

Egy új, mágneses-optikai elven működő maláriadiagnosztikai eszköz fejlesztése

PhD Tézisfüzet

Orbán Ágnes

Témavezető: Dr. Kézsmárki István

Fizika Tanszék

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

BME

(2019)



1. A kutatások előzménye

A malária egyike a Föld legrégebbi, napjainkban is jelen lévő fertőző betegségeinek, mely még mindig több mint négyszázezer halálos áldozattal jár évente annak ellenére, hogy a 20. század során a mérsékelt égövi országokból sikerült visszaszorítani. A 2000-es évek elején a malária, immár a trópusi betegségeként, továbbra is a világ lakosságának mintegy felét veszélyeztette, évente közelítőleg 262 millió megbetegedést okozva és nyolcszázezer halálos áldozatot követelve. Az elmúlt két évtizedben, részben a rendkívül hatékony új gyógyszer, az artemisin elterjedésének, részben a Bill és Melinda Gates alapítvány munkájának köszönhetően a fertőzés elleni globális küzdelem új erőre kapott és az Egészségügyi Világszervezet (WHO) azt az ambíciózus célt tűzte ki, hogy a fertőzések és a halálozások aránya 90%-kal csökkenjen 2030-ra. Ehhez ugyanakkor rendkívüli társadalmi, politikai és tudományos összefogásra van szükség. A probléma leghatékonyabb megoldása az évtizedek óta zajló vakcinafejlesztés sikerre vitele lehetne, és bár a terület intenzíven kutatott, a betegséget okozó paraziták bonyolult életciklusa miatt ez egy különösen összetett feladat. A küzdelmet tovább nehezíti az artemisin-rezisztencia kialakulására utaló első jelek megfigyelése a délkelet-ázsiai régióban, és egy olyan hatékony, tömeges tesztelésre alkalmas módszer hiánya, mely rendkívül érzékenyen, ugyanakkor költséghatékonyan képes kimutatni a fertőzést az érintett, többségében fejlődő országokban élő lakosság körében [1].

A betegséget a *Plasmodium* nemzetségbe tartozó egysejtű paraziták okozzák, melyeket az *Anopheles* szúnyogok terjesztenek. A paraziták több szakaszból álló életciklusának egyike a humán vér fázis. Ennek során a paraziták a vörösvértestek aminosavait saját fehérjéik bioszintézisére használják, felemésztve ezáltal a megtámadott vértesteket, és periodikus, aszexuális reprodukciót folytatva, ciklusonként 5 – 10-szeresére növelik a fertőzött sejtek számát. A fertőzés ezen szakasza felelős a betegséggel járó ciklikus tünetegyüttesért (magas láz, hidegrázás, fejfájás, végtagfájdalmak), a vörösvértestek szinkronizált felszakadása során ugyanis, nagy mennyiségű idegen anyag kerül a véráramba, mely erős immunválaszt vált ki [2]. A vérfázis kezdeti stádiumának tünetei ugyanakkor enyhék és általánosak, így a WHO minden esetben parazitológiai tesztet javasol a gyógyszeres kezelés megkezdése előtt. Napjainkban ez fénymikroszkópos vizsgálatot vagy antigén-alapú gyorstesztet jelent. Bár a két módszer együttesen többé-kevésbé ki-

elégíti a jelenlegi klinikai igényeket, előbbi hosszadalmas és időigényes, míg utóbbi nem elég érzékeny a kis parazitémiájú (a fertőzött vörösvértestek százalékos aránya), illetve tünetmentes hordozók kimutatására. Egy új, nagy volumenben olcsón alkalmazható, ugyanakkor érzékeny ma-lá-ri-a-di-ag-nosz-ti-ka-i eszköz kifejlesztése nagyban előremozdítaná a betegség visszaszorításáért folytatott küzdelmet [3].

2. Célkitűzések

Kutatómunkám során egy, a fent felsorolt kritériumoknak eleget tevő, optikai diagnosztikai eljárás lehetőségét vizsgáltam, mely a betegséget a maláriapigment kristályok vérből való kimutatása útján diagnosztizálja. A maláriapigment, vagy hemozoin kristályok a fertőzés vér fázisában, a paraziták hemoglobin-metabolizmusának melléktermékeként jelennek meg a páciensek véráramában, egyedi biomarkerei a betegségnek, koncentrációjuk pedig nő annak előrehaladtával. A néhány száz nanométer hosszú, tűszerű kristályok a többi véralkotóhoz képest egyedi mágneses és optikai tulajdonságokkal rendelkeznek: kristálytani anizotrópiájuk következtében fellépő lineáris dikroizmust, valamint a bennük lévő vas ionok magas spinű állapotából fakadó anizotrop paramágneses viselkedést mutatnak.

Newman és munkatársai a kristályok ezen tulajdonságai nyomán vetették fel a magneto-optikai mérés-technikával történő detektálás lehetőségét egy 2008-ban megjelent tanulmányukban, ugyanakkor az általuk kidolgozott mérési eljárás sem érzékenységet, sem technikai megvalósítását tekintve nem volt alkalmas terepi felhasználásra [4]. Kutatásom elsődleges célja tehát az volt, hogy felépítsek és minősítsek egy olyan eszközt, amely nem igényel laboratóriumi mérőberendezéseket, ugyanakkor képes a hemozoin kristályokat mágnesesen indukált lineáris dikroizmusuk révén nagy érzékenységgel kimutatni vérmintákban. A műszer érzékenységének tesztelését a legegyszerűbb modellel, szintetikus hemozoin kristályokkal kezdtem, majd vizsgálataimat biológiailag egyre relevánsabb rendszerekre terjesztettem ki, úgy mint maláriaparazita sejt kultúrák, egérkísérletek és egy maláriafertőzött régióban gyűjtött humán vérminták.

3. Új tudományos eredmények

A kutatás doktori tanulmányaimat megelőző szakaszában kollégáimmal (i) mágnesezettség méréseket végeztünk pormintákon és orinetált hemozoin szuszpenziókon, melyekkel igazoltuk azt a korábbi feltevést, hogy a kristályok könnyű síkú paramágneses anizotrópiával rendelkeznek; (ii) meghatároztuk a hemozoin lineáris dikroizmus spektrumát a látható és közeli infravörös spektrális tartományban, illetve vizsgáltuk az effektus mágneses tértől és kristálykoncentrációtól való függését [5]. Ezen mérések tapasztalatai alapján felépítettünk egy olyan, olcsó optikai elemekből álló, hordozható berendezést, amely egy forgó mágneses gyűrű segítségével a kristályok anizotrop mágnességét kihasználva képes megvalósítani nagy érzékenységgű, polarizáció-modulációs mérés technikát. A műszer kristálykoncentrációra vonatkozó érzékenysége a néhány $pg/\mu l$ nagyságrendbe esik, mely a legjobb tudomásom szerint a legérzékenyebb eljárás a hemozoin szuszpenzióban történő koncentrációjának meghatározására.

A doktori kutatómunkám során elért legfontosabb, új tudományos eredményeket az alábbi tézispontokban foglalom össze:

1. Részt vettem a forgókristályos maláriadiagnosztikai mérőműszer felépítésében, mely munka során megterveztem az optikai fényutat, teszteltem és meghatároztam az ideális optikai elemeket és a folyadékminták mérésére alkalmas optikai mintatartókat. Meghatároztam a műszer szintetikus hemozoin-szuszenziókra vonatkozó kimutathatósági határát, amely vizes minták esetén $0.5\text{ pg}/\mu\text{l}$ -nek, míg hemolizált vér esetén $15\text{ pg}/\mu\text{l}$ -nek adódott. Megvizsgáltam továbbá, hogy hogyan függ a minták lineáris dikroizmus jele a mágnes tér forgási frekvenciájától, a közeg viszkozitásától és a kristálméret-eloszlástól. Ezen dinamikai mérésekkel megerősítettem azt a feltevést, hogy a kristályok könnyű-síkú paramágneses anizotrópiával rendelkeznek, és meghatároztam a jel-zaj viszony szempontjából optimális mérési tartományt [P1].
2. A validációs eljárás második szakaszában azt tanulmányoztam, hogy a műszer képes-e *in vitro Plasmodium falciparum* sejt kultúrák által előállított hemozoin kristályok detektálására. Két, különböző koreloszlású parazitákat tartalmazó mintasorozaton végzett méréseim során megállapítottam, hogy a műszer parazitáira vonatkozó érzékenysége

fiatal sejt kultúrák esetén $p = 0.0008\%$, míg a ciklus végső szakaszába lépett paraziták esetén $p = 0.0002\%$ [P2].

3. A hemozoin kristályok a paraziták vérsejteken belüli metabolizmusának melléktermékei, így megtermelt mennyiségük ideális indikátora lehet a paraziták cikluson belüli fejlettségi állapotának. Ezen feltevésekből kiindulva megvizsgáltam, hogy forgómágneses eljárás alkalmas-e a paraziták növekedésének nyomon követésére, és gyógyszerhatóanyagok fejlődést gátló hatásának kimutatására. Megállapítottam hogy szinkronizált parazitapopulációk életcikluson belüli fejlődése néhány óras időfelbontással követhető, és meghatároztam az átlagos, ciklusra vonatkozó hemozoin-termelési görbéjüket. Kidolgoztam továbbá egy mintaelőkészítési eljárást, amellyel egyszerűen és nagy érzékenységgel lehetséges gyógyszerhatékonyági vizsgálatokat végezni. [M1].
4. Egérkísérletek segítségével tanulmányoztam, hogy a módszer alkalmas-e *in vivo* fertőzések kimutatására. Ezen kontrollált fertőzéses kísérletekben az egereket *Plasmodium berghei* sporozoitákkal (a szúnyogok által terjesztett formája a parazitáknak) fertőztük meg injekcióval, ill. fertőzött szúnyogokkal való kontaktus útján, és azt vizsgáltuk, hogy a májfázist követően melyik az a legkorábbi időpont, amikor a véráramba kitörő parazitákat detektálni tudjuk. A kísérletek eredményei azt mutatták, hogy a fertőzés kialakulása már az első vagy második vérciklusban feltárható a magneto-optikai eljárással, mely a mikroszkópiához hasonló érzékenységet jelentett. Fertőzött egerek gyógyítása során a hemozoin véráramból való kiürülésének időfüggését is analizáltam, és megállapítottam, hogy a kristályok még átlagosan 4 napig jelen vannak a véráramban a paraziták eltűnése után (az általunk alkalmazott kísérleti körülmények között ez utóbbi átlagosan 3 nap volt) [P3, P4].
5. A laboratóriumi validálási sorozat utolsó állomásaként összeállítottam egy forgómágneses mérőműszert a Mahidol Vivax Research Unit (Bangkok, Thaiföld) kutatóintézetben, ahol a külföldi kollégák által malária-fertőzött-régiókban, terepi tesztek során gyűjtött humán mintákat vettem alá magneto-optikai vizsgálatnak. A fertőzött minták analízisa előtt kidolgoztam egy mintaelőkészítési-protokollt, ami optimális fagyasztott teljes vérminták optikai méréshez való előkészítésére, illetve meghatároztam azt a jelszintet, ami alapján a malária-pozitív/

malária-negatív klasszifikálás elvégezhető. Az összesen 35 darab, *Plasmodium vivax* által fertőzött vérminta mindegyikét pozitívnak minősítette a magnet-optikai módszer, így érzékenysége ezen a kis volumenű mintasorozaton 100%-nak bizonyult. Az eredeti mintákból hígítási sorokat készítettem, melyekkel vaktesztek során megbecsültem, hogy a legkisebb kimutatható parazitémia *Plasmodium vivax* minták esetén közelítőleg $p = 0.0002\%$, ami a szakértők által végzett fénymikroszkópos vizsgálatok érzékenységének felel meg. Elemeztem továbbá a korrelációt a minták magneto-optikai jelének nagysága, azok nominális parazitémiája és a paraziták mintákon belüli koreloszlása szerint, és megmutattam, hogy bár az optikai jel és a parazitémia érték gyengén korrelált, a koreloszlás figyelembe vételével az eredmény jelentősen javul. A fent felsorolt validációs eljárás meggyőző eredményei lehetővé tették, hogy az eljárást egy nagy volumenű terepi tesztnek vessük alá egy, ausztrál kollégákkal folytatott, kollaboratív projekt keretein belül Pápua-Új Guineában [M2].

4. Publikációk és kéziratok

Tézispontokhoz kapcsolódó publikációk listája

- P1. Butykai, A., **Orban, A.**, Kocsis, V., Szaller, D. *és tsai.* Malaria pigment crystals as magnetic micro-rotors: key for high-sensitivity diagnosis. *Sci Rep* 3. köt., 1431. old. (2013).
- P2. **Orban, A.**, Butykai, A., Molnar, A., Prohle, Z. *és tsai.* Evaluation of a novel magneto-optical method for the detection of malaria parasites. *PLoS ONE* 9. köt., e96981. (2014).
- P3. **Orban, A.**, Rebelo, M., Molnar, P., Albuquerque, I. S. *és tsai.* Efficient monitoring of the blood-stage infection in a malaria rodent model by the rotating-crystal magneto-optical method. *Sci Rep* 6. köt., 23218. old. (2016).
- P4. Pukancsik, M., Molnar, P., **Orban, A.**, Butykai, A. *és tsai.* Highly Sensitive and Rapid Characterization of the Development of Synchronized Blood Stage Malaria Parasites Via Magneto-Optical Hemozoin Quantification. *Biomolecules* 9. köt. (2019).

További tudományos közlemények

- P5. Pukancsik, M., **Orban, A.**, Nagy, K., Matsuo, K. *és tsai.* Secondary Structure Prediction of Protein Constructs Using Random Incremental Truncation and Vacuum-Ultraviolet CD Spectroscopy. *PLoS ONE* 11. köt., e0156238. (2016).
- P6. Ceolin, G., **Orban, A.**, Kocsis, V., Gyurcsányi, R. *és tsai.* Electrochemical template synthesis of protein-imprinted magnetic polymer microrods. English. *Journal of Materials Science* 48. köt., 5209–5218. old. (2013).
- P7. Rebelo, M., Grenho, R., **Orban, A.** & Hanscheid, T. Transdermal Diagnosis of Malaria Using Vapor Nanobubbles. *Emerging Infect. Dis.* 22. köt., 343–344. old. (2016).

Kéziratok előkészületben

- M1. Molnár, P., Babai, R., **Orban, A.**, Izrael, R., Marton, L., Butykai, A., Vértessy, B.G., Kézsmárki, I., *Fast and sensitive antimalarial efficacy testing using the RMOD method.*

A publikációban a 3-as számú tézispontban ismertetett univerzális hemozoin-termelési görbét, a magneto-optikai gyógyszerhatékonysági vizsgálatokhoz kifejlesztett protokollt, és annak ismert antimaláriás szereken történő validálást fogjuk bemutatni, különös tekintettel a korai és alacsony parazitémájú mintákon történő detektálásra.

- M2. Karl, S., Arndt, L., **Orban, A.**, Koleala T., *et. al. Evaluation of a novel magneto-optical method for malaria diagnosis in Papua New Guinea.*

A publikáció a Pápua-Új Guineában lezajlott terepi tesztelés eredményeit ismerteti majd, kiegészítve a mintaelőkészítési eljárással és a Thaiföldön gyűjtött *P. vivax* mintákra vonatkozó adatokkal.

5. Irodalomjegyzék

1. *World malaria report 2017.* Geneva: World Health Organization. 2017.
2. Cowman, A. F., Healer, J., Marapana, D. & Marsh, K. Malaria: Biology and Disease. *Cell* 167. köt., 610–624. old. (2016).
3. The malERA Refresh Consultative Panel on Tools for Malaria Elimination. An updated research agenda for diagnostics, drugs, vaccines, and vector control in malaria elimination and eradication. *PLOS Medicine* 14. köt., 1–35. old. (2017).
4. Newman, D. M., Heptinstall, J., Matelon, R. J., Savage, L. és tsai. A magneto-optic route toward the in vivo diagnosis of malaria: preliminary results and preclinical trial data. *Biophys. J.* 95. köt., 994–1000. old. (2008).
5. Butykai, Á. *Malária diagnózisa mágnesesen indukált lineáris dikroizmus révén.* dipl. (Budapest University of Technology és Economics, 2012).