introduction System αντίστοιχα.

Στο Γράφημα 109 παρουσιάζεται η σύγκριση των ιστογραμμάτων μάζας Ca ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 400 μM As (V), όπως αυτά εξήχθησαν με το HEN και το Standard Introduction System. Παρατηρούμε ότι οι δύο κατανομές εκτείνονται στο ίδιο εύρος μάζας με τη διαφορά ότι το HEN σύστημα ανιχνεύει περισσότερα cell events στα υψηλά fg. Αυτό έχει αντίκτυπο στη προσδιοριζόμενη μέση μάζα Ca ανά κύτταρο που είναι 37.6 fg και 28.4 fg για το HEN και το Standard Introduction System αντίστοιχα. Ο αριθμός των cell events που υπολογίστηκαν με το HEN είναι πολύ υψηλότερος αυτού που υπολογίστηκε με το Standard Introduction System, αν ο πρώτος κανονικοποιηθεί για όγκο 1 mL εισαγωγής. Έτσι έχουμε 1340 και 150 cell events για HEN και Standard Introduction System αντίστοιχα.



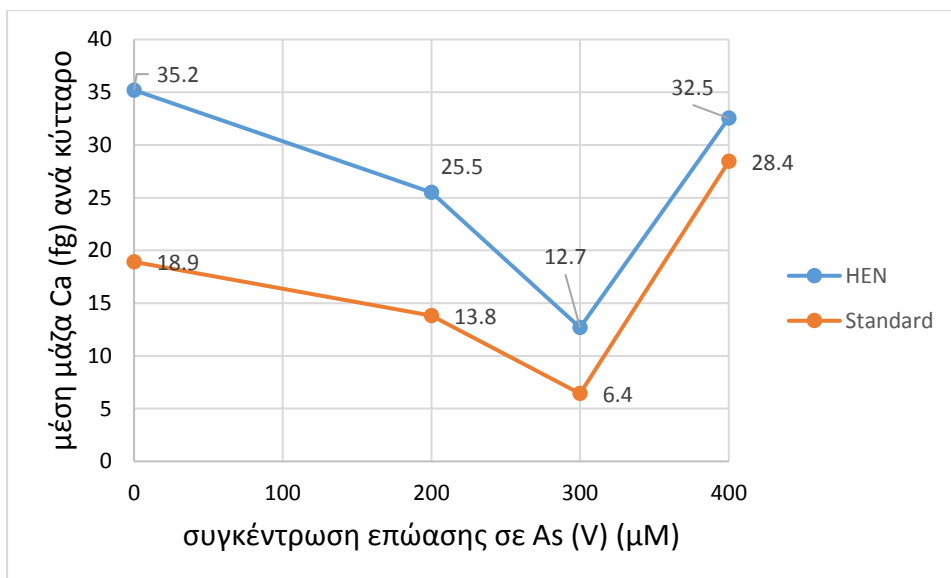
Γράφημα 109. Ιστόγραμμα μάζας Ca ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 400 μM As (V) με HEN και Standard Introduction System. Ο χρόνος καταγραφής ήταν 1 min και για τα 2 συστήματα. Οι αριθμοί cell events δεν είναι κανονικοποιημένοι και προκύπτουν με sample uptake rate 0.1 και 1 mL/min για το HEN και το Standard Introduction System αντίστοιχα.

Από την συνολική σύγκριση των δύο συστημάτων εκνέφωσης ως προς τον αριθμό των cell events (Γράφημα 110), συμπεραίνουμε τον υψηλότερο αριθμό cell events Ca που μετρούνται με το HEN Introduction System για τα κύτταρα των 3 συγκεντρώσεων επώασης As (V). Η σύγκριση του αριθμού των cell events για τα δύο συστήματα γίνεται εφικτή με την κανονικοποίηση των cell events που ανιχνεύονται με το σύστημα HEN για όγκο εισαγωγής 1 mL (όγκος εισαγωγής με Standard Introduction System). Θετικό σημείο στη σύγκριση των δύο συστημάτων είναι κοινή τάση που επιδεικνύει ο αριθμός των cell events συναρτήσει της συγκέντρωσης επώασης σε As (V) και η οποία τάση φαίνεται να εξαρτάται από τη συγκέντρωση του εξωκυττάριου διαλυτού Ca (Γράφημα 112).

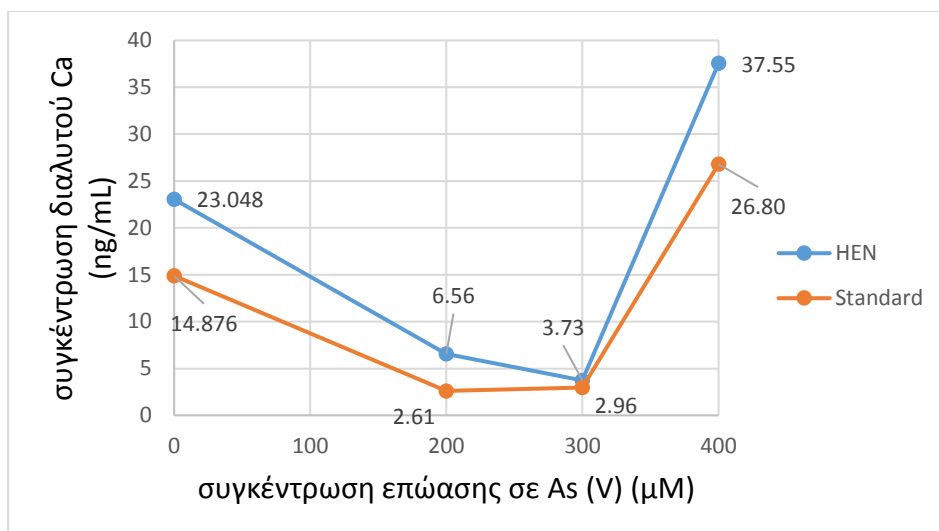


Γράφημα 110. Σύγκριση συστήματος HEN με Standard που δείχνει πως μεταβάλλεται ο αριθμός των cell events Ca συναρτήσει της συγκέντρωσης επώασης σε As (V). Ο αριθμός των cell events για το HEN έχει κανονικοποιηθεί για όγκο εισαγωγής 1 mL και με τα 2 συστήματα. Οι ετικέτες δεδομένων βοηθούν στην ανάγνωση του άξονα γ.

Όσο αφορά την προσδιοριζόμενη μέση μάζα Ca ανά κύτταρο (Γράφημα 111), αυτή ακολουθεί ανάλογη τάση με αυτήν της συγκέντρωσης του εξωκυττάριου διαλυτού Ca. Προσδιορίζεται σε υψηλότερες τιμές με το HEN για όλα τα κύτταρικά δείγματα, και αυτό μάλλον οφείλεται στην ανίχνευση περισσότερων συσσωματωμάτων κυττάρων με το HEN Introduction System.



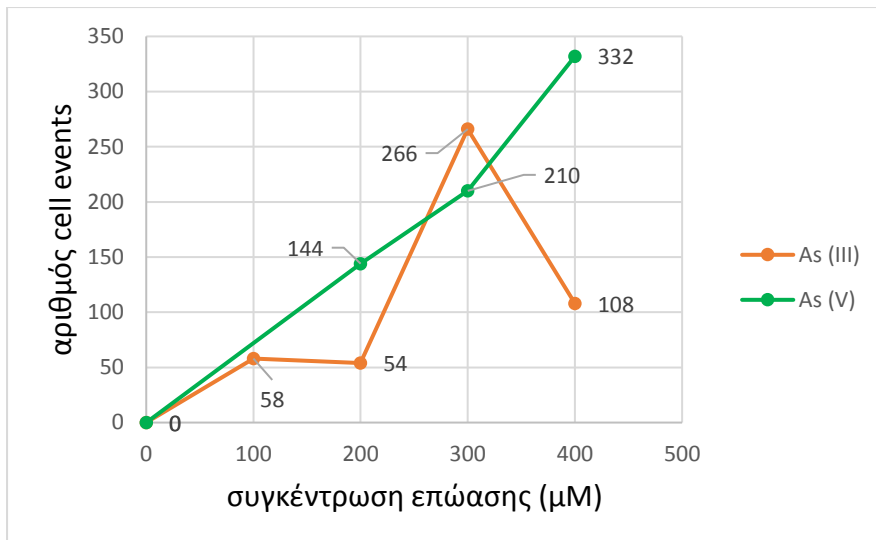
Γράφημα 111. Σύγκριση συστήματος HEN με Standard που δείχνει πως μεταβάλλεται η μέση μάζα Ca ανά κύτταρο συναρτήσει της συγκέντρωσης επώασης σε As (V). Οι ετικέτες δεδομένων βοηθούν στην ανάγνωση του άξονα γ.



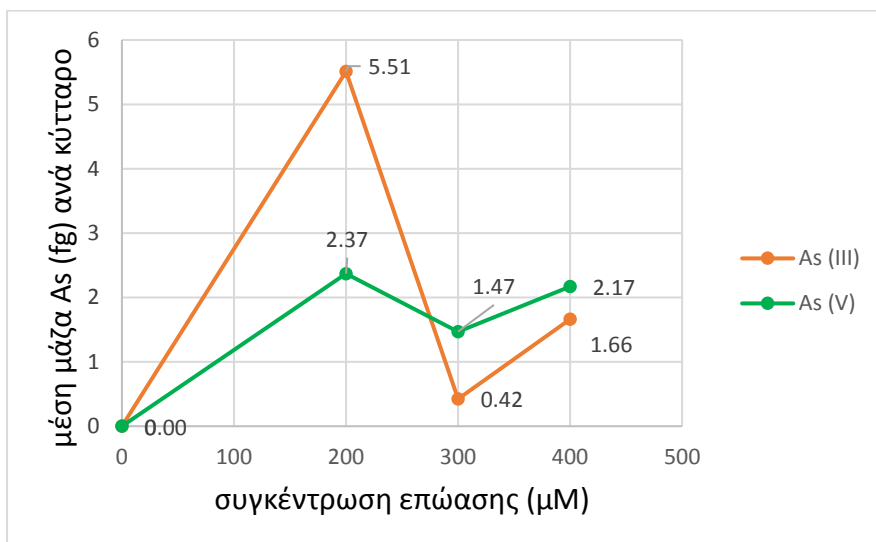
Γράφημα 112. Σύγκριση συστήματος HEN με Standard ως προς τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του διαλυτού Ca στα κυτταρικά αιωρήματα. Οι ετικέτες δεδομένων βοηθούν στην ανάγνωση του άξονα γ. Βρίσκονται πάνω από τα σημεία για το HEN και κάτω από αυτά για το Standard.

3.8.3 Σύγκριση της πρόσληψης As (III) και As (V) με τη μέθοδο SC ICP-MS και το HEN Introduction System

Αναφορικά με τη σύγκριση των κυττάρων επωασμένων σε As (III) και As (V) για τις ίδιες συγκεντρώσεις επώασης, ο υψηλότερος αριθμός cell events As (V) (Γράφημα 113) και η υψηλότερη μέση μάζα As (V) ανά κύτταρο (Γράφημα 114) υποδηλώνει τη μεγαλύτερη προτίμηση των *Chlamydomonas reinhardtii* προς το As (V) έναντι του As (III). Πιο συγκεκριμένα, παρατηρούμε ότι η μέση μάζα As (V) ανά κύτταρο είναι κατά περίπου 3 και 1.5 φορές υψηλότερη από αυτήν του As (III) για τις συγκεντρώσεις επώασης των 300 και 400 μM As. Τα κύτταρα επωασμένα σε 200 μM As(III) και As (V) σημειώνουν χαμηλότερους αριθμούς cell events σε σχέση με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις επώασης (300, 400 μM As). Οπότε η υψηλότερη μέση μάζα As (III) και As (V) που επιδεικνύουν έναντι των υψηλότερων συγκεντρώσεων επώασης As (III) και As (V), δεν μπορεί να ληφθεί σαν αντιπροσωπευτική ένδειξη της πρόσληψης των δύο ενώσεων As από τα κύτταρα. Αναφορικά με τα κύτταρα επωασμένα σε 300 μM As, ο αριθμός των events είναι λίγο υψηλότερος για το As (III) σε σχέση με το As (V). Αυτό όμως αντισταθμίζεται από την σχεδόν 3 φορές χαμηλότερη μέση μάζα As ανά κύτταρο των κυττάρων επωασμένων σε As (III) σε σχέση με αυτή που επιδεικνύουν τα κύτταρα επωασμένα σε As (V). Με βάση το παραπάνω, συμπεραίνουμε ότι αν και τα κύτταρα ξεκινούν να προσλαμβάνουν As (III) και As (V) ήδη από τη συγκέντρωση των 200 μM, αντιπροσωπευτική εικόνα της πρόσληψης των δύο ενώσεων λαμβάνεται κατά το σχηματισμό κατανομών As(III) και As(V), δηλαδή στις υψηλές συγκεντρώσεις επώασης των 300 και 400 μM.

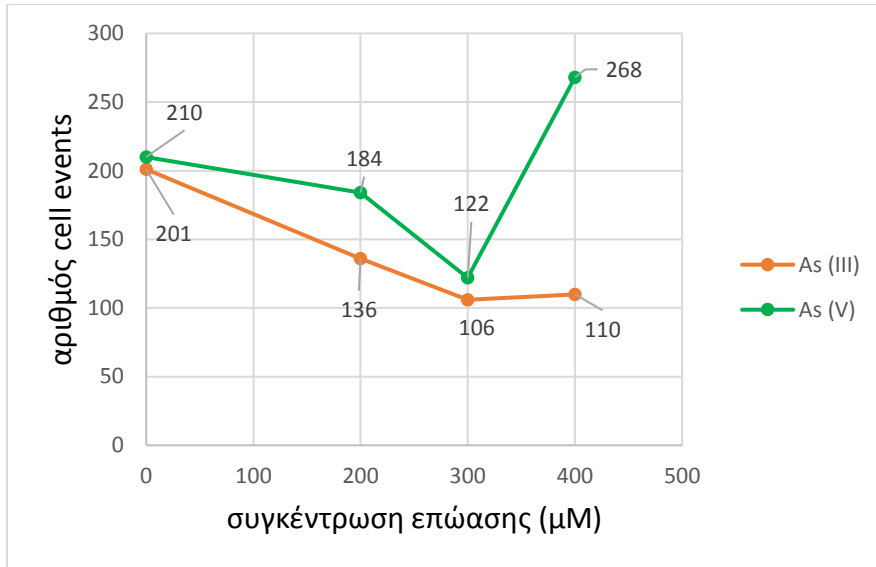


Γράφημα 113. Συγκεντρωτικό γράφημα σύγκρισης κυττάρων επωασμένων σε As (III) και As (V) δείχνοντας πως μεταβάλλεται ο αριθμός των cell events As συναρτήσει της συγκέντρωσης επώασης, όπως προέκυψε από την ανάλυση με το HEN introduction system. Οι αριθμοί cell events είναι κανονικοποιημένοι για όγκο εισαγωγής 0.2 mL. Οι ετικέτες δεδομένων διευκολύνουν στην ανάγνωση του άξονα γ. Ο αριθμός των events έχει μετατραπεί σε events/min.

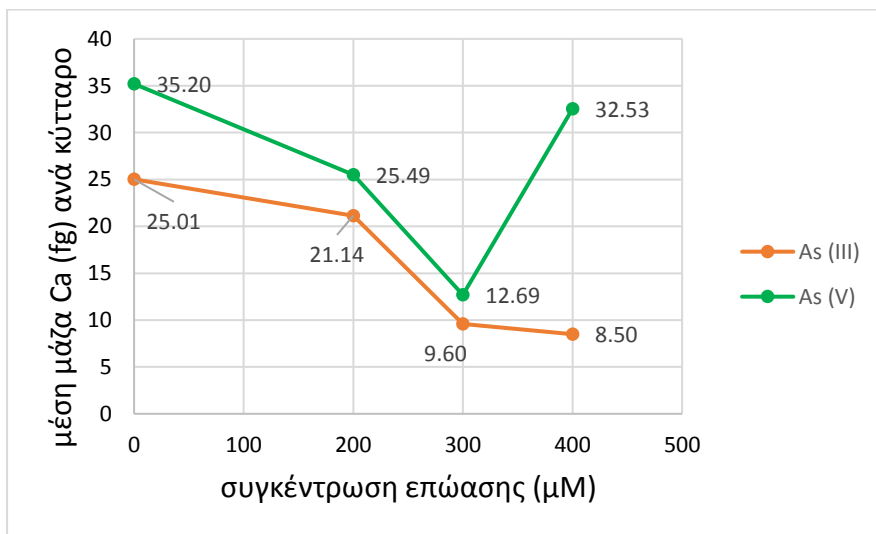


Γράφημα 114. Συγκεντρωτικό γράφημα σύγκρισης κυττάρων επωασμένων σε As (III) και As (V) δείχνοντας πως μεταβάλλεται η μέση μάζα As ανά κύτταρο συναρτήσει της συγκέντρωσης επώασης. Οι ετικέτες δεδομένων διευκολύνουν στην ανάγνωση του άξονα γ.

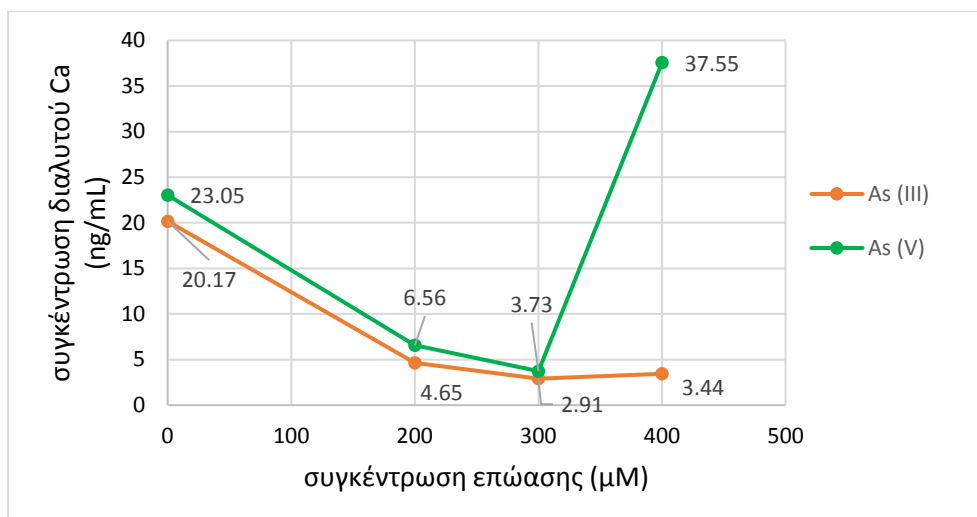
Στα Γραφήματα 115 και 116 παρουσιάζεται η σύγκριση των κυττάρων επωασμένων σε As (III) και As (V) ως προς τα επίπεδα Ca (αριθμός cell events, μέση μάζα Ca ανά κύτταρο). Ο αριθμός των cell events Ca και η μέση μάζα Ca ανά κύτταρο δείχνουν να εξαρτώνται άμεσα από τη συγκέντρωση του εξωκυττάρου διαλυτού Ca στο κυτταρικό αιώρημα (Γράφημα 117) καθώς επιδεικνύουν όμοια τάση. Αυτό επιβεβαιώνει περαιτέρω το συμπέρασμα ότι το περισσότερο Ca εντοπίζεται στο τοίχωμα του κυττάρου κι όχι στο εσωτερικό του, όπως έδειξε το πλύσιμο των κυττάρων με EDTA (ενότητα 3.4.5).



Γράφημα 115. Συγκεντρωτικό γράφημα σύγκρισης κυττάρων επωασμένων σε As (III) και As (V) δείχνοντας πως μεταβάλλεται ο αριθμός των cell events Ca συναρτήσει της συγκέντρωσης επώασης, όπως προέκυψε από την ανάλυση με το HEN introduction system. Οι ετικέτες δεδομένων διευκολύνουν στην ανάγνωση του άξονα y. Οι αριθμοί cell events είναι κανονικοποιημένοι για όγκο εισαγωγής 0.2 mL. Βρίσκονται πάνω από τα σημεία για τη σειρά του As (V) και κάτω από αυτά για τη σειρά του As (III).



Γράφημα 116. Συγκεντρωτικό γράφημα σύγκρισης κυττάρων επωασμένων σε As (III) και As (V) δείχνοντας πως μεταβάλλεται η μέση μάζα Ca ανά κύτταρο συναρτήσει της συγκέντρωσης επώασης, όπως προέκυψε από την ανάλυση με το HEN introduction system. Οι ετικέτες δεδομένων διευκολύνουν στην ανάγνωση του άξονα y. Βρίσκονται πάνω από τα σημεία για τη σειρά του As (V) και κάτω από αυτά για τη σειρά του As (III).



Γράφημα 117. Συγκεντρωτικό γράφημα σύγκρισης κυττάρων επωασμένων σε As (III) και As (V) δείχνοντας πως μεταβάλλεται η συγκέντρωση διαλυτού Ca συναρτήσει της συγκέντρωσης επώασης, όπως προέκυψε από την ανάλυση με το HEN introduction system. Οι ετικέτες δεδομένων διευκολύνουν στην ανάγνωση του άξονα y. Βρίσκονται πάνω από τα σημεία για τη σειρά του As (V) και κάτω από αυτά για τη σειρά του As (III).

3.8.4 Αποτελέσματα από τους υπολογισμούς ισοζυγίου μάζας για τον προσδιορισμό As και Ca σε κύτταρα επωασμένα σε As (V) με το HEN introduction system.

Παρατηρείται αρκετά καλή συμφωνία μεταξύ των δύο τεχνικών, δεδομένο που ενισχύει περαιτέρω την αξιοπιστία του SC ICP-MS ως τεχνική. Η υψηλότερη μάζα As (V) ανά κύτταρο στα control cells 3/7 σε σχέση με αυτά που επώαστηκαν σε As (V) (Πίνακας 31) είναι απόρροια της μέτρησης των false positive κορυφών λόγω του ότι η συγκέντρωση του εξωκυττάρου διαλυτού As (V) βρίσκεται στα όρια ανίχνευσης του οργάνου.

Πίνακας 31. Υπολογισμοί ισοζυγίου μάζας As για τα *Chlamydomonas reinhardtii* επωασμένα σε 200, 300 και 400 μM As(V) και για τα control cells 3/7. Ο συμβολισμός – υποδηλώνει ότι η τιμή ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης, ενώ το n.d (not determined) ότι δεν προσδιορίστηκε.

Chlamydomonas reinhardtii επωασμένα σε As (V) (μM)	SC-ICP-MS			Conventional ICP-MS Ολικό As (fg)	Recovery %
	Ενδοκυττάριο As (fg)	Εξωκυττάριο As(V) (fg)	Ολικό As (fg)		
Control	4.01E+03	-	4.01E+03	1.01E+03	339.4
200	1.38E+03	1.52E+04	1.66E+04	2.15E+04	77.3
300	1.30E+03	1.78E+04	1.91E+04	2.39E+04	79.7
400	3.08E+03	5.54E+04	5.85E+04	6.49E+04	90.0

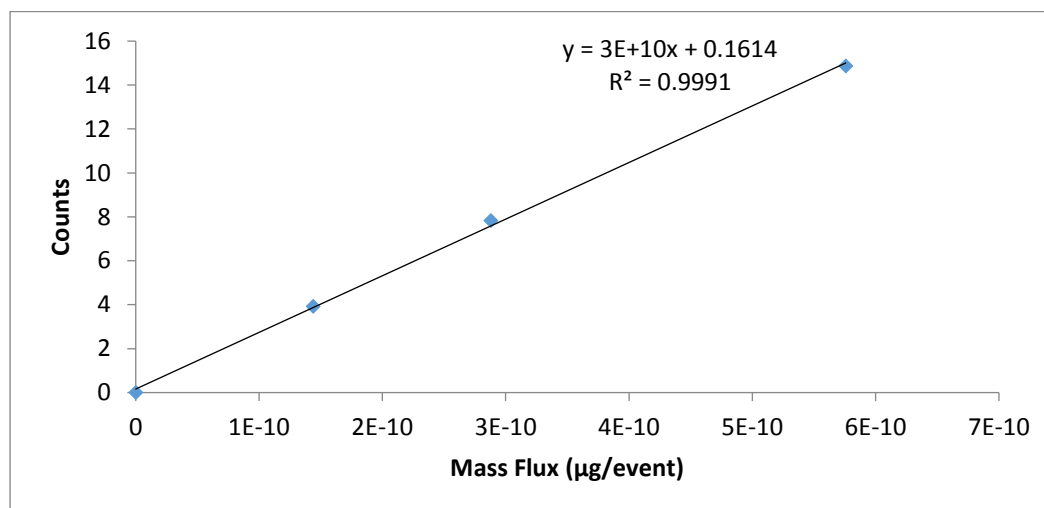
Πίνακας 32. Υπολογισμοί ισοζυγίου μάζας Ca για τα *Chlamydomonas reinhardtii* επωασμένα σε 200, 300 και 400 μM As(V) και για τα control cells 3/7.

Chlamydomonas reinhardtii επωασμένα σε As (V) (μM)	SC-ICP-MS			Conventional ICP-MS Ολικό Ca (fg)	Recovery %
	Ενδοκυττάριο Ca (fg)	Εξωκυττάριο Ca (fg)	Ολικό Ca (fg)		
Control	3.47E+04	2.28E+06	2.31E+06	2.98E+06	77.70
200	1.98E+04	6.48E+05	6.68E+05	9.31E+05	71.75
300	9.95E+03	3.69E+05	3.78E+05	4.13E+05	91.62
400	3.68E+04	3.71E+06	3.75E+06	4.15E+06	90.25

3.9 Ανάλυση κυττάρων επωασμένα σε Cd με το Standard Introduction System

3.9.1 Προσδιορισμός Cd σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard introduction system

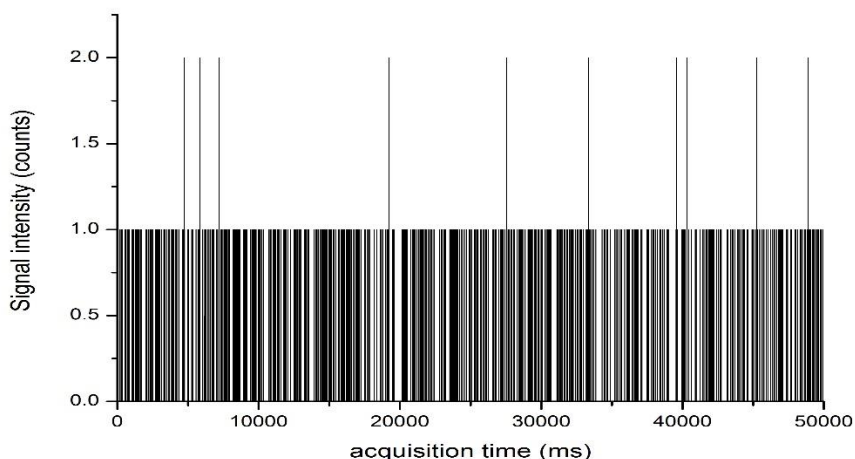
Συνδυάζοντας την καμπύλη βαθμονόμησης για το διαλυτό Cd και της TE% που προσδιορίστηκε, προέκυψε η καμπύλη συσχέτισης της έντασης ^{114}Cd με την απόλυτη μάζα του Cd που εισέρχεται και ανιχνεύεται ανά 50 μs {mass flux Cd ($\mu\text{g}/50 \mu\text{s}$)} (Γράφημα 118).



Γράφημα 118. Καμπύλη συσχέτισης της έντασης (counts) ^{114}Cd με το Mass Flux Cd ($\mu\text{g}/50 \mu\text{s}$) με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard Introduction System.

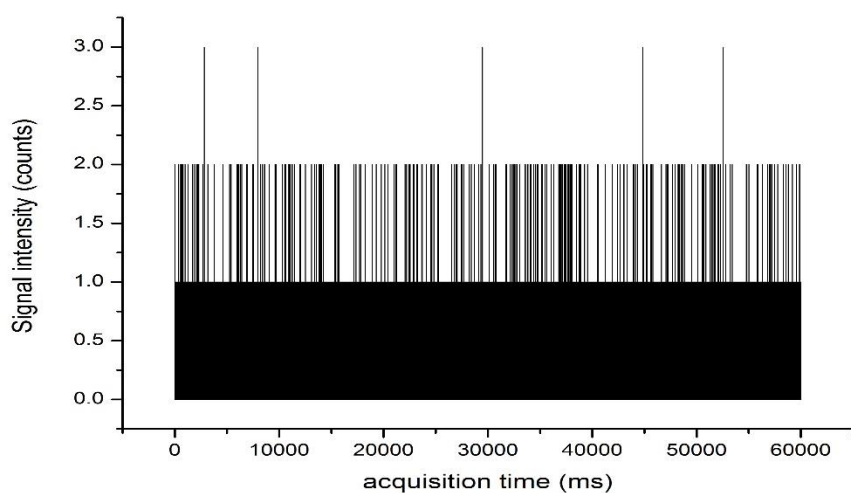
Για τον προσδιορισμό Cd στα κύτταρα επωασμένα σε Cd, αναλύθηκε το κυτταρικό δείγμα control cells new. Αυτό δεν εμφάνισε κάποια ένδειξη παρουσίας κυτταρικού ή διαλυτού εξωκυττάρου Cd. Οι εξαιρετικά χαμηλές τιμές της έντασης του σήματος (Γράφημα 119) οφείλονται στο σήμα του υποβάθρου για το m/z 114 και όχι στον κυτταρικό ή διαλυτό εξωκυττάριο Cd. Εντάσεις των 1, 2 counts δεν αντιστοιχούν σε cell events καθώς έχουν διάρκεια 1 data point ($\leq 50 \mu\text{s}$). Έτσι αν και το λογισμικό

(Nano Syngistix, PE) μετρά 817 κορυφές, αυτές δεν είναι τίποτε άλλο παρά false positives λόγω της μη κανονικής κατανομής του υποβάθρου σήματος.

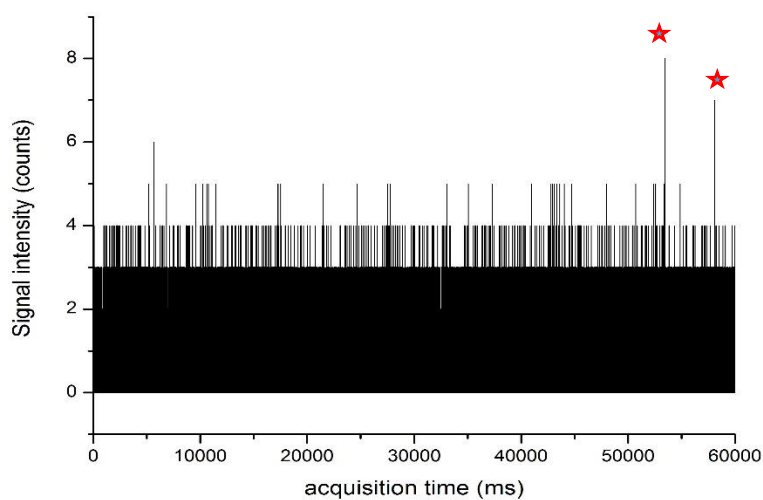


Γράφημα 119. Καταγραφή έντασης σήματος ^{114}Cd για τα control cells new με τη μέθοδο SC ICP-MS και το Standard Introduction System για πάροδο 50 s.

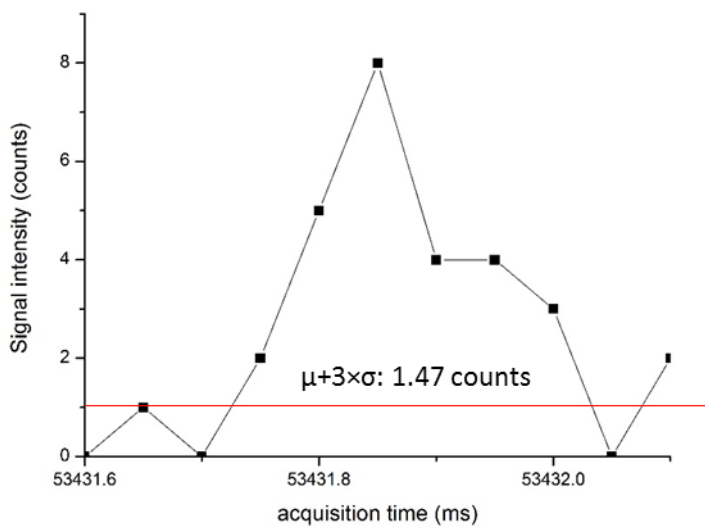
Περνώντας στην ανάλυση των κυττάρων επωασμένων σε Cd, τα κύτταρα επωασμένα σε 0.36 και 3.64 ppm Cd επέδειξαν παρόμοια εικόνα με αυτή των control cells new (Γραφήματα 120, 121). Πιο συγκεκριμένα, κατά την ανάλυση των κυττάρων επωασμένων σε 3.64 ppm Cd, το λογισμικό ανιχνεύει 415 κορυφές, η πλειοψηφία των οποίων αντιστοιχούν σε false positives. Ο αριθμός των false positives είναι χαμηλότερος σε σχέση με τον αντίστοιχο αριθμό των control cells new διότι η συγκέντρωση του εξωκυττάριου διαλυτού Cd στα κύτταρα επωασμένα σε 3.64 ppm Cd προσδιορίζεται στα 0.0529 ng/mL σε αντίθεση με τα control new και τα κύτταρα επωασμένα σε 0.36 ppm Cd των οποίων η συγκέντρωση είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης. Όσο η ένταση της baseline αυξάνεται, τόσο μειώνονται τα false positives. Οι κορυφές που πιθανώς αντιστοιχούν σε cell events απαριθμούνται δύο (Γράφημα 121).



Γράφημα 120. Καταγραφή έντασης σήματος ^{114}Cd για τα κύτταρα επωασμένα σε 0.36 ppm Cd με τη μέθοδο SC ICP-MS και το Standard Introduction System για πάροδο 60 s.

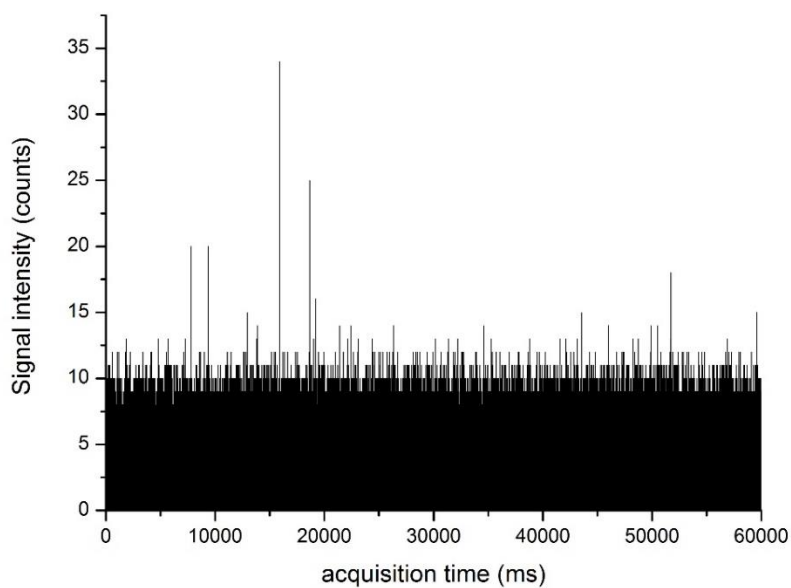


Γράφημα 121. Καταγραφή έντασης σήματος ^{114}Cd για τα κύτταρα επωασμένα σε 3.64 ppm Cd με τη μέθοδο SC ICP-MS και το Standard Introduction System για πάροδο 60 s. Τα events που αντιπροσωπεύουν κύτταρα σημαδεύονται με τον κόκκινο αστερίσκο.

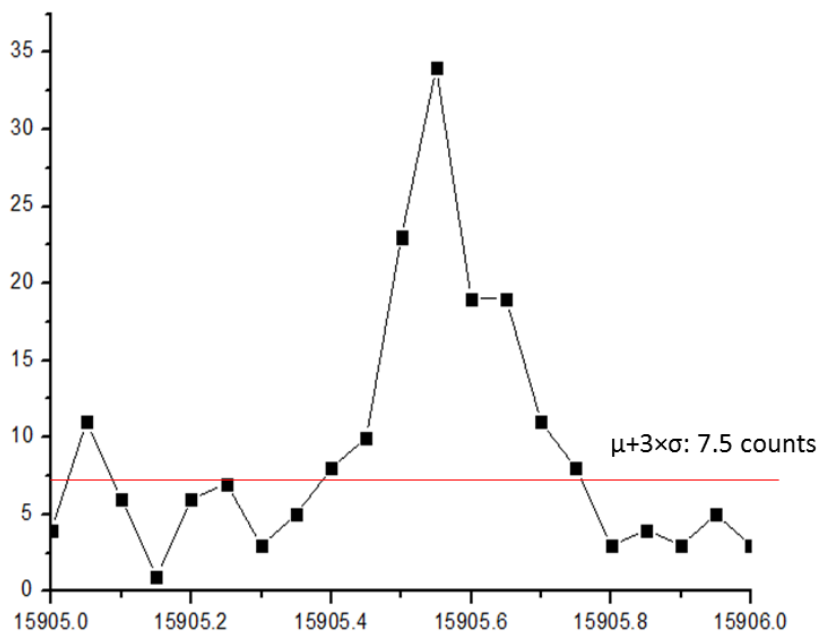


Γράφημα 122. Προφίλ σημαδεμένου cell event του γραφήματος 121 που πιθανόν αντιπροσωπεύει κύτταρο. Η χρονική διάρκεια του παλμού είναι περίπου 250 μ s. Η baseline ($\mu+3\sigma$) αποτελεί το όριο πάνω από το οποίο υπάρχουν τα data points που ορίζουν cell events.

Αναφορικά με τον προσδιορισμό Cd στα κύτταρα επωασμένα σε 7.29 ppm Cd, τα cell events απαριθμούνται 8. Η ένταση της baseline είναι υψηλότερη (7.5 counts) σε σχέση με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις επώασης (1.47 counts, κύτταρα επωασμένα σε 3.64 ppm Cd), που σημαίνει ότι τα false positives ελαχιστοποιούνται. Παρόλλα αυτά, ο αριθμός των cell events είναι πολύ χαμηλός για τον σχηματισμό κάποιας κατανομής. Εστιάζοντας σε μεμονωμένα cell events (Γράφημα 123), παρατηρούμε ότι η τυπική διάρκεια τους είναι 350 μ s (Γράφημα 124), σε αντίθεση με τη διάρκεια που παρατηρήθηκε για τα δύο κορυφές που ανιχνεύθηκαν κατά την ανάλυση των κυττάρων επωασμένων σε 3.64 ppm Cd (Γράφημα 122). Εφόσον ο αριθμός των cell events είναι χαμηλός, είναι δύσκολο να αποφανθούμε για την πραγματική διάρκεια των cell events Cd. Περαιτέρω πληροφορίες για τη διάρκεια των cell events Cd μπορούμε να αντλήσουμε κατά την ανάλυση των δεδομένων δειγμάτων με το HEN Introduction System.



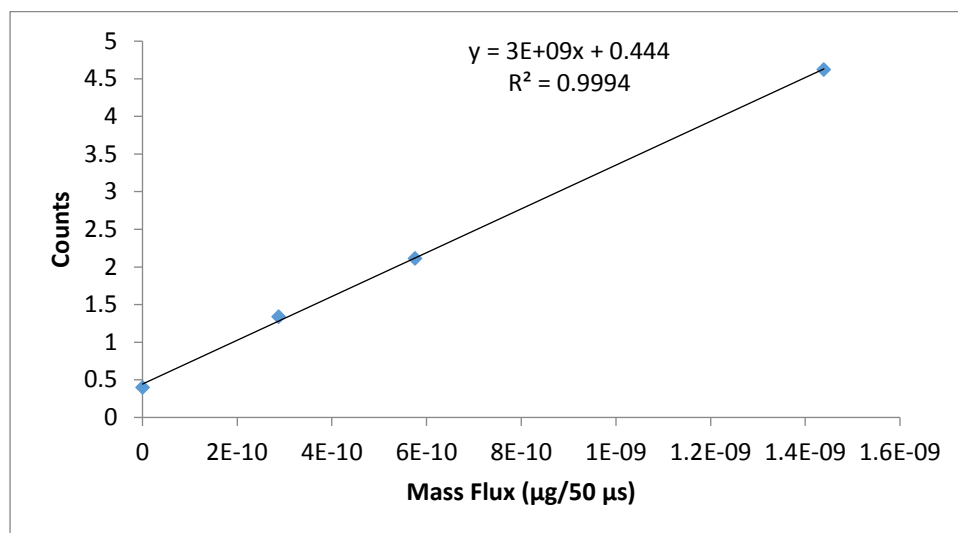
Γράφημα 123. Καταγραφή έντασης σήματος ^{114}Cd για τα κύτταρα επωασμένα σε 7.29 ppm Cd με τη μέθοδο SC ICP-MS και το Standard Introduction System για πάροδο 60 s.



Γράφημα 124. Προφίλ ενός cell event Cd από την καταγραφή της έντασης ^{114}Cd για τα κύτταρα επωασμένα σε 7.29 ppm Cd. Η χρονική διάρκεια του παλμού είναι περίπου 350 μs . Η baseline ($\mu+3\sigma$) αποτελεί το όριο πάνω από το οποίο υπάρχουν τα data points που ορίζουν cell events.

3.9.2 Προσδιορισμός Ca σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard introduction system

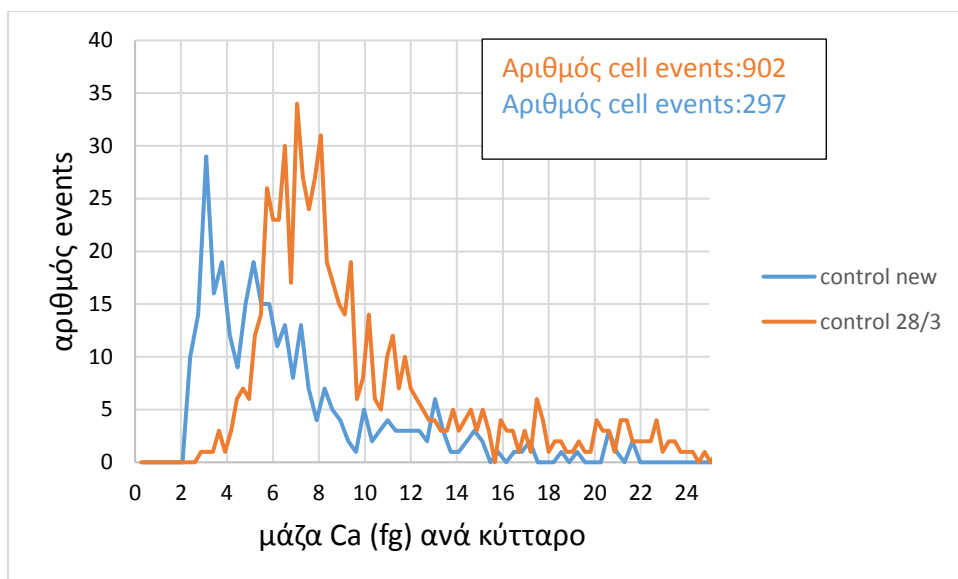
Συνδυάζοντας την καμπύλη βαθμονόμησης για το διαλυτό Ca και της TE% που προσδιορίστηκε, προέκυψε η καμπύλη συσχέτισης της έντασης ^{44}Ca με την απόλυτη μάζα του Ca που εισέρχεται και ανιχνεύεται ανά 50 μs {mass flux Ca($\mu\text{g}/50 \mu\text{s}$)} (Γράφημα 125).



Γράφημα 125. Καμπύλη συσχέτισης της έντασης του σήματος (counts) με το Mass Flux ($\mu\text{g}/50 \mu\text{s}$) του ^{44}Ca με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard Introduction System.

Για την ανάλυση των κυττάρων επωασμένων σε συγκεντρώσεις Cd ως προς το περιεχόμενό τους σε Ca, αναλύθηκε ως control δείγμα τα control cells new. Το ιστόγραμμα μάζας Ca ανά κύτταρο για τα control cells new αντιπαρατίθεται με το ιστόγραμμα μάζας Ca ανά κύτταρο για τα control cells 28/3 (Γράφημα 126), χάριν σύγκρισης των αποτελεσμάτων της μεθόδου SC ICP-MS για το ίδιο κυτταρικό δείγμα με το Standard Introduction System.

Όπως προκύπτει από το Γράφημα 126, η κατανομή Ca για τα control cells new είναι μετατοπισμένη προς χαμηλότερα fg Ca. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το προσδιορισμό χαμηλότερης μάζας Ca ανά κύτταρο για τα control cells new σε σχέση με τα control cells 28/3. Δεδομένου ότι η συγκέντρωση του εξωκυττάριου διαλυτού Ca προσδιορίζεται 33.6 και 47 ng/mL για τα control new και control 28/3 αντίστοιχα, η μετατόπιση προς κατανομής Ca για τα control cells new προς χαμηλότερα fg αποτελεί μία ακόμα ένδειξη ότι το Ca που εντοπίζεται στα κύτταρα είναι κατά κύριο λόγο προσροφημένο στο κυτταρικό τοίχωμα κι εξαρτάται από τη συγκέντρωση του εξωκυττάριου διαλυτού Ca.



Γράφημα 126 Ιστόγραμμα κατανομής Ca για control new και control 28/3 κύτταρα με το Standard introduction system SC ICP-MS. Ο χρόνος καταγραφής ήταν 1 min και ο όγκος εισαγωγής 1 mL.

Αναφορικά με τον προσδιορισμό Ca στα κύτταρα επωασμένα σε συγκεντρώσεις Cd, δεν παρουσιάζονται ιστογράμματα μάζας Ca ανά κύτταρο καθώς ο αριθμός των cell events Ca ήταν ελάχιστος. Πιο συγκεκριμένα, ο αριθμός των events που ανιχνεύονται είναι 10, 5 και 6 για τις συγκεντρώσεις επώασης των 0.36, 3.64 και 7.29 Cd αντίστοιχως, ενώ η συγκέντρωση του εξωκυττάρου διαλυτού Ca προσδιορίζεται στα 21.6, 13.9 και 7.2 ng/mL αντίστοιχα για τις προαναφερθείσες συγκεντρώσεις επώασης.

3.9.3 Αποτελέσματα από τους υπολογισμούς ισοζυγίου μάζας για τον προσδιορισμό Cd και Ca σε κύτταρα επωασμένα σε Cd με το Standard introduction system

Παρατηρείται αρκετά καλή συμφωνία μεταξύ των δύο τεχνικών (Πίνακες 33, 34), δεδομένο που ενισχύει περαιτέρω την αξιοπιστία του SC ICP-MS ως τεχνική. Η υψηλή μάζα Cd στα control cells new (Πίνακας 33) οφείλεται στον υπολογισμό των false positive λόγω της μη κανονικής κατανομής του σήματος του υποβάθρου. Για τα κύτταρα επωασμένα σε 3.64 ppm Cd η απόκλιση μεταξύ των δύο τεχνικών μάλλον δικαιολογείται αφού η συγκέντρωση εξωκυττάρου διαλυτού Cd είναι κοντά στο όριο ανίχνευσης του οργάνου.

Πίνακας 33. Υπολογισμοί ισοζυγίου μάζας Cd για τα *Chlamydomonas reinhardtii* επωασμένα σε 0.36, 3.64 και 7.29 ppm Cd και για τα control cells new. Ο συμβολισμός – υποδηλώνει ότι η τιμή ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης, ενώ το n.d (not determined) ότι δεν προσδιορίστηκε.

Chlamydomonas reinhardtii επωασμένα σε Cd (ppm)	SC-ICP-MS			Conventional ICP-MS Ολικό Cd (fg)	Recovery %
	Ενδοκυττάριο Cd(fg)	Εξωκυττάριο Cd (fg)	Ολικό Cd (fg)		
Control	9.52E+02	-	9.52E+02	-	nd
0.36	1.45E+04	-	1.45E+04	-	nd
3.64	1.89E+03	5.42E+04	5.61E+04	1.52E+05	37.0
7.29	3.45E+02	3.59E+06	3.59E+06	3.96E+06	90.7

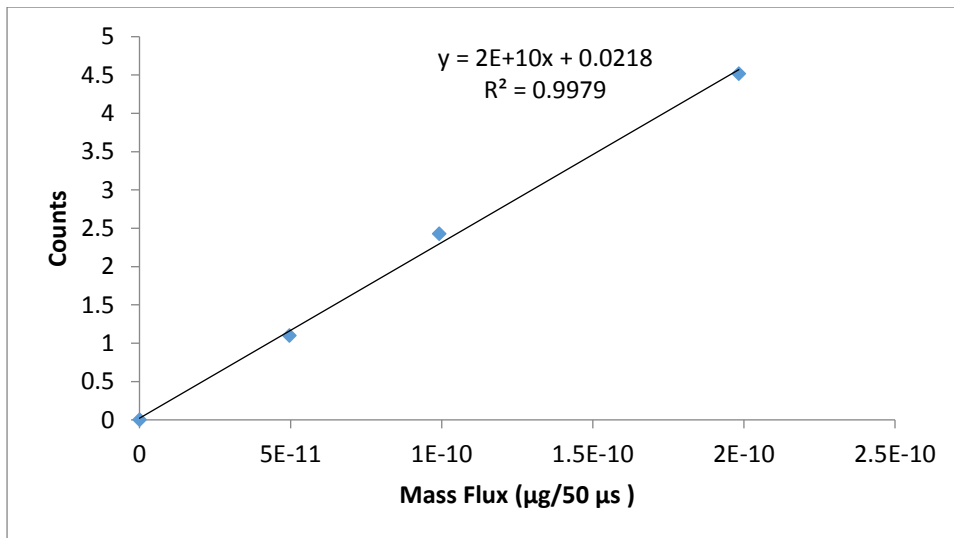
Πίνακας 34. Υπολογισμοί ισοζυγίου μάζας Ca για τα *Chlamydomonas reinhardtii* επωασμένα σε 0.36, 3.64 και 7.29 ppm Cd και για τα control cells new.

Chlamydomonas reinhardtii επωασμένα σε Cd (ppm)	SC-ICP-MS			Conventional ICP-MS Ολικό Ca (fg)	Recovery %
	Ενδοκυττάριο Ca(fg)	Εξωκυττάριο Ca (fg)	Ολικό Ca (fg)		
Control	5.67E+04	3.45E+07	3.45E+07	3.73E+07	92.55
0.36	2.61E+03	2.22E+07	2.22E+07	2.41E+07	91.92
3.64	7.75E+03	1.19E+06	1.20E+06	1.38E+06	86.62
7.29	2.40E+03	6.43E+05	6.46E+05	8.06E+05	80.10

3.10 Ανάλυση κυττάρων επωασμένα σε Cd με το HEN Introduction System

3.10.1 Προσδιορισμός Cd σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το HEN introduction system

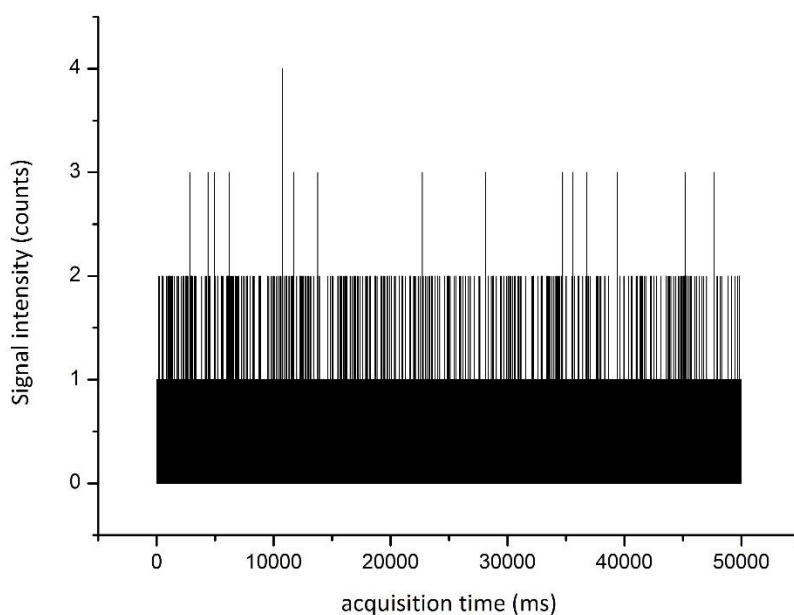
Κατά την εισαγωγή προτύπων διαλυμάτων Cd για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης παρατηρήθηκε μία εντονότερη διακύμανση της έντασης ^{114}Cd σε σχέση με τα στοιχεία As και Ca που προσδιορίστηκαν με το HEN Introduction System στις προηγούμενες ενότητες. Έτσι, ο χρόνος καταγραφής κάθε δείγματος αυξήθηκε στα 3 min με σκοπό την εξαγωγή πιο αντιπροσωπευτικών στατιστικών. Η καμπύλη συσχέτισης της έντασης ^{114}Cd με την απόλυτη μάζα Cd που εισέρχεται και ανιχνεύεται ανά 50 μs {mass flux Cd ($\mu\text{g}/50 \mu\text{s}$)} παρουσιάζεται στο Γράφημα 127.



Γράφημα 127. Καμπύλη συσχέτισης της έντασης του σήματος (counts) με το Mass Flux ($\mu\text{g}/50 \mu\text{s}$) του ^{114}Cd με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το HEN Introduction System.

Όπως και κατά την ανάλυση των κυττάρων επωασμένων σε Cd με το Standard Introduction System, ως control κυτταρικό δείγμα αναλύθηκαν τα control cells new. Αυτό δεν εμφάνισε κάποια ένδειξη παρουσίας κυτταρικού ή διαλυτού εξωκυττάριου Cd. Οι εξαιρετικά χαμηλές τιμές της έντασης του σήματος (Γράφημα 128) οφείλονται στο σήμα του υποβάθρου για το m/z 114 και όχι στον κυτταρικό ή διαλυτό εξωκυττάριο Cd. Εντάσεις των 1, 2, 3 και 4 counts δεν αντιστοιχούν σε cell events καθώς έχουν διάρκεια 1 data point ($\leq 50 \mu\text{s}$). Έτσι αν και το λογισμικό (Nano Syngistix, PE) μετρά 1780 κορυφές, αυτές δεν είναι τίποτε άλλο παρά false positives λόγω της μη κανονικής κατανομής του υποβάθρου σήματος.

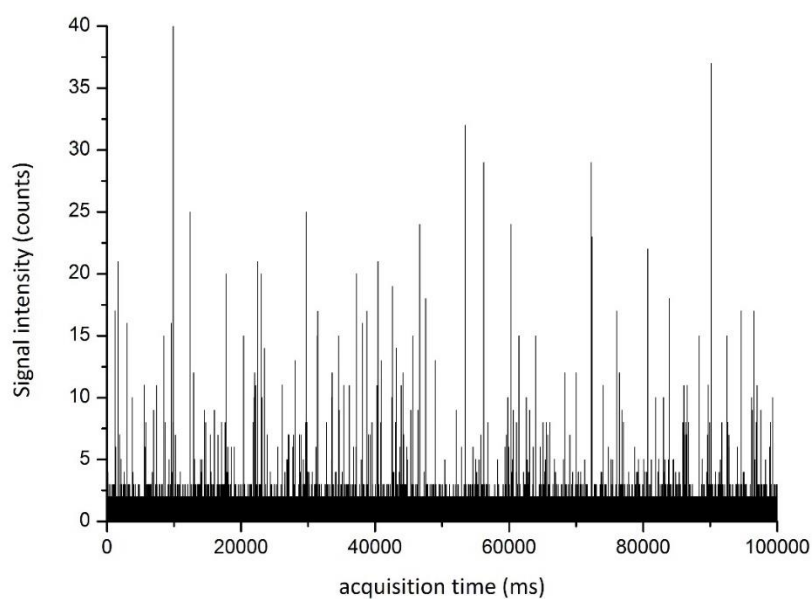
Ως προς τον προσδιορισμό Cd στα κύτταρα επωασμένα σε Cd, τα κύτταρα επωασμένα σε 0.36 ppm Cd δεν εμφάνισαν κάποια ένδειξη κυτταρικού ή εξωκυττάριου διαλυτού Cd, όπως συνέβει και κατά την ανάλυση του ίδιου δείγματος με το Standard Introduction System.



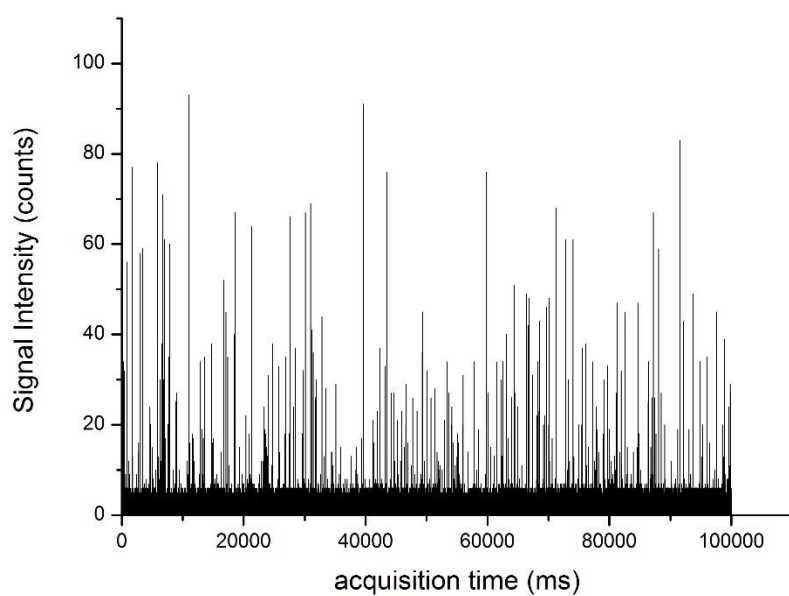
Γράφημα 128. Καταγραφή σήματος ^{114}Cd για τα control cells new με τη μέθοδο SC ICP-MS και το HEN Introduction System για πάροδο 50 s.

Στα Γραφήματα 129 και 130 παρουσιάζεται η καταγραφή της έντασης ^{114}Cd για τα κύτταρα επωασμένα σε 3.64 και 7.29 ppm Cd με το HEN Introduction System. Αξιοσημείωτο είναι ότι το HEN ανιχνεύει άφθονα σε ένταση cell events και για τις δύο συγκεντρώσεις επώασης σε αντίθεση με την ανάλυση των αντίστοιχων κυτταρικών δειγμάτων με το Standard Introduction System. Παρατηρείται ότι τα cell events έχουν υψηλότερη ένταση ^{114}Cd για τα κύτταρα επωασμένα σε 7.29 ppm, υποδηλώνοντας την πρόσληψη μεγαλύτερων ποσοτήτων Cd από τα κύτταρα.

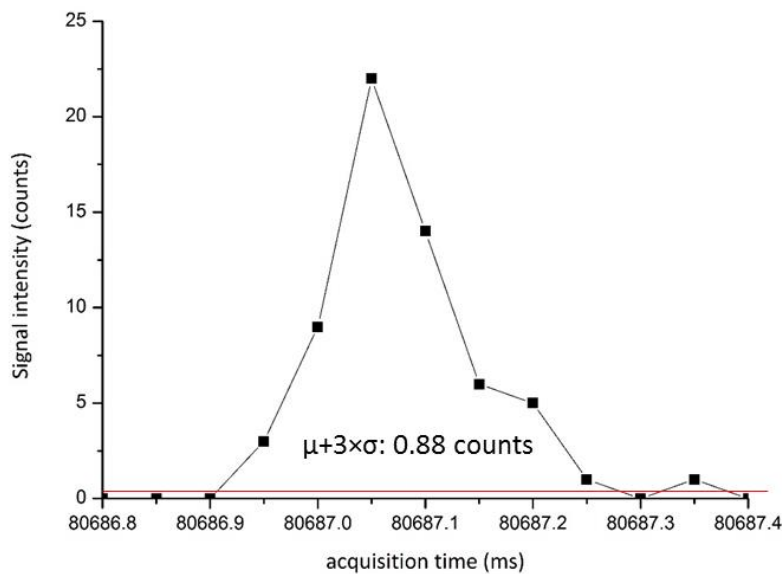
Εστιάζοντας σε μεμονωμένα cell events που απεικονίζονται στα Γραφήματα 129, 130 λαμβάνουμε μία εικόνα της χρονικής διάρκειας των cell events Cd με το HEN σύστημα εισαγωγής. Η τυπική διάρκεια των cell events είναι 300-350 μs (Γράφημα 131), και αυτή μπορεί να χαρακτηριστεί με περισσότερη βεβαιότητα απ' ό,τι κατά την ανάλυση των ίδιων κυτταρικών δειγμάτων με το Standard Introduction System καθώς τα cell events είναι αριθμητικά άφθονα.



Γράφημα 129. Καταγραφή σήματος ^{114}Cd για τα κύτταρα επωασμένα σε 3.64 ppm Cd με τη μέθοδο SC ICP-MS και το HEN Introduction System για πάροδο 100 s.



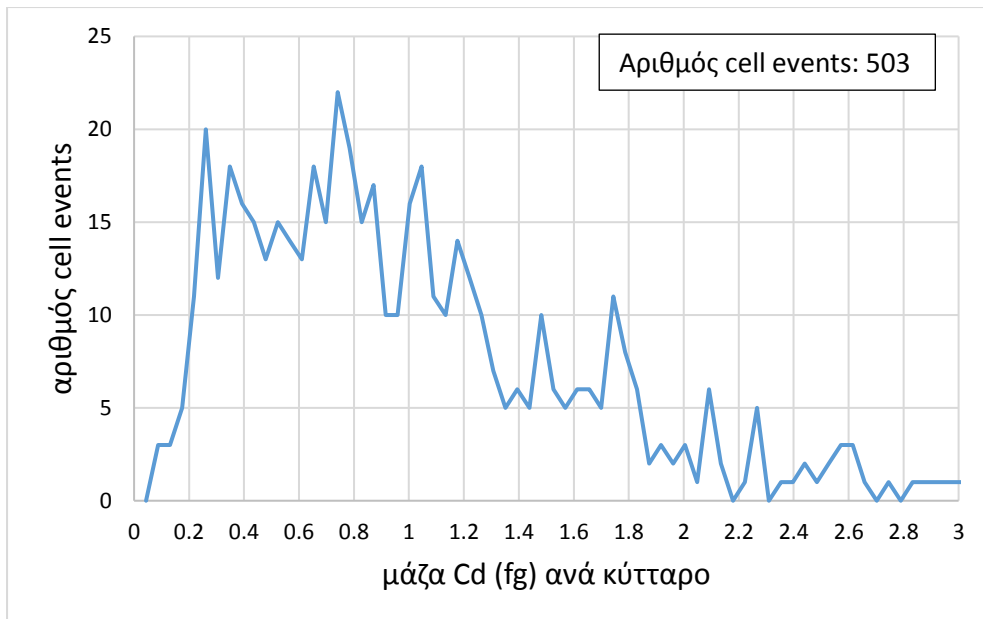
Γράφημα 130. Καταγραφή έντασης ^{114}Cd για τα κύτταρα επωασμένα σε 7.29 ppm Cd με τη μέθοδο SC ICP-MS και το HEN Introduction System για πάροδο 100 s.



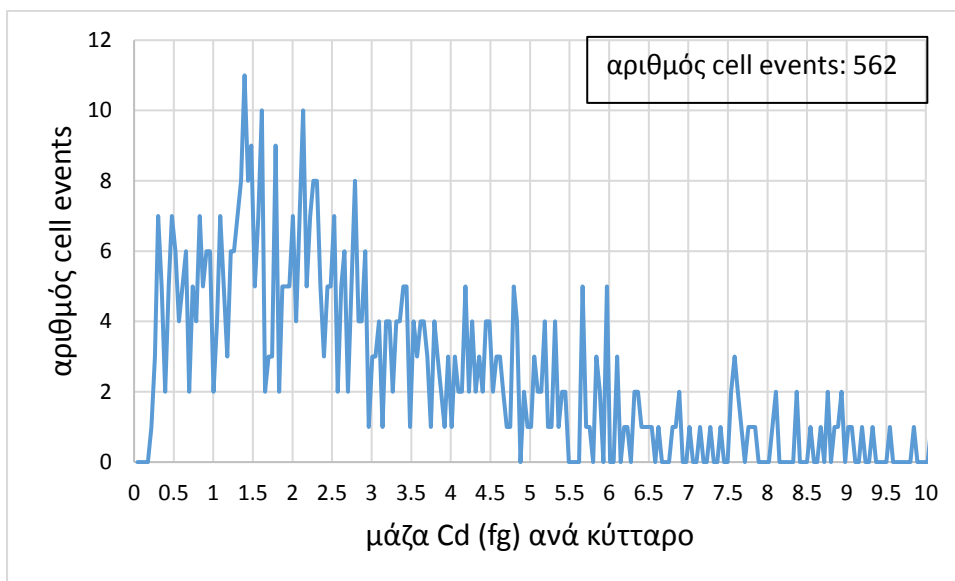
Γράφημα 131. Προφίλ ενός cell event Cd από την καταγραφή της έντασης ^{114}Cd για τα κύτταρα επωασμένα σε 7.29 ppm Cd. Η χρονική διάρκεια του παλμού είναι περίπου 350 μs . Η baseline ($\mu+3\sigma$) αποτελεί το όριο πάνω από το οποίο υπάρχουν τα data points που ορίζουν cell events.

Μέσω της σχετικής βαθμονόμησης, παράγονται τα ιστογράμματα μάζας Cd ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 3.64 και 7.29 ppm Cd. Αναφορικά με τα πρώτα (Γράφημα 132), η πλειοψηφία των cell events συγκεντρώνεται στην περιοχή των χαμηλών 0.2-1.8 fg Cd. Η μέση μάζα Cd ανά κύτταρο εντοπίζεται στα 0.88 fg.

Σχετικά με τα κύτταρα που επώαστηκαν σε 7.29 ppm Cd, το ιστόγραμμα μάζας Cd ανά κύτταρο (Γράφημα 133) διαφοροποιείται από το αντίστοιχο των κυττάρων επωασμένων σε 3.64 ppm Cd. Ενώ ο αριθμός των cell events που ανιχνεύονται διατηρήθηκε σταθερός, το εύρος μάζας που καλύπτει η κατανομή είναι μεγαλύτερο (0.5-6 fg Cd). Η συχνότητα εμφάνισης των cell events σε υψηλότερα fg Cd (>6 fg Cd) είναι χαμηλή και μάλλον τα δεδομένα cell events οφείλονται σε συσσωματώματα κυττάρων. Λόγω του ότι η κατανομή Cd στα κύτταρα της συγκέντρωσης επώασης των 7.29 ppm Cd σε σχέση με αυτήν της συγκέντρωσης των 3.64 ppm Cd είναι skewed προς υψηλότερες μάζες, η μέση μάζα Cd ανά κύτταρο αυξάνεται στα 2.5 fg.



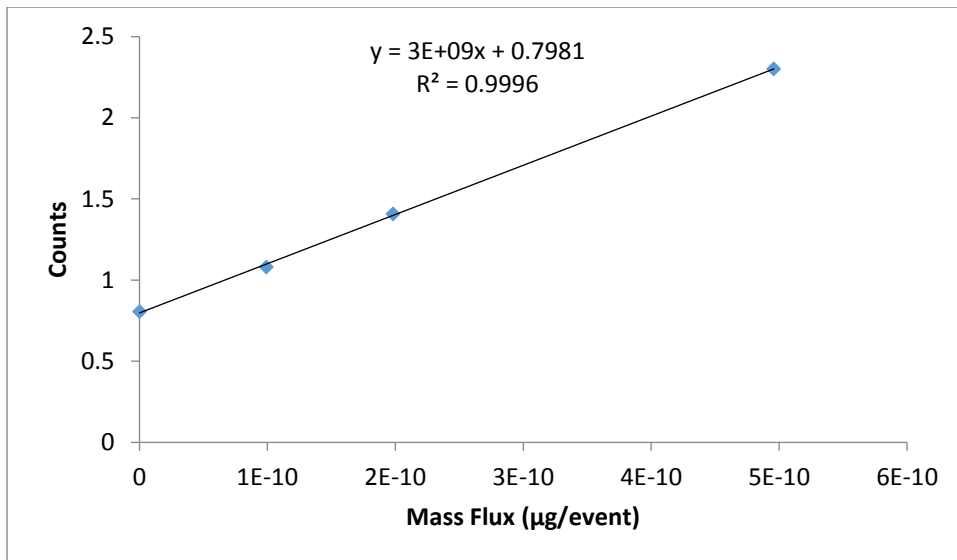
Γράφημα 132. Ιστόγραμμα μάζας Cd ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 3.64 ppm Cd με το HEN Introduction System SC ICP-MS. Η καταγραφή διήρκησε 3 min.



Γράφημα 133. Ιστόγραμμα μάζας Cd ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 7.29 ppm Cd με το HEN Introduction System SC ICP-MS. Η καταγραφή διήρκησε 3 min.

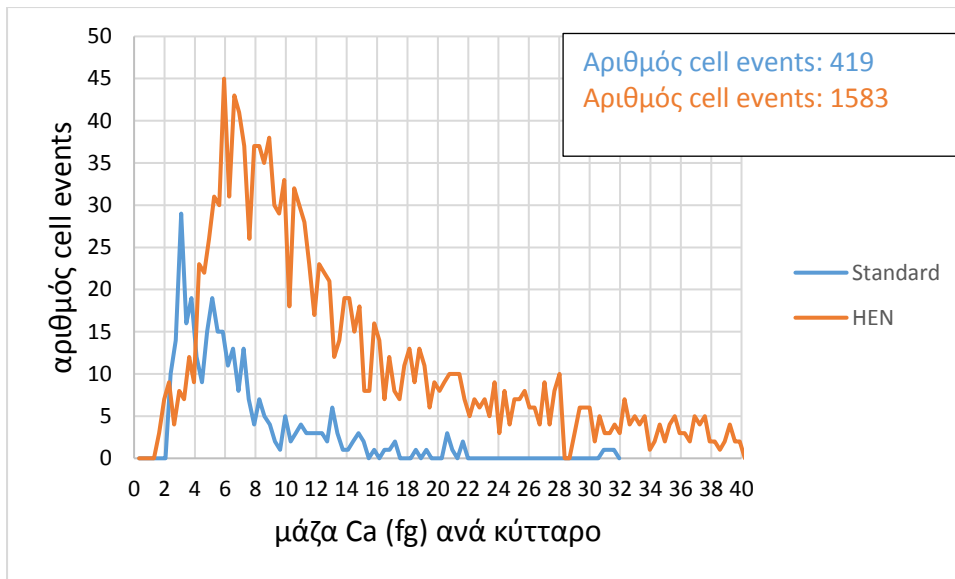
3.10.2 Προσδιορισμός Ca σε μεμονωμένα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το HEN Introduction System

Η καμπύλη συσχέτισης της έντασης (counts) ^{44}Ca με την απόλυτη μάζα Ca που εισέρχεται και ανιχνεύεται ανά 50 μs {mass flux Ca($\mu\text{g}/50 \mu\text{s}$)} παρουσιάζεται στο Γράφημα 134. Ο χρόνος καταγραφής κάθε κυτταρικού δείγματος διατηρήθηκε στα 3 min.



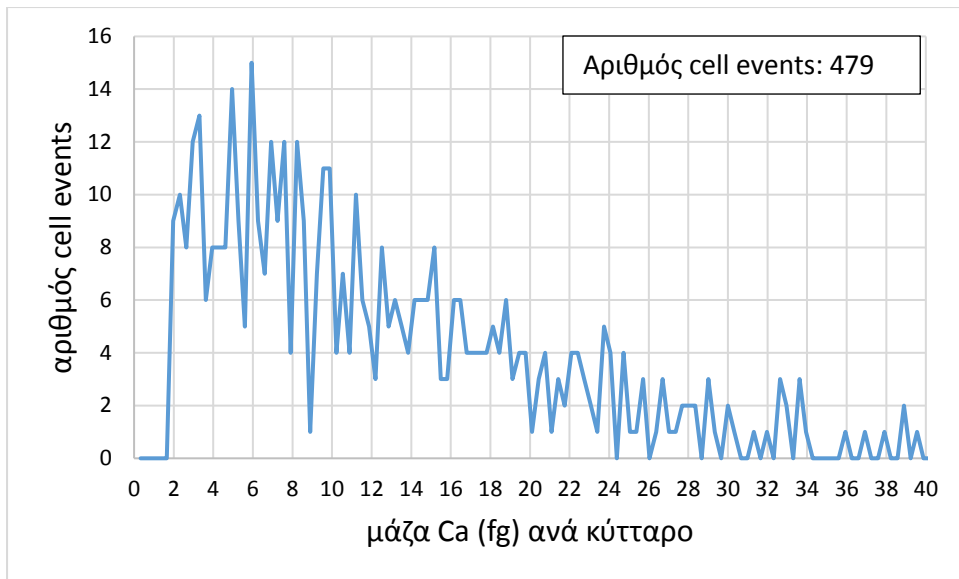
Γράφημα 134. Καμπύλη συσχέτισης της έντασης του σήματος (counts) με το Mass Flux ($\mu\text{g}/50 \mu\text{s}$) του ^{44}Ca με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το HEN Introduction System.

Στο Γράφημα 135 αντιπαρατίθενται τα ιστογράμματα μάζας Ca ανά κύτταρο για τα control cells new, όπως αυτά εξήχθησαν με το HEN και το Standard Introduction System. Η κατανομή της μάζας του Ca στα κύτταρα, όπως εξάγεται με το HEN σύστημα εισαγωγής, είναι μετατοπισμένη προς υψηλότερα fg. Επίσης παρατηρείται η ανίχνευση περισσότερων cell events που αντιστοιχούν σε υψηλή μάζα Ca (22-40 fg) και τα οποία δεν ανιχνεύονται με το Standard Introduction System. Η μετατόπιση της κατανομής Ca, που προκύπτει με το HEN Introduction System, προς υψηλότερα fg έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της προσδιοριζόμενης μέσης μάζας Ca ανά κύτταρο στα 15.53 fg έναντι των 6.43 fg που προκύπτει με το Standard. Ως προς τον αριθμό των cell events, αυτός είναι εξαιρετικά υψηλότερος για το HEN Introduction System ιδιαίτερα αν αυτός κανονικοποιηθεί για τον ίδιο όγκο εισαγωγής. Αν κανονικοποιήσουμε τον αριθμό των cell events για όγκο εισαγωγής 1 mL/min και για τα δύο συστήματα εισαγωγής, τότε έχουμε 5276 και 419 cell events για το HEN και το Standard Introduction System αντίστοιχα.

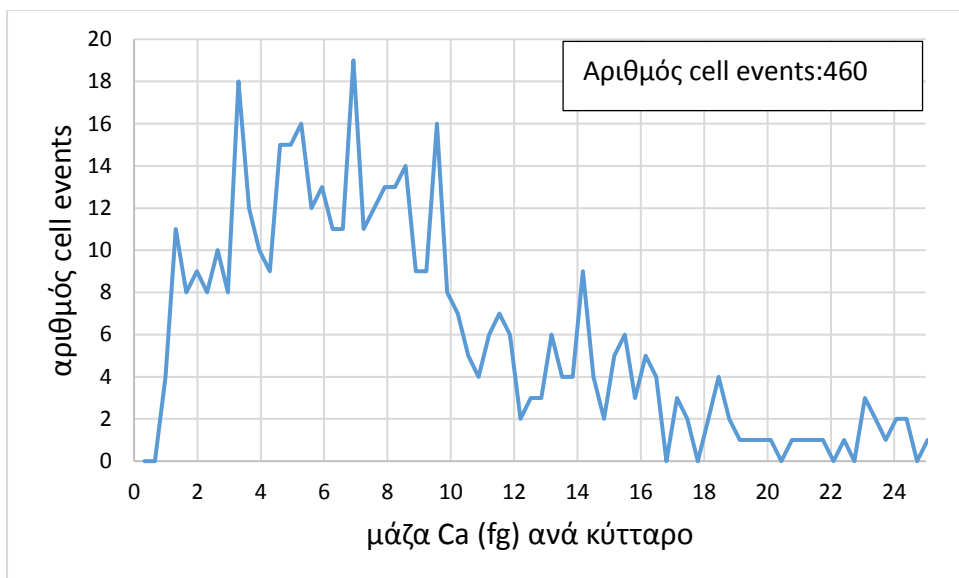


Γράφημα 135. Κατανομή Ca ανά κύτταρο στα control new cells με HEN και Standard Introduction System. Ο χρόνος καταγραφής ήταν 1 και 3 min για το Standard και HEN introduction system αντίστοιχα. Οι αριθμοί cell events δεν είναι κανονικοποιημένοι και προκύπτουν από όγκους εισαγωγής 0.3 και 1 mL για το HEN και Standard Introduction System αντίστοιχα.

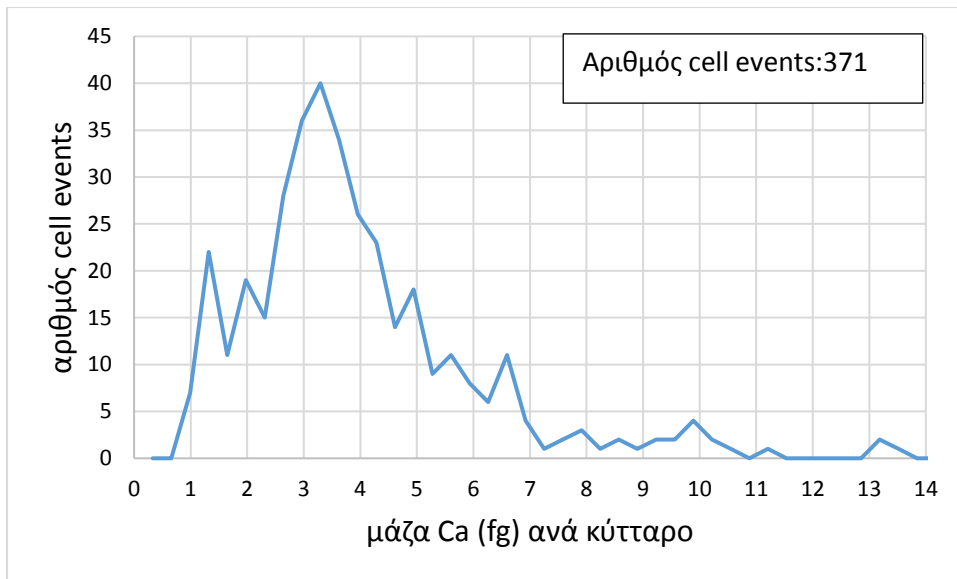
Στα Γραφήματα 136, 137 και 138 παρουσιάζονται τα ιστογράμματα μάζας Ca ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα στις τρεις συγκεντρώσεις Cd. Μεταξύ των τριών ιστογραμμάτων παρατηρείται η μείωση του εύρους μάζας που καλύπτουν οι κατανομές Ca με την αύξηση της συγκέντρωσης επώασης σε Cd. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της μέσης μάζας Ca ανά κύτταρο καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση επώασης σε Cd. Επιπλέον, στα ιστογράμματα μάζας Ca ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 3.64 και 7.29 ppm Cd (Γραφήματα 137, 138) διακρίνουμε την ανίχνευση cell events που αντιστοιχούν σε μάζα Ca χαμηλότερη των 2 fg η οποία αποτελούσε την αρχή των κατανομών για τα control cells new και τα κύτταρα επωασμένα σε 0.36 ppm Cd. Δεδομένου ότι η συγκέντρωση του εξωκυττάριου διαλυτού Ca ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσης, τα δεδομένα cell events (<2 fg Ca) αποτελούν false positives (Γράφημα 139) λόγω της μη κανονικής κατανομής του σήματος του υποβάθρου για το ^{114}Cd .



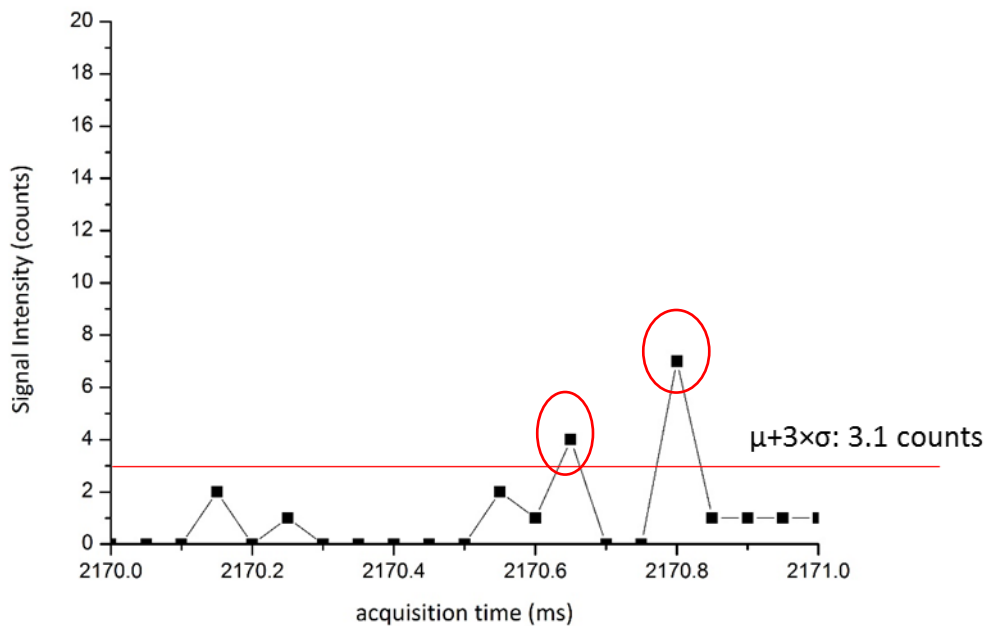
Γράφημα 136. Ιστόγραμμα μάζας Ca ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 0.36 ppm Cd με το HEN Introduction System SC ICP-MS. Ο χρόνος καταγραφής ήταν 3 min.



Γράφημα 137. Ιστόγραμμα μάζας Ca ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 3.64 ppm Cd με το HEN Introduction System SC ICP-MS Introduction System. Ο χρόνος καταγραφής ήταν 3 min.



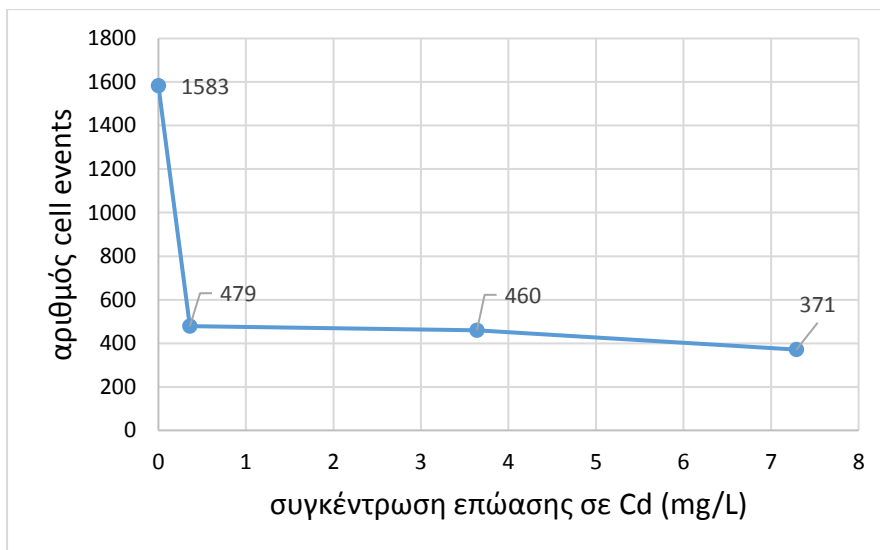
Γράφημα 138. Ιστόγραμμα μάζας Ca ανά κύτταρο για τα κύτταρα επωασμένα σε 7.29 ppm Cd με το HEN Introduction System SC ICP-MS. Ο χρόνος καταγραφής ήταν 3 min.



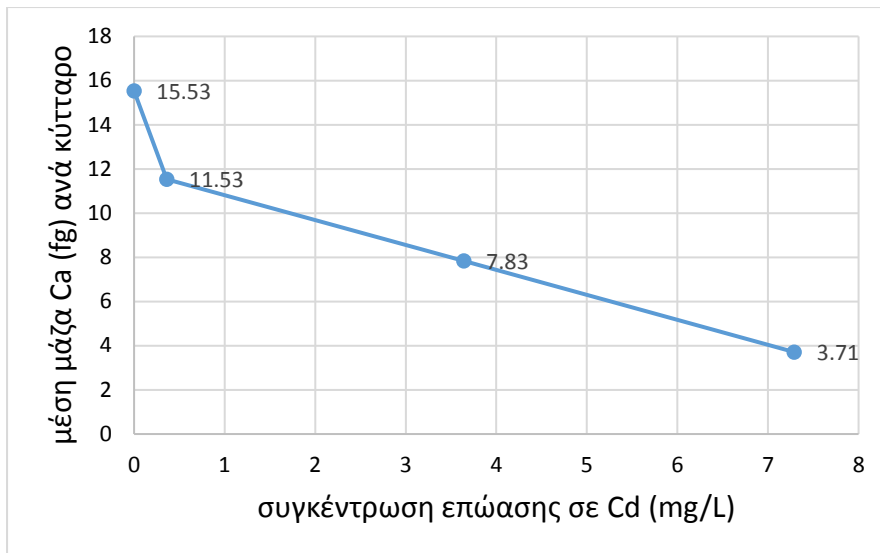
Γράφημα 139. Καταγραφή έντασης ^{44}Ca για τα κύτταρα επωασμένα σε 7.29 ppm Cd με τη μέθοδο SC ICP-MS και το HEN Introduction System. Το γράφημα είναι αποτέλεσμα εστίασης στην χρονική κλίμακα για εμφάνιση των false positives.

Στα Γραφήματα 140, 141 και 142 γίνεται μία συνολική σύγκριση των control cells new και των κυττάρων επωασμένων σε Cd ως προς τον αριθμό cell events, τη μέση μάζα Ca ανά κύτταρο και τη συγκέντρωση του εξωκυττάρου διαλυτού Ca. Τα cell events Ca μειώνονται κατά την επώαση των κυττάρων σε συγκεντρώσεις Cd, όμως παραμένουν σχετικά σταθερά μεταξύ των κυττάρων των τριών

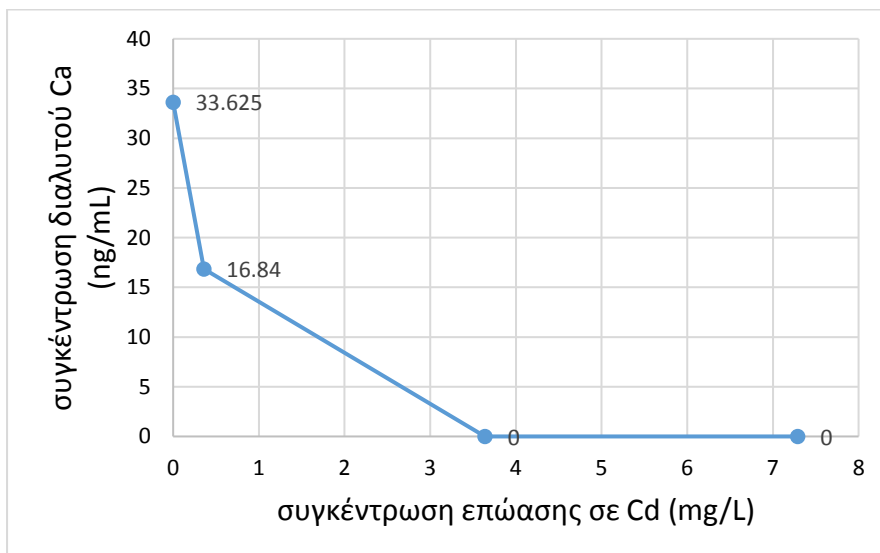
συγκεντρώσεων επώασης σε Cd. Η πτωτική τάση της μέσης μάζας Ca ανά κύτταρο (Γράφημα 141) προτείνει μία αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων Ca και της επώασης των κυττάρων σε Cd. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο συναγωνισμό μεταξύ των ιόντων δισθενούς Cd και Ca ως προς την κατάληψη θέσεων στο κυτταρικό τοίχωμα των κυττάρων, όπως συμβαίνει με την περίπτωση των ιόντων δισθενούς Pb και Ca. Εφόσον όμως δεν πραγματοποιήθηκε κατεργασία των κυττάρων με χηλικό αντιδραστήριο (EDTA) για περαιτέρω διερεύνηση του φαινομένου, το παραπάνω αποτελεί εικασία. Με τα υπάρχοντα δεδομένα όμως, ο αριθμός των cell events και η μέση μάζα Ca ανά κύτταρο επιδεικνύουν όμοιες πτωτικές τάσεις με τη συγκέντρωση του εξωκυττάρου διαλυτού Ca, υποστηρίζοντας περαιτέρω το ότι το Ca υφίσταται στο κυτταρικό τοίχωμα. Η απουσία συγκέντρωσης εξωκυττάρου διαλυτού Ca για τα κύτταρα επωασμένα σε 3.64 και 7.29 ppm Ca είναι κάτι αναπάντεχο καθώς η ανάλυση των ίδιων κυτταρικών δειγμάτων με το Standard Introduction System έδειξε πως η συγκέντρωση του εξωκυττάρου διαλυτού Ca είναι πάνω από το όριο ανίχνευσης (13.9 και 7.2 ppb για τις συγκεντρώσεις επώασης των 3.64 και 7.29 ppm Cd).



Γράφημα 140. Συγκεντρωτικό διάγραμμα που δείχνει πως μεταβάλλεται ο αριθμός των cell events Ca συναρτήσει της συγκέντρωσης επώασης σε Cd, με το HEN Introduction System. Οι ετικέτες βοηθούν στην ανάγνωση του άξονα y. Ο αριθμός των cell events αντιστοιχεί σε όγκο εισαγωγής 0.3 ml.



Γράφημα 141. Συγκεντρωτικό διάγραμμα που δείχνει πως μεταβάλλεται η μέση μάζα Ca (fg) ανά κύτταρο συναρτήσει της συγκέντρωσης επώασης σε Cd με το HEN Introduction System. Οι ετικέτες βοηθούν στην ανάγνωση του άξονα y.



Γράφημα 142. Συγκεντρωτικό διάγραμμα που δείχνει πως μεταβάλλεται η συγκέντρωση του εξωκυττάριου διαλυτού Ca στα κυτταρικά αιωρήματα με το HEN Introduction System. Οι ετικέτες βοηθούν στην ανάγνωση του άξονα y. Τα μηδενικά σημεία συμβολίζουν τον αρνητικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης του διαλυτού Cd.

3.10.3 Αποτελέσματα από τους υπολογισμούς ισοζυγίου μάζας για τον προσδιορισμό Cd και Ca σε κύτταρα επωασμένα σε Cd με το HEN introduction system

Η μάζα Cd που προσδιορίζεται στα control cells new και στα κύτταρα επωασμένα σε 0.36 ppm Cd (Πίνακας 35) είναι αποτέλεσμα των false positives λόγω της μη κανονικής κατανομής του σήματος του υποβάθρου.

Το ισοζύγιο μάζας Ca (Πίνακας 36) δεν διατηρείται για τα κύτταρα επωασμένα σε 3.64 και 7.29 ppm λόγω αδυναμίας προσδιορισμού της συγκέντρωσης εξωκυττάριου διαλυτού Ca από το SC ICP-MS, που μπορεί να προέκυψε από κάποιο τυχαίο σφάλμα κατά την επεξεργασία των δεδομένων από το λογισμικό.

Πίνακας 35. Υπολογισμοί ισοζυγίου μάζας Cd για τα *Chlamydomonas reinhardtii* επωασμένα σε 0.36, 3.64 και 7.29 ppm Cd και για τα control cells new. Ο συμβολισμός – υποδηλώνει ότι η τιμή ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης, ενώ το n.d (not determined) ότι δεν προσδιορίστηκε.

Chlamydomonas reinhardtii επωασμένα σε Cd (ppm)	SC-ICP-MS			Conventional ICP-MS Ολικό Cd (fg)	Recovery %
	Ενδοκυττάριο Cd (fg)	Εξωκυττάριο Cd (fg)	Ολικό Cd (fg)		
Control	2.65E+02	-	2.65E+02	-	n.d
0.36	2.76E+03	-	2.76E+03	-	n.d
3.64	1.11E+03	2.31E+04	2.42E+04	1.32E+04	183.8
7.29	3.51E+03	3.28E+05	3.31E+05	3.44E+05	96.3

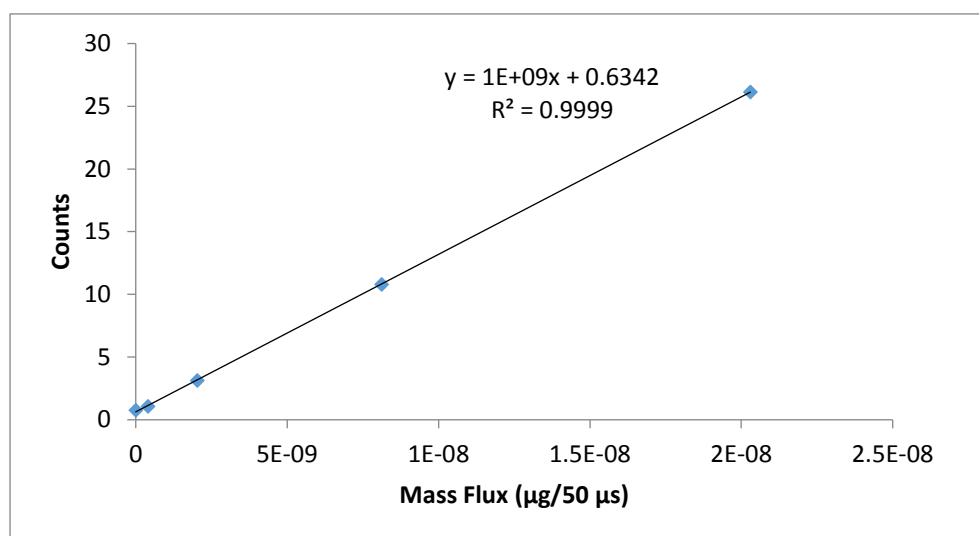
Πίνακας 36. Υπολογισμοί ισοζυγίου μάζας Ca για τα *Chlamydomonas reinhardtii* επωασμένα σε 0.36, 3.64 και 7.29 ppm Cd και για τα control cells new. Ο συμβολισμός – υποδηλώνει ότι η τιμή ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης.

Chlamydomonas reinhardtii επωασμένα σε Cd (ppm)	SC-ICP-MS			Conventional ICP-MS Ολικό Cd (fg)	Recovery %
	Ενδοκυττάριο Cd (fg)	Εξωκυττάριο Cd (fg)	Ολικό Cd (fg)		
Control	4.87E+04	2.99E+06	3.04E+06	2.94E+06	103.3
0.36	1.32E+04	1.50E+06	1.51E+06	1.68E+06	90.0
3.64	8.20E+03	-	8.20E+03	7.94E+05	1.0
7.29	3.13E+03	-	3.13E+03	6.84E+05	0.5

3.11 Ανάλυση δειγμάτων καλλιιεργειών *Chlamydomonas reinhardtii* για Θείο (S) και Φώσφορο (P) με DRC και Standard Introduction System

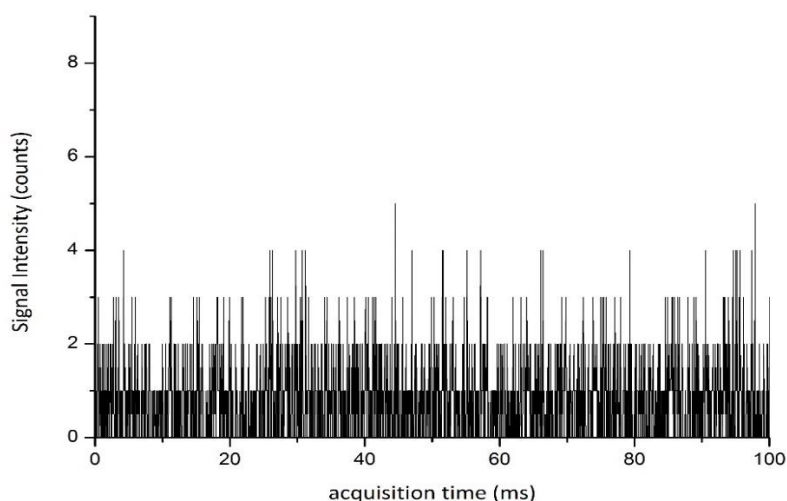
3.11.1 Προσδιορισμός S στα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS με DRC και Standard introduction system

Για την κατασκευή της καμπύλης συσχέτισης της έντασης ^{48}SO με το mass flux του S (Γράφημα 143), εισήχθησαν διαφορετικές συγκεντρώσεις προτύπων διαλυμάτων S και προσδιορίστηκε η TE με 60 nm Au NPs.



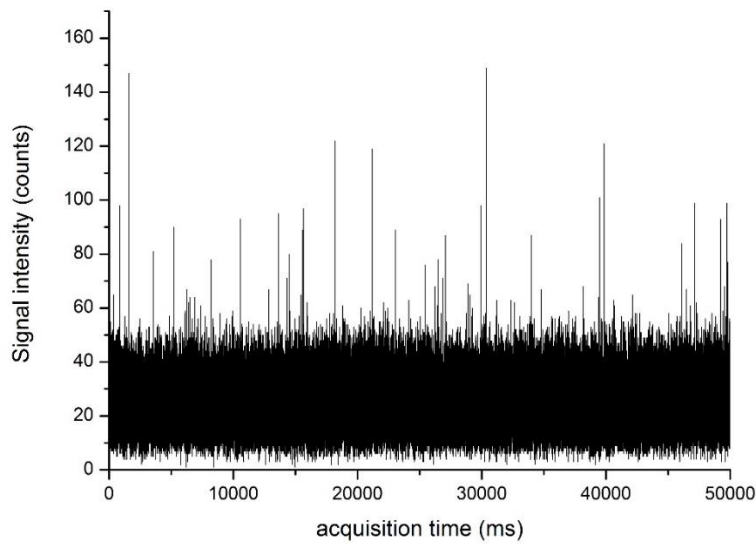
Γράφημα 143. Καμπύλη συσχέτισης της έντασης (counts) ^{48}SO με το Mass Flux S (μg/50 μs) με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard Introduction System.

Προκειμένου να εξασφαλίσουμε ότι το διάλυμα (0.1% NaCl), στο οποίο διασπείρουμε τα κύτταρα, δεν επιφέρει κάποια ενίσχυση στην ένταση του σήματος ^{48}SO σε σχέση με το υπερκάθαρο νερό που χρησιμοποιήσαμε ως τυφλό δείγμα για την καμπύλη βαθμονόμησης, καταγράφουμε την ένταση $^{48}\text{SO}^+$ για το 0.1% NaCl (Γράφημα 144). Πράγματι, το mean dissolved intensity που προσδιορίζεται είναι 0.78 counts σε σχέση με τα 0.76 counts που ελήφθησαν για το υπερκάθαρο νερό. Όπως προκύπτει από το Γράφημα 144, η ένταση ^{48}SO οφείλεται στο υπόβαθρο σήμα για το m/z 48, καθώς όλες οι μεταβολές αποτελούνται από μεμονωμένα data points (≤ 50 μs).

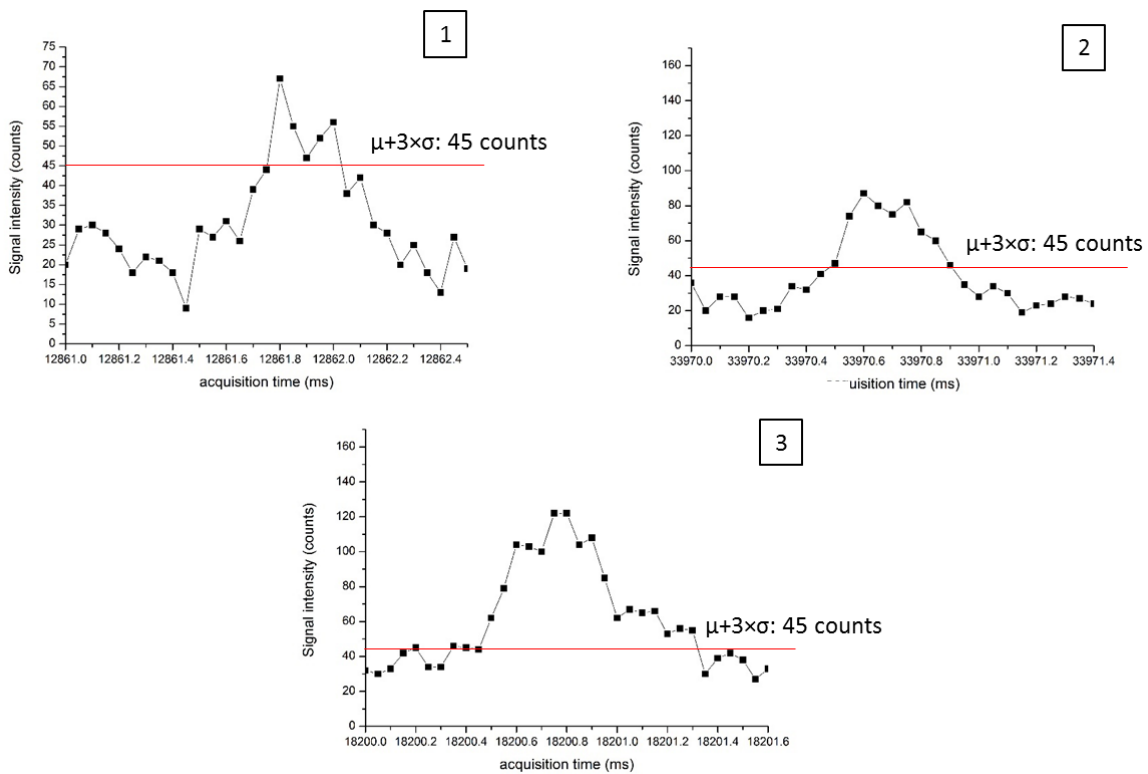


Γράφημα 144. Καταγραφή έντασης ^{48}SO στο διάλυμα 0.1% NaCl για 1 min με το Standard Introduction System SC ICP-MS. Η εικονιζόμενη καταγραφή αποτελεί τμήμα της καταγραφής για 100 ms.

Στο Γράφημα 145 παρουσιάζεται η καταγραφή της έντασης του ^{48}SO για τα control cells new. Εστιάζοντας σε μεμονωμένα cell events, λαμβάνουμε μία εικόνα της χρονικής διάρκειας αυτών. Η διάρκεια των cell events δεν μπορεί να καθοριστεί με βεβαιότητα, καθώς παρατηρούνται κορυφές με διάρκεια από 250-900 μs (γράφημα 146). Η πλειοψηφία των κορυφών υψηλής έντασης ορίζονται από 15-17 data points, δηλαδή αντιστοιχούν σε χρονική διάρκεια 750-850 μs. Εξαιτίας όμως του ότι η συγκέντρωση του διαλυτού S, που προσδιορίζεται στα 462 ng/mL, είναι πολύ υψηλή, υπάρχει η περίπτωση κύτταρα με χαμηλότερη ποσότητα S να επισκιάζονται από την υψηλή συγκέντρωση του εξωκυττάριου διαλυτού S ή να είναι παραλίγο ανιχνεύσιμα (κορυφή 1, Γράφημα 146). Έτσι, στερούμαστε της δυνατότητας να γνωρίζουμε αν τα S cell events που ανιχνεύονται είναι μεμονωμένα κύτταρα ή συσσωματώματα κυττάρων και να αποκτήσουμε μία αντιπροσωπευτική εικόνα της διάρκειας των S cell events.

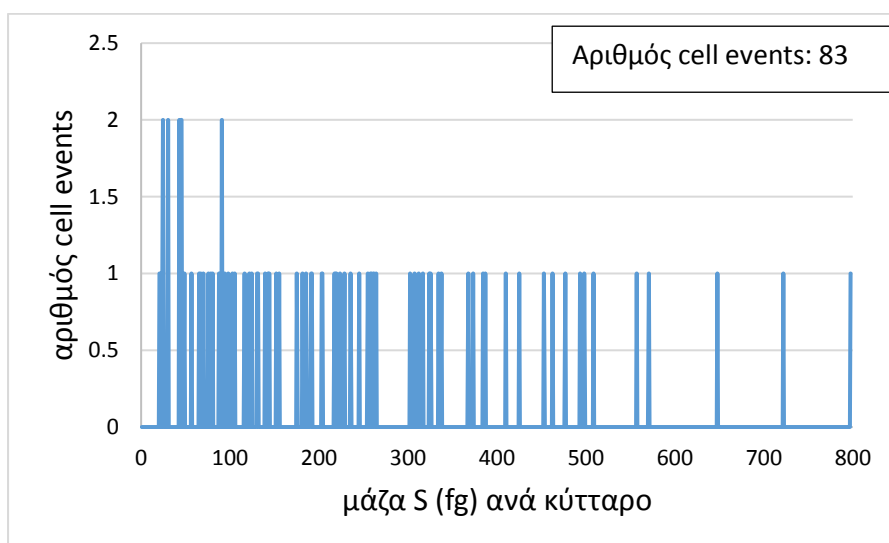


Γράφημα 145. Καταγραφή έντασης ^{48}SO για τα control cells για 50 s με το Standard Introduction System SC ICP-MS.



Γράφημα 146. Προφίλ κορυφών που αντιστοιχούν σε cell event S με διάρκεια 250, 400, 900 μs . Η baseline ($\mu+3\sigma$: 45 counts) αποτελεί το όριο πάνω από το οποίο βρίσκονται τα data points που ορίζουν cell events

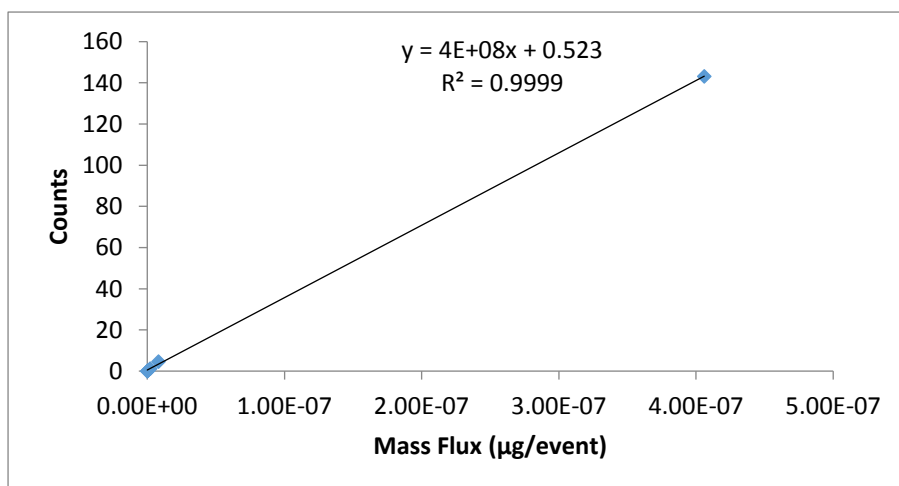
Αν και ανιχνεύθηκαν 83 cell events για S, αυτά δεν δημιουργούν κάποια κατανομή καθώς διασπείρονται σε μεγάλο εύρος μαζών (Γράφημα 147).



Γράφημα 147. Ιστόγραμμα μάζας S ανά κύτταρο για τα control cells new με το Standard introduction system SC ICP-MS.

3.11.2 Προσδιορισμός P στα κύτταρα με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard introduction system

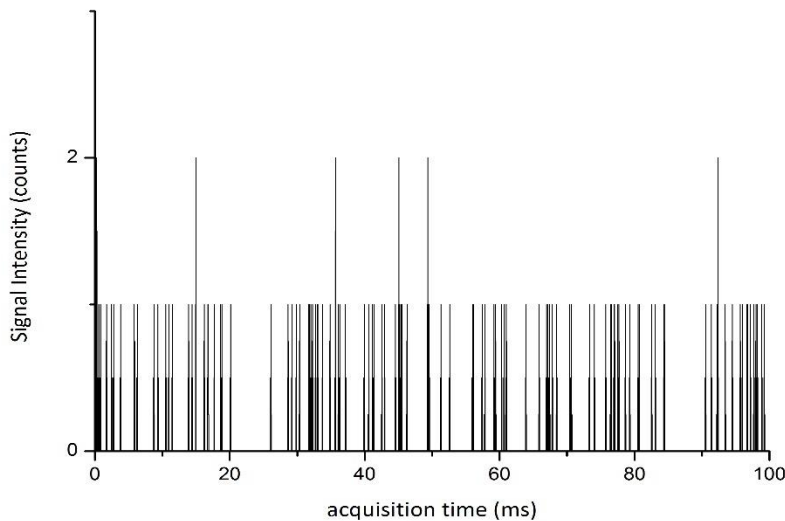
Για την κατασκευή της καμπύλης συσχέτισης της έντασης του ^{47}PO με την απόλυτη μάζα P (Γράφημα 148), εισήχθησαν διαφορετικές συγκεντρώσεις προτύπων διαλυμάτων P και προσδιορίστηκε η TE με 60nm Au NPs.



Γράφημα 148. Καμπύλη συσχέτισης της έντασης (counts) ^{31}P με το Mass Flux P ($\mu\text{g}/50 \mu\text{s}$) με τη μέθοδο του SC ICP-MS και το Standard Introduction System.

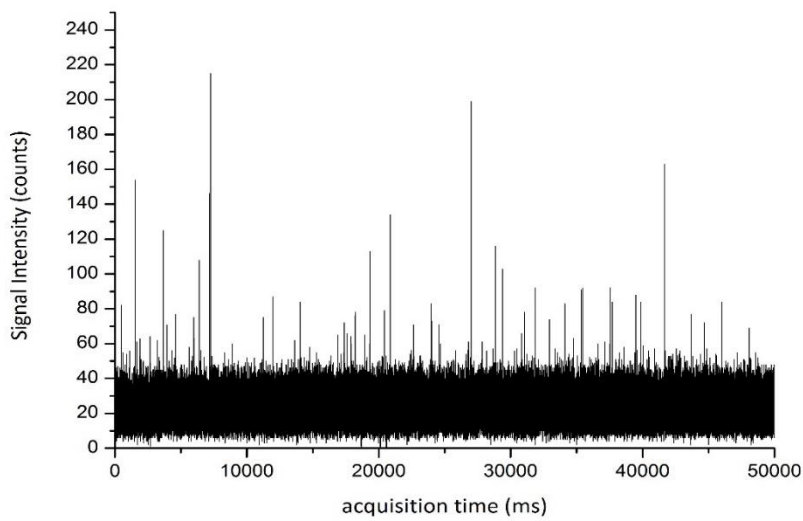
Προκειμένου να εξασφαλίσουμε ότι το διάλυμα (0.1% NaCl), στο οποίο διασπείρουμε τα κύτταρα, δεν επιφέρει κάποια ενίσχυση στην ένταση του σήματος ^{47}PO σε σχέση με το υπερκάθαρο νερό που χρησιμοποιήσαμε ως τυφλό δείγμα για την καμπύλη βαθμονόμησης, καταγράφουμε την ένταση ^{47}PO

για το 0.1% NaCl . Όπως προκύπτει από το Γράφημα 149, η ένταση ^{78}PO οφείλεται στο υπόβαθρο σήμα, καθώς όλες οι μεταβολές αποτελούνται από μεμονωμένα data points ($\leq 50 \mu\text{s}$).

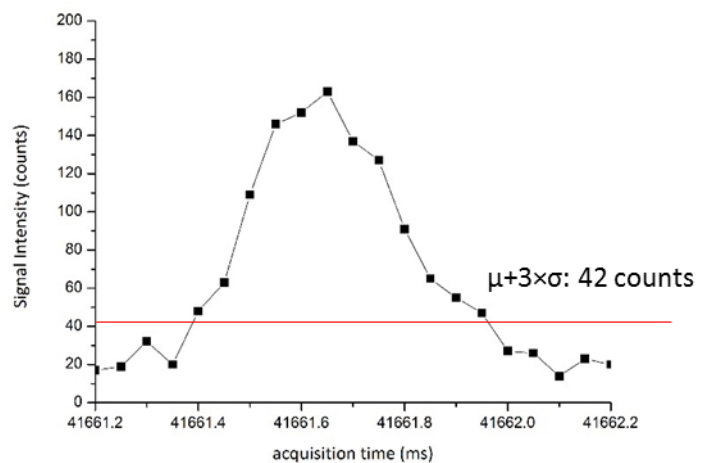
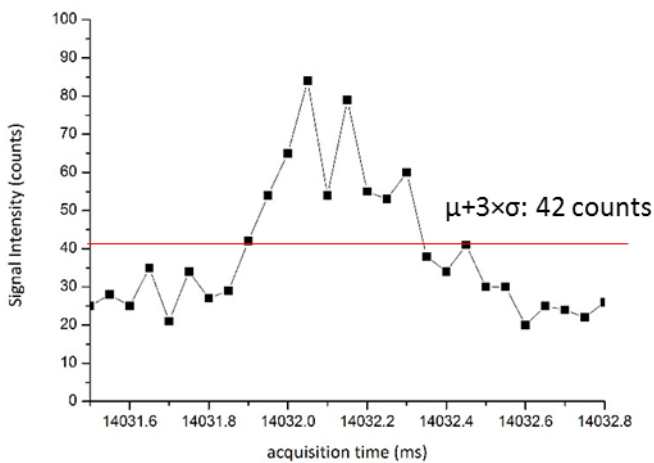


Γράφημα 149. Καταγραφή έντασης ^{47}PO του 0.1% NaCl για διάστημα 1 min με το Standard Introduction System SC ICP-MS . Η εικονιζόμενη καταγραφή αποτελεί τμήμα της καταγραφής για 100 ms.

Στο Γράφημα 150 απεικονίζεται η καταγραφή της έντασης ^{47}PO για τα control cells new. Όπως και κατά τον προσδιορισμό S, η συγκέντρωση του διαλυτού P είναι πολύ υψηλή, στα 1568 ppb. Έτσι, πρέπει να καθοριστεί η baseline πάνω από την οποία βρίσκονται τα σημεία που ορίζουν αυτές τις κορυφές ώστε να λάβουμε μία εικόνα της χρονικής διάρκειας των cell events P. Η παρατηρούμενη διάρκεια είναι μεταξύ 400-600 μs (Γράφημα 151) σε αντίθεση με τη μεγαλύτερη χρονική διάρκεια των 900 μs που παρατηρήθηκε για κάποια cell events κατά το προσδιορισμό S στα κύτταρα.

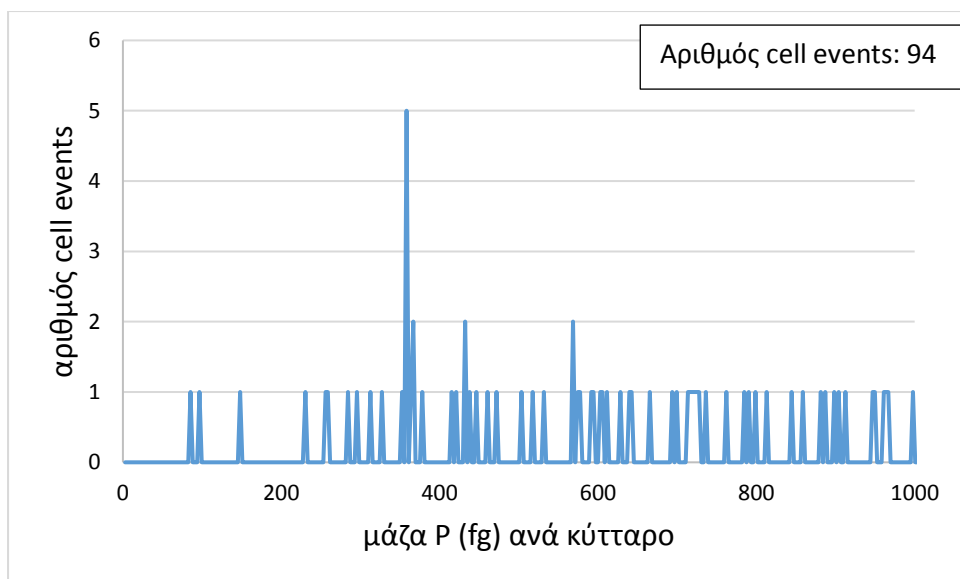


Γράφημα 150. Καταγραφή της έντασης ^{47}PO για τα control cells με το Standard Introduction System SC ICP-MS για 50s.



Γράφημα 151. Προφίλ κορυφών που αντιστοιχούν σε cell events P με χρονική διάρκεια 450 και 550 μs . Η baseline ($\mu+3\sigma$: 42 counts) αποτελεί το όριο πάνω από το οποίο βρίσκονται τα data points που ορίζουν cell events

Το Γράφημα 152 αποτελεί το ιστόγραμμα μάζας P ανά κύτταρο για τα control cells new. Τα κύτταρα διασπείρονται σε ένα τεράστιο εύρος μάζας χωρίς να δημιουργούν κάποια μορφή κατανομής. Η πιθανότητα ανίχνευσης cell events χαμηλότερης έντασης με μείωση της συγκέντρωσης του διαλυτού P θα προσέφερε μία πιο αντιπροσωπευτική εικόνα της κατανομής P στα κύτταρα.



Γράφημα 152. Ιστόγραμμα μάζας P ανά κύτταρο για τα control cells με το Standard introduction system SC ICP-MS

3.11.3 Αποτελέσματα από τους υπολογισμούς ισοζυγίου μάζας για τον προσδιορισμό S και P σε control κύτταρα με το Standard introduction system

Για τον υπολογισμό της ολικής μάζας S και P με SC ICP-MS, τη μεγαλύτερη συνεισφορά έχει η μάζα που προκύπτει από την συγκέντρωση του εξωκυττάριου διαλυτού S ή P. Η καλή συμφωνία μεταξύ των δύο τεχνικών προτείνει πως η μέθοδος μπορεί δυνητικά να χρησιμοποιηθεί στον προσδιορισμό S και P σε μεμονωμένα κύτταρα.

Πίνακας 37. Υπολογισμοί ισοζυγίου μάζας S για τα control cells new.

Chlamydomonas reinhardtii	SC-ICP-MS			Conventional ICP-MS Ολικό S (fg)	Recovery %
	Ενδοκυττάριο S (fg)	Εξωκυττάριο S (fg)	Ολικό S (fg)		
Control	3.15E+05	4.88E+08	4.88E+08	3.97E+08	123.2

Πίνακας 38. Υπολογισμοί ισοζυγίου μάζας P για τα control cells new.

Chlamydomonas reinhardtii	SC-ICP-MS			Conventional ICP-MS Ολικός P (fg)	Recovery %
	Ενδοκυττάριος P (fg)	Εξωκυττάριος P (fg)	Ολικός P (fg)		
Control	1.60E+09	1.59E+09	1.60E+09	8.76E+08	182.0

Κεφάλαιο 4

Συμπεράσματα

- Επιδείχθηκε η ανάπτυξη της τεχνικής του SC ICP-MS και η εφαρμογή της στον ποσοτικό προσδιορισμό μετάλλων (Pb, Cd) και μεταλλοειδών (As) σε μεμονωμένα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* τα οποία είχαν επωαστεί σε συγκεντρώσεις ενώσεων Pb, Cd, As (III) και As (V). Επιπλέον, το SC ICP-MS εφαρμόστηκε στον ποσοτικό προσδιορισμό Ca, ενδογενές μέταλλο των κυττάρων, σε μεμονωμένα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* που επώαστηκαν σε Pb, Cd, As (III), As (V) καθώς και σε κύτταρα που αναπτύχθηκαν απουσία αυτών (control cells).
- Σημαντικό πλεονέκτημα του SC ICP-MS σε σχέση με την τεχνική του συμβατικού ICP-MS (Conventional ICP-MS) είναι ο ταυτόχρονος προσδιορισμός της μάζας του στοιχείου που υπάρχει μέσα στο κύτταρο καθώς και της συγκέντρωσης του εξωκυττάριου διαλυτού στοιχείου που εντοπίζεται στο κυτταρικό αιώρημα. Χάρης σε αυτό το πλεονέκτημα του SC ICP-MS, καλυπτεται το γνωστικό κενό που άφηνε η ανάλυση ενός κυτταρικού αιωρήματος με το Conventional ICP-MS. Το τελευταίο είναι σε θέση να προσδιορίσει την απόλυτη μάζα του στοιχείου στο αιώρημα η οποία όμως αποτελεί το άθροισμα της μάζας του στοιχείου στα κύτταρα και της μάζας του εξωκυττάριου διαλυτού στοιχείου στο αιώρημα, χωρίς να μπορεί να διαχωρίσει τα δύο είδη.
- Η τεχνική του SC ICP-MS αναπτύχθηκε με τη βοήθεια λογισμικού (Nano Syngistix, PE) επεξεργασίας του τεράστιου όγκου δεδομένων ανά καταγραφή δείγματος (1.2×10^6 data points για 1 min καταγραφής). Ο στατιστικός τρόπος καθορισμού της baseline ($\mu + 3\sigma$), η οποία αποτελεί συγχρόνως την ανώτατη τιμή έντασης του εξωκυττάριου διαλυτού στοιχείου και το όριο πάνω από το οποίο υφίστανται τα data points που ορίζουν cell events, αποδείχθηκε αδύναμος όταν η συγκέντρωση του εξωκυττάριου διαλυτού στοιχείου προσδιοριζόταν στα όρια ανίχνευσης του οργάνου. Η μη κανονική κατανομή του σήματος του υποβάθρου επέφερε τον υπολογισμό false positive κορυφών που δεν αντιπροσώπευαν cell events στον τελικό αριθμό των cell events. Αν και επιτεύχθηκε ο προσδιορισμός αυτής της αδυναμίας, εντούτοις αυτή δεν μπόρεσε να ξεπεραστεί αφού δεν υπήρχε τρόπος καθορισμού χειροκίνητου καθορισμού της baseline .
- Τα *Chlamydomonas reinhardtii* προσλαμβάνουν Pb ήδη από τη χαμηλότερη συγκέντρωση επώασης των 0.36 mg/L (ppm) Pb. Η πρόσληψη Pb από τα κύτταρα, που υποδηλώνεται από τη μέση μάζα Pb ανά κύτταρο που ανιχνεύεται, αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης

επώασης των κυττάρων σε Pb και αγγίζει τη μέγιστη τιμή (17.3 fg) με την επώαση των κυττάρων σε 12.5 ppm Pb. Τα κύτταρα που επώαστηκαν στην ενδιάμεση εκ των 3 συγκεντρώσεων επώασης σε Pb (6.26 ppm Pb) επέδειξαν χαμηλότερη μέση μάζα ανά κύτταρο (15.0 fg) αλλά ταυτόχρονα μεγαλύτερο αριθμό cell events Pb (άρα και πλυθυσμό κυττάρων που έχει προσλάβει Pb) .

- Η κατεργασία των *Chlamydomonas reinhardtii* επωασμένα σε συγκεντρώσεις Pb με χηλικό αντιδραστήριο (EDTA) προκάλεσε τη αφαίρεση Pb προσροφημένου στο κυτταρικό τοίχωμα των κυττάρων, γεγονός που επιβεβαιώνεται από τη μετατόπιση των ιστογραμμάτων μάζας Pb ανά κύτταρο προς χαμηλότερα fg Pb για τα κύτταρα επωασμένα σε 6.26 και 12.5 ppm Pb.
- Ο προσδιορισμός Ca στα κύτταρα επωασμένα σε Pb έδειξε μία αρνητική συσχέτιση μεταξύ επιπέδων Ca στα κύτταρα και συγκέντρωσης επώασης σε Pb, γεγονός που μπορεί να προτείνει μία συναγωνιστική συμπεριφορά ιόντων διθενούς Ca και Pb. Η ανάλυση των ίδιων κυττάρων για Ca μετά από επώασή τους σε EDTA έδειξε πως το μεγαλύτερο ποσοστό Ca εντοπίζεται στο εξωτερικό τοίχωμα των κυττάρων κι επηρεάζεται από τη συγκέντρωση του εξωκυττάρου διαλυτού Ca στο αιώρημα. Αυτό το συμπέρασμα ενισχύει η εκμηδένιση του αριθμού των cell events Ca για τα control cells μετά την επώασή τους σε EDTA.
- Η ανάλυση των κυττάρων επωασμένων σε As (III), As (V) και Cd περιλάμβανε τη χρήση δύο συστημάτων εισαγωγής δείγματος, το σύστημα υψηλής απόδοσης (HEN) το οποίο σχεδιάστηκε εργαστηριακά και το Standard Introduction System που αποτέλεσε το σύστημα αναφοράς. Επιτεύχθηκε πολύ καλή συμφωνία μεταξύ των δύο συστημάτων εισαγωγής ως προς τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων εξωκυττάρου διαλυτού στοιχείου στα κυτταρικά αιωρήματα καθώς και στις τάσεις του αριθμού των cell events και της μέσης μάζας μετάλλου ανά κύτταρο συναρτήσει των συγκεντρώσεων επώασης στα δεδομένα μέταλλα και μεταλλοειδή. Η μέση μάζα μετάλλου ανά κύτταρο, όπως προσδιορίστηκε με το HEN, είναι μεγαλύτερη σε κάποια κυτταρικά δείγματα από την αντίστοιχη που προσδιορίστηκε με το Standard Introduction System λόγω της μεγαλύτερης πιθανότητας εισαγωγής συσσωματωμάτων κυττάρων. Σε όλα τα κυτταρικά δείγματα ανιχνεύθηκαν περισσότερα cell events, γεγονός που δείχνει τη μεγαλύτερη απόδοση μεταφοράς του HEN έναντι του Standard Introduction System.
- Ο υψηλότερος αριθμός cell events As και μέσης μάζας As ανά κύτταρο που επιδείχτηκε για τα κύτταρα επωασμένα σε As (V) συγκριτικά με τα κύτταρα επωασμένα σε As (III) και με τα δύο συστήματα εισαγωγής υποδηλώνει τη μεγαλύτερη προτίμηση των κυττάρων προς το As (V). Πιο συγκεκριμένα η μέση μάζα As, όπως αυτή προσδιορίστηκε με το Standard Introduction System, για τα κύτταρα επωασμένα σε 400 μM As (V) είναι 2.7 φορές υψηλότερη

της αντίστοιχης μάζας As για τα κύτταρα επωασμένα σε 400 μM As (III) (1.59 έναντι 0.58 fg). Η μέση μάζα As, όπως προσδιορίστηκε με το HEN Introduction System, για τα δεδομένα κύτταρα είναι 2.17 και 1.66 fg. Οι τιμές είναι υψηλότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες του Standard Introduction System και μάλλον οφείλονται στην ανίχνευση περισσότερων συσσωματωμάτων κυττάρων με το HEN Introduction System. Η ανάλυση της κυτταρικής σειράς του As (III) και As (V) μαζί με τα αντίστοιχα control cells έδειξε πως τα επίπεδα Ca στα κύτταρα (cell events και μέση μάζα Ca ανά κύτταρο) επηρεάζονται από τη συγκέντρωση εξωκυττάρου διαλυτού Ca.

- Η ανάλυση των κυττάρων επωασμένων σε Cd με το Standard Introduction System αποκάλυψε εξαιρετικά χαμηλό αριθμό cell events ακόμη και για την μεγαλύτερη συγκέντρωση επώασης των 7.29 ppm Cd. Πιο συγκεκριμένα, τα cell events απαριθμούνται 8 οπότε ο αριθμός είναι εξαιρετικά χαμηλός για τη δημιουργία κάποιας κατανομής. Παρόλλα αυτά, η ανάλυση των δύο υψηλών συγκεντρώσεων επώασης σε Cd (3.64 και 7.29 ppm Cd) κυτταρικών δειγμάτων με το HEN Introduction System απέδωσε άφθονα σε αριθμό και ένταση σήματος cell events Cd ώστε να έχουμε δημιουργία κατανομής Cd στους δεδομένους κυτταρικούς πληθυσμούς. Πιο συγκεκριμένα, η μέση πρόσληψη Cd από τα κύτταρα ήταν 0.88 και 2.5 fg για τα κύτταρα επωασμένα σε 3.64 και 7.29 ppm Cd. Άρα, η επώαση σε αυξανόμενη συγκέντρωση Cd αυξάνει τη πρόσληψη αυτού από τα κύτταρα. Τα επίπεδα Ca στα κύτταρα επωασμένα σε Cd προτείνουν μία συναγωνιστική σχέση μεταξύ δισθενούς Ca και Cd αλλά απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση.
- Η καλή συμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων του Single-Cell και του Conventional ICP-MS είναι αρκετά ενθαρρυντική ως προς την αξιοπιστία του πρώτου. Μεμονωμένες αστοχίες στη σύγκριση των δύο συστημάτων θεωρούνται ότι προέκυψαν όταν η συνολική μάζα των στοιχείων στα κυτταρικά αιωρήματα βρισκόταν στα όρια ανίχνευσης του οργάνου.

Μελλοντικοί στόχοι

- Ανάπτυξη κατάλληλου λογισμικού επεξεργασίας των δεδομένων (raw data) που συλλέγονται για κάθε καταγραφή, που θα ξεπερνά τις αδυναμίες του Nano Syngistix και θα προσαρμόζει τη baseline λαμβάνοντας υπόψη περισσότερες παραμέτρους, όπως χρονική διάρκεια cell events, κατανομή έντασης του υποβάθρου σήματος.
- Βελτιστοποίηση του συστήματος εισαγωγής υψηλής απόδοσης (HEN) ως προς τη σταθερότητα και τη μέγιστη απόδοση μεταφοράς των κυττάρων στο ICP. Αυτοματοποίηση της μεθόδου εισαγωγής δείγματος με το HEN Introduction System, όπως χρήση αντλίας παροχής σταθερής ροής και κατάργηση της φυσικής αναρρόφησης δείγματος. Σκοπός είναι η ελαχιστοποίηση των πηγών που μπορούν να εισάγουν σφάλμα κατά την καταγραφή της έντασης ενός κυτταρικού δείγματος.
- Κατανόηση του χρονικού προφίλ των cell events κι αν αυτό παρέχει πληροφορίες για το κύτταρο που εισάγεται στο ICP.
- Ανάπτυξη βελτιωμένης μεθόδου βαθμονόμησης για πιο ακριβή ιστογράμματα μάζας, όπως εισαγωγή μονοδιάσπαρτων σωματιδίων ίδιου μέσου μεγέθους με τα κύτταρα που αναλύονται για πιο ακριβή προσδιορισμό της TE% και άρα της ροής μάζας του στοιχείου (mass flux) που εισέρχεται στο ICP ανά μονάδα χρόνου, ή ανάπτυξη συστήματος παραγωγής μονοδιάσπαρτων σταγόνων (micro droplet dispenser).

Βιβλιογραφία

- [1] G. Papanikolaou, K. Pantopoulos, Iron metabolism and toxicity, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 202 (2005) 199–211. doi:10.1016/j.taap.2004.06.021.
- [2] A.I. Bush, Metals and neuroscience, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4 (2000) 184–191. doi:10.1016/S1367-5931(99)00073-3.
- [3] A.I.D.E. Ktessabi, M.A.R. Abionet, The Role of Trace Metallic Elements in Neurodegenerative Disorders : Quantitative Analysis Using XRF and XANES, 21 (2005) 885–892. doi: 10.2116/analsci.21.885
- [4] L. Mueller, H. Traub, N. Jakubowski, D. Drescher, V.I. Baranov, J. Kneipp, Trends in single-cell analysis by use of ICP-MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 6963–6977. doi:10.1007/s00216-014-8143-7.
- [5] Giselle Cerchiaro, Tania Maria Manieria and Fernanda Rodrigues Bertuchia, Analytical methods for copper, zinc and iron quantification in mammalian cells, *Metallomics*, 5 (2013) 1336-1345 doi: 10.1039/c0xx00000x
- [6] F. Li, D.W. Armstrong, R.S. Houk, Behavior of bacteria in the inductively coupled plasma: Atomization and production of atomic ions for mass spectrometry, *Anal. Chem.* 77 (2005) 1407–1413. doi:10.1021/ac049188l.
- [7] F. Regnier, Perfusion chromatography., *Nature.* 350 (1991) 634 doi:10.1038/350634a0
- [8] M.P. Dziewatkoski, L.B. Daniels, J.W. Olesik, Time-Resolved Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Measurements with Individual, Monodisperse Drop Sample Introduction, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1101–1109. doi:10.1021/ac951013b.
- [9] H.E. Pace, N.J. Rogers, C. Jarolimek, V.A. Coleman, C.P. Higgins, J.F. Ranville, Determining Transport Efficiency for the Purpose of Counting and Sizing Nanoparticles via Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (vol 83, pg 9361, 2011), *Anal. Chem.* 84 (2012) 4633. doi:10.1021/ac300942m.
- [10] J.W. Olesik, P.J. Gray, Considerations for measurement of individual nanoparticles or microparticles by ICP-MS: determination of the number of particles and the analyte mass in each particle, *J. Anal. At. Spectrom.* 27 (2012) 1143. doi:10.1039/c2ja30073g.
- [11] K. Ho, W. Chan, Time-resolved ICP-MS measurement for single-cell analysis and on-line cytometry †, *J. Anal. At. Spectrom.* 7 (2010) 1114–1122. doi:10.1039/c002272a.
- [12] C.N. Tsang, K.S. Ho, H. Sun, W.T. Chan, Tracking bismuth antiulcer drug uptake in single helicobacter pylori cells, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 7355–7357. doi:10.1021/ja2013278.
- [13] S. Miyashita, A.S. Groombridge, S. Fujii, A. Minoda, A. Takatsu, A. Hioki, K. Chiba, K. Inagaki, Highly efficient single-cell analysis of microbial cells by time-resolved inductively coupled

- plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 29 (2014) 1598–1606.
doi:10.1039/c4ja00040d.
- [14] H. Wang, B. Wang, M. Wang, L. Zheng, H. Chen, Z. Chai, Y. Zhao, W. Feng, Time-resolved ICP-MS analysis of mineral element contents and distribution patterns in single cells., *Analyst.* 140 (2015) 523–31. doi:10.1039/c4an01610f.
- [15] K. Shigeta, G. Koellensperger, E. Rampler, H. Traub, L. Rottmann, U. Panne, A. Okino, N. Jakubowski, Sample introduction of single selenized yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) by micro droplet generation into an ICP-sector field mass spectrometer for label-free detection of trace elements, *J. Anal. At. Spectrom.* 28 (2013) 637. doi:10.1039/c3ja30370e.
- [16] Alan R Wellburnn, *J. Plant Physiology* 144 (1994) 307-313
- [17] Perkin Elmer, *Introducing the NexION 300 ICP-MS* (2010)
- [18] A. Hineman, C. Stephan, Effect of dwell time on single particle inductively coupled plasma mass spectrometry data acquisition quality, (2014) 1252–1257. doi:10.1039/c4ja00097h.
- [19] C. Walliwalagedara, Differential Proteome Analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* Response to Arsenic Exposure, *Am. J. Plant Sci.* 3 (2012) 764–772. doi:10.4236/ajps.2012.36092.
- [20] A.R. Grossman, M. Lohr, C.S. Im, *Chlamydomonas reinhardtii* in the Landscape of Pigments, *Annu. Rev. Genet.* 38 (2004) 119–173. doi:10.1146/annurev.genet.38.072902.092328.
- [21] M.F. Hughes, Arsenic toxicity and potential mechanisms of action, *Toxicol. Lett.* 133 (2002) 1–16. doi:10.1016/S0378-4274(02)00084-X.
- [22] D. Planas, F.P. Healey, EFFECTS OF ARSENATE ON GROWTH AND PHOSPHORUS METABOLISM OF PHYTOPLANKTON, *J. Phycol.* 14 (1978) 337–341. doi:10.1111/j.1529-8817.1978.tb00309.x.
- [23] M. Lang, F. Stober, H.K. Lichtenthaler, Fluorescence emission spectra of plant leaves and plant constituents, *Radiat. Environ. Biophys.* 30 (1991) 333–347. doi:10.1007/BF01210517.
- [24] M. Tanner, D. Günther, Short transient signals, a challenge for inductively coupled plasma mass spectrometry, a review, *Anal. Chim. Acta.* 633 (2009) 19–28. doi:10.1016/j.aca.2008.11.041.
- [25] M. Tanner, Shorter signals for improved signal to noise ratio, the influence of Poisson distribution, *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010) 405. doi:10.1039/b921077f.
- [26] O. Borovinskaya, B. Hattendorf, M. Tanner, S. Gschwind, D. Günther, A prototype of a new inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometer providing temporally resolved, multi-element detection of short signals generated by single particles and droplets, *J. Anal. At. Spectrom.* 28 (2013) 226–233. doi:10.1039/C2JA30227F.
- [27] T J B Simons, CELLULAR INTERACTIONS BETWEEN LEAD AND CALCIUM, *British Medical Bulletin* 42 (1986) 431-434 doi: 10/1093

- [28] Inductively coupled argon plasma as an ion source for mass spectrometric determination of trace elements, Robert S. Houk, Velmer A. Fassel, Gerald D. Flesch, Harry J. Svec, Alan L. Gray, Charles E. Taylor, *Anal. Chem.*, 52(14) (1980) 2283–2289
- [29] Robert Thomas, *Practical Guide to ICP-MS: A Tutorial for Beginners*, Third Edition (Practical Spectroscopy)
- [30] <http://www.celeromics.com/en/resources/Technical%20Notes/fuchs-roenthal-chamber-concentration/fuchs-roenthal-chamber-concentration.php>
- [31] ELEMENTAL ANALYSIS OF *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* CELLS EXPOSED TO Cd, Ni and Pb, N Lydakis-Simantiris, M. Bolanaki, L. Raisi, E. Katsivela, 10th Aegean Analytical Chemistry Days, 29 September-2 October, 2016, Çanakkale, Turkey
- [32] Arsenic accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii* cells grown in As-contaminated media, E. Mavrakis, L. Sakelaraki, M. Gaulier, A. Riaudel, S. Pergantis, N. Lydakis-Simantiris, 15th International Conference on Environmental Science And Technology, 31st August-2nd September, 2017, Rhodes, Greece
- [33] *Handbook of the Poisson Distribution*, Frank A. Haight, Wiley (1967)