

**HaCaT sejtek szérumentes szinkronizációjának vizsgálata
perfúziós rendszerrel kiegészített Long-Term Scan mikroszkópia
segítségével**

Fidrus Eszter

Debrecen

2014

Tartalomjegyzék:

Tartalomjegyzék:.....	2
1. Bevezetés	3
2. A kísérletek célja	5
2.1 A perfúziós rendszer fejlesztése	5
2.2. HaCaT sejtek szérumentes szinkronizációja	5
3. Irodalmi áttekintés.....	7
4. A perfúziós rendszer működési elve, felépítése	9
5. A rendszer működése.....	13
5.1. Az oldatot tartalmazó fecskendő hozzáadása a perfúziós rendszerhez.....	13
5.2. A sejtenyészet perfúziós rendszerbe helyezése	14
5.3. A sejtenyésző edény LTS rendszerbe helyezése	15
5.4. A perfúziós rendszer használata	15
6. A szinkronizációs vizsgálatok eredményei.....	17
7. Összefoglalás.....	21
8. További fejlesztési lehetőségek.....	23
<i>Irodalom jegyzék:</i>	<i>24</i>

1. Bevezetés

A sejtteni kutatások alapját általában a különböző, sejttenyésztő edényekben *in vitro* létrehozott sejtpopulációk képezik, melyek segítségével vizsgálhatjuk a sejtek viselkedését, metabolizmusát vagy különböző kémiai ágensek hatását egy adott sejt típusra vonatkozóan. A sejteket steril körülmények között, kifejezetten sejttenyésztésre kifejlesztett edényekben kell tartani, így a kísérleteknél is ügyelni kell a sejt kultúra kontaminációjának elkerülésére.

A Debreceni Egyetem Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszékén 2000-ben alakult eTox hallgatói munkacsoport 2005-ben fejlesztette ki az ún. Long-Term Scan mikroszkópos rendszert, melynek segítségével képesek vagyunk a sejtek fénymikroszkópos megfigyelésére a vizsgálat teljes időtartama alatt. A rendszer lényege, hogy a sejttenyészet adott állapotáról meghatározott időközönként digitális fénykép készül, majd az így nyert képsorozat videofelvétellel alakítható és kvantitatív paraméterek mentén elemezhető. Így lehetővé válik a sejt kultúra hosszú távú, sejt- és populációs szintű megfigyelése.

A perfúziós rendszer kifejlesztésére azért volt szükség, hogy segítségével képesek legyünk Long-Term Scan rendszerünkben egyszerűen és tisztán különböző anyagok sejttenyésztésre gyakorolt hatását vizsgálni úgy, hogy a felhasználónak ne kelljen fizikai kontaktusba kerülnie a tenyésztőkörnyezettel a kísérlet alatt.

A létrehozott rendszerrel képesek vagyunk a kísérlet közben adott időpontokban különböző anyagokat hozzáadni a sejttenyészethez. Ezáltal sikerült kizárni a sejttenyészet esetleges kontaminációját és a mechanikai behatásokat, biztosítva a tenyészetek zavartalan fejlődését. További előnye a rendszernek, hogy kombinálva a Long-Term Scan rendszerrel (továbbiakban LTS), nem fogjuk elmozdítani a képen látható sejteket a tenyésztőedény kiemelésével. Így specifikus régiók hosszú távú megfigyelése is megvalósítható, illetve elkerülhető a felvétel vegyszer hozzáadása miatti megszakadása. Ezáltal *in vitro* evolúciós megfigyelések is lehetségesek, tehát képesek vagyunk egy adott sejt utódsejtjeit is végigkövetni a vizsgálat ideje alatt.

A rendszer működésének tesztelése sejtciklus-szinkronizációs módszerek vizsgálata során történt, a kísérletekhez HaCaT (immortalizált humán keratinocita) sejtvonalat használtunk. A sejtciklus szinkronizálási metódusok célja egy aszinkron (a sejtciklus különböző fázisaiban tartózkodó sejteket tartalmazó) tenyészet sejtjeinek a sejtciklus egy meghatározott fázisában való blokkolása, majd a szinkronizáló hatás megszüntetésével a sejtek felszabadítása a blokk alól. Így elérhető, hogy a sejtek egyszerre lépjenek a sejtciklus további szakaszaiba, ami megkönnyíti a sejtciklus szabályozására és a sejtosztódásra irányuló kutatásokat. Emellett lehetővé teszi a biológiai, kémiai és fizikai ágensek sejtciklusra gyakorolt hatásának vizsgálatát, a potenciális mutagének hatásmechanizmusainak megfigyelését.

2. A kísérletek célja

2.1 A perfúziós rendszer fejlesztése

A dolgozatban ismertetett perfúziós rendszer kifejlesztése előtt az oldatok sejtenyészethez való hozzáadása és eltávolítása a sejtenyészítő edény LTS rendszerből való elmozdítása nélkül csak manuálisan, fecskendőkből kézzel adagolva történhetett. A sejtenyészítő edény tetején izzásig hevített túvel ütött lyukon keresztül egy-egy oldatok bevezetésére, illetve leszívására alkalmas steril tűt vezetünk át. A tűket melegragasztóval (200°C) fixáltuk.

A flaskákat az LTS rendszer tárgyasztalán rögzítettük, a tápoldat cseréjéhez a tenyészethez hozzáadni kívánt oldatot egy fecskendőben steril körülmények között felszívtuk, majd egy óráig az inkubátorban hagytuk, hogy a 37 °C-os hőmérsékletet felvegye. Ezután a bemeneti tű fecskendőcsatlakozó dugóját eltávolítva az oldatot a flaskába injektáltuk, majd visszahelyeztük a csatlakozó dugóját. A tenyészőmédium eltávolítását szintén egy, az elszívásra behelyezett tűre rögzített cső és egy fecskendő segítségével valósítottuk meg. Az elvezető cső végére csatlakoztatott fecskendő kihúzásával keletkezett vákuum a fecskendőbe szívta a flaskában található folyadékot.

Az alkalmazott módszernek számos hátránya volt. Az oldatok beinjektálása során ugyanis nagy volt a tenyészet befertőződésének veszélye, valószínűsíthetően a fecskendő és a beinjektálásra használatos cső gyakori szétválása miatt. (A fecskendő és a flaska így nem képezhetett steril, zárt rendszert.) További gond volt, hogy a kézi befecskendezések alkalmával a flaska gyakran elmozdult. Így a rendszer eredeti célját veszítette el, azaz hogy a sejt-kultúra tápoldatsere előtti és utáni állapotát egyazon specifikus régió keresztül tudjuk vizsgálni. Ezért vált szükségessé a rendszer továbbfejlesztése, automatizálása.

2.2. HaCaT sejtek szérumentes szinkronizációja

A perfúziós rendszer segítségével az úgynevezett szérumentes sejtciklus szinkronizációt vizsgáltuk. Humán sejt vonalak in vitro tenyésztése során a sejtek túléléséhez és proliferációs képességének megőrzéséhez a használt tápoldathoz (esetünkben RPMI 1640

médium) 10% foetális szérumot (itt: fetal bovine serum, FBS) kevernek, mely tartalmazza a sejtpopuláció növekedéséhez szükséges faktorokat.

A szérum tápoldatból való megvonásának hatására a sejtek a sejtciklus G0 vagy G1 fázisában blokkolódnak, majd a szérum újbóli hozzáadásával egyszerre lépnek ciklus további szakaszaiba, így elérhető, hogy a tenyészet sejtjei néhány sejtcikluson keresztül adott időpontban mindig azonos fázisban legyenek.

A kísérlet során frissen passzált, letapadás utáni HaCaT (humán adult keratinocita) sejteket használtunk abból az okból kifolyólag, hogy adherens (letapadó) sejt kultúra lévén a Long-Term Scan rendszer által készített felvételeken morfológiailag jól elkülöníthetők a letapadt interfázisos sejtek a felülúszóban lebegő M fázisos sejtektől. A szinkronitás elérésére 15-20%-os konfluenciaszintet mutató HaCaT kultúra 10%-os szérumtartalmú tápoldatát a sejtek letapadását követően szérummentesre, majd 24 óra múlva újra 10% szérumot tartalmazó tenyésztőmédiumra cseréltük a perfúziós rendszer segítségével. A módszer sikerességét, azaz tenyészet szinkronitását az egyidejűleg osztódó sejtek számának változásán keresztül vizsgáltuk.

3. Irodalmi áttekintés

A különböző sejtciklus szinkronizálási metódusok igen elterjedtek a sejtciklus szabályzására és sejtosztódásra irányuló kutatásokban. Az eljárások célja egy olyan sejtpopuláció *in vitro* előállítása, melynek sejtjei a sejtciklus azonos fázisában tartózkodnak, így egyszerre (szinkronban) haladnak végig a proliferációs ciklus szakaszain. Szinkron tenyészet létrehozására számos módszer létezik, melyek eltérnek toxicitásukban, a szinkronitás mértékében és fennállásának idejében, illetve a különböző sejttypusoknál való alkalmazhatóságukban.

A szinkronizációs protokollok egyik részét képezik azok a technikák, amelyeknél egy aszinkron populáció azonos fázisban található sejtjeit valamilyen eljárás segítségével kiválasztjuk a tenyészet többi sejtjétől. Erre példa a centrifugális elutriáció, amely azon alapszik, hogy a nagyobb nukleinsavtartalmú (azaz G2 és M fázisos) sejtek nagyobb méretűek a G1 és S fázisos sejteknél. A módszer alkalmazása során a sejtek centrifugálása közben egy, a centrifugális erővel ellentétes irányú folyadékáramlás is biztosított, melynek hatására azok méret szerint különböző frakciókban gyűlnek össze és elválaszthatóak egymástól.

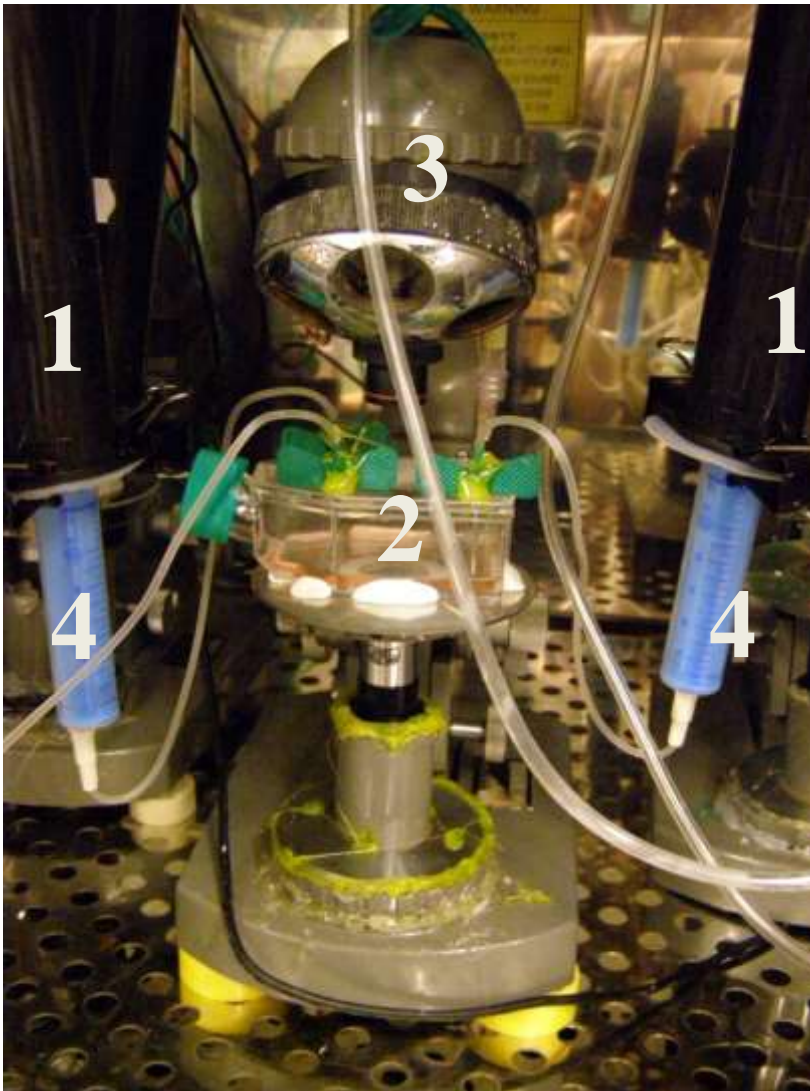
A sejtciklus szinkronizáció elterjedtebb formái az úgynevezett „arrest and release” módszerek. Itt azt használjuk ki, hogy a sejtek bizonyos kémiai ágensek vagy a proliferációhoz nem megfelelő körülmények hatására a sejtciklus egy adott pontján blokkolódnak, majd a gátló hatás megszűnte után erről a pontról újraindulva folytatják a ciklust. Ezeknek a módszereknek az előnye, hogy segítségével sokkal nagyobb mennyiségű szinkronban lévő sejtet tudunk előállítani, mint az azonos fázisú sejtek szeparálásával, illetve sokkal pontosabban definiálható az a pont, ahol a sejtek a sejtciklus során blokkot szenvednek. A sejtciklus blokkoló módszereknek 3 típusát különböztetjük meg:

- a) G2/M fázisos blokkot okozó szerek, melyek a mitózis folyamatát gátolják (pl.: colchicine),
- b) S fázisos blokkot okozó szerek, melyek DNS szintézis inhibitoroként használhatók (pl.: hidroxürea),
- c) és G0/G1 fázisos blokkot okozók, melyek általában az ún. restrikciós pontot célozzák meg (pl. nátrium-butirát, szérumeheztetés).

A dolgozatban az utóbbi csoportba tartozó, szérummegvonáson alapuló szinkronizációt vizsgáltuk. A módszer előnye, hogy alkalmazásához nincs szükség speciális sejtciklusgátló vegyületekre, így költséghatékonyabb a többi kémiai szinkronizációs módszernél, valamint elkerülhető a vegyszerek miatti toxicitás és a sejtek viselkedésének megváltozása. Hátránya, hogy ez a technika kizárólag nem-tumor sejteknél alkalmazható, melyek proliferációjukhoz nem tudják nélkülözni a tápoldathoz mesterségesen hozzáadott növekedési faktorokat.

4. A perfúziós rendszer működési elve, felépítése

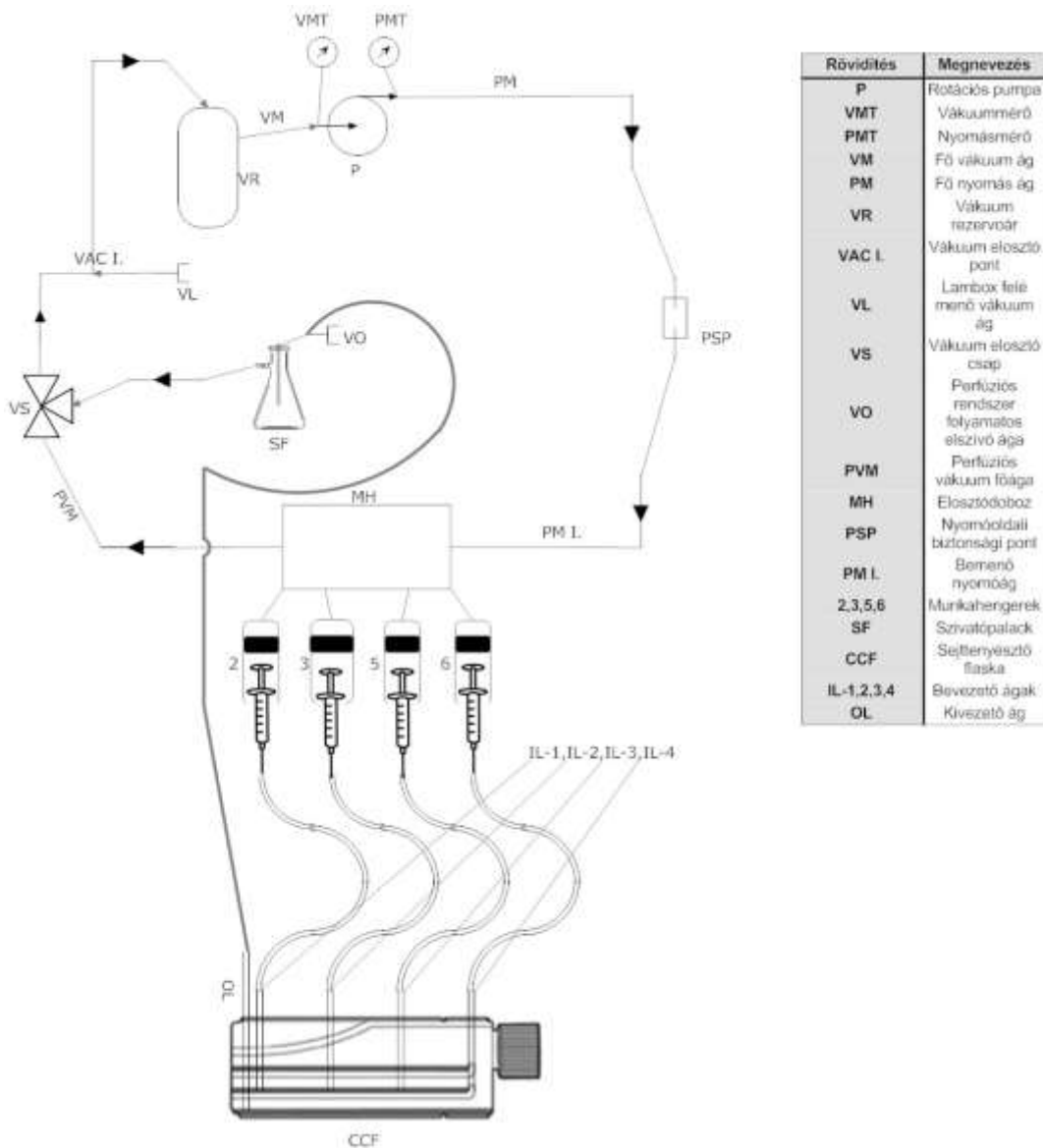
A rendszer megalkotásakor biztonsági okokból választottunk pneumatikus rendszert, ugyanis így kisebb a kár mértéke egy esetleges rendszerhiba esetén. (Hidraulikus nyomáselosztás alkalmazásával, ha hiba történik és szétesik valahol a folyadékot szállító csőrendszer, akkor rövidzárlat is kialakulhat, ami nem megengedhető.) A perfúziós rendszer működését egy szivattyú teszi lehetővé, amely egyik oldalon beszívja a levegőt, a másik oldalon kinyomja azt. A levegő beszívásáért felelős oldalt vákuum-oldalnak nevezzük, tekintve, hogy itt csökkentett légnyomású tér alakul ki, ha egy zárt rendszerre tesszük a pumpát. A másik oldal a nyomóoldal vagy a pozitív nyomás oldala, mert itt megnő a rendszer nyomása egy zárt rendszerbe helyezve azt.



Jelmagyarázat az 1. képhez:

- | | |
|---|---------------------|
| 1 | munkahengerek |
| 2 | sejttenyésztő edény |
| 3 | LTS mikroszkóp |
| 4 | steril fecskendők |

1. kép: a perfúziós rendszerrel kiegészített LTS mikroszkóp képe



1. ábra az LTS perfúziós rendszer sematikus ábrája

Egy-egy mérőóra a vákuum illetve a nyomás mértékét méri a rendszerben. A nyomásmérő óra “bar”-os beosztással van ellátva, amíg a vákuum méréséért felelős óra “mmQS” beosztással bír, ami egyenértékű a “mmHg” mértékegységgel, és átváltható “bar”-ra, ami megkönnyíti a rendszerben uralkodó nyomás és vákuum viszonyainak megítélését.

A vákuum ágból kiindulva egy rezervoár-tartály van beiktatva a rendszerbe a szivattyú védelmére.

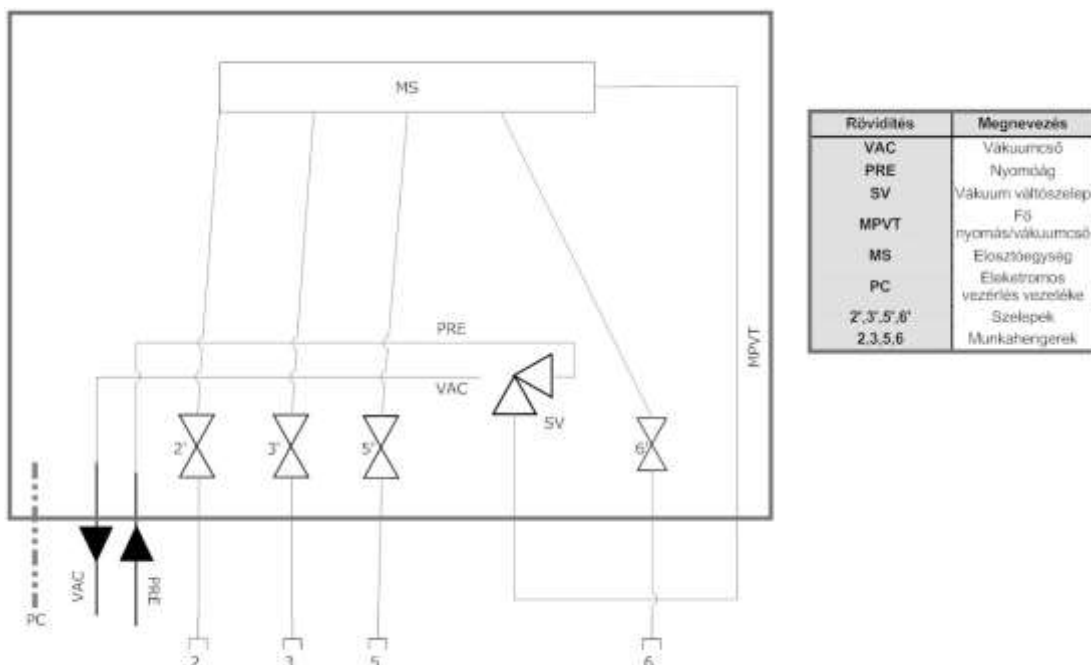
Ezután egy T-elágazás kétfelé bontja a vákuum útját. Az egyik irány a perfúziós rendszer felé megy, amit a továbbiakban részletesen tárgyalok majd. A másik ág egy szivatópalackhoz fut, ami a lamináris áramlású fülkéhez tartozik és a napi rutin során használatos. A lamináris fülke felé futó ágat a perfúziós rendszer működtetése alatt lezárjuk.

A perfúziós rendszer felé futó vákuum ág egy háromirányú váltócsaphoz csatlakozik. Ez a csap utat biztosít a vákuumnak a perfúziós rendszer elosztódoboz felé, illetve a rendszer használatához elengedhetetlen elszívó ágat teszi aktívvá. Ennek az ágnak az a feladata, hogy a sejtenyészítő edényben található felesleges folyadékot eltávolítsa a rendszerből egy szivatópalackba. Ez a folyadék általában a kísérlet során fel nem használt, éppen osztódó sejteket, a halott sejteket és az elhasználódott, vagy a vizsgálat céljából eltávolítandó tápoldatot tartalmazza. A szivatópalack bármikor könnyen leválasztható a rendszerről és kiüríthető.

A vákuum körét az elosztó doboz zárja, ami részletesebben a továbbiakban kerül bemutatásra.

A perfúziós rendszer nyomóága (a pozitív nyomást tartalmazó csőrendszer) a pumpából indul ki és egy biztonsági pontot tartalmaz. Ennek a biztonsági pontnak az a funkciója, hogy a rendszer indításakor kialakuló esetleges hirtelen megnövekvő nyomás (ami 0,8-1 bar) esetén ennél a gyengített pontnál a folyamatos csőrendszer megszakad, így a nyomás nem terheli túl a nyomóág további, érzékenyebb pontjait. Ebben az esetben a nyomás gyengítésével a kör könnyen újra zárható, majd a nyomás visszaállítható.

A nyomóág a fő elosztódobozba csatlakozik.



2. ábra a perfúziós rendszer elosztódobozának sematikus rajza

A fő elosztódoboz funkciója, hogy a pumpa által létrehozott nyomást és vákuumot egyenletesen és szabályozott módon elossza a munkahengerek között, azaz létrehozza a tiszta

téren kívülről szabályozott, egyenletes anyagáramot. Az elosztódobozban található öt darab elektromos szelep, ezekből négy szelep egy-egy munkahengerhez csatlakozik, egy pedig a nyomás és a vákuum váltásáért felelős. Utóbbi egy kétállású váltószelep, melynek feladata, hogy alapesetben a rendszerbe nyomást juttasson. Ha áramot adunk a szelepre, akkor az vált, és a rendszerbe vákuum kerül. Így tudjuk szabályozni, hogy a munkahengerek nyomó vagy szívó hatást fejtsenek ki.

A további négy, munkahengerekhez csatlakoztatott szelep egy elosztón keresztül kapja a nyomást vagy a vákuumot. Ezek jel hiányában kikapcsolt állapotban vannak, a szelepek jel hatására nyitnak a munkahengerek felé.

A rendszer munkahengereinek feladata, hogy a beléjük helyezett fecskendő fecskendőrudját nyomják vagy húzzák, ezzel szabályozva a bejuttatott anyag mennyiségét.

Az elektronikus vezérlésért egy vezérlőpanel felelős. Ez a panel az inkubátoron kívül található, és tartalmazza a rendszert aktiváló bekapcsoló gombot, a négy munkahenger aktiváló gombját és a vákuumváltó gombot.

A rendszer aktiválása a pumpa, a táp, majd a vezérlőpanel bekapcsolásával történik, ekkor a rendszer aktív, a munkahengerek vezérelhetők a szelepeken keresztül.

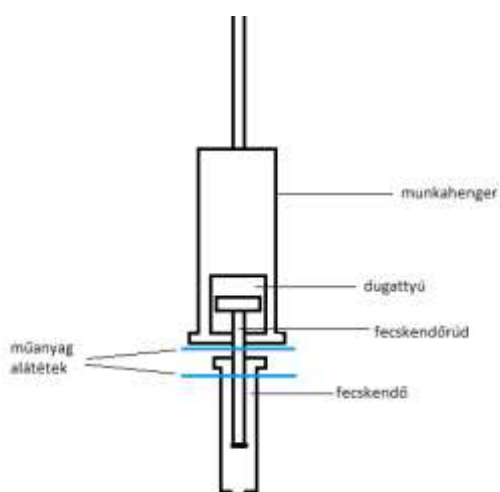
5. A rendszer működése

5.1. Az oldatot tartalmazó fecskendő hozzáadása a perfúziós rendszerhez

A kísérlethez használni tervezett összes oldatot előre, még a kísérlet megkezdése előtt a perfúziós rendszerbe helyezzük. Az oldatokat steril fülke alatt, alkoholos bemosakodást követően fecskendőben felszívjuk, majd a megfelelő mennyiségű oldatokat tartalmazó fecskendőbe további 2 ml szűrt levegőt szívunk fel szintén steril fülkében. Erre azért van szükség, hogy az oldatot a flaskába fecskendezve a bevezető csőben ne maradjon folyadék, ugyanis a magas fehérje tartalmú oldatok képesek megragadni a csőben, így eltömítve azt.

A fecskendő végét steril alufóliával lezárjuk, majd az inkubátorban elhelyezett perfúziós rendszerhez visszük. A rendszerbe helyezés úgy történik, hogy a fecskendőtestre és a fecskendőrúdra 1-1 műanyag alátétet helyezünk, illetve a fecskendőrúd végére rátesszük a dugattyút, aminek segítségével a fecskendő a munkahengerbe illeszthető. (Lásd: 1. ábra)

Az irányítópanelon az adott dugattyúhoz tartozó ("2", "3", "5" vagy "6") gombot és a vákuumot egyszerre lenyomva a fecskendőt a perfúziós rendszerben rögzítjük. A fecskendőn található alátéteket és a dugattyút fémkapoccsal fogjuk össze. A fecskendő végét sterilen tartó alufóliát mindaddig a fecskendőn tartjuk, amíg azt a bevezető cső fecskendőcsatlakozójához nem rögzítjük.



3. ábra a fecskendő és a dugattyú részei

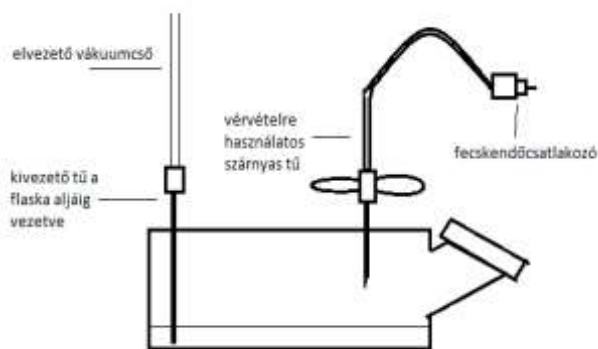


2. kép munkahenger a beillesztett fecskendővel

5.2. A sejtenyészet perfúziós rendszerbe helyezése

A műveletet steril fülke alatt végezzük a fertőzések elkerülése végett, a tűz- és balesetveszély miatt azonban alkoholos fertőtlenítést nem használunk. A munka első fázisaként egy 3mm átmérőjű, izzásig hevített acél tűvel lyukat ütünk a műanyag flaska tetején. A tű ilyen mértékű felmelegítésével annak sterilitása is biztosított. Az így keletkezett lyukon keresztül egyszer használatos, vérvételre kifejlesztett, steril szárnyas tűt vezetünk át, ezen keresztül történik majd az oldatok bejuttatása. A szárnyas tűt melegragasztóval rögzítjük. A flaskába annyi szárnyas tűt vezetünk az előbbi módszerrel, ahányszor tervezünk oldatot cserélni a tenyészetben. (Minden új oldatot külön fecskendőn, így külön szárnyas tűn keresztül juttatunk a flaskába a sterilitás miatt.)

Az oldatok kivezetésére a flaska aljával párhuzamosan vágott végű tűt (továbbiakban: kivezető tű) használunk, amit az előbbieken leírt módon egy izzásig hevített tűvel ütött lyukon keresztül vezetünk a flaskába és melegragasztóval rögzítünk. Fontos, hogy a kivezető tű egészen a flaska aljáig vezessük, így a benne lévő oldatot maximálisan le tudjuk szívni a tenyészetről. A későbbiekben a flaskát úgy helyezük az LTS rendszerbe, hogy az előbb említett tű felé enyhén lejtson, a folyadék lehető legnagyobb mértékű eltávolítása érdekében. A fülkében a kivezető tű végét steril alufóliával lezárjuk. (A szárnyas tűk elvezető csövének végén gyárilag egy szorosan záródó fecskendőcsatlakozó dugó található, így ott az utóbbi lépés nem szükséges.)



4. ábra a sejtenyésztő edénybe vezetett tűk sematikus rajza



3. kép sejtenyésztő edény a bevezetett tűkkel

5.3.A sejttenyésztő edény LTS rendszerbe helyezése

Az előbb leírt módon előkészített flaskát az inkubátorban elhelyezett LTS rendszer tárgyasztalán rögzítjük. A perfúziós rendszer elvezető csövét a kísérlet megkezdése előtt 70%-os etanol oldattal átmoszuk, majd az inkubátorban lévő menetes végét a kivezető tűre csavarjuk (miután arról az alufóliát eltávolítottuk). A bemeneti szárnyas tűk fecskendőcsatlakozó dugóját eltávolítjuk, majd az előre a rendszerbe készített, oldatot tartalmazó fecskendőket a fecskendőcsatlakozóba helyezzük. A fecskendőcsatlakozót a dugó eltávolítása előtt 70%-os etanol oldattal fertőtlenítjük. A fecskendőket ezután már csak a kísérlet befejeztével választjuk le a szárnyas tű csatlakozójáról.

Miután a sejttenyésztő edényt és a fecskendőket az előbbieken leírt módon rögzítettük, az LTS rendszer mikroszkópját élesre állítjuk és megkezdjük a kísérletet.

5.4. A perfúziós rendszer használata

Ha mind a sejttenyésztet, mind a kísérlet során használni tervezett oldatokat a korábbiakban leírt módon a perfúziós rendszerbe helyeztük, lehetségessé válik a tenyészetben lévő oldat cseréje vagy a vizsgálandó oldat bevitele steril körülmények között anélkül, hogy az inkubátor üvegajtóját kinyitnánk. Ez a következőképpen történik.

A rendszert és a tápegységet külön-külön kapcsolóval indítjuk el, valamint a kontrollpanelon található gombot az "on" feliratra állítjuk. A rendszert működtető vákuum és nyomás kialakításához bekapcsoljuk a vákuumszivattyút. A baloldali mérőórán (nyomásmérő) 0.4 bar nyomásnak, a jobb oldalin (vákuummérő) 350-380 mmOS vákuumnak (0,46-0,5 bar vákuum) kell jelen lennie a megfelelő működéshez. Ettől eltérő értékek esetén a vákuumszivattyún található csavaros szelepek segítségével csökkentjük, illetve növeljük a rendszer nyomását vagy vákuumát. Így a rendszer üzemkész állapotba kerül.

A kívánt fecskendőben lévő anyagot a kontrollpanelon lévő gombok folyamatos nyomva tartásával tudjuk bejuttatni a flaskába. Ez úgy történik, hogy a "2" "3" "5" vagy "6" gombok nyomva tartásával a 2-es, 3-mas, 5-ös, illetve 6-os munkahengerekben megnöveljük a nyomást, aminek hatására az adott fecskendőben található oldat a flaskába injektálódik.

Ha a panel közepén látható VÁKUUM szabályzó gombot és az adott munkahengerhez tartozó gombot (“2”, “3”, “5” vagy “6”) egyszerre és folyamatosan nyomva tartjuk, az előző művelet ellentéte, azaz a flaskában található oldat fecskendőbe való visszajuttatása is lehetséges. Ezzel a rendszerben vákuumot idézünk elő, aminek segítségével a fecskendők végén található dugattyút (és vele a fecskendő rúdját) a munkahengerbe felszívjuk. Így a flaskában található oldat visszaszívódik a fecskendőbe. Ez a lehetőség többek között hasznos lehet, ha a flaskában az adott pillanatban osztódó, tehát nem letapadt, szuszpenzióban lévő sejtekre van szükségünk, ezért az oldatot nem szeretnénk a hulladékot tartalmazó edénybe üríteni.

A flaskában lévő felesleges anyag eltávolítása egy folyamatos vákuumot biztosító, külön szálon futó rendszerrel történik. A rendszer külön kapcsolóval van ellátva, melyet elfordítva a korábban a kivezető türe csatlakoztatott elvezető csövön keresztül folyamatos és egyenletes vákuummal egy szivatópalackba szívja le a folyadékot.

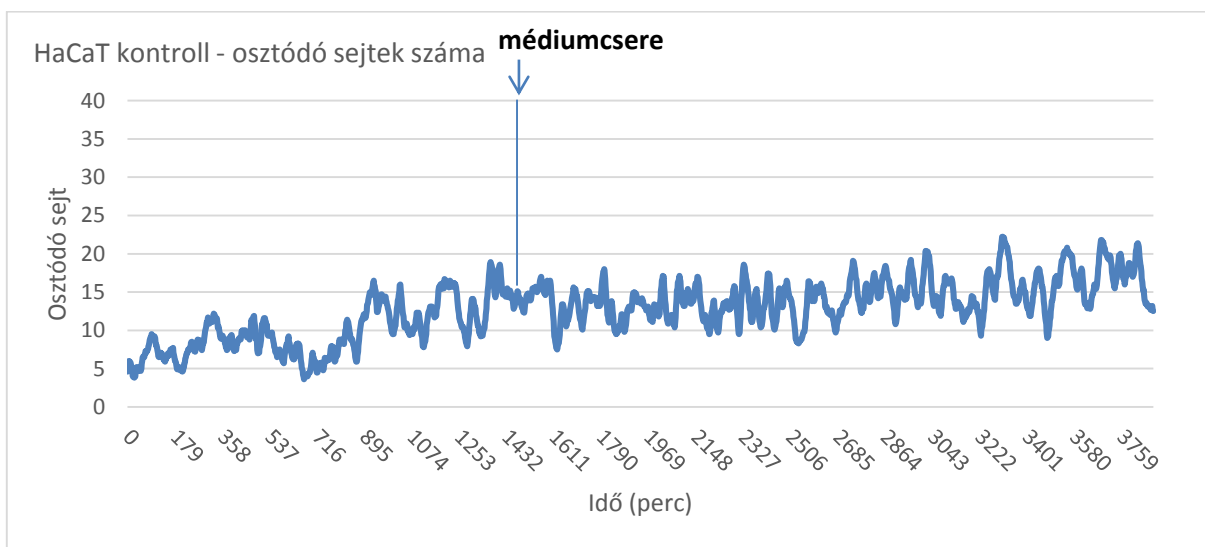
Az elszívó rendszer tisztítása úgy történik, hogy minden nagyobb vizsgálat után vagy minden leszívás után a rendszert feleslegben levő 70%-os etanollal átszívátjuk, ezzel kitisztítva azt. A szivatópalack ürítése értelemszerűen minden nagyobb vizsgálat után szükséges.



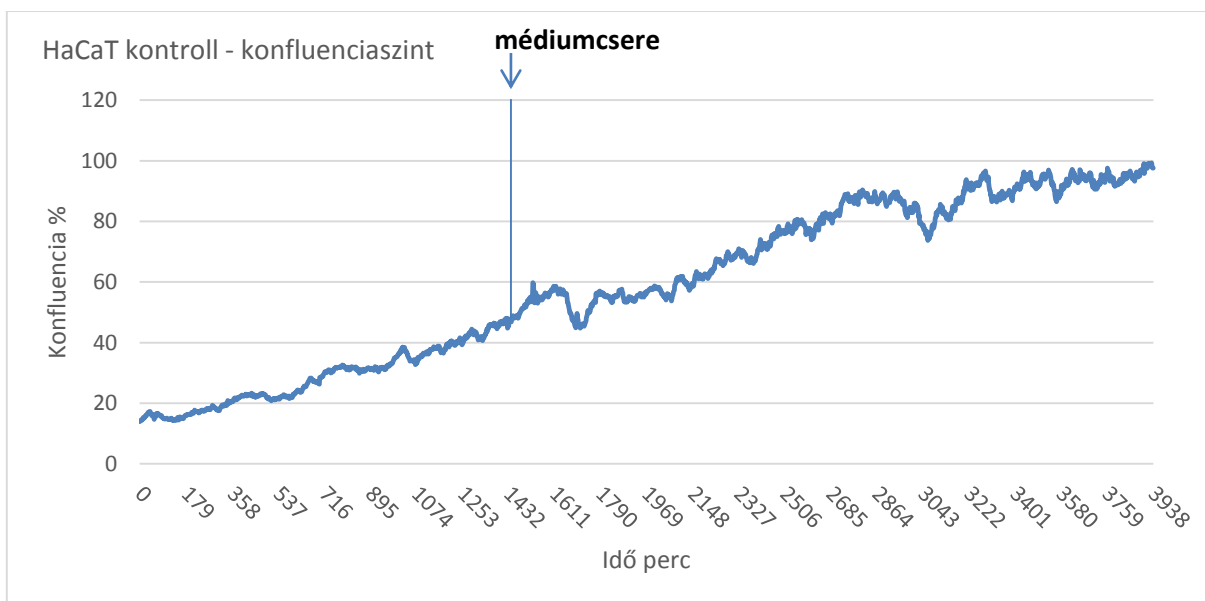
4. kép az elszívó ág átmosása 70%-os etanollal

6. A szinkronizációs vizsgálatok eredményei

A kísérletek kontrolljaként alacsony (10-20%-os) konfluenciaszintet mutató HaCaT sejt kultúrát használtunk. A sejteket 24 óráig 10% FBS-t tartalmazó RPMI 1640 tápoldatban tenyésztettük, majd közvetlenül a sejtek letapadását követően a szinkronizációs protokollhoz hasonlóan médiumcserét hajtottunk végre perfúziós rendszer segítségével. Az újonnan hozzáadott médium az előzővel megegyező összetételű, 10% FBS-t tartalmazó RPMI 1640 tápoldat volt. A kapott felvételekből kvantitatív képanalízissel készült diagramokon látható az osztódó sejtek számának változása és a konfluenciaszint növekedése.

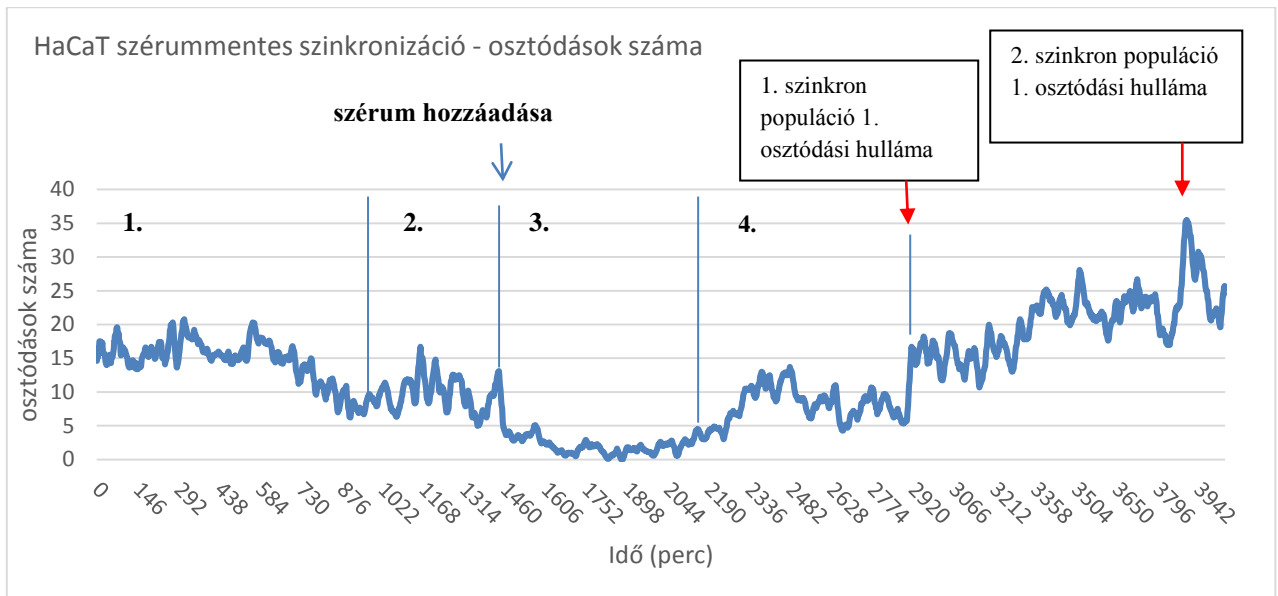


5. ábra: Osztódo sejtek számának változása a kontroll tenyészetben

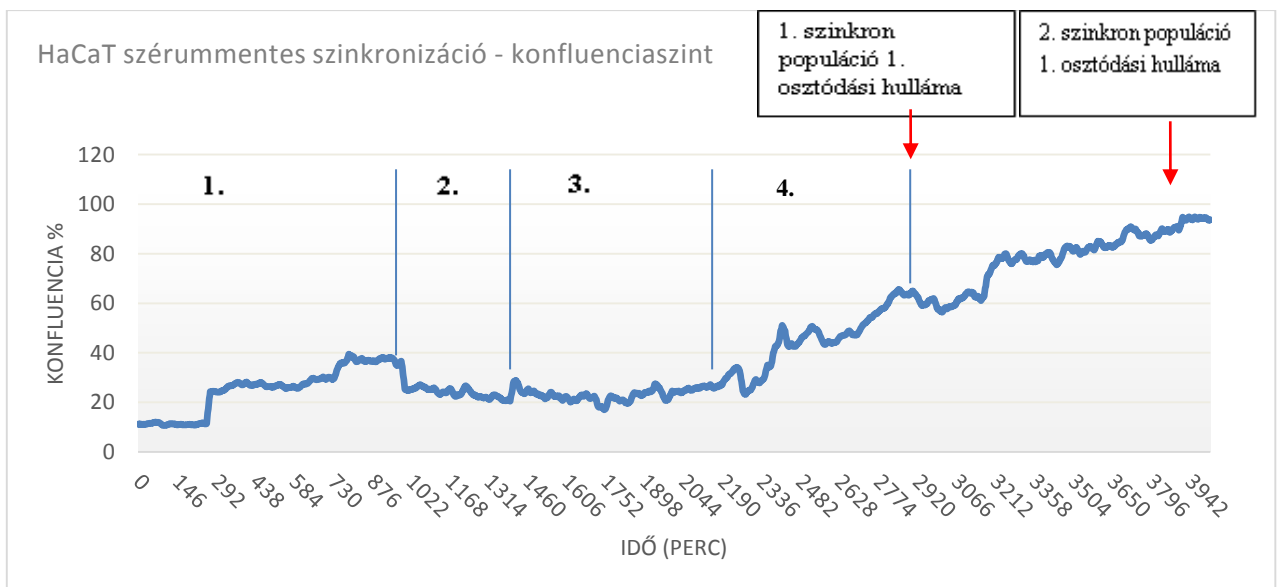


6. ábra: Konfluenciaszint változása a kontroll tenyészetben

A sejtek szérumentes szinkronizációjára irányuló vizsgálatokat szintén 20% alatti konfluenciát mutató, letapadás utáni HaCaT sejtekkel végeztük. A tenyésztőedényben található 10 % FBS- t tartalmazó RPMI 1640 médiumot a sejtek letapadását követően szérumentes, majd 24 h után újra 10% FBS-t tartalmazó tápoldatra cseréltük perfúziós rendszer segítségével. A kontroll tenészethez képesti eltérések az alábbi diagramokon követhetők nyomon.



7. ábra: Osztódó sejtek számának változása szérumentesítés hatására



8. ábra: konfluenciaszint változása szérumentesítés hatására

Ábramagyarázat:

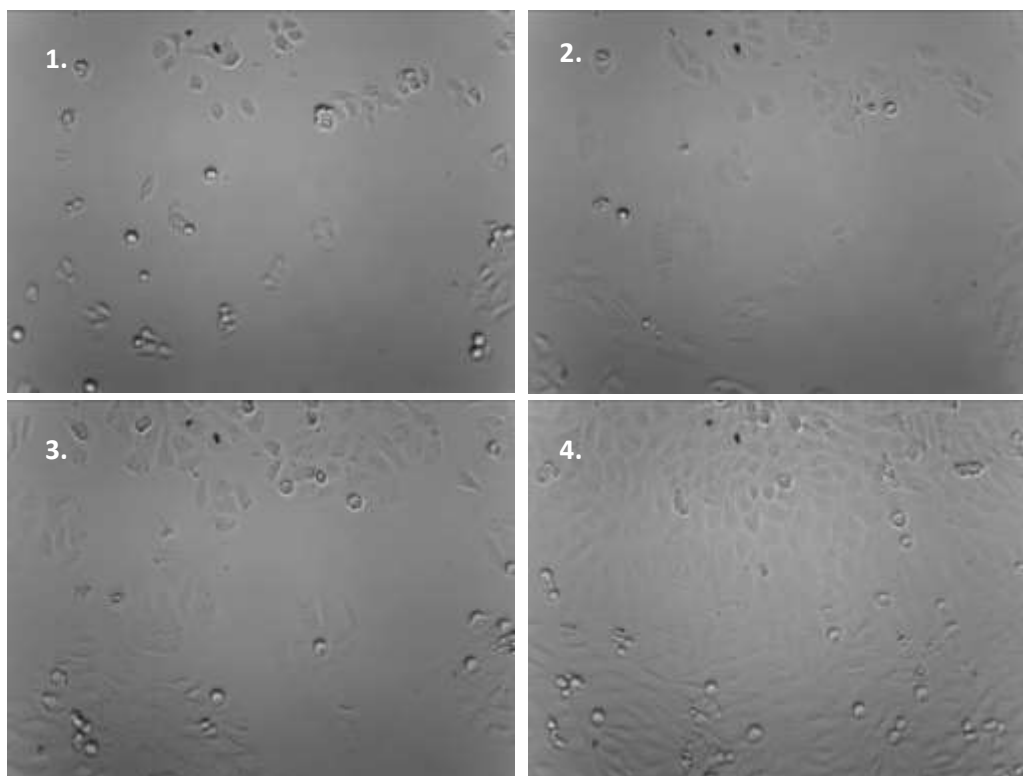
- (1) **1. perc:** A szérummegvonás következményeképpen az osztódó sejtek számának fokozatos esése, ezzel egyidejűleg a konfluenciaszint kismértékű növekedése figyelhető meg a letapadó sejtek osztódó sejtekhez képesti felületnövekedése miatt.
- (2) **963. perc:** Az osztódó sejtek számának növekedése – történhet az autokrin növekedési faktorok termelése miatt, de okozhatja a HaCaT sejt kultúrákra jellemző osztódási periodikusság is (lásd: kontroll tenyészet osztódási görbéje).
- (3) **1440. perc:** A szérum újbóli hozzáadása a tenyészethez. Az éppen M fázisban lévő sejtek felülúszóval történő lemosása, az osztódások száma kb. 12 óráig alacsonyan marad (1-3 sejt). Ezután a tenyészetben 2 szinkron és egy aszinkron (szérummegvonás hatására sejt ciklus-blokkot nem mutató) populáció különíthető el.
- (4) **2160. perc:** Az osztódások száma fokozatos növekedésnek indul. A növekedés fokozatossága és az M fázisos sejtek számának hosszabb ideig tartó fennállása miatt valószínűsíthető, hogy ez az emelkedés a szérummegvonás hatására sejt ciklus-blokkot nem mutató sejt populációból származik. (A diagram ezen szakasza a kontroll felvétel osztódási görbéjéhez hasonló.)
- (5) **2900. perctől** az osztódó sejtek száma két alkalommal (2900. és 3850. perc) ugrásszerű emelkedést mutat, előbb 62,5%-kal, majd 51,4%-kal nő a felülúszóban található sejtek száma. (A két hullámtól eltérő időkből max. 23-27%-os növekedések figyelhetők meg.) Az ugrások 24, majd 40 óra elteltével következnek be a szérum újbóli hozzáadását követően, amely időtartamok megfeleltethetők a G1, illetve G0 fázisból szinkronban újrainduló sejtek populációinak. Az ábrán nyíllal jelöltük az 1. és a 2. szinkron populáció osztódási hullámainak kezdetét. A két hullám közötti egyenes M fázisos sejtszámnövekedés a sejt ciklus blokkot nem mutató sejt populációból adódik.

Az osztódó sejtek felülete kisebb, mint a letapadt interfázisos sejteké, ennek köszönhetően az osztódási görbén tapasztalható esés a növekedési görbén a konfluenciaszint növekedésében jelenik meg és fordítva. Megfigyelhető, hogy a 2900. perc után az osztódó sejtek számának növekedése csak relatíve kis esést okoz a növekedési görbén, ennek oka, hogy az osztódó és a letapadt sejtek közti méretkülönbség idővel egyre kisebb a sejtek által lefedett összes

területhez képest. Ennek köszönhetően 80%-os konfluenciaszint elérése után a növekedési görbe nagyjából egyenletes a nagy hullámzást mutató osztódási görbe ellenére.

Megjegyzés: A közvetlenül a szérum hozzáadását követő, kismértékű emelkedést a növekedési görbén a perfúziós technikából adódó, a tápoldat cseréje miatt a látótéren átfutó árnyék vagy folyadékcsepp okozta, amely a képek elemzésénél sejtek által elfoglalt területként jelenik meg.

Amíg a kontroll felvételekről készült diagramok fokozatos növekedést mutatnak mind az osztódó sejtek számában, mind a tenyészetek konfluenciaszintjében, a 24 óráig szérummentes közegben tartott sejtek esetében hirtelen, a görbe más szakaszaitól jelentősen eltérő ugrások jelennek meg. (Megjegyzés: bár csak a szinkronizált tenyészetnél figyelhetőek meg az adott diagram átlagához képest jelentősen megemelkedő értékek, a kontroll tenyészetben az egyszerre osztódó sejtek száma sokkal nagyobb mértékű ingadozást mutat.) Az M fázisos sejtek száma a kontroll tenyészetben maximálisan 22 közel 100%-os felszínborítottságnál, míg ez a szérummentesen szinkronizált kultúránál 36 sejt az adott látótérben. A kontroll populációban a médium cseréje nem okozott változást az osztódások számában, a konfluenciagörbén található rövid idejű csökkenés a felülúszó oldattal együtt leszívott M fázisos sejtekből adódott.



9. ábra: Az LTS rendszer által készített képek - HaCaT sejtek (1) letapadás után, (2) közvetlenül a 24 órás széruméheztetést követően, (3) az első osztódások megjelenésekor, a szérum visszajuttatását követően 17 órával, illetve (4) a legnagyobb osztódási hullám idején, a szérum hozzáadása után 35 órával

7. Összefoglalás

A dolgozatban bemutatásra került perfúziós rendszer lehetővé teszi, hogy a korábban kifejlesztett Long-Term Scan rendszer használata esetén *in vitro* sejttenyészetek hosszú idejű fénymikroszkópos megfigyelése és videófelvételek készítése közben megoldható legyen a sejtek tápoldatának cseréje, illetve különböző kémiai ágensek tenyésztőmédiához való hozzáadása steril körülmények között, a kísérlet megszakítása és a sejttenyésztő edény elmozdítása nélkül. Ezáltal tovább növelhető az adott tenyészetéről készíthető felvétel hossza, hiszen a tenyésztőmédiumban található faktorok mennyisége már nem limitálja azt az időt, amit a sejtek maximálisan az LTS-rendszerben tölthetnek a tápanyagok elhasználódása nélkül. Ezen kívül alkalmas arra, hogy a tenyészet ugyanazon régióiról készítsünk felvételt bizonyos sejttenyészethez adott ágensek jelenlétében illetve hiányában.

A létrehozott perfúziós rendszer pneumatikus elvű, a tenyésztőedényben található médium cseréje levegőnyomás és vákuum segítségével mozgatott munkahengerekkel történik, melyek az inkubátoron kívülről irányíthatóak. A rendszer a kísérlet indulásakor tartalmazza az összes vizsgálat során felhasználásra kerülő oldatot, melyek a tenyésztőedénybe való injektálás előtt egy-egy inkubátorban található munkahengerben rögzített fecskendőben vannak elhelyezve. A tenyésztőedényről eltávolított oldat az inkubátoron kívül található tartályba kerül, így annak ürítése és tisztítása független a kísérlet adott állapotától. A sejtek és a felhasználni kívánt oldatok perfúziós rendszerben való elhelyezése steril fülke alatt történik, a befertőződés teljes mértékben elkerülhető.

A rendszer alkalmasnak bizonyult HaCaT sejtek szinkronizációjának vizsgálatára. A képekből kvantitatív képanalízissel készült növekedési görbéken elkülöníthetőek a sejtek különböző populációi a széruméheztetésre adott válaszuk szerint, illetve a felvételeken nyomon követhető a tenyészet növekedésének, morfológiájának és motilitásának változása a kísérlet különböző szakaszaiban.

A kapott eredmények ismeretében megállapítható, hogy a széruméheztetés részben effektív módszer HaCaT sejtek sejtciklus szinkronizációjára. A tenyészet a szérum visszajuttatását követően három populációra oszlik, amelyből kettő szinkronnak tekinthető. Az itt leírt módszer alkalmas arra, hogy adott sejt kultúrában egy adott időpontban a

normálistól magasabb osztódási arányt érjünk el (kb. 40%-kal növelhető a maximálisan egyszerre osztódó sejtek száma), amely hasznos lehet a sejtosztódás vizsgálatára irányuló kutatásokban. Teljesen szinkron populáció azonban nem hozható létre szérumeheztetéssel, amit valószínűsíthetően (szakirodalmi adatok alapján) a HaCaT sejtek autokrin növekedési faktor termelése okozza. A szinkron tenyészet előállítását továbbá gátolja, hogy a sejtciklus G1 és G0 fázisában blokkolódott sejtek a szérum visszajuttatását követően 16 órás eltéréssel folytatják a proliferációs ciklusukat, ezáltal két külön populációt képeznek.

8. További fejlesztési lehetőségek

A jövőbeli tervek között szerepel a perfúziós rendszer digitalizálása, azaz a kontrollpanel mellett egy szoftveres, felhasználóbarát kezelőfelület létrehozása az egyszerűbb munkavégzéshez, illetve a rendszer interneten keresztül történő kezelésének biztosításához. A rendszer távoktatási potenciáljának kihasználására az interneten keresztüli hozzáférés és kísérlet levezetése is egy lehetséges opció.

A rendszer kezelésének jelenlegi bonyolultsága miatt folyamatban van egy perfúziós rendszeroperátori képzési terv elkészítése, melynek célja, hogy a sejttenyésztési technikákban jártas hallgató/dolgozó képes legyen önállóan dolgozni a rendszerrel.

A Tanszék jelenlegi törekvése, hogy a rendszer használatát össze tudjuk kötni az eTox Long-Term Scan rendszer használatával és ezáltal képesek legyünk videó-dokumentáció készítésére e két rendszer összehangolt működtetésével. Az Informatikai Karral való együttműködés révén jelenleg épül a rendszer valósídejű, képtartalomelemzés által vezérelt automatikus verziója. A fejlesztés alatt álló rendszer lehetővé teszi, hogy a valósídejű mikroszkópos kép kvantitatív paramétereinek felhasználásával előre definiált feltételek teljesülése esetén (konfluencia, osztódás-, apoptózis-, nekrozisszámváltozás) a számítógép automatikusan beavatkozva működtesse a perfúziós rendszert.

Irodalom jegyzék:

1. Synchronization of Mammalian Cell Cultures by Serum Deprivation. Thomas J. Langan and Richard C. Chou. *Methods in Molecular Biology Volume 761*, 2011, pp 75-83
2. Overview of cell synchronization. Banfalvi G. *Methods Mol Biol.* 2011;761:1-23. doi: 10.1007/978-1-61779-182-6_1.
3. IGF-I stimulates proliferation of spontaneously immortalized human keratinocytes (HACAT) by autocrine/paracrine mechanisms. Pozzi G, Guidi M, Laudicina F, Marazzi M, Falcone L, Betti R, Crosti C, Müller EE, DiMattia GE, Locatelli V, Torsello A. *J Endocrinol Invest.* 2004 Feb;27(2):142-9
4. Kiterjesztett time-lapse imaging rendszer a citotoxikológiában; Turáni Melinda, Balogh Enikő, Király Gábor; XXX. OTDK Biológia Szekció; 2010; Debreceni Egyetem, Természettudományi és Technológiai Kar, Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszék
5. Apoptogenic and necrogenic effects of mercuric acetate on the chromatin structure of K562 human erythroleukemia cells. Erzsebet Farkas, Kinga Ujvarosi, Gabor Nagy, Jozsef Posta, Gaspar Banfalvi *Toxicology in Vitro* Volume 24, Issue 1, February 2010, Pages 267–275
6. Time-Lapse Analysis of Cell Death in Mammalian and Fungal Cells Gabor Nagy, Gabor Pinter, Gabor Kohut, Attila L. Adam, Gyorgy Trencsenyi, Laszlo Hornok, and Gaspar Banfalvi *DNA and Cell Biology* Volume: 29 Issue 5: May 13, 2010

7. Optimization of Cell Cycle Measurement by Time-Lapse Microscopy Gabor Nagy, Gabor Kiraly, Gaspar Banfalvi *Methods in Cell Biology Volume 112, 2012, Pages 143–161*

8. Chromatin Toxicity of Ni(II) Ions in K562 Erythroleukemia Cells Gábor Nagy, Diána Laza, Kinga Ujvárosi, Gáspár Bánfalvi. *Cellular Effects of Heavy Metals 2011, pp 163-178*