

## **Publikálva:**

Lőrincz, A. – Neményi, M. (2002): Az in vitro sejtfeltárás hatékonyságát befolyásoló fizikai tényezők (1. rész). Laboratóriumi Információs Magazin, Biofizika rovat. XI. évfolyam, No. 1. pp. 42-48.

## **In vitro sejtfeltárás hatékonyságát befolyásoló fizikai tényezők**

A sejtuszpenziók in vitro ultrahangos besugárzása különböző intracelluláris sejtalkotó extrakciós és más kísérleti biológiai, esetleg in vivo előkészítő céllal, már évtizedekkel ezelőtt magas szintre jutott. A bonyolult biofizikai folyamatokra, az adott felhasználási célnak megfelelő, a mai napig jól használható összefüggések születtek. A különböző ipari és laboratóriumi felhasználási célú ultrahang besugárzási eljárások azonban, az egyes rendszerek bonyolult biológiai, fizikai és kémiai felépítése miatt, még tartogat meg nem oldott problémákat. Jól ismert tény, hogy a besugárzás fizikai paraméterei, például a frekvencia, intenzitás, a hangtér kialakítása, illetve a kezelt közeg fizikai, kémiai és biológiai tulajdonságai, e képen a hőmérséklet, sűrűség, oldott ion koncentráció, az oldott ion típus, oldott gáz típus, oldott gáz mennyiség, kavitációs magok jelenléte, és egyéb tényezők külön-külön milyen összefüggésekkel bírnak a besugárzásra, például a kavitációs küszöbre. Azonban a gyakorlatban kezelendő különböző anyagok, például az élelmiszerek, mint polidiszperz rendszerek, sajátosságaikat tekintve egymástól az előzőekben felsorolt tulajdonságaikban alapvetően különbözhetnek, sőt az egyes élelmiszerek minősége sem tekinthető folyamatosan állandónak. Ezért a meghatározott céllal történő ultrahangos besugárzás hatásainak elméleti meghatározását, a gyakorlati felhasználás szempontjából könnyen és biztonságosan alkalmazható módszerekkel kell kiegészíteni. Ilyen lehet besugárzás alatt a sejtpusztítási célú kavitáció detektálása audionális, vagy a szeparációs célú állóhullám vizuális, vagy optikai detektálása, illetve magának a végeredménynek a mérése. A kavitációs küszöb, illetve a haladó és az állóhullám kialakulása egyazon közegben az intenzitás mellett, a gyakorlati eseteket figyelembe véve, leginkább a diszpergált részecskék koncentrációjától és minőségétől függ. Ez az elméleti, sőt a gyakorlati munkákban sincs kihangsúlyozva megfelelő súllyal. Az elméleti munkákban a szemcsék, mint szóró centrumok szerepelnek, melyek a síkhullámokat gömbhullámmá alakítják, illetve pontszerű hőforrásként működnek. Azonban ha kiszámítjuk, milyen mértékű az energiaveszteség e miatt a hangtérben, akkor sem tudhatjuk pontosan, milyen intenzitás szükséges a megcélzott hatás küszöb kialakításához. Ezért van szükség jó indikátor módszerekre a jelenségek felismerése céljából, valamint ezeknek a módszereknek a hatásokkal történő biztonságos összeegyeztetésére az adott felhasználási területen. A gyakorlatban egy-egy adott jelenség kihasználására különböző tudományterületek fejlődtek ki, amilyen például a szonokémia, vagy a most születő EuroUltraSonoSep Európai Unió TMR hálózatban zajló kutatási projekt, melynek célja a biotechnológiai emulzió disszociáció, és más diszperziók, például sejtuszpenziók ultrahangos szétválasztása, mely projektben több kutatóintézet, kutatói team és egyetem vesz részt. A feltáró munka kapcsán azt is fel kellett ismerni, hogy az egyes szakterületeken zajló ultrahangos munkák egymásba nem mindig konvertálhatóak, amelyre jó példák lehetnek az ultrahangos szeparáció és a sejtuszerv extrakció, mivel e két alkalmazási terület céljai homlokegyenest ellentétesek. Az első célja egy sejtekből álló tervszerű térbeli rendszer megalkotása álló hullámok segítségével a sejt életképesség megőrzése mellett a haladó hullámok és a kavitáció kizárásával, a második célja viszont a sejtek szétroncsolása, a kavitáció által, az állóhullám kizárásával. A probléma nehézsége, hogy a két hatás egy hangtérben is könnyen létre jöhet akaratlagosan, vagy nem megfelelően működtetett rendszer esetében véletlenszerűen is. Emiatt nagy hibák és az ultrahang hatékonyságával kapcsolatos

gyakori félreértések származhatnak a kísérleti körülmények nem megfelelő megválasztásából, melyre jó példa a kísérleti körülmények közül például csak a sejt szuszpenzió koncentrációjának megváltoztatása miatt kialakuló sokféle ultrahang jelenség, amelyek eltérő hatást fejtenek ki a sejtekre. Az eltérő jelenségek célirányos kihasználásával azonban különböző feladatok végrehajtására nyílik mód.

Kísérleteink célja, hogy megfelelő elméleti és gyakorlati háttér segítségével szelektív ultrahanghatást érjünk el, mégpedig úgy, hogy a közeg bizonyos komponenseit inaktíváljuk, míg más komponenseket pedig érintetlenül hagyunk. Ennek két elérhető módja mutatkozik. Az első, amikor térben ultrahang hullámokkal szétválasztjuk egymástól a kérdéses komponenseket fizikai tulajdonságaik alapján, és a nem kívánt komponenseket kivezethetjük a rendszerből, illetve a helyszínen például kavitáció által széttroncsolhatjuk azokat. A második pedig a közegben található egyes komponensek eltérő érzékenységét használja ki az egyes ultrahang által létrehozható jelenségekkel szemben. A kísérleteinkben optimális gyakorlati felhasználhatóságú ultrahangos folyamatérzékelő detektálási módszereket alkalmazunk, amelyek eredményeit a hullámjelenségek által okozott sejtroncsoló hatáshoz viszonyítjuk a kezelési idő függvényében pékélesztő (*Saccharomyces cerevisiae*)lesztő mikroorganizmusra. Feltártuk a kölcsönhatását a szuszpendált szemcsék hangtérbeli koncentrációjának a hangtérben kialakult hullámjelenségekkel, valamint a kialakult hullámjelenségek hatását az adott szuszpendált részecskékre a behatási idő függvényében.

## Irodalmi áttekintés

Tar et al. (1982) a hangtér a tér minden olyan pontja, ahol a hanghullámokra jellemző, váltakozó nyomás lép fel. A hangtérben kialakuló hullámtípusok a sugárzó típusától, a hangtér kialakításától, valamint a hangtér fizikai paramétereitől függnnek. Longitudinális hullám esetén a hullámmozgást végző közeg sűrűsödései és ritkulásai a hullám terjedésének irányában vannak, ami a gázokra és folyadékokra jellemző. Az állóhullám akkor alakul ki, ha két azonos típusú, frekvenciájú és amplitúdójú, de ellentétes irányú hullám találkozik, ez az interferencia jelenség. Az állóhullám úgy keletkezik, hogy egy haladó hullám valamilyen akadályon visszaverődik és az eredeti, valamint a visszavert hullám interferál. Ha egy irányba halad a hullám, haladó hullámról van szó. A hangszóródás ott jelentkezik, ahol a hullámok rugalmas közegbe ágyazott idegen testhez, akadályhoz érnek. A hanghullámok minden anyagban frekvenciájuktól, a hullám típusától, a hőmérséklettől, illetve az anyag tulajdonságaitól függő mértékben adszorbeálódnak, a rezgési energia irreverzibilis hővé alakulása következtében. Hobenko et al. (1977) szerint a hangtérben a hangnyalábot feloszthatjuk közel térre, átmeneti tartományra és távolytérre. Az ultrahang közel tér (near field) távolságát a kör alakú rezgőnél az alábbi képlettel fejezi ki:

$$N_{\text{kör}} = D^2 * f / 4 * c = 0,25 * (D^2 * f / c)$$

Ahol (D) a rezgő átmérő [mm], (f) a frekvencia [Hz], (c) a hullám terjedési sebessége [m/s]. A közel térben a hangnyomás ingadozás mértéke, a minimumok és a maximumok helye eltérő.

Frizzel et al. (1988) szerint a kavitációs jelenség olyan folyadékokban alakul ki, amelyek akusztikus zavarnak vannak kitéve akkor, ha az akusztikus nyomás a hangciklus ritkulási fázisának folyamán a teljes nyomást nézve lecsökken egy bizonyos küszöb, vagy határérték alá. Ez az akusztikus nyomás amplitúdó küszöb számos fizikai paraméter függvénye, amelyek a közeg állapotát írják le. Ezekbe bele tartozik a hangintenzitás, a frekvencia, a hőmérséklet, a nyomás, az oldott gáz típusa, mennyisége, a viszkozitás, a közeg előélete, a kavitációs magok típusa, mennyisége, az oldott ion koncentráció, stb.

A kavitációnak két típusa van, melyek közül az egyik a stabil kavitáció, amikor a buborék számos hangcikluson keresztül oszcillál a közegben, illetve a másik a tranzien kavitáció, amely azt jelenti, hogy a buborék néhány hangciklus alatt gyorsan növekedik majd utána hevesen összeomlik. Veit et al. (1977) szerint a kavitáció akusztikailag zajként jelentkezik, ami mikrofonnal felvehető és elemezhető. Fry et al. (1978) biofizikai vizsgálatok során azt találták, hogy ultrahangos besugárzás alatt az intracelluláris sejttestecskék egyenletesen pörögnek a sejtekkel együtt, ami az ultrahangos forgató nyomaték következménye. A mikroáramlások, az akusztikai határrétegekben indukálódnak, mint például a folyadék, és a szuszpendált objektum közti határrétegben, ahol a váltakozó irányú áramlás eredményeként erős turbulenciákként manifesztálódnak. A mikroáramlás fontos kapcsolatban van a biológiai hatásokkal, ahol magas sebesség gradiens és nagy nyírófeszültség jellemző, ami a határfelületi rétegekben keletkezik és a biológiai sejtek, valamint a sejtstruktúrák, makromolekulák roncsolódását, pusztulását, ill. inaktiválódását okozza.

A biológiai anyagokban, mint minden anyagban irreverzibilis folyamatok játszódnak le, melyek a hang energia folyamatos hővé történő átalakulását okozzák, mely hőhatás szignifikáns az ultrahangok biológiai hatásaival. A hőmérséklet emelkedésének ez a folyamata könnyen elegendő a biológiai struktúrák és folyamatok megváltoztatásához. Az intenzitás:

$$I = I_0 * e^{-2\alpha x}$$

ahol ( $I_0$ ) [ $W/cm^2$ ] vagy [dB] a kiindulási intenzitás, ( $I$ ) az aktuális intenzitás [ $W/cm^2$ ] vagy [dB], ( $\alpha$ ) az abszorpciókoefficiens [ $Np/cm$ ] = 8,7 [dB/cm], ( $x$ ) pedig az irány. A hőképződés egységnyi térfogatra pedig:

$$q_v = 2\alpha I.$$

Eckart et al. (1948) szerint a kvarc szél, az ultrahang globális áramlása térben, a sugárzótól a közegbe a sugárzás irányában. Nemlineáris mechanikai hatás tehát az akusztikai áramlás, mely az ultrahang hullámokkal besugárzott folyadékokban jön létre, amelynek kapcsán a folyadékban lévő szuszpendált részecskék a folyadékkal együtt mozognak, miközben sűrűsödnek. Suslick et al (1988) szerint a sugárzási erő azt jelenti, hogy ultrahang besugárzás alatt a hangtérben minden besugárzott objektumra adott nagyságú és irányú erő hat, melyet a sugárzó intenzitása és a tér paraméterei befolyásolnak. Thacker et al. (1973) a haploid és diploid *Saccharomyces cerevisiae* pékélesztő sejtek túlélésében eltéréseket tapasztaltak. Ezzel kapcsolatban nem szinkronizált populációk vizsgálata javasolt, a sejtek eltérő kavitációs érzékenysége miatt. A kapott túlélési görbék több szakasszal rendelkezhetnek lefutásukban. A kavitációs határon dolgozó kutatók a pusztulási arányt az egyszerűség kedvéért állandó exponenciális lefutásúra veszik fel. Miller et al. (1996) szerint a sejt szuszpenzióban ultrahang hatására kialakuló nem termikus folyamatok legfontosabbika a kavitáció, melynek mindkét formája a biológiai hatások széles skáláját okozza. Miller és Thomas (1994) szerint a hidrogén peroxid és egyéb szonokemikáliák genetikai, biokémiai hatásaihoz adódik hozzá a kavitáció erőteljes mechanikai roncsoló hatása. Loverock és ter Haar (1991) kijelentik, hogy a sejt koncentráció fontos tényezője az in vitro szonolízisnek, mégpedig, a magas koncentrációknál a szonolízis kisebb mérvű. Liebeskind et al. (1979) szerint az ultrahang hatásai a besugárzást túlélő sejtek között lehet struktúra-, funkcióváltozás, vagy akár az örökítő anyagra, a DNS-re gyakorolt hatások, melynek kapcsán DNS szál törés, aberráció következhet be. Brayman et al. (1994) szerint a nagyobb átmérőjű sejtek, kavitációra vonatkozó nagyobb érzékenysége azzal magyarázható, hogy a nagyobb sejt nagyobb valószínűséggel találkozik a kavitációs buborékokkal. Blackshear és Blackshear (1987) szerint azonban az ok abban áll, hogy a kisebb sejtek sejt falának szétszakításához nagyobb

nyíróerő szükséges. Göschl et al. (1999) és munkatársai kijelentik, hogy a kis méretű szuszpendált részecskék manipulálására, irányítására alkalmas rezonátorok legkevesebb négy összetevőből kell, hogy álljanak. Ezek a piezoelektromos transzducér, a hordozó edény (üvegedény), a folyadék (szuszpenzió) és az akusztikus reflektor. Walsch et al. (1999) és munkatársai a *Saccharomyces cerevisiae* sörélesztő ultrahangos immobilizációjának biológiai hatásait vizsgálták. A tanulmányok kimutatták, hogy az élő sejtszám csökkenés, valamint a sejt osztódási képességének a csökkenése (elvesztése) a fő hatásai a terjedő (haladó) ultrahang hullámoknak az élesztő sejtek fiziológiájára. Az állóhullámú térben nem voltak szignifikáns károsító hatások. Az eredmények metilénkék vitális festésen alapultak. Az élesztő sejtek térbeli rendszerét eredményezi az állóhullámú tér, ami megvédi a sejteket a károsodástól. Tarnóczy et al. (1963) korai munkájában leírja, hogy az ultrahang mechanikai hatására az állóhullám térben a szilárd részecskék nagyobb tömegekbe összecsapódnak a nyomási csomósíkokba, ez alatt súlyuk megnövekszik, a nagyobb súlyú darabok pedig nem maradnak lebegő állapotban, hanem a nehézségi erő hatására kiülednek. Lőrincz et al. (2001) in vitro ultrahangos besugárzással szemben a sejtek, még egy populáción belül is eltérő érzékenységek, ami számos morfológiai és genetikai tényező függvénye. Ezt az ismeretet egyértelműen ki lehet használni a szelektív kezeléseknél. Deák et al. (1997) szerint a környezeti tényezőkön keresztül ható beavatkozások, melyek a mikroorganizmusok pusztulását okozzák, a vizsgálatok többségének eredményei szerint exponenciális lefutásúak. Továbbá kinetikailag a sejtpopulációk pusztulásának időbeli lefutása az egysejtű mikroorganizmusok szaporodásához hasonlóan, az elsőrendű kémiai reakciók analógiájára írható le:

$$dN / dt = -k * N.$$

Az egyenletben az [N] a túlélő sejtszám, melynek változása [t] idő alatt arányos a mindenkori sejtszámmal, és ahol a [k] arányossági tényező a pusztulási sebességi együttható, vagyis a fajlagos pusztulási sebesség. A fenti differenciál egyenletet  $N_0$  (kezdeti sejtszám  $t_0$  időpillanatban) és  $N_t$  (túlélő sejtszám  $t$  időpillanatban) határok közt integrálva, a mikrobapopulációk pusztulásának alapegyenletét kapjuk:

$$N_t = N_0 * e^{-k(t-t_0)}$$

Amely alakilag azonos az exponenciális szaporodás egyenletével, csak az együttható negatív előjelű. Az egyenletet logaritmálva, a túlélési görbe egyenletét kapjuk:

$$\log N_t = \log N_0 - (k/2,303) * (t-t_0)$$

amiből látszik, hogy a túlélő sejtek logaritmusát az időben ábrázolva egyenest kapunk, melynek meredeksége a pusztulási sebességi együtthatóval arányos, melyet az egyenletből kifejezve:

$$k = ((2,303 / (t-t_0)) * \log (N_0 / N_t))$$

A kezdeti és a  $t$  időben mért végső sejtszámból a [k] értéke meghatározható. Ha a túlélési görbe egyenletében szereplő  $t-t_0$  időt úgy definiáljuk, mint azt az időtartamot, mely alatt a túlélő sejtszám a tizedére csökken, akkor a tizedelődési idő [D] fogalmához jutunk.

Ha  $t-t_0 = D$  és  $N_t = 0,1 * N_0$ , akkor:

$$k = 2,303 / D , \text{ vagy } D = 2,303 / k$$

A tizedelési idő a mikrobapopuláció ellenállásának (rezisztenciájának) percekben kifejezett mértéke. Adott behatás mellett, minden [D] időtartam alatt a sejtek 10 %-a marad életben, 90 %-a elpusztul, tehát a pusztulási arány állandó és független a kezdeti sejtszámtól. Amennyiben a populáció kiindulási sejtszámának tizedénél nagyobb mértékű pusztulási arányt akarunk elérni, akkor a többségi pusztulási időt [ $\tau$ ] kell meghatározni. Ha az exponenciális pusztulási kinetika érvényesül és ismerjük a tizedelődési időt, akkor a mikrobaszám tetszőleges mértékű csökkentéséhez szükséges többségi pusztulási időt, bármely kezdeti sejtszám esetére kiszámolhatjuk:

$$\tau = D * (\log N_0 - \log N_t)$$

Ezzel meghatározhatjuk a kívánt mértékű mikrobaszám csökkentéséhez szükséges kezelési időt állandó pusztító dózis alkalmazása mellett. Bíró et al. (1976) szerint a mikroorganizmusok életképességének meghatározására a legrégebb és legegyszerűbb eljárás a metilénkékes festés. Főleg az élesztők esetében elterjedt a módszer, melynek alapja, hogy ha az élő és holt sejtekből álló szuszpenziót híg metilénkékkel hozzuk össze, akkor a holt sejtek rögtön kékre festődnek, míg az élők a festék dehidrogenázokkal történő redukálása miatt, nem színeződnek. Az utóbbiak számarányának és az összes csíraszámnak ismeretében az élő csíraszám meghatározható.