

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 4.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	2
2. Célkitűzés	3
3. Irodalom	4
4. Anyagok és módszerek	5
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
5. Eredmények	9
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
6. Összefoglalás és következtetések	11

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 cm³-es mérőlombikba öntöttem, ezután az oldatot kiegészítettem desztillált vízzel 100 cm³ 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 10⁻⁶ 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 referenciaelektrod-jához 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 cm³ hígítatlan (A=0,12) és a 2. számú lombikba 2 cm³ 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 cm³ hígítatlan (A=0.459) és a 2. számú lombikba 2 cm³ 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 cm³ térfogatú főzőpohárba 6-6 cm³ -t és egy 10 cm³ térfogatú főzőpohárba 8 ml-t pipettáztam. A két 6 cm³ 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 cm^3 térfogatú főzőpohárba $5\text{--}5\text{ cm}^3$ -t és egy 10 cm^3 térfogatú főzőpohárba 3 cm^3 -t pipettáztam. A két 5 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

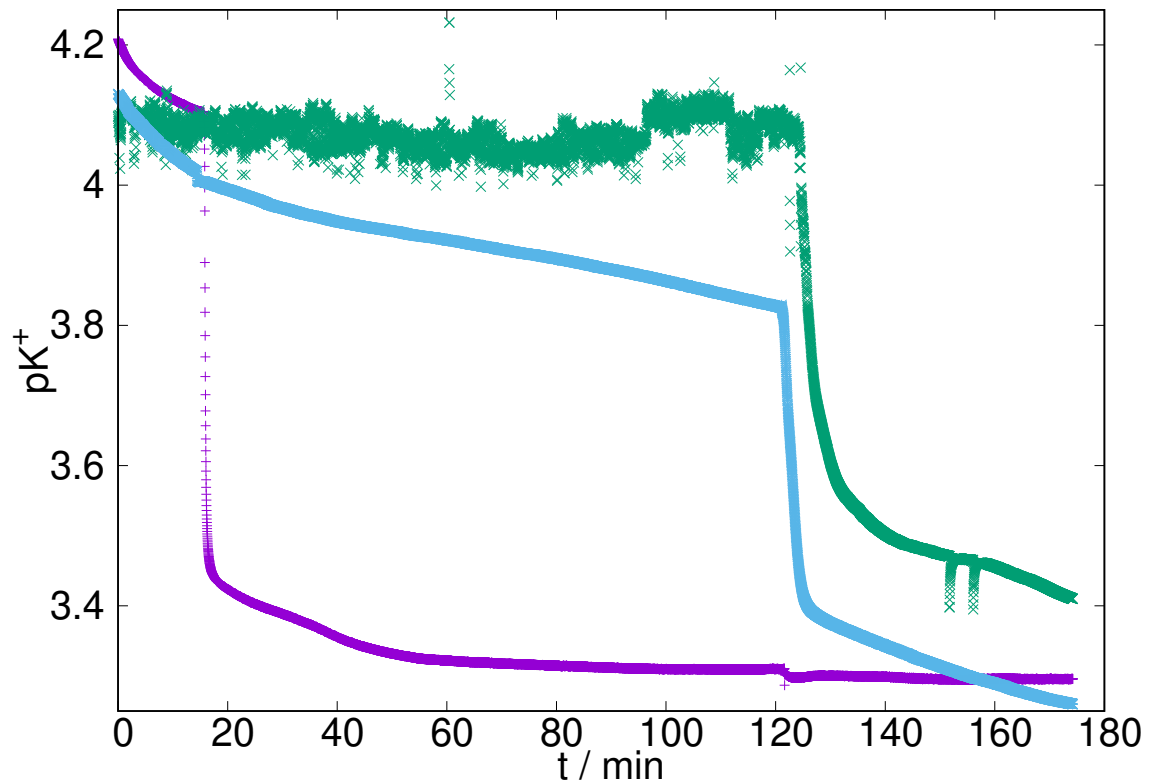
Eredmények

5.1. Sejtekből kiszabaduló káliumion koncentráció közelítő számítása

A kísérletes munkát megelőzően számolásokat végeztem el annak érdekében, hogy az elektród képes lesz detektálni a sejt szétesést követően az intracelluláris térből felszabaduló kálium-ion mennyiséget., hiszen, mint minden készülékkel, így a kálium-ionszelektív elektróddal is csak meghatározott tartományon belül lehet pontos mérést végezni. Az elektród alsó kimutatási határa 10^{-6} , 10^{-6} M. A számolás lépései a következők voltak: Megnéztem az általam vizsgálandó fajra *Candida albicans* jellemző sejtterfogatot [3], ami körülbelül μm^3 /. Kiszámoltam, hogy 10 cm^3 oldatban mennyi a teljes intracelluláris térfogat, ha a sejtkoncentráció 1 cm^3 térfogatban 10^7 db sejt. Viszont szükséges volt annak a meghatározása is, ha az összes sejt szétesik, akkor mennyi lesz az összes felszabadult káliumion koncentráció. Az intracelluláris kálium-ionkoncentráció (0.1 M) és a teljes intracelluláris térfogat ($2 \cdot 10^9\text{ }\mu m^3$) szorzatából kiszámoltam $2 \cdot 10^{-6}\text{ dm}^3$ sejtterfogatban lévő teljes kálium-ion anyagmennyiséget ($2 \cdot 10^{-7}\text{ mol}$), majd ezt elosztottam az oldat (0.01 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



5.1. ábra. képaláírás

jobb nyomon követhetőség és érthetőség érdekében bizonyos lépéseket újból leírok.

$$10^7 \text{ db sejt/cm}^3 \cdot 10 \text{ cm}^3 = 10^8 \text{ db sejt}$$

$$10^8 \text{ db sejt} \cdot 20 \mu\text{m}^3/\text{sejt} = 2 \cdot 10^9 \mu\text{m}^3 = 2 \cdot 10^{-6} \text{ dm}^3$$

ha az összes sejt szétesik, és az összes intracelluláris káliumion kiszabadul az extracelluláris térbe:

$$2 \cdot 10^{-6} \text{ dm}^3 \cdot 0.1 \text{ M} = 2 \cdot 10^{-7} \text{ mol}$$

$$2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} / 0.01 \text{ dm}^3 = 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$$

5.3. Káliumion kiáramlás nyomon követése ionszelektív elektróddal

Ahogy az a 5.1. ábrán látható.

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.