

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Szigeti-Turáni Melinda**

**HOSSZÚTÁVÚ IN VITRO VIDEÓ MIKROSKÓPIA  
ÉS DIGITÁLIS KÉPELEMZÉS A SZEMÉSZETI  
SZÖVETREGENERÁLÓDÁS ÉS TUMORNÖVEKEDÉS  
VIZSGÁLATÁBAN**

**DEBRECENI EGYETEM**

**KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

**DEBRECEN, 2020.**

**EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**HOSSZÚTÁVÚ *IN VITRO* VIDEÓ MIKROSZKÓPIA  
ÉS DIGITÁLIS KÉPELEMZÉS A SZEMÉSZETI  
SZÖVETREGENERÁLÓDÁS ÉS TUMORNÖVEKEDÉS  
VIZSGÁLATÁBAN**

**Szigeti-Turáni Melinda**

**Témavezetők: Dr. Kemény-Beke Ádám**

**Dr. Szemán-Nagy Gábor György**



**DEBRECENI EGYETEM**

**KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2020.**

*“The point of a scientific method is that it considers the problems as problems, thus looking for a solution without prejudices and chauvinism. We do not ask who is right but what is the truth.”*

*A. Szent-Gyorgyi*

## TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	7
1. BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
1.2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	10
1.2.1 Uveális traktus, uveális melanomák	10
Uveális melanomák	11
1.2.2. Limbus és a cornea anatómiai leírása, cornea felszíni regenerációja	13
Limbus felépítő sejtek	14
1.2.3. Karcmodell a cornea felszíni sérülések reepithelizációjának celluláris dinamikai vizsgálatára	17
1.2.3.1 A regenerációt befolyásoló anyagok tesztelése a karcmodellben	17
Szemészetben alkalmazott antibiotikumok	17
Chloramphenicol	18
Rifampicin	18
Nanorészecskék biológiai alkalmazásai, sejttani hatásai	20
Szén nanocsövek és biomedikai alkalmazásuk	20
Nanoarany részecskék celluláris hatásai	23
Ezüst nanorészecskék celluláris hatásai	25
1.3.4 Vizsgálati módszerek	26
1.3.4.1 Long-term scann rendszer, képalkotó videó mikroszkópia	26
Videó mikroszkópia használata és lehetőségei	26
Videó mikroszkópia előnyei és hátrányai	26
Az eTox munkacsoport long-term scann rendszere	27
Fototoxicitás a videó mikroszkópiában	29
1.3.4.2. Kromatin kondenzálódási intermedierek vizsgálata a genotoxicitás bizonyítékaiként	30
Kromatin kondenzálódási folyamat vizsgálata	30

2. CÉLKITŰZÉSEK	33
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	34
3.1. Sejtek izolálása és tenyésztése a limbus gyűrűből	34
3.1.1. A limbális sejtek izolálása	34
3.1.2. Sejtvonalak tenyésztése:	35
3.2. A sejtenyészetek videó mikroszkópos vizsgálata a long-term scann rendszerben	36
3.2.2. Limbális regenerációs karcmodell	39
3.2.2.1 HuLi monolayer regenerációs modell gyakorlati felhasználása	39
3.3. Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok	40
3.3.1. A HuLi sejtpásztázó időbeli regenerációjának vizsgálata	40
3.3.2. Az ezüst nanorészecskék méretének meghatározása	41
3.4. Nanoszén aggregáció mérése time lapse videómikroszkópiával.	41
3.4. Kromatin szerkezetek vizsgálata	42
Sejtmagok, kromatin szerkezetek izolálása	42
3.5. A vizsgálatok során felhasznált vegyszerek és oldatok	43
3.5.1. Vegyszerek	43
3.5.2. Oldatok	45
4. EREDMÉNYEK	46
4.1. Uveális melanóma sejtek morfológiai vizsgálata long-term scann rendszerrel	46
4.1.2. Videó mikroszkópos vizsgálatok egyedi OCM-1 sejteken: multipoláris sejtosztódás	46
Kvalitatív jellemzők	46
Kvantitatív jellemzők	47
4.2. Limbális eredetű sejtek vizsgálata: felszíni corneális regeneráció modellezése limbális eredetű monolayeren	50
4.2.1. A sérült monolayer regenerációjának vizsgálata time-lapse videó mikroszkópiával	51
4.2.2. HuLi monolayer regenerációs modell gyakorlati felhasználása	53

4.2.2.1. Chloramphenicol és rifampicin hatása a HuLi monolayer regenerációjára	53
A monolayer regenerációja chloramphenicol jelenlétében	54
HuLi monolayer regenerációja 0,5 mg/ml chloramphenicollal kezelve	54
HuLi monolayer regenerációja 1,0 mg/ml chloramphenicollal kezelve	55
A monolayer regenerációja rifampicin jelenlétében	56
HuLi monolayer regenerációja 0,1 mg/ml rifampicinnel kezelve	56
HuLi monolayer regenerációja 0,2 mg/ml rifampicinnel kezelve	57
4.2.2.1. Nanorészecskék hatása a HuLi monolayer regenerációjára	59
Az ipari minőségű többfalú szén nanocsövek hatása a limbális monolayer regenerációjára	59
HuLi monolayer regenerációja 5 µg/ml MWCNT jelenlétében	59
HuLi monolayer regenerációja 50 µg/ml MWCNT jelenlétében	60
HuLi monolayer regenerációja 100 µg/ml MWCNT jelenlétében	61
HuLi monolayer regenerációja 500 µg/ml MWCNT jelenlétében	62
Arany nanorészecskék hatása a limbális monolayer regenerációjára	64
A monolayer regenerációja 80 ppm arany nanorészecske kezelést követően	64
Limbális monolayer regenerációja 200 ppm arany nanorészecske jelenlétében	65
Limbális monolayer regenerációja 320 ppm arany nanorészecske jelenlétében	66
Ezüst nanorészecskék hatása a limbális sejtenyészet monolayer regenerációjára	67
A HuLi monolayer regenerációja 140 ppm ezüst nanorészecske jelenlétében	67
HuLi monolayer regenerációja a 200 ppm ezüst nanorészecske jelenlétében	68
HuLi sejtpázsit regenerációja 320 ppm ezüst nanorészecske jelenlétében	69
4.2.3. Kromatin kondenzálódás folyamata a limbális sejteken	71
A HuLi sejtek kromatin kondenzálódás intermedierei	71
5.2.3.1. Az antibiotikumok hatására bekövetkező változások a kromatin kondenzálódásban	72
Chloramphenicol	72
Rifampicin	73

5.2.3.2. Nanorészecskék hatására bekövetkező változások a kromatin kondenzálódásban	74
A kromatin változások a többfalú szén nanocsövek hatására	74
A kromatin változások az arany nanorészecske kezelés hatására	75
A kromatin változások az ezüst nanorészecskék hatása	76
5. MEGBESZÉLÉS	78
5.1. Videómikroszkópia alkalmazhatósága	78
5.2. Uveális melanóma OCM-1 sejtek <i>in vitro</i> vizsgálata	79
5.3. Klinikailag izolált limbális sejtek <i>in vitro</i> megfigyelése	81
5.3.1. Limbális regenerációs karcmodell	81
5.3.2. HuLi monolayer regenerációs modell felhasználása	82
Szemészeti terápiában alkalmazott antibiotikumok hatás vizsgálata	82
Limbális monolayer regeneráció nanorészecskék jelenlétében	84
6. ÚJ EREDMÉNYEK	87
6.1. Távlatok	89
7. ÖSSZEFOGLALÁS	90
8. SUMMARY	91
9. IRODALOMJEGYZÉK	92
10. KULCSSZAVAK-KEY WORDS	117
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	118
12. FÜGGELÉKEK	119
ÁBRAJEGYZÉK	121

## **RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE**

**BAP1:** a BRCA1 protein-1 deubikvitináz enzimet kódoló gén

**CCD:** Charge-Coupled Device, töltés csatolt eszköz

**CCL 209:** szarvasmarha pulmonális endothel sejtek

**CDC:** US Centers for Disease Control and Prevention (USA Betegség Kontrol és Megelőzési Központok)

**CHO:** kínai hörcsög ovarium sejt

**CNT:** carbon nanotubes, szén nanocsövek

**CTAB:** cetil - trimetil - ammónium – bromid

**DAPI:** 4,6-diamidino-2-phenylindole

**DMEM:** Dulbecco által módosított Eagle tápfolyadék

**DMEM-Ham's F12:** Dulbecco által módosított Eagle tápfolyadék, és Ham-féle tápfolyadék 1:1 arányú keveréke

**ECM:** extracelluláris mátrix

**EMEM:** Eagle féle minimum esszenciális tápfolyadék

**FBS:** magzati (foetális) borjú szérum.

**HaCaT:** immortalizált humán keratinocita sejt vonal

**HeLa:** humán cervix carcinoma sejt vonal

**HOB:** humán osteoblast-szerű sejtek

**HuLi:** humán limbális sejt vonal

**IM:** indiai muntyákszarvas fibroblast sejtek

**K-562:** humán erythroleukemia sejtek

**LDH:** laktát dehidrogenáz

**LED:** Light Emitting Diode, fényt kibocsájtó dióda

**MWCNT:** multi walled carbon nanotubes, többfalú szén nanocsövek

**NIH:** National Institute of Health (USA, Nemzeti Egészségügyi Szolgálat)

**OCM-1:**

**OD:** optikai denzitás

**PBS:** foszfát-pufferes sóoldat

**PSN:** penicillin streptomycin neomycin antibiotikum oldat

**RPMI 1640:** Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 tápfolyadék

**ROS:** reaktív oxigén gyökök

**SEM:** Scanning Electron Microscopy, pásztázó elektronmikroszkópia

**SWCNT:** single walled carbon nanotubes, egyfalú szén nanocsövek

**USP:** az Egyesült Államok Gyógyszerkönyve

**UV:** ultraibolya

## 1. BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az élő rendszerek vizsgálatában általánosan elterjedt módszerek során az élettani folyamatok dinamikai vizsgálata pillanatfelvételek diszkrét adatpontjai alapján történik. Az adatfelvétel időbeli felbontásának egyik jelentős korlátozó tényezője a vizsgálat invazív jellegéből adódó műtermék képződés. A mintavételi gyakoriság növekedésével a mintavételi eljárás fokozódó mértékben torzítja a kapott eredményeket, kompromisszumokra kényszerítve a kutatót. Szűkebb időintervallumban lejátszódó sejtélettani események tanulmányozása során így a szükséges időbeli felbontás csak rövid ideig biztosítható.

A nagy időbeli felbontással rendelkező, nem invazív time-lapse videó mikroszkópos rendszer felhasználható olyan tenyésztett sejtpopulációk vizsgálatára is, melyekben egy vagy néhány sejt jelentősége növekszik meg a tenyésztési ciklus alatt. Ilyen folyamatok például a tumor képződés vizsgálata, a sebgyógyulás, és annak farmakológiai vizsgálata, illetve az *in vitro* sejtszelekció megfigyelése.

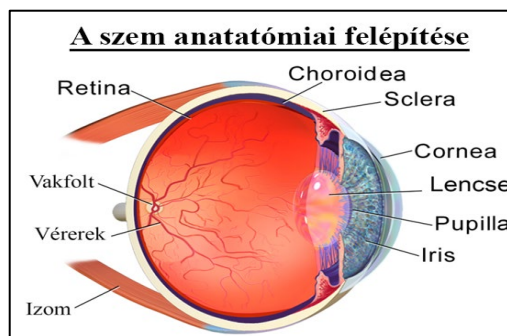
A hosszú távú videó mikroszkópos vizsgálatok segítségével az egyes sejttani folyamatok valós időben és hosszú időtartamban vizsgálhatók a művelet befejezéséig. A megfigyelés alatt álló mechanizmus a teljes időtartam alatt végig követhetővé válik és ez által összefüggéseiben lesz vizsgálható. A videó mikroszkópos rendszer által készített felvételek feldolgozása során, az egyes vizsgálatokra specifikusan adaptált dinamikus képanalízist alkalmazva, a vizsgálat és a módszer egyre pontosabban modellezhetővé válik.

A képanalízis során kvantitatív és kvalitatív szempontok szerint is tanulmányozhatjuk a vizsgálandó folyamatot. A videó mikroszkópia egy olyan, hosszú távon is alkalmazható monitoring-rendszer, melyben a célszerűen kiválasztott digitális képelemzési algoritmusokkal és adatfeldolgozással egy kombinált kísérleti elrendezéshez jutunk. Ennek fő előnye, hogy a kapott adatok, változások időbeli lefutása dinamikusan vizsgálhatóvá, illetve modellezhetővé válik, így hívebben tükrözi az *in vivo* végbemenő folyamatokat.

## 1.2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 1.2.1 Uveális traktus, uveális melanomák

Az uveális traktus kifejezés, röviden uvea a szemgolyó külső, rostos burka, valamint az ideghártya között található tunica vasculosa bulbi másik elnevezése. Dús érhálózattal rendelkező, sűrűn pigmentált rétege a bulbusnak (Barsky 1990). Az uvea magában foglalja az irist, a corpus ciliarist (sugártest) és a chorioideát (érhártyát) (1. ábra).



1. ábra: A szem anatómiája (<https://en.wikipedia.org/wiki/Choroid>)

Az iris vagy szivárványhártya az uveális traktus elülső része, erősen pigmentált gyűrű, melynek középső nyílása a pupilla. Az iris funkciója a szemlencsébe belépő fény diafragmaként történő szabályozása, ami a paraszimpatikus beidegzésű pupillaszűkítő izom (*musculus sphincter pupillae*) és a szimpatikus beidegzésű pupillatágító izom (*musculus dilatator pupillae*) működésével valósul meg.

A corpus ciliarea körkörös elhelyezkedésű ciliáris izmot foglalja magában, mely a lencsefüggesztő rostokon keresztül a szemlencse fénytörő képességét szabályozza. A sugártest a supraciliáris réteggel kapcsolódik a sclerához. Alapját a radialis, hosszanti és körkörös lefutású simaizom sejtek adják.

Az érhártya vagy *choroidea* az *ora serrata* és a *nervus opticus* között húzódik, a retina és a sclera között. Vékony, szivacsos, erősen erezett réteg, elsődleges funkciója a retina sejteinek táplálása, de az erek feszülése révén szerepe van a szem belső nyomásának szabályozásában és hőelvezetőként védi a receptor sejteket.

### *Uveális melanómák*

A leggyakoribb malignus intraocularis daganat. A National Cancer Institute adatai alapján az előfordulási gyakorisága 3-4 új eset/millió fő az Egyesült Államokban. Az intézet Felügyeleti, Epidemiológiai és Végeredményei, SEER program (Surveillance Epidemiology and End Results) adatbázisa alapján 1973 és 2013 között az incidencia (átlagosan 5,2/millió fő) nem mutatott szignifikáns változást (Aronow et al., 2018). A melanóma a nőknél ritkábban jelentkezik, férfiaknál 1,29%-kal gyakoribb (Jovanovic et al., 2013), illetve idősebb korban (70 év körül) a legelterjedtebb. Az ocularis melanómák 85%-a uveális eredetű. Elhelyezkedésük szerint lehetnek anterior (iris, sugártest), vagy gyakoribb esetben (80-90%-ban) posterior (choroidea) lokalizációjúak (Zografos 2005).

A primer tumor viszonylag egyszerűen kezelhető, a kezelések kis részénél mutatható ki áttét, azonban a betegek 50%-ánál később metasztázisok jelennek (Yang et al 2018) meg. Az uveális melanómák áttétképzése általában nem érinti a nyirokrendszert és a helyi nyirokcsomókat. Az elsődleges áttét a vérkeringési rendszeren keresztül (McLean 1993, Folberg 1993). leggyakrabban a májban alakul ki (Bedikian et al., 1995). A hosszú távú túlélési arány 5-10 év, már kialakult máj áttét jelenlétében 4-6 hónap. A máj metasztázis esetén kisebb a túlélési esély, mint a test más szervében kialakult áttét esetében (Bakalian et al., 2008). Ennek az oka az erős metastatisáló képességű epitheliális illetve kevert sejttípusú tumorok sejteinek kromoszóma rendellenességével magyarázható. Az uveális melanóma citologiai tekintetben heterogén megjelenést mutat. A Callender-féle beosztás (1931) hatféle sejttípust különböztetett meg: 1) orsószzerű naevus, 2) orsósejtes A (kismagvú sejtek); 3) orsósejtes B (nagyobb magvú sejtek); 4) nagy magvú B típusú orsósejtes, 5) kis epitheloid és 6) nagy epitheloid típusú sejtes (McLean et al., 1982). Napjainkban a citologiai osztályozás már egyszerűsödött, orsósejtes A, B, epitheloid sejtes és kevert sejtes melanómákat különítünk el (Albert et al., 1984, Kivelä 2009). Az epitheloid sejtes típusnál a daganatok jelentős százalékában a 3. kromoszóma monoszómiája (Scholes et al 2003, Shields et al., 2007, Young et al., 2008); illetve a 3., és ritkábban a 9., 13. és 17. kromoszómánál a heterozigótaság elvesztése (LOH loss of heterozygosity) is megfigyelhető, de ez utóbbi leginkább az epitheloid és kevert sejtes daganatokra jellemző (Scholes et al 2001). A legtöbb uveális melanóma általában diploid (~2N), azonban az esetek 11,4% -ánál poliploid (>2N) karyotypust figyeltek, ami együtt járt a nagyobb tumor mérettel és gyakran a 3. kromoszóma heterozigótaságának elvesztésével.

A legjelentősebb független faktor a poliploid uveális melanóma prognózisban a BAP1

expresszió hiánya, ami 16x-os kockázatot jelent (Yavuzigitoglu et al., 2016). A BAP1 a BRCA1 protein-1 deubikvitináz enzimet kódoló gén, mutációja a csírvonalban (a későbbiekben cutan és uveális melanóma) zajlik; mesothelioma illetve egyéb malignus elváltozások kialakulását okozhatja (Carbone et al., 2013).

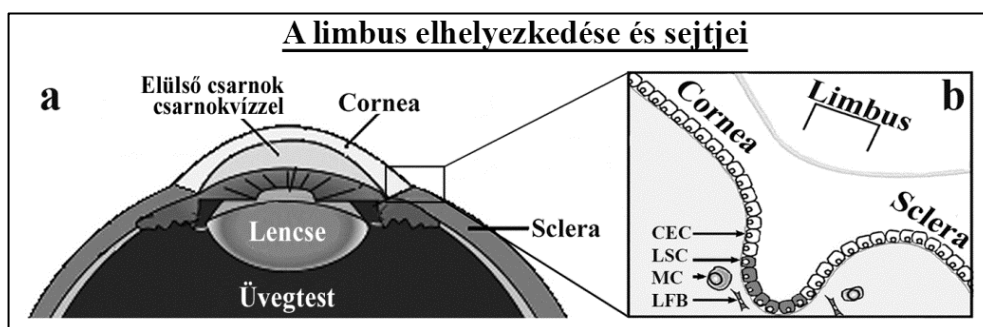
Az uveális melanómák áttétképzése erősen függ a tumorsejtek vaszkularizációt utánzó hajlamától, ami a daganaton belüli érszerű csatornák létrehozásának képessége, a vaszkuláris mimikri (Folberg et al 2000), mely során a melanóma sejtek fenotípusosan az endothel sejtekhez válnak hasonlónak (Hendrix et al., 2003, Onken et al., 2006, Bakalian et al., 2008), és capillariskra emlékeztető csatornákat hoznak létre. Az uveális melanóma daganatok prognózisában fontos szerepe van citológiai típusokon túl a daganat mikroerezettségének és a fibrovasculáris csatornák által kialakított formációknak, a Folberg-féle érrajzolatoknak (Foss et al., 1996).

OCM-1 (humán choroidea melanóma-1 sejtvonala) sejtek aneuploid, közel tetraploid sejtvonalként írták le (Kemeny-Beke et al., 2006), és ezt a 6. kromoszóma hiányával hozták összefüggésbe (Luyten et al., 1996). Az OCM-1 sejtvonalat egy uveális melanómával diagnosztizált női páciens choroidea melanóma daganatából hozták létre 1985-ben. Az OCM-1 sejtek morfológiájukat tekintve a Callender-féle besorolás szerint dominánsan az orsósejtes B, és kis részben epitheliális típusnak feleltethetők meg (Kan-Mitchell et al., 1989). Ez a sejtípus a gyenge invazív képessége miatt kevésbé tekintendő agresszívnek (Hendrix et al., 1998; Maniotis et al., 1999; Hendrix et al., 2001), amit bizonyít, hogy *in vitro* körülmények között vizsgálva a 3D kultúrákban nem alakult ki a sejtek közötti, a sejtek által kialakított, perjódsva-Schiff (PAS) festéssel detektálható perfúziós hálózati rendszer (Maniotis et al., 1999).

### 1.2.2. Limbus és a cornea anatómiai leírása, cornea felszíni regenerációja

A szemünk elülső átlátszó része a szaruhártya, a cornea. Felépítését tekintve hat réteget különíthetünk el. Elülső a hámréteg (*epithelium anterius corneae*), az epithel sejtek rétege, amit 2-7 el nem szarusodó laphám sejtsor alkot. A cornea külső sejtrétegeinek folytonos nedvesen tartásáról, felszínének védelméről a könny termelése és a pislogás gondoskodik. Az epithel sejtrétegek alatt helyezkedik el a Bowman-hártya (*lamina limitans anterior*) sejtmentes rétege, az epithel-réteg bazális membránja, melyben szaruhártya idegei haladnak. Ez alatt helyezkedik el a cornea legvastagabb része a stroma (*substantia propria corneae*), ami a szaruhártya vastagságának 90%-át alkotja. A stroma és a Descemet membrán (*lamina limitans posterior*) között helyezkedik el a 15  $\mu\text{m}$  vastagságú Dua-réteg (Dua et al., 2013) vagy pre-Descemet réteg (McKee et al., 2014). A legbelső réteg, a corneális endothel (*endothelium camerae anterioris*) egyrétegű, hexagonális laphámrétegből áll.

A limbus az átlátszó cornea és az átlátszatlan ínhártya között elhelyezkedő, átmeneti szöveti zóna (2. ábra). Funkciói: táplálja és fenntartja a perifériális cornea képződését, szerepe van a csarnokvíz elfolyásában, illetve ezen a területen keresztül történnek a sebészeti bemetszések az elülső csarnok beavatkozásai során, pl.: *cataracta* (szürke hályog) és glaucoma-ellenes műtétek esetén (Ahmad et al., 2012). A limbusból alakul ki a corneális- és a conjunctivális hám. Ezen hámok megkülönböztetésére szolgáló technikák alapján elmondható, hogy ezt a régiót multipotens corneális limbális sejtek alkotják. A limbális zóna a perifériális kiterjedésű Descemet-membrán és a corneális endothelium kapcsolódásánál kezdődik. A trabeculáris hálózat elülső kiterjedése - ugyanúgy, mint a Schwalbe-vonal -, gonioszkóppal (speciális dőlésszögű lencse) azonosítható és jól vizsgálható (Van Buskirk et al., 1989) (2. ábra).



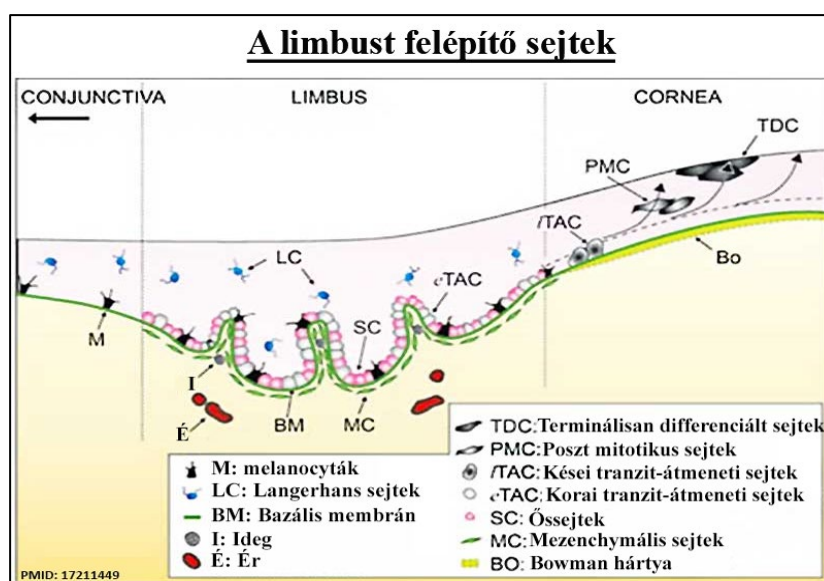
2. ábra: A limbus elhelyezkedése a szemben (Secker and Daniels, 2015).

a) A limbus lokalizációja a környező szövetekhez viszonyítva. b) A limbus kinagyítva. CEC = corneális epithel sejt, LSC = limbális őssejt, MC= melanocyt, LFB = limbális fibroblast.

### ***Limbust felépítő sejtek***

A limbális régió a szövettani felépítését tekintve nem sejtgazdag, a felépítésében inkább a kollagénes kötőszöveti szerkezet dominál. A limbus érrendszere táplálja a perifériális corneát, a sclerát, az episclerális területet és a perifériális uveát. Az artériás utánpótlás az elülső ciliáris artériából vezethető le (Mitchell et al., 1989). A limbusnak két fontos feladata van a corneális epithel egészséges működésének biztosításában. Az első a corneális epithel őssejt limbusban tartózkodásának biztosítása. A második, hogy a limbus barrierként választja el az átlátszó avasculáris corneális epithelt az azt körülvevő erezett kötőszövetes ínhártyától (Osei-Bempong et al., 2013). Ha ezek a funkciók nem teljesülnek, az látásromlással járó limbális őssejt elégtelenséget okozhat. Ez az állapot magában hordozza a corneális epithel regenerációs zavarának lehetőségét, mivel a limbális őssejt nem képesek pótolni a cornea felszín epithel sejtjeinek hiányát (Ahmad et.al., 2012).

A limbus leginkább sejtgazdag régiói a conjunctiva és a corneális epithelium határán, a trabeculáris hálózatonál, a limbus conjunctivális részénél találhatók (3. ábra). A limbális multipotens őssejt niche-k a Vogt-palisádok barázdáiban helyezkednek el. Ez a terület a melanocyták jelenléte miatt erősen pigmentált; illetve antigén termelő Langerhans-sejtek és T-lymphocyták infiltrálják. A corneától eltérően a bazális membrán itt hullámzó lefutású, és a limbális stroma kitüremkedései miatt szemölcsös megjelenésű, fenestrált szerkezetű. A felsorolt anatómiai sajátosságok alapján feltételezhető, hogy a limbális őssejt szoros kapcsolatban állnak az erősen erezett limbális alapállománnyal (Li et al., 2007).



3. ábra: A limbus sejtjei (Li et al., 2007)

A corneális epithelium őssejtpopulációja a limbális zónában a cornea és a conjunctiva közötti gyűrűben helyezkedik el (Secker, Daniels 2015). A limbális őssejtek nagy coloniáiban találhatóak a felnőtt szövet legkisebb méretű sejtjei, melyek a bazális régióban helyezkednek el (Romano et al., 2003). Sérüléskor, - de az öregedés során is -, a limbus aljáról felfelé mozgó sejtek jól láthatóvá válnak és a limbus felszínét hullámossá teszik. A bazális membrán hullámzó mozgása bizonyítja, hogy léteznek mélyebb epitheliális benövések is a limbális stromában, melyeket limbális epitheliális kriptáknak nevezünk (Ahmad et.al., 2012).

A bazális rétegben ülő limbális őssejtek szoros kapcsolatot tartanak fenn más sejtekkel is: A limbális stromális fibroblast sejtek módosítják az őssejtek viselkedését a felszín felé történő migrációban és a mikro környezet kialakításában is szerephez jutnak (Ahmad et al 2012). A limbusban megtalálható sejtek közé tartoznak a már említett melanocyták is. A szerepük a melaninszemcsék termelése, melyek az epithelium mikroredőiben találhatóak (Higa et al., 2005).

### **Cornea felszíni sérüléseinek reepithelizációja**

A corneális epithelium regenerációjában kulcsfontosságú szerepe van a limbális epitheliális őssejteknek: proliferációjuk és migrációjuk során végbemenő differenciációjuk révén pótolják a cornea felszínén bekövetkező hámszövet hiányt.

A limbális őssejtek a felnőtt szomatikus őssejtekhez hasonló sajátosságokkal rendelkeznek, kisméretűek és magas a sejtmag/citoplazma arányuk. Ezeknek a sejteknek ugyan lassú a sejtciklusuk, de a felszíni corneális hámszövet hiány esetén gyors proliferációra képesek. Megújulásuk során képesek sejtjeik anyagát utódsejtjeikben egyenlőtlen arányban elosztani. Az egyenlőtlen osztódás szolgálhatja mind az őssejt állapot aktiválását, mind annak gyengítését. A limbális sejtek aszimmetrikus DNS szegregációjuk során megtartják eredeti genetikai tulajdonságaikat (Cotsarelis et al.,1989, Potten, Lajtha 1989, Daniels et al., 2001). A corneális epithelium sejtjei a limbus működésekor az epitheliális őssejtek kiegészítő, átmeneti növekedésével és migrációjával, differenciációjával alakulnak ki (Tseng 1989, Kinoshita et al., 1981, Sun et al., 2010). A gyógyulási folyamat során a sejtek a corneosclerális régió területén, centripetális útvonalon, hullámszerűen mozognak a megmaradt intakt corneális epithelium felől a (Dua, Forrester 1990; Dua, Azura-Blanco 2000). Az epithel sejtek migrációját az X Y Z hipotézissel jellemezhetjük, ahol a hámszövet hiány a Z, ami egyenlő a proliferáló bazális epithel sejtek X, és a centripetálisan migráló sejtek Y összegével (Thoft et al., 1983).

A limbális sejtek izolálásában a transzplantált cornea életképességének elősegítése azonban a donor cornea korlátozott megújulási képessége miatt nagy kihívást jelent (Majo et al., 2008, Albert et al., 2012), továbbá fontos szerepe van a sejtek kolónia-formáló potenciáljának kialakításában. A limbális sejtek kolónia-formáló képességét fokozza a szérum hozzáadása (Kruse és Tseng 1993); viszont emellett növelheti az állati eredetű vírusok átvitelének veszélyét, továbbá antigén anyagok sejtmembránba történő beépülését is a sejttenyésztés során. (Baylis et al., 2011; Shortt et al., 2007). Ezek a veszélyek azonban kiküszöbölhetők az állati összetevőktől mentes tenyésztőközeg használatával (Albert et al., 2012). A szaruhártya gyógyulási folyamata során a beültetett szövet vagy a limbus sejtek kilökődési veszélye miatt ügyelni kell a fertőzési veszély kockázatának csökkentésére. Ez normál esetben saját szérum használatát, profilaktikus helyi antibiotikum, steroid vagy nem steroid szemcsepp alkalmazását (Dua et al., 2010), orális steroid, és cyclosporin alkalmazását jelenti az áthatoló keratoplasztika után. (Frucht-Pery, 1998). A corneális sérülések helyreállítására a humán amnionmembrán megfelelő közegnek bizonyult a limbális őssejtek *in vitro* felszaporításhoz a limbális epithel sejtek analóg transzplantációja előtt (Tsai et al. 2000). Alternatív kezelésként a limbális őssejt terápia a hosszú távú cornea regeneráció hasznos módszerének bizonyult a corneális sérülések kezelésében (Rama et al., 2010).

### **1.2.3. Karcmodell a cornea felszíni sérülések reepithelizációjának celluláris dinamikai vizsgálatára**

A modell előzménye a HaCaT (humán keratinocyta sejtvonal) migrációs modell létrehozása volt (Ruzsavanszky et al., 2013). A cornea felszíni sérüléseinek regenerációját, vagyis a reepithelizáció folyamatát a migrációs modell célszerű adaptálásával vizsgáltuk. A vizsgálat során a monolayer-regenerációját erre a célra optimalizált videó mikroszkópiával követtük nyomon. Limbális eredetű sejteken létrehozott karcmodellt fejlesztettünk ki, melyet a corneális regenerálódás folyamatának tanulmányozására használtunk.

#### ***Szaruhártya felszíni regenerációjának modellezése a limbális karcmodell segítségével***

Az *in vitro* karcmodell egyszerű, gyors, olcsó és jól használható a sejtmigráció mérésére, segítségével kvantifikálható többek között a migrációs ráta is. Más tanulmányokkal összehasonlítva a konfluens sejttenyészetek *in vitro* karcmodellje alkalmas a sejt-mátrix, a sejt-sejt interakciók és a sejtmigráció tanulmányozására az *in vitro* sebgyógyulás vizsgálatára. Ezeket a folyamatokat az élő sejtekről készített képek segítségével értékelhetjük ki (Liang et al., 2007). Saját vizsgálataink során Liang és mtsai. modelljét vettük kiindulási alapul, melyet a kísérleti céljainkhoz igazítva alkalmaztuk.

#### ***1.2.3.1 A regenerációt befolyásoló anyagok tesztelése a karcmodellben***

##### ***Szemészetben alkalmazott antibiotikumok***

A cornea regenerálódási folyamata a sérülés okától és mértékétől függően akár két-három hónapos időtartamú is lehet. Ebben az időszakban kiemelkedő fontosságú a bakteriális fertőzések megakadályozása széles spektrumú antimikrobás terápiás kezeléssel, vállalva a gyógyulási folyamat időtartamának hosszabbodását és az egyéb mellékhatások kialakulásának kockázatát.

A helyi antibiotikum terápia *in vivo* sikeressége attól is függ, hogy annak protektív hatása mellett a hámsejtek növekedésének folyamatossága is fenntartható maradjon (Wingard et al., 2011). A helyileg alkalmazott antibiotikumok jótékony hatásuk mellett káros, a proliferációt gátló, akár pusztító hatást is kifejtenek a sejtekre. Helyileg, magas dózisban alkalmazva, pl.: a mitomycin-C viszonylag sokszor őssejt deficienciát okozott (Lichtinger et al., 2010). Klinikai alkalmazásban a chloramphenicol és a gentamicin gyakran használt széles spektrumú antibiotikumok.

### *Chloramphenicol*

A chloramphenicol, a *Streptomyces venezualae* filtráltomból 1947-ben izolált viszonylag egyszerű szerkezetű vegyület az egyik elsőként felfedezett széles spektrumú antibiotikum (Martindale, 1989). A chloramphenicol a prokaryota szervezetek növekedését gátló toxikus anyag. A chloramphenicol egyrészt bakteriosztatikus hatású a Gram-negatív *Enterobacteriaceae* és a Gram-pozitív *Staphylococcaceae* családra nézve. Klinikai használatát a *Haemophilus influenzae*, a *Streptococcus pneumoniae* és a *Neisseria meningitidis* fajokkal szemben mutatott baktericid hatásának is köszönheti, illetve fontos szerepe van a bakteriális meningitis gyógyításában is (Rahal, Simberkoff 1979). A chloramphenicol gátolja a Gram-negatív *Alcaligenes eutrophus* növekedését - melyet napjainkban *Ralstonia metalliduransként* ismerünk. Hatását a prokaryota fehérjeszintézis és a peptidil-transzferáz aktivitásának blokkolásával feje ki, amely függ az expozíciós időtől (Edwards et al., 1983).

Széles körben alkalmazott antibiotikumként, számos tanulmány született a chloramphenicol humán sejtekre gyakorolt hatásáról. K-562 humán erythroleukemia sejtek esetében a mitokondrium funkcióvesztését okozta és jelentősen csökkentette a citokróm-c oxidáz aktivitást, az ATP szintézist és a ferritin szintézist, ezzel megakadályozva a sejtek osztódását. Sejtciklus analízis során kimutatták azt is, hogy a chloramphenicol hatására a sejtek mennyisége nőtt a G1 fázisban és csökkent az S fázisban (Leiter et al., 1999). A chloramphenicol jelenlétében a kolónia-formáló csontvelői sejtcsoportok számukban és méretükben redukálódtak, viszont ez a hatás reverzibilisnek bizonyult (Ratzen et al., 1974). A chloramphenicol *in vitro* szignifikánsan gátolta a humán keratinocyták proliferációját, ami nem járt együtt fokozott LDH (laktát-dehidrogenáz) felszabadulással, vagyis a sejtmembrán integritásra nem volt hatással a kezelés, és nem járt a sejt nekrotikus elhalásával. A megnövelt expozíció magas kaspáz aktivitást és nagyszámú apoptózist eredményezett. A vizsgálat rámutatott arra, hogy az antibiotikum fehérjeszintézis gátló hatása nemcsak a kórokozó mikrobákra, hanem az eukaryota sejtekre is érvényes (Popadic et al., 2006).

### *Rifampicin*

A rifampicin az *Amycolatopsis rifamycinica*ból nyert, félszintetikus antibiotikum. Hivatalos neve a VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben *Rifampicinum*. Vörösesbarna, kristályos szerkezetű anyag, vízben kevésbé, metanolban jól oldódik. A rifampicin általános szerkezetét tekintve heterociklusos vegyület, egy nafto-hidrokinon magból áll, amelyet alifás ansa lánc fed le (Tomiya et al., 1996). A rifampicin baktericid hatása a DNS-függő RNS polimerázok

blokkolásával történő RNS-polimerizálás gátlásán alapszik, a transzkripció inicializálásnak megakadályozásán keresztül (Wehrli et al., 1968, Di Mauro et al., 1969). A rifampicin *Thermus aquaticus*-on kifejtett hatásmechanizmusa: blokkolja a bakteriális RNS polimeráz  $\beta$  algységét, amivel közvetlenül gátolja az RNS elongáció folyamatát a transzkripció 2-3 nukleotid hosszúságánál (Campbell et al., 2001).

A humán alkalmazásban antituberculoticumként használják. A *Mycobacterium tuberculosis* kezelésére szolgáló antibiotikumok hatását *in vitro* vizsgálták. Ezek az ofloxacin (fluorokinolon), antibiotikumok sulbactammal ( $\beta$ -lactamase inhibitor) kombinálhatók, pl. ampicillin/sulbactam, de önmagukban vagy rifampicinnel és isoniaziddal is adhatók. A mikroba különböző növekedési fázisaiban, a betegség korai szakaszában az ofloxacin és a sulbactam-ampicillin bizonyult a leghatékonyabbnak, későbbi fázisokban azonban a rifampicin magában, illetve az isoniaziddal kombinálva már kisebb dózisban effektívebbnek bizonyult (Herbert et al., 1996). A tüdő tuberculosis azon eseteiben, mikor a köpet kenetéből kimutatható a kórokozó, a rifampicin korai baktericid aktivitása az első két napban lineáris növekedést mutatott, közel megduplázódott a standard dózis használata mellett. A kezelés időtartamának lerövidítéséhez a rifampicin magasabb dózisban történő alkalmazhatóságára további vizsgálatok szükségesek (Diacon et al., 2007).

A rifampicin hasznosnak bizonyult továbbá a csontgyógyulásnál, mivel gátolta a bakteriális fertőzést; de bizonyos szisztémásan elérhető koncentrációnál a sejt differenciálódásra káros lehet, mivel *in vitro* gátolta a HOB (humán osteoblast szerű) sejtek (Isefultu et al., 2001) és a csontvelői mezechymális őssejtek (Zhang et al., 2014) proliferációját. A tumorok már kis koncentrációban is érzékenyebbek voltak a rifampicin jelenlétére. Eltérő szövetekből származó normál és a tumoros sejtvonalaknál időfüggő kumulatív expozíciót, és tumor sejtek esetében a korlátozott expozíció mellett is megállapítható érzékenységet mutattak ki. Ezeken felül megfigyelték, hogy a toxicitást befolyásolja a sejtciklus, az érzékenységet pedig a mitotikus szakasz (Winters et al., 1974). Tüdő epithel sejtek (A459) esetében a rifampicin jelenléte csökkentette az oxidatív stresszt és a proinflammációs citokinek kibocsátását az összegyógyszer rezisztencia miatt kialakuló károsodás során (Smani et al., 2011). Az egészséges máj epithel sejtekben vizsgálva azonban azt tapasztalták, hogy megemeli az interleukin-8 és a gamma interferon által indukált protein-10 termelését, ami a rifampicin gyulladást keltő hatását igazolta (Yuhas et al., 2011).

Kimondottan hiperendémiás, a *Chlamydia trachomatis* baktérium által okozott trachoma kezelésére hathetes 1%-os rifampicin hatóanyagú szemkenőcsös terápiát alkalmaztak sikeresen (Dawson et al., 1975).

### ***Nanorészecskék biológiai alkalmazásai, sejttani hatásai***

A különböző típusú nanorészecskék gyártása a 1990-es évek elején kezdődött, napjainkban pedig egyre nagyobb mérteteket ölt (Alivisatos 1996; Tervonen et al., 2009). Az UNESCO Science Report: towards 2030. (UNESCO SCIENCE REPORT: Towards 2030, Edition: paper and electronic, Publisher: UNESCO Publishing) szerint a nanorészecskék növekvő részét képezik a mindennapi életünknek, ezáltal a nanorészecskékkel kapcsolatos vizsgálatok napjainkban az egyik legdinamikusabban fejlődő kutatási területet képezik.

A nanorészecskék biomedikai kutatásokban való népszerűségüket az ultra-kis méretüknek, extrém nagy felszín és térfogat arányuknak, hangolható optikai emissziójuknak, sokrétű mechanikai tulajdonságaiknak, szupermágneses viselkedésüknek, biokompatibilitásuknak és viszonylag egyszerű szintetizálhatóságuknak köszönhetik (Das et al 2013). Az orvosbiológiai felhasználásban rejlő potenciál ellenére kevés adat áll rendelkezésre a különböző nanorészecskék alkalmazásának rövid- és hosszútávú hatásairól. A nanopartikulumok méretükből adódóan a szervezetbe kerülve sejt szinten végbemenő, az egész szervezetre kiható változások okozói lehetnek. A nanorészecskék vizsgálati stratégiájában javasolt fő szempontjai azok, hogy fizikai-kémiai, az *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokban citotoxicitást ne okozzanak (Oberdörster et al. 2005). Ezek a stratégiák megegyeznek a nanorészecskék nagy változatosságából adódó kutatási feladatokkal. A különböző méretük, alakjuk, felszíni módosításaik és felszín terület/egységnyi tömeg arányuk melyek mind befolyásolják a toxicitást. Ezen változók nagy száma ösztönözte az ötletet, ami a költséges és időigényes állatkísérletek toxikológiai vizsgálatairól egyre inkább az *in vitro* tesztelés irányába tereli a hangsúlyt (Donaldson et al. 2009). Az *in vitro* toxikológiai tesztek során megbízható kiindulási pontnak bizonyult a nanorészecskék által kiváltott, oxidatív stressz indukálta reaktív oxigéngyökök mérése (Nel et al. 2006).

### ***Szén nanocsövek és biomedikai alkalmazásuk***

A szén nanocső (CNT) a szén speciális formája, melyben a szénatomok kémiai kötéseik révén csőszerű struktúrát formálnak. Két csoportját különböztethetjük meg: az egyfalú (SWCNT) és a koncentrikusan elhelyezkedő rétegekből felépülő, többfalú (MWCNT) nanoszén csöveket.

Hosszúságuk széles skálán mozog: általánosságban több tíz mikron, az egyfalúak 0,7 és 3, a többfalúak 10 és 200  $\mu\text{m}$  közötti hosszúságúak (Tejral et al., 2009).

A speciális tulajdonságuk tehetik a szén nanocsöveket a modern gyógyászat hatékony eszközévé, így felhasználhatóságukat széles körben vizsgálják (Dey, Das 2013; Eatemadi et al 2014). A felhasználási lehetőségek kutatása mellett számos csoport azzal foglalkozik, hogy meghatározzák a szén nanocsövek (cito-) toxikus hatását kiváltó tényezőket *in vivo* és *in vitro* körülmények között (Jaurand et al., 2009; Madani et al. 2013). Az összehasonlítható, reprodukálható és pontos eredmények elérése érdekében szabványok és megbízható kimutatási módszerek kidolgozása szükséges. (Liu Y, et al. 2012; Madani et al. 2013).

A szén nanocsövek hosszúság/szélesség arányú (High Aspect Ratio Nanomaterials, HARN) részecskék. Egyes tulajdonságaik teljesítik a WHO szálas anyagokra vonatkozó definícióját, ezáltal feltételezhető, patogénitásuk az ún. szál paradigmát követheti (Donaldson et al. 2006), ami szerint ezen anyagok toxikussága összefügg a hosszukkal, a bio-perzisztenciájukkal és a dózissal (Donaldson et al., 2010). A szén nanocsövek toxicitása tehát hasonló pl.: azbesztéhez (Service 1998): genotoxikus (Lam et al., 2006; Di Giorgio et al. 2011) és karcinogén (Zhu et al., 2007) ezáltal tumor és mesothelioma indukáló tulajdonsággal rendelkeznek (Tejral et al., 2009; Donaldson et al. 2010 Fukushima et al., 2017). Ezen felül hossz-függő patológiás hatásúak (Poland et al., 2008), a macrophagok „frusztrált” fagocitózis jelenségét váltják ki (Madani et al., 2013).

A karbon nanocsövek előállításánál fémzennyezők maradhatnak vissza. A nanocsövek fém szennyezettsége és biológiai hatásuk -toxicitásuk- között nem találtak összefüggést (Pulskamp et al., 2007; Kagan et al., 2006; Wörle-Knirsch et al., 2006 Simon-Deckers et al., 2008). A tiszta szén nanocsövek káros hatásokról viszont több szerző is beszámolt (Tamura et al., 2004; Monteiro-Riviere et al., 2005). A szintézissel létrehozott szén nanocsövek kémiaiilag inertek a biológiai jelentőségük is csekély, tisztításuk során, és oldhatóságuk növelése érdekében oxidálják, funkcionalizálják, ami az eredetitől magasabb toxicitásukat eredményezte (Magrez et al., 2006). A CNT-k sejtekbe történő internalizációjának széleskörűen elfogadott mechanizmusai: endo/fagocitózis (Kam et al., 2004; Kam, Dai 2005; Firme, Bandaru 2010), illetve a passzív nanopenetráció (Kostarelos et al. 2007) további lehetőségek pl.: a fagocitózis, macro-pinocitózis, clathrin-mediált endocitózis, stb. (Yu et al., 2008). Az intracelluláris felvételük és a subcelluláris lokációjuk függ a fizikai méretüktől. A többfalú nanocsövek, melyek hossza 0,5-2  $\mu\text{m}$ , átmérője 10-30 nm felett van, már nem

jutnak be a sejtbe. Az egyfalú szén nanocsövek közül a 100-200 nm hosszúak és 1-3 nm átmérőjűek internalizálódnak a citoplazmába; az ettől rövidebbek: 50-100 nm, egy része bejuthat a sejtmagba is (Kang et al., 2010a; Mu et al., 2009). A már sejtben lévő nanokarboncsövek a citoplazmában egyesével vagy aggregálódva endoszóma szerű vezikulumokban (Simon-Deckers et al., 2008, Guo et al., 2011) a perinukleáris térbe transzportálódnak (Kostarelos et al., 2007). A mag körül akkumulálódva (Monteiro-Riviere et al., 2005; Di Giorgio et al. 2011; Lamprecht et al., 2012) helyezkednek el, és morfológiai változásokat is okozhatnak (Simon-Deckers et al., 2008; Guo et al., 2011).

Az egy- és a többfalú tisztított karboncsövek esetében egyaránt citotoxikus, apoptózist és nekrozist indukáló hatásokat tapasztaltak (Manna et al., 2005; Bottini et al., 2006). Emellett az egyfalú formák erősebb (Jia et al., 2005), a többfalú formák gyengébb (Magrez et al., 2006; Tian et al., 2006) toxicitását mutatták ki (Khaliullin et al., 2015; Cveticanin et al., 2010; Tian et al. 2006). A különféle szerkezetű szén nanocsövek pathológiás hatásait tekintve megjegyzendő, hogy nemcsak a koncentráció (Bottini et al., 2006) és az expozíciós idő (Prylutska, et al., 2008), hanem több faktor együttesen befolyásolja az *in vitro* toxicitást. Ilyen faktorok: a felszín struktúrája (Tian et al., 2006), geometriája (Jia et al., 2005); a hosszúság (Liu D et al., 2012), a merevség (Francis, Devasena, 2018), a funkcionizáltság (Sayes et al., 2006), és aggregáció foka (Wick et al., 2007), illetve a sejt fajtája (Liu Y, et al. 2012). Továbbá feltételezhető, hogy a kisebb átmérő és a nagyobb hossz a nanocső erősebb toxicitásával függ össze (Hillegass et al., 2010). Különböző kísérletek eredményei alapján apoptózis (Shvedova et al., 2004, Srivastava et al. 2010) lehetséges fő oka a lizoszómás károsodás (Andón, Fadeel 2012) más csoportok a mitokondriális károsodást jelölik meg (Wang et al., 2012; Wang et al., 2011; Ravichandran et al., 2009), ami ugyancsak a lizoszóma károsodásához is vezet (Madani et al., 2013). Összefoglalva a különböző egy és többfalú szén nanocsövek citotoxicitási mechanizmusait és vizsgálatait (Francis, Devasena 2018): az expozíció oxidatív stresszt (Shvedova et al., 2004, Porter et al., 2007), okozott, az intracelluláris reaktív oxigénradikálok (ROS) szintjének növekedése (Poland et al, 2008; Pacurari et al., 2008) mitokondriális membránpotenciál csökkenést (Pantarotto et al., 2004; Pulskamp et al., 2007 Simon-Deckers et al., 2008), ami esetenként immunközvetített indirekt citotoxicitást (Li et al 2005, Monteiro et al., 2005b; Monteiro-Riviere, Inman, 2006; Yang et al., 2009), és a proinflammációs citokinek termelődését stimulálta (Shvedova et al., 2005, Muller et al. 2005; Hirano et al. 2008; Sun et al., 2011). További vizsgálatokban DNS-károsodást (Kisin et al., 2007; Pacurari et al. 2008), és nekrozist (Guo et al., 2011 Pulskamp et

al., 2007) váltott ki gyulladásszerű válaszreakció okozása nélkül. Más esetben a toxikicitást a hidroxil szabad gyökök jelenléte (Shvedova et al., 2004) és az antioxidánsok kimerülése jelezte a sejtekben (Shvedova et al., 2005). A nanocsövek ultrastrukturális károkat is indukáltak a membránon való bejutáskor (Pantarotto et al., 2004; Simon-Deckers et al., 2008), melyek morfológiai változásokat, integritás csökkenést is okoztak (Shvedova et al., 2004); illetve ezen felül a sejtmaghártyához asszociáltak (Di Giorgio et al. 2011) felsértve, átlukasztva azt (Monteiro-Riviere et al., 2005). Jelenlétük gátolta a sejtproliferációt és az adherencia csökkentését (Cui et al. 2005; Jia et al 2005) okozta. A citoskeletont károsítva, a motilitási sebesség csökkentését (Garcia-Hevia et al., 2015), az adhéziót megnövelve (Septiadi et al., 2018) is antimigrációs hatást váltott ki.

#### *Nanoarany részecskék celluláris hatásai*

Az arany nanorészecskék biológiai-orvosi célú felhasználása sokoldalú. A fizikai tulajdonságaik alapján a képalkotásban (Stone et al., 2007), fototermális terápiában (von Maltzahn et al., 2009), kémiai detektálásra (Anker et al., 2008), optikai anyag-meghatározásra (Murphy et al., 2008) használhatók az arany, egyes esetekben az ezüst nanorészecskék is.

Az arany nanorészecskék felvétele általában receptor mediált endocitózis révén megy végbe (Chithrani et al., 2006). A transferrinnel bevont nanorészecskék clatrin mediált endocitózissal (Chithrani, Chan 2007), illetve transferrin receptor mediált endocitózis során is bejutottak a sejtbe (Yang et al., 2005). A bejutás mechanizmusának fontos lépése a „wrapping hatás”, melynek során a sejt citoplazmája beborítja, becsomagolja a nanorészecskét (Gao et al., 2005). A nanorészecskék felszíni tulajdonságainak megváltozása kulcsfontosságú szereppel bírhat a sejtekbe történő bejutásuk sikerességében. A élő szervezetbe jutva kapcsolatba kerülnek biológiai folyadékokkal, ami befolyásolja a felszíni töltésüket, a felszínhez kötött fehérjéket, melyek aggregálódásukat okozhatják (Alkilany Murphy 2010). A részecske felszíni változtatásai már a penetráció közben is károsíthatják a sejtmembránt (Goodman et al., 2004).

A szakirodalmi adatok között azt találjuk, hogy az arany nanorészecske nem, vagy csak kismértékű toxikus hatással bír még a felszíni bevonattal ellátott részecskék esetében is (Connor et al., 2005, Alkilany et al., 2009). Az újabb keletű tanulmányok megkérdőjelezik a nanoméretű arany részecskék használatának biztonságát (Jenkins et al., 2013), a kedvező elektromos, kémiai, mechanikai, termális és optikai tulajdonságaik ellenére (Aillon et al.,

2009; Bracamonte et al. 2011; Jenkins et al., 2013) is. Több tanulmányban bizonyítható volt az arany részecskék káros hatása, ha valamilyen kémiai anyag volt kötve a részecske felszínéhez, ami: citoskeletonális károsodásokat, proliferáció csökkenést (Pernodet et al., 2006), LDH felszabadulást (Uboldi et al., 2009), vagy oldatban lévő szabad kémiai anyagként okozta a toxicitást (Alkilany et al., 2009).

A kritikus részecske méret a sejtmaghártya penetrációjakor 1,4 nm (Tsoli et al., 2005). Az ettől kisebb részecskék a magba jutás során nekrozist, illetve az 1,2 nm nagyságú részecskék apoptózist okoztak. Megfelelő felszíni módosításokkal a nagyobb méretű nanoarany részecskék is képesek lehetnek a magba bejutni (Nativo et al. 2008), ahol a speciális bevonattal ellátott arany nanorészecskék a target tumor sejtek DNS-ének kettős száltörését okozták (Kang et al., 2010b). A leginkább tanulmányozott arany nanorészecskék a 100 nm alatti mérettartományba esnek, melyek a sejtekbe receptor mediált endocitózis által jutnak be, ott pedig endosomákba (Shukla et al., 2005; Nativo et al., 2008), vagy vesiculákba kerülnek (Pernodet et al., 2005; Chithrani and Chan 2007; Mao et al., 2007).

A nagyméretű, 15 nm nagyságú nanorészecskék önmagukban már nem voltak toxikus hatásúak (Pan et al., 2007), liganddal kötötten is csak enyhe hatást fejtettek ki (Pan et al., 2009). Kolloid méretet elérő, 50-90 nm-es részecskéknél a proliferáció enyhe növekedését tapasztalták a ROS csökkentésével együtt (Malugin, Ghandehari 2010). A részecskék mérete mellett formát és a felszínen kötött oldalláncokat szintén számításba kell venni, ha az arany nanorészecskék toxicitását vizsgáljuk (Yah 2013). Az arany nanorészecske sejtekre kifejtett hatása nagyban függ a részecske geometriájától, mivel a gömb alakú részecskék felvétele könnyebbnek bizonyult, mint oszlop vagy pálca alakúaké (Chithrani et al., 2006).

Bár az *in vitro* eredmények nem teljesen egyértelműek az arany nanorészecskék toxicitását illetően (Griffith and Schwartz, 2006), az elérhető nanotoxikológiai adatok jelentős része mégis *in vitro* kutatásokból származik. Áttekintésüket zavarja a használt metodikák és az általuk nyert eredmények széles spektrumú ingadozása (Ostrowski et al., 2009). Több, egymásnak ellentmondó tanulmány ellenére az eredmények arra utalnak, hogy az arany nanorészecskék intracelluláris toxicitását elsősorban a fizikokémiai tulajdonságaik szabják meg (Yah 2013). Az *in vivo* toxicitási adatok egységesek abban, hogy a nanoarany az egyes szervekben például az agyban akkumulálódik (De Jong e al., 2008; Suosa et al., 2010), viszont a sejtszintű toxicitás problémájához hasonlóan, a szervezetre gyakorolt toxicitási kockázatának megértéséhez további, hosszútávú vizsgálatok szükségesek (Yah 2013).

### *Ezüst nanorészecskék celluláris hatásai*

A nanoméretű ezüst részecskéket fogyasztói viszonylatban leggyakrabban kolloid oldatként lehet beszerezni, de kozmetikumokban, fertőtlenítőszerekben, élelmiszerek csomagolásában, ruházati termékekben is találkozhatunk velük. Sokrétű és elterjedt felhasználásuk ellenére a nanoaranyhoz hasonlóan a nanoezüst részecskék biztonságát illetően is komoly kétségek merülnek fel. A sejtekbe bejutó ezüst nanorészecske jelentős károkat okozhat a részecske méretének és a koncentrációjának függvényében. A ROS emelkedése, morfológiai és mitokondriális károsodás és a jellegzetes sejthalálformák (apoptózis, nekrozis), megjelenését figyelték meg az ezüst nanopartikulumok jelenlétében (Arora et al., 2008; Asharani et al., 2008; 2009; Foldbjerg et al., 2011; Haussian et al., 2005; Kawata et al., 2009). Humán sejteken végzett vizsgálatok alapján az ezüst nanorészecskék egyenletes eloszlásban voltak jelen intracellulárisan és a sejttagon belül. A dózis-, és időfüggő jelenlétük genotoxikus, citotoxikus és antiproliferatív hatásúnak bizonyult (Asharani et al., 2009). Egybehangzó következtetéseket vontak le arra vonatkozóan, hogy a tumor sejtek érzékenyebbnak bizonyultak az ezüst nanorészecskék jelenlétére (Asharani et al., 2008, 2009, Moaddab et al., 2011), kisebb antimikrobás koncentrációkban is (Arora et al., 2008). Genotoxicitásukat tekintve az ezüst nanorészecskék jelenléte abnormális proliferációt, DNS-károsodást (Kawata, 2009) és magméret csökkenést okozhat (Kim et al., 2010). A csírasejtek differenciálódására toxikus hatásúnak bizonyultak, jelenlétük mitokondriális károsodást és LDH felszabadulást indukált (Braydich-Stolle et al., 2005). A zebraahal (*Danio rerio*) post-fertilitási vizsgálata során az aranyrészecskék csupán enyhe toxicitást mutattak, míg az ezüstrészecskék magas mortalitást és súlyos fejlődési rendellenességeket provokáltak. A részecskék fizikai-kémiai felszíni hatása mellett azok kémiai szerkezete is jelentősen befolyásolta a károsodás mértékét (Bar-Ilan et al., 2009).

Az ezüstkolloid 5-50 nm méretű fémezüst részecskék nagy tisztaságú vizes oldata, ami oldott ezüstionokat is tartalmazhat (Panyala et al., 2008). Az ezüstkolloid hosszú távú alkalmazásának következtében kialakulhat az argyria ami fő jellemzője ezüst a bőrben és a nyálkahártyákban akkumulálódva kékes-szürke színváltozást okoz (Tóth et al., 2009). Az ezüst nanorészecskék szervezeten belüli megoszlására jellemző, hogy a keringési rendszeren és a fő barrieréken keresztül képesek átjutni és akkumulálódni a szövetekben, a vér-agy gáton átjutva az agyban halmozódnak (Tang et al., 2009, Loeschner et al., 2011). A hosszú távú ezüst expozíció lehet lokális vagy szisztémás, és letális következményei is lehetnek (Perscott et al., 1994).

### 1.3.4 Vizsgálati módszerek

A vizsgálataink során a sejtek egyedi és populációs szintű folyamatait hosszútávú videó mikroszkópiával követtük nyomon képszekvenciák rögzítésével, melyből az adatokat digitális képanalízissel nyertük ki. A toxikológiai vizsgálatok során a time-lapse videó mikroszkópos megfigyeléseinket a kromatin kondenzálódás köztes formáinak morfológiai összehasonlításával támasztottuk alá.

#### 1.3.4.1 Long-term scann rendszer, képkalkotó videó mikroszkópia

##### *Videó mikroszkópia használata és lehetőségei*

A sejttenyésztés, sejt-és szövetkultúra megfigyelésére a legkézenfekvőbb eszköz az egyszerű fénymikroszkóp, amely a standard sejttenyésztési gyakorlatban a sejtek életképességének és növekedésének adott időközönkénti ellenőrzésére szolgál. A sejtek sztereó mikroszkóppal történő megfigyelése általában az inkubátoron kívül történik, az optimális tenyésztési körülményekből kiemelve. A sejttenyésztés eszköztárának fejlődésével a sejt kultúrák fenntartása egyre egyszerűbbé, megbízhatóbbá és kiszámíthatóbbá vált, így a 21. század elejére a sejt kultúrákat használó *in vitro* kísérletek elvégzésénél már számos tenyésztési és monitorozási lehetőség állt rendelkezésre, csak úgy, mint az eredmények értékelésére.

A time-lapse mikroszkópia hatékony, sokoldalú és folyamatosan fejlődő eszköz az élő sejtek valós idejű képkalkotására (Collings et al., 2019). Sejteken végzett kutatások terén jelentős mennyiségű időt, és anyagköltséget takaríthatunk meg, ha egy megfigyelt tenyészet felhasználásával több különböző vizsgálandó paramétert tudunk meghatározni. Ilyen eszközzé fejlesztettük a sejttenyészetek hosszú, és rövid távú megfigyelései során és az adatok rögzítésével, analízisével, kiértékelésével az egyre szélesebb körben alkalmazott videó mikroszkópos rendszerünket.

##### *Videó mikroszkópia előnyei és hátrányai*

A time-lapse videó mikroszkópia -eredetileg time-lapse cinemikrográfiaként (mikrofotográfia) leírt (Klausewitz 1953), - leginkább a makroszkopikus események megörökítéséből ismert, nagy időbeli felbontásban készült fényképfelvételek sorozatára emlékeztet, melyeket filmként lejátszva betekintést nyerünk olyan folyamatokba, melyek lefolyása az emberi léptékhez képest lassan zajlik. Az 1990-es évek elején jött létre a mikro-mikroszkopikus rendszer, a videó mikroszkópia (Landecker 2009), melynek célja a sejtek optimális körülmények között tartása közben végzett hosszú távú megfigyelés volt. A

felvételek elkészítésére képes mikroszkópos rendszerek megalkotását olyan problémák indokolták, melyeket csak az időbeli korlátok feloldásával lehetett vizsgálni. Szükségessé vált a tenyészetek megfigyelése kisebb időbeli (perc, másodperc) felbontásban, az *in vitro* vizsgálatokhoz. A folyamatos megfigyeléssel szolgáltatott újabb információk áttöréssel kecsegtetnek a tumor-biológiai kutatásokban, az *in vitro* gyógyszer-technológiai kutatások terén és jelentősen csökkentik az *in vivo* kutatási fázisok költségeit. Előnyei mellett azonban számos technikai kihívással szembesítette a felhasználókat. Az emlős sejtek time-lapse mikroszkópos vizsgálata általában megköveteli az inverz mikroszkópot, amelyet teljesen vagy részben egy sejtinkubátorban (környezeti kamra) helyeznek el. Az eszköz egy részlegesen lezárt átlátszó doboz, amely fenntartja a hőmérsékletet, a páratartalmat és akár a gáz (széndioxid) részleges nyomását, megvédi a tenyésztett sejteket a fénytől, és lehetővé teszi a vizsgáló számára, hogy a mikroszkóp beállításait (látótér egyéb képalkotó paraméterek kiválasztása) elvégezze (Riddle 1990; Tuttle 1992; Kulesa, Kasemeier-Kulesa 2007). A jelenlegi házilag fejlesztett és kereskedelmi forgalomban két típusa kapható: kisméretű inkubátorban elhelyezett, akár teljes méretű képalkotó rendszer (Payne et al., 1997; Hardarson et al., 2002; Mio és Maeda, 2008), vagy kisméretű képalkotó rendszer nagy inkubátorban (Lemmen et al., 2008; Meseguer et al., 2011; Cruz et al., 2011). Mindkét stratégia feltétele az ideális környezet és stabil tenyésztési körülmények biztosítása a képalkotó vizsgálat során (Lemmen et al., 2008; Meseguer et al., 2011; Wong et al., 2010). Összességében a time-lapse képalkotó rendszer használata nem veszélyeztetheti a tenyésztési körülményeket, ideértve a hőmérsékletet, a pH-t és a páratartalmat (Wong et al 2013). Az ilyen berendezés alkalmas ideális körülmények között tartott sejttenyészetek folyamatos megfigyelésére, nagyfelbontású mikroszkópos felvételek készítésére digitális kamerával, amely utóbbi a számítógéppel összekötve automatikusan rögzíti a felvételeket a beállított időpontokban.

#### ***Az eTox munkacsoport long-term scann rendszere***

A long-term scann mikroszkópok fejlesztése, építése csoportunkban több mint 15 éves múltat tekint vissza. A scann-rendszerek létrejöttének célja, hogy a sejt kultúrák folyamatos megfigyelésén keresztül, digitális képanalízissel kombinálva, olyan kvantitatív adatokat szolgáltatson, melyek más megfigyelési módszerekkel nem mutathatók ki. A long-term scann rendszerünk az alábbi kutatások során került felhasználásra.

- Sejthalálformák vizsgálata (Nagy et al., 2010)
- Primer sejt kultúrák differenciálódásának vizsgálata (Nagy et al., 2012, Kiraly et al., 2014)

- Nanoszelen részecskék celluláris hatásai (Nagy et al., 2015)
- Patogén gombák és HaCaT monolayer interakciója
- Citotoxikológia: nehézfémek (Banfalvi et al., 2005, Farkas et al., 2010, Nagy et al., 2011a Nagy et al 2011b), UV és gamma sugárzás (Nagy et al., 2004, Banfalvi et al., 2007b, Ujvarosi et al., 2007), illetve oxidatív stressz vizsgálata (Papp et al., 2011)
- Regeneráció celluláris folyamatainak vizsgálata (Ruzsavanszky et al., 2013)

Az eddig használt mikroszkópjaink fejlesztésében fő szempont volt a mikroszkóp hosszú távú használhatósága és költséghatékony cserélhetősége, valamint a vizsgálatok időbeli limitációinak csökkentése. Ahhoz, hogy a kívánt feltételeket érvényesíteni tudjuk mikroszkópjainkban, el kellett térnünk a hagyományos felső megvilágítású, és inverz fénymikroszkópok felépítésétől és eszköztárától. Ennek eredményeként jöttek létre a long-term scann generációk (1. táblázat), melyeknek minden tagja hatékonyabban közelítette meg a hosszú távú megfigyelés problémáit.

<i>Generáció</i>	<i>Állványzat</i>	<i>Megvilágítás</i>	<i>Szenzor</i>	<i>Optikai rendszer</i>
<i>1</i>	egyedileg készített fém állványzat	látható fény - hagyományos mikroszkóp izzó	analóg kamera	szabvány objektív
<i>2</i>	hagyományos mikroszkóp statív	látható fény LED	holdfény, kék színátmenetet biztosító kamera	inverz, szabvány objektív
<i>3</i>	műanyag polcok fém vázon	közeli infravörös LED, 940 nm fény emittáció	CCD érzékelő, mikroszkópkamera	inverz, szabvány objektív, fix fókus
<i>4</i>	Mikroszkóp statív	közeli infravörös LED, 940 nm fény emittáció	CCD érzékelő HD, digitális mikroszkópkamera	inverz, szabvány objektív

1. táblázat: Munkacsoportunk time-lapse mikroszkópjainak fejlesztései

### ***Alapelvek az eszközfejlesztésben***

A long-term scann mikroszkópok fejlesztése során három alapelv határozta meg a felépítésük egyszerűsítését és a használat során felmerülő problémák megoldását. Az eszközfejlesztés folyamatában arra törekedtünk, hogy a rendszer a lehető legegyszerűbben, széles körben hozzáférhető alkatrészekből megépíthető és legkönnyebben használható formában lássa el a kijelölt funkciókat.

A helyettesíthetőséget és egyszerűsítést tekintve a tervezésnél kihagytuk azokat a hétköznapi fénymikroszkópokban alapvetőnek számító alkatrészeket, melyek nem látnak el hasznos funkciót az inkubátorban történő képalkotásnál. Azon elemeket, melyek az inkubátor belső körülményei következtében nehezen kiküszöbölhető, a képalkotással összeegyeztethetetlen változásokon mennek keresztül, olyanokkal helyettesítettük, melyek sejtenyésztési körülmények között is kiszámíthatóan viselkednek.

A kiküszöbölhetőség szempontjából a rendszer azon tulajdonságait, melyek alapvetően szükségesek a kísérletek lefolytatásához és más különböző alkatrészek helyettesítésével nem kezelhetők teljes mértékben az általuk okozott problémák, új alkatrészek beépítésével próbáltuk kiküszöbölni, vagy a kísérletek megtervezése során figyelembe vettük őket.

A kompenzálhatóság elve szerint, azokat a nehézségeket, amik az inkubátor működéséből következnek, megpróbáltuk szoftveresen, vagy a képelemzés folyamán kompenzálni anélkül, hogy a képszekvencia információ tartalmát megváltoztatnánk.

### ***Fototoxicitás a videó mikroszkópiában***

A sejtek folyamatos megfigyelése felveti a rendszerekkel készült felvételek hitelességének problematikáját. A konkrét kérdés az volt, hogy a tenyésztőedény megvilágítása milyen hatással lehet a kísérletek eredményére, azaz a sejtek esetleges érzékenysége, vagyis az adott hullámhosszú fény toxicitása a vizsgálandó sejtvonal esetében meghamisítja-e az eredményeket. Közismert tény, hogy a fény károsíthatja a DNS-t, lokális melegedést indukálhat, vagy szabadgyök képződést generálhat a sejtekben (Frigault et al., 2009). A látható fény kevésbé zavaró, mint a nagy energiájú, például ultraibolya fény vagy a fókuszált infravörös fény, így time-lapse rendszerek általában a látható fényt alkalmazzák, ideértve az átmenőfényes és a sötétlátóteres képalkotást. Fontos szempont, hogy a többnapos kísérlet teljes fénymegvilágítási ideje csak percekre, az expozíciós időtartamra korlátozódjon a képfelvételi időtartam minimalizálásával (Meseguer et al., 2011; Wong et al., 2010).

Ezenkívül maga a megvilágítási rendszer módosításai (Meseguer et al., 2012 Wong et al., 2010) vagy alacsony fogyasztású LED (light emitting diode, fényt kibocsájtó dióda) megvilágítás használata egy sötét látóterű megvilágítási rendszerben, illetve üreges fénykúp kivetítése a mintákra minimalizálhatja a fényerősséget (Wong et al., 2013).

Az általunk használt rendszerek infravörös fényforrást alkalmaznak. Korábbi kísérleteink tapasztalatai, -melyek során a különböző hullámhosszú fények toxikus hatását vizsgáltuk-, arra engednek következtetni, hogy az alacsony energiájú és nagy hullámhosszú, közeli infravörös fény nincs toxikus hatással a sejtekre. Két hetes időintervallumban követve a különböző megvilágító fényeknek kitett sejt kultúrákat, az infravörös fényvel besugárzott tenyészet állapota nem tért el szignifikánsan a kontroll tenyésztétől.

#### ***1.3.4.2. Kromatin kondenzálódási intermedierek vizsgálata a genotoxicitás bizonyítékaiként***

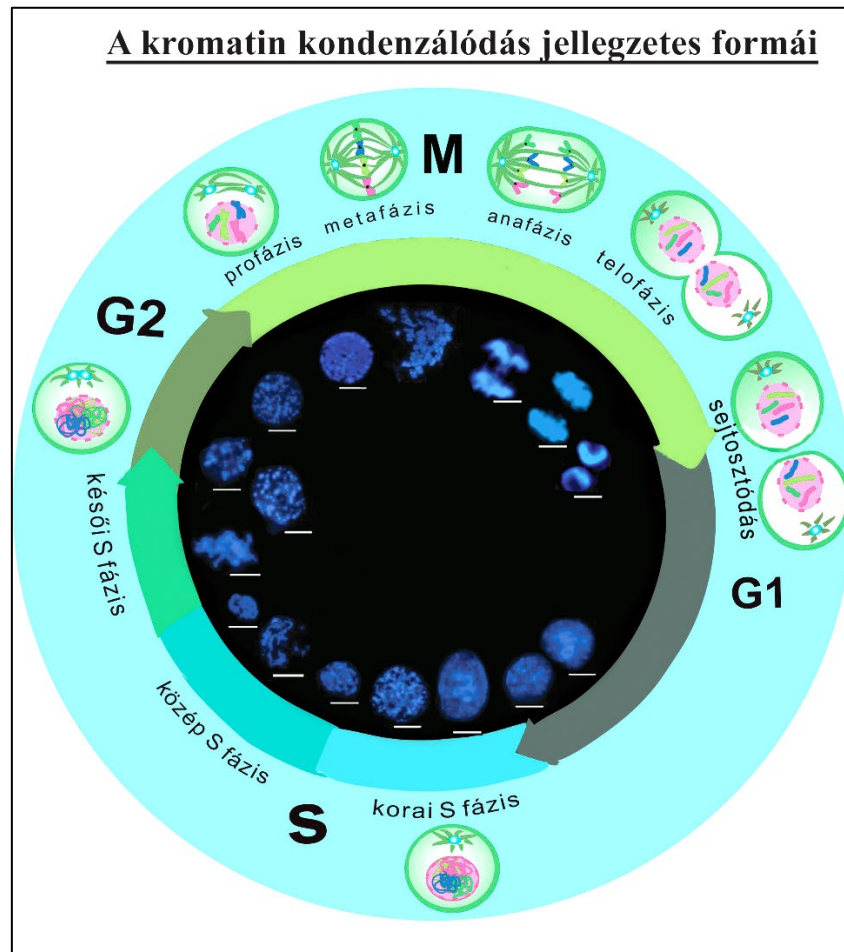
A sejt ciklus során a maganyag kromoszómákká alakulása a sejt ciklus fázisaira jellemző jellegzetes morfológiai szerkezeteken keresztül valósul meg, ekkor jönnek létre a metafázisos kromoszómák.

#### ***Kromatin kondenzálódási folyamat vizsgálata***

A G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fázisban - ezt a sejt nyugalmi fázisaként is említik- a maganyag dekondezál, homogén, fátyolszerű struktúráként jelenik meg. Az ezután következő G<sub>1</sub>-S fázis -melyet korai S fázisként jelölünk meg- a DNS megkettőződésének kezdeti szakasza. Ekkor a maganyag heterogén megjelenést mutat, mivel a replikáció helyén a DNS szálai elválnak. A korai, középső S fázisra jellemző a fátyolos szerkezet, a szalagszerű kondenzálódás megindulása a maganyag polarizációja révén. Ez a folyamat később az egész sejtmagra kiterjed. A késői S fázis már a szalagos, illetve a szalagok kondenzálódása során létrejövő, tömörebb, hosszabb, fonalas képletekkel jellemezhető.

Egyes magoknál a kromatin szalagok további szupertekercselődésével kialakuló kromatin testeket is megfigyelhetjük, a fázis végére a maganyag gyűrűszerű struktúrává rendeződik, melyet elongált kromoszómák alkotnak. A G<sub>2</sub> fázisban -a sejt növekedési fázisát a nagymértékű fehérje és RNS szintézis jellemzi-, a maganyag már kromoszóma elő-telepeket, praekromoszómákat és már megkülönböztethető kromoszómákat is tartalmaz, melyek kondenzáltsági foka még eltérő. Az M fázis, azaz a mitózis a sejtosztódás előtti fázisa, mikor magban már teljesen kondenzálódott kromoszómákat találunk.

A sejtosztódás ana- illetve telofázisában a megkettőződött és különvált sejtmagállomány visszarendeződése figyelhető meg. A maganyag újrászerveződik, lazább, fátyolos, majd egyre tömörebb, dekondezál, homogén szerkezetű lesz. A sejtciklus során végbemenő kromatin kondenzálódási körfolyamatot, és az egyes fázisokat jellemző köztes kromatinformákat a 4. ábra szemlélteti.



4. ábra: A kromatin kondenzálódási intermedierek a sejtciklus fázisaiban

A sejtmag anyagának kromoszómákká formálódása során a sejtciklus fázisaiban bekövetkező változásokat az egyes kromatin kondenzálódási intermedierek megjelenésével jellemezhetjük. A toxikológiai kutatások során kromatin elváltozások érzékeny indikátorok, és számos esetben nyújtottak lehetőséget a toxicitási kutatások eredményeinek alátámasztására, akár a genotoxicitás szintjén is. A citotoxicitás kromatin szintű megnyilvánulását szinkronizált sejtpopulációkon standardizált kromatin szerkezetek elemzésével vizsgáltuk (Gacsi et al., 2005, Banfalvi et al., 2006a, 2006b, Trencsenyi et al., 2007a). A long-term scann rendszerrel

megvizsgált tenyészetekből sejtmagokat izoláltuk és a feltárt sejtmagok kromatin struktúráját fluoreszcens mikroszkópiával elemeztük.

A kromatin kondenzálódás folyamata a vizsgált eukaryota fajok szintjén nagyfokú hasonlóságot mutatott. Négy emlősfaj (CHO – kínai hörcsög ovarium, IM – indiai muntyákszarvas fibroblast, eger pre-B sejtek és humán K-562 erythroleukemia) kromatin formáinak összehasonlítása révén kiderült, hogy a kondenzálódás intermediereinek S-fázis alatti megjelenése jól elkülöníthető, morfológiai stádiumokkal jellemezhető, amely szoros korrelációt mutat a sejtmérettel, magmérettel és a replikálódott DNS mennyiségével (Banfalvi et al., 2006). Vizsgálataink szerint ismert genotoxikus hatások fajtól független módon zavarják meg a kondenzálódás folyamatát, illetve, kondenzálódási intermedierek morfológiai megjelenése specifikusan és érzékenyen reagál a genotoxikus hatásokra. A genotoxikus hatásokat vizsgáltuk nehézfémek hozzáadása mellett (Banfalvi et al., 2005; Farkas et al., 2010; Nagy et al., 2011a; Papp et al., 2011; Nagy et al., 2011b; Banfalvi et al., 2012), és ionizáló sugárzás jelenlétében (Nagy et al., 2004; Banfalvi et al., 2007b; Ujvarosi et al., 2007). Illetve tanulmányoztuk az egyes genotoxikus anyagok specifikus hatását a kromatin kondenzálódási intermediereinek kialakulására (Banfalvi 2014). Bizonyítottuk, hogy az interfázisos kromoszómák metafázisos kromoszómákká szerveződése (a kromatin kondenzálódás) morfológiailag jellemezhető módon szenvedett zavart a citotoxikus hatások következtében (Nagy et al., 2011). A kiváltott kromatin kondenzálódási zavarok a toxikus hatástól függő, jellegzetes kondenzálódási intermedierek megjelenését eredményezték és a subtoxikus koncentrációban alkalmazott ágensek jelenlétében, ahol celluláris toxicitás még nem detektálható, a kondenzálódási intermediereken már jelentkeznek a toxikus hatásra utaló esetlegesen reversibilis elváltozások (Banfalvi 2014). A tumorsejtek és metaphasis vizsgálatok alkalmával összehasonlítottuk a tumoros és a regenerálódó májsejtek kondenzálódási mintázatát *in vitro* és *in vivo* (Trencsenyi et al., 2007b). A kromatin kondenzálódási intermediereket az egyes kutatásokban megvizsgáltuk különböző emlős és számos humán sejtfeleség mellett, de ízeltlábú (*Drosophila*) (Banfalvi et al., 2007a, Banfalvi 2008) és hasadó élesztő (*Saccharomyces pombe*) esetében is (Horvath et al., 2012).

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

A leképző videó mikroszkópos rendszer és a célszerűen alkalmazott digitális képelemzési módszerek kombinációjával egy sokoldalú modellrendszer létrehozását tűztük ki célként. Ennek segítségével a szemészeti klinikai gyakorlatból származó mintákon egyszerűen, sokoldalúan, könnyen reprodukálhatóan és időbeni dinamikájukat megőrizve, *in vitro* körülmények között tanulmányozhatóvá válnak a szemben végbemenő életfolyamatok akár a sejtek egyedi akár populációs szintjén zajlanak. A vizsgálatainkat tehát két csoportba sorolhatjuk: a sejttenyészetek egyedi sejtjein az OCM-1 (humán choroidea melanóma-1 sejtvonala) sejtek multipoláris osztódásai, illetve sejtpopulációk szintjén az izolált humán limbális sejtek (HuLi) monolayer regenerációs karcmodellje.

Az uveális melanómák esetében a poliploiditás ritka (18%), azonban kedvezőtlen prognózist jelent. Az OCM-1, közel tetraploid sejtek osztódásai között viszonylag magas gyakorisággal figyeltünk meg multipláris osztódásokat. Ezek feltételezhető oka az instabil tetraploid állapot elkerülése. Ezek a rendellenes osztódások a tumorprogresszióra és áttétképződésekre is hathatnak.

A corneális sebgyógyulás során a limbális tranzienst sejteknek kiemelkedő szerepe van a regeneráció során. A limbális sejttenyészetben létrehozott karc regenerációs rendszer segítségével a szaruhártya felszíni sebgyógyulását modelleztük.

A vizsgálatainkban a kiválasztott életfolyamatok az alábbiak voltak.

- 1) Uveális melanóma (OCM-1) sejttenyészetek egyedi sejtjeinek vizsgálata: multipoláris sejtosztódások kvalitatív morfológiai leírása, kvantitatív dinamikai analízise.
- 2) Klinikai mintából izolált limbális sejtpopuláció létrehozása, fenntartása és leírása.
- 3) *In vitro* corneális sebgyógyulási modell kidolgozása: Humán limbális monolayer regenerációs karcmodell
- 4) A karcmodell felhasználása farmakológiai vizsgálatok során: antibiotikumok hatása a szaruhártya regenerációjára
- 5) A karcmodell felhasználása citotoxicitás vizsgálatokhoz: Többfalú ipari minőségű szén nanocsövek hatása. Inert fém nanorészecskék hatása a monolayer regenerációra.

### **3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

A kutatásaink során célunk klinikai mintákból származó sejtféleségekben lezajló folyamatok időbeni dinamikájának vizsgálata volt: a sejtek életjelenségeit *in vitro* a vizsgálataink teljes időtartamában nyomon tudjuk követni. Ezen célunk megvalósításához a time-lapse videó mikroszkópos módszert használtuk. A vizsgálatok időtartamában rögzített képadatbázis statisztikai képelemző módszerekkel történő feldolgozása révén kapott nagy időbeli felbontású, több hétig gyűjtött adatokat használtuk fel a megfigyelt folyamatok dinamikai vizsgálatához.

#### **3.1. Sejtek izolálása és tenyésztése a limbus gyűrűből**

A vizsgálatainkban minden klinikumból származó humán eredetű szövet- és sejt minta esetében az Európai Közösség 2004/23/EK irányelve, az Orvosi Világszövetség Helsinkai Deklarációja és a Debreceni Egyetem Etikai Kódexe szerint jártunk el. A limbus gallért a transzplantációra szánt cornea részeként kadaver szem enucleációja révén nyerték ki a Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Centrum Szemklinikáján. A szövetminták a lehető legrövidebb időn belül kerültek feldolgozásra.

##### **3.1.1. A limbális sejtek izolálása**

A corneális epitheliális limbus egy 56 éves nőbeteg kadaverének enucleált szeméből származott, mely szövetet Debreceni Egyetem Szemklinikára biztosította. A limbus gyűrűt és a transzplantációra szánt corneát- melynek a központi korongja beültetésre került-, felhasználásig Eusenol-C transzplantációs folyadékban tároltuk 4 °C-on. A sejtek izolálását megelőzően fertőtlenítettük a corneosclerális gallért: először 70%-os etanol oldattal, majd Betadine-nal többszörös átmosást végeztünk. Végül a Betadine oldatot DMEM-Ham's F12 (Dulbecco által módosított Eagle tápfolyadék, és Ham-féle tápfolyadék 1:1 arányú keveréke) médiummal mostuk le, ami 10% FBS-t és 1% PSN-t tartalmazott. A fertőtlenítés minden lépése során új, steril eszközöket használtunk. Az izolálás következő lépéseként a cornea és sclera visszamaradt részeit eltávolítottunk, és a limbust mechanikusan aprítottuk 2×2 mm-es darabokra. A limbus darabokat ezután 5 ml 800 U/ml collagenase IV-et tartalmazó DMEM-Ham's F12 +10% FBS +1% PSN-ben inkubáltuk két órán keresztül. A sejtuszpenzió létrehozásához a collagease-os emésztés végén a sejteket négy réteg steril gézlapon szűrtük át. Végül a sejtek életképességét tripánkék festéssel ellenőriztük majd az izolált sejteket DMEM-

Ham's F12 tápfolyadékban tenyésztettük, melyet 10% FBS-sel és 1% PSN-nel egészítettünk ki. A vizsgálatokhoz a hatodik átoltás sejtjeit használtuk fel.

A limbális eredetű őssejttenyészetből a fibroblast sejtek, szelektív eliminálását a második átoltás sejtjein genecicin (G-418-szulfát) hozzáadásával végeztük, két napig, 50 µg/ml végkoncentrációban.

A sejtfelszíni markerek vizsgálata a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Patológiai Intézetében történt. A sejtfelszíni markerek meghatározását Dr. Dezső Balázs végezte.

### **3.1.2. Sejtvonalak tenyésztése:**

OCM-1 humán ocularis choroidea melanóma-1 sejtvonal: Az OCM-1 sejtvonalat RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium) tápfolyadékban tenyésztettük, melyhez 10% FBS (embrionális borjú vérsavóval) és 1% PSN (antibiotikum, antimycoticum keverékkel) oldatot adtunk.

HaCaT: Humán keratinocita sejtvonalat RPMI 1640 tápfolyadékban tenyésztettük, melyet 10% FBS-sel és 1% PSN-nel egészítettünk ki

HeLa: A humán cervix carcinoma sejtvonalat DMEM (Dulbecco által módosított Eagle tápfolyadék) médiumban tenyésztettük, és ezt 10%FBS-sel és 1% PSN-nel supplementáltuk.

CCL 209 a szarvasmarha pulmonális endothel sejtek tenyésztőközege EMEM (Eagle féle minimum esszenciális tápfolyadék) melyhez 20% FBS-t és 1% PSN-t adtunk.

### 3.2. A sejttenyészetek videó mikroszkópos vizsgálata a long-term scann rendszerben

A vizsgálatok során a videó mikroszkópos rendszer paraméterei a következők voltak: az inkubátor típusa: SANYO MCO18-AC CO<sub>2</sub> sejttenyésztő inkubátor (Wood Dale, IL, US) négy videó mikroszkóppal felszerelve. A mikroszkópok Olympus (Tokyo Japan) gyártmányúak, inverz állásban, célszerű módosításokkal: a revolvertoronyban elhelyezett fényforrással, és az okulárba telepített CCD (Charge-Coupled Device, töltés csatolt eszköz) kamerával lettek felszerelve. Az objektívek (10x0,25, achromat Carl Zeiss, Jena, nagy látóterű objektívek) a CCD kamera előtt helyezkednek el. A CCD kamera adatai: 2 megapixel felbontású UVC USB 2 webkamera. Módosítások: a kameraház, objektívek, és infraszűrő eltávolításra kerültek. Fényforrás: 960 nm hullámhosszúságú, közeli infravörös fényt emittáló LED (5 mm átmérő, 1,2 V, 50 mA). Az infravörös megvilágítást alkalmazva és a percenkénti expozíciós időt (5 sec) csökkentve minimalizáltuk a hő kibocsájtását és a fototoxicitást (Nagy et al., 2014).

A rendszerben működő videó mikroszkópok segítségével az ugyanazon tenyészetből származó kontroll és a kezelt sejtpopulációk egyidejű vizsgálata valósítható meg. Előnye, hogy a vizsgálatok valós idejű információkat nyújtanak a megfigyelés teljes időtartama alatt a letapadó sejtek széles spektrumára és rugalmasan felhasználható számos kísérleti elrendezésben.

A rendszer sokrétű felhasználhatóságát bizonyítja a munkánk során megvizsgált folyamatok bemutatása. A rendszer felhasználhatósága közül bemutatjuk a disszertáció alapjául szolgáló vizsgált folyamatokat.

1. Egyedi tumorsejtek celluláris etológiájának morfológiai vizsgálata. A megfigyelések több sejtciklust, generációt felölelő időtartamú, kis időbeli felbontású beállítások mellett megmutatták a sejtosztódások morfológiai és időbeni változásait.
2. Sejtpopulációs szintű regenerációs karcmodell: a mikroszkópos rendszer olyan szöveti folyamatok sejt szintű vizsgálatára nyújt lehetőséget, mint a regeneráció vagy a reepithelizáció. A megfelelő *in vitro* regenerációs modell, például a néhány sejtréteg modellezésére alkalmas sejtmigrációs karcmodell, melynek segítségével a folyamatot a sejtmigrációt alapul véve, időben dinamikusan jellemezhetjük. A vizsgálat során az ilyen esetekben alkalmazott vagy alkalmazható ágensek jelenlétében is teszteltük a módszert.

A long-term scann rendszerrel kapott felvételeket a National Institute of Health (NIH) által fejlesztett, Java futtatókörnyezetet (Java Runtime Environment, JRE) igénylő, platform független, nyílt forráskódú ImageJ (eredeti alkotója: Wayne Rasband) vagyis Fiji programcsomag (<https://fiji.sc>) segítségével kvalitatív és kvantitatív módon értékeltük ki. A képszekvenciák kiértékelése, vagyis a képelemzés az egyes vizsgálatokra és képszekvenciákra adaptált módon történt.

### **A videó mikroszkópos megfigyelések során készített képek feldolgozása**

Az első lépés a képek átlagolása és rögzítése: a megfigyelés időtartama alatt percenkénti felbontásban készítettünk el egy képet 10 frame átlagolásával, aminek célja a jel/zaj arányának növelése volt. A jel erősítéséhez a képkockákat a program 5 másodpercenként átlagolta, ennek révén elkerülhettük a kamera fényerejének növelését, és esetleges fototoxikus hatást. A képeket nagy 1600x1200 pixel felbontásban, 24 bit RGB BMP file formátumban mentettük. A Fiji software segítségével a képszekvencát összerendeztük videó formátumba, melyek a DVD-mellékleten találhatóak. Az egyes képszekvenciákhoz tartozó pixelméretet és a méretskálát Bürker kamráról készített kalibrációs fotók alapján számítottuk ki.

A második lépés a képek feldolgozása Fiji software segítségével: A képek elemzése során a nyílt forráskódú Fiji (ImageJ) software-t és az erre a célra fejlesztett macro-kat és kiegészítő software applikációkat (plugin) használtuk (<https://imagej.nih.gov/ij>). Az egyes vizsgálatok során a képszekvenciákra és az adott problémára specifikusan végeztük el a felvételek feldolgozását. A képszekvenciák feldolgozása az alábbi fő lépéseket tartalmazta:

#### 1) Képvisszaállítás, zajsűrés

A kép file-ok betöltése után a szekvencia (24 bites bitmap képek) RGB (red, green, blue) csatornáinak egyesítése következett, melynek eredménye egy 8-bit szürke árnyalatos képekből álló sorozat lett.

A megvilágító rendszerből és a sejtenyészési körülményekből adódó megvilágítási egyenetlenségeket a Stack deflicker plugin alkalmazásával küszöböltük ki.

A képszekvenciák elején és végén rögzített üres képkockák a háttér referenciájaként használhatók. Ezen a felvételek átlagolásával olyan képet kaptunk, amelynek a segítségével kiküszöbölhetők az egyenetlen megvilágítás (bulb effect), a porszemcsék miatti, illetve a CCD érzékelő gyártási hibáiból eredő képi hibák. Az átlagolással kapott háttérképen a Gauss életlenítés (Gaussian blur) funkciót  $r=2$  pixel, beállítással alkalmaztunk a zaj szűréshez. A

létrejövő és invertált kép a mérendő szekvenciából történő kivonásával elértük, hogy a képi zaj jelentős része eltűnjön, de a határvonalak sértetlenek maradjanak, ezáltal megtartva a mérendő információt.

A képszekvenciákon a méréseket az alábbi általános séma szerint végeztük: a megfelelő kontraszt és fényviszonyok beállítása: Brightness/Contrast, vagy Enhance contrast parancs alkalmazásával. Ezt követően egy a teljes szekvenciára kiterjedő artefact szűrés következett a gyors Fourier transzformáció (Bandpass filter) és a rolling ball algoritmus (Subtract background) használatával.

- A Bandpass filter egy sávszűrő algoritmus alapján működik, amely a szekvenciáról eltávolítja egy általunk meghatározott mérettartományon kívül eső elemeket. Esetünkben a 40 pixelnél nagyobb és a 3 pixelnél kisebb átmérőjű objektumok kerültek kiszűrésre.
- A rolling ball algoritmus a képet a pixelek színintenzitás változásai alapján szűri. Az algoritmus működési elve: a szekvencia képeinek pixelekhez a színintenzitásuk alapján magasság értékeket rendel, majd kiszámítja azt, hogy egy meghatározott sugarú-, ami a leggyakrabban 50 pixel volt, - labda átgördül, vagy akadályba ütközik. Ahol a labda akadálytalanul gördül tovább, ott az algoritmus kiszűri az információt – apró intenzitásbeli eltérések, az elemzés szempontjából zajnak tekintendő kisméretű objektumok, például: törmelék, fényútba kerülő porszemcse – ahol akadályba ütközik, ott megtartja azt.

Néhány esetben a képszekvenciákon egyéb szűrő alkalmazása is szükséges volt, például a Variance filter, amelyet az élek, körvonalak kiemelésére használtunk. A háttérkivonás után a szekvencia hisztogram simítása következett, amelyhez a képsorozat pixeleinek 0,4%-át telítettük a felvételek kontrasztjának javításáért.

## 2) Szegmentálás

Küszöbérték meghatározása threshold funkcióval. A képszekvenciák fentebb említett feldolgozásának célja a képek előkészítése a szegmentálásra (threshold). A szegmentálás a képsorozat hisztogramja alapján készült el. A threshold során létrejött, bináris képszekvenciákból csak a nem villódzó, zárt körvonalú, nem átfedő részecskék kerültek további analízisre. A küszöbérték meghatározása után a bináris képeken végeztük el a tényleges méréseinket, megmértük a képsorozat küszöbértékkel meghatározott részecskéinek területeit. A szegmentált felvételek esetében a zajsűrést, ha szükséges volt, a Remove

outliers, vagy a Fill holes paranccsal végeztük. A remove outliers használatával általában 1-12 pixel méretű objektumok eltávolítását végeztük el.

### 3) Mérések

A küszöbérték meghatározása után a bináris képeken végeztük el a tényleges méréseinket: megmértük a képsorozat küszöbértékkel meghatározott részecskéinek területeit.

A harmadik lépésben történt az adatok grafikonon való ábrázolása és kiértékelése. A Fiji program olyan opciót is felkínál, melynek segítségével Excel file formátumban is menthetjük az adatokat, melyeket ezután grafikonon ábrázolni tudtuk.

## 3.2.2. Limbális regenerációs karcmodell

A limbusból izolált sejtek felhasználásával *in vitro* regenerációs modellt hoztuk létre, amihez Liang és mtsai. (Liang et al., 2007) munkáját vettük alapul. A sejtek limbális eredete lehetővé tette, hogy a regenerációs modellt a szaruhártya felszíni sérüléseinek tanulmányozására használjuk. A HuLi sejteket DMEM-Ham's F12 médiumban- amit +10% FBS-sel, és +1% PSN antibiotikum keverékkel egészítettünk ki-, glass bottom dish-ben, üveg aljú tenyésztőedényben (WillCo Wells B.V., Amsterdam, Holland) 48 órán keresztül tenyésztettük. A sejtborítottság ekkorra érte el a megfelelő, 90%- os konfluencia szintet. A konfluens tenyészet sejtprésitját egy 20 G átmérőjű fecskendőtüvel megkarcoltuk, majd a tenyészetet a long-term scann rendszerbe helyeztük.

### 3.2.2.1 HuLi monolayer regenerációs modell gyakorlati felhasználása

A limbális monolayer regenerációs folyamatát egy perces időbeni felbontásban vizsgáltuk. Az eredmények bemutatása során a grafikonokon óránkénti felbontásban ábrázoltuk a változásokat.

Szemészetben alkalmazott antibiotikumok hatása a monolayer regenerációra:

A vizsgálatunk alapjául szolgált, hogy corneális sérülés következtében, a limbális őssejt átültetésen átesett páciensek lokálisan chloramphenicol hatóanyagú szemcseppet kaptak (Dua and Azura-Blanco 2000; Kheirkhah and Karimian, 2010).

- A vizsgálatához szemészeti gyakorlatban is alkalmazott antibiotikumokat és dózisokat alkalmaztuk: 0,5 és 1 mg/ml chloramphenicol, illetve 0,1 és 0,2 mg/ml rifampicin oldatokat.

Nanorészecskék hatása a regenerációs modellben.

- Többfalú szén nanocsövek (MWCNT) Az ipari minőségű karbon nanocsövek tisztasága <85%, külső átmérője 10-30 nm, hosszúsága: 10-30  $\mu\text{m}$  volt. A nanocsöveket a következő koncentrációkban teszteltük: 5, 50, 100 és 500  $\mu\text{g/ml}$ .
- Nagy tömegben inert fém nanorészecskék:
  - Arany nanorészecskék: 100 nm átmérőjű, gömb alakú, 1,0 optikai denzitású (OD), citrát pufferben stabilizált részecskéket a következő koncentrációkban alkalmaztuk: 80, 200, és 320 ppm, amelyek megfelelnek: 0,41, 0,81 és 1,63  $\mu\text{M}$ -nak.
  - Ezüst nanorészecskék: gömb alakúak, átmérőjük átlagosan 10 nm volt. A vizsgált koncentrációk az alábbiak voltak: 140, 200, 320 ppm, melyek megfelelnek: 1,13, 1,84 és 2,94  $\mu\text{M}$ -nak.

### **3.3. Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok**

A limbális monolayer regenerációs karcmodell, melyet a cornea reepithelizáció modellezésére használtunk, pásztázó elektronmikroszkópiával (SEM) is megvizsgáltuk.

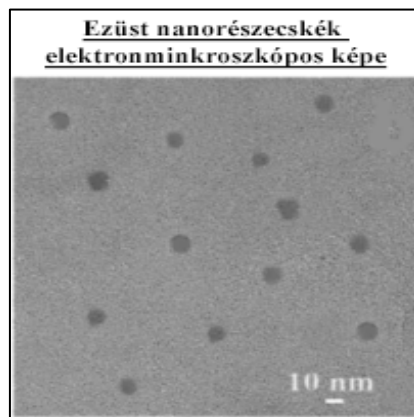
#### **3.3.1. A HuLi sejtpázsit időbeli regenerációjának vizsgálata**

Az elektronmikroszkópos felvételekhez a sejtenyészetet üveg aljzattal ellátott 35x50 mm-es műanyag Petri csészében (üveg aljú tenyésztőedény) tenyésztettük. A üveg aljú tenyésztőedény-ben tenyésztett, már konfluens sejtpázsitot meghatározott időközönként, a fixálás előtt 6, 3, és 0 órával, steril 20 G tűvel felsértettük, így különböző regenerálódási szakaszban lévő karcokat hoztunk létre. A fixálás során a sejtenyészetet 2,5% glutáraldehiddel majd 2,5% ozmium-tetroxiddal fixáltuk 30-30 percig 0°C -on. A fixálás után a minták felszínére vékony aranyréteget gőzöltünk és Hitachi S 4300 típusú pásztázó elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

A karcok a pásztázó elektronmikroszkópos fixálás (glutáraldehid, ozmium tetroxid) és az aranyréteges gőzölés miatt nem rajzolták ki élesen a karc széleket, ezért a regeneráció menetét sem tudtuk pontosan követni. Helyette a monolayer regenerációs karcmodell és time-lapse mikroszkópia segítségével követtük a szöveti regenerálódást.

### 3.3.2. Az ezüst nanorészecskék méretének meghatározása

Az ezüst nanorészecskéket 2,5%-os glutáraldehid- PBS oldatban tartottuk 0°C -on 30 percig, majd PBS-es mosást követően a részecskéket újabb 30 percig, 0°C -on, 2,5 % ozmium-tetroxidot tartalmazó PBS oldattal fixáltuk, majd a mintánkat felszálló alkoholsorban (50-100%) dehidráltuk. A részecskék felszínére ezután aranyréteget gőzöltünk, majd felületüket Hitachi S 4300 típusú elektronmikroszkóppal vizsgáltuk meg. A felvételek alapján a részecskék mérete egységesen  $9,9 \pm 1,1$  nm volt (5. ábra)



5. ábra Az ezüst nanorészecskék pásztázó elektronmikroszkópos képe

### 3.4. Nanoszén aggregáció mérése time lapse videómikroszkópiával.

A nanoszén aggregátumok mérésekor a kalibráláshoz Bürker-kamrát használtunk, melyről a kezelt sejttenyészetek time-lapse felvételeihez használt nagyítási és felbontási paraméterek mellett képeket készítettünk.

A Bürker-kamra négyzetrácsozott területén a metszéspontokból keletkező négyzetek területei ismertek: a vonalak rövidebb (50  $\mu\text{m}$ ) metszéspontjaiból keletkező kis négyzetek 2500  $\mu\text{m}^2$  területűek.

Fiji képelemző szoftver segítségével lemértük a készített fotókon a fentebb említett négyzetek területét pixelben, így megkaptuk a pixel -  $\mu\text{m}^2$  átváltási számot. Ezután lemértük az aggregátumok területét is pixelben, majd az előbbi váltószám segítségével kiszámítottuk azok tényleges területét  $\mu\text{m}^2$ -ben megadva.

### **3.4. Kromatin szerkezetek vizsgálata**

A genotoxicitás vizsgálatok alapjául a kromatin kondenzálódási intermedierek analízise szolgált. A kromatin szerkezetek kialakulása a sejtciklus lépéseire levetíthetően zajlik, ezt számos sejt típuson megvizsgált, jellegzetes kromatinformák megjelenésével bizonyítottuk. A vizsgálatok során az azonos körülmények között tenyésztett sejtekből izoláltuk a sejtmagokat a kezelt és a kontroll tenyészetekből, az alábbi protokoll alapján.

#### **Sejtmagok, kromatin szerkezetek izolálása**

A reverzibilis permeabilizálás és sejtmag izolálás módszerét eredetileg egér thymusból izolált lymphocytá sejt vizsgálatára kidolgozták ki (Banfalvi et al., 1984).

A sejtek trypsines kezelése:

A 25 cm<sup>2</sup> méretű edényben tenyésztett sejtekről a médium eltávolítása után a monolayer PBS (foszfáttal pufferelt sóoldat) oldattal mostuk, majd 0,25%-os trypsin-EDTA oldatot (0,9 ml egy

T-25-ös edényhez) adtuk a sejtenyészethez. A trypsin 10 perces hatóideje alatt a tenyészetet inkubátorban helyeztük el. A sejtek felválása után tápfolyadék hozzáadásával állítottuk le az enzimet, majd centrifugálással (5 perc, 500g) ülepítettük a sejteket.

Az életképes sejtek számának meghatározása:

A pellet sejtjeit 1 ml PBS-sel szuszpendáltuk, majd a szuszpenzióból 50 µl-t vettünk ki. A sejtuszuszpenziót ugyanennyi 0,5%-os tripánkék oldattal megfestve, Bürker kamrával számoltuk a sejteket: A tripánkéket kizáró sejtek életképesek voltak, a megfestődött sejtek elpusztultak.

Metafázisos blokk:

A sejtszám meghatározása után a sejteket colcemiddel kezeltük, ezzel megakadályozva azok következő sejtciklusba lépését (Banfalvi et al., 1984). A sejtszám függvényében 0,2 ng/ml colcemidet tartalmazó médiumot adtuk a sejtekhez, majd két órán át inkubáltuk. Ennek leteltével a sejteket kétszer átmostuk PBS-sel.

Ozmotikus duzzasztás:

A sejtek ozmotikus duzzasztása során használt Swelling puffer mennyisége az élő sejtek számának függvénye: 10<sup>6</sup> sejt/ml. A sejteket Swelling oldatban 10 percig inkubáltuk. Az inkubálás után a duzzasztóoldatot centrifugálással távolítottuk el (5 perc, 500g).

A sejtmagok izolálása, fixálása:

A sejtmagok izolálása során a pellet sejtjeihez cseppenként folyamatosan kevergetve 1 ml frissen elkészített, 3:1 arányú metanol-jégecet oldatot adagoltunk. Ezután a sejtmagokat lecentrifugáltuk (5 perc, 500g), majd kétszer újra átmostuk.

A sejtmagok belső struktúráinak feltárása:

A sejtmagok kromatin struktúráinak feltárásához a fixáló oldatban felvett sejtmagokat Pasteur-pipettával körülbelül 30 cm magasságból tárgylemezre cseppentettük. A tárgylemezeket ezután egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten – pormentes helyen száradni hagytuk, és másnap felszálló alkoholsorban (70%, 90%, 95%, 100%) víztelenítettük.

Kromatin szerkezetek vizsgálata:

A tárgylemezeken lévő víztelenített mintákat 20µl DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)-Antifade fluoreszcens festékkel festettük, majd 24×50 mm méretű fedőlemezzel lefedtük, és fluoreszcens mikroszkóppal (Carl Zeiss Compound Universal Microscope III RS 46-62-49-9903 fluorescence vertical illuminator, objektív: Neofluar, oil 100X1,30) vizsgáltuk.

A micronucleus index meghatározása: a micronucleusok számát az összes sejtmaghoz viszonyítottuk. A kontroll és a kezelt tenyészetek sejtmag izolátumaiban 1000 kromatin struktúrát vizsgáltunk meg micronucleus jelenlétét keresve

### **3.5. A vizsgáltok során felhasznált vegyszerek és oldatok**

#### **3.5.1. Vegyszerek**

Az arany nanorészecskék (Sigma-Aldrich St. Louis MO, 100 nm átmérőjű, OD 1) citrát pufferrel stabilizált szuszpenziója.

Betadine az Alcon Laboratories, Inc. (Fort Worth). terméke, 100 mg/ml Providon-jód komplexet tartalmaz, ez 10 mg/ml szabad jódnak felel meg.

A DABCO (1,4-diazobicyclo-(2,2,2) -octane) a Sigma-Aldrich terméke (St. Louis, MO).

2,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) a Braunschweig Chemie terméke (Braunschweig, Germany).

Dextran T-150 a Pharmacia-Biochemicals-tól származik (Uppsala, Svédország).

Dublecco's Modified Eagle's tápfolyadék a Sigma-Aldrich terméke. A sejtek tenyésztéséhez a médiumot 10% FBS-sel (foetális borjú vérsavó) és 1% PSN-nel (penicillin streptomycin neomycin oldat) egészítettük ki.

Dublecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F12-Ham tápfolyadék a Sigma-Aldrich terméke. A sejtek tenyésztéséhez a médiumot 10% FBS-sel (foetális borjú vérsavó) és 1% PSN-nel (penicillin streptomycin neomycin oldat) egészítettük ki.

Colcemid (N-methyl-N-deacetyl-colchicine) a Boehringer terméke (Mannheim, Németország).

Collagenase IV, a GIBCO BRL, Life Technologies (Gaithersburg, MD) terméke.

Eusenol C az Alchimia SRL (Padova, Olaszország) terméke, a cornea transzplantáció előtti tárolására szolgál, 143 µg/ml gentamycint tartalmaz.

Ezüst kolloidot a DrJuice Co (Miskolc Magyarország) forgalmazza. Ez 20 ppm töménységű ezüst kolloid oldat, tisztított, deionizált vízben.

FBS: embrionális borjú vérsavó. A GE Healthcare Life Sciences, PAA Laboratories terméke.

Az Oculogutta chloramphenicoli (chloramphenicol szemcsepp), a DEOEC egyetemi gyógyszertár készítménye. Az OGYI Formulae Normales VII. szerinti összetétele: 0,05g chloramphenicol 10,0 ml fiziológiás sóoldatban.

Az Oculogutta Rifampicini (rifampicin szemcsepp), a DEOEC egyetemi gyógyszertári készítménye. Az OGYI Formulae Normales VII. szerinti összetétele 0,01g rifampicin 10,0 ml fiziológiás sóoldatban.

PSN: Penicillin Steptomycin Neomycin oldat, ami 5000 unit penicillint, 5 mg streptomycint és 10 mg neomycint tartalmaz milliliterenként. A Sigma-Aldrich terméke.

RPMI 1640 tápfolyadék a Sigma-Aldrich terméke. A sejtek tenyésztéséhez a médiumot 10% FBS-sel és 1% PSN-nel egészítettük ki.

Többfalú szén nanocsövek (MWCNT) Az ipari tisztaságú (85%) nanocsöveket a Sun Innovations Inc (Fremont, CA, USA) (<http://www.nanomaterialstore.com>) biztosította. Fajlagos felületük: > 200 m<sup>2</sup>/g, térfogat-sűrűségük 0,14 g/cm<sup>3</sup>, valódi sűrűségük: ~2,1 g/cm<sup>3</sup> előállításuk módja: gőzfázisú kémiai leválasztás.

### **3.5.2. Oldatok**

Az antifade médium: 90% glycerol 2% (w/w), DABCO 20 mM, Tris-Cl pH 8.0, 0.02% nátrium-azid és 25 ng/ml DAPI a DNS kék fluoreszcens festéséhez.

A sejtmagizolálás során használt duzzasztó Swelling puffer: 50 mM KCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 3 mM dithiothreitol és 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 8.0.

A kromatin szerkezetek fixálásához használt oldat: frissen kevert metanol és jégcet 3:1 arányú elegye.

## 4. EREDMÉNYEK

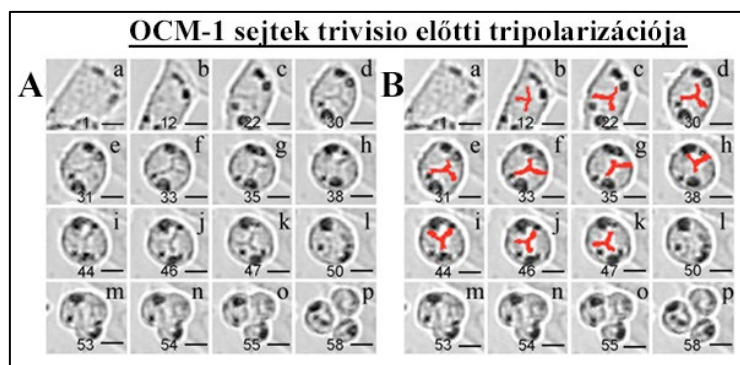
### 4.1. Uveális melanóma sejtek morfológiai vizsgálata long-term scann rendszerrel

A vizsgálatok során aneuploid sejtek, köztük az OCM-1 uveális melanóma (közel tetraploid) és egyéb sejtípusok (HeLa (hipertriploid), HaCaT (hypertetraploid) CCL 209 (közel diploid)) esetében is megfigyeltünk spontán „rendellenes”, háromfelé történő osztódásokat a normál (kontroll) tenyésztés során. A jelenség a trivisio elnevezést kapta. A folyamatot kvalitatív és kvantitatív szempontból vizsgáltuk a tenyészetekből kiválasztott, egyedi sejteken.

### 4.1.2. Videó mikroszkópos vizsgálatok egyedi OCM-1 sejteken: multipoláris sejtosztódás

#### *Kvalitatív jellemzők*

Először a trivisio folyamatát, annak lezajlását, vettük figyelembe. A háromirányú multipoláris sejtosztódás kezdeteként megfigyeltük a sejtmag anyagának háromfelé, 120 fokban történő szétválását, ami később az egész sejtre kiterjedt. A közel tetraploid uveális melanóma sejtekben a háromfelé történő sejtosztódás karakterisztikus morfológiai indikátoraként azonosítottuk a maganyag három irányba történő polarizációját (6. ábra).



6. ábra: OCM-1 sejtek tripolarizációja, és hármes osztódása

A: trivisio folyamata, B: tripolarizáció (a képek alján lévő számok az időt jelzik percben)

A jellegzetes morfológiai jegyet a trivisiók indikátoraként azonosítottuk és tripolarizációként neveztük el. A tripolarizáció alapján határozható meg a három létrejövő leánysejt helyzete. A 6. ábra a sejt hármes osztódását mutatja be a monolayerből való felválástól kezdve, amit a sejt lekerekedése, majd a maganyag hármes osztódásokra jellemző, kormánykerékre emlékeztető háromágú szerkezetének kialakulása követett. A 6. B ábrán bejelöltük az utódsejtek

kialakulásának irányát, melyet piros színnel emeltünk ki. A folyamat előre haladtát percben fejeztük ki a kép alján. A melanóma sejtek vizsgálata alapján a hármas osztódás átlagosan 58 percet vett igénybe (6. ábra a-p), amelyből a citokinezis körülbelül 10 perc alatt zajlott le (6. ábra l-p). Az OCM-1 sejtek a tripolarizációs elhelyezkedése alapján a nukleáris anyag a síkháromszög geometriája szerint rendeződött el, és a három sugár  $\sim 120$  fokot zárt be egymással, a legtávolabb elhelyezkedve a legstabilabb állapotba kerülés érdekében. A trivisio folyamán azonban a hipertriploid és közel tetraploid sejtek diploid állapotba való visszatérése során a maganyag egyenlőtlenül oszlik el az utódsejtek között, ami a maganyag trigonális elrendezésből való részleges kizáródásához vezethet.

### ***Kvantitatív jellemzők***

A trivisio folyamatát a következő számszerűsíthető paraméterekkel jellemeztük: trivisiók időtartama, gyakorisága leánysejtek mérete. Ezek megállapításához az uveális melanóma sejtek mintegy 60 órás időtartamot felölelő képszekvencia analízise során 37 normál sejtosztódást és 6 multipoláris osztódást figyeltünk meg.

1.) Osztódási idők: A mérés startpontja az osztódásra, trivisióra készülő sejt mitotikus felválása előtti képfelvétel, a végpont pedig a létrejött leánysejtek letapadása volt. A trivisiók a normál osztódáshoz képest az uveális melanóma sejteknél jelentősen hosszabb ideig tartottak, a ketté osztódás OCM-1 sejteknél  $28,8 \pm 8$  perc, HaCaT sejteknél  $41 \pm 5$  perc; a hármas osztódás OCM-1 sejteknél  $67,7 \pm 50$  perc, HaCaT sejteknél  $56 \pm 22,3$  perc. A HeLa sejteknél nem tapasztalunk jelentős eltérést. Konkrét időtartambeli eltérést azonban a sejt kultúrában pontosan nem tudtunk meghatározni az osztódások alacsony száma azok nehéz követhetősége és az azok során fellépő fluktuációk miatt. A fluktuációkat befolyásolja a sejtek ploiditása, és a három felé vándorló maganyag eloszlása az utódsejtekben, melynek pontos számszerűségeit még nem ismerjük.

2.) Sejtméret változása: A normális sejtosztódás során az anyasejtek mérete a két utódsejt méretének közel kétszerese. A leánysejtek mérete HaCaT sejteknél  $\sim 50\%$ , míg az OCM-1 sejteknél  $\sim 43\%$ , ami a sejtalkotók közel egyenlő megoszlására utal az utódsejtek között. A hármas osztódást követően az utódsejtek átlag mérete HaCaT sejteknél  $\sim 32\%$ -a volt az anyasejtnél, OCM-1 sejtek esetén a leánysejtek mérete  $\sim 22\%$ -a volt a progenitor sejtnek. Ezek az értékek jelzik, hogy a multipoláris osztódás során a sejtek anyagának egy részét elvesztették. A sejtméretet ugyanazon sejt letapadt és lekerekedett állapotban lemért átmérője és térfogata alapján határoztuk meg.

3.) A trivisiók gyakorisága: A hármas osztódások gyakoriságát a következőképpen határoztuk meg:

- A) A trivisiók számát viszonyítjuk az összes osztódás számával, CCL 209: 0,0071% (1/1400); HaCaT: 0,079% (1/126); OCM-1: 0,27% (1/37) HeLa: 0,42% (1/24)
- B) Relatív gyakoriság, ami a képkalkotás (vizsgált képszekvenciák száma) és a képszekvenciákon talált összes hármas osztódás számának hányadosát jelöli. HaCaT: 9/18 (0,50); OCM-1: 31/79 (0,39); HeLa: 10/46 (0,22); CCL 209: 1/10 (0,1)

Trivisióként azonosított osztódások az OCM-1, a HeLa (humán cervix carcinoma), HaCaT, és a közel diploid CCL 209 (szarvasmarha pulmonális endothel) sejttenyészetek esetében is megjelentek, a 2. táblázat tartalmazza a vizsgálatok eredményeit.

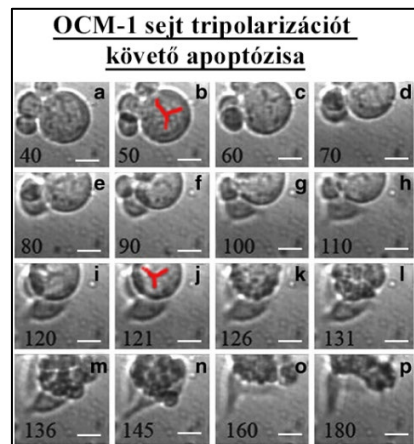
Sejtvonal Ploiditás		HaCaT hipotetraploid	OCM-1 közel tetraploid	HeLa hipertriploid	CCL 209 közel diploid
Anyasejt átmérője ( $\mu\text{m}$ )	Normál	24,4 $\pm$ 1,34	20,7 $\pm$ 16,8	16,6 $\pm$ 0,68	31,7 $\pm$ 15,1
	Trivisio	28,9 $\pm$ 8,45	25,5 $\pm$ 16,8	15,9 $\pm$ 4,6	36,055
Utódsejtek átmérője ( $\mu\text{m}$ )	Normál	16,7 $\pm$ 7,6	17,1 $\pm$ 12,1	12,9( $\pm$ 0,7)	-
	Trivisio	19,26 $\pm$ 0,68	14,1 $\pm$ 1,65	9,17 $\pm$ 4,12	17,29 $\pm$ 6,06
Normál osztódási idő (perc)		41 ( $\pm$ 5.2)	28.8 ( $\pm$ 8.5)	34 ( $\pm$ 6.3)	15 ( $\pm$ 4.7)
Trivisio időtartama (perc)		56 ( $\pm$ 22.3)	67.7 ( $\pm$ 50.7)	35 ( $\pm$ 7.4)	16
Trivisio/normál osztódás		1/126 (7.9 x 10 <sup>-3</sup> )	1/37 (2.7 x 10 <sup>-2</sup> )	1/24 (4.2x10 <sup>-2</sup> )	1/~1400 (7.1x10 <sup>-4</sup> )
Trivisio/TLK		9/18 (0.50)	31/79 (0.39)	10/46 (0.22)	1/10 (0.1)

2. táblázat: Multipoláris osztódások sejtméretei, időtartama és gyakorisága.

A sejtek átmérőjét  $\mu\text{m}$ -ben, az osztódási időt percen adtuk meg TLK= képkalkotás

A hármas osztódások a sejtpopulációkban végbemenő osztódásoknak csupán néhány százalékát teszik ki. A közel tetraploid sejtek esetében ez a szám nagyobb volt: OCM-1 sejteknél 0,3%, a hipertriploid HeLa sejtek esetében ennél magasabb, 0,4%. Továbbá hipotetraploid HaCaT sejtek esetében 0,08%, diploid sejteknél 0,007%-os arányban figyeltük meg (2. táblázat) ezt a jelenséget. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az *in vitro* megfigyelt arányok *in vivo* körülmények között hasonlóak lehetnek, különösen a hipertriploid állapothoz közeli sejteknél.

A trivisiók során a leánysejtek szinte minden esetben életképesek maradtak, de előfordult, hogy a folyamat a sejt pusztulásával végződött, viszont ez a vizsgálat során csak egy esetben következett be: megfigyeltünk egy extrém nagyméretű uveális melanóma sejtet, amely már a tripolarizációs állapotába lépett, majd apoptózist szenvedett. Az apoptózist (7. ábra) a fokozatosan végbemenő sejtösszehúzódnás, (a-j) a hólyagosodás (blebbing) (k-l) és az apoptotikus testek (m-p) megjelenése alapján azonosítottuk.



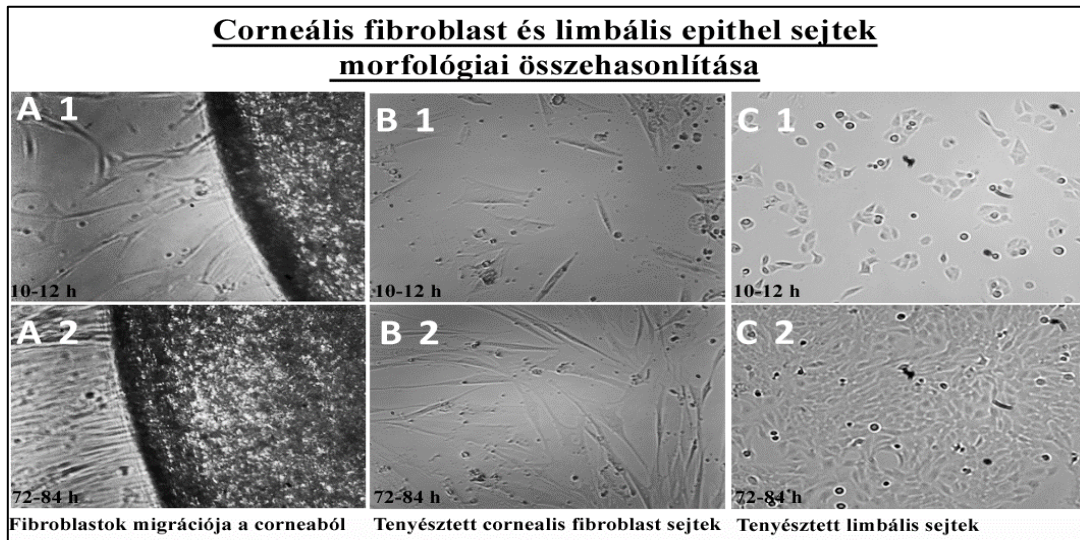
7. ábra: OCM-1 sejt tripolarizáció utáni apoptózisa

A képek alján lévő számok az időt jelzik percben.

A tény, hogy a tripolarizáció különösen ritkán vezet a sejtek pusztulásához (7. ábra), arra enged következtetni, hogy a kisméretű, hármas osztódáson átesett sejtek hosszútávon életképesek maradhatnak. A citokinezis hármas osztódásként megjelenő zavara nem okozott változást a növekedési dinamikában, sem az apoptotikus rátában. Mindazonáltal a hipertriploid, hipotetraploid és a közel tetraploid sejtek diploid állapotba való visszakerülési tendenciája a sejtmaganyag nem várt feldarabolódását eredményezheti, ezzel indukálva a heterogén aneuploiditást és ezzel a tumor sejtek rosszindulatú elfajulását.

#### 4.2. Limbális eredetű sejtek vizsgálata: felszíni corneális regeneráció modellezése limbális eredetű monolayeren

A corneális sebgyógyulás vizsgálatára limbusból származó őssejteket, HuLi-t (humán limbális sejtek) használtunk.



8. ábra: Fibroblast és limbális sejtek morfológiai összehasonlítása (objektív:10x0,25).

A: fibroblast sejtek migrációja a corneából, B: fibroblast sejtenyészet, C: limbális sejtenyészet

A limbális sejtek izolálását követően a második átoltásból származó sejtpopulációt az alábbi sejtfelszíni markerekre vizsgáltuk meg, és a következő eredményeket kaptuk.

Marker	Reakció
CD31 endotheliális marker	-
CD34 endotheliális/őssejt marker	-
S100 neurogén marker	-
Vimentin mezenhmális marker	-
Cytokeratin 19 epidermális marker	+

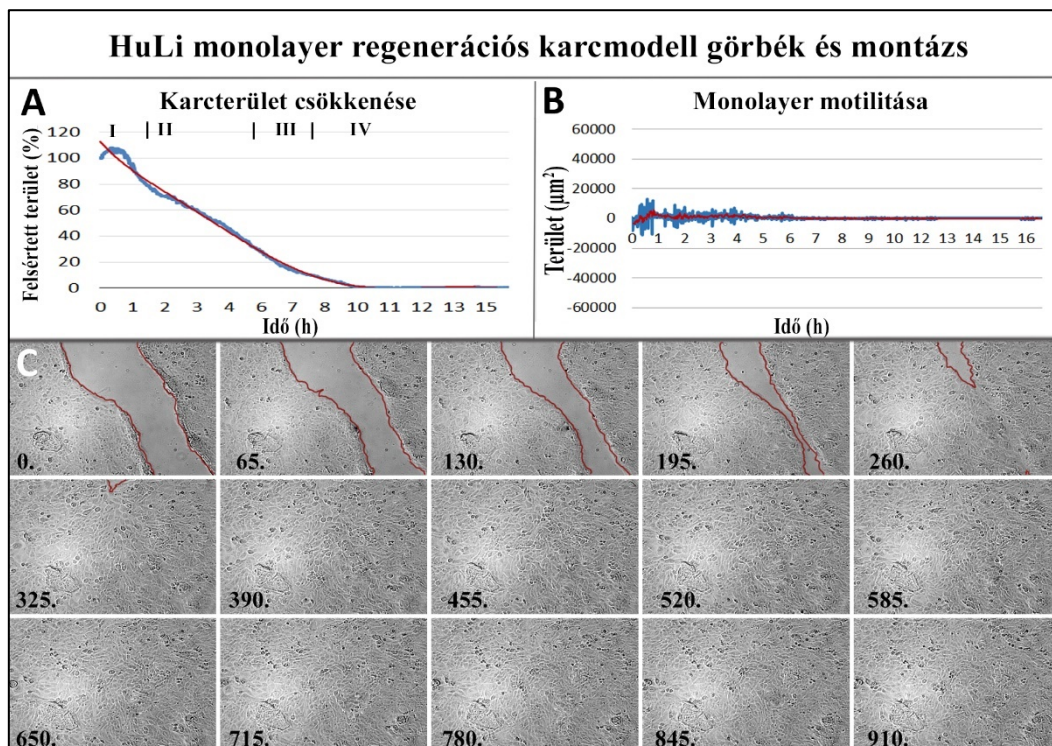
3. táblázat: Limbális sejteken vizsgált markerek

A limbális eredetű HuLi sejtek a vizsgálataink alapján morfológiailag azonosnak tekinthetők a 20. átoltás után is: epithel jellegű poligonális alakú sejtek, kisméretűek, nagy a sejtmagjuk a citoplazmához viszonyítva, illetve a citoplazma nem mutat szemcsézettséget. A HuLi citokeratin 19 markerre adott pozitív reakciója (3 táblázat) a sejtek őssejt voltára utalt (Kasper et al., 1988).

#### 4.2.1. A sérült monolayer regenerációjának vizsgálata time-lapse videó mikroszkópiával

A felsértett sejtprésitok vizsgálata során felvettük a folyamatot jellemző regenerációs görbét, amely lefutása szerint négy regenerációs fázist különböztettünk meg (10. ábra A).

- I. Első felnyílási- és visszatapadási szakasz, vagyis a késleltetett fázis, ami körülbelül 90-110 percen keresztül tart, kezdő meredek növekedést mutat, amit az életképes sejtek újbóli kitapadása okoz a felsértett monolayer peremén.
- II. A második szakasz, az exponenciális fázis, a valódi regenerációs folyamatok kezdő fázisa, mely során a sejtek újból benövik a sérült területet. Ez a szakasz a kontroll tenyészetek esetében újabb 120-130 perc időtartamot ölelt fel.
- III. A harmadik, ami egy átmeneti szakasz a logaritmikus és a stacioner fázis között, a felsértett régió záródási ideje. Ekkor a monolayer mozgásai miatt a felsértett területen még előfordulhatnak időszakosan sejtmentes részek. A kontroll sejt populációknál ez a szakasz közel 35-45 percen keresztül tartott.
- IV. A negyedik szakasz a stacioner fázis, mely a kezeltelen monolayeretek esetében 250-320 percig tartott.

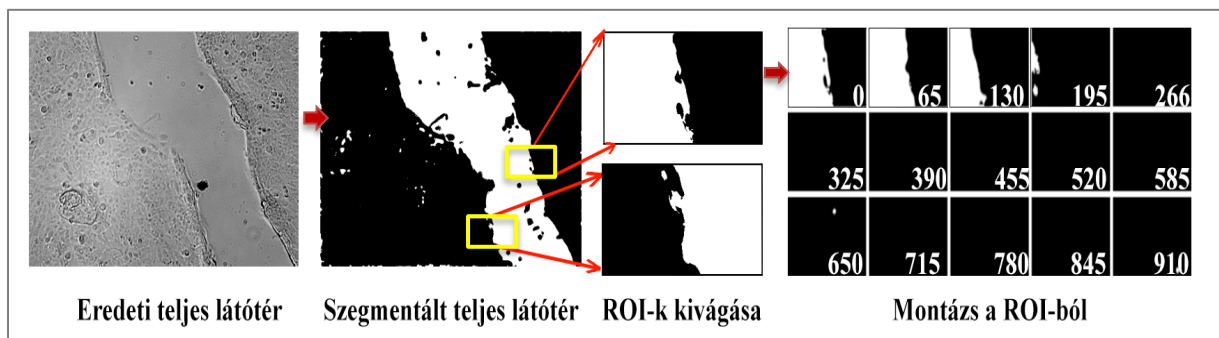


9. ábra: A regenerációs karcmodell.

A) Karcterület csökkenése, B) Karcszélek motilitása, C) Time-lapse felvételekből készült montázs (a feltüntetett számok az időt jelentik percben)

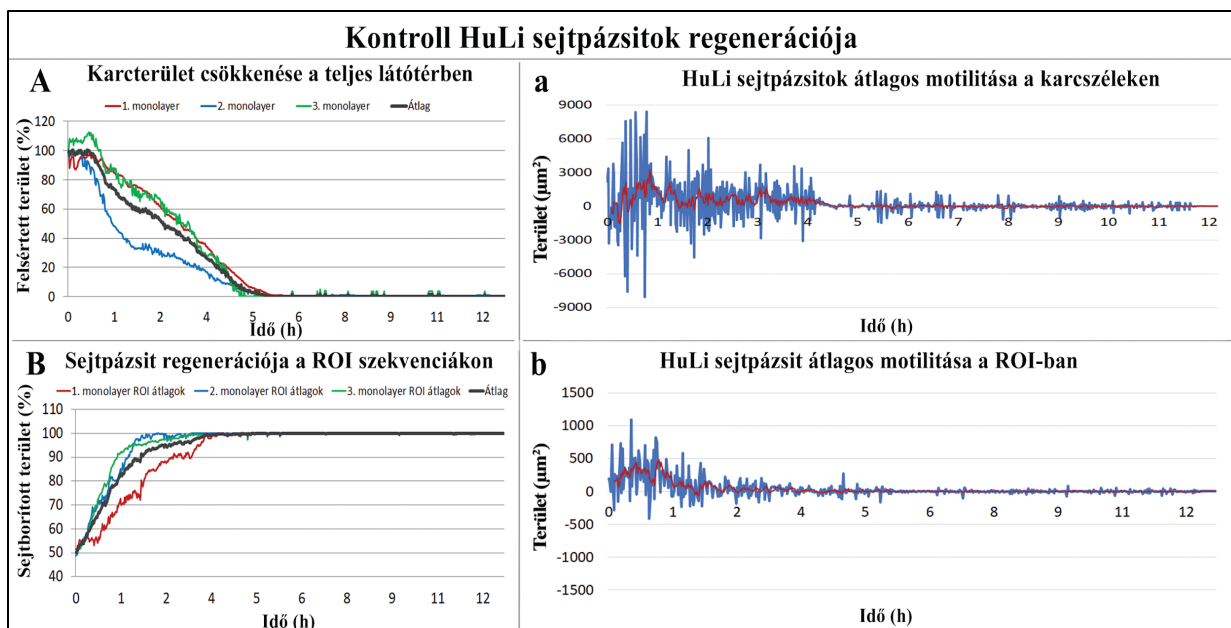
Az „A” görbén a kontroll monolayer regenerációs görbéjének egyes szakaszait római számokkal jelöltük. A „B” jelű görbe a monolayer kiterjedésének percenkénti ingadozásait mutatja be, a regenerációs görbe adatpontjainak különbségét, az idő függvényében ábrázolva. A pozitív oszcillációt a sejtek visszatapadása, a sejtosztódás és a befelé irányuló migrációja idézte elő; míg a negatív kimozdulásokat az karc következtében sérült sejtek apoptózisa, kifelé irányuló migráció, az időleges és végleges sejt zsugorodások, mitotikus felválások okozták. A limbális sejtenyészetek sérült sejtprésitjának teljes regenerációja mintegy 300-400 percet vett igénybe.

A limbális monolayer regenerációt kvantitatívan jellemző adat, a karc kiindulási területétől független motilitási érték (relatív terjedési sebesség) megállapításához a szekvenciákon kiválasztott 3-5 reprezentatív képrészleten -Region Of Interest (ROI) mértük le.



10. ábra: A ROI-k létrehozása

A ROI képrészletek a teljes karcszéleket jellemző olyan  $150 \times 300 \mu\text{m}^2$  nagyságú területek, melyek 50%-a a felszakadt, sérült részen, 50%-a pedig a sértetlen sejtprésiton helyezkedik el. Ez a karcok létrehozásának sajátosságaiból fakadó méretbeli különbözőségektől függetlenül, karcszélek és karc területek nagyságától indifferens módon adja meg a regeneráció során a karcszéli sejtek a felsértett területre irányuló motilitásának sebességét.



11. ábra: Kontroll HuLi monolayerek növekedési grafikonjai.

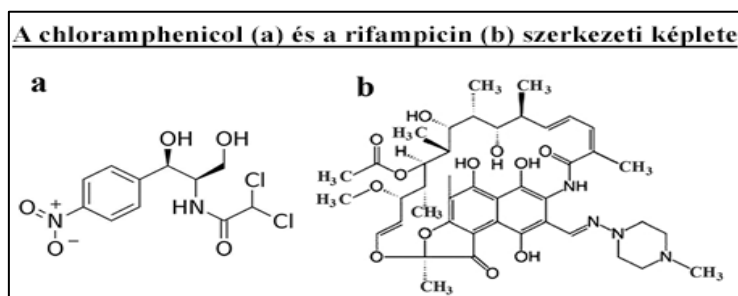
A: Karcterület csökkenése, a: Monolayer motilitása a karcszéléken B: Karc regeneráció a ROI szekvencián  
b: Monolayer motilitás a ROI szekvencián

A ROI-k regenerációs profiljait (11. ábra B) a reprezentáló motilitási görbék (11. ábra b) értékpontjainak átlagolásával határoztuk meg. A HuLi sejtpázsitot jellemző relatív terjedési sebesség:  $62,94 \pm 8 \mu\text{m}^2/\text{perc}$ .

## 4.2.2. HuLi monolayer regenerációs modell gyakorlati felhasználása

### 4.2.2.1. Chloramphenicol és rifampicin hatása a HuLi monolayer regenerációjára

A chloramphenicol összegképlete:  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$ ; a rifampicin összegképlete:  $\text{C}_{43}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_{12}$ , a szerkezeti képletüket a 12. ábra tartalmazza.



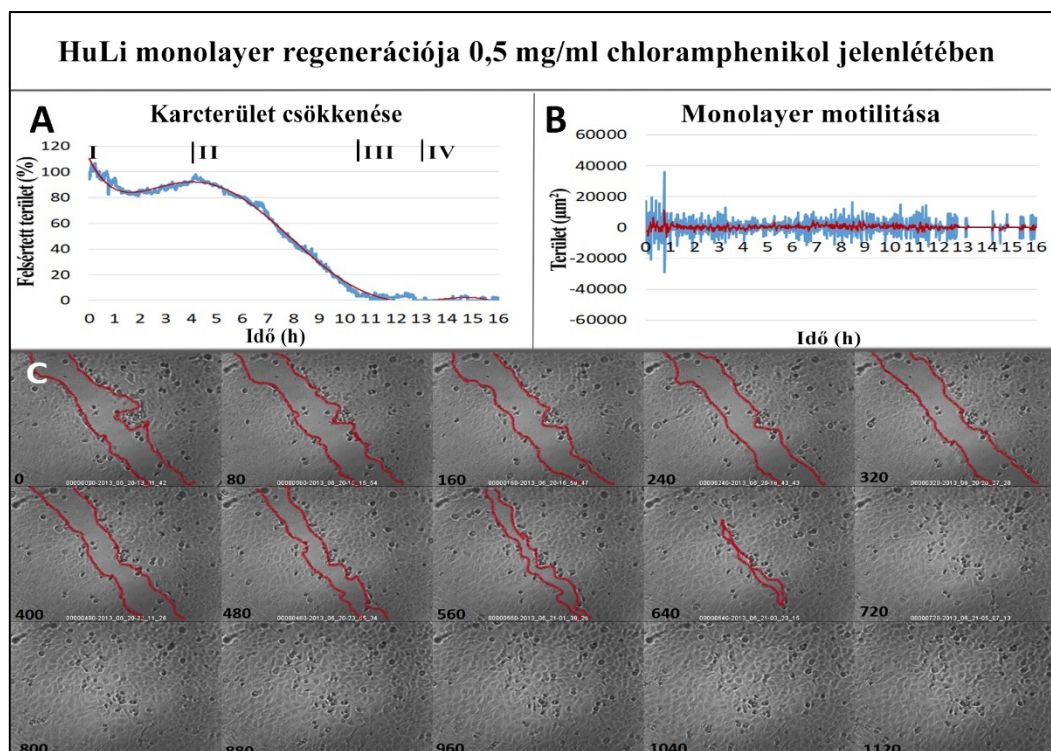
12. ábra: Az antibiotikumok szerkezeti képlete. a: chloramphenicol, b: rifampicin

### ***A monolayer regenerációja chloramphenicol jelenlétében***

A chloramphenicol jelenlétében megfigyeltük a monolayer regenerációjának négy jellegzetes fázisát.

#### *HuLi monolayer regenerációja 0,5 mg/ml chloramphenicolal kezelve*

A sejtpázsit regenerációja a 0,5 mg/ml koncentrációjú chloramphenicol (13. ábra) a kontrollal összehasonlítva időben hosszabb volt, azaz gátlódott. A sejtek visszatapadása és a karcterület regenerációja során megjelenő időbeli eltolódás oka az osztódó sejtek számának csökkenése volt, melyet a felvételeken is megjelenő, apoptózisra utaló reziduális testek jelenléte bizonyított.



13. ábra: A HuLi monolayer regenerációja 0,5 mg/ml chloramphenicol jelenlétében.

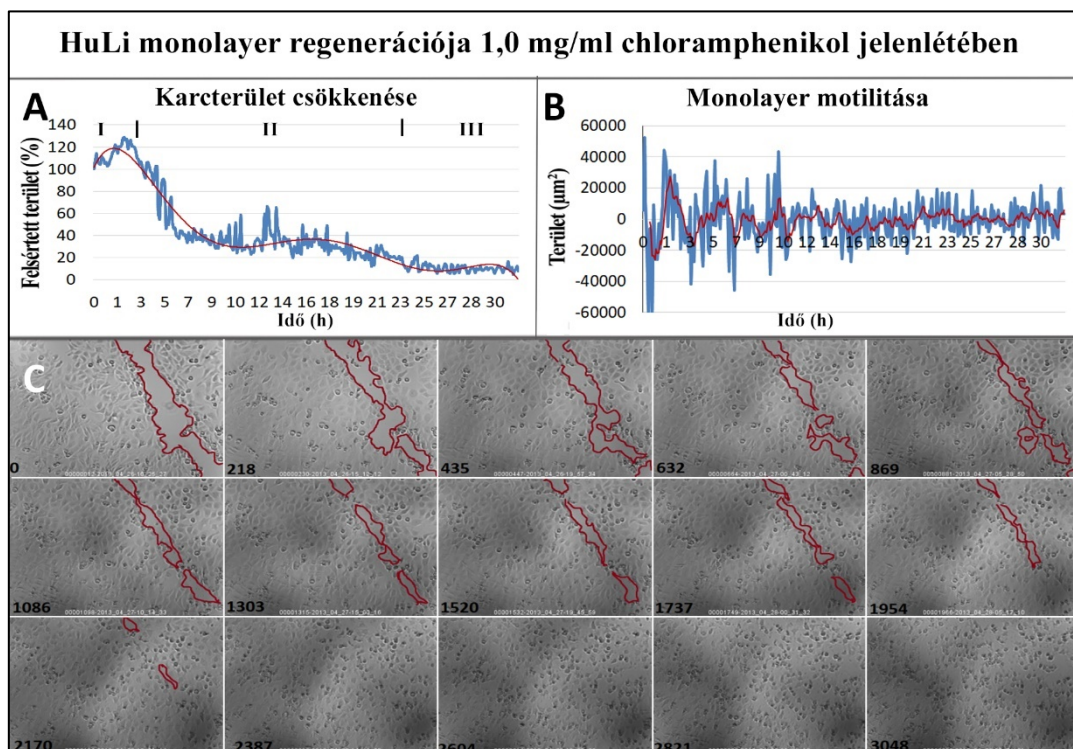
A) Karcterület csökkenése, B) Karcszélék motilitása, C) Time-lapse felvételekből készült montázs (a feltüntetett számok az időt jelentik percben)

A képanalízis adatai alapján a sejtek újbóli letapadása két és fél óra után indult meg (13. A ábra). A vizsgálat alapján a regeneráció késve, de teljesen végment és közel tizenegy órát vett igénybe. A regenerációt leíró görbe (13. A ábra) lefutása a kontrollhoz (9. és 11. ábra A és a része) képest elnyújtott, kevésbé meredek, főleg a visszatapadási fázis húzódott el. A gátló

hatást alátámasztja a karc kiindulási területétől független relatív terjedési sebesség, ami  $33,238 \mu\text{m}^2/\text{perc}$  értéket mutatott.

#### *HuLi monolayer regenerációja 1,0 mg/ml chloramphenicolal kezelve*

Magasabb chloramphenicol koncentrációnál (1 mg/ml), a felvételek alapján a regeneráció jelentősen elhúzódott, nem ment végbe, a teljes sejtborítottság 31 óra múlva sem alakult ki (14. ábra).

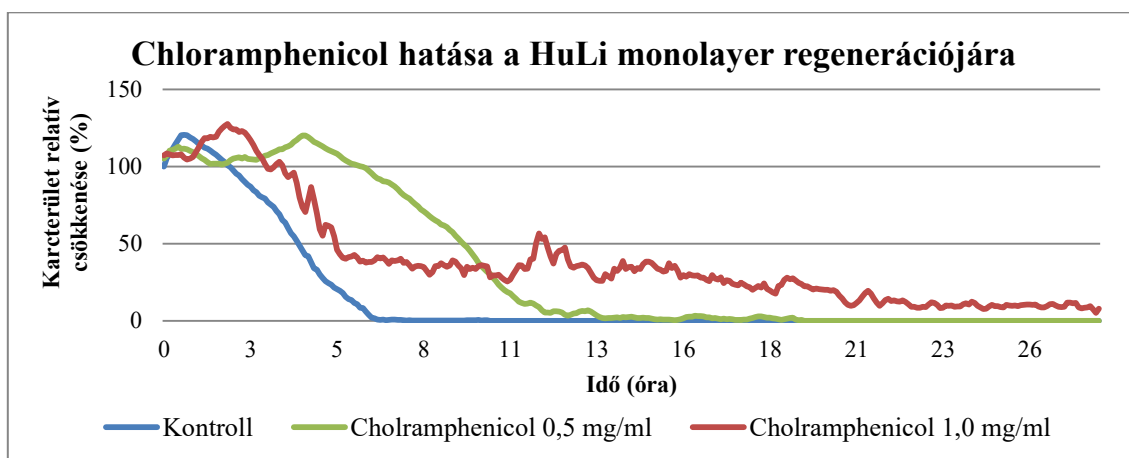


14. ábra: HuLi monolayer regenerációja 1 mg/ml chloramphenicol jelenlétében.

A) Karcterület csökkenése, B) Karc szélek motilitása, C) Time-lapse felvételekből készült montázs (a feltüntetett számok az időt jelentik percben)

A kezdeti nagymértékű felválást gyors visszatapadás követte; ezt követően a sejtek nagy hányada elpusztult, ezt a görbe II szakaszán a visszaesés is mutatja (14. A ábra). A regenerációs folyamat exponenciális szakasza körülbelül háromórás késéssel indult. A vizsgálat elején viszonylag sok lekerekedett sejtet figyeltünk meg, később azonban nagy részük elpusztult. A sérült felszín újbóli, közel konfluenssé válásának oka feltehetően a migráció volt (14. B. és C ábra). A sebszélek érintkezései után a konfluencia nem növekedett tovább (14. A ábra), a chloramphenicol jelenléte feltehetően gátolta a sejtosztódást. A karc szélek területváltozásait leíró görbén (14. B ábra), nagymértékű oszcillációk oka

feltehetően az erőteljesebb migráció, amely a vizsgálat végéig megmaradt, bizonyítva a teljes konfluencia hiányát. A felsértett sejtpázsit szélein a monolayer terjedési sebessége  $18,080 \mu\text{m}^2/\text{perc}$  volt.



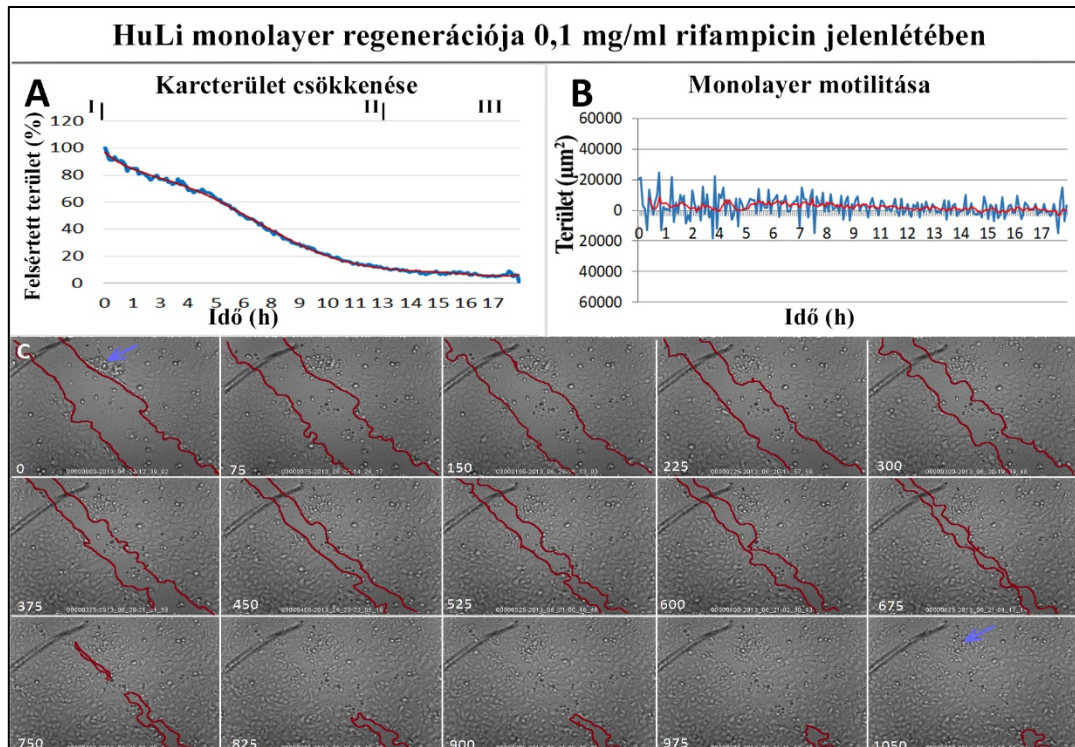
15. ábra: A HuLi monolayer regenerációja különböző chloramphenicol koncentrációk jelenlétében.

Az összehasonlító növekedési grafikon (15. ábra) szemlélteti hogy a kontroll tenyészethez képest a regeneráció a növekvő chloramphenicol koncentrációknál egyre hosszabb időt vett igénybe, a hatás dózis-függőnek mutatkozott.

### ***A monolayer regenerációja rifampicin jelenlétében***

#### *HuLi monolayer regenerációja 0,1 mg/ml rifampicinnel kezelve*

Már a kisebb terápiásan is alkalmazott 0,1 mg/ml koncentrációjú rifampicin is jelentősen megnövelte monolayer regeneráció 5-6 órás időtartamát 17-18 órára. A rifampicin hatására a regenerációs folyamatok lassulása következett be. A sejtpázsit növekedését reprezentáló görbén az egyes regenerációs szakaszok összemosódását figyeltük meg (16. A. ábra). A montázs képkockáin a felsértett, üres felszínt vörössel jelöltük (16. C ábra), és ezt az utolsó képkockán is be tudtuk jelölni, mivel a folyamat több mint 17 órát vett igénybe. Továbbá megfigyeltük, hogy karcolást követően a monolayer sebszélein megtapadt, elpusztult sejtek egészen a vizsgálat végéig megmaradtak, ezeket kék nyíllal jelöltük.



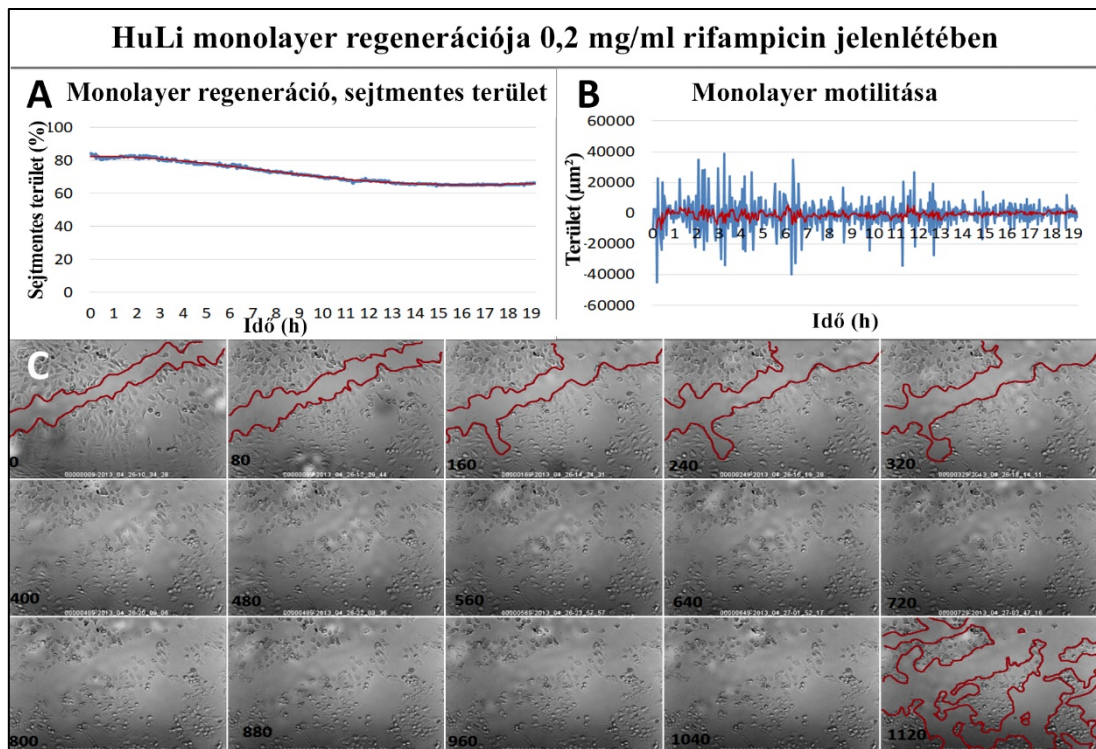
16. ábra: A HuLi monolayer regenerációja 0,1 mg/ml rifampicin jelenlétében.

A) Karcterület csökkenése, B) Karcszélék motilitása, C) Time-lapse felvételekből készült montázs (a feltüntetett számok az időt jelentik percben)

A regenerációs folyamat első fázisa késve indult el, és körülbelül 100 percig tartott. Az exponenciális fázis nem fejeződött be, a növekedés gátló hatásra a görbe kisebb meredeksége utalt (16. ábra A). Az átmeneti fázis a 930-1080. perc közé esett. A monolayer sebszélékre vonatkoztatott, karcterülettől független terjedési sebessége:  $15,069 \mu\text{m}^2/\text{perc}$  volt.

#### *HuLi monolayer regenerációja 0,2 mg/ml rifampicinnel kezelve*

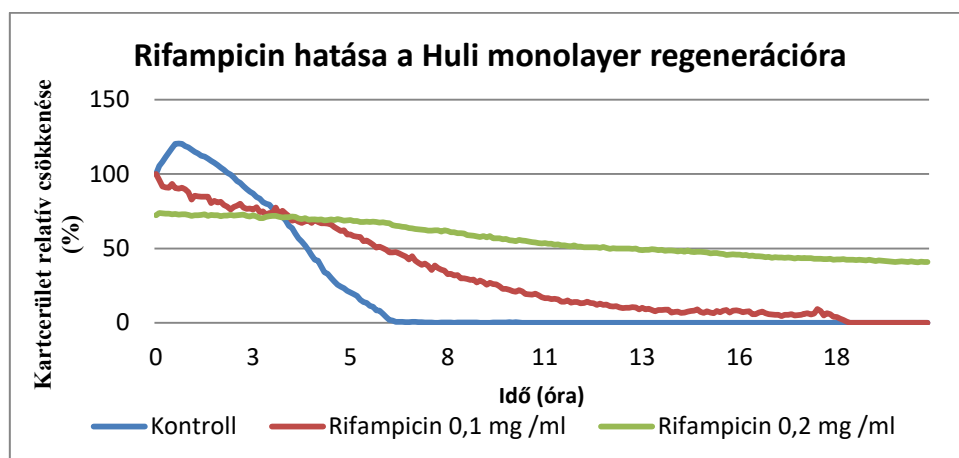
A rifampicin második, magasabb dózisban vizsgált koncentrációja 0,2 mg/ml volt, amely már citotoxikus hatással bírt. A monolayer regenerációs görbén (17. A ábra) az eddigiektől eltérően, a görbe a monolayer kiterjedésének csökkenését ábrázolja. Ennek oka a monolayer sejteinek pusztulása, vagyis a sejtpázsit paralízise és a sejtek pusztulása során végbemenő felválás és a sejtpázsit ebből következő felszakadozása után bekövetkező összehúzódása, zsugorodása. A monolayer percenkénti területváltozását leíró görbe oszcillációi is erre a folyamatra utalnak (17. B ábra).



17. ábra: A HuLi monolayer regenerációja 0,2mg/ml rifampicin jelenlétében.

A) Sejtpázsit zsugorodása, B) Karcszések motilitása, C) Time-lapse felvételekből készült montázs (a feltüntetett számok az időt jelentik percben)

A képszekvenciából készült montázon nyomon követhetjük a monolayer pusztulását: az elpusztult sejtek törmelékének, reziduális testeinek megjelenése, majd azok összetömörülése a monolayer felszakadozásával járt (17. C ábra), ez okból a sebszék karakterület független terjedési sebessége negatív értéket mutatott:  $-4,4398 \mu\text{m}^2/\text{perc}$  volt.



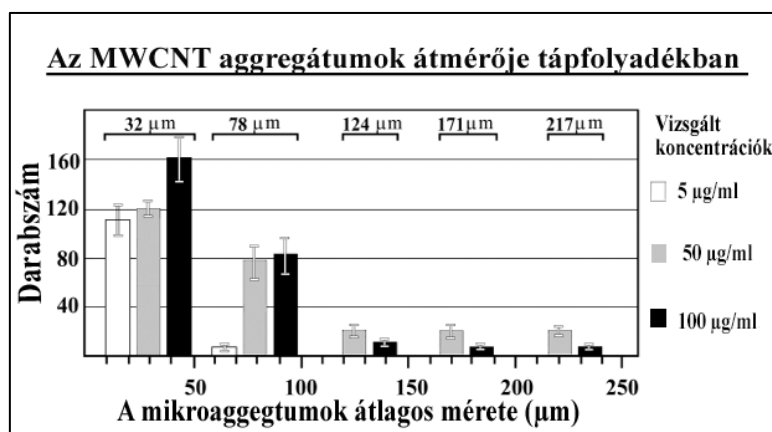
18. ábra: A HuLi monolayer regenerációja különböző rifampicin koncentrációk jelenlétében.

A második vizsgált antibiotikum, a rifampicin hatásaként (18. ábra) drasztikusabb növekedés csökkenést, és a monolayer még inkább elhúzódó regenerációját, illetve a sejtek pusztulását tapasztaltuk.

#### 4.2.2.1. Nanorészecskék hatása a HuLi monolayer regenerációjára

Vizsgálatunk során a nanorészecskék gyakorlati toxicitását ipari minőségű, többfalú szén nanocsöveken, esetleges gyógyászati alkalmazhatóságát tekintve inert fém nanorészecskék celluláris hatásain keresztül vizsgáltuk.

#### *Az ipari minőségű többfalú szén nanocsövek hatása a limbális monolayer regenerációjára*

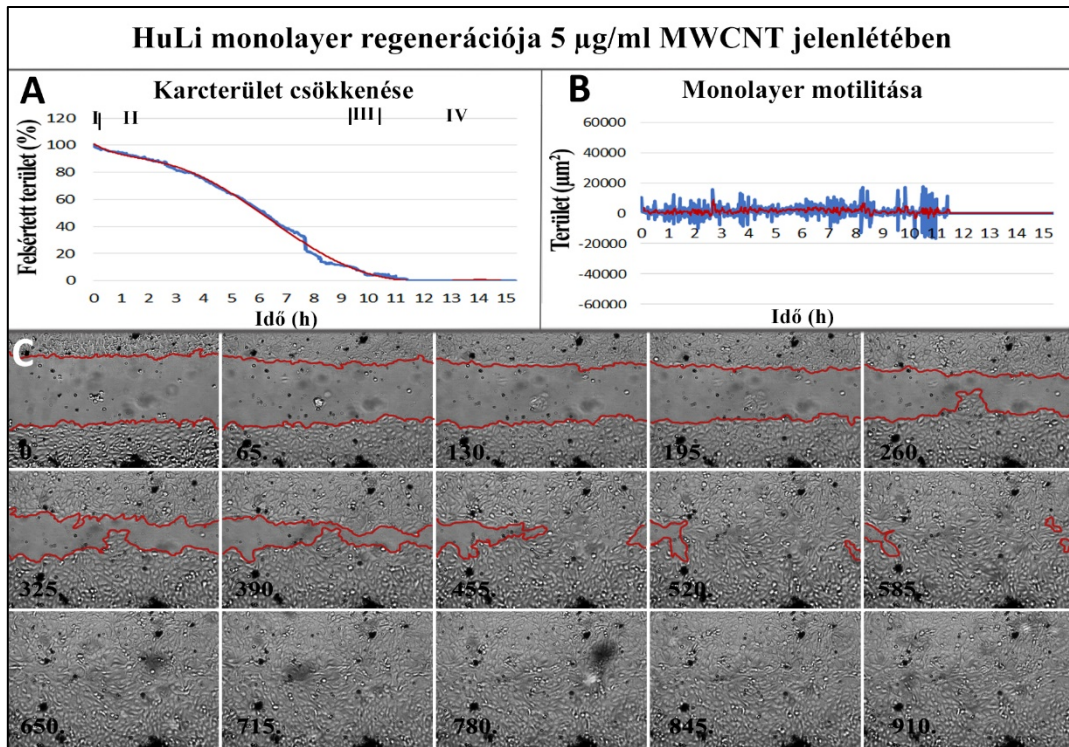


19. ábra: Aggregált MWCNT-k átlagos átmérője tápfolyadékban

Az MWCNT aggregátumok kialakulása alacsony koncentrációban (5, 10 µg/ml) alacsonyabb tendenciát mutatott, mint a közepes (50 µg/ml) és nagy (100 µg/ml) koncentrációkban (19. ábra). Ez a nanocsövek erős, nem-poláros karakterének köszönhető, és a tápfolyadékban elsődlegesen annak FBS tartalma miatt még inkább felerősödött. A legmagasabb koncentrációnál (500 µg/ml) képződött aggregátumok nagy mérete megakadályozta pontos mérésüket.

#### *HuLi monolayer regenerációja 5 µg/ml MWCNT jelenlétében*

A nanoszénecsövek jelenlétében megfigyeltük, hogy a regeneráció I. fázisa, a karc felnyílása, amit a felszakított sejtpázsit sérült sejtjeinek pusztulása, illetve a nem károsodott sejtek visszatapadása jellemez, a regenerációs görbéken (20-22. ábrák) jelentéktelen mértékű volt.



20. ábra: Monolayer regeneráció limbális sejteken, 5 µg/ml MWCNT jelenlétében.

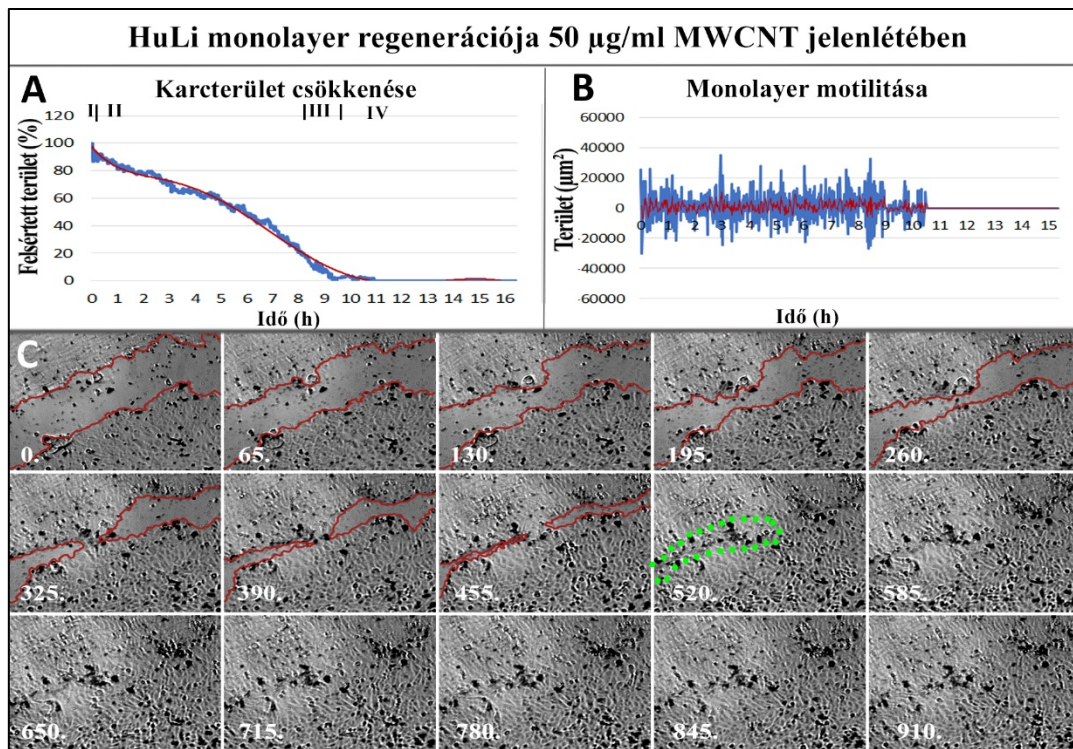
A) Karcterület csökkenése, B) Karcszélek motilitása, C) Time-lapse felvételekből készült montázs (a feltüntetett számok az időt jelentik percben)

Az 5 µg/ml koncentrációjú MWCNT-vel kezelt tenyészet regenerációs görbéjén megfigyelhető, hogy a sejtek gyors visszatapadása miatt az I. fázis mindössze néhány percet vett igénybe. A regeneráció további fázisai a kontrollhoz képest 1-1,5 órás késéssel mentek végbe. Az exponenciális fázis enyhén elnyújtott lefutású volt, és rövid átmeneti fázis követte (20. A ábra). A regeneráció körülbelül 580-620 percet vett igénybe. A karc területének nagyságától független relatív terjedési sebesség:  $41,21 \mu\text{m}^2/\text{perc}$  volt.

#### *HuLi monolayer regenerációja 50 µg/ml MWCNT jelenlétében*

Az 50 µg/ml-es és 100 µg/ml-es koncentrációnál a karcok szélein megtapadt nanocső mikro-aggregátumok mintegy hegszerűen jelezték a karcok záródásának helyét a regenerációt követően, melyek in vivo karcképződésre utalhatnak. Az ábrákon (21. 22. ábra C részei) ezt zöld pontozott vonallal rajzoltuk körül.

Az 50 µg/ml koncentrációtól a nanokarboncső aggregátumok a felvételeken nagy fekete foltok formájában jelentek meg (21. C ábra).



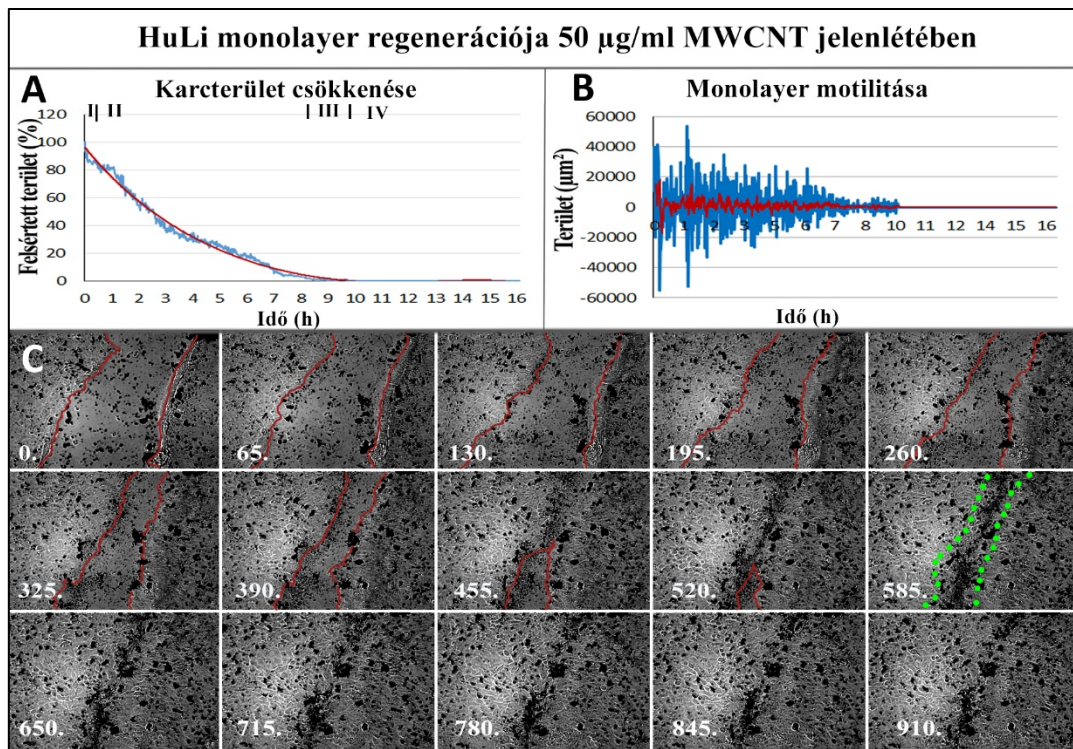
21. ábra: Monolayer regeneráció limbális sejteken, 50 µg/ml MWCNT jelenlétében.

A) Karcterület csökkenése, B) Karcszélek motilitása, C) Time-lapse felvételekből készült montázs (a feltüntetett számok az időt jelentik percben)

A felvételeken a karcszéli régiókban a karczáródás után is megmaradó kis mennyiségű reziduális testet figyeltünk meg. A visszatapadási fázis ez esetben is hiányzott, az exponenciális fázis enyhén elnyújtott lefutású volt és rövid átmeneti fázis követte. A karc záródása az 540-580. perc körül vált teljessé. A regenerációt jellemző a kiindulási karcterülettől független motilitás értéke:  $40,12 \mu\text{m}^2/\text{perc}$  volt.

#### *HuLi monolayer regenerációja 100 µg/ml MWCNT jelenlétében*

A 100 µg/ml koncentrációjú karbon nanocső jelenlétében a karcszéli sejtek felületére tapadt és a karcszélek közé kiüledett nanokarboncső aggregátumok a karc záródását követően a karc helyét megtartva a monolayerbe ágyazódtak és a monolayer felgyűrődését okozták (22. C ábra). A 100 µg/ml MWCNT jelenlétében megfigyelhető a regenerációs görbe fázisainak összemosódása: a rövid felnyílási szakaszt melyen belül gyors visszatapadás, a széli részeken felgyűrődés, majd enyhén elhúzódozó exponenciális regenerációs növekedési fázis és hosszabb átmeneti szakasz követte (22. A ábra).



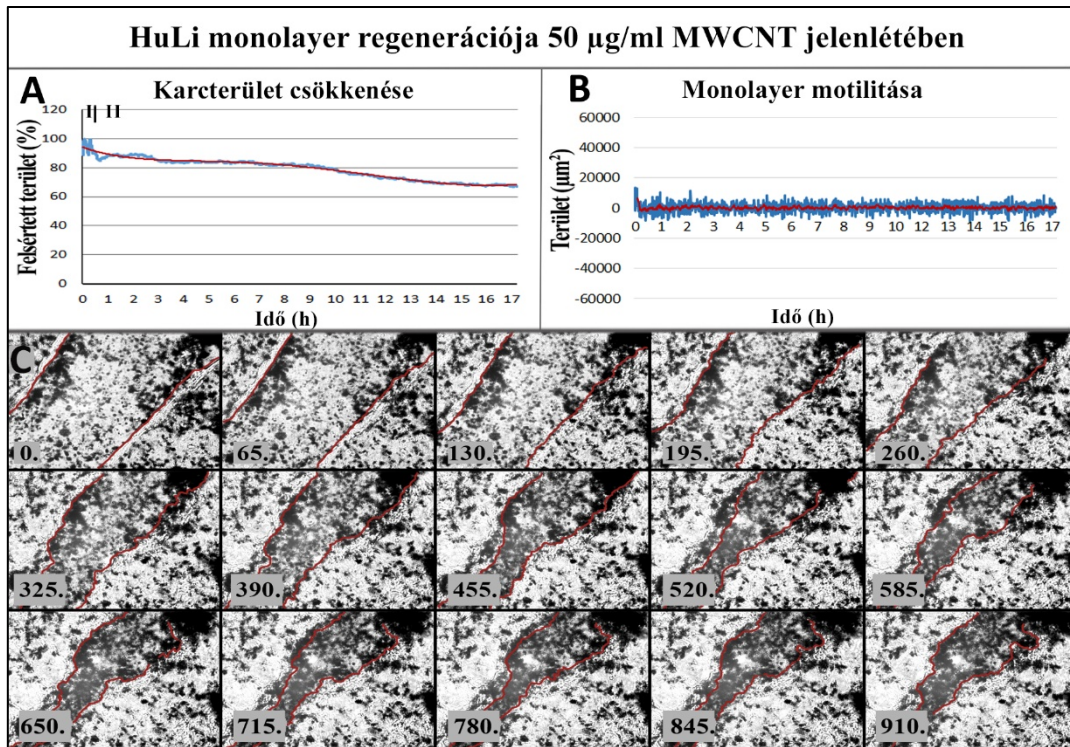
22. ábra: Monolayer regeneráció limbális sejteken, 100 µg/ml MWCNT jelenlétében.

A) Karcterület csökkenése, B) Karcszélek motilitása, C) Time-lapse felvételekből készült montázs (a feltüntetett számok az időt jelentik percben)

A nanocső aggregátumok által akadályozott és zavart migrációt a motilitás görbe megnövekedett mértékű oszcillációi jelezték. A karc záródása, az 540-590. perc körül történt meg, azonban a karc területének körülbelül 20%-át szén nanocső aggregátumok fedték, így a sejtek feltehetően alattuk mozogva zárták a karcot. A relatív monolayer terjedési sebesség értéke:  $38,9 \mu\text{m}^2/\text{perc}$  volt.

#### *HuLi monolayer regenerációja 500 µg/ml MWCNT jelenlétében*

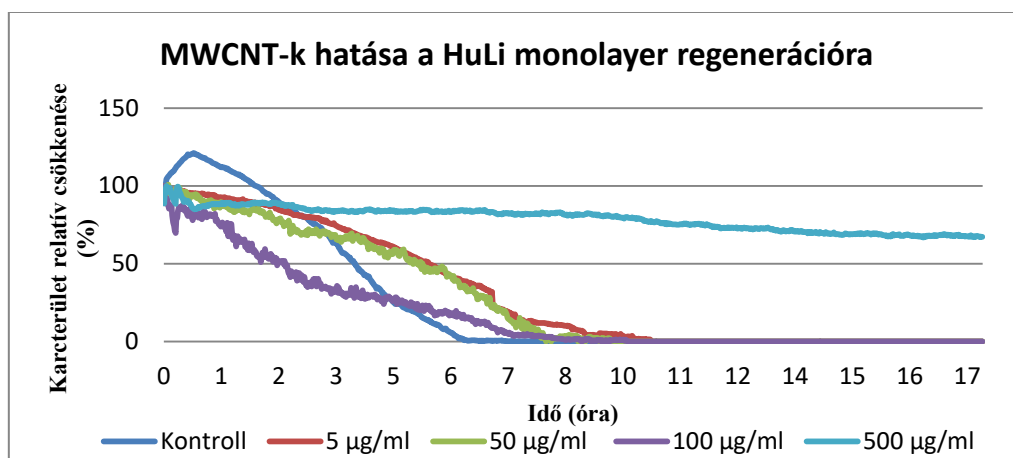
Az 500 µg/ml-es koncentráció esetében a felvételen (23. C ábra) látható, hogy a regeneráció elhúzódott, és a vizsgálat időtartama 18 óra alatt sem fejeződött be, illetve a nagyméretű aggregátumok jelenléte miatt a pontos mérés nem volt lehetséges. A monolayer szélein folyamat előrehaladtával a karcszélek közé tapadt aggregátumok miatt jelentős méretű felgyűrődés keletkezett, és megfigyelhető volt a reziduális testek jelenléte is.



23. ábra: Monolayer regeneráció limbális sejteken 500 µg/ml MWCNT jelenlétében.

A) Karcterület csökkenése, B) Karcszések motilitása, C) Time-lapse felvételekből készült montázs (a feltüntetett számok az időt jelentik percben)

A regenerációs görbe lefutása: felnyílási fázis, ezt valószínűleg a nanokarboncsövek akkumulációja, majd aggregációja okozta. A karczáródás nem következett be, a vizsgálat végén a görbe (23. A ábra) az exponenciális fázisban volt.



24. ábra: A HuLi monolayer regenerációja különböző szén nanocső koncentrációk jelenlétében

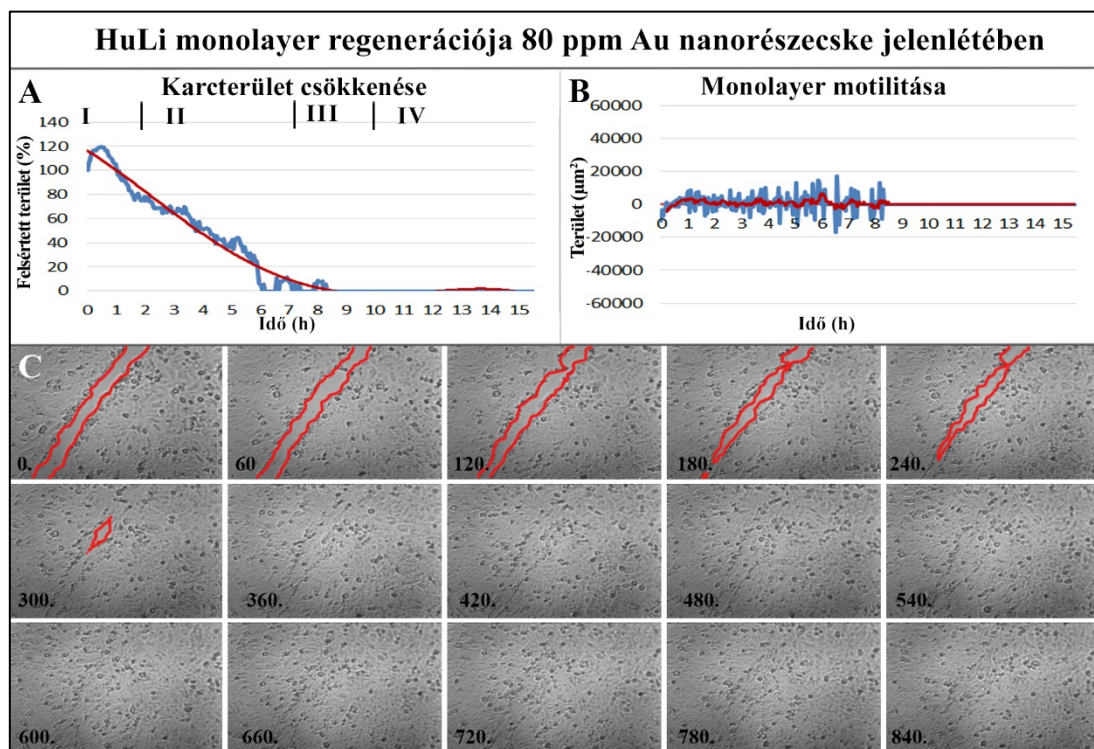
Az ipari minőségű többfalú nanokarboncsövek összehasonlító növekedési grafikonjain (24. ábra) megfigyelhető a dózissal arányos hatásuk, ami a sejtmigráció gátlásán és annak fizikai akadályozásán keresztül is megnyilvánult.

### **Arany nanorészecskék hatása a limbális monolayer regenerációjára**

A vizsgálatunk során a nagyobb méretű 100 nm átmérőjű, kevésbé toxikus hatású, (Kim et al., 2012) arany nanorészecskéket tanulmányoztuk.

#### *A monolayer regenerációja 80 ppm arany nanorészecske kezelést követően*

Alacsony arany nanorészecske koncentrációnál (80 ppm) a regeneráció időtartama körülbelül megegyezett a kezeletlen monolayer regenerációjának idejével (9. és 11. ábra A és a része). A regenerációs görbe (25. A ábra) első fázisában, a karc felnyílásakor, a karc a kiindulási méretéhez képest közel 60%-os növekedést tapasztaltunk. A karc felnyílási szakasza 25-30 perces időtartamú volt.



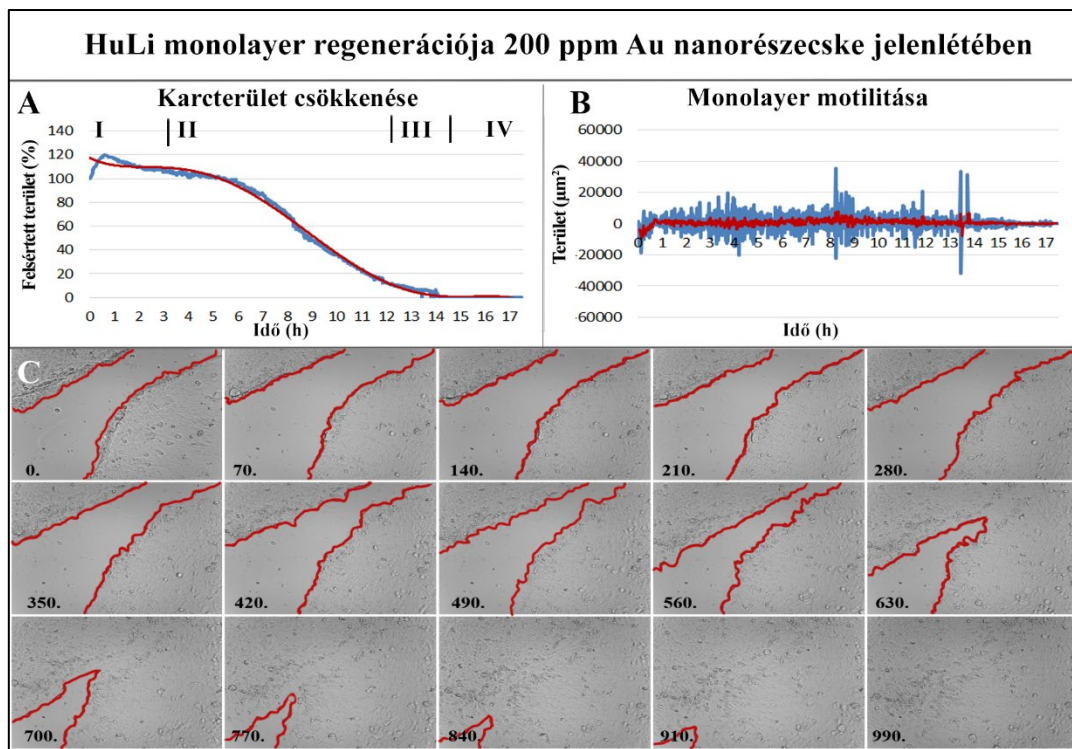
25. ábra: 80 ppm Au nanorészecske hatása a monolayer regenerációra

A) Karc terület csökkenése, B) Karczések motilitása, C) Time-lapse felvételekből készült montázs (a feltüntetett számok az időt jelentik percben)

A folyamat időtartama 260-270 perc volt, a kontroll tenyészetekhez ( $62,94 \mu\text{m}^2/\text{perc}$ ) hasonló sebességgel lezajló folyamatot tapasztaltunk, felkarcolt sejtpázsit karcterülettől független, a ROI-szekvenciákban mért terjedés sebessége:  $65,664 \mu\text{m}^2/\text{perc}$  volt. A regenerációs görbe lefutása és a monolayer gyógyulási profilja hasonló volt a 140 ppm ezüst kezeléséhez (29. ábra).

### *Limbális monolayer regenerációja 200 ppm arany nanorészecske jelenlétében*

A 26. ábra A részén a 200 ppm koncentrációban jelenlévő nanoarany hatását reprezentáló regenerációs görbe első szakaszát megfigyelve látható, hogy a kiindulási terület a felnyílás során  $\sim 20\%$ -kal növekedett. Az elhúzódó visszatapadási fázis körülbelül 180-220 percig tartott. Az ezt követő exponenciális növekedési és az átmeneti görbeszakasz is elnyújtott volt a kontrollal, és a 80 ppm koncentrációjú arany kezelés regenerációs grafikonjával összehasonlítva.



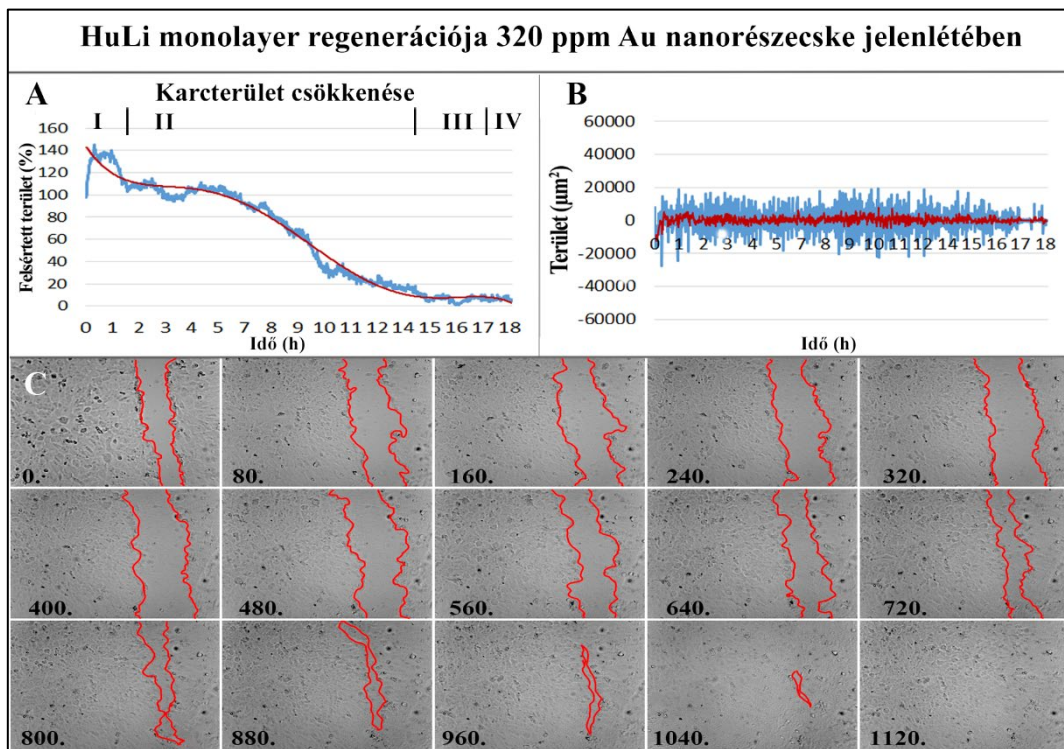
26. ábra: 200 ppm Au nanorészecske hatása a monolayer regenerációra.

A) Karcterület csökkenése, B) Karcszék motilitása, C) Time-lapse felvételekből készült montázs (a feltüntetett számok az időt jelentik percben)

A kezelést követően a regeneráció folyamata a teljes konfluencia visszanyeréséig mintegy 15,5 órát vett igénybe. A karc eredeti területétől független monolayer terjedési sebesség  $40,201 \mu\text{m}^2/\text{perc}$  volt.

#### *Limbális monolayer regenerációja 320 ppm arany nanorészecske jelenlétében*

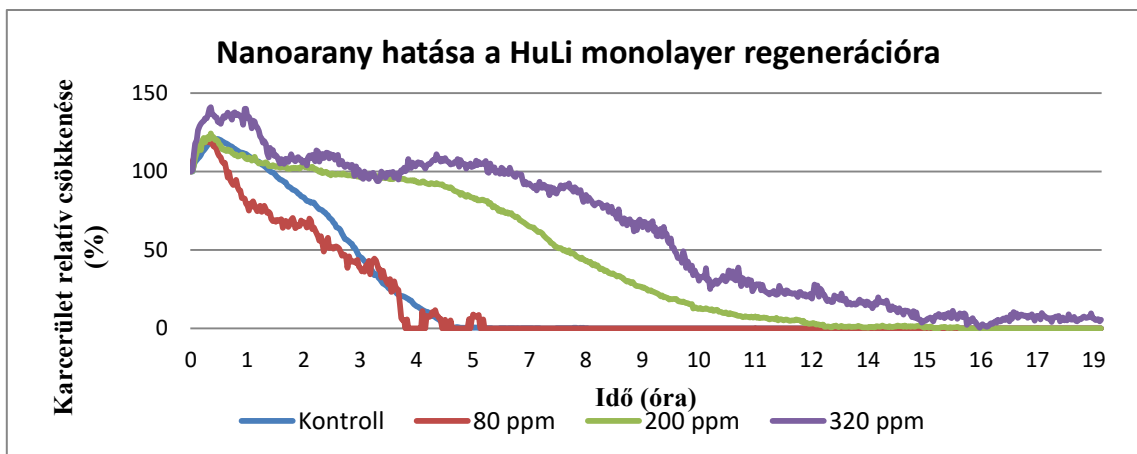
Az első szakaszban a felnyílás közel 90-100 perce alatt a sérült terület 100%-ról 140%-ra növekedett (27 A ábra). Ebből arra következtettünk, hogy az arany nanorészecskék jelenléte elősegíti a sejtek felválását a tenyésztőfelszínről. A visszatapadási fázis (körülbelül 100 perc) során a sérült felszín területe csupán 30-40%-kal csökkent. Az elhúzódó exponenciális, illetve az átmeneti szakasz együtt mintegy 16. óráig tartott (27. A ábra). A regenerációs folyamat elején a sérült monolayer területe 4 óra alatt érte el a kiindulási méretét.



27. ábra: 320 ppm Au nanorészecske hatása a monolayer regenerációra.

A) Karcterület csökkenése, B) Karc szélek motilitása, C) Time-lapse felvételekből készült montázs (a feltüntetett számok az időt jelentik percben)

A teljes folyamat 18 óra 40 percig tartott, melynek háttérében az akadályozott visszatapadás és sejt proliferáció elhúzódása állhat. Ezt tükrözi a monolayer karc széleinek ROI-kban mért, a teljes karcterülettől független terjedése, mely  $30,872 \mu\text{m}^2/\text{perc}$  volt.



28. ábra: A HuLi monolayer regenerációja különböző arany nanorészecske koncentrációk jelenlétében

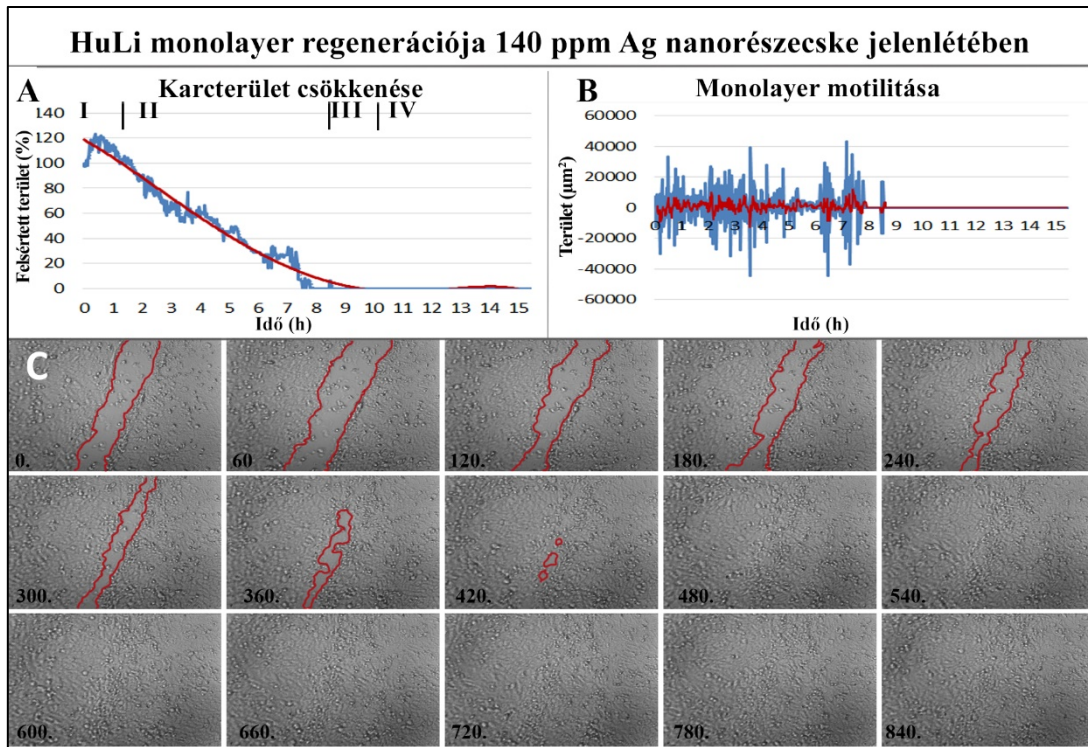
A növekvő arany nanorészecske koncentrációk (28. ábra) főleg az I., és II. regenerációs fázisra jellemző sejtadhézió csökkenésén keresztül a regeneráció enyhe elhúzódását okozták.

#### ***Ezüst nanorészecskék hatása a limbális sejtenyészet monolayer regenerációjára***

Az ezüst antibakteriális hatása már régóta ismert, melyet széleskörű alkalmazása is bizonyít, ennek ellenére az ezüst nanorészecskék egészségügyi ártalmatlanságát illetően komoly kétségek merültek fel.

#### ***A HuLi monolayer regenerációja 140 ppm ezüst nanorészecske jelenlétében***

A regenerációs görbét (29. A. ábra) elemezve és a kontroll tenyésztettel (9 és 11. A és a ábra) összehasonlítva megfigyeltük, hogy a karc felnyílási, I. fázisa kissé elhúzódott, és a kezdeti felnyílás mértéke jelentősebb volt; a kiindulási sérült régió~20%-kal megnövekedett. A sejtek visszatapadása a felnyílást követően 60-70 perc körüli időtartamot ölelt fel.



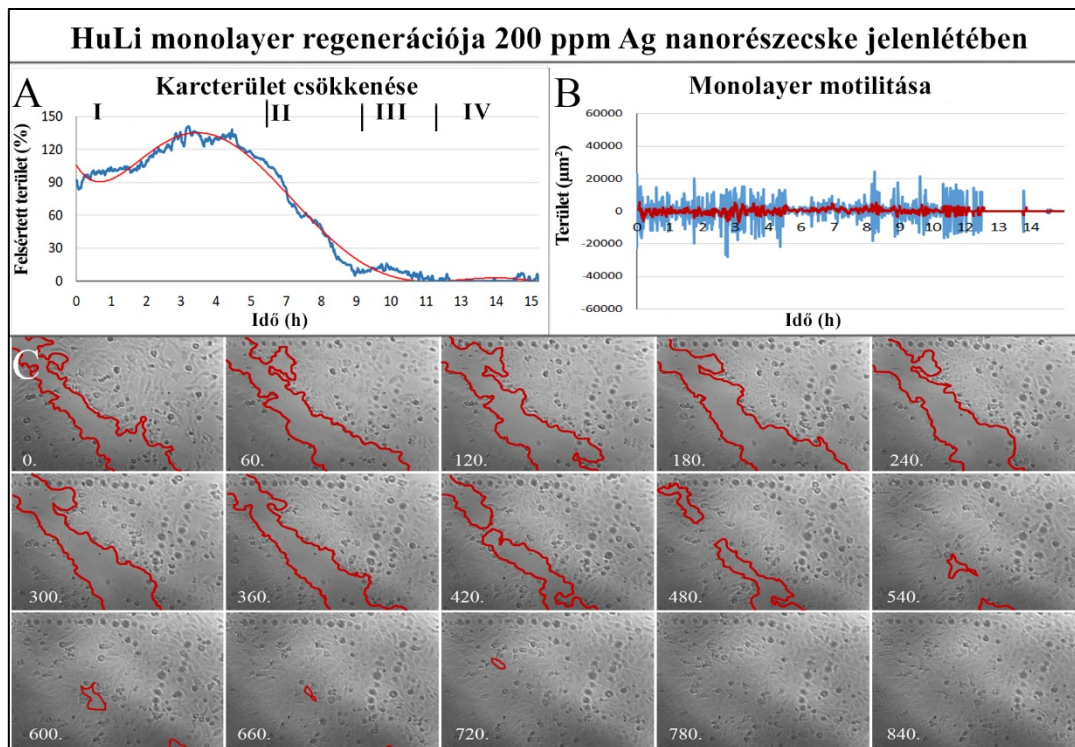
29. ábra: 140 ppm ezüst nanorészecske hatása a monolayer regenerációra.

A) Karcterület csökkenése, B) Karcszélék motilitása, C) Time-lapse felvételekből készült montázs (a feltüntetett számok az időt jelentik percben)

Az exponenciális, vagyis a II. fázist a regenerációs görbén az első, meredekebb szakasz jelöli. Ez a szakasz hosszabb lefutású volt (180 perc), mint a kontroll tenyészet esetében (körülbelül 120 perc). Az átmeneti III szakasz is viszonylag meredek. A monolayer relatív karc eredeti területtől független terjedési sebessége  $53,757 \mu\text{m}^2/\text{perc}$  volt.

#### *HuLi monolayer regenerációja a 200 ppm ezüst nanorészecske jelenlétében*

A ezüst nanorészecske kezelés a sejtpázsit regenerálódásának enyhe időbeli elhúzóását eredményezte. Az első regenerációs szakasz felnyílási fázisa a 140 ppm kezeléshez hasonlítva jelentősen tovább, 300-360 percig tartott, a karc területe eközben közel duplájára, ~40%-ra nőtt. Az exponenciális szakaszt ez esetben is viszonylag meredek lefutás jellemzi, az átmeneti szakasz pedig hosszán, mintegy 150 percig, elhúzódtott (30. A ábra). Az átmeneti fázisra jellemző nagymértékű motilitást hűen szemlélteti a 30. B ábra fluktuálása.



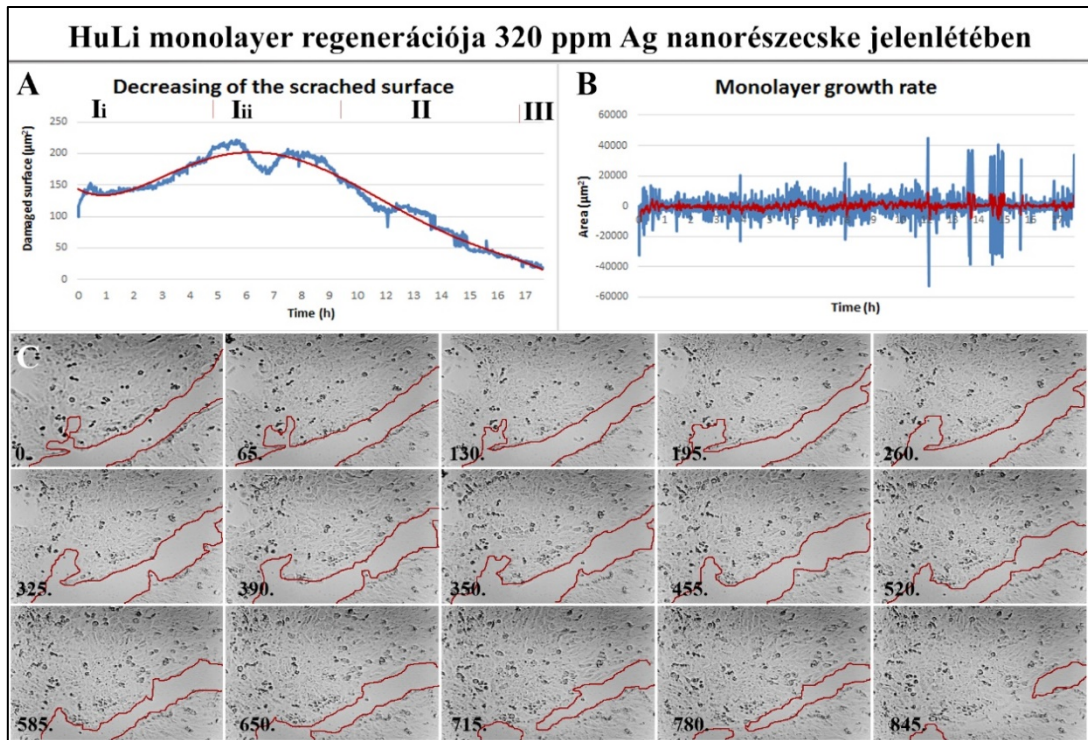
30. ábra: 200 ppm ezüst nanorészecske hatásai a HuLi monolayer regenerációjára.

A) Karcterület csökkenése, B) Karcszélek motilitása, C) Time-lapse felvételekből készült montázs (a feltüntetett számok az időt jelentik percben)

A regenerációs folyamat 690-750 perc után fejeződött be (23. ábra C). A 200 ppm koncentrációjú ezüst kezelés regenerációjára jellemző, a karc kiindulási területétől független terjedési sebessége:  $42,597 \mu\text{m}^2/\text{perc}$  volt.

#### *HuLi sejtpázsit regenerációja 320 ppm ezüst nanorészecske jelenlétében*

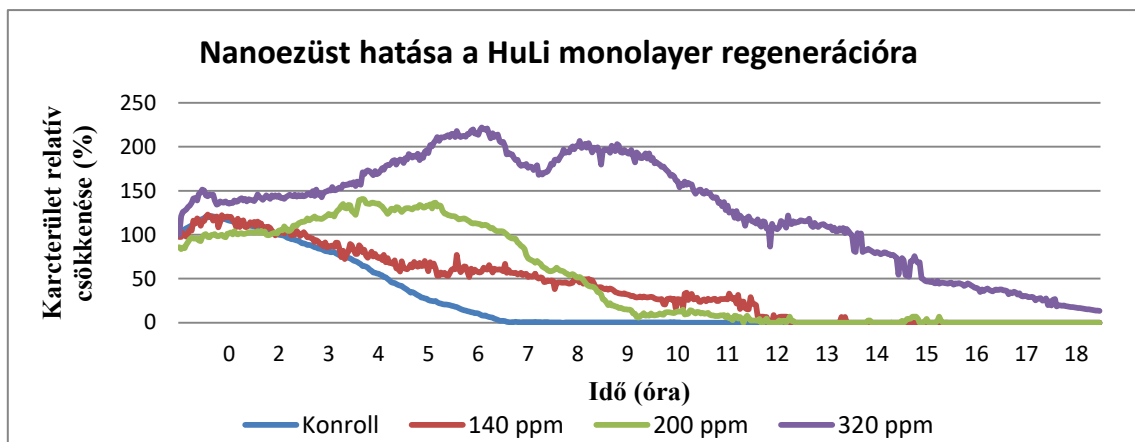
A kontroll regenerációs görbéhez (9. és 11. A ábra) képest a 320 ppm ezüst nanorészecske kezelés (31. A ábra) a következő eltéréseket mutatta: az első, a felnyílási és visszatapadási szakaszban két csúcs, alfázis különül el: az első, a felnyílási fázis, amely körülbelül 350 percet vett igénybe, és ez idő alatt a karcolt terület több, mint a kétszeresére, ~220%-ra nyílt fel. Ezt egy lassú visszatapadási fázis követte, ami 360 perc alatt ment végbe. Ez idő alatt a sérült felszín területének csökkenése elérte az eredet sérülés 150%-át, amit egy kisebb mértékű felnyílás követett (31. A. ábra). A visszatapadási fázis ezt követően még további 200 percig tartott, és ez idő alatt a megsérült terület csökkenése elérte a kiindulási, 0. perces karc méretét. Az exponenciális görbeszakasz (31. A ábra) meredeksége kisebb, mint a két alacsonyabb ezüst koncentrációban (29. és 30. ábrák A részei).



31. ábra: 320 ppm Ag nanorészecske hatása a monolayer regenerációra.

A) Karcterület csökkenése, B) Karcszéllek motilitása, C) Time-lapse felvételekből készült montázs (a feltüntetett számok az időt jelentik percben)

Az átmeneti szakasz végén a monolayer széleinek zárulása körülbelül 18. óra után következett be. A karc eredet területétől független monolayer terjedés sebessége:  $19,588 \mu\text{m}^2/\text{perc}$  volt.



32. ábra: A HuLi monolayer regenerációja különböző arany nanorészecske koncentrációk jelenlétében

A növekvő ezüst nanorészecske koncentrációk (32 ábra) az I. fázisra jellemző dózisfüggő nagymértékű sejtdhézió csökkenésé és a regeneráció enyhe elhúzódását okozták.

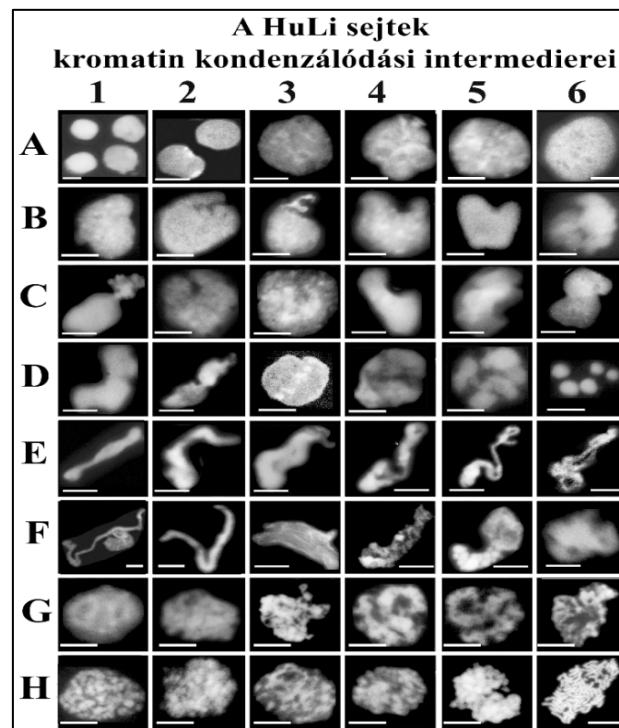
### 4.2.3. Kromatin kondenzálódás folyamata a limbális sejteken

A limbális eredetű őssejt tenyészet sejtjeinek izolálása során duzzasztottuk, majd az izolált, feltárt sejtmagot DAPI-antifade-val jelöltük.

#### *A HuLi sejtek kromatin kondenzálódás intermedierei*

A kromatin kondenzálódás (32. ábra) a sejtciklus előrehaladásával a következő sorrendben történt.

A korai S fázisban megjelenő dekondezálta kromatin fátyol-szerű szerkezeteinek (32. ábra A1-B6) majd a fátyolos szerkezet szupertekercselődő, polarizálódó formáinak (32. ábra C1-D2) a már kondenzáltabb, fátyolos szerkezetű kromatin-gócok megjelenése követte, amelyek 4-5 nagyobb kromatin csoportba tömörültek (32. ábra D3-D6).



33. ábra: A limbális sejtek kromatin kondenzálódási intermedierei.

Méretarány: 5  $\mu\text{m}$  mindegyik képkockán

A sejtciklus folyamatának tovább haladása során megfigyeltük a maganyag szupertekercselt kromatin szalagjait (33. ábra E1-F6), illetve a szalagos szerkezeteken megjelenő kromatin testeket, a kromoszóma előtelepeket (33. ábra G1-H2). A metafázisos kromoszómák megjelenése előtti jellegzetes spirál, U és V alakú praekromoszómákat (33. ábra H3-H5) a

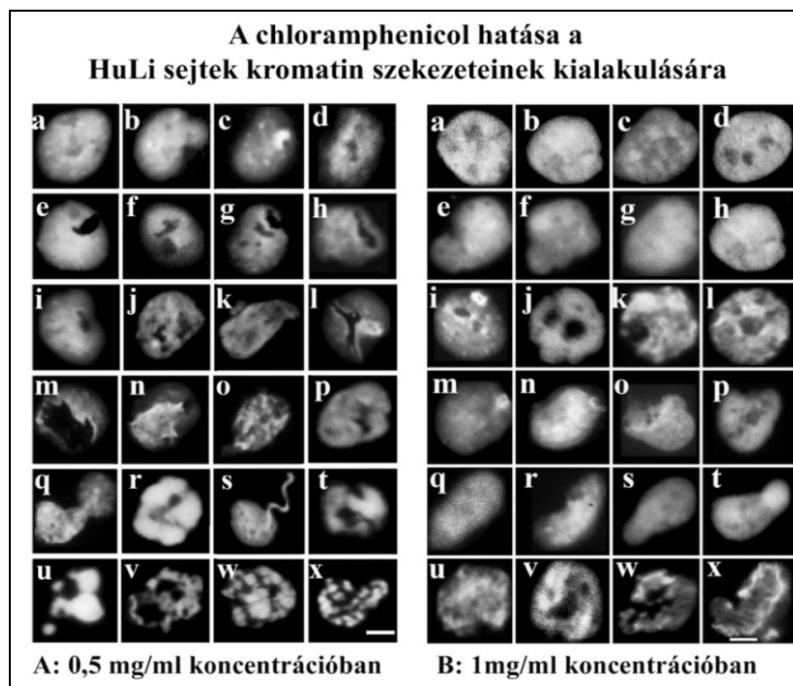
metafázisos kromoszómák megjelenése követte (33. ábra H6). A megjelenített limbális sejtek kromatin kondenzálódási intermediereit a sejtciklusra vonatkoztatott sorrend szerint csoportosítottuk, a jellegzetes formák megfeleltek az eukaryota sejtek kromatin kondenzálódás általános menetének (Banfalvi et al., 2006).

### 5.2.3.1. Az antibiotikumok hatására bekövetkező változások a kromatin kondenzálódásban

Mindkét antibiotikum jelenléte karakterisztikus változásokat okozott a kromatin kondenzálódási intermedierek megjelenési formáiban, a folyamat befejeződését, a metafázisos kromoszómák kialakulását, az antibiotikumok már alacsony dózisban gátolták.

#### *Chloramphenicol*

A 0,5 mg/ml koncentrációban jelenlévő chloramphenicol tipikus hatása a kromatin formák szerkezetére vonatkozóan a kromatinállomány lokális polarizációjában, a mag felnyílásában nyilvánul meg. Ritkábban előforduló szerkezeti változás a befejezetlen, meggyűrődött kromatin formák megjelenése volt, melyek nem jutottak el a metaphasisra jellemző, tömör állapotig (34. A ábra).



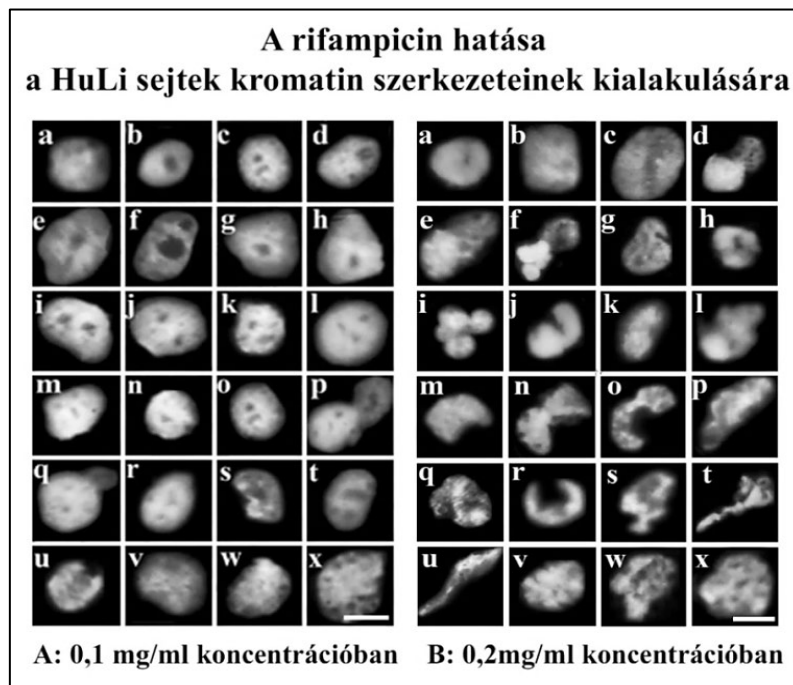
34. ábra: Chloramphenicol hatása a kromatin kondenzálódásra.

A: 0,5 mg/ml, B: 1 mg/ml; Jelzés 5  $\mu$ m

Magasabb – 1 mg/ml-es – koncentrációban a kromatin kondenzálódási folyamat megakadt a fibrillaris szerkezetnél, és nem lépett tovább a szalagos formák megjelenéséig. Ennek lehetséges oka, hogy a kromatin szálak összetapadása miatt a magban lévő kromatin nem tekeredett le, csak a mag térfogata növekedett meg mérsékelten a kontroll magok méretéhez viszonyítva (33. B ábra).

### ***Rifampicin***

A limbális sejtek 0,1 mg/ml koncentrációjú rifampicin jelenlétében történő tenyésztésekor azt tapasztaltuk, hogy karakterisztikus lyukak keletkeztek a maganyagban (35. A ábra). A kromatin kondenzálódási folyamat a fátyolos szerkezetek megjelenésétől nem haladt tovább, melynek oka a kromatinszálak ragadós volta lehetett.



35. ábra: A rifampicin hatása a kromatin kondenzálódásra.

A: 0,1 mg/ml, B: 0,2 mg/ml; Jelzés 5  $\mu$ m

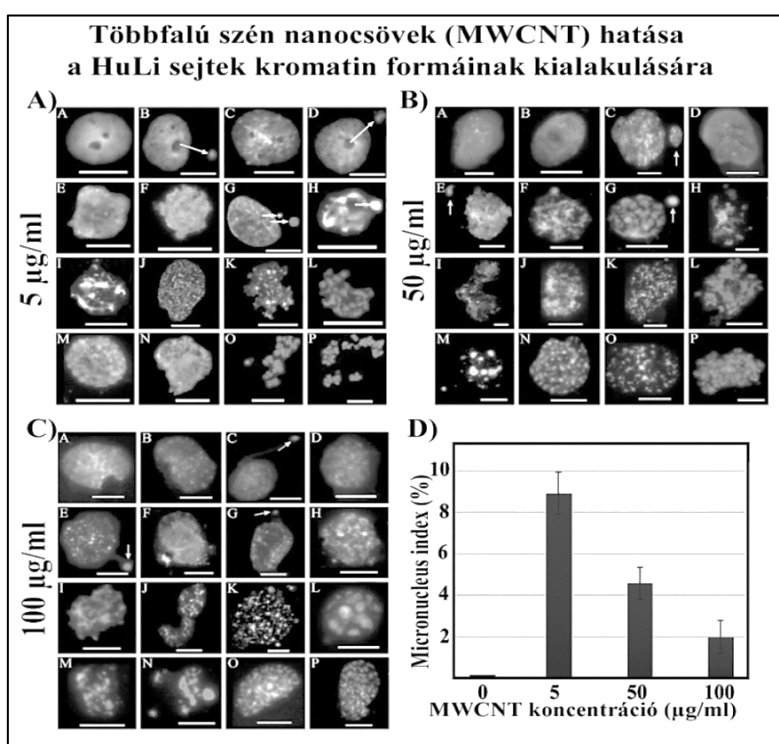
Magasabb rifampicin koncentráció (0,2 mg/ml) jelenléte a kromatin kondenzálódási intermedierek jellegzetes elváltozását okozta, mely elsősorban a szupertekercselt kromatin-szalagok megjelenésében nyilvánult meg; a magasabban szerveződött szerkezetek viszont nem jelentek meg (35. B ábra).

### 5.2.3.2. Nanorészecskék hatására bekövetkező változások a kromatin kondenzálódásban

A nanorészecskék jelenlétében nem figyeltünk meg drasztikus változásokat a korai kromatin szerkezetek megjelenésében. A szén nanocsövek esetén a metafázisos kromoszómák is megjelentek, viszont az arany és az ezüst nanorészecskék jelenléte gátolta a magasabbrendű kondenzálódási formák kialakulását.

#### A kromatin változások a többfalú szén nanocsövek hatására

A szén nanocsövek jelenlétében a kromatin struktúrák (35. A-C ábra) nem mutattak jelentősebb különbségeket a kontrollhoz képest (32. ábra).



36. ábra: Többfalú szén nanocsövek (MWCNT) hatása a kromatin kondenzációra.

A: 5 µg/ml, B: 50 µg/ml, C: 100 µg/ml, Méretek jelzése 5 µm. D: Micronucleus képződés az MWCNT koncentráció függvényében. A kromatin formák között a micronucleusokat fehér nyilak jelzik

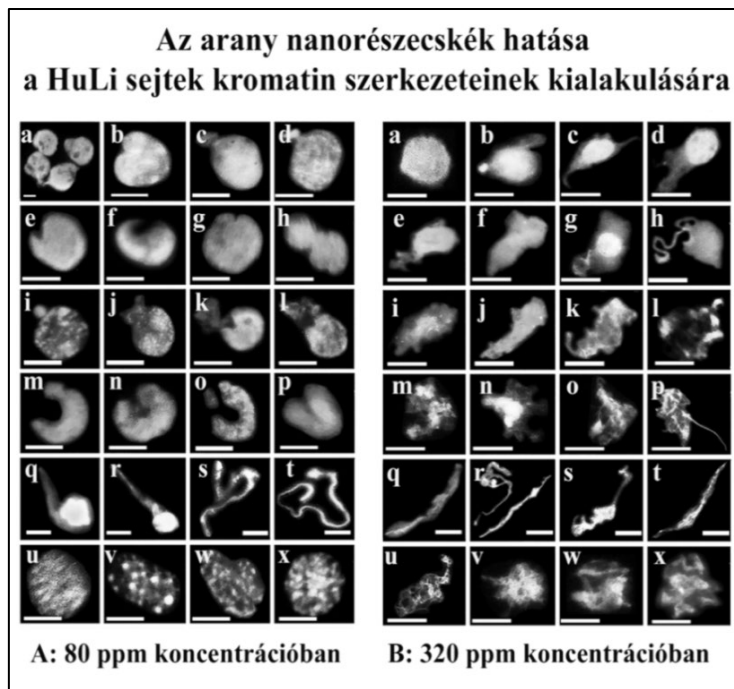
A növekvő MWCNT koncentrációk mellett megfigyeltük a metafázisos kromoszómák jelenlétét, apoptotikus testek vagy necrotikusan megnagyobbodott sejtmagok megjelenése nélkül. Az egyetlen megfigyelhető különbség az MWCNT-vel kezelt sejtekben a micronucleusok megjelenése volt, emellett kisebb késéseket tapasztaltunk a kromatin mintázatok kialakulásában, melyre a metafázisos kromoszómák inkomplett kondenzációja

utalt. A nanoszénecsövek jelenléte indukálta micronucleusok megjelenése kromatin módosulásokra utalhat. (36. D ábra). A kontroll populáció nem tartalmazott észlelhető számú micronucleust. A legmagasabb indexet ~8.9%-ot, a legalacsonyabb, 5 µg/ml MWCNT koncentráció adta. Ez azt jelezte, hogy a nem-poláros nanorészecskék megnövelték a membrán permeabilitást, ezzel lehetővé téve a micronucleusok kijutását. Magasabb MWCNT koncentrációk jelenlétében a nanorészecskék összecsapódása, illetve a sejtmagi struktúrákhoz való aggregálódása dominált, csökkentve az elkülönülő micronucleusok számát. A micronucleus index az 50 - és a 100 µg/ml MWCNT mellett csökkenő tendenciát mutatott: 4,6 és 2,9% -ot (36. D ábra).

A korábbi tanulmányok a szinkronizált emlős sejtek kromatin struktúráinak vizsgálata alapján feltételeztük, hogy a micronucleusok megjelenése a kromatin kilökődéséből ered a kondenzáció korai fázisában (Banfalvi et al., 2006) és feltételezzük, hogy gyakorta előforduló elemek a kondenzálódás korai szakaszában, de ez nem kizárólag a toxikus körülmények közötti membránsérülés jellegzetessége (Király et al., 2017). A szén nanocsövek esetében a micronucleus megjelenése nem közvetlenül citotoxicitásra enged következtetni.

#### ***A kromatin változások az arany nanorészecske kezelés hatására***

A maganyag fátyolszerű szerkezete 80 ppm nanoarany részecske kezelés hatására eltorzult. A kondenzálódási folyamatot a kromatinfátyol polarizációja és a letekeredett, dekondezálalt szalagos szerkezetek túlsúlya jellemezte. Ritkább esetben a kondenzált magok között hosszú, üstökös csóvás, tömörebb szerkezetek is megjelentek. A hosszú kromatin szalagok tovább kondenzálódtak kromatin testekké, de a korai elongált praekromoszómákkal már ritkán találkoztunk, metafázisos kromoszómák megjelenésére pedig nem is volt példa (36. A ábra). A korai kromatin formákban a kezelés nem okozott jelentős hatást, de viszonylag kevés fátyolos szerkezetet találtunk. A fonalas és a kromoszóma előtelepes szerkezetek a normálisnál valamivel kisebbek voltak. A kondenzálódási folyamatot enyhén gátolta az arany nanorészecskék jelenléte, így a praekromoszómák, elongált kromoszómák megjelenéséig jutott el. Hasonló morfológiai változásokat tapasztaltunk a kondenzálódási intermedierek megjelenésében, mint a 140 ppm koncentrációban jelen lévő ezüst nanorészecskék esetében (36. A ábra).



37. ábra: Az arany nanorészecskék hatása a kromatin kondenzálódásra.

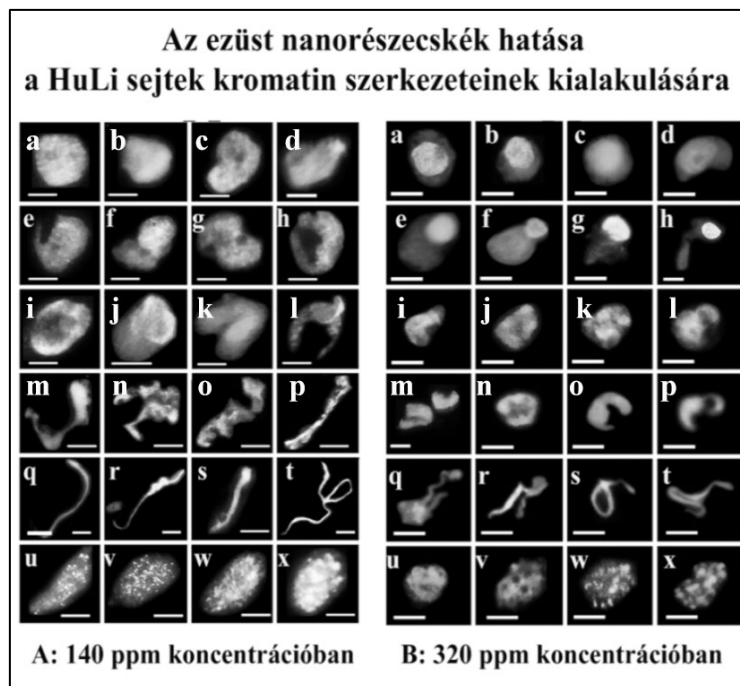
A: 80 ppm, B: 320 ppm Jelzés 5  $\mu\text{m}$

A magasabb arany nanorészecske koncentrációkban (200 és 320 ppm) a szupertekercselődési blokk a szokatlanul vékony kromatin szalagok megjelenésében manifesztálódott, illetve gátlódott a kromatin testek kialakulása is (37. B ábra, p-t, u, v). A további formák, az elongált praekromoszómák és végül a metafázisos kromoszómák kialakulása is gátlást szenvedett. Vizsgálatunkban a legmagasabb, vagyis 320 ppm koncentrációban jelenlévő nanoarany részecskék hatására már a kromatin testek és a kromoszóma előtelepek eltorzult formáinak megjelenése is megfigyelhető volt (37 B ábra w, x). A dózisfüggő károsító hatást jól szemléltetik a nanoarany részecskék növekvő koncentrációi, melyek kromatin kondenzálódás gátlását a jellegzetesen elvékonyodó kromatinszalag jelenlétével demonstrálják.

#### ***A kromatin változások az ezüst nanorészecskék hatása***

A 140 ppm koncentrációban az ezüst nanorészecskék a HuLi sejtek kromatin kondenzálódásának korai fázisában nem okoztak drasztikus torzulásokat a kromatin struktúrákban. Lekerekített, fátlyas szerkezetet csak ritkán láttunk, azonban gyakoriak voltak a polarizált és eltorzult fátlyas szerkezetek. A kezdeti laza kromatin szupertekercselődése feltételezhetően csökkent aktivitással zajlott. A folyamat elégtelensége miatt a korai kromoszómaszerkezetek megjelenése késett; a kromatin állomány megmaradt a korai kondenzálódási szakaszban, a hosszú vékony szalagos szerkezeteknél. A vékonyabb szalagok

miatt a normálistól kisebb méretű kromatin testek alakultak ki és jelentős mennyiségben visszamaradt a fátylas szerkezetű maganyag. A leginkább kondenzálódott szerkezetek eljutottak a kromatin testekig, vagyis az előkromoszómális állapotig, de elongált vagy metafázisos kromoszóma nem jelent meg (38 A ábra).



38. ábra: Az ezüst nanorészecskék hatása a kromatin kondenzálódásra.

A: 140 ppm, B: 320 ppm, Jelzés 5  $\mu$ m

Magas, 320 ppm koncentrációnál sem tapasztaltunk drasztikus változásokat a kromatin kondenzálódás köztes szerkezeteiben az alacsonyabb (140 ppm) koncentrációhoz viszonyítva. A kromatin szerkezetek ez esetben kisebbek voltak az átlagosnál. Az apoptotikus testek hiánya kizárta a sejtek apoptózissal történő pusztulásának lehetőségét. A maganyag összezsugorodása miatt, a korai kondenzálódási fázisok szerkezeteit a sejtmag körül elhelyezkedő dekondezálalt fátyol és az üstökös csóvaszerű kilökődés jellemezte. A sejtmag felnyílása lehetővé tette a félkörös, dekondezálalt kromatin formák és kromatin szalagok megjelenését, de ezek a szerkezetek csak ritkán értek el magasabb kondenzáltsági szintet (38. B ábra). Előzetes, ezüst nitráttal kapcsolatos tanulmányaink során hasonló eredményt kaptunk a kromatinformák vizsgálata során: 10-15  $\mu$ M koncentrációnál jellemző elváltozás volt a maganyag tömörödése, összehúzódása az apoptotikus testek megjelenése nélkül. További tipikus kondenzálódási rendellenességként tapasztaltuk a maganyag dekondezálalt, üstökös csóvára emlékeztető kilökődését, ami a szupertekercselődés csökkenő hatékonyságára utalt.

## 5. MEGBESZÉLÉS

Vizsgálataink eredményei arra engednek következtetni, hogy az alkalmazott kísérleti elrendezés, metodika használható a szemészeti klinikumból származó minták reprezentatív, folyamatos, nagy időbeni felbontású és hosszú távú vizsgálatához egyedi sejteken és sejtpopulációkban. Time-lapse videó mikroszkópos módszerrel vizsgálható a szemészeti daganatok nagy incidenciáját kitevő uveális melanomák egyedi sejtjeinek növekedési-, osztódási dinamikája; illetve a cornea felszíni hámphányának regenerálódása a limbális monolayer karcmodell segítségével. A modell felhasználhatósága kiterjed a terápiásan használt és potenciálisan használható szerek, anyagok toxicitásának vizsgálatára. A kapott adatok alátámasztása érdekében nagy érzékenységgű genotoxicitási vizsgálatot is végeztünk.

Mind az uveális melanóma sejtek viselkedését, mind pedig a limbális eredetű primer sejtek növekedését standard sejtenyészési körülmények között figyeltük meg; továbbá a limbális eredetű sejtek segítségével modellt hoztunk létre a corneális sebgyógyulás vizsgálatára.

### 5.1. Videómikroszkópia alkalmazhatósága

A videómikroszkópia hosszútávú dinamikus megfigyelést tesz lehetővé a sejttani vizsgálatok során. A kezdeti analóg videó rendszereket fokozatosan felváltották a számítógép vezérelt digitális rendszerekkel ellátott mikroszkópok (Inoué, Spring, 1997; Sluder, Wolf, 2003; Nagy et al., 2012). A videómikroszkópok sejtenyészítő inkubátorba helyezése megoldotta a sejtek folyamatos, hosszútávú (több napos) megfigyelésének problémáját. A közeli infravörös megvilágító rendszer alkalmazása pedig a fototoxicitás okozta károsodás minimalizálását jelenti a vizsgálat során (Nagy et al., 2013).

A létrehozott time-lapse mikroszkópos vizsgálati rendszer egyszerűen adaptálható a különböző vizsgálati igényekhez, mivel eleget tesz a következő kritériumoknak.

- A tág időbeli felbontóképesség, és a vizsgálati szempontokhoz adaptálható képkészítési intervallumok.
- A vizsgált organizmusokra könnyen adaptálható beállítások: a rendszer használható az eukaryoták alacsonyabb törzsébe tartozó állatok (rovarok, puhatestűek) és magasabb komplexitású eukaryota (emlős, köztük humán) sejtekre, növényi eredetű sejtenyészetekre, de mikroszkopikus fonalas- és élesztőgombák megfigyelésére is.

- A vizsgálati célokhoz alkalmazható rendszer: kontroll jelenlétében vizsgálhatók a sejtek életfolyamatai, a kialakuló interakciók, egyedi és populációs szinten, illetve különböző ágensek vagy organizmusok jelenlétében.
- A valós idejű megfigyelésink nagy érzékenységet biztosítja, hogy az egyedi és populációs szinten bekövetkező legkisebb élettani változások is könnyen elkülöníthetők az egyazon eredetű kontroll populációval összehasonlítva.
- A rendszerrel nyert képi adatok feldolgozását az ugyancsak sokoldalúan felhasználható Fiji software segítségével végeztük el. A digitális képanalízis során vizsgálható paraméterek: a sejtek motilitása, osztódási dinamikája, a sejthalál-formák felismerése és időbeli lefutásának mérése.
- A rendszer opcionálisan kiegészíthető egyéb vizsgálati metodikákkal, jelen esetben a kromatin kondenzálódási intermedierek vizsgálatával.

A digitális képanalízis általános, fő lépései a zajszűrés, szegmentálás majd az ezeket követő mérések voltak. Említést érdemel, hogy a fő lépéseken belül különböző, az adott kép szekvencia és a vizsgálandó információ szempontjából mindig a legoptimálisabb analízis-kombinációkat használtuk.

A bemutatott rendszer segítségével többféle sejtszintű modell kidolgozására nyílt lehetőségünk, melyek segítségével az egyes tanulmányozott életfolyamatok megfigyelése, leírása és megértése pontosabbá válhat.

- Toxikológiai vizsgálatokban: a nehézfémek (Farkas et al., 2010; Nagy et al., 2011a; Nagy et al., 2011b; Banfalvi et al., 2012) ionizáló sugárzás (Banfalvi et al., 2007b; Ujvarosi et al., 2007), és további toxicitási tesztekben (Nagy et al., 2016).
- Sejtélettani folyamatokban: Emlős sejteken: rendellenes sejtosztódások (Király et al., 2014), sejtciklus analízis (Nagy et al., 2012 Nagy et al., 2017), sejtmigráció (Ruzsavanszky et al., 2013) kemotaxis (Joós et al., 2017). Emlős és fonalas gomba sejteken sejthalál formák (Nagy et al., 2010; Király et al., 2017), mycoplasma fertőzés (Talas et al., 2017) és élesztő gombák növekedési (Nagy et al., 2014) vizsgálatára.

## **5.2. Uveális melanóma OCM-1 sejtek *in vitro* vizsgálata**

A „rendellenes”, háromfelé történő osztódásokat trivisióként azonosítottuk. A folyamatot kvalitatív és kvantitatív szempontból vizsgáltuk a tenyészetekből kiválasztott, egyedi sejteken.

- *Kvalitatív változások:* maga az osztódás folyamata, ami a trivisio esetében a háromfelé történő osztódást jelenti. Jellegzetes morfológiai indikátora a tripolarizáció. A hármas osztódás utáni tendencia az utódsejt diploid állapotba való visszatérése, és a maganyag egy részének kizáródása.
- *Kvantitatív változások* A trivisiók vizsgálata során összehasonlítottuk a hármas osztódásokat, illetve az azok révén keletkezett leánysejteket, és a normál osztódásokat.
  - *Osztódás időtartama:* A vizsgálatban a szabályos és a hármas osztódások időtartamát összevetve megállapítottuk, hogy trivisiók többségében tovább tartott a multipoláris sejtosztódás
  - *Sejtméret változása:* A leánysejtek mérete az osztódást követően az anyasejt méretének ~50%-a, trivisio után ez kisebb, ami alátámasztotta elméletünket valamelyik utódsejt méretének csökkenéséről a háromfelé történő osztódás után.
  - *A hármas osztódások gyakorisága:* tumorsejtek esetében magasabb gyakoriságot tapasztaltunk.

A hármas osztódáson átesett leánysejtek vizsgálata, vagyis a képszekvenciákon a további nyomkövetésük alapján megállapítottuk, hogy az osztódásuk után is életképesek maradtak, erre utalt, hogy a hármas osztódást követően csupán egy óriás sejtnél figyeltünk meg az apoptózisra utaló zsugorodást. Egyes sejtek esetében (HeLa) újabb trivisio, illetve a leánysejtek összeolvadása is megfigyelhető volt. A hármas osztódások által kiváltott aneuploidia a hiperploiditási állapotok súlyosbító tényezője lehet és a szabálytalan osztódások számát növeli. Ez a feltételezés összhangban áll a daganatok multi-mutációs teóriájával (Nordling, 1953; Knudson, 1971). A malignus transzformáció során a sejtek kiszabadulva a primer daganatból (Banfalvi, 2012), megnövelik a ploiditásukat, és poliploiddá, esetleg tetraploiddá alakulhatnak (Castedo et al., 2011). A mitotikus mechanizmus genomi korlátai, hogy a megnövekedett kromoszómaszám a közel tetraploid sejtek esetében hat a genom stabilitására (Storchova et al., 2006; Storchova and Kuffer 2008) és valószínűleg aktiválja a DNS repair mechanizmusát (Storchova and Pellman 2004; Fujiwara et al., 2005). A közel tetraploid állapot a sejt számára köztes állapotként fogható fel a normál diploid és a malignus elváltozáshoz kapcsolható aneuploid állapot között. Az aneuploid állapotot a sejtek próbálják elkerülni a kromoszómaszám csökkentésével és a diploid állapotba való visszatéréssel, ez pedig az aneuploid közel-diploid állapotát eredményezi (Storchova and Pellman 2004; Fujiwara et al., 2005; Margolis 2005). Feltételezhető tehát, hogy a tumor sejtek megpróbálják

ezt a metastabil hipertriploid és hipertetraploid állapotot elkerülni, mégpedig úgy, hogy az osztódások során az anyasejtből három, az átlagosnál kisebb méretű leánysejt jön létre. Ezt a jelenséget trivisionak neveztük el.

### **5.3. Klinikailag izolált limbális sejtek *in vitro* megfigyelése**

A limbális izolátum szöveti régióhoz kapcsolódó eredete, a felvételeken rögzített morfológiai megjelenése és az őssejt markerek segítségével történt azonosítása alapján limbális tranziens őssejteknek bizonyultak. A Humán Limbális (HuLi) sejtek kisméretű, nagy sejtmag-citoplazma arányú, poligonális alakú őssejtek. A HuLi sejtvonal a 20. átoltás után is homogén, változatlan morfológiával rendelkezett, citológiai vizsgálatokban reprodukálhatóan alkalmazható volt.

#### **5.3.1. Limbális regenerációs karcmodell**

A szemészeti klinikumból származó, limbális eredetű HuLi sejteken létrehozott karcmodell megfelelőnek bizonyult a corneális sebgyógyulás tanulmányozására. Ez a limbális sejtpopulációra (sejtpázsit, monolayer) létrehozott modell megfeleltethető az úgynevezett „cat scratch” traumának, ami a cornea felszínének néhány sejtrétegét érintő fájdalmas sérülése. A monolayer regenerációs modell segítségével jellegzetes szakaszok megjelenését figyeltük meg a regenerációs profilon:

- I. felnyílási- és visszatapadási szakasz, vagyis a késleltetett fázis: meredek felfelé ívelést mutat, amit az életképes sejtek újbóli letapadása okoz a felsértett monolayer peremén.
- II. exponenciális fázis: a valódi regenerációs folyamatok kezdő szakasza, mely során a sejtek újból benövik a sérült területet. Ez hasonló a sejtenyészetek logaritmikus növekedési fázisához.
- III. átmeneti fázis: a logaritmikus és a stacioner fázis közötti átmenet, a sérült régió záródási ideje. Ekkor a monolayer mozgásai miatt a károsodott területen még előfordulhatnak időszakos sejtmentes részek.
- IV. stacioner fázis: a monolayer teljes záródása, a karc terület újra konfluens sejtpázsittal borított.

Az *in vitro* eredményeink a regenerációs profil fázisai, a szaruhártya felszíni regeneráció folyamatának *in vivo* eredményeivel (Dua et al., 1994) igazolhatók, melyeket kísérleteinkben

mi is alátámasztottunk. A vizsgálatban a nyúl cornea epithel regenerációjának négy fázisát különböztették meg:

- I., látens fázis: amely a seb növekedése, ennek oka az elhalt sejtek leválása, a széli sejtek visszahúzódása, lekerekedése jellemző.
- II, a lineáris növekedési fázis: az epithel sejtek a sérült régióba vándorolva befedik azt, a proliferációtól függetlenül.
- III, az epithel sejtek proliferációja a migrációtól független proliferáció. Az előzőekben említett szerzők kutatása megjegyzi abban, hogy a II. és III szakasz kiegészíti egymást.
- IV, epithel sejtek adhéziója: a sejtek szilárdan rögzülnek az alattuk elhelyezkedő kötőszöveti réteghez a permanens, kihorgonyzó struktúrák kialakulása révén (Dua et al., 1994).

A monolayer felsértését követő regenerációt a sérült rész kiindulási területétől - azaz a karc létrehozásának mechanizmusából fakadó heterogén méretű karcok- független változóval számszerűen jellemeztük. Ez a relatív monolayer terjedési sebesség, ami a sejtpázsit karc szélein a sejtek elmozdulási területeinek percnkénti átlagát jelenti. A limbális karcmodellben ez  $62,94 \pm 8 \mu\text{m}^2/\text{min}$  értéket adott.

### **5.3.2. HuLi monolayer regenerációs modell felhasználása**

A corneális hámsiány regenerációját különböző, a reepithelizáció tekintetében jelentős, terápiásan alkalmazott, potenciálisan alkalmazható, illetve feltételezhetően toxikus anyagok jelenlétében vizsgáltuk az *in vitro* humán limbális sejtek monolayer karcmodelljének segítségével.

#### ***Szemészeti terápiában alkalmazott antibiotikumok hatás vizsgálata***

A limbális hámsejtek növekedését a rifampicin erősen gátolta már alacsonyabb koncentrációban (0,1 mg/ml) is, a magasabb koncentráció (0,2 mg/ml) pedig a sejtek pusztulását okozta, amely a terápiás spektrum meglehetősen keskeny mezsgyéjére utal. A chloramphenicol ennél kisebb mértékben gátolta a sejtek növekedését. Szignifikáns különbségeket tapasztaltunk a kontroll és a kezelt sejtek esetében a regeneráció sebességét, dinamikáját tekintve. A nem kezelt sejtek esetében körülbelül öt óra alatt regenerálódott a megsértett sejtpázsit, ezzel szemben a kezelést kapott sejteknél ez a folyamat jóval lassabban ment végbe. A 0,5 mg/ml koncentrációban jelenlévő chloramphenicol esetében ez közel

tizenkét óra, míg a 1 mg/ml koncentrációban alkalmazott chloramphenicol esetében a karc záródása harminc óra után következett be, illetve a teljes konfluencia nem alakult ki. A rifampicin esetében a monolayer regeneráció erős gátló hatását bizonyította, hogy 0,1 mg/ml koncentrációban alkalmazva a regeneráció több, mint tizenöt órát vett igénybe, és nem volt teljes. Ugyanakkor a 0,2 mg/ml koncentráció pedig már letálisnak bizonyult a limbális sejteken. Ez a szemészeti antibiotikum kezelés rendkívül gondos és aszeptikus körülmények között történő kivitelezését igényli.

Az antibiotikum kezelésem átesett limbális sejtek kromatin kondenzálódási intermedier szerkezeteinek jellegzetes károsodása alátámasztotta ezen antibiotikumok károsító hatását. A chloramphenicol alacsonyabb koncentrációban (0,5 mg/ml) a mag felnyílását okozta a kondenzálódás során; míg magasabb koncentrációban (1 mg/ml) a fonalas szerkezetek szalagos szerkezetekké való átalakulását akadályozta meg. Ehhez hasonló, reverzibilis gátlást az UV-B sugárzás okozott (Ujvarosi et al., 2007). A morfológiai hasonlóságnak köszönhetően úgy gondoljuk, hogy a chloramphenicol által okozott kromatin szerkezet módosulások kevésbé káros hatásúak, mint a rifampicin okozta károsodások. A rifampicin kisebb koncentrációban (0,1 mg/ml) a szalagos szerkezetek megjelenése után blokkolta a kromatin kondenzálódás folyamatát. Ez összhangban van a mikroszkópos megfigyeléseinkkel, vagyis a regeneráció megindulásában tapasztalt körülbelül tíz órás csúszás sejtszinkronizáló hatásra utal, melyet a módosult kromatinszerkezetek hasonlósága is alátámaszt. A rifampicin magasabb koncentrációjának (0,2 mg/ml) hatása változatos kinézetű magok és kondenzálódási formák megjelenését okozta, amely a sejtek súlyosabb károsodására utalt. Ezek a megfigyeléseink relevánsnak tekinthetők a rifampicin jövőbeli szemészeti használatának mérlegelésekor.

A rifampicin és a chloramphenicol hatékonyságát 1-1%-os szemészeti kenőcsben, a szexuálisan terjedő trachomiasis kezelésében hasonlították össze. Az 1%-os rifampicin kenőccsel a hat-hét hétig tartó kezelés 90%-os klinikai és mikrobiológiai gyógyulási rátát eredményezett. A chloramphenicol 1%-os kenőccsel a kezelés négy-hat hetes időtartam alatt mindössze csekély eredményt hozott a klinikai jeleket és tüneteket nézve, illetve a fertőzést sem szüntette meg (Darougar et al., 1977). Kimondottan hiperendémiás trachoma kezelésére hosszabb, hathetes, 1%-os rifampicin hatóanyagú szemkenőcsös terápiát alkalmaztak sikeresen és a pacienseket nyomon követve a betegség csak alacsony százalékban volt jelen (Dawson et al., 1975). A jól ismert túladaogalási tünetek mellett ezek a széles spektrumú

antibiotikumok azonban ronthatják a látásképeességet, homályos látást, könnyezést és a cornea sérülését is okozhatják. A rifampicin szemészeti klinikumban történő újabb alkalmazhatóságát tekintve: centralis serosus chorioretinopathia kezelésére sikeresen alkalmazták a rifampicint, szájon át 600 mg per nap dózisban klinikai gyógyszerkíséletben (Ravage, Packo 2011). Ezen terápia mellékhatásait tekintve azonban májkárosító hatásról számoltak be (Nelson et al., 2014). A napi dózis felére csökkentésével effektív hatást tapasztaltak a máj károsodása nélkül hosszútávon alkalmazták (Khan et al., 2016). A Chloromycetin (Chloramphenicol) 1% (10 mg/g) USP, szemészeti kenőcs is kiemelt fontosságú az olyan szemészeti fertőzések terápiájában, ahol kötőszövet és/vagy a szaruhártya érintett, illetve a fertőzést chloramphenicolra fogékony mikrobák okozzák. A chloramphenicol elérhető szemcsepp (0,5%)-napi négyszer, ha súlyos a fertőzés két óránként adagolva- és szemkenőcs formájában (1%) napi négyszer adagolva- a Brit Orvosok Szövetsége által kiadott British National Formulary for Children alapján ([www.medicinesforchildren.org.uk](http://www.medicinesforchildren.org.uk)). Ez a széles spektrumú antibiotikum részben elhanyagolt lett a szisztémás alkalmazásához kapcsolható halálos aplaszticus vérszegénység miatt, de a multidrog rezisztens szemészeti fertőzések kapcsán újra további tanulmányokat követően előtérbe kerülhet, mivel megfelel a formulálási követelményeknek (Lorenzo 2019). Nem szemészeti, de helyi alkalmazásban sebkezelésre is használják egy klinikai összehasonlító vizsgálat során plasztikai és bőrgyógyászati sebkezelésre használva hiperszenzitivitást és oesophagitist okozott mellékhatásként, alapsitcus vérszegénységet nem jelentettek (Shen et al., 2018).

### ***Limbális monolayer regeneráció nanorészecskék jelenlétében***

A többfalú karbon nanocsövek hatásának vizsgálata során törekedtünk olyan valós körülmények modellezésére, melyek során érintkezhetünk a szén nanocsövekkel, például: karbonszálas autó alkatrészekből (Nguyen-Tran et al., 2018; Muralidharan et al., 2018) balesetkor nagy mennyiségben felszabadulva potenciális expozíciós veszélyt jelenthetnek a sérült szemre. A vizsgálat célja az volt, hogy a többfalú ipari minőségű szén nanocsövek citotoxikus és a limbális monolayer regeneráció mechanizmusát befolyásoló hatásait megállapítsuk. Az eredmények azt mutatták, hogy az ipari MWCNT limbális sejtekre gyakorolt hatása hosszútávon dózisfüggő. Ez összhangban állt több szakirodalmi adattal (Jia et al., 2005; Bottini et al., 2006; Pulskamp et al., 2007; Hirano et al., 2008). Jelentős toxikus hatást nem tapasztaltuk, hasonlóan, az immortalizált és embrionális sejtekhez (Sohaebuddin et al., 2010). A szaruhártya reepithelizációt *in vitro* reprezentáló monolayer regenerációs modell vizsgálata során a koncentrációval arányos nanorészecske felhalmozódást figyeltünk meg a

karcolt régióban, ami összefügghet, illetve amplifikálhatja a karcszéleken tapasztalt monolayer felgyűrődést. Ez pedig a gátolt és zavart motilitással (García-Hevia et al., 2018) és a visszamaradó reziduális testekkel együtt *in vivo* hegesedést okozhat. A nanokarboncső aggregátumok mérete és felhalmozódásuk mértéke a koncentrációval egyenes arányosságot mutatott. Ez párhuzamba vonható az inhaláció során a tüdőben granulomok formájában történő felhalmozódással (Liu et al, 2008) is.

Az arany és ezüst nanorészecskék tesztelése során a monolayer regenerációját és a kromatin kondenzálódási intermedierek változásait vizsgáltuk és ebből vontunk le következtetéseket orvosi biológiai alkalmazhatóságukra vonatkozóan. A nanorészecskéket mint potenciális hatóanyag hordozókat is tekintetbe vettük a corneális epithel megújulása során. A nagy tömegben inertnek tekintett fémek közül az általunk vizsgált részecskék: a kisebb átmérőjű, 10 nm-es ezüst részecskék, melyek a szakirodalmi adatok alapján károsabb hatásúak, képesek bejutni a sejtekbe és a magba (Asharani et al., 2009). A nagyobb, 100 nm, átmérővel rendelkező arany nanorészecskéket melyeket a szakirodalom kevésbé károsnak ítélt meg (Connor et al., 2005, Alkilany et al., 2009, Malugin, Ghandehari 2010). Ennek oka lehet, hogy a nagyobb méretű nanoarany részecskék nem képesek bejutni a sejtmagba (Tsoli et al., 2005). A kisebb ezüst nanorészecskékkel azonban ellentmondásos eredményt kaptunk. A várakozásokkal ellentétben, jelenlétükben a monolayer regenerációja kevesebb időt vett igénybe, mint az arany részecskék jelenlétében. A kezelést követően elhúzódó regenerációt okozó celluláris szintű károsodások jól detektálhatók voltak a kromatin módosulatait tekintve is. Az ezüst részecskék jelenlétében a kromatin kondenzációs folyamat jellemezhető a mag körüli dekonkondenzálódott kromatin fátyol és az üstökös csóva-szerű kromatin képletek kilökődésével, illetve az elongált és metafázisos kromoszómákkal, továbbá az apoptózisra utaló szerkezetek hiányával. Korábban leírt, az ezüst ionok által kiváltott hatás (Nagy et al., 2011b) is ehhez hasonló eredményt adott. A megfigyelések alapján feltételezhető, hogy a kicsi, 10 nm átmérőjű ezüst nanorészecskéknek inkább citostatikus, illetve reverzibilis (Castiglioni et al. 2014), mint citotoxikus hatása van. Ez összhangban áll a kolloidális ezüst (*argentum colloidalis*) oligodinámiás hatásával. Az ezüst hatásához hasonló változásokat figyeltünk meg a toxikusabbnak mutató arany nanorészecskék esetében: A nanorészecskék jelenléte még megengedte a kromatin szalagok átalakulását kromatin testekké, de elongált praekromoszómákat csak ritkán figyeltünk meg, továbbá a metafázisos kromoszómák kialakulása sem következett be. Ennek feltételezett oka a szupertekercselődési aktivitás csökkenése, ami a magasabb rendű kromatin szerkezetek kialakulásának elengedhetetlen

követelménye. A proliferációt gátló hatást az arany részecskéknél a regenerációs idő elhúzódásán keresztül tapasztaltuk melyet a metafázisos kromoszómák megjelenésének hiánya is alátámasztott. A time-lapse felvételek és a kondenzálódási intermedierek vizsgálata során az apoptotikus testek hiánya kizárta a sejtpusztulás lehetőségét.

Az ezüst hatóanyagként történő gyógyászati felhasználása a toxikus hatásai ellenére is igen elterjedt: ezüst tartalmú kötszerek hatóanyagát tesztelve, a keratinocita sejteknél a sejtszám csökkenését és morfológiai változásokat tapasztaltak. Továbbá a sejtek lekerekedését, intracellulárisan a sejtmag méretének csökkenését és a magvacska eltűnését okozta (Paddle-Ledinek et al., 2006). Az ezüst nanorészecskék égési sérülések terápiájában lokális alkalmazásban hatékonyabbnak bizonyultak az ezüst szulfadiazinnél (Tian et al., 2007). Szemészeti vonatkozásban korábban ezüst-nitrát tartalmú szemcseppet alkalmaztak az újszülöttek conjunctivisének megelőzésére, melyet ma már nagyrészt az antibiotikumok használata váltott fel a CDC (US, Centers for Disease Control and Prevention) ajánlásának megfelelően. Az ezüst nanorészecskék *Pseudomonas aeruginosa* ellen corneális epithel és macrophag sejteken tesztelve kevésbé voltak toxikus hatásúak, mint az ezüst-nitrát, viszont az alkalmazott koncentrációknak csupán gyenge hatása volt a baktérium sejtekre (Santoro et al., 2007).

## 6. ÚJ EREDMÉNYEK

A célkitűzésben megjelölt feladatok teljesülését az alábbi eredmények bizonyítják:

### ***1. Uveális melanóma (OCM-1) sejtenyészetek egyedi sejtjeinek multipoláris osztódásai: kvalitatív morfológiai vizsgálata, kvantitatív dinamikai analízise.***

A képszekvenciák vizsgálata során megfigyeltük az uveális melanóma sejtek három irányba történő multipoláris osztódását, amit trivisionak neveztünk el. Ezt a jelenséget több sejtenyészet esetében is tapasztaltuk: K-562, HaCaT, HeLa és CCL 209 sejtek esetében. A folyamat kezdetén jellegzetes morfológiai elváltozás jellemző, ami a sejtanyag, illetve az egész sejt háromirányú szétválásával, vagyis a tripolarizációval írható le.

A digitális képanalízissel az uveális melanóma sejtekről kapott kvantitatív adatok azt mutatták, hogy a multipoláris osztódások ideje szignifikánsan eltért a normál osztódásokétól, átlagosan 40 perccel hosszabb volt. Az osztódások során összehasonlítottuk az osztódni készülő anyasejtek és a leánysejtek térfogatát. A sejtek normál osztódásánál az anyasejtek méretének 43%-át adták, trivisio után ez 22% volt. A multipoláris sejtosztódások gyakorisága az OCM-1 sejtek esetében viszonylag magas értéket adott, 0,27% volt. Vizsgálataink alapján feltéteztük, hogy a trivisio hozzájárul az aneuploidiahoz és tumor progressiójához.

### ***2. Klinikai mintából izolált limbális sejtpopuláció létrehozása, fenntartása és leírása***

A HuLi (Humán Limbális) sejtenyszetet szöveti eredete, morfológiai sajátosságai és genetikai markerei alapján őssejtnek tekintjük. Izolálásuk óta hosszútávon fenntartjuk és folytonos sejtvonalként (HuLi) tartjuk számon. A HuLi sejtek epithel jellegű poligonális alakúak, kisméretűek, nagy a sejtmag-citoplazma arányuk, a citoplazma nem mutat szemcsézettséget. A HuLi citokeratin 19 markerre adott pozitív reakciója a sejtek őssejt voltára utal.

### ***3. In vitro corneális sebgyógyulási modell kidolgozása***

A HuLi monolayer regenerációs karcmodell time-lapse videó mikroszkópos vizsgálata digitális képanalízissel kombinálva megfelelő kísérleti elrendezésnek bizonyult a corneális felszíni regeneráció dinamikájának tanulmányozására. Leírtuk az *in vitro* regenerációs folyamat négy fázisát, melyek megfeleltethetők a cornea reepithelizáció *in vivo* mechanizmusával. Továbbá monolayer regeneráció leírásához egy, a karc eredeti területétől független kvantitatív jellemzőt is bevezettünk, ami a monolayer karcszéli sejtjeinek a karcterületre irányuló migrációját számszerűsíti.

#### **4. A limbális karcmodell felhasználása és eredményei a farmakológiai vizsgálatokban**

A valós idejű, hosszú távú citotoxikológiai megfigyeléseket kiegészítve a vizsgált anyagok genotoxikus hatásainak tanulmányozásával egy széles körben alkalmazható toxikológiai screening rendszert hoztunk létre. A rendszer alkalmas arra, hogy nagy érzékenységgel, klinikai mintákon végezhesük a különböző biológiai folyamatok dinamikus megfigyelését.

A HuLi monolayer regenerációja során a celluláris növekedés az antibiotikumok jelenlétében bizonyította a fordítottan arányos kapcsolatot a sejtproliferáció és az alkalmazott koncentrációk között. A kromatin kondenzálódási intermediereinek vizsgálati eredményeivel kiegészítve a chloramphenicollal és rifampicinnel kezelt sejtek esetében karakterisztikus változások jelentek meg a kontroll mintákhoz képest, melyek jelezhetik a szemészeti regenerációs terápiában alkalmazható antibiotikum koncentrációk maximumát.

#### **5. A karcmodell felhasználása citotoxicitás vizsgálatokhoz:**

- Többfalú ipari minőségű szén nanocsövek hatása:

A többfalú szén nanocsövek hatását tekintve a regeneráció a koncentráció függvényében lelassult a sejtek gátolt, zavart migrációja miatt, melyet a regenerációs görbén késleltetett növekedéssel, a fázisok összerosódásával és a motilitásban növekvő fluktuációkkal jellemezhetünk. A legmagasabb koncentrációjú MWCNT (500 µg/ml) nanorészecske aggregátumok megakadályozták a regenerációs folyamat végbemenetelét. A sejtpázsit regenerációja során az alkalmazott koncentrációval arányosan (50 µg/ml-től) az aggregátumok a karcba ágyazódtak, 100 µg/ml-től a karc széleken a monolayer felgyűrődését okozták. Ez a jelenség *in vivo* hegképződésre utalhat. A hegbe tapadva maradt aggregátumok a látásképesség súlyos romlását okozhatják.

- Inert fém nanorészecskék hatása a monolayer regenerációra.

A limbális sejtek karcmodelljén az ezüst és arany nanorészecske kezelés a regeneráció elhúzódását és a sejtek kromatin kondenzálódási folyamatának osztódás előtti gátlását okozta. A monolayer regenerációjának mérsékelt időbeli elhúzódása a kontrollhoz viszonyítva hasonló volt a kisméretű 10 nm-es ezüst, illetve a nagyméretű 100 nm-es arany nanorészecskék jelenlétében. Az apoptotikus sejtek hiányából mindkét nanorészecske esetében arra következtettünk, hogy a részecskék jelenlétében tapasztalt gátló hatások visszafordíthatók; ez alapján pedig feltételezhető, hogy a kromatin kondenzálódás során bekövetkezett változások sem permanensek.

## 6.1. Távlatok

A videó mikroszkópia lehetőséget biztosít arra, hogy a klinikai szövetmintákból indított sejtenyészetek vizsgálata során rögzített képszekvenciák digitális képanalízisével mind a regeneráció dinamizmusa, mind pedig a tumoros elváltozások kialakulásának folyamata könnyebben, költséghatékonyabban legyen vizsgálható, akár hosszú távon is.

A time-lapse videó mikroszkópos modellrendszer pontosítása, finomítása folyamatban van, de a bemutatott, eddig kapott vizsgálati adatok alapján a módszer szemészeti, ezen belül klinikai relevanciával bíró folyamatok modellezésére történő alkalmazása és felhasználhatósága bizonyítást nyert.

A multipoláris sejtosztódások dinamikájának a képanalízis során nyert kvalitatív és kvantitatív adatai bizonyították a módszer helytállóságát a hosszútávú, nagy időbeni felbontású kísérleti elrendezésben. Igazolást nyert továbbá az ilyen típusú vizsgálatok szükségessége a biológiai mechanizmusok, esetünkben a tumorsejtek szaporodásának és a metastasis terjedésének megértéséhez.

A limbális sejtek cornea hám reepithelizációt modellező monolayer karcmodellje a corneális felszíni viszonyokat tükrözi, a regenerációs folyamat celluláris szintű dinamikáját írja le. A monolayer regenerációs modell gyakorlati alkalmazása már megoldott az antibiotikumok és nanorészecskék tesztelése révén; azonban további, a modell fiziológiásabb állapotot tükröző kísérleti elrendezésének létrehozása is a távlati céljaink között szerepel. A regenerációt befolyásoló és a folyamatot potenciálisan segítő, a már alkalmazott vagy a még vizsgálati fázisban lévő hámosító hatóanyagok *in vitro* hatástanulmányainak vizsgálata szintén a további kutatásaink alapjául szolgál.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

A time-lapse videó mikroszkópia szemészeti klinikumból származó mintákon való felhasználhatóságát két szinten vizsgáltuk: egyedi sejteken az OCM-1 sejtek rendellenes osztódásainak karakterizálásával, sejtpopulációs szinten a limbális sejtek monolayer karc regenerációs modelljének felhasználásával bizonyítottuk.

Az uveális melanóma (OCM-1) sejtek multipoláris osztódások, vagyis trivisiók dinamikai és morfológiai jellegzetességei: A digitális képanalízissel kapott kvantitatív adatok alapján a trivisiók átlagosan 40 perccel hosszabb ideig tartottak. Az anya, és leánysejtjeinek térfogataránya az átlagos 43% hoz képest 22% volt. A multipoláris sejtosztódások gyakorisága az OCM-1 sejtek esetében viszonylag magas értéket adott, 0,27% volt. A folyamat kezdetét jellegzetes morfológiai elváltozás a tripolarizációként leírt folyamat jellemzi, ami a sejtmaganyag, illetve az egész sejt háromirányú szétválásával írható le.

A corneoscleralis limbális gyűrűből izolált HuLi (Humán Limbális) sejteket a szöveti eredetük, morfológiai sajátosságaik és genetikai markeriek alapján összejtnek tekintjük. Izolálásuk óta hosszútávon fenntartjuk, és folytonos sejtvonalként tartjuk számon. A cornea felszíni hámsérülés regenerációját modellezheti a limbális sejtek monolayer karcmodellje, amit time-lapse mikroszkópiával követünk végig és az így nyert képszekvenciák digitális analízisével a regeneráció celluláris szintű dinamikáját vizsgáltuk. Megkülönböztettük a folyamat négy fázisát, és bevezettünk egy, a karc eredeti területétől független kvantitatív jellemzőt, ami karcszéli sejtek a felsértett területre irányuló migrációját számszerűsíti. A time-lapse mikroszkópos citotoxikológiai megfigyeléseket a vizsgált anyagok genotoxikus hatásainak tanulmányozásával egészítettük ki.

A HuLi monolayer regenerációja során a celluláris növekedés a vizsgált antibiotikumok jelenlétében fordított arányoságot mutatott a növekvő koncentrációkkal. A többfalú szén nanocsövek hatására a regeneráció a koncentráció függvényében lelassult a sejtek gátolt, zavart migrációja miatt, melyet a regenerációs görbén késleltetett növekedéssel, a fázisok összemosódásával és a motilitásban növekvő fluktuációkkal jellemezhetünk. Az ezüst és arany nanorészecske kezelés a regeneráció hasonló mértékű elhúzódását és a sejtek osztódás előtti gátlását okozta. Az apoptotikus sejtek hiányából mindkét nanorészecske esetében arra következtettünk, hogy a gátló hatásaik visszafordíthatók.

## 8. SUMMARY

The applicability of time-lapse video microscopy in ophthalmic clinic specimens was presented at two levels, on single cells by characterizing the abnormal divisions of OCM-1 cells; at the cell population level was demonstrated using a monolayer scratch regeneration model of limbal cells.

Multipolar divisions ie, trivisions, of uveal melanoma (OCM-1) cells, dynamic and morphological characteristics: Based on the quantitative data obtained by digital image analysis trivisions lasted on average 40 minutes longer than the divisions. The volume ratio of mother and daughter cells was 22% compared to an average of 43%. The frequency of multipolar cell division was relatively high for OCM-1 cells, it was 0.27%. The onset of the process is identified by a characteristic morphological change, a process described as tripolarization, which a three-way separation of the nucleus and the whole cell.

HuLi (Human Limbal) cells isolated from the corneoscleral limbal ring, are considered as stem cells based on their tissue origin, morphological features, and genetic markers. The cells have been maintained from isolation in a long term and considered as a continuous cell line (HuLi). The regeneration of the corneal surface can be modeled by the monolayer scratch model of limbal cells, which is followed by time-lapse microscopy, and by digital image analysis of the resulting image sequences, the cellular dynamics of the regeneration was examined. We distinguished four phases of the process and introduced a quantitative feature that is independent of the original area of the scratch and that quantifies the migration of cells from scratched edges to the affected area. The time-lapse microscopic observations of cytotoxicology were supplemented by studying the genotoxic effects of the test substances.

In the regeneration of HuLi monolayer, cellular growth in the presence of antibiotics (chloramphenicol and rifampicin) showed an inversely proportional relationship to the increasing concentrations used. Multiwalled carbon nanotubes have slowed the concentration-dependent regeneration of the cells due to inhibited, disturbed migration of the cells, which is characterized by delayed growth in the regeneration curve, phase mixing, and increased fluctuations in motility. Silver and gold nanoparticle treatment resulted in a similar delay in regeneration, and caused the inhibition of the chromatin condensation process of cells prior to proliferation. In the absence of apoptotic cells, it is concluded that the inhibitory effects observed in the presence of particles could be reversible for both nanoparticles.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

- Ahmad S., (2012). Concise review: limbal stem cell deficiency, dysfunction, and distress. *Stem cells translational medicine*. 1(2), 110-115.
- Aillon K.L., Xie Y., El-Gendy N., Berkland C.J., Forrest M.L. (2009). Effects of nanomaterials physicochemical properties on *in vivo* toxicity. *Advanced drug delivery reviews*, 61(6),457-466.
- Albert D.M., Ruzzo M.A., McLaughlin M.A., Robinson N.L., Craft J.L., Epstein J. (1984). Establishment of cell lines of uveal melanoma. Methodology and characteristics. *Investigative ophthalmology & visual science*, 25(11),1284-1299.
- Albert R., Veréb Z., Csomós K., Moe M.C., Johnsen E.O., Olstad O.K., Nicolaissen B., Rajnavölgyi E., Fésüs L., Berta A., Petrovski G. (2012). Cultivation and characterization of cornea limbal epithelial stem cells on lens capsule in animal material-free medium, *PLoS one*. 7(10), e47187.
- Alivisatos A.P. (1996). Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *Science*, 271(5251), 933-937.
- Alkilany A.M., Nagaria P.K., Hexel C.R., Shaw T.J., Murphy C.J., Wyatt M.D. (2009). Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: molecular origin of cytotoxicity and surface effects. *small*, 5(6),701–708.
- Andón F.T., Fadeel B. (2012) Programmed cell death: molecular mechanisms and implications for safety assessment of nanomaterials, *Accounts of chemical reserach*, 46(3),733–42
- Anker J.N., Hall W.P., Lyandres O, Shah N.C., Zhao J., Van Duyne R.P. (2010). Biosensing with plasmonic nanosensors, *Nature Materials*, 7(6),442–453.
- Aronow M.E., Topham A.K., Singh A.D. (2018). Uveal Melanoma: 5-Year Update on Incidence, Treatment, and Survival (SEER 1973-2013). *Ocular oncology and pathology*, 4(3), 145–151.

- Arora S., Jain J., Rajwade J.M., Paknikar K.M. (2008). Cellular responses induced by silver nanoparticles: in vitro studies. *Toxicology letters*, 179(2), 93–100.
- Asharani P.V., Hande P.M., Valiyaveetil S. (2009.) Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC cell biology*, 10(1), 65.
- Bakalian S., Marshall J.C., Logan P., Faingold D., Maloney S., Di Cesare S., Martins C., Fernandes B.F., Burnier M.N.Jr. (2008). Molecular pathways mediating liver metastasis in patients with uveal melanoma. *Clinical Cancer Research*, 14(4), 951-6.
- Banfalvi G. (2006). Condensation of interphase chromosomes in nuclei of synchronized CHO cells. *DNA and cell biology*, 25(11), 641-645. (a)
- Banfalvi G. (2006). Linear connection of condensing chromosomes in nuclei of synchronized CHO cells. *DNA and Cell Biology*, 25(9), 541-545. (b).
- Banfalvi G. (2008). Chromatin fiber structure and plectonemic model of chromosome condensation in Drosophila cells. *DNA and cell biology*, 27(2), 65-70.
- Banfalvi G. (2011). Cellular changes in mammalian cells induced by cadmium. In: *Cellular effects of heavy metals* (pp. 147-162). Springer, Dordrecht,
- Banfalvi G. (2012). Metastatic view of breast cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 31(3-4), 815-822.
- Banfalvi G. (2014). Apoptotic agents inducing genotoxicity-specific chromatin changes. *Apoptosis*, 19(9), 1301-1316.
- Banfalvi G., Gacsi M., Nagy G., Kiss B.Z., Basnakian A.G. (2005). Cadmium induced apoptotic changes in chromatin structure and subphases of nuclear growth during the cell cycle in CHO cells. *Apoptosis*, 10(3), 631-642.
- Banfalvi G., Klaisz M., Ujvarosi K., Trencsenyi G., Rozsa D., Nagy G. (2007). Gamma irradiation induced apoptotic changes in the chromatin structure of human erythroleukemia K562 cells. *Apoptosis*, 12(12), 2271-83. (a)
- Banfalvi G., Nagy G., Gacsi M., Roszer T., Basnakian A.G. 2006. Common pathway of chromosome condensation in mammalian cells. *DNA and cell biology*, 25(5), 295-301.

- Banfalvi G., Sarvari A.K., Nagy G. (2012). Chromatin changes induced by Pb and Cd in human cells. *Toxicology in Vitro* 26(6), 1064-1071.
- Banfalvi G., Sooki-Toth A., Sarkar N., Csuzi S., Antoni F. (1984). Nascent DNA chains synthesized in reversibly permeable cells of mouse thymocytes. *European journal of biochemistry*, 139(3), 553-559.
- Banfalvi G., Trencsenyi G., Ujvarosi K., Nagy G., Ombodi T., Bedei M., Somogyi C., Basnakian A.G. (2007). Supranucleosomal organization of chromatin fibers in nuclei of *Drosophila* S2 cells. *DNA and Cell Biology*, 26(1), 55-62. (b)
- Banfalvi G., Ujvarosi K., Trencsenyi G., Somogyi C., Nagy G., Basnakian A. (2007). Cell culture density dependent toxicity and chromatin changes upon cadmium treatment in murine pre-B-cells. *Apoptosis*, 12(7), 1219-28. (c)
- Bar-Ilan O., Albrecht R.M., Fako V.E., Furgeson D.Y. (2009). Toxicity Assessments of Multisized Gold and Silver Nanoparticles in Zebrafish Embryos. *Small*, 5(16), 1897–1910.
- Barsky D. (1990). Anatomy of the uveal tract. In: Tasman W., Jaeger E.A. eds. *Duane's clinical ophthalmology*. Volume IV., chapter 31,1-10. Philadelphia: JB Lippincott.
- Baylis O., Figueiredo F., Henein C., Lako M., Ahmad S. (2011). 13 years of cultured limbal epithelial cell therapy: A review of the outcomes. *Journal of cellular biochemistry*, 112(4), 993–1002.
- Bedikian A.Y., Legha S.S., Mavligit G., Carrasco C.H., Khorana S., Plager C., Papadopoulos N., Benjamin R.S. (1995). Treatment of uveal melanoma metastatic to the liver: a review of the M. D. Anderson Cancer Center experience and prognostic factors. *Cancer*, 76(9), 1665-70.
- Bishop P.N., Takanosu M., Le Goff M., Mayne R. (2002) The role of the posterior ciliary body in the biosynthesis of vitreous humour. *Eye*, 16(4):454-60.
- Bottini M., Bruckner S., Nika K., Bottini N., Bellucci S., Magrini A., Bergamaschi A., Mustelin T. (2006). Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. *Toxicology letters* 160(2), 121–126.
- Braydich-Stolle L., Hussain S., Schlager J.J., Hofmann M.C. (2005). *In vitro* cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicological sciences*, 88(2), 412–419.

- Campbell E.A., Korzheva N., Mustaev A., Murakami K., Nair S., Goldfarb A., Darst S.A. (2001). Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell*, 104(6), 901-12.
- Carbone M., Yang H., Pass H.I., Krausz T., Testa J.R., Gaudino G. (2013). BAP1 and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 13(3), 153.
- Castedo M., Galluzzi L., Vitale I., Senovilla L., Métivier D., Je` maa` M., Rello-Varona S., Kroemer G. (2011). Cytofluorometric purification of diploid and tetraploid cancer cells. Cytofluorometric purification of diploid and tetraploid cancer cells. In *Cell Cycle Synchronization* (pp. 47-63). Humana Press.
- Castiglioni S., Caspani C., Cazzaniga A., Maier, J.A. (2014). Short-and long-term effects of silver nanoparticles on human microvascular endothelial cells. *World journal of biological chemistry*, 5(4), 457.
- Chen J., Du D., Yan F., Ju H.X., Lian H.Z. (2005). Electrochemical Antitumor Drug Sensitivity Test for Leukemia K562 Cells at a Carbon-Nanotube-Modified Electrode. *Chemistry–A European Journal*, 11(5), 1467-1472.
- Chithrani B.D., Chan W.C. (2007). Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano letters*. 7(6):1542–1550.
- Chithrani B.D., Ghazani A.A., Chan W.C. (2006). Determining the size and the shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano letters*. 6(4), 662-8.
- Collins J.L., van Knippenberg B., Ding K., Kofman A.V. (2018). Time-Lapse Microscopy. In *Cell Culture*. IntechOpen.
- Connor E.E., Mwamuka J., Gole A., Murphy C.J., Wyatt M.D. (2005). Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small*, 1(3):325-7.
- Cotsarelis G., Cheng G., Dong G., Sun T.T., Lavker R.M. (1989). Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell*, 57(2), 201–209.
- Cruz M., Gadea B., Garrido N., Pedersen K.S., Martinez M., Perez-Cano I., Munoz M., Meseguer M., (2011). Embryo quality, Time-lapse microscopy in early embryo

- development research 127 blastocyst and ongoing pregnancy rates in oocyte donation patients whose embryos were monitored by time-lapse imaging. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 28(7), 569–573.
- Cveticanin J., Joksic G., Leskovac A., Petrovic S., Sobot A.V., Neskovic O. (2009). Using carbon nanotubes to induce micronuclei and double strand breaks of the DNA in human cells. *Nanotechnology*, 21(1), 015102.
- Daniels J.T., Dart J.K., Tuft S.J., Khaw P.T. (2001). Corneal stem cells in review. *Wound repair and regeneration*, 9(6), 483-494.
- Darougar S., Viswalingam M., Treharne J.D., Kinnison J.R., Jones B.R. (1977). Treatment of TRIC infection of the eye with rifampicin or chloramphenicol. *British Journal of Ophthalmology*, 61(4), 255-259.
- Das S., Mitra S., Khurana S. P., Debnath N. (2013). Nanomaterials for biomedical applications. *Frontiers in life science*, 7(3-4), 90-98.
- Dawson C.R., Hoshiwara I., Daghfous T., Messadi M., Vastine D.W., Schachter J., (1975). Topical tetracycline and rifampicin therapy on endemic trachoma in Tunisia. *American journal of ophthalmology*, 79(5), 803-811.
- De Jong W.H., Hagens W.I., Krystek P., Burger M.C., Sips A.J., Geertsma, R.E. (2008). Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials*, 29(12), 1912-1919.
- Dey P., Das N. (2013). Carbon Nanotubes: Its role in modern health care. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(4), 9-13.
- Di Giorgio ML, Di Bucchianico S, Ragnelli AM, Aimola P, Santucci S, Poma A. (2011). Effects of single and multi walled carbon nanotubes on macrophages: cyto and genotoxicity and electron microscopy. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 722(1), 20-31.
- Di Mauro E., Snyder L., Marino G.P., Lamberti A., Coppo A., Tocchini-Valenti, C.P. (1969). Rifampicin Sensitivity of the Components of DNA-Dependent RNA Polymerase. *Nature*, 222(5193), 533-537.

- Diacon A.H., Patientia R.F., Venter A., van Helden P.D., Smith P.J., McIlleron H., Maritz J.S., Donald P.R. (2007). Early bactericidal activity of high-dose rifampin in patients with pulmonary tuberculosis evidenced by positive sputum smears. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 51(8), 2994-6.
- Donaldson K., Borm P.J.A., Castranova V., Gulumian M. (2009). The limits of testing particle-mediated oxidative stress *in vitro* in predicting diverse pathologies; relevance for testing of nanoparticles. *Particle and fibre toxicology*, 6(1), 13.
- Donaldson K, Murphy FA, Duffin R, Poland CA. (2010). Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma. *Particle and fibre toxicology*, 7(1), 5.
- Donaldson K., Aitken R., Tran L., Stone V., Duffin R., Forrest G., Alexander A. (2006). Carbon nanotubes: a review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. *Toxicological sciences*, 92(1), 5-22.
- Dua H.S., Faraj L.A., Said D.G., Gray T., Lowe J. (2013). Human corneal anatomy redefined: a novel Pre-Descemet's Layer (Dua's Layer). *Ophthalmology*, 120(9) 1778-1785.
- Dua H.S., Azuara-Blanco A. (2000). Autologous limbal transplantation in patients with unilateral corneal stem cell deficiency. *British Journal of Ophthalmology*, 84(3), 273-278.
- Dua H.S., Forrester J.V. (1990). The corneoscleral limbus in human corneal epithelial wound healing. *American journal of ophthalmology*, 110(6):646-56.
- Dua H.S., Miri A., Said D.G. (2010). Contemporary limbal stem cell transplantation - a review. *Clinical & experimental ophthalmology*, 38(2), 104-117.
- Dua, H.S., Gomes, J.A., Singh, A. (1994). Corneal epithelial wound healing. *The British journal of ophthalmology*, 78(5), 401.
- Eatemadi A., Daraee H., Karimkhanloo H., Kouhi M., Zarghami N., Akbarzadeh A., Abasi M., Hanifehpour Y., Joo, S.W. (2014). Carbon nanotubes: properties, synthesis, purification, and medical applications. *Nanoscale research letters*, 9(1), 393.
- Edwards C., Mccann, R.J., Pearce P. 1983. Effects of chloramphenicol on cell division in synchronized cells of *Alcaligenes eutrophus*. *Microbiology*. 129(8), 2681-2683.

- Farkas E., Ujvarosi K., Nagy G., Posta J., Banfalvi G. (2010). Apoptogenic and necrogenic effects of mercuric acetate on the chromatin structure of K562 human erythroleukemia cells. *Toxicology In Vitro*, 24(1), 267-75.
- Firme III C.P., Bandaru, P.R. (2010). Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(2), 245-256.
- Folberg R. (1993). Tumor progression in ocular melanomas. *Journal of investigative dermatology*, 100(3), 326S-S331.
- Folberg R., Hendrix M.J., Maniotis A.J. (2000). Vasculogenic Mimicry and Tumor Angiogenesis. *American journal of pathology*, 156(2), 361-81.
- Foldbjerg, R., Dang, D. A., Autrup, H. (2011). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Archives of toxicology*. 85(7), 743-750.
- Foss A.J.E., Alexander R.A., Jefferies L.W., Hungerford J.L., Harris A.L., Lightman S. (1996). Microvessel Count Predicts Survival in Uveal Melanoma. *Cancer Research*, 56(13), 2900-2903.
- Francis A.P, Devasena T. (2018). Toxicity of carbon nanotubes: A review. *Toxicology and industrial health*, 34(3), 200-210.
- Frucht-Pery J., Siganos C.S., Solomon A., Scheman L., Brautbar C., Zauberman H. (1998). Limbal cell autograft transplantation for severe ocular surface disorders. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology*, 236(8), 582-587.
- Fujiwara, T., Bandi, M., Nitta, M., Ivanova, E.V., Bronson, R.T. and Pellman, D. (2005). Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature*, 437(7061), 1043–1047.
- Fukushima S., Kasai T., Umeda Y., Ohnishi M., Sasaki T., Matsumoto, M. (2017). Carcinogenicity of multi-walled carbon nanotubes: challenging issue on hazard assessment. *Journal of occupational health*, 17-0102.
- Gacsi, M., Nagy, G., Pinter, G., Basnakian, A.G., Banfalvi, G. (2005). Condensation of interphase chromatin in nuclei of synchronized chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *DNA and cell biology*, 24(1), 43-53.

- Gao H.J., Shi W.D., Freund L.B. (2005). Mechanics of receptor-mediated endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102(27), 9469–9474.
- García-Hevia L., Valiente R., Fernández-Luna J.L., Flahaut E., Rodríguez-Fernández L., Villegas J.C., González J., Fanarraga M. L. (2015). Inhibition of Cancer Cell Migration by Multiwalled Carbon Nanotubes. *Advanced healthcare materials*, 4(11), 1640-1644.
- Gong H., Peng R., Liu, Z. (2013). Carbon nanotubes for biomedical imaging: the recent advances. *Advanced drug delivery reviews*, 65(15), 1951-1963.
- Goodman C.M., McCusker C.D., Yilmaz T., Rotello V.M. (2004). Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjugate chemistry*, 15(4), 897–900.
- Gu, Y.J., Cheng, J., Lin, C.C., Lam, Y.W., Cheng, S.H., Wong, W.T. (2009). Nuclear penetration of surface functionalized gold nanoparticles. *Toxicology and applied Pharmacology*, 237(2), 196-204.
- Guo Y.Y., Zhang J., Zheng Y.F., Yang J., Zhu, X.Q. (2011). Cytotoxic and genotoxic effects of multi-wall carbon nanotubes on human umbilical vein endothelial cells *in vitro*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 721(2), 184-191.
- Hardarson T., Lofman C., Coull G., Sjogren A., Hamberger L., Edwards R.G. (2002). Internalization of cellular fragments in a human embryo: time-lapse recordings. *Reproductive BioMedicine Online*, 5(1), 36-38.
- Hendrix M.C.J., Seftor E.A., Hess A.R., Seftor R.E. (2003). Vasculogenic Mimicry And Tumour-Cell Plasticity: Lessons From Melanoma. *Nature reviews cancer*, 3(6), 411.
- Hendrix M.C.J., Seftor E.A., Meltzer P.S., Gardner L.M.G., Hess A.R., Kirschmann D.A., Schatteman G.C., Seftor R.E.B. (2001). Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: Role in vasculogenic mimicry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(14), 8018-23.
- Hendrix M.J.C., Seftor E.A., Seftor R.E.B., Kirschmann D., Gardner L.M., Boldt C., Meyer M., Pe'er J., Folberg R. (1998). Regulation of uveal melanoma interconverted phenotype by Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor (HGF/SF). *The American journal of pathology*. 152(4), 855.

- Herbert D., Paramasivan C.N, Venkatesan P., Kubendiran G., Prabhakar R., Mitchison D.A. (1996). Bactericidal action of ofloxacin, sulbactam-ampicillin, rifampin, and isoniazid on logarithmic- and stationary-phase cultures of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 40(10), 2296–2299.
- Higa K., Shimmurab S., Miyashitaa H., Shimazakib J., Tsubota K. (2005). Melanocytes in the corneal limbus interact with K19-positive basal epithelial cells. *Experimental eye research*. 81(2), 218–223.
- Hillegass J.M., Shukla A., Lathrop S.A., MacPherson M.B., Fukagawa N.K., Mossman, B.T. (2010). Assessing nanotoxicity in cells in vitro. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2(3), 219-231.
- Horvath E., Nagy G., Turani M., Balogh E., Papp G., Pollak E., Pocsi I., Pesti M., Banfalvi G. (2012). Effect of the fungal mycotoxin patulin on the chromatin structure of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of basic microbiology*, 52(6), 642-652.
- Hussain S.M., Hess K.L., Gearhart J.M., Geiss K.T., Schlager J.J. (2005). In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in vitro*, 19(7), 975–983.
- Inoue S., Spring K.R. (1997). Video Microscopy: the fundamentals. In *Video Microscopy: the fundamentals*.
- Isefuku S., Joyner C.J., Simpson, A.H.R.W. (2001). Toxic effect of rifampicin on human osteoblast-like cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 19(5), 950-954.
- Jaurand M.C.F., Renier A., Daubriac J. (2009). Mesothelioma: Do asbestos and carbon nanotubes pose the same health risk?. *Particle and Fibre Toxicology*, 6(1), 16.
- Jenkins J.T., Halaney D.L., Sokolov K.V., Ma L.L., Shipley H.J., Mahajan S., Loudon C.L., Asmis R., Milner T.E., Johnston K.P., Feldman M.D. (2013). Excretion and toxicity of gold-iron nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 9(3), 356-365.
- Ji S.R., Liu C., Zhang B., Yang F., Xu J., Long J., Jin C., Fu D., Ni Q., Yu X.J. (2010). Carbon nanotubes in cancer diagnosis and therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1806(1), 29-35.

- Jia G., Wang H., Yan L., Wang X., Pei R., Yan T., Zhao Y., Guo X. (2005). Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. *Environmental Science & Technology*, 39(5), 1378–1383.
- Joós G. Jákim J. Kiss B. Szamosi R. Papp T. Felszeghy S. Sághy T. Nagy G. Szondy Z. (2017). Involvement of adenosine A3 receptors in the chemotactic navigation of macrophages towards apoptotic cells. *Immunology letters*, 183, 62-72.
- Jovanovic P., Mihajlovic M., Djordjevic-Jocic J., Vlajkovic S., Cekic S., Vladisav S. (2013). Ocular melanoma: an overview of the current status. *International journal of clinical and experimental pathology*, 6(7):1230-1244.
- Kagan V.E., Tyurina Y.Y., Tyurin V.A., Konduru N.V., Potapovich A.I., Osipov A.N., Kisin E.R, Schwegler-Berry D., Mercer R., Castranova V., Shvedova, A.A. (2006). Direct and indirect effects of single walled carbon nanotubes on RAW 264.7 macrophages: role of iron. *Toxicology letters*, 165(1), 88-100.
- Kam N.W.S., Dai H. (2005). Carbon nanotubes as intracellular protein transporters: generality and biological functionality. *Journal of the American Chemical Society*, 127(16), 6021-6026.
- Kam S.N.W., Jessop T.C., Wender P.A., Dai H. (2004). Nanotube molecular transporters: internalization of carbon nanotube– protein conjugates into mammalian cells. *Journal of the American Chemical Society*, 126(22), 6850-6851.
- Kang B., Chang S., Dai Y., Yu D., Chen D. (2010). Cell response to carbon nanotubes: size-dependent intracellular uptake mechanism and subcellular fate. *Small*, 6(21), 2362-2366.(a)
- Kang B., Mackey M.A., El-Sayed M.A. (2010). Nuclear targeting of gold nanoparticles in cancer cells induces dna damage, causing cytokinesis arrest and apoptosis. *Journal of the American Chemical Society*, 132(5), 1517-9. (b).
- Kan-Mitchell J., Mitchell M.S., Rao N., Liggett P.E. 1989. Characterization of uveal melanoma cell lines that grow as xenografts in rabbit eyes *Investigative ophthalmology & visual science*, 30(5), 829-34.

- Kasper M., Moll R., Stosiek P., Karsten U. (1988). Patterns of cytokeratin and vimentin expression in the human eye. *Histochemistry*, 89(4), 369–377.
- Kawata K., Osawa M., Okabe S. (2009). In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to hepg2 human hepatoma cells. *Environmental science & technology*, 43(15), 6046–6051.
- Kemeny-Beke A., Berenyi E., Facsko A., Damjanovich J., Horvath A., Bodnar A., Berta A., Aradi J. (2006). Antiproliferative effect of 4-thiouridylate on OCM-1 uveal melanoma cells. *European journal of ophthalmology*, 16(5), 680–685.
- Khaliullin T.O., Fatkhutdinova L.M., Zalyalov R.R., Kisin E.R., Murray A.R., Shvedova A.A. (2015). In vitro toxic effects of different types of carbon nanotubes. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 98, No. 1, p. 012021). IOP Publishing.
- Khan J.A., Pillai B., Das T.K., Singh Y., Maiti S. (2007). Molecular effects of uptake of gold nanoparticles in HeLa cells. *Chembiochem*, 8(11), 1237–1240.
- Khan, M.S., Sameen, M., Lodhi, A.A, Ahmed, M., Ahmed, N., Kamal, M., Junejo, S.A. (2016). Effect of half adult dose of oral Rifampicin (300mg) in patients with idiopathic central serous chorioretinopathy. *Pakistan journal of medical sciences*, 32(5), 1158.
- Kim T.H., Kim M., Park H.S., Shin U.S., Gong M.S., Kim H.W. (2012). Size-dependent cellular toxicity of silver nanoparticles. *Journal of biomedical materials research Part A*, 100(4), 1033-1043.
- Kim Y-J., Yang S.I., Ryu J.C. (2010). Cytotoxicity and genotoxicity of nano-silver in mammalian cell lines. *Molecular & Cellular Toxicology*, 6(2), 119–125.
- Kinoshita, S., Friend, J., Thoft, R.A. (1981). Sex chromatin of donor corneal epithelium in rabbits. *Investigative ophthalmology & visual science*, 21(3), 434–441.
- Kiraly G, Simonyi A.S, Turani M, Juhasz I, Nagy G, Banfalvi G. (2017). Micronucleus formation during chromatin condensation and under apoptotic conditions. *Apoptosis*, 22(2), 207-219.
- Kiraly G., Nagy G., Turani M., Banfalvi G. (2014). Tumor cell fusion and multipolar trivision. *Journal of Cancer Research and Therapeutic Oncology*, 2, 1-5.

- Kivelä, T. (2009). Uveal Malignant Melanoma: Histopathologic Features. *Essentials of Ophthalmic Oncology*, 89.
- Klausewitz W. (1953). Cyodiagnostic studies on living blood and lymph cells of some Amphibia by means of micro-time lapse film and phase contrast microscopy. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 39(1):1-35
- Knudson A. 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(4), 820-823.
- Kostarelos K., Lacerda L., Pastorin G., Wu W., Wieckowski, S., Luangsivilay, J., Godefroy S., Pantarotto D., Briand J.P., Muller S., Prato M., Bianco A. (2007). Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type. *Nature nanotechnology*, 2(2), 108.
- Kruse, F.E., Tseng, S.C. (1993). Serum differentially modulates the clonal growth and differentiation of cultured limbal and corneal epithelium. *Investigative ophthalmology & visual science*, 34(10), 2976-2989
- Kulesa P.M., Kasemeier-Kulesa J.C. (2007). Construction of a heated incubation chamber around a microscope stage for time-lapse imaging. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2007(7), pdb-prot4792.
- Lam C.W., James J. T., McCluskey R., Arepalli S., Hunter, R.L. (2006). A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks. *Critical reviews in toxicology*, 36(3), 189-217.
- Lamprecht C., Gierlinger N., Heister E., Unterauer B., Plochberger B., Brameshuber M., Hinterdorfer P., Hild S., Ebner A. (2012). Mapping the intracellular distribution of carbon nanotubes after targeted delivery to carcinoma cells using confocal Raman imaging as a label-free technique. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 24(16) 164206.
- Landecker H. (2009). Seeing things: From microcinematography to live cell imaging. *Nature Methods*, 6(10), 707-709
- Leiter L.M., Thatte H.S., Okafor C., Marks P.W, Golan D.E., Bridges K.R (1999). Chloramphenicol-induced mitochondrial dysfunction is associated with decreased

- transferrin receptor expression and ferritin synthesis in K562 cells and is unrelated to IRE-IRP interactions. *Journal of cellular physiology*, 180(3), 334–344.
- Lemmen J.G., Agerholm I., Ziebe S., (2008). Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reproductive biomedicine online*, 17(3), 385-391.
- Li W., Hayashida Y., Chen Y.T., Tseng S.C. (2007). Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. *Cell research*, 17(1), 26-36.
- Liang C.C., Park A.Y., Guan J.L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols*, 2(2), 329.
- Lichtinger A., Pe'er J., Frucht-Pery J., Solomon A. (2010). Limbal stem cell deficiency after topical mitomycin C therapy for primary acquired melanosis with atypia. *Ophthalmology*, 117(3), 431-437.
- Liu D., Wang L., Wang Z., Cuschieri A. (2012). Different cellular response mechanisms contribute to the length-dependent cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes. *Nanoscale research letters*, 7(1), 361.
- Liu W., Wu Y., Wang C., Li H.C., Wang T., Liao C.Y., Cui L., Zhou Q.F., Yan B., Jiang G.B. (2010). Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size. *Nanotoxicology*, 4(3), 319-330.
- Liu Y., Zhao Y., Sun B., Chen C. (2012). Understanding the toxicity of carbon nanotubes. *Accounts of chemical research*, 46(3), 702-713.
- Liu, Z., Tabakman S., Welsher K., Dai H. (2009). Carbon nanotubes in biology and medicine: *in vitro* and *in vivo* detection, imaging and drug delivery. *Nano research*, 2(2), 85-120.
- Loeschner K., Hadrup N., Qvortrup K., Larsen A., Gao X., Vogel U., Mortensen A., Rye H., Larsen E. H. 2011. Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. *Particle and fibre toxicology*, 8(1), 18.
- Lorenzo, D. (2019). Chloramphenicol Resurrected: A Journey from Antibiotic Resistance in Eye Infections to Biofilm and Ocular Microbiota. *Microorganisms*, 7(9).

- Madani S.Y., Mandel A., Seifalian A.M. (2013). A concise review of carbon nanotube's toxicology. *Nano reviews*, 4(1), 21521.
- Magrez A., Kasas S., Salicio V., Pasquier N., Seo J. W., Celio M., Catsicas S., Schwaller B., Forró, L. (2006). Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials. *Nano letters*, 6(6), 1121-1125.
- Majo F., Rochat A., Nicolas M., Jaoude G.A., Barrandon Y. (2008). Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature*, 456(7219), 250–254.
- Malugin A., Ghandehari H. (2010). Cellular uptake and toxicity of gold nanoparticles in prostate cancer cells: a comparative study of rods and spheres. *Journal of Applied Toxicology*, 30(3), 212-217.
- Maniotis A.J, Folberg R, Hess A, Seftor E.A, Gardner L.M.G, Pe'er J., Trent J.M., Meltzer PS, Hendrix MJC. (1999). Vascular channel formation by human melanoma cells *in vivo* and *in vitro*: vasculogenic mimicry. *The American journal of pathology*, 155(3), 739–752.
- Manna S.K, Sarkar S, Barr J, Wise K., Barrera E.V., Jejelowo O., Rice-Ficht A.C., Ramesh G.T. (2005). Single-walled carbon nanotube induces oxidative stress and activates nuclear transcription factor-B in human keratinocytes. *Nano letters*, 5(9), 1676–1684.
- Margolis R.L. (2005). Tetraploidy and tumor development. *Cancer cell*, 8(5), 353–354.
- Martindale W., Wescott W.W., (1989.) The Extra Pharmacopoeia, 29th ed, p106. The Pharmaceutical Press, London.
- McKee, H.D., Irion, L.C., Carley, F.M., Brahma, A.K., Jafarinasab, M.R., Rahmati-Kamel, M., Mozhgan R.K., Feizi, S. (2014). Re: Dua et al.: Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet layer (Dua's layer)(*Ophthalmology* 2013; 120: 1778–85). *Ophthalmology*, 121(5), e24-e25.
- McLean I.W. (1993). The biology of haematogenous metastasis in human uveal malignant melanoma. *Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histopathology*, 422(6), 433.
- McLean I.W., Foster W.D., Zimmerman LE. (1982). Uveal melanoma: location, size, cell type, and enucleation as risk factors in metastasis. *Human pathology*, 13(2):123-32.

- Meseguer M., Herrero J., Tejera A., Hilligsoe K.M., Ramsing N.B., Remohi J., (2011). The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Human reproduction*, 26(10), 2658-2671.
- Mio Y., Maeda K., (2008). Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during in vitro development of human embryos. *American journal of obstetrics and gynecology*, 199(6), 660-e1.
- Moaddab S., Ahari H., Shahbazzadeh D., Motallebi A.A., Anvar A.A., Rahman-Nya J., Shokrgozar M.R. (2011). Toxicity study of nanosilver (Nanocid®) on osteoblast cancer cell line. *International Nano Letters*, 1(1), 11.
- Monteiro-Riviere N.A., Inman A.O. (2006). Challenges for assessing carbon nanomaterial toxicity to the skin. *Carbon*, 44(6), 1070-1078.
- Monteiro-Riviere N.A., Nemanich R.J., Inman A.O., Wang Y.Y., Riviere, J.E. (2005). Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicology letters*, 155(3), 377-384.
- Mu Q., Broughton D. L., Yan B. (2009). Endosomal Leakage and Nuclear Translocation of Multiwalled Carbon Nanotubes: Developing a Model for Cell Uptake. *Nano letters*, 9(12), 4370–4375.
- Muller J., Huaux F., Moreau N., Misson P., Heilier J. F., Delos M., Arras M., Fonseca A., Nagy J.B., Lison, D. (2005). Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicology and applied pharmacology*, 207(3), 221-231.
- Muralidharan N., Teblum E., Westover A.S., Schauben D., Itzhak A., Muallem M., Nessim G.D., Pint, C. L. (2018). Carbon Nanotube Reinforced Structural Composite Supercapacitor. *Scientific reports*, 8(1), 17662.
- Murphy C.J., Gole A.M., Hunyadi S.E., Stone J.W., Sisco P.N., Alkilany A., Kinard B.E., Hankins P. (2008). Chemical sensing and imaging with metallic nanorods. *Chemical communications (Cambridge, England)*, (5), 544-557.
- Nagy G, Hennig GW, Petrenyi K, Kovacs L, Pocsi I, Dombradi V, Banfalvi G. (2014). Time-Lapse video microscopy and image analysis of adherence and growth patterns of *Candida albicans* strains. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(11), 5185-5194.

- Nagy G., Tanczos B., Fidrús E., Talas L., Banfalvi G. (2017). Chemically induced cell cycle arrest in perfusion cell culture. In: *Cell Cycle Synchronization* (pp. 161-176). Humana Press, New York, NY.
- Nagy G., Baksa V., Kiss A., Turani M., Banfalvi G. (2017). Gadolinium induced effects on mammalian cell motility, adherence and chromatin structure. *Apoptosis*, 22(2), 188-199
- Nagy G., Benko I., Kiraly G., Voros O., Tanczos B., Sztrik A., Takacs T., Pócsi I., Prokisch J., Banfalvi G. (2015). Cellular and nephrotoxicity of selenium species. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 30, 160-170.
- Nagy G., Gacsi M., Rehak M., Basnakian A.G., Klaisz M., Banfalvi G. (2004). Gamma irradiation-induced apoptosis in murine pre-B cells prevents the condensation of fibrillar chromatin in early S phase. *Apoptosis*, 9(6), 765-776.
- Nagy G., Kiraly G., Banfalvi G. (2012). Optimization of cell cycle measurement by time-lapse microscopy. In *Methods in Cell Biology* (Vol. 112, pp. 143-161). Academic Press
- Nagy G., Laza D., Ujvárosi, K., Bánfalvi G. (2011). Chromatin toxicity of Ni (II) ions in K562 erythroleukemia cells. In *Cellular Effects of Heavy Metals* (pp. 163-178). Springer, Dordrecht. (a)
- Nagy G., Pinter G., Kohut G., Adam A.L., Trencsenyi G., Hornok L., Banfalvi G. (2010). Time-lapse analysis of cell death in mammalian and fungal cells. *DNA and cell biology*, 29(5), 249-259.
- Nagy G., Turani M., Kovacs K.E., Banfalvi, G. (2011). Chromatin changes upon silver nitrate treatment in human keratinocyte HaCaT and K562 erythroleukemia cells. In *Cellular Effects of Heavy Metals* (pp. 195-217). Springer, Dordrecht. (b)
- Nativo P., Prior I.A., Brust M. (2008). Uptake and intracellular fate of surface-modified gold nanoparticles. *ACS Nano*, 2(8), 1639–1644.
- Nel A., Xia T., Mädler L., Li N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311(5761), 622-627.
- Nelson, J., Saggau, D D., Nielsen, J.S. (2014). Rifampin induced hepatotoxicity during treatment for chronic central serous chorioretinopathy. *Retinal Cases and Brief Reports*, 8(1), 70-72.

- Nguyen-Tran H.D., Hoang V.T., Do V.T., Chun D.M., Yum Y.J. (2018). Effect of multiwalled carbon nanotubes on the mechanical properties of carbon fiber-reinforced polyamide-6/polypropylene composites for lightweight automotive parts. *Materials*, 11(3), 429.
- Nordling C. (1953). A new theory on cancer-inducing mechanism. *British journal of cancer*, 7(1), 68.
- Oberdörster G, Maynard A, Ken Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, Janet Carter, Barbara Karn, Kreyling W, Lai, Olin S, Monteiro-Riviere N, Warheit D, Hong Yang H, and A report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Nanomaterial Toxicity Screening Working Group (2005). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and fibre toxicology*, 2(1), 8.
- Onken M.D., Ehlers J.P., Worley L.A., Makita J., Yokota Y., Harbour J.W. (2006). Functional gene expression analysis uncovers phenotypic switch in aggressive uveal melanomas. *Cancer research*, 66(9), 4602-9.
- Osei-Bempong C., Figueiredo F.C., Lako M. (2013). The limbal epithelium of the eye—a review of limbal stem cell biology, disease and treatment. *Bioessays*, 35(3), 211-219.
- Ostrowski A D, Martin T, Conti J, Hurt I, Harthorn B.H. (2009). Nanotoxicology: characterizing the scientific literature, 2000–2007. *Journal of Nanoparticle Research*, 11(2), 251-257.
- Paddle-Ledinek J.E., Nasa Z., Cleland H.J. (2006). Effect of different wound dressings on cell viability and proliferation. *Plastic and reconstructive surgery*, 117(7S), 110S-118S.
- Pan Y., Leifert A., Ruau D., Neuss S., Bornemann J., Schmid G., Brandau W., Simon U., Jahn-Dechent W. (2009). Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. *Small*, 5(18):2067–2076.
- Pan Y., Neuss S., Leifert A., Fischler M., Wen F., Ulrich S., Schmid G., Brandau W., Jahn-Dechent W. (2007). Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small*, 3(11):1941–1949.

- Panyala N.R., Peña-Méndez E.M., Havel J. (2008). Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health?. *Journal of Applied Biomedicine*. 6(3) 117-129.
- Papp G., Nagy G., Pócsi I., Pesti M., Bánfalvi, G. (2011). Genotoxic chromatin changes in *Schizosaccharomyces pombe* induced by hexavalent chromium (CrVI) ions. In *Cellular effects of heavy metals* (pp. 179-193). Springer, Dordrecht.
- Payne D., Flaherty S.P., Barry M.F., Matthews C.D., (1997). Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Human reproduction (Oxford, England)*, 12(3), 532-541.
- Pernodet N., Fang X., Sun Y., Bakhtina A., Ramakrishnan A., Sokolov J., Ulman A., Rafailovich M. (2006). Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts. *Small*, 2(6), 766-73.
- Poland, C. A., Duffin, R., Kinloch, I., Maynard, A., Wallace, W. A., Seaton, A., Stone, V., Brown, S., MacNee, W., Donaldson, K. (2008). Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nature nanotechnology*, 3(7), 423.
- Popadic S., Popadic D., Ramic Z., Mostarica Stojkovic M, Trajkovic V, Milinkovic M, Medenica L. (2006). Chloramphenicol induces *in vitro* growth arrest and apoptosis of human keratinocytes. *Cell biology and toxicology*, 22(5), 371-9.
- Porter A.E., Gass M., Muller,K., Skepper J. N., Midgley P.A., Welland M. (2007). Direct imaging of single-walled carbon nanotubes in cells. *Nature nanotechnology*, 2(11), 713.
- Prescott J.R., Wells S. (1994). Systemic argyria. *Journal of clinical pathology*, 47(6), 556-557.
- Prylutska S.V., Grynyuk I.I., Matyshevska O.P., Yashchuk V.M., Prylutsky Y.I., Ritter U., Scharff P. (2008). Estimation of multi-walled carbon nanotubes toxicity in vitro. *Physica E: Low-Dimensional Systems and Nanostructures*, 40(7), 2565-2569.
- Pulskamp K, Diabate S, Krug HF.(2007). Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicology letters*, 168(1), 58-74

- Rahal J.J., Simberkoff M.S. 1979. Bactericidal and bacteriostatic action of chloramphenicol against meningeal pathogens. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 16(1), 13-18.
- Rama P., Matuska S., Paganoni G., Spinelli A., De Luca M., Pellegrini G. (2010). Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *New England journal of medicine*, 363(2), 147-155.
- Ratzan R.J., Moore M.A.S., Yunis A.A. (1974). Colony-forming cell effect of chloramphenicol and thiamphenicol on the in vitro. *Blood*, 43(3):363-9.
- Ravage Z.B., Packo, K.H. (2011). Rifampin for treatment of central serous chorioretinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52(14), 2137-2137.
- Ravichandran P., Periyakaruppan A., Sadanandan B., Ramesh V., Hall J.C., Jejelowo O., Ramesh G.T. (2009). Induction of apoptosis in rat lung epithelial cells by multiwalled carbon nanotubes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 23(5), 333-344
- Riddle, P. N. (1990). Time-lapse cinemicroscopy. In *Animal Cell Culture* (pp. 415-446). Humana Press.
- Romano A.C., Espana E.M., Yoo S.H., Budak M.T., Wolosin J.M., Tseng S.C. (2003). Different cell sizes in human limbal and central corneal basal epithelia measured by confocal microscopy and flow cytometry. *Investigative ophthalmology & visual science*. 44(12), 5125-5129.
- Ruzsnaszky O., Dienes B., Olah T., Vincze J., Gall T., Balogh E., Nagy G., Batori R., Lontay B., Erdodi F., Csernoch, L. (2013). Differential effects of phosphatase inhibitors on the calcium homeostasis and migration of HaCaT keratinocytes. *PLoS One*, 8(4):e61507.
- Ryan J.A., Overton K.W., Speight M.E., Oldenburg C.N., Loo L., Robarge W., Franzen S., Feldheim D.L. (2007). Cellular uptake of gold nanoparticles passivated with BSA-SV40 large T antigen conjugates. *Analytical chemistry*. 79(23), 9150–9159.
- Santoro C.M., Duchsherer N.L., Grainger D.W. (2007). Antimicrobial efficacy and ocular cell toxicity from silver nanoparticles. *Nanobiotechnology*, 3(2): 55–65.
- Sayes, C. M., Liang, F., Hudson, J. L., Mendez, J., Guo, W., Beach, J. M., Moore V.C., Doyle C.D., West J.L., Billups W.E., Ausman K.D., Colvin V.L. (2006). Functionalization

- density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity in vitro. *Toxicology letters*, 161(2), 135-142.
- Scholes A.G., Damato B.E., Nunn J., Hiscott P., Grierson I., Field J.K. (2003). Monosomy 3 in uveal melanoma: correlation with clinical and histologic predictors of survival. *Investigative ophthalmology and visual science*, 44(3):1008-11.
- Scholes A.G., Liloglou T., Maloney P., Hagan S., Nunn J. Hiscott P., Damato B.E., Grierson I., Field J.K. (2001). Loss of heterozygosity on chromosomes 3, 9, 13, and 17, including the retinoblastoma locus, in Uveal Melanoma, *Investigative ophthalmology & visual science*. 42(11),2472-7.
- Secker, G.A., Daniels, J.T. (2015). Limbal epithelial stem cells of the cornea. *African Scientist*, 16(3), 205-223.
- Service, R. F. (1998). CHEMISTRY: Nanotubes: The Next Asbestos?. *Science*, 281(5379), 941-941.
- Shao N., Wickstrom E., Panchapakesan B. (2008). Nanotube–antibody biosensor arrays for the detection of circulating breast cancer cells. *Nanotechnology*, 19(46), 465101.
- Shen, A.Y., Haddad, E.J., Hunter-Smith, D.J., Rozen, W.M. (2018). Efficacy and adverse effects of topical chloramphenicol ointment use for surgical wounds: a systematic review. *ANZ journal of surgery*, 88(12), 1243-1246.
- Shields C.L, Ganguly A., Materin M.A., Teixeira L., Mashayekhi A., Swanson L.A., Marr B.P., Shields J.A. (2007). Chromosome 3 analysis of uveal melanoma using fine-needle aspiration biopsy at the time of plaque radiotherapy in 140 consecutive cases: The Deborah Iverson, MD, Lectureship. *Archives of ophthalmology*, 125(8), 1017-1024.
- Shortt A.J., Secker G.A., Notara M.D., Limb G.A., Khaw P.T., Tuft S.J., Daniels J.T. (2007). Transplantation of ex vivo cultured limbal epithelial stem cells: a review of techniques and clinical results. *Survey of ophthalmology*, 52(5), 483–502.
- Shukla R., Bansal V., Chaudhary M., Basu A., Bhonde R.R., Sastry M. (2005). Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. *Langmuir*, 21(23), 10644–10654.

- Simon-Deckers A., Gouget B., Mayne-L'Hermite M., Herlin-Boime N., Reynaud C., Carriere, M. (2008). In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. *Toxicology*, 253(1-3), 137-146.
- Sluder G., and Wolf D.E. (2003). *Digital Microscopy: A second edition of " Video Microscopy"* (Vol. 72). Academic Press.
- Smani Y., Dominguez-Herrera J., and Pachón J. (2011). Rifampin protects human lung epithelial cells against cytotoxicity induced by clinical multi and pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Infectious Diseases*, 203(8), 1110–9.
- Srivastava R.K., Pant A.B., Kashyap M.P., Kumar V., Lohani M., Jonas L., Rahman Q. (2010). Multi-walled carbon nanotubes induce oxidative stress and apoptosis in human lung cancer cell line-A549. *Nanotoxicology*, 5(2), 195–207.
- Stone J.W., Sisco P.N., Goldsmith E.C., Baxter S.C., Murphy C.J. (2007). Using gold nanorods to probe cell-induced collagen deformation. *Nano letters*, 7(1), 116–119.
- Storchova Z., Breneman A., Cande J., Dunn J., Burbank K., O'Toole E., Pellman, D. (2006). Genome-wide genetic analysis of polyploidy in yeast. *Nature*, 443(7111), 541–547.
- Storchova Z., Kuffer C. (2008). The consequences of tetraploidy and aneuploidy. *Journal of cell science*, 121(23), 3859-3866.
- Storchova Z., Pellman D. (2004). From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nature reviews Molecular cell biology*, 5(1), 45.
- Sun T-T., Tseng S.C., Lavker R.M. (2010). Location of corneal epithelial stem cells. *Nature*, 463(7284), E10.
- Sun Z., Liu Z., Meng J., Duan J., Xie S., Lu X., Zhu Z., Wang C., Chen S., Xu H., Yang, X.D. (2011). Carbon nanotubes enhance cytotoxicity mediated by human lymphocytes in vitro. *PLoS One*, 6(6), e21073.
- Talas L, Banfalvi G, Fidrus E, Szigeti Z.M, Nagy G. (2017). Mycoplasma infection followed by time-lapse microscopy. *Medical hypotheses*, 108, 154-158.

- Tamura K., Takashi N., Akasaka T., Roska I.D., Uo M., Totsuka Y., Watari F. (2004). Effects of micro/nano particle size on cell function and morphology. In *Key Engineering Materials* (Vol. 254, pp. 919-922). Trans Tech Publications.
- Tang J., Xiong L., Wang S. (2009). Distribution, translocation and accumulation of silver nanoparticles in rats. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 9(8), 4924-4932.
- Tejral G., Panyala N. R., Havel J. (2009). Carbon nanotubes: toxicological impact on human health and environment. *Journal of Applied Biomedicine (De Gruyter Open)*, 7(1).
- Tervonen T, Linkov I, Figueira J.R, Steevens J, Chappell, M., Merad M. (2009). Risk-based classification system of nanomaterials. *Journal of Nanoparticle Research*, 11(4), 757-766.
- Thoft R.A., Friend J. (1983). The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Investigative ophthalmology & visual science*, 24(10), 1442-1443.
- Tian J., Wong K.K., Ho C.M., Lok C.N., Yu W.Y., Che C.M., Chiu J.F., Tam P.K. (2007). Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery*, 2(1), 129-136.
- Tian, F., Cui, D., Schwarz, H., Estrada, G.G. Kobayashi, H. (2006). Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human fibroblasts. *Toxicology in vitro*, 20(7), 1202-1212.
- Tomiyama T., Shoji A., Kataoka K., Suwa Y., Asano S., Kaneko H., Endo N. (1996). Inhibition of amyloid  $\beta$  protein aggregation and neurotoxicity by rifampicin. Its possible function as a hydroxyl radical scavenger. *Journal of Biological Chemistry*, 271(12), 6839–6844.
- Tóth V., Marschalkó M., Hársing J., Kárpáti S. (2009). Szürke Arcsín – Argyria *Orvosi Hetilap*, 150(32), 1503–1507.
- Trencsényi G., Kertai P., Somogyi C., Nagy G., Dombradi Z., Gacsi M., Banfalvi G. (2007). Chemically induced carcinogenesis affecting chromatin structure in rat hepatocarcinoma cells. *DNA and cell biology*, 26(9), 649-655. (b).
- Trencsenyi G., Ujvarosi K., Nagy G., Banfalvi G. (2007). Transition from chromatin bodies to linear chromosomes in nuclei of murine PreB cells synchronized in S phase. *DNA and Cell Biology*, 26(8):549-56. (a)

- Tsai R.J., Li L.M., Chen J.K. (2000). Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *New England Journal of Medicine*, 343(2), 86–93.
- Tseng S.C., (1989). Concept and application of limbal stem cells. *Eye*, 3(2), 141.
- Tsoli M., Kuhn H., Brandau W., Esche H., Schmid G. (2005). Cellular uptake and toxicity of Au(55) clusters. *Small*, 1(8-9), 841–844.
- Tuttle C. (1992). Analysis of equipment and methods for time lapse motion photomicrography. *Journal of Biological Photography*, 60(2), 54-55
- Uboldi C., Bonacchi D., Lorenzi G., Hermanns M.I., Pohl C., Baldi G., Unger R.E., Kirkpatrick C.J. (2009). Gold nanoparticles induce cytotoxicity in the alveolar type-II cell lines A549 and NCIH441. *Particle and Fibre Toxicology*, 6(1), 18.
- Ujvarosi, K., Hunyadi, J., Nagy, G., Pocsi, I., Banfalvi, G. (2007). Preapoptotic chromatin changes induced by ultraviolet B irradiation in human erythroleukemia K562 cells. *Apoptosis*, 12(11), 2089-2099.
- Van Buskirk E.M., (1989). The anatomy of the limbus. *Eye*, 3(2) 101.
- Von Maltzahn G., Park J.H., Agrawal A., Bandaru N.K., Das S.K., Sailor M.J., Bhatia S.N. (2009). Computationally guided photothermal tumor therapy using longcirculating gold nanorod antennas. *Cancer research*, 69(9), 3892–3900.
- Wang J., Sun P., Bao Y., Liu J., An L. (2011). Cytotoxicity of single-walled carbon nanotubes on PC12 cells. *Toxicology in vitro*, 25(1), 242–250.
- Wang X., Guo J., Chen T., Nie H., Wang H., Zang J., Cui X., Jia G. (2012). Multi-walled carbon nanotubes induce apoptosis via mitochondrial pathway and scavenger receptor. *Toxicology in vitro*, 26(6), 799–806.
- Wehrli, W., Knüsel, F., Schmid, K., Staehelin, M. (1968). Interaction of rifamycin with bacterial RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 61(2), 667.
- Wingard J.B., Romanowski E.G., Kowalski R.P., Mah F.S., Ling Y., Bilonick R.A., Shanks R.M.Q. (2011). A novel cell-associated protection assay demonstrates the ability of certain

- antibiotics to protect ocular surface cell lines from subsequent clinical *Staphylococcus aureus* challenge. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(8), 3788-3794.
- Winters W.D., Tuan L.A., Morton D.L. (1974). Differential effects of rifampicin on cultured human tumor cells. *Cancer research*, 34(12), 3173-3179.
- Wong C., Chen A.A., Behr B., Shen S. (2013). Time-lapse microscopy and image analysis in basic and clinical embryo development research. *Reproductive biomedicine online*, 26(2), 120-129.
- Wong C.C., Loewke K.E., Bossert N.L., Behr B., De Jong C.J., Baer T.M., Reijo Pera R.A., (2010). Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nature biotechnology*, 28(10), 1115.
- Wörle-Knirsch J. M., Pulskamp K., Krug, H.F. (2006). Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano letters*, 6(6). 1261-1268.
- Yah C.S. (2013). The toxicity of Gold Nanoparticles in relation to their physiochemical properties. *Biomedical Research*. 24(3), 400-413.
- Yang H., Liu C., Yang D., Zhang H., Xi, Z. (2009). Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. *Journal of applied Toxicology*, 29(1), 69-78.
- Yang J., Manson D.K., Marr B.P., Carvajal R.D. (2018). Treatment of uveal melanoma: where are we now?. *Therapeutic advances in medical oncology*, 10, 1758834018757175.
- Yang P.H., Sun X., Chiu J.F., Sun H., He Q.Y. (2005). Transferrin-mediated gold nanoparticle cellular uptake. *Bioconjugate chemistry*, 16(3), 494–496.
- Yavuziyigitoglu S., Mensink H.W., Smit K.N., Vaarwate, J., Verdijk R.M., Beverloo B., Brüggewirth H.T., van Marion R., Dubbink H.J., Paridaens D., Naus NC., de Klein A., Kiliç E.; Rotterdam Ocular Melanoma Study Group (ROMS). (2016.) Metastatic disease in polyploid uveal melanoma patients is associated with BAP1 mutations. *Investigative ophthalmology & visual science*, 57(4), 2232-2239.
- Young T.A., Burgess B.L., Rao N.P., Glasgow B.J., Straatsma B.R. (2008). Transscleral fine-needle aspiration biopsy of macular choroidal melanoma. *American journal of ophthalmology*, 145(2), 297-302.

- Yu Y., Zhang Q., Mu Q., Zhang B., Yan B. (2008). Exploring the immunotoxicity of carbon nanotubes. *Nanoscale research letters*, 3(8), 271.
- Yuhaz Y., Berent E., Ashkenazi S. (2011) Effect of rifampin on production of inflammatory mediators in HepG2 liver epithelial cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(12), 5541-5546.
- Zhang Z., Wang X., Luo F., Yang H., Hou T., Zhou Q., Dai F., He Q., Xu, J. (2014). Effects of rifampicin on osteogenic differentiation and proliferation of human mesenchymal stem cells in the bone marrow. *Genetics and Molecular Research*. 13(3), 6398-6410.
- Zhou F., Da X., Ou Z., Wu B., Resasco D.E., Chen, W.R. (2009). Cancer photothermal therapy in the near-infrared region by using single-walled carbon nanotubes. *Journal of biomedical optics*. 14(2), 021009.
- Zhu L., Chang D.W., Dai L., Hong Y. (2007). DNA damage induced by multiwalled carbon nanotubes in mouse embryonic stem cells. *Nano letters*, 7(12), 3592-3597
- Zografos L. (2009). Uveal malignant melanoma: clinical features. *Essentials in ophthalmic oncology*, 82-84.

## **10. KULCSSZAVAK-KEY WORDS**

Videó mikroszkópia

Time-lapse imaging

Long-term scann

Digitális képelemzés

Kromatin kondenzálódás

Uveális melanóma

Multipoláris sejtosztódás

Limbális regenerációs karcmodell

Humán limbális őssejt (HuLi)

### **KEY WORDS**

Video microscopy

Time-lapse imaging

Digital image analysis

Chromatin condensation

Uveal melanoma

Multipolar cell divison

Limb regeneration scratch model

Human limbal stem cell (HuLi)

## 11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőimnek, Dr. Kemény-Beke Ádámnak és Dr. Szemán-Nagy Gábornak a kutatásom folyamán a kísérletes munkám, a dolgozat és a publikációk megírása során nyújtott szakmai segítségüket, emberi támogatásukat.

Ezen felül szeretném megköszönni Dr. Berta András Professzor Úrnak, a Szemklinika volt igazgatójának, illetve Dr. Takács Lilinek a Szemklinika megbízott igazgatójának; továbbá Dr. Pócsi István Professzor Úrnak a Biotechnológia és Mikrobiológia tanszék vezetőjének, hogy lehetőséget biztosítottak a PhD munkám elvégzéséhez.

Köszönet illeti Dr. Bánfalvi Gáspár Professzor Urat az eredmények értelmezésében és a publikációk megírásában nyújtott szakmai segítségéért, emberi, és erkölcsi támogatásáért.

Szeretném megköszönni a segítségét Dr. Dezső Balázs Tanár Úrnak a sejtek azonosítási vizsgálatáért.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni minden munkatársamnak a kutatások és az értekezés létrehozása során nyújtott segítségét és támogatását.

## 12. FÜGGELÉKEK

Publikációs lista:



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/361/2019.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Turáni Melinda  
Neptun kód: A71NUO  
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Turáni, M.**, Bánfalvi, G., Péter, Á., Kukoricza, K., Király, G., Tálás, L., Tánczos, B., Dezső, B., Szemán-Nagy, G., Kemény-Beke, Á.: Antibiotics delay in vitro human stem cell regrowth. *Toxicol. Vitro.* 29 (2), 370-379, 2015.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.10.013>  
IF: 3.338
2. **Turáni, M.**, Bánfalvi, G., Kukoricza, K., Jakim, J., Pócsi, I., Kemény-Beke, Á., Szemán-Nagy, G.: Regeneration of Limbal Stem Cells in the Presence of Silver and Gold Nanoparticles. *J. Environ. Anal. Toxicol.* 5 (5), 1000318, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0525.1000318>
3. Király, G., Szemán-Nagy, G., **Turáni, M.**, Bánfalvi, G.: Tumor Cell Fusion and Multipolar Trivision. *J. Cancer Res. Therap. Oncol.* 2 (102), 1-5, 2014.
4. Szemán-Nagy, G., Király, G., **Turáni, M.**, Bánfalvi, G.: Cell Trivision of Hyperploid Cells. *DNA Cell Biol.* 32 (12), 676-684, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/dna.2013.2147>  
IF: 1.991





### További közlemények

5. Szemán-Nagy, G., Baksa, V., Kiss, A., **Turáni, M.**, Bánfalvi, G.: Gadolinium induced effects on mammalian cell motility, adherence and chromatin structure.  
*Apoptosis*. 22 (2), 188-199, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-016-1311-9>  
IF: 3.967
6. Király, G., Simonyi, A. S., **Turáni, M.**, Juhász, I., Szemán-Nagy, G., Bánfalvi, G.: Micronucleus formation during chromatin condensation and under apoptotic conditions.  
*Apoptosis*. 22 (2), 207-219, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-016-1316-4>  
IF: 3.967
7. **Turáni, M.**, Szemán-Nagy, G.: Sejtkultúrák és preparatív technikák. Debreceni Egyetemi Kiadó, Debrecen, 36 p., 2015.
8. Horváth, E., Szemán-Nagy, G., **Turáni, M.**, Balogh, E., Papp, G., Pollák, E., Pócsi, I., Pesti, M., Bánfalvi, G.: Effect of the fungal mycotoxin patulin on the chromatin structure of fission yeast.  
*J. Basic Microbiol.* 52 (6), 642-652, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.201100515>  
IF: 1.198
9. Szemán-Nagy, G., **Turáni, M.**, Sikura, K. É., Bánfalvi, G.: Chromatin Changes upon Silver Nitrate Treatment in Human Keratinocyte HaCaT and K562 Erythroleukemia Cells.  
In: Cellular effects of heavy metals. Ed.: Gáspár Bánfalvi, Springer, Milton Keynes, 195-217, 2011.

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 14,461**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 5,329**

A DEENK a Jelölt által az IDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.



Debrecen, 2019.10.28.

## ÁBRAJEGYZÉK

1. ábra: A szem anatómiája ( <a href="https://en.wikipedia.org/wiki/Choroid">https://en.wikipedia.org/wiki/Choroid</a> ) .....	10
2. ábra: A limbus elhelyezkedése a szemben (Secker and Daniels, 2015).....	13
3. ábra: A limbus sejtei (Li et al., 2007).....	14
4. ábra: A kromatin kondenzálódási intermedierek a sejtciklus fázisaiban .....	31
5. ábra Az ezüst nanorészecskék pásztázó elektronmikroszkópos képe .....	41
6. ábra: OCM-1 sejtek tripolarizációja, és hármass osztódása .....	46
7. ábra: OCM-1 sejt tripolarizáció utáni apoptózisa .....	49
8. ábra: Fibroblast és limbális sejtek morfológiai összehasonlítása (objektív:10x0,25).....	50
9. ábra: A regenerációs karcmodell.....	51
10. ábra: A ROI-k létrehozása.....	52
11. ábra: Kontroll HuLi monolayerek növekedési grafikonjai. ....	53
12. ábra: Az antibiotikumok szerkezeti képlete. a: chloramphenicol, b: rifampicin.....	53
13. ábra: A HuLi monolayer regenerációja 0,5 mg/ml chloramphenicol jelenlétében. ....	54
14. ábra: HuLi monolayer regenerációja 1 mg/ml chloramphenicol jelenlétében. ....	55
15. ábra: A HuLi monolayer regenerációja különböző chloramphenicol koncentrációk jelenlétében.....	56
16. ábra: A HuLi monolayer regenerációja 0,1 mg/ml rifampicin jelenlétében.....	57
17. ábra: A HuLi monolayer regenerációja 0,2mg/ml rifampicin jelenlétében.....	58
18. ábra: A HuLi monolayer regenerációja különböző rifampicin koncentrációk jelenlétében. ....	58
19. ábra: Aggregált MWCNT-k átlagos átmérője tápfolyadékban .....	59
20. ábra: Monolayer regeneráció limbális sejteken, 5 µg/ml MWCNT jelenlétében. ....	60
21. ábra: Monolayer regeneráció limbális sejteken, 50 µg/ml MWCNT jelenlétében. ....	61
22. ábra: Monolayer regeneráció limbális sejteken, 100 µg/ml MWCNT jelenlétében. ....	62
23. ábra: Monolayer regeneráció limbális sejteken 500 µg/ml MWCNT jelenlétében. ....	63
24. ábra: A HuLi monolayer regenerációja különböző szén nanocső koncentrációk jelenlétében.....	63
25. ábra: 80 ppm Au nanorészecske hatása a monolayer regenerációra .....	64
26. ábra: 200 ppm Au nanorészecske hatása a monolayer regenerációra. ....	65
27. ábra: 320 ppm Au nanorészecske hatása a monolayer regenerációra. ....	66

28. ábra: A HuLi monolayer regenerációja különböző arany nanorészecske koncentrációk jelenlétében.....	67
29. ábra: 140 ppm ezüst nanorészecske hatása a monolayer regenerációra. ....	68
30. ábra: 200 ppm ezüst nanorészecske hatásai a HuLi monolayer regenerációjára. ....	69
31. ábra: 320 ppm Ag nanorészecske hatása a monolayer regenerációra. ....	70
32. ábra: A HuLi monolayer regenerációja különböző arany nanorészecske koncentrációk jelenlétében.....	70
33. ábra: A limbális sejtek kromatin kondenzálódási intermedierei. ....	71
34. ábra: Chloramphenicol hatása a kromatin kondenzálódásra. ....	72
35. ábra: A rifampicin hatása a kromatin kondenzálódásra. ....	73
36. ábra: Többfalú szén nanocsövek (MWCNT) hatása a kromatin kondenzációra.....	74
37. ábra: Az arany nanorészecskék hatása a kromatin kondenzálódásra. ....	76
38. ábra: Az ezüst nanorészecskék hatása a kromatin kondenzálódásra.....	77
1. táblázat: Munkacsoportunk time-lapse mikroszkópjainak fejlesztései .....	28
2. táblázat: Multipoláris osztódások sejtmeretei, időtartama és gyakorisága.....	48
3. táblázat: Limbális sejteken vizsgált markerek.....	50