

**Modern fénymikroszkópiában használt különböző
hullámhosszú megvilágító fények fototoxikus
hatásvizsgálata fibroblaszt sejtenyészeteken**

A 21. századi biológiai kutatásban a mikroszkópiai vizsgálatok elengedhetetlenek a biológiai, biotechnológiai kísérletekhez. Az eddigi kutatások azonban bebizonyították, hogy a mikroszkópokban használatos különböző hullámhosszú fények különböző módon befolyásolhatják a sejtek viselkedését a sejtenyészetekben.

A humán fibroblaszt sejt kultúrákon végzett lézeres hullámhossz besugárzás okozta hatások kevésbé ismertek. A humán fibroblaszt sejt típusok azért kiválóak a fototoxikus hatás vizsgálatokhoz, mert szövettanilag teljesen egyformák, de különböző mértékben vannak kitéve a fényhatásoknak. Az általában összetett hatásmechanizmus tisztázása, a szerkezet és a fényérzékenyítő hatás közötti összefüggések felderítése hozzájárulhat ahhoz, hogy a jövőben kisebb számban jelenjenek meg a gyógyszerpiacon fényérzékenyítő mellékhatással rendelkező gyógyszerkészítmények.

Ezen hatásmechanizmusok vizsgálatára szükség van további sejt- és molekuláris szintű kutatásokra, alacsony energiájú és teljesítményű lézerek hatás vizsgálatára.

Célkitűzés

Munkánkban célul tűztük ki az irodalmi adatok alapján a humán fibroblaszt sejt vonalon végzett fototoxikológiai kutatások összegzését.

A kísérleti és elméleti kutatómunka konklúziójaként fel akarjuk mérni, hogy a különböző hullámhossztartományok milyen szinten befolyásolják a sejtek fiziológiáját és morfológiáját, valamint azt, hogy milyen hatással vannak a sejtosztódásra.

Végeredményeként szeretnénk létrehozni egy olyan rendszert, amelyben, a mikroszkópiában használatos fények különböző hullámhosszainak fototoxikus hatásai egy időben vizsgálhatóak és hatásaik összehasonlíthatóak.

A Fibroblaszt sejtek

A fibroblaszt egy olyan sejtípus, mely komoly szerepet játszik az extracelluláris mátrix és a kollagén szintézisében. A hámréteg alatt helyezkedik el az olyan extracelluláris mátrix fehérjékkel együtt, mint például a kollagén, elasztikus rostok, fibronektin, glükózaminoglikánok és proteoglikánok, melyeket a fibroblasztok szintetizálnak és szekretálnak az extracelluláris térbe. A legelterjedtebb kötőszöveti sejtípus: az állati szövetek strukturális szerkezetét építi fel és jelentős mértékben járul hozzá a sebgyógyulási folyamatokhoz. A fibroblasztok és a fibrociták ugyanazon sejtípus különböző megnyilvánulásai, előbbiek aktivált állapotúak, míg az utóbbiak már kevésbé aktiváltak. Szerepük a létfenntartás és a szöveti metabolizmus. A 'blaszt' utótag a sejtbiológiában használatos, jelzi, hogy egy őssejt, vagy egy sejt aktivált állapotban van-e a metabolizmus során.

A fibroblasztok morfológiailag heterogén sejtek, különféle megjelenéssel, mely az elhelyezkedésüktől és tevékenységüktől függ. Általában hosszúak, laposak, esetenként lehetnek csillag alakúak, és a kollagén rostok közelében találhatóak.

A fibroblaszt sejt fő funkciója, hogy az extracelluláris mátrix kiválasztó prekursorai által fenntartsa a kötőszövetek strukturális integritását (osztatlanságát). Az extracelluláris mátrix összes alkotóeleme közül szekretálják a prekursorokat, elsősorban a különböző rostos anyagokat. Az extracelluláris mátrix összetevői meghatározzák a kötőszövetek fizikai tulajdonságait.

A fibroblasztok elágazó citoplazmával rendelkeznek, körülvéve egy elliptikus, foltos sejttaggal, melynek kettő, vagy több sejttagvacskája van. Az aktív fibroblasztok felismerhetőek durva endoplazmatikus retikulumaikról. Az inaktív fibroblasztok (fibrociták), kisebbek és orsó alakúak és endoplazmatikus retikulumaik is kisebbek, lapítottak. A tenyészetekben a sejtek szétszóródva helyezkednek el, ugyanakkor gyakori a párhuzamos csoportokba rendeződés is.

Mint más kötőszöveti sejtek, a fibroblasztok is primitív mezenchymából származnak. Bizonyos esetekben a hámsejtekből fibroblasztok alakulhatnak ki, a folyamatot epitheliális-mezenchymális átmenetnek (EMT) nevezik. Viszont a fibroblasztok, bizonyos esetekben mezenchymális-epitheliális átalakulásra is képesek (MET) és így hámszövetté alakulhatnak.

Ellentétben a hámsejtekkel, a fibroblasztok nem képeznek sima felületű monolayerert és nincsenek korlátozva azért, hogy a *lamina basalis*-hoz kapcsolódjanak.

A fibroblasztok képesek lassú mozgásra a tápfolyadékban, míg a hámsejtek nem.

A fibroblasztok által előállított anyagok az extracelluláris mátrixban és a timusz sztrómális limfopoetinben (TSLP) találhatóak. A növekvő fibroblasztok osztódnak és szintetizálják az előbb felsorolt anyagokat. A szöveti károsodás serkenti a fibrocitákat és mitózist vált ki a fibroblasztokban.

Fototoxicitási tanulmányok

Az emberi bőr egy elsődleges kontaktja a napfénynek. A napsugárzás, elérve a földfelszínt és így az emberi bőrt, nem csak UV-R sugarakból áll (UV-A: 320-340 nm, UV-B: 280-320 nm), hanem magában foglalja az infravörös sugarakat (760 nm-1000 nm) is. Az UV fény emberi bőrre kifejtett hatásának biológiai és orvosi következtetéseit már elég széles körben tanulmányozták. Ez némiképp meglepő, ha valaki elképzei, hogy az infravörös és főképp a közeli infravörös tartomány (IR-A: 760 nm-1440 nm) hozzávetőlegesen a napenergia egyharmadával terheli meg az emberi bőrt.

Ennek megfelelően az újabb tanulmányok száma mutatja, hogy az IR-A sugárzás biológiai hatást gyakorol az emberi bőrben található fibroblasztokra, valamint azt, hogy e hatások a bőr túl korai öregedését eredményezik. Kimondottan a természetes napfényből származó IR-A sugárzást, vagy a mesterséges sugárzást biztosító eszközöket találták úgy, hogy a bőr ráncosodását váltják ki a mátrix metalloproteináz-1 enzim (MMP-1) kifejeződésének szabályozása által.

Ezen felül, összehasonlítva az UV tartományokat, az UV-A hatol be legmélyebben az emberi bőrbe, és megközelítőleg feleannyi energia éri el az irhát, és így az élő sejteket, azaz a dermális fibroblasztokat. Ezen sejttípus nagyon jelentős, mivel a bőr szerkezetének és rugalmasságának kialakulásáért felelős.

A 370 nm-es UV fény hatásait fibroblaszt sejtek növekedésén keresztül tanulmányozták. Ezen a hullámhosszon az UV fény gátolja a sejtek növekedését. A kísérletben egy vékony titán-dioxid filmréteget alkalmaztak, melynek eredményeként az UV

fény nagy része visszaverődött a táptalajról és lehetővé tette a sejtek növekedését.

A kék fény okozta károsodást a nemzetközi fénytechnikai szakirodalom blue-light hazard-nak, az orvosi szakirodalom photoretinitis-nek nevezi. A jelenséggel csak az 1970-es években kezdtek behatóan foglalkozni, és megállapították, hogy a túlzottan erős közeli ultraibolya és rövid hullámhosszúságú látható sugárzás károsíthatja a retinát. A látható fény általában nem okoz károsodást, mert a túlzottan erős fény hatására önkéntelenül is becsukjuk a szemünket vagy hunyorítással védekezünk. Jelenlegi ismeretek szerint a fotokémiai károsodás létrejöttéhez minimális sugárdózis is elegendő (446 nm, 22 J/cm²), bár úgy tűnik, hogy legalább két hatással kell számolni: az egyik a kisebb besugárzásnál is fellép, ha azokat a szem éveken át kapja (a szemorvosok kék fényű vizsgáló lámpája), a másik nagyobb, rövidebb idejű expozíciók hatására lép fel (néhány perc vagy óra időtartamú besugárzás).

A sterilizálásnak hatékony módja lehet a rövid hullámhosszú optikai besugárzás. Hagyományosan alkalmazzák a kórházak és a rendelőintézetek légtérének csíramentesítésére az elsősorban a 254 nm-es hullámhosszon sugárzó, kis nyomású higanylámpát.

A fototoxicitási kísérletekben új technológiák megalkotására is sor került az elmúlt években. A nagy intenzitású szűk spektrumú, ez esetben a 405 nm-es fényt (HINS) alkalmazva kifejlesztettek egy új technológiát, annak érdekében, hogy orvosolja az egészségügyi ellátással összefüggésben lévő fertőzések szignifikáns problémáit. A sebfertőtlenítésben rejlő lehetőségeket emlős sejteken és baktériumokon mérték fel. A fibroblasztosodott kollagén rács (FPCL) az *in vitro* sebgyógyulás modelljeként használatos. Hatásait a sejtproliferáción és morfológiai változásokon keresztül értékelték.

A baktericid hatásokat *Staphylococcus epidermidis* baktériumtenyészetben állapították meg. A HINS fényt alacsony dózisban alkalmazva nincs szignifikánsan gátló hatás a sejtproliferációra. A dózist 18 J/cm²-re növelve szintén nem volt gátló hatás a sejszámra nézve, de ez a dózis a baktérium majdnem teljes inaktivációját okozta. Ezen eredmények azt mutatják, hogy a HINS fénynek fertőtlenítő hatása van, anélkül, hogy hátrányosan befolyásolná a sebgyógyulást.

Egy másik tanulmányban az ALA-PDT (5-aminolevulinsav által közvetített fotodinamikus terápia) tumorellenes hatását vizsgálták, különböző LED fényforrásokat felhasználva, emberi vastagbél tumorsejteken. A sejtek tenyésztéséhez 96 well plate-et használtak. Az 5-ALA kezelést követően a sejteket LED-ekkel világították meg. A megvilágításhoz három különböző LED-et használtak: kék (456 nm), fehér, vörös (635 nm).

24 órával a megvilágítás után, MTT teszt alkalmazásával mérték az ALA-PDT citotoxikus hatásait. Ahhoz, hogy az ALA-PDT tumorellenes hatását értékelni tudják, csupasz egereket oltottak be HT-29 sejtekkel. Az eredmények azt mutatták, hogy – összehasonlítva a kontroll sejtekkel - a HT-29 sejtek életképessége szignifikánsan alacsonyabb az ALA-PDT-vel kezelt és vörös LED-del megvilágított sejtek esetén. A növekvő fény dózisok jelentősen lecsökkentették a sejtviabilitást. A kék és fehér LED fény nagyobb antitumor hatást mutat, mint a vörös LED fény.

Az infravörös A sugárzás (760-1440 nm) is egy fontos összetevője a napsugárzásnak. Hasonlóképp az UV-A és UV-B sugárzás hatásaihoz, az IR-A is fény általi öregedést okoz az emberi bőrből származó fibroblasztok mátrix metalloproteináz-1 szintjének növelésével.

Az UV sugárzás azonban nem csak a bőr látható részében okozhat elváltozást.

Az UV-B sugárzás a programozott sejthalált kiváltó lehetséges ágens. Mégis az UV-indukált apoptózis tévesen meghatározott. Egyes sejt típusokat - mint például a Humán leukémia HL-60, myelomonocytic U937, T-lymphoblastoid Molt-4 és Molt-3 sejtek - rövid idejű UV sugárzást követően megjelentek az apoptotizált sejtek, holott a hosszabb idejű UV sugárzás a sejthalál egy sokkal gyorsabb formáját váltotta ki, mely nekrozisra utal.

A DNS replikációról szóló korábbi tanulmányok, melyekben UV-val megvilágított HeLa sejteket vizsgáltak, kimutatták, hogy a gátlás nagysága az idő elteltével változik. A kevesebb, mint 10 J/m^2 -es dózisonál az arány eleinte csökkent, majd később javulást mutatott. Magasabb dózisonál, az utolsó 6 órában állandó és kismértékű DNS szintézist figyeltek meg. Ezen kezelések után a K562 sejtek javító mechanizmusa képes volt eltávolítani legalább részlegesen a DNS-ben okozott károkat, míg nagy dózisban (25 J/m^2) a K562 sejtek nem voltak képesek visszafordítani az apoptózist.

A Pre-erythroid K562 és B-lymphoblastoid Daudi sejt vonalak igazoltan rezisztensek a halált indukáló UV sugárzásra.

A Lymphoid sejtek UV sugárzást követően mérsékelten sérültek, a DNS dupla szálak töredezettségét mutatták. A hybridoma sejtekben az oligonukleotid degradáció kevesebb, mint 2 órával az UV sugárzás után jelent meg.

Egy korábbi kísérletben az exponenciális növekedésű K562 sejteket permeabilizálták és a dózistól függő DNS szintézis csökkenésének arányát vizsgálták UV-B (290 nm) sugárzás hatására. A sejtek túléltek a 2 és 5 J/m²-es UV dózisokat, részleges visszanyerést figyeltek meg 15 J/m²-nél, míg magas (25 J/m²) UV dózisonál a replikatív DNS szintézis elfojtott maradt. Az UV sugárzást követően a sejciklus-vizsgálat áramló citometriával nem mutatott apoptotikus sejteket. A kísérletek igazolják, hogy a DNS szintézis a permeabilis sejteken: egy ATP függő folyamat, a reverz permeabilizáció megőrzi a sejtek életképességét, az UV sugárzás gátolja a replikatív DNS szintézist, az UV sugárzás és a permeabilizáció visszafordítása nem azonnal okozza a sejtek apoptotikus összezsugorodását.

Anyagok és módszerek

Fontosnak tartottuk, hogy a kísérletben mind a csontvelői, mind a limbális fibroblaszt sejttípusokat megvizsgáljuk, ugyanis ezek a sejtípusok a test különböző pontjain helyezkednek el, ezáltal különböző mértékben vannak kitéve a fény káros hatásainak.

A sejttenyésztéshez szükséges anyagok

Médiumként RPMI 1640 tápfolyadékot használunk, kiegészítve 10% FBS-sel és 1% PSN-nel. Sejtek passzálásához PBS-t és 10-szeres hígítású Tripszin-EDTA oldatot használunk.

Sejtek viabilitásának méréséhez szükséges anyagok

A viabilitásteszt elvégzéséhez 5 mg/ml koncentrációjú MTT oldatot használunk. Az MTT port steril 10-szeres hígítású PBS-ben oldjuk fel. Az MTT fényre és hőre érzékeny, így elkészítés után fagyasztva, sötét színű edényben tárolandó.

Sejtek előkészítése

Minden művelet elvégzéséhez steril körülményeket kell biztosítani, ennek megfelelően a munkavégzés lamináris áramlású steril fülke alatt történik.

A szükséges eszközök:

- steril pipetták
- centrifugacsövek
- tenyésztőedények
- vákuumszivattyú a plate well-jeiben lévő felesleges anyagok biztonságos és precíz eltávolításához
- centrifuga
- inkubátor
- steril fülke

A szükséges anyagok:

- RPMI 1640 tápfolyadék
- FBS
- antibiotikum
- PBS
- tripszin-EDTA
- tripánkék oldat
- MTT oldat
- DMSO

Sejtfelvétel

A sejteket -70°C -on fagyasztva tároljuk. A kiválasztott sejteket csapvízbe, illetve 37°C -os vízfürdőbe téve olvasztjuk ki. Ügyeljünk arra, hogy a fagyasztócső száját ne érje víz. Addig folytatjuk a melegítést, amíg az összes jég fel nem olvad.

A kiolvasztott sejteket 15 ml-es centrifugacsőbe pipetázzuk, majd 1 ml tápfolyadékot adunk hozzá. Ezt követően a sejteket centrifugáljuk 5 percen keresztül, 1000 rpm fordulaton.

Centrifugálás után leöntjük a felülúszót és 1 ml tápfolyadékkal felfuszpendáljuk a sejteket. A letapadó sejtek, mint például a fibroblaszt sejtek, speciális felületet igényelnek a letapadáshoz.

Emiatt gamma-sugárzással fertőtlenített tenyésztőedényeket használunk a sejtenyésztéshez.

A T-25-ös tenyésztő edénybe, melyek tenyésztő felülete 25 cm^2 , 4 ml tápfolyadékot teszünk, majd hozzáadjuk pipettával a felfuszpendált sejteket, így a sejtszuszpenzió össztérfogata 5 ml lesz. Inverz mikroszkóp alatt vizsgáljuk az újonnan felvett sejteket. A tenyésztőedényt inkubátorba tesszük, ahol biztosítjuk a fiziológias körülményeket: 37°C -ot és 5%-os CO_2

tartalmat.

Sejtek passzálása (átoltása)

Az adherens sejtek monolayeret alkotnak, azaz egy rétegben kitapadnak a tenyésztőedény aljára. A tenyésztőfelület százalékos borítottsága a konfluenciaszint. Amikor ez a szint eléri a maximumot, a sejtek életben maradása érdekében szükség van átoltásra.

A sejttenyészetet inverz mikroszkóppal megvizsgáljuk, majd a steril fülke alatt megkezdjük az átoltást. A tápfolyadékot leszívjuk, PBS-sel átmoszuk a sejteket, hogy a sejtek közötti törmeléket eltávolítsuk. A sejtek közötti kihorgonyzó kapcsolatok megszüntetésére tripszin nevű emésztő enzimet használunk, amiből 1 ml-t teszünk a sejtekre. A tripszin működéséhez biztosítani kell a 37°C-os hőmérsékletet. Ügyeljünk arra, hogy a tripszin 10 percél tovább ne maradjon a sejteken, mert károsítja őket. A kezelés után a sejteket centrifugacsőbe pipetázzuk, majd 1 ml tápfolyadékkal leállítjuk a tripszin működését. 5 percig centrifugálunk, 1000 rpm fordulaton, majd a felülúszót leöntjük és 1 ml tápfolyadékkal felszuszpendáljuk a sejteket. A sejtszámolás után megállapítható, hány felé kell osztanunk a sejttenyészetet. Ennek megfelelően egészítjük ki 5 ml-re a végtérfogatot a tenyésztőedényben.

Sejtszámolás

Ahhoz, hogy megtudjuk a tenyésztett sejtek számát, sejtszámolást kell végeznünk. A felszuszpendált sejtekből 10 µl-t sejtszámoló edénybe teszünk, majd hozzáadunk 10 µl tripánkéket. A tripánkék segítségével vizsgálható a sejtek életképessége. Neve onnan származik, hogy elpusztítja a tripanosomiasis kórokozóját miközben kék színűre is festi azt.

Csak az elpusztult sejtek membránján képes áthatolni, és ott a citoplazma fehérjékhez kötődik. Az élő sejtek membránja nem ereszti át a festéket. Az így kapott szuszpenzióból 10 µl-t Bürker-kamra segítségével megvizsgálunk fénymikroszkóp alatt. 25 egységet leszámolva kiszámítjuk az 1 ml tápfolyadékban lévő sejtek számát a következő módon: a kapott szám*2*10⁴ db sejt.

Sejtek fototoxicitás-vizsgálatához szükséges eszközök

Fényforrások:

A sejteket 5 mm-es LED izzókkal világítjuk meg:

240 nm –UV

360 nm – UV

390 nm – ibolya

450 nm – kék

505 nm – zöld

600 nm – sárga

610 nm – narancs

623 nm – vörös

645 nm – vörös

760 nm – vörös

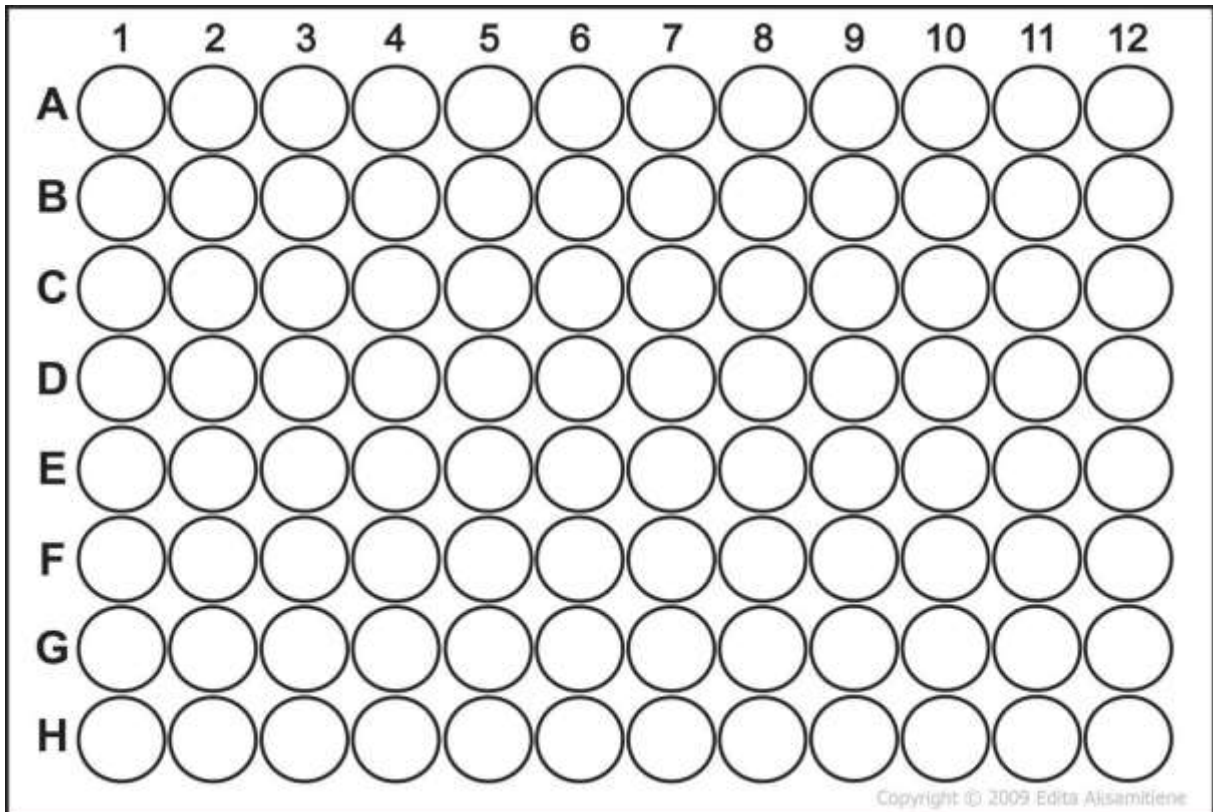
870 nm – infravörös

940 nm – infravörös

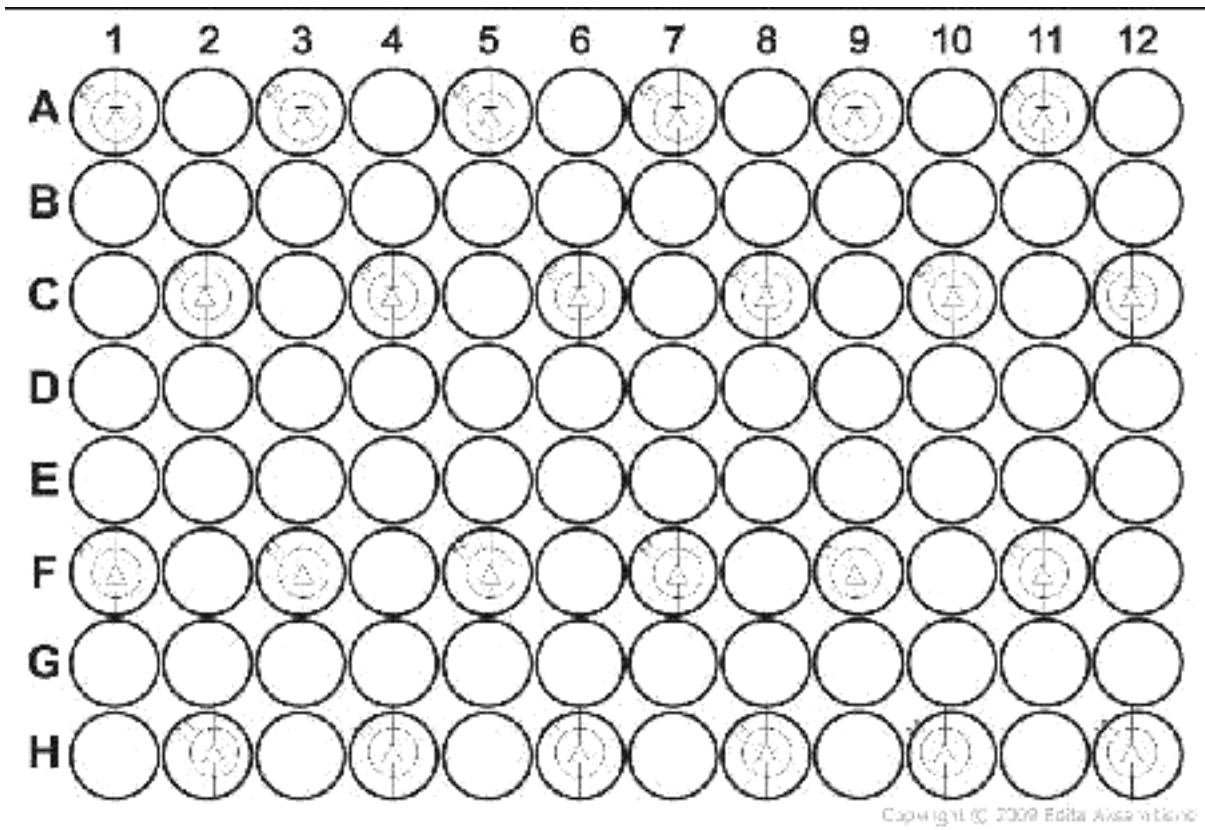
kettő darab 96 lyukú plate

Kísérlet menete:

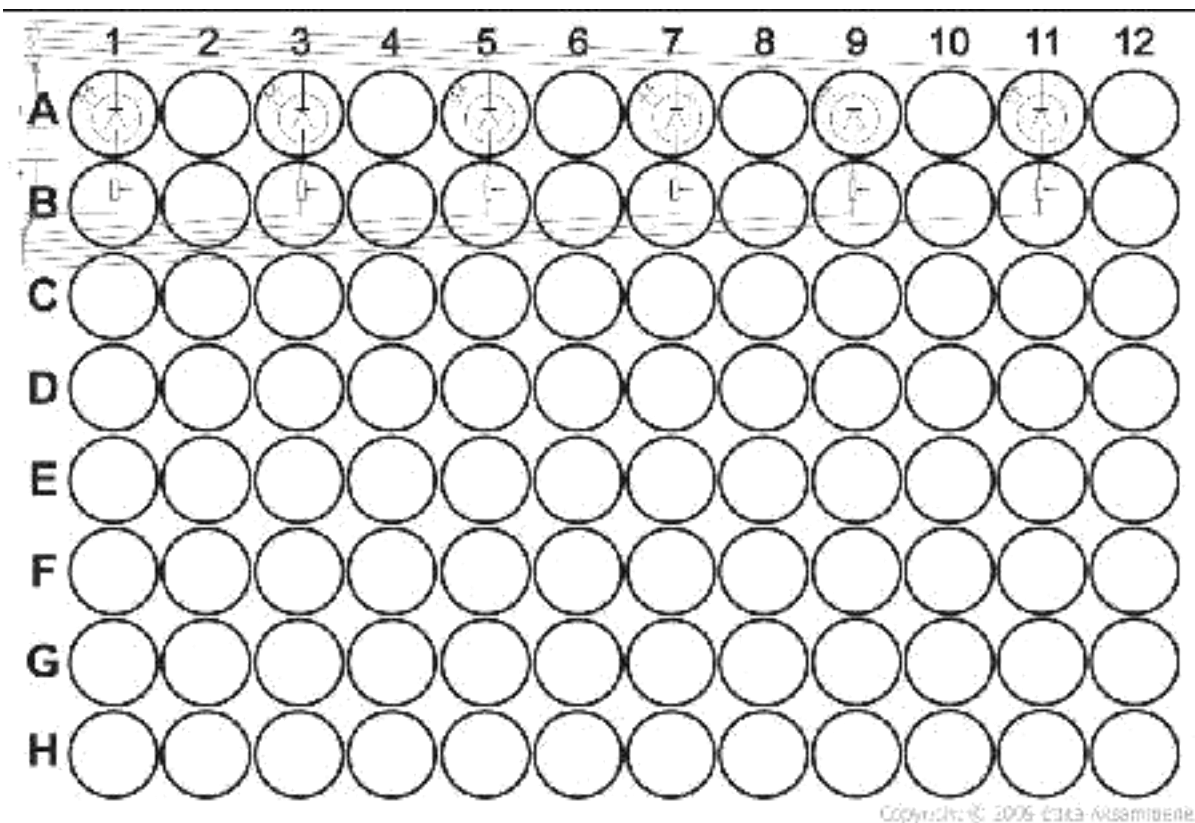
A fototoxicitási vizsgálathoz szükséges eszköz elkészítésének lépései:



Első lépés, 96 lyukú plate kiválasztása, lyukak kifúrása. Oly módon, hogy egy standard 5 mm-es LED beleférjen.

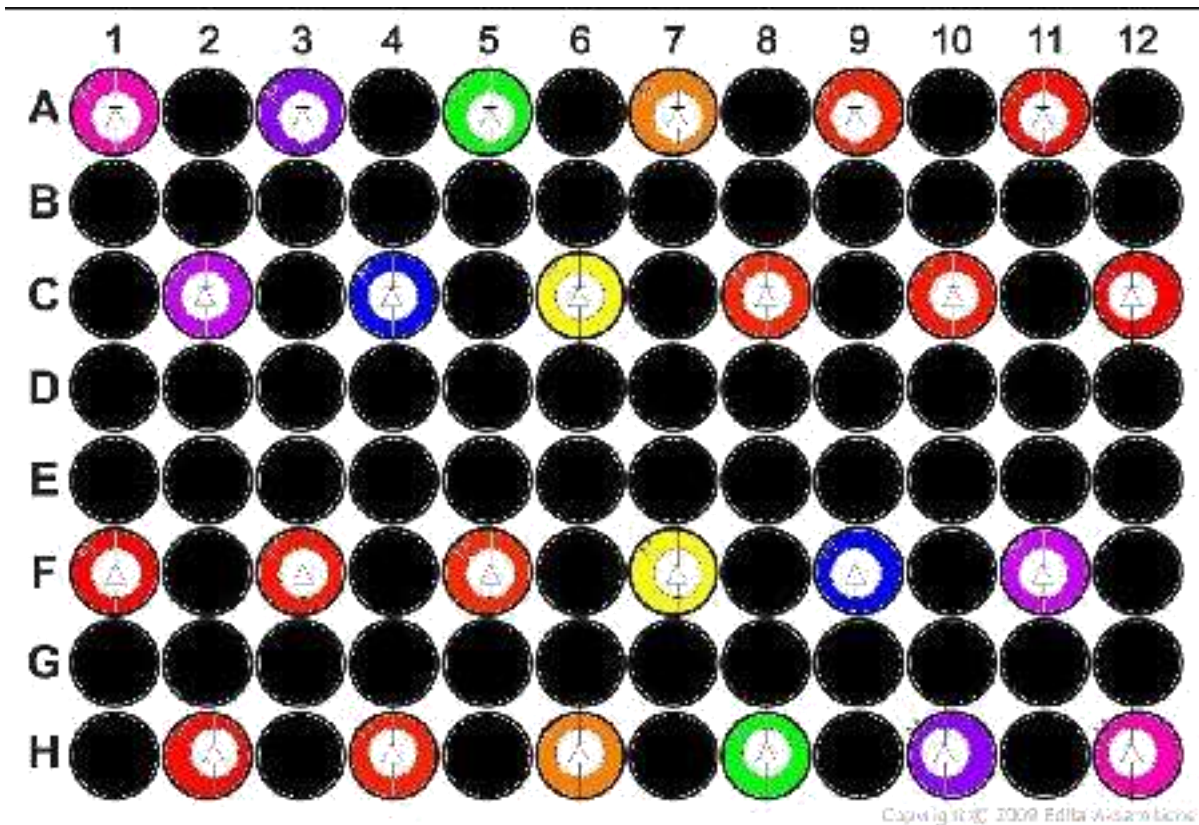


Második lépés, LED-ek elhelyezése és rögzítése a plate-ben.

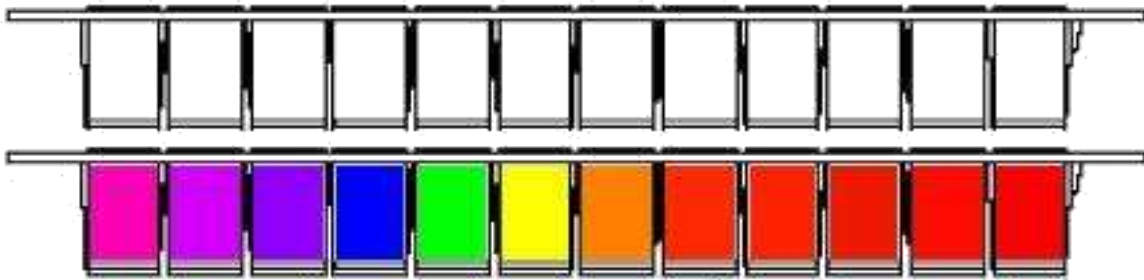


Copyright © 2006 EDA3-ÁRSAMITŐK

Harmadik lépésben a LED-ek bekötése az áramforrásra. Párhuzamos kapcsolást alkalmazunk annak érdekében, hogy a fényforrások egymástól függetlenül is tudjanak működni. A szabályzáshoz egy potmétert is bekötünk.



Negyedik lépésként – az esetleges fény-áthallás elkerülése érdekében – a plate üres welljeit az ábrán látható módon feketére színezzük.



Végző lépésként a sejtekkel és a tenyésztő médiummal feltöltött plate-et ráhelyezzük a LED-eket tartalmazó plate-re.

Nagyon fontos, hogy biztosítsuk a sejtek számára a fiziológias körülményeket. A kontamináció elkerülése érdekében elengedhetetlen a steril munkavégzés szabályainak betartása.

A vizsgálatot csontvelői és limbális fibroblaszt sejt típusokon is végrehajtjuk.

A humán fibroblaszt sejteket először T-25-ös tenyésztő edényben tenyésztjük. A tenyésztéshez RPMI 1640 médiumot használunk, kiegészítve 10% FBS-sel és 1% antibiotikummal.

24 óra elteltével sejt viabilitást vizsgálunk. Ehhez MTT-t használunk. Az MTT-teszt során alkalmazott tetrazolium vegyületet csak az élő sejtekben működő mitokondriális dehidrogenáz enzimek redukálják és végeredményben oldhatatlan, lila formazán származék képződik. A kristályok oldása után a felülúszó folyadék fázisokban mérhető színintenzitás mértéke egyenesen arányos a mintában található élő sejtek számával, illetve azok mitokondriális aktivitásával.

A sejtek életképességére a DMSO-ban feloldott formazán kristályok mennyiségéből következtethetünk.

A fototoxicitási vizsgálathoz szükséges metodika:

Sejtenyésztes plate-ben:

A T-25-ös flaskában tenyésztett sejteket 80%-os konfluenciaszint elérése után plate-ben tenyésztjük tovább. A letapadó sejteket PBS-sel átmoszuk, tripszinnel kezeljük, centrifugáljuk (1000 RPM, 5 perc), a felülúszót leöntjük. A sejtekhez 1 ml tápfolyadékot adunk, leállítva ezzel a tripszin működését. Sejtszámolás után a sejtszuspenziót 20 ml-re egészítjük ki médiummal és szétosztjuk a plate-ekbe. A well-térfogat 200 µl. A kívánt konfluenciaszint eléréséig inkubátorba tesszük a plate-et. A körülbelül 80%-os konfluenciaszint elérése után tápfolyadékot cserélünk a sejteken és megkezdjük a vizsgálatot.

Citotoxicitás mérés

A 24 órás megvilágítást követően inverz mikroszkóp alatt megvizsgáljuk a sejteket. Ezt követően a médiumot eltávolítjuk és a sejtekhez wellenként 100 µl MTT oldatot adunk. Másfél óra inkubálás után az MTT oldatot leszívjuk. Sötét színű kristályok kiválását tapasztaljuk. A kristályok feloldásához DMSO-t használtunk (100 µl/well). A lilás színváltozás jelzi a kristályok feloldódását. 15 perc inkubálás után Plate Reader segítségével mérjük a sejtek életképességét. A fotometrálas 540 nm-en történik. A kapott értékeket táblázatban rögzítjük, ebből következtetünk a különböző hullámhosszú fényforrások fototoxikus hatásaira.

Eredmények:

Munkánkban célul tűztük ki a fibroblaszt sejttípus fototoxicitás-vizsgálatát, hogy megvizsgáljuk, hogy a különböző szervekből származó, a fénnel különböző módon érintkező fibroblasztok hogyan reagálnak az eltérő hullámhosszú fényekre. Erre azért volt szükség, hogy megtudjam, hogy a laboratóriumunkban működő LTS rendszer (Long-Term

Scan) megvilágítása milyen hatással van a sejttényészetekre illetve melyek azok a hullámhosszok, amelyekkel a leoptimálisabb a sejttényészet vizsgálata. Ehhez sikerült megépítenünk egy olyan rendszert, amivel az adott sejttípust azonos körülmények között, egyidőben 12 különböző hullámhosszú fénnel tudjuk vizsgálni, és mind a fénynek kitettség időtartama, mind a fény erőssége szabályozható. Általunk módosított metodikát alkalmazva kitenyésztettük azokat a fibroblaszt sejteket, amiknek a fototoxikus vizsgálata ezzel a rendszerrel jelenleg is folyik.