

Kiterjesztett time-lapse imaging rendszer a citotoxikológiában

Tartalom

Bevezetés.....	3
Time-lapse imaging rendszer	3
A Long-Term Scan rendszer	7
Time lapse imaging rendszer alkalmazása	10
Toxicológiai vizsgálataink	11
Nehézfémtoxikológia	11
<i>Vipera berus</i> toxin hatásai HaCaT sejtekre.....	16
A sejtmentes fermentlé hatásai HaCaT sejtpopulációra.....	22
<i>In-vitro</i> evolúció HaCaT sejteken	24
Korábbi vizsgálataink a time-lapse imaging rendszerrel	26
Képanalízis ImageJ program használatával	27
Az ImageJ program bemutatása	27
Az ImageJ használata sejtszámoláshoz és animáció készítéséhez	29
Generációs idő meghatározása	30
Videó készítése.....	31
Összefoglalás.....	32
Kitekintés: a time –lapse imaging rendszer a további vizsgálatokban.....	33
Irodalomjegyzék:.....	33
Képjegyzék:.....	36

Bevezetés

A sejttani kutatások alapját a különböző sejtpopulációk képezik. A sejtek viselkedését és toxikus ágensekkel szembeni ellenálló képességét a sejtek belső és külső körülményei jelentősen befolyásolják. A belső körülményeket a sejtek fiziológiás állapota jelenti, azonban a külső körülményeket a sejt-sejt közötti, azaz intracelluláris viszonyok jelentősen befolyásolják.

A time-lapse imaging rendszer egy, a sejtpopulációk hosszú távú megfigyelésére alkalmas rendszer. A vizsgálat során a sejttenyészetekről percenként készített felvételekből videofilmet készítve tanulmányozzuk a sejtpopulációkban végbemenő változásokat.

A rendszer előnyei közül kiemeljük, hogy a vizsgálat teljes időtartama alatt lehetőségünk van a sejtek megfigyelésére, illetve a megfigyelésünk digitális rögzítésére. E mellett nagyon fontos az is, hogy a vizsgálatok teljes időtartama alatt biztosítjuk a sejtek számára megfelelő fiziológiás körülményeket.

Time-lapse imaging rendszer

A Debreceni Egyetem Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszék eTox munkacsoportja 2005-ben kifejlesztett egy mikroszkópos rendszert, mely 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 videofelvétellé 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 (1). Az adatgyűjtés három, hat

sejtgenerációt átfogó időtartama lehetővé teszi a transzgenerációs, akkumulálódó genotoxicitás, illetve kemotaxis vizsgálatát is (2).

A TLS 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.

Apoptózis és nekrozis

Természetes sejthalálformákat már a 19. században megfigyeltek fénymikroszkóp segítségével.

Azonban az 1960-as évekig váratott magára a programozott sejthalál koncepciója, amikor a molekuláris gondolkodásmód kiteljesedett. Az apoptotikus sejt összezsugorodik, az extracelluláris mátrixról és a sejtet körülölelő szomszédos sejtekről leválva (szeparáció) lekerekedik, hólyagosodik a felszíne, magja kisebbedik (karyopyknosis), kromatin állománya kondenzálódik és a maghártya mentén rendeződik (marginalizáció), ezt követően a mag feltöredezik (karyihexis), emellett viszont a sejt organellumai és a sejthártya integritása megmarad. Végül pedig a makrofágok és más szomszédos sejtek is bekebelezik, valamint apoptotikus testek fragmentálódnak. A sejthártya a folyamat ideje alatt végig ép marad így az intracelluláris makromolekulák nem jutnak ki, tehát következményes gyulladás és szövetkárosodás nem jön létre. Az apoptózis aktív, azaz „energiaigényes” és gyulladásmentes folyamat.

Az apoptózissal szemben a nekrozis passzív folyamat. Durva behatások által létrejövő nagyobb sejtpopulációt érintő sejthalál. A sejt és ezen belül a sejtmag megduzzad, lizoszómák szétesnek, végeredményben pedig a sejt mintha csak szétpukkanna, bekövetkezik a sejt lízise. A sejtmembránok integritása nem marad meg, kiáramló sejttartalomnak köszönhetően sejtkárosodás, gyulladás során fellépő hegesedés és gyulladásmos reakció következik be. Nemrégiben leírt tanulmányok kimutatták, hogy az apoptózis és a nekrozis morfológiájának kettősége nem elég arra vonatkozólag, hogy be tudjunk sorolni minden sejthalálformát.

Több adat alapján valószínűsíthető, hogy nemcsak az apoptózis lehet programozott sejthalál, hanem a nekrosis is. Ilyen sejthalált okozhatnak ligandok, melyek specifikus membránreceptorokhoz kötődnek. Nekrotikus sejthalál figyelhető meg kifejlődött szövetek homeosztázisában és az embrionális fejlődésben. A nekrosis a Szerin/ Treonin kináz aktivitástól függő sejthalálforma. Ezen típust nemcsak genetikailag, hanem epigenetikailag és gyógyszeresen is lehet szabályozni.

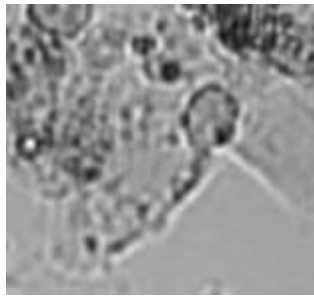
Az apoptózis indukciója:

A programozott sejthalál kiváltásában és szabályzásában endogén és exogén tényezők lényeges szerepet töltenek be. Ezek a tényezők hatásukat tekintve gátló és serkentő hatásúak. Külső tényezők jelenlététől függ (legyenek azok különböző növekedési faktorok, hormonok vagy citokinek), hogy bekövetkezik-e az apoptózis vagy sem. Apoptózis indukálóként is részt vehetnek a folyamatban vagy épp ellenkezőleg, annak indukálásában játszanak szerepet. Kulcsfontosságú szerepet tölt be a TNF (tumor nekrosis faktor) citokin család, amely családot „halál ligandnak” is nevezik továbbá a FAS ligand is jelentős szereppel bírhat az apoptózis folyamatában. Ez a ligand olyan sejtfelszíni receptorokhoz kötődik, melyek a közös jellemzője, hogy halál domént (DD) tartalmaznak az intracelluláris terükben. A programozott sejthalál másik útvonalát képezheti a mitokondrium segítségével megvalósuló folyamat, azaz a sejtet érő végzetes ágensek (különböző sugárzások (γ vagy UV), reaktív oxidatív gyökök, toxinok, gyógyszerek, mérgek) hatását követően bekövetkező apoptotikus forma. Egy p53 nevezetű fehérje nemcsak a sejtek öregedésében, hanem a sejtciklus megállításában, illetve az apoptózis kezdeményezésében is részt vesz.

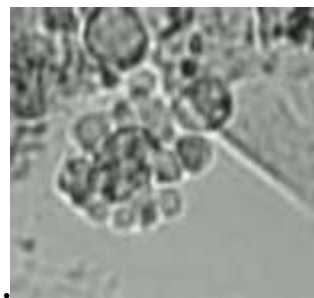
Apoptózis gátlása:

Az anti-apoptotikus hatású Bcl-XL, Bcl-2, Bcl-w fehérjék a sejttúlélésben játszanak közre, élettartamot hosszabítanak sejthalál adapterekhez kötődve, így meggátolják a kaspáz aktiváló képességet.

Az apoptózis és nekrosis képekben szemlélítve

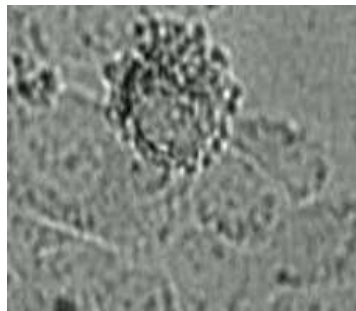


1. ábra Az apoptózis eleje

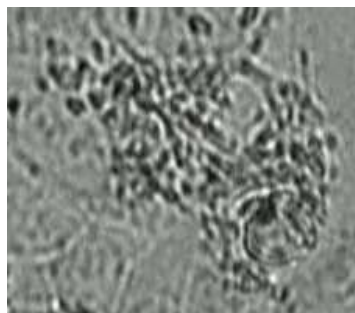


2. ábra Az apoptózis vége

(A videófelétel a DVD mellékleten az I. DVD-n található apoptózis melanoma HaCat file)



3. ábra A nekrosis kezdete



4. ábra A nekrosis vége

(A videófelétel a DVD mellékleten az I. DVD-n található a HaCat nekrosis file.)

A Long-Term Scann rendszer

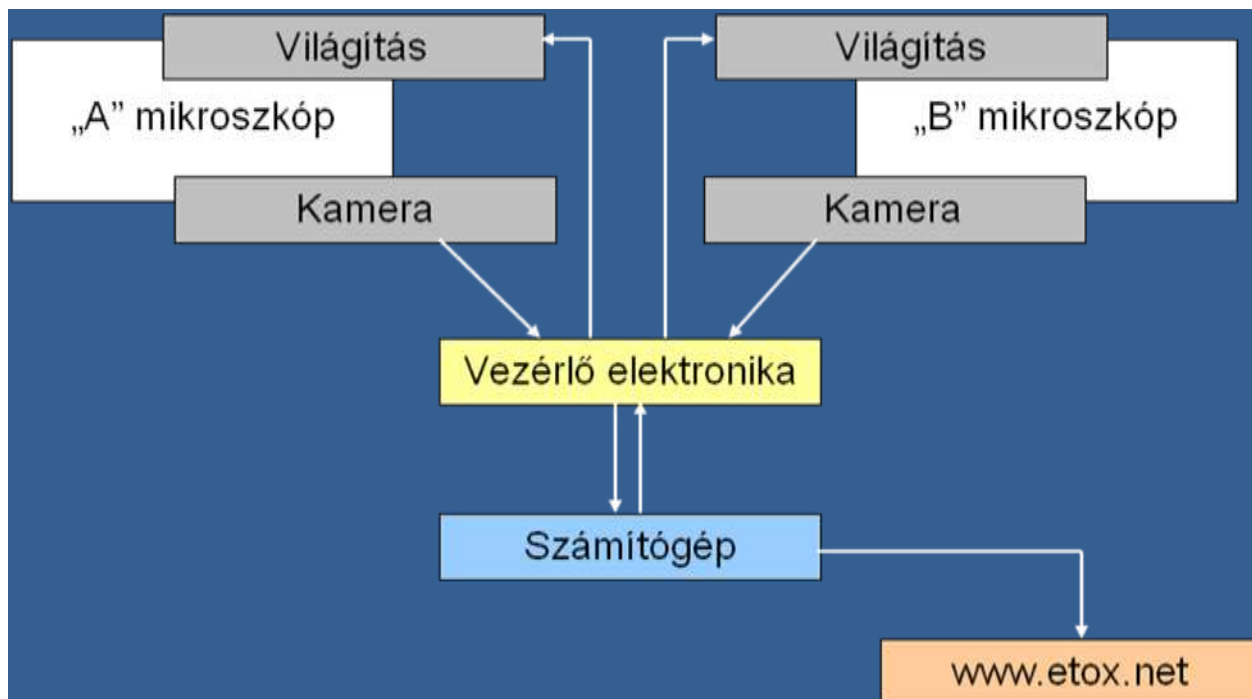
Felépítés:

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 kiálasztása, 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 mentés panelen a képtárolás formátumát is változtathatjuk (BMP, agy JPEG formátum). A szoftver lehetővé teszi az interneten keresztül történő távvezérlést is.



5. ábra A Long-Term Scann rendszer fotója



6. ábra A LTS rendszer sematikus felépítése

Működés:

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

Bizonyítottuk, hogy rendszerünkben a citotoxicitás kvantitatívan jellemezhető, karakterisztikus változásokat hoz létre mind celluláris, mind pedig populációs szinten (7). A citotoxicitás kromatinszintű megnyilvánulását szinkronizált sejtpopulációkon sztenderdizált kromatinszerkezet elemzéssel vizsgáltuk (3, 5, 6). Az LTS rendszerrel megvizsgált tenyészetekből izoláltuk a sejtmagokat, és reverzibilis permeabilizálást követően a feltárt sejtmagok kromatinstruktúráját fluoreszcens mikroszkópiával elemeztük (8). Bizonyítottuk, hogy az interfázisos kromoszómák metafázisos kromoszómákká szerveződése (a kromatin kondenzálódás) morfológiailag jól jellemezhető módon zavart szenved citotoxikus hatásokra (9, 10). A kiváltott kromatinkondenzálódási zavarok jellegzetes kondenzálódási intermedierek megjelenését eredményezik.

A bemutatott rendszer és metodika alkalmas különböző hatóanyagok citotoxikológiai vizsgálatára, mert a klasszikus citotoxicitást jellemző kvantitatív paramétereken túl lehetővé

teszi a lokális korai sejtválasz megfigyelését olyan koncentrációtartományban, mely sejtpopulációs szinten még nem okoz észlelhető változásokat. Ez a vizsgálati rendszer különösen akkor előnyös, ha a citotoxikus ágens megoszlása az inkubációs közegben heterogén, illetve ha a sejt-sejt kölcsönhatások kiemelt jelentőséggel bírnak. A várható eredmények elősegítik a sejtek citotoxikus hatásokra adott egyedi és populációs szintű válaszáinak mélyebb megismerését.

Az LTS rendszer az alábbi külső kutatások során került felhasználásra:

- Primer sejt kultúrák differenciálódásának vizsgálata.
- Heterogén összetételű (HaCat/Melanoma) sejt populációk celluláris interakciói. Melanoma sejtekről készített videofelvételt a II. DVD-n található Melanoma20061116 elnevezésű fájlban figyelhetünk meg.
- Tumor-bioassay vizsgálatok.
- Nanoszelen részecskék celluláris hatásai.
- Patogén gombák és HaCat monolayer interakciója.
- Nehézfémek, UV és gamma-sugárzás, illetve oxidatív stressz vizsgálata.

Time lapse imaging rendszer alkalmazása

A sejtek tenyésztési körülményei

A kutatásaink során szuszpenziós, (K-562, humán eritroleukémia sejtvonal) és adherens (HaCaT humán keratinocita immortalizált sejtvonal) sejt kultúrákat vizsgáltunk különböző toxikus anyagok jelenlétében.

A sejteket RPMI-1640 tápfolyadékban tenyésztettük. A médiumhoz 10% FBS-t 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).

A tenyésztés során mindkét sejtvonalnál a kiindulási sejtszám 10⁶ 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 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 AgNO₃ koncentrációnál

A munkánk során az alábbi kutatásokban vettünk részt:

- Toxikológiai kutatásaink során vizsgáltuk a különböző nehézfémek citotoxikológiai hatásait. A mi hallgatói csoportunk az ezüst-nitrát citotoxikológiai vizsgálatát végezte el.
- A toxikológiai vizsgálataink során megfigyeltük a keresztes vipera (*Vipera berus*) mérgének sejtekre gyakorolt hatásait.
- Ipari megrendelésre elvégeztük a sejtmentes fermentlé toxikus hatásának vizsgálatát humán sejt kultúrára.
- A különböző korú sejttenyészetek viselkedésének, morfológiájának összehasonlításával a munkacsoportunk tanulmányozta a sejtek kísérleti körülmények között lezajló fejlődését.

Toxikológiai vizsgálataink

Nehézfémtoxikológia

A nehézfém toxikológiai vizsgálatok során a különböző nehézfémek toxikus hatásait vizsgáltuk a sejtek szintjén.

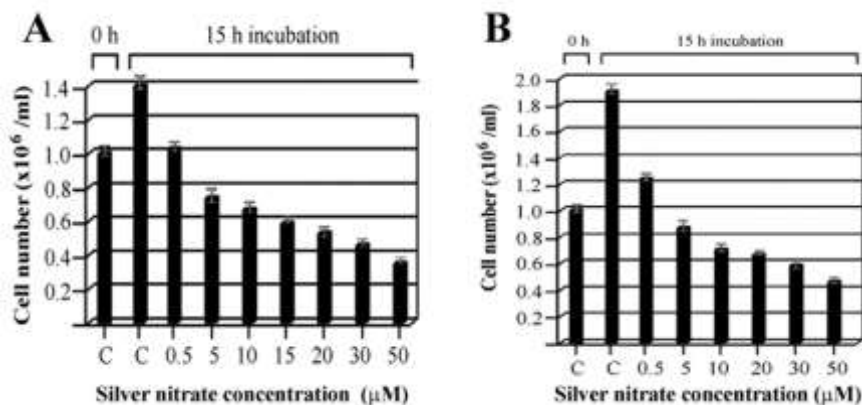
Ezüst-nitrát HaCaT és K-562 sejteken (8)

A szakirodalomban közölt Ld_{50} koncentrációk alapján hasonló koncentrációkat használtunk a vizsgálataink során. Mindkét sejtípusnál ugyanazokat az ezüst-ion mennyiségeket használtuk. Az ezüst ionok citotoxikológiai hatásainak vizsgálatával megállapítottuk a minimális gátló koncentrációt: ez az a legkisebb koncentráció, ami sejtek növekedését 50%-ban gátolja.

Ez a koncentráció érték HaCaT sejteknél: 6,4 mikroM $AgNO_3$ milliliterenként, K-562 sejteknél: 3,5 μM $AgNO_3$ milliliterenként.

További eredményeink az ezüst citotoxikológiai hatásaira:

Az ezüst-nitrát hatása függ a koncentrációtól: a különböző ezüst koncentrációk jelenlétében a sejtpusztulás és az ezüstionok mennyisége között egyenes arányosság figyelhető meg.



7. ábra (A) a HaCaT és a K-562 (B) sejtek sejtek növekedésének gátlása különböző ezüst-nitrát koncentrációk jelenlétében

A. A kilenc HaCaT sejt kultúra esetében a kiindulási sejtszám 10^6 sejt/ml volt. A kontrollhoz viszonyítva bekövetkező növekedésváltozás látható a különböző ezüst-nitrát kezelések után.

B. A K-562 sejtek növekedése látható a vizsgált ezüst-nitrát koncentrációk jelenlétében. A kiindulási sejtszám ez esetben is 10^6 sejt/ml volt. A kontroll populációkat nem kezeltük (C) A kezelés után minden esetben viabilitás vizsgálat történt.

Bebizonyítottuk, hogy az ezüst-nitrát toxicitása koncentrációfüggő. A HaCat sejt kultúrájánál (10^6 sejt/ml) 0.5- és $50\mu\text{M}$ -os koncentrációjú AgNO_3 oldattal 15 órán keresztül és 37°C -os hőmérsékleten kezeltük a sejteket. A kontrollt nem vetettük alá AgNO_3 -os kezelésnek. Az ezüst-nitrát ($\leq 0,1\ \mu\text{M}$) szubtoxikus szintjei nem okoztak toxicitást.

Feltűnő változásokat tapasztaltunk a túlélését tekintve, 0.5, 5, 10, 15, 20, 30 és $50\mu\text{M}$ Ag-ion jelenlétében, ennek megfelelően 28, 47, 52, 58, 62, 67 és 75%-os sejtvesztést figyeltünk meg. 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 K562 sejtek esetében :32, 54, 60, 64, 69, 72 és 77%-os sejtpusztulást tapasztaltunk. A MIC 50 érték K562 sejteknél: $3,5\ \mu\text{M}$ AgNO_3 . Ebből arra következtethetünk, hogy a K562 sejtek érzékenyebbek az ezüst-nitrátra, mint a HaCat sejtek.

A HaCaT sejtek esetében a time-lapse imaging módszerrel az alábbi jelenségeket figyeltük meg:

$0,5\mu\text{M}$ -os Ag-ion koncentrációnál a sejtek osztódásai normális ütemben zajlottak, mozgásuk dinamikája megfelelő, azaz számottevő hatást nem figyeltünk meg ebben az esetben.

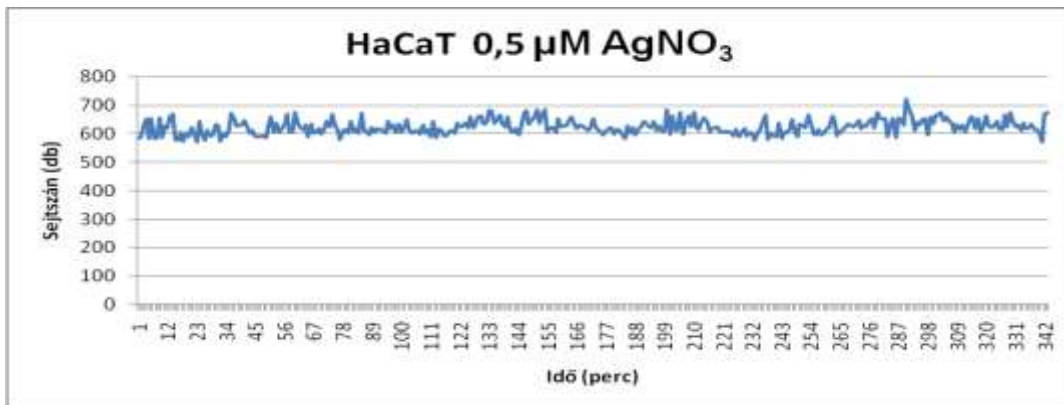
Enyhe változást az $5\mu\text{M}$ -os Ag koncentrációnál figyelhetünk meg. A sejtek osztódásának dinamikájában csökkenő tendencia következett be. A $10\ \mu\text{M}$ -os Ag koncentrációnál az osztódások sebessége tovább csökken, a sejtek nagy része osztódás közben elpusztul, a tenyészet nem képes a 100%-os konfluencia szint elérésére.

$15\ \mu\text{M}$ -os Ag koncentrációnál még viszonylag sok sejt osztódik, de az osztódások sebessége csökken, és a sejtek letapadásának időtartama nő.

$20\ \mu\text{M}$ -os Ag koncentrációnál a monolayer egy része paralizist szenved, a sejtek mozgása megbénul. Ez a folyamat belülről kifelé terjed.

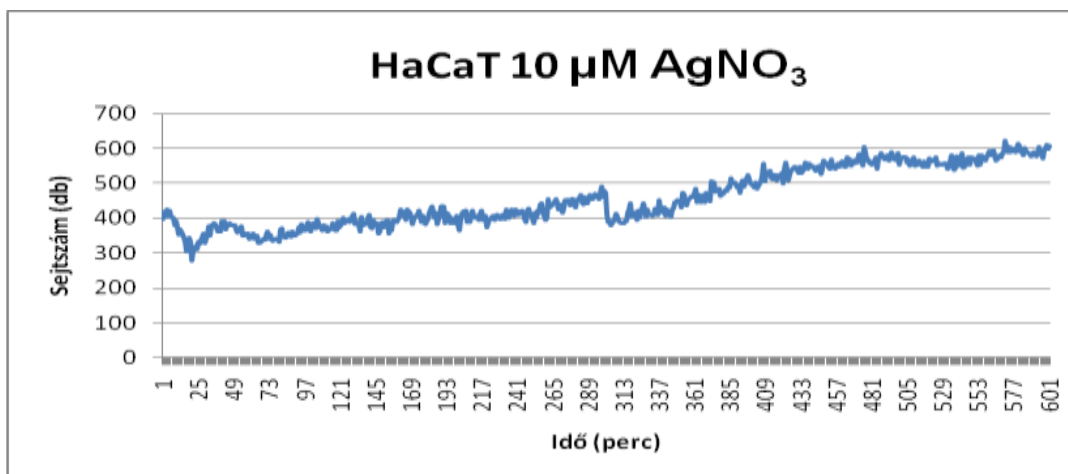
$30\ \mu\text{M}$ -os Ag koncentrációnál a monolayer megmerevedik, gyors nekrozis következik be a kisebb konfluenciájú tenyészeteken. A 100%-os konfluenciájú tenyészeteken még látható osztódás, de itt is gyorsan végbemegy a sejtek pusztulása.

$50\ \mu\text{M}$ -os Ag koncentrációnál az ezüst-nitrát hozzáadását követően a monolayer azonnal felszakad, és a sejtek nekrozissal történő pusztulása figyelhető meg.



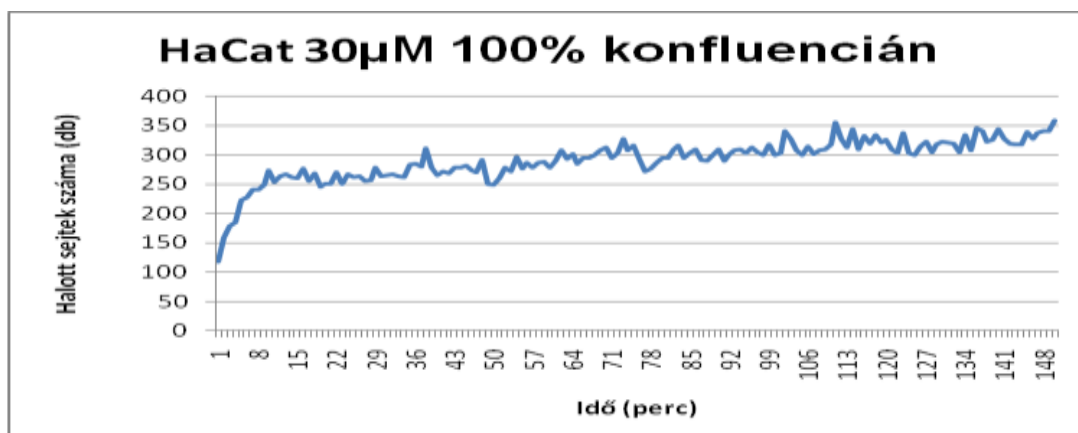
8. ábra HaCat sejtszám változás 0,5 µM-os ezüst-nitrát koncentrációjánál

(A videó felvétel az I. DVD-n található.)



9. ábra. HaCat sejtszám változás 10 µM-os ezüst-nitrát koncentrációjánál

(A videó felvétele az I. DVD-n található.)



10. ábra: Halott sejtek száma 30µM koncentrációjánál 100%-os konfluencián

(A videofelvétel a DVD mellékleten I .DVD)

Publikált kutatások

A tanszékünkön már számos vizsgálat történt a nehézfémek sejtekre gyakorolt hatásainak tanulmányozására. Ezen vizsgálatok közül már több jelent meg nemzetközi folyóiratokban publikálva.

A nehézfém-toxicológiai vizsgálatok a fent leírt, a tanszéken kifejlesztett metodika alapján zajlottak.

Higany-acetát hatásai K-562 sejteken: (2)

A hosszú távú megfigyelések során az alábbi eredményeket tapasztaltuk:

Az 1 μM és az ez alatti Hg(II) ion koncentrációk nem toxikus hatásúak. A 10 μM -osnál magasabb higany koncentrációnál apoptózis jellemző, 100 μM -os higany koncentráció felett a sejtek mérete megnő, nekrosis következik be. (3. ábra)

Nikkel-klorid hatásai K-562 sejteken: (9)

Munkacsoportunk Meghatározta a MIC50 értékét, ami 2 μM , ami azt mutatja, hogy a Ni(II) ionok már kis koncentrációban is toxikus hatásúak voltak.

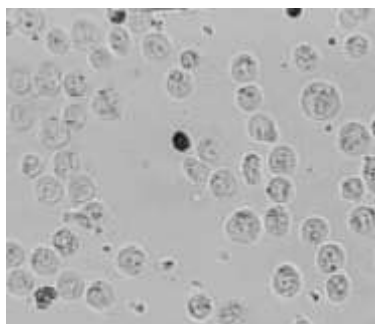
A kezelés a magasabb Ni(II)-ion koncentrációknál (10-50 μM) nem okozott intenzív mozgást az apoptózis során, de a 100 μM -os koncentráció fölött már mozgásintenzitás növekedést figyelte meg ez azonban csak időszakos volt.

A magasabb koncentrációkon a sejtek méretének növekedése volt megfigyelhető, ami a nekrosis felé való átmenetet mutatja az apoptózis felől.

Jellemző hatást figyelte meg a 100 μM -os koncentrációnál. (4. ábra)

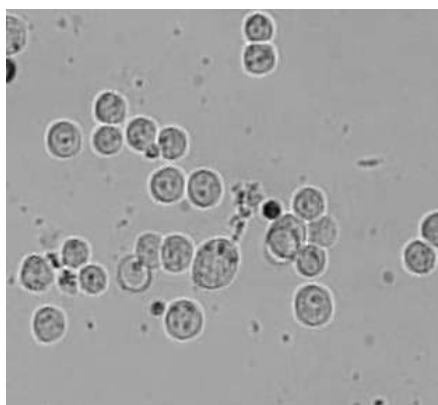
A nikkel károsítja a sejtmembránt, ami felszakad, így a sejtek a tartalma a külvilágba kerül.

Time-lapse imaging a különböző nehézfémek hatásairól:



11. ábra Hígany-acetát jellemző hatása K-562 sejtekre 100 μ M

(A videofelvétel a DVD mellékleten: I DVD)



12. ábra Nikkel-klorid jellemző hatása K-562 sejtekre 100 μ M

(A videofelvétel a DVD mellékleten: I DVD)

***Vipera berus* toxin hatásai HaCaT sejtekre**

A vizsgálat során tisztítatlan, szűretlen „nyers” mérget használtunk, tehát a mérget a lefejtés után nem kezeltük tovább.

A viperaméreg tartalmazta a vipera szájában természetes körülmények között ott lévő baktériumflórát, illetve a mérge lefejtése során belekerült egyéb szennyezőanyagokat is.

A *Vipera berus* toxinjának fő összetevői közé tartoznak a neurotoxinok, és a myotoxinok. A neurotoxinok az ideg-izom közötti ingerület átvitelt megakadályozva bénulást okoznak.

A myotoxinok emésztőenzimekből levezethető fehérjék csoportja. Főképp az izomsejteket károsítják. A *Vipera berus* mérgeiben a foszfolipáz-A mennyisége jelentős.

A tenyészetben főképp a myotoxinok hatása érvényesült.

A vizsgálatban használt mérge-hatóanyagok:

Hozzáadott toxin mennyisége (µl)	Tápfolyadék mennyisége (ml)	Toxin végső mennyisége (g/ml)
0,1	4,5	$6,2 \cdot 10^{-8}$
0,5	5,1	$2,74 \cdot 10^{-7}$
0,7	4,8	$4,08 \cdot 10^{-7}$
1,2	4,9	$6,85 \cdot 10^{-7}$
5	5,2	$2,689 \cdot 10^{-6}$
5	4,9	$2,854 \cdot 10^{-6}$

13. ábra A *Vipera berus* toxin végső hatóanyag mennyiségei.

A toxin hatása a legkisebb koncentráción és nagy konfluencián - a vizsgálat első felében ezt a koncentrációt 100%-os konfluencián vizsgáltam-, még nem figyelhető meg. A sejtek normális ütemben osztódnak, mozgásuk is dinamikus. Nekrózisra utaló jel nem látható a képeken.

A kisebb konfluenciájú tenyészeteken - a vizsgálat második felében – 70-80%-os konfluencia esetében- azonban, a sejtek toxinnal való nagyobb felületen történő érintkezése miatt gyorsan bekövetkezik a mérge hatása. A sejtek mozgása megbénul, paralizist szenved, a monolayer felválk, a sejtek nagy többségénél nekrózis következik be.

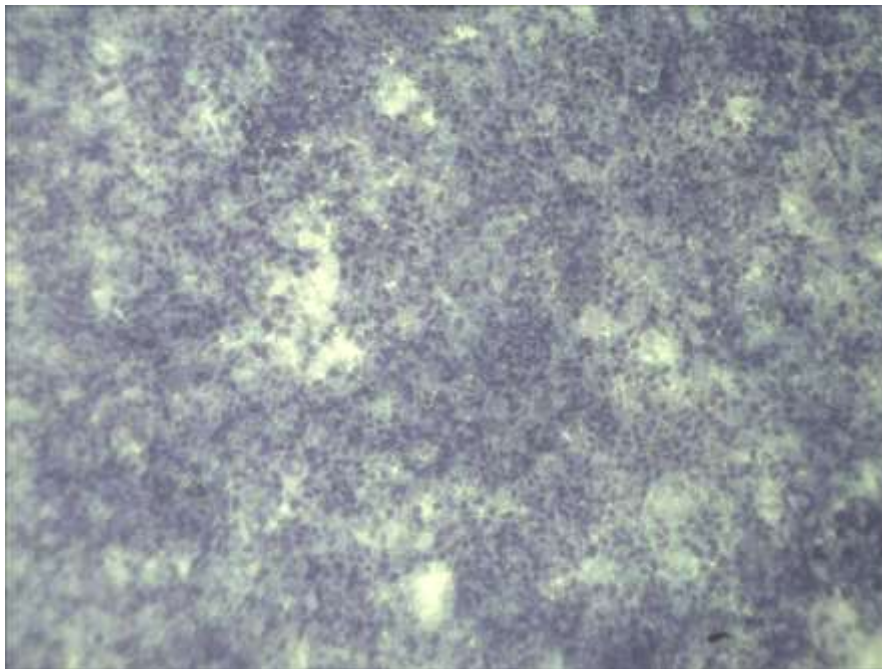
A nagyobb konfluencián 90-100% a sejtek szorosan egymás mellé csoportosulnak, és védik magukat és egymást a toxin hatásaitól. A konfluencia mértéke jelentősen befolyásolja a toxikus hatást (a nagyobb konfluenciájú tenyészetek hosszabb ideig életben maradtak a védő funkció miatt, emellett a magasabb sejtszám nagyobb puffer rendszer kapacitást biztosít a toxinban lévő enzim emésztő funkciója ellen).

A nagyobb toxin koncentráción ezek folyamatok gyorsabb lefolyásúak, a sejtek kevésbé tudnak védekezni az emésztő funkció ellen.

Szakirodalmi adatok alapján a *Vipera berus* méregnek egéren az LD₅₀ értékei: intravénásan vérbe kerülve: 0,55 µg/g; intraperitonealisan a véráramba kerülve: 0,80 µg/g; bőr alá szubkután: 6,45 µg/g. (10)

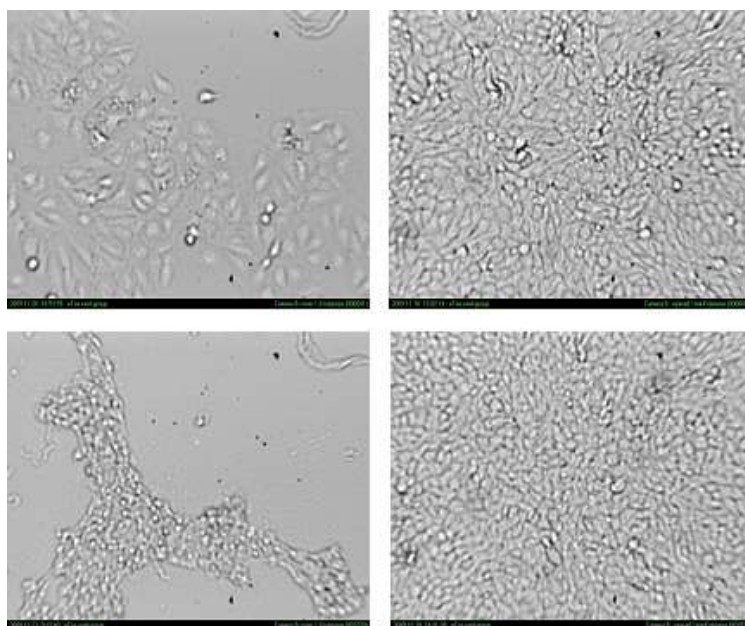
Mi a legkisebb koncentrációnál, ahol $6,2 \cdot 10^{-8}$ g/ml volt a toxin hatóanyagtartalma ez átszámolva 0,062 µg/g is érzékelhető hatást tapasztaltunk a kisebb konfluenciájú tenyészeteknél. Ezek alapján megállapítható, hogy mi már egy nagyságrenddel kisebb koncentrációnál is megfigyeltük a méreg hatását.

A viperatoxin hatásai 0,1 µl koncentrációnál a különböző konfluencia értékekenképpen szemléltetve:



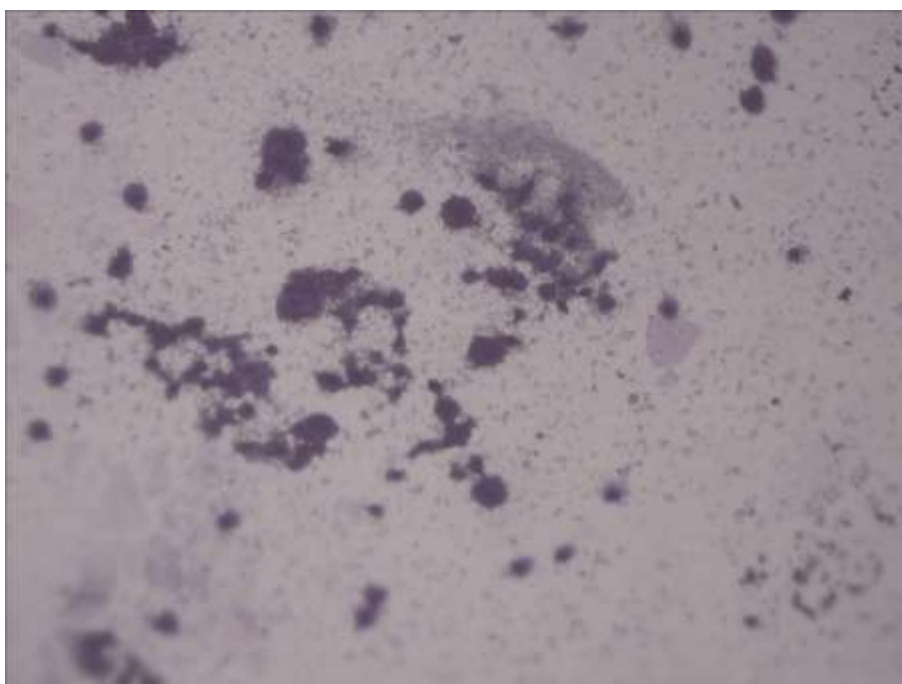
14. ábra 0,1 µl toxin hatása 100% konfluencián, kép a tenyésztőedényről 10X objektív Giemsa festés

Képek a tenyészetekről 0,1 μ l toxin hatása a long-tern scann felvételei:



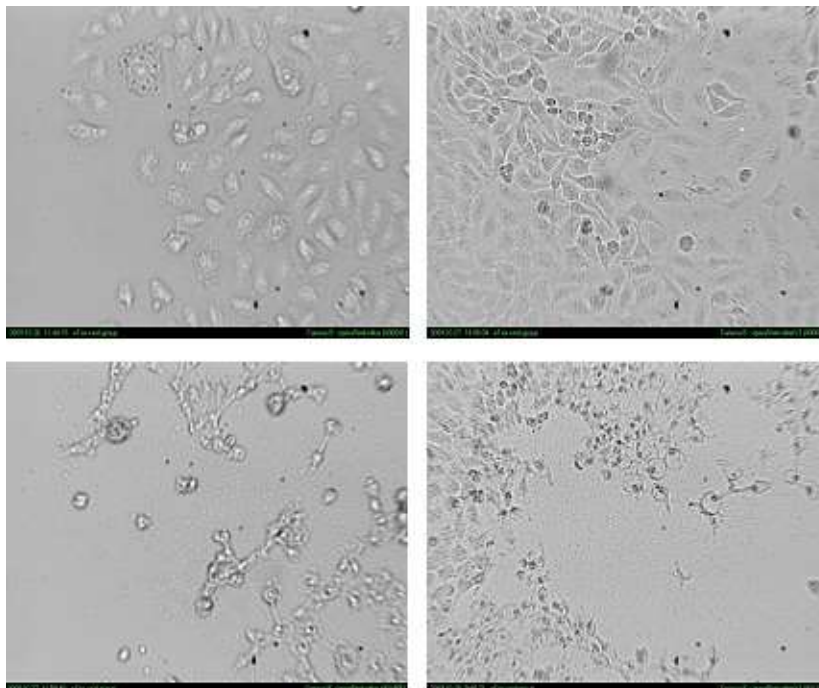
15. ábra 0,1 μ l toxin 70%-os és 100%-os konfluencián a felső kép a 0. percben készült

A viperatoxin hatásai 5 μ l-es koncentrációnál, különböző konfluencia értékeken szemléltetve:



16. ábra μ l toxin hatása 100% konfluencián, kép a tenyésztőedényről 10X objektív Giemsa festé

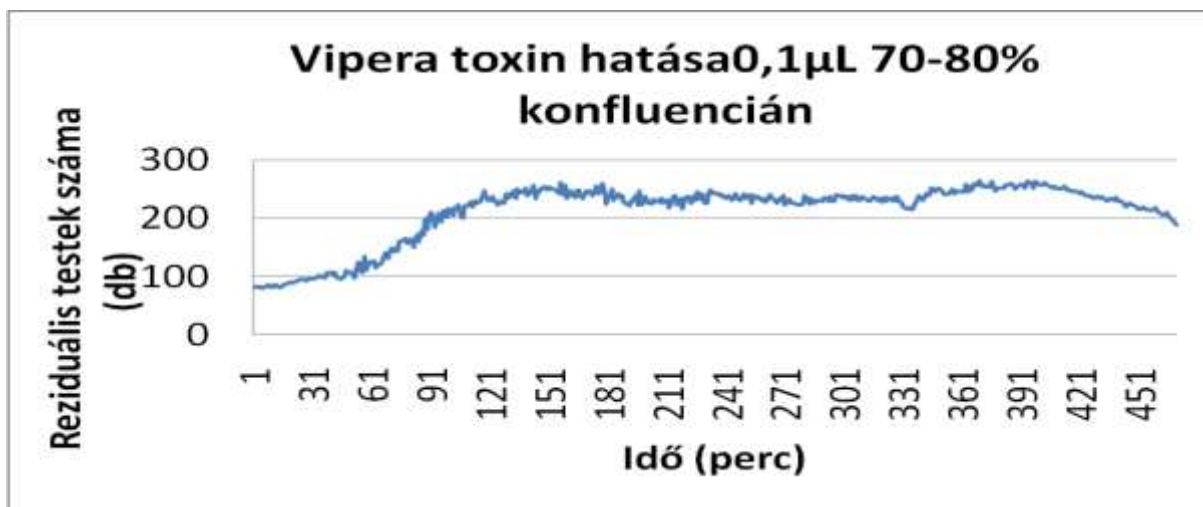
Képek a tenyészetekről 5 µl toxin hatása a long-tern scann felvételei:



17. ábra 5 µl toxin 70%-os és 100%-os konfluencián a felső kép a 0. percben készült

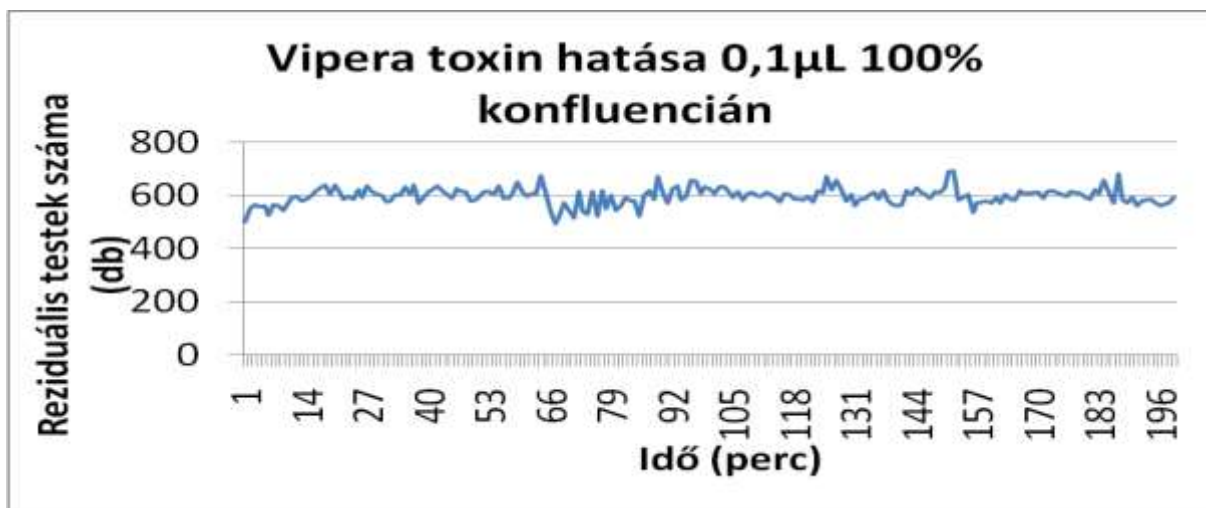
Eredményeink a képek elemzése után grafikonon ábrázolva a következők lettek:

A viperatoxin hatásai HaCat sejteken, 0,1 µl toxin különböző konfluencia értékeken:



18. ábra 0,1 µl toxin 70-80%-os konfluencián történő sejtszám változás az idő függvényében

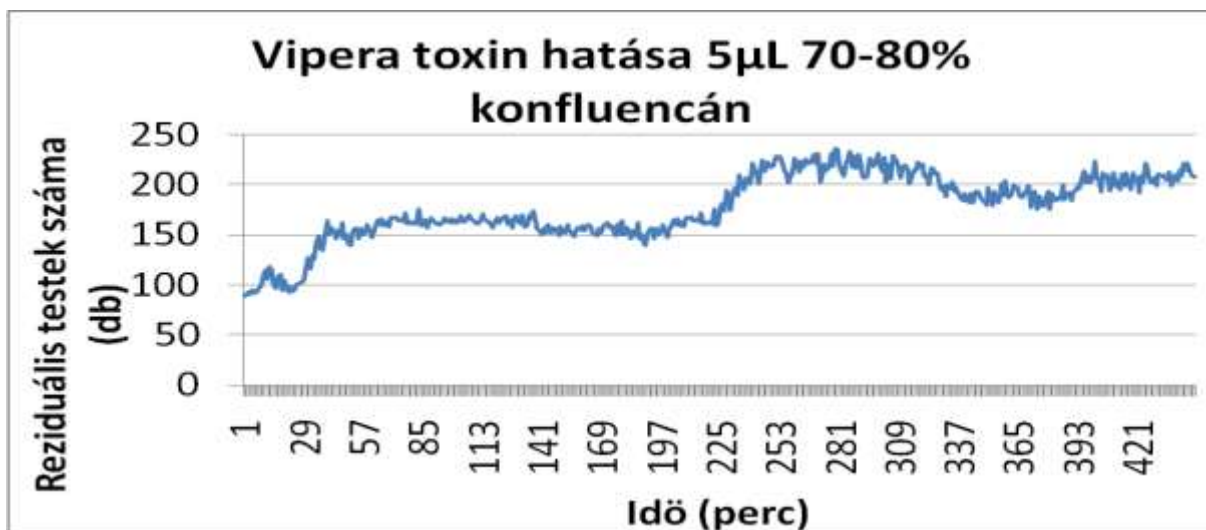
(A videofelvétel a DVD mellékleten: II DVD Vipera_toxin_0,1mikroliter_70%konf.file)



19. ábra: 0,1 ul toxin100%-os konfluencián történő sejtszám változás az idő függvényében

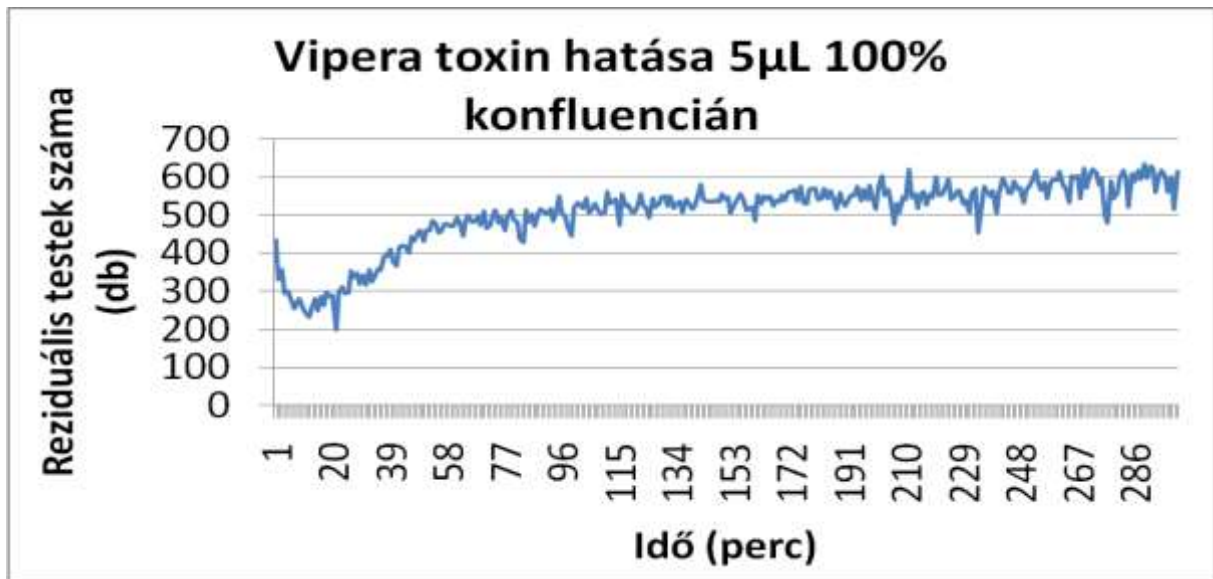
(A videofelvétel a DVD mellékleten: II DVD Vipera_toxin_0,1 mikroliter_100%konf. file)

A viperatoxin hatásai HaCat sejteken, 5μl toxin különböző konfluencia értékeken:



20. ábra 5 ul toxin 70-80%-os konfluencián történő sejtszám változás az idő függvényében

(A videofelvétel a DVD mellékleten: II DVD Vipera_toxin_5mikroliter_70%konf. file).



21. ábra: 5 ul toxin 100%-os konfluencián történő sejtszám változás az idő függvényében

(A videofelvétel a DVD mellékleten: II DVD Vipera_toxin_5mikroliter_100%konf. file).

A sejtmentes fermentlé hatásai HaCaT sejtpopulációra

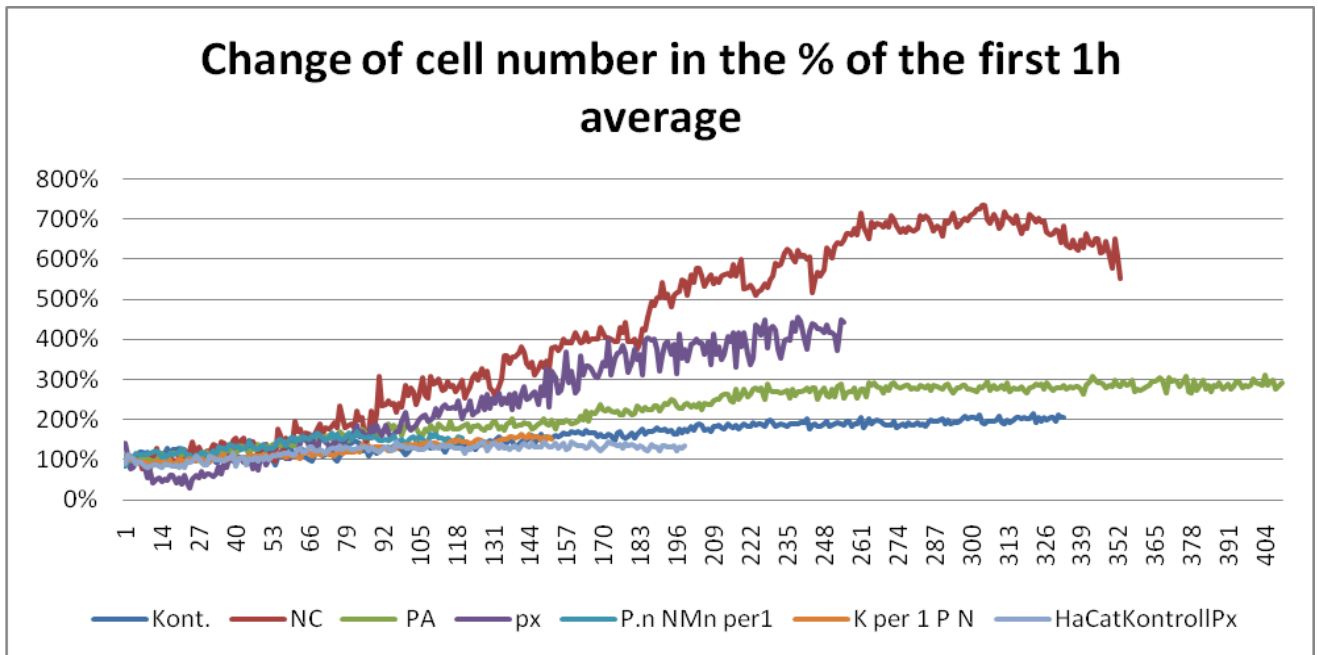
A time-lapse imaging rendszer ipari alkalmazásba is került, amikor *Neurospora crassa* és *Penicillium chrysogenum* által termelt fermentlevet kellett vizsgálnunk. A mintáknak nem tudtuk a nevét, különböző kóddal ellátott mintákat kaptunk. Az elfogulatlan értékelés miatt a fermentlében lévő fehérjék koncentrációját illetve a fermentlé egyéb jellegzetességeit sem ismertették velünk.

A vizsgálat célja az volt, hogy a sejtmentes fermentlében lévő *Neurospora crassa* és *Penicillium chrysogenum* által termelt fehérjefrakciók a humán sejtekre toxikus hatással vannak-e.

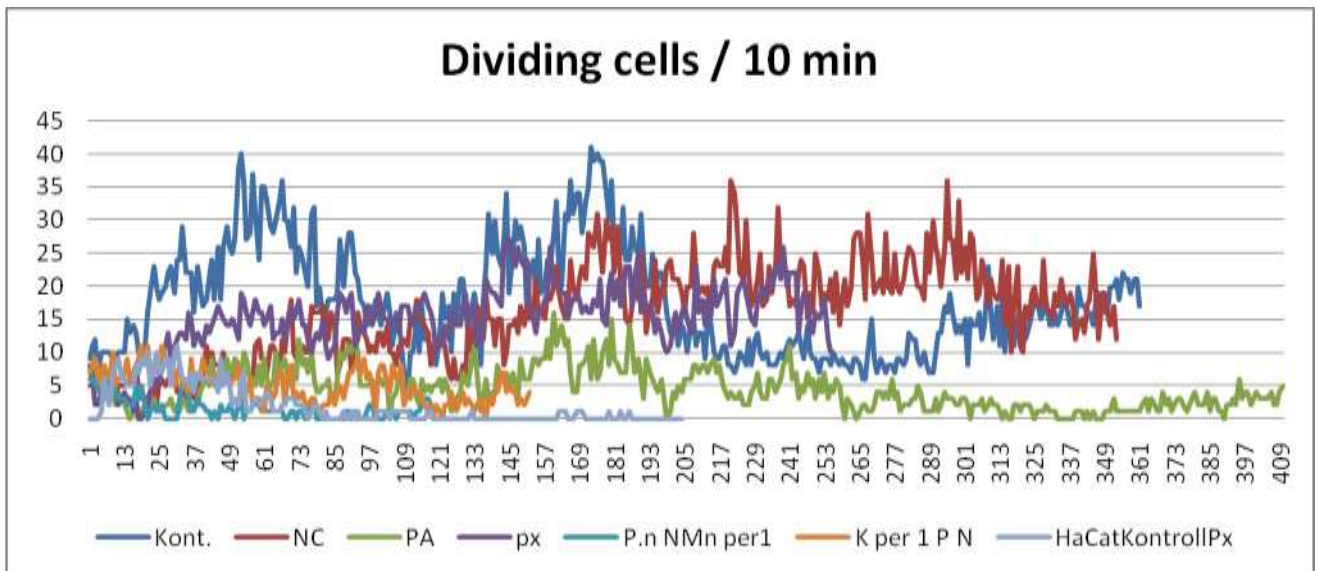
Fermentlé tapasztalatok: A kontrollhoz képest a kezelt sejtpopulációknál a hatások az idő függvényében nyilvánultak meg: kezdetben a kezelt sejtek a kontroll sejtekhez képest hasonlóan viselkedtek, de az idő előrehaladtával a mozgásuk lassult, és az osztódásuk sebessége is csökkent. Az apoptózisok száma nőtt. Később már az osztódni feljövő sejtek sem tudták befejezni az osztódást: feljőve megbénultak.

A baktériumok száma is megnövekedett, a videón is jól látható a baktériumok mozgása.

Az első órában bekövetkező % -os sejtszám változás:



22. ábra Sejtszám %-os változása az idő függvényében



23. ábra a sejtek osztódása az idő függvényében

***In-vitro* evolúció HaCaT sejteken**

A munkánk során a különböző korú tenyészeteket megfigyelve több viselkedési, morfológiai eltérést tapasztaltunk. Az idős tenyészetek viselkedésében számos eltérést figyeltünk meg.

Ezek a tapasztalatok indították el az ilyen jellegű kutatásainkat.

A vizsgálatok során több idős - több passzálást és fagyasztást megélt-, és egy fiatal, - ötször passzált -, HaCaT sejtpopulációt hasonlítottunk össze.

Az általunk megfigyelt legfontosabb eltéréseket három csoportba osztottuk.

- Morfológiai eltérések közül nagyon szembetűnő jelenség, hogy az idősebb sejtek citoplazmájában egy vagy több kisebb-nagyobb vakuolumot láthatunk. Ezek a vakuolumok gyakran az osztódást követően is megmaradhatnak.
- A sejtek viselkedésében is kisebb-nagyobb eltéréseket vettünk észre. A sejtek generációs ideje hosszabb, az osztódások lassabban mennek végbe. A letapadás időtartama is hosszabb, illetve a sejtek mozgási dinamikája is kisebb.
- A sejtek osztódási mechanikájában is jelentős eltéréseket tapasztaltunk. Az anyasejtől gyakran kettőnél több utódsejt keletkezik. Ezek az „utódsejtek” néhány esetben csak lefűződött citoplazma-fragmentumok.



24. ábra normál HaCaT sejt



25. ábra HaCaT sejt vakuolumokkal



26. ábra HaCaT sejt osztódás előtt



27. ábra négyfelé osztódott HaCaT sejt

(A videókat a DVD mellékleten a II. DVD-n a HaCat in vitro evol., HaCat kontroll in vitro evol. 2 és HaCat kontroll in vitro evol. file tartalmazza.)

Korábbi vizsgálataink a time-lapse imaging rendszerrel

Nehézfém toxikológia: A tanszéken folyó kutatásaink során a kadmium, az ólom, az uranyl-acetát toxikológiai vizsgálatait a már fent leírt módon végeztük el.

Primer sejtvonalak differenciálódásának vizsgálata: He/De: (hepatocelluláris carcinoma) és Ne/De: (mesoblastos nephroma) primer sejt kultúrák indítása, differenciálódás illetve nehézfém toxikológiai vizsgálatokat is végeztünk.

(A videofelvétel a DVD mellékleten: II DVD a NeDe20061110 file).

HaCaT- Candida interakcióját is vizsgáltuk szérumtartalmú és szérummentes médiumban. Szérummentes közegben nevelve a Candida sejtek megtámadták a HaCaT sejteket, és nitrogén forrásként használták őket. Erre a tenyészetre jellemző volt, hogy a hifák rövid morfológiájúak mindaddig, míg nem áll rendelkezésükre megfelelő mennyiségű nitrogén. A szérumtartalmú médiumban a hifák hosszú morfológiája figyelhető meg, illetve ez esetben a Candida sejtek nem támadják meg a HaCaT sejteket.

(Az interakcióról készült videót az I. DVD-n található HaCat+Candida000001 nevű fájlban található.)

Növényi embrióklónok növekedését is megfigyeltük az LTS rendszerrel. A növényi embrióklónok növekedése egy 9000 perces felölő vizsgálatot jelent. Az első és az utolsó képet összehasonlítva jól látható a méretbeli különbség.

(A videó a DVD mellékleten a II. DVD-n található a Növényi embrió nevű fájlban.)

Képanalízis ImageJ program használatával

Az ImageJ program bemutatása

Az ImageJ-ről általánosan

Az ImageJ egy nyílt forráskódú Java-alapú képfeldolgozó rendszer. Futtatása bármely platformon lehetséges asztali alkalmazásként vagy akár online appletként is. A program használatához Java 1.4 futtatókörnyezet szükséges. Az ImageJ az egyik leggyorsabb tisztán Java nyelven írt képfeldolgozó keretrendszer. A program számos kényelmi funkcióval rendelkezik. Makrók írásával több műveletet egymás után fűzhetünk, és ha nem lenne elegendő az így elérhető funkciók száma, akkor akár saját plugint is írhatunk a programhoz. Ehhez sok példát találunk a program honlapján. Az ImageJ-t akár függvénykönyvtárként is használhatjuk.

Több adattípust is támogat, ilyenek a 8-bites szürkeárnyalatos, illetve indexelt színes, 16-bites előjel nélküli egész, 32-bites lebegő pontos és RGB színes adattípusokat. Számos képformátumot támogat: TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM, FITS.

Az ImageJ-ben elérhető különböző eszközök segítségével képeket megjeleníthetjük, nagyíthatjuk (1:32-től 32:1-ig) és görgethetjük.

Az épp aktív képen kijelölhetünk területeket. A kijelölések lehetnek téglalap, ellipszis, illetve szabálytalan alakúak is. Kijelölés után a műveletek a kijelölt területen hajtódnak végre.

Az ImageJ-ben található több képjavító, helyreállító művelet. Többek között tudunk simítani, élt detektálni, medián szűrést, illetve küszöbölést végrehajtani 8-bites szürkeárnyalatos és színes képeken is egyaránt. A fényerő és a kontraszt interaktívan állítható.

A rendszer képes geometriai műveletek futtatására. Képrészletet vághatunk ki, skálázhatunk, átméretezhetünk.

Az ImageJ bővíthetősége

Az ImageJ beépített függvényei kibővíthetőek több módon is. Lehetőség van macro, script és plugin írására. Ezek a módszerek különböző komplexitású feladatok megoldására alkalmasak. Minden esetben az adott feladat határozza meg, hogy ezek közül mely módon bővítsük ki a rendszert.

A macro nyelv segítségével képfeldolgozó művelet sorokat hozhatunk létre. Legegyszerűbb módja a macrok előállításának, ha a program segítségével felvesszük a műveleteket. A macrok egyszerű szöveges fájlok. A macro telepítéséhez nem kell mást tenni, mint a programban a Plugins=>Macros=>Install... menüpont segítségével megkeresni a telepíteni kívánt szöveges fájlt. Lehetőség van egy fájlban belül több macro írására is.

Ha a rendszert scripttel szeretnénk bővíteni, akkor már több eszköz áll a rendelkezésünkre. Egyrészt a nyelve gazdagabb, mint a macro nyelv mivel JavaScriptben írjuk. Másrészt teljes hozzáférésünk van az ImageJ és a Java API-hoz. Ennek a módszernek is vannak hátrányai, mivel a JavaScriptben írt művelet sorok lassabban futnak, mint a macro nyelvben írtak, és nem érhető el a legtöbb beépített macro függvény.

Az ImageJ bővítésének harmadik módja, ha Java nyelven plugint írunk hozzá. Számos a programban elérhető parancs is pluginként van implementálva. Látható, hogy ennek a módszernek a nagy előnye, hogy így a teljes standard Java API elérhető, és akár harmadik féltől származó könyvtárakat is használhatunk.

Az ImageJ használata sejtszámoláshoz és animáció készítéséhez

Sejtszámolás

Lehetőségünk van az adott képen vagy egy képsorozaton a sejtek számában történő változások megmérésére. A kapott adatok kiértékelése történhet grafikon segítségével, melyen az idő függvényében prezentálhatjuk a változásokat.

A számolás menete:

- 1.) ImageJ program elindítása
- 2.) képsorozat betöltése: File=> Import=> Image Sequence... paranccsal
- 3.) fény és kontraszt beállítása a menü Image=> Adjust=> Brightness/Contrast... segítségével
- 4.) következő lépésben a képek elő-ill. háttérének elválasztása a Threshold funkcióval
 - A leggyakrabban alkalmazott image processing eljárások közé tartoznak a thresholding (küszöbölés) és a szegmentáció. A lényegük: bizonyos szempontok alapján területekre osztjuk a képet
 - "Foreground/Background" szétválasztási műveleteknek is nevezik őket, ami arra utal, hogy az eljárás a kép egy adott tulajdonságára koncentrál, és a többit eldobja
- 5.) ezután a sejtek megszámlálása történik az Analyze=> Analyze particles... paranccsal
- 6.) a kapott eredmények átvitele az Excel programba, és grafikonon ábrázolás

A thresholding művelet lényege és megvalósítása

1. kiválasztjuk a kép egy bizonyos szürkeintenzitás tartományát
2. az ebbe a tartományba eső pixelek alkotják a "foreground-ot" (előtér)
3. a többi pixel alkotja a "background-ot" (háttér)

Az eredmény: bináris kép

Az előtér vagy fehér vagy fekete (általában)

A thresholding-ra a hisztogram szolgál útmutatásul. Különböző szürkeintenzitás értékek kiválasztásával megváltozik a képi információ.

A thresholding módszerét felhasználhatjuk:

1. textúra analízis
2. határvonalak kiemelése

3. képi alapjellegzetességek (feature) kiemelése
4. kép előkészítése további mérésekre

Animáció

Azonos időközönként készített képek sorozatából animációk létrehozása, pl.: GIF formátumban. Itt lehetőség van egy adott képrészlet kiemelésére illetve kivágására, és ebből animáció készítésére.

Menete, egy sejt kiválasztása, ill. kivágása esetén:

- 1.) ImageJ program elindítása
- 2.) képek betöltése a File=> Import=> Image Sequence... paranccsal
- 3.) a betöltés után egy stack-et kapunk, ez egy képsorozat, a csúszkával léphetünk a képek között
- 4.) a kívánt sejt kiválasztása után a File=> Crop paranccsal az összes lépen kivághatjuk az adott részt
- 5.) végül a File=> Save as=> Gif... utasítással GIF formátumú animációt kapunk

Generációs idő meghatározása

Az ImageJ programban lehetőség van a generációs idő kiszámítására, mely egy sejtből történő sikeres osztódást követően keletkezett 2 utódsejt újbóli osztódása között eltelt időt jelenti.

A vizsgálni kívánt képekből előállítunk egy Stack-et, melyből kivághatjuk azt az osztódó sejtet, amire kíváncsiak vagyunk az Image=> Crop paranccsal.

Az ezt követően kapott új Stackből a Plugins=> 3D=> ImageJ 3D Viewer opcióval készíthetünk egy voxeltömböt.

Miután betöltött az ablak az Edit=> Display as=> Orthoslice menüpontnál beállíthatjuk, hogy a síkok vetületeit mutassa, így jól látható a sejt osztódásának helye, a sejt mozgásának iránya és a következő osztódás is. A Z tengely hosszúsága megegyezik a képek számával, így az első osztódás végétől a következő osztódás végéig tartó szakasz hosszúsága meghatározható. Mivel azonos időközönként készültek a képek, a mért hosszúság átváltható percre, illetve órába.

Videó készítése

Videó felvétel készítése, melyen jól vizsgálhatók a sejtetológiai tulajdonságok, sejtek osztódása, illetve sikertelen osztódáskor bekövetkező apoptózis.

Videó felvétel készítésére a VirtualDub nevű programot használtuk. A VirtualDub ingyenesen letölthető.

A programmal nagyméretű fájlokkal (akár 4 GB fölött) dolgozhatunk, lehetőséget biztosít a felhasználónak egy videóban különválasztani a hangot és a képet egymástól.

AVI és MPEG filmek szerkesztésére alkalmas program, amellyel az animációkon effekteket is alkalmazhatunk, újraméretezhetjük őket, valamint a hangot, ill. a képet önmagában is kimenthetjük.

Összefoglalás

Különböző sejtek viselkedésmorfológiai vizsgálata és összehasonlítása fontos adatokat tartalmaz számunkra, melynek tudatában eddig ismeretlen információkat ismerhetünk meg. Kísérleteink során a Long Term Scan Módszer használatával percenként fotókat készítettünk, így nyomon követhettük a sejtek által kialakított sajátos viselkedésbeli mintázatot, majd e képek sorozatából videót állítottunk össze. Ezeknek a videóknak a tanulmányozásával a megfigyelt sejtpopulációból módunkban állt kiválasztani egy, vagy több sejtet, és nyomon követni milyen változásokon esik, vagy esnek át. Kísérleteink során nehézfémek toxikusságának (ezüst, nikkel, kadmium, ólom és uranyl-acetát) kifejeződését vizsgáltuk, humán keratinocita (HaCat) és eritroleukémia (K562) sejteken. Ezekben a sejteken elvégzett kísérletekből készített képeket elemeztük ImageJ program segítségével. A képanalízis során információt kapunk a sejtszám változásairól: követni tudjuk a sejtosztódásokat, a sejtek mozgási dinamikáját, illetve vizsgálni tudjuk a generációs időket.

A bemutatott metodika és rendszer lehetővé teszi, hogy különböző hatóanyagok citotoxikológiai vizsgálatát az idő függvényében elemezzük. Így lehetővé válik, hogy nemcsak a toxikus hatást vegyük észre, hanem a korai sejtválasz jelenlétét is olyan koncentrációértékben, mely a sejtenyészet szintjén még nem fejtette ki észlelhető hatását. A nagyobb koncentrációparamétereket használva a nagyobb sejtpopulációkat érintő sejthalál típusok folyamata nyilvánult meg. A time-lapse imaging rendszer nagyon érzékeny módszer, hiszen alkalmazásával vizuálisan már a legkisebb változást is képesek vagyunk érzékelni.

Az *in vitro* evolúció nagy jelentőséggel bírhat az elkövetkező időszakban, mivel eddig nem fordítottak megfelelő, elegendő figyelmet arra, hogy a sejteket folyamatos szelekciós nyomás éri (tápfolyadékcsere, fagyasztás stb).

A time-lapse imaging rendszerrel végzett kutatásaink során kapott LD₅₀ értékek minden esetben megegyeznek a szakirodalmi adatokkal, kontrollként szolgálva arra, hogy a rendszerrel egzakt módon mérünk.

Ez a módszer különösen alkalmas arra, hogy a szubtoxikus dózisban adagolt vegyületek biológiai hatásait detektálhassuk.

Kitekintés: a time –lapse imaging rendszer a további vizsgálatokban

A további munkánk során tervezzük a különböző tumorokból indított primer sejt kultúrák hosszú távú megfigyelését. A különböző páciensektől származó malignus tumorokból sejt izolálás és stabil sejtpopulációk létrehozása után, a sejt típusát meghatározzuk, és a time-lapse imaging rendszerrel a sejteket megfigyeljük. Ezen primer sejtvonalakat felhasználva szeretnénk vizsgálni a kemoterápiás szerek hatóanyagait, illetve kifejleszteni egy az adott tumor típusra, és a páciens igényeire szabott kemoterápiás kezelési módszert.

A rosszindulatú daganatsejteken történő kemoterápiás szerek hatóanyagainak vizsgálatával viszonylag rövid idő alatt vizsgálhatjuk a szer sejtekre kifejtett hatását.

A kísérletünk célja, hogy az adott páciens sejteire ténylegesen ható szereket a megfelelő koncentrációkban lehessen alkalmazni. A módszert megvalósítva a szabadalmazott és a még kísérleti stádiumban lévő gyógyszereket a páciens sejteiben vizsgálva elérhetjük, hogy a páciens nincs kitéve az adott szer mellékhatásainak.

A long term scan rendszer hardver fejlesztését, ezen belül a fluoreszcens és a háromdimenziós képalkotás eszközfejlesztését is szeretnénk megvalósítani.

Irodalomjegyzék:

1. 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.
2. Apoptogenic and necrogenic effects of mercuric acetate on the chromatin structure of K562 human erythroleukemia cells. Farkas E, Ujvarosi K, Nagy G, Posta J, Banfalvi G. Toxicol In Vitro. 2010 Feb;24(1):267-75. Epub 2009 Aug 31.

3. Gamma irradiation induced apoptotic changes in the chromatin structure of human erythroleukemia K562 cells. Banfalvi G, Klaisz M, Ujvarosi K, Trencsenyi G, Rozsa D, Nagy G. Apoptosis. 2007 Dec;12(12):2271-83.
4. Preapoptotic chromatin changes induced by ultraviolet B irradiation in human erythroleukemia K562 cells. Ujvarosi K, Hunyadi J, Nagy G, Pocsi I, Banfalvi G. Apoptosis. 2007 Nov;12(11):2089-99. Epub 2007 Aug 14.
5. Transition from chromatin bodies to linear chromosomes in nuclei of murine PreB cells synchronized in S phase. Trencsenyi G, Ujvarosi K, Nagy G, Banfalvi G. DNA Cell Biol. 2007 Aug;26(8):549-56.
6. Supranucleosomal organization of chromatin fibers in nuclei of Drosophila S2 cells. Banfalvi G, Trencsenyi G, Ujvarosi K, Nagy G, Ombodi T, Bedei M, Somogyi C, Basnakian AG. DNA Cell Biol. 2007 Jan;26(1):55-62.
7. Cell culture density dependent toxicity and chromatin changes upon cadmium treatment in murine pre-B-cells. Banfalvi G, Ujvarosi K, Trencsenyi G, Somogyi C, Nagy G, Basnakian A. Apoptosis. 2007 Jul;12(7):1219-28.
8. Chromatin changes upon silver nitrate treatment in human keratinocyte HaCaT and K562 erythroleukemia cells Nagy G, Turani M, Kovacs K E, Banfalvi G, be submitted by Toxicology in-vitro
9. 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
10. Engelmann, W.E. and Obst, F.J. (1984) Snakes: Biology, Behavior and Relationship to Man. Croom Helm, London.

Képjegyzék:

1. ábra Az apoptózis eleje.....	6
2. ábra Az apoptózis vége.....	6
3. ábra A nekrozis kezdete	6
4. ábra A nekrozis vége	6
5. ábra A Long-Term Scann rendszer fotója	7
6. ábra A LTS rendszer sematikus felépítése	8
7. ábra (A) a HaCaT és a K-562 (B) sejtek) sejtek növekedésének gátlása különböző ezüst-nitrát koncentrációk jelenlétében	11
8. ábra HaCat sejtszám változás 0,5 μM -os ezüst-nitrát koncentrációnál.....	13
9. ábra. HaCat sejtszám változás 10 μM -os ezüst-nitrát koncentrációnál.....	13
10. ábra: Halott sejtek száma 30 μM koncentrációnál 100%-os konfluencián	13
11. ábra Higany-acetát jellemző hatása K-562 sejtekre 100 μM	15
12. ábra Nikkel-klorid jellemző hatása K-562 sejtekre 100 μM	15
13. ábra A Vipera berus toxin végső hatóanyag mennyiségei.	16
14. ábra 0,1 ul toxin hatása 100% konfluencián, kép a tenyésztőedényről 10X objektív Giemsa festés.....	17
15. ábra 0,1ul toxin 70%-os és 100%-os konfluencián a felső kép a 0. percben készült.....	18
16. ábra ul toxin hatása 100% konfluencián, kép a tenyésztőedényről 10X objektív Giemsa festés.....	18
17. ábra 5 ul toxin 70%-os és 100%-os konfluencián a felső kép a 0. percben készült.....	19
18. ábra 0,1 ul toxin 70-80%-os konfluencián történő sejtszám változás az idő függvényében	19
19. ábra: 0,1 ul toxin 100%-os konfluencián történő sejtszám változás az idő függvényében.	20
20. ábra 5 ul toxin 70-80%-os konfluencián történő sejtszám változás az idő függvényében..	20
21. ábra: 5 ul toxin 100%-os konfluencián történő sejtszám változás az idő függvényében...	21
22. ábra Sejtszám %-os változása az idő függvényében	23
23. ábra a sejtek osztódása az idő függvényében	23
24. ábra normál HaCaT sejt.....	24
25. ábra HaCaT sejt vakuolumokkal	25
26. ábra HaCaT sejt osztódás előtt	25
27. ábra négyfelé osztódott HaCaT sejt.....	25