

XXXII. OTDK Biológia Szekció

Különböző kolloidok és nanorészecskék hatása a corneális sebgyógyulásra *in vitro* és a kromatin kondenzálódásra

Kukoricza Krisztina, Biológia Bsc, 3. évfolyam

Jákim Judit, Biomérnök Bsc, 3. évfolyam

Debreceni Egyetem Természettudományos és Technológiai Kar

Biotechnológia és Mikrobiológia Tanszék

2014

Tartalomjegyzék

Irodalmi áttekintés.....	3
Célkitűzés.....	5
Anyagok és módszerek.....	6
1. Sejtek izolációja és tenyészetek létrehozása.....	6
1.1 Klinikai eredetű szaruhártya (cornea) korongból származó primer sejtek kitenyésztése és felszaporítása.....	6
1. 2.Limbális eredetű primer sejttenyészetek izolálása, stabil sejtpopulációk létrehozása.....	6
1.2.1 Limbus sejtek	7
1.2.2 Izolációs protokoll	8
1.2.3 A passzálás folyamata.....	8
1.3. Karcmodell készítése.....	9
2. Tenyészetek kezelése és kromatin izoláció.....	9
2.1 Kolloid/nanorészecske oldatok előkészítése.....	9
2.2 MTT assay használata a felhasznált koncentrációk vizsgálatára.....	10
2.3 Kromatin szerkezetek izolációja.....	11
3. Képkötő és képelemző módszerek.....	13
3.1 Kromatin szerkezetek vizsgálata fluoreszcens mikroszkópiával.....	13
3.2 Long-Term Scann mikroszkópok használata sejtkultúrák megfigyelésére.....	13
3.3 Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok.....	14
3.4 Az elkészült képek elemzési módszerei	14
Eredmények.....	16
1. A kromatin kondenzálódásra gyakorolt hatások.....	16
1.1 Ezüst kolloid	17
1.2 Arany kolloid	18
1.3 Arany nanorészecskék.....	19

1.3.4. Glassbottom dish in situ megjelölés.....	21
2. Sebgyógyulásra gyakorolt hatások.....	22
2.0 Kontroll.....	22
2.1 Ezüst kolloid.....	23
2.2 Arany kolloid.....	24
2.3 Arany nanorészecskék	25
Diskusszió.....	28
Rövidítések.....	30
Köszönetnyilvánítás.....	31
Irodalomjegyzék.....	33

Irodalmi áttekintés

A szem az egyik legelérhetőbb célpontja a nanorészecskékkel történő hatóanyag és gén szállításnak. Kívülről a cornea és az ínhártya határolja, ezek a szövetek a célszövetek a szokványos terápiák során. Az oculáris terápiák jelentős részét a szemcseppek teszik ki, melyek használatát azonban komoly hatékonysági problémák korlátozzák. Tulajdonképpen a szemcseppek 15-30 másodpercen belül kimosódnak a könnyel. A nanotechnológia segítséget adhat megcélozni a mélyebben fekvő szöveteket, kontrollálhatja a gyógyszermolekulák kibocsátását, illetve serkentheti a különböző anyagok szövetbe való bejutását.

A cornea felszíne negatív töltésű, így a pozitív töltésű kitozán nanorészecskék bekötődnek a felszínére. A kitozán nanorészecskék alkalmasak gyógyszermolekulák szállítására, mint például különböző antibiotikumok (pl. gatifloxacin), immunszuppresszánsok (pl. ciklosporin A), és nem szteroid típusú gyulladáscsökkentők (pl. indomethacin) (1).

A nanorészecskéken alapuló gyógyszer szállítás számos előnyt nyújthat, mint például erősíti a gyógyszeres terápia hatékonyságát és farmakológiai jellemzést ad. Javíthatja a vízben nehezen oldódó gyógyszerek oldhatóságát, növeli a gyógyszerek féléletidejét és növeli a gyógyszer specificitását a célsejt- illetve szövet iránt (2).

A szembe csepegtetett gyógyszer nagy része másodperceken belül elveszik a szem öntisztító mechanizmusai miatt. Ezért, az elmúlt évtizedben a kutatás arra irányult, hogy növeljék az aktuálisan alkalmazott gyógyszerek bejuttatásának hatékonyságát a corneába. Általában a szemcsepp nem nyújt megfelelő gyógyszer-koncentrációt a hátsó szemszövetekben, súlyosabb esetekben elengedhetetlenné válik intraocularis injekciók alkalmazása. Terápiás szempontból nem csak az a cél, hogy csökkentsük az üvegtesten belüli injekciók számát, hanem a klinikumban használatos gyógyszerek, a szemben való elérhetőségének javítása is fontos.

Korábbi kutatásokban a nanorészecskék kontrollált ibuprofen kibocsátást mutattak. A terápiás hatást kisebb gyógyszer-koncentrációval érték el, mint a szemcsepp formulával, nem váltva ki toxikus hatást a szem szöveiben. Kisebb méretű nanorészecske előnyösebbnek bizonyult a jobb interakció elérése érdekében celluláris szinten. Azonban a kisebb méretű nanorészecskék

nagyobb felszínnel rendelkeznek térfogatukhoz képest, következésképpen nagyobb az esély arra, hogy toxikus hatást fejtenek ki a szövetre, illetve sejtre (3).

A nanorészecskék széleskörű használata gyógyszerhordozóként komoly előrelépést jelenthetne az oculáris terápiák terén, ám a különböző méretű és felszíni töltéssel rendelkező részecskék viselkedésbeli különbségei miatt mindenképp szükség van a használt részecskék toxicitás vizsgálatára.

A szakirodalomban bőven találtunk olyan tanulmányokat, melyek a nano méretű anyagok káros hatásairól, illetve a biológiai és orvosi felhasználásairól szólnak.

A nanorészecskék toxicitása nagyban függ a felszín töltésétől és a felszínhez kötött anyagoktól. A részecskék felvétele a sejtbe méretfüggő, felvételük receptor-mediált endocitózissal történik. (4) A részecskék bejutási mechanizmusának fontos része a „wrapping hatás”, melynek során a sejt citoplazmájával befedi a részecskét. (5)

A 16 nm átmérőjű citráttal borított arany nanorészecskék két órás inkubálás után bejutottak a sejtbe és végül az endoszómákba. Szabad arany nanorészecskét sem a citoszolban sem a magban nem detektáltak. A sejtmagba is bejuttathatók nagyobb méretű aranyrészecskék megfelelő felszíni módosításokkal. (6)

Az ezüst nanorészecskék mozgására szervezeten belül jellemző, hogy a főbb barriereken keresztül bejutnak a szövetekbe és ott akkumulálódnak. A vér-agy gáton átjutó részecskék így az agyban fognak akkumulálni.(7)

A genotoxicitást vizsgálva arra jutottak, hogy az ezüst nanorészecske toxikusabb hatást vált ki, mint más ezüstformák. Két sejtmaggal rendelkező sejtek jelentek meg, ami a DNS károsodásra utal, a biológiai funkciók megváltozásával nagyobb mennyiségű géntermék megjelenését és abnormális proliferációt figyeltek meg. (8)

Célkitűzés

Szemsérülések esetén a klinikumban általában szemcseppeket alkalmaznak, a gyorsabb és fertőzésmentes gyógyulás érdekében. Azonban ezek a szemcseppek alacsony hatékonysággal bírnak, a hatóanyag bejuttatás utáni gyors kimosódása miatt. A könny általi kimosódás gátolja a hatóanyagok eljutását a szem hátulsó szöveteibe, így súlyosabb esetekben intraoculáris injekciók alkalmazása elkerülhetetlenné válik. A nanorészecskék új lehetőséget nyújtanak a gyógyszermolekulák effektív szállítására, és az injekciók elkerülésére, így kevésbé invazív gyógymódokat adhatnak az orvoslás kezébe.

Kísérletünk célja a kozmetikai termékekben is használt arany-és ezüstkolloid, illetve a hatóanyag-szállítási képességei miatt széles körben kutatott arany nanorészecske hatásának tanulmányozása a humán limbus (HuLi) sejtekre, konkrétabban ezen anyagok befolyásának vizsgálata a corneális sebgyógyulásra. A vizsgálataink során a kolloidok és a nanorészecskék genotoxikus hatásának vizsgálatára fordítottunk különös figyelmet.

Vizsgálataink során karcmodellt, pásztázó elektronmikroszkópos, fluoreszcens mikroszkópos és Time-Lapse Imaging vizsgálatokat használtunk a kolloidok és nanorészecskék hatásának megfigyelésére.

A karcmodellt a sebgyógyulás *in vitro* szimulációjára és az esetlegesen erre a sérülésre adott nanorészecskék – mint gyógyszermolekula szállítók – hatásának vizsgálatára használtuk. A fluoreszcens mikroszkópos vizsgálat során a kromatin kondenzálódás folyamatának megfigyelésével igyekeztünk az arany és ezüst kolloidok, illetve arany nanorészecskék esetleges genotoxikus hatásaira következtetni.

Anyagok és módszerek

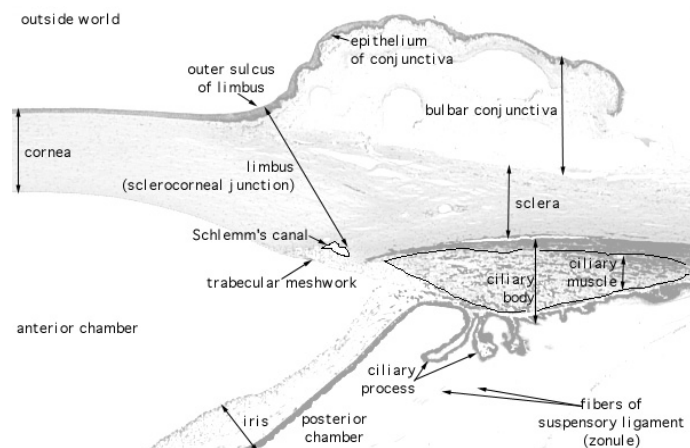
1. Sejtek izolációja és tenyészetek létrehozása

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

A corneát Eusenol-C konzerváló folyadékban kaptuk, melyben 4°C-on több mint 14 napig el lehet tartani. A cornea korongokat fertőtlenítettük 70%-os etanollal az esetleges fertőzések elkerülése végett, majd 2x2 mm-esre daraboltuk őket. A szaruhártya darabokat bekevert RPMI-1640 médiumban (+10% FBS, +1% PSN) inkubáltuk. Ezen protokoll segítségével corneális fibroblasztokat sikerült izolálnunk a primer szaruhártya korongból enzimes emésztés nélkül.

1. 2.Limbális eredetű primer sejttenyészetek izolálása, stabil sejtpopulációk létrehozása

A limbus az átlátszó cornea és az átlátszatlan szaruhártya között helyezkedik el. Kívülről a limbus alkotja a corneális és a conjunktivális hámot. Ezen hámok megkülönböztetésére szolgáló technikák alapján úgy tűnik, hogy a régiót multipotens corneális limbus sejtek alkotják. A limbus elliptikus alakkal rendelkezik hosszú vízszintes tengellyel. A limbális zóna a Descemet-membrán perifériális kiterjedése és a corneális endothélium kapcsolódásánál kezdődik. A trabecularis hálózat elülső kiterjedése ugyanúgy, mint a Schwalbe-vonal gonioszkóppal azonosítható. A limbus sejtekben kevésbé sűrű terület, inkább magas kollagén tartalmú kötőszövet. A legtöbb sejtet tartalmazó rész a conjunktiva és a corneális epithelium határán van és a trabekuláris hálózaton. A kísérletek azt mutatják, hogy a multipotens sejtek a limbus conjunktivális részénél találhatók meg. Nemrégiben megfigyelték ezen sejtek aktivitását a trabekuláris hálózaton, ami azt mutatja, hogy a multipotens sejtek a Schwalbe-vonal közelében helyezkednek el (9).



1. ábra. A limbus elhelyezkedése a szemben

forrás: <http://www.bu.edu/histology/p/080051oa.htm>

1.2.1 Limbus sejtek

A limbális epithel őssejtek ugyanolyan sajátosságokkal rendelkeznek, mint a felnőtt szomatikus őssejtek, tehát kisméretűek és magas mag-citoplazma aránnyal rendelkeznek. Hiányoznak belőlük a differenciációs markerek kifejeződése, mint például a citokeratin 3 és 12. Ezeknek a sejteknek lassú a ciklusuk a homeosztázis során, azonban sérülés esetén megnő a proliferációra való hajlamuk. A őssejteknek meg van az a képességük, hogy aszimmetrikusan osztódnak (10).

A melanocyták bonyolult elágazó struktúrával rendelkeznek. Ezek közül a legelérhetőbbet is nehéz megközelíteni vagy vizsgálni az epithel sejtek vagy a saját melanin pigmentjük miatt, melyek betakarják a melanocytát. A tranzit-kiegészítő sejtek az őssejtekből erednek és végtelenszer tudnak osztódni, míg differenciálttá nem válnak. A fibroblaszt a kötőszövet sejtje, mely rostokat szekretál, mint például kollagént. Ez fenntartja az extracelluláris mátrixot, főként szövet regenerációnál és sebgyógyulásnál (11).

1.2.2 Izolációs protokoll

Kísérleteink során a munkacsoportunk által kidolgozott protokollokat használtuk. A transzplantációra szánt cornea limbus gallérját is Eusemol C-ben tartósítva kaptuk. Az előző protokollhoz hasonlóan fertőtlenítettük 70%-os etanolban, majd Betadine-nal mostuk. A szöveteket 2x2mm-es részekre daraboltuk, majd enzimes emésztést végeztünk (800 U/ml collagenase). Az izolált sejteket a szövetdarabokkal együtt tenyésztőflaskába oltottuk, melyet 5ml DMEM+Ham's F12 tápfolyadékkal töltöttünk fel. A tápfolyadékot kiegészítettünk 10% FBS-sel és 1% PSN-nel. A flaskát inkubátorba helyeztük, ahol 37 °C, és 5% CO₂ tartalom mellett tenyésztettük a sejteket. A corneális és limbális eredetű primer tenyészetekből különböző morfológiájú sejtféleségek differenciálódását vártuk: fibroblaszt jellegű és keratinocita jellegű sejteket sikerült izolálnunk.

A humán limbus (HuLi) keratinocita sejteket (adherens sejtek) DMEM Ham's F12 tenyésztő médiumban +10% FBS-sel és +1% PSN-nel kiegészítve tenyésztettük és szaporítottuk fel. A vizsgálatainkhoz mind az izolációhoz mind a karcmodellek létrehozásához 6-os és 7-es passzálású sejteket használtunk.

1.2.3 A passzálás folyamata

A felnőtt tenyészetek passzálása során először PBS pufferes mosást alkalmaztunk, annak érdekében, hogy a sejtek közötti szennyeződések és anyagcsere termékeket kimossuk. Ezután tripszines kezelést folytattunk, ennek célja, hogy a kihorgonyzó kapcsolatok megszüntetésével felválassza a sejtekből kialakult monolayert a flaska aljáról. A tripszin működését médiummal állítottuk le, majd a sejteket 1000 RPM-en 5 percig centrifugáltuk. A leülepedett sejteket 1 ml médiummal szuszpendáltuk fel és a kísérletnek, valamint a sejtek mennyiségének megfelelően újabb flaskákba osztottuk szét, majd a sejteket tartalmazó folyadékot médiummal 5 ml-re egészítettük ki. Tenyésztő edényként T-25-ös tenyésztőflaskákat használtunk.

1.3. Karcmodell készítése

A kísérteleink során a Liang és társai (12) által megalkotott és Turáni és társai (13) által Time-Lapse imaging módszerekre továbbfejlesztett karcmodellt használtuk.

A vizsgálataink megkezdéséhez el kellett érniünk az adott tenyésztő edényeknél a 100%-os konfluenciát, amikor a sejtpopuláció a rendelkezésre álló teljes felületet benövi és összefüggő monolayer alakul ki. A 100%-os konfluencia elérése után karcmodell készítéséhez glassbottom dish-be oltottuk át a sejteket.

A sejtek glassbottom dish-be történő átoltása előtt célszerű sejtszámlálást végezni. Az induló sejtszámot ismerve következtetni tudunk a teljes konfluencia eléréséhez szükséges időre, és egyúttal a sejtek viabilitását is megvizsgálhatjuk. A sejtszámlálást tripánkék festékkel és Bürker kamrával végeztük. A vizsgálatra 10µl sejtuszpenzióhoz 10µl tripánkék festéket adtunk, majd egy fedőlemezzel lefedett Bürker kamrába pipettáztuk a sejt-tripánkék szuszpenziót. Az élő sejtek világosak maradtak, a membránjukon nem jutott át a festék, míg a halott sejtek esetében a membránon átjutva kék festődés volt tapasztalható. A glassbottom dish-be történő passzálás során célszerű az üvegfelületen a folyadékot finoman szétszuszpendálni, hogy segítsük a sejtek letapadását.

Amint a sejtek benőtték a rendelkezésükre álló teret egy steril 20 gauge tűvel megkarcoltuk a monolayert, és rátettük a megfelelő koncentrációjú kolloid, illetve nanorészecske oldatot. Célszerű, először a médiumot rápipettázni a sejtekre, majd ezután a kolloid/nanorészecske oldatot finoman rászuszpendálni. A glassbottom dish-ben való tenyésztés során figyelniünk kell a sterilitásra, célszerű a glassbottom dish-t egy steril Petri-csészébe tenni. Figyelni kell még továbbá a folyadék szintjére, mert ha a szint eléri a glassbottom-on lévő nyílást, a tenyészet könnyen befertőződhet, illetve a sejtek megfulladhatnak.

2. Tenyészetek kezelése és kromatin izoláció

2.1 Kolloid/nanorészecske oldatok előkészítése

Az **arany nanorészecske**(gömb alakú 100 nm átmérőjű) törzsoldatának a koncentrációja: 3.8×10^9 részecske/ml. A törzsoldatból szakirodalmi adatok és előkísérletek alapján két koncentráció használata mellett döntöttünk: 21,66µg/ml és 140µg/ml. A törzsoldatból 8 ml-t vettünk ki egy steril 15 ml-es centrifugacsőbe, majd lecentrifugáltuk. Az arany nanorészecske esetében is 10000 G-n centrifugáltunk 5 percig. Felszuszpendáltuk 1 ml tenyésztő médiummal

és ebből vettünk ki megfelelő mennyiségű oldatot, a nano-arany esetében nem használtunk hidrátburokkal rendelkező formát.

Az **arany kolloid**(gömb alakú 100 nm körüli átmérőjű) és az **ezüst kolloid** (gömb alakú 10nm átmérőjű) koncentrációt előkísérlet alapján választottuk. Az arany kolloid koncentrációja 3,15 μ M, az ezüst kolloid koncentráció 12,6 μ M. Mindkét koncentrációnál használtunk hidrátburokban, illetve tápfolyadékban inkubáltakat. Az inkubáció 24 órát vett igénybe.

Az ezüst kolloid törzsoldat koncentrációja 20 ppm volt, míg az arany kolloid törzsoldaté 5ppm. Steril körülmények között adott koncentrációnak megfelelő mennyiséget egy centrifugacsőbe kivettünk. Lecentrifugáltuk 10000 G-n 5 percig. A centrifugálás során különösen kell figyelni arra, hogy a leülepedett kolloid/nanorészecske ne oldódjon vissza. Arany kolloid esetén szemmel látható volt a leülepedett kolloid, melynek rózsaszín árnyalata volt, ezzel szemben az ezüst kolloidnál ilyen elszíneződést nem tapasztaltunk. Leöntöttük róla a felülúszót és vagy 1ml tápfolyadékban szuszpendáltuk fel vagy a saját felülúszójában (180 μ l-ben T25-ös tenyésztőedény esetén, illetve 90 μ l glassbottom dish esetén), fenntartva az izoozmotikus közeget. A T25-ös tenyésztő edényre az adatok kétszeresei vonatkoznak, hiszen a T25-ös tenyésztő edény végtérfogata kétszerese a glassbottom dishnek. A kísérlet megkezdése előtt a használni kívánt kolloid/nanorészecske oldatot célszerű felsuszpendálni, hogy a kolloid illetve a nanorészecske ne agglomerálódjon és, hogy így jutassuk rá a sejtekre.

2.2 MTT assay használata a felhasznált koncentrációk vizsgálatára

Előkísérletünk során egy 96 lyukú platet használtunk különböző koncentrációk vizsgálatához.

MTT assay készítése:

1. A flaskában letapadt sejtekről leszívtuk a tápfolyadékot.
2. PBS-sel átmostuk, ezzel kimostuk a sejtek közül az esetleges szennyeződések és a felesleges tápfolyadékot.
3. Tripszinnel kezeltük, és maximum 10 percre inkubáltuk.
4. A felváló sejteket centrifugáltuk (1000 RPM, 5 perc),

5. A felülúszót leöntöttük, majd a sejtekhez 1 ml tápfolyadékot adtunk, leállítva ezzel a tripszin működését.
6. Sejtszámolást végeztünk.
7. DMEM Ham's F12 médiummal hígítottuk a sejtszuspenziót 1 l ml-re és szétosztottuk a well-ekben.
8. Egy éjszakára inkubátorba tettük (37°C).
9. Inverz mikroszkóp alatt vizsgáltuk, hogy letapadtak-e a sejtek.
10. Megfelelő kitapadás után 1 nappal steril horizontális lamináris box alatt a sejtekről eltávolítottuk a használt médiumot, és kolloiddal vagy nanorészecskével kezeltük a well-eket.
11. A kezelt plate-et 24 órára inkubátorba helyeztük.
12. A sejtekhez wellenként 100µl MTT oldatot adtunk és inkubáltuk 37°C-on, másfél órán keresztül.
13. Inkubálás után az MTT oldatot leszívtuk. Sötét színű kristályok kiválását tapasztaltuk.
14. DMSO-t használtunk a kristályok feloldásához (wellenként 100µl). Lilás színelváltozást tapasztaltunk. 15 percre inkubátorba helyeztük a plate-et.
15. Plate Reader használata: DMSO-val feloldott kristályokat fotometráltuk 550nm-en.
16. A kapott értékeket táblázatban rögzítettük.

Az MTT assay alapján egyik általunk használt koncentráció sem bizonyult toxikusnak.

2.3 Kromatin szerkezetek izolációja

A tenyésztőedény (T-25 flaska) 100%-os konfluenciájának elérése után egy steril pipettaheggyel megkarcoltuk a monolayert, majd rátettük a megfelelő koncentrációjú kolloid vagy nanorészecske oldatot és a médiumot. Mivel előkísérleteink azt mutatták, hogy a seb 20-24 órán belül összenő, így 24 óra után elkezdtük az izolálási protokollt.

A sejtmag izolációt párhuzamosan végeztük a felülúszóban lévő, illetve a letapadt sejtekkel.

A kromatin izoláció lépései:

1. Első lépésként a médiumot finoman leszívjuk a sejtekről, vigyázva arra, hogy a monolayer épen maradjon.
2. Centrifugálás 5 percig 1000 rpm-en, majd a felülúszó leöntése.
3. Sejtek átmosása, szuszpendálása 1 ml nem steril PBS-sel.
4. Centrifugálás 5 percig 1000 rpm-en, majd a felülúszó leöntése.
5. Dagasztó puffer hozzáadása (swelling oldat) 5 ml 1 millió sejthez, szuszpendálás.
6. Inkubálás 10 percen keresztül dagasztó pufferben, 37 °C-os vízfürdőben vagy inkubátorban.
7. Centrifugálás 5 percig 1000 rpm-en, majd a felülúszó leöntése.
8. Átmosás fixatív oldattal (metanol-jégecet 3:1). Az oldatot frissen kell elkészíteni, először cseppenként kell hozzáadni a sejtekhez folyamatos szuszpendálás mellett, 2x1 ml-ben vesszük föl.
9. Centrifugálás 5 percig 1000 rpm-en, majd a felülúszó leöntése.
10. A fixatív átmosás megismétlése 1 ml-rel.
11. Centrifugálás 5 percig 1000 rpm-en, majd a felülúszó leöntése.
12. Sejtek felvétele sejszámtól függően 1 ml fixatív oldatban.
13. Cseppentés tárgylemezre Pasteur-pipettával 30 cm magasról.
14. Száradás szobahőn egy éjszakán keresztül.
15. Dehidráció felszálló alkohol sorban (70-80-90-100%-os etanol). Másnap címkézés, tárgylemeztartóba pakolás.
16. Kromatin szerkezetek vizsgálata: Antifade médiumhoz adott DAPI-val (20µl).

3. Képkalkotó és képelemző módszerek

Kísérleteink fázisait különböző képkalkotó módszerekkel követtük nyomon. A növekvő sejtkultúrák, valamint a karcmodellek megfigyelésére egyszerűsített Long-Term Scan mikroszkópokat építettünk, az izolált kromatin szerkezeteket pedig fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

3.1 Kromatin szerkezetek vizsgálata fluoreszcens mikroszkópiával

A vizsgálatok során törekedtünk arra, hogy a kontroll és kezelt sejtmagokról a kromatin kondenzálódás különböző fázisaiban tudjunk képet készíteni, minél több információt nyerve a kezelés eredményéről. Egy tárgylemezről átlagosan 100 felvételt készítettünk, majd ezeket kiértékeljük.

A sejtmagok DNS-ének fluoreszcens jelölésére 4',6-diamidino-2-fenolindolt használtunk. A DAPI-t Antifade médiumhoz kevertük. A gerjesztőfény kialakításához UV excitációs filtert használtunk.

Miután a glassbottom dish-ekben a karc összenőtt, *in situ* megjelöltük a kezelt tenyészeteket DAPI-val, majd fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk, hogy az izolált sejtmagokon megfigyelt változások összeegyeztethetőek-e az *in situ* jelölésnél tapasztaltakkal.

3.2 Long-Term Scann mikroszkópok használata sejtkultúrák megfigyelésére

A kitenyésztett sejtkultúrák folyamatos megfigyelésére Long-Term Scan (LTS) mikroszkópokat használtunk, amelyek inkubátorban készülő Time-Lapse felvételek rögzítésére lettek kialakítva. Egyszerűsített mikroszkópjaink egy digitális kamera CCD érzékelőjéből és polcos távtartó rendszerből állnak, melyekbe mikroszkóp objektíveket építettünk és LED fényforrással láttunk el. Az egyszerű polcos szerkezet előnye, hogy széles körben elérhető fém és műanyag alkatrészekből megépíthető, és megfelelő alátétek alkalmazásával a sejtenyésztő inkubátorban fenntartott 37°C-on jelentkező hőtágulás hatása is kiküszöbölhető, így megfelelő beállítások mellett a felvétel a kísérlet teljes időintervalluma alatt éles marad. Fényforrásként megfigyeléseinkhez közeli infra tartományban emittáló LED-eket használtunk, a folyamatos fehér fénnel történő megvilágításból következő esetleges fototoxicitás elkerülése végett.

A sejtek tenyésztésével párhuzamosan végeztük az LTS-ek beállítását. A mikroszkópokba x10/0.25 objektíveket szereltünk. A fókusz az inkubátoron kívül, már letapadt sejteket tartalmazó flaskákra állítottuk be. Ezután a mikroszkópok bekerültek az inkubátorba, ahol 24 órás csúszástesztet végeztünk, hogy megbizonyosodjunk a fókusz stabilitásáról, és elvégezzük a szükséges utólagos beállításokat. Az elkészült karcmodelleket a már beállított mikroszkópok tárgyasztalára helyeztük, és elindítottuk a felvételt.

A digitális kamera és az eTox LTS szoftver segítségével percenként készítettünk felvételeket a sejttenyészetekről. A vizsgálatot addig folytattuk, míg a sejtek be nem nőttek a készített karcot, míg újra ki nem alakult a teljesen összefüggő sejtpázsit.

3.3 Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok

Kísérleteink során lehetőségünk nyílt a kontroll karcmodellek pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatára. Az elektronmikroszkópos vizsgálat során felvételeket készítettünk a karcok felületéről és a környező sejtekről.

A kontroll karcok vizsgálatához egy HuLi tenyészetet 100%-os konfluenciáig tenyésztettünk, majd steril pipetta hegygel megkarcoltuk. A tenyészetben 3 karcot ejtettünk, különböző helyekre, megadott időpontokban. Az elsőt 12 órával, a másodikat 6 órával, a harmadikat három órával fixálás előtt.

A tápfolyadékot leszívtuk a tenyészetéről és 4%-os glutáraldehiddel fixáltuk. Három órával fixálás után a glutáraldehidet eltávolítottuk, majd a mintát víztelenítettük felszálló alkohol sorban (50%, 60%, 70%, 80%, 90% és 100%). Ezután a sejttenyésztő edényt a karcok megfigyeléséhez megfelelően elvágtuk. A minta szárítását lágy vákuumban vittük véghez. A minta kiszárítása után egy vékony arany réteggel vontuk be a minta felszínét, majd szénragasztóval rögzítettük a mintatartóhoz.

3.4 Az elkészült képek elemzési módszerei

Fluoreszcens mikroszkópos vizsgálataink során, mind a kontroll, mind a kezelt mintákat tartalmazó tárgylemezeken megkerestük a kromatin kondenzálódás intermediereit, és a kezelt mintákon a különböző fázisokban megjelent olyan változásokat, amelyeket az adott fázisban lévő sejtmagok nagy részénél tapasztaltunk. Ritkán megjelenő így szignifikánsnak nem titulálható változásoknak nem szenteltünk figyelmet. A nanorészecskék és kolloid oldatok

genotoxikus hatására az azonos kondenzálódási fázisban lévő kromatinok közötti különbségekből következtettünk.

A Long-Term Scan mikroszkópokkal készített képszekvenciákról Fiji képelemző szoftver segítségével készítettünk kvantitatív elemzéseket. A sebgyógyulásra gyakorolt hatásra a karcok összenövéséhez szükséges időből, és a növekedés sebességéből következtettünk. A sebesség megállapítása során a karc területének átlagos percenkénti változását korrigáltuk a karc frontvonalának hosszával, így megszületett a lineáris terjedési sebesség, mely független a karc alapterületétől.

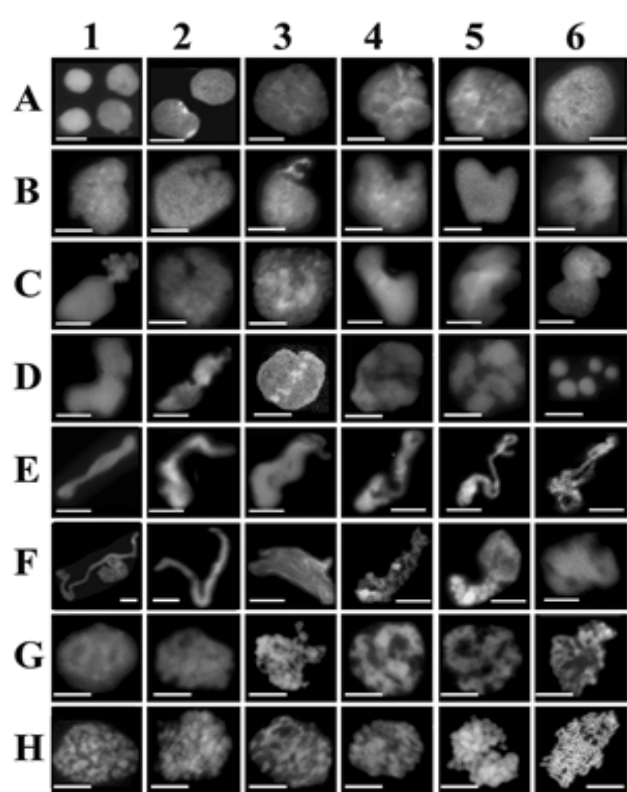
Eredmények

Mivel az arany és ezüst kolloidok hatásvizsgálata során nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a tápfolyadékban inkubáltak és a hidratburokban inkubáltak között, ezért eredményeink kifejtése során sem választottuk szét őket.

1. A kromatin kondenzálódásra gyakorolt hatások

1.0 Kontroll

A kontroll megfigyelése során a humán limbális sejtenyészetekre jellemző a munkacsoportunk által már leközölt kromatin kondenzálódási intermediereket figyeltük meg. Új intermediereket nem találtunk.

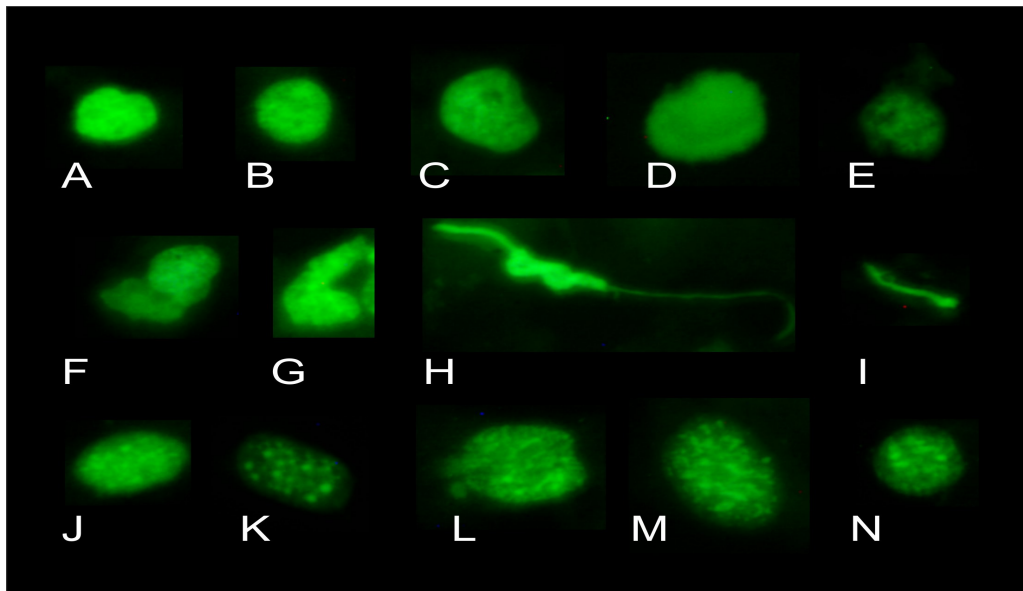


2. ábra. A HuLi kromatin kondenzálódási intermedierek forrás:(13)

1.1 Ezüst kolloid

12,6 $\mu\text{M}/\text{ml}$ ezüst kolloid hatása a kromatin kondenzálódásra

A folyamat kezdőpontja a kondenzált sejtmag megjelenése (A, B), majd a felhős szerkezet (C, D, E) kialakulása. Aztán a sejtmag anyagának felszakadásával létrejön a szalagos szerkezet (F, G), azonban ennél a koncentrációnál ennek a szerkezetnek a megjelenése a kontrollhoz képest ritkább. A fonalas szerkezet megjelenik hosszú, elongált, meghosszabbodott formában (H, I). Ezek után kialakulnak az praekromoszómák (J, K, L, M, N). A koncentrációra jellemző a sejtmagok kisebb mérete a kontrollhoz képest, illetve a sejtmag anyagában látható bemélyedések számának a megnövekedése. Nem figyeltünk meg a metafázisos kromoszómákat. Megfigyeltünk felszakadt sejtmagokat, de a számuk nem szignifikáns.

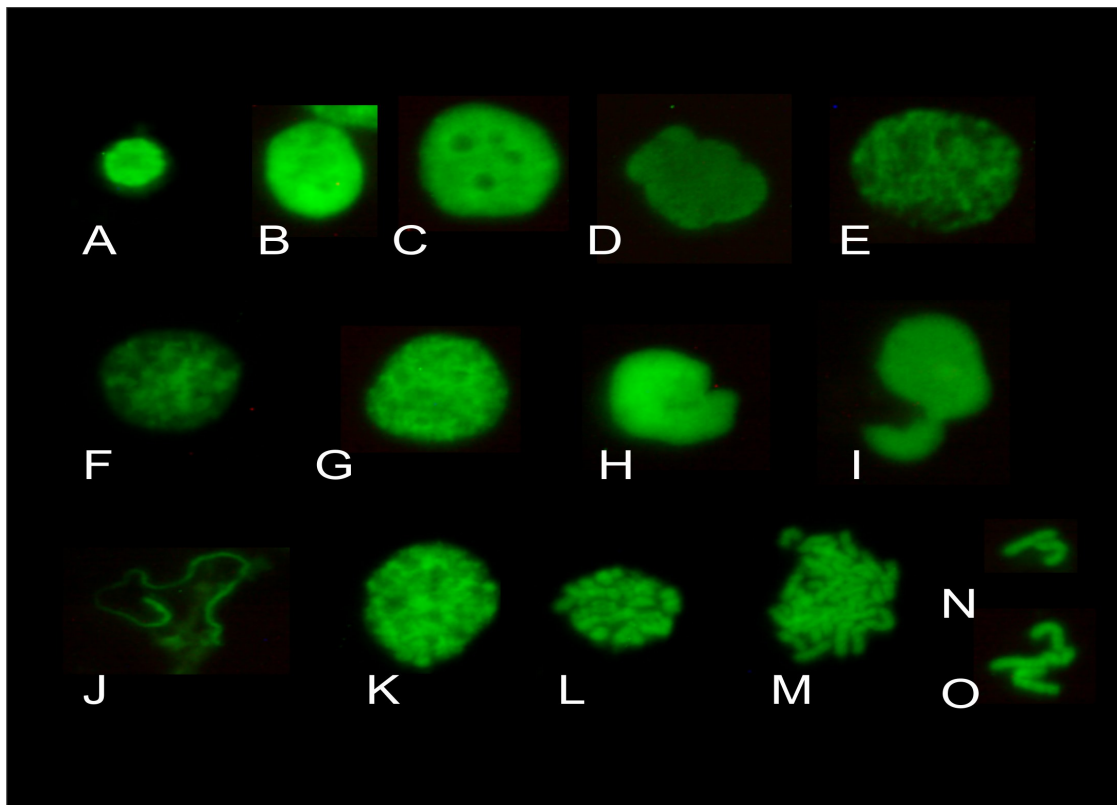


3. ábra. 12,6 μM ezüst kolloiddal kezelt tenyészet

1.2 Arany kolloid

3,15 $\mu\text{M}/\text{ml}$ arany kolloid hatása a kromatin kondenzálódásra

Ezen koncentráció mellett a kromatin kondenzálódás teljes egészében végig ment. Az interfázisos kondenzált sejtmag (A, B) megjelenése után kialakult a felhős szerkezet (C, D), amelyben kisebb kiinduló pontokban elindult a kondenzáció(E). Kialakult a szalagos alak (F, G), amiből pedig a fonalas szerkezet (H, I, J). Megjelennek a praekromoszómák (K, L), aztán pedig a metafázisos kromoszómák elongált formái (M, N, O). Itt is megjelennek a sejtmagban lévő mélyedések, melyek a kondenzáció elkezdődésére utalnak. A fonalas alak elongált változata mellett megfigyeltük rövidebb formáit is.

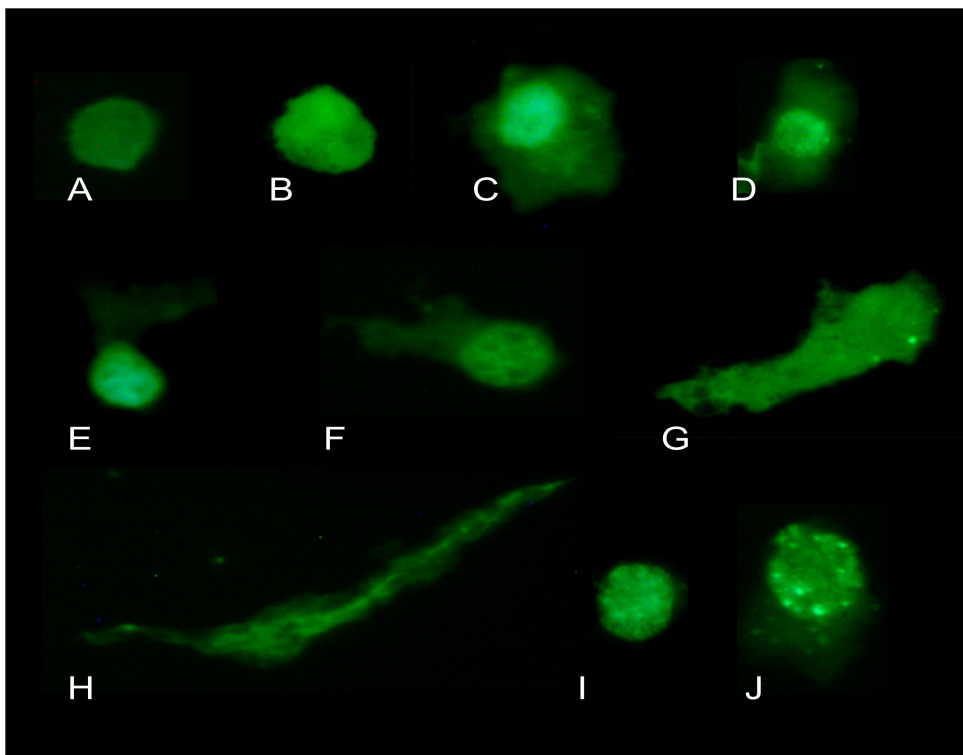


4. ábra. 3,15 μM arany kolloid hatása a kondenzációra

1.3 Arany nanorészecskék

21,66 µg/ml arany nanorészecske hatása a kromatin kondenzálódásra

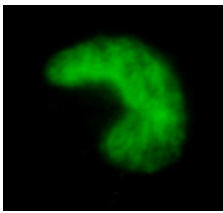
Ennél a koncentrációnál megjelenik a folyamat első alakja a kondenzált sejtmag (A, B), majd elindul a kondenzálódás a sejtmag belsejében. Kialakul a felhős szerkezet (C), ebből kiindul a szalagos szerkezet (D, E, F). A szalagos szerkezetből a kondenzálódás folyamata során a fonalas szerkezet alakul ki (G, H), amely elongált. Ahogy a fonalas alak feltekeredik, kialakulnak a kromoszóma előtelepek, a praekromoszómák (I, J). Ennél a koncentrációnál ennyit tudtunk megfigyelni a kondenzálódási folyamatból, a mintákban nem voltak jelen a már kialakult kromoszómák. Itt nem találkozunk azzal a karéjos sejtmag szerkezettel, mint a 140 µg/ml-es koncentrációnál.



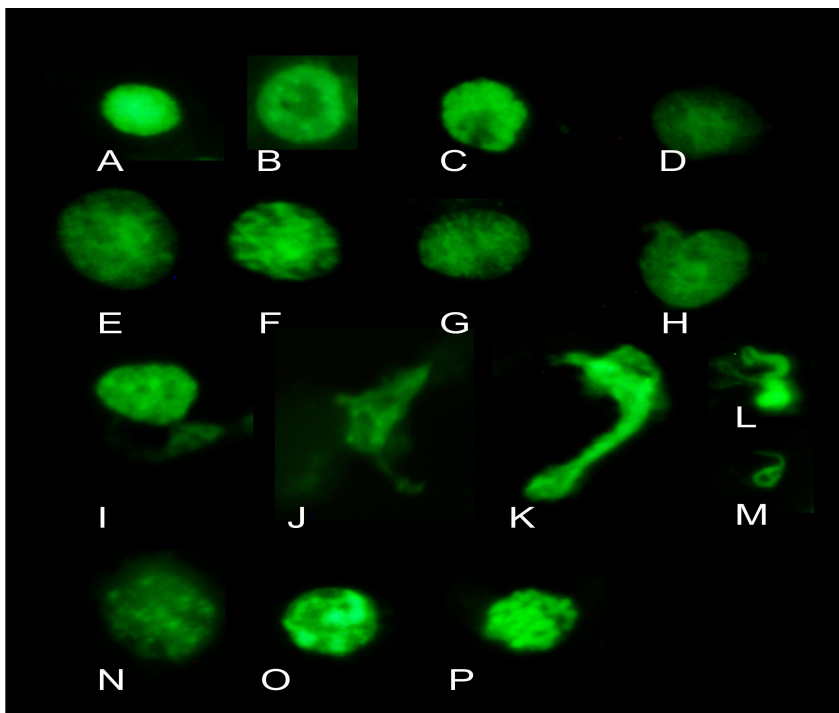
5. ábra. 21,66µg/ml-es koncentrációjú arany nanorészecske hatása a kondenzációra

140 $\mu\text{g/ml}$ arany nanorészecske hatása a kromatin kondenzálódásra

A folyamat során látható, ahogy az először kondenzált sejtmag jelenik meg (A, B, C), majd az felnyílik, így megjelenik a fátyolos szerkezet (D, E). Ezt követően a szalagos alak jelenik meg (F, G, H), ebből pedig a fonalas szerkezet alakul ki (I, J, K, L, M), amely ebben az esetben a kontrollhoz képest rövidebb és nem elongált a nanorészecske hatása miatt (ragadósság). Ahogy a fonalas szerkezet tovább kondenzálódik, megjelennek a kromoszóma előtelepek, vagyis a prekromoszómák (N, O, P). Maguk a kromoszómák a folyamatban mintában jelennek meg, az előtelepek kialakulásáig jut el a kromatin kondenzáció folyamata. Ilyen koncentráció mellett megfigyeltük olyan sejtmagok jelenlétét is, melyek nagy része hiányzott, szemben a 21,66 $\mu\text{g/ml}$ -es koncentrációval.



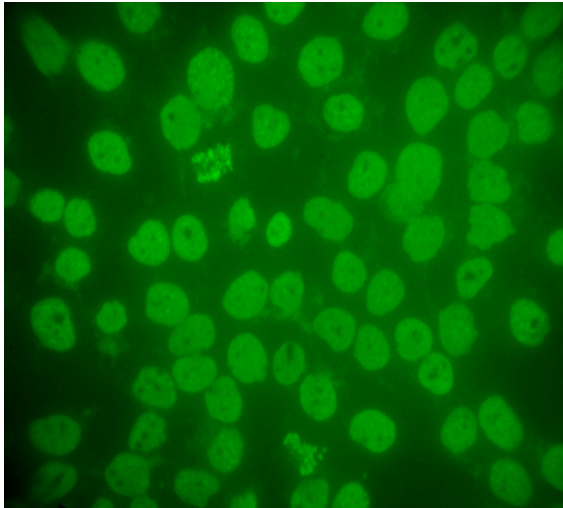
6. ábra. Karéjos megjelenésű sejtmag



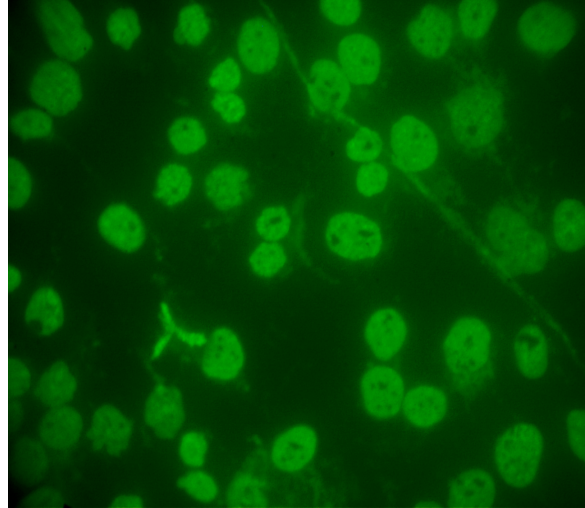
7. ábra. 140 $\mu\text{g/ml}$ arany nanorészecske hatása a kromatin kondenzálódásra

1.3.4. Glassbottom dish in situ megjelölés

A glassbottom dishben in situ fluoreszcens jelölés utáni vizsgálat során is ugyanazon eredményeket kaptuk, mint a kromatin izolálás során. A 12,6 $\mu\text{M}/\text{ml}$ -es Ag koncentrációnál megfigyeltünk trivison-re, azaz hármas osztódásra utaló jeleket. Minden koncentrációnál észrevehetőek voltak a mitotikus síkba rendeződött kromoszómák, amely azt bizonyítja, hogy az adott sejtenyészetben voltak osztódó sejtek.



9. ábra. Mitotikus síkba rendeződött kromoszómák



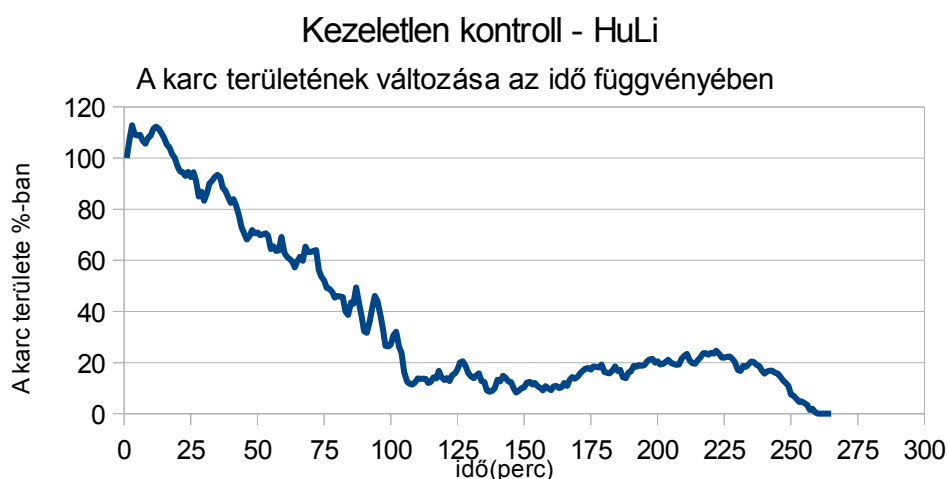
8. ábra. Hármas osztódás a 12,6 μM koncentrációjú ezüst kolloiddal kezelt tenyészetből

2. Sebgyógyulásra gyakorolt hatások

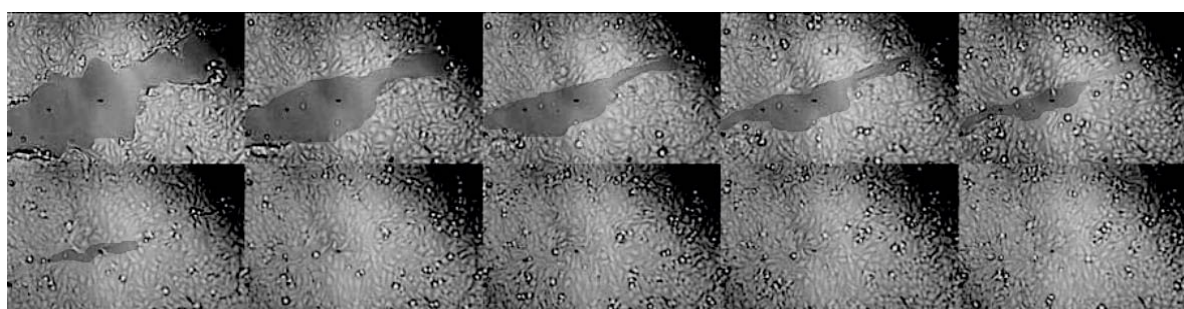
2.0 Kontroll

A karcmodellek mindegyikénél megfigyelhető a felvételek elején a karc kezdeti területnövekedése. Mivel a tenyésztőedények közvetlenül a karcok ejtése után kerülnek az LTS-ekbe, a grafikonokon és a vizsgálat első órájában készült képeken látható a karcolás következményeként elpusztult sejtek összezsugorodása és felválása a sebszéleken. Ezután megkezdődik a sebgyógyulás.

A kísérleteinkből származó képszekvenciákat elemző grafikonokat az alábbi kontrollhoz hasonlítottuk:



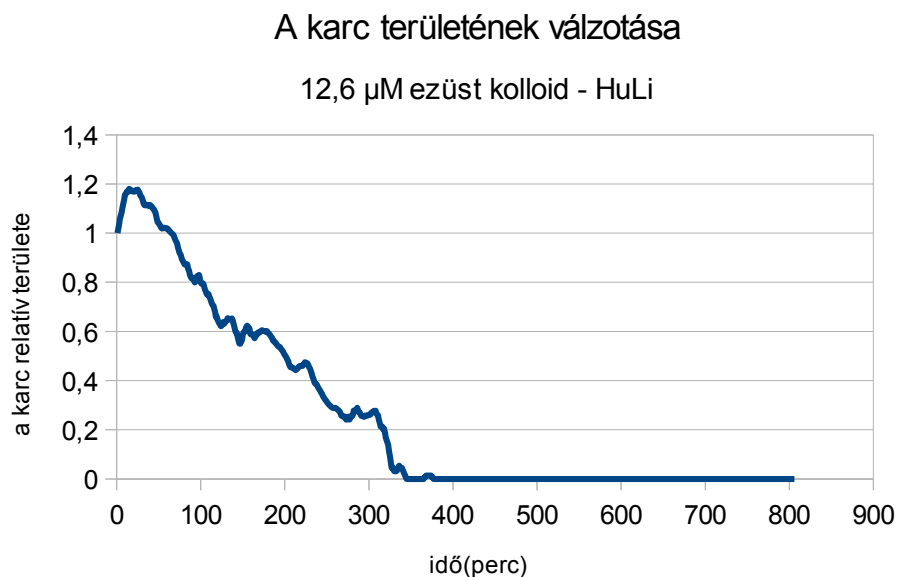
10. ábra. Kontroll tenyészetben ejtett karc gyógyulása



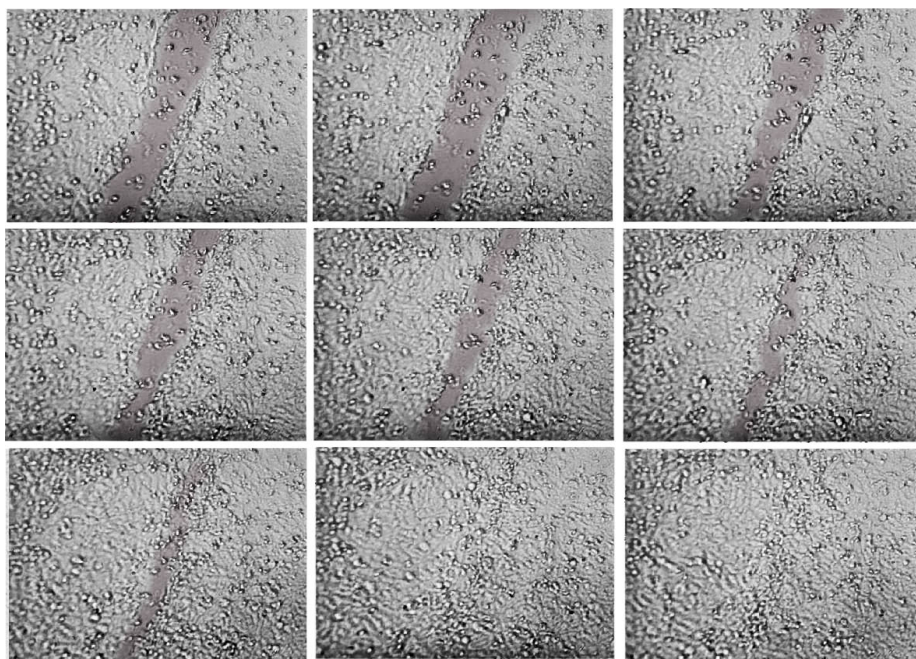
11. ábra. Kontroll karc gyógyulása

A kezeletlen HuLi tenyészet a vizsgálat megkezdése után 260 perccel begyógyult (lineáris terjedési sebesség: $1,73 \mu\text{m}/\text{perc}$). A tenyészet 100%-os konfluenciájának visszaállása után nem tapasztalható különbség a karcolás előtti állapothoz képest.

2.1 Ezüst kolloid



12. ábra. A 12,6 μM ezüst kolloiddal kezelt karc területének változása



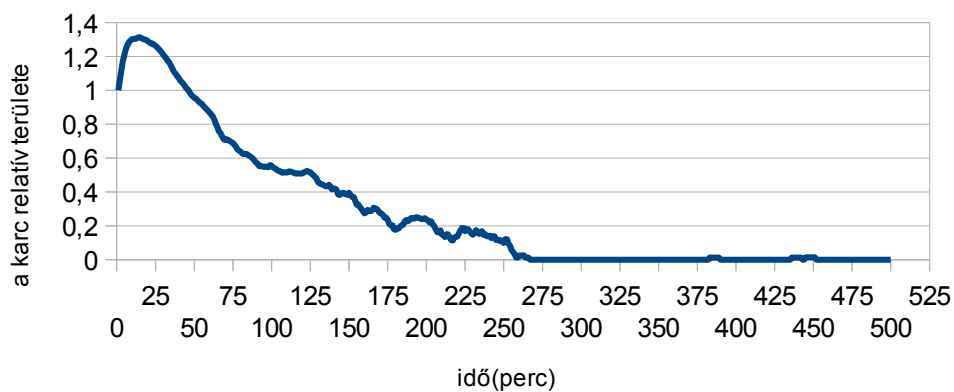
13. ábra. A 12,6 μM ezüst kolloiddal kezelt tenyészetéről készült 0,1,1.5,2,2.5,3,3.5,4 és 5 órás felvételek

A 12,6 μM -os ezüst kolloiddal kezelt tenyészet a 350 perc körül készült felvételek idejére teljesen begyógyult (lineáris terjedési sebesség: 0,46 $\mu\text{m}/\text{perc}$). A tenyészet 100%-os konfluenciájának visszaálltával a karc nyoma nem látható a sejtpázsiton.

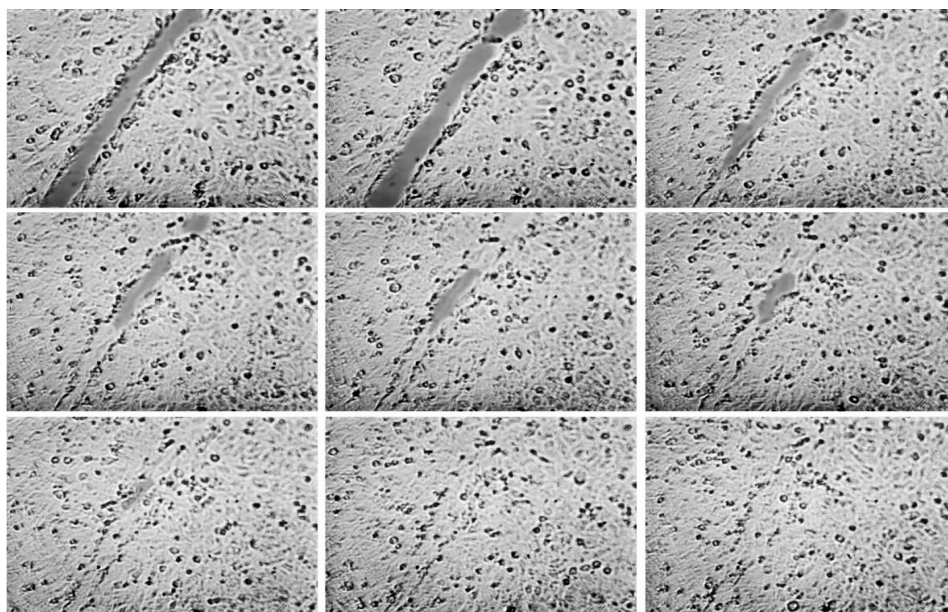
2.2 Arany kolloid

A karc területének változása

3,15 μM arany kolloid - HuLi



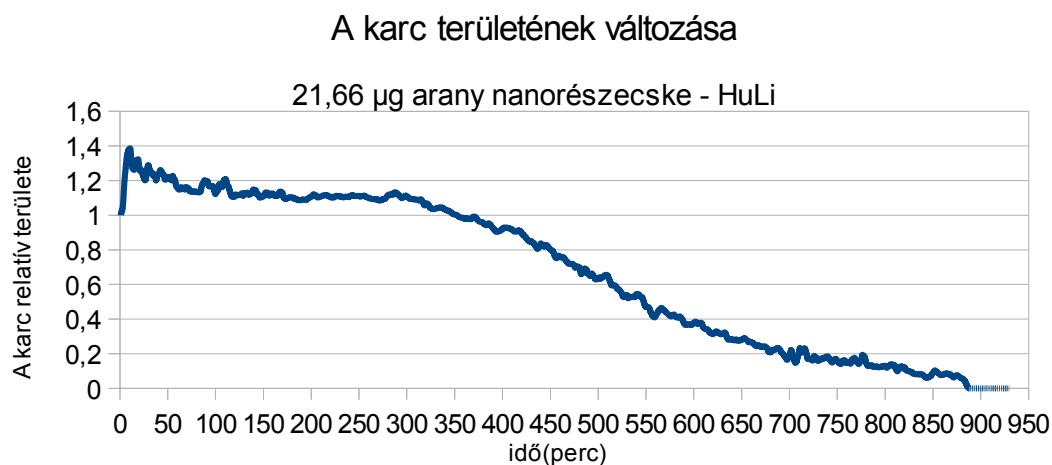
14. ábra. A 3,15 μM arany kolloiddal kezelt karc területének csökkenése



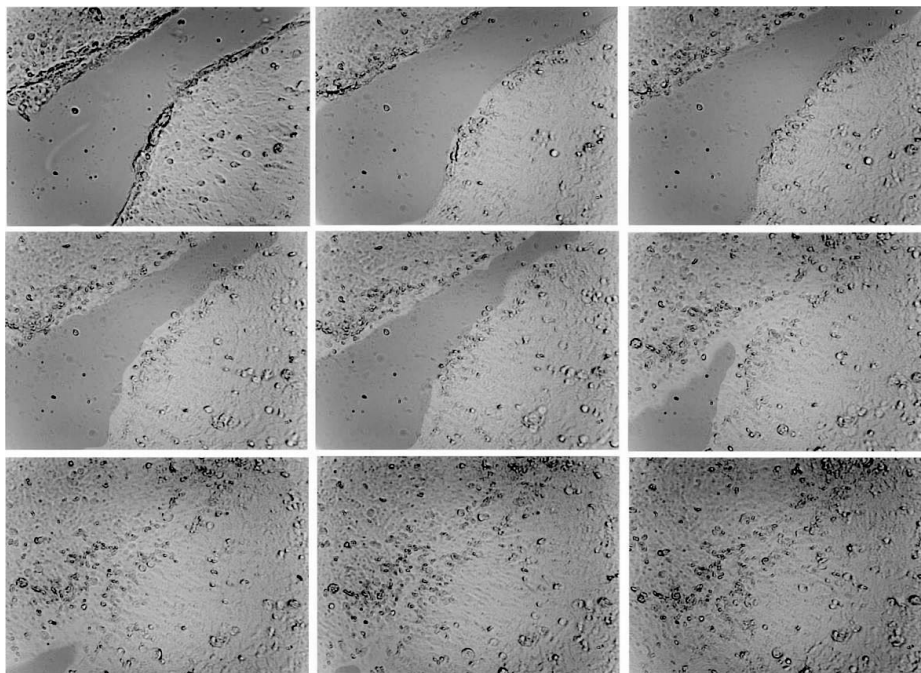
15. ábra. 3,15 μM -os koncentrációjú arany kolloiddal kezelt tenyészet soronként balról jobbra haladva 0, 1, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5 órás felvételei

A 3,15 μM -os koncentrációjú arany kolloiddal kezelt tenyészetben a karc a kontrollhoz hasonlóan 260 és 270 perc között készült felvételeknél gyógyul be (lineáris terjedési sebesség: 1,69 $\mu\text{m}/\text{perc}$). *In vivo* hegesedésre utalhat a monolayer felületéhez tapadt elpusztult sejtek jelenléte, amelyek a seb bezáródása után is mutatják a karc helyét.

2.3 Arany nanorészecskék



16. ábra. A 21,66 μg arany nanorészecskével kezelt karc területváltozása az idő függvényében

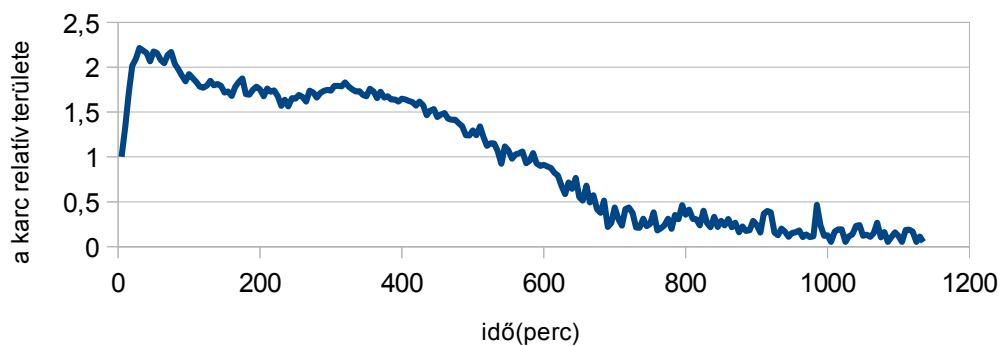


17. ábra. 21,66 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -es koncentrációjú arany nanorészecskével kezelt tenyészetből készült 0,2,4,6,8,10,12,14,15 órás felvételek (soronként balról jobbra)

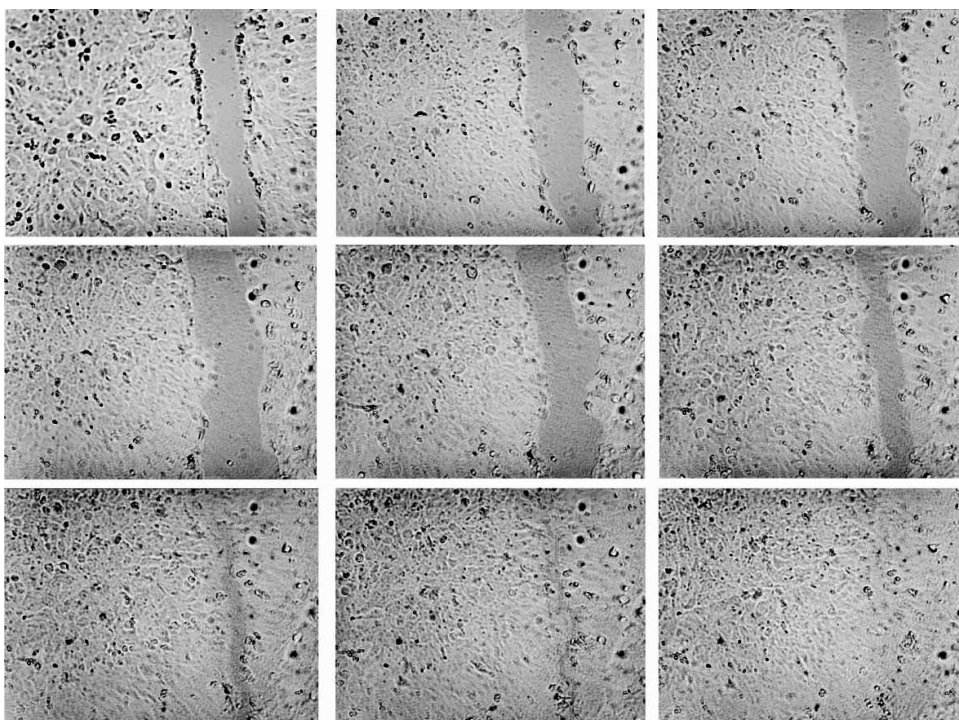
A 21,66 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -es koncentrációjú arany nanorészecskével kezelt tenyészet esetében a karc a kontrollhoz képest körülbelül háromszoros idő alatt, 880 körül zárult be (lineáris terjedési sebesség: 0,47 $\mu\text{m}/\text{perc}$). Az összehúzódtott seb helyén a monolayerhez tapadt reziduális testek láthatók.

A karc területének változása

140 µg/ml arany nanorészecske- HuLi



18. ábra. Sebgyógyulás 140 µg/ml nanorészecske kezelés mellett



19. ábra. 140µg/ml-es koncentrációjú arany nanorészecskével kezelt tenyészet: 0,2,4,6,8,10,12,14,16 órás felvételek

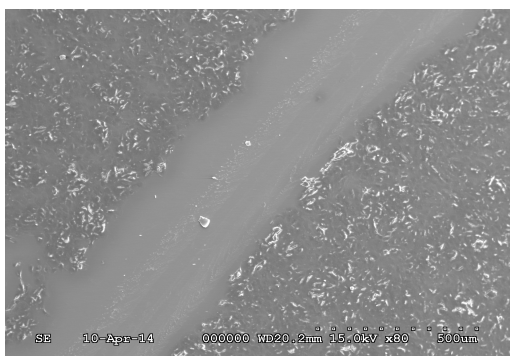
A 140 µg/ml-es koncentrációjú arany nanorészecskével kezelt tenyészet esetében a karc a kontrollnál jóval lassabban, a 840 perc után teljesen begyógyult (lineáris terjedési sebesség: 0,34 µm/perc), a gyógyult karc helyét nem mutatja a sejtpázsíthoz tapadó elpusztult sejttömeg.

3. A karcmodell elemzése a pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálat alapján

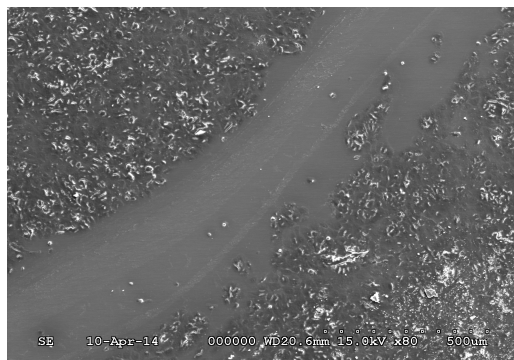
Az elektronmikroszkópos vizsgálat során információt szerezhettünk a sebgyógyulás mechanizmusáról a karcmodell esetében. A 19-es és 20-as ábrát összehasonlítva látszik, hogy a sebgyógyulás során, a sejtek a seb szélein, a rendelkezésre álló teret kihasználva kiterjednek, és félszigethez hasonló betüremkedéseket hoznak létre.

A karcokon megfigyelhető individuális sejtek kitapadása, a szabad felületet nyújtó karc belsejébe is, leginkább a sebszélek közvetlen közelében. A gyógyulás folyamatának jelentős része láthatóan nem a karcon belüli kitapadásból, hanem a HuLi osztódása, és a karc belseje felé történő sejtmigráció (21. ábra) során kialakuló félszigetes struktúrák számának növekedéséből, így a sebszélek folyamatos közeledéséből származik. Ez a megfigyelés összecseng a HuLi tenyészeteknél általánosan megfigyelt viselkedéssel. A limbális sejtenyészetek esetében, osztódás után, a sejtek már kitapadt sejtek mellé igyekeznek kitapadni, ezáltal a tenyészetben jellegzetes sejtszigetek jönnek létre, amelyek a konfluencia növekedésével egymáshoz kapcsolódva alakítják ki az összefüggő HuLi sejtpázsitot.

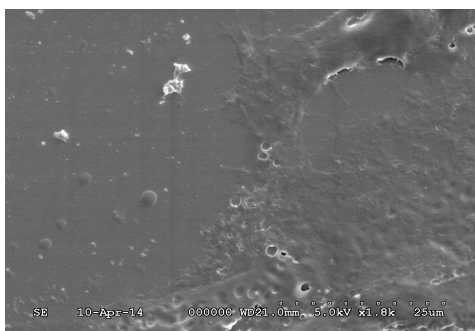
A pásztázó elektron mikroszkóppal megfigyelhettük, hogy az általunk használt karckészítési módszer milyen karcfelületet hagy hátra. A karcokon jól látható a fecskendőtü nyoma, a karcolás iránya, és a sejthártya felszakadása után kitapadva maradt kihorgonyzó kapcsolatok alkotta sejttörmelék (22. ábra).



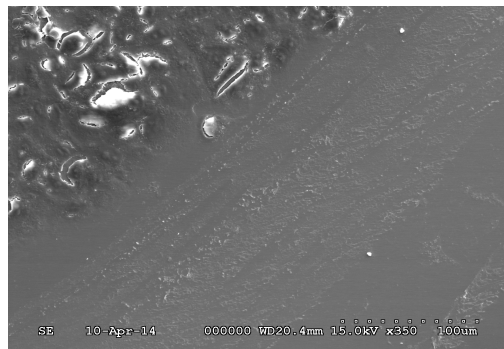
21. ábra. Kontroll karc (3 óra)



20. ábra. Kontroll karc (12 óra)



22. ábra. A limbális sejtek kiterjedése és mozgása a sebszéleken



23. ábra. A karc felülete

Diszkusszió

A vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy a kolloidok és a nanorészecskék nem voltak toxikus hatással a sejtenyészetekre, viszont jelenlétükben a sebgyógyulás folyamata minden esetben lassabban ment végbe.

A Time-Lapse Imaging vizsgálatok során minden koncentrációnál azt tapasztaltuk, hogy a sebszélek összezáródtak, a seb begyógyult. Két koncentrációnál a seb záródása folyamán reziduális testek maradtak a karc két szélén, amelyek a sebszélek összezáródása után is jelezték a karc helyét, ezzel utalva egy esetleges *in vivo* hegesedésre. A kialakult hegszerű struktúra összeaggregálódott elpusztult sejtekből és sejtörmelékből áll, melyek teljes felválás helyett a monolayerhez tapadnak és együtt mozognak a sebszélekkel. A sebszélek összezáródása kontrollhoz viszonyítva lassabban történt meg a kezelt tenyészeteknél. A 140 µg/ml-es koncentrációjú arany nanorészecskével és a 12,6 µM/ml ezüst kolloiddal kezelt tenyészetnél hegszerű struktúra kialakulását nem tapasztaltuk.

A fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok során az izolált kromatin szerkezetek tanulmányozása folyamán, a kísérletben használt kolloidok és nanorészecskék a sejtekre csekély genotoxikus hatást mutattak. A használt koncentrációk mellett a kromatin kondenzálódás végbement. Megfigyelhetők voltak felszakadt sejtmagok, de számuk nem szignifikáns. A 21,66 µg/ml-es koncentrációnál még megfigyelhattünk elongált fonalas szerkezetet, azonban a 140 µg/ml-es koncentráció esetében az arany nanorészecske „ragadóssága” miatt a fonalas szerkezet nem volt elongált, az örökítőanyag feltekeredve jelent meg. Ezen koncentráció esetében megfigyelhattunk karéjos alakú sejtmagokat.

A glassbottomban *in situ* megjelölés során mindegyik koncentrációnál megfigyelhattunk osztódási síkba rendeződött kromoszómákat, tehát az adott koncentráció mellett a sejtek képesek voltak osztódni. A 12,6 µM-os koncentrációjú ezüst kolloid jelenlétében hármas osztódásra utaló szerkezetet is megfigyeltünk.

A pásztázó elektron mikroszkópos felvételek átfogóbb képet adtak a karcmodellről, sejtek kitapadásáról és a seb gyógyulási mechanizmusáról.

Az általunk megfigyelt eredmények alapján feltehető az, hogy a forgalomban lévő biológiailag inert arany nanorészecske az általunk használt koncentrációkban megfelelő lehet hatóanyag bevitelre a szemészetben, ám jelenlétében a humán limbális keratinocita össejtek területfoglalása lassul, mely jelezheti az *in vivo* sérülés gyógyulásának lassulását.

Rövidítések

FBS: Fetal Bovine Serum(magzati borjú szérum)

LTS: Long Term Scan(hosszú távú megfigyelés)

PSN: Penicillin Streptomycin-Neomicin (antibiotikum, antimikotikum)

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

DMEM-HAM'S F12: Duplecco's Modified Eagle's MediumNutrientMixture F12-Ham

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

PBS: Phosphate buffered saline (fiziológias sóoldat)

HuLi: Humán limbális keratinocita sejtvonal

RPM: roll per minute (fordulatszám)

DMSO: Dimetil-szulfoxid

MTT: Metil-tiazol tetrazolium

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnénk megköszönni Prof. Dr. Pócsi István tanszékvezetőnek, hogy kutatási munkánkat a Biotechnológia és Mikrobiológia Tanszéken végezhattük. Köszönet illeti Dr. Szemán-Nagy Gábor György témavezetőnket, hogy munkánk elvégzésére lehetőséget biztosított és Prof. Dr. Bánfalvi Gáspárt, hogy tanácsaival támogatta kutatásunk előrehaladását.

Köszönettel tartozunk továbbá az eTox munkacsoport tagjainak támogatásukért és tanácsaikért. Külön köszönettel tartozunk Turáni Melinda PhD hallgatónak kitartó segítségéért, és Dr. Daróczi Lajosnak a Szilárdtest Fizika Tanszék egyetemi adjunktusának a pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok elvégzésére biztosított lehetőségért.

Ábrajegyzék

1. ábra. A limbus elhelyezkedése a szemben	7
2. ábra. A HuLi kromatin kondenzálódási intermedierek forrás:(13).....	16
3. ábra. 12,6 μM ezüst kolloiddal kezelt tenyészet.....	17
4. ábra. 3,15 μM arany kolloid hatása a kondenzációra.....	18
5. ábra. 21,66 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -es koncentrációjú arany nanorészecske hatása a kondenzációra	19
6. ábra. Karéjos megjelenésű sejtmag.....	20
7. ábra. 140 $\mu\text{g}/\text{ml}$ arany nanorészecske hatása a kromatin kondenzálódásra.....	20
8. ábra. Hármasszoros osztódás a 12,6 μM koncentrációjú ezüst kolloiddal kezelt tenyészetből.....	21
9. ábra. Mitotikus síkba rendeződött kromoszómák.....	21
10. ábra. Kontroll tenyészetben ejtett karc gyógyulása.....	22
11. ábra. Kontroll karc gyógyulása.....	22
12. ábra. A 12,6 μM ezüst kolloiddal kezelt karc területének változása.....	23
13. ábra. A 12,6 μM ezüst kolloiddal kezelt tenyészetéről készült 0,1,1.5,2,2.5,3,3.5,4 és 5 órás felvételek.....	23
14. ábra. A 3,15 μM arany kolloiddal kezelt karc területének csökkenése.....	24
15. ábra. 3,15 μM -os koncentrációjú arany kolloiddal kezelt tenyészet soronként balról jobbra haladva 0, 1, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5 órás felvételei	24
16. ábra. A 21,66 μg arany nanorészecskével kezelt karc területváltozása az idő függvényében.....	25
17. ábra. 21,66 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -es koncentrációjú arany nanorészecskével kezelt tenyészetéről készült 0,2,4,6,8,10,12,14,15 órás felvételek (soronként balról jobbra).....	25
18. ábra. Sebgyógyulás 140 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nanorészecske kezelés mellett.....	26
19. ábra. 140 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -es koncentrációjú arany nanorészecskével kezelt tenyészet: 0,2,4,6,8,10,12,14,16 órás felvételek.....	26
20. ábra. Kontroll karc (12 óra).....	27
21. ábra. Kontroll karc (3 óra).....	27
22. ábra. A limbális sejtek kiterjedése és mozgása a sebszéleken.....	28

Irodalomjegyzék

- (1) Tarl W. Prow; Toxicity of the nanomaterials to the eye (2010) WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology, Volume 2
- (2) Nuria Sanvicens, M. Pilar Marco; Multifunctional nanoparticles –properties and prospects for their use in human medicine (évszám) Cell press, Vol.26 No.8
- (3) Yolanda Diebold, Margarita Calonge; Progress in Retinal and Eye Research 29 (2010) 596e609, Applications of nanoparticles in ophthalmology
- (4) Chithrani BD, Chan WCW; Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. (2007) Nano Lett 7:1542–1550.
- (5) Gao HJ, Shi WD, Freund LB; Mechanics of receptormediated endocytosis. (2005) Proc Natl Acad Sci USA 102:9469–9474.
- (6) Nativio P, Prior IA, Brust M; Uptake and intracellular fate of surface-modified gold nanoparticles. (2008) ACS Nano2:1639–1644.
- (7) Tang J, Xiong L, Wang S; Distribution, translocation and accumulation of silver nanoparticles in rats. (2009) Journal of Nanoscience and Nanotechnology 9(8):4924-4932.
- (8) Kawata K, Osawa M, Okabe S; *In Vitro* Toxicity Of Silver Nanoparticles At Noncytotoxic Doses To Hepg2 Human Hepatoma Cells Environ. (2009) Sci. Technol., 43, 6046–6051
- (9) E. Michael van Buskirk; The Anatomy of the Limbus Eye (1989) 3.101-108
- (10)Cotsarelis G, Cheng G, Dong G, Sun T T, Lavker R M ; Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. (1989) Cell 57, 201–209
- (11) Hendkin P, Jay B; Induced limbal migration: a technique for studying melanocytes (1996) Journal of Anatomy 100, 139-145

- (12)Liang CC, Park AY, Guan JL; In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. (2007) Nat. Protoc. 2, 329-333.
- (13)Turani M, Banfalvi G, Peter A, Kukoricza K, Kiraly G, Talas L, Tanczos B, Dezso B, Nagy G, Kemeny-Beke A; Antibiotics delay in vitro human stem cell regrowth (2014) Toxicology In Vitro, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2014.10.013>