

A corneális sebgyógyulás klinikai modellje és az antibiotikumok hatása izolált limbális sejtekre

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	0
Bevezetés.....	3
Célkitűzések.....	4
Irodalmi áttekintés.....	5
Anyagok és módszerek.....	8
Klinikai eredetű szaruhártya (cornea) korongból származó primer sejtek kitenyésztése és felszaporítása.....	8
Limbalis eredetű primer sejttenyészetek izolálása, stabil sejtpopulációk létrehozása:	8
A limbust felépítő sejtek	9
A limbalis keratinocita sejtek karcmodelljének vizsgálata Long Term Scan rendszer segítségével.	10
A sejtek kezelése antibiotikumokkal.....	10
Sejtmagizolálás, a kromatin-szerkezet kialakulásának vizsgálata.....	11
Eredmények:	13
Long Term Scan vizsgálatok:.....	13
A kromatin szerkezet kialakulása:.....	17
Chloramphenicol	18
Rifampicin.....	20
Diskusszió	22
Irodalomjegyzék.....	23

Rövidítések

FBS: Fetal Bovine Serum (magzati borjú szérum)

LTS: Long Term Scan (hosszú távú megfigyelés)

PSN: Penicillin Streptomycin-Neomicin (antibiotikum)

RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute-ban (RPMI) kifejlesztett médium HaCat sejttenyésztéshez

DMEM-HAM'S F12: Duplecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F12-Ham

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

PBS: Phosphate Buffered Saline (fiziológias sóoldat)

LDH: laktát-dehidrogenáz

Bevezetés

A bőrsérülések esetében számos hámosító hatású készítmény közül választhatunk, melyek elősegítik a sebgyógyulást. A leggyakrabban használt készítmények nemcsak a felszíni sérülések esetén használhatóak, hanem kisebb égési sérülések, felmaródások és műtét utáni kisebb hegek ellen is. Ilyen készítmények például a Neogranormon és a Bepanthen.

Ezzel szemben a szem sérüléseire mind véletlenszerűen bekövetkezett sérülésre mind műtét utáni hegekre általában antibiotikum tartalmú készítményt írnak fel. Ezen készítmények célja a fertőzések és baktériumok elleni védelem, mivel a szemünk az egyik legfontosabb érzékszervünk. A szemészetben a leggyakrabban használt két antibiotikumot használtuk a kísérleteinkhez, ami a chloramphenicol és a rifampicin volt.

Az antibiotikumok olyan vegyületek, melyek gátolják a mikroorganizmusok növekedését (bakteriosztatikus), illetve pusztítják (baktericid) azokat. A kísérletben a chloramphenicol és a rifampicin hatásait vizsgáltuk sejtenyészeteken, különös tekintettel a sebgyógyulásra tett hatásaira. Vizsgálataink során mind karcmodellt, mind scanning vizsgálatokat használtunk az antibiotikum hatásainak több oldalról való megfigyelése érdekében. A hosszú távú videó mikroszkópiás kísérlet a kezelt tenyészetben az osztódó sejtek számbeli megfigyelése illetve maga az osztódás hiánya miatt volt célra vezető a kezeletlen tenyészethez viszonyítva. A karcmodellt azért alkalmaztuk, hogy *in vitro* körülmények között szimuláljuk a sebgyógyulást illetve az erre általában adott antibiotikumok hatását a folyamatra.

Célkitűzések

Munkánk célja a szakirodalmi adatok alapján áttekinteni a szemészeti sérülések kezelésére leggyakrabban használt antibiotikumok rövid történetét, egyéb hatásait az orvosbiológiai tudományokban. Mindenekelőtt szeretnénk volna megtudni, hogy a cornea felszínén kialakult sérülés gyógyulását, annak menetét, gyorsaságát mennyire befolyásolják ezek az antibiotikumok.

A sérülések imitálásához egy új sebgyógyulási modellt szeretnénk volna kifejleszteni és alkalmazni a limbális keratinocita sejteken. Ezen eredményeket prezentálni, majd az eredmények alapján megtudni, hogy a chloramphenicol és a rifampicin a baktericid hatásuk mellett elősegítik-e a sebgyógyulást.

Irodalmi áttekintés

Számos kísérlet folyt a rifampicin és a chloramphenicol hatásának vizsgálatára. A chloramphenicol megállítja a mikroorganizmusok növekedését, oly módon, hogy gátolja a fehérje szintézisüket, megelőzi a fehérje lánc elongációját, a peptidil-transzferáz aktivitás blokkolásával. A chloramphenicol a sejtsztódást gátolta attól függően, hogy mikor adták hozzá a baktériumhoz. A növekvő kultúrában a chloramphenicol (por) már 100µg/ml- végső koncentrációban gátolja a fehérje szintézist.(1)

Vizsgálták a chloramphenicol hatását a K562 sejtek mitokondriumának funkcióvesztésére. A chloramphenicol jelentősen csökkentette a sejt növekedést, a citokrom c oxidáz aktivitást, ATP szintézist, és a ferritin szintézist. Három koncentrációt vizsgáltak: 10, 25, és 40 µg/ml. Mindhárom koncentrációjú chloramphenicol akadályozta a sejtsztódást (2). A sejtciklus analízis kimutatta, hogy a növekedés akadályozása mellett fokozatosan nőtt a G1 fázisban lévő sejtek százaléka, átlagban 37%-kal magasabb, mint a kezeletlen sejteknél. Fokozatos csökkenést is tapasztaltak az S-fázisban lévő sejtek százalékában a kezeletlen sejtekhez képest a nyolcadik kezelési napra. Apoptotikus sejtek is jelen voltak a 8 napos kezelésnél. (2)

A chloramphenicol növekedés megállást és apoptózist okoz humán keratinocitákban *in vitro* módon. A chloramphenicol szignifikánsan gátolja a humán keratinociták proliferációját és előidézi apoptózisukat. A bőrminták 10 egészséges önkéntestől származnak. A kontroll sejt kultúrák megegyező mennyiségű etanolt tartalmaztak, mint a bizonyos kísérletben a legmagasabb chloramphenicol koncentráció. A chloramphenicol 25 és 250 µg/ml-es koncentrációban gátolta a keratinociták proliferációját. Azonban a megfigyelt antiproliferatív hatása a chloramphenicolnak nem járt együtt LDH felszabadulás fokozódásával. Sejtmembrán integritásra a humán keratinocita kultúrákban nem volt hatással a chloramphenicol kezelés, ez azt jelzi, hogy a drog gátló hatása nem jár a sejt nekrotikus elhalásával (3). A kísérletek arról tanúskodtak, hogy a chloramphenicol baktericid hatása mellett jelentős hatása van a humán sejtekre is. Ezek a hatások sokszínűek voltak, például a chloramphenicolal kezelt humán keratinocita sejtek nagyobb apoptotikus százalékot mutattak, és olyan sejtek voltak nagyobb százalékban melyek kaszpáz aktivitást mutattak (4). A tumorok már kis koncentrációban is

érzékenyek. A normál és a tumoros sejtvonalaknál a hosszantartó kitettség az idővel korreláló pusztulást mutat. Azonban a tumorsejtek esetében a limitált expozíció mellett is megállapítható volt a sejtek érzékenysége. Azt figyelték meg, hogy a toxikus hatást befolyásolja a sejtciklus, az érzékenységet pedig a mitotikus szakasz (4). Ez az analízis jó példa arra, hogy az antibiotikum fehérje szintézis gátló hatása nemcsak a kórokozóra érvényes, hanem a normál sejtekre, hisz blokkolta a humán sejtek DNS replikációját, így antiproliferatív hatással rendelkezik. A chloramphenicol leukocitákra való hatását is vizsgálták. A limfociták differenciálódására nem volt hatással a kezelés. A mitotikus indexre viszont hatással volt, a kezelt sejtek kisebb mitotikus index-el rendelkeztek. Ez lineáris kapcsolatot enged feltételezni a drog jelenléte és a mitotikus index csökkenése között. Megfigyelték, hogy a kezelés idejével is arányos a mitotikus gátlás, 24 és 48 óra után kisebb gátlást tapasztaltak, mint 72 órás kezelés után (5).

A chloramphenicol antiproliferatív hatását csontvelő sejtek esetében is vizsgálták. Az eredmények azt mutatják, hogy a kolóniák mind számban mind méretben is kisebbek lettek, 60 sejtől álló kolóniánál nem tapasztaltak nagyobbakat. A kísérlet arra enged következtetni, hogy a chloramphenicol gátolja a kolóniaformáló sejtek osztódását, így a kolóniák számban és méretben is redukáltabbak lettek. Azonban ez a hatás 24 órán belül reverzibilisnek mutatkozott.(6)

A rifampicin hatásmechanizmusa az RNS- polimerizáció gátlásán alapul. Baktericid hatása mind intracelluláris mind extracelluláris kórokozókra érvényes. A rifampicin az egyik leghatásosabb antibiotikum a patogén baktériumok ellen és kulcskezelés a tuberkulózissal szemben is, mivel blokkolja a bakteriális RNS polimerázt (RNAP). A vizsgálat során meghatározták a *Thermus aquaticus* core RNS-polimeráz-rifampicin komplexének a kristálystruktúráját. A szerkezeti ismeretet és a biokémiai eredményeket felhasználva magyarázatot adtak a rifampicin hatásairól RNAP-ra, továbbá arra az indikátor funkcióra is fényt derített a vizsgálat; hogy a rifampicin közvetlenül gátolja az RNS elongáció folyamatát mikor a transzkripció 2-3 nukleotid hosszúságú.(7) A rifampicin és rokon vegyületei gátolják több baktériumfaj növekedését a DNS-függő RNS polimerázok blokkolásával, így a transzkripció inicializálásnak megakadályozásával. (8,9)

A jelenleg forgalomban lévő szemeszeti gyógyszerek ilyen mechanizmuson alapulnak. Azonban nem csak a kórokozók sejt metabolizmusát tudják blokkolni, hanem az egészséges,

normál sejtek proliferációját is megzavarhatják, így kárt okozva a sejtenyészetben, távolabbról nézve pedig a páciens sejtjeiben. Tehát nincs hámosító hatásuk. Baktericid hatásuk mellett nem rendelkeznek olyan hatásokkal, melyek a szövetek regenerálódását, a sejtek osztódását idéznék elő. Ezáltal kárt okozva a szöveti regenerációban, az egészséges szövetekben, sejtekben. Kísérletünk célja az volt, hogy ezt különböző technikákkal és kezelésekkel bemutassuk, és megfigyeljük a hatásmechanizmusokat.

Anyagok és módszerek

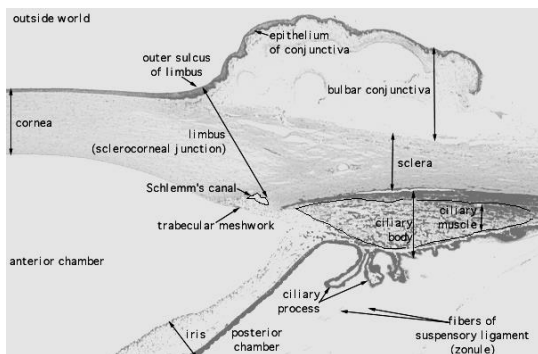
Klinikai eredetű szaruhártya (cornea) korongból származó primer sejtek kitenyésztése és felszaporítása.

Eusenol C konzerváló folyadékban kaptuk a cornea szövetet, melyben 4 C°-on több mint 14 napig lehet eltartani a kapott szövetmintát.

A cornea korongokat fertőtlenítettük 70%-os etanollal az esetleges fertőzések elkerülése végett, majd 2x2 mm-esre daraboltuk őket. A szaruhártya darabokat bekevert RPMI-1640 médiumban (+10% FBS, +1% PSN) inkubáltuk. Ezzel a protokollal corneális fibroblasztokat sikerült izolálni a primer szaruhártya korongból enzimes emésztés nélkül.

Limbális eredetű primer sejtenyészetek izolálása, stabil sejtpopulációk létrehozása:

A limbus az átlátszó cornea és az átlátszatlan szaruhártya között helyezkedik el. Kívülről a limbus alkotja a corneális és a conjuktivális hámot. Ezen hámok megkülönböztetésére szolgáló technikák alapján úgy tűnik, hogy a régiót multipotens corneális limbus sejtek alkotják. A limbus elliptikus alakkal rendelkezik hosszú vízszintes tengellyel. A limbális zóna a Descemet-membrán perifériális kiterjedése és a corneális endothelium kapcsolódásánál kezdődik. A trabecularis hálózat elülső kiterjedése ugyanúgy, mint a Schwalbe-vonal gonioszkóppal azonosítható. A limbus nem nagyon sejtes rész, inkább magas kollagén tartalmú kötőszövet. A legtöbb sejtet tartalmazó rész az conjuktiva és a corneális epithelium határán van és a trabekuláris hálózatnál. A bizonyítékok azt mutatják, hogy a multipotens sejtek a limbus conjuktivális részénél vannak, nemrégiben megfigyelték ezen sejtek aktivitását a trabekuláris hálózatnál, ami azt mutatja, hogy a multipotens sejtek a Schwalbe-vonal közelében helyezkednek el (10).



1. ábra: A limbus elhelyezkedése a szemben

A limbust felépítő sejtek

A limbális epithel őssejtek ugyanolyan sajátosságokkal rendelkeznek, mint a felnőtt szomatikus őssejtek, tehát kisméretűek és magas mag-citoplazma aránnyal rendelkeznek. Hiányoznak belőlük a differenciációs markerek kifejeződései, mint például a citokeratin 3 és 12. Ezeknek a sejteknek lassú a ciklusuk a homeosztázis során, azonban ha sérülés történik, nagyon proliferatívvá válnak. A őssejteknek meg van az a képességük, hogy aszimmetrikusan osztódnak (11).

A melanocyták bonyolult elágazó struktúrával rendelkeznek. Ezek közül a legelérhetőbbet is nehéz megközelíteni vagy vizsgálni az epithel sejtek vagy a saját melanin pigmentjük miatt, melyek betakarják a melanocytát. A tranzit-kiegészítő sejtek az őssejtekből erednek és végtelenszer tudnak osztódni, míg differenciálttá nem válnak. A fibroblaszt a kötőszövet sejtje, mely rostokat szekretál, mint például kollagént. Ez fenntartja az extracelluláris mátrixot, főként szövet regenerációnál és sebgyógyulásnál (12).

A transzplantációra szánt cornea limbus gallérját is Euseinol C-ben tartósítva kaptuk. Az előző protokollhoz hasonlóan fertőtlenítettük 70%-os etanolban majd Betadine-nal is átmostuk. Feldaraboltuk, majd enzimes emésztést végeztünk (800 U/ml collagenase). Az izolált sejteket a szövetdarabokkal együtt T-25-ös tenyésztőflaskába tettük, melyet 5ml DMEM+Ham's F12 tápfolyadékkal töltöttünk fel kiegészítve 10% FBS-sel és 1% PSN-nel. A flaskát inkubátorba helyeztük, ahol 37 °C, és 5% CO₂ tartalom van. A corneális és limbális eredetű primer tenyészetekből különböző morfológiájú sejtfeleségek differenciálódását vártuk: fibroblaszt jellegű és endo- vagy epithel jellegű sejteket sikerült izolálnunk.

A limbális keratinocita sejtek karcmodelljének vizsgálata Long Term Scan rendszer segítségével

A limbális keratinocita sejteket tenyésztőflaskába tettük majd megvártuk, míg egy sejtréteget alkotnak. Ezután a letapadt sejtpázsitot egy steril tűvel felkarcoljuk, ezzel imitálva a szaruhártya felszínén keletkező sérülést.

A sejtek kezelése antibiotikumokkal:

A megfelelő konfluencia szinten lévő sejteket megkarcoltuk az előző kísérletben leírtak szerint.

Következő lépésként az antibiotikumokat a klinikumban alkalmazott dózisok alapján vonatkoztatott koncentrációban vizsgáltuk az alábbiak szerint:

- Kontroll, amely nem tartalmazott antibiotikumot
- Rifampicin első koncentráció (0,1mg/ml)
- Rifampicin második koncentráció (0,2mg/ml)
- Chloramphenicol első koncentráció (0,5mg/ml)
- Chloramphenicol második koncentráció (1mg/ml)

A sejttenyészetek vizsgálatát a Long Term Scan rendszerrel (sejttenyésztő inkubátorban elhelyezett, célszerűen módosított HD felbontású kamerával felszerelt inverz mikroszkópok) végeztük. Egy-egy vizsgálat időtartama akár 168 órás is lehet, percenként egy képkocka időbeni felbontás mellett (15).

Az LTS-sel készült vizsgálatok során a felvételeket minőségi és mennyiségi képelemző módszerekkel dolgoztuk fel a Fiji szoftver segítségével, majd a kapott adatokat grafikus formában értékeltük ki. A képek feldolgozása során az alábbi paramétereket tervezzük vizsgálni:

A corneális és limbális eredetű primer sejtpopulációkon:

- A sejtek morfológiai változásait
- Sejtszám növekedést (a sejtszódások számának változásával)
- A monolayer konfluencia szintjének változásait a sebgyógyulás modellezéséhez a megkarcolt területen

A vizsgálat 24 órán keresztül történt.

Sejtmagizolálás, a kromatin-szerkezet kialakulásának vizsgálata

A kontrollt és a kezelt sejteket az alábbi protokoll szerint izoláltuk:

A tápfolyadékban lévő sejteket centrifugáltuk 1000 RPM-en 5 percig. A felülúszót leöntöttük, majd PBS-sel átmostuk, szuszpendáltuk. A PBS mennyisége a sejtszám függvénye. Újra lecentrifugáltuk 1000 RPM-en 5 percig, majd a felülúszót leöntöttük. A médiumot visszaadtuk a sejteknek, szintén sejtszámtól függően. Felsuszpendáltuk őket, ezután a centrifugacső kupakját meglazítottuk, hogy a sejtek levegőt kapjanak. Majd betettük inkubálni a sejteket 3 óra hosszára,- ez a regenerálódás időszaka. A regenerálódás után 14 µl/ml colchicine-t adtunk a sejtekhez (ez a metafázisos blokk).

Ezután inkubáltuk 2 órán keresztül. Megint lecentrifugáltuk 1000 RPM-en 5 percig, majd leöntöttük a felülúszót. A sejtekhez hozzáadtunk 5ml dagasztó puffert és 10 percig inkubáltuk a sejteket. Ezek után centrifugáltuk 1000RPM-en 5 percig. A felülúszót leöntöttük, átmostuk fixatív oldattal-metanol jégecet 3:1arányú keveréke- ezt az oldatot frissen kell elkészíteni. Az elején cseppenként kell hozzáadni, folyamatos szuszpendálás mellett. Centrifugáltuk 1000 RPM-en 5 percig. A felülúszót leöntöttük. Megismételtük a fixatív oldattal való átmosást és a centrifugálást-1000 RPM 5 perc. A felülúszót leöntöttük, majd a sejteket felvettük sejtszámtól függően 1 ml fixatív oldatban.

Az izolált sejtmagokat tárgylemezre csepegtettük Pasteur pipettával 30cm magasról. Egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten száradni hagytuk. Dehidratáltuk a sejteket felszálló alkoholsorban: 70-90-95-100 %-os etanol oldatokban. Másnap felcímkéztük a tárgylemezeket, majd tárgylemeztartóba raktuk őket.

- Fluoreszcens mikroszkópos vizsgálat

A vizsgálat során a már fixált, izolált sejtmagokat 20 µl DAPI fluoreszcens festékekkel festettük meg, melyet antifade médiumban vettünk fel. A fedőlemez levegőmentes ráhelyezése után, a tárgylemezt a tárgyasztalra helyezve elkezdtük a vizsgálatot. Élesre állítás előtt immerziós olajat csepegtettünk a fedőlemez és az objektív közé a jobb kép elérése érdekében. A tárgylemezen egyedülálló, jól kivehető sejtmagokat kerestünk és azokat ToupView program

segítségével lefényképeztük, majd az adott tárgylemezről elmentettük a képeket további analízisre.

A vizsgálat során törekedtünk arra, hogy mind a kontroll és mind a kezelt sejtmagokról a kromatin kondenzálódás különböző fázisaiban tudjunk képet készíteni, minél több információt nyerve a kezelés eredményéről.

Átlagosan egy tárgylemezről 100 felvételt készítettünk, majd ezeket a felvételeket átnézve kiválasztottuk a számunkra legmegfelelőbb képeket a munkánkhoz. Ezután a képeket a kromatin kondenzálódás fázisai szerint csoportosítottuk.

Eredmények:

A klinikai szövetmintából kétféle sejttípust sikerült izolálni:

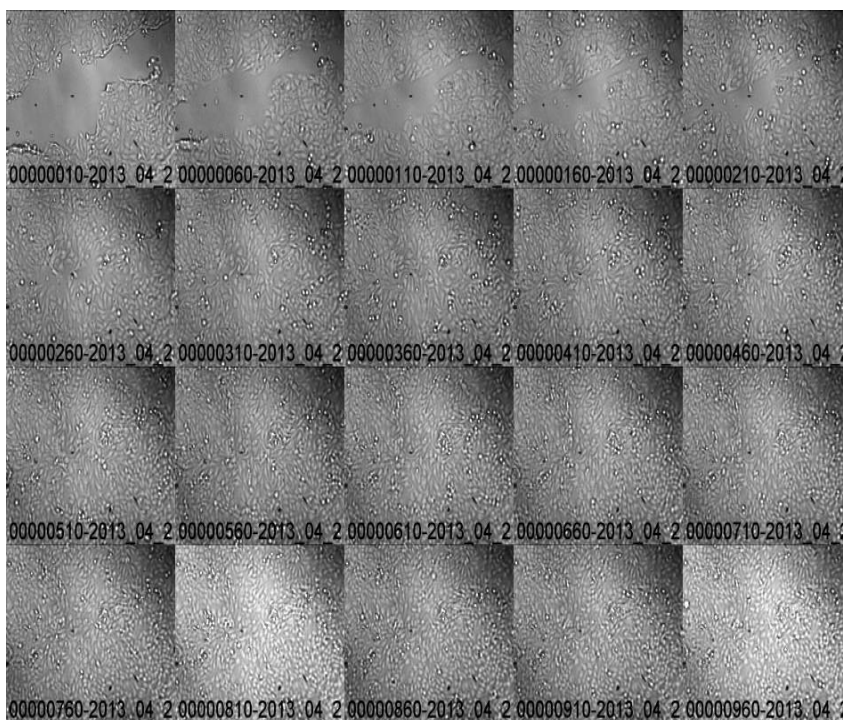
- keratinocita jellegű sejteket (eddig átoltások száma: 11),
- fibroblaszt jellegű sejteket (eddig átoltások száma: 7).

A karcmodellek és az LTS rendszer segítségével megállapítottuk, hogy a kontroll és a kezelt sejtek között jelentős különbség van.

Long Term Scan vizsgálatok:

A kontroll karcmodell a LTS- rendszerrel való vizsgálat alatt időbeli változást mutatott, mégpedig a steril tüvel megkarcolt felszínt (sebet) az osztódó sejtek benőtték. Ezzel szemben a kezelt karcolt tenyészetben ez nem volt megfigyelhető.

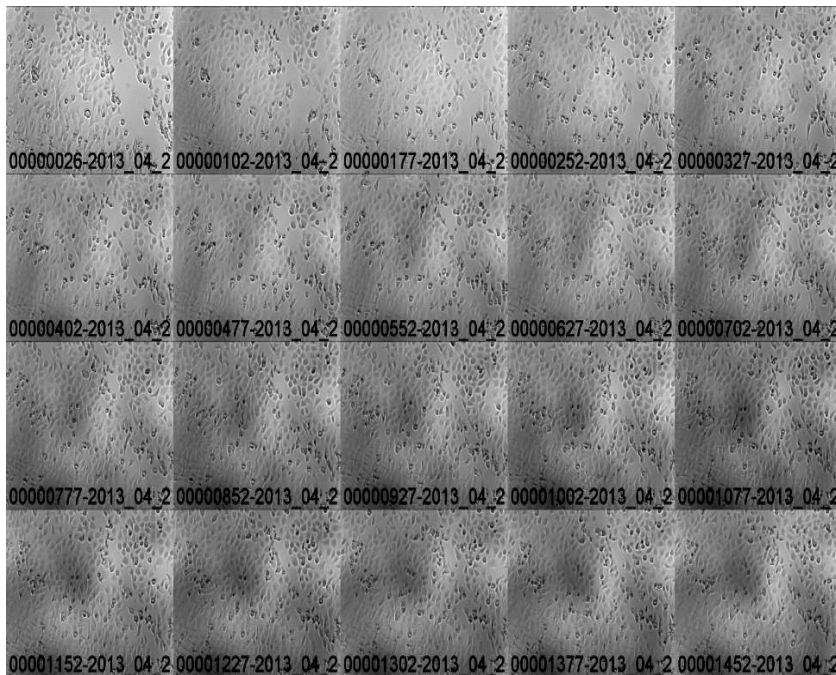
Kontroll:



2. ábra Kontroll tenyészet

A felvételek jól mutatják a sebgyógyulás folyamatát. Az első pár felvételen jól kivehető a karcolt terület, mely az osztódó sejtek miatt el is tűnik. A folyamat gyorsan lezajlik, hiszen sok osztódó sejtet figyelhetünk meg. Apoptotikus sejtek nincsenek jelen. A felvételek végén egy 100%-os konfluenciájú tenyészetet láthatunk.

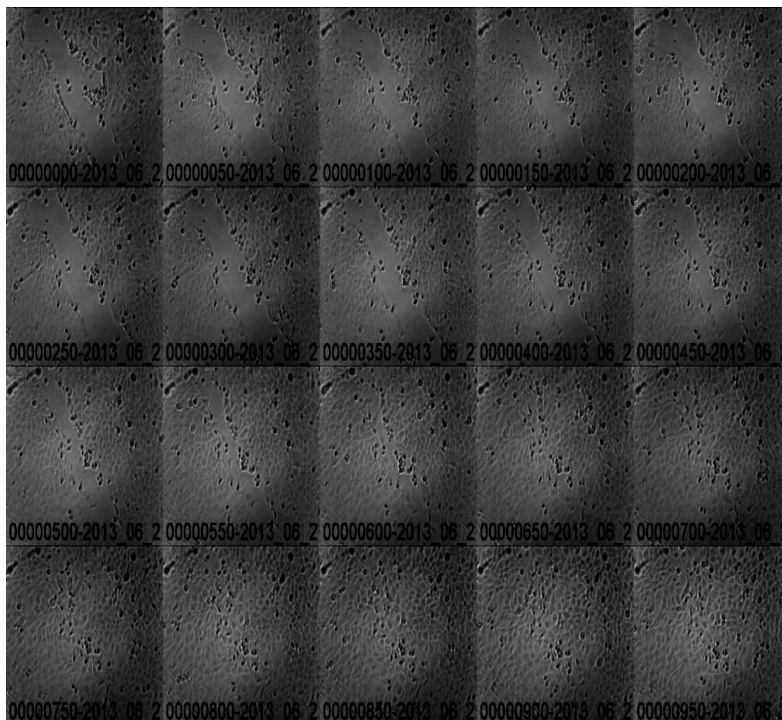
Chloraphenicol 5x hígítás, 1 mg/ml koncentráció



Az első képen látható a karcolt rész a tenyészetben. Továbbiakban megfigyelhető, ahogy elkezdődik a sebgyógyulás, de a folyamat igen lassú, és be sem fejeződik. Az osztódó sejtek száma is alacsony és megfigyelhetők apoptotikus sejtek is. A kezelt tenyészet nem éri el a kontrollra jellemző konfluencia szintet.

3. ábra: 1 mg/ml koncentrációjú chloraphenicollal kezelt tenyészet

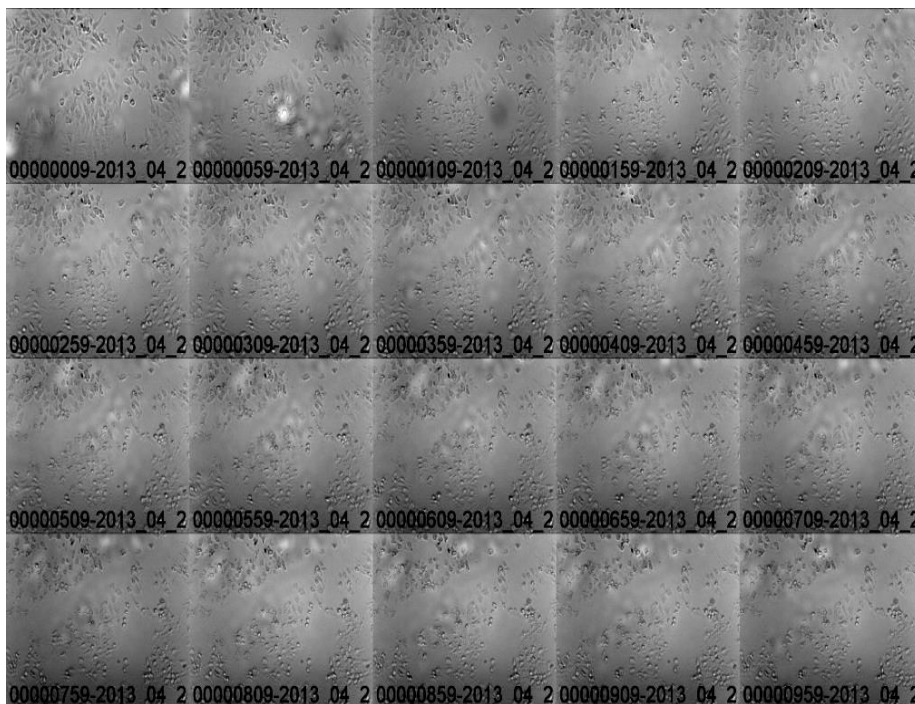
Chloraphenicol 10x hígítás, 0,5 mg/ml koncentráció



Az első felvételen látható a karcolt minta a monolayerben. A sebgyógyulás folyamat itt is lassú, de az 5X hígításhoz képest itt a folyamat már befejeződik „eltűnik a seb”. Az osztódó sejtek száma itt is alacsony és az elpusztult sejtek is jelen vannak. Kontrollhoz viszonyítva, itt is befejeződik a sebgyógyulási folyamat, de lassabban.

4. ábra: 0,5 mg/ml koncentrációjú chloraphenicollal kezelt tenyészet

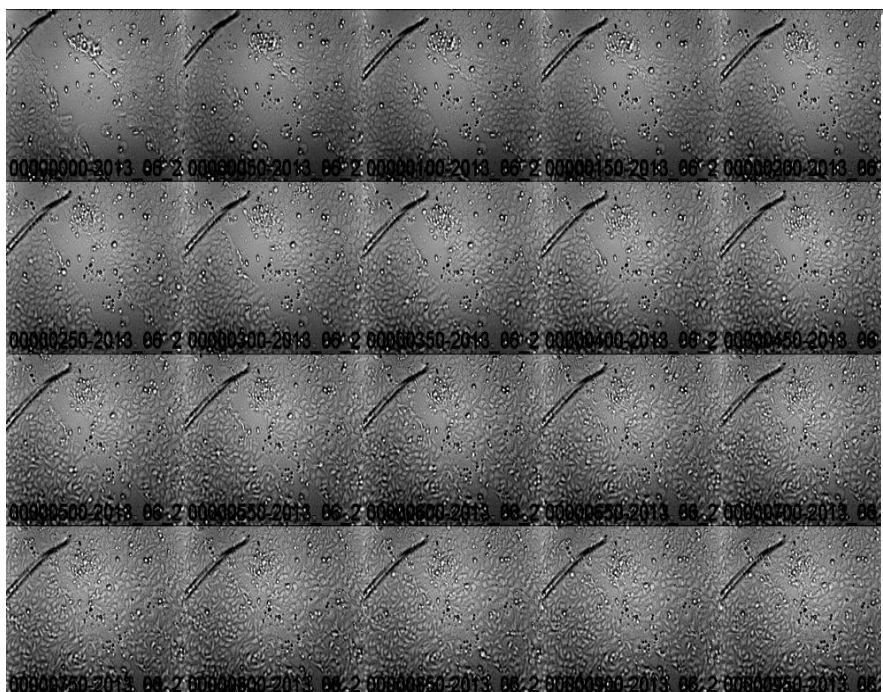
Rifampicin 5x hígítás, 0,2 mg/ml koncentráció



Az ábra azt mutatja, hogy a rifampicin ebben a koncentrációban semmilyen sebgyógyulási aktivitást nem mutat a karcmodellben. A steril tűvel megkarcolt monolayerben a karcolást követően a sejteknél nem történt proliferáció, ennek következtében a seb nem tűnt el a vizsgálat végén sem.

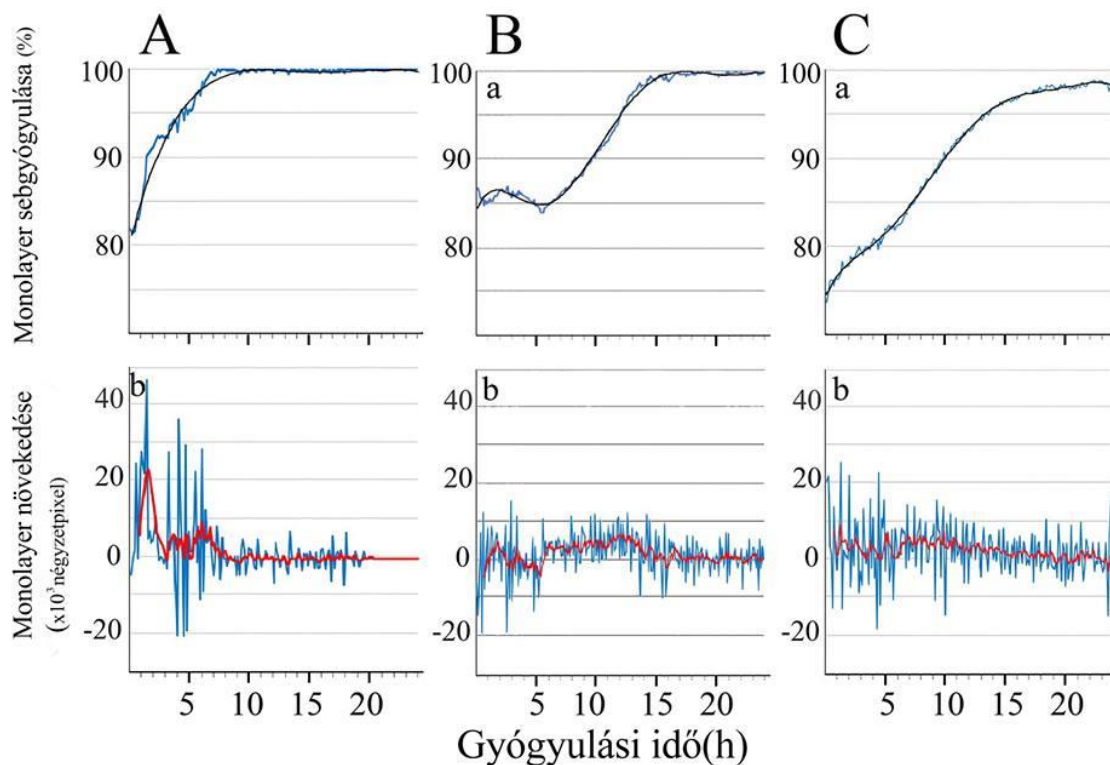
5. ábra: 0,2 mg/ml koncentrációjú rifampicinnel kezelt tenyészet

Rifampicin 10x hígítás, 0,1 mg/ml koncentráció



Az ábrán jól látható, hogy a sérülés után a sejtek osztódásba kezdtek, viszont a rifampicin hatásának köszönhetően a seb nem gyógyult be maradéktalanul. A karcmodell elején még a sérülés szemmel jól látható. Ezzel szemben az utolsó képen a karc szinte teljesen eltűnt.

6. ábra: 0,1 mg/ml koncentrációjú rifampicinnel kezelt tenyészet



A: kontroll tenyészet

B: Chloramphenicol 0,5 mg/ml-es koncentrációja a tenyészetben

C: Rifampicin 0,1 mg/ml-es koncentrációja a tenyészetben

A kontroll esetében a sebgyógyulási diagramon a sejtszám növekedése figyelhető meg a tenyészetben (A/a). Ezt jól mutatja a monolayer növekedési diagram is, mivel az eleinte megugró érték azt a letapadási felületet mutatja, ami a karcolás során keletkezett (A/b).

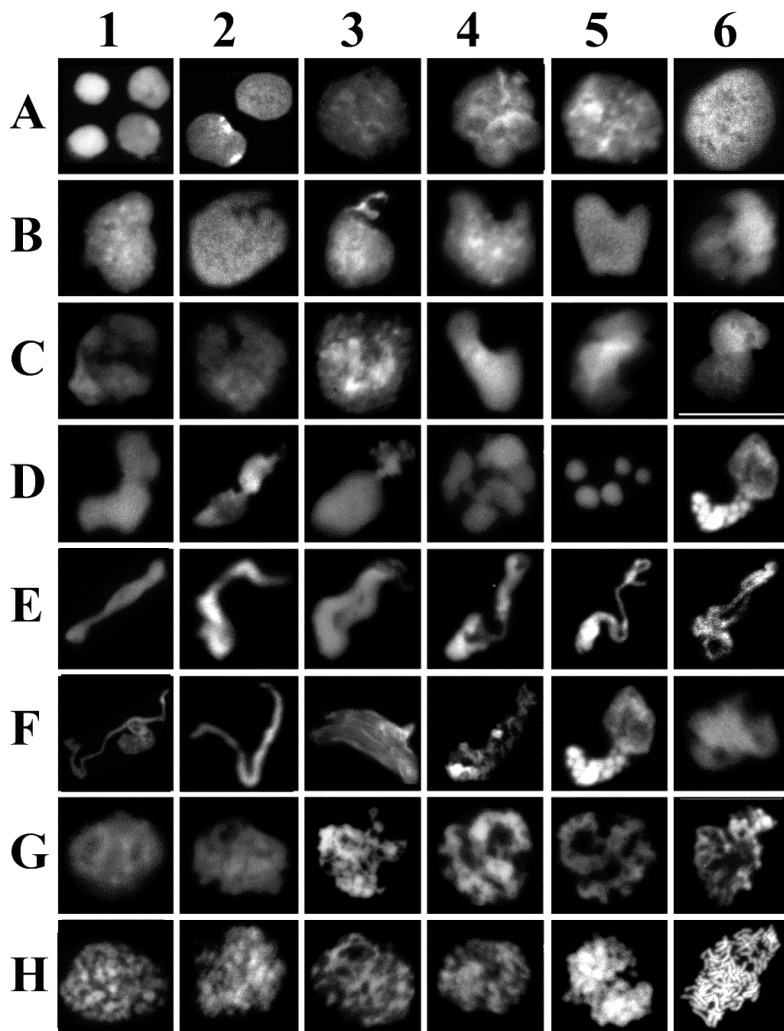
A chloramphenicolal kezelt tenyészetnél a sejtszám növekedés mértéke nagyobb, mint az 1 mg/ml-es koncentrációnál, mivel az 1mg/ml-es koncentrációban a sejteknél apoptotikus folyamatok indultak meg. A kontrollhoz képest viszont kisebb a sejtszám növekedés a chloramphenicol hatásának köszönhetően (B/a). A monolayer területe is növekszik a kontrollhoz hasonlóan, viszont itt sokkal lassabban megy végbe a sebgyógyulási folyamat (B/b).

A rifampicin diagramján szembevetünk, hogy a monolayer nem nő teljesen össze, nem éri el a 100%-ot és a sejtszám itt lassú növekedést mutat (C/a). A teljes területet figyelve megállapítható, hogy a monolayer nem növekszik és a sebgyógyulás nem megy végbe a rifampicin hatása miatt (C/b).

A kromatin szerkezet kialakulása:

A fluoreszcens mikroszkópia segítségével megfigyeltük, hogy a kontrollban a kromatin kondenzálódás teljesen végbemegy.

Először a fátyolos szerkezet alakul ki (A1-C6). A késői fátyolos szerkezeteken keresztül tűnnek át a korai szalagos képletek kiindulópontjai (C3). Már a szalagos szerkezetben szembetűnik, hogy a kondenzálódás folyamata ellentétes irányba fog megindulni (D1-E3). A fonalas szerkezetben a természetes felnyílás után a fonalak ellentétes irányba alakulnak ki (E4-F5). Ekkor már látszódnak a praekromoszómák előtelepei (F6-H3). Kialakulnak a praekromoszómák (4-H5), melyek később a metafázisos kromoszómák kialakulását biztosítják (H6).

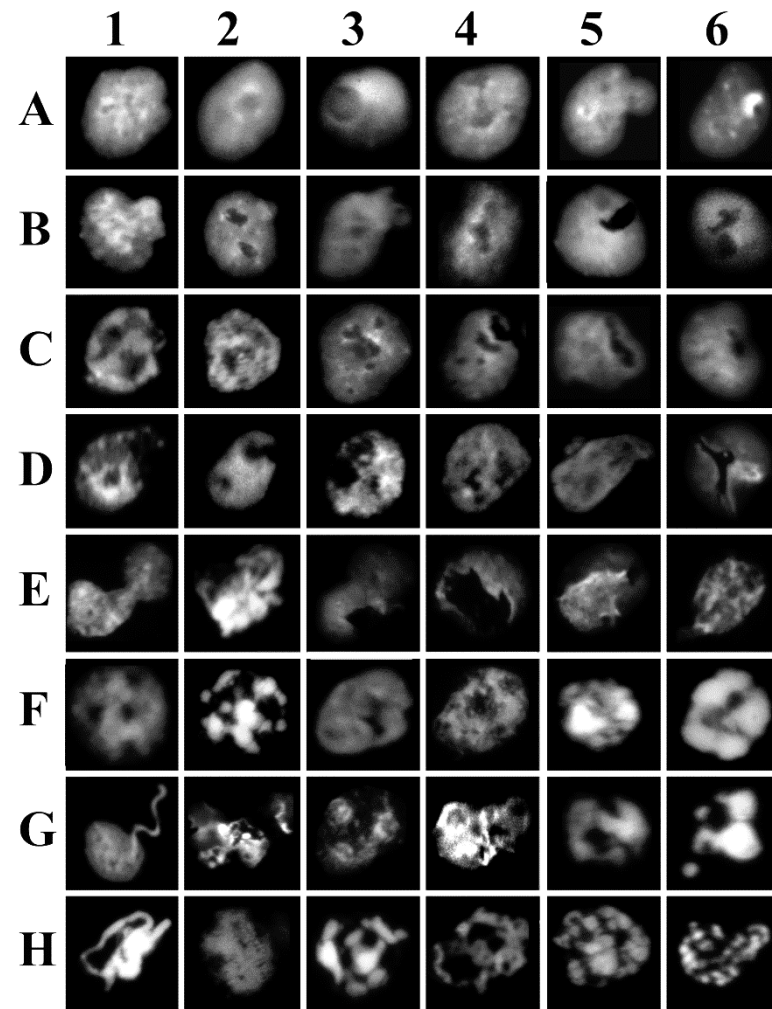


7. ábra: A kromatin szerkezet kialakulása

Chloramphenicol

0.5 mg/ml koncentráció

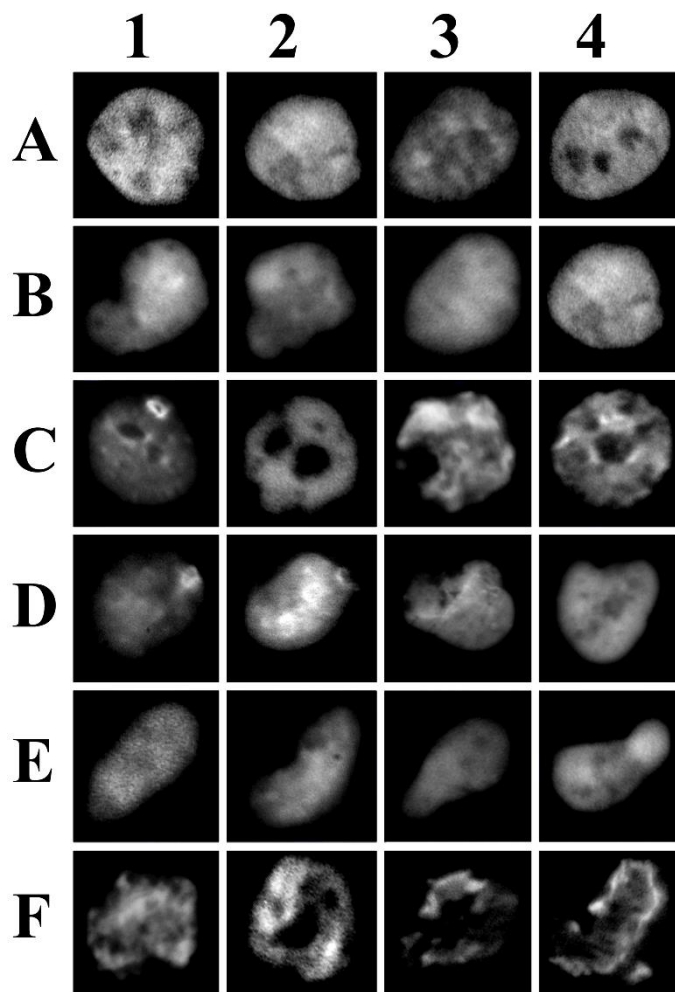
A 0.5 mg/ml-es chloramphenicol koncentrációnál a fátyolos szerkezet elhúzódott. A mikronukleusz helyén elvékonyodás figyelhető meg, mely később felszakítja a sejtmagot. Néhány esetben ezen a helyen a kromatin állomány kiszabadul és a magon kívülre ürül. Mivel a fátyolos szerkezet kialakulása elhúzódott, ezért a szalagos szerkezet is később figyelhető meg. A fonalas szerkezetnél a kontrollhoz hasonlóan a fonalak ellentétes irányban indulnak meg és alakulnak ki. A praekromoszómák még kialakulnak, viszont a chloramphenicol hatására a kromatin szerkezet nem tud kiteljesedni és nem jut el a metafázisos kromoszómáig.



8. ábra 0.5 mg/ml chloramphenicol

1mg/ml koncentráció

Ebben a koncentrációban a kromatin kondenzálódás megakadt a korai fibrilláris stádiumban. A kromatin szerkezet kialakulása csak a szalagos szerkezetig jutott el. A kisebb chloramphenicol koncentráció esetén a kromoszómák mentén történik a hasadás, míg ezt itt nem tudjuk megfigyelni mivel a kromoszómák nem, jutnak el a hasadás szintjéig.



9. ábra 1mg/ml chloramphenicol

Rifampicin

A chloramphenicolhoz hasonló hatást mutat. Itt is több helyen megfigyelhető a magállományban a göbszerű képlet. Itt a kromoszómák kialakulása nem megy végbe már kisebb koncentráció esetében sem. Ellentétben a chloramphenicollal, itt már a praekromoszómák sem alakulnak ki. Itt több esetben megjelenik a mikronukleuszok helyén az elvékonyodás, azaz több esetben lesz megfigyelhető a kromatin állomány magon kívülre ürülése.

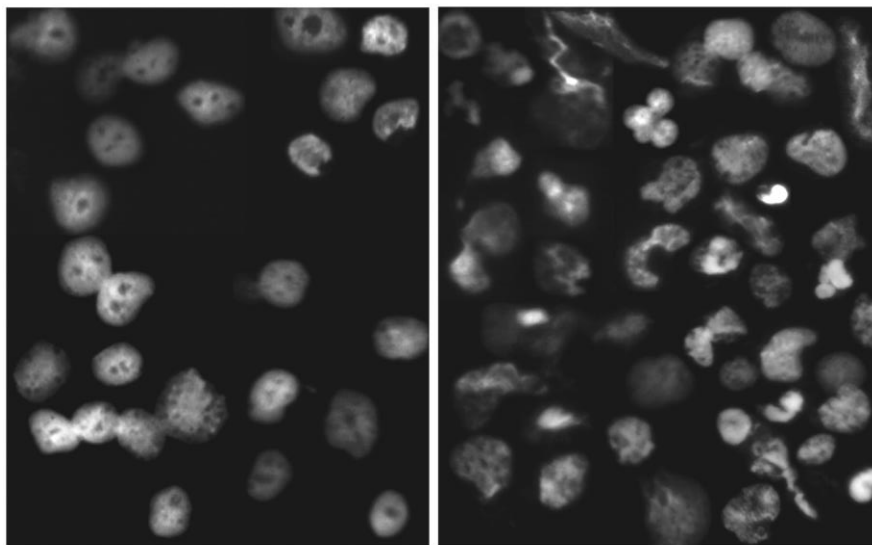
0,1 mg/ml koncentráció

Ebben a koncentrációban dekondezált magokat és fátolszerű képleteket figyelhetünk meg. A kromatinszerkezet már a szalagos szerkezet kialakulásáig sem jut el. Egyes sejtmagoknál a dekondezált sejtmag mellett az abból kiömlött fátol struktúrával rendelkező maganyagot is láthatjuk.

0,2 mg/ml koncentráció

Ezen koncentráció hatására a fátolos dekondezált felépítés mellett szalagszerű képletek is megjelennek. Gyakran előfordult, hogy a rifampicin fesztő hatásának köszönhetően a maganyag kilövellt a sejtmagból. Ebben a koncentrációban a dekondezáció még inkább megfigyelhető, nagyobb a külvilágban lévő maganyag mennyisége. Az előző 0,1 mg/ml

koncentrációhoz képest az itt megfigyelt sejtmagok mérete kisebb.



10. ábra 0,1 mg/ml rifampicin és 0,2 mg/ml rifampicin

Diszkusszió

A vizsgálatok során tapasztaltuk, hogy szignifikáns különbségek vannak a kezelt és a kezeletlen sejtek/sejttenyészetek között.

Fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatot végeztünk, melynek során az izolált sejtmagokat vizsgáltuk a szerzett képeken. A kontroll sejtek a kromatin kondenzálódás minden fázisát mutatták, hiszen nem voltak befolyásolva antibiotikumokkal. Láthatóak a kialakult kromoszómák, ami azt mutatja, hogy a tenyészetben voltak osztódásra képes sejtek. A rifampicin az RNS polimerizációt, a chloramphenicol pedig a fehérjeszintézis lánc elongációját gátolja. Kezelt sejteknél már nem lehet megfigyelni ezeket a kialakuló vagy kialakult kromoszómákat. Bizonyos fázisokig eljutottak a sejtek a képek alapján, azonban az utolsó fázisokat már nem lehet látni, melyben az osztódásra képes kromoszómákat lehetne látni. Ez bizonyítja azt, hogy ezek az antibiotikumok nemcsak a kórokozók osztódását gátolják, ami szükséges a gyógyulás érdekében, de a normál humán sejtek osztódását is blokkolják különböző pontokon. Rámutat arra, hogy a kezelt tenyészetekben nem volt osztódó sejt, hiszen különböző mechanizmusokkal gátolva volt. Ez a következtetés negatív a sebgyógyulás szempontjából, mert osztódó sejtek nélkül a keletkezett seb nem tud begyógyulni, bár kórokozótól mentes.

A kromatin szerkezetek vizsgálatnál megfigyeltük, hogy a kontrollhoz képest a kezelt sejtek sejtmagjai nem egyenletesen gömbölyű alakúak, hanem egy kis félkörív alakú lyuk van bennük. A két antibiotikum hatását összehasonlítva arra a következtetésre jutottunk, hogy az anyagoknak hasonló a hatása, abból a szempontból, hogy a sejtmaghártyáját felnyitják és ezáltal a maganyag a külvilágba kerül.

Irodalomjegyzék

1. C. Edwards, R. J. Mccann And P. Pearce: Effects Of Chloramphenicol On Cell Division In Synchronized Cells Of Aicaligertes Eutrophus JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY (1983), 129, 2681-2683
2. Lorene M. Leiter, Hemant S. Thatte, Chukwuka Okafor, Peter W. Marks, David E. Golan, And Kenneth R. Bridges Chloramphenicol-Induced Mitochondrial Dysfunction Is Associated With Decreased Transferrin Receptor Expression and Ferritin Synthesis in K562 Cells and Is Unrelated to IRE-IRP Interactions JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY 180:334 –344 (1999)
3. Popadic S, Popadic D, Ramic Z, Mostarica Stojkovic M, Trajkovic V, Milinkovic M, Medenica L. Chloramphenicol induces in vitro growth arrest and apoptosis of human keratinocytes. CELL BIOL TOXICOL. 2006 Sep;22(5):371-9
4. Wendell D. Winters, Ada L. Tuan, and Donald L. Morton Differential effects of rifampicin on cultured human tumor cells CANCER RESEARCH 34, 3173-3179, December 1974
5. The effects of chloramphenicol on mitosis of phytohemagglutinin stimulated human leukocytes C. E. Nasjleti and H. H. Spencer ACADEMIC PRESS 1968
6. Colony-forming Cell Effect of Chloramphenicol and Thiamphenicol on the In Vitro R. Judith Ratzan, Malcolm A. S. Moore and Adel A. Yunis BLOOD 2013
7. Elizabeth A. Campbell, Nataliya Korzheva, Arkady Mustaev, Katsuhiko Murakami, Satish Nair, Alex Goldfarb, and Seth A. Darst Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase CELL, Vol. 104, 901–912, March 23, 2001

8. di Mauro, E., Snyder, L., Marino, G. P., Lamberti, A., Coppo, A., and Tocchini-Valenti, C. P. Rifampicin Sensitivity of the Components of DNA-Dependent RNA Polymerase. *NATURE*, 222:533-537, 1969
9. Wehrli, W., Kunsel, F., Schmid, K., and Staehelin M. Interaction of Rifampicin with Bacterial RNA Polymerase. *PROC. NATL. ACAD. SCI. U. S.*, 61: 667-673, 1968.
10. E. Michael van Buskirk; *The Anatomy of the Limbus EYE* 1989 3 101-108
11. Cotsarelis, G. Cheng, G. Dong, G. Sun, T.T. Lavker, R.M. (1989). Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *CELL*: 57, 201–209
12. P. Hendkin, B. Jay Induced limbal migration: a technique for studying melanocytes; *Journal Of Anatomy* 1996 100, 139-145
13. . Time-Lapse Analysis of Cell Death in Mammalian and Fungal Cells. Nagy G, Pinter G, Kohut G, Adam AL, Trencsenyi G, Hornok L, Banfalvi G. *DNA CELL BIOL.* 2010 Mar 10
1. ábra forrása: <http://www.bu.edu/histology/p/080051oa.htm>