

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**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



DEBRECENI EGYETEM

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2020.

Hosszútávú *in vitro* videó mikroszkópia és digitális képelemzés a szemészeti szövetregenerálódás és tumornövekedés vizsgálatában

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Szigeti-Turáni Melinda
OKLEVELES BIOLÓGUS

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok doktori iskola
Konzervatív orvostudományok és klinikai vizsgálatok programja keretében

TÉMAVEZETŐK: DR. KEMÉNY-BEKE ÁDÁM, PhD
DR. SZEMÁN-NAGY GÁBOR, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Illés Árpád, az MTA doktora
tagok: Dr. Sohár Nicolette, PhD
Dr. Pósa Anikó, PhD

A doktori szigorlat időpontja: 2020. július 8., 11.00

Az értekezés bírálói: Dr. Szőke Éva, PhD
Dr. Fenyvesi Ferenc, PhD

A doktori védési bizottság:

elnök: Prof. Dr. Illés Árpád, az MTA doktora
opponensek: Dr. Szőke Éva, PhD
Dr. Fenyvesi Ferenc, PhD
tagok: Dr. Sohár Nicolette, PhD
Dr. Pósa Anikó, PhD

Az értekezés védésének (online formában) időpontja: 2020. július 8., 12.00

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze a varoczy@internal.med.unideb.hu e-mail címre a vitát megelőző munkanap (2020. július 7.) 12 óráig. A határidő lejártát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

1. BEVEZETÉS ÉS ELMÉLETI HÁTTER

Bevezetés, probléma felvetés

A folyamatos pillanatfelvételszerű mintavételezés problémája: Ha egy folyamatot mélyebben és összefüggéseiben vizsgálunk, az invazív hosszantartó és gyakori mintavételezés következtében létrejövő műtermékek meghamisíthatják az eredményeket. A nagy időbeli felbontással rendelkező hosszú távú valós idejű és non invazív videó mikroszkópos vizsgálatok felhasználhatók olyan tenyésztett sejtpopulációk vizsgálatára is, melyekben egy vagy néhány sejt jelentősége növekszik meg a tenyésztési ciklus alatt.

A vizsgált sejtfeleségek anatómiai lokációja, funkciói és jellegzetességei

Uveális traktus, uveális melanómák

Az uvea belülről a retina és kívülről a corneosclerális bordázat között elhelyezkedő, dús érhálózattal rendelkező, sűrűn pigmentált rétege a bulbusnak. A szem több anatómiai régióját magába foglaló uvea tartalmazza az irist, a ciliáris régiót és a choroideát.

Az uveális melanómák a leggyakoribb malignus intraocularis daganatok közé tartoznak. A National Cancer Institute adatai alapján az Egyesült Államokban az incidencia sűrűség 5,4 új eset/ millió fő. Az oculáris melanómák 85%-a uveális eredetű, elhelyezkedésük szerint lehetnek anterior (iris, sugártest), vagy gyakoribb esetben, 80-90%-ban posterior (choroidea) lokalizációjúak.

Az uveális melanoma sejtípusai, tumornövekedés

Az uveális melanoma cytologiai tekintetben heterogén megjelenésű: orsósejtes A, B; epitheloid sejtes; és kevert sejtes lehet. Az epitheloid sejtes típusnál a daganatok jelentős százalékában a 3. kromoszóma monoszómiája; illetve a 3.; és ritkábban a 9., 13. és 17. kromoszóma esetében a heterozigótaság elvesztése is

megfigyelhető. A tumorok növekedése, terjedése során fontos, limitációs szerepe van a vascularisációnak. Az elsődleges áttét a vérkeringési rendszeren keresztül leggyakrabban a májban alakul ki, melynek magyarázata lehet az erős metastatisáló képességű epitheliális illetve kevert sejttípusú tumorok sejteinek kromoszóma rendellenessége.

Az OCM-1 (ocular choroidea melanoma-1) sejtvonalat egy uveális melanomával diagnosztizált női páciens choroidea melanoma daganatából hozták létre 1985-ben. A sejtvonalat aneuploid, közel tetraploidként írtak le, ezt a 6. kromoszóma hiányával hozták összefüggésbe.

A cornea és limbus sejteinek szerepe a cornea regenerációban

A szemünk elülső átlátszó része a szaruhártya, vagyis a cornea. Felépítését tekintve: kívülről befelé haladva az elülső a hámréteg, alatta a Bowman-hártya majd a stroma, a Dua-réteg vagy pre-Descemet membrán ez alatt a Descemet membrán és a corneális endothel. A limbus az átlátszó cornea és az átlátszatlan ínhártya között elhelyezkedő, átmeneti szöveti réteg. Funkciói: táplálja és fenntartja a perifériális cornea képződését, szerepe van a csarnokvíz elfolyásában. Továbbá fontos szerepe van corneális epithel egészséges működésében is: a corneális epithel őssejtek limbusban tartózkodásának és niche-ének biztosítása, illetve, a limbus barrier funkciója révén is. Ha ezek a funkciók nem teljesülnek, az látásromlással járó limbális őssejt elégtelenséget okozhat.

A corneális epithelium regenerációjában kulcsfontosságú szerepe van a limbális epitheliális őssejteknek. A limbális őssejtek a felnőtt szomatikus őssejtekhez hasonló sajátosságokkal rendelkeznek, kisméretűek és magas a sejtmag/citoplazma arányuk. Ugyan lassú a sejtciklusuk, de a felszíni corneális hámszövet hiány esetén gyors proliferációra képesek. A gyógyulási folyamat során a

sejtek a corneosclerális régió kerületén, centripetálisan, hullámszerűen mozognak a megmaradt intakt corneális epithelium felől a corneosclerális limbus irányába. Az epithel sejtek migrációját az X Y Z hipotézissel jellemezhetjük, ahol a hámsejt hiány a Z, ami egyenlő a proliferáló basalis epithel sejtek X, és a centripetálisan migráló sejtek Y összegével.

A migrációs karcmodell

Az *in vitro* karcmodell egyszerű és jól fejlett modell a sejt migráció mérésére, segítségével kvantifikálható többek között a migrációs ráta is, illetve részben megfelelő a sejt-mátrix, a sejt-sejt interakciók tanulmányozására az *in vitro* sebgyógyulás vizsgálatokor.

Gyakorlati felhasználás során tesztelt anyagok

A természetben alkalmazott antibiotikumok:

A cornea regenerációs folyamata akár több hónapos időtartamú is lehet, mely alatt kiemelkedő fontosságú a fertőzések megakadályozása. A lokális terápia sikeressége attól is függ, hogy az antibiotikumok jelenlétében a hámsejtek növekedése is fenntartható maradjon.

1, _____ Chloramphenicol:

A chloramphenicol baktericid és bakteriosztatikus hatásai miatt széleskörű a gyógyászati felhasználása. A számos terápiában való előnyös felhasználhatósága mellett azonban káros hatásai is vannak. Több, humán sejt típuson végzett kutatás bizonyítja, hogy gátolja a sejtek proliferációját, és apoptosist is okozhat

2, _____ Rifampicin

A humán alkalmazásban antituberculosikumként használják, de egyes szemészeti fertőzések során is alkalmazzák. A különböző szövetekből származó normál és a tumoros sejtvonalaknál az expozíció az idővel korreláló pusztulást

mutatott, illetve kimutatták kumulatív károsító hatását. Emellett megfigyelték, hogy a toxicitását befolyásolja a sejtciklus, az érzékenységet pedig a mitotikus szakasz.

A nanorészecskék biológiai alkalmazásai, hatásai

A nanopartikulumok méretükből adódóan a szervezetbe kerülve sejtszinten végbemenő, az egész szervezetre kiható változások okozói lehetnek.

1, Szén nanorészecskék

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 többfalú (MWCNT) nanoszén csöveket. A többi nanorészecske esetében fennálló akadályokat feloldó speciális tulajdonságaik miatt a biomedikai felhasználhatóságukat széles körben vizsgálják. Azonban a szén nanocsövek hosszúság/szélesség arányú részecskék, így a szerkezeti sajátosságait tekintve belátható, hogy a toxicitásuk hasonló más szálszerű nanorészecskékhez, pl.: azbesztéhez. A szintézissel létrehozott szén nanocsövek kémiaileg inerte, vizes közegben nem oldódnak, valamint a biológiai jelentőségük is csekély. A tisztításuk során, és az oldhatóság növelése érdekében erős savakkal oxidálják, funkcionalizálják, ami egyes esetekben a nanocsövek eredetétől magasabb toxicitását eredményezte: cytotoxikus, apoptosist és nekrozist indukáló hatásokat tapasztaltak.

2, Arany nanorészecskék

A szakirodalmi adatok alapján az arany nanorészecske nem, vagy csak kismértékű toxikus hatással bír még a felszíni bevonattal ellátott részecskék esetében is. Újabb tanulmányok azonban megkérdőjelezzik a nanoarany részecskék használatának biztonságosságát, és melyek szerint az intracelluláris toxicitás elsősorban a fizikokémiai tulajdonságaik alapján mérhető fel. Az *in vivo* toxicitási adatok egységesek abban, hogy a nanoarany az egyes szervezetben

pl.: az agyban akkumulálódik, viszont a sejtszintű toxicitás problematikájához hasonlóan, a szervezetre gyakorolt toxicitási kockázatának megértéséhez további, hosszútávú vizsgálatok szükségesek.

3. Ezüst nanorészecskék

A nanoaranyhoz hasonlóan az ezüstrészecskék biztonságossága esetében is komoly kétségek merülnek fel. A szakirodalmi adatok az ezüst részecskék előnyei mellett a részecskék káros hatásairól is beszámolnak, ezek alapján csakis megfelelő körületekintéssel alkalmazandó ez az anyag. A sejtekbe bejutó ezüst nanorészecske jelentős károkat okozhat a sejtekben a részecske méretének és a koncentrációjának függvényében. A ROS emelkedése, morfológiai és mitochondriális károsodás és a jellegzetes sejthalálformák megjelenését figyelték meg.

Time-lapse mikroszkópia és digitális képanalízis

A time-lapse felvételek fogalma a nagy időbeli felbontásban készült felvételek sorozata, melyeket filmként lejátszva betekintést engednek olyan folyamatokba, amelyek lefolyása az emberi léptékhez képest lassan zajlik. Ez a technika a mikroszkopikus méretű események megfigyelésére is egyszerűen és reprodukálhatóan felhasználható, megfelelő optikai rendszerek alkalmazása révén. A time-lapse felvételek elkészítésére képes mikroszkópok megalkotását olyan kérdések indokolták, melyeket csak az időbeli korlátok feloldásával lehetett vizsgálni. A folyamatos megfigyeléssel szolgáltatott adatok áttörést eredményezhetnek számos *in vitro* kutatásban.

2. CÉLKITÚZÉS

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 sejtek multipoláris osztódásai, illetve sejtpopulációk szintjén az izolált humán limbális sejtek (HuLi) monolayer regenerációs karcmodellje.

A vizsgálatainkban a kiválasztott életfolyamatok az alábbiak voltak.

- 1) Uveális melanoma (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 cytotoxicitás vizsgálatokhoz: Többfalú ipari minőségű szén nanocsövek hatása. Inert fém nanorészecskék hatása a monolayer regenerációra

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtek izolálása, tenyésztése, modellrendszerek

Ocularis melanoma sejtek tenyésztési körülményei:

A sejteket RPMI 1640, illetve DMEM-Ham's F12 tápfolyadékban tenyésztettük, melyet 10% FBS (embrionális borjú vérsavóval) és 1% PSN (antibiotikum, antimycoticum keverékkel) egészítettünk ki.

Limbális eredetű sejtek izolálása, tenyésztése

A corneális epitheliális limbus egy 56 éves nőbetegből származott. A limbus gyűrűt felhasználásig Euseinol-C transzplantációs folyadékban tároltuk 4 °C-on. A sejtek izolálását megelőzően a corneosclerális gallért 70% etanol oldattal, majd Betadine-nal fertőtlenítettük. A következő lépésként a cornea és sclera visszamaradt részeit eltávolítottunk, és a limbust mechanikusan aprítottuk 2×2 mm-es darabokra. A szövetdarabokat ezután 5 ml 800 U/ml collagenase IV-et tartalmazó DMEM-Ham's F12 +10% FBS +1% PSN-ben inkubáltuk két óráig. A sejtuszuspenzió létrehozásához a sejteket steril gézlapon szűrtük le. Végül viabilitás vizsgálatot végeztünk, és az izolált sejteket DMEM-Ham's F12 médiumban tenyésztettük, melyet 10% FBS-sel és 1% PSN-nel egészítettünk ki.

Limbális regenerációs karcmodell

A limbusból izolált sejtek felhasználásával *in vitro* regenerációs modellt hoztuk létre: A HuLi sejteket glass bottom dish-ben tenyésztettük, amikor sejtborítottság elérte a 90%-os szintet, sejtprésitot egy 20 G fecskendőtüvel felkarcoltuk, majd a tenyészetet a long-term scann rendszerbe helyeztük.

A monolayer regeneráció vizsgálata time-lapse videó mikroszkópiával

A monolayer regenerációs karcmodellen a konfluens limbális sejtprésit felsértését követő regenerációjának videó mikroszkópos nyomon követését egy

perces időbeli felbontásban, és az ez által kapott képszekvenciák digitális kiértékelését értjük. 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. A ROI képrészletek a teljes látóteret jellemző olyan $150 \times 300 \mu\text{m}^2$ nagyságú területek, melyek 50%-a felszakadt sérült részen, 50%-a pedig a sértetlen sejtpázsiton helyezkedik el.

HuLi monolayer regenerációs modell gyakorlati felhasználása

Szemészetben alkalmazott antibiotikumok hatása a monolayer regenerációra:

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

Nanorészecskék vizsgálata a regenerációs modellben.

- Többfalú ipari minőségű szén nanocsövek: Tisztasága <85%, külső átmérője 10-30 nm, hosszúsága: 10-30 μm volt. A vizsgált koncentrációk: 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 stabilizálva. A vizsgált koncentrációk: 80, 200, és 320 ppm, amelyek megfelelnek: 0,41, 0,81 és 1,63 μM -nak.
 - Ezüst nanorészecskék: gömb alakúak, átmérőjük átlagosan 10 nm volt. A vizsgált koncentrációk: 140, 200, 320 ppm, melyek megfelelnek: 1,13, 1,84 és 2,94 μM -nak.

Time-Lapse videó mikroszkópia digitális képfeldolgozás

A vizsgálatok során használt saját fejlesztésű time-lapse videó mikroszkópos rendszer beállításai: az inkubátor típusa: SANYO MCO18-AC CO₂ sejttenyésztő inkubátor (Wood Dale, IL, US) négy videó mikroszkóppal felszerelve. A mikroszkópok (Olympus Tokyo Japan) inverz állásban, célszerű módosításokkal: a revolvertoronyban elhelyezett fényforrással, és az okulárba telepített CCD kamerával lettek felszerelve. Az objektívek (x10:0,25, achromat Carl Zeiss, Jena) a CCD kamera (2 megapixel felbontású UVC USB 2 webkamera) előtt helyezkednek el. Fényforrás: 960 nm, közeli infravörös fényt emittáló LED (5mm átmérő 1,2V 50 mA).

Képrögzítés: a megfigyelés időtartama alatt percenként készítettünk el egy képet 10 frame átlagolásával. A képek 1600x1200 pixel felbontásban, 24 bit RGB formátumban készültek.

A digitális képszekvencia-analízis

A képfeldolgozásra a NIH által fejlesztett Fiji/ImageJ képanalizáló programcsomagot használtuk. A képszekvenciák feldolgozásának három fő lépése: a képvisszaállítás és zajszűrés, szegmentálás, mérések.

A zajszűrés célja a jel/zaj arány növelése a vizsgált képi információk megtartásával. Az információ kiszűrését és a zaj csökkentését az alábbi általános séma szerint végeztük: A kontraszt és fényviszonyok beállítása: Enhance contrast vagy Brightness/Contrast paranccsal. Ezt követően a teljes szekvenciára kiterjedő artifaktum szűrés gyors Fourier transzformációval. A háttérkivonás után a szekvencia hisztogram ekvalizációja következett, amelyhez a képsorozat pixeleinek 0,4%-át szaturáltuk a kontraszt javításhoz.

A szegmentálás célja valamilyen paraméter alapján felosztani a képi információt, vagyis az előtér információ tartalmú részeit elkülöníteni a háttértől. A szegmentálást, küszöbértéket a Threshold funkcióval határoztuk meg. A szegmentált felvételek esetében a zajszűrést, ha szükséges volt, a Remove outliers, vagy a Fill holes paranccsal végeztük. A küszöbérték meghatározása után a bináris képeken végeztük el a tényleges méréseinket: megmértük a képsorozat küszöbértékkel meghatározott részecskéinek számát, területét. Végül a kapott mérési eredményeket grafikusán ábrázoltuk.

A sejtmagok, kromatin szerkezetek izolálása:

A sejtenyésző médium eltávolítása után a sejteket PBS oldattal mostuk át, majd előmelegített 0,25%-os trypsin-EDTA oldatot adtunk a sejtenyészethez. A trypsin hatóidejének lejártával inaktívtuk az enzimet, majd centrifugálással (5 perc 500g) ülepítettük a sejteket, és eltávolítottuk a felülúszót. A viabilis sejtszám meghatározása után a sejteket 0,2 ng/ml colcemidet tartalmazó médiummal inkubáltuk 2 órán át (metafázisos blokk) majd kétszer átmostuk PBS-sel. A sejtek ozmotikus duzzasztása során a Swelling puffer mennyisége az élő sejtek számának függvénye volt: 10^6 sejt/ml. Az előírt 10 perc inkubálás után a duzzasztóoldatot centrifugálással távolítottuk el (5 perc 500g). A sejtmagok izolálása során a pellet sejteihez folyamatosan kevergetve 1 ml frissen elkészített, 3:1 arányú metanol-jégecet fixáló oldatot adagoltunk, majd kétszer újra átmostuk a fixáló oldattal. A sejtmagok kromatin struktúráinak feltárásához a fixáló oldatban felvett sejtmagokat Pasteur-pipettával 30 cm magasságból tárgylemezekre cseppentettük. A tárgylemezeket egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten száradni hagytuk, és másnap felszálló alkoholsorban (70, 90, 95, 100%) víztelenítettük. A mintákat 20 μ l DAPI-Antifade-del festettük meg, majd fluoreszcens mikroszkóppal (Karl Zeiss Compound Universal Microscope IIIRS fluorescence vertical illuminator) vizsgáltuk.

4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

A time-lapse videó mikroszkópos módszerrel vizsgálható a szemészeti daganatok nagy incidenciáját kitevő uveális melanomák egyedi sejteinek növekedési-, osztódási dinamikája. Illetve a cornea felszíni hámhiányának 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.

Videómikroszkópia alkalmazhatósága

A videó mikroszkópia hosszútávú dinamikus megfigyelést tesz lehetővé, a közeli infravörös megvilágító rendszer alkalmazása pedig minimalizálja a fototoxicitást a vizsgálatok során.

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

- A tág időbeli felbontóképesség: a megfigyelés időtartama egy órát, illetve egy hetet is felölelhet; emellett az időbeli felbontás is könnyen variálható: másodperc, perc, óra.
- A vizsgált organizmusokra könnyen alakítható beállítások: a rendszer használható humán, állati és növényi eredetű sejtenyészetek, fonalas- és élesztőgombák megfigyelésére is.
- A vizsgálati célokhoz alkalmazható nagy érzékenységgű rendszer: folyamatosan, vizsgálhatók a sejtek életfolyamatai, egyedi és populációs szinten bekövetkező legkisebb élettani változások is könnyen elkülöníthetők az egyazon eredetű kontroll populációval összehasonlítva.

- A digitális képanalízis során vizsgálható paraméterek: a sejtek motilitása, osztódási dinamikája, a sejthalálformák felismerése és időbeli lefutásának mérése.

Uveális melanoma OCM-1 sejtek in vitro vizsgálata

A vizsgálatok során aneuploid sejtek, köztük az OCM-1 uveális melanoma (közel tetraploid) és egyéb sejtípusok (HeLa (hypertriploid), HaCaT (hypertetraploid) CCL 209 (közel diploid)) esetében is megfigyeltünk spontán „rendellenes”, háromfelé történő osztódásokat a standard tenyésztés során. Az OCM-1 és a HeLa sejtek esetében a normál osztódásokhoz képest a hármas osztódások aránya magas volt: HeLa 1:24, (0.4 ‰), OCM-1 1:37, (0.3 ‰). A jelenség a trivisio elnevezést kapta. A folyamatot kvalitatív és kvantitatív szempontból vizsgáltuk a tenyészetekből kiválasztott, egyedi sejteken:

- *Kvalitatív változások:* A trivisio esetében jellegzetes morfológiai indikátora a tripolarizáció, ami a sejt lekerekedését követően a sejt maganyagának háromirányú szétválása, azaz a háromágú szerkezet kialakulása.
- *Kvantitatív változások* A trivisiók és a normál osztódások, illetve az azok révén keletkezett leánysejtek összehasonlítása OCM-1 sejteken.
 - *Osztódás időtartama:* A kezdőpont az anyasejt lekerekedése, felválása; a végpont pedig a leánysejtek letapadása. A normál osztódás $28,8 \pm 8$ perc, hármas osztódás $67,7 \pm 50$ perc.
 - *Sejtméret változása:* A sejtosztódás során az anyasejtek mérete a két utódsejt méretének közel kétszerese: ~43%, a hármas osztódást követően ez átlagosan ~22% volt.

- *A trivisiók gyakorisága:* A gyakoriságot kétféleképpen határoztuk meg: A) A trivisiók számát viszonyítjuk az összes osztódás számával: 0,27% (1/37), B) Relatív gyakoriság, ami a képkötés (vizsgált képszekvenciák száma) és a képszekvenciákon talált összes hármas osztódás számának hányadosát jelöli: 31/79 (0,39).

A hármas osztódáson átesett leánysejtek további nyomkövetése alapján megállapítottuk, hogy az osztódásuk után is életképesek maradtak.

Limbális eredetű sejtek vizsgálata: monolayer regenerációs karcmodell

A limbális eredetű összejttenyészetből a fibroblast sejtek szelektív eliminálását geneticin (G-418-szulfát) hozzáadásával végeztük, két napig, 50 µg/ml végkoncentrációban. A HuLi sejtek a vizsgálataink alapján morfológiailag azonosnak tekinthetők a 20. átoltás után is: epithel jellegű polygonális alakú sejtek, kisméretűek, nagy a sejtmagjuk a cytoplazmához viszonyítva, illetve a cytoplazma nem mutat szemcsézettséget. A HuLi cytokeratin 19 markerre adott pozitív reakciója a sejtek összejt voltára utalt.

Limbális regenerációs karcmodell

A limbusból izolált sejtek felhasználásával *in vitro* regenerációs modellt hoztunk létre. A sejtek limbális eredete lehetővé tette, hogy a regenerációs modellt a szaruhártya felszíni sérüléseinek tanulmányozására használjuk.

A monolayer regeneráció vizsgálata time-lapse videó mikroszkópiával

A felsértett sejt-pázsitok vizsgálata során a görbe lefutása szerint négy regenerációs fázist különböztettünk meg:

- I. Első: felnyílási- és visszatapadási szakasz, a késleltetett fázis, ami ~90-110 percen keresztül tartott, kezdő meredek növekedést mutatott, amit az életképes sejtek újbóli kitapadása okozott.

- II. A második szakasz, az exponenciális fázis, mely során a sejtek újból benövik a sérült területet. A kontroll tenyészetek esetében 120-130 perc.
- III. A harmadik, átmeneti szakasz a logaritmikus és a stacioner fázis között, a felsértett régió záródási ideje: 35-45 perc. Ekkor még előfordulhatnak időszakosan sejtmentes részek.
- IV. A negyedik szakasz a stacioner fázis, mely 250-320 percig tartott.

A limbális monolayer regenerációt kvantitatívan leíró az üveg felszínén tenyésztett sejtprésitot jellemző relatív terjedési sebesség: $62,94 \pm 8 \mu\text{m}^2/\text{perc}$.

HuLi monolayer regenerációs modell gyakorlati felhasználása

Antibiotikumok hatása a HuLi monolayer regenerációjára

A monolayer regenerációja chloramphenicol jelenlétében

HuLi monolayer regenerációja 0,5 mg/ml chloramphenicollal kezelve

A 0,5 mg/ml koncentrációjú chloramphenicol jelenlétében a sejtek visszatapadása regeneráció során megfigyelt időbeli eltolódás oka az osztódó sejtek számának csökkenése, illetve a sejtek pusztulása melyet apoptosira utaló reziduális testek jelenléte bizonyított. A sejtek újbóli letapadása 2,5 óra után indult meg. A regeneráció késve, de teljesen végbement és közel 11 órát vett igénybe. A regenerációs görbe lefutása elnyújtott, kevésbé meredek, főleg a visszatapadási fázis húzódtott 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 chloramphenicollal kezelve

A regeneráció jelentősen elhúzódtott, a teljes sejtborítottság 31 óra múlva sem alakult ki. A kezdeti nagymértékű felválást gyors visszatapadás követte; ezután a sejtek nagy hányada elpusztult. A regenerációs folyamat exponenciális

szakasza 3 órás késéssel indult. A sebszélék érintkezései után a konfluencia szintje nem növekedett tovább, a chloramphenicol jelenléte gátolta a sejtosztódást. A motilitási görbén nagymértékű oszcillációk oka feltehetően az erőteljesebb migráció, ami vizsgálat végéig megmaradt, bizonyítva a teljes konfluencia hiányát. A monolayer terjedési sebessége $18,080 \mu\text{m}^2/\text{perc}$ volt.

A monolayer regenerációja rifampicin jelenlétében

HuLi monolayer regenerációja 0,1 mg/ml rifampicinnel kezelve

Már a kisebb koncentrációjú rifampicin is jelentősen megnövelte monolayer regeneráció 5-6 órás időtartamát 17-18 órára. A regenerációs görbén az egyes szakaszok összemosódását, továbbá, a karcok szélein megtapadt elpusztult sejtek jelenlétét figyeltük meg. A regeneráció első fázisa késve indult el, és körülbelül 100. percig tartott. Az exponenciális fázis nem fejeződött be, a gátló hatásra a görbe kisebb meredeksége utalt. A monolayer relatív terjedési sebessége: $15,069 \mu\text{m}^2/\text{perc}$ volt.

HuLi monolayer regenerációja 0,2 mg/ml rifampicinnel kezelve

A regenerációs görbén a monolayer terület csökkenésének oka a monolayer paralízise, a sejtek pusztulása során végbemenő felválás és a sejtprésit ebből következő felszakadozása után bekövetkező zsugorodása. Ez okból a sebszélék terjedési sebessége negatív értékű: $-4,4398 \mu\text{m}^2/\text{perc}$ volt.

Nanorészecskék hatása a HuLi monolayer regenerációjára

Az ipari minőségű többfalú szén nanocsövek hatása a monolayer regenerációjára.

HuLi monolayer regenerációja 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MWCNT jelenlétében

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. A regeneráció körülbelül 580-620 percet vett igénybe. A relatív terjedési sebesség: $40,21 \mu\text{m}^2/\text{perc}$ volt.

HuLi monolayer regenerációja 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MWCNT jelenlétében

Az 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ koncentrációtól a nanokarboncső aggregátumok a felvételeken nagy fekete foltok formájában jelentek 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 kiindulási karcterülettől független motilitás értéke: $40,21 \mu\text{m}^2/\text{perc}$ volt.

Az 50 és a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -es koncentrációnál a karcszéleken megtapadt nanocső mikroaggregátumok hegszerűen jelezték a karcok záródási helyét, ami *in vivo* karc képződésre utalhat.

HuLi monolayer regenerációja 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MWCNT jelenlétében

A regenerációs görbe fázisai összemosódtak: A rövid felnyílási szakaszt melyen belül gyors visszatapadás, majd enyhén elhúzódo exponenciális regenerációs növekedési fázis, amit hosszabb átmeneti szakasz követett. A szén nanocső aggregátumok által akadályozott és megzavart migrációt a motilitás görbe megnövekedett mértékű oszcillációi jelezték. A karcszéli részeken a monolayer megmaradó felgyűrődését figyeltük meg. 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MWCNT jelenlétében

Az 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -es koncentráció esetében a regeneráció elhúzódozott, 18 óra után exponenciális fázisig jutott, illetve a nagyméretű aggregátumok jelenléte miatt a pontos mérés nem volt lehetséges. A monolayer felkarcolt széléin a regenerációs folyamat előrehaladtával a karcszélek közé tapadt aggregátumok miatt jelentős méretű felgyűrődés keletkezett, és megfigyelhető volt a reziduális testek jelenléte.

Arany nanorészecskék hatása a limbális monolayer regenerációjára

A monolayer regenerációja 80 ppm arany nanorészecske kezelést követően:

A regenerációs görbe első fázisában, a karc felnyílásakor, a karc a kiindulási méretéhez képest közel 60%-os növekedést tapasztaltunk. A karc felnyílási szakasza 25-30 percet vett igénybe. A regeneráció időtartama 260-310 perc volt, a kontroll tenyészetekhez ($62,94 \mu\text{m}^2/\text{perc}$) hasonló sebességgel lezajló folyamatot tapasztaltunk, felkarcolt sejtpázsit karakterülettől független terjedési sebessége: $65,664 \mu\text{m}^2/\text{perc}$ volt. A regenerációs görbe lefutása és profilja hasonló volt a 140 ppm ezüst kezeléséhez.

A monolayer regenerációja 200 ppm arany nanorészecske jelenlétében

A regenerációs görbe első szakaszába a kiindulási terület a felnyílás során ~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 kezelést követően a regeneráció folyamata mintegy 15,5 órát vett igénybe. A monolayer relatív terjedési sebessége $40,201 \mu\text{m}^2/\text{perc}$ volt.

A 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. Ebből arra következtettünk, hogy az arany nanorészecskék jelenléte elősegíti a sejtek felválását a tenyésztőfelszínről. A regenerációs folyamat elején a sérült monolayer területe 4 óra alatt érte el a kiindulási méretét. A visszatapadási fázis (~100 perc) során a sérült felszín területe csupán 30-40%-kal csökkent. Az elhúzódó exponenciális, illetve az átmeneti szakasz együtt mintegy 16. óráig tartott. A teljes folyamat 19 óráig tartott, melynek háttérében az akadályozott visszatapadás és sejt proliferáció elhúzódása állhat. A teljes karakterülettől független terjedési sebesség $30,872 \mu\text{m}^2/\text{perc}$ volt.

Ezüst nanorészecskék hatása a limbális monolayer regenerációjára.

A monolayer regenerációja 140 ppm ezüst nanorészecske jelenlétében.

A regenerációs görbét elemezve és a kontroll tenyészet göbéjével összehasonlítva megfigyeltük, hogy a karc felnyílási, I. fázisa kissé elhúzódott, és a kezdeti 60-70 perces felnyílás mértéke jelentősebb volt (~20%). A sejtek visszatapadása a felnyílást követően újabb 60-70 percig tartott. Az exponenciális fázis hosszabb lefutású volt (280 perc), mint a kontroll tenyészet esetében (120 perc). Az átmeneti, III szakasz viszonylag meredek lefutású. A monolayer relatív karc eredeti területtől független terjedési sebessége $53,757 \mu\text{m}^2/\text{perc}$ volt.

A monolayer regenerációja a 200 ppm ezüst nanorészecske jelenlétében

Az első regenerációs szakasz felnyílási fázisa 300-360 percig tartott, a karc területe ezalatt közel duplájára, ~40%-ra nőtt. Az exponenciális szakaszt ez esetben is viszonylag meredek lefutás jellemzi, az átmeneti szakasz pedig hosszán, mintegy 150 percig, elhúzódott. Az átmeneti fázisra nagymértékű motilitás volt jellemző. A regenerációs folyamat 690-750 perc után fejeződött be. A karc kiindulási területétől független terjedési sebesség: $42,597 \mu\text{m}^2/\text{perc}$ volt.

HuLi sejtpázsit regenerációja 320 ppm ezüst nanorészecske jelenlétében:

A kontrollhoz képest a következő eltéréseket tapasztaltuk: az első szakaszban két csúcs, alfázis különül el: a felnyílási fázis, amely ~350 percig tartott, és ez alatt a karcolt terület ~220%-ra nyílt fel. Ezt egy lassú visszatapadási fázis követte, ami 360 perc alatt ment végbe mely alatt a sérült felszín terület csökkenése elérte az eredeti 150%-át, amit egy újabb, kisebb mértékű felnyílás követett. A visszatapadási fázis ezután további 200 percig tartott. Az exponenciális görbeszakasz meredeksége kisebb, mint az alacsonyabb ezüst koncentrációban. A sebszék zárulása 17.-18. óra után következett be. A relatív terjedési sebesség: $19,588 \mu\text{m}^2/\text{perc}$ volt.

Kromatin kondenzálódás folyamata a limbális sejteken

A HuLi sejtek kromatin kondenzálódás intermedierei

A korai S fázisban megjelenő dekondezált kromatin fátyol-szerű szerkezeteinek majd a fátyolos szerkezet szupertekercselődő, polarizálódó formáinak a már kondenzáltabb, fátyolos szerkezetű kromatin-gócok megjelenése követte, amelyek 4-5 nagyobb kromatin csoportba tömörültek. A folyamat tovább haladása során megfigyeltük a maganyag szupertekercselt kromatin szalagjait, illetve a szalagos szerkezeteken megjelenő kromoszóma előtelepeket. A metafázisos kromoszómák megjelenése előtti jellegzetes spirál, U és V alakú prekromoszómákat a metafázisos kromoszómák megjelenése követte.

Az antibiotikumok hatása a kromatin kondenzálódásban

Chloramphenicol

A 0,5 mg/ml koncentrációban jelenlévő chloramphenicol tipikus hatása a kromatin formák szerkezetére vonatkozóan a kromatinállomány lokális polarizációjában és a mag felnyílásában nyilvánult meg. Ritkábban előforduló szerkezeti változás a befejezetlen, meggyűrődött kromatin formák megjelenése volt, melyek nem jutottak el a metaphasisra jellemző, tömör állapotig. Magasabb 1 mg/ml-es koncentrációban a kromatin kondenzálódási folyamat megakadt a fibrillaris szerkezetnél, és nem lépett tovább a szalagos formák megjelenéséig.

Rifampicin

0,1 mg/ml rifampicin jelenlétében azt tapasztaltuk, hogy karakterisztikus lyukak keletkeztek a maganyagban. A kromatin kondenzálódási folyamat a fátyolos szerkezetek megjelenéséig jutott el. Magasabb koncentrációban a kromatin szerkezetek jellegzetes elváltozását okozta, mely elsősorban a szupertekercselt kromatin-szalagok megjelenésében nyilvánult meg.

Nanorészecskék hatása a kromatin kondenzálódásban

A kromatin változások a többfalú szén nanocsövek hatására

A szén nanocsövek jelenlétében a kromatin struktúrák nem mutattak jelentősebb különbségeket a kontrollhoz képest. A növekvő MWCNT koncentrációk mellett is 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 melyre a metafázisos kromoszómák inkomplett kondenzációja utalt. A nanoszénecsövek indukálta micronucleusok megjelenése nem közvetlenül cytotoxicitásra utal, hanem a kondenzáció korai fázisában a kromatin kilökődéséből ered. A micronucleus index: A legmagasabb indexet ~8.9%-ot, a legalacsonyabb, 5 µg/ml MWCNT koncentráció adta, 50 - és a 100 µg/ml MWCNT mellett csökkenő tendenciát mutatott: 4,6 és 2,9% -ot.

A kromatin változások az arany nanorészecske kezelés hatására

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 prekromoszómákkal már ritkán találkoztunk, metafázisos kromoszómák megjelenésére pedig nem volt példa. A korai kromatin formákban kevés és gyakran torzult fátyolos szerkezetet találtunk. A fonalas és a kromoszóma előtelepes szerkezetek a normálisnál kisebbek voltak. A kondenzálódási folyamat a prekromoszómák, elongált kromoszómák megjelenéséig jutott el.

A magasabb koncentrációkban (200 és 320 ppm) a szupertekercselődési blokk a szokatlanul vékony kromatin szalagok megjelenésében manifesztálódott, illetve gátlódott a kromatin testek és a további formák kialakulása is. A 320 ppm

koncentrációban az aranyrészecskék hatására a kromatin testek és a kromoszóma előtelepek eltorzult formáit figyeltük meg. A dóziszfüggő hatás, a kromatin kondenzálódás gátlásának indikátora a jellegzetesen elvékonyodó kromatinszalag megjelenése.

Ezüst nanorészecskék hatása a kromatin kondenzálódásra

A 140 ppm koncentrációban az ezüst nanorészecskék a kromatin kondenzálódás korai fázisában nem okoztak drasztikus torzulásokat a kromatin struktúrákban. Lekerekített, fátylas szerkezetet csak ritkán láttunk, azonban gyakoriak voltak a polarizált és eltorzult fátylas szerkezetek. A kezdeti laza kromatin szupertekercselődése feltételezhetően csökkent aktivitással zajlott emiatt a további szerkezetek megjelenése késett; a kromatin állomány megmaradt a korai kondenzálódási szakaszban, a hosszú vékony szalagos szerkezeteknél. A vékonyabb szalagok miatt kisebb méretű kromatin testek alakultak ki és jelentős mennyiségben visszamaradt a fátylas szerkezetű maganyag. A leginkább kondenzálódott szerkezetek eljutottak az előkromoszómális állapotig.

Magas, 320 ppm koncentrációnál a kromatin szerkezetek kisebbek voltak az átlagosnál. Az apoptotikus testek hiánya kizárta a sejtek apoptosissal történő pusztulásának lehetőségét. A maganyag összezsugorodása miatt, a korai szerkezeteket a sejtmag körül elhelyezkedő, dekondezálalt fátjol és a maganyag üstökös csóvaszerű kilökődése jellemezte, ami a szupertekercselődés csökkenő hatékonyságára utalt. 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.

5. MEGBESZÉLÉS

A time-lapse videó mikroszkópos rendszer segítségével többféle modell kidolgozására nyílt lehetőségünk. A munkánk során elvégzett vizsgálataink alapján megállapítható, hogy a módszer megfelelően használható a szemészeti klinikumból származó minták hosszú távú és valós idejű time-lapse megfigyeléseire.

Az OCM-1 sejtek *in vitro* time-lapse vizsgálata

A képszekvenciák vizsgálata során megfigyeltük az uvealis melanoma sejtek három irányba történő multipoláris osztódását, amit trivisionak neveztünk el. A kvantitatív adatok alapján a multipoláris osztódások ideje szignifikánsan eltért a normál osztódásokétól, az OCM-1 sejttypusnál ez átlagosan 40 perccel tovább tartott. Az osztódások során összehasonlítottuk az anyasejtek és a leánysejtek térfogatát. Az OCM-1 utódsejtek normál osztódásánál 43%- át adták az anyasejtnek, trivisio után ez már 32% volt, mely eltérés a leánysejtek térfogatában kissejtes daganatos elváltozásokra utalhat. A multipoláris sejtosztódások gyakorisága az OCM-1 sejtek esetében 0,27% volt. A folyamatot jellegzetes morfológiai megjelenés indukálja, ami a sejtmaganyag, illetve az egész sejt háromirányú szétválásával, vagyis a tripolarizációval írható le. Néhány vizsgálatunk során már feltéteztük azt, hogy a tumor progresszió és a metastatisáló képesség összefügghet a hármas osztódásokkal. A trivisiók kiváltotta aneuploidia a magasabb ploeditási állapotokban súlyosbító tényező lehet, mivel a szabálytalan osztódások számát növeli. Ez a feltételezés összhangban áll a daganatok multi-mutációs teóriájával.

Klinikailag izolált limbális sejtek *in vitro* megfigyelése

A limbusból izolált sejtek szöveti régióhoz kapcsolódó eredetük, a morfológiai megjelenésük és az őssejt markerek segítségével történt azonosításuk alapján

limbális tranziens őssejteknek bizonyultak. A Humán Limbális (HuLi) sejtek kisméretű, nagy sejtmag-cytoplazma arányú, polygonális alakúak. A HuLi sejtvonal a 20. átoltás után is homogén, változatlan morfológiával rendelkezett, cytológiai vizsgálatokban reprodukálhatóan alkalmazható volt.

Limbális regenerációs karcmodell

A szemészeti klinikumból származó, limbális eredetű HuLi sejteken létrehozott karcmodellt használtuk a corneális sebgyógyulás tanulmányozására. A monolayer regenerációs modell segítségével négy jellegzetes szakasz megjelenését figyeltük meg a regenerációs profilon: I.: felnyílási- és visszatapadási szakasz, vagyis a késleltetett fázis; II.: exponenciális fázis: regenerációs folyamatok kezdő szakasza; III.: átmeneti fázis: a felsértett régió záródási szakasza; IV.: stationer fázis: a karc terület újra konfluenssé válása.

A monolayer felsértését követő regenerációt a sérült rész kiindulási területétől független változóval számszerűen jellemeztük. Ez a relatív monolayer terjedési sebesség, ami a sejtpázsit karc szélein a sejtek elmozdulásának percenkénti átlagát jelenti.

HuLi monolayer regenerációs modell felhasználása

Szemészeti terápiában alkalmazott antibiotikumok hatás vizsgálata

A chloramphenicol kisebb mértékben gátolta a sejtek növekedését. Szignifikáns különbségeket tapasztaltunk a kontroll és a kezelt sejtek között a regeneráció dinamikáját tekintve. A kontroll sejtpázsit 5 óra alatt regenerálódott ezzel szemben a 0,5 mg/ml koncentrációban közel 12 óra, míg a 1 mg/ml esetében a karc záródása 30 óra után következett be, illetve a teljes konfluencia nem alakult ki. A limbális sejtek növekedését a rifampicin erősen gátolta már alacsonyabb, 0,1mg/ml, dózisban is: a regeneráció több, mint 15 órát vett igénybe, és nem

volt teljes, a magasabb koncentráció 0,2 mg/ml pedig a sejtek pusztulását okozta.

A kromatin kondenzálódási intermedier szerkezeteinek jellegzetes károsodása alátámasztotta az antibiotikumok károsító hatását. A chloramphenicol alacsonyabb dózisban a mag felnyílását okozta; magasabb koncentrációban akadályozta fonalas szerkezetek szalagos szerkezetekké való átalakulását. A rifampicin kisebb koncentrációban a szalagos szerkezetek megjelenése után blokkolta a kondenzálódás folyamatát. Ez összhangban áll a mikroszkópos megfigyeléseinkkel: a regeneráció megindulásában tapasztalt csúszás sejtszinkronizáló hatásra utal. A rifampicin magasabb dózisban változatos kinézetű magok és kondenzálódási formák megjelenését okozta, amely a sejtek súlyosabb károsodására utalt.

Limbális monolayer regeneráció nanorészecskék jelenlétében

A többfalú karbon nanocsövek hatásának vizsgálata során törekedtünk olyan valós körülmények modellezésére, melyek során érintkezhetünk ezen anyagokkal. Az eredmények azt mutatták, hogy az ipari MWCNT-k limbális sejtekre gyakorolt hatása hosszútávon dóziszfüggő, azonban jelentős toxikus hatás nem volt kimutatható, hasonlóan, mint azt az immortalizált és embrionális sejteken tapasztalták. Az *in vitro* monolayer regenerációs modell vizsgálata során a koncentrációval arányos nanorészecske felhalmozódást figyeltünk meg a felsértett régióban, ami összefügghet, illetve amplifikálhatja a karcszéleken a monolayer felgyűrődésével. A nano karboncsövek dózissal arányos hatása a sejtmigráció fizikai akadályozásán keresztül nyilvánult meg, ez a gátolt és zavart motilitással és a visszamaradó reziduális testekkel együtt *in vivo* hegesedésre utalhat.

Az arany és ezüst nanorészecskéket mint potenciális hatóanyag hordozókat is tekintetbe vettük a corneális epithel megújulása során. A kisebb, -ezáltal toxikusabbnak tartott- ezüst nanorészecskékkel ellentmondásos eredményt kaptunk: jelenlétükben a monolayer regenerációja kevesebb időt vett igénybe, mint az arany részecskék jelenlétében. A kezelést követően elhúzódó regenerálódási folyamatot okozó celluláris szintű károsodások jól detektálhatók a genotoxicitás specifikus kromatin módosulatait tekintve is: Az ezüst nanopartikulumok jelenlétében a mag körüli dekondezálódott kromatin fátyol és az üstökös-szerű képletek kilökődésével, illetve az elongált és metafázisos kromoszómákkal, továbbá az apoptosira utaló szerkezetek hiányával. Ezek alapján feltételezhető, hogy ezen részecskék inkább cytosztatikus, reverzibilis, hatásúak. Az arany nanorészecskék jelenléte még megengedte a kromatin szalagok átalakulását kromatin testekké, de elongált prekromoszómákat csak ritkán figyeltünk meg, a proliferációt gátló hatást a regenerációs idő elhúzódásán keresztül tapasztaltuk melyet a metafázisos kromoszómák megjelenésének hiánya is alátámasztott.

6. ÚJ EREDMÉNYEK, ÉS RELEVANCIÁJUK

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.

1. Uveális melanoma (OCM-1) sejttenyészetek egyedi sejtjeinek multipoláris osztódásai

A képszekvenciák vizsgálata során megfigyeltük az uveális melanoma sejtek három irányba történő multipoláris osztódását, amit trivisionak neveztünk el. A folyamat kezdetén jellegzetes morfológiai elváltozás jellemző, ami a sejtanyag, illetve az egész sejt háromirányú szétválásával, vagyis a tripolarizációval írható le. A digitális képanalízissel 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 feltételeztük, hogy a trivisio hozzájárul az aneuploidiahoz és tumor progressziójához.

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

A HuLi (Humán Limbális) sejttenyészetet 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 polygonális alakúak, kisméretűek, nagy a sejtmag-cytoplazma arányuk, a cytoplazma nem mutat szemcsézettséget. A HuLi cytokeratin 19 markerre adott pozitív reakciója a sejtek összejt 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 megfeleltetők 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 cytotoxikológiai eredményeket és a kromatin kondenzáció morfológiai vizsgálatának genotoxicitási adatainak kombinálásával széles körben alkalmazható toxikológiai screening rendszert fejlesztettünk ki a vizsgált anyagok hatásainak tanulmányozására. A rendszer nagy érzékenységgel képes különféle biológiai folyamatok dinamikus monitorozására a klinikai mintákon.

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 morfológiai vizsgálati eredményeivel kiegészítve a

chloramphenicolal és rifampicinnel kezelt sejtek esetében karakterisztikus változások jelentek meg a kontroll mintákhoz képest, melyek jelezhetik a szemeszeti regenerációs terápiában alkalmazható antibiotikum koncentrációk maximumát.

5. A karcmodell felhasználása cytotoxicitás 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 $\mu\text{g/ml}$) nanorészecske aggregátumok megakadályozták a regenerációs folyamat végbemenetelét. A sejtprésit regenerációja során az alkalmazott koncentrációval arányosan (50 $\mu\text{g/ml}$ -től) az aggregátumok a karcba ágyazódtak, 100 $\mu\text{g/ml}$ -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.

A time-lapse 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 multipoláris sejtosztódások dinamikájának a képanalízis során nyert kvalitatív és kvantitatív adatai bizonyították a módszer helytállóságát a hosszútávú, nagy időbeni felbontású kísérleti elrendezésben.
- A limbális sejtek cornea hám reepithelizációt modellező monolayer karcmodellje a corneális felszíni viszonyokat tükrözi, a regenerációs folyamat celluláris szintű dinamikáját írja le.



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., Tólas, 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 Hyperploidy 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 tudománytermetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.



Debrecen, 2019.10.28.

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ KONFERENCIA PREZENTÁCIÓK ÉS POSZTEREK

Turáni, M; Baksa, V; Kovács, F; Kiss, A; Nagy, G **Többfalú karbon nanocsövek (MWCNT) hossz-összefüggés vizsgálata, geno- és citotoxikus hatásainak megfigyelése a szaruhártya regenerációja során.** Tavasz Szél Nemzetközi Multidiszciplináris Konferencia 2019 Debrecen

Turani M; Belany Zs; Balsa V; Nagy G **The effect of the different matrix materials on the in vitro corneal wound healing** Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája "FIBOK 2018": Budapest

Király G, Turáni M, Ungvári O, Nagy G, Kemény-Beke Á, Juhász I. **Limbal cell monolayer regeneration: Videomicroscopy and Digital Image Analysis in a Corneal Surface Regeneration Model.** Wound Care from Innovations to Clinical Trials (WCICT 2017), 2017. Manchester UK

Turani M; Banfalvi G; Kukoricza K; Jakim J; Kemeny-Beke A; Nagy G **Silver and gold nanoparticles delay limbal stem cell regeneration and chromatin condensation.** 12th Multinational Congress on Microscopy: (MCM) 2015 Eger

Turani M; Banfalvi G; Peter A; Kukoricza K; Kiraly G; Kemeny-Beke A; Nagy G **In vitro model of corneal eye healing. Antibiotics affecting putative limbal stem cell growth and interphase chromatin structure.** Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája "FIBOK 2014" Szeged.

EGYÉB KONFERENCIA PREZENTÁCIÓ ÉS POSZTER

Turáni M, Nagy G; Bánfalvi G; Pápai P; Tánczos B. **Hystopathological examination of tumours in ferrets and the consequences of delayed angiogenesis** 26th Mustelid Colloquium (2008) Budapest.