



# Sejthalál nyomonkövetése káliumion szelektív elektróddal

BSc. SZAKDOLGOZAT

Készítette:

HAVASI TÍMEA KLAUDIA

*kémia szakos hallgató*

Általános és Fizikai Kémia Tanszék

Témavezető:

KISS ANDRÁS, PhD.

*egyetemi adjunktus*

Általános és Fizikai Kémia Tanszék



Pécsi Tudományegyetem

2021. május 7.



# Tartalomjegyzék

<b>1. Bevezetés</b>	<b>2</b>
<b>2. Célkitűzés</b>	<b>3</b>
<b>3. Irodalom</b>	<b>4</b>
<b>4. Anyagok és módszerek</b>	<b>5</b>
4.1. Káliumion szelektív elektródok jellemzése . . . . .	5
4.1.1. Kalibrálás . . . . .	5
4.1.2. Szelektivitás vizsgálat . . . . .	6
4.2. Sejttenyésztés . . . . .	6
4.3. Extracelluláris káliumion koncentráció nyomonkövetése antifungális szerek jelenlétében . . . . .	7
<b>5. Eredmények</b>	<b>9</b>
5.1. Sejtekből kiszabaduló káliumion koncentráció közelítő számítása . . .	9
5.2. Káliumion szelektív elektródok kalibrációja . . . . .	9
5.3. Káliumion kiáramlás nyomon követése ionszelektív elektróddal . . . .	10
<b>6. Összefoglalás és következtetések</b>	<b>13</b>

# Köszönetnyilvánítás

köszönet

## **1. fejezet**

# **Bevezetés**

bevezetés

## 2. fejezet

# Célkitűzés

Pontokba foglalva az alábbi célokat tűztem ki magam elé a munka megkezdése előtt és során:

1. 1
2. 2 ...

### **3. fejezet**

## **Irodalom**



## 4. fejezet

# Anyagok és módszerek

Az általam alkalmazott módszereket és az ehhez szükséges eszközöket, illetve anyagokat ismertetem ebben a fejezetben.

### 4.1. Káliumion szelektív elektródok jellemzése

Három kereskedelmi elektróddal dolgoztam, melyek közül kettő Thermo Scientific Orion 9719BNWP és egy WTW-Z0008I kombinált káliumion szelektív elektród. Az elektródokat magam kalibráltam, a szelektivitási együtthatók számításához szükséges adatok a gyártótól származnak.

#### 4.1.1. Kalibrálás

A mérések elvégzése előtt kalibráltam mindhárom elektródot. A következő lépések alapján végeztem a kalibrációt. KCl (Reanal Laborvegyszer Kft., Budapest, Magyarország) kristályvízmentes sójából bemért analitikai mérlegen a 0.1 M koncentrációhoz szükséges előre kiszámolt tömeget, majd feloldottam kevés desztillált vízben, és egy 100 cm<sup>3</sup>-es mérőlombikba öntöttem, ezután az oldatot kiegészítettem desztillált vízzel 100 cm<sup>3</sup> térfogatra, homogenizáltam az oldatot. Ezt követően 10 ml-t pipettáztam egy másik 100 ml-es mérőlombikba, majd jelretöltöttem vízzel, majd az új, tízszer hígabb oldatot homogenizáltam. A fenti lépéseket megismételtem, míg el nem értem a 10<sup>-6</sup> M koncentrációt. A só feloldásához, hígításhoz, valamint az edények mosási utáni átöblítéséhez használt desztillált vizet az Általános és Fizikai Kémia Tanszék vízdesztilláló készülékkel lett előállítva (Elix Essential 10 Water Purification System, központi cím), mely 0.067 µS/cm fajlagos vezetőségű nagytisztaságú víz előállítására képes.

Az oldatkészítés befejezése után mindhárom elektródot kalibráltam úgy, hogy a leghígabb oldattól kezdve minden egyes oldatba bemelegítettem az adott elektródot, és

az egyensúlyi potenciál beállta után lejegyeztem a saját beépített referenciaelektrodjához képest mért potenciált. A mérésekhez nagy bemeneti impedanciájú négycsatornás feszültségmérőt használtam (EPU452 Quad Multi Function isoPod™ with USB - eDAQ, 6 Doig Ave, Denistone East NSW 2112, Australia). A kapott potenciálértékeket grafikusán ábrázoltam a koncentráció negatív logaritmusának függvényében. A pontokra egyenest illesztettem Qtiplot programmal.

#### 4.1.2. Szelektivitás vizsgálat

A szelektivitás adatokat a gyártó által publikált mérések alapján [1] számoltam az *azonos potenciálhoz tartozó aktivitásokból* különoldatos módszerrel [2]. A módszer az azonos potenciálhoz tartozó aktivitások arányaként adja meg a szelektivitási együtthatót, a 4.1. egyenlet alapján. Munkám során az aktivitások helyett mindenhol koncentrációkkal számoltam, ami esetemben elhanyagolható hibát okoz, tekintve, hogy híg oldatokkal dolgoztam. A káliumion kiáramlás vizsgálat során a legnagyobb tapasztalt koncentráció  $\approx 10^{-5}$  M volt.

$$k_{i,j}^{pot} = \frac{a_i}{a_j^{z_i/z_j}} \quad (4.1)$$

## 4.2. Sejtenyésztés

A *Candida albicans* sejtenyésztést rutin mikrobiológiai módszerekkel végeztem a PTE TTK Általános és Környezeti Mikrobiológiai Tanszéken Dr. Papp Gábor segítségével. Vizsgálataim során fontos volt a lehető legnagyobb sejtkoncentráció elérése, és az, hogy a sejtenyészet megfelelő, aktívan metabolizáló fázisban legyen. Ezek azért fontosak, hogy a lehető legnagyobb káliumion koncentráció változást tudjam detektálni, mely növeli a mérés pontosságát és lehetővé teszi az általánosan használt káliumion szelektív elektród használatát, melynek alsó kimutatási határa nagyjából  $10^{-6}$  M. A tenyésztés több napot vesz igénybe, és közben röbb mosási és átoltási lépés van, melyek között lehetőség van beállítani a következő tenyésztési lépés kiindulási sejtkoncentrációját. Ezt sejtszámolás helyett abszorbancia méréssel szokták végezni (hullámhossz).

A kiindulási *Candida albicans* sejtenyészet mosásához nátrium-foszfát pufferoldatot használtam, ami izotóniás tulajdonsággal rendelkező sóoldat (PBS, Phosphate Buffered Saline 1X, pH 7.4, AAT Bioquest). Nem mérgező hatású a sejtekre nézve, így széles körben alkalmazható sejtek mosására vagy hígításokhoz, olyan készítményekre, melyek után visszamarad némi anyagfelesleg, de a szöveteket is ezzel kezelik, hogy könnyen lehessen szállítani őket. pH-értéke megközelíti az emberi testben mér-

hetőt, ugyanakkor hasonlóságot mutat az ozmolaritásban, ionkoncentrációban.

A sejttenyészet előkészítésénél ügyelni kellett a steril környezet fenntartására, mert könnyen beszennyeződhet a vizsgálni kívánt sejttenyészet. Ezért a tenyésztéshez használt eszközöket sterilizáltam autoklávban vagy lánggal, és minden műveletet előzetesen sterilizált, mikrobiológiai elszívó fülke alatt végeztem. A kiindulási sejtszuszpenzió mért abszorbancia értéke 0.112 volt, ezt 48.8-szoros térfogatra hígítottam, majd spektrofotométerrel megmértem a hígított sejtszuszpenzió abszorbanciáját. Az elérni kívánt abszorbancia 0,0025 és a mért pedig 0,00222 volt, amit az együttműködő mikrobiológus kollégák elfogadhatónak találtak. Ezután szacharóz tartalmú tápanyagot pipettáztam mindkét lombikba, majd pedig az 1. számú lombikba 1 cm<sup>3</sup> hígítatlan ( $A=0,12$ ) és a 2. számú lombikba 2 cm<sup>3</sup> hígított szuszpenziót ( $A=0,222$ ). Rázógépbe helyeztem el a lombikokat, ahol 30 °C-os hőmérsékleten 13 órán át (ide azért kéne egy ige, pl "volt" vagy "növekedett"), ez idő alatt nőtt a sejtszám a szuszpenzióban. az ülepedés megakadályozása érdekében folyamatos volt a lombikok rázása.

A méréshez szükséges kiindulási sejtszuszpenziót spektrofotométerrel (egyfényutas, UV/VIS tartomány (korábban is ezt használtad, az első előfordulási helyen kell leírni)) mértem meg, a mért abszorbancia érték 0,459 volt. A szükséges koncentráció elméleti abszorbancia értéke 0.015, ehhez 30.6-szoros hígításra volt szükség, viszont figyelembe kellett venni, hogy előzőleg már elvégeztem egy 10-szeres hígítást, ezért a végleges 306-szoros volt. Ezt követően szacharóz tartalmú tápanyagot pipettáztam mindkét lombikba, majd az 1. számú lombikba 1 cm<sup>3</sup> hígítatlan ( $A=0.459$ ) és a 2. számú lombikba 2 cm<sup>3</sup> hígított szuszpenziót ( $A=0.015$ ). Rázógépbe helyeztem el mindkét lombikot, ahol 29,5°C-os hőmérsékleten 150 rpm (round per minute) keverési sebesség mellett 18 órán át folyamatos rázás alatt állt.

### 4.3. Extracelluláris káliumion koncentráció nyomonkövetése antifungális szerek jelenlétében

Az előző nap folyamán a *Candida albicans* sejttenyészetből készített szuszpenziót háromfele osztottam. Két 10 cm<sup>3</sup> térfogatú főzőpohárba 6-6 cm<sup>3</sup> -t és egy 10 cm<sup>3</sup> térfogatú főzőpohárba 8 ml-t pipettáztam. A két 6 cm<sup>3</sup> térfogatú szuszpenzióhoz adott időpontban antifungális szereket adtam meghatározott térfogatban (30 µl), a harmadik oldatot kezeletlenül hagytam. Mindhárom oldatot kevertettem a mérés során, hogy megakadályozzam a sejtek a főzőpohár aljára történő ülepedését. A 2. csatornán Orion elektródot helyeztem a propolisszal kezelt szuszpenzióba és mértem az elektród potenciálváltozását. A 3. csatornára volt csatlakoztatva a WTW elektród, ezt a kezeletlen szuszpenzióba tettem (negatív kontrol). A 4. csatornán szintén Ori-

on elektród merült az szuszpenzióba, ezt nysztatinnal kezeltem. Adott időpontban adtam hozzá az antifungális szereket mindkét szuszpenzióhoz (17 min-nél propolisz, 17.6 min-nél nysztatin). NaOH oldatot ( $0,6\text{ cm}^3$  és  $0,8\text{ cm}^3$ ) oldatot adagoltam a nysztatinnal kezelt mintához, itt nem történt változás, viszont a propolisszal kezelt mintához adva feszültségnövekedés volt megfigyelhető, ez azzal magyarázható, hogy erős lúg hatására a még szét nem esett sejtek is elpusztultak.

Az mérés időpontját megelőző napon elkészített *Candida albicans* gombatenyészetből ( $10^7$  db sejt/ml,  $A=0,625$ ) készített szuszpenziót háromfelé osztottam. Két  $10\text{ cm}^3$  térfogatú főzőpohárba  $5\text{--}5\text{ cm}^3$ -t és egy  $10\text{ cm}^3$  térfogatú főzőpohárba  $3\text{ cm}^3$ -t pipettáztam. A két  $5\text{ cm}^3$  térfogatú szuszpenziót adott időpontban meghatározott térfogatú antifungális szerekekkel kezeltem. A harmadik szuszpenziót kezeletlenül hagytam. Mindhárom oldatot kevertettem a mérés során, hogy a sejtek ne ülepedjenek le a főzőpohár aljára. A 2. csatornán Orion elektróddal a propolisszal kezelt szuszpenzióban mértem az elektród potenciálváltozását. A 3. csatornára volt csatlakoztatva a WTW elektród, ez a kezeletlen szuszpenzióba merült (negatív kontrol). A 4. csatornán szintén Orion elektród követtem nyomon a változást a szuszpenzióban, ezt nysztatinnal kezeltem. Adott időpontban adtam hozzá az antifungális szereket mindkét szuszpenzióhoz (15 min-nél  $50\text{ }\mu\text{l}$  propolisz, 15.3 min-nél  $50\text{ }\mu\text{l}$  nysztatin). Ezt követően 2 óra elteltével mindhárom szuszpenzióhoz térfogatarányosan adagoltam nysztatint. Ezzel a lépéssel kizárhattam azt, hogy esetlegesen az elektródból kiszivárgott elektrolit oldat okoz koncentrációváltozást vagy, hogy a hatóanyag okozott sejtszétesést, ami szintén növeli az extracelluláris kálium-ionkoncentrációt. Túl kicsi sejtszám esetén nem biztos, hogy detektálni tudom a változást az elektróddal. Akár megdőlhét a főzőpohár és kifolyik a szuszpenzió egy része, így megint nem a tényleges koncentrációt detektálom, hanem a ténylegesnél kisebb értéket.

Mindkét mérés során online módszert alkalmaztam, vagyis, hogy időben folyamatos volt a változás nyomon követése, így a sampling módszerrel szemben a legrövidebb idő alatt végbemenő változást is detektálni tudtam, nemcsak a kiindulási-és a végállapotot. A mérési adatokból pedig grafikusán tudtam ábrázolni, hogy az idő tört része alatt hogyan változott a potenciál az egyensúly beálltáig. A rendelkezésre álló kalibrációs egyenes egyenletének segítségével a potenciál értékekből pedig koncentrációt számoltam.

## 5. fejezet

# Eredmények

### 5.1. Sejtekből kiszabaduló káliumion koncentráció közelítő számítása

A kísérletes munkát megelőzően számolásokat végeztem el annak érdekében, hogy felderítsem azt, hogy az elektród egyáltalán képes lehet-e detektálni az összes sejt szétesést követően az extracelluláris tére felszabaduló kálium-ion koncentrációját. Hiszen mint minden mérőszközzel, így a kálium- ionszelektív elektróddal is csak meghatározott tartományon belül lehet pontos mérést végezni. A tipikus ionszelektív elektród alsó kimutatási határa  $10^{-6}$ ,  $10^{-6}$  M. A számolás lépései a következők voltak. Megnéztem az általam vizsgálandó fajra (*Candida albicans*) jellemző sejt-térfogatot [3], ami körülbelül (ide kéne érték)  $\mu m^3$ /. Kiszámoltam, hogy  $10\text{ cm}^3$  oldatban mennyi a teljes intracelluláris térfogat, ha a sejtszám  $1\text{ cm}^3$  térfogatban  $10^7$  db sejt. Az intracelluláris kálium-ionkoncentráció (0.1 M, hivatkozás kell ide is) és a teljes intracelluláris térfogat ( $2 \cdot 10^9\text{ }\mu m^3$ ) szorzatából kiszámoltam  $2 \cdot 10^{-6}\text{ dm}^3$  sejt-térfogatban lévő teljes kálium-ion anyagmennyiséget ( $2 \cdot 10^{-7}\text{ mol}$ ), majd ezt elosztottam az oldat ( $0.01\text{ dm}^3$ ) térfogatával, így megkaptam a teljes extracelluláris kálium-ionkoncentrációt ( $2 \cdot 10^{-5}\text{ M}$ ) arra vonatkozóan, ha az összes sejt károsodást szenvedne. A kapott eredmények alapján elmondható, hogy elvégezhető a mérés, mert a számolt kálium-ionkoncentráció nagyobb, mint a legkisebb koncentráció, amit az elektród még képes detektálni/kimutatni.

### 5.2. Káliumion szelektív elektródok kalibrációja

A méréshez használt elektródokon kalibrációt végeztem el, hogy a kapott egyenes egyenletének segítségével a potenciálértékekből tudjak koncentrációt számolni. A jobb nyomonkövethetőség és érthetőség érdekében bizonyos lépéseket újból leírok. Az elektródokat úgy kalibráltam, hogy a töményebbtől a hígabb oldat felé haladva belemerítettem az elektródot és  $t = 1\text{ min}$  időpontban mért potenciált jegyeztem fel.

A kapott feszültségértékeket a káliumion- koncentráció tízes alapú negatív logaritmusának függvényében ábrázoltam, majd megszerkesztettem a kalibrációs egyenest lineáris regresszióval, hogy megkaptam az egyenes egyenletét. Ezeket a lépéseket mindhárom elektród esetében elvégeztem.

A kalibrációs egyenesek és a kiszámolt szelektivitási együtthatók alapján elmondható, hogy zavaró ionok közül a legkevésbé zavaró hatást a nátrium ionok jelentik, mert a hidrogén és az ammóniumion kisebb koncentrációja esetén nagyobb a szelektivitási együttható értéke, mint a nátriumion esetén (ide azért kéne számérték. vagy a szelektivitás, vagy az összehasonlító adat, ami a kis füzetben meg volt adva). Az egyenes meredeksége megadja, hogy ha az oldat tízszeresére hígul vagy töményedik, akkor mennyi lesz (az egységnyi koncentrációváltozás esetében: nem egységnyi, az előbb írtad le, hogy tízszeres) a bekövetkező potenciálváltozás, ez az általam használt elektródok esetén 54.76-53.188 mV/dekád között változott, ami megközelíti a kézikönyvben közölt adatot (elektródonként le kell írni az egyenes egyenletét, és utalni kell az ábrára, amit mellesleg el kéne készítened, és feltölteni a dokumentum mellé).

ez a rész már a következő "section"-be való, hiszen ez már nem kalibráció, hanem a mérés: A mérés kezdetén a kezeletlen szuszpenziókba merült mindhárom elektród. Mindhárom elektród esetében nem változott a potenciál, viszont mikor adott időpontban hozzá az egyik szuszpenzióhoz a nysztatint, a másik szuszpenzióhoz a propoliszt és a harmadikat pedig kezeletlenül hagytam (ez a mondat nagyon sántít). Meglepően gyorsan fejtette ki hatását a nysztatin, ami a potenciálváltozásban is szemmel látható volt, mert a görbe meredeken emelkedett egészen az egyensúly beálltáig. Ezzel szemben a propolissszal kezelt szuszpenzióban kevésbé volt meredek a detektált változás, a kezeletlen szuszpenzióban. Nagyjából tízszeres változás figyelhető meg a két pozitív kontrol potenciálváltozása között, ami a kiáramlott káliumion-koncentrációváltozásban is megmutatkozik.

### 5.3. Káliumion kiáramlás nyomon követése ionszelektív elektróddal

Ha ezt a kísérletet valamely mintavételi módszerrel végeztem volna el, akkor csak a kiindulási állapotot (amikor még nem adtam hozzá egyik befolyásoló szert sem a szuszpenzióhoz) és a végállapotot (mikor a nysztatin változást okoz, és a sejtfalat roncsolja, így hirtelen nagy mennyiségű káliumion kiáramlik) tudtam volna csak vizsgálni és csak a változás lett volna detektálható. Viszont in situ online módszert alkalmazva detektálható volt a roncsolás időtartama és az ezt követő időszak is, mikor a teljes káliumion mennyiség kiáramlott az extracelluláris.

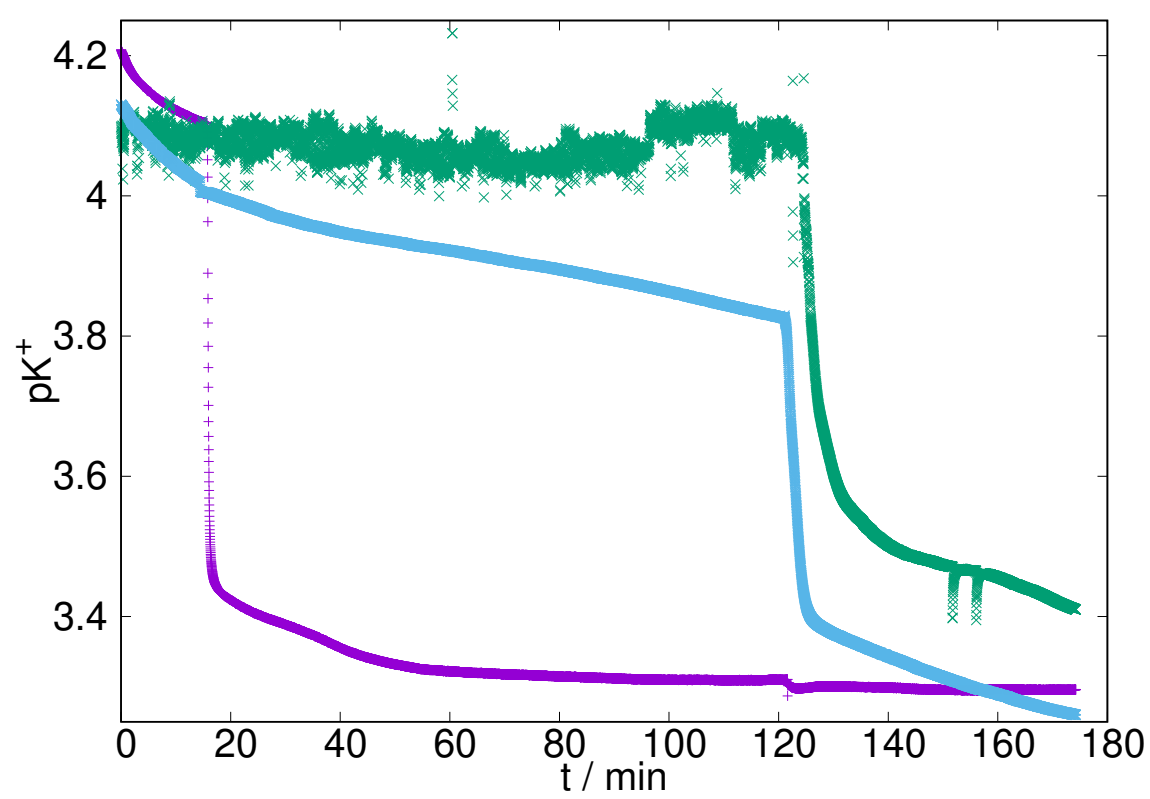
A propolis görbéről (nem a propolis görbéje, pontosabban fogalmaz) azt lehet

leolvasni, hogy ha dezorganizáló hatású anyagot juttatunk a szuszpenzióba, akkor a sejtpusztulás és a káliumion kiáramlás folyamata hosszabb időt vesz igénybe, míg végül eléri ugyanazt a végkoncentrációt, mint amit a nisztatin esetén tapasztaltam, ahol pillanatok alatt (pontos adat: mennyi idő) lezajlott a sejtfal roncsolódása és a káliumion extracelluláris térbe történő kiáramlása. A negatív kontrol mintában egészen addig nem volt tapasztalható változás, ameddig hozzá nem adtam a nisztatint.

ide azért részletesebb leírás kell. ezt sokszor megbeszéltük. sokkal több következtetés van. a nisztatinos és oldószeres kontrollról nem írtál. fontos, hogy azokra nem reagált az elektród. mit jelent ez: a tapasztalt potenciálváltozást csak a káliumion koncentráció változás okozhatta, hiszen minden más változót megvizsgáltál - ami változik a mérés során - és egyik esetben sem tapasztaltál potenciálváltozást.

mi volt a lényege a mérésnek biológiai szempontból? a propolis köztudottan antifungális szer, de nem tudni pontosan, hogyan fejti ki a hatását. te kiderítetted, hogy a hatás egyik eleme az, hogy roncsolja a sejtfalat, de kevésbé mint pl. a nisztatin, ami azonnal, néhány perc alatt az összes sejtet szétroncsolja. A mérési görbéről (xy. ábra, kék jelölésű görbe) egyértelműen leolvasható, hogy lassú, de határozott káliumion koncentráció növekedés volt a propolis hozzáadást követően. Honnan tudjuk, hogy ezt a propolis okozta és nem roncsolódott volna a sejtfal amúgy is? Onnan, hogy a kontroll is elvégezted, ugyanúgy jártál el ezzel, csak ehhez nem adtál semmit, tehát itt a két oldat sorsa elvált, és látjuk, hogy ha nem raktál volna semmit a propoliszal kezelt mintához, nem történt volna semmi. Mire volt való a pozitív kontroll? ...

Ahogy az a 5.1. ábrán látható.



5.1. ábra. képaláírás



## 6. fejezet

# Összefoglalás és következtetések

összefoglalás

# Irodalomjegyzék

- [1] T. F. S. Inc., „User guide - potassium ion selective electrode,” p. 34, 2008.
- [2] R. P. Buck, E. Lindner, *et al.*, „Recommendations for nomenclature of ion-selective electrodes (iupac recommendations 1994),” *Pure and Applied Chemistry*, vol. 66, no. 12, pp. 2527–2536, 1994.
- [3] W. L. Chaffin, „The relationship between yeast cell size and cell division in candida albicans,” *Canadian journal of microbiology*, vol. 30, no. 2, pp. 192–203, 1984.