

Ezüst-nitrát hatásai a kromatin
kondenzálódásra HaCaT és K-562
sejtvonalon.

Tartalomjegyzék:

Tartalomjegyzék:	2
Kulcsszavak, rövidítések	4
Bevezetés	5
Az ezüst-nitrát (AgNO_3 lúpisz, pokolkő)	6
Az ezüst Ag (Argentum).....	6
<i>Az ezüst biológiai tulajdonságai</i>	7
Az ezüst-nitrát (AgNO_3)	9
<i>Élettani hatása:</i>	10
A sejtciklus	11
A sejtciklus fázisai:.....	11
A sejtciklus szabályozása:	12
Célkitűzések	14
Anyagok és módszerek.....	15
Sejtkultúrák.....	15
A vizsgálat menete.....	16
Time-Lapse Imaging módszer	18
Long-Term Scan rendszer.....	18
Felépítése.....	19
Time-Lapse Imaging módszer a citotoxikológiai kutatásokban	20
Eredmények	21
HaCaT és K-562 sejtek viabilitása az ezüst kezelés után	21

A Time-Lapse Imaging módszerrel végzett megfigyeléseink	25
A HaCaT sejtek esetében:	25
A K-562 sejtek time lapse imaging vizsgálata	32
Interfázisos kromatin szerkezetek vizsgálata ezüst ionok jelenlétében	35
A HaCaT sejtek kromatin szerkezetei	35
A K-562 sejtek kromatin szerkezetei	40
Összefoglalás	44
Az ezüst-nitrát hatásai a sejtek viabilitására	44
Az ezüst-nitrát hatásai a celluláris etológiára	44
Az ezüst-nitrát hatásai a kromatin kondenzálódásra.....	44
Irodalomjegyzék	47
Képjegyzék	50

Kulcsszavak, rövidítések

Ag: ezüst

AgNO₃: ezüst-nitrát

HaCaT: (Human Adult skin keratinocysts, low Ca²⁺ elevated Temperature),
immortalizált keratinocita sejtek

K-562: humán myleoid leukémia

FBS: Fetal bovine Serum

PBS: phosphate buffered saline

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

Ld₅₀: Lethal Dose, 50% - halálos adag-50%

MIC₅₀: minimal inhibitory concentration – minimális gátló koncentráció

Bevezetés

A mindennapi életben egyre gyakrabban találkozhatunk az ezüst gyógyító hatását hirdető reklámokkal, hirdetésekkel. Azonban ha nem megfelelő módon alkalmazzuk ezen ezüst vegyületeket (kolloidot), súlyos egészségkárosító hatást válthatunk ki velük. Sajnálatos módon a nagyobb profit érdekében az ilyen termékekről sok esetben a nem megfelelő tájékoztatás miatt jelentős egészségügyi problémák léphetnek fel.

Az ezüstnek és vegyületeinek a biocid tulajdonságát már évszázadok óta ismerik, és mind a mai napig, használják gomba-és baktériumölő hatása miatt. Ezen tulajdonságát már a görög, és a római birodalom idején ismerték. A görögök ezüst edényekben tárolták a vizet, rómaiak a bort, hogy tovább friss maradjon. Hippokratész szerint az ezüst kiválóan alkalmas vágott sérülések gyógyítására vértisztító, fertőtlenítő hatása miatt. Az ókori egyiptomi feljegyzésekben is találunk utalásokat az ezüst jótékony hatásaira. A középkorban az ezüst evőeszközök használata sokat segített a fertőzések ellen. A vízbe és a tejbe még napjainkban is ezüst érméket, evőeszközöket raknak, hogy tovább maradjanak frissen, illetve hogy a vízben megakadályozzák a moszatok és a baktériumok megjelenését.

Az antibiotikumok és a modern fertőtlenítőszer megjelenése előtt a kórházakban, egészségügyi intézményekben ezüst vegyületeket használtak fertőtlenítésre. A modern orvoslásban egyre kevesebb szerepet kapnak az ezüsttartalmú készítmények, gyógyszerek. Azonban több területen pl.: kozmetikai iparban (több szépségápolási cikk összetevője), növénytermesztésben (növényvédő szerek összetevője) még mindig elterjedt az ezüstvegyületek felhasználása.

Az ezüst-nitrát (AgNO_3 lúpisz, pokolkő)

Az ezüst Ag (Argentum)



Rendszám: 47

Olvadáspont: $960\text{ }^\circ\text{C}$

Forráspont: $2162\text{ }^\circ\text{C}$

Sűrűség: $10,49\text{ g/cm}^3$

Relatív atomtömeg: $107,88\text{ g/mol}$

1. ábra Az ezüst

A kép forrása: <http://www.vilaglex.hu/Kemia/Html/Ezust.htm>

Az ezüst a természetben leggyakrabban szulfid-ásványokban, kevésbé gyakran elemi állapotban is előforduló fehéresen csillogó nemesfém. Fizikai jellemzői közé tartozik a jó megmunkálhatóság, és a nagyon jó termális és elektromos vezetőlépcség. Régóta használják ékszerek, érmék alapanyagaként, de evőeszközöket, edényeket, dísz tárgyakat, tükröt is készítenek belőle.

Vegyületeinek széles körű felhasználása van:

- A fotóiparban a fényképek (filmek papírok) előhívásánál ezüst-nitrátot használnak a fényérzékenysége miatt.
- A jó vezetőképessége miatt fontos vegyület az elektronikai ipar számára pl.: nyomtatott áramkörök gyártásánál.
- A robbanóipar számára az ezüst-fulmiát és az ezüst-acetilid fontos vegyület, mivel ezek az anyagok érzékeny robbanószerkek.
- Gyógyászatban és az ivóvízkezelésnél fertőtlenítésre használják.

Az ezüst biológiai tulajdonságai

Az ezüst főleg az egysejtű szervezetek és a vízi élőlények (halak) számára kifejezetten veszélyes. A magasabb rendű szervezetekbe kerülve felhalmozódik. Maga az elemi fém ezekre a szervezetekre nem toxikus hatású, de a vegyületei azok lehetnek. Az ezüstvegyületek toxikus képességét azonban több tényező határozza meg. Ilyen tényezők: az oldhatóság, a fehérjékhez való kötődési képesség, illetve a szervezetből való kiürülés mechanizmusa.

Az ezüstöt kimutatták az emberi szervezetből, a funkcionálisan betöltött szerepe azonban nem ismert. A májban halmozódik fel, de az epe kiválasztja, és a széklettel a nagy része távozik a szervezetből. Normális szöveti koncentrációja ezért elég csekély. Túladagolva káros, de ha elemi formában van, nem mérgező, ha vegyületben, vagy kolloid formában van, akkor toxikus.

Levegőből belélegezve hosszú kitettség esetén, általában foglalkozási ártalom következtében, előforduló tünetek: légzési nehézség a torok és a tüdő ingerlése, irritációja. Egyes személyeknél bőrirritáció, kiütés, és duzzanat keletkezhet, ha hosszú ideig ezüsttel érintkeznek.

Az ezüstmérgezés legjellemzőbb formája az argyria. A bőrben, nyálkahártyákon felhalmozódott ezüst kékes-szürkére színezi a bőrt. Ez a folyamat nem életveszélyes, de visszafordíthatatlan állapothoz vezet. Az elszíneződés mértéke és lokációja az ezüstvegyület használati módjától, és az egyéni érzékenységtől függ. A legtöbb esetben az argyriát a nem megfelelően alkalmazott ezüst kolloid oldat indukálja.(1)

Az ezüst ionok DNS-be kötődve viszont jelentős DNS károsító hatással rendelkeznek. Az ezüst (I) ion erőteljes kötőanyag, és a DNS-el komplexet képez. Fourier-transzformációs infravörös spektrofotométerrel és kapilláris elektroforézissel mérve megállapították, hogy az ezüst (I) ion a glutaminhoz kötődik, és kétféle komplexet is képezhet a DNS-sel:

I Ag^+ -DNS komplex: a G-C bázispárhoz kötődik az ezüst-ion

II Ag^+ -DNS komplex: a G-C és A-T bázispárokhoz kötődik az ezüst-ion. (2)

Az ezüst vegyületeit a baktericid és fungicid hatása miatt még mindig fontos szerekként tarthatjuk számon a gyógyászatban.

A fontosabb ezüst vegyületek felhasználása az egészségügyben:

- Ezüst-szulfadiazin: gomba és baktérium elleni hatásossága miatt az égési sebek gyógyítására,
- Ezüst nitrát: a gyermekgyógyászatban fertőtlenítőnek, valamint kelések, szemölcsök kezelésére, korábban szemcseppként is,
- Ezüst-jodid, ezüst-klorid: fertőtlenítőként,
- Ezüst-laktát: gyulladás elleni készítményekben található meg,
- Ezüst-oxid: korábban kolera és epilepszia gyógyítására,
- Ezüst pikrat: moniliasis. trichomoniasis kezelésére.

Az ezüst-nitrát (AgNO₃)



Olvadáspont: 212 °C

Forráspont: 444 °C

Sűrűség: 4,35 g/cm³

Moláris tömeg: 169,87 g/mol

2. ábra Az ezüst-nitrát

A kép forrása: <http://www.amesgoldsmith.com/products/silver-nitrate.asp>

Az ezüst –nitrát piszkosfehér színű, szagtalan, szobahőmérsékleten kristályos megjelenésű anyag.

Előállítás: a tiszta fém ezüstöt salétromsavban oldva, és az oldatot bepárolva ezüst-nitrát kristályokat kapunk:



Vízben jól oldódik, vizes oldata semleges, vagy enyhén savas kémhatású.

Szerepel az ENINECS (European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances. 1981. szeptember 18-án az Európai Közösség piacán jelen levő valamennyi anyagot tartalmazó Létező Kereskedelmi Anyagok Európai Jegyzéke) listán, (száma: 231-853-9) maró hatású (R 34), oxidáló (R 8), és a környezetre veszélyes besorolású vegyületként (1).

Élettani hatása:

Nagy adagban lenyelve az ezüst-nitrát maró hatású, hastáji fájdalmat, hasmenést, hányást, sokkos állapotot, görcsöket és halált okoz. (3)

Hosszú ideig tartó kitettség esetében az ezüst-oxid és ezüst-nitrát porokat belélegezve megfigyelték, hogy a szemben ezüstlerakódások jelentek meg –s ez csökkenti az éjszakai látást,- és hastáji fájdalmakat okozott. (4)

Az ezüst-nitrát oldatok bőrrel érintkezve, nyálkahártyára és szembe kerülve erőteljesen maró hatásúak. A kristályok bőrrel érintkezve enyhe allergiás reakciót válthatnak ki (5), és fekete elszíneződést okoznak a bőrön.

Hosszú távon szájon át adagolva a kísérleti állatoknál az ezüst-nitrát a vese glomerulusok sejtjeiben az alapmembrán csekély vastagodását, a sejtek növekedésének lassulását és az élettartamuk csökkenését figyelték meg. Emellett a bőrben, szemben, belső szervekben szemcsés ezüst lerakódásokat is tapasztaltak. (6, 7, 8)

Az ezüst nitrát toxicitási szintjei:

Az ezüst-nitrátra vonatkozó toxikológiai adatok a szervezetbe való bejutás módjának és a vizsgált állatfaj függvényében:

- LD50 intraperitonealis, macska: 22,0 mg/kg
- LD50 orális, macska: 50,0 mg/kg
- LDLo intraperitonealis, tengerimalac: 216,0 mg/kg
- LDLo intravénás, nyúl: 9,00 mg/kg
- LDLo orális, kutya: 20,0 mg/kg
- LDLo orális, nyúl: 800 mg/kg
- LDLo szubkután, tengerimalac: 62,0 mg/kg
- LDLo ismeretlen, ember: 29,0 mg/kg

Irodalmi adatok szerint nagy a valószínűsége, hogy az ezüst egyik formája sem toxikus az immun-, a kardiovaszkuláris, az ideg- és a reprodukív rendszerre, továbbá nem tekinthető karcinogénnek (1).

A sejtciklus

A sejtciklus vizsgálatához a sejtek tenyésztésben történő fenntartása jó lehetőséget biztosít. Az osztódó sejtpopulációkban mitózisok és interfázisok váltják egymást ezek, a folyamatok alkotják a sejtek életciklusát, a sejtciklust. Vizsgálataink során alapvetően a sejtciklusban bekövetkező változások alapján tudunk megfelelő következtetéseket levonni a vizsgált anyagok hatásairól

A sejtciklus fázisai:

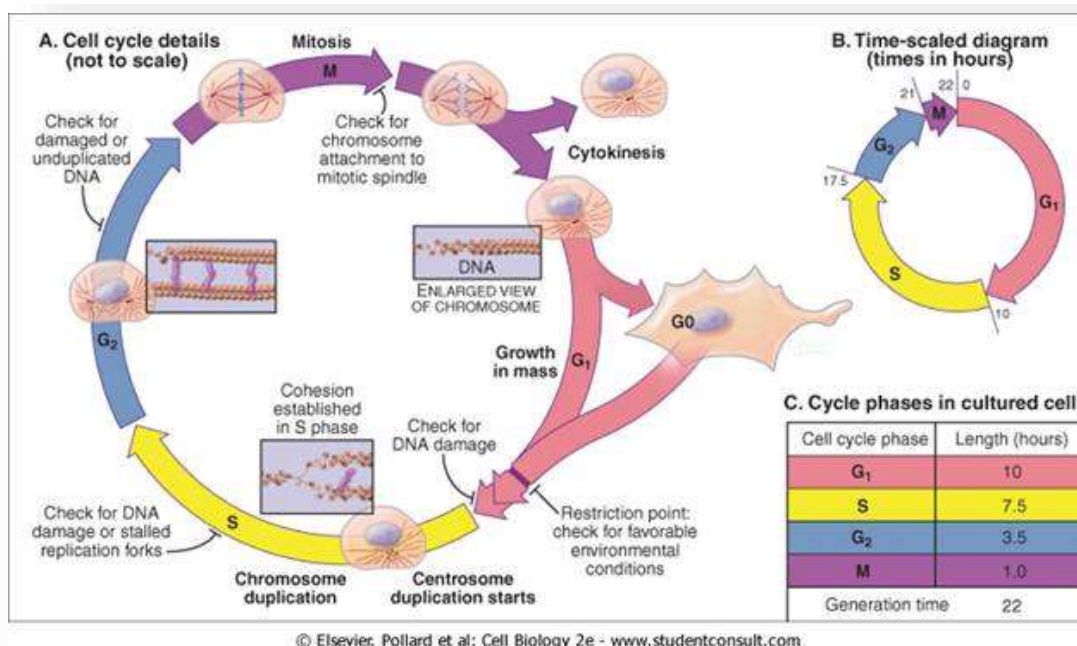
G1 fázis: az első növekedési fázis. Ezt a szakaszt még nyugalmi fázisnak is szokták hívni. Ekkor megy végbe az mRNS-ek, tRNS-ek, a DNS megkettőződéséhez szükséges fehérjék (riboszómák, enzimek), és a centriolumok szintézise. Kiemelt szakasza a restrikciós (R) pont, amikor a sejt a G1 szakasz végén elkötelezi magát az osztódásra (ez az első check-point).

S fázis: a DNS megkettőződésének szakasza.

G2 fázis: újabb növekedési időszak, melyben fehérje- és mRNS szintézis folyik. A mitózishoz szükséges fehérjék szintézise zajlik ebben a szakaszban.

M fázis: a sejtek osztódási szakasza. Ekkorra alakulnak ki a kromoszómák a sejtmagban. A kromoszómák kettéválása után a sejt kétfelé osztódik.

Ha az R pont előtt nincs mitotikus szignál, az emlős sejteknél ez általában a sejtre jellemző növekedési faktor, akkor a sejt kilép a sejtciklusból, ezt a nyugalmi állapotot más néven G0 fázisnak hívjuk (9)



3. ábra a sejtciklus morfológiai és időbeli lefolyása

A kép forrása: <http://www.tumorbio.sote.hu/TB/APOPTOZIS-REPAIR-TELOMER.htm>

A sejtciklus szabályozása:

A növekedés és osztódás ciklusát szabályozó fehérjék összetett rendszere irányítja. Ezen rendszer meghatározza a folyamatok lépéseit, és biztosítja a mechanizmus pontos végrehajtását. Az ellenőrzés több ponton történik, a külső és belső szignálok figyelembevételével.

A sejtciklus szabályozó molekulái:

A legfontosabb szabályozómolekulák a G₁ és mitózisos ciklinek, és a ciklinekkel komplexet alkotó ciklin dependens kinázok.

A CDK-oknak gátló, és serkentő funkciójú változatuk is van. A hatásukat a ciklinekhez kapcsolódva fejtik ki a G₁-, S-, és M fázisban. A CDK-ok működését a többek között CDK-

inhibítorok is befolyásolják, megakadályozva a ciklinekhez történő. Ezen inhibítorokból emlős sejteknél legalább hétfélét ismerünk.

A ciklinek CDK-k mellett a sejtciklus szabályozásában az APC (anafázis-promoting komplex) is fontos szerepet tölt be. Funkciójuk a testvér kromatidákat összekötő cohesin lebontásának beindításával, és az M fázis ciklinjeinek lebontásával töltik be.

Fontos szerepe van a p53 fehérjének is a sejtciklus szabályozásában, azzal, hogy jelzi a DNS szintézisében bekövetkező hibákat. A „kis”, javítható hibák a sejtciklus felfüggesztéséhez vezetnek, a nagy, nem javítható hibák az apoptózist indukálják (9).

Célkitűzések

Munkánk célja az volt, hogy eldöntsük, hogy az ezüst-nitrát, ill. az ezüst-ion milyen hatással van a kromatin kondenzálódásra, illetve a sejtek viselkedésére.

A vizsgálatot két különböző sejtvonalon, az adherens típusú HaCaT (humán keratinocita), és a szuszpenziós kultúrát létrehozó K-562 (humán erytroleukémia) sejteken végeztük. Azért esett a választásunk ezekre a sejtekre, mert a HaCaT sejteken jól vizsgálható kísérleti körülmények között az ezüst-nitrát erősen irritatív hatása, ami a bőrön, nyálkahártyán és a szemén érvényesül (10). A K-562 sejtvonalat azért választottuk, mert foglalkozási ártalom miatt belélegzett ezüst-nitrát és ezüst-oxid por okozta hasi fájdalom szignifikánsan korrelál a vér ezüst szintjeivel (4).

A citotoxicitás vizsgálatát a sejtek osztódásainak szintjén követjük végig kezelt és kontroll tenyészeteken. A sejtek viselkedésének vizsgálatát, celluláris etológiáját a Time Lapse Imaging módszerrel végeztük, mely lehetővé tette számunkra, hogy valós időben figyelhettük meg a különböző koncentrációk hatására adott populációs szintű sejtválaszt.

A kromatin-kondenzálódás intermedierjeinek vizsgálata régóta beletartozik a munkacsoportunk profiljába. Ezzel a módszer érzékenyebb a többi toxikológiai vizsgálati módszernél, mivel itt a kromoszómák szintjén tudjuk nézni az adott anyag hatását.

Célunk volt még, hogy eldöntsük azt, hogy az ezüst-nitrát kromatin-kondenzálódásra mutatott hatásai mennyire specifikusak az eddigi nehézfém-vizsgálatok eredményeivel összevetve.

Anyagok és módszerek

Sejtkultúrák

A kutatásaink során szuszpenziós, (K-562, humán eritroleukémia sejtvonal) és adherens (HaCaT humán keratinocita immortalizált sejtvonal) sejtkultúrákat vizsgáltunk különböző ezüst-nitrát koncentrációk jelenlétében.

A sejteket RPMI-1640 tápfolyadékban tenyésztettük. A médiumhoz 10% FBS-t, (fetal bovine serum) és 1% antibiotikum-antimikotikum keveréket adtunk kiegészítésként. A sejteket a kísérletek teljes időtartama alatt- a long term scann vizsgálatok teljes időtartamát is beleértve- fiziológias körülmények között tartottuk (37 °C és 5 % CO₂).

K-562 sejtek

A K-562 sejtek humán myleoid leukémia (CML) sejtek. Ezt a sejtvonalat egy 53 éves leukémiás női pacienstől származnak (11).

A sejtekre jellemző, hogy lekerekítettek, lebegnek a tápközegben, majd leülepednek a tenyésztőedény aljára. Ezekre a sejtekre jellemző a gyors és kontrollálatlan proliferálódás, spontán differenciálódás, ami a tenyészet heterogén morfológiáját okozhatja (12).

A HaCaT sejtek (Human Adult skin keratinocysts, low Ca²⁺ elevated Temperature),

HaCaT sejtvonal sejtjei bizonyítottan nem tumoros humán keratinocita sejtek. Egy melanomában szenvedő kaukázusi férfi hátbőrének azon részéből származnak, amit még nem érintett a malignus elváltozás.

Kalcium tartalmú közegben tenyésztve spontán módon immortalizálódtak. Ezekre a sejtekre is jellemző a nagy differenciálódási potenciál. A normál keratinocitákhoz hasonlóak, nude egérbe ültetve keratinocitákká differenciálódnak. (13, 14)

A vizsgálat menete

A sejtek tenyésztése során ügyeltünk arra, hogy a kontaminációt elkerüljük, ezt a steril munkavégzés szabályainak betartásával értük el.

A HaCaT és a K-562 sejteket is T-25-ös tenyésztőedényben tenyésztettük. Mindkét sejtfeleséget RPMI 1640 tápoldatban tenyésztettük, amit 10% foetális borjú savóval, és 1% antibiotikum-antimikotikum keverékkel egészítettünk ki

A sejteket a kísérlet megkezdése előtt egy, - másfél nappal vettük fel mélyfagyasztásból (-70 °C). Az adherens HaCaT sejteknél a letapadási idő a fagyasztásból történő felvétel után egy napot ölelt fel. A tenyésztés során mindkét sejtvonalnál a kiindulási sejtszám 10^6 sejt per milliliter volt. A letapadó sejteknél (HaCaT) a vizsgálat megkezdése előtt megvártuk, míg a konfluencia mértéke eléri a 70-80%-ot, azaz a sejtek benövik a rendelkezésre álló terület 70-80%-át. A vizsgálatokat logaritmikus fázisban lévő tenyészeteken végeztük.

Az ezüst-nitrátot desztillált vízben oldottuk fel, majd sterilre szűrtük. A vizsgálathoz három törzsoldatot használtunk 0,1; 1; és 10 mM-os koncentrációban, és ezen oldatokból vettük ki a megfelelő koncentrációhoz (0,5; 5; 10; 15; 20; 30; és 50 μM) való mennyiséget. Ezután a különböző koncentrációk hatását tizenöt órán keresztül vizsgáltuk a Long-Term Scan rendszerrel. Az elkészült képeken a sejtszám változást, és a mozgási dinamikát figyeltük, a képekből videót is készítettünk.

A Long-Term Scan vizsgálat a legtöbb esetben 15 órás, vagy ennél hosszabb időtartamot ölelt fel. Abban az esetben, amikor a sejtek pusztulása a kezelést követően szinte azonnal bekövetkezett, nem tartott 15 órán keresztül a megfigyelés pl.: HaCaT sejtek esetében 50 μM -os AgNO_3 koncentrációnál.

A kromatin kondenzálódás intermedierjeinek vizsgálatához a kontroll és a kezelt mintákból is izoláltunk sejtmagokat.

A sejtmagok izolálása a következő lépésekből áll:

- Felülúszó eltávolítása, és az adherens kultúráknál sejtek tripszines kezelése: ennek hatására a sejtek felválnak a tenyésztőedény aljáról, ezután centrifugálással elválasztjuk a sejteket a folyadéktól.
- Sóoldatos (PBS) mosás után reverzibilis permeabilizálás következik; ezzel a lépéssel a membrán átjárhatóságát növeljük.
- A reverzibilis permeabilizálás után colcemides kezelés következik; ennek hatására a sejtek megrekednek a metafázisban
- A metafázisos blokk kialakítása után swelling-puffert adunk a sejtekhez, melynek hatására a sejtek megduzzadtak.
- A sejteket ezek után metanol-jégecet 3-1 arányú keverékébe vettük fel, majd ebben a fixálóoldatban 30 cm magasról cseppentettük tiszta tárgylemezre. Egy éjszakán keresztül száradni hagytuk, majd felszálló alkoholsorban víztelenítettük.
- A kész mintákat propidium-jodiddal, vagy DAPI-val megfestettük, és XBO megvilágítást használva fluoreszcens mikroszkóppal néztük meg. A kromatin szerkezetekről fotókat készítettük.

Time-Lapse Imaging módszer

Long-Term Scan rendszer

A Debreceni Egyetem Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszék eTox munkacsoportja által 2005-ben kifejlesztett mikroszkópos rendszer, amely lehetővé teszi *citotoxikus* anyagok hatásának valós idejű, celluláris szintű vizsgálatát a teljes sejtciklus alatt. A munkacsoportunk számára fontos kutatási terület a különböző toxikus hatások vizsgálata. A kutatásunk alapját a toxikus ágensek hatására bekövetkező kromatin kondenzálódási rendellenességeinek vizsgálatai jelentik. A mikroszkópos rendszer létrehozásának egyik oka, hogy a sejtek közötti variabilitás, illetve a sejt-sejt közötti interakciók jelentős mértékben befolyásolják az eredményeket.

A rendszer segítségével a standard tenyésztési körülmények között tartott tenyészetek mikroszkópos megfigyelése akár százhatvannyolc órás intervallumban, hat másodperces időbeli felbontásban történhet. Az így nyert képsorozat videofelvétellel alakítható, mely a citotoxicitás közvetlen, sejt és populációs szintű tanulmányozására alkalmas. A képadatbázis statisztikai képelemző módszerekkel való feldolgozása nagy időbeli felbontású adatokat biztosít a toxikus folyamatok dinamikai vizsgálatához (15). Az adatgyűjtés három, hat sejtgenerációt átfogó időtartama lehetővé teszi a transzgenerációs, akkumulálódó genotoxicitás, illetve kemotaxis vizsgálatát is (16).

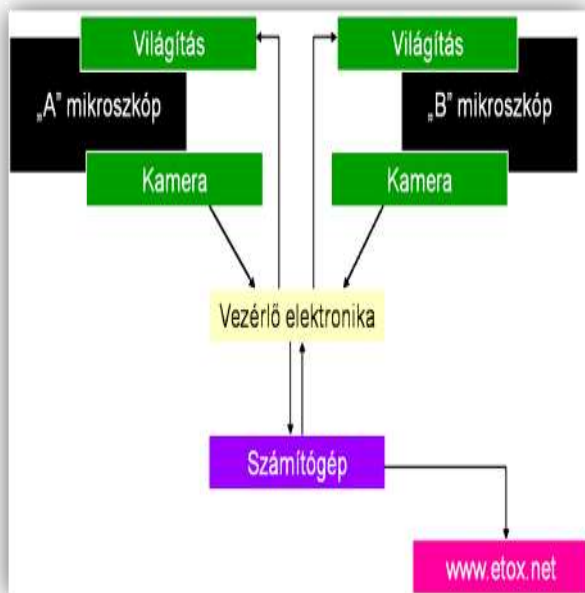


4. ábra A Long-Term Scan rendszer

Felépítése

A Long-Term Scann rendszert két inverz mikroszkóp alkotja, melyek egy sejttenyésztésre alkalmas CO₂ inkubátorban helyezkednek el. A mikroszkópok objektívjéhez egy-egy nagy érzékenységű CCD kamera van csatlakoztatva. A kamerákat vezérlő egység soros porton keresztül kapcsolódik a számítógéphez. A vezérlés feladata a világítás be- és kikapcsolása, a kamera kiválasztása, és a kamerák közötti átkapcsolás.

A számítógépen a munkacsoport által kifejlesztett szoftver segítségével végezzük a képek rögzítését. Lehetőségünk van a szoftver segítségével a kamera kiválasztására (eszköz kiválasztása, eszköz beállítása), és a fény beállítására is. A beállítások között kiválaszthatjuk és menthetjük az aktuális nézetet. A szoftver használatával megoldhatóvá válik az esetleges képhibák szűrés (cut margins), a készítendő képek információ tartalmának növelése (Averaging, Auto intensity, Grayscale 9 bit (SIVA), Display transfer), illetve a képi adatok értelmezhetőségének elősegítése (Negative, Histogram, Grayscale, Distance). A mentéspanelen a képtárolás formátumát is változtathatjuk (BMP, vagy JPEG formátum). A szoftver lehetővé teszi az interneten keresztül történő távvezérlést is.



A Long Term Scan rendszer előnyei:

- Időkorlátja nincs, a sejtek számára a fiziológias körülmények biztosítottak.
- A sejtek egyedileg vizsgálhatók.
- Az életfolyamatok az idő függvényében jellemezhetők.
- A time-lapse imaging módszer segítségével az apoptózis és a nekrozis is részletesen tanulmányozható.

5. ábra A Long-Term Scan sematikus felépítése

Time-Lapse Imaging módszer a citotoxikológiai kutatásokban

A rendszerben működő két azonos felépítésű videó mikroszkóp segítségével az egyazon tenyészetből származó kontrol, és a kezelt sejtpopulációk egyidejű vizsgálata is megvalósítható. A rendszerrel végzett vizsgálataink során meghatároztuk számos citotoxikus ágens sejttenyészetekre gyakorolt hatását.

Eddig megjelent publikációkban bizonyítottuk, hogy rendszerünkben a citotoxicitás kvantitatívan jellemezhető, karakterisztikus változásokat hoz létre mind celluláris, mind pedig populációs szinten (21). A citotoxicitás kromatinszintű megnyilvánulását szinkronizált sejtpopulációkon sztenderdizált kromatinszerkezet elemzéssel vizsgáltuk (17, 19, 20). Az LTS rendszerrel megvizsgált tenyészetekből izoláltuk a sejtmagokat, és reverzibilis permeabilizálást követően a feltárt sejtmagok kromatinstruktúráját fluoreszcens mikroszkópiával elemeztük (22). Bizonyítottuk, hogy az interfázisos kromoszómák metafázisos kromoszómákká szerveződése (a kromatin kondenzálódás) morfológiailag jól jellemezhető módon zavart szenved citotoxikus hatásokra (23, 24). A kiváltott kromatin-kondenzálódási zavarok jellegzetes kondenzálódási intermedierek megjelenését eredményezik.

Eredmények

HaCaT és K-562 sejtek viabilitása az ezüst kezelés után

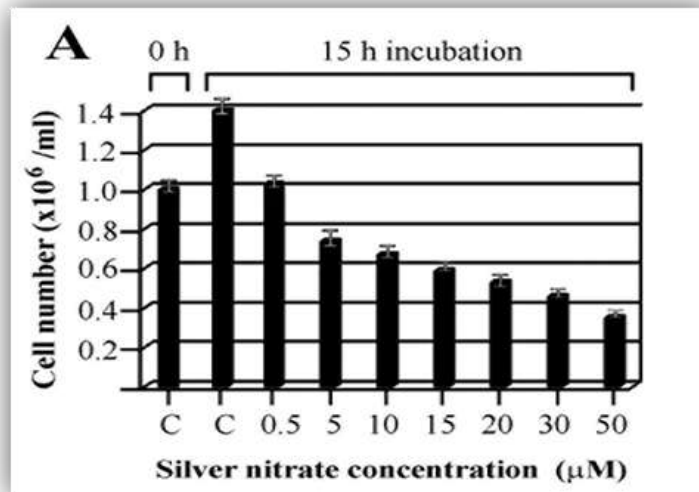
A szakirodalomban közölt Ld_{50} koncentrációk alapján (25, 26, 27) hasonló koncentrációkat használtunk a vizsgálataink során. Mindkét sejttypusnál ugyanazokat az ezüst-nitrát mennyiségeket használtuk

Mindkét sejt kultúrájánál (10^6 sejt/ml) 0.5- és 50 μ M-os koncentrációjú $AgNO_3$ oldattal 15 órán keresztül és 37°C-os hőmérsékleten tartva kezeltük a sejteket. A kontrollt nem vetettük alá $AgNO_3$ -os kezelésnek. Az ezüst-nitrát ($\leq 0,1 \mu$ M) szubtoxikus szintjei nem okoznak toxicitást, ezért ezeket a koncentrációkat nem vizsgáltuk.

A 15 órás vizsgálati idő után minden koncentráció esetében viabilitás tesztet végeztünk. A sejtek életképességét tripánkékes festési eljárással ellenőriztük. Ennek a lényege, hogy a tripánkék csak az elpusztult sejtek membránján tud átjutni, és ott a citoplazmához kötődve megfesti a sejtet. A K-562 sejteket az ezüst-nitrátos kezelés előtt és után is leszámoltuk, mindig a kiindulási állapotot vettük 100%-nak és a 15-órás kezelés után kapott sejtszámot viszonyítottuk hozzá.

A HaCaT sejteknél ez a módszer nem kivitelezhető, mivel ezek a sejtek a flaska aljára tapadnak. Így ezeknél a sejteknél a 15 órás kontrollnál kapott sejtszámhoz (ez a 100%) viszonyítottuk a kezelt tenyészeteknél a kapott 15 órás sejtszámot.

A kapott eredmények alapján megállapítottuk, hogy az ezüst-nitrát hatása függ a koncentrációtól: a különböző ezüst koncentrációk jelenlétében a sejtpusztulás és az ezüst ionok mennyisége között egyenes arányosságot figyeltünk meg.

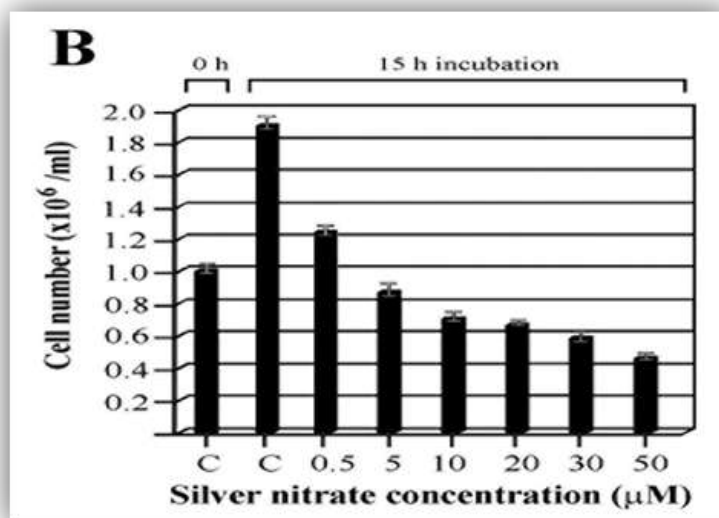


1. grafikon: A különböző AgNO₃ koncentrációk hatása HaCaT sejteken

A nyolc HaCaT sejt kultúra esetében a kiindulási sejtszám 10^6 sejt/ml volt. A grafikonon a kontrollhoz viszonyítva bekövetkező sejtszám változás látható a különböző ezüst-nitrát kezelések után. A „C” jelű oszlopokon ábrázoltuk a kontroll, azaz a nem kezelt sejtek a nulladik órában, és a 15 órási vizsgálatot

A 0,5 µM-os kezelést követően a sejtszám a kiindulási sejtszámhoz képest valamivel magasabb, mivel itt a sejtek számára az Ag⁺-ion koncentráció még nem olyan magas, hogy gátolja az osztódásukat.

Az 5-50 µM-os koncentrációknál a sejtszám csökkenése és a koncentrációk növekedése egyenesen arányos.



2. grafikon A különböző AgNO₃ koncentrációk hatása K-562 sejteken

A K-562 sejtek számának növekedése látható a vizsgált ezüst-nitrát koncentrációk jelenlétében. A kiindulási sejtszám ez esetben is 10⁶ sejt/ml volt. A „C” a kontroll sejtpopulációt jelenti kezdeti sejtszám, és 15 óra elteltével megszámlolva. Itt is megfigyelhető a sejtszám növekedése a 0,5 µM-os ezüst-nitrát dózisonál.

AgNO ₃ koncentráció	0,5 µM	5 µM	10 µM	15 µM	20 µM	30 µM	50 µM
HaCaT	28	47	52	58	62	67	75
K-562	32	54	60	64	69	72	77

1. táblázat Az AgNO₃ koncentrációkra bekövetkező %-os sejtpusztulás

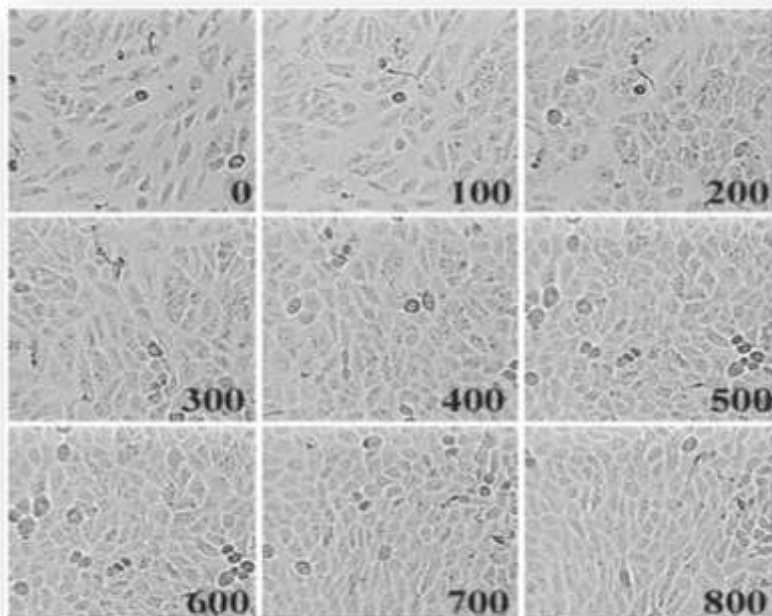
A két sejtpopuláció esetében kapott sejtszámokat összehasonlítva a K-562 sejtek estében is a HaCaT sejtekhez hasonló jelenséget tapasztaltunk, de itt a sejtszám csökkenés nagyobb mértékű volt, tehát ezek a sejtek érzékenyebbek az ezüst-nitrát hatásaira, mint a HaCaT sejtek. Ezt a megállapításunkat jól alátámasztja az 1. táblázatban látható százalékos sejtpusztulás az adott koncentráció értékeket nézve, ahogy a sejtvonalakat összehasonlítottuk.

Mindkét sejtvonalnál meghatároztuk a minimális inhibíciós koncentrációt, azaz a MIC 50 értéket. ez az a legkisebb koncentráció, ami a populáció növekedését 50%-ban gátolja. A minimális gátló koncentráció HaCat sejtek esetében $6,4 \mu\text{M AgNO}_3$.

Hasonló, de némiképp magasabb sejtpusztulási arányt figyeltünk meg ugyanazon koncentrációk mellett a K562 sejtek esetében is, itt a MIC 50 érték: $3,5 \mu\text{M AgNO}_3$.

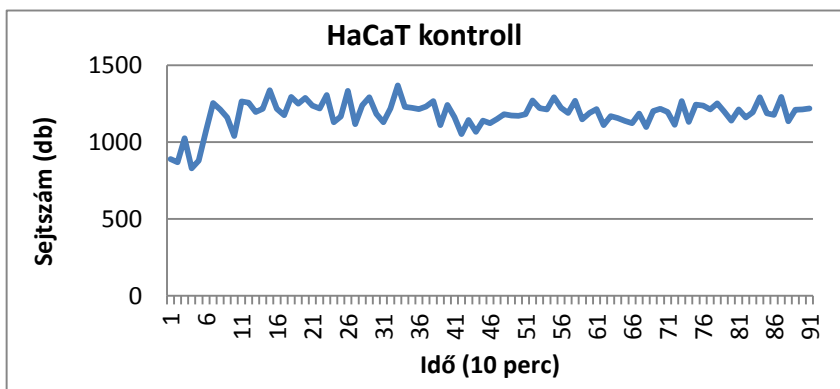
A Time-Lapse Imaging módszerrel végzett megfigyeléseink

A HaCaT sejtek esetében:



6. ábra HaCaT kontroll Time-Lapse Imaging fotók

A kontroll tenyészetben jól látható volt, hogy a sejtek benövik a rendelkezésükre álló területet, és eléri a 100%-os konfluencia értéket. Az éppen osztódó sejtek a monolayer felett láthatók. Jól elkülönülnek attól a denzitásuk és az alakjuk miatt, mivel kerek formát vesznek fel, és más a fénytörésük, mint a letapadt sejteknek.



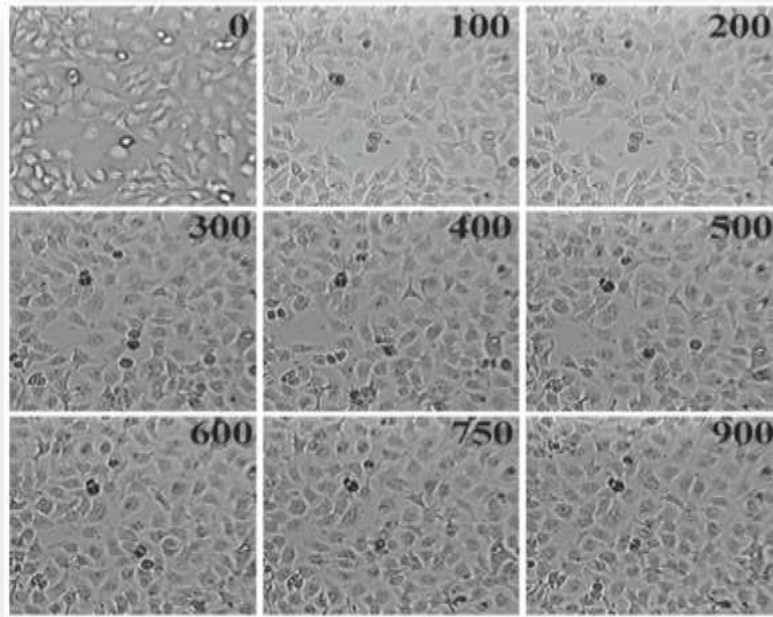
3. grafikon HaCaT kontroll scan

A Long-Term Scan rendszer által készített képek kiértékelésével készült grafikonon jól látható a sejtszám növekedése. Ez a növekedési tendencia azonban a 100%-os konfluencia szint elérése előtt lassul, majd stagnálni kezd.

Fontos megjegyezni, hogy az így készített grafikonok nem a teljes populációkat jellemzik, hanem csak sejttenyésztő edény a scan-rendszer által „átlátott” részét. A scan felvételek alapján csak a képeken látható területek konfluencia értékét tudjuk biztosan megállapítani. Azonban a toxikus hatás a teljes sejtpopulációra jellemző, és minden sejtre hatást gyakorol, Bár mi csak egy részüket láttuk, de így is a teljes populációt meghatározó következtetéseket vonhattunk le.

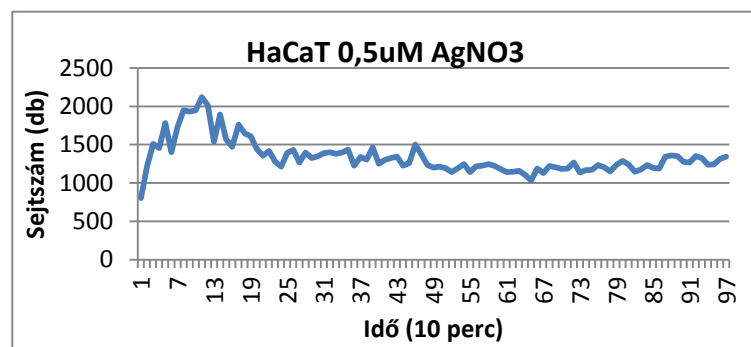
A vizsgálatok 15 órás időtartamot, azaz körülbelül 900 perces időintervallumot öleltek fel. A 900 képet tízesével elemeztük le. A grafikon vízszintes tengelyén lévő időskála tehát tízszeres értéket jelent.

0,5 μM ezüst-nitrát scan, és grafikon



7. ábra 0,5 μM AgNO_3 -mal kezelt HaCaT Time-Lapse Imaging fotók

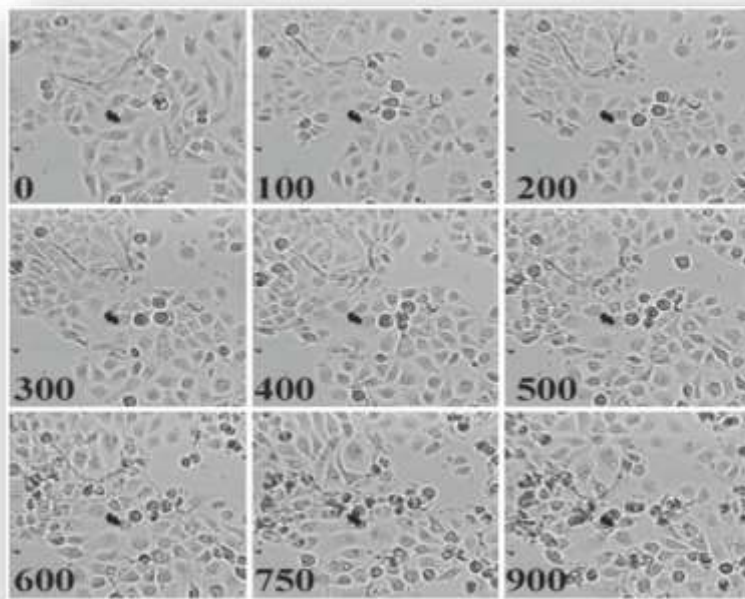
0,5 μM -os Ag^+ ion koncentrációnál a sejtek osztódásai normális ütemben zajlottak, mozgásuk dinamikája megfelelő, azaz számottevő hatást ebben az esetben nem figyeltünk meg. A megfigyelés időtartama alatt sem a sejtek morfológiájában, sem az egymáshoz viszonyított viselkedésükben nem következett be szignifikáns változás.



4. grafikon 0,5 μM AgNO_3 -mal kezelt HaCaT tenyészet scan

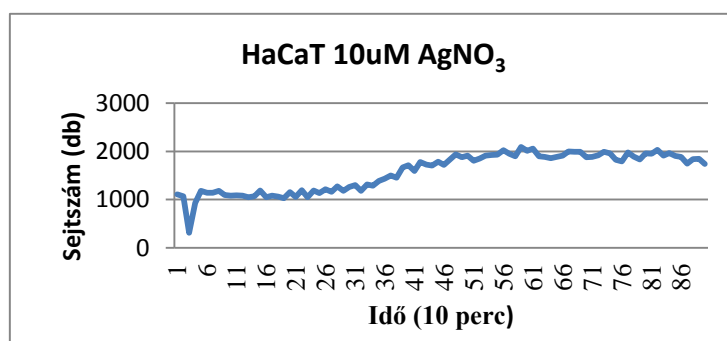
Az elkészült képeket kiértékelve megállapítottuk, hogy a vizsgálat elején a sejtszám növekszik, majd csökken. Ennek oka az, hogy a sejtek lassan benövik a tenyésztőfelületet, és ez okból kifolyólag kevesebb sejt jön fel osztódni.

15 μM ezüst-nitrát scan, és grafikon



8. ábra 10 μM AgNO_3 -mal kezelt HaCaT Time-Lapse Imaging fotók

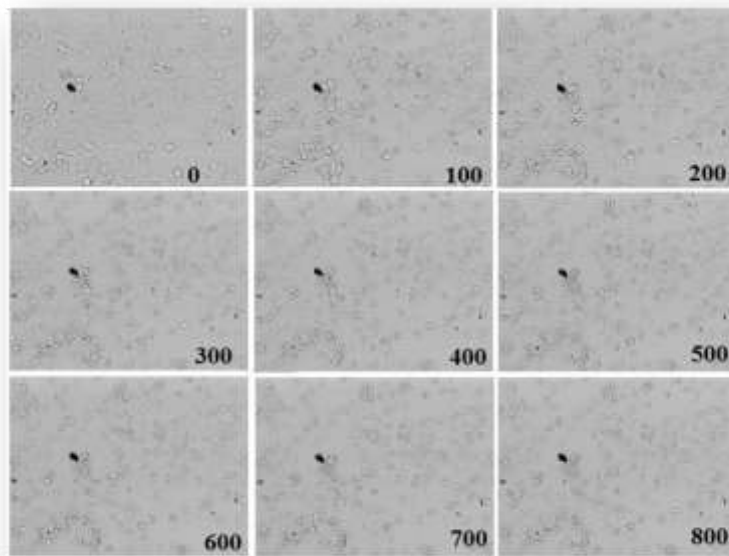
Enyhe változást az 5 μM -os Ag koncentrációnál figyelhattunk meg. A sejtek osztódásának dinamikájában csökkenő tendencia következett be. A 10 μM -os Ag koncentrációnál az osztódások sebessége tovább csökken. A halott sejtek maradványai egyre nagyobb számban jelennek meg a képeket ennél a koncentrációnál. Sok sejt osztódás közben pusztul el.



5. grafikon: 10 μM AgNO_3 -mal kezelt HaCaT tenyészet scan

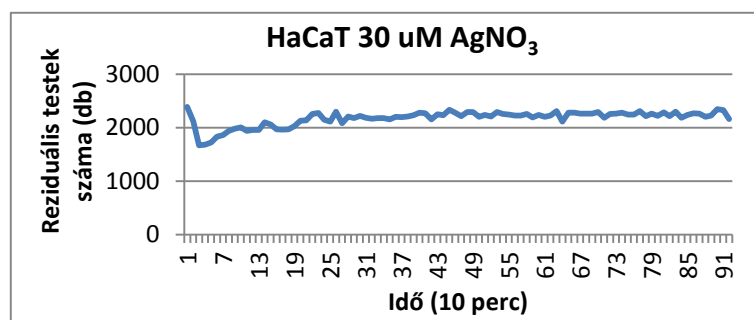
A grafikonon a sejtszám lassú növekedését láthatjuk, a scan alapján a sejtek nagyobb hányada nem tudja befejezni az osztódást, de sokuknál ez a folyamat még végbemegy, bár a 100%-os konfluencia szintet nem tudja elérni a tenyészet.

30 μM ezüst-nitrát scan, és grafikon:



9. ábra 30 μM AgNO_3 -mal kezelt HaCaT Time-Lapse Imaging fotók

15 μM -os Ag^+ ion koncentrációnál még viszonylag sok sejt osztódik, de az osztódások sebessége csökken, és a sejtek letapadásának időtartama nő. 20 μM -os Ag^+ ion koncentrációnál a monolayer egy kis része paralízist szenved, a sejtek mozgása idővel megbénul. 30 μM -os Ag^+ ion koncentrációnál a monolayer megmerevedik, gyors nekrozis következik be a kisebb konfluenciájú tenyészeteken. A 100%-os konfluenciájú tenyészeteken még látható osztódás, de itt is gyorsan végbemegy a sejtek pusztulása.

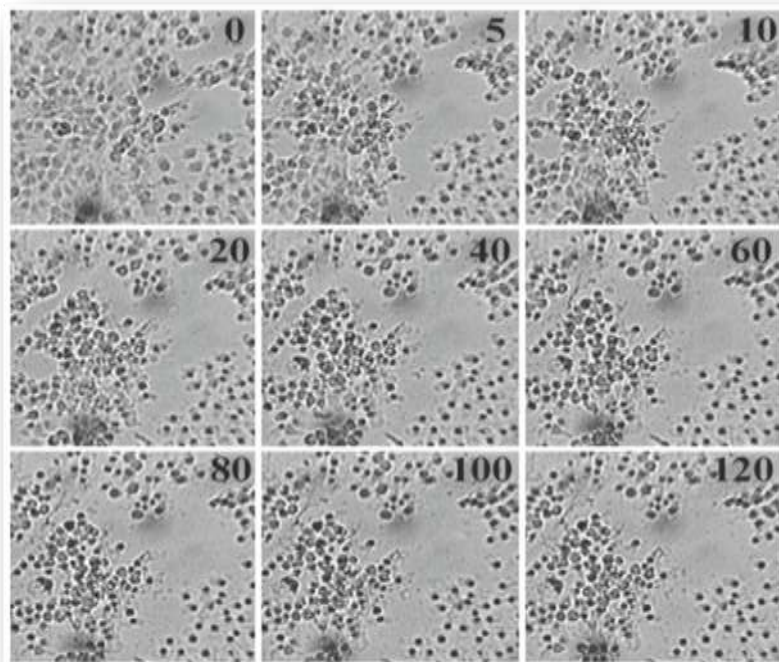


6. grafikon 30 μM AgNO_3 -mal kezelt HaCaT tenyészet scan

A grafikonon az elpusztult sejtek maradványainak (reziduális testek) a mennyiség növekedését követhetjük nyomon. A hirtelen csökkenés oka, hogy a sejtek mérete a

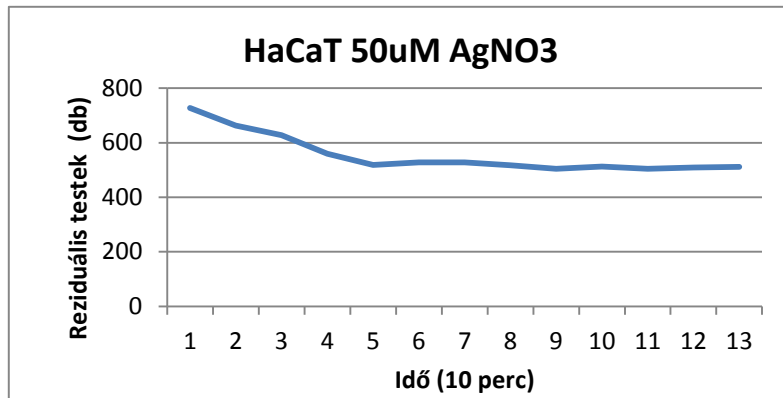
pusztulásuk–az ezüst-nitrát hozzáadása után pár perccel- során megnőtt, majd lecsökkent, ahogy a sejtek felváltak, és ezután a citoplazmájuk felszakadásával újra megnőtt.

50 μ M ezüst-nitrát scan, és grafikon



6. ábra 50 μ M AgNO₃-mal kezelt HaCaT Time-Lapse Imaging fotók

Az általunk vizsgált, legnagyobb, 50 μ M-os Ag⁺ ion koncentrációnál az ezüst-nitrát hozzáadását követően a monolayer azonnal felszakad, és a sejtek nekrozissal történő pusztulása figyelhető meg. A monolayer felszakadása a mellékelt ábrán is nyomon követhető, a kevésbé konfluens részeken indul meg. A folyamat során a sejtekből reziduális testek képződtek, melyek egymáshoz csapódtak.



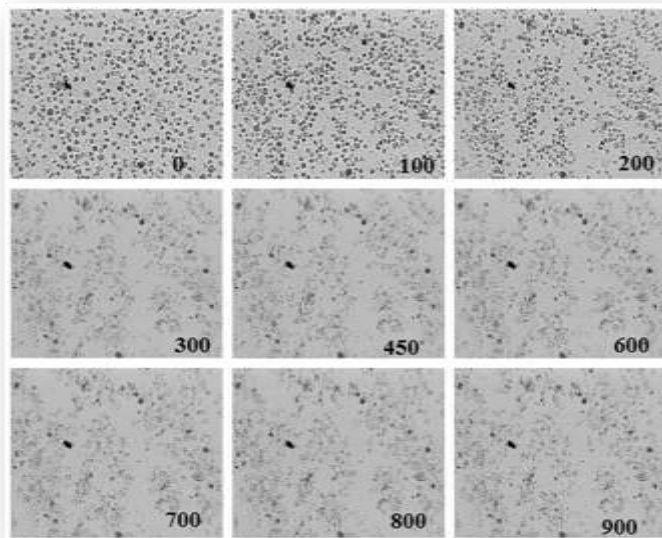
7 grafikon 50 uM AgNO₃-mal kezelt HaCaT tenyészet scan

A grafikonon az 30 μM -os Ag^+ ion koncentrációnál már leírt változásokat látjuk. Itt is megfigyelhető, hogy sejtek területe nő, majd csökken, de itt az ezüst-nitrát rögtön elpusztította a sejteket, amint hozzáadtuk a tenyészethez. Mivel a sejtek szinte azonnal elpusztultak nem folytattuk a scan vizsgálatot 15 órán keresztül.

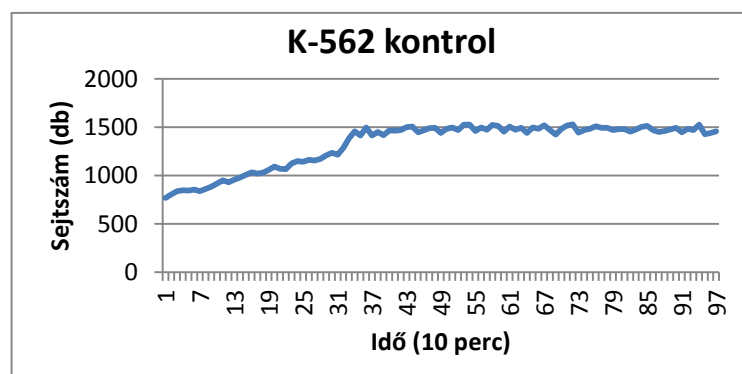
A K-562 sejtek time lapse imaging vizsgálata

A szuszpenziós kultúráknál a scan vizsgálat kevésbé sokrétű, mint az adherens sejtek esetében.

A K-562 sejtek scan vizsgálata során a képek kielemezésénél a sejtszám változását vizsgáltuk. Ezek a sejtek, ha már nagy sejtszámmal vannak jelen a tenyészetben hajlamosak az aggregálódásra. Ezt a folyamatot azonban toxikus hatású anyagok is kiválthatják. A kontrol K-562 scan fotókon, a 11-es ábrán, a sejtek fokozatos aggregálódása látható.



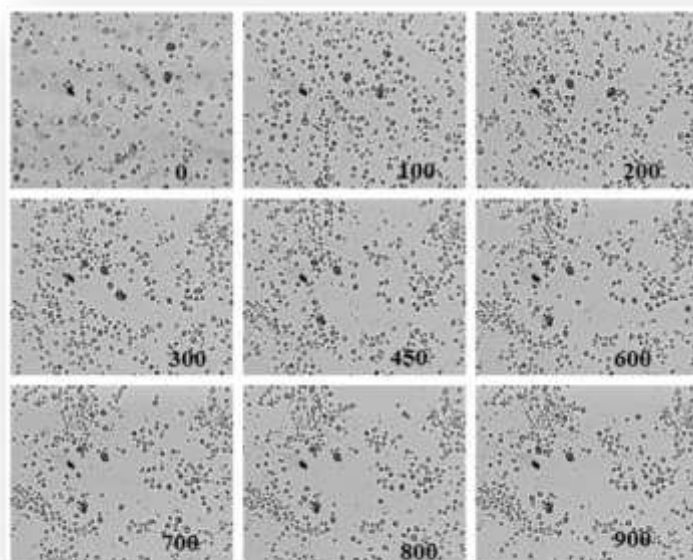
11. ábra K-562 kontrol



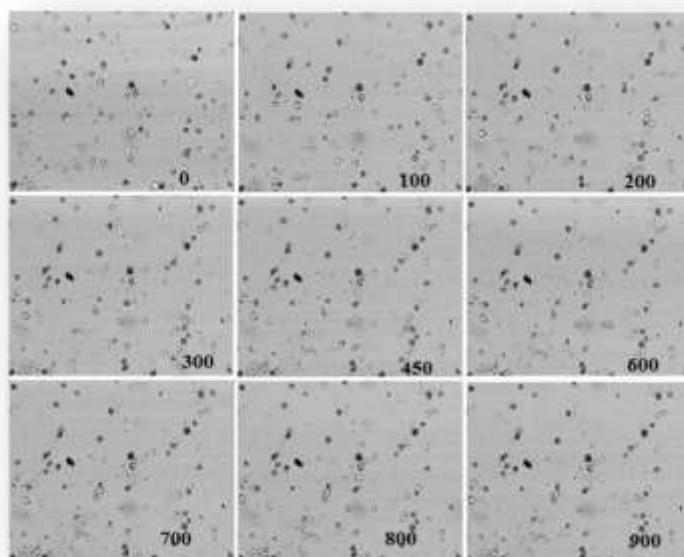
8. grafikon K-562 kontrolról készített grafikon

A scan felvételek alapján elkészített grafikon jól szemlélteti a kontroll tenyészet esetében a sejtszám növekedését, ami a maximális sejtszám elérése után stagnálni, és a sejtek aggregációja következtében csökkenni kezdett.

Scan felvételek és elemzés a szubtoxikus és a legmagasabb dózisban

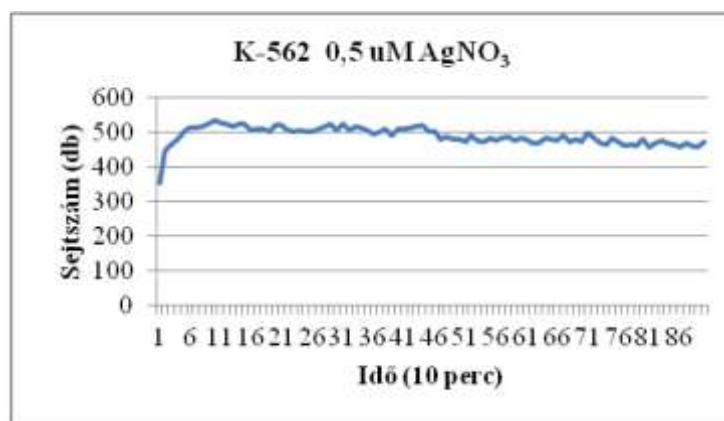


12. ábra 0,5 μM AgNO_3 -mal kezelt K-562

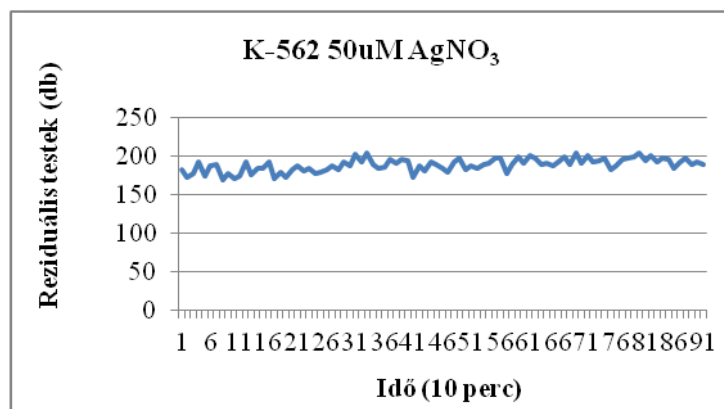


13. ábra 50 μM AgNO_3 -mal kezelt K-562

A kezelt sejteknél a scan-felvételeken szignifikáns változásokat a sejtszám fokozatos csökkenésében láttunk. Minél nagyobb koncentrációt vizsgáltunk annál kevesebb ép sejtet láttunk a felvételeken. A halott sejtekből származó maradványok mennyisége viszont fokozatosan nőtt. Az alábbi grafikonokon (a 9-es és a 10-es grafikonon) ezt a tendenciát követhetjük nyomon



9. grafikon 0,5 uM AgNO₃ scan grafikonja



10. grafikon 50 uM AgNO₃ scan grafikonja

A 0,5 μ M-os koncentrációnál az ezüst-nitrát még nem volt toxikus hatású a sejtekre nézve. a grafikon alapján is megállapítottuk, hogy ez a dózis még enyhe sejtszám növekedést okozott. Miután a természetben lévő sejtek elérték a maximális számot enyhe csökkenést figyeltünk meg a sejtszám változásában. Ennek az volt az oka, hogy a sejtek összecsapzódtak.

Az 50 μ M-os ezüst-nitrát kezelés scan-jéről készített diagram értéktengelyén a reziduális testek számát tüntettük fel. Ebben az esetben azt tapasztaltuk, hogy a sejtek azonnal elpusztultak, és a maradványaikból létrejött reziduális testeket figyelhettük csak meg.

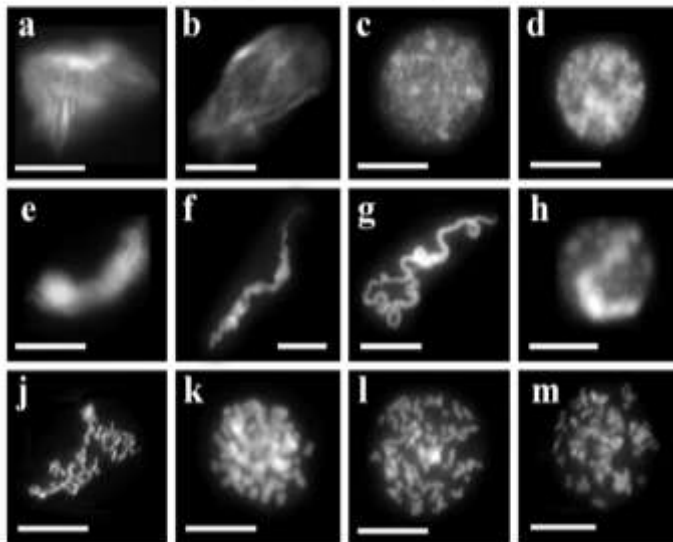
Interfázisos kromatin szerkezetek vizsgálata ezüst ionok jelenlétében

Az interfázisban lévő sejtek kromatinjának kondenzálódását a folyamat során megjelenő intermedierek tanulmányozásán keresztül tudjuk vizsgálni. Ezzel a vizsgálati módszerrel a toxikus anyagok már kismértékű, a sejtmagban bekövetkező hatását vizsgálhatjuk. Ezen módszerrel az ezüst-ionok okozta változásokat könnyen karakterizálhattuk, és akár más nehézfémek okozta tipikus morfológiai változásokkal is összevethetjük.

A HaCaT sejtek kromatin szerkezetei

Kromatin szerkezetek a HaCaT kontroll sejtekben:

HaCaT control



- a-b: korai S fázisban lévő sejtben a kromatin fátyszerű.
- c-d: a magállomány fibrózus szerkezetet vesz fel
- e-j: a fibrózus, majd szalagszerű képletek
- j-k: praekromoszómák
- l-m: a kialakult metafázisos kromoszómák

14. ábra HaCat kontrol kromatin szerkezetek

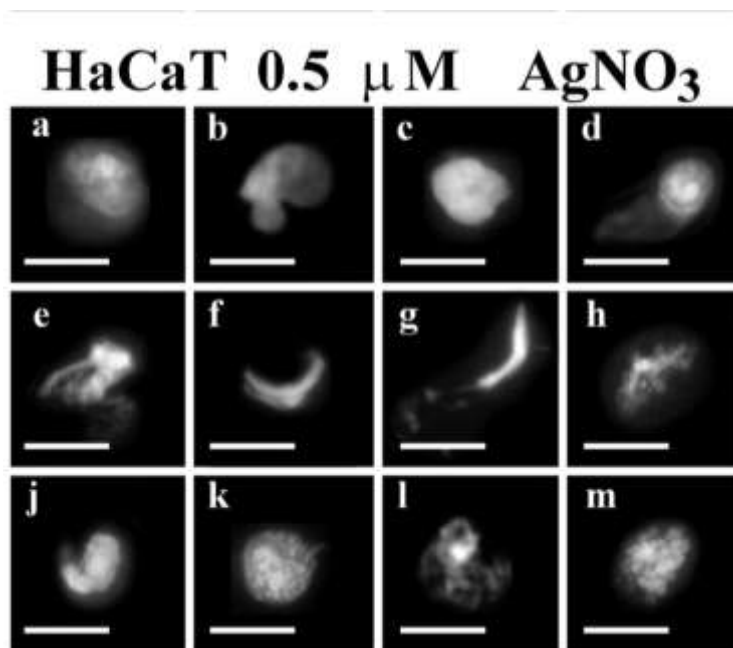
A korai S fázisban lévő üstökös szerű kromatin először fibrózus majd negatív szupertekercselt szalagos formát vesz fel, amit a közép S fázistól a késői S fázisig a kromatin testek kialakulása követ. A kromoszómák kialakulása csak a metafázisban fejeződik be, a metafázisos kromoszómák megjelenése előtt úgynevezett praekromoszómákat is megfigyeltünk.

Ezek a felvételek szolgáltak kontrollként az ezüst-nitráttal kezelt sejtekkel szemben. Az ábrán „a”-tól „m”-ig a kondenzálódás során megjelenő intermediereket láthatjuk

Kromatin szerkezetek az ezüst-nitráttal kezelt HaCaT sejtekben

Szubtoxikus dózis feletti koncentráció

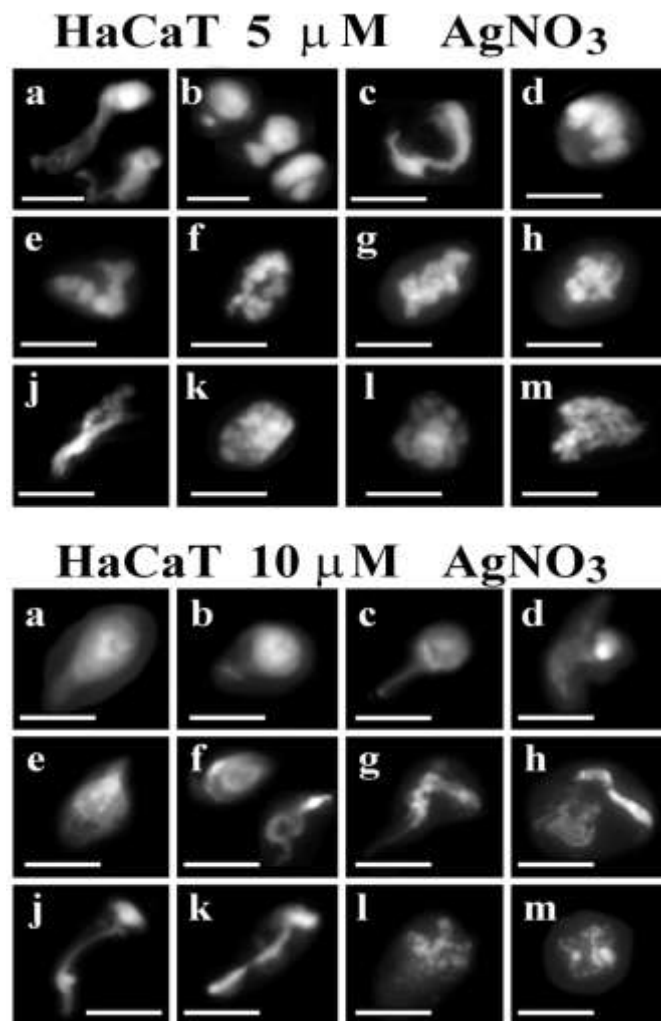
A kezelés hatására már a szubtoxikus dózis felett is (0,5 μM) látunk változásokat a kondenzálódási intermediereket vizsgálva (kromatin polarizáció és fibrózus kromatin végek a sejtmag körül) és a magasabb koncentrációk felé haladva (5-10 μM) ez a hatás jóval erősebben jelentkezett.



7. ábra HaCat 0,5 μM AgNO_3 -mal kezelt sejtek kromatin szerkezetei

A 0,5 μM -os koncentrációban adagolt ezüst-nitrát hatásait vizsgálva megfigyeltük, hogy a kondenzálódás során kialakuló jellegzetes formák megjelennek, de ezeket finom fibrózus képlet borítja (a-h). A metafázisos kromoszómák nem alakultak ki megfelelően. Megjelenésükre jellemző volt, hogy a kontrolhoz viszonyítva befejezetlennek tűnnek (m).

Alacsony dózis

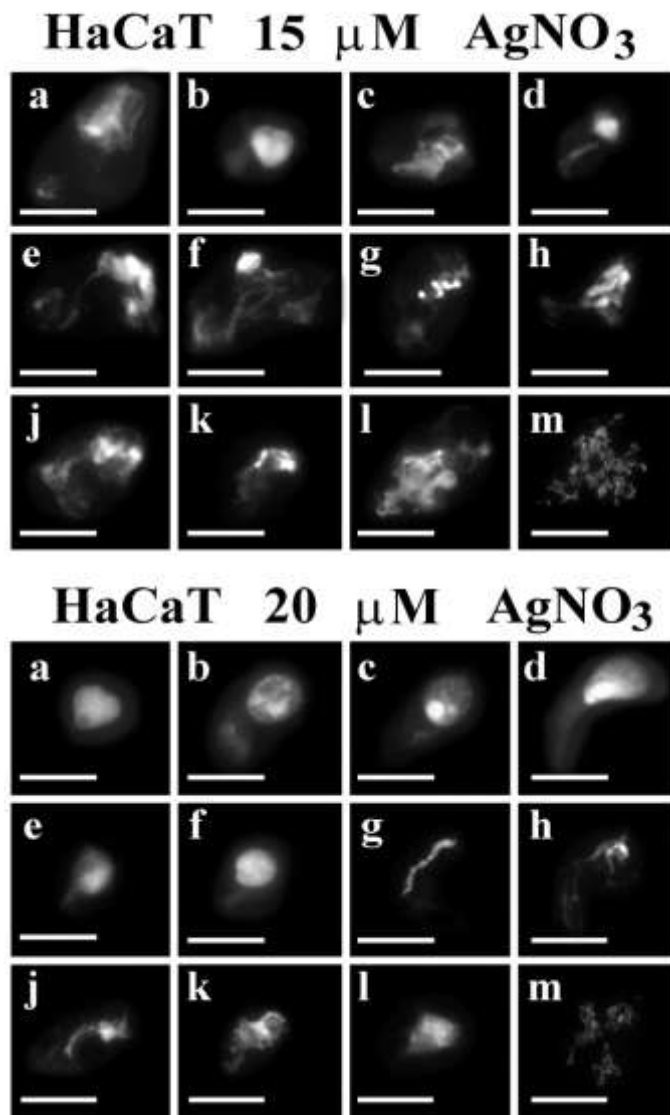


8. ábra HaCat 5, és 10 μ M AgNO₃-mal kezelt sejtek kromatin szerkezetei

Alacsony, 5-10 μ M-os ezüst-nitrát koncentrációnál a leginkább szembetűnő jelenség a sejtmag körül elhelyezkedő fibrózus és szalagos kromatin-farok megjelenése.

Fontosnak tartottuk továbbá az a megfigyelést is, miszerint a sejtmagok méretében csökkenést tapasztaltunk, de ez a csökkenés az apoptotikus testek méretét vizsgálva nem jelentkezett arányosan.

Közepes dózis

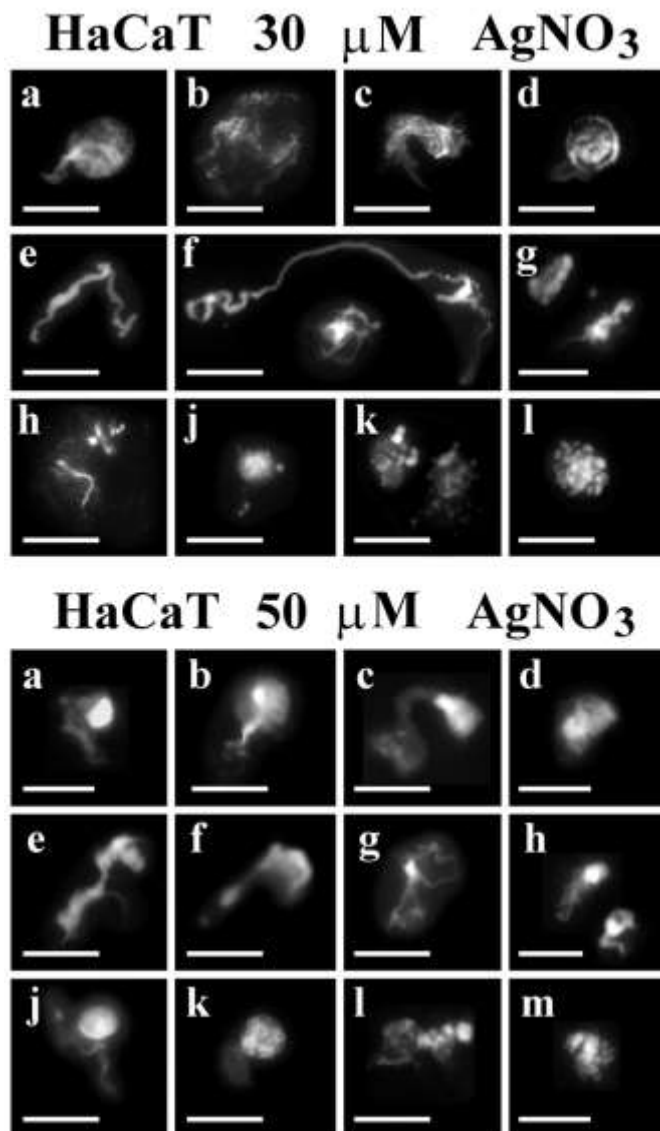


97. ábra HaCat 15, és 20 μ M AgNO₃-mal kezelt sejtek kromatin szerkezetei

Közepes 15-20 μ M-os ezüst-nitrát koncentrációnál a sejtmagok méretének csökkenése folytatódik, maga a maganyag kondenzebbé válik, egyre jobban tömörödik, és ez a jelenség mindkét ábrán végigkövethető. A 15 μ M-os koncentrációnál megjelenik a kondenzálódási pontokat lefedő, finom szálak szerkezetű fátyolszerű képlet (15 μ M a, c, d, e, f, g, j, k, l kép). A 20 μ M-os dózison azonban ez a jelenség már kevésbé jellemző (20 μ M h, j, l kép)

A megvizsgált sejtmagok között nem tudtuk az apoptózis legkarakterisztikusabb bizonyítékát az apoptotikus testeket megfigyelni. Ez a jelenség a magas koncentrációnál is megfigyelhető volt.

Magas dózis



18. ábra HaCat 30, és 50 μ M AgNO₃-mal kezelt sejtek kromatin szerkezetei

Magas koncentrációnál, 30-50 μ M-os ezüst-nitrát esetében, nemcsak az üstökös-szerű formák megjelenése volt szembeűnő jelenség számunkra (30 μ M a, d kép, 50 μ M b, h, j kép), hanem a szalagos szerkezetek letekeredése is. (30 μ M f kép, 50 μ M c, e, g kép)

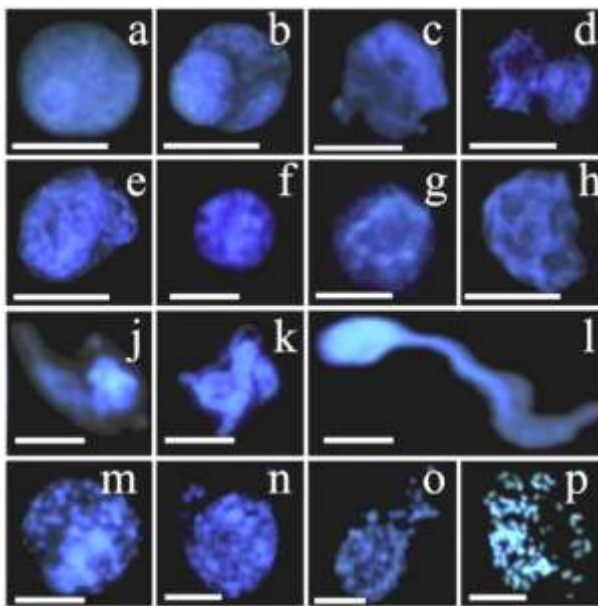
Ebből azt a következtetést vontuk le, hogy az ezüst ionok befolyásolják és gátolják a szupertekercselt kromatin szerkezetek kialakulásának mechanizmusát.

A K-562 sejtek kromatin szerkezetei

Kromatin szerkezetek a K-562 kontroll sejtekben

A HaCaT sejtekhez hasonlóan a K-562 sejteken is elvégeztük a kromatin kondenzálódás intermediereinek vizsgálatát, a kontroll és a kezelt sejteken is.

Az alábbi ábrán a kontroll mintából származó sejtmagokat látjuk. A képen A-tól indulva P-ig a korai S fázistól kezdve nyomon követhetjük a kromatin szerkezetekből a kromoszómák kialakulását. Korai S fázis a fátyolszerű szerkezetek jellemzők. A közép S fázisban fibrózus és szupertekercselt formák jelennek meg. Az S fázis második felében a kromatin testek, elongált és a kondenzált formák jellemzőek.

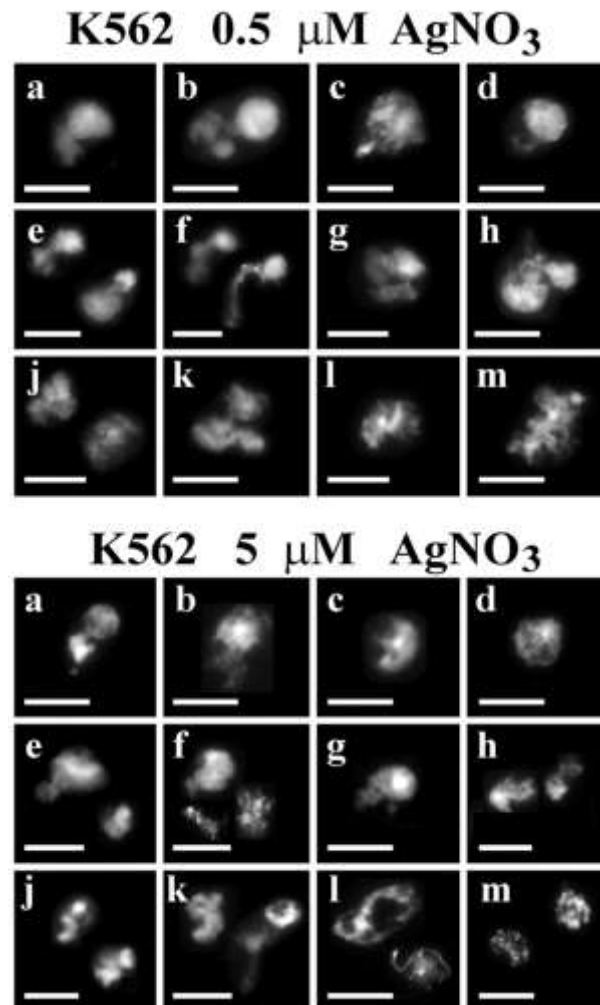


- A: decondenzált kromatin szerkezet
- C-D: fibrózus kromatin
- E: kromatin testek
- F-L: szalagos szupertekercselt kromatin
- M-O: praekromoszómák
- P: metafázisos kromoszómák

19. ábra K-562 kontrol sejtek kromatin szerkezetei

Kromatin szerkezetek az ezüst-nitráttal kezelt K-562 sejtekben

Szubtoxikus dózis feletti és alacsony dózis

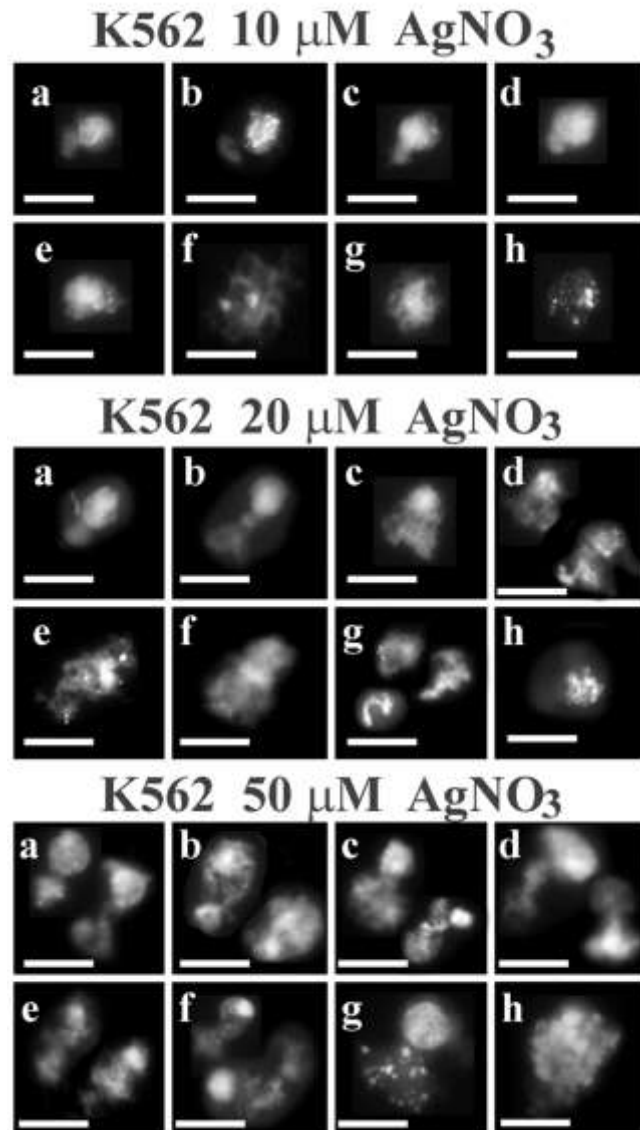


10. ábra 0,5 és 5 μM AgNO₃-mal kezelt K-562 sejtek kromatin szerkezetei

Az alacsony 0,5-5 μM -os ezüst-nitrát koncentrációnál a HaCaT sejteknél megfigyelt változásokat tapasztaltunk. A karakteresen üstökös-szerű szerkezetek megjelenését a K-562 sejtek esetében már a 0,5 μM -os koncentrációnál is megfigyeltük, bizonyítva hogy ezek a sejtek érzékenyebbek az ezüst ionok jelenlétére (0,5 μM a-h kép). A K-562 sejtek érzékenyebb voltát a már kis dózisonál megfigyelhető fátyolszerű szerkezetek megjelenése is alátámasztja (0,5 μM a-m kép).

Az 5 μM -os ezüst koncentrációnál ezek a jelenségek továbbra is megfigyelhetők voltak, de ez esetben az erősebben kondenzálódott kromatin szálas szerkezetei is megjelentek (5 μM k, 1 kép).

Közepes és magas dózis:



111. ábra 10, 20 és 50 μM AgNO_3 -mal kezelt K-562 sejtek kromatin szerkezetei

Közepes és magas 10-50 μM -os ezüst-nitrát koncentráción a K-562 sejteknél is megfigyeltük a sejtmagok méretcsökkenését, illetve ezeknél a sejteknél a magban lévő alkotórészek méretének növekedését is.

A mag méretének csökkenését 10 μM -os ezüst-nitrát koncentrációnál figyeltük meg először. Apoptotikus testeket figyeltünk meg ahol a sejt apoptózison esett át. 20-50 μM -os koncentrációnál a mag méretének csökkenése folytatódik, a maganyag tömörödik, anélkül hogy a mag szétesne. A sejtmag alakja oválissá válik, a maganyag egyre jobban megfeszül a magban. Az apoptotikus testek alacsony száma és a szétszakadozott sejtmagok miatt nem volt egyértelmű az apoptózis vagy a nekrosis túlsúlya.

Összefoglalás

Az ezüst-nitrát citotoxikológiai, és legfőbbképpen a kromatin kondenzálódási intermedierek kialakulására gyakorolt hatásának vizsgálatával az alábbi megállapításokra jutottunk:

Az ezüst-nitrát hatásai a sejtek viabilitására

Bebizonyítottuk, hogy az ezüst-nitrát toxicitása koncentrációfüggő, azaz az egyre nagyobb dózisban adagolt ezüst-nitrát egyre erőteljesebb toxikus hatást gyakorol a sejtekre. Megállapítottuk, hogy a K-562 sejtek (erytroleukémia sejtek) érzékenyebbek az ezüst-nitráttal szemben, mint a HaCaT sejtek (keratinocita sejtek). Ez világosan látszik a minimális inhibíciós koncentrációkból is: HaCaT sejtek esetében: $6.4\mu\text{M}$ AgNO_3 , K562 sejtek esetében: $3,5\mu\text{M}$ AgNO_3 .

Az ezüst-nitrát hatásai a celluláris etológiára

A valós időben történt megfigyelések alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a minimális inhibíciós koncentráció alatti koncentrációk serkentő hatásúak a sejtekre, az e feletti esetében pedig a dózis függvényében valósul meg a gátlás, illetve magas koncentrációknál a kifejezett toxikus hatás. Populációs szinten jelentős elváltozást nem mutatnak a kezelt koncentrációk, az adherens sejteknél a toxikus hatás (sejtpusztulás és a monolayer felválása) a tenyészet kisebb konfluencia értékű területeiről indult ki.

Az ezüst-nitrát hatásai a kromatin kondenzálódásra

Az ezüst és az ezüst-ionok hatása a széles skálájú kromatin szerkezeten korábban még nem volt vizsgálva. Az ezüst-ion, mivel a DNS-be bekötődik, és azzal komplexet képez, hatással

van a DNS javító mechanizmusaira, és a kromatin kondenzálódásra is, ezért feltételezhetően mutagén lehet.

Az ezüst-nitrát kezelést követően kapott mintáinkban nem láttunk metafázisos kromoszómákat. Ez azzal magyarázható, hogy az ezüstnek mutagén hatása lehet, mivel megállítja a sejtciklus folyamatát a G2/M fázisban a replikációban bekövetkező esetleges DNS hibák javítása miatt.

- Az ezüst-nitrát hatásai az alacsonyabb koncentrációkon (10 μ M): a sejtmag a mérsékelt csökkenése nem volt összhangban az apoptotikus testek megjelenésével. A megfigyeléseink során alacsony koncentrációknál nem találtunk apoptotikus vagy nekrotikus sejthalálra utaló jeleket a kromatin szerkezetek vizsgálata közben.
- Magas (10-5 μ M) ezüst-nitrát koncentrációnál figyeltük meg a maganyag sejtmagból történő expanzióját. Elsődlegesen a maghártya átszakadásánál elongált struktúrák, és szalagszerű, kromatinra hasonló szerkezetek jelennek meg a nekrozisra jellemző sejtmagi morfológia nélkül.

Dózistól függően az apoptózis és a nekrozis morfológiai jellemzőinek keveredését láttuk. Ezek a megfigyelések összeegyeztethetők azzal a feltevéssel, hogy az ezüst malignus elváltozásokat okozhat az állatokban. Mindkét sejtvonalon (HaCaT, K-562) megfigyeltük, hogy az ezüst-nitrát mind alacsony, mind magas koncentrációban a kromatin struktúrák széttekeredését okozza, ezzel gátolva a kromatin kondenzálódását.

Irodalomjegyzék

1. Andrea Lugasi (2009) About the toxicity and conditions of use of silver and silver salts. *Orvosi Hetilap*, Akadémiai Kiadó. 150 (32): 1493-1496
2. H Arakawa, J F Neault, and H A Tajmir-Riahi (2001) Silver(I) complexes with DNA and RNA studied by Fourier transform infrared spectroscopy and capillary electrophoresis. *Biophys J.* 81(3): 1580–1587)
3. U.S. EPA. 1985. Drinking Water Criteria Document for Silver (Final Draft). Environmental Criteria and Assessment Office, Cincinnati, OH. ECAO-CIN-026, PB86-118288.
4. Rosenman KD, Moss A, Kon S (1979) Argyria: clinical implications of exposure to silver nitrate and silver oxide. *J Occup Med* 21:430–435
5. ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 1990. Toxicological Profile for Silver. Prepared by Clement International Corporation, under Contract 205-88-0608. U.S. Public Health Service. ATSDR/TP-90-24.
6. Matuk, Y., M. Gosh and C. McCulloch. 1981. Distribution of silver in the eyes and plasma proteins of the albino rat. *Can. J. Ophthalmol.* 16: 145-150. (Cited in ATSDR, 1990)
7. Olcott, C.T. 1948. Experimental argyrosis. IV. Morphologic changes in the experimental animal. *Am. J. Path.* 24: 813-833.
8. Olcott, C.T. 1950. Experimental argyrosis. V. Hypertrophy of the left ventricle of the heart. *Archives of Pathol.* 49: 138-149.
9. Réz Gábor: A sejtciklus motorjai és sebességváltói *Természet Világa*, 133. évf. 3. sz. 2002. március p. 106-109.
10. Stokinger HE (1981) Silver. In: Clayton GD, Clayton E (eds) *Patty's industrial hygiene and toxicology*, vol 2A. Wiley, New York, pp 1881–1894
11. Lozzio CB, Lozzio BB (1975) Human chronic myelogenous leukemic cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45: 321-334

12. Boukamp P, Dzarlieva-Petrusevska RT, Breitkreuz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* 106: 761-771, 1988.
13. Boukamp P, Popp S, Altmeyer S, Hülsen A, Fasching C, Cremer T, Fusenig NE. Sustained nontumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosome content during long-term culture of the human keratinocyte line HaCat. *Genes, Chromosomes and Cancer* 19: 201-214, 1997.
14. Koefler HP, Golde DW (1980) Human myeloid leukemia cell lines: a review. *Blood* 56(3):344-50
15. Nagy G, Pinter G, Kohut G, Adam AL, Trencsenyi G, Hornok L, Banfalvi G. Time-Lapse Analysis of Cell Death in Mammalian and Fungal Cells. *DNA Cell Biol.* 2010 Mar 10.
16. Farkas E, Ujvarosi K, Nagy G, Posta J, Banfalvi G. Apoptogenic and necrogenic effects of mercuric acetate on the chromatin structure of K562 human erythroleukemia cells. *Toxicol In Vitro.* 2010 Feb;24(1):267-75. Epub 2009 Aug 31.
17. Banfalvi G, Klaisz M, Ujvarosi K, Trencsenyi G, Rozsa D, Nagy G. Gamma irradiation induced apoptotic changes in the chromatin structure of human erythroleukemia K562 cells. *Apoptosis.* 2007 Dec;12(12):2271-83.
18. Ujvarosi K, Hunyadi J, Nagy G, Pocsi I, Banfalvi G. Preapoptotic chromatin changes induced by ultraviolet B irradiation in human erythroleukemia K562 cells. *Apoptosis.* 2007 Nov; 12(11):2089-99. Epub 2007 Aug 14.
19. Trencsenyi G, Ujvarosi K, Nagy G, Banfalvi G. Transition from chromatin bodies to linear chromosomes in nuclei of murine PreB cells synchronized in S phase. *DNA Cell Biol.* 2007 Aug; 26(8):549-56.
20. Banfalvi G, Trencsenyi G, Ujvarosi K, Nagy G, Ombodi T, Bedei M, Somogyi C, Basnakian AG. Supranucleosomal organization of chromatin fibers in nuclei of *Drosophila* S2 cells. *DNA Cell Biol.* 2007 Jan;26(1):55-62.
21. Banfalvi G, Ujvarosi K, Trencsenyi G, Somogyi C, Nagy G, Basnakian A. Cell culture density dependent toxicity and chromatin changes upon cadmium treatment in murine pre-B-cells. *Apoptosis.* 2007 Jul; 12(7):1219-28.

22. Nagy G, Turani M, Kovacs K E, Banfalvi G. Chromatin changes upon silver nitrate treatment in human keratinocyte HaCaT and K562 erythroleukemia cells. In: Cellular effects of heavy metals. G. Banfalvi ed. Springer, Dordrecht 2010
23. Laza, D., Ujvarosi, K., Nagy G., Banfalvi, G. Chromatotoxic effects of Ni(II) ions in K562 erythroleukemia cells. In: Cellular effects of heavy metals. G. Banfalvi ed. Springer, Dordrecht 2010
24. Hidalgo, E., Domínguez, C., 1998. Study of cytotoxicity mechanisms of silver nitrate in human dermal fibroblasts. *Toxicol. Lett.* 98, 169-179.
25. Hidalgo, E., Bartolomé, R., Barroso, C., Moreno, A., Domínguez, C., 1998. Silver nitrate: antimicrobial activity related to cytotoxicity in cultured human fibroblasts. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 11, 140-151.
26. Hussain, S., Anner, R.M., Anner, B.M., 1992. Cysteine protects Na, K-ATPase and isolated human lymphocytes from silver toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189, 144-149.

Képjegyzék

1. ábra Az ezüst	6
2. ábra Az ezüst-nitrát.....	9
3. ábra a sejtciklus morfológiai és időbeli lefolyása.....	12
4. ábra A Long-Term Scan rendszer.....	18
5. ábra A Long-Term Scan sematikus felépítése.....	19
1. grafikon: A különböző AgNO ₃ koncentrációk hatása HaCaT sejteken.....	22
2. grafikon A különböző AgNO ₃ koncentrációk hatása K-562 sejteken	23
1. táblázat Az AgNO ₃ koncentrációkra bekövetkező %-os sejtpusztulás.....	23
6. ábra HaCaT kontroll Time-Lapse Imaging fotók	25
3. grafikon HaCaT kontroll scan	25
7. ábra 0,5 uM AgNO ₃ -mal kezelt HaCaT Time-Lapse Imaging fotók	27
4. grafikon 0,5 uM AgNO ₃ -mal kezelt HaCaT tenyészet scan.....	27
8. ábra 10 uM AgNO ₃ -mal kezelt HaCaT Time-Lapse Imaging fotók	28
5. grafikon: 10uM AgNO ₃ -mal kezelt HaCaT tenyészet scan.....	28
9. ábra 30uM AgNO ₃ -mal kezelt HaCaT Time-Lapse Imaging fotók	29
6. grafikon 30 uM AgNO ₃ -mal kezelt HaCaT tenyészet scan.....	29
10. ábra 50uM AgNO ₃ -mal kezelt HaCaT Time-Lapse Imaging fotók	30
7 grafikon 50 uM AgNO ₃ -mal kezelt HaCaT tenyészet scan.....	31
11. ábra K-562 kontrol	32
8. grafikon K-562 kontrolról készített grafikon.....	32
12 ábra 0,5 uM AgNO ₃ -mal kezelt K-562.....	33
13. ábra 50 uM AgNO ₃ -mal kezelt K-562.....	33
9. grafikon 0,5 uM AgNO ₃ scan grafikonja.....	34
10. grafikon 50 uM AgNO ₃ scan grafikonja.....	34
14. ábra HaCat kontrol kromatin szerkezetek	35
15. ábra HaCat 0,5 uM AgNO ₃ -mal kezelt sejtek kromatin szerkezetei	36
16. ábra HaCat 5, és 10 uM AgNO ₃ -mal kezelt sejtek kromatin szerkezetei	37
17. ábra HaCat 15, és 20 uM AgNO ₃ -mal kezelt sejtek kromatin szerkezetei	38
18. ábra HaCat 30, és 50 uM AgNO ₃ -mal kezelt sejtek kromatin szerkezetei	39

19. ábra K-562 kontrol sejtek kromatin szerkezetei	40
20. ábra 0,5 és 5 uM AgNO ₃ -mal kezelt K-562 sejtek kromatin szerkezetei	41
21. ábra 10, 20 és 50 uM AgNO ₃ -mal kezelt K-562 sejtek kromatin szerkezetei	42