

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

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

Kiss Alexandra

Témavezető: Dr. Szemán-Nagy Gábor György



**DEBRECENI EGYETEM**

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2023

# Bevezetés

---

A tradicionális tumorelleses 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 tumorerő kialakulását eredményezi, ezáltal drasztikusan csökkentve a gyógyulás lehetőségét és a túlélési rátát. Mindezek ismeretében a hatékony kezelésekhez 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. 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

---

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

teszteket 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 végezhetők 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 tumorelleses 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

---

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

lila formazán kristály szolubizálható és ezáltal számszerűsíthető spektrofotometriai módszerekkel. Minden sejttípusnál 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 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, 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

---

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

horizontját. Disszertációmban leírom továbbá, hogy az általam fejlesztett, kombinált elemzés kiterjeszhető többek között az antimetabolikus, gombaellenes és tumorelleses szerek citotoxicitási profiljának a feltérképezésére, mely hatékony és gyors szelektálást biztosít. Az általam kifejlesztett új vizsgálati módszer segítségével a hagyományos életképességi tesztek által kapott végponti mérések eredményéről a time-lapse videómikroszkóppal készült felvételekkel bővebb információt kaphatunk arról, hogy milyen celluláris események okozzák azokat.

## Célkitűzések

---

Az értekezésem témája az MTT-teszt és a Time-lapse imaging videómikroszkópia kombinációjára irányul az egyes daganatos sejtvonalakra jellemző  $IC_{50}$  koncentrációk vizsgálata mellett.

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, nekrozis).

**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/nekrózis indukáló hatásainak megfigyelése és leírása.

**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 time-lapse videómikroszkóppal történő kiegészítése értékes vizuális információkat ad, és lehetővé teszi a felvételek kvantitatív kiértékelését is. Ez a kombinációs elemzés kiterjeszhető többek között az antimetabolikus, gombaellenes és rákellenes szerek citotoxicitási profiljának a feltérképezésére, mely hatékony és gyors szelektálást biztosít.

# Anyagok és módszerek

---

## 1. Sejttenyésztési körülmények

A vizsgálatok során humán eredetű bőr és méhnyakrák sejtekkel (HaCaT, HeLa), rágszáló eredetű laphám karcinóma (SCC-VII) és kínai hörcsög eredetű ovárium (CHO-K1) sejtvonallakkal dolgoztunk. Az SCC-VII sejteket DMEM/HAM'S F12 médiumban tenyésztettük 10% hőinaktivált magzati borjú szérum hozzáadása mellett. A CHO-K1 sejttenyészetet pedig az előzőhöz hasonló összetételű Ham's-F12 tápfolyadékban tenyésztettük. A HaCaT sejttenyészetet 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.

## 2. Viabilitás vizsgálat MTT-teszttel

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, emiatt alkalmas poláros és apoláros vegyületek oldására egyaránt, valamint a hidrofób membránokon is képes átjutni. Ezért előszeretettel használják terápiák során az amfipatikus tulajdonsága miatt annak ellenére, hogy a fiziológiai és farmakológiai hatásai még nem teljesen feltártak<sup>4</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>5</sup>.

### 3. Time-Lapse Imaging videómikroszkópia

A sejt kultúrák folyamatos megfigyelésére a citotoxicitási vizsgálat során time-lapse imaging videómikroszkópos rendszert<sup>6</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 sejtenyésző inkubátor (Wood Dale, IL, US) négy videó mikroszkóppal felszerelve. A mikroszkópok Olympus (Tokyo Japan) gyártmányúak, inverz állásban, célszerű módosításokkal: a revolvertoronyban elhelyezett fényforrással, és az okulárba telepített

---

<sup>4</sup> de Abreu et al., 2017

<sup>5</sup> Ferik and Dariš, 2018, Holthaus et al., 2018

<sup>6</sup> Nagy et al., 2010

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>7</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 szem előtt tartanunk, hogy a kiértékelés az adott kísérlet szempontjából a legtöbb információval lásson el<sup>8</sup>.

---

<sup>7</sup> Nagy et al., 2014

<sup>8</sup> <https://fiji.sc/>

## 4. Alkalmazott vegyületek

Az **N-153** nevű vegyületet (1- [2'-dezoxi-2'-C- (n-propil-szulfanil-metil) -3 ', 5'-di-O- (terc-butil-dimetil-szilil) -β-D-arabinofuranozil] -uracil) a Debreceni Egyetem Gyógyszerkémiai Tanszékén állították elő. Az N-153 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.<sup>9</sup>

A daganatellenes **5-fluorouracil** egy jól ismert antimetabolit<sup>10</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>11</sup>. Dezinukleotid-analógja, az F-dUMP a timidilát-szintáz gátlója<sup>12</sup>.

A **metotrexát (MTX)** daganatellenes, antimetabolit, antifolát-szer, jelentős immunszuppresszív potenciállal jellemezhető. Egy tetrafolát-inhibitor, amely megakadályozza a tetrahidrofolát-dehidrogenáz enzimaktivitását és megakadályozza a timidilát szintéziséhez szükséges tetrahidrofolát képződését<sup>13</sup>.

Módosított nukleozid származékok, amelyek 3',5'-O-helyzetben szililénacetil védőcsoportot tartalmaznak, kivéve az 5., melyről eltávolították ezt a csoportot. Az **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 **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

---

<sup>9</sup> Bege et al., 2017

<sup>10</sup> Blanke et al., 2010

<sup>11</sup> Goshal et al., 1994

<sup>12</sup> Liu et al., 1994

<sup>13</sup> NCBI, PubChem Database. Methotrexate

egy 3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraizopropildisziloxán-1,3-diil)-β-D-ribofuranozil-timin. Ribotimidin diszililénacetálozásával lett előállítva. A **9.** az egy 2'-Dezoxi-2'-metilidén-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraizopropildisziloxán-1,3-diil)-β-D-ribofuranozil-timin.

Ribotimidin 2'-exometilénszármazéka. 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'-ditioacetát 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 **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 **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 **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 **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. 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.

# Új tudományos eredmények

---

Az új kutatási eredményeink alapján az MTT-teszt és a time-lapse imaging videómikroszkópia kombinációja hatékony módszer a daganatos sejtvonalakra jellemző IC<sub>50</sub> koncentrációk átfogóbb vizsgálatára. Az MTT-teszt az sejtek metabolikus aktivitását méri, de nem specifikus a sejthalál típusának megkülönböztetésére és az életképes és nem életképes sejtek közötti különbségtételre. A time-lapse imaging videómikroszkópia viszont lehetővé teszi a sejtek növekedésének és osztódásának valós idejű megfigyelését, valamint a sejtciklus és a sejthalálra jellemző folyamatok nyomon követésére.

A kutatásunk során kidolgoztunk egy protokollt, amely alkalmazható az MTT-teszt és a Time-lapse Imaging videómikroszkópia kombinált alkalmazására citotoxicitási vizsgálatok során. A protokoll segítségével több nukleozid analógot teszteltük a daganatos és nem daganatos sejtvonalakon, és meghatároztuk az egyes vegyületek IC<sub>50</sub> koncentrációit. Az MTT-teszt eredményeit a time-lapse imaging videómikroszkópia felvételeivel kombináltuk, amely lehetővé tette a sejtméret változásának, az osztódási időknél, a sejtciklus időtartamának, a sejthalál jellemzőinek (pl. apoptózis, nekrozis) a vizsgálatát.

Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy az új kutatási módszer pontosabb és gyorsabb eredményeket nyújt a gyógyszerjelöltek értékelésében. Az MTT-teszt és a time-lapse imaging videómikroszkópia kombinációja lehetővé teszi a celluláris események részletesebb vizsgálatát, így pontosabb információkat nyújt a sejtek érzékenységről és a gyógyszerek hatásmechanizmusáról. Ez a módszer további kutatások irányát is meghatározza, lehetővé téve a mellékhatásprofil és az érzékenység szélesebb körű feltárását.

Az új kutatási eredmények hozzájárulnak a citotoxicitás vizsgálatok fejlődéséhez és a hatékonyabb gyógyszerek kifejlesztéséhez. Ezenkívül csökkentik a kutatási időt és költségeket, és segítenek a

gyógyszerjelöltek további optimalizálásában a klinikai alkalmazás előtt.

## 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 tumorelles 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>14</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 tumorelles és antibakteriális tulajdonságokkal rendelkezik, mivel képes gátolni a DNS-szintézist.<sup>15</sup> A leinamicin analógjai fokozott citotoxikus aktivitást mutattak HeLa tumorsejtekkel szemben. Különösen a leinamicin lipofil, szililcsoportot tartalmazó származékai mutattak jelentős aktivitást.<sup>16</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 sejtosztódás ideje és a sejtek generációs ideje jelentősen megváltozott a DMSO kontrollhoz képest. A HeLa sejtek voltak a legérzékenyebbek az N-153 nukleozid analógra, és a fenti paraméterek, valamint a

---

<sup>14</sup> Shelton et al., 2016

<sup>15</sup> Hara et al., 1990; Asai et al., 1996

<sup>16</sup> Szilagyi et al., 2006

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 ug/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 ug/ml. A videomikroszkópos számszerűsítés azt mutatta, hogy a tumoros sejtvonalak (SCC, HeLa) érzékenyebbek az 5-FU-ra, mint a nem tumoros HaCaT keratinocita sejtvonal. 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 sejtvonalakban 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 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-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 sejt méretre, 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  $IC_{50}$  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  $IC_{50}$  értékek hasznosságára a sejtnövekedés gátlásának mérőszámaként.

Az értekezésem alapját adó kísérletek során az MTT-tesztet kombináltuk az egyes tumoros sejtvonalakra jellemző, megfelelő  $IC_{50}$  koncentrációknál végzett time-lapse mikroszkópiával. A time-lapse mikroszkópia a sejtek életképességén kívül a következő további információkat szolgáltatta 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 sejttoxikológiai vizsgálatok horizontját. A kombinált elemzés perspektívái többek között az antimetabolikus, gombaellenes és tumorelleses szerek inhibitorainak citotoxicitási szempontjait foglalják magukban.

Más módszerekkel összehasonlítva az MTT-teszt és a 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.

## 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] 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.
- [5] 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.

- [6] 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.
- [7] 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
- [8] <https://fiji.sc/>
- [9] 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.
- [10] Blanke, Charles D., Claus Rödel, and Mark S. Talamonti, eds. *Gastrointestinal Oncology: A Practical Guide*. Springer Science & Business Media, 2010.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] NCBI, PubChem Database. Methotrexate
- [14] 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
- [15] 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
- [15] 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
- [16] Szilagyai 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



Nyilvántartási szám: DEENK/163/2023.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kiss Alexandra  
Doktori Iskola: Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10078890

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

#### Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

1. Bege, M.\*, Kiss, A.†, Bereczki, I., Hodek, J., Polyák, L., Szemán-Nagy, G., Naesens, L., Weber, J., Borbás, A.: Synthesis and Anticancer and Antiviral Activities of C-2'-Branched Arabinonucleosides.

*Int. J. Mol. Sci.* 23 (20), 1-24, 2022. EISSN: 1422-0067.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms232012568>

IF: 6.208 (2021)

\* Megosztott első szerzős közlemény.

2. Kiss, A., Baksa, V., Tólas, L., Bege, M., Borbás, A., Bereczki, I., Bánfalvi, G., Szemán-Nagy, G.: MTT Test and Time-lapse Microscopy to Evaluate the Antitumor Potential of Nucleoside Analogues.

*Anticancer Res.* 41 (1), 137-149, 2021. ISSN: 0250-7005.

DOI: <http://dx.doi.org/10.21873/anticancer.14759>

IF: 2.435

### További közlemények

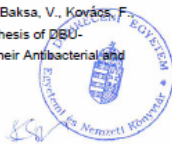
#### Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (9)

3. Demeter, F., Török, P., Kiss, A., Kovásznai-Oláh, R., Máthéné Szigeti, Z., Baksa, V., Kovács, F., Balla, N., Fenyvesi, F., Váradi, J., Borbás, A., Herczeg, M.: First Synthesis of DBU-Conjugated Cationic Carbohydrate Derivatives and Investigation of Their Antibacterial and Antifungal Activity.

*Int. J. Mol. Sci.* 24 (4), 1-20, 2023. EISSN: 1422-0067.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24043550>

IF: 6.208 (2021)





4. Máthéné Szigeti, Z., Tálás, L., Széles, A., Hargitali, Z., Nagy, Z. L., Nagy, M., Kiss, A., Kéki, S., Szemán-Nagy, G.: Potential Original Drug for Aspergillosis: In Vitro and In Vivo Effects of 1-N,N-Dimethylamino-5-Isocyanonaphthalene (DIMICAN) on *Aspergillus fumigatus*. *J. Fungi*. 8 (10), 1-11, 2022. EISSN: 2309-608X.  
DOI: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.3390/jof8100985>  
IF: 5.724 (2021)
5. Herman, P., Kiss, A., Fábíán, I., Kalmár, J., Szemán-Nagy, G.: In situ Remediation Efficacy of Hybrid Aerogel Adsorbent in Model Aquatic Culture of *Paramecium caudatum* Exposed to Hg(II). *Chemosphere*. 275, 1-8, 2021. ISSN: 0045-6535.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130019>  
IF: 8.943
6. Nagy, M., Szemán-Nagy, G., Kiss, A., Nagy, Z. L., Tálás, L., Rácz, D., Majoros, L., Tóth, Z., Máthéné Szigeti, Z., Pócsi, I., Kéki, S.: Antifungal Activity of an Original Amino-Isocyanonaphthalene (ICAN) Compound Family: Promising Broad Spectrum Antifungals. *Molecules*. 25 (4), 1-12, 2020. ISSN: 1420-3049.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25040903>  
IF: 4.411
7. Nagy, M., Rácz, D., Nagy, Z. L., Fehér, P. P., Kovács, S. L., Bankó, C., Bacsó, Z., Kiss, A., Zsuga, M., Kéki, S.: Amino-isocyanooxiridines: Novel, Tunable Solvatochromic Fluorophores as Physiological pH Probes. *Sci. Rep.* 9, 1-39, 2019. ISSN: 2045-2322.  
IF: 3.998
8. Bege, M., Kiss, A., Kicsák, M., Bereczki, I., Baksa, V., Király, G., Szemán-Nagy, G., Máthéné Szigeti, Z., Herczegh, P., Borbás, A.: Synthesis and Cytostatic Effect of 3'-deoxy-3'-C-Sulfanylmethyl Nucleoside Derivatives with d-xylo Configuration. *Molecules*. 24 (11), 1-23, 2019. ISSN: 1420-3049.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24112173>  
IF: 3.267
9. Nagy, Z., Nagy, M., Kiss, A., Rácz, D., Barna, B., Könczöl, P., Bankó, C., Bacsó, Z., Kéki, S., Bánfalvi, G., Szemán-Nagy, G.: MICAN, a new fluorophore for vital and non-vital staining of human cells. *Toxicol. Vitro*. 48, 137-145, 2018. ISSN: 0887-2333.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2018.01.012>  
IF: 3.067





10. Nagy, M., Rácz, D., Nagy, Z. L., Fehér, P. P., Kalmár, J., Fábán, I., Kiss, A., Zsuga, M., Kéki, S.: Solvatochromic isocyanonaphthalene dyes as ligands for silver(I) complexes, their applicability in silver(I) detection and background reduction in biolabelling. *Sens. Actuator B. Chem.* 255 (3), 2555-2567, 2018. ISSN: 0925-4005.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2017.09.061>  
IF: 6.393
11. Szemán-Nagy, G., Baksa, V., Kiss, A., Turáni, M., Bánfalvi, G.: Gadolinium induced effects on mammalian cell motility, adherence and chromatin structure. *Apoptosis*. 22 (2), 188-199, 2017. ISSN: 1300-8185.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-016-1311-9>  
IF: 3.967

Magyar nyelvű absztrakt kiadványok (11)

12. 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, Fábán Zsófia Andrea, Debreceni Egyetem, Debrecen, 25, 2021. ISBN: 9789633189283
13. 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, Fábán Zsófia Andrea, Debreceni Egyetem, Debrecen, 27, 2021. ISBN: 9789633189283
14. 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, Fábán Zsófia Andrea, Debreceni Egyetem, Debrecen, 183, 2021. ISBN: 9789633189283
15. 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, Fábán Zsófia Andrea, Debreceni Egyetem, Debrecen, 181, 2021. ISBN: 9789633189283





16. Baksa, V., Tóth, D. A., Ujlaki, E., Kiss, A., Turáni, M., Szemán-Nagy, G.: TIO2 biokompatibilitás vizsgálata humán sejtenyészetek esetében.  
In: XII. Sántha Kálmán Tudományos Kerekasztal : Absztraktkötet 2019/2020. Szerk.: Matolay Orsolya, Fábián Zsófia Andrea, Debreceni Egyetem, Debrecen, 113, 2020. ISBN: 9789633188569
17. Baksa, V., Turáni, M., Kiss, A., Tóth, L., Kovács, F., Szemán-Nagy, G.: Többfalú karbon nanocsövek (MWCNT) eltérő hosszúságából adódó aggregáció okozta geno- és citotoxikus hatások vizsgálata a cornea regenerációjában.  
In: XII. Sántha Kálmán Tudományos Kerekasztal : Absztraktkötet 2019/2020. Szerk.: Matolay Orsolya, Fábián Zsófia Andrea, Debreceni Egyetem, Debrecen, 67, 2020. ISBN: 9789633188569
18. Tóth, L., Kiss, A., Farkas, D., Deák, A. G., Szemán-Nagy, G.: Az Aspergillus Fumigatus tapadási és növekedési dinamikájának hosszútávú videomikroszkópos vizsgálata.  
In: Tavasz Szél Konferencia 2019 : Nemzetközi Multidiszciplináris Konferencia : Absztraktkötet. Szerk.: Németh Katalin, Doktoranduszok Országos Szövetsége, Debrecen, 197, 2019. ISBN: 9786155586422
19. Tóth, L., Kiss, A., Polyák, L., Berta, B., Máthéné Szigeti, Z.: Digitális képelemzés a hisztopatológiában.  
In: Tavasz Szél Konferencia 2019 : Nemzetközi Multidiszciplináris Konferencia : Absztraktkötet. Szerk.: Németh Katalin, Doktoranduszok Országos Szövetsége, Debrecen, 583, 2019. ISBN: 9786155586422
20. 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 regenerációjában.  
In: Tavasz Szél Konferencia 2019 : Nemzetközi Multidiszciplináris Konferencia : Absztraktkötet. Szerk.: Németh Katalin, Doktoranduszok Országos Szövetsége, Debrecen, 201, 2019. ISBN: 9786155586422
21. Bege, M., Bereczki, I., Kiss, A., Baksa, V., Szemán-Nagy, G., Borbás, A.: Új, zénhidrát-módosított nukleozidszármazékok előállítás 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
22. Baksa, V., Kiss, A.: Gadolínium-klorid emulzió sejtjeire gyakorolt geno- és citotoxikus hatásainak vizsgálata.  
In: XXXIII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia Biológia szekció : program és összefoglalók. Szerk.: Antal László, DE Természettudományi és Technológiai Kéz. Debrecen, 40, 2017. ISBN: 9789634736548





Idegen nyelvű absztrakt kiadványok (1)

23. 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.

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 54,621**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 8,643**

A DEENK a Jelölt által az IDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.05.17.



**Short thesis for the degree of doctor of philosophy  
(PhD)**

**Dynamic cytological methods for studying the  
structure-activity relationship of compounds**

by Alexadra Kiss

Supervisor: Dr. Gábor Szemán-Nagy



UNIVERSITY OF DEBRECEN

Juhász-Nagy Pál Doctoral School

Debrecen, 2023

# Introduction

---

Traditional cancer therapy includes surgical interventions, chemotherapy, and radiation treatment. However, many synthetic drugs and other therapeutic solutions used in chemotherapy often fail to achieve the desired effect on their own and metastatic conditions frequently develop. In metastasis, cancer cells spread through the bloodstream to different parts of the body, resulting in tumor formation in those locations, drastically reducing the chances of recovery and survival rates. Given this knowledge, there is a need for effective treatments that involve compounds suitable for cancer therapy derived from biological or natural sources. These compounds should be selective, have fewer side effects, cost-effective, minimize the likelihood of resistance development, and possess multiple advantageous therapeutic properties.

According to a summary article [1], the testing and approval of new potential drug compounds can be a costly and time-consuming process. In numerical terms, it takes 10-15 years, during which only 1 out of the tested 5,000-10,000 candidates meets all the necessary criteria for FDA (Food and Drug Administration) approval. The time and cost required for these tests are attempted to be reduced through high-throughput screening (HTS) based on cell cultures. While the use of cell cultures may not necessarily activate the same cellular response reactions as in the tissue environment, it allows for rapid selection of compounds that are either ineffective or highly toxic. However, in vivo animal testing cannot be replaced.

Cell-based investigative systems play an important role in the discovery and development of active substances, including the identification of main molecules, preclinical studies - which also include toxicity tests - and the study of efficacy and drug delivery mechanisms.

The pharmaceutical industry constantly strives to discover new drug candidate molecules to meet unexpected needs. The parallel

development of science and technology has rapidly increased the number of drug candidates. However, along with this development, new problems have emerged, such as the efficient processing and evaluation of drug libraries in terms of toxicity. Testing large numbers of molecules economically and ethically is not practical, thus the scientific community relies on cell-based *in vitro* techniques. High-throughput screening (HTS) is the solution to the aforementioned problems, both economically and in terms of time. The tests can be performed in microtiter plates, either manually or robotically, and flow cytometry can also be applied for this purpose. These methods enable the efficient testing of numerous drug concentrations and exposure times.

Cancer diseases are currently recognized as leading causes of death, with their numbers increasing worldwide. Therefore, it is not surprising that the use of anticancer preparations, including nucleoside derivatives and their analogs, has significantly increased in the field of oncology. In practice, nucleoside, nucleotide, or base analog drugs are used in the therapy of cancer patients in approximately 20% of cases, either alone or in combination with other preparations [2].

The MTT assay is commonly used to assess cytotoxicity in various cell lines, both human and animal-derived. Reduction of tetrazolium salts is a widely accepted method to study the effect of a given xenobiotic on viability *in vitro*. Metabolically active cells reduce the yellow tetrazolium MTT by the activity of dehydrogenase enzymes, generating NADH and NADPH. The resulting purple formazan crystals are soluble and can be quantified using spectrophotometric methods. Proportional relationship between cell count and signal can be observed in every cell type, allowing for the quantification of changes in cell viability.

Time-lapse imaging videomicroscopy (TLS) enables the real-time observation of cell behavior in the presence of added compound(s). This method allows for the monitoring of morphological changes, effects on generation time, apoptosis, and necrosis. The images

obtained through this method can be subjected to qualitative and quantitative analysis using routine image analysis techniques applied in our laboratory [3,3,3].

The focus of my dissertation focuses on the combination of the MTT assay and time-lapse imaging videomicroscopy for the investigation of  $IC_{50}$  concentrations specific to different cancer cell lines. In my dissertation, I aim to demonstrate that, in addition to assessing cell viability, videomicroscopy provides the following information during treatment with nucleoside analogs:

1. Cell size and changes in cell size
2. Division times of daughter cells (cytokinesis)
3. Duration of the cell cycle
4. Degree of cell death
5. Type of cell death observed (if applicable) (apoptosis, necrosis).

In the summary, it can be observed that the MTT assay provides information about the extent of inhibition by cytotoxic agents, regardless of whether the cells remain alive or die. Supplementing the MTT assay with time-lapse videomicroscopy provides valuable visual information and allows for quantitative evaluation of the recordings. Time-lapse imaging can be sustained for longer periods, up to several weeks, and expands the horizons of cytotoxicity studies. In my dissertation, I also describe that the combined analysis I have developed can be extended to mapping the cytotoxic profiles of antimetabolites, antifungal agents, and anticancer drugs, providing an effective and rapid screening method. With the new testing method I have developed, we can obtain more detailed information about the cellular events underlying the endpoint measurements obtained from traditional viability assays by analyzing the recordings made with time-lapse videomicroscopy.

# Objectives

---

The topic of my dissertation focuses on the combination of the MTT assay and time-lapse imaging videomicroscopy for investigating IC<sub>50</sub> concentrations specific to different cancer cell lines.

With the help of videomicroscopy, in addition to assessing cell viability, the following information can be determined during treatment with nucleoside analogs:

1. Cell size and changes in cell size
2. Division times of daughter cells (cytokinesis)
3. Duration of the cell cycle
4. Degree of cell death
5. Type of cell death observed (if observable) (apoptosis, necrosis).

**The development of the methodology involves the following steps:**

**a) Development of the protocol**

Testing and validation of the developed protocol using known chemotherapy agents (MTX and 5-FU) and newly synthesized nucleoside analog (N-153). Extension of the developed protocol to other newly synthesized nucleoside analogs.

**b) Cytotoxicity evaluation of nucleoside analogs using the MTT assay**

Cytotoxicity assessment of 17 compounds on tumor and non-tumor cell lines at various concentrations. Determination of IC<sub>50</sub> values for each compound following spectrophotometric detection.

**c) Time-Lapse Imaging videomicroscopy of the best nucleoside analog(s)**

Selection of compound(s) characterized by the best IC<sub>50</sub> values based on MTT assays, with a significant difference observed compared to

values specific to tumor and non-tumor cells. Subsequent TLS examination of cell size, division times, and generation times for the selected compound(s). Observation and description of the compound(s)' apoptotic/necrotic-inducing effects.

#### **d) Evaluation of results:**

The results obtained from the MTT assay will be analyzed using GraphPad. The recordings made with the TLS system will be analyzed using software such as Fiji/ImageJ.

Supplementing the MTT assay with time-lapse videomicroscopy provides valuable visual information and allows for quantitative evaluation of the recordings. This combined analysis can be extended to mapping the cytotoxic profiles of antimetabolites, antifungal agents, and anticancer drugs, providing an effective and rapid screening method.

## **Materials and methods**

---

### **1. Cell culture conditions**

During the experiments, we worked with human-derived skin and cervical cancer cells (HaCaT, HeLa), rodent-derived squamous cell carcinoma (SCC-VII), and Chinese hamster ovary (CHO-K1) cell lines. The SCC-VII cells were cultured in DMEM/HAM'S F12 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum. The CHO-K1 cell culture was grown in Ham's F12 medium with a similar composition. The HaCaT cells were cultured in DMEM medium containing 10% bovine serum albumin, and the HeLa cells were cultured in RPMI 1640 medium.

For the study, control and treated cells were cultured under identical conditions. The cells were cultured at 37°C in an incubator providing 95% humidity and 5% CO<sub>2</sub>.

The MTT assay was performed in 96- and 24-well plates. For HaCaT cells, an initial cell density of 10,000 or 50,000 cells per well was used, while for SCC cells, it was 5,000 or 25,000 cells per well. The difference in initial cell numbers is justified by the different cell cycle characteristics of the cell lines. After passage, the cells were allowed to adhere for 24 hours, and then treated with the specified compound and observed for 48 hours to assess the effect of the nucleoside on the cells.

For Time-Lapse Imaging videomicroscopy, the cells were cultured in glass-bottom dishes. In the case of HaCaT cells, the culture was started with 150,000 cells, and for SCC cells, it was 75,000 cells. Again, a 24-hour period was provided for cell attachment, followed by incubation with the specified compound for 48 hours.

## 2. Viability assessment using the MTT assay

The MTT assay is commonly used to evaluate cytotoxicity in various cell lines, both of human and animal origin. The reduction of tetrazolium salts is a widely accepted method to investigate the viability effects of a given xenobiotic *in vitro*. Metabolically active cells reduce the yellow tetrazolium MTT to form purple formazan, which is soluble and can be quantified using spectrophotometric methods, due to the action of dehydrogenase enzymes producing NADH and NADPH agents. The MTT reagent has minimal background absorbance in the absence of live cells. There is a linear relationship between cell number and the signal in every cell type, allowing for the quantification of changes in cell viability.

During the assay, we used 96- and 24-well microtiter plates for the measurements. The final volume per well was 200 or 500  $\mu$ l. The nucleoside analogs were tested at 10 different concentrations (100-80-60-50-30-20-15-10-7.5-5  $\mu$ g/ml) in a 96-well microtiter plate. Based on the observed effects, further concentration refinement was

necessary, so we tested an additional 5 concentrations (10-9-8-7-6 µg/ml) in a 24-well microtiter plate. For N-153, 5-FU, and MTX, we also tested five concentrations (40-30-20-10-5 µg/ml) in a 96-well microtiter plate. The compounds were dissolved in DMSO, ensuring a final DMSO content of 1% (v/v) in each well. The substances were diluted in culture medium specific to the cell line, and the duration of the assay was 48 hours.

We added 100 µl of MTT solution (0.5 mg/ml dissolved in PBS) to each well. The plates were incubated for 2 hours at 37°C. Afterward, the liquid was aspirated from the wells, and the MTT formazan was dissolved with 100 µl of DMSO. The samples were incubated in an incubator for 15 minutes to ensure complete dissolution of the formazan crystals. The absorbance was measured at 570 nm using a plate reader. The viability of cell populations was calculated as follows:

$$\frac{\text{absorbance of the treated cells}}{\text{absorbance of the control cells.}} \quad \times 100$$

### DMSO - dimethyl sulfoxide

DMSO is amphipathic in nature, making it suitable for dissolving both polar and nonpolar compounds, and it can also penetrate hydrophobic membranes. Therefore, it is commonly used in therapies due to its amphipathic properties, despite the fact that its physiological and pharmacological effects are not fully understood [4].

DMSO does not uniformly affect different cell lines. For example, T-cells are not affected in their viability in the long term (72 h) by 1% DMSO. In the case of the WM-266-4 cell line, based on the studies, the cells tolerate even the concentration of 1.5% DMSO. Overall, in various studies, DMSO is most commonly used at concentrations of up to 1% [5].

### 3. Time-Lapse Imaging Videomicroscopy

For continuous observation of cell cultures during cytotoxicity testing, we utilized a time-lapse imaging videomicroscopy system [6]. The latest advancements in the time-lapse video microscopy system were employed for the experiments. The setup included a SANYO MCO18-AC CO<sub>2</sub> cell culture incubator (Wood Dale, IL, US) equipped with four video microscopes. The microscopes were manufactured by Olympus (Tokyo, Japan) and modified for inverted positioning, with a light source integrated into the revolver turret and a CCD camera installed in the eyepiece. The objectives (x10:0.25, achromat Carl Zeiss, Jena) were positioned in front of the CCD camera. The CCD camera used was a modified 2-megapixel UVC USB 2 webcam. Modifications included removal of the camera housing, objectives, and infrared filter. The light source consisted of a 960 nm near-infrared LED (5mm diameter, 1.2V, 50 mA) to minimize phototoxicity [7]. During the time-lapse videomicroscopic observations, recordings were made at one-minute intervals for both control and treated cultures.

#### Fiji (ImageJ)

Throughout the experiments, images were captured at one-minute intervals with an averaging of 11 frames to increase the signal-to-noise ratio for easier analysis. The images were captured at a resolution of 1600 x 1200 pixels in 24-bit RGB format. The pixel size and scale were determined based on calibration photos taken with a Bürker chamber.

Quantitative analysis of the captured images was performed using the Fiji image analysis software, which is an open-source software based on ImageJ, developed by the National Institutes of Health (NIH). Macros and plugins specifically designed for this purpose were utilized during image processing. Finally, the obtained results were plotted using the Excel program.

During the evaluation, it was important to consider that the same analysis scheme could not be applied to all image sequences. Each evaluation had to take into account the specific experimental requirements to provide the most relevant information [8].

#### 4. Applied Compounds

The compound referred to as **N-153** (1-[2'-deoxy-2'-C-(n-propyl-sulfanyl-methyl)-3',5'-di-O-(tert-butyl-dimethyl-silyl)- $\beta$ -D-arabinofuranosyl]-uracil) was synthesized at the Department of Medicinal Chemistry, University of Debrecen. The compound named N-153 is a di-O-silylated nucleoside analog derived from uridine, containing an unnatural D-arabinose sugar configuration and an n-propyl-sulfanyl-methyl branching at the C2 position [9].

The anticancer agent **5-fluorouracil** is a well-known antimetabolite. Under in vivo conditions, it is converted to 5-fluoro-uridine monophosphate. Substituting UMP with 5-fluoro-uridine monophosphate did not affect pre-rRNA processing. Its deoxynucleotide analog, F-dUMP, is an inhibitor of thymidylate synthase [10,11,12].

**Methotrexate (MTX)** is an anticancer antimetabolite and antifolate agent with significant immunosuppressive potential. It is a tetrafolate inhibitor that prevents the enzymatic activity of dihydrofolate reductase and the formation of tetrahydrofolate required for thymidylate synthesis [13].

Modified nucleoside derivatives containing a 3',5'-O-silylacetate protecting group, except for the **5th** derivative where this group has been removed. The **1st**, **2nd**, and **5th** derivatives are ribothymidine, while the **3rd**, **4th**, **6th**, and **7th** derivatives are uridine. They contain alkylsulfanyl-methyl groups at the 2' position, with the **1st** and **4th** derivatives having propyl, the **2nd** and **3rd** derivatives having butyl, and the **6th** derivative having a hexyl group. The **7th** derivative contains an acetylthio group. Each derivative has an arabinose

configuration, contrasting with the ribose configuration of natural nucleosides. The **8th** derivative is a 3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)- $\beta$ -D-ribofuranosyl-thymine. It was produced by disilylacetation of ribothymidine. The **9th** derivative is a 2'-Deoxy-2'-methylene-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)- $\beta$ -D-ribofuranosyl-thymine. It is the 2'-exomethylene derivative of ribothymidine. The **10th** derivative is the 2nd and 3rd structural analogue, containing a methyl aglycone instead of a nucleobase, making it a beta-methyl-ribofuranoside derivative rather than a nucleoside. The **11th** derivative is uridine 5'-dithioacetate derivative. In vivo, it potentially undergoes cleavage to yield thioacetic acid and 5'-thiouridine. The **12th** derivative is a 2'-Deoxy-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxyl)-N-dimethoxytrityl-2'-methylene-adenosine. It is the 2'-exomethylene derivative of adenosine protected with 3',5'-silylacetate and N-dimethoxytrityl groups. The **13th** derivative is a [2'-Deoxy-2'-C-(5'-deoxyuridin-5'-yl)-sulfanilmethyl-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)- $\beta$ -D-arabinofuranosyl]-thymine. It consists of two nucleosides (uridine and ribothymidine) connected via a sulfide bond. The **14th** derivative is a [2'-Deoxy-6-N-dimethoxytrityl-2'-C-n-butylsulfanilmethyl-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)- $\beta$ -D-arabinofuranosyl]-adenine. It is an arabino-configured 2'-deoxy-2'-C-butylsulfanilmethyl-adenosine derivative protected with 3',5'-silylacetate and N-dimethoxytrityl groups. The **15th** derivative is a [2'-Deoxy-6-N-dimethoxytrityl-2'-C-(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -glucos-1-yl)-sulfanilmethyl-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)- $\beta$ -D-arabinofuranosyl]-adenine. It is an arabino-configured adenosine derivative protected with 3',5'-silylacetate and N-dimethoxytrityl groups. It contains a glucose-peracetate substituent at the 2' position. The **16th** derivative is a [2'-Deoxy-6-N-dimethoxytrityl-2'-C-acetylsulfanilmethyl-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)- $\beta$ -D-ribofuranosyl]-adenine. It is a ribose-configured adenosine derivative protected with 3',5'-silylacetate and N-dimethoxytrityl groups. It carries an acetylsulfanilmethyl substituent at the 2' position. The **17th** derivative is a [2'-Deoxy-6-N-dimethoxytrityl-2'-C-acetylsulfanilmethyl-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)- $\beta$ -D-arabinofuranosyl]-

adenine. It is an arabino-configured adenosine derivative protected with 3',5'-silylacetate and N-dimethoxytrityl groups. It carries an acetylsulfanilmethyl substituent at the 2' position.

## New scientific results

---

Based on our new research findings, the combination of the MTT assay and time-lapse imaging videomicroscopy is an effective method for a more comprehensive examination of  $IC_{50}$  concentrations specific to cancer cell lines. The MTT assay measures cellular metabolic activity but is not specific for distinguishing the type of cell death or differentiating between viable and non-viable cells. On the other hand, time-lapse imaging videomicroscopy allows real-time observation of cell growth and division, as well as monitoring of processes related to the cell cycle and cell death.

During our research, we developed a protocol that can be used for the combined application of the MTT assay and time-lapse imaging videomicroscopy in cytotoxicity studies. Using this protocol, we tested several nucleoside analogs on cancer and non-cancer cell lines and determined the  $IC_{50}$  concentrations of each compound. We combined the results of the MTT assay with the recordings from time-lapse imaging videomicroscopy, which enabled the examination of changes in cell size, division times, duration of the cell cycle, and characteristics of cell death (e.g., apoptosis, necrosis).

Based on the results, we concluded that this new research method provides more accurate and faster results in the evaluation of drug candidates. The combination of the MTT assay and time-lapse imaging videomicroscopy allows for a more detailed examination of cellular events, thus providing more precise information about cell sensitivity and the mechanism of action of drugs. This method also determines the direction of further research, allowing for a broader exploration of side effect profiles and sensitivity.

The new research findings contribute to the advancement of cytotoxicity studies and the development of more effective drugs. Additionally, they reduce research time and costs and assist in further optimization of drug candidates before clinical application.

## Summary

---

Cancer is one of the leading causes of death, and the number of cases worldwide continues to rise. It is no wonder that the use of nucleoside derivatives and analogs as anticancer agents has significantly increased in the field of oncology. Nucleotides, nucleosides, or base analogs alone or in combination with other drugs account for about 20% of the therapy for cancer patients [14].

Currently, there are approximately ten different compounds in this category used in tumor therapy, and the demand for such compounds is continuously growing. Purine and pyrimidine analogs are present as antimetabolites in clinical practice. Several macrolactam compounds produced by the *Streptomyces atroolivaceus* species, such as leinamycin, have remarkable anticancer and antibacterial properties as they can inhibit DNA synthesis [15,15]. Analogs of leinamycin have shown increased cytotoxic activity against HeLa tumor cells, particularly those containing lipophilic, silylethyl groups [16].

The  $IC_{50}$  values of N-153 were nearly identical in CHO-K1 and HeLa cells. When quantified through time-lapse videomicroscopy, following treatment with N-153 nucleoside analogs at  $IC_{50}$  concentrations, cell size, cell division time, and cell generation time significantly changed compared to the DMSO control. HeLa cells were the most sensitive to N-153 nucleoside analogs, and the aforementioned parameters, along with the number of remaining necrotic bodies, increased in a time- and concentration-dependent manner compared to the DMSO control.

5-FU reduced the viability of cell cultures at lower concentrations than N-153. The MTT test showed that cell viability decreased by 60% at 5  $\mu\text{g/ml}$  of 5-FU, except for CHO-K1 cells. For HaCaT, SCC, and HeLa cells, the  $\text{IC}_{50}$  values were lower than 5  $\mu\text{g/ml}$ . Videomicroscopic quantification showed that tumor cell lines (SCC, HeLa) were more sensitive to 5-FU than the non-tumor HaCaT keratinocyte cell line. The characteristic of 5-FU treatment was necrotic cell death, except for CHO-K1 cells, where no necrotic remnants were observed in the TLS images. In contrast to this observation, necrotic remnants appeared in a time- and concentration-dependent manner after 5-FU treatment in HaCaT, SCC, and HeLa cells.

Experiments also showed that MTX reduced viability to a lesser extent than N-153 or 5-FU. Another noteworthy observation was the high  $\text{IC}_{50}$  value in CHO-K1 cells compared to HaCaT and HeLa cells, which was consistent with the formation of necrotic bodies in these cell lines.

D-arabinose-configured thymidine, uridine, and adenosine analogs were effectively synthesized through 3',5'-O-silyl-protected nucleoside 2'-exomethylene derivatives and various thiols, including alkylthiols, thioglycolic acid, and 1-thiosuccinic acid, by photoinduced thiol-ene reactions. The cytotoxic effect of these compounds was examined on tumor SCC and healthy HaCaT cell lines using the MTT assay. Among the sixteen tested nucleoside analogs, eleven derivatives showed concentration-dependent cytotoxicity. For compounds containing the same C2' modifying group, pyrimidine nucleosides exhibited higher activity than adenine derivatives, while all derivatives containing the 1' sugar were inactive regardless of the nucleobase type. The silyl protecting group, nucleobase, and appropriate C2' substituent were found to be crucial for the growth-inhibitory activity.

The 11th, 13th, and 15th pyrimidine nucleoside analogs, which had butylsulfanylmethyl or acetyltiomethyl substituents, showed the best cytotoxic profiles: they significantly reduced the viability of tumor SCC cells at low micromolar concentrations while barely affecting the viability of healthy HaCaT cells. The effects of the top three compounds, 11, 13, and 15, were studied in terms of cell size, division time, and cell generation time using time-lapse microscopy. The most significant increase in the size of the mother cells of tumor cell lines was caused by compound 13. The division time was significantly altered in both cell lines with treatment with compound 15. Interestingly, compound 13 selectively and significantly modified the division time in SCC cells, increasing it by 65%, while barely affecting the division time in HaCaT cells. All three compounds significantly increased the generation time. Although the MTT assay indicated that compound 11 more strongly inhibited tumor cells with greater selectivity than compound 13, the time-lapse microscopy studies showed the most significant changes in cell parameters indicating cytotoxicity caused by compound 13. Therefore, the 13th compound, a 2'-acetyltiomethyl-uridine derivative, can be considered a leading structure for designing new and more effective antitumor compounds.

The results of the experiments show that the N-153 nucleoside analog had similar  $IC_{50}$  values in CHO-K1 and HeLa cells but exerted a greater effect on the latter, as evidenced by the changes in the mentioned parameters and the time- and concentration-dependent appearance of necrotic cell remnants. In contrast, the compound 5-FU had a greater effect on tumor cells (SCC and HeLa cells) than on non-tumor HaCaT cells, and it induced time- and concentration-dependent necrotic cell death. The experiments also revealed that the compound MTX had a lesser effect on cell viability than N-153 or 5-FU. Experiments with different nucleoside analogs showed that compounds with specific modifications, such as butylsulfanylmethyl or acetyltiomethyl substituents, exhibited the best cytotoxic profiles by significantly reducing the viability of SCC cells at low microgram 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.

In the experiments that formed the basis of my thesis, we combined the MTT assay with time-lapse microscopy performed at appropriate  $IC_{50}$  concentrations specific to each tumor cell line. Time-lapse microscopy provided additional information on the effects of treatment with nucleoside analog inhibitors, including changes in:

1. Cell size
2. Duration of daughter cell division (cytokinesis)
3. Cell cycle duration
4. Extent of cell death (if present)
5. Type of cell death (apoptosis, necrosis)

The MTT assay provided information on the extent of inhibition by the cytotoxic compound, regardless of whether the cells remained viable or underwent cell death. Supplementing the MTT assay with time-lapse microscopy provided valuable visual information and allowed for quantitative analysis of the images obtained through light microscopy. Microscopy and image analysis can be sustained for longer periods, up to several weeks, broadening the horizons of cell toxicology studies. The perspectives of the combined analysis include the cytotoxic aspects of antimetabolites, antifungal agents, and antitumor agents.

Compared to other methods, such as flow cytometry, fluorescence microscopy, and Western blotting, the combined approach of the MTT assay and time-lapse microscopy has the advantage of providing a more comprehensive picture of the effects of nucleoside analog inhibitors on tumor cell lines.

While other methods, such as flow cytometry, are limited to analyzing cell cycle progression and apoptosis, and fluorescence microscopy may not be suitable for tracking temporal changes, Western blotting is restricted to analyzing protein expression without providing information about functional effects.

In contrast, the MTT assay and time-lapse microscopy allow for quantitative measurement of cytotoxicity and detailed visual documentation of the temporal changes in cell behavior and morphology. This approach aids in gaining a more comprehensive understanding of the effects of nucleoside analog inhibitors on tumor cell lines, potentially leading to the recognition and discovery of new therapeutic agents. Additionally, the application of image analysis enables more objective and reproducible data analysis, reducing the possibility of human error and bias.

## References

---

- [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] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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
- [8] <https://fiji.sc/>

- [9] 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.
- [10] Blanke, Charles D., Claus Rödel, and Mark S. Talamonti, eds. *Gastrointestinal Oncology: A Practical Guide*. Springer Science & Business Media, 2010.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] NCBI, PubChem Database. Methotrexate
- [14] 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
- [15] 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
- [15] 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
- [16] Szilagyí 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



Registry number: DEENK/163/2023.PL  
Subject: PhD Publication List

Candidate: Alexandra Kiss

Doctoral School: Pál Juhász-Nagy Doctoral School of Biology and Environmental Sciences

MTMT ID: 10076890

### List of publications related to the dissertation

#### Foreign language scientific articles in international journals (2)

1. Bege, M.<sup>\*</sup>, Kiss, A.<sup>\*</sup>, Bereczki, I., Hodek, J., Polyák, L., Szemán-Nagy, G., Naesens, L., Weber, J., Borbás, A.: Synthesis and Anticancer and Antiviral Activities of C-2'-Branched Arabinonucleosides.

*Int. J. Mol. Sci.* 23 (20), 1-24, 2022. EISSN: 1422-0067.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms232012566>

IF: 6.208 (2021)

<sup>\*</sup> These authors contributed equally to this work.

2. Kiss, A., Baksa, V., Tálas, L., Bege, M., Borbás, A., Bereczki, I., Bánfalvi, G., Szemán-Nagy, G.: MTT Test and Time-lapse Microscopy to Evaluate the Antitumor Potential of Nucleoside Analogues.

*Anticancer Res.* 41 (1), 137-149, 2021. ISSN: 0250-7005.

DOI: <http://dx.doi.org/10.21873/anticancer.14759>

IF: 2.435

### List of other publications

#### Foreign language scientific articles in international journals (9)

3. Demeter, F., Török, P., Kiss, A., Kovásznai-Oláh, R., Máthéné Szigeti, Z., Baksa, V., Kovács, F., Balla, N., Fenyvesi, F., Váradi, J., Borbás, A., Herczeg, M.: First Synthesis of DBU-Conjugated Cationic Carbohydrate Derivatives and Investigation of Their Antibacterial and Antifungal Activity.

*Int. J. Mol. Sci.* 24 (4), 1-20, 2023. EISSN: 1422-0067.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24043550>

IF: 6.208 (2021)





4. Máthéné Szigeti, Z., Tálás, L., Széles, A., Hargitai, Z., Nagy, Z. L., Nagy, M., Kiss, A., Kéki, S., Szemán-Nagy, G.: Potential Original Drug for Aspergillosis: In Vitro and In Vivo Effects of 1-N,N-Dimethylamino-5-Isocyanonaphthalene (DIMICAN) on *Aspergillus fumigatus*. *J. Fungi*. 8 (10), 1-11, 2022. EISSN: 2309-608X.  
DOI: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.3390/jof8100985>  
IF: 5.724 (2021)
5. Herman, P., Kiss, A., Fábrián, I., Kalmár, J., Szemán-Nagy, G.: In situ Remediation Efficacy of Hybrid Aerogel Adsorbent in Model Aquatic Culture of *Paramecium caudatum* Exposed to Hg(II). *Chemosphere*. 275, 1-8, 2021. ISSN: 0045-6535.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130019>  
IF: 8.943
6. Nagy, M., Szemán-Nagy, G., Kiss, A., Nagy, Z. L., Tálás, L., Rácz, D., Majoros, L., Tóth, Z., Máthéné Szigeti, Z., Pócsi, I., Kéki, S.: Antifungal Activity of an Original Amino-Isocyanonaphthalene (ICAN) Compound Family: Promising Broad Spectrum Antifungals. *Molecules*. 25 (4), 1-12, 2020. ISSN: 1420-3049.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25040903>  
IF: 4.411
7. Nagy, M., Rácz, D., Nagy, Z. L., Fehér, P. P., Kovács, S. L., Bankó, C., Bacsó, Z., Kiss, A., Zsuga, M., Kéki, S.: Amino-isocyanocridines: Novel, Tunable Solvatochromic Fluorophores as Physiological pH Probes. *Sci. Rep.* 9, 1-39, 2019. ISSN: 2045-2322.  
IF: 3.998
8. Bege, M., Kiss, A., Kiosák, M., Bereczki, I., Baksa, V., Király, G., Szemán-Nagy, G., Máthéné Szigeti, Z., Herczegh, P., Borbás, A.: Synthesis and Cytostatic Effect of 3'-deoxy-3'-C-Sulfanylmethyl Nucleoside Derivatives with d-xylo Configuration. *Molecules*. 24 (11), 1-23, 2019. ISSN: 1420-3049.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24112173>  
IF: 3.267
9. Nagy, Z., Nagy, M., Kiss, A., Rácz, D., Barna, B., Könczöl, P., Bankó, C., Bacsó, Z., Kéki, S., Bánfalvi, G., Szemán-Nagy, G.: MICAN, a new fluorophore for vital and non-vital staining of human cells. *Toxicol. Vitro*. 48, 137-145, 2018. ISSN: 0887-2333.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2018.01.012>  
IF: 3.067





10. Nagy, M., Rácz, D., Nagy, Z. L., Fehér, P. P., Kalmár, J., Fábíán, I., Kiss, A., Zsuga, M., Kéki, S.: Solvatochromic isocyanonaphthalene dyes as ligands for silver(I) complexes, their applicability in silver(I) detection and background reduction in biolabelling. *Sens. Actuator B. Chem.* 255 (3), 2555-2567, 2018. ISSN: 0925-4005.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2017.09.061>  
IF: 6.393
11. Szemán-Nagy, G., Baksa, V., Kiss, A., Turáni, M., Bánfalvi, G.: Gadolinium induced effects on mammalian cell motility, adherence and chromatin structure. *Apoptosis*. 22 (2), 188-199, 2017. ISSN: 1360-8185.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-016-1311-9>  
IF: 3.967

Hungarian abstracts (11)

12. Lőrincz, V., Laczkó, L., Polyák, L., Szemán-Nagy, G., Kiss, A.: A 640 nm-es hullámhosszúságú fény hatásának vizsgálata a szaruhártya regenerációjában in vitro karomodell alkalmazásával.  
In: Sántha Kálmán Tudományos Kerekasztal : Absztraktkötet 2020/2021. Szerk.: Matolay Orsolya, Fábíán Zsófia Andrea, Debreceni Egyetem, Debrecen, 25, 2021. ISBN: 9789633189283
13. Laczkó, L., Lőrincz, V., Polyák, L., Szemán-Nagy, G., Kiss, A.: A 700 nm-es hullámhosszúságú fény hatásának vizsgálata a szaruhártya regenerációjában in vitro karomodell alkalmazásával.  
In: Sántha Kálmán Tudományos Kerekasztal : Absztraktkötet 2020/2021. Szerk.: Matolay Orsolya, Fábíán Zsófia Andrea, Debreceni Egyetem, Debrecen, 27, 2021. ISBN: 9789633189283
14. Lőrincz, V., Laczkó, L., Polyák, L., Bege, M., Borbás, A., Baksa, V., Szemán-Nagy, G., Kiss, A.: Metotrexát és az N-153 nukleozid analóg tumorelleses 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
15. 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





16. Baksa, V., Tóth, D. A., Ujlaki, E., Kiss, A., Turáni, M., Szemán-Nagy, G.: TiO<sub>2</sub> biokompatibilitás vizsgálata humán sejtenyészetek esetében.  
In: XII. Sántha Kálmán Tudományos Kerekasztal : Absztraktkötet 2019/2020. Szerk.: Matolay Orsolya, Fábán Zsófia Andrea, Debreceni Egyetem, Debrecen, 113, 2020. ISBN: 9789633188560
17. Baksa, V., Turáni, M., Kiss, A., Tóth, 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, Fábán Zsófia Andrea, Debreceni Egyetem, Debrecen, 67, 2020. ISBN: 9789633188560
18. Tóth, L., Kiss, A., Farkas, D., Deák, A. G., 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
19. Tóth, 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, 563, 2019. ISBN: 9786155586422
20. Turáni, M., Baksa, V., Kovács, F., Kiss, A., Szemán-Nagy, G.: Többfalú karbon nanocsövek (mwnt) 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
21. Bege, M., Bereczki, I., Kiss, A., Baksa, V., Szemán-Nagy, G., Borbás, A.: Új, szénhidrát-módosított nukleozidszármazékok előállítás 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
22. Baksa, V., Kiss, A.: Gadolínium-klorid emiós 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





Foreign language abstracts (1)

23. 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.

**Total IF of journals (all publications): 54,621**

**Total IF of journals (publications related to the dissertation): 8,643**

The Candidate's publication data submitted to the IDEa Tudóstér have been validated by DEENK on the basis of the Journal Citation Report (Impact Factor) database.

17 May, 2023

