



TDK DOLGOZAT

Gyógyszeres kezelés hatása a maláriapigment kristályok képződésére

MUCZA SZILVIA

Témavezető:

DR. KÉZSMÁRKI ISTVÁN

Egyetemi tanár

BME Fizika Tanszék

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

2018

Tartalomjegyzék

1. Motiváció	1
2. Bevezetés	2
2.1. A maláriafertőzés	2
2.2. A hemozoin kristályok	4
2.2.1. A hemozoin kristályok mágneses és optikai tulajdonságai	6
3. Célkitűzés	9
4. Kísérleti módszerek	9
4.1. A <i>P. falciparum</i> kultúrák gondozása	9
4.2. Magneto-optikai mérések	11
4.3. A kristályok kivonási protokollja	16
4.4. Elektronmikroszkópos felvételek és a képek kiértékelése	17
5. Eredmények	21
5.1. A mágneses tér forgási frekvenciájának hatása szintetikus hemozoin kristályokon	22
5.2. A kivonási protokoll hatékonysága	29
5.3. Sejtkultúrák hemozoin-termelésének analízise	35
5.3.1. Az első kísérletsorozat: fénymikroszkópos és pásztázó elektronmikroszkópos mérések	35
5.3.2. A második kísérletsorozat: fénymikroszkópos, pásztázó elektronmikroszkópos és magneto-optikait mérések	41
6. Összefoglalás, tervek a jövőre	50
7. Köszönetnyilvánítás	51
Irodalomjegyzék	52

1. Motiváció

A malária a világ egyik legerősebben fertőző betegsége, és bár előfordulása korunkban a trópusi övezetekre korlátozódik, egészen a XX. század első feléig minden égövben megtalálható volt. Gyakorisága ellenére a fertőzés diagnosztikájára még napjainkban sincsen automatizált, ugyanakkor megfelelően olcsó és hatékony eljárás, ami megnehezíti a fertőzés visszaszorítását az érintett, jellemzően elmaradottabb területeken. Egy további, a maláriára kifejezetten jellemző probléma a hatóanyagokkal szembeni rezisztencia gyors megjelenése. Emiatt a parazitákon belül lejátszódó biológiai folyamatok, illetve a maláriaellenes gyógyszerek pontos mechanizmusa intenzíven kutatott terület.

A BME Fizika Tanszékének Magneto-Optikai Spektroszkópia kutatócsoportja 2012 óta egy diagnosztikai eszközt fejleszt, ami a malária pigment kristályok fizikai tulajdonságainak révén mutatja ki a fejlődést. A paraziták által termelt kristályok a néhány száz nanométeres tartományba esnek, paramágnesesek és optikai anizotrópiát mutatnak. Az eszköz ezen tulajdonságai alapján határozza meg a kristályok koncentrációját egy adott vérmintában. 2017-ben csoportunk az MTA TTK Enzimológiai Kutatócsoportjával együttműködésben kialakított egy laboratóriumot, amely alkalmas az egyik maláriát okozó faj, a *Plasmodium falciparum*, parazitakultúráinak fenntartására. A laboratóriumban jelenleg ilyen sejt-kultúrákon folytatnak gyógyszeres tesztek kollégáink.

Munkámat az ezen kísérletek során felmerülő kérdések motiválták. Egyik célom annak vizsgálata, hogy a gyógyszeres kezelés hogyan befolyásolja a kristályok méreteloszlását és morfológiáját, illetve korábbi mérések során időnként tapasztalt váratlan kristálykoncentráció-csökkenés milyen folyamatok következménye. A paraziták gyógyszeres és gyógyszermentes közegben történő növekedését egy általánosan használt fénymikroszkópos eljárással követtem nyomon, a metabolikus folyamataik által termelt kristályok össz mennyiségéről pedig a csoportban fejlesztett diagnosztikai eszköz segítségével kaptam információt. Az eddigi hatóanyagtesztek tapasztalata, hogy ennek a két módszernek az alkalmazásával a gátló hatás kimutatható, vizsgálataimban a módszert több ponton kiegészítettem: egyrészt a kultúrából kivont kristályok méretstatisztikáit készítettem el elektronmikroszkópos felvételek alapján, ezen kívül azt is vizsgálom, hogy a diagnosztikai eszköz segítségével nyerhető-e információ a kristályok méreteloszlásáról. Ezzel egy mélyebb betekintést nyerhetek a kristályképződés folyamatába, így megtudható, hogy a gyógyszer blokkolja-e a kristályképződést és ez az életciklus mely folyamatában következik be.

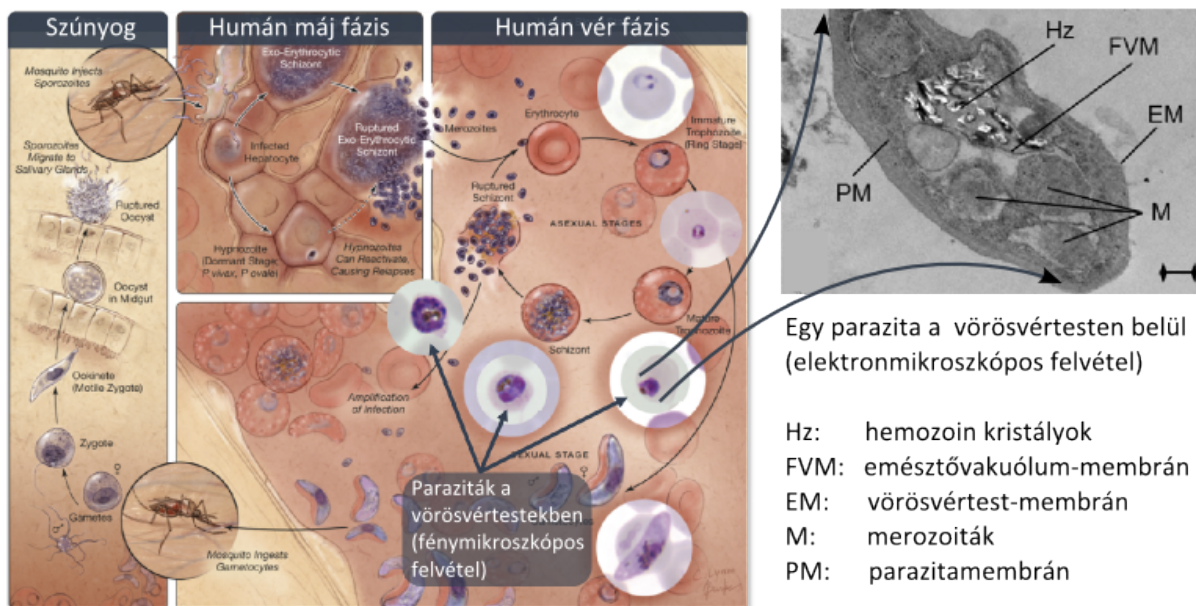
2. Bevezetés

2.1. A maláriafertőzés

A malária a világon az egyik legelterjedtebb fertőző betegség, a WHO 2017-ben a fertőzött esetek számát 216 millióra, a halálesetek számát pedig 445 000-re becsülte [1]. A betegség előfordulása az afrikai, dél- és közép amerikai, illetve dél- és délkelet-ázsiai térségekben, ezen kívül egyes trópusi szigetországokban a leggyakoribb. A fertőzést a *Plasmodium* nemzetségbe tartozó egysejtű paraziták okozzák, ezen belül is négy különböző faj, amelyeknek földrajzi elterjedtsége nagyrészt elhatárolható, néhány esetben átfedő. Közülük a *P. vivax*, a *P. ovale* és a *P. malariae* általi fertőzések enyhébb kimenetelűek, általában nem halálosak. A *P. falciparum* a legveszélyesebb, a legtöbb halálesetért felelős maláriát okozó faj [2]. Részben ez által motiválva, részben specifikus tulajdonságainak köszönhetően a négy faj közül ez utóbbit sikerült laboratóriumi körülmények közötti, hosszútávú sejt kultúrákban történő fenntartásra adaptálni [3].

A természetben a fertőzés terjesztői az *Anopheles* nemzetségbe tartozó nőstény szúnyogok. A szúnyog csípése után az emberi testbe kerülő paraziták először a májsejteket támadják meg, majd a májban gyors szaporodásba kezdenek. Ennek eredményeként fiatal, ún. merozoita formák kerülnek a véráramba, amelyek a vörösvértesteket támadják meg. A vörösvértestek belsejében a paraziták fajtól függően 24-48 óránként ciklikusan szaporodnak, miközben növekedésükhöz a sejtek hemoglobinjának aminosavait hasznosítják. A merozoiták kitörése a májból közel azonos időben történik, ezáltal a paraziták a vérben szinkronizáltak élnek, azaz fejlődési stádiumuk egy tetszőleges időpillanatban hasonló lesz. A paraziták kora vérkenet készítése és megfestése után mikroszkóp alatt azonosítható. Az életciklus első harmadát *ring* fázisnak nevezik, ebben az állapotban a gyűrűszerű alakjukról ismerhetők fel, mivel a megfestés leginkább a sejthártyán hatékony. Az életciklus második harmada a *trophozoita* fázis, ekkor a sejten belüli egyéb szervek is láthatóvá válnak. Ebben az állapotban a legintenzívebb a hemoglobin emésztésének folyamata. Az életszakasz utolsó fázisa a *schizont* állapot, amikor a parazita osztódni kezd és 5-15 új merozoita formává alakul át. A ciklus végén a merozoiták kitörnek a fertőzött vörösvértestből és újabbakat támadnak meg. Az 1. ábrán látható a fejlődési ciklus sematikusán [2].

A betegség tünetei is a vérfázis során lépnek fel, amelyek fejfájás, ízületi fájdalmak, ciklikusan előtörő magas láz. A fertőzés nem megfelelő kezelés mellett kómához vagy halálhoz vezethet [2].



1. ábra. Balra a malária fertőzési ciklusa a vérbeli növekedés egyes fejlődési stádiumában készített fénymikroszkópos felvételekkel együtt. Jobbra egy szizontról készített transzmissziós elektronmikroszkópos felvétel.

A betegség diagnosztizálása a leggyakoribb módszer a betegtől vett vér kenetének fénymikroszkópos elemzése. Ez a legnagyobb érzékenységgű terepen is használt eljárás. Emellett léteznek antigénekre alapuló gyors diagnosztikai tesztek, melyek kereskedelmi forgalomban kaphatóak, viszont a betegség előrehaladottságáról nem adnak információt és érzékenyséjük is alacsonyabb [4]. Ezen kívül léteznek egyéb, kutatásban használt vagy fejlesztés alatt álló diagnosztikai módszerek, mint például automatizált kenetfeldolgozás [5], áramlási citometria [?], mikrofluidikai rendszerek [7], és olyan molekuláris biokémiai módszerek terepi körülményekhez való adaptálása mint a PCR (polymerase chain reaction) [8] vagy a LAMP (loop-mediated isothermal amplification) [9]. A maláriához kapcsolódó alkalmazott kutatási területek aktuális helyzetéről és kérdéseiről részletes összefoglaló található a [10] hivatkozás alatt.

Azokon a területeken, ahol megfelelő erőforrások állnak rendelkezésre és biztosított a közegészségügyi ellátás valamilyen formája, az ideális esetben vérkenetek vagy gyors diagnosztikai tesztek alapján megerősített diagnózist követően a betegeket a WHO részletes,

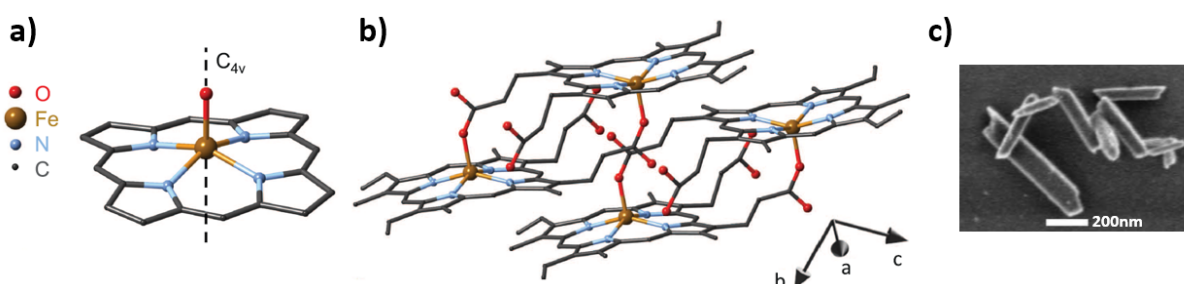
malária kezelésére vonatkozó irányelvei alapján látják el [11]. Ez napjainkban túlnyomórészt ACT-t, vagyis artemizinin kombinációs terápiát jelent, ami egy artemizinin származék és egy kiegészítő, eltérő hatásmechanizmusú gyógyszer párhuzamos, előre meghatározott adagolásban történő alkalmazása. Az artemizinin felfedezése egy nagy volumenű, az 1960-as évek végén indított kínai kutatási program eredménye, mely célja egy új, nagy hatékonyságú maláriaellenes hatóanyag megalkotása volt, eleinte a hadsereg számára. Ehhez, kínai kutatók a hagyományos gyógyászatban alkalmazott növényi eredetű kivonatok ezreit tesztelték, míg végül Tu Youyou az Egynyári üröm (*Artemisia annua*) leveleiből izolálta a rendkívül hatékony artemizinin molekulát. Az emberiség számára globális jelentőségű felfedezéséért 2005-ben orvosi Nobel-díjjal jutalmazták. Az artemizinin nagy előnye a korábbi hatóanyagokkal szemben (pl. kinin és származékai, klorokin, piperaquine, stb.), hogy hatását már kis koncentrációban is gyorsan képes kifejteni, jól tolerálható, és a szűnyogok által felvett, vér stádiumú szexuális formákra is fejt ki gátló hatást, lassítva ezzel a fertőzés tovább terjedését.

2.2. A hemozoin kristályok

A malária pigmentnek is nevezett hemozoin kristályok a paraziták vérben történő növekedése során keletkeznek. A vörösvértestek fehérjetartalmának emésztése során hátramarad az ún. haem csoport (Fe^{II} -protoporphyrin), ami lényegében a 2.a ábrán is látható porfirinyűrű néhány oldallánccal. A molekula reaktivitása, oxidatív folyamatokban katalizátorként való viselkedése folytán, mérgező a parazitákra nézve, így a hemoglobin metabolikus felhasználásához ki kellett alakítaniuk egy olyan folyamatot, mellyel a haem csoportok ártalmatlanná tehetőek. A molekula központjában egy Fe^{2+} ion található, ami első lépésben Fe^{3+} ionná oxidálódik, a teljes molekulát ebben az állapotban α -hematinnek (Fe^{III} -protoporphyrin) nevezik. A központi vasatom, és egy másik haem oldalláncában található karboxilcsoport oxigénatomja közti kovalens kötés kialakításával β -hematin dimerek alakulnak ki, amelyek a kristályok elemi celláját alkotják (lásd: 2.b ábra). A dimerek között hidrogénkötések segítségével indul meg a kristályképződés, melynek eredményei a hemozoin kristályok (lásd: 2.c ábra). Ezek a kristályok a paraziták emésztő vakuólumában felhalmozódnak, sem itt, sem pedig a vérben nem oldódnak [12].

A kristály elemi cellája triklinikus szerkezetű, jellemző paraméterei: $a = 1,22 \text{ nm}$, $b = 1,468 \text{ nm}$, $c = 0,804 \text{ nm}$, $\alpha = 90,22^\circ$, $\beta = 96,80^\circ$, $\gamma = 97,92^\circ$, térfogata $V_{uc} = 1,3 \text{ nm}^3$

[12]. A kristályok túszerű alakkal rendelkeznek, ami annak a következménye, hogy a különböző rácssíkok mentén létrejövő rétegekben tárolt energia eltérő, a kristályok növekedésének mértékét az egyes síkok irányában pedig ez a paraméter befolyásolja. Elméleti számítások alapján a növekedés iránya a kristálytani c tengely mentén a domináns, az így megjósolt szerkezet egyezést mutat a kristályok megfigyelt alakjával [13], átlagos méretük pedig $100 \times 100 \times 500 \text{ nm}^3$. A kristályok szerkezetüknél fogva optikai és mágneses anizotrópiával rendelkeznek, a központi vasatom magas spinű állapotának köszönhetően pedig paramágnesesek. Ezeket a tulajdonságokat a következő alfejezetben részletesebben is ismertetem.



2. ábra. a) A kristályok elemi cellájában található porfirin gyűrű a központi vasatommal, a négyfogású szimmetriatengely jelölésével. b) A kristály két elemi cellája, β -hematin dimerek. Mellettük a kristálytani tengelyek jelölése [14]. c) Hemozoin kristályokról készített pásztázó elektronmikroszkópos kép [15].

Bár a hemozoin kristályok szerkezete és fizikai tulajdonságai elég jól ismertek, a biológiai kristályosodás folyamata máig kutatott terület. A legvalószínűbb feltételezések szerint a hematin molekulák közötti kristályképződés megindításához hidrofób közegre van szükség, melyet specifikus membránok hoznak létre, és a víz eltávolításával járulnak hozzá a vasoxigén kötés kialakulásához. A hidrogénkötések létrejöttét pedig lipidek segíthetik elő [16]. Kriogén röntgentomográfiai felvételek alapján a kristályok a paraziták emésztőszervének belső felületén találhatóak meg, fejlődésük során a domináns kristálytani tengelyeik egymással párhuzamosak. Az emésztőszerv növekedése során a nagyobb kristályok leválnak az emésztőszerv faláról, és annak belsejében csoportosulnak, ezt követően újabb kristályok képződése indul meg a membránfalán. A kristályok (100) kristálysíkja érintkezik a membrán falán található lipidekkel. A dimerek létrejöttének helye és módja még nem ismert: egyelőre kérdéses, hogy csak az emésztőszervben, vagy már a hemoglobin transzportjáért felelős vezikulum belsejében történik a dimerizálódás [17].

A kinin és a kininből származtatott maláriaellenes gyógyszerek hatásáról köztudott, hogy a hemozin kristályok keletkezését befolyásolják. A pontos mechanizmus egyelőre nem ismert, a hatás kifejtése az emésztési és kristályosodási folyamat több pontján is megtörténhet: 1. A hematin-monomerhez vagy dimerhez történő direkt kötődés, 2. a kristályképződésben részt vevő enzimek gátlása a monomerhez vagy dimerhez hasonló molekulákkal, 3. a már növekvő kristályok felületéhez való kötődés, ezzel megakadályozva azok további növekedését [12]. Ez utóbbi esetben a lehetséges kémiai kötési módra létezik megalkotott elmélet [13], illetve kísérletileg is igazolták, hogy valóban történik felületre való kötődés *in vitro* körülmények között [18]. Ezt a tulajdonságot megvizsgálták elméletileg az artemizinin származékokra is, a gyógyszer képes lenne a kristály felületéhez való kötődésre, de a gyógyszer molekulái nem tudnak olyan erősen abszorbálni a kristály felületre, hogy gátolják annak növekedését [18]. Így a legutóbbi eredmények alapján ezek a gyógyszerek feltehetőleg nem a hemoglobin emésztésén keresztül hatnak [?].

2.2.1. A hemozin kristályok mágneses és optikai tulajdonságai

A kristályok alacsony szimmetriájának egy következménye, hogy mágneses és optikai anizotrópiával rendelkeznek, triklinikus struktúrájuk alapján a mágneses és optikai szuszceptibilitásuk különböző lehetne a három kristálytani tengely mentén. Azonban a mágnesességért és a látható tartományban fellépő optikai abszorpcióért felelős vasatom a porfirin gyűrűk középpontjában helyezkedik el, ez lokálisan lokálisan egy magasabb, C_{4v} szimmetriával rendelkező pont. Mérések alapján a vasatom spinje a vas-oxigén kötés kialakításával a hemozinban $S = 5/2$ lesz, ennek következménye a kristály élő szervezetekben egyedülálló paramágnesessége [20]. A mágneses viselkedést leíró Hamilton-operátor

$$H = D \left(S_z^2 - \frac{S(S+1)}{3} \right) + E(S_x^2 - S_y^2) + \mu_B g \mathbf{B} \mathbf{S}, \quad (1)$$

ahol \mathbf{S} a vasatomok spinje, S_z a C_{4v} szimmetria forgástengelyébe eső komponens, \mathbf{B} a külső mágneses tér, D és E pedig az anizotróp mágneses szuszceptibilitást jellemző paraméterek. ESR és Mössbauer-spektroszkópiai mérések alapján a D paraméter pozitív. Egy ilyen rendszer egy könnyű síkú viselkedést ír le, azaz a porfirin gyűrűk síkjával egybeeső tengelyek mágneses szuszceptibilitása magasabb, mint a rájuk merőleges irányba eső tengelyé [21].

A mágneses energiában anizotrópia jelenlétében egy szögfüggő tag is megjelenik:

$$U = -\frac{1}{2} \frac{B^2}{\mu_0} \cos^2(\theta) (\chi_z - \chi_x) V, \quad (2)$$

ahol χ_z a nehéz tengely, χ_x pedig a könnyű sík irányában lévő mágneses szuszceptibilitások, B a külső mágneses tér nagysága, V egy kristály térfogata, θ pedig a nehéz tengely és a külső mágneses tér által bezárt szög [14]. Könnyű sík elrendezésben $(\chi_z - \chi_x)$ negatív, így a képlet első kifejezése pozitív. Az energia akkor lesz minimális, ha $\cos^2(\theta) = 0$, azaz $\theta = \pm\frac{\pi}{2}$, vagyis a nehéz tengely a mágneses tér irányára merőlegesen áll.

Az abszorpciós spektrumban, az abszorpciós gerjesztések azonosításával megállapították, hogy a kristályok optikai anizotrópiája is a mágneses téréhez hasonló szimmetriát követ [22].

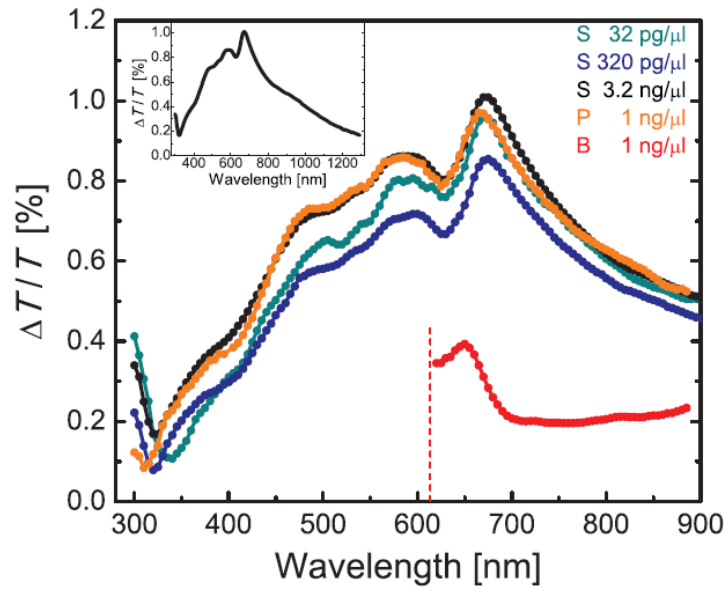
Egy, a fenti tulajdonságokkal rendelkező kristálysokaság esetén mérhető, eredő lineáris dikroizmus az alábbi képlettel írható fel:

$$\frac{\Delta\mathcal{T}}{\mathcal{T}} = c \frac{T_x - T_z}{T_x + T_z} \int \pi \cdot f(\theta)(3 \cos^2(\theta) - 1) \sin(\theta) d\theta \quad (3)$$

ahol $\Delta\mathcal{T}$ a két merőleges, lineáris polarizációjú fénykomponens átlagos transzmittált intenzitásainak különbsége, \mathcal{T} ezek átlaga, T_x és T_z a könnyű sík és a nehéz tengely irányára jellemző transzmissziós együttható, c a minta koncentrációja, θ a külső mágneses tér és a nehéz tengely által bezárt szög egy tetszőleges egykristály esetén, $f(\theta)$ pedig a Boltzmann-eloszlás, ami hőmérséklettől és mágneses anizotrópia energiájától való függését jellemzi [14].

Ez a mennyiség 500 mT nagyságú mágneses térben felvett abszorpciós mérések alapján karakterisztikus hullámhosszfüggéssel rendelkezik, a mágnesesen indukált lineáris dikroizmus spektrum alakja a 3. ábra grafikonján látható. A spektrumnak a látható vörös tartományban van maximuma [14].

Ezen tulajdonságok ismeretében felmerült annak a lehetősége, hogy mágnesesen indukált lineáris dikroizmus jelenségén keresztül a hemozoin kristályok, és ezen keresztül a malária fertőzés specifikusan detektálható [23]. A BME Fizika Tanszékének Magneto-Optikai Kutatócsoportja egy olyan műszer fejlesztésébe kezdett néhány éve, ami akár terepi körülmények között is alkalmas lehet a fertőzés kimutatására. A csoporthoz csatlakozva kutatómunkám során azt vizsgálom, hogyan alkalmazható a műszer egyéb módszerekkel kiegészítve parazitakultúrák által termelt hemozoin kristályok morfológiájának jellemzésére.



3. ábra. A hemozoin kristályok mágneses anizotrópiájának spektruma különböző közegekben (S - különböző koncentrációjú sóoldatok, P - vérplazma, B - vér) [14].

3. Célkitűzés

A kísérleteim célja annak vizsgálata, hogy gyógyszeres közegben termelt hemozoin kristályok hogyan változnak a gyógyszermentes közegben fejlődő parazitakultúrákéhoz képest. Vérkenetek optikai mikroszkópos elemzésével a parazitakultúrák koreloszlása a sejtek morfológiája alapján bizonyos korlátok között beazonosítható, így fejlődésük nyomon követhető. Ezen optikai mikroszkópos megfigyeléseket elektronmikroszkópos felvételekkel egészítem ki, amelyekben statisztikus analízisnek vetem alá a parazitakultúrákból kivont és megtisztított hemozoin kristályokat. Azt is elemzem továbbá, hogy magneto-optikai mérések során a kristályok alakja befolyással van-e forgó mágneses tér fordulatszámának változtatásával felvett görbe alakjára.

4. Kísérleti módszerek

Ebben a fejezetben egy általánosabb betekintést nyújtok a kutatásom során alkalmazott módszerek technikai háttéréről. A fejezetet a *P. falciparum* kultúrák gondozásával kezdem, majd a kristályextrakciós protokollt mutatom be. Ezt követően a magneto-optikai mérések menetéről és az elektronmikroszkópos képek kiértékelési módjáról írok.

4.1. A *P. falciparum* kultúrák gondozása

A kísérleteim során a parazitakultúrákkal való munkát a Magyar Tudományos Akadémia Természettudományi Kutatóintézetében működő BME-MTA Maláriakutató Laboratóriumában végzetem. A 2017 tavaszán alakult laboratóriumot kollégáim kifejezetten *P. falciparum* sejt kultúrák fenntartására alakították ki, így ideális környezetet biztosít a továbbiakban ismertetett fenntartási protokollok végrehajtásához, melyeket kutatómunkám első szakaszában sajátítottam el.

Itt szeretném megjegyezni, hogy a fejezetben bemutatott módszerek, protokollok részletes leírása a [24] kézikönyv-jellegű protokollgyűjteményben megtalálható, így ebben a fejezetben további referenciák feltüntetésétől eltekintek.

In vitro körülmények között a *P. falciparum* paraziták vér stádiumú formái tarthatók fenn egy vörösvértestetek és a számukra tápanyagul szolgáló oldatot tartalmazó folyadékuszpenzióban. A szuszpenzió térfogatának 5%-át alkotják 0+ vagy A+ vércsoportú vörösvértestetek, a fennmaradó 95% pedig egy MCM-nek (malaria culture medium) nevezett

táplódat, amely aminosavakat, cukrokat, antibiotikumot és különféle sókat tartalmaz. A paraziták fennmaradásához továbbá a vérkeringésbeli környezethez hasonló körülmények megteremtése szükséges. Ez 37 °C-on, 5%-os oxigén és 5% CO₂ koncentráció mellett történő inkubálást, és a vörösvértestek időszakos cseréjét jelenti.

A kultúrák táplódatát naponta kell cserélni. Ennek során alacsony, 1500-3000 percenkénti fordulatszámon a kultúrát centrifugálni kell, a felülúszót leszívni, és új táplódatral feltölteni. Ezen kívül minden nap vérkenetet kell készíteni róluk, ez alapján pedig az aktuális korukat azonosítani és a parazitémiát leszámolni. Ha a parazitémia az 1-2%-ot meghaladja, akkor a kultúra hígítása szükséges friss, fertőzetlen vörösvértestekkel.

Vérkenet készítése során 2 μ l mintát veszünk a kultúrából, melyet egy tárgylemezre cseppentünk föl. Egy másik tárgylemez segítségével a vérminta felületi feszültségen alapuló összegyűjtését és gyors végighúzását követően egy vékony folyadékfilm marad hátra, amiben megfelelő elkészítés esetén egy réteg vörösvértest marad. Száradás után metanolos öblítéssel fixáljuk a sejteket, majd Giemsa-festést alkalmazunk, mely lilás árnyalatúvá színezi a paraziták kromatinját és citoplazmáját, míg a vörösvértestek csak egy sokkal halványabb, rózsaszínes árnyalatot kapnak. A festést követő száradás után a minták transzmissziós optikai mikroszkóp alatt figyelhetőek meg.

A parazitémia becslésekor 10-30 látómezőben (egy látómező átlagosan 150-200 vörösvértestet tartalmaz) határozzuk meg a paraziták számát. Az eredményeimet tartalmazó 5. fejezetben ismertetett koreloszlás hisztogramokhoz pedig legalább 100 parazitát számoltam le, melyek korát a Függelék 'A' részében megtalálható referenciaképek alapján osztályoztam. Ez, az egy vérfázisú parazita fejlődési folyamatát bemutató ábra, 25 pontra osztja a teljes élelciklust, melyeket a saját statisztikáimhoz 5 nagyobb kategóriára egyszerűsítettem le.

Ahhoz, hogy jól definiált koreloszlással rendelkező kultúrával dolgozzak, a kultúra szinkronizálása szükséges, mert amíg *in vivo* körülmények között a paraziták szinkronizáltan fejlődnek, addig *in vitro* elveszítik ezt a jellemzőjüket és néhány ciklus elteltével mindenféle korú egyed előfordul a sejt kultúrákban. A koreloszlás szűkítése többféleképpen is lehetséges, a méréseimhez felhasznált kultúrákon a szorbit-kezelés (sorbitol treatment) módszert alkalmaztam. A protokollt egy új fejlődési ciklus kezdetén kell elvégezni, lényege ugyanis az idős parazitákat tartalmazó vörösvértestek célzott elpusztítása. Utóbbiak ugyanis lényegesen gyorsabban abszorbálják a cukoralkoholt tartalmazó oldatot mint fiatal társaik, és a

túl gyors diffúzió miatt kipukkadnak. Első lépésként centrifugálást követően a tápoldaton kívül a halott sejtek és a sejten kívüli hemozointartalom eltávolítása szükséges, melyek a kiülepített minta felszínén lévő feketés rétegben találhatóak. A tápoldattal együtt ezt is eltávolítom. Ezt követően 5%-os, steril fiziológiás sóoldatban feloldott szorbitol oldatot kell a kultúrához adni, majd 10 percen keresztül 37°C-on inkubálni. A kultúra ismételt centrifugálását követően a halott vértetek hatására a felülúszó vörössé válik. Ennek leszívása után a fejlődéshez használt tápoldat hozzáadásával egy, már csak fiatal sejteket tartalmazó kultúra marad meg.

Az 'Eredmények' fejezetben ismertetett hemozin kivonási kísérleteimnél a sztenderd gyógyszereszetekhez nagyon hasonló mérési protokollt követtem. A kultúrát szinkronizálás után annyi részre osztottam, amennyi mérési pontot a későbbiekben felvenni terveztem. A jelen munkában ismertetett két független kísérletsorozatban ez 2-2, tehát összesen négy mintát jelentett. Ezek közül kettőt gyógyszermentes tápoldatban inkubáltam, míg kettőt 50 nM klorokint tartalmazó tápoldattal. Mind a kontroll, mind a hatóanyagot tartalmazó kultúrák egyikét 24 óra elteltével hemolizáltam és megkezdtem a hemozin kivonási folyamatot, míg a maradék két kultúra-egységet további 24 órán keresztül hagytam növekedni és utána használtam fel őket. A kultúrákból a kezdeti és mindkét mintavételi időpontban vérkeneteket készítettem, melyeket a paraziták koreloszlása szerint analizáltam. Mindkét kísérlet-sorozatban a parazitémia a tesztek megkezdésekor a sztenderd 2% körüli volt. A második kísérletsorozatban ezen túl minden sejt-kultúrából elkülönítettem 2 magneto-optikai méréshez elegendő térfogatot a kivonás megkezdése előtt, melyeken tisztítás nélkül, a diagnosztikai körülményekhez hasonló protokoll szerint megmértem a hemozin kristályok magneto-optikai jelét. Az egyelőre nem túl sűrű mintavételezés oka az volt, hogy a kontroll és a gyógyszeres mintákat egy sejt-kultúra 4-felé osztásával szerettem volna előkészíteni, és így nem aprózhattam el a kultúrák térfogatát túlságosan, mert félő volt, hogy a kivonási protokoll hatékonysága nem túl magas és kevés kristály marad az elektronmikroszkópos képanalízishez.

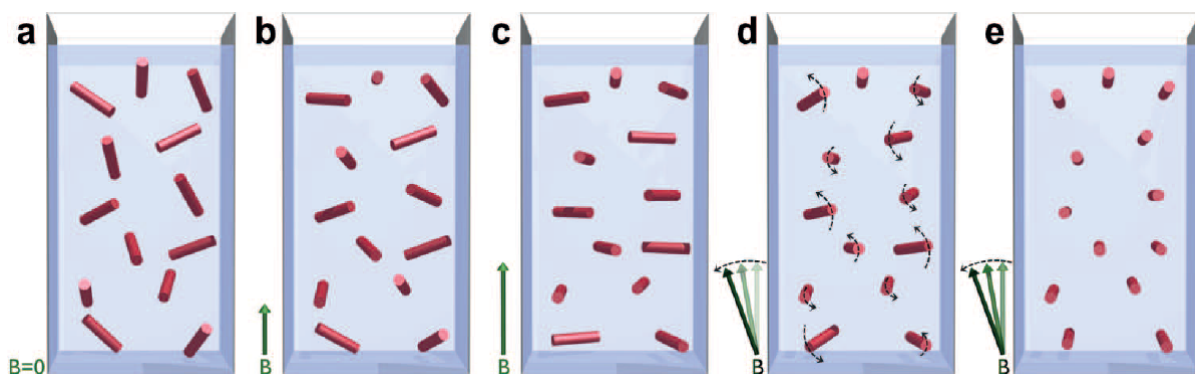
4.2. Magneto-optikai mérések

A hemozin kristályok anizotrop mágneses és optikai tulajdonságai lehetőséget adnak arra, hogy a maláriafertőzés jelenlétét fizikai úton is ki lehessen mutatni [23]. 2012 óta a BME Fizika Tanszéken működő Magneto-Optikai Spektroszkópia Kutatócsoport egy ezeken a

tulajdonságokon alapuló diagnosztikai eszközt fejlesztett, ami nagy érzékenységgel képes szuszpenzióban lévő hemozoin kristályok koncentrációjának kimutatására.

A módszer alapja a forgó mágneses tér által indukált lineáris dikroizmus (MLD) jelensége. Folyadék közegben mágneses tér hatására a kristályok úgy fordulnak el, hogy a nehéz tengelyük a mágneses tér irányára merőlegesen álljon, ezáltal csökkentve mágneses energiájukat (lásd: 4.b. ábra). Megfelelően nagy mágneses tér a szuszpenziót képes úgy rendezni, hogy az egyedi kristályok mágneses nehéz tengelyei párhuzamos síkokba rendeződnek (4.c. ábra). A mágneses tér irányának lassú forgatása esetén a kristályok követni tudják a forgásirányt (4.d. ábra). Nagyobb szögsebességű mágneses térben viszont a rájuk ható közegellenállás is növekszik, a két hatás együttesen pedig úgy rendezi a kristályokat, hogy a nehéz tengely merőleges legyen a forgási síkra is (4.e. ábra). Ezáltal a mágneses tér vektora mindig a könnyű mágnesezési síkjukban marad, nem kényszerülnek tovább fordulni a mágneses tér szögének változása esetén sem, mágneses energiájuk anizotrópia járuléka állandó lesz.

Az anizotrop paramágneses szuszceptibilitás mellett a diagnosztikai módszer a kristályok egy további irányfüggő tulajdonságát, nevezetesen lineáris kettőtörésüket (dikroizmust) használja ki. Mivel a mágneses és a látható hullámhossz-tartományban jellemző optikai tulajdonságokat egyaránt az elemi cella központi vasatomja határozza meg, így a kristályok mágneses nehéz tengelye és a másik kettőtől eltérő transzmissziós együtthatóval rendelkező tengely egybeesik. Ennek köszönhetően egy mágnesesen rendezett kristályszakasz makroszkopikus lineáris kettőtörést képes indukálni, vagyis elforgatja egy, az optikai tengellyel nem nulla szöget bezáró lineárisan polarizált fénynyaláb polarizációs síkját. Forgó mágneses térben a szuszpenzió a mágneses tér forgási síkjára merőlegesen átvilágítva periodikusan fogja modulálni az átmenő fény polarizációs irányát, amely egy analizátor közbeiktatásával könnyen detektálható intenzitásváltozássá alakítható. Az átmenő intenzitás a várakozásoknak megfelelően a mágneses tér szögének hamronikus függvénye lesz. A periódus hossza ugyanakkor nem közvetlenül a mágneses tér forgásának periódusidejével egyezik meg, hanem egy forgási periódus alatt az egyik polarizációs komponensre két ponton ad maximumot, ugyanis itt csak az befolyásolja a fényelnyelést, hogy az optikai tengely párhuzamos vagy merőleges-e a fény polarizációjának irányára. Emiatt a kétszeres forgási frekvenciában jelenik meg a lineáris dikroizmus által indukált jel [14].

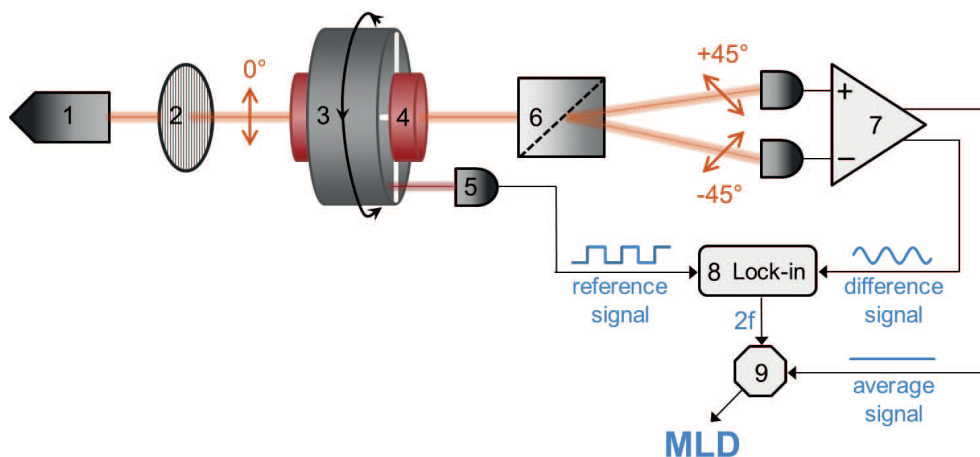


4. ábra. A kristályok rendezettsége külső mágneses tér jelenlétében. A hengerek forgástengelye a nehéz tengelyt, az erre merőleges, körlapjukkal párhuzamos sík a könnyű síkot modellezi. (a) A szuszpenzió mágneses tér nélkül. (b) Kis mágneses térben részleges mágneses rendeződés. (c) Megfelelően nagy mágneses térben a kristályok nehéz tengelye merőlegessé válik a mágneses tér irányára. (d) Lassan forgó mágneses térben a kristályok követik a mágneses tér mozgását. (e) Nagyobb szögsebességgel forgó mágneses térben a kristályok nem tudják követni a mágneses tér forgását a közegellenállási erő megnövekedésének hatására, ennek eredménye egy olyan rendeződés, ahol a nehéz tengelyek merőlegesek a mágneses tér forgási síkjára és párhuzamossá válnak, ezzel a kristályok forgása megszűnik [14].

A mérésekhez egy erre az alkalmazásra fejlesztett, két végén üveglappal ellátott mintatartót használunk, amelybe a kristályokat tartalmazó szuszpenziót töltjük. Ezt egy piros, $\lambda = 650$ nm hullámhosszú lézerdióddal világítjuk át, ugyanis a 2.2.1. fejezetben bemutatott spektrum alapján itt a legjelentősebb a hemozoin transzmissziós anizotrópiája. Mielőtt a fénysugár a mintatartót eléri, egy polarizátor és egy $\lambda/4$ -es lemez segítségével lineárisan, majd cirkulárisan polarizáljuk. A cirkuláris polarizáció használatának előnye, hogy kiküszöbölhetők a mintatartó ablakai és a mintában jelen lévő egyéb komponensek Faraday-effektusából származó optikai jelek járulécai. A mintatartó körül egy Halbach-mágneses elrendezés [25] van kialakítva, ami a szuszpenzió helyén homogén mágneses teret hoz létre. Ez a struktúra egy vezérelhető egyenáramú léptetőmotor segítségével forgatható, ami a rá kapcsolt feszültséggel arányos frekvencián működik. A mágneses elrendezést tartalmazó henger külső palástján egy fekete-fehér csíkozás található, melyet egy közvetlenül a henger mellett elhelyezett optikai kapuként használt fotodióda érzékel. Ebből egy, a mágneses tér forgási frekvenciájára jellemző négyzögjelet kapunk, melyet a későbbi jelfel-

dolgozásban a referenciajel előállításához használunk fel. A mintatartóból kilépő lézerefény egy Rochon-prizmára esik, ami a az egymásra merőleges fénykomponenseket 10° -ban téríti el. Az így kettéosztott fénysugarat egy-egy detektorra fókuszáljuk. A két jel különbségét a referenciajellel összeszorozva digitális lock-in technikával határozzuk meg az intenzitás-változás azon komponensét, mely a minta mágneseesen indukált lineáris dikroizmusából származik. Ennek az amplitúdóját a teljes átmenő fényintenzitással normáljuk, az így kapott jel nagysága pedig egyenesen arányos a mintában található hemozoin kristályok koncentrációjával [14].

Egy optikai mérés során egy parazitakultúrából származó mintát először hemolizálni kell, ez a vörösvértetek ozmotikus effektusok révén történő roncsolását jelenti. Erre több ok miatt van szükség: (i) a sejtmembránokba zárt hemozoint szabaddá kell tenni, (ii) az ép vörösvértetek által szórt fény miatt jelentősen lecsökkentené az átmenő fényintenzitást. Ezt 13 mmol/ml koncentrációjú NaOH és 0,03%-os Triton oldat segítségével végezzük. A mintatartó behelyezése után a polarizátort és a $\lambda/4$ -es lemezt minden mérés előtt úgy kell beállítani, hogy a fotodióda-hidat tartalmazó csatolt detektorpárra eső jel DC komponense a két diódán azonos legyen - ekkor a bejövő fénynyaláb polarizációs iránya éppen 45° -ot zár be az analizátor (a Rochon-prizma) optikai tengelyével. A DC motor vezérlése és az optikai kapu jelének digitalizálása egy analóg-digitális mérőkártyán keresztül történik. Egy optikai mérés során 1 V vezérlőfeszültség beállításával a motor körülbelül 13 Hz-es fordulatszámon forgatja a mágneses gyűrűt, miközben mintát átvilágító lézer jelét érzékelő detektorpár és a mérőkártya folyamatos adatfelvételt végez. A mérőprogram körülbelül 10 másodpercnyi idő eltelte után dolgozza fel a jeleket és határoz meg ebből egy MLD értéket, azaz mérési pontot. Egy adott optikai minta esetén egy mérés alatt 7–8 pontot veszünk fel, majd ezek átlagából kapjuk meg az adott mintára jellemző átlagos jelnagyságot.

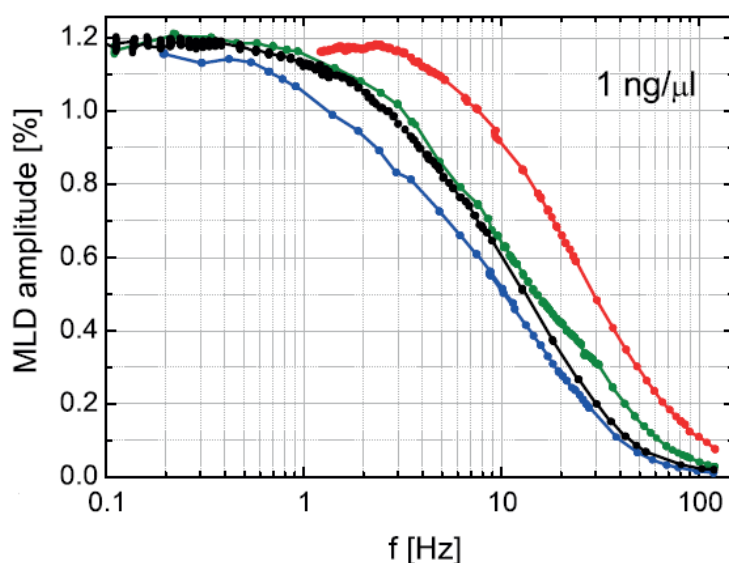


5. ábra. A használt magneto-optikai mérőeszköz sematikus ábrája. (1) Lézerdióda. (2) Polarizátor és $\lambda/4$ -es lemez. (3) Motorral forgatott Halbach-mágneses elrendezés. (4) Átvilágítható mintatartó. (5) Referenciajel felvétele. (6) Rochon-prizma, a kétféle polarizációjú fény kettéosztására. (7) Két diódából álló detektor, átlag és különbségi jel kivezetése. (8) Digitális lock-in technika alkalmazása a két detektor különbségi jelére a felvett referencia kétszeresét referenciaként használva. (9) A második harmonikus normálása az átlagjellel [14].

A mágneset forgató motor fordulatszámának változtatásával tanulmányozható a kristályok folyadékbeli dinamikája optikai válaszukon keresztül. A növekvő fordulatszám mellett felvett mérésorozatok alapján az MLD jel karakterisztikus frekvencia-függéssel rendelkezik, és koncentrációtól, illetve a kristályokat tartalmazó közegtől függetlenül a jel csökkenése tapasztalható. Ezen görbék tipikus alakja a 6. ábrán látható.

A görbék pontos matematikai modelljét még nem alkottuk meg, ugyanakkor szemléletesen a 4. ábra alapján a következőképp magyarázhatók: statikus mágneses térben a kristályok úgy rendeződnek, hogy könnyű mágnesezési síkjuk tartalmazza a mágneses tér vektorát, ugyanakkor ezen vektor körül tetszőleges szögben elfordulva mágneses energiájuk nem változik. Így statikus térben a kristálysokaság csak részben rendezett, és egy vertikális síkban polarizált fénynyaláb polarizációját megváltoztatja, ami mérhető MLD jelet eredményez. Nagy forgási frekvencián ugyanakkor, a kristályok a folyadék által kifejtett közegellenállás miatt fáziscsúszásba kerülhetnek a mágneses tér irányához képest, így feltehetőleg olyan helyzetbe rendeződnek, amelyben a B vektor nem fordul ki a könnyű síkból (4.e ábra). Ebben az esetben a sokaság teljes rendeződése megtörténik, a könnyű síkbeli közel izotrop törésmutató miatt pedig a szuszpenzió lineáris dikroizmus megszű-

nik. Amennyiben a fenti kvalitatív elemzés helyes, azt várjuk, hogy a fordulatszám-MLD görbék alakja függ (i) az alkalmazott B tér nagyságától, (ii) a közeg viszkozitásától, (iii) a kristálméret-eloszlástól és természetesen a hőmérséklettől [14]. Csoportunk korábban vizsgálta a közeg viszkozitásának hatását (lásd:6. ábra), így munkám során én a méreteloszlás okozta változásokra fókuszáltam. Feltételezésem szerint, a kisméretű kristályok a tér forgását még nagyobb fordulatszámon is követni tudják, míg a nagyobb kristályokra ható nagyobb közegellenállási erő miatt hamarabb történik meg, hogy a nehéz tengely a mágnes forgási tengelyének irányába áll be, így ezek járuléka megszűnik, a görbék lefutása ekkor meredekebbé válik.



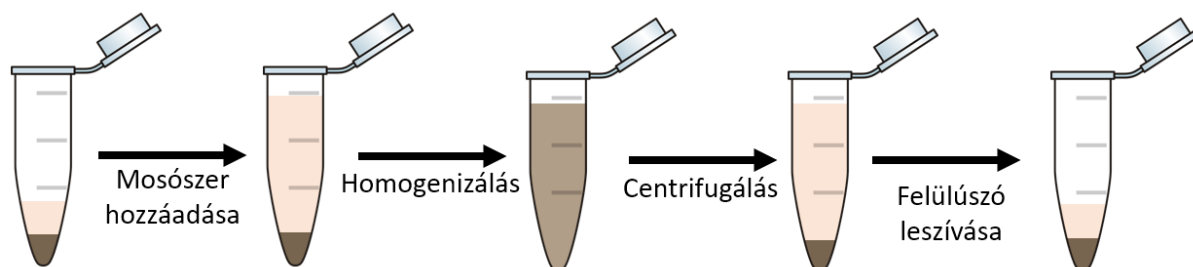
6. ábra. A magneto-optikai jel a mágneses tér frekvenciájának függvényében, különböző közegekben. A színek jelentése: kék: propanol, fekete: víz, zöld: metanol, piros: acetone [14].

4.3. A kristályok kivonási protokollja

A kutatásom egyik célja, hogy elektronmikroszkópos felvételek alapján kultúrákból kivont kristályok méretstatistikáját vizsgáljam. Mivel a hemozoin kristályok a vörösvértetek belsejében lévő parazita emésztőszervében találhatóak, így az őt körülvevő membránok és egyéb szerves anyagok bontása szükséges, hogy olyan kristálysuszpenziót nyerjek ki, amelyben felcseppentést követően jól láthatóak lesznek az önálló kristályok.

A kivonást egy, az irodalomban talált, hemozoinextrakciós protokoll módosított változata alapján végeztem el [26]. Első lépésben a kultúrát centrifugálok, majd a sejtek

fölötti tápoldatot leszívom. Ezt követően hemolizálom a sejteket egy hígabb (1 mM NaOH és 0,03, V/V% Triton koncentrációjú) oldattal, mint amit a magneto-optikai méréshez is használunk. Ezt követően több vízzel, és 2%-os SDS (nátrium-dodecil-szulfát) oldattal való mosást végzek. Egy mosási lépés az újabb mosószert hozzáadását, a minta ultrahangos keverésével és vortexelésével való homogenizálását, ezt követő centrifugálását és a felülúszó leszívását jelenti (sematikusan lásd: 7. ábra) Következő lépés az egy éjszakán keresztüli proteináz K enzimmel történő 37 °C-on való inkubálás, amit azonban néhányszor kísérleti jelleggel elhagytam, azt vizsgálva szükség van-e erre a lépésre, remélve, hogy a kivonási protokoll költsége ezáltal – a minta minőségének romlása nélkül – csökkenthető. Az inkubálást követően kétszeri SDS-sel történő mosás után a kristályokat tartalmazó mintát három órán át UREA oldattal kell inkubálni folyamatos keverés mellett. Az UREA és a proteináz a mintában lévő membránok és fehérjék bontásában játszik szerepet. Az inkubálást követően újabb SDS-sel, majd vízzel történő mosási lépések következnek. A kivont pellet desztillált vízben, hűtve tárolható. Elektronmikroszkópos vizsgálat előtt egy oxidrétegétől megtisztított szilíciumlapra cseppentem föl a végső szuszpenziót. A protokoll pontos lépései megtalálhatóak a Függelék B részében.

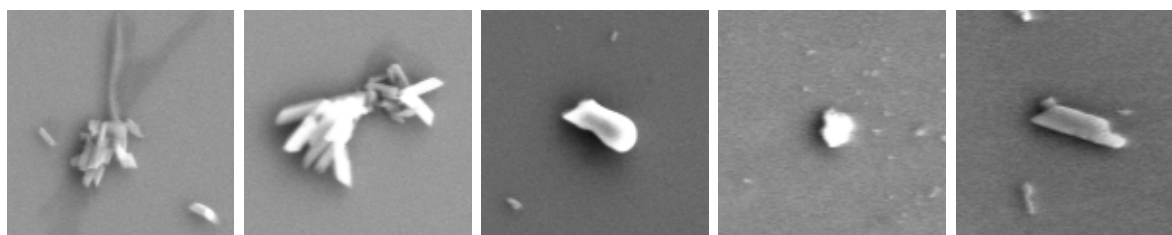


7. ábra. Egy mosási lépés sematikusan.

4.4. Elektronmikroszkópos felvételek és a képek kiértékelése

Az elektronmikroszkópos felvételek a Központi Fizikai Kutatóintézet Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézetének Mikrotechnológiai osztályán készültek, a mérések kivitelezésében az intézet munkatársa, Illés Levente segített. A képek egy Thermo Scientific Scios 2 típusú pásztázó elektronmikroszkóppal készültek, Everhart–Thornley detektor alkalmazásával, amelyet szekunder elektron detektor módban használtunk. A hemozoin kristályok vastartalma, a vas nagy rendszáma révén, a felvételeken fehér kontrasztot ad, így könnyen azonosíthatóak nem csak szemmel, hanem szoftveresen is.

Az elektronmikroszkóppal készített képek automatizált kiértékelését az ImageJ nevű nyílt forráskódú szoftver segítségével végeztem [27]. A képanalízis első lépésként a kép valódi méretét méretét állítom be az *Analyze/Set scale* parancs segítségével, ehhez a felvételek alján található paraméterlista HFW (horizontal field width) pontját használtam fel. Következő lépésként egy küszöbszintet állítok be, ezzel a háttérhez képest világosabb területeket jelölöm ki, köztük a hemozoin kristályokat (*Image/Adjust/Threshold*). A küszöbszint beállítása egy bináris fájlt hoz létre a képből. Amennyiben a küszöbszint beállítása nem működik megfelelően, a teljes felvétel fényerősségen és kontrasztján is változtatok. Ezt követően a bináris fájlt összehasonlítva az eredeti képpel kitörlöm azokat a részecskéket, melyek nem feleltethetőek meg egyértelműen egyedi hemozoin kristályoknak, például kristálycsoportosulásokból, sókristályokból vagy egyéb objektumokból származnak. Erre néhány példa található a 8. ábrán. A program automatikus részecskeazonosító és részecskéket elemző funkciója segítségével (*Analyze/Analyze particles* parancs) egy statisztikát kaphatok a képen lévő kristályokról. A kiértékelés folyamata a 9. ábrán is végigkövethető.

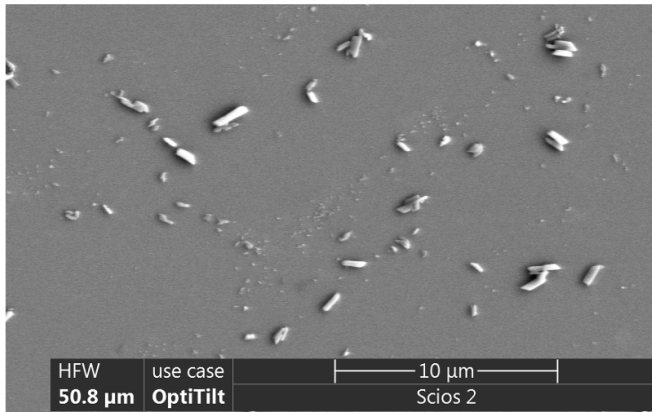


8. ábra. Példák olyan kristálycsoportosulásokra, vagy nem egyértelműen hemozoinból származó felvételrészletekre, amelyeket a törlök a létrehozott bináris fájlról az automatikus részecskeanalízis előtt. Az utolsó képen egy olyan hemozoin kristály látható, amit sötétebb színe révén a program nem azonosít megfelelően.

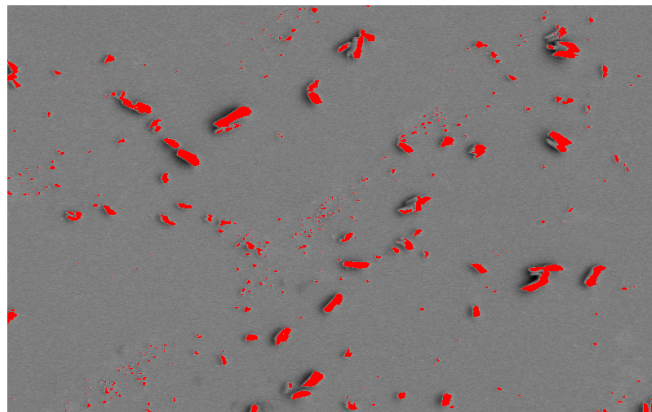
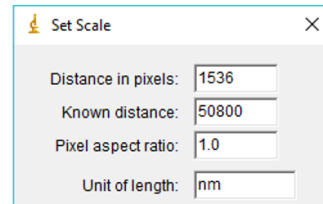
A statisztikákban 20 négyzetpixel fölötti azonosított objektumokat tekintek kristálynak, ezzel kizárom az esetleges háttérzajt, illetve a kis méretű objektumokat, amik szemmel sem azonosíthatóak legtöbb esetben. A statisztikából azzal az adatponttal jellemzem a kristályokat, ami egy azonosított objektum körvonalának két legtávolabbi pontját köti össze (a programban *Feret diameter*).

A tényleges statisztikák elkészítéséhez még e fölött az azonosítási határ fölött is definiáltam egy küszöbszintet a kristályok minimális hosszára, ami 10-20%-kal nagyobb, mint a 20 négyzetpixel által azonosított legkisebb részecske hossza. Ezzel ki lehet zárni az alsó

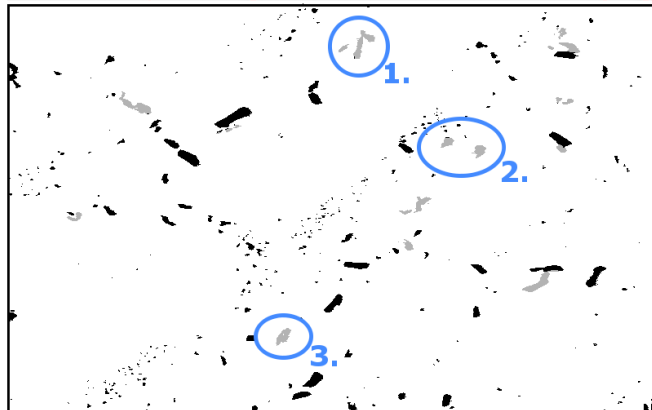
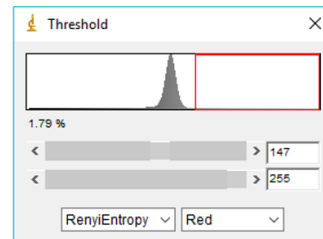
határ körül a gömbszerűbb részecskéket, és csak a hosszúkás kristályok hosszát meghagyni, melyek nagy valószínűséggel hemozointól származnak.



1. Méretskála beállítása

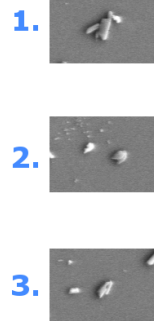


2. Küszöbszint beállítása a kristályok kijelölésére

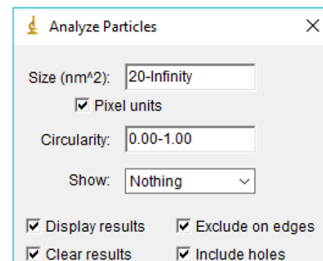
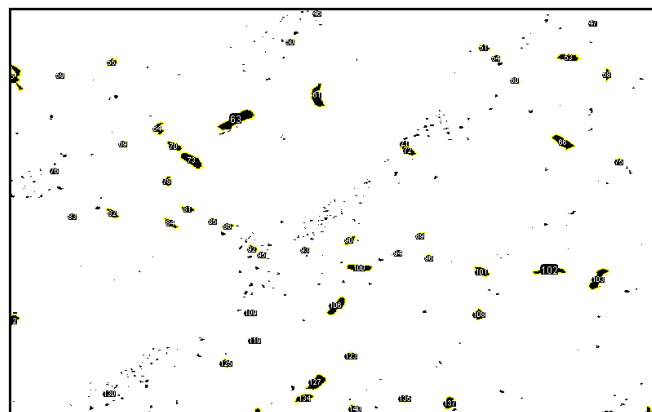


3. A nem megfelelően azonosított, kristálycsoportosulásokból származó vagy nem egyértelműen hemozin által adott jelek törlése.

Példák törölt jelekre:



4. Az azonosított részecskék automatikus elemzése.



9. ábra. Az elektronmikroszkópos képek kiértékelésének menete egy tipikus hemozin kristályokról készült képen.

5. Eredmények

A dolgozat következő fejezetében ismertetem azon kísérletsorozataim eredményeit, melyeket *P. falciparum* sejt kultúrákon végeztem azzal a céllal, hogy tanulmányozzam, hogyan változik a paraziták növekedése során termelt hemozoin kristályok méreteloszlása, és ezt befolyásolja-e maláriaellenes hatóanyag alkalmazása. A sejt kultúrákon végzett éles mérési sorozatok előtt metodikai tesztek is végeztem szintetikus hemozoin kristályok segítségével, hogy megvizsgáljam, alkalmas-e a SEM-képanalízis, illetve a magneto-optikai dinamikai mérés a kristályméret-eloszlás jellemzésére. Ezen méréseimet az 5.1. alfejezben ismertetem.

A gyógyszeres és gyógyszermentes közegben növekedő kultúrákon két mérést mutatok be. Ezek közül az egyik egy előtanulmány, az első próbálkozásom a különböző módon növő paraziták által termelt kristályok összehasonlítására. A második vizsgálat során az első mérés tanulságai alapján több ponton is kiegészítettem a mérési protokollt.

A kultúrák, amelyekkel dolgoztam, a mérés megkezdése előtt két-három növekedési ciklus lefolyását követően szinkronizálva voltak. Ezzel egyrészt elérhető, hogy a tesztek kezdetekor viszonylag szűk koreloszlású kultúrából indulhassak ki, másrészt eltávolítható a korábbi ciklusokból származó, a sejtek közötti folyadéktérbe kilökődött hemozointartalom, melyek a sejttenyésztő flaska felületén gyűlhetnek össze. Az utolsó szinkronizálást követően a kultúrát két részre osztottam. Ezek közül az egyikük tápoldatához klorokin maláriaellenes gyógyszert kevertem, $cc = 50$ nM koncentrációban, mely értéket úgy választottam meg, hogy megfeleljen a kutatócsoport által korábban megállapított IC₅₀-es értéknek. Ez az érték azt a hatóanyag-koncentrációt adja meg, mely egy adott parazita kultúra populációjának növekedési mértékét egy ciklus alatt a felére csökkenti. Az, hogy ez milyen módon történik – a populáció érzékenyebb felének gyors eliminálásával, az összes parazita növekedésének lassításával vagy a két hatás együttes jelenlétével – még kutatott terület és jövőbeni vizsgálataink tárgya. Mindkét azonos forrásból származó, de immáron külön fejlődő parazitakultúrából két mintavételt végeztem, az egyik mérést a trophozoita fázis, a másikat a schizont fázis idejére próbáltam időzíteni. Egy mintavétel alatt mindkét kultúra (kontroll és kezelt) térfogatának felét-felét készítettem elő az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz. A kivonás során a kivonási protokoll egyes lépéseinek hatékonyságát is vizsgáltam, ennek eredményeit az 5.2. alfejezben írom le. A kristályok morfológiájá-

val kapcsolatos méréseket, ezek kapcsolatát a koreloszlással és a gyógyszer jelenlétével az 5.3. alfejezet alatt fejtem ki.

A kultúrákon való mérések során az alábbi jelöléseket alkalmaztam:

- DF (drug free) és CQ (chloroquine) névvel jelzem a gyógyszermentes, illetve gyógyszeres közegben felnövő kultúrákon végzett éréseket a fejezet grafikonjain.
- Fiatal és idős kultúrának nevezem a két különböző idejű mintavételt a könnyebb megkülönböztetés érdekében, bár a kultúrák kora nem feltétlenül tükrözi ezen állapotokat, ugyanis mindkét kivonást a növekedési ciklusuk periódusának második felére időzítettem.

5.1. A mágneses tér forgási frekvenciájának hatása szintetikus hemozoin kristályokon

A magneto-optikai műszerrel való mérések tapasztalata, hogy a forgó mágneses tér fordulatszámának növekedésével a hemozoinszuszpenziók lineáris dikroizmus jele egyre kisebb lesz. A 4.2 fejezetben leírt szemléletes kép alapján a kristályok a nagyobb forgási sebességük folytán növekvő közegellenállási erő hatására fokozatosan befordulnak könnyű mágnesezési és egyben optikailag izotrop síkjukkal a mágneses tér forgási síkjába, elveszítve ezáltal polarizációs hatásukat a lézerfény megvilágítási irányából. A jelenlegi feltételezés, hogy a kisebb kristályok, mivel kisebb mértékű közegellenállás hat rájuk, tovább tudják fáziskésés nélkül követni a mágneses tér forgását. Emiatt nagy fordulatszámon egy kisebb kristályokat tartalmazó szuszpenzió nagyobb magneto-optikai jelet fog adni mint egy azonos koncentrációjú, de átlagosan hosszabb vagy nagyobb méretű kristallitokat tartalmazó. Ezt a feltételezést a következő módon vizsgáltam: szintetikus hemozoin kristályokból vizes szuszpenziót készítettem, majd különböző fordulatszámokon való centrifugálást követően a felülúszóban maradó kristályokon dinamikai méréseket végeztem. Egyszerű mechanikai megfontolások alapján feltehetjük, hogy különböző fordulatszámú, rövid idejű centrifugálás során a nagyobb kristályok gyorsabban kiülepíthetőek, a felső rétegekben pedig a kisebb méretűek maradnak hátra. A legfelső rétegből egy magneto-optikai méréshez szükséges felülúszót leszívok, majd egyrészt vizsgálom a frekvenciafüggő jelalakot, másrészt a jel nagysága a kristálysuszpenzió koncentrációjával arányos, így a kapott jel nagyságok összehasonlításával centrifugálás hatékonyságáról is információt kaptam. A felülúszóban

megmaradó kristályok méreteloszlást pedig szilíciumlapra történő felcseppentést követően elektronmikroszkópos felvételek alapján elemeztem.

A mérésorozat során használt szintetikus hemozoin kristályok a Jaramillo és társai által fejlesztett szintézis alapján készültek [28]. A kristályok szerkezete, mágneses és optikai tulajdonságai a paraziták által termelt kristályokéval megegyezik. A szintézis során nagyobb mennyiségű kristály készíthető, ami lehetővé teszi olyan kísérletek elvégzését, amelyekhez nagy koncentrációjú vagy térfogatú kristálysuszpenziók szükségesek.

Centrifugálás során egy folyadékban lévő részecske mozgását befolyásoló három legfontosabb erő a hőmérsékleti mozgást elhanyagolva a gravitációs erő, a centrifugális erő és a közegellenállási erő. Ez alapján felírható a mozgásegyenlete:

$$m\omega^2\mathbf{r} + m\mathbf{g} + k\eta\frac{d\mathbf{r}}{dt} = m\frac{d^2\mathbf{r}}{dt^2}, \quad (4)$$

ahol m a részecske tömege, k a részecskékre jellemző alaktényező, η a folyadék viszkozitása, ω a centrifugálás forgási frekvenciája, \mathbf{r} a részecske helykoordinátája. A gravitációs erő nagy fordulatszámon elhanyagolható. A centrifugális erő a térfogattal arányos, a közegellenállási erő az áramlás paramétereitől függően a karakterisztikus hosszal vagy a felülettel. A kisebb kristályoknak nagyobb a felület térfogathoz viszonyított aránya, így a közegellenállási erő arányaiban nagyobb hatást képes kifejteni. A nagyobb kristályok esetén éppen ellenkezőleg, a centrifugális erő határozza meg az elmozdulásukat nagyobb mértékben, azaz feltételezhetően gyorsabban kiülepedíthetők.

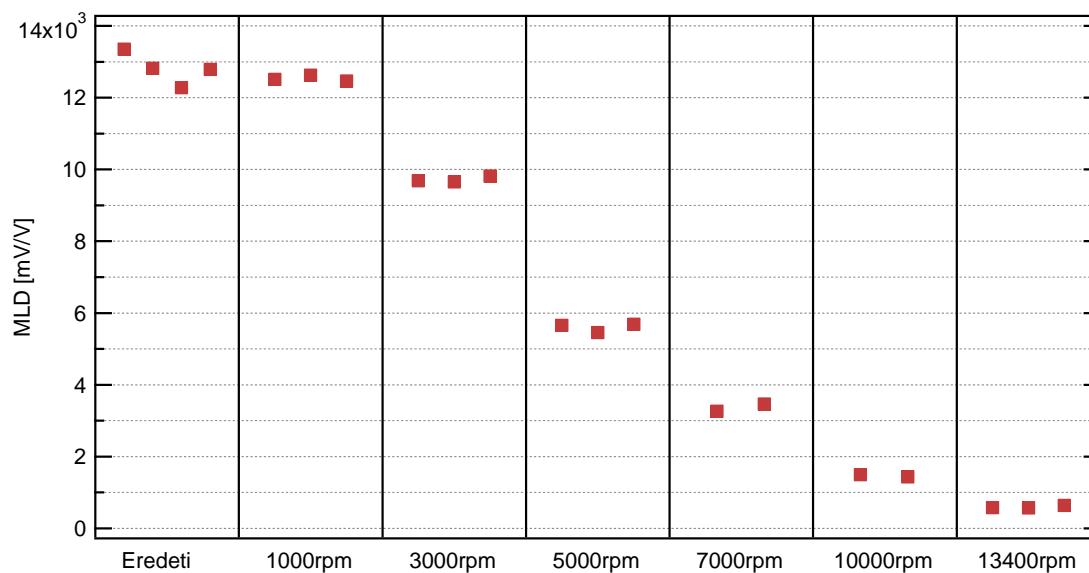
A méréseimhez $40\ \mu\text{g}/\text{ml}$ koncentrációjú vizes hemozoinuszuszpenziót készítettem elő, melyből egy méréshez 1 ml-t töltöttem egy 1,5 ml-es Eppendorf csőbe. A kitöltött szuszpenziót különböző fordulatszámokon centrifugáltam rövidebb időtartamokig egy Eppendorf MiniSpin 1,5 ml-es Eppendorf csöveknek kialakított centrifugában. Ezt követően a szuszpenzió felsőbb részéből leszívtam egy magneto-optikai méréshez szükséges mennyiséget, melyen megvizsgáltam a lineáris dikroizmus jelét a mágneses tér forgási frekvenciájának függvényében. Az egyes mérések időtartama, percenkénti fordulatszáma és a centrifugált minták száma az 1. táblázatban találhatóak meg.

A felvett pontok alapján lineáris interpolációval meghatároztam a 20 Hz-es mágneses fordulatszámnak megfelelő magneto-optikai jel nagyságát, mellyel a centrifugálás hatékonysága jellemezhető. Ezek az értékek a 10. ábrán láthatóak. A centrifugálás hatása a 3000-es fordulatszámtól kezdett látszani, 3 perc alatt 5000-es fordulatszámnál a koncentráció már a felére csökkent. A hemozoin kivonási protokollnál ugyanezzel a centrifugával

a maximális, 13400-as fordulatszámom dolgoztam, melyen itt már 3 perc centrifugálást követően is azt tapasztaltam, hogy körülbelül 5%-ra csökkenti le a kristálmennyiséget az Eppendorf csőben található folyadékoszlop legfelsőbb tartományából. Ebből kiindulva a hemozin kristályok kivonási protokolljának lépéseinél a maximális forgási frekvencián történő centrifugálások alatt a használt 10-15 perces időtartamnak megfelelőnek kell lennie a kristályok kiülepítéséhez.

Fordulatszám	Centrifugálás időtartama	Minták száma
1000 rpm	2 perc	3
3000 rpm	3 perc	3
5000 rpm	3 perc	3
7000 rpm	3 perc	2
10000 rpm	3 perc	2
13400 rpm	3 perc	3

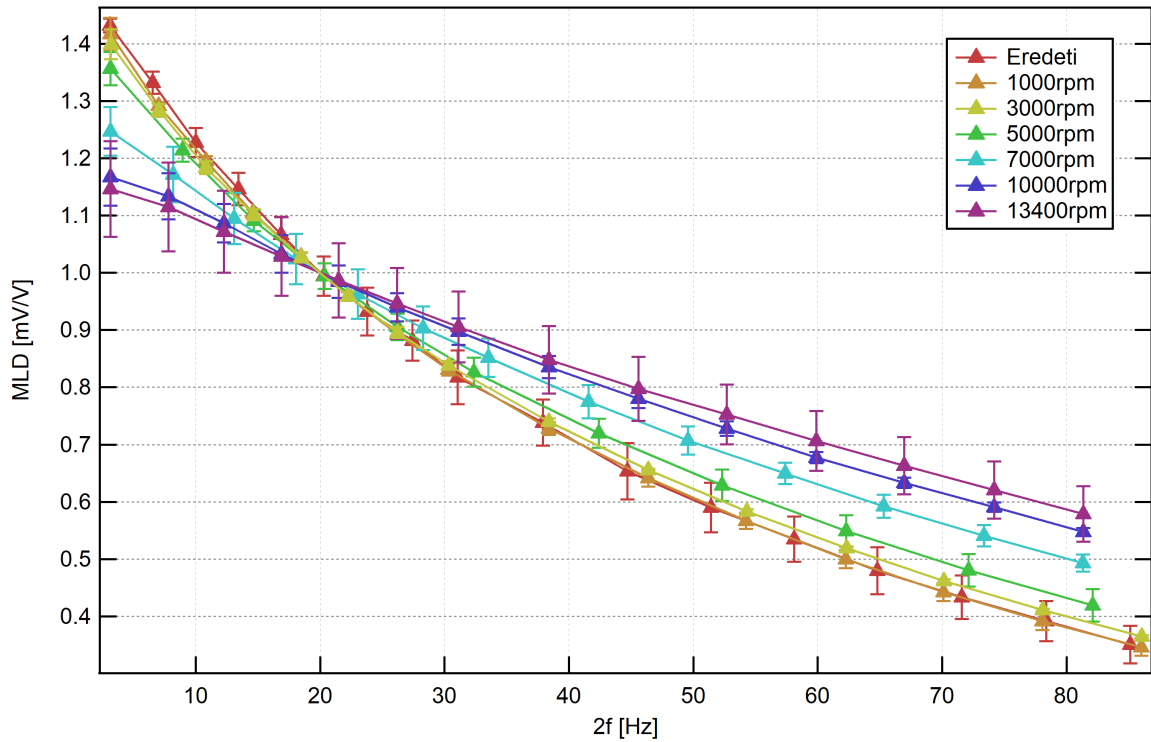
1. táblázat. A centrifugálások percenkénti fordulatszáma és időtartama, és az egyes pontokban centrifugált minták száma.



10. ábra. A felülúszókon mért magneto-optikai jel nagysága a forgó mágneses tér 20 Hz-es frekvenciájú pontjára normálva, a különböző fordulatszámom történő centrifugálások után.

A mágneses tér forgási frekvenciájának léptetésével felvett jelek a 11. ábrán láthatóak, 20 Hz-re interpolált értékükkel normálva. A 20 Hz-es normálást az indokolja, hogy ebben a tartományban a legjobb a jel-zaj viszony a korábbi vizsgálatok tapasztalatai szerint. Alacsonyabb frekvencián a digitális lock-in technika kevésbé megbízható, míg magasabb frekvencián az elrendezés mechanikai instabilitásai vihetnek zajt a mérésbe. Az 1. táblázatban listázott mintákon mért görbéket először normáltam, majd vettem az azonos paraméterekhez tartozó minták átlagát és szórását. Az így kapott adatsorban az adott pontokban a már normált jeleket vettem a különböző mérések átlagát és szórását.

A mérések alapján 3000 percenkénti fordulatszámig a görbék hibahatáron belül meg-egyeznek, az 5000-es fordulatszámon felvett görbe sem különül el teljesen. Az előtti fordulatszámon mért jelek kisfrekvenciás jele ugyanakkor alacsonyabbá, nagyfrekvenciás jele pedig magasabbá válik, azaz a jel kisebb arányú csökkenése történik a mágneses tér forgásának növekvő frekvenciája esetén. Ez annak a feltételezésnek megfelel, hogy a kisebb kristályok nagyobb forgási frekvencián tovább követik a mágneses tér változását, és így járulékok megmarad a magasabb forgási frekvenciákon. A továbbiakban ezt közvetlen módon, elektronmikroszkópos képek elemzése alapján is vizsgáltam, hogy valóban eltolódott-e a kristályok hosszának eloszlása a kisebb értékek felé a magneto-optikai mérésekhez felhasznált szuszpenziókból felcsöppentett mintákban.



11. ábra. A különböző fordulatszámon centrifugált minták felülúszóján mért magneto-optikai jelek a mágneses tér forgatási frekvenciájának függvényében.

Az elektronmikroszkópos felvételekhez az egyes felülúszókból szilíciumlapra cseppenttem föl egy-egy cseppet a mintákból. Az egyes mintákra jellemző tipikus kristályok láthatóak a 12. ábrán. A száradás során a minta külsőbb részein keletkeztek olyan területek, ahol a kristályok egyenletesen vannak szétszóródva (lásd: 12.a-e. ábra), a belsőbb területeken viszont gyakori, hogy nagy mennyiségű kristályok találhatóak összeragadva (lásd: 12.f. ábra). A felvételek nagyobb részét ezeken a külső területeken készítettem, viszont egyes belső tartományok felvételeit is felhasználtam a statisztikához, csak az összeragadt részek közötti, egyenletesebb eloszlású régiók felhasználásával.

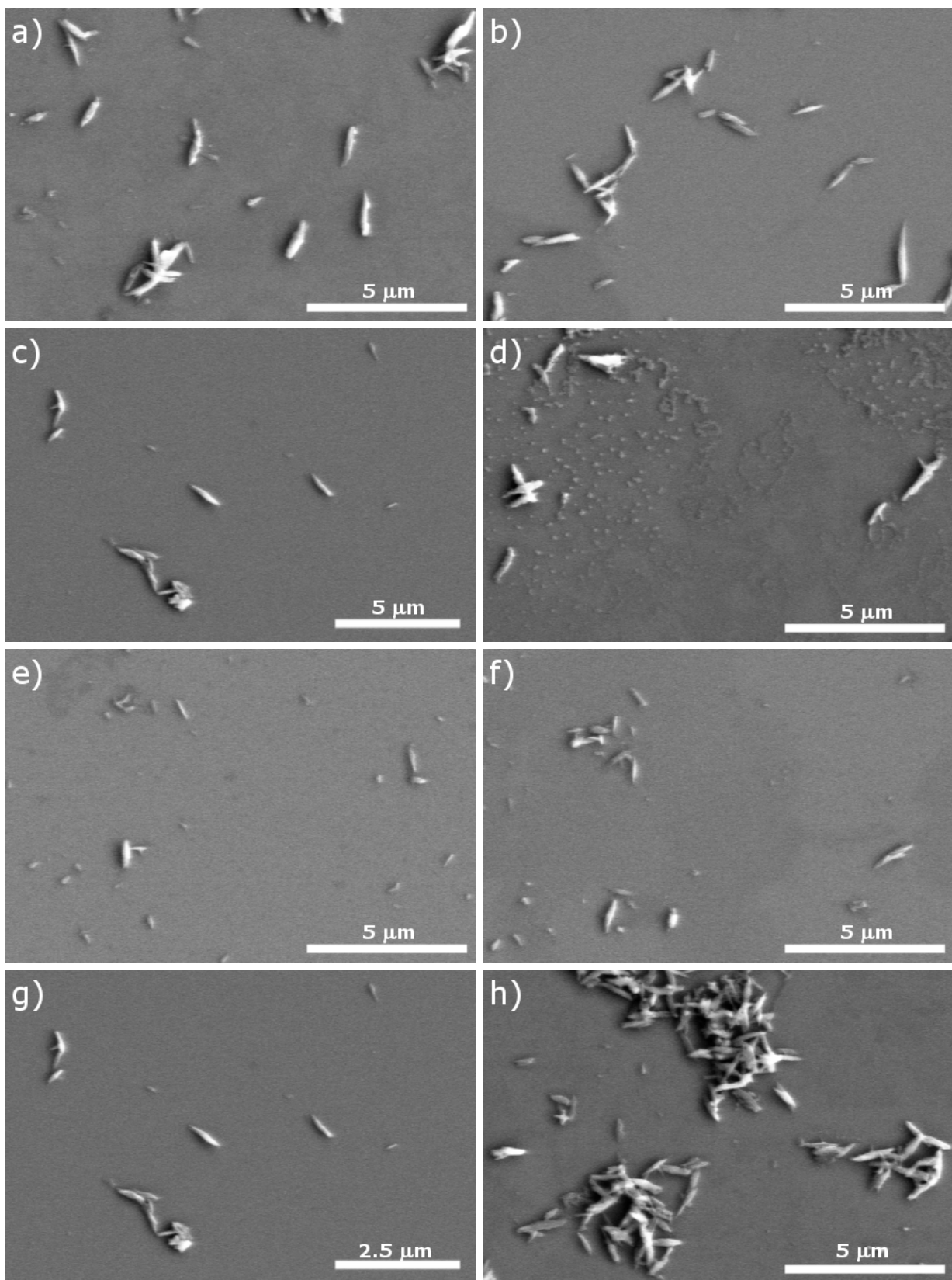
A képek felhasználásával az azonosított kristályok méretstatisztikáját elkészítettem. A hisztogramok a készítésükhöz használt részecskék számával vannak normálva, az egyes oszlopok szélessége 120 nm. A leggyakoribb nagyítású képeken egy pixel szélessége 33 nm, a kristály két végén ± 1 pixelnyi hibával számolva a hisztogram szélessége a kristály méretének hibája. A vizsgált alsó határt a felhasznált képek nagyítása alapján határoztam meg, ezeket a 2. táblázatban összegeztem a képek alapján azonosított kristályok számával együtt. A normált hisztogramok a 13. ábrán láthatóak.

Minta	Azonosított kristályok száma	Alsó hosszúsághatár
Eredeti	125	240 nm
1000 rpm	198	240 nm
3000 rpm	177	360 nm
5000 rpm	162	360 nm
7000 rpm	709	240 nm
10000 rpm	453	240 nm
13400 rpm	99	240 nm

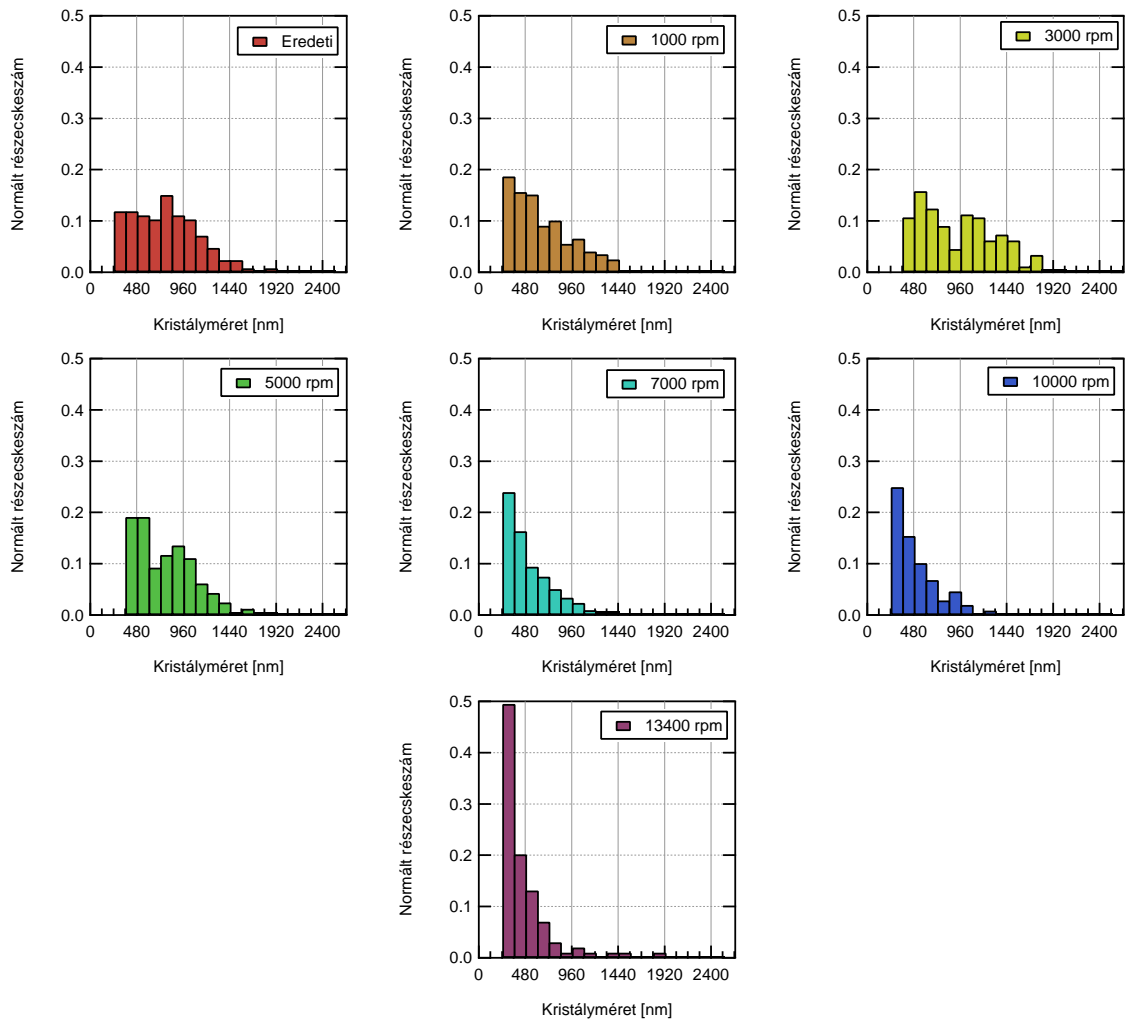
2. táblázat. Az adott mintákon a méretstatisztika elkészítéséhez felhasznált kristályok száma és a definiált alsó küszöbszint a kristályméretre.

A méretstatisztika alapján az eredeti, és a kisebb frekvencián centrifugált jelekben 1400 nm-ig, folyamatosan találhatóak kristályok. A magneto-optikai mérések szerint a 7000 rpm-en centrifugált mintán lehet a jel eltolódását kimutatni, a statisztika szerint itt az 1000 nm fölötti kristályok mennyisége jelentősen lecsökken. Hasonló csökkenés látható a 10000 rpm-es centrifugálás esetében is, a 13400 rpm-es esetben pedig már a 800–1000 nm-es tartományban is alig található kristály. Ez utolsó három esetben az is megfigyelhető, hogy arányaiban a kisfrekvenciás csúcs egyre magasabb, míg a kisebb frekvenciás centrifugálások során 1000 rpm alatt az oszlopok magassága hasonló nagyságrendbe esik.

Összességében a mérés eredménye, hogy a mágneses tér különböző forgási frekvenciáján felvett jelek nagyságában van kimutatható alakfüggés, a kisebb méretű kristályokat tartalmazó görbék laposabb, a nagyobb kristályokat is tartalmazó minták meredekebb lefutású görbéket eredményeznek. Az elektronmikroszkópos felvételek alapján pedig a hemozoinszuszpenziókról lehetséges méretstatisztikát készíteni, a felvételek elemzése alátámasztotta a görbék lefutásával kapcsolatos feltételezéseket. Ez alapján úgy gondolom, hogy a mérési elvnek működnie kell a kultúrákon is, ott viszont a szintetikus kristályokon közvetlen méréssel szemben egy újabb kérdést vet fel, hogy a kivonási protokoll befolyásolja-e a kristályok méreteloszlását.



12. ábra. Tipikus kristályok a pásztázó elektronmikroszkópos képeken a különböző centrifugálási paraméterek mellett készített mintákról. a) Eredeti szuszpenzió. b) 1000 rpm. c) 3000 rpm. d) 5000 rpm. e) 7000 rpm. f) 10000 rpm. g) 13400 rpm. h) Tipikus példa a száradás belső területein összetapadó kristályokra.



13. ábra. A különböző centrifugálási paraméterekkel készített minták méretstatisztikák, a centrifuga fordulatszámának jelölésével a jobb felső sarokban.

5.2. A kivonási protokoll hatékonysága

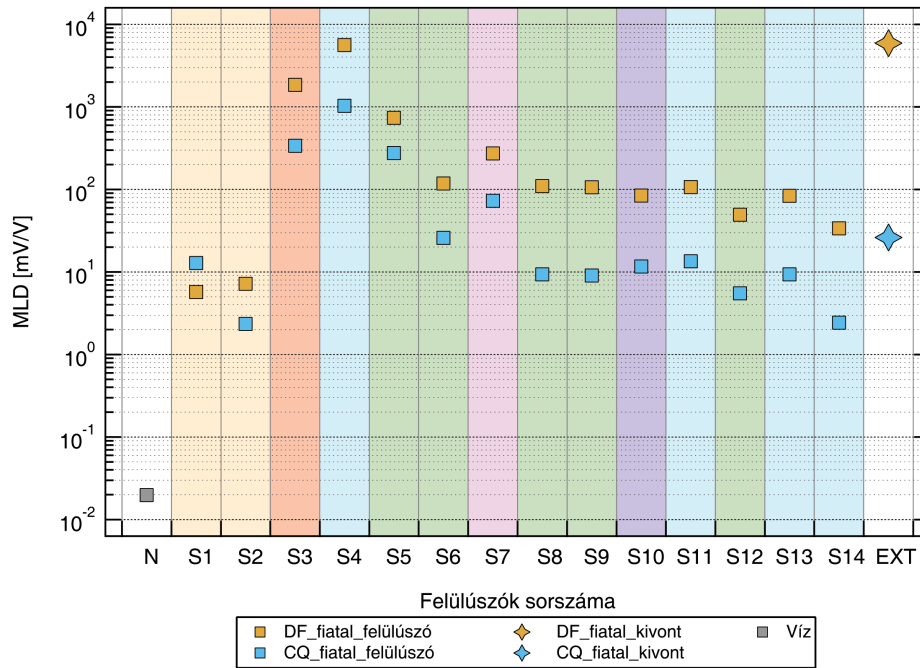
A szintetikus kristályokon való mérések megmutatták, hogy az elektronmikroszkópos felvételek statisztikai analízise és a dinamikai magneto-optikai mérések eredményei összhangban vannak, és alkalmasak a hemozoin méreteloszlásának vizsgálatára. Így hasonló elven végeztem méréseket a paraziták által természetes úton termelt hemozoin kristályokon is. A kultúrából való kinyerés során viszont lényegesen kisebb mintamennyiséggel kell dolgoznom, a felvételek elkészítése előtt pedig a már a 4.3. alfejezetben bemutatott kivonási protokollt is végig kell csinálni a méretstatisztikák elkészítése előtt. Különböző kutatócsoportok végeztek már korábban hemozoin extrakciót különféle Plasmodium fajokból, de a kivonási protokoll hatékonyságát nem vizsgálták. Emiatt a kristálymorfológiát vizsgáló

méréseimmel párhuzamosan a protokoll hatékonyságának, egyszerűsítési és rövidítési lehetőségeinek vizsgálata is a kutatómunkám része volt. Minderre a magneto-optikai műszer ad lehetőséget, hiszen a vele végzett mérések útján az egyes mosási lépések után eltávolított felülúszókban megmaradó, a kivonásból elvesző kristályok mennyisége nagy pontossággal megállapítható.

A protokoll hatékonyságát Ana Strinic 2018 májusában kezdte vizsgálni. Már az ő BSc szakdolgozatában ismertetett eredményei alapján is több ponton megváltoztattuk az eljárást: (i) a teljes sejt kultúrát NaOH-t és Tritont tartalmazó oldattal hemolizáljuk, illetve (ii) az első desztillált vizes centrifugálás után egy fél órás várakozás, mialatt a minta alá egy erős mágnest helyezünk, hogy a paramágneses részecskéket a centrifugacső alján tartjuk. A mérések alapján a legnagyobb veszteség az első lépésekben történik, amikor még egy nagyobb méretű, de kisebb, 4000 percenkénti fordulatszámra képes centrifugát használtunk. A tapasztalatok szerint a centrifugálás fordulatszáma szignifikánsan befolyásolja a hatékonyságot, kiindulási nagyobb mintatérfogatot kisebb egységekre való felosztását követően a kisebb rotor-átmérojű, de lényegesen nagyobb fordulatszámra képes MiniSpin centrifugát kezdtük használni. Ez egy egyszerű változtatás, viszont lényegesen eltér attól, amit az eredeti protokoll alkotói használtak, akik a sejtekkel való munkák során gyakori, 3000-4000 vagy ez alatti percenkénti fordulatszámot alkalmazták [29].

Az általam végzett kivonások során is minden lépést követően eltároltam a felülúszókat, majd megmértem az általuk adott magneto-optikai jeleket. Ez az adott mintában található hemozoin koncentrációjával arányos. Hogy összehasonlítható jel nagyságokat kapjak, ezt a jelet megszoroztam az egyes felülúszók térfogatával, hogy így a kristályok mennyiségével arányos adatokkal dolgozzak. A későbbi grafikonokon már ezeket, a teljes kristálymennyiséget jellemző értékeket ábrázoltam.

Az előzetes mérésorozat során az egyes mosási lépéseken mért jelek a 14. ábrán láthatóak. A gyógyszermentesen fejlődő kultúrán való kivonás esetében látható, hogy van olyan pont, ahol az elvesztett kristályok mennyisége összemérhető a végső, kinyert kristálymennyiséggel. A gyógyszeres közegben növekvő kultúránál pedig akár egy nagyságrenddel több kristályt is elveszítettem több mosási lépés során is. Bár itt a kiindulási kultúrán nem végeztem magneto-optikai mérést, az egyértelmű, hogy ebben a sorozatban a módszer elég rossz hatásfokkal működött.



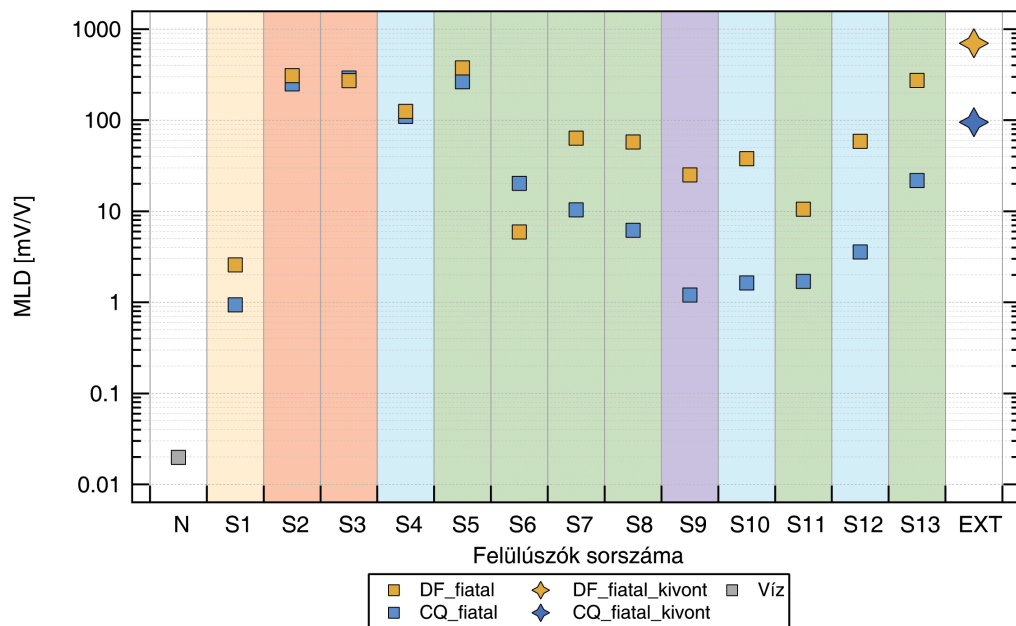
14. ábra. Az előzetes kivonás felülúszóin mért magneto-optikai jelek. A különböző színű sávok az egyes mosási lépések során használt anyagokat, a szuszpenziók közegét jelzik: sárga - tápoldat, barna - hemolizáló NaOH és Triton oldat, kék - desztillált víz, zöld - SDS, rózsaszín - proteináz K, lila - UREA.

A folyamatos magneto-optikai nyomon követés egy másik következménye, hogy azonosíthatóak azok a pontok, ahol a legnagyobb veszteség történik, mivel az egyes mosási lépések egymáshoz képesti aránya hasonló tendenciát követ a gyógyszeres és gyógyszermentes esetben. Ez alapján megállapítható, hogy a protokoll mely műveleteiben szükséges változtatásokat végezni. Jelen esetben a harmadik mosási lépés során történik meg a kristályok kiszabadítása a sejtekből, itt és az ezt követő lépések adják a legnagyobb veszteséget. Ebben az előzetes mérésorozatban még a nagyobb centrifugát használtam az első néhány mosás során a nagy mintatérfogat miatt. A szintetikus kristályokon már azt láttam, hogy 3 perc után a kis centrifugában a maximális fordulatszám a kristályok elég nagy mennyiségét kiülepíti a folyadék felső rétegéből. Emiatt a természetes kristályok esetén is hasonló viselkedésre számítottam, így áttértem a kisebb, nagyobb fordulatszámra képes centrifuga használatára. Továbbá az is az első mérésorozat tanulsága, hogy már a kivonás megkezdése előtt, a sejt kultúra egészéből érdemes mintát venni és magneto-optikai méréseknek alávetni, hogy a paraziták által termelt teljes kristálymennyiség a kontroll és a gyógyszeresen kezelt esetben közvetlenül, még a mosási veszteségek előtt is követhető legyen.

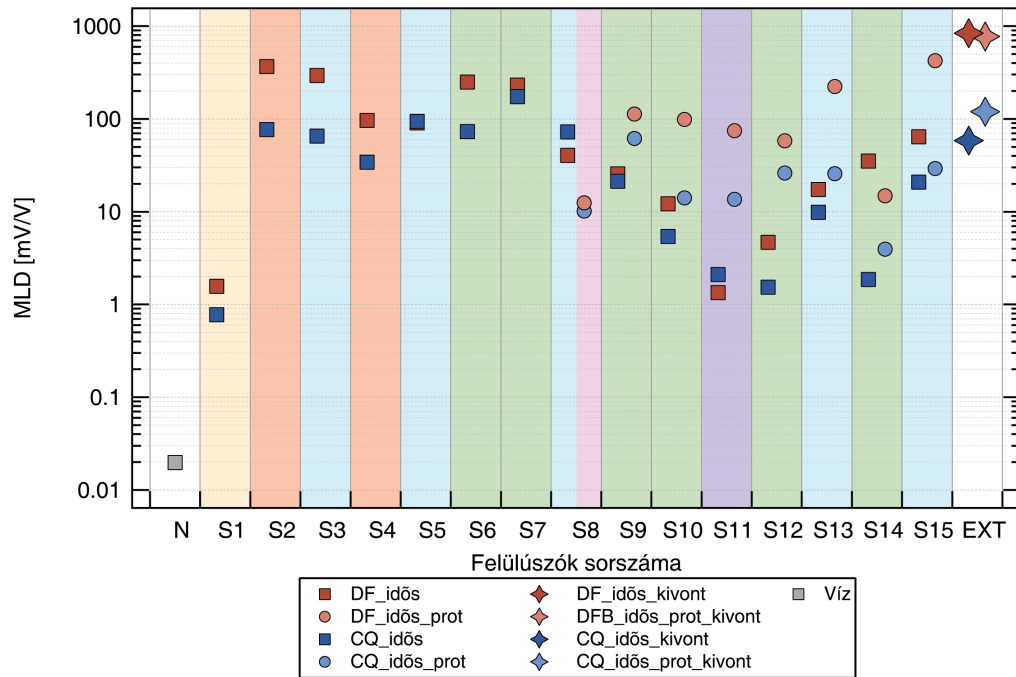
A második mérésorozatban a kivonás minden lépésben a nagyobb fordulatszámra képes, kisebb méretű centrifugával dolgoztam, ezen kívül az NaOH-t ér Tritont kis koncentrációban tartalmazó oldattal való hemolizálási lépést is kétszer végeztem el. Itt a kivonás alatt egy újabb pontban is megvizsgáltam a protokollt, az idősebb kultúránál a kivont kristályokat a proteináz hozzáadása előtt kettéválasztottam, és csak az egyik feléhez adtam hozzá a meglehetősen költséges és időigényes lépést jelentő enzimet. A második kivonás során felvett mérések a fiatal kultúrán a 15., az idős kultúrán pedig a 16. ábrán láthatóak.

A gyógyszermentes kultúrából történő kivonásban immáron minden felülúszóban kisebb jelet mértem, mint amit a végső kivont minta adott, bár az első néhány lépésben, a kristályok felszabadítását követően még mindig elég nagy a veszteség. Itt megjegyzem, hogy az első lépés alacsony jelének magyarázata, hogy a táptalaj közegében a vörösvértestek és a paraziták még épségben vannak, melyek nagyobb méretük révén szinte maradéktalanul kiülepednek a centrifugálás során.

A gyógyszeres kultúrából való kivonásnál viszont még mindig nagy probléma, hogy a lépések során elvesztett kristályok mennyisége nagyobb a kivont mintában lévőével, feltehetőleg az eleve alacsony kiindulási koncentrációk miatt.

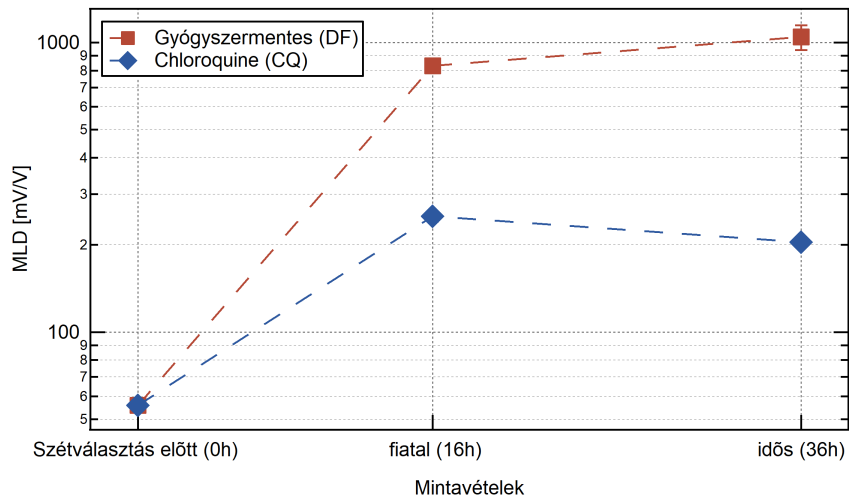


15. ábra. A második mérés fiatal kultúrán végzett kivonásakor keletkező felülúszókon mért magneto-optikai jelek nagysága. A különböző színű sávok az egyes mosási lépésekben használt anyagokat jelzik: sárga - tápoldat, barna - hemolizáló NaOH és Triton oldat, kék - desztillált víz, zöld - SDS, rózsaszín - proteináz K, lila - UREA.



16. ábra. A második mérés idős kultúráin végzett kivonásakor keletkező felülúszókon mért magneto-optikai jelek nagysága. A mérés felénél a mintát kettéosztottam, és a proteinázzal való inkubálást csak az egyik esetben végeztem el. A különböző színű sávok az egyes mosási lépésekben használt anyagokat jelzik: sárga - tápoldat, barna - hemolizáló NaOH és Triton oldat, kék - desztillált víz, zöld - SDS, rózsaszín - proteináz K, lila - UREA.

A második kivonás megkezdése előtt a kultúrából két magneto-optikai méréshez elegendő mintát vettem ki. Hemolizálás után megmértem az általuk adott jel nagyságát, melyek a 17. grafikonon láthatóak. Ezek a jelek a kultúrák fennmaradó részéből kivont pelletek jeleivel együtt az optikai mérésekhez használt hígítások korrekciója a mintatér-fogattal való szorzás után a 3. ábrán láthatóak, ebben a formában a mintában található kristálmennyiséggel arányosak. A végső és a kiindulási mennyiség hányadosa megadja a módszer hatásfokát (itt a mérés közben kettéosztott mintákon mért jeleket összeadtam). Ez a hatásfok egy széles tartományban 4,2% és 17,1% között változik, a gyógyszermentesen fejlődő kultúrákra a kivonás jelentősen jobb eredményt mutat. Ennek oka lehet a nagyobb kiindulási koncentráció, illetve az, hogy a nagyobb kristályok a gyógyszermentes mintában jelentősen gyakoribbak, ezt a következő fejezetben fogom bemutatni. Erre a fontos megállapításra utaló eredményeimet az a következő fejezetben mutatom be.



17. ábra. A különböző mintavételeknél a kivonás megkezdése előtt a parazitakultúrákon mért, a kiindulási kristálykoncentrációkkal arányos magneto-optikai jelek nagysága.

	Kultúra	Kivont	Hatásfok
DF fiatal	7491	698	9,3%
DF idős	9425	839	17,1%
DF idős prot		773	
CQ fiatal	2259	95	4,2%
CQ idős	1839	66	10,1%
CQ idős prot		120	

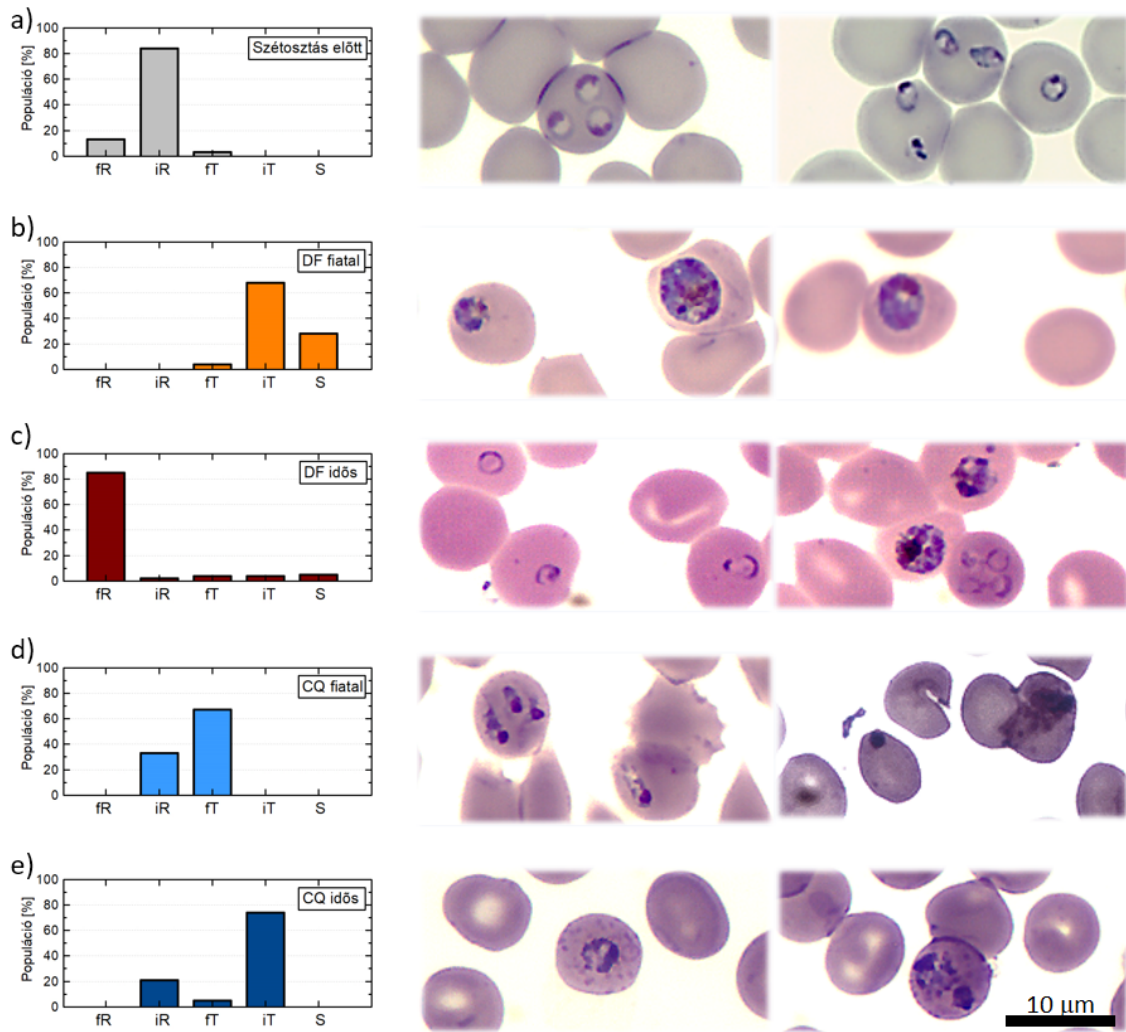
3. táblázat. A kivonás előtt a kultúrán, illetve a kivonást követően a kapott mintán a – hígítások és térfogatok figyelembe vétele után meghatározott – kristálmennyiséggel arányos magneto-optikai jelek, illetve az egyes kivonásokra számított hatásfok.

5.3. Sejtkultúrák hemozoin-termelésének analízise

5.3.1. Az első kísérletsorozat: fénymikroszkópos és pásztázó elektronmikroszkópos mérések

Ebben a fejezetben a gyógyszeres és gyógyszermentes kultúrából való hemozoin-kivonás legelső eredményeit mutatom be. A kísérlet során a kettéosztott kultúra növekedését vérkenetek készítésével követtem nyomon, a kivonási protokoll végrehajtása után pedig a hatóanyag jelenlétében és anélkül termelt kristályok méreteloszlását elektronmikroszkópos felvételek alapján vizsgáltam.

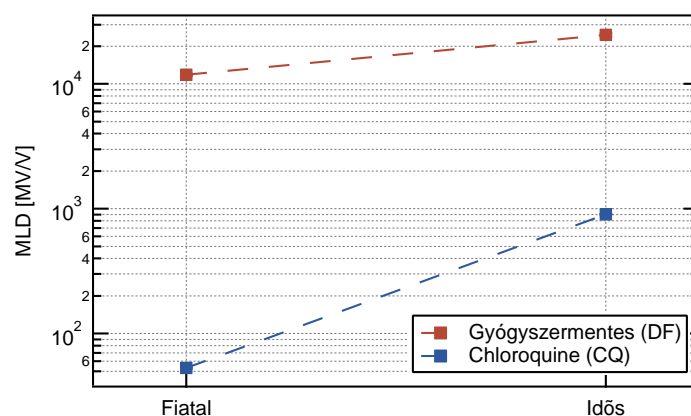
A paraziták vérkenetek alapján meghatározott koreloszlása és néhány tipikus kép az egyes időpontokra jellemző fejlődési stádiumokról a 18. ábrán látható. A szétválasztás pillanatában egy fiatal, legnagyobb részben idősebb ringeket tartalmazó kultúrából indultam ki. 24 óra elteltével, az első kivonás időpontjáig a gyógyszermentes kultúra a várakozásoknak megfelelően növekedett, a paraziták többsége idősebb trophozoita állapotban volt, viszont egy jelentős részük már a fejlődési ciklus végéhez közelebb, schizont fázisba került. A gyógyszeres közegben növő kultúránál a vérkenetek elemzése a paraziták lassabb fejlődésére utal, egy részük pedig el is pusztult. Utóbbi folyamatra a kenetekben megjelenő sötétlila, pontszerű foltok egyre gyakoribb megjelenése utal (pl. 18.d. ábra jobb oldali mikroszkópos felvétele). Ezeket ugyanakkor sokszor nehéz az egyszerű festékrészecskéktől megkülönböztetni, így a már nem életképes paraziták kvantifikálása ezzel a módszerrel nehézkes. Feltehetőleg hasonlóan nem életképesek azok a paraziták sem, melyek sejtmembránja töredezettnek tűnik, apró pontok láthatók mellettük a vörösvértesten belül, amik valószínűleg a citoplazmájukból származnak (pl. 18.e. ábra mindkét mikroszkópos felvétele). A korok statisztikájába ugyanakkor ezeket a parazitákat is belevettem, hiszen a kivonás során az általuk termelt kristályokat is egyaránt összegyűjtöm. A második időpontban, újabb 24 óra elteltével vizsgált, idősebb kultúránál még erőteljesebben látszik a növekedés elmaradása a kezeletlen kultúrához képest. Összességében a kenetek alapján egyértelműen megállapítható, hogy a gyógyszer valamilyen mértékben fejtett ki gátló hatást.



18. ábra. Bal oldalon a kultúrák leszámllása alapján meghatározott koreloszlás. Az x tengely pontjainak jelentése: fR - fiatal ring, iR - idős ring, fT - fiatal trophozoita, iT - idős trophozoita, S - schizont. Jobb oldalon az egyes felvételekre jellemző tipikus parazitákról láthatóak transzmissziós optikai mikroszkóppal készített felvételek.

A mikroszkópos képek vizsgálatával csak a paraziták koreloszlása követhető nyomon növekedésük során. Kvantitatív módon a kultúra által megtermelt kristályok összmenységét a magneto-optikai mérések alapján határozhatom meg, amivel a kristálykoncentrációról kapok információt. A kivonási protokoll végrehajtása után a kinyert kristályszuszpenziókon mért magneto-optikai jelek nagysága a 19. ábrán látható. A mérések azt mutatják, hogy a gyógyszeres és gyógyszermentes kultúrákból kinyert kristályok között több, mint egy nagyságrendi különbség lép fel, gyógyszeres esetben ez az első és második mintavételt követő mérésekre is igaz. Az előző fejezetben végigkövettem az első mintavétel sejtkultúráinak tisztítása során eltávolított felülúszóban elveszített kristályok mennyiségét (lásd.

12. ábra), viszont mivel a kivonás megkezdése előtt nem végeztem méréseket a teljes sejt-kultúrán, így nem tudom, hogy ezek az értékek hogyan viszonyulnak az eredetileg termelt hemozoin mennyiségéhez. A rossz hatások lehet az egyik oka ezen különbségnek, de már a kiinduláskor is nagy valószínűséggel jelentősen kevesebb a gyógyszeres közegben termelt kristályok mennyisége. Ebből a bizonytalanságból kiindulva a következő mérésorozat elvégzésekor már közvetlenül a sejt-kultúrából vett mintán is végeztem magneto-optikai méréseket, melyek a protokoll hatáskórának kvantitatív jellemzését is lehetővé teszik. A jelen kísérletsorozat során viszont ettől a hiányosságtól eltekintve megvizsgálhattam, hogy milyen minőségű elektronmikroszkópos felvételek készíthetőek, és hogyan lehet belőlük a mintákat jellemző méretstatisztikákat elkészíteni.



19. ábra. A kivonást követően a kapott kristálysuszpenziók koncentrációjával arányos magneto-optikai jelek. Gyógyszeres esetben több, mint egy nagyságrendi különbség oka a kezdetben megtermelt kristályok kisebb mennyisége, illetve a kivonási protokoll rossz hatásfoka is.

A kivont kristálysuszpenziókban még mindig sok szerves maradék volt a felcseppentés után, viszont találhatóak olyan területek, ahol egyenletesen vannak jelen az egyedi kristályok. Ezeket a pontokat több felvételt készítettem, az egyes minták tipikus kristályait tartalmazó látómezőkről a 20. ábrán látható egy-egy példa. A tapasztalatok alapján az egyedi kristályok megfelelő mennyiségben és minőségben azonosíthatóak, kivéve a fiatal gyógyszeresen növekvő kultúrából kinyert mintát, ahol a rendelkezésre álló műszeridő alatt nem találtunk a kiértékeléshez elegendő mennyiségű kristályt.

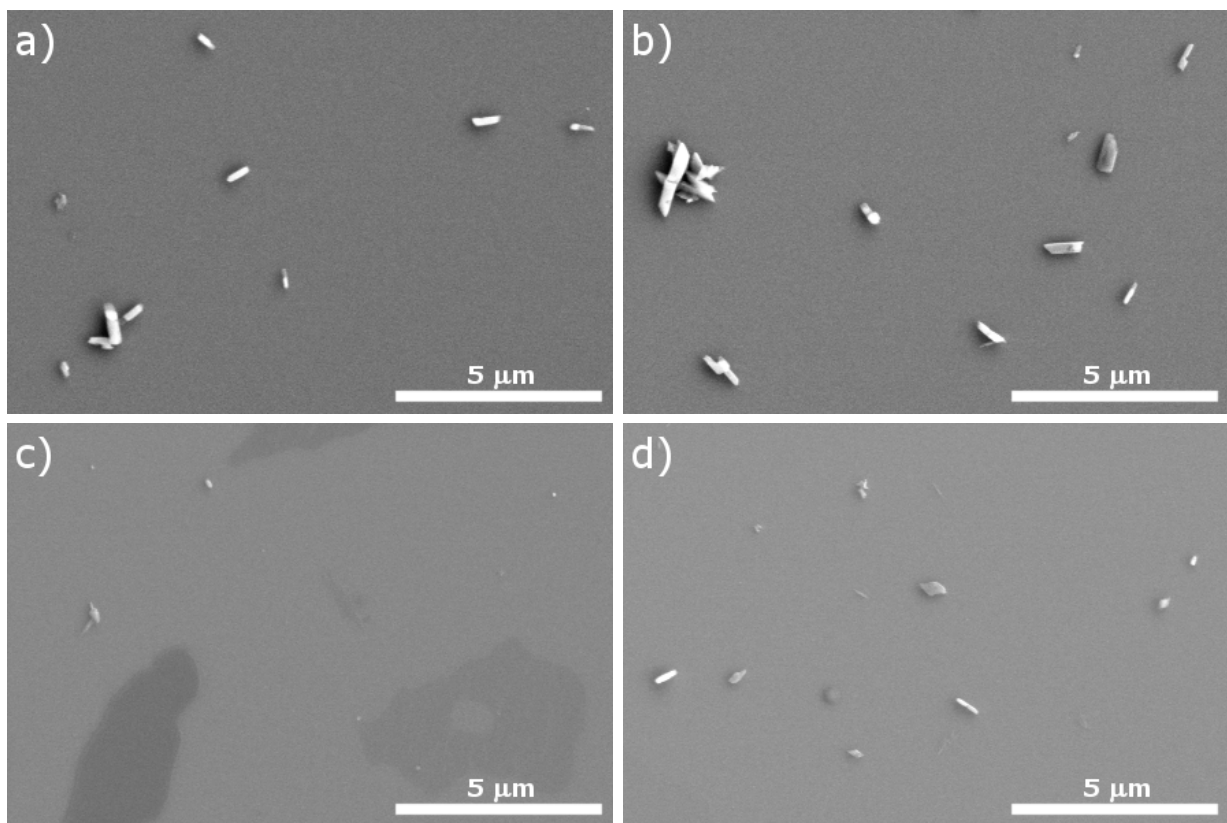
Több, egymástól távolabb készített kép felhasználásával, a felvételeket 4.4. fejezetben leírt módon kiértékelve meghatároztam a kristályok méreteloszlását. A hisztogramhoz fel-

használt kristályok száma a 4. táblázatban van feltüntetve, a hisztogramok pedig a 21. ábrán láthatóak. A hisztogramok alsó határát megadó 240 nm-es értékben is nagy arányú kristálykezdemény található, a jellemző nagyobb kristályok az 1200 nm-es tartományig terjednek, ennél nagyobbak csak elvétve fordulnak elő. A két különböző időpontban extraktált gyógyszermentes kultúra hisztogramjait összevetve azt a következtetést vonhatjuk le, hogy nem szignifikánsan ugyan, de az idősebb kultúrában megnő a kis méretű kristályok aránya. A 18. ábrán bemutatott koreloszlás alapján ez a látszólag váratlan esemény azzal magyarázható, hogy a kultúra a következő fejlődési ciklusba átlépett, az új generáció fiatal parazitái pedig már megkezdheték a kristályok termelését.

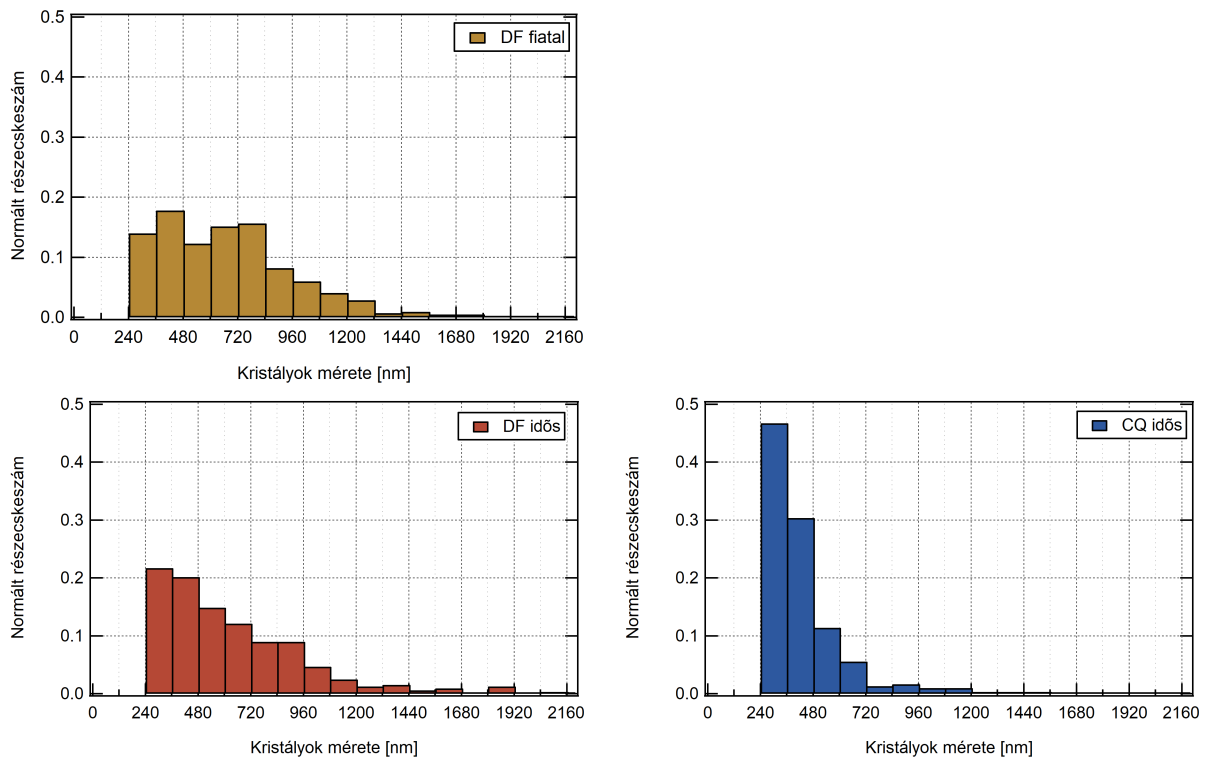
A gyógyszeres esetben a fiatal kultúrán nem vizsgáltam méreteloszlást, ugyanis a kis koncentráció miatt nehezen és kevés kristályt lehetett megtalálni. A későbbi időpontban extraktált kultúra hisztogramján ugyanakkor az látható, hogy a 700nm-es hosszt csak néhány kristály mérete haladja meg. Ez különbözik a gyógyszermentes esethez képest, azaz a gyógyszer a kristályok növekedését egy adott határon túl gátolni látszik. A gyógyszeres idős, és a gyógyszermentes fiatal kultúrán belüli koreloszlás hasonló, mindkettőben az idős trophozoita paraziták a leggyakoribbak, így a hisztogramok alapján arra az új megállapításra juthatunk, hogy a paraziták képesek voltak tovább fejlődni, viszont az emésztési folyamatuk megváltozhatott a gyógyszer hatására, ez pedig kihathatott a termelt kristályok méretének eloszlására is. A kenetekkel összevetve viszont a koreloszlást csak a morfológia alapján lehet behatárolni, így nehéz megkülönböztetni a már elpusztult, alakjukat veszítő fiatal trophozoitákat az idősebb stádiumba átlépő, fejlődő társaiktól, ami a gyógyszeres kultúra korának felülbecsülését eredményezheti.

Minta	Azonosított kristályok száma	Alsó hosszúsághatár
DF fiatal	415	240 nm
DF idős	322	240 nm
CQ idős	306	240 nm

4. táblázat. Az adott mintákon a méretstatisztika elkészítéséhez felhasznált kristályok száma és a kristályméretre definiált alsó küszöbszint.



20. ábra. Tipikus pásztázó elektronmikroszkópos képek a kettéosztott kultúra különböző korú mintavételeinél. a) DF fiatal. b) DF idős. c) CQ fiatal. d) CQ idős.



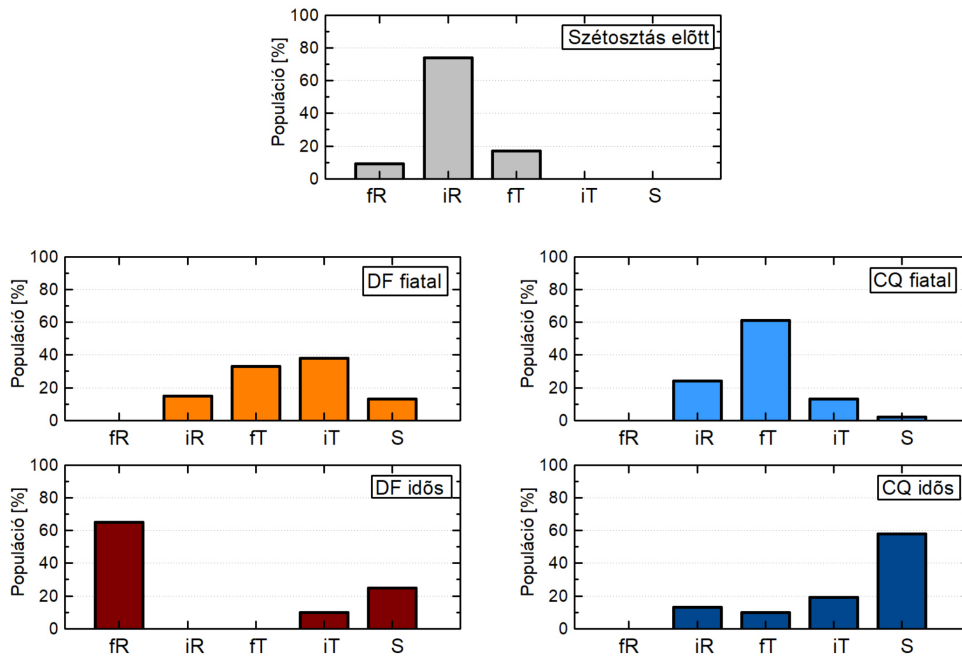
21. ábra. Az első sejt kultúrákon végzett kivonási protokoll után megmaradt hemozoin kristályok méretstatistikái elektronmikroszkópos felvételek alapján. A fiatal gyógyszeres kultúráról, alacsony koncentrációja miatt nem tudtam annyi kristályt azonosítani, ami alapján egy ilyen hisztogram elkészíthető lenne.

A fejezetben ismertetett előzetes eredmények alapján arra a következtetésre jutottam kutatómunkám ezen pontján, hogy a kísérlet felépítése működőképes, a kivonási protokoll elvégzése után valóban lehet a kristályokról méretstatistikát készíteni, a termelt kristályok eloszlása nincs ellentmondásban a kultúrán készített optikai mikroszkópos felvételekkel. Ennek ellenére több pontban szükséges változtatás: egyrészt a kivonási protokoll hatékonyságát egyes, beazonosítható lépések jelentősen rontják, illetve egy felmerülő kérdés, hogy a kinyerés elvégzését követően kapott szuszpenzió mennyire jellemzi jól a kultúra által termelt kristályok eloszlását. Emiatt a következő kísérletsorozatban már az extrakciós protokoll megkezdése előtt, a sejt kultúra közvetlen hemolizálása után nyert optikai mintán is végeztem méréseket. Emellett nem csupán a kristályok koncentrációját határoztam meg, de a dinamikai mérések útján a hisztogramoktól független információt próbáltam nyerni azok méreteloszlásáról is.

5.3.2. A második kísérletsorozat: fénymikroszkópos, pásztázó elektronmikroszkópos és magneto-optikait mérések

Az újabb kivonás alkalmával az előző fejezetben leírt mérés menetét követtem azzal a kiegészítéssel, hogy a kivonás megkezdése előtt a kultúrából vett mintán is megvizsgáltam a magneto-optikai jeleket. Ennek köszönhetően az extrakció előtti és utáni kristálmennyiségét össze tudtam hasonlítani, és az 5.2. alfejezetben ismertetett módon számszerűsíteni az immáron módosított kivonási protokoll hatékonyságát. Továbbá, a szintetikus kristályokon végzett mérés tapasztalatai alapján azt is megvizsgálom, hogy a kultúra korának statisztikája hogyan tükröződik a frekvenciafüggő magneto-optikai görbékben. A mérés során arra törekedtem, hogy az előző tanulmányhoz hasonló időpontokban végezzem a mintavételeket a kivonási protokollhoz.

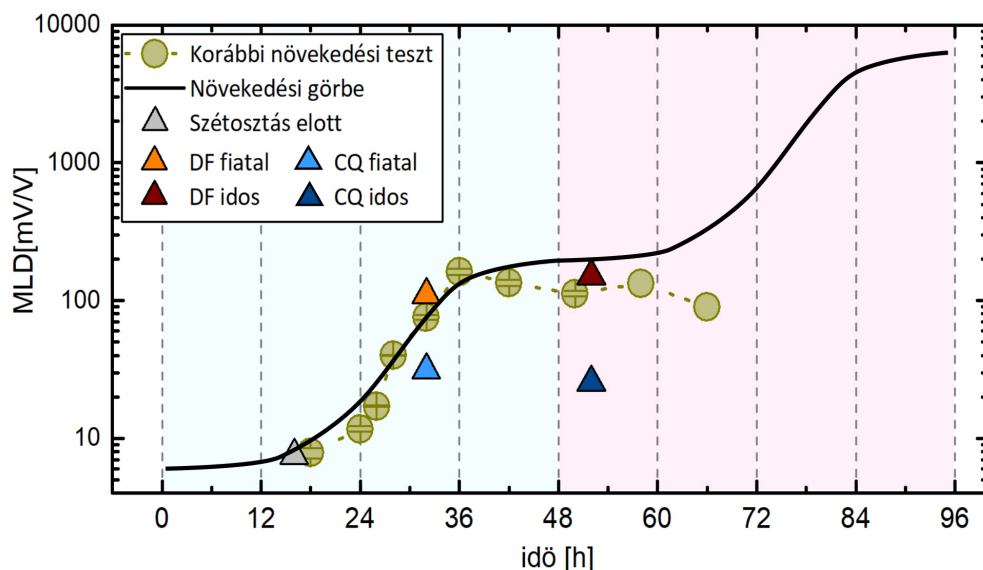
A kultúrákat jellemző koreloszlások a 22. ábrán láthatók, külön-külön paneleken feltüntetve a szétválasztás előtti, illetve a két-két mintavételi időpontban a gyógyszer hozzáadásával és anélkül inkubált populációkat. A hisztogramok alapján a paraziták fejlődése az előző kísérletsorozatban megfigyelthez hasonló viselkedést mutat. Ahogyan korábban is, a kiindulási kultúra most is többségében késői ringeket tartalmazott. A paraziták morfológiája alapján a klorokinnel kezelt kultúra itt is szignifikánsan lassabban fejlődött mindkét mintavételi időpontig, mint a hatóanyag nélküli.



22. ábra. A paraziták koreloszlása a különböző mintavételi időpontokban a vérkenetekből való leszámlálás alapján. Az egyes stádiumok: fR - fiatal ring, iR - idős ring, fT - fiatal trophozoita, iT - idős trophozoita, S - schizont.

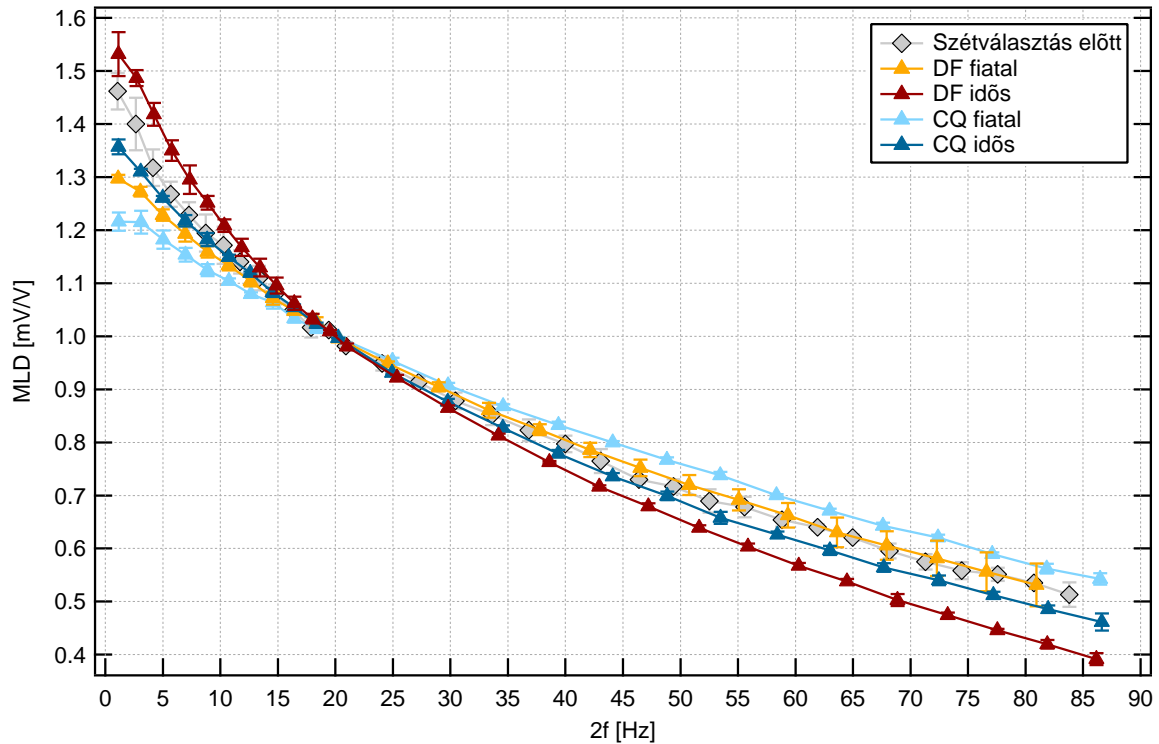
A kultúrákon mért magneto-optikai jelek nagyságát összevetettem kollégám, Molnár Petra egy korábbi gyógyszeresztjének azon eredményeivel, melyeket a sorozathoz tartozó kontroll (gyógyszermentes) kultúrán mért. Ezáltal le tudtam ellenőrizni, hogy a második kivonási teszt során termelt kristályok mennyisége megfelel-e egy tipikus fejlődési görbe értékeinek. A mikroszkópos kenetek alapján a szétválasztás előtti minta egy korai stádiumú kultúra, az első mintavételezési időpont helye pedig az intenzíven növekvő szakasz vége, a trophozoita fázisban. A harmadik pontban már egy újabb fejlődési periódus kezdetébe lépett át a paraziták többsége. Ha a hatóanyag nélküli kultúrán a három vizsgált időpontban mért magneto-optikai jeleket egy közös konstans faktorról elosztjuk, az így kapott pontsorozat szinte tökéletesen fedésbe hozható a korábbi gyógyszereszt során felvett növekedési görbével. A skálázási faktor feltehetőleg a kultúrák eltérő parazitémia-értékéből fakad, de az, hogy ettől eltekintve a független kísérletek során mért hemozoin koncentrációk aránya megegyezik, arra enged következtetni, hogy az általam vizsgált kultúra a sztenderdeknek megfelelően növekedett a kivonási kísérlet során. A gyógyszeres esetben termelt kristálymennyiség szignifikánsan elmarad ehhez az értékhez képest, és mindkét mérési időpontban hasonló nagyságú. Tehát annak ellenére állandó marad a termelt kristályok mennyisége,

hogy a morfológia alapján a paraziták egy része még lassú növekedést mutat az első és második mintavételi pont között.



23. ábra. A magneto-optikai mérések a koreloszlás alapján összevetve Molnár Petra egy korábbi gyógyszeresztjével. Folytonos vonallal egy ideális koncentrációnövekedési görbe látható.

A mágneseszen indukált lineáris dikroizmus frekvenciafüggő görbéi a 24. ábrán láthatóak. Minden görbe négy mérés átlagából származik: a kultúrákból két méréshez elegendő mintát vettem ki, ezeket függetlenül hemolizáltam, majd mindkét optikai mintán kétszer mértem meg a jelet. Végül a szintetikus kristályos méréshez hasonlóan 20 Hz-re normáltam a görbéket, hogy a nagyságrendi különbségektől függetlenül a görbék frekvenciafüggését lehessen összehasonlítani. A szétválasztás előtti jelek egy fiatal kultúrából származnak, legnagyobb arányban kisebb kristályokat tartalmazhatnak. Ezzel összehasonlítva a későbbi időpontokban mért görbéket, a gyógyszeres, illetve a fiatal gyógyszer nélküli esetben a kiindulási jelhez képest csak kis mértékű eltolódás látható, azaz valószínűleg hasonló méreteloszlással rendelkeznek. Mind a kontroll, mind a kezelt esetben megfigyelhető az idősebb kultúra meredekebbé váló jelalakja a fiatalabbéhoz képest, ez az eltolódás pedig nagyobb mértékű a gyógyszermentes esetre, így arra számítok, hogy ez a szuszpenzió a többi mintánál nagyobb kristályokat tartalmaz.

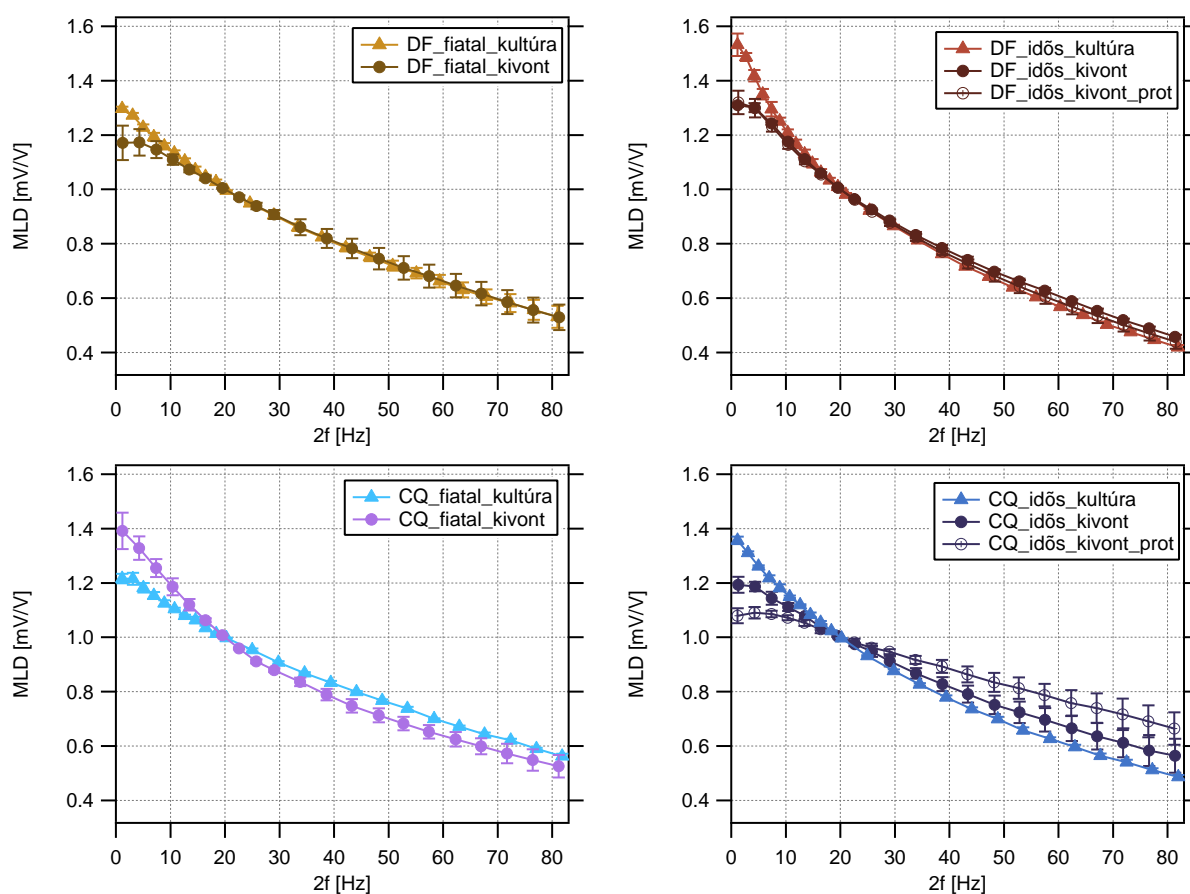


24. ábra. A lineáris dikroizmus jele a mágneses tér kétszeres forgási frekvenciájának helyén, 20 Hz-re normálva, a hemolizált kultúrákon való mérés alapján.

Ugyanezt a magneto-optikai mérést az egyes kultúrákból kivont pelletéken is elvégeztem, hogy lássam, eltér-e a görbe lefutása a kiindulásként használt kultúrákból közvetlenül mintavételezett, és csupán hemolizálás útján mért jelalakoktól. Ezek a vizsgálatok arról árulkodhatnak, hogy az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz használt, tisztítási folyamaton átesett kristálysokaság mennyire tükrözi hűen az eredeti, sejt-kultúra által termelt méreteloszlást. Az összehasonlított görbék láthatóak a 25. ábrán. A magas frekvenciás szakaszokat vizsgálva a gyógyszermentes esetben a görbék jól egyeznek, a fiatal gyógyszeres esetben is hasonlóak. Az idős klorokines közegben növekvő mintában viszont a jel laposodása látszik, ami arra utal a szintetikus kristályok méréséből levont tanulságok alapján, hogy a szuszpenzióban lévő kristályok mérete csökkent. A tisztítási folyamat során a centrifugálási lépések azok, melyek leginkább befolyásolhatják a méreteloszlást, ugyanakkor centrifugálásnál éppen a kis kristályok mennyisége csökkenhet, hiszen ezek hosszabb idő alatt ülepednek ki. Itt viszont éppen ennek az ellenkezője történik, különösen a polimeráz hozzáadásával végzett kivonáskor. Ezen túl a kivont szuszpenziók görbéi kis frekvencián, vagyis a mágneses tér nagyon lassú forgatása mellett ellaposodnak, ellentétben a hemolizált sejt-kultúrán mért jelalakokkal. Utóbbi két jelenség oka egyelőre további vizsgálatokra

szorul. Az alacsony frekvenciás eltérésben szerepet játszhat, hogy a kivonás után a kristályok vizes közegben vannak, míg a sejt kultúra közvetlen hemolizálásával nyert optikai mintákban a kristályokon túl benne van minden szerves maradvány, illetve a különféle sókat, cukrokat és aminosavakat tartalmazó sejttenyésztő médium is.

Összefoglalva tehát az a 25. ábra eredményei arra utalnak, hogy mindkét gyógyszermentes és a fiatal, gyógyszeres közegben növekedett kultúrákból kivont kristályok méreteloszlása jól jellemzi a paraziták által termelt kristályok eredeti eloszlását, míg ugyan ez a negyedik, idős, gyógyszeres kultúra esetében egyelőre kérdéses.



25. ábra. A hemolizált kultúrán és a kivont kristályokon mért lineáris dikroizmus nagyságának változása a külső mágneses tér forgási frekvenciájának változása függvényében.

A pelleték magneto-optikai méréseit követően, az előző kivonáshoz hasonlóan, elkészítettem a felcseppentett szuszpenziókat és ezek elektronmikroszkópos felvételei alapján az egyes minták méretstatisztikáját. A felvételek elemzésekor az első fontos konklúzió, hogy a proteinázzal és anélkül készült képeken nem volt észrevehető különbség a szerves maradványok mennyiségében, eloszlásában. Mivel a felvételek kiértékelést nem befolyásolta az

enzim hiánya, így ez a lépés a későbbiek során is elhagyható, jelentősen csökkentve ezáltal a protokoll idő- és költségigényét.

Az egyes kultúrák mintáiról készült tipikus felvételek a 26. ábrán láthatók. A statisztikához felhasznált kristályok száma az 5. táblázatban található meg, a hisztogramok pedig a 27. ábrán. Bár a kivonás hatásfoka javult az első kísérlethez viszonyítva, az idős, gyógyszeres közegben növekvő kultúra SEM mintáján továbbra is nehéz volt kristályokat tartalmazó látómezőt találni, különösen a proteinázzal végzett kivonást követően. Így ennél a mintánál összesítettem az enzim kivonása mellett és anélkül kinyert kristályok statisztikáit.

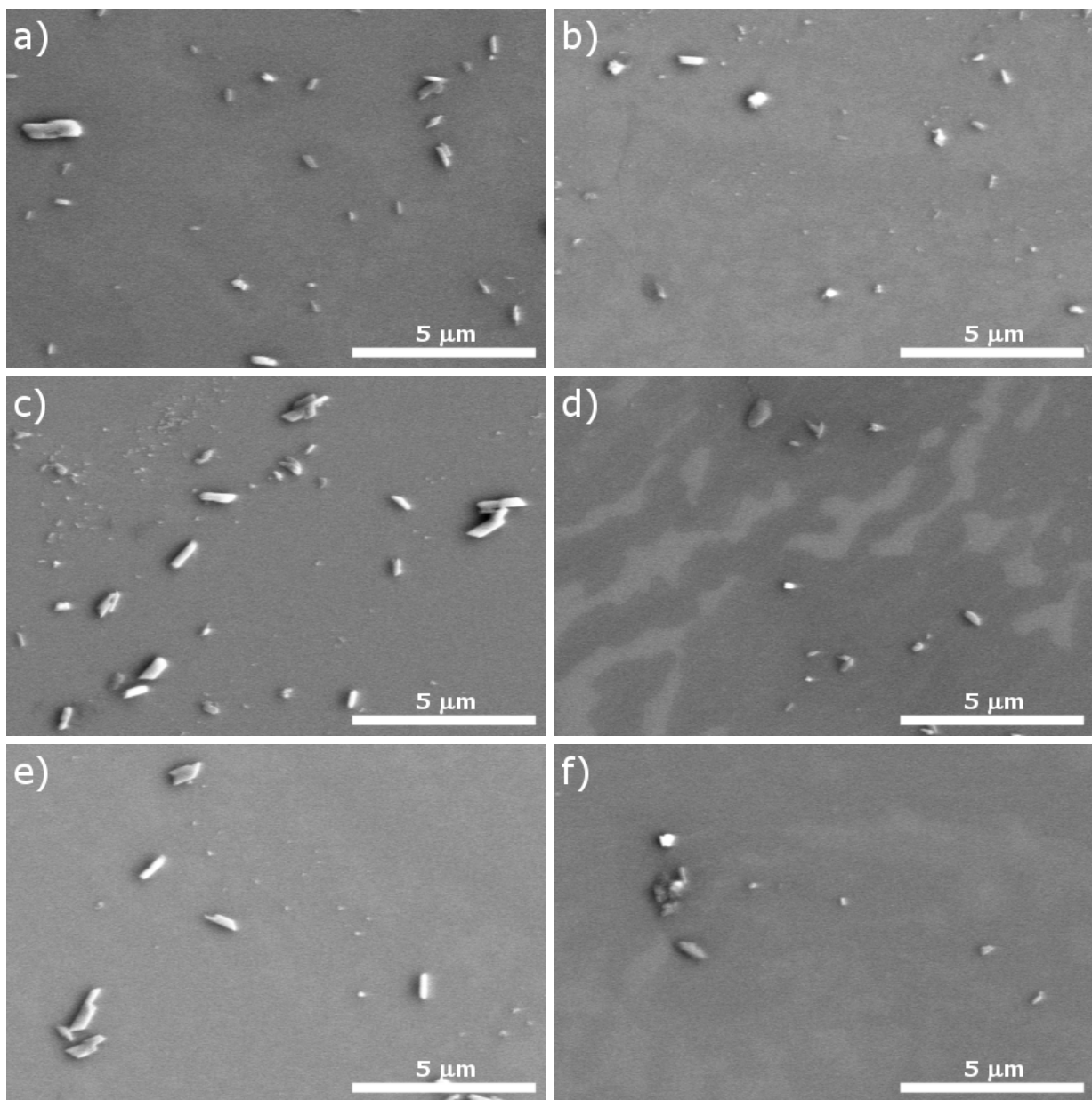
A hisztogramokban a gyógyszermentes eset két kivonását összehasonlítva az látható, hogy a fiatalabb mintában még nem jelennek meg az 1000 nm körüli, illetve afölötti kristályok, amelyek az idősebb kultúrában már jelen vannak. Összevetve a paraziták eloszlásával és a magneto-optikai mérésekkel, mindez azzal magyarázható, hogy az új kristálygócok kialakulása a trophozoiták fázisban a legjelentősebb, így ez okozza a magneto-optikai jel nagyságrendi növekedését, míg a későbbi, schizont fázisban az emésztés során a kristályok mérete növekszik, nem pedig a mennyiségük. Ebben a szakaszban így a koncentrációval arányos jel nagysága kisebb mértékben növekszik, viszont a felvételeken nagyobb méretű kristályok is megjelennek, ami a frekvenciafüggő magneto-optikai jelalakban a görbe meredekebbé válását eredményezi. A nagyobb méretű kristályok hiánya a fiatal gyógyszermentes, illetve mindkét gyógyszeres mintán lehet az oka annak, hogy a 24. ábrán látható magneto-optikai görbékben nincs jelentős eltolódás nagy frekvencián a szétosztás előtti állapothoz képest.

A gyógyszeres mintákon a kis kristályok jelenléte a leggyakoribb, éppen úgy, mint az első kivonás alkalmával. A fiatal és idős kultúrák között nincs jelentős eltérés, 700 nm fölött mindkét esetben csak kevés kristály található. A magneto-optikai jel nagyságából kiindulva a kristályok mennyisége szintén azonos marad. A SEM hisztogramok alapján az idősebb gyógyszeres kultúrák kristályai kevésbé térnek el a fiatalabbtól, ami látszólag ellentmond a koreloszlásukban tapasztalt különbségeknek (lásd. 22. ábra). Ugyanakkor a 25. ábra jobb alsó grafikonján látható, eltérő magneto-optikai jelalakok arra utalnak, hogy az idős, gyógyszeres kultúrából kivont pelleték nem feltétlen jellemzik elég pontosan a paraziták által termelt kristályok eredeti méreteloszlását. Ahogyan korábban említettem, ennek a jelenségnek az okát nem ismerjük, de a koreloszlásokat, a nyers kultúrákon mért

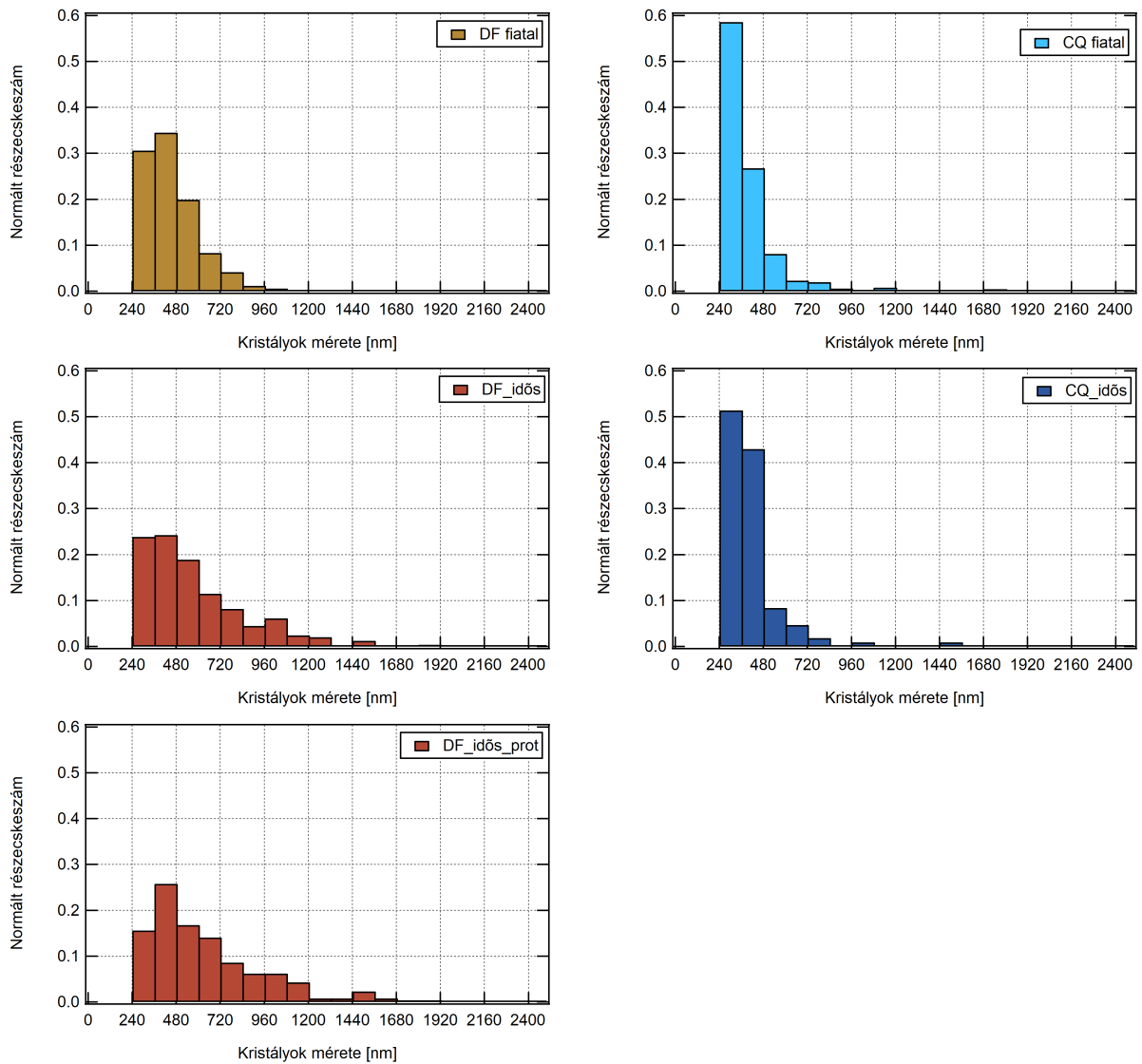
magneto-optikai görbékét és a SEM hisztogramokat összevetve az idős, gyógyszeres kultúra esetén az tűnik az ellentmondás legkézenfekvőbb feloldásának, hogy a kivonási protokoll során itt nagyobb arányban veszítettük el a hosszabb kristályokat mint a másik három esetben, melyeknél a különböző módszerek eredményei következetesek. Egy további, biológiai szempontból kevésbé valószínű, ugyanakkor rendkívül érdekes magyarázata lehetne a gyógyszeres kultúrák eredményeinek, hogy a paraziták képesek lehetnek egy adott pontig olyan módon lassabban növekedni, hogy nem termelnek új kristályokat, vagy csak nagyon keveset. Ennek tisztázásához ugyanakkor további növekedési és kivonási kísérletek kivitelezése szükséges.

Minta	Azonosított kristályok száma	Alsó hosszúsághatár
DF fiatal	336	240 nm
DF idős	243	240 nm
DF idős, proteinase	256	240 nm
CQ fiatal	650	240 nm
CQ idős	94	240 nm
CQ idős, proteinase	13	240 nm

5. táblázat. A különböző mintákon a méretstatisztika elkészítéséhez felhasznált kristályok száma és a definiált alsó küszöbszint a kristályméretre.



26. ábra. Tipikus pásztázó elektronmikroszkópos képek a kettéosztott kultúra különböző korú mintavételeinél. a) DF fiatal. b) CQ fiatal. c) DF idős. d) CQ idős. e) DF idős (kivonás proteinase-zal). f) CQ idős (kivonás proteinase-zal).



27. ábra. A hemolizált kultúrán és a kivont kristályokon mért lineáris dikroizmus nagyságának változása a külső mágneses tér forgási frekvenciájának változása függvényében.

A hemozoin kivonás vizsgálata során a három különböző mérési módszer, az optikai mikroszkópia, a magneto-optikai mérések és az elektronmikroszkópos felvételek elemzése alapján több információt is nyerhettem a kristályosodási folyamatról. A szintetikus kristályokon való mérések során kimutattam, hogy a méreteloszlás változása valóban kimutatható változást okoz a jel lefutásában, a kultúrán való mérések is ennek megfelelő jeleket adtak.

6. Összefoglalás, tervek a jövőre

A kutatási munkám során lehetőségem volt a BME-MTA Maláriakutató Laboratórium munkálataiba bekapcsolódni. Megtanultam, hogyan lehet a maláriaparaziták sejt kultúráit gondozni, hogyan követhetem nyomon optikai mikroszkóp segítségével a koreloszlásokat. Munkámban arról a már régi felvetésről is készítettem előtanulmányt, hogy a forgó mágneses magneto-optikai műszer mágneses terének fordulatszámja milyen módon hat a különböző méreteloszlású minták jelének menetére. A vizsgálat kontrolljaként elektronmikroszkópos képek alapján készítettem el a leszártított kristálysuszpenziók automatizált méretanalízisét.

A kultúrák által termelt kristályok gyógyszer hatása alatti növekedésének vizsgálatára először egy előzetes tesztet végeztem, melyben a módszer működőképességéről megbizonyosodtam. A hemozoin kivonási protokoll hatékonyságának javításán a mérésekkel párhuzamosan dolgoztam. Tapasztalataim alapján a méréseimhez a proteínáz használata elhagyható, ami a protokoll idejét lényegesen lerövidíti, emellett jelentősen olcsóbbá is teszi.

A sejt kultúra által termelt kristályokon végzett vizsgálataim alapján az alábbi állításokra jutottam: a korábbi eredményekkel összevetve létezik egy univerzális hemozointermelési görbe, amelyre a gyógyszermentesen növekedő kultúrán mért pontok jól illeszkednek. A gyógyszer hatás esetében a termelt kristályok összmenyiségének csökkenése, illetve vérkenetek alapján a gyógyszer hatékonysága igazolható. A kivonást követő szuszpenzió mért frekvenciafüggő magneto-optikai görbe 4-ből 3 esetben jó egyezést mutatott a közvetlenül a kultúrából vett mintával, azaz a belőlük készített statisztikák jól tükrözik a paraziták által termelt kristályok méreteloszlását. Ennek eredményei megfeleltek a magneto-optikai mérések utáni feltételezéseimnek, a nagyfrekvenciás tartományon fellépő jelcsökkenés ott volt jelentősebb, ahol a statisztikában is több nagyobb méretű kristályt láttam. A növekedési fázis középső szakaszában a koncentrációval arányos magneto-optikai jelben intenzív növekedés tapasztalható, viszont az itt mért frekvenciafüggő görbe nem tér el jelentősen a kultúrák szétválasztása előtti fiatal kultúrán mérttől. Ez alapján arra a következtetésre jutottam, hogy a koncentráció növekedése az új kristályok létrejöttéből származik. Ezzel szemben a fejlődési fázis végén az emésztési folyamatok a kristályok méretének növekedéséhez járul hozzá inkább, erre utalnak a statisztikában megjelenő nagyobb kristályok, miközben a koncentrációval arányos jelben már csak kisebb arányú növekedést láttam. A

statisztikák alapján egy másik érdekes megfigyelés, hogy a gyógyszeres közegben felnövő kultúrában a hemozointermelés mind mennyiségben, mind a kristályok méretében lemarad a gyógyszermentes kontroll mintához képest, viszont a vérkenetek alapján a paraziták lassabban, de képesek elérni a fejlődési ciklus későbbi szakaszait.

Összefoglalva a metodológia tisztázott és megbízható - főleg a szintetikus kristályokon végzett mérési eredmények meggyőzőek. A jövőben a kultúrán végzett méréseket többször is meg szeretném ismételni, hogy lássam, az eredmények mennyire reprodukálhatók. A kivonási protokoll hatékonyságát részletesebben is megvizsgálnám, ezen kívül nagyobb mintatérfigattal is dolgoznék, hogy a gyógyszeres esetben is több kristályt tudjak kigyűjteni. Vizsgálnám azt is, hogy hogyan hat a kristályfejlődésre egy lényegesen nagyobb gyógyszerkoncentráció, ezen kívül a módszert összevetném valamilyen automatizált eljárással is (pl. fluoreszcens eljárások vagy áramlási citometria), mellyel a kultúra koreloszlásáról egy megbízhatóbb eloszlást kaphatok. Más hatóanyagok alkalmazásával is elvégezném a mérést, például artemizinin (ami feltehetőleg nem a hemozoin termelődésénél fejt ki hatását), illetve megvizsgálnám, hogy a gyógyszer specifikusan hat-e egyes fejlődési stádiumokra.

7. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Kézsmárki Istvánnak, hogy lehetőséget kaptam a kutatási munka kivitelezésére, és köszönöm az iránymutatásait az eredmények feldolgozásában. Szeretném továbbá megköszönni Orbán Ágnes a malária-fertőzéssel, a parazitákkal és a kristályokkal kapcsolatos ismeretek elsajátításában és a kapcsolódó irodalom feldolgozásában nyújtott segítségét, illetve a mérések elvégzésében adott tanácsait.

Szeretnék köszönetet mondani a Központi Fizikai Kutatóintézet munkatársainak, Fürjes Péternek és Illés Leventének az elektronmikroszkópos méréseim megszervezésében és a képek elkészítésében nyújtott segítségükért.

Megköszönöm továbbá a malária laboratórium munkatársainak, Molnár Petrának és Marton Líviának, hogy megtanulhattam a parazitakultúrák nevelését. Köszönettel tartozok Katharina Preissingernek és Orbán Ágnesnek a kísérletek kivitelezésében nyújtott segítségükért. Végül szeretném megköszönni minden kollégának, akik a felmerülő kérdéseimben segítségemre voltak.

Irodalomjegyzék

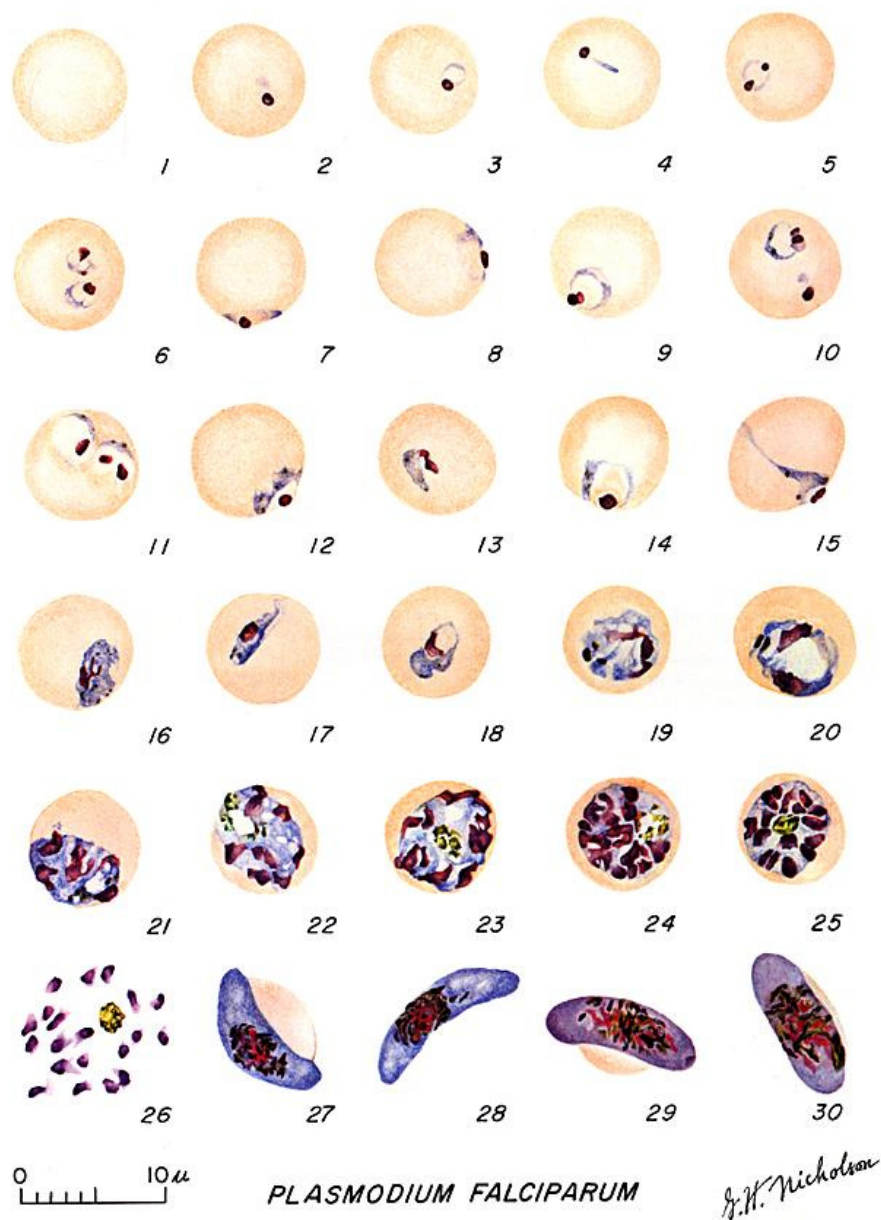
- [1] WHO: *World Malaria Report 2017* <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2017/en/>
- [2] A. F. Cowman, J. Healer, D. Marapana and K. Marsh: Malaria: Biology and Disease. *Cell*. **167** : 610-624 (2016)
- [3] W. Trager and J.B. Jensen: Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. **193** : 673-675 (1976)
- [4] The malERA Consultative Group on Diagnoses and Diagnostics: A Research Agenda for Malaria Eradication: Diagnoses and Diagnostics. *PLoS Med* **8**(1): e1000396. (2011)
- [5] D. K. Das, R. Mukherjee and C.Chakraborty: Computational microscopic imaging for malaria parasite detection: a systematic review. *Journal of Microscopy*. **260**(1) : 1-19 (2015)
- [6] M. Rebelo, C. Tempera , C. Bispo , C. Andrade , R. Gardner, H. M. Shapiro and T. Hänscheid: Light depolarization measurements in malaria: A new job for an old friend. *Cytometry A*. 87:437–445 (2015)
- [7] A. Tay, A. Pavesi, S.R. Yazdi, C.T. Lim and M. E. Warkiani: Advances in microfluidics in combating infectious diseases. *Biotechnology Advances*. **34**(4) : 404-421 (2016)
- [8] K. H. Chua, P. C. Lee and H. C. Chai: Development of insulated isothermal PCR for rapid on-site malaria detection. *Malaria Journal*. **15**(1) : 134 (2016)
- [9] J. C. Patel, N. W. Lucchi, P. Srivastava, J. T. Lin, R.Sug-Aram, S. Aruncharus et al.: Field evaluation of a real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification assay, RealAmp, for the diagnosis of malaria in Thailand and India. *The Journal of Infectious Diseases* **210**(8) : 1180-1187 (2014)
- [10] The malERA Refresh Consultative Panel on Tools for Malaria Elimination (2017) malERA: An updated research agenda for diagnostics, drugs, vaccines, and vector control in malaria elimination and eradication. *PLoS Medicine*. **14**(11) : e1002455 (2017)

- [11] Guidelines for the treatment of malaria. Third edition. April 2015. ISBN: 978 92 4 154912 7
- [12] S. Pagola, P. W. Stephens, D. S. Bohle, A. D. Kosar and S. K. Madsen: The structure of malaria pigment b-haematin. *Nature*. **404**: 307–310 (2000)
- [13] R. Buller, M. L. Peterson, Ö Almarsson and L. Leiserowitz: Quinoline Binding Site on Malaria Pigment Crystal: A Rational Pathway for Antimalaria Drug Design. *Crystal Growth and Design*. **2** : 553–562 (2002)
- [14] A. Butykai, A. Orbán, V. Kocsis, D. Szaller, S. Bordács, E. Tátrai-Szekeres, L. F. Kiss, A. Bóta, B. G. Vértessy, T. Zelles and I. Kézsmárki: Malaria pigment crystals as magnetic micro-rotors: key for high-sensitivity diagnosis. *Scientific Reports* **3** : 1431 (2013)
- [15] G. S. Noland, N. Briones, and D. J. Sullivan Jr.: The shape and size of hemozoin crystals distinguishes diverse Plasmodium species. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **130** : 91-99 (2003)
- [16] E. Hempelmann: Hemozoin Biocrystallization in Plasmodium falciparum and the antimalarial activity of crystallization inhibitors. *Parasitology Research*. **100** : 671–676(2007)
- [17] S. Kapishnikov, A. Weinaer, E. Shimonib, P. Guttmann, G. Schneiderc, N. Dahan-Pasternakd, R. Dzikowskid, L. Leiserowitza and M. Elbauma: Oriented nucleation of hemozoin at the digestive vacuole membrane in Plasmodium falciparum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **109** : 11188-11193 (2011)
- [18] I. Weissbuch and L. Leiserowitz: Interplay Between Malaria, Crystalline Hemozoin Formation, and Antimalarial Drug Action and Design. *Chemical Reviews*. **108** : 4899–4914 (2008)
- [19] P. M. O’Neill, V. E. Barton and S. A. Ward: The Molecular Mechanism of Action of Artemisinin—The Debate Continues. *Molecules*. **15**(3) : 1705-1721 (2010)
- [20] A. Sienkiewicz, J. Krzystek, B. Vilen, G. Chatain, A. J. Kosar, D. S. Bohle and L. Forró: Multi-frequency high-field EPR study of iron centers in malarial pigments. *Journal of the American Chemical Society*. **128** : 4534–4535 (2006)

- [21] D. S. Bohle, P. Debrunner, P. A. Jordan, S. K. Madsen and C. E. Schulz: Aggregated heme detoxification byproducts in malarial trophozoites: β -hematin and malaria pigment have a single $S = 5/2$ iron environment in the bulk phase as determined by EPR and magnetic Mössbauer spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*. **120** : 8255–8256 (1998)
- [22] W. A. Eaton, L. K. Hanson, P. J. Stephens, J. C. Sutherland and J. B. R. Dunn: Optical spectra of oxy- and deoxyhemoglobin. *Journal of the American Chemical Society*. **100** : 4991–5003 (1978)
- [23] D. M. Newman, J. Heptinstall, R. J. Matelon, L. Savage, M. L. Wears, J. Beddow, M. Cox, H. D. Schallig and P. F. Mens: A magneto-optic route toward the in vivo diagnosis of malaria: preliminary results and preclinical trial data. *Biophysical Journal*. **95** : 994–1000 (2008)
- [24] Methods in Malaria Research, 6th Edition (2013) edited by K. Moll, I. Ljungström, Hedvig Perlmann, A. Scherf, M. Wahlgren. EVIMalaR. Glasgow, UK
- [25] K. Halbach: Design of permanent multipole magnets with oriented rare earth cobalt material. *Nuclear Instruments and Methods*. **169**: 1-10 (1980)
- [26] M. M. Chen, L. Shi, D. J. Sullivan Jr.: Haemoproteus and Schistosoma synthesize heme polymers similar to Plasmodium hemozoin and β -hematin. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **113** : 1-8 (2001)
- [27] <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>
- [28] M. Jaramillo, M. J. Bellemare, C. Martel, M. T. Shio, A. P. Contreras, et al: Synthetic Plasmodium-Like Hemozoin Activates the Immune Response: A Morphology - Function Study. *Public Library of Science ONE*. **4**: 6957. (2009)
- [29] Ana Strinic: Magneto-optical detection of malaria parasites. BSc szakdolgozat. University of Augsburg (2018)

Függelék

Függelék A - A paraziták korának azonosításához felhasznált referencia koreloszlás táblázata



28. ábra. Az egyes paraziták korának megállapításához alkalmazott referenciatáblázat. Az osztódással történő szaporodást az 1. és 25. pont közötti állapotok jellemzik. fiatal ring fázis: 1-5; idős ring fázis: 6-10; fiatal trophozoita fázis: 11-15; idős trophozoita fázis: 16-18; schizont fázis: 19-25.

Függelék B - A hemozoin kivonási protokolljának lépései

HEMOZOIN PURIFICATION PROTOCOL FOR SEM MEASUREMENT

(from culture samples)

1. Save for optical measurement. Centrifuge (CF) the whole culture in 15 ml Falcon, big centrifuge, max RPM, 10 min
2. Remove and save Supernatant-1.
3. Dilute pellet with 5 ml Lysis (1 mM NaOH, 0.03,% Triton).
4. Mix and sonicate for 5 min, CF (max RPM, 10 min)
5. Remove and save Supernatant-2, Add 1 ml DW to the pellet, sonicate for 5 min, vortex thoroughly, put over a magnet for 15 min or more, remove Supernatant-3
6. Wash with SDS 2% two times (CF, remove Supernatant-4; Supernatant-5, fill up, sonicate, repeat)
7. Resuspend in 1 ml Proteinase K buffer (10 mM TrisHCl pH 8, 0.5% SDS, 1 mM CaCl₂) with 2 mg/ml of Proteinase K overnight at 37 °C, after incubation CF and save Supernatant-6
8. Wash two times with SDS 2%; save Supernatant-7; Supernatant-8
9. Incubate it in 6 M urea for 3 h: first sonicate with UREA for 5 minutes and vortex every 15 minutes, save Supernatant-9
10. wash with DW , save Supernatant-10
11. wash two times with SDS 2%;save Supernatant-10, Supernatant-11
12. wash three times with DW, save Supernatant-12, Supernatant-13, Supernatant-14