



1949

**Dinamikus citológiai módszerek vegyületek  
szerkezet-hatás összefüggésének vizsgálatához**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

**Készítette:**

Kiss Alexandra

**Témavezető:**

Dr. Szemán-Nagy Gábor György

DEBRECENI EGYETEM

Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2023

*Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola Kvantitatív és Teresztris Ökológia programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.*

*Nyilatkozom arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.*

*Debrecen, 2023. 06. 10.*

.....  
*a jelölt aláírása*

*Tanúsítom, hogy Kiss Alexandra doktorjelölt 2019- 2023 között a fent megnevezett Doktori Iskola Kvantitatív és Teresztris Ökológia programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Nyilatkozom továbbá arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.*

*Az értekezés elfogadását javasolom.*

*Debrecen, 2023. 06. 10.*

.....  
*a témavezető aláírása*

# Dinamikus citológiai módszerek vegyületek szerkezet-hatás összefüggésének vizsgálatához

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében  
a Biológia tudományágban

Írta: Kiss Alexandra okleveles biotechnológus

Készült a Debreceni Egyetem Juhász-Nagy Pál doktori iskolája  
(Kvantitatív és Teresztris Ökológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Szemány-Nagy Gábor

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Juhász István.....  
Dr. Borbély János .....

A bírálóbizottság:

elnök:

Prof. Dr. Mahura Tibor György .....

tagok:

Gálné Dr. Miklós Ida.....

Dr. Prokisch József.....

Dr. Boda Pál .....

Dr. Várbíró Gábor .....

Az értekezés védésének időpontja: 2023. ....

# Tartalom

---

Bevezetés .....	1
Irodalmi áttekintés .....	5
1. Daganatos megbetegedés.....	5
1.1. A daganatos sejtek anyagcseréje.....	8
1.1.1. Glikolízis .....	9
1.1.2. Citromsav-ciklus .....	10
1.1.3. Glutaminolízis .....	11
1.1.4. Terminális oxidáció.....	12
1.1.5. Szerin bioszintézis.....	13
2. Nagy áteresztőképességű vizsgálatok.....	17
2.1. Hatóanyag fejlesztés és tesztelés .....	19
3. <i>In vitro</i> sejttenyésztési modellek: előnyök és hátrányok.....	24
3.1. Sejttenyészetek.....	24
4. Onkogének.....	28
5. Hosszútávú valós időben történő megfigyelésre alkalmas mikroszkópos módszerek áttekintése .....	37
6. Daganat ellenes szerek hatása a sejtméretre és a sejtsztódásra .....	45
6.1. 5-fluorouracil .....	46
6.2. Metotrexát .....	47
6.3. 5-fluorouracil és metotrexát együttes hatás vizsgálata .....	52
7. Mi a különbség a nekrosis és az apoptózis között? .....	53
7.1. Apoptózis .....	55
7.2. Nekrosis .....	56
7.3. Nekroptózis .....	56
7.4. Sejthalál kvantifikálása .....	57
Anyagok és módszerek.....	62
1. Sejttenyésztési körülmények .....	62

1.1. Alkalmazott sejtvonalak .....	63
2. Viabilitás vizsgálat MTT-teszttel .....	65
3. Time-Lapse Imaging videómikroszkópia .....	66
3.1. Adatfeldolgozás .....	68
4. Alkalmazott vegyületek .....	79
Célkitűzések .....	84
Eredmények .....	87
1. A kidolgozott módszer beállítása és validálása .....	87
1.1. MTT-teszt .....	87
1.2. A hosszú távú megfigyelés kvantifikálása .....	94
1.2.1. Az anyasejtek méretének változása .....	94
1.2.2. A sejtosztódás ideje .....	97
1.2.3. Generációs idő .....	100
1.2.4. A sejthalál során keletkező reziduális testek .....	104
1.2.5. Maradványtestek kialakulása és láthatóvá tétele .....	106
2. A kidolgozott módszer tesztelése nagy mintaszámmal .....	113
2.1. Citotoxikus aktivitás .....	113
2.2. Élő sejtek képződése time-lapse mikroszkópián keresztül .....	120
2.2.1. Az anyasejtek méretének változása .....	120
2.2.2. A sejtosztódás időtartama .....	121
2.2.3. Generációs idő .....	123
Összefoglalás .....	127
Summary .....	133
Irodalom jegyzék .....	139
Ábra jegyzék .....	148
Táblázatok jegyzék .....	149
Köszönetnyilvánítás .....	155

# Rövidítések jegyzéke

---

47-DN – hormonfüggő emberi emlőkarcinóma

5-FU – 5-fluorouracil

ACD – véletlenszerű sejthalál (accidental cell death)

ADP- adenzin-difoszfát

ANOVA - Analysis of Variance

APC - adenomatous polyposis coli

ATP – adenzin-trifoszfát

BRCA1 – breast cancer gene 1

BRCA2 - breast cancer gene 1

CCD - Charge-Coupled Device

CHO – kínai hörcsög ovárium eredetű sejtvonal

CHO-K1 - kínai hörcsög ovárium eredetű sejtvonal

CMOS - Complementary Metal-Oxide Semiconductor

ConA - Concanavalin A

CYP-enzimek – citokróm P450

CSC – cancer stem cell

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMEM/HAMS'S F12 - Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F-12

DMSO – dimetil szulfoxid

DNS – dezoxiribonukleinsav

ECM – extracelluláris mátrix

ER – endoplazmatikus retikulum

FADH<sub>2</sub> – flavin-adenin-dinukleotid

FDA – Food and Drug Administration

F-dUMP - 5-Fluoro-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate

FSC - Forward Scatter

HaCaT - a spontaneously immortalized human keratinocyte cell line that was derived from adult human skin

HCT-8 - Human colon tumor - 8

HeLa – Henrietta Lacks méhnyakrák eredetű sejt

HER2/neu - human epidermal growth factor receptor 2

HTS – high-throughput screening

IC<sub>50</sub> - fél-maximális gátló koncentráció

MCDB 153 - Minimum Essential Medium Eagle's Basal Medium with Earle's Salts and L-glutamine supplemented with Vitamins

MCT – monokarboxilát transzporterek 1, 4

Msn2 - Multicopy suppressor of SNF1 protein 2

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid

MTX - metotrexát

MYC - myelocytomatosis oncogene

NAD - nikotinamid-adenin-dinukleotid

NADP - nikotinamid-adenin-dinukleotid - foszfát

NIH – National Institute of Health

PBS – foszfáttal pufferezt sóoldat

PG - peptidoglükán

PI – propidium jodid

RAS - renin–angiotenzin system

RCD – szabályozott sejthalál (regulated cell death)

RDW – vörösvértest-szélesség eloszlás

RGB – red green blue

RNS - ribonukleinsav

ROS – reaktív oxidatív gyök

RPMI 1640 - Roswell Park Memorial Institute 1640

rRNS – riboszómális ribonukleinsav

SCC VII - Squamous cell carcinoma VII

SI – szelektivitási index

Si - szilícium

SIFT - single-cell isolation following time-lapse imaging

THP1 - Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and Heterophile of Human Chronic Myelogenous Leukemia (AML) Patient 1 cell line

TLS – time-lapse imaging system

TP53 – tumor szuppresszor protein

U937 - hisztiocitás limfóma

UVC USB – USB Video Class USB

WM-266-4 - human melanoma cell line

# Bevezetés

---

A sejtek rendellenes fejlődését, mely során korlátlanul osztódnak, tumornak nevezzük. Az elmúlt két évtizedben világszerte 21 millió új tumoros megbetegedést diagnosztizáltak, amely drasztikus növekedést jelent. A klinikai jelentések alapján tízből hét halálesetet a daganatos megbetegedések okoznak, főleg Észak- és Közép-Amerikában, valamint Afrikában. Ez egy figyelmeztető jel, hogy a legfejlettebb országoknak is szükséges a gyors fejlődés, mind a korai detektálás, mind a gyógyítás terén. Minden korosztály érintett a daganatos megbetegedések kapcsán, azonban a kor előrehaladtával ennek a valószínűsége egyre nagyobb a DNS-t érintő mutációk, valamint a különböző karcinogénekkal történő érintkezés miatt.

A tradicionális tumorelles terápia a sebészeti beavatkozásokat, kemoterápiát és a sugárkezelést foglalja magába. A kemoterápiás kezelések során alkalmazott számos szintetikus gyógyszer és egyéb terápiás megoldás a legtöbb esetben önmagában nem éri el a kívánt hatást és gyakran kialakul a metasztatikus állapot. A metasztatikus állapot során a daganatos sejtek a vérárammal szétterjednek a szervezet különböző pontjain, amely azokon a helyeken is a tumorok kialakulását eredményezi, ezáltal drasztikusan csökkentve a gyógyulás lehetőségét és a túlélési rátát. Mindezek ismeretében a hatékony kezelésekhöz szükségünk van olyan biológiai vagy természetes forrásokból származó daganatterápiára alkalmas vegyületekre, amelyek szelektívek, kevesebb mellékhatásuk van, költséghatékonyak, minimális a rezisztencia kialakulásának a valószínűsége és több előnyös gyógyászati tulajdonságuk is van.

Egy összefoglaló cikk alapján<sup>1</sup> az új potenciálisan gyógyszerként alkalmazható vegyületek tesztelése és engedélyeztetése igen költséges és időigényes folyamat.

---

<sup>1</sup> Sharifi-Rad et al., 2019

Számokban kifejezve ez 10-15 évet jelent, mely során a tesztelt 5000-10000 jelölt közül csak 1 felel meg az összes FDA (Food and Drug Administration) jóváhagyásához szükséges kritériumnak. A tesztekhez szükséges időt és költséget sejttenyészeteken alapuló *high-throughput* (HTS) szűréssel próbálják csökkenteni. A sejttenyészetek alkalmazása során nem feltétlenül ugyanazon sejtválasz reakciók aktiválódnak, mint a szöveti környezetben, de ezzel már gyorsan szelektálhatók azok a vegyületek, amelyek hatástalanok vagy magas a toxicitásuk. Mindezek mellett továbbra sem válthatók ki az *in vivo* állatkísérletes tesztelések sem.

A hatóanyag felfedezése és fejlesztése során a sejt alapú vizsgáló rendszerek fontos szerepet játszanak: a főmolekula azonosításában, a preklinikai vizsgálatokban, -amely magába foglalja a toxicitási tesztek is-, a hatékonyság és gyógyszeradagolási mechanizmus tanulmányozásában.

A gyógyszeripar folyamatosan arra törekszik, hogy újabbnál újabb gyógyszerjelölt molekulákat fedezzen fel a váratlan igények kielégítése érdekében is. A tudomány és technológia párhuzamos fejlődése gyorsan megnövelte a gyógyszerjelöltek számát. Azonban ezzel együtt új problémák bukkantak fel, úgymint a gyógyszerkönyvtárak hatékony feldolgozása és értékelése toxicitási szempontból. A molekulák ezreit nagy mennyiségben gazdasági és etikai szempontokból nem célszerű tesztelni, így a tudománynak a sejtes alapú *in vitro* technikákra kell hagyatkoznia. A *high-throughput screening* (HTS) a megoldás az előbb említett problémákra. Mind gazdaságilag, mind az időtényező miatt ez a legkedvezőbb tesztelési lehetőség. A vizsgálatok történhetnek mikrotiter lemezekben, melyek manuálisan vagy robotizáltan végezhetőek el; továbbá alkalmazhatják az áramlási citometriát is erre a célra. Ezekkel lehetőség van számos gyógyszerkoncentrációt és expozíciós időt hatékonyan tesztelni.

Napjainkban a daganatos megbetegedéseket a vezető halálokok között tartják számon és világszerte egyre nő ezen megbetegedések száma. Ezért nem meglepő,

hogy a tumorellenes készítmények, köztük a nukleozid származékok és azok analógjainak alkalmazása szignifikánsan nőtt az onkológia területén. Gyakorlatilag a daganatos betegek terápiájában 20%-os arányban használnak nukleozid, nukleotid vagy bázis analóg gyógyszereket önmagukban vagy más készítményekkel kombinálva<sup>2</sup>.

Az MTT-tesztet gyakran használják citotoxicitás vizsgálatára különböző sejtvonalakon, emberi és állati eredetű sejteknél egyaránt. A tetrazolium sók redukciója már egy széles körben elfogadott módja annak, hogy egy adott xenobiotikum viabilitására kifejtett hatását vizsgálják *in vitro*. A metabolikusan aktív sejtek csökkentik a sárga tetrazolium MTT mennyiségét, a dehidrogenáz enzimek azon aktivitása által, amikor NADH és NADPH ágenseket hoznak létre. A lila formazán kristály szolubizálható és ezáltal számszerűsíthető spektrofotometriai módszerekkel. Minden sejtípusnál egyenes arányosság figyelhető meg a sejtszám és a szignál között; ez lehetővé teszi, hogy kvantifikálhassák a sejtek viabilitásában bekövetkező változásokat.

A Time-lapse imaging videómikroszkópia (TLS) segítségével valós időben figyelhetik meg a sejtek viselkedését a hozzáadott vegyület(ek) jelenlétében. A morfológia változását, a generációs időre gyakorolt hatást, az apoptózist és a nekrozist tudják nyomon követni ezzel a módszerrel. A laboratóriumunkban rutinszerűen alkalmazott képelemző módszerekkel nemcsak kvalitatív, de kvantitatív információkat is kinyerhetnek az így elkészült felvételekből<sup>3</sup>.

Az értekezésem témája az MTT-teszt és a Time-lapse imaging videómikroszkópia kombinációjára irányul az egyes daganatos sejtvonalakra jellemző IC<sub>50</sub> koncentrációk vizsgálata mellett. Értekezésemben többek között bizonyítom, hogy a videómikroszkópia segítségével a nukleozid analógokkal végzett

---

<sup>2</sup> Shelton et al., 2016

<sup>3</sup> Nagy et al., 2010, 2012, 2014

kezelés során a sejtek életképességén kívül a következő információkat állapíthatjuk meg:

1. sejt méretet, illetve a változását
2. leánysejtekre vonatkozó osztódási időket (citokinézis)
3. a sejtciklus időtartamát
4. a sejthalál mértékét
5. a sejthalál típusát (ha megfigyelhető) (apoptózis, nekrozis).

Az összefoglalásban megfigyelhetjük, hogy az MTT teszt a citotoxikus ágens gátlásának mértékével kapcsolatos információkat szolgáltatott, függetlenül attól, hogy a sejtek életben maradtak vagy elpusztultak. Az MTT teszt time-lapse videómikroszkóppal történő kiegészítése értékes vizuális információkat ad, és lehetővé teszi a felvételek kvantitatív kiértékelését is. A TLS hosszabb ideig, akár több hétig is fenntartható, és kiszélesíti a citotoxikológiai vizsgálatok horizontját. Disszertációmban leírom továbbá, hogy az általam fejlesztett, kombinált elemzés kiterjeszhető többek között az antimetabolikus, gombaellenes és tumorellenes szerek citotoxicitási profiljának a feltérképezésére, mely hatékony és gyors szelektálást biztosít. Az általam kifejlesztett új vizsgálati módszer segítségével a hagyományos életképességi tesztek eredményeképpen kapott végponti mérések eredményéről a time-lapse videómikroszkóppal készült felvételekkel bővebb információt kaphatunk arról, hogy milyen celluláris események okozzák azokat.

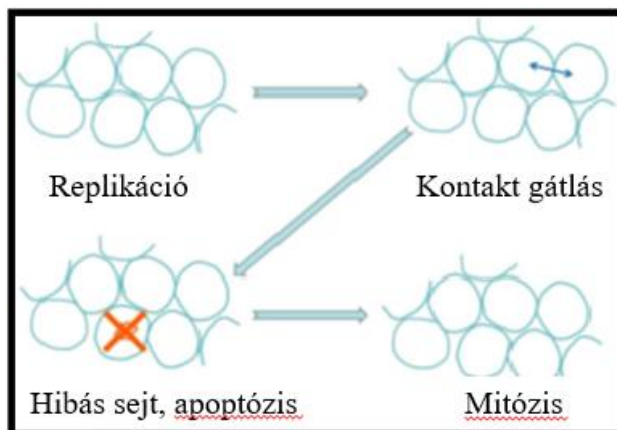
# Irodalmi áttekintés

---

## 1. Daganatos megbetegedés

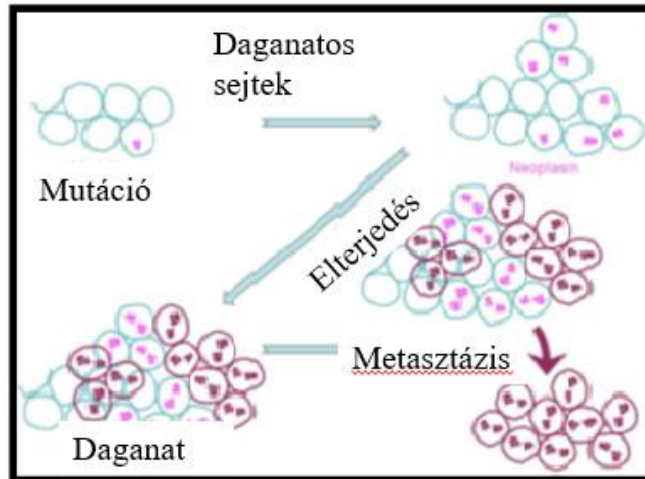
A daganatok kialakulása nem egytényezős folyamat, számos különböző mechanizmus járul hozzá a létrejöttéhez. A rendellenesen osztódó vagy mutálódott sejtek gyors és kontrollálatlan proliferációja vezet a tumor kialakulásához.

A normál sejtek sejtciklusa és anyagcsere folyamatai szabályozottak, azonban ezt a kontroll mechanizmust a tumoros sejtek elveszítik. A testi sejtekre számfelező, mitotikus osztódás jellemző. A legtöbb sejt abbahagyja az osztódást, amikor folytonos réteget hoz létre. Ha ezen osztódás során létrejön egy mutálódott sejt, az programozott sejthalállal megsemmisül és azt egy normál sejt helyettesíti. Ezen hibás sejtek száma napi szinten nagyon alacsony, néhány ezer környékére tehető, mely az emberi testben elhanyagolható mennyiség. Azonban előfordulhat, hogy mutáció jön létre az adott sejt DNS-ében, amely rezisztenssé teszi az apoptózisra vagy biztosítja számára a gyors duplázódást. Ebben az esetben az osztódások során mindig a hibás DNS fog örökítődni, tehát túlsúlyba kerül a mutációt hordozó sejtek száma a szervezetben. Ezek a neoplasztikus sejtek kontroll nélkül növekednek. Ezek az invazív mutálódott sejtek a daganatos sejtek, amelyek a későbbiekben a tumor kialakulásához járulnak hozzá.



1. ábra A sejtek osztódásának egyszerű szemléltetése ([7] Kalyanaraman 2017)

A tumoros sejtek esetében nincs kontakt gátlás, így gyorsan osztódnak, nem hatnak rájuk a sejtes ellenőrzési folyamatok, rezisztenciát képeznek a sejthalállal szemben, a rendelkezésre álló tápanyagokat felhalmozzák, valamint genetikai rendellenességgel jellemezhetők. Másik eshetőség a tumoros sejtek esetében, hogy az invazív daganatos sejtek kiszabadulnak a szöveti közegből és bekerülnek a véráramba, így távolabbi szervekhez is eljutnak, ahol megtapadhatnak. Ezt a folyamatot metasztázisnak nevezzük, ahol a metasztatikus sejteknek más mutációi is előfordulhatnak, továbbá a primer tumorhoz képest másként reagálhatnak a kemoterápiás szerre. Tehát a tumoros megbetegedés több kórképet is tartalmazhat, amely komplexsége és nehezebbé teszi a gyógyítását.



2. ábra A daganatos sejtek kontroll nélküli növekedésének szemléltetése ([7] Kalyanaraman 2017)

A megnövekedett energiaigény kielégítésére a tumoros sejtek további mechanizmusok segítségével egyéb tápanyagok megszerzésére törekednek. A rájuk jellemző metabolikus útvonalakon keresztül a daganatos sejtek is kielégítik a szükségleteiket, azonban a normál sejtektől eltérő módon. A jelenlegi gyógyszerkutatások a tumor kezelés hatékonysága érdekében a tumorsejtekre jellemző metabolikus útvonalak gátlására irányulnak. A citotoxikus terápiákkal ellentétben - amelyek megölik a hibás sejteket és a tumor gyors zsugorodásához vezetnek - , a célzott terápiák nem közvetlenül pusztítják el a daganatos sejteket, inkább megváltoztatják vagy lassítják a daganat metabolizmusát. A célzott terápia megakadályozza a sejtek növekedését, gátolja a glükóz felvételét, mely idővel változáshoz vagy a tumor regressziójához vezethet, végül a daganatos sejtek elpusztulnak<sup>4</sup>.

<sup>4</sup> Galluzi et al., 2010; Hanahan et al., 2000; DeBerardinis et al., 2008; Michalopoulou et al., 2016; Ward et al., 2012; Cheong et al., 2011; Shafae et al., 2015; Hamanaka et al., 2012; Lunt et al., 2011; Rodríguez-Enríquez et al., 2014; Serkova et al., 2016; İçli et al., 1993

## 1.1. A daganatos sejtek anyagcseréje

A sejtek működésükhöz is energiát igényelnek, amelyet különböző kémiai folyamatok, az anyagcsere útján szereznek be. A metabolizmus egyensúlyi folyamata a felépítő anabolikus és a lebontó katabolikus folyamatok között alakul ki.

Terápiás szempontból is fontos a daganatos sejtek metabolikus folyamatainak megértése. A daganat kezelés során megfigyelhető fő metabolikus útvonalak például a glikolízis, a Krebs-ciklus, az oxidatív foszforiláció, a nitrogén metabolizmus, a zsírsav oxidáció, a nukleinsav szintézis, a lipid szintézis és az aminosav anyagcsere.

*A Warburg effektus: a normál és a daganatos sejtek metabolizmusa közötti jellegzetes különbségek*

Annak érdekében, hogy a tumoros sejtek fenn tudják tartani a kontrollálhatatlan növekedési ütemüket, szokatlan módon jutnak energiához. A normál sejtek energiaigény esetén nem alakítják át a glükózt laktáttá, kellő mennyiségű oxigén jelenlétében. Ezt csak alacsony vagy oxigénhiányos közegben végzik. Ezzel ellentétben a daganatos sejtek oxigén jelenlétében is átalakítják a glükózt laktáttá, azaz aerob glikolízis zajlik.

Ezt a megfigyelést közel száz évvel ezelőtt Otto Warburg tette. A folyamatot, amikor a sejtek megfelelő oxigénszint mellett is laktáttá alakítják a glükózt, Warburg-effektusnak nevezzük. A tumoros sejtek nagyobb mennyiségben tudják laktáttá alakítani a glükózt aerob körülmények között is. A normál sejtek az oxidatív foszforilációs folyamatok során a mitokondriumban ATP-t termelnek. Normál körülmények között a sejtek és szövetek a glükózt széndioxiddá és vízzé alakítják az oxidatív foszforilációs folyamatok során, valamint a glükózt laktáttá alakítják alacsony oxigén szint mellett, azaz anaerob állapotban. Ez tekinthető az első megfigyelt biokémiai markernek, ami a tumoros sejtekre jellemző. Általában a

daganatos sejtek sokkal nagyobb mennyiségben veszik fel a glükózt, mint a normál sejtek. Ez arra vezethető vissza, hogy egyes membrán glükóz transzportért felelős izoformák nagyobb mennyiségben expresszálódnak. Mindezek ellenére sokáig csak, mint diagnosztikai eszközt használták ki ezt a felismerést, csak később gondoltak rá, mint terápiás lehetőségre.

Sokáig nem volt ismert, hogy mi az oka a megnövekedett glikolízisnek a tumoros sejtekben. Warburg azt feltételezte, hogy a mitokondrium működésének zavara az oka annak, hogy a daganatos sejtek a túlélés érdekében a glikolízisre hagyatkoznak. Azonban egyes vizsgálatok során kiderült, hogy a tumoros sejtek anyagcseréjében a mitokondriumok is fontos szerepet játszanak. A mitokondriális oxidatív foszforiláció azonban lassabb és időigényesebb folyamat szemben a gyorsabb, de jóval költségesebb glikolízisnél.

A legújabb kutatások szerint a Warburg-hatás egyik fő előnye nem a glikolitikus ATP előállításában rejlik, hanem számos olyan glikolitikus közttermék előállításában, amelyek az anabolikus folyamatok előfutárai. Felmerült, hogy egy a Warburg-szerű mechanizmus más gyorsan szaporodó sejtekben és szövetekben (például T-limfocitákban vagy embrionális szövetekben) is működik<sup>5</sup>.

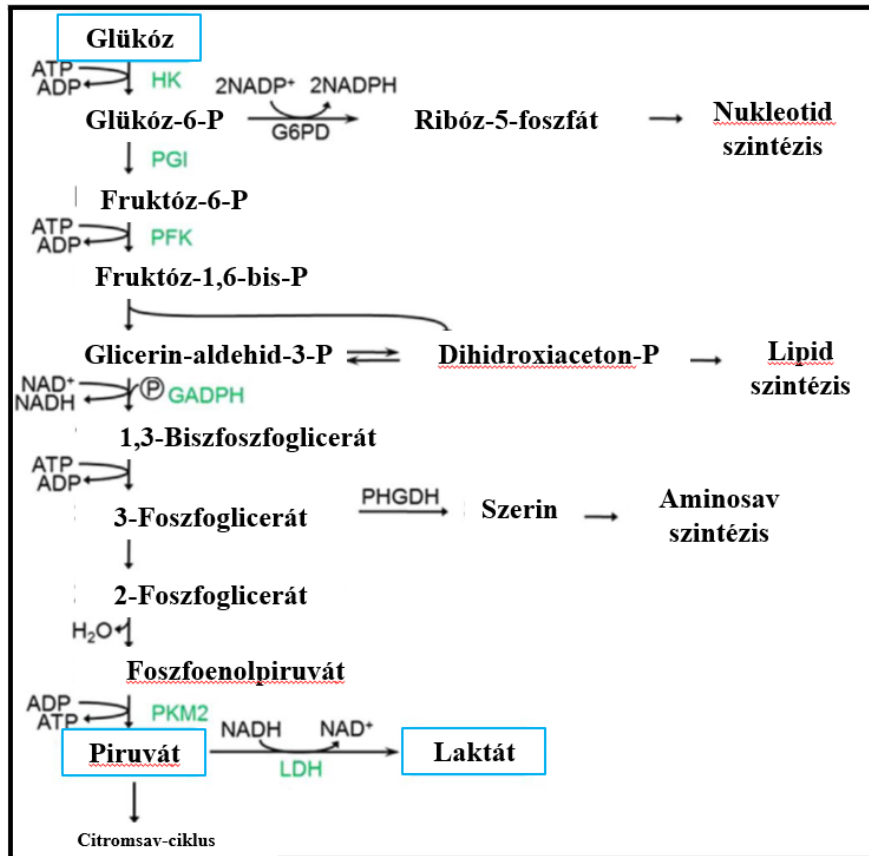
#### 1.1.1. Glikolízis

A fentebb említettek alapján a glikolízis kulcsfontosságú a daganatos sejtek számára. Ezért ha meggátoljuk a glikolízist az a tumoros sejtek pusztulásához vezethet, melyet kihasználva ez egy potenciális tumorellenes célpont lehet a terápia során. A glikolízis a glükóz lebontási folyamata, mely során piruvát keletkezik többszörös oxidációs reakciókon keresztül, amelyhez ATP energiára és NAD<sup>+</sup>-ra van szükség. A glikolízis intermedierjein keresztül nukleotidok, zsírsavak és

---

<sup>5</sup> Bortner et al., 2016; Fernández-Ramos et al., 2016

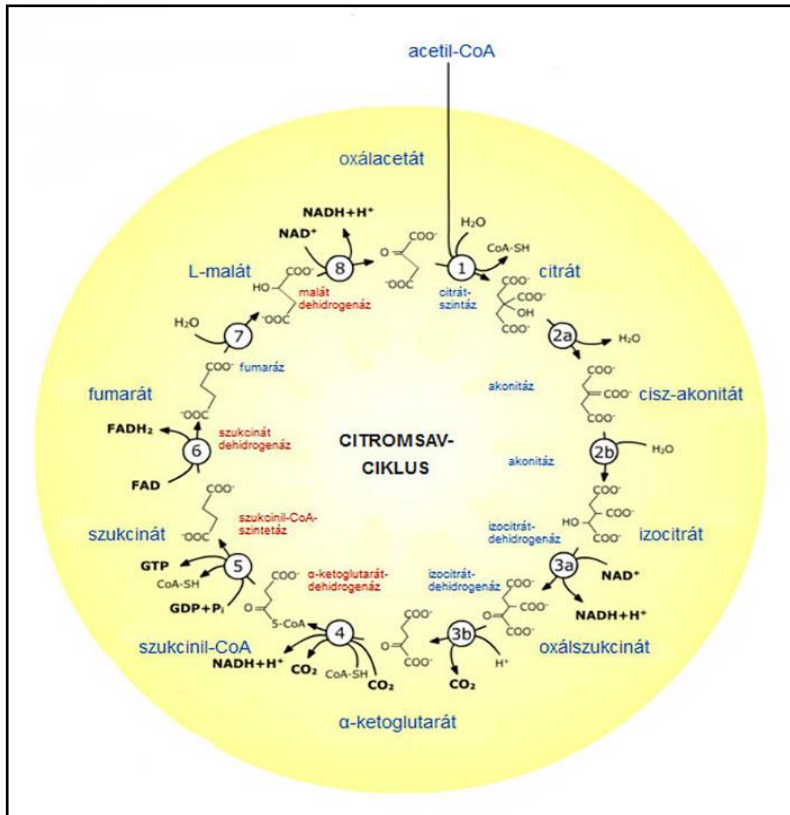
aminosavak szintézise is lehetséges. Mindezek alapján érthető, hogy a daganatos sejtek miért az aerob glikolízist használják. Ugyan alacsony az energiatermelés, azonban a glükóz lebontása során számos olyan intermediert termel, amely fontos más anyagcsere-termékek felépítéséhez.



3. ábra Glikolízis és fontos metabolitja ([7] Kalyanaraman 2017)

### 1.1.2. Citromsav-ciklus

A glikolízis során piruvát keletkezik, amit a piruvát-dehidrogenáz acetil koenzim-A-vá alakít és ez az oxálacetáttal citromsavat képez. Ez a citromsav ciklus kezdő lépése. A glikolízis intermedierei prekursorai a sejtek felépítéséhez szükséges molekuláknak, úgy mint: zsírsavak, nukleotidok, porfirinek és a hem.



4. ábra A citromsav ciklus és fontos metabolitjai  
<https://hu.wikipedia.org/wiki/Citromsavciklus>

### 1.1.3. Glutaminolízis

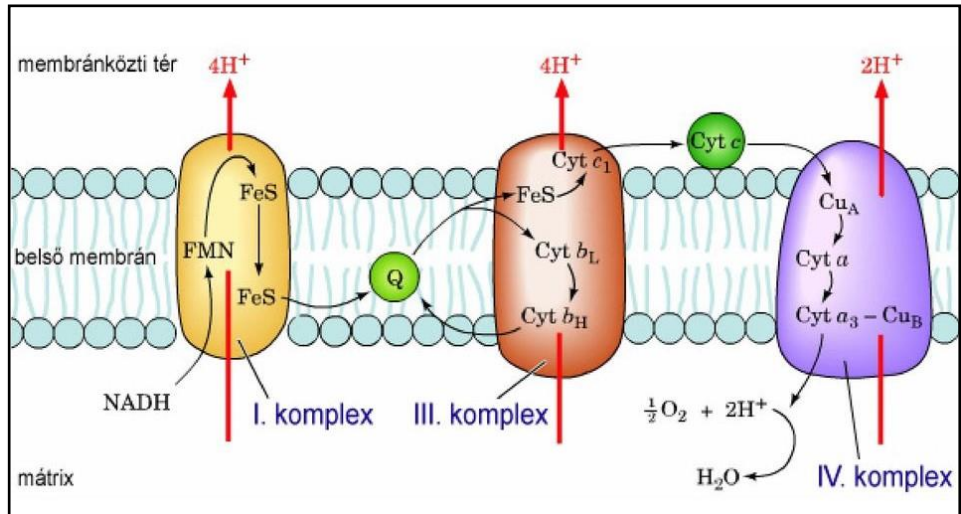
A daganatos sejtek a glutamint is felveszik és hasznosítják. Ez szükséges ahhoz, hogy zavartalanul működjön a citromsav ciklus. A glutaminolízis magába foglalja a glutamin glutamát átalakítását, amiből alfa-ketoglutarát keletkezhet. Ez utóbbi be tud lépni a citromsav ciklusba. A glutamin a hypoxiás sejtekben a zsírsav szintézis szubsztrátja is, feltehetően a hypoxia indukáló-1 faktor aktiválásán keresztül. Bizonyos daganatos pácienseknél megfigyelték, hogy a vér glutamin tartalma csökkent.

A diszfunkcionális mitokondriumokban a glutamátnek a glutamát-dehidrogenáz által alfa-ketoglutaráttá történő átalakítása károsodhat, ami glutamát felhalmozódásához és az ATP-termelés csökkenéséhez vezet. Ez hozzájárulhat a glutamin felhalmozódásának a sejtanyagcserére gyakorolt negatív hatásaihoz.

A túlzott glutaminszint számos káros hatással lehet a szervezetre. A glutamin például a glutamát előanyaga. Ez az agyban egy olyan neurotranszmitter, amely nagy koncentrációban excitotoxikus lehet, végül sejthalálhoz vezethet. Ezenkívül a glutamin emelkedett szintje az oxidatív stressz növekedését okozhatja, ami károsíthatja az olyan sejtkomponenseket, mint a fehérjék, a lipidek és a DNS. Ez hozzájárulhat különböző betegségek, köztük neurodegeneratív rendellenességek és rák kialakulásához.

#### 1.1.4. Terminális oxidáció

Az oxidatív foszforiláció során ADP-ből és foszfátból az ATP-szintáz a mitokondrium belső membránján keresztül kialakult proton grádienszt használja fel ATP termelésre. A  $\text{NADH} + \text{H}^+$  oxidációja során 3 ATP és a  $\text{FADH}_2$ -ből 2 ATP keletkezik, miközben az oxigén vízzé redukálódik.



5. ábra Terminális oxidáció

(<https://docplayer.hu/7345507-A-legzesi-lanc-es-az-oxidativ-foszforilacio.html>)

#### 1.1.5. Szerin bioszintézis

A szerin szintézis érinti a glikolízist és a glutaminolízist is. Ez utóbbi kettő jellemzően aktív a daganatokban, ezért fontos kifejeíteni. A szerin bioszintézis fontos útvonal, főleg a mellrák esetében, amelynél igen alacsony a túlélési ráta<sup>6</sup>.

#### *Fordított Warburg-effektus*

A reverz Warburg-effektus a daganatos sejtekre jellemző. A jelenség lényege az, hogy a hibás sejtek a szomszédjukban lévő normál sejteket fokozott katabolizmusra kényszerítik. Az egyik ilyen folyamat a „gazda” sejtekben az aerob glikolízis.

<sup>6</sup> Koppenol et al., 2011; Vander et al., 2009; Skoura et al., 2012; Gatenby et al., 2004; Warburg, 1956; Ramsay et al., 2011; Weinberg et al., 2010; Scatena et al., 2012; Hosiois et al., 2016

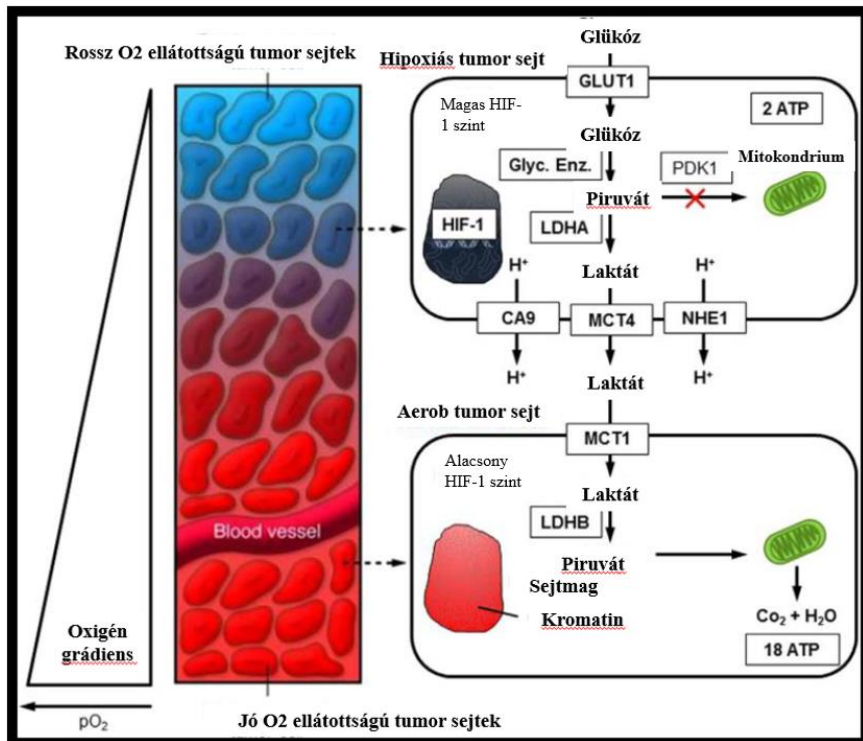
A tumor sztróma - melynek mikrokönyezeté fibroblasztokból, adipocitákból, endotheliális sejtekből és makrofágokból áll-, a daganat növekedésének jellegzetes velejárója.

A daganatok energiadús metabolitokat vesznek el a mikrokönyezetből, mellyel a tumoros sejtek állandó kölcsönhatásban vannak. A glikolízis mellett a daganatos sejtek az adipocita szövetekből származó zsírsavakat használják fel energiaként. Az epitheliális tumoros sejtekben az oxidatív mitokondriális anyagcserét és az ATP termelést elősegítő egyéb metabolitok a sztrómából származó glutamin és a ketonok. A monokarboxilát transzporterek (MCT) az L-laktátot szállítják a tumorhoz kapcsolódó sztrómális sejtek és a daganatos sejtek között. A fibroblasztokban található MCT-4 felelős az L-laktát kivezetéséért a sztróma sejtekből, az MCT1 pedig az epitheliális tumoros sejtekben lokalizáva az L-laktát felvételéért.

#### *Hypoxia és a Warburg-effektus: laktát transzfer*

A tumorok felépítését tekintve heterogének, ugyanis egyaránt tartalmaznak aerob és hypoxiás területeket. Az oxigén grádiens kifejezés a tumorok esetében egy ismert fogalom. Ez azt jelenti, hogy a tumor véredényekhez közel eső sejtjei oxigénben gazdagok, míg a távolabbi sejtekhez lényegesen kevesebb oxigén jut. Azonban az oxigénben gazdag és szegény területek között úgynevezett anyagcsere szimbiózis figyelhető meg. A hypoxiás sejtek a glikolízisben laktátot termelnek, amelyet az aerob tumoros sejtek az MCT-1 transzporterrel felvesznek és a laktát-dehidrogenáz-B által piruváttá alakítják. Ezt követően a piruvát, mint szubsztrát a tumorsejtekben oxidatív foszforilációs folyamatokon keresztül ATP-vé alakul. Ezáltal a hypoxiás daganatos sejtek számára több szabad glükóz marad, amely biztosítja a túlélésüket.

Amennyiben az MCT-1 gátolt, az aerob tumoros sejtek nem tudnak laktátot felvenni, így verseny alakul ki az aerob és hypoxiás daganatos sejtek között a glükózáért. Ha ezt a transzportert sikeresen gátoljuk, a használt vegyület potenciális kemoterápiás ágens lehet. A tumoros sejteket gátló gyógyszer a glikolízist, a mitokondrium anyagcseréjét vagy a szomszédos sztróma sejtek katabolizmusát akadályozva hatékony lehet a tumor előrehaladásával és metasztázisával szemben.



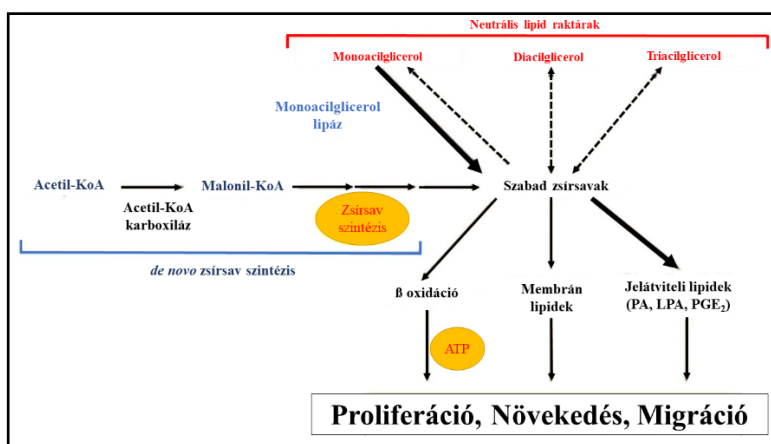
6. ábra Oxigén grádiens csökkenése, laktát transzfer a daganatokban ([7] Kalyanaraman 2017)

### *A zsírsav oxidáció szerepe a tumor anyagcserében*

Gyakori, hogy a gyorsan növekvő tumoros sejtek energia igényével nem tud lépést tartani a rendelkezésre álló glükóz mennyiség, ekkor a sejtek zsírsav oxidációjából származó energia tartalékokból merítenek. A prosztatában keletkező

tumor sejteiben ez az egyik legjellemzőbb anyagcsere folyamat, mely hatására megnövekszik a palmitát és a zsírsav oxidációja. A zsírsav oxidáció gátlására alkalmas gyógyszer az etornoxir, amely a karnitin palmitoil-transzferáz enzimet gátolja, így gátolt a tumor növekedése.

Egyes tumor sejtekben megnövekszik a monoacil-glicerol lipáz aktivitás. Ezt petefészekdaganattal diagnosztizált páciensekben mutatták ki. Ez az enzim hidrolizálja a monogliceridokat, így glicerol és szabad zsírsav szabadul fel, az agresszív tumorfajták pedig ezen mechanizmus segítségével jutnak energiához. A monoacil-glicerol lipáz indukálja a szabad zsírsav függő lipideket, mint például prosztaglandin E2-t, foszfatisavat és lizofoszfatisavat. Ezek a lipid molekulák aktiválják a tumor jelátviteli folyamatait. Ennek hatására a zsírsav-szintáz az acetyl-KoA-t palmitáttá alakítja. A frissen előállított szabad zsírsavak neutrális lipidtárakba kerülnek, ahonnan a monoacil-glicerol lipáz juttatja ki azokat. Számos tanulmány alapján a monoacil-glicerol lipáz egy ígéretes terápia célpont lehet<sup>7</sup>.



7. ábra A zsírsav anyagcsere szerepe a daganatos sejtekben ([7] Kalyanaraman 2017)

<sup>7</sup> Martinez-Outschoorn et al., 2011; Pavlides et al., 2009; Sotgia et al., 2012; Ribatti et al., 2015; Hui et al., 2015; Sanitá et al., 2014; Semenza et al., 2008, 2011; Yecies et al., 2010; Zhang et al., 2016; Kalyanaraman et al., 2017

A jelenleg alkalmazott kemoterápiás kezelések során gyakran merül fel akut vagy később megjelenő toxikus mellékhatás. A konvencionális terápiás ágensek potenciális citotoxikus hatásúak nem csak a tumoros sejtekre, hanem az egészséges sejtekre is. Ezzel ellentétben az újabb célzott terápiás szerek terápiás indexe nagyobb. Ezeknek a vegyületeknek a kemoterápiás hatékonysága megnövekedett, míg a mellékhatások száma csökkent. A daganatok metabolikus kemoterápiájában kulcsfontosságú cél több vegyület kombinatorikus kemoterápiás alkalmazása azért, hogy a daganatsejtek citotoxicitása fokozódjon azáltal, hogy a metabolikus gátlószereket kombinálják a szokásos kemoterápiás szerekkel és így csökkenthetik a normál sejtekre gyakorolt citotoxicitást<sup>8</sup>.

## 2. Nagy áteresztőképességű vizsgálatok

Mint ahogy azt a bevezetésben is említettem, egy 2017-es összefoglaló cikk megerősíti, hogy az új, potenciális gyógyszerként alkalmazható vegyületek tesztelése és engedélyeztetése igen költséges és időigényes folyamat. Számokban kifejezve ez 10-15 évet jelent, mely során a tesztelt 5000-10000 jelölt közül csak 1 felel meg az összes szükséges kritériumnak, amely ahhoz szükséges, hogy az FDA (Food and Drug Administration) jóváhagyja. Az ehhez szükséges időt és költséget sejttenyészeteken alapuló *high-throughput* teszteléssel próbálják kiváltani. A sejttenyészetek alkalmazása során nem feltétlenül ugyanazon sejtválasz reakciók aktiválódnak a szöveti környezetben, de ezzel már gyorsan kiszűrhetők azok a vegyületek, amelyek hatástalanok vagy magas a toxicitásuk. Mindezek mellett továbbra sem válthatók ki az *in vivo* állatkísérletes tesztelések sem.

Ha el is jut egy vegyület a klinikai tesztelések fázisáig, a humán tesztek során - legtöbbször a májra gyakorolt toxikus hatásai miatt-, azt még a korai fázisban

---

<sup>8</sup> Kalyanaraman 2017

alkalmatlannak nyilvánítják. Tehát a megfelelően választott állatmodell és ígéretes eredmények ellenére is használhatatlan lehet az adott vegyület. Ennek a valószínűségét csökkenthetjük, ha a sejtenyészetekkel végzett vizsgálatok során humán eredetű sejtvonalat vizsgálunk. Azonban itt is számolni kell több befolyásoló tényezővel, mint például egyes sejtvonalak nehézkes fenntartása, vagy, hogy fenotípusosan soha nem lesznek egyformák, ugyanis a megváltozott környezeti körülményekre reagálva az utódsejtek már nem hasonlítanak az anyasejtekhez. Az utóbbi kiküszöböléséhez az szükséges, hogy jól meghatározott állandó körülményeket biztosító környezetet tudjunk kialakítani az adott sejtvonal számára.

Leggyakrabban a gyors tesztelésre a különféle mikrotiter lemezeket alkalmazzuk, amellyel úgynevezett statikus kultúrát tudunk fenntartani. Ezzel minimalizálni lehet a kontamináció valószínűségét, ellentétben a folyadék kultúrákkal. Azonban a tápfolyadék csere következtében megváltozik a sejtek fiziológiai környezete. Ezzel ellentétben, ha perfúziós rendszerben tartják fenn a kultúrákat a tesztelés során állandó környezetet tudunk biztosítani a sejteknek. Mindemellett sejt-sejt interakciók alakulhatnak ki, ami válaszreakciókat aktiválhat a különböző környezeti tényezőkre (kevertetés, stressz választényezők stb.), biztosítható az állandó koncentráció grádiens, így pedig jobban másolhatók az *in vivo* körülmények. Azonban ebben az esetben sem képesek ugyanolyan körülményeket biztosítani, amelyek ugyanazon fiziológiai állapotokat aktiválnak a sejtekben. Tehát a statikus és a dinamikus kultúrák alkalmazásának ugyanúgy megvannak a maguk előnyei és hátrányai.

Ha a 2D és 3D sejt-kultúrákat kell összehasonlítani, egyértelmű, hogy a tesztelések során a 3D kultúrák segítségével lehet a legvalósabb következtetéseket levonni. Ugyanis ilyen körülmények között a sejtek extra-celluláris mátrix (ECM) kialakítására képesek, termelhetnek szolubilis molekulákat (pl. hormonok, növekedési faktorok és citokinek), továbbá valódi sejt-sejt interakciók is

megvalósulhatnak. Ezen jelek és folyamatok összessége alapján a sejtekben különböző reakciók aktiválódhatnak, ez dönti el, hogy apoptózis, proliferáció vagy differenciáció következik be. Mindezek ellenére a statikus és dinamikus kultúrákat használják, ugyanis ezek egyszerűbbek és kevésbé költségesek, mint a 3D tenyészetek fenntartása<sup>9</sup>.

## 2.1. Hatóanyag fejlesztés és tesztelés

A hatóanyag felfedezése és fejlesztése során a folyadék kultúrák és a sejt alapú vizsgáló rendszerek fontos szerepet játszanak: a hatékony molekulák azonosításában, a preklinikai vizsgálatokban - amely magába foglalja a toxicitási tesztek is -, a hatékonyság és gyógyszeradagolási mechanizmus tanulmányozásában.

Ahhoz, hogy a biológiai rendszerek komplexitását megértsük, de legalább modellezni tudjuk, különböző technikák és modell rendszerek szükségesek, amellyel a humán fiziológiás körülmények fontos jellemzőit tudjuk utánozni. Ezeknek a módszereknek különböző tényezőkkel kell egyensúlyba kerülniük: mennyire hasonlít a vizsgálandó rendszerre, mennyire költséges és mennyire használható az adott rendszer. Továbbá igen nagy az igény a gyors gyógyszerfejlesztésre a globális egészségre jellemző változások miatt, úgymint a különböző új járványok megjelenése, vagy a gyorsan kialakuló antibiotikum rezisztencia.

Azért a tumor ellenes vizsgálatokat választottam disszertációm témájául, mert a daganatos megbetegedések száma globálisan növekszik főként a fejlett országokban, így Amerikában és Nyugat-Európában is. Ahogy növekedett ezen megbetegedések száma, úgy lett egyre nagyobb az igény a tumor ellenes gyógyszerek kutatására és alkalmazására. Az elmúlt két évtizedben ezeknek a

---

<sup>9</sup> Wu et al., 2010

kutatásoknak száma jelentősen megnőtt. A legtöbb esetben egy-egy potenciális vegyület vizsgálata során csak a klinikai fázisban derült ki, hogy mégsem használható. Ezen sikertelen vizsgálatok költsége nagyon magas.

A preklinikai tesztek során az első lépés a célpont azonosítása. Ezek megismerésére 2D sejtkultúrákat használnak. A sikeres tesztek követik az *in vivo* vizsgálatok is. Azonban a modell rendszerek, szervezetek mindegyikének megvan az előnye és a hátránya is. Ezen hiányosságok vezethetnek ahhoz, hogy az egyes vegyületek hatékonyságát túlbecsüljük, míg más alkalmas vegyületet kiszűrnek már az előzetes tesztek során.

A 2D sejttenyészetek alkalmazhatóságát befolyásolja, hogy polisztirénből készült, előre bevont felszínen nőnek. Ez viszont nem biztosítja a valós környezet megfelelő modellezését. Emiatt jobb hatékonyságú szűrővizsgálatok szükségesek. Számos tanulmány alátámasztja azt a tényt, hogy ha csak a sejtkultúrákkal végzett vizsgálati eredményekre hagyatkoznak, azok sokszor hibás előrejelzéseket adnak a klinikai tesztekhez. Mindezek ellenére szükséges ezen modell további alkalmazása.

Ezzel ellentétben, ha a sejtek 3D mikrokörnyezetben növekednek, megváltozik a sejtek közötti kölcsönhatás, a tápanyag hozzáférhetőség, amely alternatív génexpressziós folyamatokat indukál. Ez pedig befolyásolja a proliferációt, a metabolizmust, a differenciációt, a kommunikációt és a sejtek migrációját is. Az így tenyésztett sejtek génexpressziós profilja nagyban hasonlít a natív szövet és a primer tumorok génexpressziós profiljára. Összevetve a monolayer kultúrák és a szferoid kultúrák génexpressziós profilját, az utóbbi jobban hasonlít a natív környezethez. Mindezek ellenére a 3D modellek alkalmazása nem igazán terjedt el. Hátrányuk, hogy drágák, nehéz egyforma méretű szferoid kultúrák kialakítani, valamint fenntartani a szferoid kokultúrákat. A kereskedelmi forgalomban kapható tesztek nem optimálisak a 3D tenyészetekhez, továbbá az eredmények kiértékelése nem megoldott az egységes protokollok hiánya miatt.

Ugyanakkor a 2D kultúrákkal ellentétben kevés irodalmi adat áll rendelkezésre a 3D tenyészetekről, úgymint gyógyszerinterakciók mechanizmusa, a sejtek differenciálódása és a sejtek szignalizációja<sup>10</sup>.

Mind a 2D, mind a 3D sejtenyésztési technikák olyan módszereket biztosítanak, amelyek szükségesek a kutatás előrehaladásához. A 3D sejt-kultúra azonban bebizonyította, hogy képes teljesen megváltoztatni az új gyógyszeres kezelések tesztelésének, a betegségek modellezésének, az őssejtek felhasználásának és a szervek átültetésének módját. Ahogy a 3D sejtenyésztés egyre általánosabbá válik, a technikák jobban megérthetőek, és fejlettebb módszerek jelennek meg. A jelenleg új gyógyszeres terápiák 2D sejtenyésztési modelleken keresztüli tesztelésén dolgozó kutatóknak komolyan meg kell fontolniuk a 3D sejtenyésztési lehetőségeket. A sejtek 3D-ben történő együttes tenyésztésének előnyei felülmúlják a 2D-s sejtenyésztés előnyeit, és ahogy javulnak a szövetsebészeti technikák, úgy javulnak a daganatmodellek, a tumorkezelési terápiák és a betegségek vizsgálati módszerei<sup>11</sup>.

Az *in vivo* gyógyszer toxicitás egy többtényezős, dinamikus és komplex folyamat, amely befolyásolja a fiziológiai körülményeket. Azok a szövetkárosító folyamatok melyek farmakológiai hatásra vezethetők vissza, érinthetnek egy adott szervet, beleértve a sejtek és a hatóanyag közötti interakciót, a gyógyszer metabolizmust és hatóanyag-fehérje konjugátum képződést. Ezek a komplex folyamatok azonban egyszerűbben vannak jelen az *in vitro* vizsgálatok során. A szervspecifikus toxicitással szemben jobban ismertek a következő celluláris folyamatok: apoptózis, DNS fragmentáció, kaspáz aktiváció és az oxidatív stressz. Például a szív és a vesék citokróm P450 aktív szervek, bőséges  $\gamma$ -glutamil-transzferáz aktivitással. Ez azért fontos, mert könnyen konjugálódhatnak a vizsgált

---

<sup>10</sup> Verjans et al., 2018

<sup>11</sup> Jensen et al., 2020

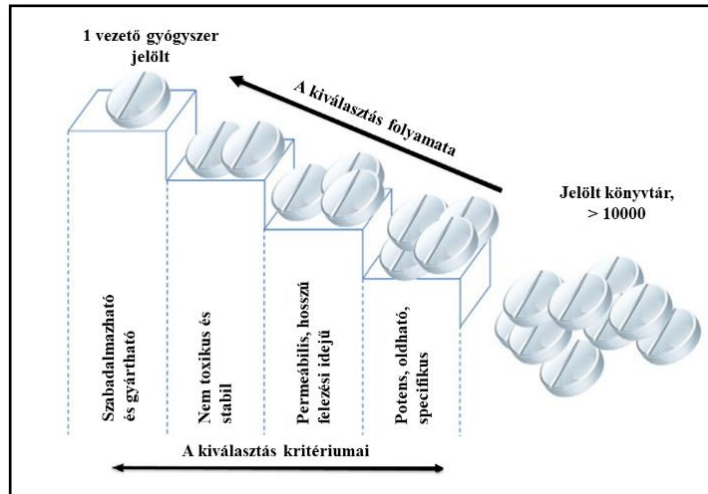
hatóanyaggal, amely toxicitáshoz vezet főként a májban. Azonban még kevés információ áll rendelkezésre a kémiai anyagok által indukált vese és kardiovaszkuláris problémákról. Továbbá előfordulhat, hogy a bomlástermék okozza a toxicitást és nem maga a gyógyszer jelölt hatóanyag<sup>12</sup>.

A gyógyszeripar folyamatosan arra törekszik, hogy újabbnál újabb gyógyszerjelölt molekulákat fedezzen fel a váratlan igények kielégítése érdekében is. A tudomány és technológia párhuzamos fejlődése gyorsan megnövelte a gyógyszerjelöltek számát. Azonban ezzel együtt új problémák bukkantak fel, úgymint a gyógyszerkönyvtárak hatékony feldolgozása és értékelése toxicitás szempontjából. Gazdasági és etikai szempontokból nem célszerű a molekulák ezreit nagy mennyiségben tesztelni, így a sejtes alapú *in vitro* technikákra kell hagyatkozni. A megoldás a *high-throughput screening* (HTS) lehet az előbb említett problémákra. Mind gazdaságilag, mind az időtényező miatt ez a legkedvezőbb tesztelési lehetőség. A HTS módszerrel sejteket, sejtvonalatokat tudnak használni a teszteléshez. A vizsgálatok történhetnek mikrotiter lemezekben, manuálisan vagy robotizáltan is, továbbá alkalmazhatják az áramlási citometriát is erre a célra. Ezekkel lehetőség nyílik számos gyógyszerkoncentráció és expozíciós idő időhatékony tesztelésére.

A HTS összehangolt, automatizált technikákat igényel a vizsgálatokhoz, amelyeket korlátoznak: 1) a gyors, megbízható mikroanalitikai értékeléshez rendelkezésre álló eszközök és / vagy vizsgálatok, valamint 2) a meglévő sejttenyésztési modellek minősége. Mindkettő megbízhatósága és pontossága kulcsfontosságú a releváns, megbízható toxicitási adatok megszerzéséhez.

---

<sup>12</sup> Balis, 2002; Xu et al., 2004; O'Brien & Haskins, 2007



8. ábra A gyógyszerjelöltek azonosítási lépései

A gyógyszer jelöltek kutatása és felfedezése az iparban és az egyetemi laboratóriumokban eltérően zajlik. Amíg az egyetem egy-egy lehetséges hatóanyag teljeskörű vizsgálatára törekszik, addig a gyógyszeriparban több jelölt folyamatos tesztelése zajlik, melyekből kiválasztják a legjobbakat. A fő hangsúly a végpont-vizsgálatokon van, amelyek meghatározzák a sejtek túlélését és szaporodását, valamint a célhatékonyság előrejelzését a tenyészetekben végzett külső ágens hatása után. A legtöbb toxicitási teszt vagy a sejtek viabilitását vagy a végponti proliferációt méri, de magára a toxicitás mechanizmusára nem specifikusak. Tehát csak ebből nem tudják meghatározni azt, hogy apoptózis/nekrózis történt-e a vizsgálatok során, csak a koncentráció-hatás összefüggést tudják megállapítani. Az így kapott *in vitro* eredmények könnyen félrevezető előrejelzést adhatnak az *in vivo* kísérletekkel kapcsolatban.

Noha a sejtlapú toxicitási vizsgálatok alacsony költségűek, a nagy sebességű és többparaméteres értékelési előnyei vitathatatlanok, azonban azt feltételezik az egyes

sejt fenotípusokról, hogy azok egyenértékűek az *in vivo* szöveti környezetben lévő társaikkal.

### 3. *In vitro* sejtenyésztési modellek: előnyök és hátrányok

Bármely *in vitro* modell elsődleges célja a kísérleti változók egyszerűsítése a szervek vagy szervstruktúrák különböző komponenseinek hatékony izolálása érdekében, ehhez pedig jól kontrollált és könnyen értékelhető környezet szükséges. Az, hogy ezeknek az állapotoknak pontosan meg kell-e ismételniük az *in vivo* körülményeket, a vizsgálat tervétől és a kívánt eredményektől függ. Az *in vitro* sejtenyésztési rendszerek kiaknázása több mint egy évszázada értékes eszköznek bizonyult a sejtbiológiai, fiziológiai és kóros folyamatok tanulmányozásában; de mint minden eszköz, korlátozások, zavaró tényezők, artifaktok és félrevezető eredmények vonatkoznak rájuk, amikor eltávolítják őket a fiziológiai kontextusból validálás vagy igazolás nélkül. A kutatók egyet értenek abban, hogy egyetlen *in vitro* tenyészet sem fogja soha teljes egészében reprezentálni a teljes állatkísérleteket, azonban az alaptudományban sok olyan eset fordul elő, amikor erre nincs is szükség. Ezért bármely *in vitro* tenyészet kiválasztásakor a toxicitási vizsgálatoknak tükrözniük kell a feltett kérdések összetettségét<sup>13</sup>.

#### 3.1. Sejtenyészetek

A disszociált sejtenyészetek lehetnek primer sejt kultúrák, melyek közvetlenül egy élőlényből származnak, és lehetnek immortalizált sejt kultúrák, amelyek genetikailag megváltoztak (gyors proliferáció, átolthatóság és könnyű fenntartás). Ezek könnyen fenntarthatók 2D-s körülmények között, erre alkalmas műanyagból készült és megfelelő felszíni kezeléssel ellátott edényekben.

---

<sup>13</sup> Astashkina et al., 2012

Számos területen ezen technika szinonimája az „*in vitro* tenyészet” kifejezés. A disszociált sejtek általános sikere annak a ténynek tulajdonítható, hogy az emlőssejtek többsége műanyag tenyésztő felszínen telepként bővíthetők. Ezen módszer népszerűségét nagyban befolyásolják a következő tényezők:

- 1) a sejtek fenntartásának és kezelésének viszonylagos egyszerűsége;
- 2) alacsony költség a teljes állatkísérletekhez képest;
- 3) a piacon a sejttenyészet disszociált értékelésére szánt kereskedelmi forgalomban lévő sejtfenntartó termékek, készletek és felmérő berendezések száma;
- 4) nemrégiben forgalomba hozott molekuláris technikák létrehozása, amelyek lehetővé teszik a genetikai sejtmanipulációt (géntranszfer, inszerció, delécio és silencing; sejtfüzió; génszekvenálás);
- 5) a gén és a fehérje expressziójának manipulálása;
- 6) nagy áteresztőképességű tesztelés lehetősége akadémiai vagy ipari környezetben; és
- 7) viszonylag olcsó, steril, pirogénmentes eldobható anyagok és kereskedelmi forgalomban lévő sejtvonalak, különböző szövettípusokon keresztül<sup>14</sup>.

#### *Immortalizált sejtvonalak*

A daganatos sejtvonalak spontán immortalizálódott primer sejt kultúrákból származnak, amelyeket direkt genetikailag módosítottak annak érdekében, hogy kiküszöböljék a primer sejt kultúrák hátrányait. Fontos kiemelni, hogy a genetikai módosításuk miatt már nem azonosak ezek a sejtek a primer elődjeik fenotípusával (minimális a hasonlóság). Mindezek ellenére ezek a sejtvonalak könnyen

---

<sup>14</sup> Astashkina et al., 2012

fenntarthatók, szérumot tartalmazó vagy mentes médiumban nevelhetők, fagyaszthatók és átolthatók 25-50 passzázsig. Ennél magasabb átoltáskor felmerül a fenotípusos változás lehetősége. Néha előfordulhat, hogy az egyes sejtbankoktól nem megfelelő minőségű sejtvonallal érkezik (keresztkontaminálódott másik sejtvonallal, vagy nem megfelelő a sejtvonallal besorolása).

Az immortalizált sejtek használata nagymértékben leegyszerűsítette a sejtalapú vizsgálatokat az alap- és az alkalmazott tudományokban. Ezért nem meglepő, hogy a sejtvonalak számos kísérleti terv részét képezik. Sok tanulmány vitatkozik arról, hogy az immortalizált sejtek használatának kényelme felülmúlja-e annak hátrányait. Ugyanakkor kevés tanulmány igazolja azt, hogy a választott immortalizált sejtvonallal fenotípusa eltér az originális szövet fenotípusától. Továbbá egyre több kutatás foglalkozik azzal, hogy a sejtvonalak biomarker készlete szegényes az *in vivo* körülményekhez képest. A gyógyszerek bejutását, felhalmozódását, transzformációját, eliminációját és a toxicitással szembeni védekezést magában foglaló fontos sejtmechanizmusok, például az endocitotikus aktivitások, a transzporterek, az endoszómális anyagcsere-feldolgozás, a glutation-szabályozó mechanizmusok és a CYP-enzimek eltérő szintjei olyan rendszereket eredményezhetnek, amelyek túlságosan érzékenyek vagy hibásak a gyógyszerfeldolgozási kapacitásokban, vagy lényegében képtelenek pontosan tükrözni az *in vivo* toxicitási profilokat. Mindezek ismeretében be kell látni, hogy a 2D felszínen tenyésztett sejt kultúráknak megvannak a maguk fontos hiányosságai, mint például a komplexitás hiánya, amely a toxicitási, gyulladási és metabolikus válasz folyamatokra terjednek ki<sup>15</sup>.

---

<sup>15</sup> Ghosh et al., 2005; Lim et al., 2005

### *Vérsejtekkel kapcsolatos daganatok*

A vérsejtekkel kapcsolatos **tumorok**, más néven hematológiai daganatok a vért, a csontvelőt és a nyirokrendszert érintik. A hematológiai daganatok néhány leggyakoribb típusa a következő:

**Leukémia:** A vérsejtek tumoros megbetegedése, amelyet a kóros fehérvérsejtek ellenőrizetlen termelődése jellemez.

**Limfóma:** A nyirokrendszer daganatos megbetegedése, beleértve a Hodgkin-limfómát és a non-Hodgkin-limfómát.

**Myeloma multiplex:** A plazmasejtek, a fehérvérsejtek egy fajtájának rákos megbetegedése.

**Myelodysplastikus szindrómák:** A vérbetegségek egy csoportja, amelyet a vérsejtek kóros termelődése jellemez a csontvelőben.

A hematológiai daganatok kialakulását genetikai mutációk, sugárzásnak vagy mérgező vegyi anyagoknak való kitettség vagy egyéb környezeti tényezők okozhatják. Gyakran speciális kezelést igényelnek, beleértve a kemoterápiát, sugárterápiát, őssejt-transzplantációt és egyes esetekben monoklonális antitestekkel végzett célzott terápiát.

A hematológiai tumorok háttérben álló molekuláris mechanizmusok megértésében elért legújabb előrelépések új és hatékonyabb kezelések kifejlesztéséhez vezettek. Ugyanakkor még mindig sok a tennivaló a vérsejtekkel összefüggő daganatos megbetegedésekben szenvedő betegek eredményeinek javítása érdekében<sup>16</sup>.

A sejtenyésztéshez szükséges folyadékokat különböző adalékanyagokkal egészíthetik ki, mint például: 5 vagy 10%, növekedéshez szükséges szérumszén-dioxid mennyisége vagy különböző puffer oldatok, amelyek mind-mind befolyásolhatják a

---

<sup>16</sup> Konopleva et al., 2015; Zhang et al., 2014; Lee et al., 2010; Shortt et al., 2012; Geoffrey Brown, 2021

választott sejtvonal fenotípusát. Az eredmények kiértékelése során ezeket a tényezőket is figyelembe kellene venni a különböző toxicitási vizsgálatok során. Az *in vitro* eredmények és az *in vivo* állatkísérletes eredményeknek egybe kellene vágniuk, azonban ezt a vizsgált kérdés komplexitása is befolyásolja. Ez különösen igaz a gyógyszerek újonnan szintetizált könyvtárainak vizsgálatokor, ugyanis ezen HTS vizsgálatok során eddig ismeretlen toxin mediálta útvonalak aktiválódhatnak, ezért szükség van az *in vitro* és *in vivo* eredmények közötti magasfokú korrelációra. Ezenkívül a korai szövetspecifikus toxikológia és a dózis-válasz felmérés során olyan biomarkerek indukálására van szükség, amelyek megbízhatók, lefordíthatók és mérhetők állati vagy emberi klinikai vizsgálatok során, és nem csak a sejthalálra vagy a kultúrában történő szaporodás hiányára mutatnak rá. Ennélfogva a nem egységes sejtenyészet kevésbé valószínű, hogy kielégíti a sejtek által közvetített gyógyszer-toxicitásban szerepet játszó többtényezős folyamatok azonosításához szükséges specifikus követelményeket. A tesztek sikeressége általában a toxicitás hatására aktiválódott eddig ismeretlen szignálokon múlik<sup>17</sup>.

#### 4. Onkogének

A proto-onkogének olyan normál gének, amelyek az emberi test minden sejtjében jelen vannak. Létfonosságú szerepet játszanak a sejtek növekedésének és osztódásának szabályozásában, és "jó" géneknek számítanak. Ha azonban megváltoznak vagy mutálódnak, onkogénekké alakulhatnak át, amelyek a sejtek ellenőrizetlen növekedését és osztódását okozhatják, ami rák kialakulásához vezethet.

Az egyik legismertebb proto-onkogén a RAS géncsalád. Ez a géncsalád részt vesz a jelek továbbításában a sejtfelszínről a sejt belseje felé. A RAS-gének mutációit

---

<sup>17</sup> Astashkina et al., 2012

számos daganat típusal, köztük a hasnyálmirigy-, tüdő- és vastagbélrákkal hozták összefüggésbe.

A **RAS géncsalád** olyan gének csoportja, amelyek döntő szerepet játszanak a sejtfelszínről a sejt belsejébe irányuló jelek továbbításában. Ezek a jelek különböző sejtfolyamatokat, többek között a sejtnövekedést és a sejtosztódást szabályozzák. A RAS géncsaládnak három fő tagja van: a HRAS, a KRAS és az NRAS.<sup>18</sup>

A **TP53 gén** egy tumorszupresszor gén, amely döntő szerepet játszik a sejtek növekedésének és osztódásának szabályozásában. A TP53 gén egy p53 nevű fehérjét termel, amely a sejtciklus és a DNS-javítás kulcsfontosságú szabályozójaként működik.

Valójában a TP53 mutáció a leggyakoribb genetikai elváltozás az emberi daganatos megbetegedésekben, az összes tumoros megbetegedés több mint 50%-át érinti. A TP53 mutációkat a daganatos megbetegedések széles körével hozták összefüggésbe, többek között a tüdő-, petefészek-, gyomor- és emlőtumorral<sup>19</sup>.

**TP53 és RAS gének:** A TP53 és a RAS gének egymást kiegészítő szerepet játszanak a sejtek növekedésének és osztódásának szabályozásában. Míg a TP53 a sejtosztódás fékeként, addig a RAS gyorsítóként működik. Ez rávilágít annak fontosságára, hogy mindkét gén megfelelően működjön a tumor kialakulásának megelőzése érdekében.

Egyéb tumorszupresszor gének: A TP53 mellett számos más tumorszupresszor gén is létezik, amelyek fontos szerepet játszanak a tumor kialakulásának megelőzésében. Ilyen gének például az APC, a BRCA1 és a BRCA2.

Az **onkogének** olyan gének, amelyek mutálódva vagy aktiválódva daganatokat okozhatnak. Ezek a proto-onkogénekből származnak, olyan normál gének, amelyek fontos szerepet játszanak a sejtnövekedés és -osztódás szabályozásában. A proto-

---

<sup>18</sup> Murugan et al., 2019

<sup>19</sup> Petitjean et al., 2007

onkogénekkal ellentétben az onkogének kontrollálatlan sejtnövekedést és osztódást okozhatnak, ami tumor kialakulásához vezet.

Az onkogének aktiválódása számos mechanizmuson keresztül történhet, beleértve a mutációkat, kromoszóma-átrendeződéseket és a génexpresszióban bekövetkező változásokat. A legismertebb onkogének közé tartozik a RAS, a MYC és a HER2/neu.

A RAS az onkogének családjába tartozik, amelyek kritikus szerepet játszanak a sejtek növekedésének és osztódásának szabályozásában. A RAS-gének mutációit számos daganatos megbetegedés kialakulásához kapcsolták, beleértve a vastagbél-, tüdő- és hasnyálmirigy-tumort.

A MYC egy olyan gén, amely a sejtnövekedésben és -osztódásban részt vevő más gének kifejeződését szabályozza. Ha a MYC túlzott mértékben fejeződik ki vagy mutálódik, az ellenőrizetlen sejtnövekedést és osztódást okozhat, ami daganat kialakulásához vezethet. A MYC mutációkat számos tumoros megbetegedés kialakulásával hozták összefüggésbe, beleértve a limfómát, a leukémiát és az emlőtumort.

A HER2/neu egy gén, amely a humán epidermális növekedési faktor 2 receptor (HER2) nevű fehérjét kódolja. A HER2 egy sejtfelszíni receptor, amely részt vesz a sejtek növekedésének és osztódásának szabályozásában. Ha a HER2 túlzottan kifejeződik vagy mutálódik, elősegítheti a kontrollálatlan sejtnövekedést és osztódást, ami daganat kialakulásához vezethet. A HER2 mutációit összefüggésbe hozták az emlőtumor kialakulásával.

Olyan célzott terápiákat fejlesztettek ki, amelyek célja a specifikus onkogének aktivitásának gátlása, és ígéretesnek bizonyultak számos daganatos megbetegedés kezelésében. Fontos azonban megjegyezni, hogy a daganat kialakulása összetett folyamat, amely számos genetikai és környezeti tényező kölcsönhatásából áll, és

hogy az onkogének célzott kezelése csak egy a sok stratégia közül, amelyet a rák elleni küzdelemben vizsgálnak.

Összességében az onkogének kritikus szerepet játszanak a daganatok kialakulásában, működésük és az aktiválásuk mechanizmusainak megértése a tumorbiológia területén folyó kutatások fontos területe<sup>20</sup>.

Az **immunrendszer** döntő szerepet játszik a tumorsejtek eltávolításában. Normális esetben az immunrendszer képes felismerni és elpusztítani a kóros sejteket, beleértve a daganatos sejteket is, egy immunfelügyeletnek nevezett folyamat révén. Egyes esetekben azonban a tumoros sejtek képesek elkerülni az immunrendszer általi felismerést, és tovább növekednek és terjednek.

Az immunrendszernek a daganat elpusztításában játszott szerepe fokozható az immunterápiával, amely a tumorkezelés egy olyan típusa, amely az immunrendszer erejét használja fel a daganat elleni küzdelemben. Az immunterápiának többféle típusa létezik, többek között:

**Checkpoint-gátlók:** Ezek a gyógyszerek az immunsejteken található specifikus fehérjéket célozzák meg, amelyek a daganatos sejtekkel szembeni immunválasz korlátozásáért felelősek. Ezen ellenőrzőpont-fehérjék blokkolásával az ellenőrzőpont-gátlók fokozhatják az immunrendszer azon képességét, hogy felismerje és megtámadja a tumoros sejteket.

**Rák elleni vakcinák:** Ezek a vakcinák segítenek az immunrendszert felkészíteni arra, hogy felismerje és megtámadja a daganatos sejteken található specifikus antigéneket.

**Adaptív sejtherápia:** Az immunterápia ezen típusa során immunsejteket távolítanak el a beteg szervezetéből, úgy alakítják ki őket, hogy felismerjék és megtámadják a tumoros sejteket, majd visszaültetik őket a betegbe.

---

<sup>20</sup> Kontomanolis et al., 2020

Monoklonális antitestek: Ezek olyan laboratóriumban előállított fehérjék, amelyek utánozzák az immunrendszer azon képességét, hogy leküzdje a fertőzéseket és betegségeket. A monoklonális antitesteket úgy lehet megtervezni, hogy a daganatos sejteken található specifikus fehérjét célozzák meg, és immunválaszt váltssanak ki ellenük.

Összefoglalva, az immunrendszer kritikus szerepet játszik a tumorsejtek eltávolításában, és fontos eszköz a daganatok elleni küzdelemben. Az immunrendszer erejének az immunterápián keresztül történő hasznosításával javíthatjuk a tumoros sejtek felismerésének és elpusztításának képességét, ami hatékonyabb és célzottabb daganatkezeléshez vezet<sup>21</sup>.

A **tumorsejtek in situ evolúciója** azt a folyamatot jelenti, amelynek során a daganaton belüli sejtek idővel fejlődnek és változnak, és amely új, eltérő genetikai és funkcionális jellemzőkkel rendelkező szubklónok kialakulásához vezet. Ezt a folyamatot a genetikai mutációk, epigenetikai változások és egyéb genetikai változások felhalmozódása irányítja, amelyek a környezeti és anyagcsere-nyomás hatására következhetnek be.

A tumorsejtek *in situ* evolúciójának egyik legfontosabb aspektusa a klonális heterogenitás kialakulása, amely több szubklón jelenlétére utal egyetlen tumoron belül. Ez a klonális heterogenitás gyógyszerrezisztens daganatos sejtek, valamint fokozott invazív és migrációs képességgel rendelkező sejtek kialakulásához vezethet, amelyek hozzájárulhatnak a tumor progressziójához és az áttétképződéshez.

A tumorsejtek *in situ* evolúciójának egy másik fontos aspektusa a mikrokörnyezet hatása, beleértve a gazdaszervezet immunrendszerét és a környező *stromasejteket*. A

---

<sup>21</sup> Helmy et al., 2013

daganatos sejtek és mikrokörnyezetük közötti kölcsönhatások befolyásolhatják a daganat kialakulását és progresszióját, valamint a kezelésre adott válaszát.

Összességében a daganatsejtek *in situ* fejlődésének megértése fontos az olyan új tumorterápiák kifejlesztéséhez, amelyek a betegség fejlődő jellegét célozzák, nem pedig a daganat egyetlen, statikus ábrázolását. Az elmúlt években a genomikai- és az egysejtes technológiák fejlődése elősegítette a tumorsejtek *in situ* evolúcióját irányító mechanizmusok részletesebb megértését; és ezekben rejlik a lehetőség, hogy személyre szabott és hatékonyabb tumorkezelések kifejlesztéséhez szolgáltatassanak információt<sup>22</sup>.

#### *Az immunrendszer szerepe a daganatterápiában*

Az immunrendszer döntő szerepet játszik mind a daganat-, mind az immunterápiában.

1. Felismerés: Az immunrendszer kezdeti szerepe a daganatsejtek felismerése és abnormálisként való azonosítása. Ezt a daganatos sejtek felszínén lévő specifikus molekulák vagy antigének érzékelésével teszi. Ez a felismerés segít az immunrendszernek a tumoros sejteket megcélozni és elpusztítani.
2. Elimináció: Amint a daganatos sejtek azonosításra kerültek, az immunrendszer immunválaszt indít, hogy elpusztítsa őket. Ez a válasz olyan immunsejtek aktiválását foglalja magában, mint a citotoxikus T-sejtek, természetes ölósejtek (NK-sejtek) és makrofágok, amelyek együttesen dolgoznak a tumoros sejtek elpusztításán.
3. Gyulladás: Az immunrendszer a daganat elleni immunválasz részeként gyulladást indukál. Ez segíti az immunsejtek toborzását a daganat helyére, és a tumor növekedése számára kevésbé kedvező környezetet teremt.

---

<sup>22</sup> Brücher et al., 2014

4. Tumorfelügyelet: Az immunrendszer a tumorfelügyeletben is szerepet játszik, folyamatosan figyeli a szervezetet a rákos sejtek kialakulása szempontjából. Az immunsejtek képesek felismerni és eltávolítani a kisebb daganatokat, mielőtt azok klinikailag nyilvánvalóvá válnának.

A **veleszületett immunrendszer** a tumoros sejteket a rosszindulatúsággal összefüggő specifikus minták vagy elváltozások azonosításával észleli és ismeri fel.

- a) Természetes ölősejtek (NK-sejtek): Az NK-sejtek olyan veleszületett immunsejtek, amelyek közvetlenül képesek felismerni és elpusztítani a daganatos sejteket.
- b) Makrofágok: A makrofágok beszivárognak a tumorokba, és többféle funkciót látnak el, többek között a tumorsejtek fagocitózist, citotoxikus anyagok felszabadítását és a tumorantigének bemutatását az adaptív immunválasz aktiválása érdekében.
- c) Dendritikus sejtek: A dendritikus sejtek a daganatos sejtek antigénjeit befogják és bemutatják a T-sejteknek, célzott immunválaszt indítva a tumor ellen.
- d) Komplement rendszer: A komplementrendszer, a veleszületett immunrendszer fehérjéinek csoportja, hozzájárul a daganatos sejtek felismeréséhez és eltávolításához.

Az **adaptív immunrendszer** döntő szerepet játszik a daganatos sejtek felismerésében és célba vételében.

- a) Antigén felismerés: Az adaptív immunrendszer a T- és B-sejtek receptorain keresztül felismeri a daganatos sejtek felszínén megjelenő specifikus antigéneket.
- b) Tumorspecifikus T-sejtválasz: Amikor a T-sejtek specifikus antigéneket megjelenítő daganatos sejtekkel találkoznak, aktiválódnak és immunválaszt indítanak el. A CD8<sup>+</sup> citotoxikus T-sejtek közvetlenül felismerik és

elpusztítják a tumoros sejteket, míg a CD4+ segítő T-sejtek segítik az immunválaszt.

- c) Memória és hosszú távú védelem: Az adaptív immunrendszer memóriasejteket hoz létre, amelyek "emlékeznek" a múltban találkozott specifikus tumorellenes antigénekre. A memória T-sejtek hosszú távú védelmet nyújtanak a daganat kiújulása ellen, gyors és erős immunválaszt adva, ha újra találkoznak a tumoros sejtekkel.
- d) Antitest-termelés: A B-sejtek olyan antitesteket termelnek, amelyek képesek felismerni a daganat-specifikus antigéneket és kötődni hozzájuk. Ezek az antitestek képesek megjelölni a tumoros sejteket, hogy más immunsejtek elpusztítsák őket az antitest-függő sejtközvetített citotoxicitás (ADCC) révén.

Az adaptív immunrendszer szerepe a daganatos betegségekben a tumor-specifikus antigének felismerésében, az immunválaszok aktiválásában, az immunológiai memória létrehozásában és az immunválasz szabályozásában az ellenőrzőpont-molekulákon keresztül történik.<sup>23</sup>

#### *Legújabb immunterápiás eredmények*

Az immunterápia forradalmasította a daganatkezelés területét azáltal, hogy az immunrendszer erejét a tumor sejtek felismerésére és megtámadására használja fel.

Az immunterápia egyik legígéretesebb területe az immunellenőrzőpont-gátlók fejlesztése, amelyek úgy működnek, hogy blokkolják azokat a fehérjéket, amelyek megakadályozzák, hogy az immunsejtek megtámadják a daganatos sejteket. Az olyan gyógyszereket, mint a pembrolizumab (Keytruda), a nivolumab (Opdivo) és az atezolizumab (Tecentriq) különböző daganatos betegedések kezelésére engedélyezték, többek között a melanóma, a tüdőrák és a hólyagrák kezelésére. Ezek

---

<sup>23</sup> Gonzalez et al., 2018; Hiam-Galvez et al., 2021; Mukherjee et al., 2022

a gyógyszerek egyes betegeknél figyelemre méltó hatást mutattak, amelyek hosszan tartó remissziót és jobb túlélési arányt eredményeztek.

Egy másik érdekes terület a kiméra antigénreceptoros (CAR) T-sejtes terápia. A CAR T-sejt terápia a beteg saját T-sejtjeinek módosítását jelenti, úgy hogy azok olyan receptort fejazzenek ki, amely felismeri a tumoros sejtek egy jellemző fehérjéjét. Ezeket a módosított T-sejteket ezután vissza kell infundálni a betegbe, ahol célba vehetik és elpusztíthatják a daganatos sejteket. Az olyan CAR T-sejtes terápiákat, mint a Kymriah és a Yescarta, a vérképzőszervi daganatok bizonyos típusainak, például a leukémiának és a limfómának a kezelésére engedélyezték, és lenyűgöző válaszadási arányt mutattak olyan betegeknél, akik más kezelésekre nem reagáltak.

E bevált terápiák mellett a folyamatban lévő kutatások és klinikai megfigyeléseket továbbra is új megközelítéseket és kombinált terápiákat vizsgálnak az immunterápia hatékonyságának további fokozása érdekében.

Immunterápián alapuló legújabb gyógyszerkategóriák:

**Tumorba beszivárgó limfociták (TIL):** A TIL-terápia során a beteg daganatából TIL-nek nevezett immunsejteket izolálnak, laboratóriumban felszaporítják, majd visszaültetik a betegbe. Ennek a megközelítésnek a célja, hogy fokozza a beteg immunválaszát a daganat ellen. A kezdeti vizsgálatok ígéretes eredményeket mutattak bizonyos daganattípusok, például az áttétes melanoma esetében.

**Bispecifikus antitestek:** A bispecifikus antitesteket úgy tervezték, hogy egyszerre két különböző célpontot ismerjenek fel. Ezek az immunsejteket a daganatos sejtek közelébe tudják hozni, segítve az immunrendszer aktiválását és a daganatellenes válasz kiváltását. Különböző bispecifikus antitesteket, amelyek a tumoros sejtek és

az immunsejtek különböző fehérjéit célozzák, klinikumban tesztelik, többek között a hematológiai rosszindulatú daganatok és a szolid tumorok ellen.

**Immunellenőrzőpont-gátlók:** Míg az immunellenőrzőpont-gátlókat, mint például a pembrolizumabot és a nivolumabot, számos daganattípus esetében engedélyezték, a folyamatban lévő kutatások új immunellenőrzési pontok azonosítására és célzott kezelésére összpontosítanak. Ezek az új inhibitorok potenciálisan javíthatják a jelenleg rendelkezésre álló terápiákra nem reagáló betegek eredményeit.

**Rák elleni vakcinák:** A daganat elleni vakcinák célja, hogy az immunrendszert a tumoros sejtek felismerésére és megtámadására ösztönözzék. Különböző típusú daganat elleni vakcinákat fejlesztenek, beleértve a peptidvakcinákat, a teljes sejt vakcinákat és a dendritikus sejt vakcinákat. Ezek a vakcinák személyre szabhatók, hogy specifikus tumorantigéneket célozzanak meg, ami potenciálisan fokozza hatékonyságukat.

**T-sejt bevonások:** A T-sejt-összekötők olyan molekulák, amelyeket arra terveztek, hogy a tumoros sejteket és az immunsejteket, különösen a T-sejteket, közelebb hozzák egymáshoz, megkönnyítve ezzel a daganatos sejtek elpusztítását. A T-sejt-befogadók közé tartoznak például a bispecifikus T-sejt-befogadók (BiTE-k) és az antitesthez kapcsolt T-sejt-receptor (ACTR) molekulák. Ezeket vizsgálják hematológiai rosszindulatú daganatokban és szolid tumorokban.<sup>24</sup>

## 5. Hosszútávú valós időben történő megfigyelésre alkalmas mikroszkópos módszerek áttekintése

A sejtbiológia jelenlegi megértésének nagy részét a fenotípusok populációs szintű vizsgálatával érhetik el a kutatók. Bár felbecsülhetetlen értékű eszközök, a populációt átlagoló módszerek elfedik a sejtek közötti különbségeket, és ezért

---

<sup>24</sup> Zhang et al., 2018; Esfahani et al., 2020; Yang et al., 2022

kevésé alkalmasak olyan folyamatok jellemzésére, amelyekben a sejtek heterogenitása fontos szerepet játszik. Az elmúlt évtizedekben az egysejtes jellemzés a biológia számos különböző területén a kutatások középpontjába került. A populációelemzésről az egysejtes elemzésre való áttérést az olyan technológiák elterjedése katalizálta, mint a mikroszkópia és az áramlási citometria. Különösen kiemelendő a fluoreszcens time-lapse mikroszkópia, amelyet gén riporter konstrukciókkal társítva széles körben használták a sejt-folyamatok nem invazív és dinamikus vizsgálatára az egyes sejtekben. A pontos és reprodukálható mérések elérése érdekében az time-lapse képalkotást ma már egyre gyakrabban használják mikrofluidikai eszközökkel kombinálva, amelyek lehetővé teszik a környezet pontos tér-időbeli szabályozását és a nagy áteresztőképességű adatgyűjtést az egyes sejtekről.

A pálca alakú baktériumok egysejtes vizsgálatára szolgáló egyik hasznos mikrofluidikai eszköz a Wang és munkatársai<sup>25</sup> által 2010-ben kifejlesztett úgynevezett "mother machine". Ez több ezer párhuzamos, holtponthozos mikrocsonnából áll, amelyekben a sejtek egyenként növekednek. A sejtek a mikrocsonnában több száz generáción keresztül képesek növekedni és osztódni, így kísérletenként több mint 105 egyedi sejtről lehet nagy áteresztőképességű adatokat gyűjteni. Az anyagép-berendezéseket egyre gyakrabban használják baktériumok egysejtes vizsgálatára, például a sejt-növekedés, a sejt-ciklus szabályozása, valamint a génexpresszió és -szabályozás elemzésére. Wang és munkatársai által kifejlesztett eszköz és a DNS-replikációs hibák által létrehozott naszcens mutációk fluoreszcens markerének felhasználásával nemrégiben új egysejtes megközelítést dolgoztak ki Ollion és munkatársai a mutagenézis és az evolúció baktériumokban történő tanulmányozására.

---

<sup>25</sup> Wang et al., 2010

Az anyagépben növekvő sejteket vizsgáló hosszú távú képalkotási módszer nagy mennyiségű adatot eredményez, kísérletenként jellemzően több száz gigabájtnyi képet. Ezért az adatkezelés, a képfeldolgozás és -elemzés gyors és megbízható megoldást igényel az automatizált képelemzéshez. Ennek a kihívásnak a megoldására nemrégiben kifejlesztettek egy szoftvert, amely a fent említett módszer alkalmazásával keletkező adatok elemzésére szolgál. Ez a szoftver, amelyet BACMMAN-nak neveztek, lehetővé teszi a nagy adathalmazok gyors és nagy pontosságú feldolgozását. A BACMMAN képes a mikroszatornákban lévő baktériumok felismerésére, szegmentálására és nyomon követésére akár fáziskontrasztos, akár fluoreszcens képekből, valamint a baktériumok felismerésére és intracelluláris fluoreszcens foltok kimutatására és nyomon követésére. Lehetővé teszi továbbá a kép egyszerű vizualizálását, kézi szerkesztését és feldolgozását is<sup>26</sup>.

Az áramlási citometria az ultranagy átteresztőképességű egysejtes szűrési technológiák sarokköve. Ezek a módszerek azonban csak végponti pillanatfelvételeket biztosítanak, és ezért kevés információt nyújtanak a növekedésről, az intracelluláris dinamikáról és a környezeti változásokra adott válaszokról. Továbbá, mivel minden egyes sejtet csak egyszer vizsgálnak, a citométerek nehezen tudják megkülönböztetni a genetikailag stabil tulajdonságokat az átmeneti fenotípusos heterogenitástól. Ugyanis az érdeklődésre számot tartó mutánsok általában ritkák, gyakran előfordul, hogy a citometrián alapuló szűrések sok találatát fenotípusos kiugró jelenségekből származó hamis pozitív eredmény. A cseppfluidika elvileg lehetővé teszi a time-lapse megfigyelést, de az egyes növekvő sejtek követése továbbra is problémás, és az alacsony felbontású képek nem tudják pontosan megragadni a fontos fenotípusos jellemzőket, például a lokalizációs

---

<sup>26</sup> Ollion et al., 2019

mintázatokat, az osztódáskori szegregációt, a sejtciklus hatásait és az expressziós dinamikát.

Luro és munkatársai egy olyan nagy áteresztőképességű platformot hoztak létre, amely alkalmas az egysejtes genetikai szűréseket hatékonyan elvégezni. Bemutatták a SIFT-et, az egysejtű izolálást követő time-lapse képalkotást, amellyel leküzdhetők a korábbi korlátok az egysejtes genetikai szűrés területén. A szigorúan ellenőrzött növekedési körülmények között több tíz egymást követő generáción keresztül képet készítettek és nyomon követték az egyes baktériumokat, az érdeklődésre számot tartó sejteket izolálták és szaporították a későbbi elemzéshez, szennyeződésektől mentesen, genetikai vagy fiziológiai perturbációk nélkül<sup>27</sup>.

Az elmúlt évtizedben a konfokális mikroszkópról az alacsony fototoxicitású fénymikroszkópra való áttérés teljesen új területet nyitott meg az *in vivo* biológiai vizsgálatok számára, beleértve a fejlődés, a sejt-sejt kölcsönhatások és a teljes embriósejtek sorsának közvetlen és rutinszerű megfigyelését.

Taylor és munkatársai olyan képalkotó rendszert alakítottak ki, amely alkalmas a zebrahal dobogó szívéről 3D képeket készíteni. A módszerük minimális fototoxicitása biztosítja, hogy a 24 órás time-lapse vizsgálatok során megbízhatóan készítsenek kiváló minőségű 3D képeket, amelyek lehetővé teszik a szív morfogenezisének, a gyulladásos sejt-vándorlásnak és a kardiomiocita sejtproliferációnak a megfigyelését<sup>28</sup>.

A kvantitatív time-lapse fluoreszcens mikroszkópiával összekapcsolt mikrofluidika javítja a jelátviteli dinamika ellenőrzését, mérését és megértését az egyes élő sejtekben.

---

<sup>27</sup> Luro et al., 2019

<sup>28</sup> Taylor et al., 2019

Hansen és munkatársai egy olyan csővezetékert hoztak létre, amely magába foglalja egyszerre a mikrofluidikai sejt kultúrát, az automatizált programozható folyadékkezelést a sejtek perturbációjához, a kvantitatív time-lapse mikroszkópiát és a time-lapse felvételek számítógépes elemzését. Bemutatták, hogyan lehet ezt a berendezést a bimbós élesztő Msn2 transzkripciós faktor nukleáris lokalizációjának szabályozására használni. Ezt a protokollt használva az Msn2 lokalizációjának oszcillációit hozták létre és ezzel megmérték az egyes gének dinamikus génexpressziós válaszát az egyes sejtekben. A protokoll lehetővé teszi egyetlen kutató számára, hogy 24 óra alatt akár 20 különböző kísérletet végezzen egy témában, miközben több ezer egyedi sejtről gyűjthet adatokat. Más protokollokkal összehasonlítva a jelen protokoll viszonylag könnyen alkalmazható és nagyobb áteresztőképességű. A protokoll széles körben használható az egysejtes jelátviteli dinamika ellenőrzésére és monitorozására más jelátviteli rendszerekben a mikroorganizmusokban.

E protokoll fő korlátja a sejtek hosszú távú (>6 óra) képkalkotás esetén történő megtartása. A ConA által biztosított sejt megtartás az áramlási sebességtől függően ~4 óra áramlás után lassan kezd meghibásodni, és az egyes sejtek fokozatos elvesztése figyelhető meg. Továbbá még egyetlen sejt is nagyon nagy kolóniát tud létrehozni ez idő alatt. Ezért a hosszú távú képkalkotáshoz (>6 h) olyan alternatív megközelítések javasoltak, amelyek szelektíven csak az anyasejteket tartják vissza. Bár a time-lapse mikroszkópiával összekapcsolt mikrofluidika általában nagy teljesítményű technika, a mikrofluidika bevonása bonyolítja a kísérleti elrendezést. A jelenlegi protokollt azonban viszonylag egyszerűen fel lehet állítani, és nem igényel drága vagy összetett berendezéseket<sup>29</sup>.

Berdeu és munkatársai egy új, lencse nélküli mikroszkópián alapuló háromdimenziós képkalkotó platformnak köszönhetően lehetővé tették a 3D-s

---

<sup>29</sup> Hansen et al., 2015

sejtkultúrák több szögből történő felvételét és holografikus rekonstrukciójukat közvetlenül az inkubátorban.

Ez lencse nélküli mikroszkópiás elrendezésen alapul, amelyet az azimutális felvételi geometriának köszönhetően a 3D jelenet nagy szögletes lefedettségét biztosítja. Ezt a berendezést úgy módosították, hogy egy inkubátorban, szabályozott hőmérsékleten és páratartalom mellett folyamatos megfigyelést végezzen. A 3D-s sejttenyészet felé néző CMOS-érzékelő hőmérsékletét mostantól lamináris légáramlással szabályozzák, ami lehetővé teszi a képérzékelő működtetését a sejttenyészet felmelegítése nélkül. Ez a mikroszkóp így közvetlenül az inkubátorban működik egy hagyományos sejttenyésztő edénnyel, és képes nagy mennyiségű (~5,6 mm<sup>3</sup>) címkézésmentes 3D-s sejttenyészet rekonstrukálására<sup>30</sup>.

Gritti és munkatársai bemutattak egy olyan mikroszkópiai technikát, amely mozgó és táplálkozó *Caenorhabditis elegans* lárvákban lehetővé teszi a hosszú távú time-lapse mikroszkópiát egyetlen sejt felbontásával. A *C. elegans* posztembrionális fejlődésének time-lapse mikroszkópiája kihívást jelent, mivel a lárvák rendkívül mozgékonyak. Ráadásul a mozgásképtelenség általában gyors fejlődési leálláshoz vezet. Ehelyett a lárvák mozgását baktériumokat táplálékként tartalmazó mikrokamrákba korlátozták, és gyors képfelvételt és képelemzést alkalmaztak az egyes lárvák sejtdinamikájának követésére, ahogyan azok az egyes mikrokamrákban mozognak. Ez lehetővé tette számukra, hogy 10-20 állat fluoreszcens mikroszkópiáját párhuzamosan, 20 perces időfelbontással végezzék. Megközelítésük hatékonyságát a sejtosztódás, a sejtvándorlás és a génexpresszió dinamikájának elemzésével mutatták be a lárvától egészen a kifejlett egyedekig tartó

---

<sup>30</sup> Berdeu et al., 2018

48 órás fejlődés teljes időtartama alatt. Megközelítésük lehetővé tette az egyes sejtek viselkedésének tanulmányozását egy táplálkozó és növekvő állat testében<sup>31</sup>.

A monociták felhalmozódnak a gyulladással helyeken, amint azt az intravitalis képkalkotás egérmodellekben igazolták, de a szövetgyógyulás és a kórokozótisztulás elősegítése mellett ezek a sejtek súlyosbíthatják is a betegséget. Ez a "sötét oldal" különösen nyilvánvaló az ateroszklerózis patogenezisében. Byzmeck és munkatársai *in vitro* 2D és 3D kemotaxis próbákat hoztak létre, és forgó korongos konfokális mikroszkópiát használtak a humán monociták motilitás mechanizmusainak vizsgálatára, és feltárták a Rho ROCK-myosin II jelátvitel szerepét a sejtek alakjának szabályozásában, sebességében és kemotaktikus navigációjában.

A time-lapse epi-fluoreszcencia felvételek egyes képkockáin a humán monociták jellemzően három alapvető morfológia egyikét mutatták (kompakt, legyezőszerű vagy vesszőszerű), és a time-lapse videókon a sejtek úgy tűntek, mintha levelekként lobogtak volna a kemoattraktáns felé. A szekvenciális forgólemezes konfokális mikroszkópiával nyert z-halmazok 3D rekonstrukciói azt mutatták, hogy a sejtek az x-y síkból elhajló (az x-y vetületi nézetekben a legyezőszerű morfológiának megfelelő) vagy az ortogonális sík felé elforgatott (az x-y síknak megfelelő) levéllapát-szerű nyúlványokat hoztak létre vessző alakú sejteknek (az x-y vetületi nézetekben). Az alkalmazott módszer segítségével a sejtek helyzetének változtatását és alakváltását figyelhették meg<sup>32</sup>.

A sejtfal bioszintézisének és a PG-k újrahasznosításának folyamatát valós időben nyomon követő eszközök és módszerek kifejlesztése napjainkban jelentős érdeklődésre számot tartó probléma, amelyre eddig nem volt általános megoldás. A fluoreszcensen jelölt antibiotikumokat, például a vancomycinre támaszkodó, a

---

<sup>31</sup> Gritti et al., 2016

<sup>32</sup> Byzmeck et al., 2016

naszcens peptidoglükánokat (PG) vizsgáló módszerek nagy hatást gyakorolnak a területre azáltal, hogy megkönnyítették a Gram-pozitív baktériumok növekedési módjának (módozatainak) vizualizálását, de ezeknek a módszereknek is van néhány inherens korlátjuk. Először is, az antibiotikum-koncentrációt és a kezelés időtartamát gondosan szabályozni kell ahhoz, hogy elfogadható jelölést kapjon, miközben elkerüljük a sejtek kiterjedt károsodását, másodsor pedig e szerek jelentős mérete miatt a jelölés az oldószerrel exponált sejtfalú baktériumok (azaz a Gram-pozitív baktériumok) PG-szintézisének helyeire vagy a Gram-negatív baktériumok olyan mutánsaira korlátozódik, amelyek külső membránja sérült.

Más megközelítések a baktérium sejtfalának kovalensen történő módosítására törekedtek olyan szintetikusán módosított sejtfal-prekurzorok beépítésével, amelyeket a PG bioszintetikus gépezet metabolikusan beépít. Ezek a módszerek többnyire lehetővé tették a PG jelölését impulzus követés típusú kísérletekhez, amelyek során a nem jelölt régió jelzi az új PG szintézis helyét. Sajnos ezek a módszerek nem adtak kielégítő eredményeket vagy a gyenge a szubsztrát felvételre és beépülésre és/vagy a szonda beépítésére kiválasztott hely toxicitása miatt. Egy nemrégiben készült jelentés a PG-szár peptid fluoreszcensen módosított tripeptid komponensének használatát írta le a baktérium sejtfalának kovalens jelölésére élő *E. coli*-ban. Mivel azonban a módszer az e szerkezet által használt specifikus PG-újrahasznosítási útvonalra támaszkodik, alkalmazása az *E. coli*-ra korlátozódik, és a szubsztrát analógok gyenge kihasználtsága miatt is hátrányos. Kuru és munkatársai nemrégiben kimutatták, hogy a kis bioortogonális fogantyúkkal ellátott d-alanyl-d-alanin dipeptid analógok hatékonyan és stabilan jelölhetik a legkülönbözőbb baktériumok PG-it hasonló citoplazmatikus beépítési útvonalon keresztül. Sajnos a

beépült anyag kimutatásához fixált és permeabilizált mintákra van szükség, ezért ez a módszer nem használható élő baktériumok növekedésének nyomonkövetésére<sup>33</sup>.

## 6. Daganat ellenes szerek hatása a sejtméretre és a sejtosztódásra

A normál (nem-tumoros) állati sejtek többségének átlagos átmérője 10-20  $\mu\text{m}$ . Az emlős sejtek folyamatosan növekednek, ahogy öregszenek, ami a megnövekedett intracelluláris RNS és fehérje tartalomnak tulajdonítható. Az osztódási és a nyugalmi állapotban lévő őssejtek eltérő anyagcsere-szükséglettel rendelkeznek, így a nyugvó sejtekben csökken a nukleotid szintézis mértéke, ami kisebb sejtméretet eredményez. Az őssejtek jóval kisebb méretűek, mint a proliferáló sejtek. A tumoros sejtekben a metabolizmus másképp szabályozódik, mint a normál sejtekben, ami eltérő sejtméretet eredményez.

A sejtméret az anabolikus és katabolikus folyamatok egyensúlyának tükröződése, amelyeket különböző jelátviteli utak indítanak el. A sejtek mérete tehát dinamikusan változhat ezen jelek teljes nettó bemenete alapján. A sejtméret és az egyes fenotípusok, például az őssejtek jellemzői között egyértelmű összefüggéseket fedeztek fel a normál sejtvonalakban. Korlátozott jelentések és előzetes tanulmányok arra a következtetésre jutottak, hogy a kis daganatos sejtek jellemzőbb tumorigének és több CSC (cancer stem-cell) tulajdonsággal rendelkeznek. Az azonban, hogy valóban fennáll-e kapcsolat a sejtméretnek és az összes CSC között, kevésbé egyértelmű, valószínűleg tumorsejt-függő lehet, és alaposabb vizsgálatokat igényel. Ez részben annak köszönhető, hogy a különféle sejtfractionálási módszerek előnyben részesíthetnek bizonyos sejtméreteket másokkal szemben, vagy egyszerűen műszakilag nem megfelelőek<sup>34</sup>.

---

<sup>33</sup> Kuru et al., 2015

<sup>34</sup> Li et al., 2015

## 6.1. 5-fluorouracil

Az 5-fluorouracil mag- és sejt morfológiára gyakorolt hatását tanulmányozva azt találták, hogy a PI-festést alkalmazó kezdeti sejt ciklus-elemzés az apoptotikus sejtek növekedésének tendenciáját és az 5-fluorouracillal replikálódó (S-fázisú) endoteliális sejtek csökkenését jelezte 1  $\mu\text{M}$ -nál nagyobb koncentráció esetében. Ez arra utalhat, hogy a sejtek soha nem érik el a mitotikus fázist, ezért kicsik maradnak.

Amikor a kísérlet során megvizsgálták az előregedett sejtek számát szignifikánsan magas értéket kaptak. Ezen eredmények arra engednek következtetni, hogy az 5-FU-val végzett 72 órás kezelés hatására a sejt méret stagnáló pontot ér el.

A ciklus sebességének csökkenése a tumor 5 fluorouracil szökésének mechanizmusa lehet, így feltételezhető, hogy a lassú replikációs potenciál védelmet jelenthet az 5-fluorouracil normál sejtekre gyakorolt hatásaival szemben.

Az adatok azonban arra utalnak, hogy ez nem így van. Az endoteliális sejtek csökkenését figyelték meg az S és a G2 / M fázisban, míg a kardiomiocitákban a G2 / M fázis enyhe növekedését és a replikálódó sejtek teljes hiányát tapasztalták magasabb 5-fluorouracil koncentrációk esetén. A különböző sejt típusok eltérő viselkedése (pl. felhalmozódás a sejt ciklus különböző fázisaiban) az 5-fluorouracilra adott válaszként nem meglepő, a különböző hisztotípusú tumor sejtek az 5-fluorouracil-kezelést követően eltérő sejt ciklus-eloszlást mutattak<sup>35</sup>.

Az 5-FU 5-fluorouracil-rezisztens vastagbélrákos sejtekben kifejtett hatás vizsgálatakor azt tapasztalták, hogy a 24 órás kezelés során az S-fázis leállt, p53 felhalmozódott, a p53-cél génnek DNS-károsodásra adott válaszában szabályozása, sejt ciklus-szabályozása, az apoptózis-szabályozó utak, valamint apoptózis indukció fokozódott a szülői és a rezisztens sejt vonalakban. Az 5-fluorouracil DNS-be történő

---

<sup>35</sup> de Carvalho Filgueiras et al., 2013

beépülésének szintje hasonló volt a sejtvonalaknál. A sejtciklus progressziójának mintája a helyreállítás során következetesen bizonyította, hogy az 5-fluorouracil-rezisztens sejtvonalaknak a legkisebb az S fázisú frakciója és a legnagyobb a G2 (/ M) frakciója.

Mivel a sejtek több időt töltenek a G2 / M fázisban, arra lehet következtetni, hogy az 5-fluorouracil hatására nő a sejt méret, de nyilvánvalóan nem képesek túl sokáig életben maradni a gyógyszer antimetabolit jellege miatt. A nagyobb sejtek nem képesek fenntartani magukat, és a DNS károsodás, valamint a meghibásodott helyreállítási utak, replikatív öregedést és / vagy apoptózist eredményeznek.

A gyógyszerek hasonló jellegére és felhasználásuk módjára hivatkozva levezethető, hogy hatásuk a sejtek méretétől, a megcélzott sejtek típusától és a sejtek végső szakaszától függ, amelyet a sejtek a gyógyszer beadása előtt elérnek. Általában a sejtek végül a normálnál nagyobbak, mert a feltételezések szerint a DNS károsodása a sejteket alkalmatlanná teszi önmaguk szabályozására<sup>36</sup>.

## 6.2. Metotrexát

Eichholtz és munkatársai a sejtek életképességét vizsgálták *in vitro*, mely során növekvő koncentrációkban figyelték meg a metotrexát hatását kínai hörcsög sejteken, pontosabban tüdő eredetű fibroblasztokon. A koncentráció tartomány: 0,1-2,5 µg/ml közé esett. Mind emellett a hatás időbeli függését is vizsgálták így 4, 16, 24, 30 és 48 h kísérleteket végeztek. Azt tapasztalták, hogy a koncentráció növelésével csökkent az életképes sejtek száma.

A sejt méret változása olyan tényező lehet, amely kiválthatja a sejt pusztulását, ugyanis ha a *de novo* purin és a pirimidin bioszintézise nem valósul meg, akkor DNS és RNS nem termelhető. Ezért, ha a genetikai anyag nem szintetizálódik, akkor a

---

<sup>36</sup> De Angelis et al., 2006

fehérjék és a sejtkomponensek sem termelhetők, így a sejtméret valószínűleg kicsi marad, ami korai sejthalálhoz vezet.

A kísérlet során a HeLa sejtek 24 órás expozíciós időt követően szintén ugyanazokat az eredményeket mutatták; a sejtek életképessége az alkalmazott koncentráció függvényében változott.

Három párhuzamos kísérlet során 53 CHO sejt progresszióját figyelték meg time-lapse videomikroszkópiával és 1 µg/ml MTX kezelés alkalmaztak. A megfigyelés a kezelés előtt kezdődött, amely kiterjedt a kezelési időre és a kezelést követő időszakra is. A kezelést követően 5 óra alatt 2,6%/h sebességgel fokozódott a sejtek osztódása. Azt 5 órás kezelést követő 20 órában nagyon kevés osztódást figyeltek meg. A tenyészet 10%-a osztódott csak 0,5%/h osztódási sebességgel. A 24 órás expozíciót követően médium csere történt, aminek a hatására 8-14 h-val később a sejtek 40% szinkronban osztódott. Ez a késleltetett szinkron mitózis valószínűleg azt a célt szolgálta, hogy a sejtek regenerálódjanak az MTX kezelés hatásaitól. A legtöbbjükön azonban késleltetett sejtpusztulás következett be. A fennmaradó sejtek piknotikussá vagy óriássejteké alakultak, anélkül, hogy megpróbálták volna osztódni (interfázisos sejthalál). Ez azt jelenti, hogy a sejtek elvesztették osztódási képességüket, és sejtmembránjaik összeolvadtak, nagy sejtet képezve.

Az MTX hatására irreverzibilis változások következtek be a sejtekben. Ezen változás kiterjedhet a dihidrofolát-reduktáz enzimre, melynek következtében nincs több szubsztrát a nukleotid termeléshez. Továbbá károsulhattak a sejtosztódás egyes lépései az expozíció során, ami a sejtek elöregedéséhez vezethettek<sup>37</sup>.

Herman és munkatársai T-limfocita sejtvonalakon vizsgálta a metotrexát hatását áramlási citométer segítségével. Az MTX 0,1 mM optimális koncentráció mellett minden sejtvonalban csökkentette a sejtméretet, kivéve az U937 monocita vonalat,

---

<sup>37</sup> Eichholtz et al., 1980

amint azt a lineáris FSC jelzi. A legnagyobb szignifikáns csökkenést a limfocita vonalakban figyelték meg.

A sejtméret enyhe csökkenését tapasztalták a THP1 sejtvonalban. Az U937 sejtvonalban nőtt a sejtméret, amely azonban statisztikailag nem volt szignifikáns. Az SSC értékek szerint az összes sejtvonalban jelentősen megnőtt a szemcsézettség. Az áramlási citometriával kimutatott morfológiai változások a sejtméret szignifikáns csökkenését és a szemcsézettség növekedését jelezte az optimális 0,1 mM dózis mellett, különösen a T-limfocita vonalakban. Ezek olyan jelenségek, amelyek apoptotikus sejtek zsugorodását és citoplazmatikus kondenzációját jelenthetik. Érdekes módon a sejtek mérete egyetlen monocita sejtvonalban sem csökkent szignifikánsan, azonban szemcséségük nőtt. Ez jelezheti a monociták eltérő citotoxikus mechanizmusát, ezt a feltételezést alátámasztja az Annexin V és ROS vizsgálatok.

Az Annexin V teszt és az FDA korai apoptózis polarizációs tesztje is azt mutatta, hogy az apoptotikus folyamat és annak különböző szakaszai a T-sejtvonalakban a legjellegzetesebb<sup>38</sup>.

Sand és munkatársai a metotrexát növekedés gátlása mellett számos morfológiai változást figyeltek meg, hasonlóan az *in vitro choriocarcinoma* metotrexát-hatásainak leírása során. A sejtméret fordítottan arányos volt a konfluenciával és összefüggésben volt a sejt morfológiai formájával.

Négy különböző sejtformát figyeltek meg: sokszög, orsó, ovális és "tükörtojás". A sokszögletű sejtek túlnyomórészt nyílt területeken jellemzőek, és gyakran többmagvúak voltak. Ezek a sejtek nagyobbak voltak, mint a többi, és számos sejtvetületük volt, ami aktív növekedés látszatát keltette. Az orsósejtek nagyrészt felváltották a multianguláris formákat, amikor a konfluenssé vált a tenyészet.

---

<sup>38</sup> Herman et al., 2005

Gyakran párhuzamos kötegekbe rendeződtek, de nyílt területeken kis csoportokban voltak jellemzőek. Ovális sejteket találtak a sűrű növekedési területeken, amelyek gyakran képeztek mozaik mintákat. Az ovális sejtek többrétegű növekedést is mutattak, és így alakultak ki a "kupolák". A sejthatárok gyakran nem voltak egyértelműek ezeken a sűrű növekedési területeken, ami *syncytium* megjelenését jelentette. A "tükör tojás" sejteket a sűrű növekedési területeken is megtalálták, és hasonlóak voltak azokhoz a sejtekhez, amelyeket Cotte és munkatársai<sup>39</sup> írtak le amorf citoplazmával és központi maggal.

A négy meghatározott morfológiai sejtípus együttesen jelent meg a sejtenyészetben, nem pedig négy különféle sejtípusként, mint azt korábban leírták.

A konfluens területeken csak ovális és "tükör tojás" sejtformákat figyeltek meg, melyek jelenlétét csak a tenyészet 7 napos növekedése után tapasztalták. Más mikroszkóposan megállapított morfológiai különbségek voltak a metotrexáttal kezelt és a kontroll kultúrák között. A tenyésztés 7–10 napján a szekrécións granulátumok gyakoribbak voltak a metotrexáttal kezelt sejtekben és általában a többmagvú sejtekben, összehasonlítva a kontroll sejtekkel. A multinukleáris sejtek sokkal gyakoribbak voltak a metotrexáttal kezelt tenyészetekben, ami ezt a szekrécións granulátum különbséget magyarázhatja. E sejtek aktív szekréciónsjának bizonyítékát elektronmikroszkóppal figyelték meg.

A kontroll sejtpopulációk több bizonyítékot mutattak a nem konfluens területek növekedésére, összehasonlítva a metotrexáttal kezelt tenyészetekkel. A kontroll sejtek fokozott finomsejt-vetületeket mutattak a nem konfluens területeken. A konfluens területeken a sejtek növekedésében nem tapasztaltak különbséget<sup>40</sup>.

Egy másik, a vörösvértesteket vizsgáló tanulmány *rheumatoid arthritis*-ben szenvedő betegeknél arra a következtetésre jutott, hogy a metotrexát jelentős hatással

---

<sup>39</sup> Cotte et al., 2010

<sup>40</sup> Sand et al., 1986

van az RDW-re (vörösvértest-szélesség eloszlás). Az RDW-t a rutin vérkép eredményei alapján számítják ki, úgymint a vörösvérsejt-térfogat / MCV  $\times$  100. A vizsgálat során 385 *rheumatoid arthritis*-ben szenvedő beteg eredményeit vizsgálták. Folyamatosan nyomon követték a betegek állapotát, illetve folyamatos kardiovaszkuláris vizsgálatokat végeztek a kezelés előtt, MTX-szel történő kezelés közben, valamint azt követően is. A vizsgálatok során az RDW értékeket határozták meg. Az MTX-szel kezelt betegek RDW-je szignifikánsan magasabb volt ( $p < 0,001$ ), mint azoknak az alanyoknak, akiknek a gyógyszert nem adták be, annak ellenére, hogy az összes MTX-kezelés alatt álló betegnél folsav-kiegészítést írtak elő<sup>41</sup>.

Schwartz és munkatársai kimutatták, hogy az MTX gátolja a keratinociták szaporodását timidinmentes MCDB 153 táptalajban. A szaporodásra gyakorolt hatása mellett az MTX megváltoztatta a sejt morfológiáját és megnövelte a sejtmennyiséget. A maximális változásokat 1  $\mu$ M MTX okozta, amely 75% -kal gátolta a sejtproliferációt és 225% -kal növelte a medián sejtmennyiséget. Az alacsonyabb koncentrációk kisebb hatást értek el. Az MTX növekedést gátló dózisának jelenlétében a keratinociták nagyobbak és laposnak tűntek, valamint kisebb volt a nukleáris / citoplazmatikus arányuk, mint a kontroll sejteknél.

Az MTX hatása a sejtek növekedésére, méretére és az involucrin expressziójára: A sejteket 1  $\mu$ M MTX-vel kezelték timidinmentes MCDB 153 tápközegben (0,1  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>). Az MTX kis mértékben befolyásolta a sejtnövekedést vagy más paramétereket 24 órán keresztül, de 24 és 48 óra között a sejtek abba hagyták a szaporodást, és határozott változást mutattak morfológiájában és méretben. 72 óra múlva jelentős volt a változás a kontrollhoz képest<sup>42</sup>.

---

<sup>41</sup> Held et al., 2018

<sup>42</sup> Schwartz et al., 1992

Taylor és munkatársai 96 órán keresztül alacsony és magas MTX dózis hatását figyelték meg humán leukémia eredetű sejtvonalon.

Alacsony dózissal kezelt sejtek:  $2 \times 10^{-8} \text{M}$  MTX az életképes sejtek fenntartását eredményezte 96 órán keresztül. Ezen idő alatt azonban a tenyészetben az elhalt sejtek aránya közel 50% -ra nőtt. Az első 24 órában a tenyészet DNS tartalma kezdeti felhalmozódást mutatott, majd a sejtek kohortja fejlődött. A második 24 órában az RNS tartalom, illetve a sejtméret nőtt és ez a növekedés a káros DNS-szintézissel összefüggésben kiegyensúlyozatlan sejtnövekedést jelzett (a DNS, illetve RNS összevetésével megfigyelhető, hogy a kontrollhoz képest az RNS meghaladja a DNS tartalmat). 48 és 96 óra között az RNS szint normalizálódott, azonban a sejtméret még így is jelentős volt.

Magas dózissal kezelt sejtek:  $10^{-4} \text{M}$  MTX a sejtek életképességének gyors csökkenését eredményezte. 72 órával a kezelés után az életképes sejtek aránya 10%-ra csökkent. DNS analízis  $G_1$  növekedést és  $G_2 + M$  csökkenést mutatott 24 órán belül. Azonban ezt követően nem volt megfigyelhető a sejtciklus-eloszlás változása. Az állandó sejtciklus-eloszlás az MTX hozzáadása utáni idő függvényében azt jelentheti, hogy az MTX nem volt hatással a sejtciklusra. Az MTX szintén csekély hatással volt az RNS tartalomra. A 48 órás kétparaméteres elemzés azt mutatja, hogy ezen dózis nem eredményezett kiegyensúlyozatlan sejtnövekedést<sup>43</sup>.

### 6.3. 5-fluorouracil és metotrexát együttes hatás vizsgálata

Benz és munkatársai a metotrexát és az 5-fluorouracil ciklusfüggő citotoxicitását vizsgálták humán vastagbél- és emlő tumorsejtvonalakban.

A HCT-8 és 47-DN klonális növekedési kísérletek eredményei azt mutatják, hogy 1  $\mu\text{M}$  5-FU-val 6 órán tartó kezelés nem befolyásolta a HCT-8 sejtek klonális

---

<sup>43</sup> Taylor et al., 1981

növekedését. 0,1  $\mu\text{M}$  MTX 24 órán át 40%-os növekedést eredményezett. A 24 órás MTX expozíció első 6 órájában adott 5-FU nem gátolta jobban a klonális növekedést, mint amikor csak az MTX-t adták. Mivel a 6 órás 5-FU dózist fokozatosan adták be később a 24 órás MTX expozíciós időszakba, megfigyelték a klonális növekedés szinergikus gátlását. 6 órás 10  $\mu\text{M}$  5-FU-val történő kezelés csökkentette a 47-DN klonális növekedését 25%-ra és 24 órás 0,1  $\mu\text{M}$  MTX 67%-os klonális növekedést eredményezett. A 24 órás MTX-kezelési periódus első 6 órájában adott 5-FU nem eredményezett nagyobb növekedésgátlást, mint amit csak az 5-FU esetében tapasztaltak. Ha az MTX és az 5-FU gátló hatása teljesen független lenne, és így a kombinált adagolás additív lenne, a kontroll 17%-ához került volna közelebb. Ha a 6 órás 5-FU adagot később adták be a 24 órás MTX-kezelési periódusba, e két gyógyszer együttes gátló hatása szinergikus lett<sup>44</sup>.

## 7. Mi a különbség a nekrozis és az apoptózis között?

A sejthalál természetes jelenség a többsejtű szervezetekben, és a sejtek belső és külső ingerek hatására is elpusztulhatnak. A sejthalált alapvetően **szabályozott sejthalálra** (RCD) és szabályozatlan sejthalálra, más néven **véletlen sejthalálra** (ACD) lehet osztályozni. Míg az ACD egy váratlan támadás vagy sérülés következtében kialakuló rendezetlen folyamat, addig az RCD pontos jelátviteli útvonalakon keresztül zajlik, amelyek meghatározott biokémiai és funkcionális változásokat eredményeznek.

A **szabályozott sejthalál** (regulated cell death, RCD) olyan biológiai folyamat, amely során a sejt programozott módon elpusztul a szervezet szükségleteinek és homeosztázisának fenntartása érdekében. Ezek a folyamatok, mint például az apoptózis és az autofágia, szigorúan szabályozott molekuláris mechanizmusokon

---

<sup>44</sup> Benz et al., 1980

keresztül működnek, amelyek célzott jelátviteli útvonalakon alapulnak. A szabályozott sejthalál fontos szerepet játszik az embrionális fejlődésben, a szövetek homeosztázisának fenntartásában és a kóros állapotok, például daganatok kialakulásának megakadályozásában.

A **véletlen sejthalál** (accidental cell death, ACD), más néven szabályozatlan sejthalál, azt a folyamatot jelenti, amikor a sejtek külső tényezők vagy súlyos károsodás következtében, programozott molekuláris mechanizmusok bevonása nélkül pusztulnak el. A szabályozott sejthalállal ellentétben, amely meghatározott útvonalakat követ és szigorúan ellenőrzött, a véletlen sejthalál fizikai sérülés, toxinok, szélsőséges körülmények vagy a sejteket érő túlterhelés hatására következik be. Jellemző rá a pontos jelátvitel és koordináció hiánya, ami a sejtek pusztulásához és potenciális szövetkárosodáshoz vezet. A véletlenszerű sejthalál különböző kóros állapotokban, például trauma, ischaemia vagy káros anyagoknak való érintkezés esetén fordulhat elő, szerepet játszik a szöveti sérülésekben és a betegségek progressziójában.

Az apoptózis a legkorábban felfedezett és a legterjedelmesebben vizsgált RCD útvonal. Számos nem apoptotikus RCD-útvonal, köztük a piroptózis, a ferroptózis és a nekroptózis jelentős figyelmet kapott az elmúlt években a rákterápiában rejlő lehetőségeik és a számos betegség patogenezisében való részvételük miatt. A következőkben az apoptózis és az ACD leggyakoribb, nekrozisnak nevezett formájának legfontosabb jellemzőit tárgyaljuk, miközben kiemeljük a két sejthalál útvonal közötti legfontosabb különbséget, és közelebbről megvizsgáljuk a nekroptózist, a nekrozis szabályozott formáját.<sup>45</sup>

---

<sup>45</sup> Galluzi et al., 2018; Kanduc et al., 2002; Zhang et al., 2009

## 7.1. Apoptózis

Az apoptózis az RCD-út vonal klasszikus formája, amely kritikus szerepet játszik mind a normális fiziológiai, mind a patológiás folyamatokban. Különböző fizikai, kémiai és biológiai tényezőkkel kiváltható, és a sejtválasz szigorúan szabályozott. Az apoptózis során a sejt komponensek ellenőrzött lebontását a kaspázok szabályozzák, amelyek az apoptózis során aktiválódó proteázok családja.

Az egészséges sejtekben a kaspázok proenzimként léteznek inaktív formájukban. Az apoptotikus jelátvitel aktivál egy kaspáz kaszkádot (kaspáz -2, -8, -9 és -10, az úgynevezett iniciátor kaspázok). Ezután az iniciátor kaspázok viszont hasítják és aktiválják a downstream effektor kaspázokat (kaspáz -3, -6 és -7). Az effektor kaspázok a célzott sejtfehérjék hasításával hajtják végre az apoptózist. Az apoptózist kiváltó ingerek lehetnek belső (pl. DNS-károsodás, ER stressz, megnövekedett ROS-szint, sejt hibák a mitózis során), vagy külső, amikor az extracelluláris ingereket a sejtek plazmamembrán-receptorokon keresztül érzékelik.

Az apoptózist egy sor erősen szabályozott biokémiai esemény jellemzi, amelyek a sejt morfológia jelentős változásához és végül a sejthalálhoz vezetnek. A korábbi fázisokban az apoptózisban lévő sejt elveszíti a sejt kapcsolatokat és megváltoztatja alakját. A kromatin kondenzálódik a sejtmagban és a maghártya felé mozog. A sejtmag kondenzációja (pyknózis) elindítja a DNS lebomlását. A vízvesztés a sejt jelentős zsugorodását és a plazmamembrán permeabilitás növekedését eredményezi, a többi sejtorganelum morfológiai változása nem jellemző. A foszfatidil-szerin, egy olyan lipid, amely csak a plazmamembrán belső rétegében van jelen, megjelenik a plazmamembrán külső rétegében. A sejtmag és a citoplazma apoptotikus testekké töredezik. A sejt proteázok felszabadulása, a sejt váz, a membránok és a fehérjék

szétesését katalizálják. A szomszédos makrofágok felismerik, elnyelik és megemésztik az apoptotikus testeket, ezzel befejezve a folyamatot.<sup>46</sup>

## 7.2. Nekrózis

A nekrózis az ACD egyik formája, amely belső vagy külső stressz, például mechanikai sérülések, vegyi anyagok vagy kórokozók következtében alakul ki. A folyamat általában gyors, és az ozmotikus nyomás elvesztése miatt sejtduzzadáshoz (onkózis) és felszakadáshoz vezet.

A nekrózis során a plazmamembrán integritásának elvesztése a sejtek tartalmának az extracelluláris térbe való távozását idézi elő, ami gyulladással reagál. A sejtek szétesését morfológiai változások sorozata előzi meg, beleértve a sejtorganelumok, például az ER és a mitokondriumok megduzzadását vagy a Golgi-apparátus bomlását. Az extracelluláris mátrixból beáramló kalciumionok aktiválják az intracelluláris nukleázokat, amelyek a DNS-t fragmentálják. A felszabadult lizoszomális hidrolázok hozzájárulnak a nukleinsavak és fehérjék lebontásához. A bomlástermékek aktiválják a leukocitákat, limfocitákat és makrofágokat, amelyek fagocitálják az elhalt sejtek maradványait.

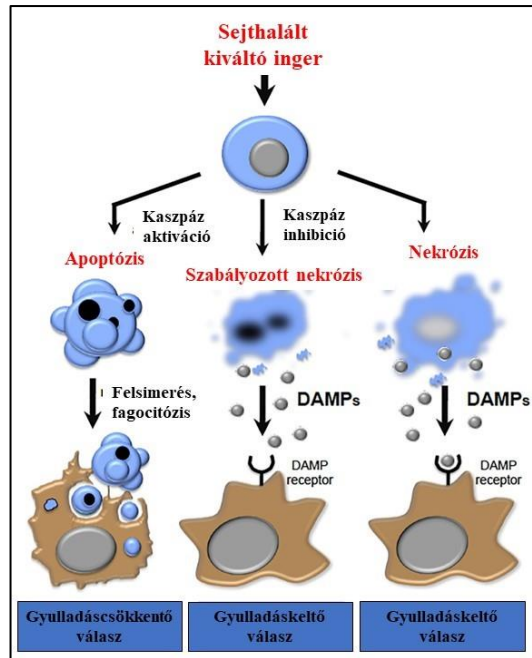
## 7.3. Nekroptózis

Míg korábban a nekrozist szigorúan a sejthalál szabályozatlan formájának tekintették, a legújabb vizsgálatok a sejthalálnak egy szabályozott, nekrotikus fenotípusú formáját azonosították, amelyet nekroptózisnak neveznek. Ez különböző stresszingerre, többek között interferonokra, halál-ligandokra vagy Toll-szerű receptorokra adott válaszként jön létre. A nekroptózis természeténél fogva erősen immunogén, és a gazdasejtek gyakran használják a kórokozók elleni védekezési

---

<sup>46</sup> Elmore 2007; He és Wang 2018

mechanizmusként. Továbbá, mivel a nekroptikus útvonal nem támaszkodik a kaspáz aktivációra, az RCD alternatív formájaként aktiválódik, amikor az apoptotikus útvonalat bizonyos tényezők, például vírusfehérjék vagy genetikai hibák gátolják.<sup>47</sup>



9. ábra Sejthalál mechanizmusok (Kearney et al., 2017)

#### 7.4. Sejthalál kvantifikálása

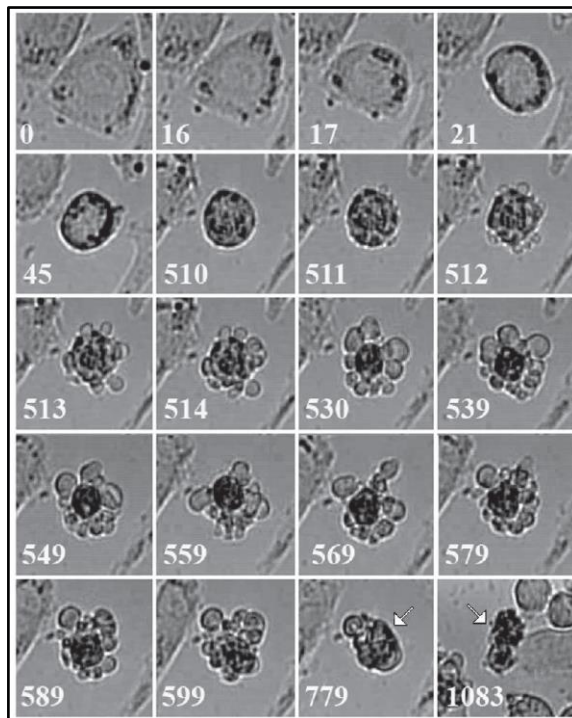
Az apoptotikus testek és a nekrotikus testek általában különböznek egymástól morfológiai, biokémiai és sejtbológiai jellemzők alapján. Az apoptózis során a programozott sejthalál jellemzője az, hogy a sejt a folyamat során önmagában indukálja a sejthalált. Az apoptotikus testek általában kisebbek, sűrűbben csomósak, membránnal körülvett struktúrák lehetnek, és a sejt tartalma sűrű, tömör lehet. Ezzel szemben a nekrozis során a sejt vagy a szövet sérülése miatt következik be a sejthalál,

<sup>47</sup> He et al., 2019; Cho et al., 2009

és a nekrotikus testek általában nagyobbak, duzzadtabbak, szétört sejtalkotók és a sejtek tartalmának szivárgása jellemzi.

#### A HaCaT sejtek apoptotikus zsugorodásának grafikus ábrázolása

Az apoptózis rövidebb vagy hosszabb ideig tarthat. Az alacsony gyakoriságú, viszonylag hosszú ideig tartó apoptotikus sejthalál során végbemenő tipikus felszíni változásokat a 10. ábra mutatja. A sűrű monolayer-hez kapcsolódó háromszög alakú HaCaT sejt 20 perc alatt levált és kerek alakúvá vált, majd blebbinggel megkezdte apoptotikus mozgását, amely több órán át tartott, mielőtt mozdulatlaná vált és lízis következett be. A 10. ábra 1083 perces paneljében látható mező azért tűnik némileg másnak, mint a 779 perces panelben látható mező, mert eltelt 5 óra. Ez idő alatt a zsugorodó halott sejt (a nyíl jelzi) elvesztette a kapcsolatot a monolayer-rel, és közelebb került a többi sejthez.

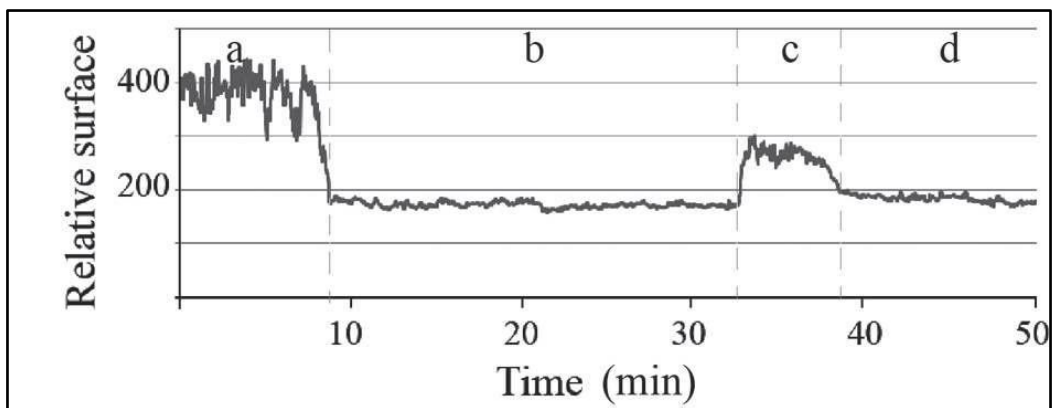


10. ábra Karakterisztikus morfológiai változások az apoptózis során (Nagy et al., 2010)

## Az apoptózis sejtfelszíni profilja

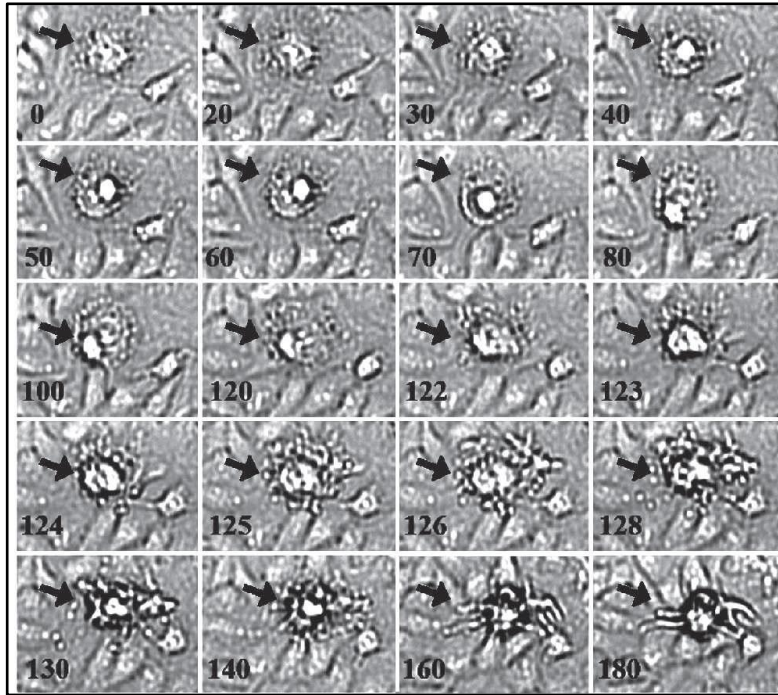
A konfluenciához közeli monolayer kultúrában lévő sejt sokkal nagyobb felülettel rendelkezik (11. a ábra), mint a levált, zsugorodott és gyorsan mozgó apoptotikus forma (11. b ábra). Az erőteljes mozgás alatti blebbing ("danse macabre") kb. 20 percig tartott, ami hozzájárult a sejtfelület átmeneti növekedéséhez (11. c ábra), majd a teljes széteséshez és lízishez (11. d ábra) vezetett. Az, hogy az apoptózis korai szakaszában (11. b ábra) a sejt relatív felszíne gyakorlatilag megegyezik az apoptózis végső szakaszában (11. d ábra) a lizált sejtekével, némi magyarázatra szorul.

Bár az apró, szétesett részecskék emberi szemmel nem voltak láthatók, de a számítógépes elemzés felismerte ezeket a finom részecskéket, amelyek felülete hozzájárult a lizált sejt látható felületéhez. Ebben a konkrét esetben az apoptotikus folyamat 1 órán belül befejeződött.



11. ábra Az apoptózis kialakulásának időbeli profilja (Nagy et al., 2010)

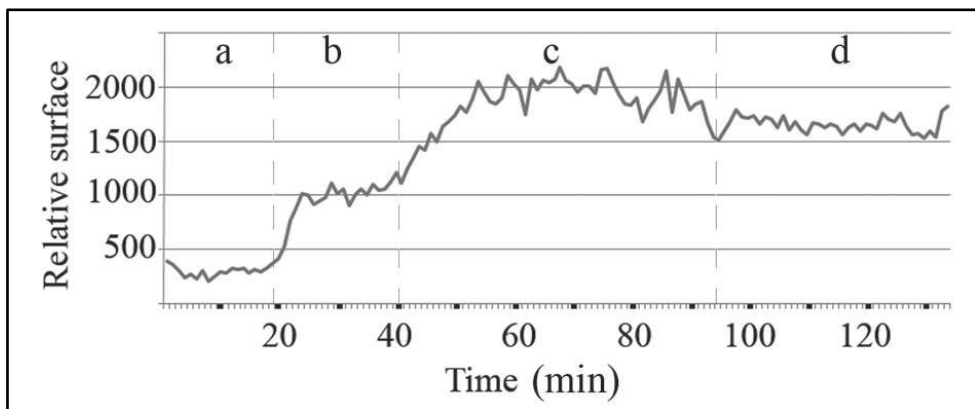
A sejthalál mintázata jelentősen különbözött az apoptózistól. A sejtmag és a nyállal jelzett nekrotikus sejt a sejtek leválása nélkül kezdett el növekedni. A nekrotikus sejt csak 120 perc megfigyelés után vált ki a monorétegből. A nekrotikus folyamat végén inkább szálszerű citoplazmatikus pusztulás, mint blebbing következett be (12. ábra).



12. ábra Nekrotikus HaCaT-sejtpusztulás magas ólom koncentrációval történő kezelés után (Nagy et al., 2010)

#### A nekrosis sejtfelszíni profilja

A nekrotikus folyamat sejtfelszíni elemzése négy megkülönböztethető stádiumot mutatott, amelyeket korábban nem írtunk le. Az 1. fázis (13. ábra a) a nekrotikus sejt monolayer felületét ábrázolja. A 2. fázisban (13. ábra b) a látható felület körülbelül 3-4-szer nagyobb, mint a monolayer felület. A harmadik fázisban a sejtfelület közel 8-szor nagyobb, mint a kezdeti monolayer felület (13. ábra c). Végül a 4. szakaszban a sejtfelület mérsékelt csökkenése figyelhető meg (13. ábra d). Ezek az adatok összhangban vannak azokkal a megfigyelésekkel, hogy a nekrosis során a sejtméret óriási mértékben megnövekszik.



13. ábra A nekrotikus sejtfelszín növekedésének időbeli fázisai (Nagy et al., 2010)

# Anyagok és módszerek

---

## 1. Sejttenyésztési körülmények

A vizsgálatok során humán eredetű bőr és méhnyakrák sejtekkel (HaCaT, HeLa), rágsáló eredetű laphám karcinóma (SCC-VII) és kínai hörsög eredetű ovárium (CHO-K1) sejtvonalakkal dolgoztunk. Az SCC-VII sejteket DMEM/HAM'S F12 médiumban tenyésztettem 2mM L-glutamin, 23 mM nátrium-bikarbonát, 100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin, 1% nem esszenciális aminosav keverék és 10% hőinaktivált magzati borjú szérum hozzáadása mellett. A CHO-K1 sejttenyészetet pedig az előzőhöz hasonló összetételű Ham's-F12 tápfolyadékban tenyésztettük. A HaCaT sejttenyészetet 2 mM L-glutamint, 23 mM NaHCO<sub>3</sub>-ot, 100 U/mL penicillint, 100 U/mL *streptomycint*, 1%-os nem esszenciális aminosav keveréket és 10% borjú szérum albumint tartalmazó DMEM tápfolyadékban, a HeLa sejttenyészetet pedig, RPMI 1640-es tápfolyadékban tenyésztettük.

A vizsgálat során azonos körülmények között tenyésztett kontroll és kezelt sejteket tanulmányoztuk. A sejteket 37°C-on, 95%-os páratartalmat és 5%-os CO<sub>2</sub> mennyiséget biztosító inkubátorban tenyésztettük.

Az MTT-tesztet 96 és 24-lyukú platek-ben végeztük. A HaCaT sejtek esetében 10.000 vagy 50.000/lyuk, az SCC sejtek esetében 5000 vagy 25.000/lyuk sejt volt az induló sejtszám. Az eltérést az induló sejtszámban a sejtvonalak eltérő sejtciklusa indokolja. A passzálás után 24 órát biztosítottunk a sejteknek a kitapadásra, majd a megadott vegyülettel kezeltük és 48 óráig vizsgáltuk az adott nukleozid hatását a sejteken.

A Time-Lapse Imaging videómikroszkópiához *glass-bottom dish-be* tenyésztettük a sejteket. A HaCaT esetében 150.000 sejttel, SCC esetében 75.000

sejttel indítottuk a tenyészetet. Itt szintén 24 órát biztosítottunk a kitapadáshoz, majd 48 óráig inkubáltuk a sejteket az adott vegyülettel.

## 1.1. Alkalmazott sejtvonalak

### HaCaT sejtek

Humán, kaukázusi felnőtt férfi bőrének hám rétegéből származó, spontán transzformálódott, aneuploid keratinocita, adherens sejtípus. 1986-ban immortalizálódott sejtvonala, amint arra a neve is utal, alacsony kalcium szint mellett, magas hőmérséklet hatására jött létre. A sejtet egy férfi hátbőrének olyan részéből izolálták, mely bár a tumor melletti infiltrálódott területről származott, de bizonyítottan nem szenvedett *malignus* átalakulást. A HaCaT sejtek genetikailag különböznek a normál humán epidermális keratinocitáktól, azonban a differenciálódási potenciáljukat megtartották. A HaCaT sejtek nude egérbe ültetve keratinocitákká differenciálódnak<sup>48,49</sup>.

### SCC VII sejtek

Laboratóriumi egér szájüregi laphámjából származó daganatos sejtvonala<sup>50</sup>. Közvetlen áttéteket képez a nyak, a méhnyak és a tüdő területén<sup>51</sup>. Hatása kiterjed a citoszkeletonra is, az adhézións molekulák számának csökkenését okozza. SCC VII modellsejteken vizsgálják a hipoxia, az immunszuppresszív anyagok és xenobiotikumok hatását is annak érdekében, hogy a humán szájüregi daganatokat korán felismerjék és hatásosan kezeljék<sup>52</sup>. A jelentős metasztatizáló képességekkel

---

<sup>48</sup> Boukamp et al., 1997

<sup>49</sup> Akaza et al., 2011

<sup>50</sup> Hwang-Bo et al., 2015

<sup>51</sup> O'Malley et al., 1997

<sup>52</sup> Sominski et al., 2015; Duarte et al., 2012,

rendelkező egér eredetű karcinóma sejtet C3H egértörzsből izolálták, a Boston-i Massachusetts General Hospital-ban<sup>53</sup>.

### CHO-K1 sejtek

Kínai hörcsög méh eredetű sejtvonalt, melyet először 1957-ben izoláltak. A sejtvonalt modell orvosi és gyógyszerészeti kutatásokban, gyakran alkalmazzák rekombináns fehérjék előállítására. Az eredeti sejtvonalt egyik szubklónja a CHO-K1, mely sejtípus az eredetitől kevesebb DNS-sel rendelkezik. Az iparban terápiás fehérjék tömegtermelésére használják, 3-10 gramm rekombináns fehérjét állítanak elő tenyészeteként. Alkalmas emberi felhasználásra, mivel lehetővé teszik a poszttranszlációs módosításokat olyan rekombináns fehérjéknél, melyek az emberekben is képesek működni. Ezen sejtek prolint igényelnek a prolin szintézis gén hiánya miatt, a bioszintetikus lánc blokkja abban áll, hogy a glutaminsavat glutamin-gamma-aldehiddé alakítja át<sup>54</sup>.

### HeLa sejtek

A HeLa sejtvonalt az egyik legrégebbi, legelterjedtebb emberi sejtvonalt. Nevét Henrietta Lacks afroamerikai hölgyről kapta, akinek a méhnyakrákjából izolálták ezeket a sejteket 1951-ben<sup>55</sup>. Széleskörűen alkalmazzák biológiai kutatásokban, modell szervezetként való használata szintén jelentős. Többek közt a járványos gyermekbénulás elleni vakcinát is HeLa sejtek alkalmazásával fejlesztették ki<sup>56</sup>. A HeLa sejtvonalt rendkívül alkalmazkodó és gyorsan növekszik, ezért körültekintően kell végezni a tenyésztését. Gyakorta beszennyezi a többi sejtvonaltat<sup>57</sup>.

---

<sup>53</sup> Kanazawa et al., 1988

<sup>54</sup> Lewis et al., 2013

<sup>55</sup> Beskow, 2016

<sup>56</sup> Landry et al., 2013

<sup>57</sup> Rahbari et al., 2009

## 2. Viabilitás vizsgálat MTT-tesztel

Az MTT-tesztet gyakran használják citotoxicitás vizsgálatára különböző sejtvonalakon, emberi és állati eredetű sejteknél egyaránt. A tetrazolium sók redukciója már egy széleskörben elfogadott módja annak, hogy egy adott xenobiotikum viabilitásra kifejtett hatását vizsgáljuk *in vitro*. A metabolikusan aktív sejtek csökkentik a sárga tetrazolium MTT mennyiségét és a dehidrogenáz enzimek hatására NADH és NADPH ágensek jönnek létre. Az emiatt keletkezett lila formazán szolubizálható és számszerűsíthető spektrofotometriai módszerekkel. Ez az MTT reagens csekély háttér abszorbanciát eredményez élő sejtek hiányában. Minden sejttypusnál egyenes arányosság van a sejtszám és a szignál között, ez lehetővé teszi, hogy kvantifikálhassuk a sejtek viabilitásában bekövetkező változásokat.

A teszt során 96 és 24 lyukú mikrotiter lemezeket használtunk a mérésekhez. A végtérfogat lyukanként 200 vagy 500  $\mu\text{l}$  volt. A nukleozid analógokat 10 különböző koncentrációban (100-80-60-50-30-20-15-10-7.5-5  $\mu\text{g/ml}$ ) teszteltük (96 lyukú mikrotiter lemez). A hatások függvényében a koncentráció sor finomítására volt szükség, ezért a későbbiekben 5 másik koncentrációt (10-9-8-7-6  $\mu\text{g/ml}$ ) teszteltünk (24 lyukú mikrotiter lemez). Az N-153, 5-FU és MTX esetében is öt koncentrációt vizsgáltunk (40-30-20-10-5  $\mu\text{g/ml}$ ) 96 lyukú mikrotiter lemezben. A vegyületek feloldása DMSO-ban történt, különös tekintettel arra, hogy minden egyes lyukban 1% (v/v) legyen a DMSO tartalom. Az anyagokat a sejtvonalra jellemző tenyésztőfolyadékba hígítottuk, és a vizsgálat időtartama 48 h volt.

100  $\mu\text{l}$  MTT oldatot (0,5 mg/ml PBS-ben oldottan) adtunk minden lyukhoz. A lemezeket 2 órán keresztül inkubáltuk 37 °C-on. Ezután a lyukakból a folyadékot kiszívtuk, és az MTT formazánt 100  $\mu\text{l}$  DMSO-val oldottuk. A mintákat inkubátorba helyeztük 15 percre, hogy tökéletes legyen a formazán kristályok oldódása. 570 nm-en mértük az abszorbanciát *plate reader* segítségével. A sejtpopulációk viabilitását a következőképpen számoltuk ki:

a kezelt sejtek abszorbanciája  
a kontroll sejtek abszorbanciája. X 100

DMSO – dimetil szulfoxid

A DMSO amfipatikus sajátságú, ugyanis tartalmaz egy poláros szulfonil csoportot és két apoláros metil csoportot. Emiatt alkalmas poláros és apoláros vegyületek oldására egyaránt, valamint a hidrofób membránokon is képes átjutni. Széles körben alkalmazzák kezelése során a gyógyszerek szolubilizációjára. A DMSO-t előszeretettel használják terápiák során az amfipatikus tulajdonsága miatt annak ellenére, hogy a fiziológiai és farmakológiai hatásai még nem teljesen feltártak<sup>58</sup>.

A különböző sejtvonalakra nem hat egységesen a DMSO. Például a T-sejtek viabilitására hosszú távon (72 h) nincs hatással az 1% DMSO. A WM-266-4 sejtvonal esetében a vizsgálatok alapján az sejtek még az 1,5% DMSO koncentrációt is tolerálják. Összességében a különböző vizsgálatok során leggyakrabban legfeljebb 1%-os koncentrációban alkalmazzák a DMSO-t<sup>59</sup>.

### 3. Time-Lapse Imaging videómikroszkópia

A sejtkultúrák folyamatos megfigyelésére a citotoxicitási vizsgálat során time-lapse imaging videómikroszkópos rendszert<sup>60</sup> használtunk. A vizsgálatok során a time-lapse videó mikroszkópos rendszer legújabb fejlesztésű beállításait alkalmaztuk. Ezek a következők voltak: az inkubátor típusa: SANYO MCO18-AC CO2 sejtenyésztő inkubátor (Wood Dale, IL, US) négy videó mikroszkóppal

---

<sup>58</sup> de Abreu et al., 2017

<sup>59</sup> Ferk and Dariš, 2018, Holthaus et al., 2018

<sup>60</sup> Nagy et al., 2010

felszerelve. A mikroszkópok Olympus (Tokyo Japan) gyártmányúak, inverz állásban, célszerű módosításokkal: a revolvertoronyban elhelyezett fényforrással, és az okulárba telepített CCD kamerával lettek felszerelve. Az objektívek (x10:0,25, achromat Carl Zeiss, Jena) a CCD kamera előtt helyezkednek el. A CCD kamera adatai: 2 megapixel felbontású UVC USB 2 webkamera, módosításai: a kameraház, az objektívek és az infraszűrő eltávolításra kerültek. Fényforrás: 960 nm hullámhosszúságú, közeli infravörös fényt emittáló LED (5mm átmérő 1,2V 50 mA). Az infravörös megvilágítást alkalmazva minimalizáltuk a fototoxicitást.<sup>61</sup> A time-lapse videó mikroszkópos megfigyeléseink során a kontroll és a kezelt tenyészetekről percenkénti felbontásban készítettünk felvételeket.

### Fiji (ImageJ)

A kísérletek teljes időtartama alatt percenkénti felbontásban készítettünk képeket 11 frame átlagolásával, aminek célja a jel-zaj arányának növelése volt a könnyebb elemezhetőség érdekében. A képek 1600 x 1200 pixel felbontásban, 24 bit RGB formátumban készültek. Az egyes képszekvenciákhoz tartozó pixelméretet és a méretskálát Bürker kamráról készített kalibrációs fotók alapján számítottuk ki.

Az így elkészített képekről Fiji képelemző szoftver segítségével kvantitatív elemzéseket végeztünk. A képek feldolgozása során a NIH által fejlesztett nyílt forráskódú Fiji (ImageJ) software-t, és az erre a célra kifejlesztett macro-kat és plugin-eket alkalmaztuk. Végezetül a kapott eredményeket az Excel programban ábráztuk.

A kiértékeléskor fontos szempont volt az, hogy az egyes képszekvenciák elemzése során nem alkalmazhattuk ugyanazt a sémát. Minden esetben azt kellett

---

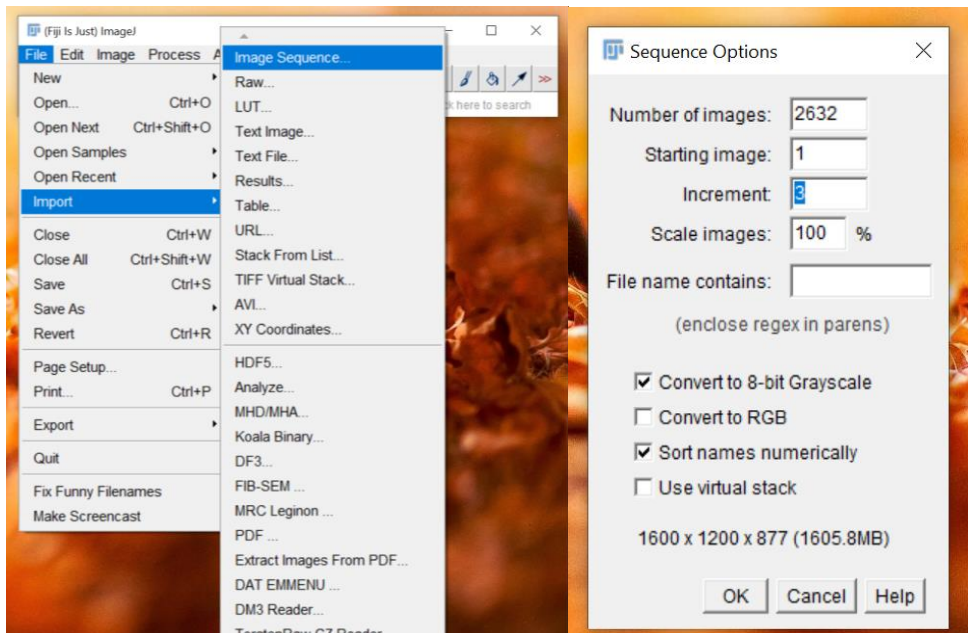
<sup>61</sup> Nagy et al., 2014

szem előtt tartanunk, hogy a kiértékelés az adott kísérlet szempontjából a legtöbb információval lásson el<sup>62</sup>.

### 3.1. Adatfeldolgozás

1) A képszekvencia előkészítése kiértékelésre

A Fiji / ImageJ szoftver segítségével a képi adatokból számadatot nyerhetünk a megfelelő algoritmusok alkalmazásával. Ehhez először is betöltjük a szükséges szekvenciát. A *File* → *Import* → *Image sequence* segítségével.



9. ábra Képszekvencia betöltése

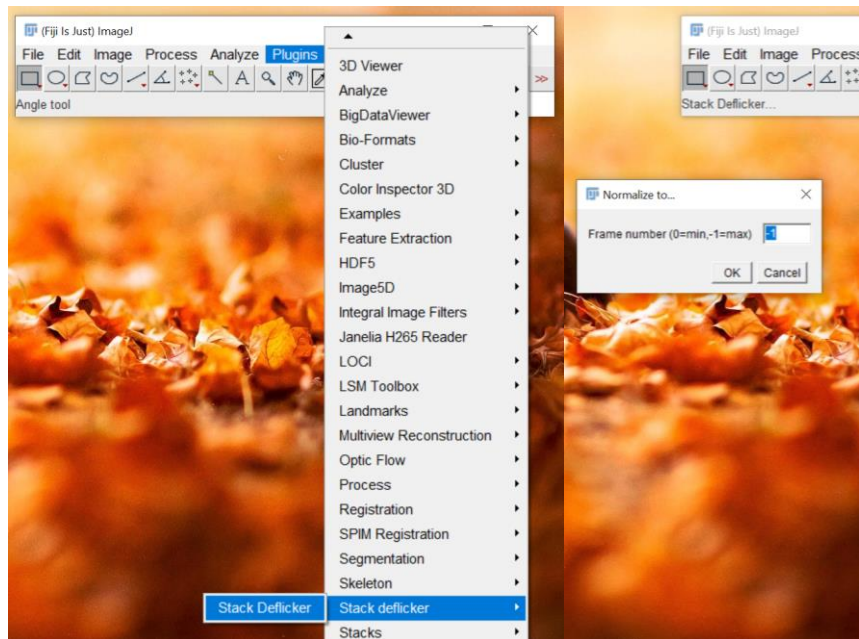
A felugró ablakban lévő paraméterek közül az alábbiak fontosak:

- *Increment*: bármilyen tetszőleges számot beállíthatunk, ugyanis ez arra vonatkozik, hogy minden hányadik képet töltsse be a szekvenciából (jelen esetben célszerű 1 értékre állítani)

<sup>62</sup> <https://fiji.sc/>

- *Convert to 8-bit Grayscale*: ezt az opciót bepipáljuk, ezzel csökkenthető a betöltött szekvencia által foglalt memória mérete

*Stack Deflicker*: a *Plugins* menüjében található algoritmus, mely a megvilágítás egyenetlenségéből származó villódzásokat minimalizálja, ehhez a felugró ablakban a -1 érték beállítása szükséges



14. ábra Stack Deflicker

A folyamat eredménye az, hogy megszűnik a villódzás a képszekvencián.

Ezt követően a teljes szekvenciában az osztódó sejteket kerestük. Ha megtaláltuk a sejteket, akkor a különböző paraméterek mérése következik.

### **A minőségi adatok számadattá konvertálása**

A vizsgálandó paraméterek: anya sejt méret, osztódási idő és a generációs idő.

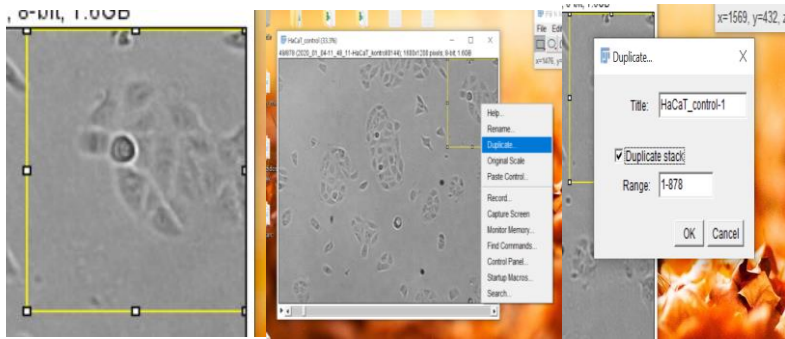
**Anya sejtméret:** az osztódni készülő sejtmérete a felválás és lekerekedés pillanatában

**Osztódási idő:** az az időtartam mialatt az anyasejt két utódsejtté osztódik, az anyasejt lekerekedésének pillanatától az utódsejtek megjelenéséig tart

**Generációs idő:** ez az időtartam az anya sejtosztódásakor keletkező utódsejtekre jellemző, mely során addig követjük őket nyomon amíg azok is osztódnak

#### a) Osztódás idő

Keresnünk kell egy jól felvált és lekerekedett osztódásra kész anyasejtet, majd ellenőriznünk kell, hogy ennek az utódsejtjeit és ezek utódait is nyomon tudjuk követni.



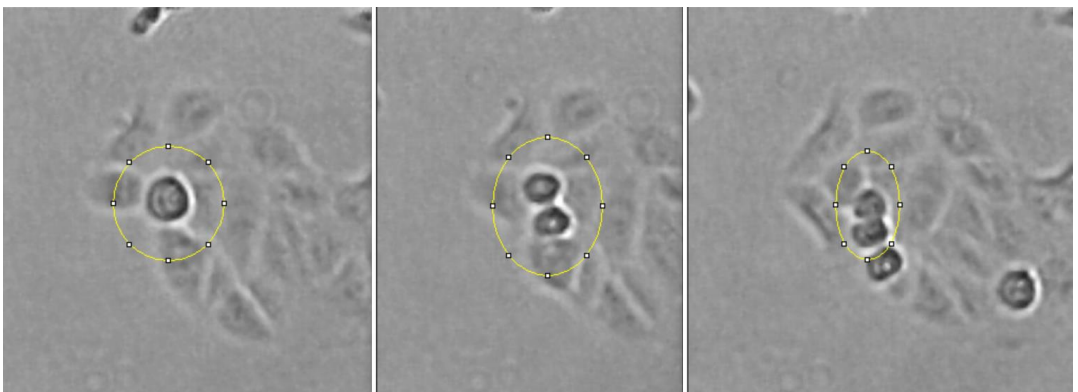
15. ábra Anyasejt kiválasztása

Célszerű azt a területet kijelölni a szekvencián, majd ezt duplikálni a fent látható módon. Attól, hogy megdupláztuk a képszekvenciát, az eredeti szekvenciát ne zárjuk be, ugyanis ezt követően további sejteket szükséges mérni, minimum 30-at vagy amennyire lehetőség van a tenyészet állapotától függően.

Ha nem sikerül elegendő sejtet mérni a kívánt mintanagyság eléréséhez, akkor több lehetséges limitáció is hatással lehet a vizsgálatra. Néhány ilyen korlátozás a következő:

- 1) Csökkent statisztikai teljesítmény: A kisebb mintaméret korlátozhatja a csoportok vagy feltételek közötti statisztikailag szignifikáns különbségek kimutatásának képességét, ami csökkentheti a vizsgálat általános teljesítményét.
- 2) Megnövekedett mérési hiba: Kisebb mintaméret esetén nagyobb az esélye annak, hogy az eredményeket mérési hiba befolyásolja, mivel az egyes mérések nagyobb hatással lehetnek az általános eredményekre.
- 3) Elfogult vagy nem reprezentatív minta: Ha nem tudunk elegendő sejtet mérni ahhoz, hogy reprezentatív mintát kapjunk, az eredmények torzulhatnak, vagy nem tükrözik teljes mértékben a vizsgált populációt.
- 4) Az eredmények általánosításának nehézségei: Kisebb mintaméret esetén nehezebb lehet az eredményeket nagyobb populációkra általánosítani, mivel a minta esetleg nem teljesen reprezentatív.
- 5) Az 1. vagy 2. típusú hibák megnövekedett kockázata: Kisebb mintaméret esetén nagyobb a kockázata mind az I. típusú hibáknak (hamis pozitív eredmények), mind a II. típusú hibáknak (hamis negatív eredmények), ami befolyásolhatja az eredmények általános pontosságát.

Fontos, hogy gondosan mérlegeljük a vizsgálat lehetséges korlátait, és azt, hogy ezek hogyan befolyásolhatják az eredményeinket és következtetéseinket.



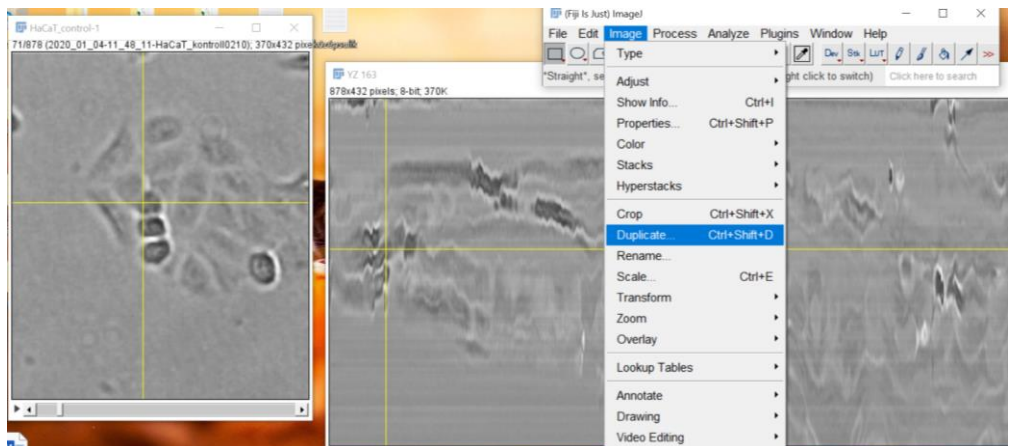
16. ábra Sejtosztódás idejének meghatározása

A bal oldalon egy tökéletesen kerek sejtet láthatunk. Középen ennek a sejtnek az osztódását figyelhetjük meg. Jobb oldalon pedig a két utód sejtet, amelyek már a letapadásra készek. Ez idő alatt meghatározhatjuk az osztódás idejét. Ehhez az alább részletezett lépésekre van szükség. Első lépésnek a képen látható módon az *Orthogonal Views* parancsot választjuk.



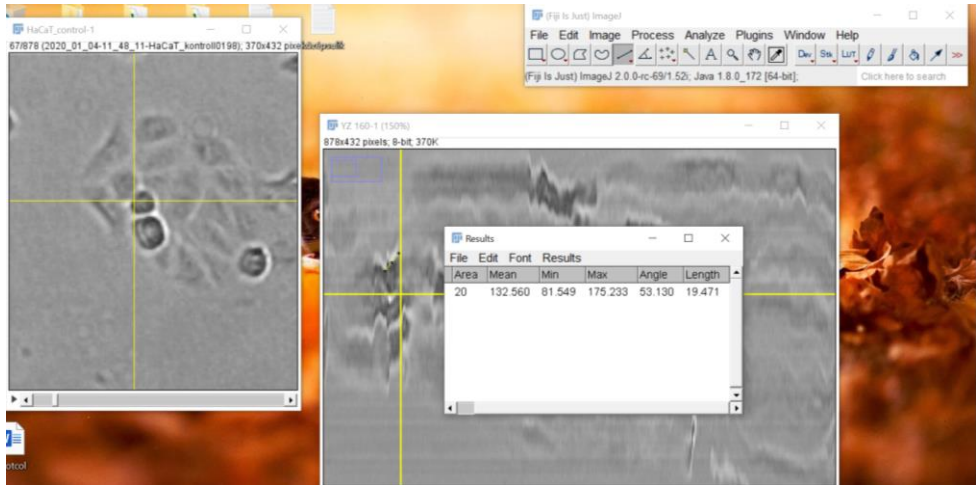
17. ábra Az *Orthogonal Views* parancs eredménye

Ezt követően lemérjük a képen az „osztódás hosszát”, mely egyenértékű lesz az osztódáshoz szükséges idővel. Ahhoz azonban, hogy ezt megtehesük az YZ nézetünket duplikálni szükséges és azon lemérni a hosszt.



18. ábra Az osztódási idő mérése

A célkeresztet úgy állítjuk be, hogy az YZ nézetben az osztódás kezdeténél legyen. Ha nem látjuk jól, az eszköztárban lévő nagyítógomb segítségével ránagyíthatunk a képre, annak érdekében, hogy minél pontosabban tudjuk meghatározni az osztódáshoz szükséges időt.



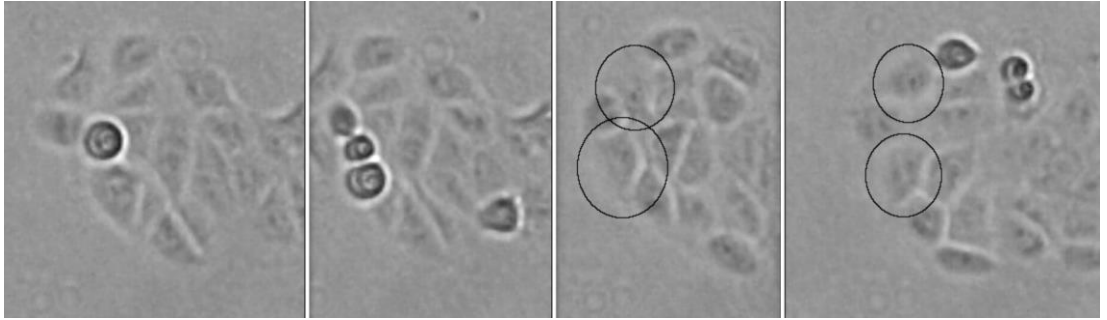
19. ábra A mérés eredménye

A méréshez az eszköztáron található *Straight Line*-t használjuk, mely segítségével egyenest rajzolhatunk. Ezt követően ennek az egyenesnek megmérhetjük a hosszát is a CTRL+M parancs segítségével. Az eredmény a felugró ablakban jelenik, amelyből a *Length* azaz a hossz információt kell figyelembe vennünk. Ezt Excelbe importálhatjuk.

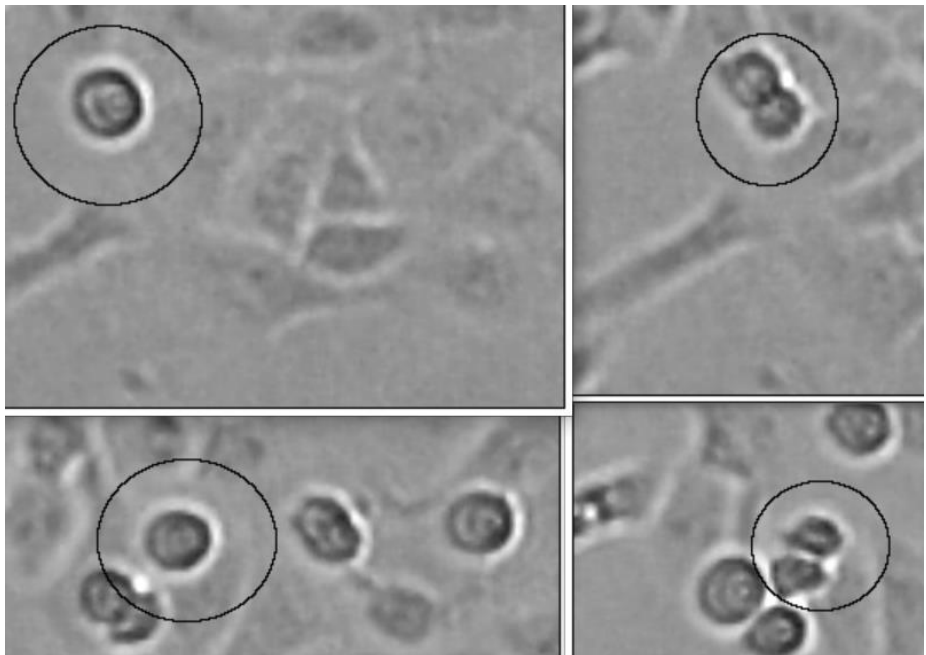
### b) Generációs idő (sejtciklus idő)

Azt az időtartamot jelenti, mely során az anyasejt két utód sejtre osztódik, majd ezt követően azokat is nyomon követjük mindaddig, amíg azok is két utódsejtre osztódnak.

Ennek a meghatározása a fentebb részletezett osztódási idő mérésével azonos módon történik.



20. ábra A) Generációs idő meghatározása



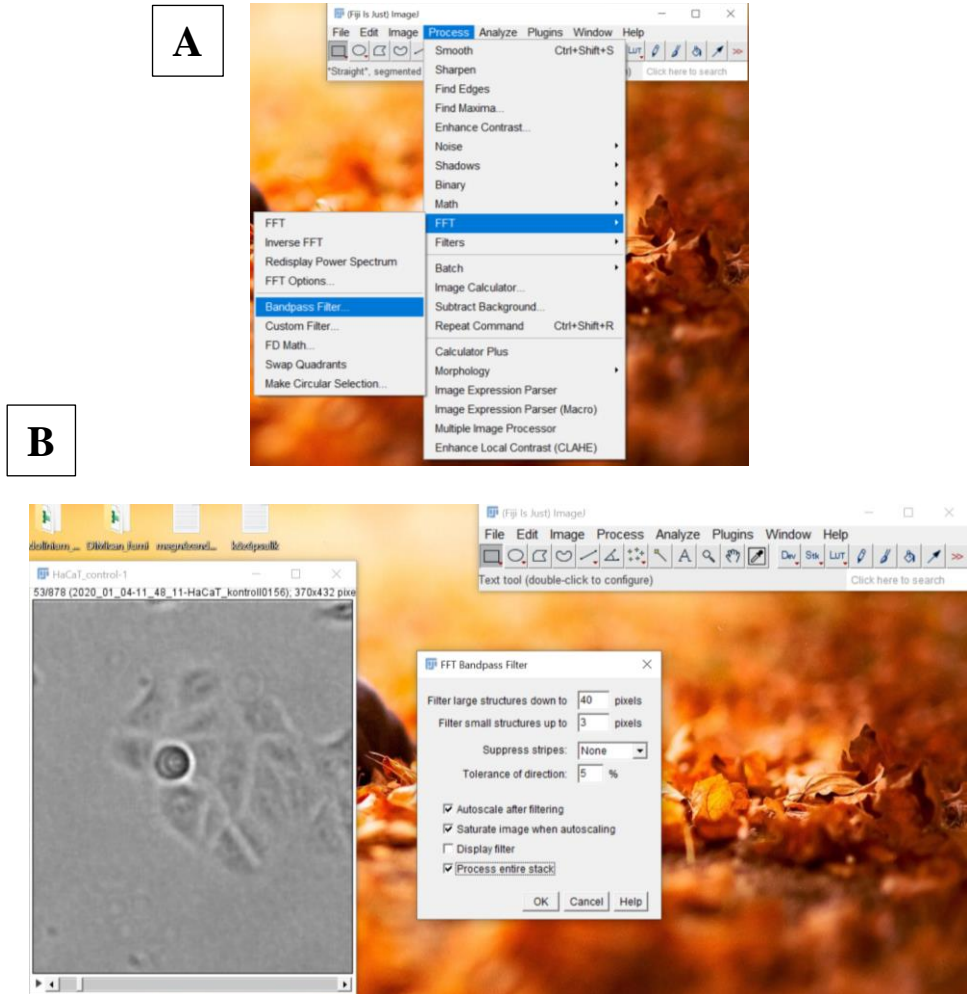
21. ábra B) Generációs idő meghatározása

A fenti ábrsorozaton (A, B ábrák) a generációs idő folyamata látható. Az anyasejttől kiindulva egészen az utódsejtek utódjaikig.

### c) Az anyasejt méretének meghatározása

El kell választanunk az előteret a háttértől. Az előtér az információ a számunkra, azaz a sejtek. A háttér pedig minden más, amely nem információ, azaz a mérés szempontjából szükségtelen. Ehhez a *Bandpass* filtert használjuk, amely kiszűr

minden 3 pixel alatti és minden 40 pixel feletti „adatot” a képünkről, azaz mindent, ami a sejtek mérettartományán kívül esik.



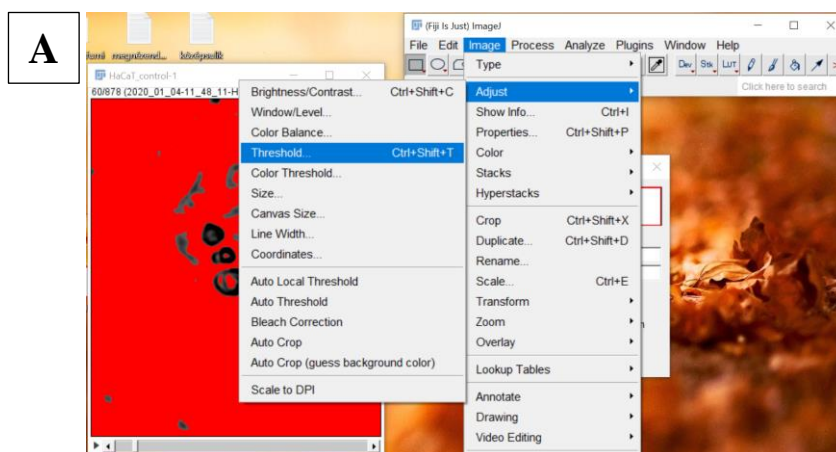
22. ábra *Bandpass filter* alkalmazása (A, B ábrák)

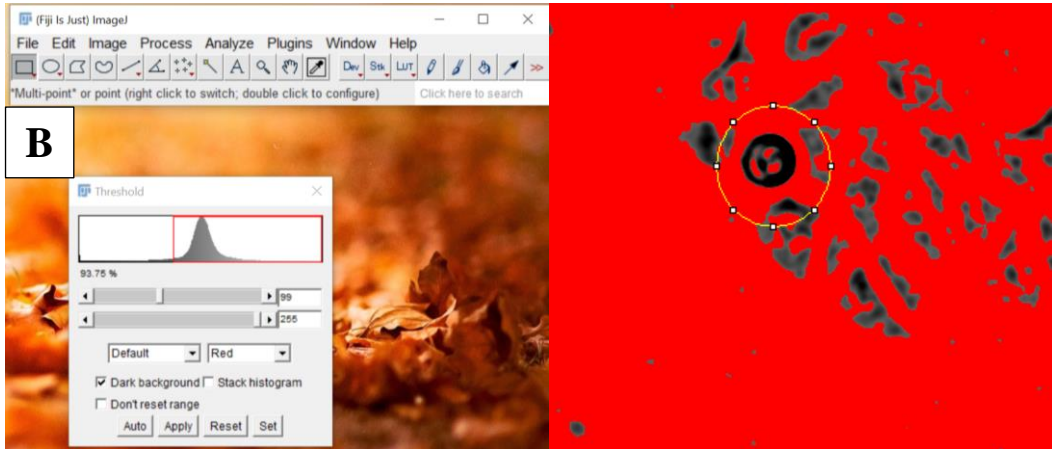
Ahogy a fenti képen látható, a *Process entire stack*-t be kell pipálni. (Ha azt elfelejtjük, akkor csak az első képen történik meg a módosítás). Aztán az OK-ra kattintunk, majd a felugró ablakban szintén az OK-ra kattintunk. Az eredmény pedig az alábbi módon néz ki.



23. ábra Mérhető anyasejt

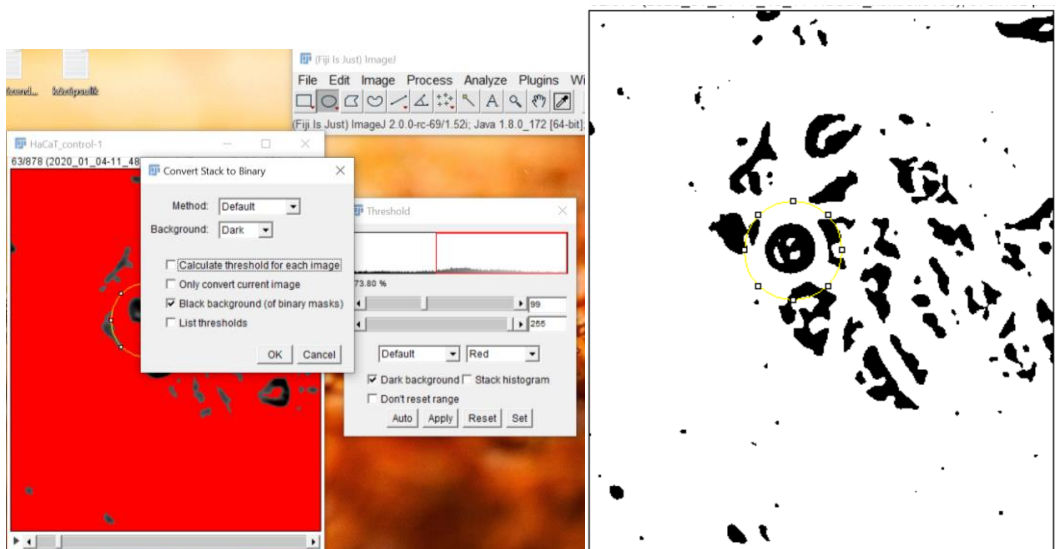
Arra kell figyelniünk, hogy a mérendő anyasejt tökéletesen körül határolható legyen. Ezt követően szegmentáljuk a képet, a *Threshold* funkcióval mely eredményeként egy bináris, azaz fekete-fehér képet kapunk. Az alábbi módon nyithatjuk meg.





24. ábra *Threshold* beállításai (A, B ábrák)

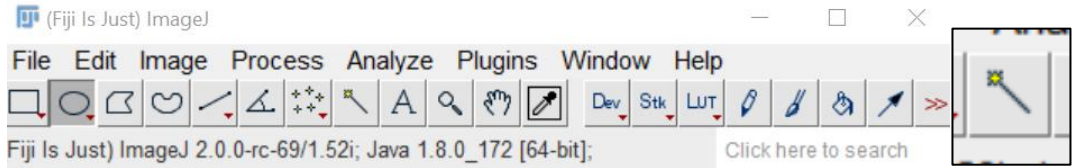
A felugró ablakban módosítható az automatikusan beállított szegmentálás. Azt kell ellenőriznünk, hogy az anyasejt tökéletesen lefedhető-e. Ezt követően alkalmazzuk a beállításokat. A felugró ablakban (25. ábra) kivesszük a pipa jelzést a *Calculate threshold for each image* elől. Majd ezt követően OK. gombra kattinva az eredmény a jobb oldalon látható.



25. ábra *Threshold* további beállításai

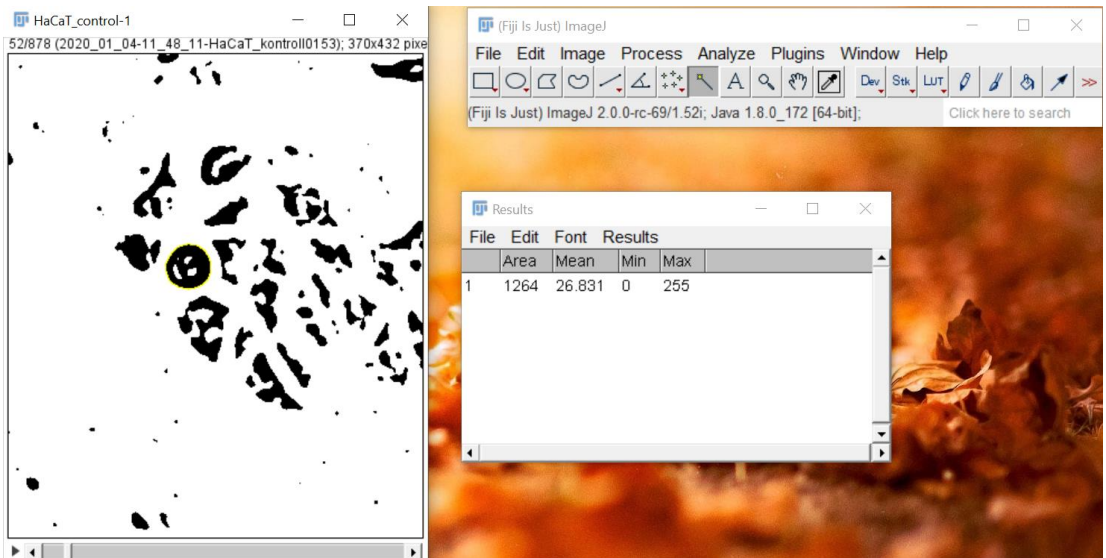
## d) Sejtméret meghatározása

A sejtméretet az alábbi módon határozhatjuk meg:



26. ábra Sejtméret meghatározás eszköze

A jobb oldalt látható varázspálca ikon segítségével kijelölhető a sejtünk, ha az élesen elhatárolható. A kijelölést követően a CTRL+M paranccsal meghatározhatjuk a területét.



27. ábra A mérés eredménye

A felugró ablakban az *Area* azaz a terület a fontos információ számunkra. A terület értéket jelenleg  $\text{pixel}^2$ -ben fejezi ki a szoftver. Ezt  $\mu\text{m}^2$ -re váltjuk a megfelelő váltószám ismeretében. A váltószám meghatározását Bürker-kamra segítségével végezzük.

## GraphPad

A statisztikai analíziseket a GraphPad (Prism) segítségével végeztük. A kiértékelés során a többszörös illesztésű ANOVA algoritmust alkalmaztunk. Statisztikailag szignifikánsnak a következőt tekintettük:  $P < 0.05$ .

### 4. Alkalmazott vegyületek

#### N-153

Az N-153 nevű vegyületet (1- [2'-dezoxi-2'-C- (n-propil-szulfanil-metil) -3', 5'-di-O- (terc-butil-dimetil-szilil) - $\beta$ -D-arabinofuranozil] -uracil) a Debreceni Egyetem Gyógyszerkémiai Tanszékén állították elő (Magyarország, Debrecen). Az N-153 (28. A ábra) néven említett vegyület egy uridinből származó di-O-szililált nukleozid-analóg, amely természetellenes D-arabinóz-cukor-konfigurációt és n-propil-szulfanil-metil-elágazást tartalmaz a C2-helyzetben. A vegyületet úgy szintetizáltuk, hogy az n-propántiolból keletkező tiilgyököt fotoiniciálás után hozzáadtuk a megfelelő uridin-2'-exometilén-származék kettős kötéséhez. Az utóbbi nukleozid exometilént három lépésben nyerték munkatársaink az uridinből, beleértve a 3'- és 5'-hidroxilcsoportok szililezését, majd ezt követően az oxidálást és a diszilil-származék C-2'-helyzetében történő Wittig-olefinálását<sup>63</sup>.

#### 5-fluorouracil

A daganatellenes 5-fluorouracil (28. B ábra, Sigma-Aldrich Budapest) egy jól ismert antimetabolit<sup>64</sup>. *In vivo* körülmények között 5-fluor-uridin-monofoszfáttá alakul. Az UMP 5-fluor-uridin-monofoszfáttal történő helyettesítése az rRNS-szubsztrátban nem befolyásolta az rRNS előtti feldolgozást<sup>65</sup>. Dezinukleotid-

---

<sup>63</sup> Bege et al., 2017

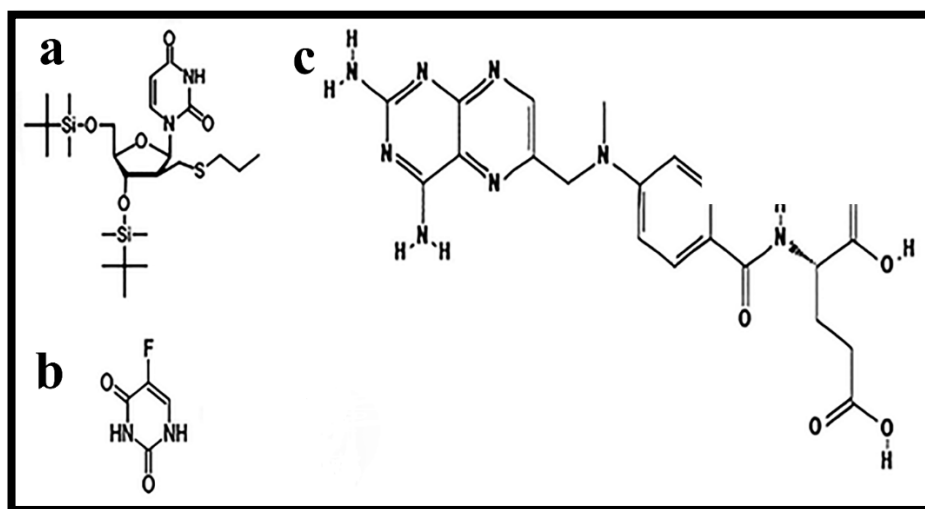
<sup>64</sup> Blanke et al., 2010

<sup>65</sup> Goshal et al., 1994

analógja, az F-dUMP a timidilát-szintáz gátlója<sup>66</sup>. Más fluorouracil -származékok is képesek beépülni az RNS -be és a DNS -be, amelyek erős élettani hatást fejtenek ki, és hasznos daganatellenes szerekként szolgálnak vastagbél-, végbél-, emlő-, gyomor-, hasnyálmirigy-, petefészek- és májrák ellen<sup>67</sup>.

MTX – metotrexát

A metotrexát (MTX) daganatellenes, antimetabolit, antifolát -szer, jelentős immunszuppresszív potenciállal jellemezhető (28. C ábra, Sigma-Aldrich Budapest). A gyógyszert széles körben használják leukémia, limfóma, pikkelysömör és reumatoid arthritis kezelésére. Az MTX egy tetrafolát-inhibitor, amely megakadályozza a tetrahidrofolát-dehidrogenáz enzimátikus aktivitását és megakadályozza a timidilát szintéziséhez szükséges tetrahidrofolát képződését<sup>68</sup>.



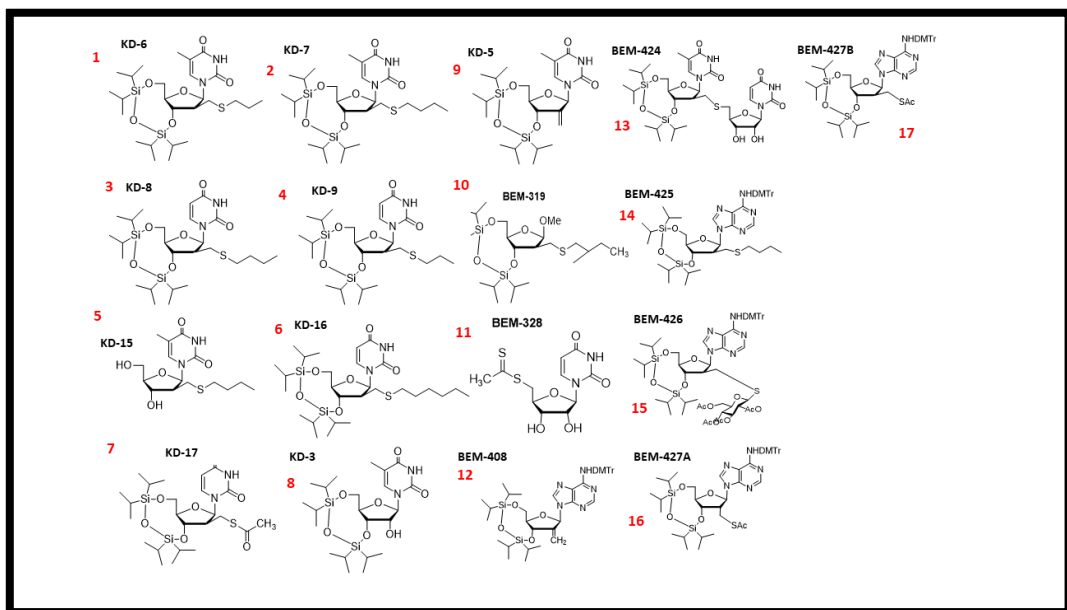
28. ábra a) N-153, b) 5-fluorouracil, c) metotrexát

<sup>66</sup> Liu et al., 1994

<sup>67</sup> Wecker, 2018

<sup>68</sup> NCBI, PubChem Database. Methotrexate

## Módosított nukleozid analógok



29. ábra Módosított nukleozid analógok képletei

A módosított nukleozid analógok képleteit az 29. ábra tartalmazza. Módosított nukleozid származékok, amelyek 3',5'-O- helyzetben szililénacetél védőcsoportot tartalmaznak, kivéve az 5., melyről eltávolították ezt a csoportot. A **1.**, **2.** és az **5.** ribotimidin, míg a **3.**, **4.**, **6.**, és a **7.** uridin származékok. 2'-helyzetben alkilszulfanilmetil csoportot tartalmaznak. Az **1.** és **4.** propil-, a **2.** és a **3.** pedig butil- míg a **6.** hexilcsoportot tartalmaz. A **7.** acetiltiocsoportot tartalmaz. Mindegyik származék *arabino* konfigurációjú, szemben a természetes nukleozidokkal, melyek *ribo* konfigurációjúak.

A **8.** az egy 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraizopropildisziloxán-1,3-diil)- $\beta$ -D-ribofuranozil-timin. Ribotimidin diszilénacetálozásával lett előállítva.

A **9.** az egy 2'-Dezoxi-2'-metilidén-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraizopropildisziloxán-1,3-diil)- $\beta$ -D-ribofuranozil-timin. Ribotimidin 2'-

exometilénszármazéka. A megfelelően védett ribotimidinből lett előállítva, jodoxibenzoésavas ketonná oxidálással, majd Wittig reakcióval.

A **10.** a **2.** és **3.** szerkezeti analógja, mely nukleobázis helyett metil-aglikont tartalmaz, tehát nem nukleozid, hanem béta-metil-ribozid származék.

A **11.** uridin 5'-dítioacetát származék. *In vivo* potenciálisan hasadhat tioecetsavra és 5'-tiouridinre.

A **12.** az egy 2'-Dezoxi-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraizopropildisziloxil)-N-dimetoxitritil-2'-metilén-adenozin. 3',5'-szililénacetállal és N-dimetoxitritil csoporttal védett adenzin 2'-exometilén. A védett adenzinszármazék jodoxibenzoésavval ketonná való oxidációját követő Wittig reakcióval került előállításra.

A **13.** az egy [2'-Dezoxi-2'-C-(5'-dezoziuridin-5'-il)-szulfanilmetil-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraizopropildisziloxán-1,3-diil)-β-D-arabinofuranozil]-timin. 2 nukleozidból (egy uridinből és egy ribotimidinből) áll, melyek szulfidkötésen keresztül kapcsolódnak. A ribotimidin egység 3',5'-szililénacetál formájában van jelen, míg az uridin 2',3'-hidroxilcsoportjai szabadok.

A **14.** az egy [2'-Dezoxi-6-N-dimetoxitritil-2'-C-n-butilszulfanilmetil-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraizopropildisziloxán-1,3-diil)-β-D-arabinofuranozil]-adenin. 3',5'-szililénacetállal és N-dimetoxitritil csoporttal védett arabino konfigurációjú 2'-dezozi-2'-C-butilszulfanilmetil-adenozin származék. A megfelelő exometilénből lett előállítva, butántiol addíciójával.

A **15.** az egy [2'-Dezoxi-6-N-dimetoxitritil-2'-C-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-glükóz-1-il)-szulfanilmetil-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraizopropildisziloxán-1,3-diil)-β-D-arabinofuranozil]-adenin. 3',5'-szililénacetállal és N-dimetoxitritil csoporttal védett arabino konfigurációjú adenzin származék. 2'-helyzetben glükóz-peracetát

szubsztituenst tartalmaz. A megfelelő exometilénből lett előállítva, 1-tioglükóz-peracetát. addíciójával.

A **16.** az egy [2'-Dezoxi-6-N-dimetoxitritil-2'-C-acetilszulfanilmetil-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraizopropildisziloxán-1,3-diil)-β-D-ribofuranozil]-adenin. 3',5'-szililénacetállal és N-dimetoxitritil csoporttal védett ribo konfigurációjú adenzinszármazék. 2'-helyzetben acetilszulfanilmetil-szubsztituenst hordoz. Tiolecetsav és a megfelelő adenzin-exometilén reakciójával lett előállítva. A reakcióban 3:1 arányban képződött az arabino és a ribo izomer.

A **17.** az egy [2'-Dezoxi-6-N-dimetoxitritil-2'-C-acetilszulfanilmetil-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraizopropildisziloxán-1,3-diil)-β-D-arabinofuranozil]-adenin. 3',5'-szililénacetállal és N-dimetoxitritil csoporttal védett arabino konfigurációjú adenzinszármazék. 2'-helyzetben acetilszulfanilmetil-szubsztituenst hordoz. Tiolecetsav és a megfelelő adenzin-exometilén reakciójával lett előállítva. A reakcióban 3:1 arányban képződött az arabino és a ribo izomer.

## Célkitűzések

---

Az értekezésem témája az MTT-teszt és a Time-lapse imaging videómikroszkópia kombinációjára irányul az egyes daganatos sejtvonalakra jellemző IC<sub>50</sub> koncentrációk vizsgálata mellett.

Bár az MTT-teszt széles körben használt és hasznos eszköz a sejtek életképességének és proliferációjának értékelésére emlős sejtvonalakban, fontos tisztában lenni a korlátokkal és az értelmezés lehetséges hibaforrásaival. Az MTT-teszt a sejtek általános metabolikus aktivitását méri, amely magában foglalja a proliferációs és a nem-proliferatív folyamatokat is. Ezért az MTT-teszt nem biztos, hogy elég specifikus ahhoz, hogy különbséget tegyen a különböző sejthalálmechanizmusok, például az apoptózis, a nekrozis és az autofágia között. Továbbá az MTT-teszt nem tud különbséget tenni az életképes és a nem életképes sejtek között, mivel mindkettő képes az MTT-t formazánná redukálni. Ezért az MTT-teszt nem biztos, hogy alkalmas olyan alkalmazásokhoz, amelyek az életképes sejtek specifikus kimutatását igénylik.

Az time-lapse képalkotást gyakran használják a sejtek növekedésének és osztódásának tanulmányozására. A sejtkultúra-vizsgálatok során például az time-lapse képalkotás használható a sejtek növekedésének valós idejű nyomon követésére, valamint a sejtciklus és a sejtosztódás során bekövetkező események megfigyelésére.

A videómikroszkópia segítségével a nukleozid analógokkal végzett kezelés során a sejtek életképességén kívül a következő információkat állapíthatjuk meg:

1. sejtméretet, illetve a változását
2. leánysejtekre vonatkozó osztódási időket (citokinézis)
3. a sejtciklus időtartamát
4. a sejthalál mértékét

5. a sejthalál típusát (ha megfigyelhető) (apoptózis, nekrosis).

**A metodika fejlesztése a következő lépéseket foglalja magába:**

**a) Protokoll kidolgozása**

Ismert kemoterápiászerek (MTX és 5-FU) és újonnan szintetizált nukleozid (N-153) analóg alkalmazásával a kidolgozott protokoll alkalmazhatóságának tesztelése és validálása. A kifejlesztett protokoll, kiterjesztése további újonnan szintetizált nukleozid analógokra.

**b) A nukleozid analógok citotoxicitási vizsgálata MTT-assay segítségével**

17 vegyület citotoxikológia vizsgálata tumoros és nem tumoros sejtvonalakon, különböző koncentrációkban.  $IC_{50}$  értékek meghatározása az egyes vegyületekre a spektrofotometriás detektálást követően.

**c) A legjobb nukleozid analóg Time-Lapse Imaging videómikroszkópos vizsgálata**

Az MTT tesztek alapján a legjobb  $IC_{50}$  értékkel jellemezhető vegyület(ek) kiválasztása, amelyeknél kellően nagy volt a különbség a tumoros és nem tumoros sejtekre jellemző értékeket összehasonlítva. Ezt követően a TLS vizsgálatok a sejtméretbéli, osztódási időbéli és generációs időbéli változásokra vonatkozóan az adott vegyületben. A vegyület(ek) apoptózis/nekrosis indukáló hatásainak megfigyelése és leírása. Az alkalmazott rendszer legnagyobb előnye, hogy valós időben, folyamatosan nyomon követhettük az adott sejtpopuláció viselkedését.

#### **d) Eredmények kiértékelése:**

Az MTT-assay elvégzését követően kapott eredményeket a GraphPad segítségével értékeljük ki. A TLS rendszerrel készített felvételeket a Fiji / ImageJ nevű szoftver segítségével elemezzük.

Az MTT teszt a citotoxikus ágens gátlásának mértékével kapcsolatos információkat szolgáltat, függetlenül attól, hogy a sejtek életben maradnak vagy elpusztulnak. Az MTT teszt time-lapse videómikroszkóppal történő kiegészítése értékes vizuális információkat ad, és lehetővé teszi a felvételek kvantitatív kiértékelését is. A TLS hosszabb ideig, akár több hétig is fenntartható, és kiszélesíti a citotoxikológiai vizsgálatok horizontját. Ez a kombinációs elemzés kiterjeszhető többek között az antimetabolikus, gombaellenes és rákellenes szerek citotoxicitási profiljának a feltérképezésére, mely hatékony és gyors szelektálást biztosít.

Az általam kifejlesztett új vizsgálati módszer segítségével az életképességi teszt eredményeképpen kapott végponti mérések eredményéről a time-lapse videómikroszkóppal készült felvételekkel bővebb információt kaphatunk arról, hogy milyen celluláris események okozzák a mérési eredményeket. Az új módszer alkalmazásával tehát pontosabban és gyorsabban értékelhetők ki a lehetséges gyógyszerjelöltek. A molekuláris folyamatok mélyebb megismerésével szélesebb spektrumban írható le a mellékhatásprofil, illetve feltárható az egyes gyógyszerjelöltek adott sejtekre vonatkozó érzékenysége. Ezáltal specifikálni tudjuk a további kutatások irányát, jelentősen csökkentve a kutatási időt és a kutatási összeget.

# Eredmények

---

## 1. A kidolgozott módszer beállítása és validálása

### 1.1. MTT-teszt

Amikor egy új vegyület sejtekre gyakorolt hatását vizsgáljuk, a koncentrációs viszony kritikus tényező, amelyet figyelembe kell venni. Az MTT-teszt egy gyakori módszer, amelyet egy vegyület sejtek életképességére vagy proliferációjára gyakorolt hatásának értékelésére használnak. A vizsgálat azt méri, hogy a sejtek mennyire képesek egy sárga tetrazoliumsót lila formazantermékké redukálni, amely spektrofotometriásan számszerűsíthető.

Ahhoz, hogy az MTT-tesztet egy új vegyület sejtekre gyakorolt hatásának értékelésére használjuk, a vegyület különböző koncentrációit adhatjuk a tenyészetben lévő sejtekhez, és a sejteket egy meghatározott ideig inkubálhatjuk. Az inkubációs idő után elvégezhető az MTT-teszt, és mérhető a formazantermék abszorbanciája. Ez információt szolgáltat a vegyületnek a sejtek életképességére vagy proliferációjára gyakorolt hatásáról.

A vegyületet különböző koncentrációkban vizsgálva meghatározható az a koncentráció, amelynél a vegyület a legnagyobb hatást gyakorolja a sejtekre. Ezt a koncentrációt  $IC_{50}$ -nek (félmaximális gátló koncentráció) nevezik, és a vegyület hatásosságának mérésére használják.

Ha a vegyületet potenciális rákellenes szerként fejlesztik, az MTT-teszt vagy egy hasonló sejtéletképességi teszt megfelelő lehet a vegyület tumoros sejtekre gyakorolt hatásának értékelésére. Az  $IC_{50}$  ebben az esetben a vegyület azon koncentrációja, amely 50%-kal csökkenti a daganatos sejtek életképességét.

Az újonnan szintetizált nukleozid-analógnak a normál és a tumoros sejtvonalakra gyakorolt hatása közötti koncentrációs összefüggés értelmezése a kísérlet konkrét eredményeitől függ.

Általánosságban elmondható, hogy az MTT-vizsgálatból vagy hasonló sejtletképeségi vizsgálatból előállított dózis-válaszgörbe információt adhat a vegyület citotoxicitásáról és szelektivitásáról. A citotoxicitás a vegyület azon képességére utal, hogy a normál és a daganatos sejtek életképességét egyaránt csökkenti, míg a szelektivitás a vegyület azon képességére utal, hogy a tumoros sejteket előnyben részesíti a normál sejtekkel szemben.

Ha a dózis-válasz görbe hasonló koncentráció-válasz összefüggést mutat mind a normál, mind a tumoros sejtek esetében, ez arra utal, hogy a nukleozid analóg hasonló citotoxicitással rendelkezik mindkét sejtípussal szemben. Ebben az esetben a vegyület nem biztos, hogy jó jelölt a további fejlesztésre, mivel elfogadhatatlan mellékhatásai lehetnek a normál sejtekre.

Másrészt, ha a dózis-válasz görbe meredekebb koncentráció-válasz összefüggést mutat a tumoros sejtekben, mint a normál sejtekben, ez arra utal, hogy a nukleozid-analóg szelektívebb ezen sejtekkel szemben. Ebben az esetben a vegyületben potenciális lehetőség rejlik a daganatterápiás szerek továbbfejlesztésére, mivel kevesebb mellékhatása lehet a normál sejtekre.

A dózis-válasz görbén kívül további kísérletekre is szükség lehet a nukleozid-analóg hatásmechanizmusának és szelektivitásának, valamint a célponton kívüli hatások és farmakokinetikai tulajdonságok teljes megértéséhez. Összességében egy újonnan szintetizált nukleozid-analóg normál és daganatos sejtvonalakra kifejtett hatása közötti koncentrációs összefüggés értelmezése a kísérleti eredmények gondos elemzését és több tényező figyelembevételét igényli.

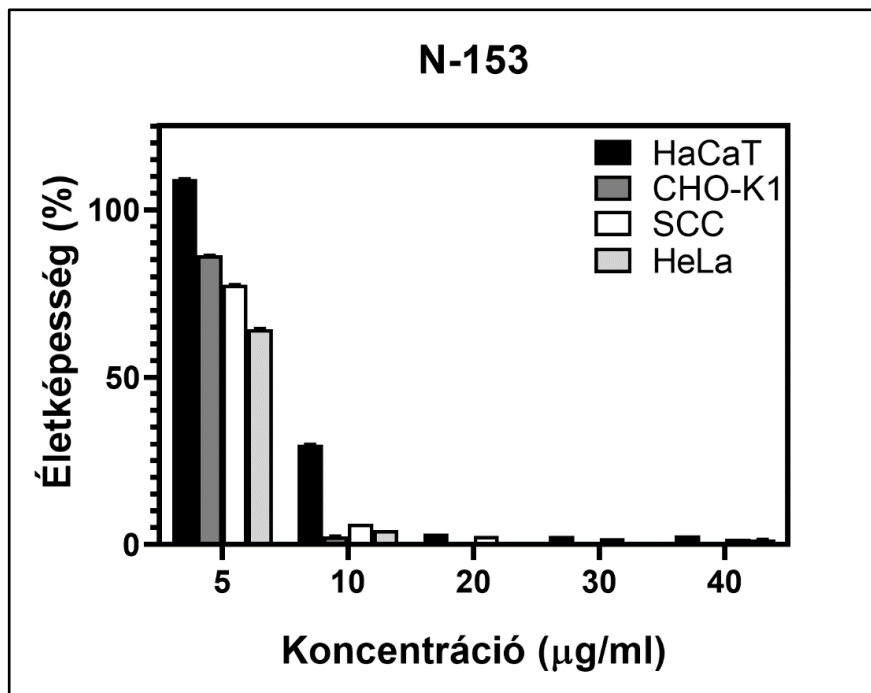
A következő nukleozid analóg koncentrációkat vizsgáltuk: 5, 10, 20, 30 és 40  $\mu\text{g/ml}$ . Az  $\text{IC}_{50}$  értékeket az 1. táblázatban megadott egyenletek segítségével

határoztuk meg. Az N-153 gátló koncentrációját minden sejtvonal esetében meghatároztuk (1. táblázat). Ezek az adatok jelentős különbséget mutattak a nem tumoros HaCaT és a tumoros SCC sejtvonalak között, míg a CHO-K1 és HeLa sejtek gátló koncentrációi gyakorlatilag azonosak voltak (30. ábra).

Megvizsgáltuk az N-153 nukleozid analóg hatását különböző sejtvonalakra, köztük normál és tumoros sejtvonalakra vonatkoztatva. Sejtéletképességi vizsgálatot alkalmaztunk a nukleozid analóg gátló koncentrációjának (IC<sub>50</sub>) meghatározására az egyes sejtvonalak esetében. Összességében a kísérlet eredményei azt mutatták, hogy a vizsgált nukleozid analóg hatékonyan csökkentette a tumoros sejtek életképességét, és a sejtvonalak típusa szerepet játszik a hatékonyságban.

N-153	Fél-logaritmikus egyenlet	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
HaCaT	$50=239.1-193.2*\log(x)$	0.9551	9.52
SCC	$50=126.5-105*\log(x)$	0.7509	5.35
CHO-K1	$50=149.5-124.2*\log(x)$	0.8302	6.32
HeLa	$50=147.7-123.1*\log(x)$	0.8170	6.21

1. Táblázat Az N-153-as vegyületre jellemző IC<sub>50</sub> koncentrációk

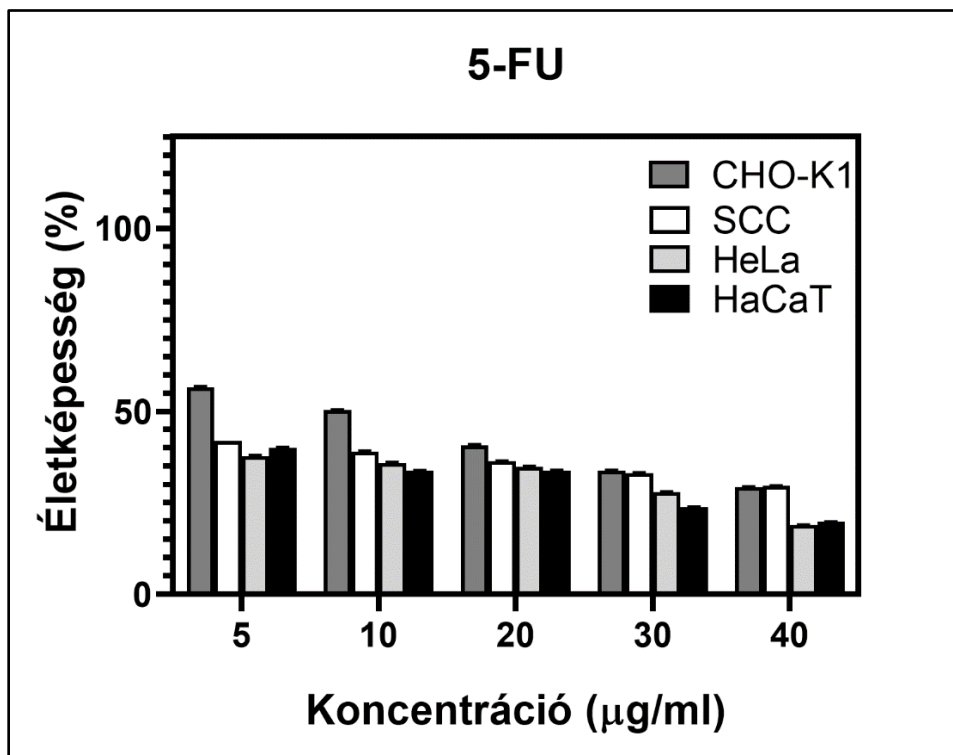


30. ábra Az N-153 MTT életképességi vizsgálata különböző sejtvonalakon.

Az életképességet az N-153 nukleozid analóg 5, 10, 20, 30 és 40 µg/ml koncentrációban vizsgáltuk. A kezelés 48 órán át tartott.

Vizsgáltuk az 5-FU nukleozid analóg hatását a sejtek életképességére 5, 10, 20, 30 és 40 µg/ml koncentrációban. A kezelés 48 órán keresztül tartott. A CHO-K1 kivételével az összes többi sejtkultúra életképessége 50% alá csökkent az 5 µg/ml 5-FU kezelés hatására (31. ábra). Az  $IC_{50}$  értékeket a 2. táblázatban szereplő egyenletek segítségével határoztuk meg.

Az eredmények azt mutatták, hogy az 5-FU nukleozid analóg gátló hatást gyakorolt mind a normál (HaCaT), mind a tumoros (SCC és HeLa) sejtvonalak életképességére. A CHO-K1 sejtvonalat kevésbé befolyásolta a kezelés.



31. ábra Az 5-FU MTT életképességi vizsgálata különböző sejtvonalakon.

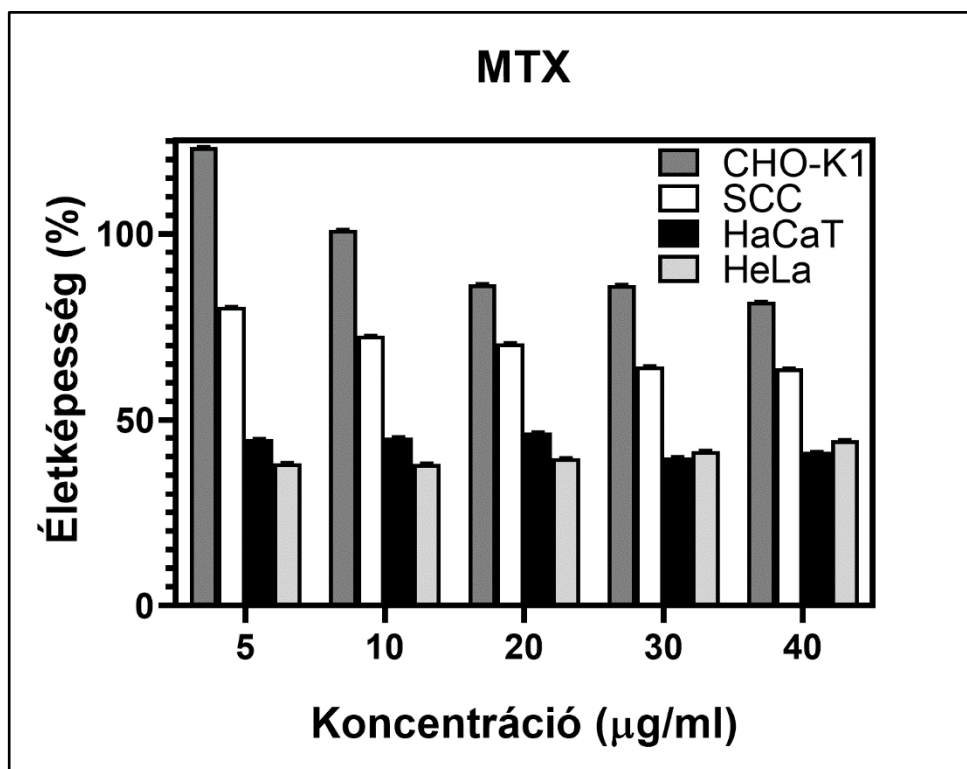
Az életképességet az 5-FU nukleozid analóg 5, 10, 20, 30 és 40 µg/ml koncentrációban vizsgáltuk. A kezelés 48 órán át tartott. A CHO-K1 kivételével a többi sejtkultúra életképessége 50% alá csökkent 5 µg/ml 5-FU-val történő kezelés hatására.

5-FU	Fél-logaritmikus egyenlet	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
HaCaT	50=91.47-36.45*log(x)	0.8767	13.73
SCC	50=43.66-10.90*log(x)	0.9041	0.26
CHO-K1	50=80.60-30.57*log(x)	0.9781	10.02
HeLa	50=56.34-17.13*log(x)	0.8144	2.34

2. Táblázat Az 5-FU IC<sub>50</sub> koncentrációi különböző sejtvonalak esetében

Az MTX hatására a HaCaT és HeLa sejtek életképessége már a legalacsonyabb MTX-koncentráció esetén is 50% alatt volt. Ezzel szemben a CHO-K1 és SCC sejtek életképessége a legmagasabb inhibitor-koncentráció esetén is meghaladta az 50%-ot (32. ábra). Az IC50 értékeket a korábban használt egyenletekkel számoltuk ki (3. táblázat).

Az eredmények azt mutatták, hogy az MTX kezelésre a nem tumoros HaCaT és a tumoros HeLa sejtek érzékenyebbek voltak, mint a tumoros CHO-K1 és SCC sejtek. Még a legalacsonyabb MTX-koncentráció mellett is a HaCaT és HeLa sejtek életképessége 50% alá csökkent, míg a CHO-K1 és SCC sejtek életképessége még a legmagasabb inhibitor-koncentráció mellett is 50% felett maradt.



32. ábra Az MTX MTT életképességi vizsgálata különböző sejtvonalakon.

Az életképességet 5, 10, 20, 30 és 40 µg/ml MTX-koncentrációval történő kezelés után vizsgálták. A kezelés 48 órán át tartott.

MTX	Fél-logaritmikus egyenlet	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
HaCaT	$50=52.20-7.08*\log(x)$	0.8455	2.04
SCC	$50=92.32-18.09*\log(x)$	0.9568	218.48
CHO-K1	$50=150.1-44.7*\log(x)$	0.9277	173.53
HeLa	$50=49.10-7.094*\log(x)$	0.9801	0.75

3. Táblázat Az MTX IC<sub>50</sub> koncentrációi különböző sejtvonalakban

Megvizsgáltuk az N-153 nukleozid analóg hatását különböző sejtvonalak esetében, köztük normál és tumoros sejtvonalakra vonatkoztatva. Sejtéletképességi vizsgálatot alkalmaztunk a nukleozid analóg gátló koncentrációjának (IC<sub>50</sub>) meghatározására az egyes sejtvonalak esetében. Megállapítottuk, hogy az IC<sub>50</sub> értékek a normál és a tumoros sejtvonalak között eltérőek. Vizsgáltuk egy másik nukleozid analóg, az 5-FU hatását is a sejtek életképességével kapcsolatban, és azt találtuk, hogy a CHO-K1 kivételével minden sejtvonalban 50% alá csökkentette az túlélési arányt. Végül az MTX sejtéletképességre gyakorolt hatását figyeltük meg, és azt találtuk, hogy a HaCaT és HeLa sejtvonalakban még a legalacsonyabb vizsgált koncentrációban is 50% alá csökkentette az életképességet, míg a CHO-K1 és az SCC sejtvonalak esetében nem. Összességében az eredmények arra utaltak, hogy a nukleozid analóg és más kemoterápiás szerek eltérő hatással vannak a különböző sejtvonalakra, a különböző daganattípusok összefüggésében szükséges a hatékonyságuk és toxicitásuk gondos értékelése. Azonban a kísérlet eredményei azt is mutatták, hogy a vizsgált, újonnan szintetizált nukleozid analóg hatékonyan csökkentette a tumoros sejtek életképességét.

Az MTT-tesztel meghatározott nukleozid-analógok IC<sub>50</sub> értékei (1., 2. és 3. táblázat) a sejtfolyamatok követésére szolgáltak time-lapse videomikroszkópia segítségével. Azt kellett eldönteni, hogy a sejtfolyamat a sejtciklus átmeneti megszakadása révén a sejtek életképességének drasztikus csökkenését eredményezte-e, vagy sejthalál (apoptózis vagy nekrozis) következett be. Ezekre a kérdésekre az MTT-teszt önmagában nem tudott egyértelmű választ adni. Minden egyes sejttípust a nukleozid analógnak megfelelő IC<sub>50</sub> koncentráción tenyésztettünk.

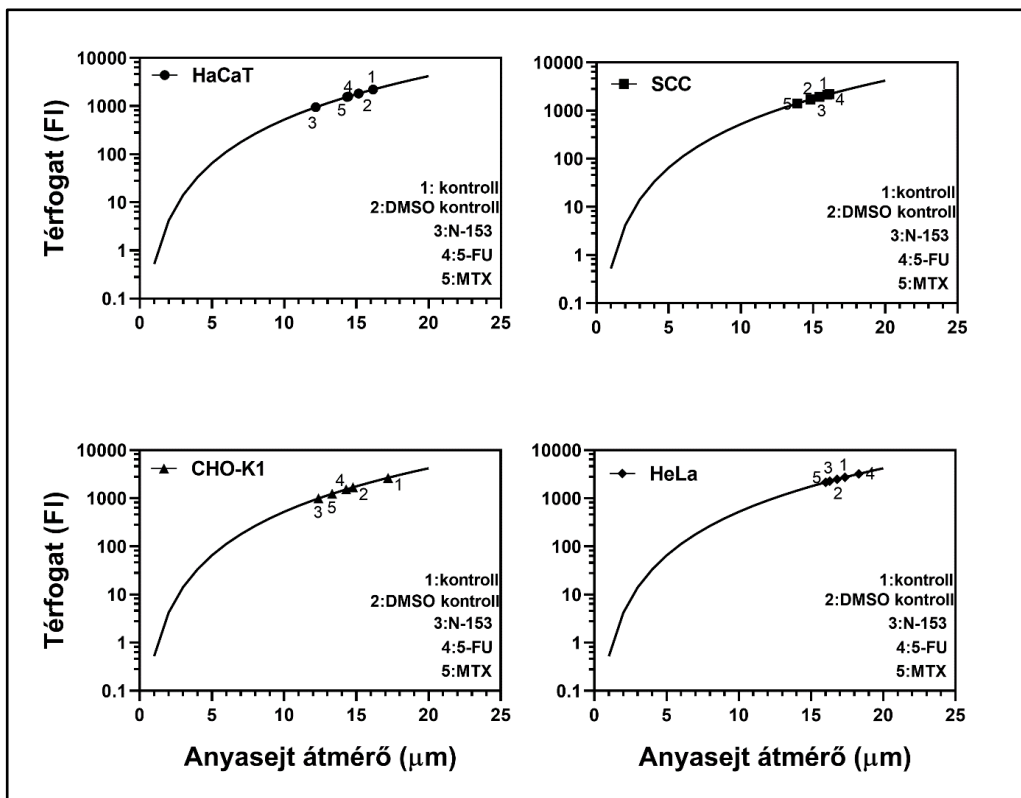
## 1.2. A hosszú távú megfigyelés kvantifikálása

### 1.2.1. Az anyasejtek méretének változása

Az anyasejtek méretét az átmérő és a térfogat közötti összefüggés alapján határoztuk meg.<sup>69</sup> A standard görbe a TLS segítségével kapott, majd mért átmérők és az átmérőkhöz tartozó számított térfogatok adatait tartalmazza. Megmutattuk, hogy az átmérő-térfogat értékek hogyan változtak a sejtvonalakban a DMSO-kontrollhoz viszonyított kezelés hatására (33. ábra).

---

<sup>69</sup> Schwartz et al., 1983



33. ábra A sejtméret és a sejttérfogat változásai.

A sejtméretet és a sejttérfogatot a kontrollhoz viszonyítva mértük, miután N-153, 5-FU és MTX  $IC_{50}$ -es értéken kezeltük (A) HaCaT, (B) SCC, (C) CHO-K1 és (D) HeLa sejteket.

A sejteket 1% DMSO-t tartalmazó tápfolyadékban növesztettük az N-153 nukleozid analógra jellemző  $IC_{50}$  koncentrációi mellett, és a sejtek változását követtük nyomon, majd az eredményeket %-ban határoztuk meg. Az eredményeket a DMSO-kontrollhoz (100%) viszonyított százalékos különbségként adtuk meg a kezelés után.  $N=30$ . A paraméterek jellemző adatait az  $n=30$  minta átlagértékei adták meg (4. táblázat). A sejtek méretének változása citotoxicitást tükrözhetett. Az értékek százalékban lettek megadva a DMSO-kontrollhoz viszonyítva. A HaCaT sejtek mérete 19,71%-kal, a CHO-K1 sejteké 16,20%-kal, a HeLa sejteké pedig 3,01%-kal csökkent az N-153  $IC_{50}$  koncentrációjával történő kezelés hatására.

Másrészt az SCC sejtek mérete a kezelés után 4,18%-kal nőtt. Az 5-FU-val történő kezelés után a HaCaT sejtek mérete 22%-kal, a CHO-K1 sejteké 5,62%-kal, a HeLa sejteké 6,17%-kal és az SCC sejteké 1,71%-kal csökkent. Csak a HaCaT sejt méret okozta változás tekinthető szignifikánsnak. A sejt méret változásokat százalékban adtuk meg, mint kezelt - 5FU/ DMSO kontroll (100%). A mérések száma: HaCaT n=18, SCC n=2, HeLa n=12. A kezelés hatására a HaCaT anyasejt 5,83%-kal, a CHO-K1 2,45%-kal csökkent, az SCC sejteknél nem változott, a HeLa sejteknél pedig 7,3%-kal nőtt. A sejtek változásai százalékban lettek megadva, mint a kezelt - MTX/DMSO kontroll (100%). HaCaT n=20, SCC n=20, HeLa n=12.

Anyasejt méret ( $\mu\text{m}$ ) változás %-ban kifejezve	N-153	5-FU	MTX
HaCaT	-9.57 $\pm$ 1.44	22.06 $\pm$ 0.66	5.83 $\pm$ 0.61
SCC	4.18 $\pm$ 0.88	-1.71 $\pm$ 0	0.27 $\pm$ 1.45
CHO-K1	-16.20 $\pm$ 1.14	5.67 $\pm$ 1.01	-2.45 $\pm$ 6.27
HeLa	-3.01 $\pm$ 0.50	6.17 $\pm$ 0.57	7.29 $\pm$ 1.63

#### 4. Táblázat Az anyasejtek méretének százalékos változása IC<sub>50</sub> koncentráció hatására

Összefoglalva, e kísérletek eredményei arra utaltak, hogy a különböző sejtvonalak érzékenysége a tumorellenes gyógyszerekkel szemben nagymértékben eltért. Az N-153 nukleozid analóg és az MTX jelentős citotoxikus hatást gyakorolt a HaCaT és HeLa sejtekre, míg a CHO-K1 és SCC sejtekre kevésbé volt hatással. Másrészt az 5-FU jelentős hatással volt a HaCaT, CHO-K1 és HeLa sejtekre, de sokkal kisebb hatással volt az SCC sejtekre. A sejt méret változása az említett

gyógyszerekkel történő kezelést követően szintén eltérő volt a különböző sejtvonalak között. Összességében ezek az eredmények rávilágítottak annak fontosságára, hogy megértsük a különböző sejtvonalak eltérő érzékenységét, mindezt a daganatellenes gyógyszerekkel történő hatékony kezelések kifejlesztésének érdekében.

A sejtméretben bekövetkező változások a citotoxicitás fontos mutatói lehetnek, mivel tükrözik a sejtnövekedés, a proliferáció és az általános egészségi állapot változásait. Bizonyos esetekben a sejtméret csökkenése jelezheti, hogy a sejtek apoptózis vagy programozott sejthalál alatt állnak, ami a citotoxicitás jele lehet. Emellett a sejtméret változása azt is jelezheti, hogy a sejtek stressznek vagy károsodásnak vannak kitéve, ami végső soron a sejtek elhalásához vezethet. Ezért a sejtméretben bekövetkező változások nyomon követése fontos információkat szolgáltat egy adott kezelés vagy vegyület sejtekre gyakorolt potenciális citotoxikus hatásairól.

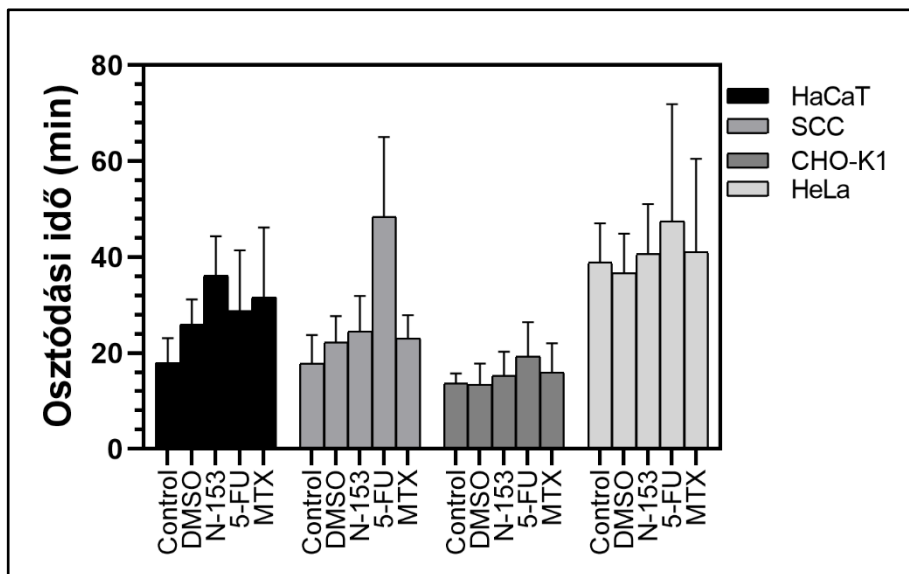
### 1.2.2. A sejtosztódás ideje

A sejteket 1% DMSO-t tartalmazó tápfolyadékban növesztettük a megfelelő  $IC_{50}$  gátló koncentrációjú inhibitorok mellett. A sejtosztódás változásait követtük nyomon és %-ban adtuk meg (5. táblázat). Az eredmények a kezelés utáni százalékos különbségek a DMSO-kontrollhoz (100%) viszonyítva ( $N=30$ ). A paraméterek jellemző adatait az  $n=30$  minta átlagértékei adták.

Sejtosztódás (min) kontrollal összehasonlítva %-ban kifejezve	N-153	5-FU	MTX
HaCaT	39.24±8.26	23.11±12.65	8.24±14.52
SCC	10.20±7.44	100.44±16.56	0.73±4.87
CHO-K1	13.65±4.92	5.65±7.12	9.76±5.98
HeLa	10.71±10.37	58.97±24.45	25.40±19.50

5. Táblázat A sejtosztódási idő változása antimetabolitok IC<sub>50</sub> koncentrációi jelenlétében

A sejtosztódás ideje az egyes sejtípusokban különböző mértékben nőtt az N-153-mal történő kezelés hatására (34. ábra, 5. táblázat). A sejtosztódási idő 39,24%-kal nőtt a HaCaT sejtekben és csak 10%-kal az SCC sejtekben. Ez azt tükrözte, hogy a nem tumoros HaCaT sejtek érzékenyebbek voltak az N-153-mal szemben, mint a tumoros SCC sejtek. A többi sejtvonalon a sejtosztódás növekedését mutatta, a CHO-K1 13,65% és a HeLa 11%-kal, hasonlóan a tumoros SCC sejtekhez.



34. ábra A sejtosztódás ideje (perc).

Az ábra azt mutatja, hogyan változik a sejtosztódás ideje 48 órás inhibitoros kezelés után a DMSO-kontrollhoz képest.

Az N-153-hoz hasonlóan az 5-FU is különböző mértékben befolyásolta a sejtosztódás idejét. Szignifikáns növekedést tapasztaltunk a HaCaT (23,11%), az SCC (100,44%) és a HeLa (58,97%) esetében. A sejtszintű változásokat százalékban adtuk meg, mint kezelt - 5FU/DMSO kontroll (100 %). HaCaT n=18, SCC n=2, HeLa n=12.

A sejtosztódás ideje hosszabb volt a HaCaT sejteknél (+8,24%), a CHO-K1 (+9,8%) és a HeLa sejteknél (+25,4%), de változatlan maradt az SCC sejtek esetében az MTX-szel történő kezelés hatására. A sejtváltozásokat százalékban adtuk meg, mint kezelt - MTX/ DMSO kontroll (100%). HaCaT n=20, SCC n=20, HeLa n=10.

Az eredmények azt mutatták, hogy a sejtosztódási idő különböző mértékben nőtt a különböző sejtvonalakban az N-153, 5-FU és metotrexát kezelés hatására. A nem daganatos HaCaT sejtek érzékenyebbnek bizonyultak az N-153-ra, mint a daganatos SCC sejtek, amit a sejtosztódási idő 39,24%-os növekedése bizonyított a

HaCaT sejteknél, míg az SCC sejteknél csak 10%-os növekedés volt tapasztalható. A többi sejtvonal a sejtosztódás növekedését mutatta, hasonlóan a tumoros SCC sejtekhez.

Az 5-FU kezelés a HaCaT, SCC és HeLa sejtekben a sejtosztódási idő jelentős növekedését mutatta. A metotrexát kezelés szintén növelte a sejtosztódási időt a HaCaT, CHO-K1 és HeLa sejtekben, de nem volt hatása az SCC sejtekre. Ezek az eredmények arra utaltak, hogy a különböző sejttípusok eltérő választ mutattak a különböző gátlókra, ami hatással lehetett a tumorok kezelésére.

A sejtosztódás időtartama, - vagyis az az idő, amely alatt a sejtek befejeznek egy osztódási ciklust-, a citotoxicitás fontos mutatója, mivel információt adhat arról, hogy egy adott kezelés mennyire hatékonyan gátolja vagy lassítja a sejtnövekedést. A sejtosztódási idő változásai jelezhetik a különböző sejttípusok érzékenységének szintjét egy adott kezeléssel szemben, ami segíthet annak meghatározásában, hogy mely kezelések lehetnek hatékonyabbak a különböző daganattípusok kezelésében.

Ezen túlmenően a sejtosztódási idő változásai információt szolgáltathatnak egy adott kezelés hatásmechanizmusáról is. Például, ha egy kezelés a sejtosztódási idő jelentős növekedését okozza, az arra utalhat, hogy a kezelés megzavarja a sejtosztódáshoz szükséges fontos sejtfolyamatokat. Ez segíthet a kutatóknak jobban megérteni a különböző kezelések hatásmechanizmusát, ami végső soron hatékonyabb és célzottabb terápiák kifejlesztéséhez vezethet.

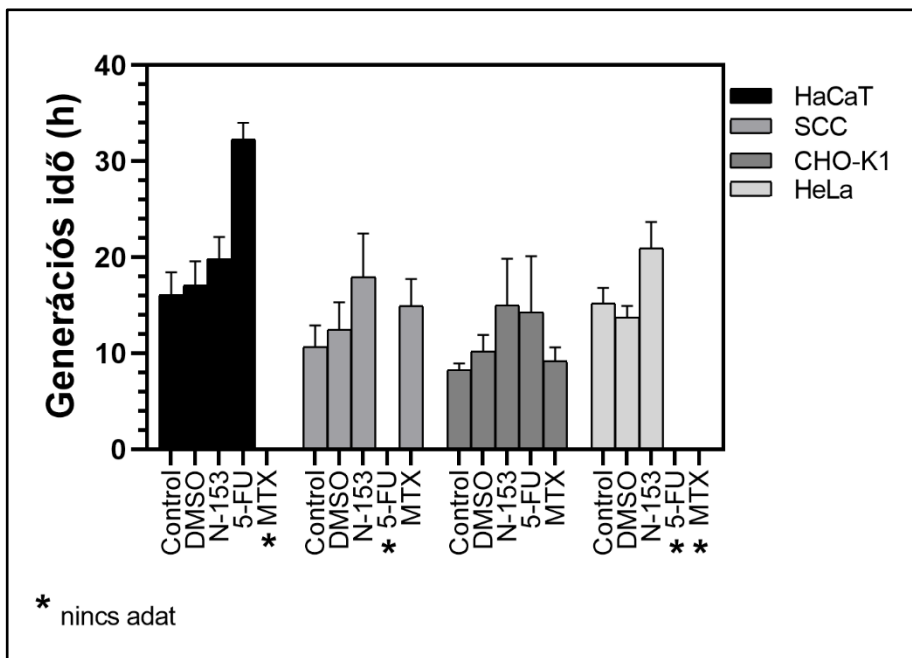
### 1.2.3. Generációs idő

A 6. táblázat a sejtciklus időtartamának változását tartalmazza kezelést követően. A sejteket 1% DMSO-t tartalmazó tápfolyadékban tenyésztettük az N-153 nukleozid analógra jellemző  $IC_{50}$  koncentrációi mellett, végül a sejtek változását követtük nyomon és %-ban adtuk meg. Az eredményeket a DMSO-kontrollhoz (100%) viszonyított százalékos különbséggként adtuk meg a kezelés után. A

paraméterek jellemző adatait n=30 minta átlagértékei adják meg. n.m.=nem mérhető. A sejtciklus időtartamának változása is jelzi a citotoxicitást. A sejtosztódási idővel ellentétben a HaCaT sejtek generációs ideje csak kisebb mértékben nőtt az N-153 kezelést követően, míg a többi sejtvonalon jelentős növekedés volt megfigyelhető (35. ábra). A HaCaT sejtekben a sejtciklus növekedése 15,83%, az SCC-ben 43,68% volt. A HeLa sejtekben a generációs idő közel 50%-kal tartott tovább, mint a kontroll sejtekben.

Generációs idő (h) változás %-ban kifejezve	N-153	5-FU	MTX
HaCaT	15.83±2.28	97.30±-1.68	n.m.
SCC	43.68±4.55	n.m.	38.46±2.75
CHO-K1	48.03±4.78	55.81±5.84	1.41±1.40
HeLa	52.14±2.70	n.m.	n.m.

6. Táblázat A sejtciklus időtartamának változása az N-153 IC<sub>50</sub> koncentrációjú kezelését követően



35. ábra A sejtciklus időtartama (h).

A 48 órás kezelést követő változásokat a DMSO-kontrollhoz viszonyított  $IC_{50}$ -es értéken adjuk meg. A fekete pontok a hiányzó adatokat jelzik, amelyeket nem lehetett 48 órán belül mérni.

A tumoros sejtvonalak generációs idejét 5-FU kezelés hatására nem lehetett meghatározni. A nem tumoros HaCaT sejtek sejtciklusának hossza szintén jelentősen megnövekedett, majdnem megduplázódott (97,3%), míg a CHO-K1 sejtciklusa 55,81%-kal nőtt 5-FU kezelést követően. A sejt szintű változásokat százalékban adjuk meg, mint kezelt - 5FU/ DMSO kontroll (100%). HaCaT  $n=4$ , SCC  $n=0$ , HeLa  $n=0$ . A HaCaT sejtek generációs idejének változása nem volt mérhető, mivel a leánysejtek nem növekedtek. A felvételek azt mutatják, hogy a sejtek nem osztódtak, és azok a sejtek, amelyek osztódtak, azonnal nekrotikus sejthalállal pusztultak el. Az SCC sejteknél a sejtnövekedés aránya közel 40% volt a kontrollhoz képest. Ez a növekedés az MTX citosztikus hatásával magyarázható. A CHO-K1 sejtek generációs ideje nem változott, míg a HeLa sejtek generációs ideje MTX kezelés

hatására nem volt meghatározható, mivel ezek a sejtek elvesztették a mátrixhoz való kapcsolódási képességüket és nem tudtak osztódni, vagy az osztódó sejtek nekrotikus sejthalált szenvedtek. A sejtek változásai százalékban lettek megadva, mint kezelt - MTX/ DMSO kontroll (100%). HaCaT n=0, SCC n=15, HeLa n=0.

Hasonló kísérleteket végeztek mások is metotrexáttal (MTX) kezelt keratinocitákon. MTX-kezelést követően megnövekedett sejtméretet figyeltek meg.<sup>70</sup> Azt tapasztalják továbbá, hogy a proliferációs időt a vese tubuláris sejtszövetekben is meghosszabbította az MTX.<sup>71</sup> Humán leukémiasejtekben az MTX kiegyensúlyozatlan sejtnövekedést okozott.<sup>72</sup> A vastagbél- és emlődagatok MTX-szel és 5-FU-val történő kombinált kezelése során klonális szinergista gátlást figyeltek meg.

A sejtosztódás időtartamának változása jelzi a citotoxicitást, amint azt egy olyan vizsgálat is kimutatta, amelyben különböző sejtvonalak generációs idejét mérték kemoterápiás szerekkel való kezelést követően. A HaCaT sejtvonalnál a többi sejtvonalhoz képest kisebb mértékű növekedést mutatott a generációs idő, míg a tumoros sejtvonalaknál jelentős növekedést tapasztaltak. A generációs idő százalékos növekedését jelentette, hogy a HaCaT és a CHO-K1 sejtek jelentős növekedését figyelhették meg 5-FU kezelés után, míg a tumorsejtvonalak kis változást mutattak. A vizsgálat azt is megállapította, hogy egyes sejtek nem osztódtak és nekrotikus sejthalálon mentek keresztül a kezelés után. Összességében a generációs idő változása a citotoxicitás indikátoraként használható.

Röviden, a sejtciklus időtartamának változása jelezheti a citotoxicitást, és számos tanulmány kimutatta, hogy a citotoxikus szerekkel, például 5-FU-val és MTX-szel végzett kezelés növelheti a sejtciklus időtartamát és kiegyensúlyozatlan sejtnövekedést okozhat különböző sejtípusokban, beleértve a keratinocitákat, a

---

<sup>70</sup> Schwartz et al., 1992

<sup>71</sup> Grönroos et al., 2006

<sup>72</sup> Taylor et al., 1985; Benz et al., 1980

vesetubuláris sejteket, a leukémiás sejteket, valamint a vastagbél- és emlőrákos sejteket. Ezek a változások a kontroll sejtciklus időtartamához képest százalékos növekedésként mérhetők.

A sejtciklus időtartamának változása jelezheti egy adott vegyület vagy kezelés sejtekre gyakorolt citotoxikus hatását. A citotoxicitás egy vegyület sejthalált okozó képességére utal, és felhasználható egy kezelés hatékonyságának vagy egy vegyi anyag toxicitásának értékelésére.

Amikor a sejtek citotoxikus vegyületeknek vannak kitéve, a sejtciklusuk megszakadhat, ami a ciklus különböző fázisainak időtartamában bekövetkező változást eredményez. Egyes vegyületek például sejtciklus-megállást idézhetnek elő, amelyben a sejtek megállnak a sejtciklus egy adott fázisában. Más vegyületek a sejteket apoptózisba, a programozott sejthalál egy fajtájába taszíthatják, ami szintén megváltoztathatja a sejtciklus időtartamát.

A sejtciklus időtartamában bekövetkező változások mérésével a kutatók értékelni tudják a különböző vegyületek és kezelések különböző sejtvonalakra gyakorolt citotoxikus hatásait, és meg tudják határozni, hogy melyek a leghatékonyabbak a sejthalál kiváltásában.

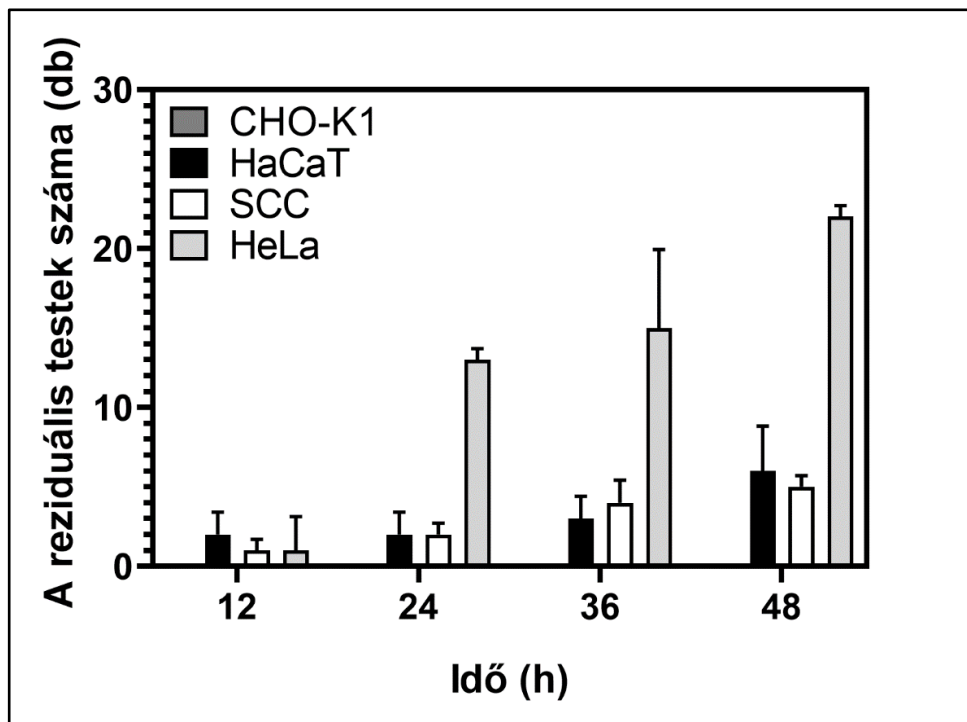
A tumorkutatásban a generációs idő változásai felhasználhatók a kemoterápia vagy más daganatterápiák hatékonyságának értékelésére, valamint a gyógyszerek különböző típusú tumoros sejtekre gyakorolt citotoxicitásának felmérésére.

A farmakológiában a generációs idő változásai segíthetnek meghatározni a különböző betegségek gyógyszeres kezelésének optimális dóziséját és időtartamát.

#### 1.2.4. A sejthalál során keletkező reziduális testek

A sejthalál során keletkező maradványtestek két típusúak: apoptotikus testek és nekrotikus testek. Fontos megjegyezni, hogy ezek nem azonosak az exocitózissal kiválasztott maradványtestekkel, amelyek makrofágokban fordulnak elő, vagy a

lipofuszcín granulákkal, amelyek a citoszolban hosszú ideig megmaradnak. Az említett körülmények mellett az apoptotikus és nekrotikus sejtek, valamint maradványtestjeik azonosíthatók és mennyiségeiket TLS segítségével számszerűsíthetjük. Az 5-FU és az MTX kezelés során nem észleltünk apoptózist, viszont a képeken láthatók voltak nekrotikus sejtek és a nekrotikus testek. A HaCaT és SCC sejtenyészetekben kevés maradványtest volt jelen, míg a CHO-K1 kultúrában nem voltak jelen, viszont a HeLa tenyészetekben nagy mennyiségben képződtek az N-153 nukleozid analóg kezelése során (36. ábra). A legtöbb nekrotikus test a HaCaT sejtekben a 48 órás 5-FU kezelés végére alakult ki. A CHO-K1 sejtek nem mutatták maradványtestek képződését az 5-FU kezelés hatására. Az SCC és HeLa tenyészetekben alacsony számban voltak jelen maradványtestek, részben azért, mert ezeknek a sejtípusoknak a sejtciklusát nem lehetett meghatározni. Ezek az észlelések fontosak, mivel ezeken az ábrákon nem volt változás a sejtek számában. Ezért csak azokat a maradványtesteket lehetett megszámolni, amelyek a sejtek nekrozisa során keletkeztek.



36. ábra Nekrotikus testek képződése N-153 kezelést követően.

A látómezőben visszamaradt testek számát különböző inkubációs idők (12, 24, 36, 48 óra) alatt számoltuk meg. 12 óra elteltével nem képződtek reziduális testek, de számuk később az inkubáció folytatásával növekedett. A maradványtestek számának legjelentősebb növekedése a HeLa sejtekben következett be.

#### 1.2.5. Maradványtestek kialakulása és láthatóvá tétele

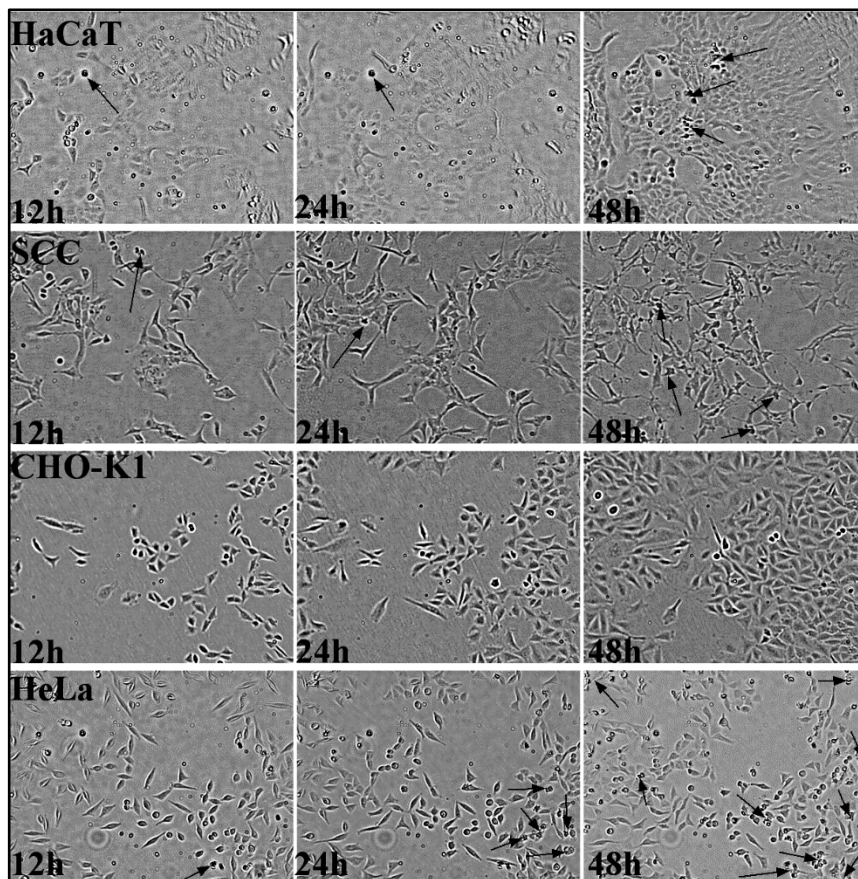
Az apoptózis korai folyamata során a sejtek zsugorodása és pyknózis látható fénymikroszkópiával. A sejtzsugorodás során a sejtek kisebb méretűek, a citoplazma sűrűbb, a szerveztek pedig szorosabban helyezkednek el. A pyknózis a kromatin kondenzációjának eredménye, és ez az apoptózis legfőbb jellemzője.<sup>73</sup>

A time-lapse képszekvencia időbeli áttekintésével az apoptózist kísérő dinamikus morfológiai változások figyelemmel kísérhetőek. Bár a reziduális testek

<sup>73</sup> Susan Elmore 2007

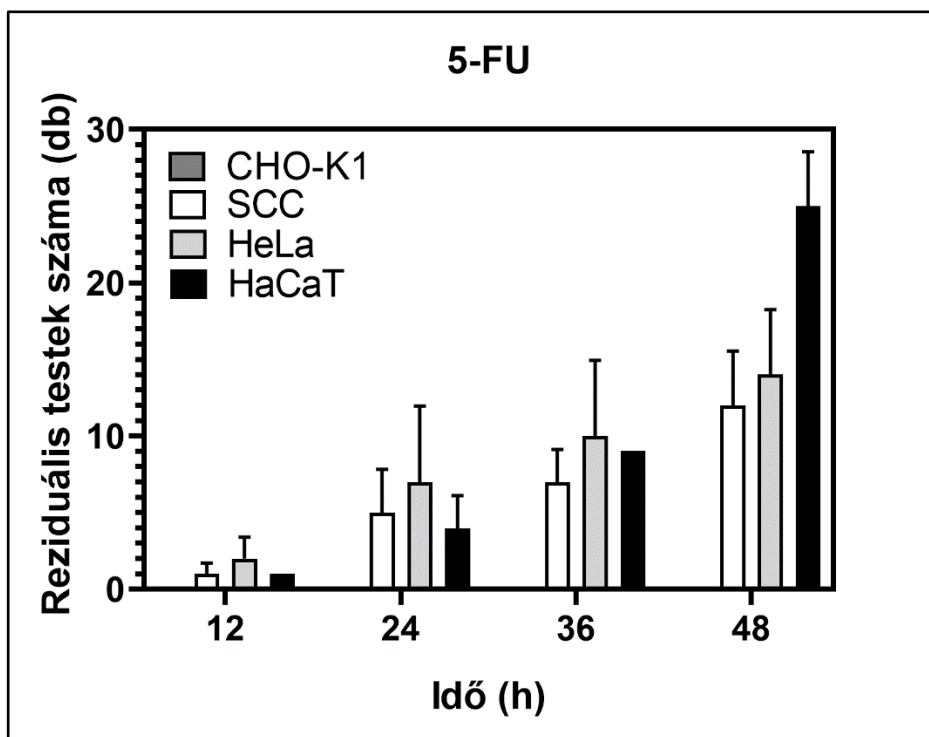
végmorfológiája hasonló az apoptózis és nekrozis esetén, kialakulásuk időbeli lefutása jelentősen eltérő dinamikát mutat. Az apoptózist kísérő jellegzetes membrán-blebbing jelenségét és a nekrozisra utaló celluláris dezintegrációt a szekvencia áttekintésével tudtuk elkülöníteni. Az apoptózis és nekrozis közötti átmenetet képviselő jelenségeket nem figyeltünk meg vizsgálataink során, ennek ellenére a reziduális testek kifejezést használjuk a dolgozatban, mivel apoptózis-specifikus festést nem tudtunk a vizsgálat során alkalmazni.

CHO-K1 kultúrában nem figyeltünk meg maradványtestek képződését (37. ábra). Más sejt kultúrákban a maradványtestek az inkubációs idő függvényében jelentek meg, és számuk a sejt típusok nukleozid analóggal szembeni érzékenységétől függött. A sejt kultúrák 5- FU  $IC_{50}$  koncentrációval történő kezelését követően a maradványtestek képződését vizsgáltuk (38. ábra). A CHO-K1 sejtekben a maradéktestek száma túl alacsony volt, nem volt kimutatható. A többi sejt kultúrában detektálható mértékben képződtek nekrotikus maradványtestek az inkubációs idő függvényében, de változó arányban. A legnagyobb számban a HaCaT sejtekben tapasztaltuk a maradványtestek jelenlétét.



37. ábra A reziduális testek képződése sejt kultúrákban N-153 jelenlétében az idő függvényében.

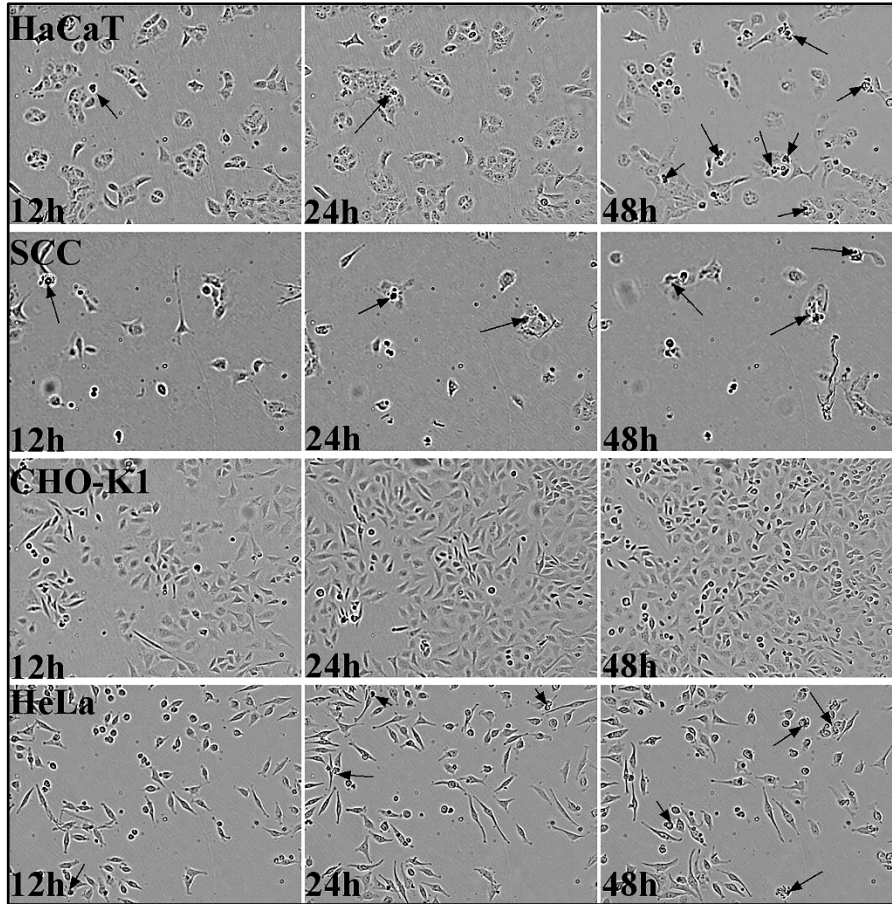
A maradványtestek vizualizálása az N-153  $IC_{50}$  koncentrációjával kezelt sejtek időzített mikroszkópos vizsgálata során történt. A fekete nyilak a nekrotikus testekre mutatnak.



38. ábra A maradványtestek kialakulása 5-FU-kezelést követően.

Megszámoltuk a különböző inkubációs idők (12, 24, 36, 48 óra) alatt kialakult maradék nekrotikus testek számát.

Az N-153-hoz hasonlóan a sejtek 5-FU-val történő kezelése a CHO-K1 kultúrában sem eredményezett reziduális testeket (39. ábra). Más sejttípusok reziduális teste az inkubációs idő függvényében a sejtípusok 5-FU nukleozid analógra való érzékenységétől függően növekvő számban voltak jelen. A legnagyobb számban a nekrotikus testek 48 óra elteltével a HaCaT sejtekben képződtek. MTX-kezelés hatására a CHO-K1 sejtekben nem alakultak ki nekrotikus testek (40. ábra). Az SCC, HeLa és HaCaT sejtekben a nekrotikus testek 24 órával az MTX kezelés után jelentek meg, és számuk az idő múlásával növekedett (41. ábra). A nekrotikus testek növekvő száma a különböző sejtvonalakban az alábbi sorrendben jelzik a sejtvonalak MTX iránti érzékenységét: CHO-K1 < SCC < HeLa < HaCaT.

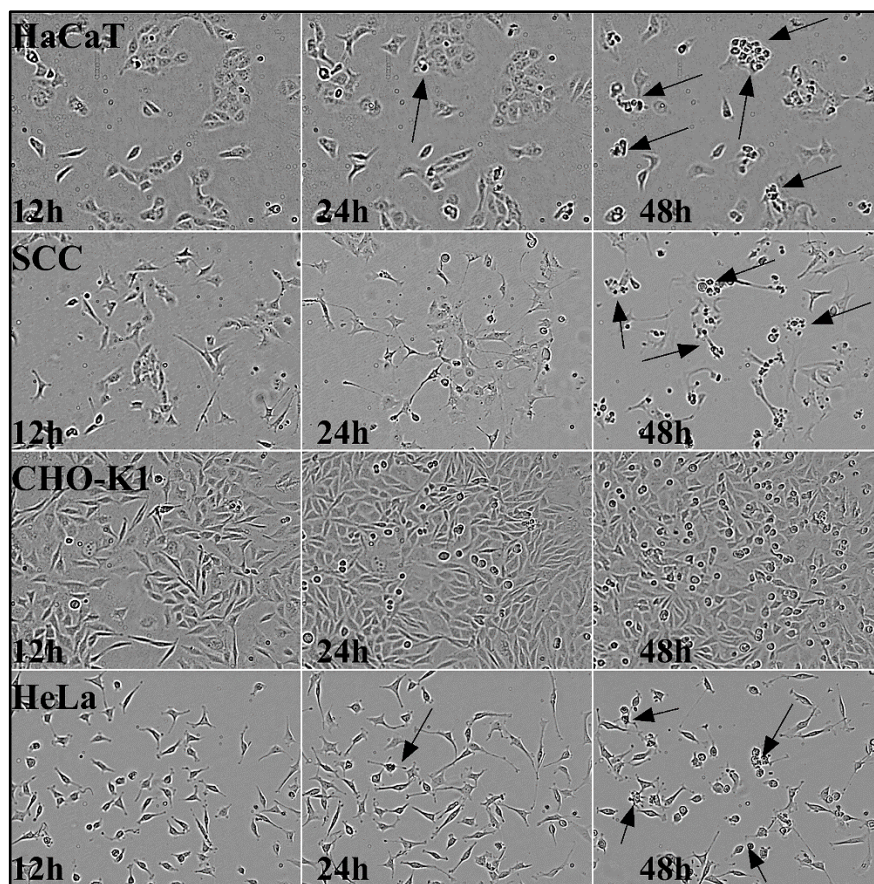


39. ábra A maradványtestek vizualizálása sejt kultúrákban 5-FU jelenlétében az idő függvényében.

A maradvány testek vizualizálása time-lapse mikroszkópia során történt, a sejteket 5-FU  $IC_{50}$  koncentrációjával kezelve. A fekete nyilak a nekrotikus testekre mutatnak.

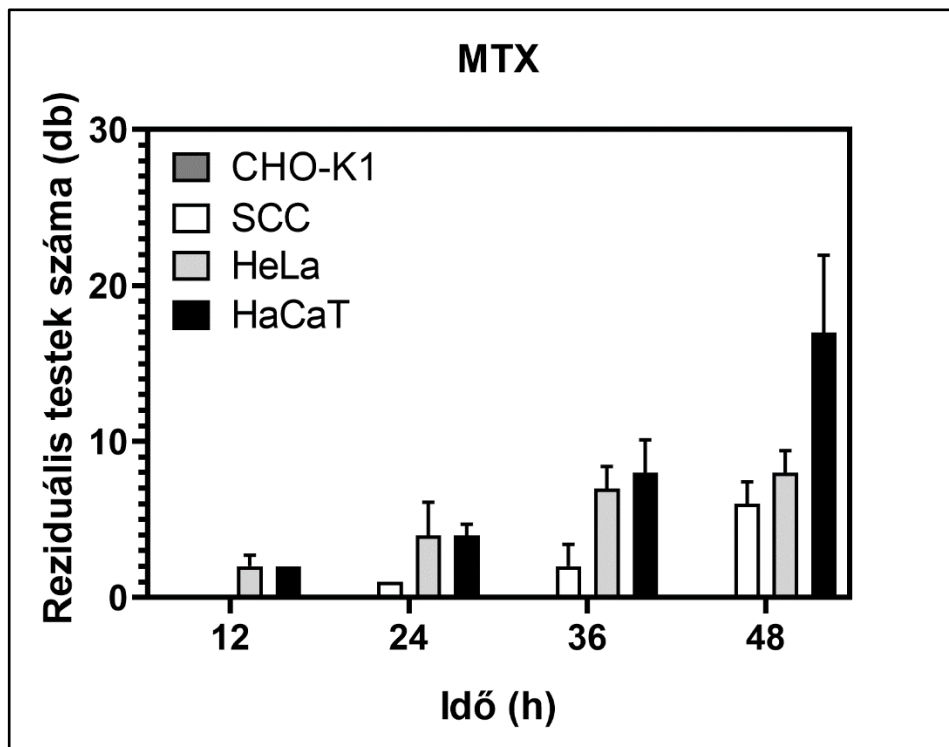
A CHO-K1 sejt kultúrában az inkubációs időtől és az 5-FU vagy MTX kezelésétől függetlenül nem figyeltünk meg maradványtesteket. Más sejt kultúrákban azonban az inkubációs időtől és a sejt vonal típusától függően maradványtestek képződtek. A legtöbb nekrotikus maradványtest a HaCaT sejtekben képződött, majd a HeLa és az SCC sejtek következtek. A maradványtestek száma az 5-FU vagy MTX kezelés után az idő függvényében nőtt, és az MTX-re való érzékenység sorrendje CHO-K1 < SCC < HeLa < HaCaT volt. Ezek az eredmények arra utaltak, hogy a sejt ciklus időtartama

és a kemoterápiás szerekkel szembeni érzékenység szerepet játszhatott a maradványtestek kialakulásában és az általános citotoxicitásban. A CHO-K1 sejtvonalonban a reziduális testek hiánya bizonyos kemoterápiás szerekkel szembeni potenciális rezisztenciára utalhatott.



40. ábra A maradványtestek felhalmozódása sejt kultúrákban MTX jelenlétében az idő függvényében.

A maradványtestek vizualizálása time-lapse mikroszkópiával történt, a sejteket  $IC_{50}$  koncentrációjú MTX-szel kezelve. A fekete nyilak a nekrotikus testekre mutatnak.



41. ábra Maradványtestek képződése MTX-kezelés után.

Megszámoltuk a különböző inkubációs idők (12, 24, 36, 48 óra) alatt kialakult maradék nekrotikus testek számát.

A maradványtestek képződése szintén fontos mutatója lehet a gyógyszerérzékenységnek a különböző sejtvonalakban. A képződött maradványtestek száma és típusa a sejtípustól és az alkalmazott gyógyszer vagy kezelés típusától függően változhat. A különböző sejtvonalakban a maradványtestek képződésének mérésével betekintést nyerhetünk egy gyógyszer vagy kezelés hatásmechanizmusába, és meghatározhatjuk, hogy mely sejtvonalak a legérzékenyebbek rá. Ez az információ hasznos lehet a célzott tumorterápiák és egyéb kezelések kifejlesztésében.

## 2. A kidolgozott módszer tesztelése nagy mintaszámmal

### 2.1. Citotoxikus aktivitás

Az új nukleozid-analógok citotoxikus hatását tumoros SCC (egér laphám tumor sejt) és immortalizált HaCaT (humán keratinocita) sejt vonalakon vizsgáltuk. A 29-es vegyület kivételével a D-ribozil és D-arabinozil diasztereomereket oszlopkromatográfiával nem lehetett elválasztani, ezért a citotoxicitási vizsgálatokat az izomer keverékekkel végeztük. A vegyületek félmaximális gátló koncentráció ( $IC_{50}$ ) értékeit a 7. táblázat foglalja össze. A hatos és nyolcas szilénacetál-védett ribotimidin-származékok, valamint a 10-16 számú 2'-tioszubsztituált uridin- és ribotimidinanalógok koncentrációfüggő módon gátolták a sejtnövekedést (42., 43. és 44. ábrák), az  $IC_{50}$ -értékek 4.49-26.45  $\mu\text{g/ml}$  voltak az SCC-sejtek és 2.14-40.74  $\mu\text{g/ml}$  a HaCaT-sejtek esetében. A 17-es és 18-as 1-tioszukur-konjugátumok (nem látható), valamint a 15 deszilálásával kapott védetelen 19-es nem fejtett ki citotoxicitást egyik sejt vonalra sem. A 19 inaktivitása rávilágít a szililcsoportok fontos szerepére a nukleozid-analógok sejtnövekedést gátló hatásában, amit számos irodalmi eredmény is alátámaszt. Például a t-butildimetil-szilil (TBDMS) védőcsoportról kimutatták, hogy döntő szerepet játszik a leinamicin-nukleozidok<sup>74</sup>, az ureidoadenozinok<sup>75</sup>, a 3'-modifikált xilofuranozil-nukleozidok<sup>76</sup> és a ribotimidin-eredetű TSAO-T reverz transzkriptáz inhibitor<sup>77</sup> megfigyelt citotoxikus/antiproliferatív hatásában. Ezenkívül arról is beszámoltak, hogy a szililcsoportok nukleozidokba történő bevezetése önmagában is citotoxikus hatással ruházza fel az alapvegyületeket<sup>78</sup>, ami összhangban van a 6-os és 8-as szililált nukleozidoknál tapasztalt aktivitással. Ugyanakkor a citotoxikus hatás és a tumoros sejt vonallal szembeni szelektivitás jelentősen növelhető a megfelelő szintetikus

---

<sup>74</sup> Szilágy et al., 2006

<sup>75</sup> Peterson et al., 2009; Shelton et al., 2012

<sup>76</sup> Bege et al., 2019

<sup>77</sup> Chamorro et al., 2001

<sup>78</sup> Harmse et al., 2015

módosításokkal, amint azt a 11, 13 és 15 tiobutil- és tioacetyl-modifikált vegyületek mutatták, amelyek magas és szelektív citotoxicitást mutattak a tumoros sejtekkel szemben. Ugyanakkor a C2' pozícióban tiouridin-szubsztituenssel rendelkező 16-os vegyület ellentétes szelektivitást fejtett ki, és 2,5-szer nagyobb sejtnövekedésgátlást mutatott az egészséges sejtekben, mint a tumoros sejtekben. A 23-as metilribozid, amely ugyanazt az n-butilszulfanil-metil szubsztituenssel rendelkezik, mint a 11 és 15, aktivitásának hiánya egyértelműen azt jelzi, hogy a nukleobázis nélkülözhetetlen a sejtnövekedést gátló hatáshoz. A 28 és 29-ara purin-nukleozid-analógok, amelyek a C2' pozícióban tiobutil- és tioacetyl-szubsztituenssel rendelkeznek, alacsonyabb aktivitást mutattak a 11, 13 és 15 pirimidin-nukleozid-kongenerekhez képest. Mindazonáltal figyelemre méltó a 29-ara szelektív citotoxicitása a tumoros sejtekre. A D ribo-konfigurációjú izomer, a 29-ribo inaktivitása ráadásul rámutatott a C2'-konfiguráció biológiai aktivitásra gyakorolt nagy hatására. A tió cukorral módosított 30-as arabinoadenozin inaktív volt, hasonlóan a 16-os és 17-es arabinotimidin-kongenerekhez.

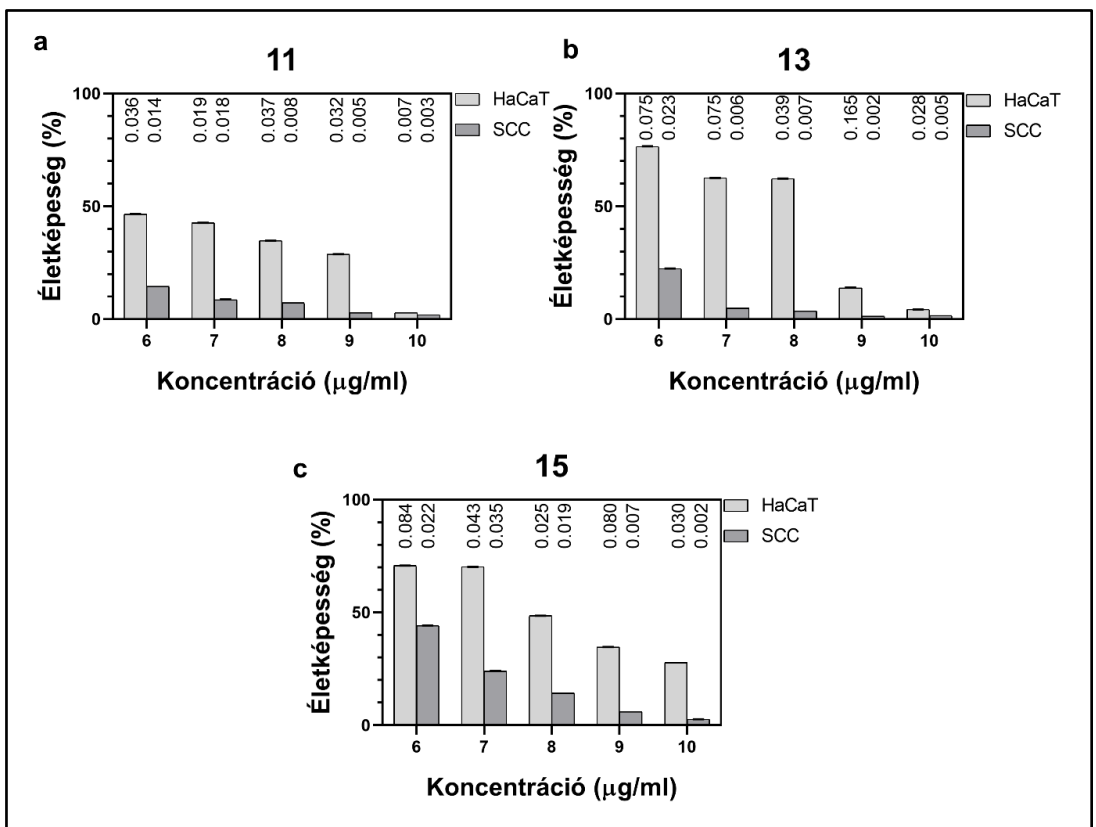
A nukleozid-analógjaink hatásmechanizmusának jobb megértése érdekében a legígéretesebb aktivitási profillal rendelkező 11, 13 és 15 vegyületeket választottuk ki további vizsgálatokra.

Vegyület	HaCaT IC <sub>50</sub> [µg/mL]	SCC-VII IC <sub>50</sub> [µg/mL]	SI <sup>a</sup>
<b>6</b>	10.17±0.94	7.73±0.53	1.3
<b>8</b>	9.34±0.68	6.64±0.20	1.4
<b>10</b>	4.49±0.25	6.14±0.03	0.7
<b>11</b>	6.94±0.19	2.14±0.39	3.3
<b>12</b>	9.33±0.25	7.46±0.21	1.3
<b>13</b>	7.57±0.11	2.63±0.24	2.9
<b>14</b>	10.88±0.09	9.19±0.37	1.2
<b>15</b>	8.06±0.16	4.44±0.12	1.8
<b>16</b>	13.43±2.04	34.64±0.54	0.4
<b>19</b>	n.a. <sup>b</sup>	n.a.	
<b>23</b>	n.a.	n.a.	
<b>27</b>	n.a.	n.a.	

<b>28</b>	26.45±5.91	40.74±6.21	0.6
<b>29ara</b>	n.a.	24.95±8.40	
<b>29ribo</b>	n.a.	n.a.	
<b>30</b>	n.a.	n.a.	

7. Táblázat A vegyületek citotoxikus aktivitása egészséges (HaCaT) és tumoros (SCC) sejtvonalakon.

a szelektivitási index = HaCaT IC<sub>50</sub>/ SCC IC<sub>50</sub>; b a legmagasabb, 20 µg/ml-es vizsgálati koncentrációnál nincs citotoxicitás; c pozitív kontrollként 5-FU (5-fluorouracil).



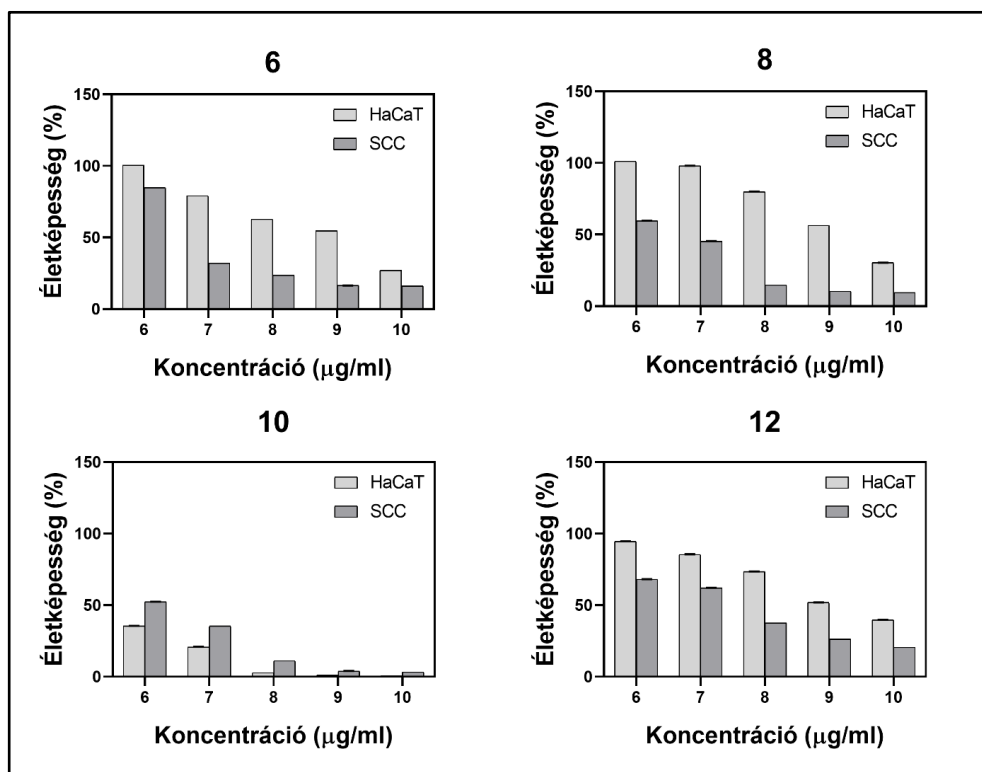
42. ábra A 11. (a), 13. (b) és 15. (c) vegyületek hatása a HaCaT és SCC sejtek életképességére MTT-vizsgálattal.

**11:** szemmel látható különbségeket tapasztaltunk a két sejtvonalra gyakorolt hatás tekintetében. A HaCaT életképességét minimálisan, míg az SCC életképességét

jelentősen csökkentette. Ezen hatás jól látszik a meghatározott IC<sub>50</sub> értékeken is, ugyanis 3x-os különbség volt megfigyelhető.

**13:** hatékonynak bizonyult a vegyület, mely esetben 3x-os különbséget tapasztaltunk az IC<sub>50</sub> értékek vizsgálata során. Mindkettő sejtvonalra hatással volt, lépcsőzetesen csökkent az életképesség a koncentráció növelés függvényében. Azonban a meghatározott értékeknek megfelelően alakultak a viabilitási értékek is, ugyanis az SCC (tumoros) sejtvonal esetében drasztikusan csökkent az életképesség.

**15:** szemmel látható különbségeket tapasztaltunk a két sejtvonalra gyakorolt hatás tekintetében. A HaCaT életképességét minimálisan, míg az SCC életképességét jelentősen csökkentette. Ezen hatás jól látszott a meghatározott IC<sub>50</sub> értékeken is, ugyanis 2x-es különbség volt megfigyelhető.



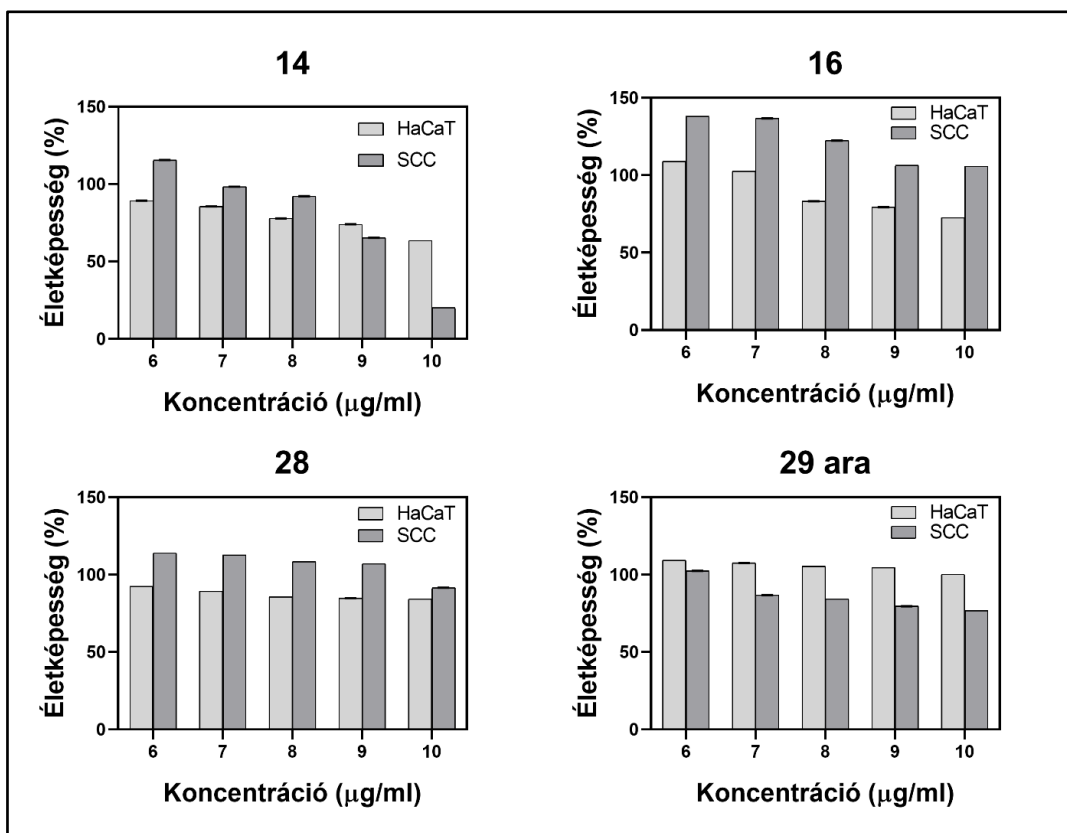
43. ábra A 6, 8, 10 és 12 vegyületek hatása a HaCaT és SCC sejtek életképességére MTT-teszt alkalmazásával

**6:** ahogy nőtt a koncentráció, úgy csökkent lépcsőzetesen az életképesség is mindkettő sejtvonal esetében. Az SCC érzékenyebbnek bizonyult a HaCaT-hoz képest, azonban nem szignifikáns a jellemző inhibíciós koncentráció értékek közötti különbség.

**8:** ahogy nőtt a koncentráció, úgy csökkent lépcsőzetesen az életképesség is mindkettő sejtvonal esetében. Az SCC érzékenyebbnek bizonyult a HaCaT-hoz képest, azonban nem szignifikáns a jellemző inhibíciós koncentráció értékek közötti különbség.

**10:** egyforma hatást gyakorolt mindkettő sejtvonalra, ez a meghatározott  $IC_{50}$  értékeken is jól látszott. Ezen egyforma hatás abban nyilvánult meg, hogy mindkettő sejtvonal életképessége jelentősen csökkent, sőt a HaCaT (nem tumoros) érzékenyebbnek bizonyult a vizsgált vegyületre.

**12:** ahogy nőtt a koncentráció, úgy csökkent lépcsőzetesen az életképesség is mindkettő sejtvonal esetében. Az SCC érzékenyebbnek bizonyult a HaCaT-hoz képest, azonban nem szignifikáns a jellemző inhibíciós koncentráció értékek közötti különbség. Továbbá vizsgálatunk jobb hatékonysággal jellemezhető vegyületeket ennél.



44. ábra A 14, 16, 28 és 29ara vegyületek hatása a HaCaT és SCC sejtek életképességére MTT-teszt alkalmazásával

**14:** egyforma hatást gyakorolt mindkettő sejtvonalra, ez a meghatározott  $IC_{50}$  értékeken is jól látszott. Ezen egyforma hatás abban nyilvánult meg, hogy mindkettő sejtvonal életképessége csak minimálisan csökkent.

**16:** nem volt megfigyelhető drasztikus hatás a vizsgált sejtvonalak esetében, azonban a meghatározott  $IC_{50}$  jelentős különbségeket mutattak. Ezen jelentős különbség abban nyilvánult meg, hogy az SCC (tumoros) sejtek proliferációját fokozta a vizsgált vegyület. Így jóval magasabb volt a jellemző  $IC_{50}$  koncentráció az SCC sejtvonal esetében, ami azt jelenti, hogy a nem tumoros HaCaT sejtvonalra nézve szelektívebb volt a vegyület.

**28:** nem volt megfigyelhető drasztikus hatás a vizsgált sejtvonalak esetében, azonban a meghatározott  $IC_{50}$  jelentős különbségeket mutattak. Ezen jelentős különbség

abban nyilvánult meg, hogy az SCC (tumoros) sejtek proliferációját fokozta a vizsgált vegyület. Így jóval magasabb volt a jellemző  $IC_{50}$  koncentráció az SCC sejtvonala esetében, ami azt jelenti, hogy a nem tumoros HaCaT sejtvonala volt szelektívebb a vegyület.

**29:** nem figyelhetünk meg szignifikáns hatást egyik sejtvonala esetében sem, ezt az is jól mutatta, hogy  $IC_{50}$  értékeket nem tudtuk meghatározni a HaCaT sejtvonala esetében. Azonban az SCC sejtvonala életképessége minimálisan csökkent, így meghatározható volt az inhibíciós koncentráció értéke. Kiemelkedő ez a szelektivitás, azonban vizsgálatunkat jobb tulajdonságokkal rendelkező vegyületekkel folytattuk ehelyett.

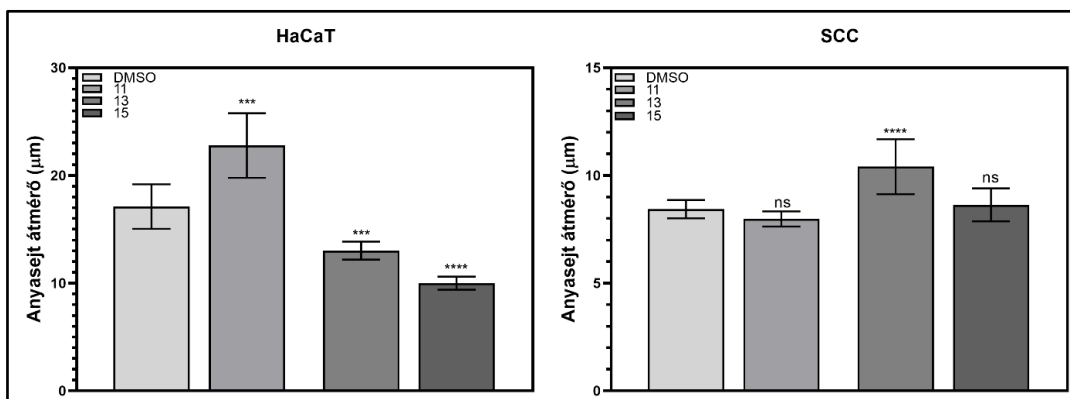
Számos vegyület citotoxikus aktivitását vizsgáltuk egészséges (HaCaT) és tumoros (SCC-VII) sejtvonalaikon, valamint a HaCaT  $IC_{50}$  és SCC-VII  $IC_{50}$  hányadosaként számított szelektivitási indexet (SI). A 10-es és 11-es vegyület mutatta a legmagasabb szelektivitási indexet (0,7, illetve 3,3), ami viszonylag erősebb citotoxikus hatást jelez a tumorsejtekre, mint az egészséges sejtekre. A 16-os vegyület mutatta a legalacsonyabb szelektivitási indexet (0,4), ami az egészséges sejtekre gyakorolt erősebb citotoxikus hatást jelzi, mint a tumorsejtekre. A 19-es vegyület a legmagasabb vizsgált 20  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációban sem mutatott citotoxicitást.

Az eredmények azt sugallják, hogy a vizsgált C-2'-elágazó arabinonukleozidok némelyike jelentős tumorellenes hatással rendelkezik az SCC-VII sejtekkel szemben, amelyek egér laphámsejtes karcinóma sejtek. Az SCC-VII sejtekkel szemben a legalacsonyabb  $IC_{50}$ -értékkel rendelkező vegyületek (ami a legerősebb daganatellenes aktivitást jelzi) a 11-es és a 13-as vegyület volt. A 11-es vegyületnek magas volt a szelektivitási indexe (SI) is, ami azt jelzi, hogy szelektívebb a tumoros sejtekkel szemben, és kevésbé mérgező az egészséges sejtekre.

## 2.2. Élő sejtek képkalkotása time-lapse mikroszkópián keresztül

### 2.2.1. Az anyasejtek méretének változása

Az egyes sejtvonalakat a 11 (2.14  $\mu\text{g/ml}$ ), 13 (2.63  $\mu\text{g/ml}$ ) és 15 (4.44  $\mu\text{g/ml}$ ) vegyületekkel kezeltük, amelyeket 1%-os (v/v) DMSO-ban oldottunk, és alkalmazás előtt sejtenyésző közeggel hígítottunk. Ezután 1%-os (v/v) DMSO-t használtunk kontrollként. A sejtek méretének változásait, a levált és lekerekített sejteket közvetlenül az osztódás előtt mértük (45. ábra), és százalékban adtuk meg a DMSO-kontrollhoz viszonyítva (8. táblázat). Az anyasejtek osztódás előtti megnövekedett mérete a citotoxicitás általános indikátora. A 11-gyel történő kezelés hatására a HaCaT anyasejtek mérete jelentősen megnőtt, míg az SCC VII sejtek mérete enyhén csökkent. A 15-ös vegyület éppen ellenkezőleg változtatta meg az anyasejtek méretét: a HaCaT sejtvonalban jelentős, 41%-os méretcsökkenést idézett elő, míg az SCC VII sejtvonalban csak elhanyagolható mértékű méretnövekedést. Ugyanakkor a 13-as vegyület mindkét sejtvonal anyasejtjének méretét jelentősen megváltoztatta, a tumoros anyasejtek méretét 24%-kal növelte, míg a HaCaT sejtek méretét ugyanilyen mértékben csökkentette.



45. ábra A DMSO és a 11, 13 és 15 vegyületek hatása a HaCaT és SCC sejtek anyasejtméretére.

(A csillagok és az "nsz" az adatok szignifikancia szintjére utalnak a statisztikai szignifikancia teszt alapján; nsz: nem szignifikáns ( $p > 0,05$ ), \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,001$ ;  $p$  = valószínűségi szint).

	<b>Anyasejt méret (<math>\mu\text{m}</math>) változás %-ban kifejezve<sup>b</sup></b>		
	<b>11</b>	<b>13</b>	<b>15</b>
HaCaT n = 30	29.23 $\pm$ 0.60	-23.90 $\pm$ 0.83	-41.57 $\pm$ 0.61
SCC VII n = 30	-5.34 $\pm$ 0.35	23.36 $\pm$ 1.27	2.37 $\pm$ 0.76

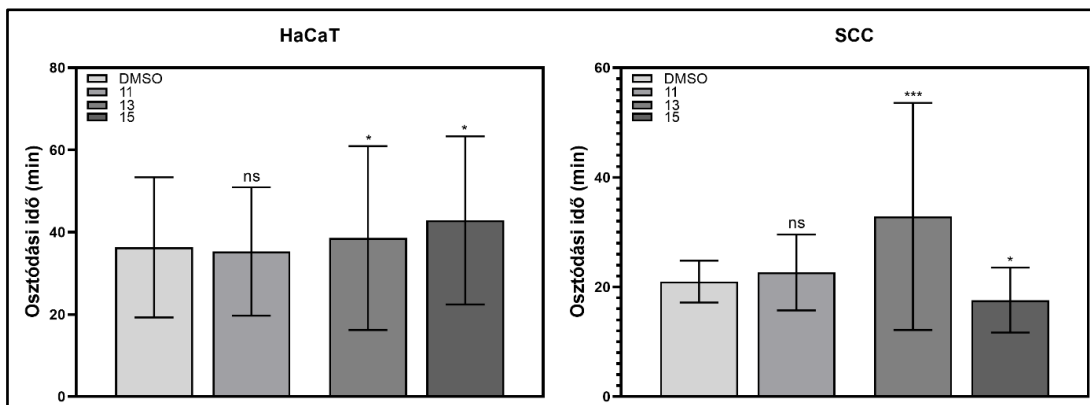
8. Táblázat A 11, 13 és 15 vegyületek<sup>a</sup> hatása az anyasejtek méretére.

a A sejteket 3,7  $\mu\text{M}$  11-gyel, 4,7  $\mu\text{M}$  13-mal és 7,5  $\mu\text{M}$  15-tel kezelték; b (kezelt sejtek mérete/DMSO kontroll sejtek mérete) $\times$ 100; a sejtek méretét n = 30 minta átlagértékével számoltuk.

Ezek az eredmények arra utaltak, hogy a három vegyület eltérő hatást gyakoroltak a két sejtvonalra. A 11-es vegyület a HaCaT sejtekkel szemben volt toxikusabb; míg a 15-ös vegyület szintén ezekre a sejtekre hatott toxikusabban, mint az SCC VII sejtekre. A 13-as vegyület mindkét sejtvonalra jelentős hatást gyakorolt, de ellentétes hatást gyakorolt a méretükre. Ezek az eredmények rávilágítanak a vegyületek különböző sejttípusokra gyakorolt specifikus hatásainak megértésének fontosságára, és segíthetnek a különböző betegségek célzottabb és hatékonyabb terápiáinak kifejlesztésében.

### 2.2.2. A sejtosztódás időtartama

A 11-es vegyület csak kis mértékben befolyásolta a sejtosztódás időtartamát, enyhén csökkentette azt a HaCaT sejtek esetében, és enyhén növelte az SCC VII sejtek esetében. A 13-as vegyület jelentősen, 56%-kal növelte az SCC VII sejtek osztódási idejét, míg a HaCaT sejtvonalra alig volt hatása. A 15-ös vegyület jelenlétében kisebb, de szignifikáns változások voltak megfigyelhetők mindkét sejtvonalban, a sejtosztódás időtartama 18%-kal nőtt a HaCaT sejteknél, míg az SCC sejteknél 16%-kal csökkent (9. táblázat, 46. ábra).



46. ábra A DMSO és a 11., 13. és 15. vegyület hatása a HaCaT és SCC sejtek sejtosztódásának időtartamára.

(A csillagok és az "nsz" az adatok szignifikanciaszintjére utalnak a statisztikai szignifikanciateszt alapján; nsz: nem szignifikáns ( $p > 0,05$ ), \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ;  $p =$  valószínűségi szint).

	Sejtosztódás (min) kontrollal összehasonlítva %-ban kifejezve <sup>b</sup>		
	11	13	15
HaCaT n = 30	-2.75±15.62	6.25±22.36	18.04±20.45
SCC VII n = 30	8.00±3.82	56.55±20.70	-16.06±5.92

9. Táblázat A 11, 13 és 15 vegyületek hatása a HaCaT és SCC sejtek sejtosztódásának időtartamára.

a) A sejteket  $3,7 \mu\text{M}$  11-gyel,  $4,7 \mu\text{M}$  13-mal és  $7,5 \mu\text{M}$  15-tel kezelték; b) (a kezelt sejtek sejtosztódásának időtartama/ a DMSO kontroll sejtosztódásának időtartama) $\times 100$ .

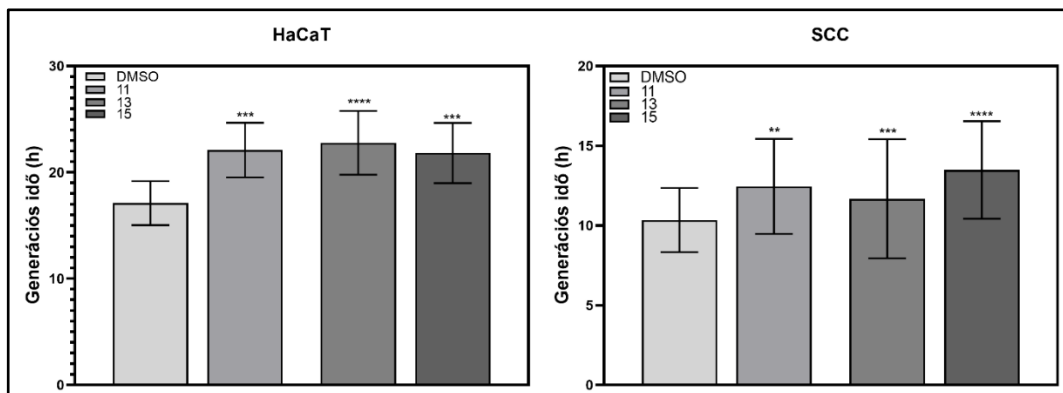
A sejtméret változásán kívül a vizsgálat során a három vegyületnek a sejtosztódás időtartamára gyakorolt hatását is mértük mindkét sejtvonalban. A 11-es vegyület alig befolyásolta a sejtosztódás időtartamát, a HaCaT sejteknél enyhén csökkentette, az SCC VII sejteknél pedig kis mértékben növelte azt. Ezzel szemben a 13-as vegyület jelentősen, 56%-kal növelte a sejtosztódás időtartamát az SCC VII sejtekben, de a

HaCaT sejtekre alig volt hatása. A 15-ös vegyület kisebb, de még mindig jelentős hatást gyakorolt a sejtosztódás időtartamára mindkét sejtvonalban, 18%-kal növelte azt a HaCaT sejtekben és 16%-kal csökkentette azt az SCC VII sejtekben.

Ezek az eredmények együttesen azt mutatták, hogy a három vegyület eltérő hatással van mind a sejt méretre, mind a sejtosztódás időtartamára a két sejtvonalban. Míg a 11-es és 15-ös vegyület ellentétes hatást gyakorolt a sejtosztódás időtartamára a két sejtvonalban, addig a 13-as vegyület jelentősen növelte a sejtosztódás időtartamát az SCC VII sejtekben. Ezek az eredmények további betekintést nyújtanak a vegyületek hatásmechanizmusába.

### 2.2.3. Generációs idő

A 11., 13. és 15. vegyületek sejtciklusra gyakorolt hatásának vizsgálatához a sejtgenerációs időket time-lapse képsorozatok segítségével határoztuk meg. A sejtciklus időtartamának változása egyben sejttoxicitást is jelez. A 11. és 15. vegyületekkel történő kezelés mindkét sejtvonal esetében jelentősen megnövelte a sejtciklust. A 11-gyel történő kezelés után a HaCaT sejtek generációs ideje 29%-kal, az SCC sejteké 20%-kal nőtt, 15 jelenlétében pedig ez a növekedés a HaCaT sejtek esetében 27%, az SCC sejtek esetében 30% volt. A 13 vegyület nagymértékben, 33%-kal növelte a HaCaT sejtvonal generációs idejét, de kevésbé jelentős, 13%-os növekedést okozott az SCC VII sejtvonal generációs idejében (10. táblázat, 47. ábra).



47. ábra A DMSO és a 11., 13. és 15. vegyületek hatása a HaCaT és SCC sejtek generációs idejére

(A csillagok a statisztikai szignifikancia teszt alapján meghatározott szignifikancia szinteket jelzik; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ;  $p =$  valószínűségi szint).

	Generációs idő (h) változás %-ban kifejezve <sup>b</sup>		
	11	13	15
HaCaT n = 30	29.10±2.57	32.96±3.00	27.41±2.83
SCC VII n = 30	20.40±2.97	12.86±3.72	30.00±3.06

10. Táblázat A 11, 13 és 15 vegyületek<sup>a</sup> hatása a HaCaT és SCC sejtek generációs idejére.

a A sejteket 3,7  $\mu\text{M}$  11-gyel, 4,7  $\mu\text{M}$  13-mal és 7,5  $\mu\text{M}$  15-tel kezelték; b (kezelt sejtek generációs ideje/ DMSO kontroll generációs ideje)x100.

A 11, 13 és 15-ös vegyületek változó mértékben hatottak a sejtciklusra mindkét sejtvonalban. A 11-es. és 15-ös. vegyület jelentősen megnövelte a sejtciklus idejét mindkét sejtvonalban, míg a 13-as vegyület csak a HaCaT sejtvonalban okozott nagyobb növekedést. Ezek az eredmények összességében arra utalnak, hogy a vegyületek eltérő hatással lehetnek az egyes sejtvonalakra, valamint a hatások összetett módon alakulhatnak ki a sejtosztódási fázisokban. Az eredmények fontosak lehetnek az egyes vegyületek hatékonyságának meghatározásához és a további

kutatásokhoz, amelyek célja az adott vegyületek hatásmechanizmusának és terápiás alkalmazásának feltárása lehet.

A D-Arabino-konfigurált timidin-, uridin- és adenzin-analógokat hatékonyan állították elő 3',5'-O-szililén-acetál-védett nukleozid 2'-exometilén-származékok és különböző tiolok, köztük alkiltiolok, tioecetsav és 1-tioszugárok fotoindukált tiol-ének reakcióival. E vegyületek citotoxikus hatását tumoros SCC és egészséges HaCaT sejtvonalakon vizsgáltuk MTT-teszttel. A tizenhat vizsgált nukleozid-analóg közül tizenegy származék mutatott koncentrációfüggő citotoxicitást. Az azonos C2' módosító csoportot tartalmazó vegyületek esetében a pirimidin-nukleozidok nagyobb aktivitást mutattak, mint az adenzin-származékok, míg az összes 1-tiocukrot tartalmazó származék inaktív volt, függetlenül a nukleobázis típusától. A szililvédő csoport, a nukleobázis és a megfelelő C2' szubsztituens döntőnek bizonyult a sejtnövekedést gátló aktivitás szempontjából. A 11, 13 és 15 pirimidin-nukleozid analógok, amelyek butilszulfanil-metil vagy acetiltiometil szubsztituenssel rendelkeztek, mutatták a legjobb citotoxicitási profilt: alacsony mikrogrammos koncentrációban jelentősen csökkentették a tumoros SCC sejtek életképességét, miközben alig befolyásolták az egészséges HaCaT sejtek életképességét. A legjobb három vegyület, a 11, 13 és 15 hatását a sejtméretre, az osztódási időre és a sejtgenerációs időre timelapse mikroszkópiával vizsgáltuk. A tumoros sejtvonal anyasejtjeinek méretének legjelentősebb növekedését a 13-as vegyület okozta. A sejtosztódás időtartamát mindkét sejtvonalban szignifikánsan megváltoztatta a 15-ös vegyülettel történő kezelés. Figyelemre méltó, hogy a 13 szelektíven csak az SCC sejtekben módosította az osztódási időt, jelentősen, 65%-kal növelve azt, ugyanakkor a HaCaT sejtekben jelentéktelenül változtatta meg a sejtosztódási időt. A generációs időt mindhárom vegyület szignifikánsan növelte. Bár az MTT-vizsgálat szerint a 11-es vegyület valamivel erősebben és nagyobb szelektivitással gátolta a tumorsejteket, mint a 13-as vegyület, az time-lapse mikroszkópos vizsgálatokban a 13-as vegyület okozta a legjelentősebb változásokat

a citotoxicitásra utaló sejtparaméterekben. Ezért a 13-as 2'-acetiltiometil-uridin-származék vezető szerkezetnek tekinthető az új, hatékonyabb daganatellenes vegyületek tervezésében.

A vegyületek citotoxikus hatását tumoros és egészséges sejtvonalakon vizsgáltuk, és megállapítottuk, hogy néhány analóg koncentrációfüggő citotoxicitást mutatott. A vizsgálat során arra a következtetésre jutottunk, hogy a szililvédő csoport, a nukleobázis és a megfelelő C2' szubsztituens döntő szerepet játszott a citotoxikus aktivitásban. A butilszulfanil-metil vagy acetilti-metil szubsztituenssel rendelkező vegyületek közül három bizonyult a citotoxikus profil szempontjából a legjobbnak, és a 13-as vegyület mutatta a citotoxicitásra utaló sejtparaméterek legjelentősebb változását. Ezért a 13-as 2'-acetilti-metil-uridin-származékot új és hatékonyabb tumorelles vegyületek tervezéséhez használható irányadó szerkezetként azonosítottuk.

# Összefoglalás

---

A rák a vezető halálozási okok között szerepel, és az ilyen megbetegedések száma világszerte folyamatosan növekszik. Nem csoda tehát, hogy a nukleozidszármazékok és -analógok tumorellenes szerekként történő alkalmazása jelentősen megnőtt az onkológia területén. A tumoros betegek terápiájában a nukleotidok, nukleozidok vagy bázisanalógok önmagukban vagy más gyógyszerekkel kombinálva mintegy 20%-ot tesznek ki<sup>79</sup> Ma már mintegy tízféle, ebbe a kategóriába tartozó hatóanyagot használnak a tumorterápiában, és az ilyen vegyületek iránti kereslet folyamatosan nő. A purin- és pirimidin-analógok antimetabolitokként vannak jelen a klinikai gyakorlatban. Több, a *Streptomyces atroolivaceus* faj által termelt makrolaktám, leinamicin figyelemre méltó tumorellenes és antibakteriális tulajdonságokkal rendelkezik, mivel képes gátolni a DNS-szintézist.<sup>80</sup> A leinamicin analógjai fokozott citotoxikus aktivitást mutattak HeLa tumorsejtekkel szemben. Különösen a leinamicin lipofil, szililcsoportot tartalmazó származékai mutattak jelentős aktivitást.<sup>81</sup>

A szilil és tritil módosított nukleozidok hatékonyabbnak bizonyultak a tumorsejtvonalakkal szemben, mint a nem módosított nukleozidok<sup>82</sup>. A gyógyszerfejlesztés jelöltjei között vannak olyan vegyületek, amelyek a tumor- és vírusellenes cukorral módosított nukleozidok közé tartoznak. A daganatterápiában előnyben részesítették azoknak a nukleozidoknak és nukleinsavanalógoknak a fejlesztését, amelyek kedvező kémiai és biológiai tulajdonságokat mutattak. A ribózban lévő oxigén különböző elemekkel, például kénnel, nitrogénnel vagy fluorral való helyettesítése új terápiás analógokat eredményezett. Példaként

---

<sup>79</sup> Shelton et al., 2016

<sup>80</sup> Hara et al., 1990; Asai et al., 1996

<sup>81</sup> Szilagyi et al., 2006

<sup>82</sup> Panayides et al., 2016

említhetők az 5'-tio-nukleotidszármazékok, amelyek a nukleinsav-bioszintézis alapvető enzimeinek gátlói, az elágazó C2', C3' nukleozidok pedig tumor- és vírusellenes aktivitást mutatnak.<sup>83</sup>

További potenciálisan aktív, gyógyászati jelentőségű vegyületek a szilíciummal (Si) szubsztituált nukleotidok. Az ilyen típusú származékok a szénelapú formákhoz hasonló, szintén négy értékű elektronokkal rendelkező, hasznos biológiai vegyületeket eredményezhetnek. Mindazonáltal a C- és Si-atomok közötti alapvető elektronszerkezeti különbségek lényegesen eltérő fizikai-kémiai és farmakokinetikai tulajdonságokhoz vezetnek. A Si-C kötés hossza jelentősen hosszabb (C-Si, 186 pm), mint a C-C kötésé (C-C, 154 pm), ami a Si és C-tartalmú analógok méret- és alakbeli különbségeit okozza. A Si viszonylag hosszabb kötéstávolsága a szilíciumtartalmú származékok speciális fehérjékkel való kölcsönhatását eredményezheti. A kötéstávolságok azt is megmagyarázhatják, hogy a farmakológiai profilok miért különböznek a szénelapú származékokétól. A Si nagyobb elektropozitivitása miatt a redukció, azaz egy elektron elvesztése és pozitív ion képződése nagyobb, mint a szénéé.

Általában a szilícium lipofil jellege erőteljesebb, mint a szénváltozaté. A lipofil jelleg növelésével javítható a vegyi anyagok szövetekbe történő bejuttatásának hatékonysága. Ez hatással van a máj metabolikus aktivitására és a plazma felezési idejére a nem szilicilált változathoz képest. A lipofil jelleg hozzájárul a gyógyszerjelölt molekulának a vér-agy gáton való gyorsabb átjutásához.<sup>84</sup>

Az N-153 IC<sub>50</sub> értékei közel azonosak voltak a CHO-K1 és a HeLa sejtekben. Az eredmények time-lapse videomikroszkópiával történő számszerűsítése során az N-153 nukleozid analóg IC<sub>50</sub> koncentrációival történő kezelést követően a sejtek mérete, a sejtsztódás ideje és a sejtek generációs ideje jelentősen megváltozott a

---

<sup>83</sup> Bege et al., 2019; Guinan et al., 2020

<sup>84</sup> Mills et al., 2014

DMSO kontrollhoz képest. A HeLa sejtek voltak a legérzékenyebbek az N-153 nukleozid analógra, és a fenti paraméterek, valamint a maradék nekrotikus testek száma idő- és koncentrációfüggő módon nőtt a DMSO-kontrollhoz viszonyítva.

Az 5-FU alacsonyabb koncentrációban csökkentette a sejt kultúrák életképességét, mint az N-153. Az MTT-teszt azt mutatta, hogy a sejtek életképessége 5 µg/ml 5-FU mellett 60%-kal csökkent, a CHO-K1 sejtek kivételével. HaCaT, SCC és HeLa sejteknél az IC<sub>50</sub> értékek alacsonyabbak voltak, mint 5 µg/ml. A videomikroszkópos számszerűsítés azt mutatta, hogy a tumoros sejt vonalak (SCC, HeLa) érzékenyebbek az 5-FU-ra, mint a nem tumoros HaCaT keratinocita sejt vonal. Az 5-FU kezelésre jellemző volt a nekrotikus sejthalál, kivéve a CHO-K1 sejteket, ahol a TLS-képeken nem voltak láthatók nekrotikus maradványtestek. Ezzel a megfigyeléssel ellentétben a HaCaT, SCC és HeLa sejteknél a nekrotikus maradványtestek idő- és koncentrációfüggő módon jelentek meg az 5-FU kezelést követően.

A kísérletek azt is kimutatták, hogy az MTX kisebb mértékben csökkentette az életképességet, mint az N-153 vagy az 5-FU. Egy másik említésre méltó megfigyelés a CHO-K1 sejtek magas IC<sub>50</sub> értéke a HaCaT és HeLa sejtekkel ellentétben, ami összhangban áll az ezekben a sejt vonalakban kialakuló nekrotikus testképződéssel.

A D-Arabino-konfigurált timidin-, uridin- és adenzin-analógokat hatékonyan állították elő 3',5'-O-szililén-acetál-védett nukleozid 2'-exometilén-származékok és különböző tiolok, köztük alkiltiolok, tioecetsav és 1-tioszugárok fotoindukált tiol-ének reakcióival. E vegyületek citotoxikus hatását tumoros SCC és egészséges HaCaT sejt vonalakon vizsgáltuk MTT-teszttel. A tizenhat vizsgált nukleozid analóg közül tizenegy származék mutatott koncentrációfüggő citotoxicitást. Az azonos C2'-módosító csoportot tartalmazó vegyületek esetében a pirimidin-nukleozidok nagyobb aktivitást mutattak, mint az adenzin-származékok, míg az összes 1-es cukrot tartalmazó származék inaktív volt, függetlenül a nukleobázis típusától. A

szililvédő csoport, a nukleobázis és a megfelelő C2' szubsztituens döntőnek bizonyult a sejtnövekedést gátló aktivitás szempontjából.

A 11, 13 és 15 pirimidin-nukleozid analógok - amelyek butilszulfanil-metil vagy acetiltiometil szubsztituenssel rendelkeztek-, mutatták a legjobb citotoxicitási profilt: alacsony mikromoláris koncentrációban jelentősen csökkentették a tumoros SCC sejtek életképességét, miközben alig befolyásolták az egészséges HaCaT sejtek életképességét. A legjobb három vegyület, a 11, 13 és 15 hatását a sejtméretre, az osztódási időre és a sejtgenerációs időre vonatkoztatva timelapse mikroszkópiával vizsgáltuk. A tumoros sejt vonal anyasejtjeinek méretének legjelentősebb növekedését a 13. vegyület okozta. A sejtosztódás időtartamát mindkét sejt vonalban szignifikánsan megváltoztatta a 15-ös vegyülettel történő kezelés. Figyelemre méltó, hogy a 13-as vegyület szelektíven csak az SCC sejtekben módosította jelentősen az osztódási időt, 65%-kal növelve azt; ugyanakkor a HaCaT sejtekben alig változtatta meg a sejtosztódási időt. A generációs időt mindhárom vegyület szignifikánsan növelte. Bár az MTT-vizsgálat szerint a 11-es vegyület valamivel erősebben és nagyobb szelektivitással gátolta a tumorsejteket, mint a 13-as vegyület, az time-lapse mikroszkópos vizsgálatokban a 13-as vegyület okozta a legjelentősebb változásokat a citotoxicitásra utaló sejtparaméterekben. Ezért a 13-as 2'-acetiltiometil-uridin-származék vezető szerkezetnek tekinthető az új, hatékonyabb daganatellenes vegyületek tervezésében.

A kísérletek eredményei azt mutatják, hogy az N-153 nukleozid analóg hasonló IC<sub>50</sub> értékekkel rendelkezett a CHO-K1 és a HeLa sejtekben, de az utóbbira nagyobb hatást gyakorolt, amit a fent említett paraméterek változása és a nekrotikus sejtmaradványok idő- és koncentrációfüggő módon történő megjelenése bizonyít. Ezzel szemben az 5-FU vegyület nagyobb hatást gyakorolt a tumoros sejtekre (SCC és a HeLa sejtek), mint a nem tumoros HaCaT sejtekre; valamint idő- és koncentrációfüggő módon indukált nekrotikus sejthalált. A kísérletek azt is kimutatták, hogy az MTX vegyület kisebb hatást gyakorolt a sejtek életképességére,

mint az N-153 vagy az 5-FU. A különböző nukleozid-analógokkal végzett kísérletek azt mutatták, hogy bizonyos módosításokkal, például butilszulfanil-metil vagy acetiltiometil szubsztituensekkel rendelkező vegyületek mutatták a legjobb citotoxicitási profilt, amelyek alacsony mikrogrammos koncentrációban csökkentették az SCC-sejtek életképességét. A kísérletek eredményei rávilágítanak az time-lapse imaging mikroszkópia fontosságára a kémiai vegyületek sejtekre gyakorolt hatásainak vizsgálatában, valamint az IC<sub>50</sub> értékek hasznosságára a sejtnövekedés gátlásának mérőszámaként.

Az értekezésem alapját adó kísérletek során az MTT-tesztet kombináltuk az egyes tumoros sejtvonalakra jellemző, megfelelő IC<sub>50</sub> koncentrációknál végzett time-lapse mikroszkópiával. A time-lapse mikroszkópia a sejtek életképességén kívül a következő további információkat szolgáltatja a nukleozid analóg inhibitorokkal történő kezelés hatására, beleértve a változásokat:

1. sejtméret
2. A leánysejtekre való osztódás (citokinézis) ideje
3. A sejtciklus időtartama
4. A sejthalál mértéke (ha van ilyen)
5. A sejthalál típusa (apoptózis, nekrozis)

Az MTT-teszt a citotoxikus szer gátlásának mértékére vonatkozó információt szolgáltat, függetlenül attól, hogy a sejtek életben maradnak-e vagy sejthalált szenvednek. Az MTT-teszt kiegészítése az time-lapse mikroszkópiával értékes vizuális információt ad, és lehetővé teszi a fénymikroszkópiás képek kvantitatív elemzését. A mikroszkópia és a képelemzés hosszabb, akár több hétig is fenntartható, és kiszélesíti a sejtoxicológiai vizsgálatok horizontját. A kombinált elemzés perspektívái többek között az antimetabolikus, gombaellenes és tumorelles szerek inhibitorainak citotoxicitási szempontjait foglalják magukban.

Más módszerekkel összehasonlítva az MTT-teszt és az time-lapse mikroszkópia kombinált megközelítésének előnye, hogy átfogóbb képet ad a nukleozid-analóg inhibitorok tumorsejtvonalakra gyakorolt hatásáról.

Bár más módszerek, például az áramlási citometria, a fluoreszcens mikroszkópia és a Western blotting értékes információkat nyújtanak a sejtek viselkedésének vagy fehérjeexpressziójának bizonyos aspektusairól, nem biztos, hogy a kezelés sejtekre gyakorolt hatásainak teljes skáláját megragadják. Az áramlási citometria például a sejtciklus előrehaladásának és az apoptózisnak az elemzésére korlátozódik, míg a fluoreszcens mikroszkópia nem feltétlenül alkalmas az időbeli változások nyomon követésére. A Western blotting a fehérjeexpresszió elemzésére korlátozódik, anélkül, hogy a funkcionális hatásokról információt szolgáltatna.

Ezzel szemben az MTT-teszt és a time-lapse mikroszkópia a citotoxicitás mennyiségi mérését, valamint a sejtek viselkedésében és morfológiájában bekövetkező időbeli változások részletes vizuális rögzítését is lehetővé teszi. Ez a megközelítés segíti a nukleozid-analóg inhibitorok tumorsejtvonalakra gyakorolt hatásainak teljesebb megértését, ami potenciálisan új hatóanyagok felismerésekhez és felfedezésekhez vezethet. Emellett a képelemzés alkalmazása objektívebb és reprodukálhatóbb adatelemzést biztosít, csökkentve az emberi hiba és az elfogultság lehetőségét.

## Summary

---

Cancer is one of the leading causes of death worldwide, and its incidence continues to rise. It's no wonder that the use of nucleoside derivatives and analogues as anticancer agents has significantly increased in the field of oncology. Nucleotides, nucleosides, or base analogues alone or in combination with other drugs make up about 20% of cancer therapy. There are now about ten different drugs in this category used in tumor therapy, and demand for such compounds is continuously growing. Purine and pyrimidine analogues are present in clinical practice as antimetabolites. Several macrolactams produced by the *Streptomyces atroolivaceus* species, such as leinamycin, have notable antitumor and antibacterial properties as they can inhibit DNA synthesis. Analogues of leinamycin have shown increased cytotoxic activity against HeLa tumor cells. Especially the lipophilic, silylether-containing derivatives of leinamycin have been found to be active.

The silyl and trityl modified nucleosides proved to be more effective against tumor cell lines than non-modified nucleosides. Among the drug development candidates are compounds that belong to tumor- and antiviral sugar-modified nucleosides. In cancer therapy, the development of nucleosides and nucleic acid analogs that show favorable chemical and biological properties was preferred. Substitution of the oxygen in ribose with different elements such as sulfur, nitrogen, or fluorine resulted in new therapeutic analogs. Examples include 5'-thio-nucleotide derivatives, which are inhibitors of the basic enzymes of nucleic acid biosynthesis, and branched C2', C3' nucleosides, which show tumor- and antiviral activity.

Further potentially active, medically significant compounds with silicon (Si) substituted nucleotides. Such derivatives can result in useful biological compounds similar to their carbon-based forms, both of which have four valence electrons. However, the fundamental electronic structural differences between C and Si atoms

lead to significantly different physical-chemical and pharmacokinetic properties. The Si-C bond length is significantly longer (C-Si, 186 pm) than the C-C bond (C-C, 154 pm), causing differences in size and shape between Si and C-containing analogues. The relatively longer bond distance of Si may result in special protein interactions of silicon-containing derivatives. Bond distances can also explain why pharmacological profiles differ from those of carbon-based derivatives. Due to its higher electropositivity, Si has a greater tendency to lose an electron and form a positive ion than carbon.

Generally, the lipophilic nature of silicon is stronger than that of carbon. Increasing the lipophilic nature can enhance the efficiency of chemical substances entering tissues. This affects the metabolic activity of the liver and the plasma half-life compared to the non-silicon version. The lipophilic nature contributes to faster crossing of the blood-brain barrier by the drug candidate molecule.

The IC<sub>50</sub> values of N-153 were similar in CHO-K1 and HeLa cells. Quantification of the results using time-lapse videomicroscopy showed significant changes in cell size, cell division time, and generation time of cells following treatment with N-153 nucleoside analogue IC<sub>50</sub> concentrations compared to the DMSO control. HeLa cells were the most sensitive to N-153 nucleoside analogue, and the above parameters, as well as the number of remaining necrotic bodies, increased in a time- and concentration-dependent manner compared to the DMSO control.

5-FU decreased the viability of cell cultures at a lower concentration compared to N-153. The MTT assay showed that cell viability decreased by 60% at 5 µg/ml 5-FU, except for CHO-K1 cells. The IC<sub>50</sub> values for HaCaT, SCC, and HeLa cells were lower than 5 µg/ml. Video microscopy quantification showed that tumor cell lines (SCC, HeLa) were more sensitive to 5-FU than the non-tumor HaCaT keratinocyte cell line. Necrotic cell death was characteristic of 5-FU treatment,

except for CHO-K1 cells, where no necrotic remnants were visible in the TLS images. In contrast, necrotic remnants appeared in a time- and concentration-dependent manner in HaCaT, SCC, and HeLa cells after 5-FU treatment.

The experiments also showed that MTX decreased viability to a lesser extent than N-153 or 5-FU. Another notable observation was the high IC<sub>50</sub> value of CHO-K1 cells compared to HaCaT and HeLa cells, consistent with the necrotic body formation observed in these cell lines.

D-Arabino-configured thymidine, uridine, and adenosine analogues were efficiently synthesized by photoinduced thiol-ene reactions of 3',5'-O-silyl acetal-protected nucleoside 2'-exomethylene derivatives and various thiols, including alkyl thiols, thioacetic acid, and 1-thio-β-D-glucose. The cytotoxic effect of these compounds was evaluated on tumor SCC and healthy HaCaT cell lines using the MTT assay. Among the sixteen nucleoside analogues tested, eleven derivatives showed concentration-dependent cytotoxicity. For compounds containing the same C2'-modifier group, the pyrimidine nucleosides exhibited greater activity than the adenosine derivatives, while all derivatives containing the 1-sugar were inactive regardless of the nucleobase type. The silyl protecting group, the nucleobase, and the appropriate C2' substituent were crucial for the inhibitory activity of cell growth.

Analogues of pyrimidine nucleosides with butylsulfonyl-methyl or acetylthiomethyl substituents at positions 2 and 4, namely 11, 13 and 15, demonstrated the best cytotoxicity profile: they significantly reduced the viability of tumor SCC cells at low micromolar concentrations while minimally affecting the viability of healthy HaCaT cells. The effects of the top three compounds, 11, 13, and 15, on cell size, division time, and cell cycle time were examined using time-lapse microscopy. The most significant increase in the size of the progenitor cells of the tumor cell line was caused by compound 13. Treatment with compound 15 significantly altered the duration of cell division in both cell lines. Notably, only

compound 13 selectively altered the division time in SCC cells, significantly increasing it by 65%, while having a negligible effect on the division time of HaCaT cells. The generation time was significantly increased by all three compounds. Although the MTT assay showed that compound 11 inhibited tumor cells slightly more strongly and with greater selectivity than compound 13, time-lapse microscopy revealed that compound 13 caused the most significant changes in cytotoxicity-related cell parameters. Therefore, the 13-acetylthiomethyl-2'-uridine derivative can be considered a lead structure in the design of new and more effective anticancer compounds.

The results of the experiments showed that the N-153 nucleoside analog had similar  $IC_{50}$  values in CHO-K1 and HeLa cells, but had a greater effect on the latter, as evidenced by changes in the aforementioned parameters and the time- and concentration-dependent appearance of necrotic cell remnants. In contrast, the 5-FU compound had a greater effect on tumor cells, such as SCC and HeLa cells, than on non-tumor HaCaT cells, and induced time- and concentration-dependent necrotic cell death. The experiments also showed that the MTX compound had a smaller effect on cell viability than N-153 or 5-FU. Experiments with various nucleoside analogs showed that compounds with certain modifications, such as butylsulfanyl-methyl or acetylthiomethyl substituents, had the best cytotoxicity profile, reducing the viability of SCC cells at low micromolar concentrations. The results of the experiments highlight the importance of time-lapse imaging microscopy in studying the effects of chemical compounds on cells, as well as the usefulness of  $IC_{50}$  values as a measure of growth inhibition.

During the experiments that formed the basis of my dissertation, we combined the MTT assay with time-lapse microscopy performed at the appropriate  $IC_{50}$  concentrations for each cancer cell line. In addition to cell viability, time-lapse microscopy provided the following information on the effects of nucleoside analog inhibitors:

1. Cell size
2. Time to daughter cell division (cytokinesis)
3. Cell cycle duration
4. Level of cell death (if any)
5. Type of cell death (apoptosis, necrosis)

The MTT assay provided information on the extent of cytotoxic inhibition, regardless of whether the cells survived or underwent cell death. The addition of time-lapse microscopy to the MTT assay provided valuable visual information and allowed for quantitative analysis of the brightfield images. Microscopy and image analysis could be maintained for longer periods of time, up to several weeks, thereby expanding the horizon of cell toxicology investigations. The prospects for combined analysis include the cytotoxic aspects of antimetabolites, antifungal agents, and anticancer drugs.

Compared to other methods, the advantage of the combined approach of the MTT assay and time-lapse microscopy is that it provides a more comprehensive understanding of the effects of nucleoside analog inhibitors on tumor cell lines.

Although other methods such as flow cytometry, fluorescent microscopy, and Western blotting provide valuable information on specific aspects of cell behavior or protein expression, they may not capture the full range of effects of treatment on the cells. For example, flow cytometry is limited to analyzing cell cycle progression and apoptosis, while fluorescent microscopy may not be suitable for tracking changes over time. Western blotting is limited to analyzing protein expression without providing information on functional effects.

In contrast, the MTT assay and time-lapse microscopy provide both a quantitative measure of cytotoxicity and a detailed visual record of changes in cell behavior and morphology over time. This approach allows for a more complete understanding of the effects of nucleoside analog inhibitors on tumor cell lines,

potentially leading to new insights and discoveries. Additionally, the use of image analysis provides a more objective and reproducible analysis of the data, reducing the potential for human error and bias.

## Irodalom jegyzék

---

- [1] Sharifi-Rad, Javad, et al. "Natural products and synthetic analogs as a source of antitumor drugs." *Biomolecules* 9.11 (2019): 679.
- [2] Shelton, Jadd, et al. "Metabolism, biochemical actions, and chemical synthesis of anticancer nucleosides, nucleotides, and base analogs." *Chemical reviews* 116.23 (2016): 14379-14455.
- [3] Nagy, Gabor, et al. "Time-lapse analysis of cell death in mammalian and fungal cells." *DNA and Cell Biology* 29.5 (2010): 249-259.
- [3] Nagy, Gabor, Gabor Kiraly, and Gaspar Banfalvi. "Optimization of cell cycle measurement by time-lapse microscopy." *Methods in Cell Biology*. Vol. 112. Academic Press, 2012. 143-161.
- [3] Nagy, Gabor, et al. "Time-lapse video microscopy and image analysis of adherence and growth patterns of *Candida albicans* strains." *Applied microbiology and biotechnology* 98.11 (2014): 5185-5194.
- [4] Galluzzi, Lorenzo, et al. "Mitochondrial gateways to cancer." *Molecular aspects of medicine* 31.1 (2010): 1-20.
- [4] Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. "The hallmarks of cancer." *cell* 100.1 (2000): 57-70.
- [4] DeBerardinis, Ralph J., et al. "Brick by brick: metabolism and tumor cell growth." *Current opinion in genetics & development* 18.1 (2008): 54-61.
- [4] Michalopoulou, Evdokia, Vinay Bulusu, and Jurre J. Kamphorst. "Metabolic scavenging by cancer cells: when the going gets tough, the tough keep eating." *British journal of cancer* 115.6 (2016): 635-640.
- [4] Ward, Patrick S., and Craig B. Thompson. "Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate." *Cancer cell* 21.3 (2012): 297-308.
- [4] Cheong, Jae-Ho, et al. "Dual inhibition of tumor energy pathway by 2-deoxyglucose and metformin is effective against a broad spectrum of preclinical cancer models." *Molecular cancer therapeutics* 10.12 (2011): 2350-2362.
- [4] Shafae, Abbas, et al. "Inhibition of tumor energy pathways for targeted esophagus cancer therapy." *Metabolism* 64.10 (2015): 1193-1198.
- [4] Hamanaka, R. B., & Chandel, N. S. (2012). Targeting glucose metabolism for cancer therapy. *Journal of Experimental Medicine*, 209(2), 211-215.
- [4] Lunt, Sophia Y., and Matthew G. Vander Heiden. "Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation." *Annual review of cell and developmental biology* 27 (2011): 441-464.
- [4] Rodríguez-Enríquez, Sara, et al. "Canonical and new generation anticancer drugs also target energy metabolism." *Archives of toxicology* 88.7 (2014): 1327-1350.
- [4] Serkova, Natalie J., and S. Gail Eckhardt. "Metabolic imaging to assess treatment response to cytotoxic and cytostatic agents." *Frontiers in oncology* 6 (2016): 152.
- [4] İçli, Fikri, et al. "Severe vascular toxicity associated with cisplatin-based chemotherapy." *Cancer* 72.2 (1993): 587-593.

- [5] Bortner, C. D., et al. "T-cell development of resistance to apoptosis is driven by a metabolic shift in carbon source and altered activation of death pathways." *Cell Death & Differentiation* 23.5 (2016): 889-902.
- [5] Fernández-Ramos, Ana A., et al. "The effect of immunosuppressive molecules on T-cell metabolic reprogramming." *Biochimie* 127 (2016): 23-36.
- [6] Koppenol, Willem H., Patricia L. Bounds, and Chi V. Dang. "Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism." *Nature Reviews Cancer* 11.5 (2011): 325-337.
- [6] Vander Heiden, Matthew G., Lewis C. Cantley, and Craig B. Thompson. "Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation." *science* 324.5930 (2009): 1029-1033.
- [6] Skoura, Evangelia, et al. "Role of positron emission tomography in the early prediction of response to chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer." *Clinical lung cancer* 13.3 (2012): 181-187.
- [6] Gatenby, Robert A., and Robert J. Gillies. "Why do cancers have high aerobic glycolysis?." *Nature reviews cancer* 4.11 (2004): 891-899.
- [6] Warburg, Otto. "On the origin of cancer cells." *Science* 123.3191 (1956): 309-314.
- [6] Ramsay, Emma E., Philip J. Hogg, and Pierre J. Dilda. "Mitochondrial metabolism inhibitors for cancer therapy." *Pharmaceutical research* 28.11 (2011): 2731-2744.
- [6] Weinberg, Frank, et al. "Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107.19 (2010): 8788-8793.
- [6] Scatena, Roberto. "Mitochondria and cancer: a growing role in apoptosis, cancer cell metabolism and dedifferentiation." *Advances in Mitochondrial Medicine* (2012): 287-308.
- [6] Hosios, Aaron M., et al. "Amino acids rather than glucose account for the majority of cell mass in proliferating mammalian cells." *Developmental cell* 36.5 (2016): 540-549.
- [7] Martinez-Outschoorn, Ubaldo E., et al. "Energy transfer in " parasitic " cancer metabolism: mitochondria are the powerhouse and Achilles' heel of tumor cells." *Cell cycle* 10.24 (2011): 4208-4216.
- [7] Pavlides, Stephanos, et al. "The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma." *Cell cycle* 8.23 (2009): 3984-4001.
- [7] Sotgia, Federica, et al. "Mitochondrial metabolism in cancer metastasis: visualizing tumor cell mitochondria and the "reverse Warburg effect" in positive lymph node tissue." *Cell Cycle* 11.7 (2012): 1445-1454.
- [7] Ribatti, D., G. Mangialardi, and A. Vacca. "Stephen Paget and the 'seed and soil' theory of metastatic dissemination." *Clinical and experimental medicine* 6.4 (2006): 145-149.
- [7] Hui, Lanlan, and Ye Chen. "Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil." *Cancer letters* 368.1 (2015): 7-13.
- [7] Sanità, Patrizia, et al. "Tumor-stroma metabolic relationship based on lactate shuttle can sustain prostate cancer progression." *BMC cancer* 14.1 (2014): 1-14.
- [7] Semenza, Gregg L. "Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate." *The Journal of clinical investigation* 118.12 (2008): 3835-3837.

- [7] Semenza, Gregg L. "Oxygen sensing, homeostasis, and disease." *New England Journal of Medicine* 365.6 (2011): 537-547.
- [7] Yecies, Jessica L., and Brendan D. Manning. "Chewing the fat on tumor cell metabolism." *Cell* 140.1 (2010): 28-30.
- [7] Zhang, Junyong, et al. "Monoacylglycerol lipase: a novel potential therapeutic target and prognostic indicator for hepatocellular carcinoma." *Scientific reports* 6.1 (2016): 1-13.
- [7] Kalyanaraman, Balaraman. "Teaching the basics of cancer metabolism: Developing antitumor strategies by exploiting the differences between normal and cancer cell metabolism." *Redox biology* 12 (2017): 833-842.
- [8] Kalyanaraman, Balaraman. "Teaching the basics of cancer metabolism: Developing antitumor strategies by exploiting the differences between normal and cancer cell metabolism." *Redox biology* 12 (2017): 833-842.
- [9] Wu, Min-Hsien, Song-Bin Huang, and Gwo-Bin Lee. "Microfluidic cell culture systems for drug research." *Lab on a Chip* 10.8 (2010): 939-956.
- [10] Verjans, Eddy-Tim, et al. "Three-dimensional cell culture models for anticancer drug screening: Worth the effort?." *Journal of cellular physiology* 233.4 (2018): 2993-3003.
- [11] Jensen, Caleb, and Yong Teng. "Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture?." *Frontiers in molecular biosciences* 7 (2020): 33.
- [12] Balis, F. M. (2002). Evolution of anticancer drug discovery and the role of cell-based screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(2), 78-79
- [12] Xu, J. J., Diaz, D., & O'Brien, P. J. (2004). Applications of cytotoxicity assays and pre-lethal mechanistic assays for assessment of human hepatotoxicity potential. *Chemico-biological interactions*, 150(1), 115-128.
- [12] O'Brien, P., & Haskins, J. R. (2006). In vitro cytotoxicity assessment. *High Content Screening: A Powerful Approach to Systems Cell Biology and Drug Discovery*, 415-425.
- [13] Astashkina, A., Mann, B., & Grainger, D. W. (2012). A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. *Pharmacology & therapeutics*, 134(1), 82-106.
- [14] Astashkina, A., Mann, B., & Grainger, D. W. (2012). A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. *Pharmacology & therapeutics*, 134(1), 82-106.
- [15] Ghosh, S., Spagnoli, G. C., Martin, I., Ploegert, S., Demougin, P., Heberer, M., & Reschner, A. (2005). Three-dimensional culture of melanoma cells profoundly affects gene expression profile: A high density oligonucleotide array study. *Journal of cellular physiology*, 204(2), 522-531.
- [15] Lim, S. W., Li, C., Ahn, K. O., Kim, J., Moon, I. S., Ahn, C., ... & Yang, C. W. (2005). Cyclosporine-induced renal injury induces toll-like receptor and maturation of dendritic cells. *Transplantation*, 80(5), 691-699.
- [16] Konopleva, M., Thall, P. F., Yi, C. A., Borthakur, G., Coveler, A., Bueso-Ramos, C., ... & Kantarjian, H. (2015). Phase I/II study of the hypoxia-activated prodrug PR104 in refractory/relapsed acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia. *haematologica*, 100(7), 927.

- [16] Zhang, H. M., Zhao, L., Li, H., Xu, H., Chen, W. W., & Tao, L. (2014). Research progress on the anticarcinogenic actions and mechanisms of ellagic acid. *Cancer biology & medicine*, 11(2), 92.
- [16] Lee, E. Y., & Muller, W. J. (2010). Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(10), a003236.
- [16] Shortt, J., & Johnstone, R. W. (2012). Oncogenes in cell survival and cell death. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(12), a009829.
- [16] Brown, G. (2021). Oncogenes, proto-oncogenes, and lineage restriction of cancer stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 9667.
- [17] Astashkina, A., Mann, B., & Grainger, D. W. (2012). A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. *Pharmacology & therapeutics*, 134(1), 82-106.
- [18] Murugan, A. K., Grieco, M., & Tsuchida, N. (2019, December). RAS mutations in human cancers: Roles in precision medicine. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 59, pp. 23-35). Academic Press.
- [19] Petitjean, A., Achatz, M. I. W., Borresen-Dale, A. L., Hainaut, P., & Olivier, M. (2007). TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene*, 26(15), 2157-2165.
- [20] Kontomanolis, E. N., Koutras, A., Syllaios, A., Schizas, D., Mastoraki, A., Garmpis, N., ... & Fasoulakis, Z. (2020). Role of oncogenes and tumor-suppressor genes in carcinogenesis: a review. *Anticancer research*, 40(11), 6009-6015.
- [21] Helmy, K. Y., Patel, S. A., Nahas, G. R., & Rameshwar, P. (2013). Cancer immunotherapy: accomplishments to date and future promise. *Therapeutic delivery*, 4(10), 1307-1320.
- [22] Brücher, B. L., & Jamall, I. S. (2014). Epistemology of the origin of cancer: a new paradigm. *BMC cancer*, 14(1), 1-15.
- [23] Zhang, Hongming, and Jibei Chen. "Current status and future directions of cancer immunotherapy." *Journal of cancer* 9.10 (2018): 1773.
- [23] Esfahani, K., et al. "A review of cancer immunotherapy: from the past, to the present, to the future." *Current Oncology* 27.s2 (2020): 87-97.
- [23] Yang, Ling, Qian Ning, and Sheng-song Tang. "Recent advances and next breakthrough in immunotherapy for cancer treatment." *Journal of Immunology Research* 2022 (2022).
- [24] Gonzalez, Hugo, Catharina Hagerling, and Zena Werb. "Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression." *Genes & development* 32.19-20 (2018): 1267-1284.
- [24] Mukherjee, Anirban Goutam, et al. "Role of Immune Cells and Receptors in Cancer Treatment: An Immunotherapeutic Approach." *Vaccines* 10.9 (2022): 1493.
- [24] Hiam-Galvez, Kamir J., Breanna M. Allen, and Matthew H. Spitzer. "Systemic immunity in cancer." *Nature reviews cancer* 21.6 (2021): 345-359.
- [25] Wang, Ping, et al. "Robust growth of Escherichia coli." *Current biology* 20.12 (2010): 1099-1103.

- [26] Ollion, Jean, Marina Elez, and Lydia Robert. "High-throughput detection and tracking of cells and intracellular spots in mother machine experiments." *Nature protocols* 14.11 (2019): 3144-3161.
- [27] Luro, Scott, et al. "Isolating live cells after high-throughput, long-term, time-lapse microscopy." *Nature methods* (2019): 1-8.
- [28] Taylor, Jonathan M., et al. "Adaptive prospective optical gating enables day-long 3D time-lapse imaging of the beating embryonic zebrafish heart." *Nature communications* 10.1 (2019): 1-15.
- [28] Hansen, A. S., Hao, N., & O'shea, E. K. (2015). High-throughput microfluidics to control and measure signaling dynamics in single yeast cells. *Nature protocols*, 10(8), 1181
- [29] Berdeu, Anthony, et al. "Lens-free microscopy for 3D+ time acquisitions of 3D cell culture." *Scientific reports* 8.1 (2018): 1-9.
- [30] Gritti, Nicola, et al. "Long-term time-lapse microscopy of *C. elegans* post-embryonic development." *Nature communications* 7.1 (2016): 1-9.
- [31] Bzymek, Robert, et al. "Real-time two-and three-dimensional imaging of monocyte motility and navigation on planar surfaces and in collagen matrices: roles of Rho." *Scientific reports* 6 (2016): 25016.
- [32] Kuru, Erkin, et al. "Synthesis of fluorescent D-amino acids and their use for probing peptidoglycan synthesis and bacterial growth in situ." *Nature protocols* 10.1 (2015): 33-52.
- [33] Li, Q., Rycaj, K., Chen, X., & Tang, D. G. (2015, December). Cancer stem cells and cell size: a causal link?. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 35, pp. 191-199). Academic Press.
- [34] de Carvalho Figueiras, M., Morrot, A., Soares, P. M. G., Costa, M. L., & Mermelstein, C. (2013). Effects of 5-fluorouracil in nuclear and cellular morphology, proliferation, cell cycle, apoptosis, cytoskeletal and caveolar distribution in primary cultures of smooth muscle cells. *PLoS One*, 8(4), e63177.
- [35] De Angelis, P. M., Svendsrud, D. H., Kravik, K. L., & Stokke, T. (2006). Cellular response to 5-fluorouracil (5-FU) in 5-FU-resistant colon cancer cell lines during treatment and recovery. *Molecular cancer*, 5(1), 20.
- [36] Eichholtz, H, and Trott, K. R., "Effect of methotrexate concentration and exposure time on mammalian cell survival in vitro." *British journal of cancer* vol. 41,2 (1980): 277-84.
- [37] Herman, S., Zurgil, N., & Deutsch, M. (2005). Low dose methotrexate induces apoptosis with reactive oxygen species involvement in T lymphocytic cell lines to a greater extent than in monocytic lines. *Inflammation Research*, 54(7), 273-280.
- [38] Cotte, C., et al. "Preparation of highly purified cytotrophoblast from human placenta with subsequent modulation to form syncytiotrophoblast in monolayer cultures." *In vitro* 16.8 (1980): 639-646.
- [39] Sand, P. K., Stubblefield, P. A., & Ory, S. J. (1986). Methotrexate inhibition of normal trophoblasts in vitro. *American journal of obstetrics and gynecology*, 155(2), 324-329.
- [40] Held, J., Mosheimer-Feistritz, B., Gruber, J., Mur, E., & Weiss, G. (2018). Methotrexate therapy impacts on red cell distribution width and its predictive value for cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *BMC rheumatology*, 2(1), 6.

- [41] Schwartz, P. M., Barnett, S. K., Atillasoy, E. S., & Milstone, L. M. (1992). Methotrexate induces differentiation of human keratinocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(2), 594-598.
- [42] Taylor, I. W., & Tattersall, M. H. (1981). Methotrexate cytotoxicity in cultured human leukemic cells studied by flow cytometry. *Cancer research*, 41(4), 1549-1558.
- [43] Benz, C. H. R. I. S., Schoenberg, M. A. R. K., Choti, M. I. K. E., & Cadman, E. (1980). Schedule-dependent cytotoxicity of methotrexate and 5-fluorouracil in human colon and breast tumor cell lines. *The Journal of Clinical Investigation*, 66(5), 1162-1165.
- [44] Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., ... & Turk, B. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25(3), 486-541.
- [44] Kanduc, D., Mittelman, A., Serpico, R. O. S. A. R. I. O., Sinigaglia, E., Sinha, A. A., Natale, C., ... & Farber, E. M. A. N. U. E. L. (2002). Cell death: apoptosis versus necrosis. *International journal of oncology*, 21(1), 165-170.
- [44] Zhang, D. W., Shao, J., Lin, J., Zhang, N., Lu, B. J., Lin, S. C., ... & Han, J. (2009). RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science*, 325(5938), 332-336.
- [45] Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
- [46] He, S., & Wang, X. (2018). RIP kinases as modulators of inflammation and immunity. *Nature immunology*, 19(9), 912-922.
- [47] He, S., Wang, L., Miao, L., Wang, T., Du, F., Zhao, L., & Wang, X. (2009). Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF- $\alpha$ . *Cell*, 137(6), 1100-1111.
- [47] Cho, Y., Challa, S., Moquin, D., Genga, R., Ray, T. D., Guildford, M., & Chan, F. K. M. (2009). Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell*, 137(6), 1112-1123.
- [48] Boukamp, Petra, et al. "Sustained nontumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosome content during long-term culture of the human keratinocyte line HaCaT." *Genes, Chromosomes and Cancer* 19.4 (1997): 201-214.
- [49] Akaza N, Akamatsu H, Kishi M, Mizutani H, Nakata S, Matsunaga K (2011) Normal human epidermal keratinocytes react differently than HaCaT keratinocyte cell line on exposure to *Propionibacterium acnes*. *J Dermatol* 38(5):499-502.
- [50] Hwang-Bo, J., Park, J. H., & Chung, I. S. (2015). Tumstatin induces apoptosis mediated by Fas signaling pathway in oral squamous cell carcinoma SCC-VII cells. *Oncology letters*, 10(2), 1016-1022.
- [51] O'Malley, B. W., Cope, K. A., Johnson, C. S., & Schwartz, M. R. (1997). A new immunocompetent murine model for oral cancer. *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery*, 123(1), 20-24.
- [52] Sominski, Devon D., et al. "Development of a squamous cell carcinoma mouse model for immunotoxicity testing." *Journal of immunotoxicology* 13.2 (2016): 226-234.

- [53] Kanazawa, H., Rapacchietta, D., & Kallman, R. F. (1988). Schedule-dependent therapeutic gain from the combination of fractionated irradiation and cis-diamminedichloroplatinum (II) in C3H/Km mouse model systems. *Cancer research*, 48(11), 3158-3164.
- [54] Lewis, Nathan E., et al. "Genomic landscapes of Chinese hamster ovary cell lines as revealed by the *Cricetulus griseus* draft genome." *Nature biotechnology* 31.8 (2013): 759.
- [55] Beskow LM (2016) Lessons from HeLa Cells: The Ethics and Policy of Biospecimens. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 17:395-417
- [56] Landry JJM, Pyl PT, Rausch T, Zichner T, Tekkedil MM, Stütz AM, Jauch A, Aiyar RS, Pau G, Delhomme N, Gagneur J, Korbel JO, Huber W, Steinmetz LM (2013) The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. *G3 (Bethesda)* 3(8):1213-1224
- [57] Rahbari R, Sheahan T, Modes V, Collier P, Macfarlane C, Badge RM (2009) A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification. *Biotechniques* 46(4):277-284
- [58] de Abreu Costa, Lucas, et al. "Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Decreases Cell Proliferation and TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and IL-2 Cytokines Production in Cultures of Peripheral Blood Lymphocytes." *Molecules* 22.11 (2017): 1789.
- [59] Ferk, P., & Dariš, B. (2018). The influence of dimethyl sulfoxide (DMSO) on metabolic activity and morphology of melanoma cell line WM-266-4. *Cellular and Molecular Biology*, 64(11), 41-43.
- [57] Holthaus, L., Lamp, D., Gavrisan, A., Sharma, V., Ziegler, A. G., Jastroch, M., & Bonifacio, E. (2018). CD4+ T cell activation, function, and metabolism are inhibited by low concentrations of DMSO. *Journal of immunological methods*, 463, 54-60.
- [60] Nagy, Gabor, et al. "Time-lapse video microscopy and image analysis of adherence and growth patterns of *Candida albicans* strains." *Applied microbiology and biotechnology* 98.11 (2014): 5185-5194.
- [61] Nagy G, Pinter G, Kohut G, Adam AL, Trencsenyi G, Hornok L, Banfalvi G (2010) Time-lapse analysis of cell death in mammalian and fungal cells. *DNA Cell Biol* 29(5):249-59
- [62] <https://fiji.sc/>
- [63] Bege, Miklós, et al. "A low-temperature, photoinduced thiol–ene click reaction: a mild and efficient method for the synthesis of sugar-modified nucleosides." *Organic & Biomolecular Chemistry* 15.43 (2017): 9226-9233.
- [64] Blanke, Charles D., Claus Rödel, and Mark S. Talamonti, eds. *Gastrointestinal Oncology: A Practical Guide*. Springer Science & Business Media, 2010.
- [65] Ghoshal, Kalpana, and Samson T. Jacob. "Specific inhibition of pre-ribosomal RNA processing in extracts from the lymphosarcoma cells treated with 5-fluorouracil." *Cancer research* 54.3 (1994): 632-636.
- [66] Liu, Lu, and Daniel V. Santi. "5-Fluoro-2'-deoxycytidine 5'-monophosphate is a mechanism-based inhibitor of thymidylate synthase." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1209.1 (1994): 89-94.
- [67] Wecker, Lynn. *Brody's Human Pharmacology*. Elsevier Health Sciences, 2018.
- [68] NCBI, PubChem Database. Methotrexate

- [69] Schwartz A, Sugg H, Ritter T and Fernandez-Repollet E: Direct determination of cell diameter, surface area, and volume with an electronic volume sensing flow cytometer. *Cytometry* 3(6): 456- 458, 1983. PMID: 6851794. DOI: 10.1002/cyto.990030613
- [70] Schwartz PM, Barnett SK, Atilasoy ES and Millstone LM: Methotrexate induces differentiation of human keratinocytes. *Proceed Natl Academy Sci* 89(2): 594-598, 1992. PMID: 1731329. DOI: 10.1073/pnas.89.2.594
- [69] Grönroos M, Chen M, Jahnukainen T, Capitanio A, Aizman RI and Celsi G: Methotrexate induces cell swelling and necrosis in renal tubular cells. *Pediatr Blood Cancer* 46(5): 624-629, 2006. PMID: 16025437. DOI: 10.1002/pbc.20471
- [71] Taylor IW and Tattersall MH: Methotrexate cytotoxicity in cultured human leukemic cells studied by flow cytometry. *Cancer Res* 41(4): 1549-1558, 1981. PMID: 6163527.
- [71] Benz C, Schoenberg M, Choti M and Cadam E: Schedule- dependent cytotoxicity of methotrexate and 5-fluorouracil in human colon and breast tumour cell lines. *J Clin Invest* 66(5): 1162-1165, 1980. PMID: 7430346. DOI: 10.1172/JCI109946
- [72] Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
- [73] Szilágyi, Á.; Fenyvesi, F.; Majercsik, O.; Pelyvás, I.F.; Bácskay, I.; Fehér, P.; Váradi, J.; Vecsernyés, M.; Herczegh, P. Synthesis and Cytotoxicity of Leinamycin Antibiotic Analogues. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 5626–5630. <https://doi.org/10.1021/jm060471h>.
- [74] Peterson, M.A.; Oliveira, M.; Christiansen, M.A.; Cutler, C.E. Preliminary SAR analysis of novel antiproliferative N6,5'-bisureidoadenosine derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 6775–6779. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.09.083>.
- [74] Shelton, J.R.; Cutler, C.E.; Browning, M.S.; Balzarini, J.; Peterson, M.A. Synthesis and SAR of 2',3'-bis-O-substituted N6,5'-bisureidoadenosine derivatives: Implications for prodrug delivery and mechanism of action. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22,6067–6071. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.08.050>.
- [75] Bege, M.; Kiss, A.; Kicsák, M.; Bereczki, I.; Baksa, V.; Király, G.; Szemán-Nagy, G.; Szigeti, M.Z.; Herczegh, P.; Borbás, A. Synthesis and cytostatic effect of 3'-deoxy-3'-C sulfanylmethyl nucleoside derivatives with D-xylo configuration. *Molecules* **2019**, 24, 2173–2196. <https://doi.org/10.3390/molecules24112173>.
- [76] Chamorro, C.; Pérez-Pérez, M.J.; Rodríguez-Barrios, F.; Gago, F.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; San-Félix, A.; Camarasa, M.J. Exploring the role of the 5'-position of TSAO-T. Synthesis and anti-HIV evaluation of novel TSAO-T derivatives. *Antivir. Res.* **2001**, 50, 207–222. [https://doi.org/10.1016/s0166-3542\(01\)00145-0](https://doi.org/10.1016/s0166-3542(01)00145-0).
- [77] Harmse, L.; Dahan-Farkas, N.; Panayides, J.L.; van Otterlo, W.; Penny, C. Aberrant Apoptotic Response of Colorectal Cancer Cells to Novel Nucleoside Analogues. *PLoS One* **2015**, 10, e0138607. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138607>.
- [78] Shelton J, Lu X, Hollenbaugh JA, Cho JH, Amblard F and Schinazi RF: Metabolism, biochemical actions, and chemical synthesis of anticancer nucleosides, nucleotides, and base analogues. *Chem Rev* 116(23): 14379-14455, 2016. PMID: 27960273. DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00209

- [79] Hara M, Saitoh Y and Nakano H: DNA strand scission by the novel antitumor antibiotic leinamycin. *Biochem* 29(24): 5676- 5681, 1990. PMID: 2383554. DOI: 10.1021/bi00476a005
- [80] Asai A, Hara M, Kakita S, Kanda Y, Yoshida M, Saito H and Saitoh Y: Thiol-mediated DNA alkylation by the novel antitumor antibiotic leinamycin. *J Am Chem Soc* 118(28): 6802-6803, 1996. DOI: 10.1021/ja960892w
- [81] Szilagyi A, Fenyvesi F, Majercsik O, Pelyvas IF, Bacskay I, Feher P, Varadi J, Vecsernyes M and Herczegh P: Synthesis and cytotoxicity of leinamycin antibiotic analogs. *J Med Chem* 49(18): 5626-5630, 2006. PMID: 16942037. DOI: 10.1021/jm060471h
- [82] Panayides, J.L.; Mathieu, V.; Banuls, L.M.Y.; Apostolellis, H.; Dahan-Farkas, N.; Davids de Leonie Harmse, H.; Rey, M.E.C.; Green, I.R.; Pelly, S.C.; Kiss, R.; et al. Synthesis and in vitro growth inhibitory activity of novel silyl- and trityl-modified nucleosides. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 2716–2724. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.04.036>.
- [83] Bege M, Kiss A, Kicsák M, Bereczki I, Baksa V, Király G, Szemán-Nagy G, Szigeti MZ, Herczegh P and Borbás A: Synthesis and cytostatic effect of 3'-deoxy-3'-C-sulfanylmethyl nucleoside derivatives with d-xylo configuration. *Molecules* 24(11): 2173, 2019. PMID: 31185601. DOI: 10.3390/molecules24112173
- [83] Guinan M, Benckendorff C, Smith M and Miller GJ: Recent advances in the chemical synthesis and evaluation of anticancer nucleoside analogues. *Molecules* 25(9): 2050, 2020. PMID: 32354007. DOI: 10.3390/molecules25092050
- [84] Mills JS and Showell GA: Exploitation of silicon medicinal chemistry in drug discovery. *Expert Opinion Invest Drugs* 13(9): 1149-1157, 2004. PMID: 15330746. DOI: 10.1517/13543784.13.9.1149

# Ábra jegyzék

1. ábra A sejtek osztódásának egyszerű szemléltetése ([7] Kalyanaraman 2017) .....	6
2. ábra A daganatos sejtek kontroll nélküli növekedésének szemléltetése ([7] Kalyanaraman 2017) .....	7
3. ábra Glikolízis és fontos metabolitja ([7] Kalyanaraman 2017) .....	10
4. ábra A citromsav ciklus és fontos metabolitjai ( <a href="https://hu.wikipedia.org/wiki/Citromsavciklus">https://hu.wikipedia.org/wiki/Citromsavciklus</a> ) .....	11
5. ábra Terminális oxidáció.....	13
6. ábra Oxigén grádiens csökkenése, laktát transzfer a daganatokban ([7] Kalyanaraman 2017) .....	15
7. ábra A zsírsav anyagcsere szerepe a daganatos sejtekben ([7] Kalyanaraman 2017).....	16
8. ábra A gyógyszerjelöltek azonosítási lépései.....	23
9. ábra Sejthalál mechanizmusok (Kearney et al., 2017).....	57
10. ábra Karakterisztikus morfológiai változások az apoptózis során (Nagy et al., 2010) .....	58
11. ábra Az apoptózis kialakulásának időbeli profilja (Nagy et al., 2010) .....	59
12. ábra Nekrotikus HaCaT-sejtpusztulás magas ólom koncentrációval történő kezelés után (Nagy et al., 2010) .....	60
13. ábra A nekrotikus sejtfelszín növekedésének időbeli fázisai (Nagy et al., 2010).....	61
14. ábra Stack Deflicker.....	69
15. ábra Anyasejt kiválasztása .....	70
16. ábra Sejtosztódás idejének meghatározása .....	71
17. ábra Az <i>Orthogonal Views</i> parancs eredménye .....	72
18. ábra Az osztódási idő mérése.....	72
19. ábra A mérés eredménye.....	73
20. ábra A) Generációs idő meghatározása.....	74
21. ábra B) Generációs idő meghatározása.....	74
22. ábra <i>Bandpass filter</i> alkalmazása (A, B ábrák).....	75
23. ábra Mérhető anyasejt.....	76
24. ábra <i>Threshold</i> beállításai (A, B ábrák) .....	77
25. ábra <i>Threshold</i> további beállításai .....	77
26. ábra Sejtméret meghatározás eszköze.....	78
27. ábra A mérés eredménye.....	78
28. ábra a) N-153, b) 5-fluorouracil, c) metotrexát.....	80
29. ábra Módosított nukleozid analógok képletei .....	81
30. ábra Az N-153 MTT életképességi vizsgálata különböző sejtvonalakon. ....	90
31. ábra Az 5-FU MTT életképességi vizsgálata különböző sejtvonalakon. ....	91
32. ábra Az MTX MTT életképességi vizsgálata különböző sejtvonalakon.....	92
33. ábra A sejttátmérő és a sejttérfogat változásai. ....	95
34. ábra A sejtosztódás ideje (perc). ....	99
35. ábra A sejtciklus időtartama (h) .....	102
36. ábra Nekrotikus testek képződése N-153 kezelést követően. ....	106

37. ábra A reziduális testek képződése sejt kultúrákban N-153 jelenlétében az idő függvényében.....	108
38. ábra A maradványtestek kialakulása 5-FU-kezelést követően.....	109
39. ábra A maradványtestek vizualizálása sejt kultúrákban 5-FU jelenlétében az idő függvényében.....	110
40. ábra A maradványtestek felhalmozódása sejt kultúrákban MTX jelenlétében az idő függvényében.....	111
41. ábra Maradványtestek képződése MTX-kezelés után.....	112
42. ábra A 11. (a), 13. (b) és 15. (c) vegyületek hatása a HaCaT és SCC sejtek életképességére MTT-vizsgálattal. ....	115
43. ábra A 6, 8, 10 és 12 vegyületek hatása a HaCaT és SCC sejtek életképességére MTT-teszt alkalmazásával.....	116
44. ábra A 14, 16, 28 és 29-ara vegyületek hatása a HaCaT és SCC sejtek életképességére MTT-teszt alkalmazásával.....	118
45. ábra A DMSO és a 11, 13 és 15 vegyületek hatása a HaCaT és SCC sejtek anyasejtméretére. ....	120
46. ábra A DMSO és a 11., 13. és 15. vegyület hatása a HaCaT és SCC sejtek sejtosztódásának időtartamára. ....	122
47. ábra A DMSO és a 11., 13. és 15. vegyületek hatása a HaCaT és SCC sejtek generációs idejére .....	124

## Táblázatok jegyzék

1. Táblázat Az N-153-as vegyületre jellemző IC <sub>50</sub> koncentrációk.....	89
2. Táblázat Az 5-FU IC <sub>50</sub> koncentrációi különböző sejt vonalak esetében.....	91
3. Táblázat Az MTX IC <sub>50</sub> koncentrációi különböző sejt vonalakban .....	93
4. Táblázat Az anyasejtek méretének százalékos változása IC <sub>50</sub> koncentráció hatására.....	96
5. Táblázat A sejtosztódási idő változása antimetabolitok IC <sub>50</sub> koncentrációi jelenlétében .....	98
6. Táblázat A sejt ciklus időtartamának változása az N-153 IC <sub>50</sub> koncentrációjú kezelését követően.....	101
7. Táblázat A vegyületek citotoxikus aktivitása egészséges (HaCaT) és tumoros (SCC) sejt vonalakon. ....	115
8. Táblázat A 11, 13 és 15 vegyületek <sup>a</sup> hatása az anyasejtek méretére.....	121
9. Táblázat A 11, 13 és 15 vegyületek <sup>a</sup> hatása a HaCaT és SCC sejtek sejtosztódásának időtartamára. ....	122
10. Táblázat A 11, 13 és 15 vegyületek <sup>a</sup> hatása a HaCaT és SCC sejtek generációs idejére...	124

# Tudományos teljesítmény

## **Az értekezés alapját képező publikációk:**

**Kiss, A.**, Baksa, V., Bege, M., Talas, L., Borbás, A., Bereczki, I., ... & Szemán-Nagy, G. (2021). MTT Test and time-lapse microscopy to evaluate the antitumor potential of nucleoside analogues. *Anticancer Research*, 41(1), 137-149.

### **Impakt faktor: 2.435**

Bege, M.\*, **Kiss, A.\***, Bereczki, I., Hodek, J., Polyák, L., Szemán-Nagy, G., ... & Borbás, A. (2022). Synthesis and Anticancer and Antiviral Activities of C-2'-Branched Arabinonucleosides. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20), 12566.

\*megosztott első szerzői hely

### **Impakt faktor: 6.208**

## **Egyéb publikációk:**

Nagy, G., Baksa, V., **Kiss, A.**, Turani, M., & Banfalvi, G. (2017). Gadolinium induced effects on mammalian cell motility, adherence and chromatin structure. *Apoptosis*, 22, 188-199.

### **Impakt faktor: 3.967**

Nagy, M., Rácz, D., Nagy, Z. L., Fehér, P. P., Kalmár, J., Fábíán, I., ... **Kiss A.**, & Kéki, S. (2018). Solvatochromic isocyanonaphthalene dyes as ligands for silver (I) complexes, their applicability in silver (I) detection and background reduction in biolabelling. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 255, 2555-2567.

### **Impakt faktor: 6.393**

Nagy, Z., Nagy, M., **Kiss, A.**, Rácz, D., Barna, B., Könczöl, P., ... & Szemán-Nagy, G. (2018). MICAN, a new fluorophore for vital and non-vital staining of human cells. *Toxicology in Vitro*, 48, 137-145.

**Impakt faktor: 3.067**

Bege, M., **Kiss, A.**, Kicsák, M., Bereczki, I., Baksa, V., Király, G., ... & Borbás, A. (2019). Synthesis and cytostatic effect of 3'-deoxy-3'-C-sulfanylmethyl nucleoside derivatives with d-xylo configuration. *Molecules*, 24(11), 2173.

**Impakt faktor: 3.267**

Nagy, M., Rácz, D., Nagy, Z. L., Fehér, P. P., Kovács, S. L., Bankó, C., ... **Kiss A.**, Zsuga M., & Kéki, S. (2019). Amino-isocyanoacridines: Novel, tunable solvatochromic fluorophores as physiological pH probes. *Scientific Reports*, 9(1), 8250.

**Impakt faktor: 3.998**

Nagy, M., Szemán-Nagy, G., **Kiss, A.**, Nagy, Z. L., Tálás, L., Rácz, D., ... & Kéki, S. (2020). Antifungal activity of an original amino-isocyanonaphthalene (ICAN) compound family: Promising broad spectrum antifungals. *Molecules*, 25(4), 903.

**Impakt faktor: 4.411**

Herman, P.\*, **Kiss, A.\***, Fábíán, I., Kalmár, J., & Nagy, G. (2021). In situ remediation efficacy of hybrid aerogel adsorbent in model aquatic culture of *Paramecium caudatum* exposed to Hg (II). *Chemosphere*, 275, 130019.

\*megosztott első szerzői hely

**Impakt faktor: 8.943**

Szigeti, Z. M., Tálás, L., Széles, A., Hargitai, Z., Nagy, Z. L., Nagy, M., **Kiss A.**, Kéki S., & Szemán-Nagy, G. (2022). Potential Original Drug for Aspergillosis: In

Vitro and In Vivo Effects of 1-N, N-Dimethylamino-5-Isocyanonaphthalene (DIMICAN) on *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Fungi*, 8(10), 985.

**Impakt faktor: 5.724**

Demeter, F., Török, P., **Kiss, A.**, Kovásznai-Oláh, R., Szigeti, Z. M., Baksa, V., ... & Herczeg, M. (2023). First Synthesis of DBU-Conjugated Cationic Carbohydrate Derivatives and Investigation of Their Antibacterial and Antifungal Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3550.

**Impakt faktor: 6.208**

**Összesített impakt faktor: 54.621**

### **Értekezésem témájában elhangzott előadások:**

Lőrincz, V., Laczkó, L., Polyák, L., Bege, M., Borbás, A., Baksa, V., Szemán-Nagy, G., **Kiss, A.**: Metotrexát és az N-153 nukleozid analóg tumorelles hatásának összehasonlítása MTT teszt és time-lapse mikroszkópia segítségével.

In: Sántha Kálmán Tudományos Kerekasztal: Absztraktkötet 2020/2021. Szerk.: Matolay Orsolya, Fábíán Zsófia Andrea, Debreceni Egyetem, Debrecen, 183, 2021. ISBN: 9789633189283

Laczkó, L., Lőrincz, V., Polyák, L., Bege, M., Borbás, A., Baksa, V., Szemán-Nagy, G., **Kiss, A.**: Nukleozid analógok hatásainak összehasonlítása. In: Sántha Kálmán Tudományos Kerekasztal: Absztraktkötet 2020/2021. Szerk.: Matolay Orsolya, Fábíán Zsófia Andrea, Debreceni Egyetem, Debrecen, 181, 2021. ISBN: 9789633189283

### **Egyéb elhangzott előadások:**

Baksa, V., **Kiss, A.**: Gadolinium-klorid emlős sejtekre gyakorolt geno- és citotoxikus hatásainak vizsgálata. In: XXXIII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia Biológia szekció: program és összefoglalók. Szerk.: Antal László, DE

Természettudományi és Technológiai Kar, Debrecen, 40, 2017. ISBN: 9789634739548

Bege, M., Bereczki, I., **Kiss, A.**, Baksa, V., Szemán-Nagy, G., Borbás, A.: Új, szénhidrát-módosított nukleozidszármazékok előállítása és citotoxikus és antivirális vizsgálata. In: I. FKF Szimpózium: Fiatal Kémikusok Fóruma: Konferencia Kiadvány - Debrecen, 2019. április 3-5.. Szerk.: Ádám Anna Adél, Ziegenheim Szilveszter, Fiatal kémikusok Fóruma, Debrecen, 56-63, 2019. ISBN: 9786156018007

Turáni, M., Baksa, V., Kovács, F., **Kiss, A.**, Szemán-Nagy, G.: Többfalú karbon nanocsövek (mwcnt) hossz-összefüggés vizsgálata, geno-és citotoxikus hatásainak megfigyelése a szaruhártya regenerációja során. In: Tavaszi Szél Konferencia 2019: Nemzetközi Multidiszciplináris Konferencia: Absztraktkötet. Szerk.: Németh Katalin, Doktoranduszok Országos Szövetsége, Debrecen, 201, 2019. ISBN: 9786155586422

Tálas, L., **Kiss, A.**, Polyák, L., Berta, B., Máthéné Szigeti, Z.: Digitális képelemzés a hisztopatológiában. In: Tavaszi Szél Konferencia 2019: Nemzetközi Multidiszciplináris Konferencia: Absztraktkötet. Szerk.: Németh Katalin, Doktoranduszok Országos Szövetsége, Debrecen, 583, 2019. ISBN: 9786155586422

Tálas, L., **Kiss, A.**, Farkas, D., Deák, A., Szemán-Nagy, G.: Az Aspergillus Fumigatus tapadási és növekedési dinamikájának hosszútávú videomikroszkópos vizsgálata. In: Tavaszi Szél Konferencia 2019: Nemzetközi Multidiszciplináris Konferencia: Absztraktkötet. Szerk.: Németh Katalin, Doktoranduszok Országos Szövetsége, Debrecen, 197, 2019. ISBN: 9786155586422

Baksa, V., Turáni, M., **Kiss, A.**, Tálas, L., Kovács, F., Szemán-Nagy, G.: Többfalú karbon nanocsövek (MWCNT) eltérő hosszúságából adódó aggregáció okozta geno-és citotoxikus hatások vizsgálata a cornea regenerációja során. In: XII. Sántha Kálmán Tudományos Kerekasztal: Absztraktkötet 2019/2020. Szerk.: Matolay

Orsolya, Fábíán Zsófia Andrea, Debreceni Egyetem, Debrecen, 67, 2020. ISBN: 9789633188569

Baksa, V., Tóth, D., Ujlaki, E., **Kiss, A.**, Turáni, M., Szemán-Nagy, G.: TiO<sub>2</sub> biokompatibilitás vizsgálata humán sejttenyészetek esetében. In: XII. Sántha Kálmán Tudományos Kerekasztal: Absztraktkötet 2019/2020. Szerk.: Matolay Orsolya, Fábíán Zsófia Andrea, Debreceni Egyetem, Debrecen, 113, 2020. ISBN: 9789633188569

Baksa, V., **Kiss, A.**, Polyák, L., Turáni, M., Szemán-Nagy, G.: Examination of longitudinal correlation of multi-walled carbon nanotubes (mwcnts), observation of their geno- and cytotoxic effects during corneal regeneration. In: 4th National Conference of Young Biotechnologists "FIBOK 2020" online conference abstract book. Ed.: by Tünde Pusztahelyi, Levente Czeglédi, Éva Domokos-Szabolcsy, Tamás Emri, Debreceni Egyetem, Debrecen, 57, 2020.

Laczkó, L., Lőrincz, V., Polyák, L., Szemán-Nagy, G., **Kiss, A.**: A 700 nm-es hullámhosszúságú fény hatásának vizsgálata a szaruhártya regenerációjában in vitro karcmodell alkalmazásával. In: Sántha Kálmán Tudományos Kerekasztal: Absztraktkötet 2020/2021. Szerk.: Matolay Orsolya, Fábíán Zsófia Andrea, Debreceni Egyetem, Debrecen, 27, 2021. ISBN: 9789633189283

Lőrincz, V., Laczkó, L., Polyák, L., Szemán-Nagy, G., **Kiss, A.**: A 640 nm-es hullámhosszúságú fény hatásának vizsgálata a szaruhártya regenerációjában in vitro karcmodell alkalmazásával. In: Sántha Kálmán Tudományos Kerekasztal: Absztraktkötet 2020/2021. Szerk.: Matolay Orsolya, Fábíán Zsófia Andrea, Debreceni Egyetem, Debrecen, 25, 2021. ISBN: 9789633189283

## Köszönetnyilvánítás

---

Ezúton szeretnék köszönetet mondani **Dr. Szemán-Nagy Gábor** témavezetőmnek, hogy munkám elvégzéséhez és az értekezésem megírásához lehetőséget biztosított, illetve, hogy tanácsaival támogatta munkám megvalósulását.

Emellett köszönettel tartozom **Prof. Dr. Pócsi István** tanszékvezetőnek, hogy kutatásomat a Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológia Tanszéken végezhettem.

Továbbá köszönettel tartozom a DE – Gyógyszerkémia Tanszéknek, különösen **Dr. Bege Miklósnak** és **Prof. Dr. Borbás Anikónak**, amiért a rendelkezésemre bocsátották a vegyületeket nélkülük nem készülhetett volna el az értekezésem.

Külön köszönettel tartozom **Prof. Dr. Bánfalvi Gáspárnak** nélkülözhetetlen szakmai tanácsaiért. Bármilyen problémával bizalommal fordulhattam hozzá, szakmai hozzáértésével és ötleteivel pedig nagyban elősegítette a kísérletek sikerességét. Professzor úr nélkül nem készülhetett volna el az értekezésem.

Hálás köszönettel tartozom még barátaimnak és kollégáimnak, akik elejétől a végéig kitartottak mellettem és a dolgozatom legrosszabb verzióit is olvasták és figyelemmel kísérték annak folyamatos fejlődését:

**Baksa Viktóriának, Dr. Bojté Csillának, Márton Alexandrának és Dr. Tóth Lászlónak.** Laci külön köszönöm, hogy képes voltál megannyi elfoglaltságod mellett is időt szakítani az értekezésem olvasására és javítására, különös tekintettel a „rák” szóismétlésre.

Köszönöm azon volt Bsc és Msc hallgatók munkáját akik **szakdolgozóként** a vezetésem mellett készítették a szakdolgozataikat és diplomamunkáikat és ezáltal hozzájárultak a kísérletek sikerre viteléhez.

Végezetül szeretném megköszönni **családomnak, páromnak** és a **barátaimnak**, akik mindvégig támogattak és toleráltak a leggyengébb pillanataimban is.