

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Egy ígéretes fotodinámiás kismolekula, a diMICAAC
hatásainak sejtbiológiai vizsgálata**

Bankó Csaba

Témavezető: Dr. Bacsó Zsolt



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2022

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	1
Rövidítések jegyzéke	3
1. Bevezetés.....	5
2. Irodalmi áttekintés.....	8
2.1 A PDT mechanizmusa és molekuláris háttere.....	8
2.2. A fotoérzékenyítők és a PDT generációi.....	11
2.3. A fotoérzékenyítők és a terápiás célpontok kombinálása	14
2.4. Az akridin származékok bemutatása, széleskörű biológiai funkciója.....	15
2.4.1. Az akridinek interakciója a DNS-el.....	16
2.5. Az akridin narancs bemutatása.....	17
2.6. Az akridin vázas vegyületek szintézise	18
2.7. Az új vegyületek bemutatása.....	21
3. Célkitűzések	23
4. Anyagok és módszerek.....	24
4.1. Alkalmazott sejtvonalak és tenyésztésük.....	24
4.2 A három vegyület fluoreszcens tulajdonságainak összehasonlítása.....	24
4.3. Toxicitás meghatározása	25
4.4. Spektrofluorimetriás mérések.....	26
4.5. Konfokális mikroszkópia	26
4.5.1. Spektrális képalkotás	26
4.5.2 Lizoszóma membrán fotolízis konfokális mikroszkópiával	27
4.6. LED indukált fototoxicitás vizsgálat.....	27
4.7. Sejtenkénti életképesség meghatározás lézer-szkenning citométerrel.....	28
4.8. Hiszton elúciós vizsgálat	29
4.8.1. Beágyazás.....	29
4.8.2 Permeabilizálás, hiszton elúció NaCl-al és immunfluoreszcens jelölés.....	29
4.9. Lizoszóma károsodás meghatározása	30
4.9.1 Mikrotálca leolvasó és LSC mérések.....	30
4.9.2 Képanalízis	31
5. Eredmények.....	34
5.1. Az új vegyületek fluoreszcens tulajdonságának vizsgálata	34

5.2.	A diMICAAC fluoreszcencia intenzitása a legmagasabb	35
5.3.	A diMICAAC jobb vitális festék, mint a másik két vegyület	36
5.4.	A diMICAAC toxicitása hasonló, mint az akridin narancsá	37
5.5.	A két vegyület abszorpciós maximuma 488 nm.....	38
5.6.	A diMICAAC emissziós spektruma jobbra tolódott	39
5.7.	Az AN és a DM spektrális képalkotása sejteken 405 nm-es gerjesztéssel	40
5.8.	A két vegyület spektrális képalkotása 488 nm-es gerjesztéssel	41
5.9.	A két vegyület spektrális képalkotása 543 nm-es gerjesztéssel	41
5.10.	Az AN fluoreszcencia intenzitása nagyobb, mint a DM-é.....	42
5.11.	Különböző szubcelluláris lokalizáció.....	44
5.12.	Az AN teljes sejtmagot, míg a DM nukleóluszt jelöl.....	45
5.13.	Fototoxicitás kék LED folyamatos megvilágítást követően.....	45
5.14.	Folyamatos zöld LED megvilágítással hasonló a fototoxicitás.....	47
5.15.	Frakcionált lézer megvilágítással az AN gyorsabb fototoxicitás mutat	48
5.16.	Csak a megvilágított területeken halnak el a sejtek	49
5.17.	A festékek mennyiségével arányos a fototoxicitás.....	50
5.18.	Az AN fototoxikusabb frakcionált besugárzással	51
5.19.	A membrán permeabilizálási PI kinetika statisztikai elemzése.....	53
5.20.	A PI festődés kinetikája frakcionált megvilágítás esetén.....	53
5.21.	Hisztin fehérjék elúciójának vizsgálata	55
5.23.	A fényérzékenyítők kromatin kapcsolatának vizsgálata	58
5.24.	A festékek hatása a lizoszómák integritására	59
5.25.	Lizoszóma károsodás kvantitatív meghatározása.....	63
6.	Megbeszélés	64
7.	Összefoglalás.....	74
8.	Summary	75
9.	Irodalomjegyzék.....	76
10.	Tárgyszavak.....	82
11.	Köszönetnyilvánítás	83
12.	Függelék.....	84

Rövidítések jegyzéke

3T3-MDR:	Humán pgp overexpresszált multidrog rezisztens egér fibroblaszt
ALA:	5-aminolaevulinsav
AMD	Korhoz kötött makuláris degeneráció
AN:	Akridin narancs
ATMPn:	9-acetoxi-2,7,12,17-tetrakis(β -metoxietil)-poribenzén
BSA:	Szarvasmarha szérum albumin
BPD:	Benzoporin származék
BPD-MA:	Benzoporin származék-monosav gyűrűje
DAM	Károsodással kapcsolatos molekula
DM:	3-dimetilamino-6-izocianoakridin
DMEM:	Sejt tenyésztő médium
DMSO:	Dimetil-szulfoxid
EDTA:	Etilén-diamin-tetraecetsav
ELISA:	Enzim-között immunoszorbens vizsgálat
ER:	Endoplazmatikus retikulum
EtNBS:	5-Etilamino-9-dietilaminobenzo fenotiazinium
FCS:	Fetális borjú szérum
HeLa:	Henrietta Lacks humán cervix karcinóma sejt
IC:	Belső konverzió
ICAAC:	3-amino-6-izocianoakridin
ISC:	Rendszerek közti átmenet
LMP:	Alacsony olvadáspontú agaróz

LLOMe:	L-leucyl-L-leucin metil észter, lizoszóma membrán károsító anyag
LSC:	Lézer-pásztázó citometria
monoMICAAC:	3-N-metilamino-6-izocianoakridin, 3-monometilamino-6-izocianoakridin
MTT:	(3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólium bromid), aktivitási életképesség próba
NCs:	Naftalocianin
NK	Természetes ölü sejtek
NPe6:	N-aszpartil chlorin
OCM-1:	Humán melanóma sejtvonal
PBS:	Foszfát puffer oldat
PDT:	Fotodinámiás terápia
PC:	Pftalocianin
PI:	Propidium jodid
PZ:	Porfirazin
RDT	Röntgen-sugár indukálta fotodinámiás terápia
ROI:	Az általunk vizsgált terület
RPMI:	Sejt tenyésztő médium
SKBR3:	Humán emlőtumor sejtvonal
TC	Citotoxikus T-limfocita
WHO	Egészségügyi világszervezet

1. Bevezetés

A WHO statisztikái alapján Európa szerte és világviszonylatban is, a balesetek, a szív- és érrendszeri betegségek mellett, a különböző eredetű malignus elváltozások, mint pl. a trachea, a bronchusok, a tüdőállomány, a colon, a rectum, vagy akár az agy daganatai is együttesen, a vezető halálozások okai közé tartoznak, mind a férfiak, mind a nők körében. Az immunrendszer kórokozókcal szemben felvonultatott védekező folyamatai a szervezet saját elöregedett, károsodott vagy elpusztult sejtjeit is képesek felismerni és eltávolítani, míg az egészséges szöveti sejtekkel szemben az immunrendszer nem lép fel, hanem "toleráns" marad. A daganatok kialakulásának lehetősége azt igazolja, hogy az immunrendszer ezt a feladatot nem vagy nem mindig megfelelően látja el [1]. A daganatok diagnosztizálása után a legjelentősebb terápiás lehetőségek közé tartoznak a sebészeti-, a sugár- (vagy radio-) és a kemoterápiás kezelések. Daganattípustól függően ezeket a terápiás lehetőségeket vagy önálló terápiaként vagy kombinálva alkalmazzák a tumor eliminálásának érdekében. Ezek közül a sebészeti beavatkozás, hogyha a daganat még nem adott metasztázist más szövetekbe vagy szervekbe, az elváltozás teljes eltávolítása adja a legnagyobb esélyt a gyógyulásra. A sugárterápiát általánosan arra alkalmazzák, hogy a daganatnövekedést kontroll alatt tartsák és ezáltal meghosszabbítsák a beteg életét vagy enyhítsék a tüneteket. A kemoterápiás beavatkozás lényege, hogy olyan citosztatikumokkal kezelik a betegeket, amely szerek gátolják a rákos sejtek proliferációját, meggátolva a daganatok növekedését, terjedését. Sajnos mind a sugárterápia mind a kemoterápia számos kellemetlen mellékhatással jár (hányinger, hányás, hasmenés, hajhullás, bőrviszketés és pl. napérzékenység). A mellékhatások mellett megfigyelhető, hogy a daganatos sejtek mellett az egészséges sejtek is rendkívül nagy számban pusztulnak. A legtöbb bevett kemoterápiás szer DNS-károsító módon hat, ami a tumorsejtek apoptotikus pusztulásához vezet [2, 3]. A kanonikus apoptózis a normál szöveti regenerálódás, ezáltal a fiziológiás homeosztázis része. Immunológiailag csendes folyamat, nem indukál kóros veszély jeleket. Az apoptózis aktiválódása inkább gyulladáscsökkentő hatást vált ki, így a rákos sejtek apoptotikus pusztulása gyakran észrevétlen marad az immunrendszer számára.

Ugyanakkor a daganat sejtek képződése esetén fellépő patológiás sejtpusztulási folyamatok esetén a specifikus immunsejtek felismerhetik a veszélyt és aktiválhatják az immunrendszert, például az apoptózis korai eseményei között a PS átfordul a membrán külső oldalára, ami opsonizáló hatású és elősegíti, hogy a fagocitasejtek felismerjék és eltávolítsák az apoptotikus hólyagokat. A daganatsejtek ellen kialakuló hatékony immunválasz sok

hasonlóságot mutat a vírussal fertőzött sejtek által kiváltott sejtes immunválasszal, amennyiben mind a vírus-, mind pedig a tumorelles immunválasz leghatékonyabb végrehajtó/effektor sejtjei a természetes ölósejtek (NK-sejt), valamint a citotoxikus T-limfociták (Tc). A két sejtfeleség eltérő módon tesz különbséget az egészséges és a megváltozott tulajdonságú, vírussal fertőzött vagy rákos sejtek között, de a sejtpusztító mechanizmusok beindulása hasonló molekulák közvetítésével vezet a vírust hordozó vagy ráksejtek membránjának károsításához és a célsejt elpusztításához. A Tc-sejteket a ráksejtekben szintetizálódó tumor antigének sejtben belüli lebontása során képződő peptidek MHC-I fehérjékkel alkotott sejt felszíni komplexei aktiválják. Az NK-sejtek citotoxikus aktivitását a peptiddel feltöltött sejt felszíni MHC-I molekulák jelenléte gátolja, így elsősorban azokat a tumorsejteket képesek károsítani, amelyek felszínén a tumorfejlődés késői szakaszában csökken az MHC-I molekulák megjelenése. Ezek a szigorúan szabályozott folyamatok indulnak be a kóros állapotok ellen, ami végeredményben a sejtek pusztulásához vezetnek [4]. Ezt a sejtpusztulási módot nevezzük immunogén sejtthalálnak. Az immunogén sejtthalál feltétele a plazmamembrán permeabilizációja és néhány intracelluláris károsodással kapcsolatos molekula (DAM) felszabadulása. Az ATP, az endoplazmatikus retikulum fehérjéje a kalretikulin, a HMGB1, a DNS-kötő nukleáris fehérje, illetve a sejtek RNS-e és DNS-e tipikus DAM-ok. Ezek számos szabályozott sejt halál folyamatban közösek. Például a piroptózisban, nekroptózisban, ferroptózisban, vagy a lizoszomális sejtthalálban a plazmamembrán permeabilizálódik, a specifikus membránfehérjék vagy oxidatív vagy proteozómális degradációja által, és ez megnyitja az utat a DAM-ok számára [2, 3, 5-7].

Az utóbbi években, az elméleti orvostudományban zajló kutatásoknak köszönhetően, egyre több új módszer, terápiás lehetőség áll a klinikumban dolgozó orvosok számára a daganatok kezelésére. Egyik legjelentősebb előrelépés a biológiai terápiák esetében tapasztalható, melyek a daganatok elleni immunfolyamatok aktiválásán keresztül kívánnak segíteni a szervezet saját daganatellenes tevékenységében.

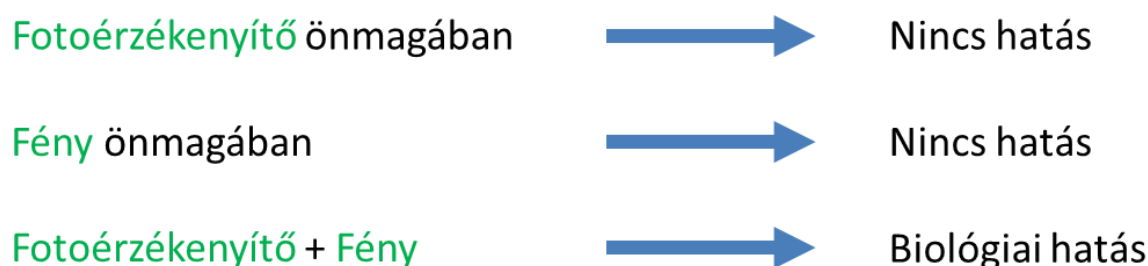
Manapság egyre nagyobb számban alkalmazzák az ún. fotodinámiás terápiát (PDT), amely a biológiai terápia, kemoterápia és a sugárterápia határvonalán helyezkedik el. A PDT-vel egy lépésben lehet diagnosztizálni és terápiás eljárást, ún. teranosztikát alkalmazni [8]. Az eljárás során használt fototoxikus szerek szintén hatékony DNS-károsító szerek, amelyeknek előnye, hogy hatásuk fényel szabályozható. Másrészt a fototoxicitás a DNS-en kívül más sejt organelumokat is célba vehet, így nem csak a gyorsan osztódó sejtek pusztításán keresztül hat.

Az extra-nukleáris organellumok károsodása általában piroptózist vagy nekroptózist okoz, melyek immunogénebb sejthalál-mechanizmusok, adaptív immunválaszt váltanak ki a legyőzendő tumorsejtek ellen, növelve ezzel a terápia hatékonyságát [6, 9-11]. A PDT lényege, hogy olyan atoxikus vegyületet juttatnak a szervezetbe, amelyek önmagukban semmilyen sejtkárosító hatást nem fejtenek ki. Köztudott, hogy a látható fény az elektromágneses hullámok közé tartozik, amelynek hullámhossz tartománya 400-750 nm közé esik és önmagában a látható fény sem okoz sejtkárosodást a szervezetben. Az eljárás lényege azonban, hogy a beadott vegyületet, adott területen, adott hullámhosszúságú fényel megvilágítva, a megvilágított területeken, különböző direkt és indirekt hatásoknak köszönhetően a sejtek elpusztulnak. Az első feljegyzett „fototerápiát” az ókori egyiptomiak alkalmazták, melyet Finsen írt le először a 19. században. Finsen örökletes Niemann-Pick betegségben szenvedett. Ez a betegség a máj, szív és lép kötőszöveteinek megvastagodásával, idegrendszeri, mozgáskoordinációs problémákkal és általános gyengeséggel jár. Állatkísérleteket végzett, majd a napfény és ívfény hatását kutatta különböző betegségekben, többek között fekete himlő és lupus vulgaris (bőrfarkas) esetében. Azt tapasztalta, hogy a fény stimulálja a szövetek működését, kivéve, ha túl koncentráltan adagolta, mert akkor szövetkárosodás lépett fel. Munkásságáért 1903-ban Nobel díjat kapott. A PDT-t a daganatokon kívül alkalmazzák pl. korhoz kötött makula degenerációban (AMD) vagy bőrelváltozásokban. Az alkalmazott vegyülettől függően antivirális, antimikrobális, antibakteriális hatást is kifejtethet, sőt a vérplazma és a víz sterilizálására is használhatják [12, 13]. A PDT alkalmazásainak területeit, típusait a következő részben bővebben is ismertetni fogom. Az Alkalmazott Kémia Tanszékkal együttműködve az újonnan szintetizált molekulák lehetséges fotodinamiás hatásának vizsgálatát tűztük ki célul.

2. Irodalmi áttekintés

2.1 A PDT mechanizmusa és molekuláris háttere

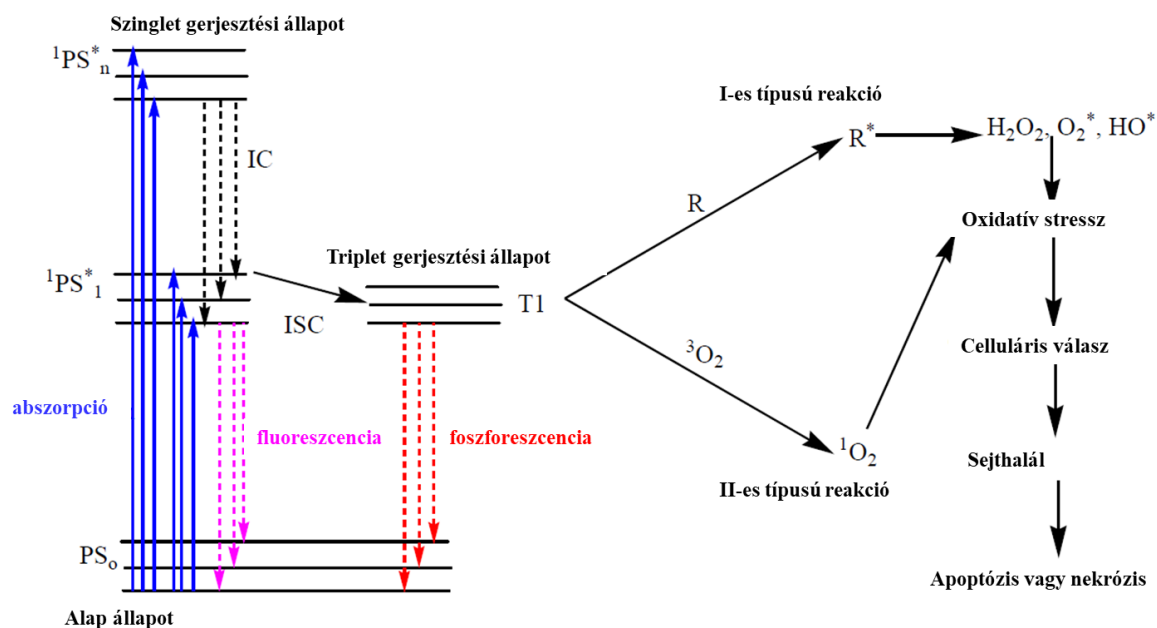
A PDT egy nem invazív terápiás eljárás, amely hatással lehet daganatokra, baktériumokra, vírusokra és mikrobákra egyaránt [14]. A terápia során három dolog játszik kulcsszerepet a hatás kiváltásában: egy fotoérzékenyítő anyag, a fény és az O_2 . A sejtek felveszik a fotoérzékenyítő anyagot, mely fény hiányában ártalmatlan mind az egészséges, mind a malignus sejtekre nézve is. Ezt a folyamatot mutatja a 2.1-es ábra.



2.1. ábra. A fotoérzékenyítő anyag csak a fénnel együtt tud hatást kiváltani biológiai rendszerekből. A 2.1-es ábrát a [15]-es számú hivatkozásban olvasott információk alapján készítettem.

Azonban, mikor egy adott hullámhosszúságú fénnel megvilágítjuk és a fotoérzékenyítő anyag elnyel egy fotont, a stabil alap állapotból valamelyik magasabb energiájú gerjesztett állapotába kerül. Innen rövid idő alatt belső konverzióval (IC) az első gerjesztett állapot alsó vibrációs szintjére kerül hőleadás révén. Az alapállapotba való visszatérésre több lehetőség van, melyek a környezettől vagy a molekulától függően különböző valószínűséggel következhetnek be. Az egyik lehetséges út a fluoreszcencia, amikor egy lépésben visszatér az alapállapot valamelyik vibrációs állapotába. Ekkor a különbözeti energiát foton formájában bocsájtja ki. Egy másik lehetőség a rendszerek közti átmenet (ISC). Ebben az esetben bizonyos külső kölcsönhatás révén az állapot jellege megváltozik és szingulett állapotból triplett állapotba megy át. Triplett állapotból a szingulett állapotba való direkt átmenet kis valószínűséggel mehet végbe, így ha innen történik sugárzásos átmenet az alapállapotba, akkor ehhez újra külső segítség kell, és ekkor a sokkal hosszabb élettartamú foszforeszcenciáról beszélünk. A foszforeszcencia élettartama hosszabb, mint a fluoreszcenciáé és a spektruma a hosszabb hullámhosszúságú, vörös tartomány felé tolódik el.

Ezt mutatja be a 2.2-es ábra bal oldali része [16, 17].



A 2.2. ábra egy módosított Jablonski diagram, amely a fotodinámiás terápia esetén bekövetkező hatásmechanizmust mutatja. (PS₀) gerjesztett szingulett állapot (S₁-S_n), amelyet rendszerközi átmenet követ egy gerjesztett triplett állapotba (T1). Rövidítések: IC: belső konverzió; ISC: rendszerközi átmenet; PS: fotoérzékenyítő; ¹PS*: szingulett gerjesztett fotoérzékenyítő; T1: triplett gerjesztett állapot; R: biológiai szubsztrát; R*: oxidált biológiai szubsztrát; ¹O₂: szingulett oxigén; H₂O₂: hidrogén-peroxid; O₂*: superoxid; HO*: hidroxilgyök. A 2.2. ábra a [16]-es referenciában fellelhető ábra felhasználásával készült.

Amikor a fotoérzékenyítőt megvilágítottuk a megfelelő hullámhosszúságú fénnel és bekövetkezett a gerjesztett állapot, látható, hogy a T1-es állapotból két biológiai kimenetel lehetséges. Az I-es típusú reakciónál a gerjesztett molekula reakcióba lép egy szubsztráttal és hidrogénperoxid vagy reaktív gyökök keletkeznek pl. (H₂O₂, O₂* , OH*), amelyek reakcióba léphetnek fehérjékkel és a bennük lévő aminosavakkal (triptofán, tirozin, hisztidin, cisztein) lipidekkel, (telítetlen foszfolipidek és koleszterol) és nukleobázisokkal (pl. guanin) [18, 19]. A II-es típusú reakció esetén a fotoérzékenyítő anyag energiát ad át az oxigénnek és triplett állapotú oxigénből gerjesztett szingulett állapotú oxigén keletkezik [20]. Ezt követően a reaktív gyökök vagy a szingulett állapotú O₂ a sejtben oxidatív stressz választ indukál, melyre a sejt ad egy celluláris választ, és ha a változás olyan mértékű, hogy a sejt már nem tudja kompenzálni a hatást (irreverzibilis) a sejt elpusztul.

A sejt pusztulásnak több típusa mehet végbe PDT terápia során attól függően, hogy milyen fotoérzékenyítőt, milyen célorganellel ellen használunk. Az általánosan ismert programozott sejthalál (apoptózis) és a hirtelen sejtelhalás (nekrózis) kívül szerepe van az autofágiának és a paraptózisnak is [15]. A PDT során bekövetkező apoptotikus útvonalat 1991-ben azonosították [21]. A fototoxicitásnak köszönhetően a fény hatására a mitokondriumból citokrom-c jut ki a citoplazmába, amely aktiválja az apoptotikus kaskád [22]. Az apoptotikus útvonal aktiválódásának hátterében a Bcl-2 fehérje direkt fotodestrukciója is állhat, amely folyamatnak köszönhetően a Bcl-2 elveszti a programozott sejthalál elleni védő hatását [23]. A nekrosis általában olyan halál út, amelynek következtében extracelluláris oldalról történő hatás indukálja a hirtelen sejtelhalást. A PDT kontextusában ez azt jelenti, hogy a fotoérzékenyítő és fény dózisa vezet a membrán integritásának elvesztéséhez, ezáltal a sejt líziséhez [24].

Az apoptózison és nekrozison kívül a PDT során fontos szerepet játszik az autofágia és a paraptózis is. A PDT esetén az autofágia mechanizmusával kapcsolatban megoszlanak a vélemények abban a tekintetben, hogy sejt elhalást indukál vagy gátol. Az autofágiának több típusa ismert, azonban általánosan igaz, hogy a lizozóma közreműködésével a feleslegessé vált vagy funkcióját veszítő sejt-komponensek újrahasznosításával, túlélő útvonalakat aktiválhatnak [25]. Erre egy kiváló példa, hogy az autofágia véd a mitokondriális fénykárosodás, ezáltal az apoptózis ellen, mégpedig úgy, hogy az elsődlegesen károsodott organellel megemésztődnek a lizozómákban.

Más kísérletek igazolták, hogy a lizozómális fotokárosodás létrehozásához ATG7 fehérje szükséges ahhoz, hogy a lizozómális proteázok felszabaduljanak, ami kiváltja az apoptózist. Tehát az ATG7 fehérje hiánya megvédi a sejteket a lizozómális sejtelhalástól lizozómális fénykárosodás esetén [26, 27]. Ha tehát a lizozóma volt a terápiás célpont, az autofágia és az autofágiához kapcsolt fehérjék kulcs szerepet játszanak a halál út, a beindításában a lizozómális permeabilizációt követően. Ezt a folyamatot nevezik úgy a szakirodalomban, hogy „halál autofágiával” [28, 29]. Ezek alapján elmondható, hogy terápiás célponttól függően az autofágia aktiválhat halál út, a túlélésben segíthet a sejteknek.

Megemlíthetünk egy másik, az apoptózistól különböző kimenetelt, amikor nem a kaspáz aktiváció, a kromatin kondenzáció vagy a sejt fragmentáció játsza a kulcsszerepet a sejtelhalásban. Ezt a lehetőséget paraptózisnak nevezzük, ahol egy jelentős mértékű

vakuolizáció zajlik. Legfőbb morfológiai különbség tehát az apoptózishoz képest, hogy nem látunk membrán lefűződéseket, kromatin kondenzációt vagy fragmentációt, hanem sejten belül számos vakuólumot találunk. Mind a mitokondriumnak, mind az ER-nek szerepe lehet a folyamatban. PDT során az ER-t stresszhatások érik, amelyek Ca^{2+} felszabadulást indukálnak a citoplazmába. Ennek a Ca^{2+} felszabadulásnak nagy jelentősége van a paraptózis kialakulásában. A paraptózis megjelenéséhez folyamatos RNS és fehérjeszintézisre van szükség, ugyanis leírtak több olyan kísérletet, ahol PDT terápia során fehérjeszintézis antagonistával (cycloheximide) vagy RNS szintézist gátló szerrel (actinomycin D) gátolták a paraptózis kialakulását [30, 31].

2.2. A fotoérzékenyítők és a PDT generációi

A PDT során alkalmazott fotoérzékenyítőknek több típusát különböztetjük meg. Ezeket az altípusokat különböző generációkra osztjuk. Az 1. generációs fotoérzékenyítőket a 20. század elején használták sikeresen először Tappenier munkacsoportjában Münchenben. Fluoreszcein alapú eozint használtak bőr karcinomás betegeken. Röviddel ezután egy német orvos, Meyer-Betz leírta a PDT legfőbb akadályát, mégpedig, hogy miután magába injektálta a Hematoporfirint, a napfényen általános bőrérzékenységet tapasztalt magán [32, 33]. Későbbi kutatások alapján, tisztított Hematoporfirin származékokat kezdtek el használni a klinikumban (Photofrin). Kezdetben hólyagrákban, később nyelőcső és nem kis sejtes tüdőrák esetében kezdték el használni először Japánban, majd az USA-ban és utána Európa egyes országaiban. Ennek a terápiának azonban számos hátránya volt, mégpedig, hogy abszorpciós maximuma 630 nm volt és gyengébb penetrációs hatékonyságot mutatott és kezelést követően az általános bőrérzékenység továbbra is fennállt [34, 35]. A 2. generációs fotoérzékenyítőknél a fejlesztés célja az erő és a hatékonyság növelése volt. További cél volt az, hogy minél több betegségben sikeresen alkalmazható legyen. A kutatásokban arra fókuszáltak, hogy megnöveljék az abszorpciós hullámhosszt, ugyanis a hullámhossz növelésével a szöveteknek kisebb az extinkciós koefficiense az elektromágneses spektrum vörös/közeli infra tartományában (600-850nm), amely lehetővé teszi, hogy a megvilágításra használt fény mélyebbre penetráljon a bőrben. A mélység növelésével pedig növelni lehet a tumorok elérhetőségét.

A 2. generációban szélesedtek a fotoérzékenyítők spektruma. Klinikailag használatban maradtak a porfirinek, azonban bevezették a chlorint, texapirint, porficéneket, purpurinokat és a phtalocianinokat [36-38]. Az ALA-ból, amely Levulanként lett forgalomba hozva, a hem bioszintézis útvonalán keletkezik a Protoporfirin IX, amelyet elsősorban képalkotásban és a

felszíni tumorok terápiája során használnak, de különböző dermatológiai eredetű betegségekben pl. acné, Bowen betegség, vagy psoriasis, is találunk példát alkalmazására. Az ALA származékait, mint pl. benzil-észter (Benvix), metil-észter (Metvix) és a hexil-észter (Hexvix) sikeresen használták bazális sejt karcinómákban, bőr léziókban és és gasztrointesztinális daganatokban terápiás szerként, azonban hólyag daganatok diagnosztizálása esetén is hasznos vegyületeknek bizonyultak [39-41]. Benzeporin származékok közül a BDP-MA (Visudyne és Verteporfin) makula degenerációban és nem melanóma bőr daganatokban biztató eredményeket mutattak. A Verteporfin nagyobb abszorpciós maximummal rendelkezik (690nm), így a fény 50%-al mélyebbre tudott penetrálni a bőrbe, ezért hatékonyabbnak bizonyult ez a terápiás eljárás, mint az 1. generációs Photofrin [42]. Az ón-etioapurin (Purlytin) egy chlorin alapú fotoérzékenyítő, ami egy porfirin származék, amely egy redukált exociklusos kettős kötéssel rendelkezik, amelynek köszönhetően a vörös fény felé 20-30 nm eltolódást eredményez az abszorpciós hullámhosszban, így abszorpciós maximuma 650-680 nm. A Purlytint jóváhagyták mellrák, psoriasis, restenosis és AIDS-es betegek esetén fellépő Kaposi szarkóma terápiás alkalmazására [43]. A Tetra-chlorin hatóanyagú Foscan és Temoporfin néven forgalomba hozott szereket fej és nyaki eredetű, gyomor és pancreas daganatokban, hyperplasiában jóváhagyták terápiás használatra, sőt sebészeti beavatkozások után sterilizációra, baktériumok elleni rezisztencia védelem esetén is hatásosnak bizonyultak. A Foscan előnye, hogy alacsony koncentrációban adható a betegeknek és kisebb fény dózis is elég a hatás kiváltásához, mert közel 100x fotoaktívabb, mint az előző esetekben bemutatott szerek. Azonban hátránya, hogy a beteg kezelést követően több mint 20 napig fényérzékeny lesz. A fényérzékenység a 2. generációs Verteporfin esetén 1-2 nap, Purlytin esetén kb. 2 hét, míg az 1. generációs fotoérzékenyítők használata után akár 90 nap is lehet [44, 45]. A lítium texaphyrin (Lutex/Lutrin) abszorpciós maximuma 730-770 nm, jobb penetrációs hatékonysággal rendelkezik és sikeresen alkalmazták mellrákban és malignus melanómákban, sőt restenosis megelőzésére is ígéretes szernek bizonyult. A Texapirin származékokat gadolinium komplexekkel MRI kontraszt anyagként is sikeresen használták [46, 47]. Az ATMPn, a porfirin strukturális izomerjének abszorpciós maximuma kb. 640 nm-nél van és psoriasis vulgaris és felszíni nem melanóma bőr elváltozásokban alkalmazták [48]. Klinikai kísérletekben pikkelyes sejt karcinómákban és emésztő rendszeri daganatokban ígéretes eredményeket mutatott a cink phtalocianin (PC) [49]. Szulfonált-alumínium porfirin származékként (Photosens) szintén belépett a klinikai kísérletes fázisba és különböző bőr, mell, tüdő és gasztrointesztinális eredetű daganatokban hatásosnak bizonyult [50]. A szulfonálás javítja a polaritását a vegyületnek, ezért hordozó egységekre volt szükség, amelyek

segítségével könnyebben injektálhatóvá vált a vegyület. A szulfonált formát szilikon komplexekkel kezdték el kombinálni és hatékonynak bizonyultak colon, ovarium malignus elváltozásiban és gliomákban is. A daganatok terápiás alkalmazásán kívül, a vér komponenseinek sterilizálásában is biztató eredményeket mutatott. A szilikon hordozók azért voltak hatékonyabbak a fém hordozókkal szemben a szulfonált vegyületek esetében, mert amikor fém hordozót használtak, a vegyületek vagy részlegesen vagy teljesen elvesztették a fotoaktivitásukat [46]. Megszintetizálták a Porfirazin származékok közé tartozó Tetraazoporfirint, melyet sikeresen alkalmazták kínai hörsög tüdő fibroblast sejtek esetén in vitro körülmények között, és kationos fém komplexekkel, (CuPZ, MgPZ, AlPZ, GaPZ), a többi vegyülethez hasonlítva, az egyik legjobb toxicitást tudták elérni [39]. Megszintetizálták a Naftalocianint (NCs), amelynek abszorpciós maximuma 740-780 nm, abban bízva, hogy mélyebben lévő szöveteket is sikeresen tudnak majd kezelni, ugyanis a látható fényt nehezen lehet eljuttatni az ilyen területekre. Az NCs emissziós spektruma közeli infravörös tartományba esik, így nagyon jó lehetőség nyílt, a vegyület, in vivo képalkotásban való tesztelésére. Az NCs kevésbé stabil, mint a PC, mivel fény és O₂ jelenlétében lebomlik, és H aggregátumok fognak keletkezni [51, 52]. Ha megváltoztatjuk a makrociklusos fotoérzékenyítők funkciós csoportjait, javíthatjuk a fotodinámiás hatást. A diamino platina porfirin jobb antitumor aktivitással rendelkezik, mert kombinálja a platina komplex citotoxicitását és a porfin vázas vegyületek PDT aktivitását [53]. A kationos PC származékok pozitív töltéssel rendelkeznek és valószínűleg a mitokondriumban lokalizálódnak és kulcs szerepet játszanak a sejt túlélésben és az oxidatív foszforilációban. A cink és réz PC komplexeit megvizsgálva azt találták, hogy nem rendelkeznek nagy fotoaktivitással. A vízdékony nitrofenil, aminofenil, hidroxyfenil, és/vagy a pyridiniumyl funkciós csoporttal rendelkező PC származékok in vitro kísérletekben változó fotoaktivitással rendelkeztek funkcióscsoportoktól és a természetesen előforduló fém vegyületektől függően. A mangán pyridiniumyl rendelkezett a legnagyobb fotoaktivitással, míg a nikkell és cink analógok teljesen inaktívok voltak. A vas kelátok hasonlóan magas fotoaktivitást mutattak HIV fertőzött immundeficiens MT-4 sejtekben [54-56]. A hidrofílszulfonált és diszulfonált analógok nagyobb fotodinámiás aktivitással rendelkeznek, mint a szerkezet analóg mono- tri és tetra szulfonált analógok [57].

A 3. generációs fotoérzékenyítőknél a kutatások arra fókuszálnak, hogy a gyenge oldékonyságú 1. és 2. generációs fotoérzékenyítőkkal ellentétben közvetlenül a véráramba lehessen injektálni az alkalmazott szereket. Direkt célpontokra fejlesztik a vegyületeket és akár antitesthez kötve, akár nano hordozókba injektálva célzott biológiai terápiás ágensként

szándékoznak használni a fotoérzékenyítő anyagokat. Fontos szempont az is, hogy a szelektivitás és specificitás növelésével emelkedjen a terápia hatékonysága is. Napjainkban a PDT során a legfontosabb elv, hogy képesek legyünk egy lépésben diagnosztizálni és terápiás eljárást is alkalmazni a lehető legrövidebb idő alatt a legnagyobb hatékonysággal. A képalkotás fejlődésével lehetőség nyílt a fotoérzékenyítők fluoreszcens tulajdonságainak kihasználásával a pontosabb lokalizálásra, a farmakokinetikai és farmakodinámiai ismeretekkel pedig lehetőség nyílt a kis molekulájú terápiás alkalmazásra, amelyek elkerülik a vese károsítást és hosszútávon sem károsítják a szervezetet [14].

2.3. A fotoérzékenyítők és a terápiás célpontok kombinálása

Az eddig leírt PDT terápia legjelentősebb célpontja a mitokondrium volt, ugyanis a különböző típusú fotoérzékenyítők felhalmozódása a mitokondriumban eredményesen indította be az apoptotikus kaszkádot. A mitokondrium mellett az ER károsítása is indukálhat apoptózist. Egy másik terápiás célpont a sejtmag lehet, mert a sejtmag az egyik legérzékenyebben reagáló organelum a károsító ágensekre nézve, tehát a sejtmag károsítása igen gyorsan sejtelhaláshoz vezet [58]. A fotoérzékenyítők feldúsulhatnak ezeken a célpontokon kívül még a lizoszómákban is. A fotoérzékenyítők intracelluláris lokalizációja nem egy statikus folyamat. Megvilágítás alatt megváltozhat a fotoérzékenyítők sejten belüli eloszlása, ugyanis például a lizoszómában fény indukált károsodás hatására membrán károsodás jöhet létre, melynek következtében a lizoszómában dúsult anyagok kijutnak a citoplazmába. A PDT fejlődésében kiemelt jelentősége van a fotoérzékenyítő anyagok fejlesztésének és a terápiás célpontok kombinálásának. Az első kombinációt 1996-ban Cincotta kísérte meg, ugyanis publikált egy sikeres PDT terápia protokollt, ahol EtNBS-nek nevezett fenilbenzoltiazolt BPD-vel kombinált, amely terápiával sikeresen távolított el nagy méretű tumorokat egerekből. Ebben a terápiában magas volt a fotoérzékenyítők dózisa. A nagyobb méretű (3-5 mm) tumorok eltűntek, azonban nagyszámban megjelentek különböző eredetű léziók. A benzoporin származék volt a felelős a tumorok érrendszerének károsításáért, míg az EtNBS volt a fotokémiai reakcióért [59]. A későbbi tanulmányok nem igazolták az antivaszkuláris hatást, így ebben a terápiában a szinergikus hatás rejtély maradt. Ezt a szinergikus hatást azonban egy másik kutató csoport is sikeresen igazolta, ugyanis több fotoérzékenyítő anyagot használtak egyidőben, amelyek ugyanolyan hullámhosszon aktiválódtak [60, 61]. Az EtNBS és NPe6 (N-aszpartil klorin n6) terápiás célpontja a lizoszóma volt, míg a BPD nagy affinitást mutatott a mitokondrium és az ER irányába. A lizoszómális

károsodás Ca^{2+} felszabadulást okozott a citoplazmába, amely calpain aktivációt eredményezett. Ezt követően következett be a fragmentáció és az apoptotikus sejtelhalás, de bizonyított tény, hogy a programozott sejthalál beindításához az szükséges, hogy a lizoszóma fotokárosodása időben hamarabb bekövetkezzen. A lizoszómális károsodás továbbá okozhat még vasion felszabadulást, amely a mitokondriumban reaktív oxigén gyökök keletkezését eredményezi, amely szintén gyorsította az apoptózis beindítását ezekben a kísérletekben [62, 63]. Ebben a részben azt szerettem volna bemutatni, hogy ha több organelum is érintett a PDT terápia során, ez emelheti a terápia hatékonyságát.

2.4. Az akridin származékok bemutatása, széleskörű biológiai funkciója

Az akridin származékok egyike a legrégebben és a legsikeresebben alkalmazott bioaktív származékoknak. A proflavint és az acriflavint (proflavin és euflavine keveréke) már a 20. század elején használták helyi antibakteriális hatása miatt [64], az 1940-es évektől pedig elterjedt egy másik akridin, az aminoakrin (9-aminoakridin) [65]. Az akridineket széleskörben használják az 1940-es évektől egészen napjainkig antimaláriás ágensként elsősorban mepacrin és pyronaridin formájában [66]. Az euflavin, acriflavin és a hozzájuk kapcsolódó akridin sárga esetében gyenge tumorelles hatást mutattak ki állat modellekben, és a mepacrint eléggé széles körben használták daganat ellen adjuvánsként. Azonban az első akridin alapú daganat terápiát az 1970-es években fejlesztették ki, Lengyelországban, az ún. nitracrint (1-nitroakridin) és Új-Zélandon az ún. amsacrint (9-anilinoakridin) használták erre [67]. Azóta farmakológiai hatás szempontjából számos akridin alapú származék került a piacra. Bucricaint [butyl-(1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)-amin] használnak szem- ill. gerinc helyi érzéstelenítésére, perifériás ideg blokkolásra.

A quinacrint [2-methoxy-6-chloro-9-(1-diethylamino-3-methylpropanamine)-akridin] a mepacrinhoz hasonlóan antimaláriás szerként használják, mivel gátolja a plasmodium gametogenezisét. A 9-aminoakridin fertőtlenítő hatású. A proflavin (3,6-diaminoakridin) bakteriosztatikus hatását is igazolták számos Gram pozitív baktériumnál [68]. Nitracrin [1-nitro-9-(dimetil-aminopropilamino)akridin] DNS károsodást okoz, ezért daganatellenes hatása van [66]. Az acriflavint (3,6-diamino-10-metilakridinium klorid) bőr és nyálkás membránok fertőtlenítésére használják [69]. A 9-arylakridin származékok erős interakcióba lépnek a topoizomeráz 1-el, így daganatellenes hatásuk bizonyított [70]. Tomar és munkacsoportja végzett nem katalizált nukleofil aromás szubsztitúciót 3'-aminokalkon vagy 4'-aminokalkon és 9-kloroakridin között, mely reakciókkal kalkon származékokat szintetizált, amelyek 10

$\mu\text{g/ml}$ -es koncentrációban gátolták a *Plasmodium falciparum* gametogenezisét [71]. Sondhi és munkacsoportja kivitelezett 9-chloro-2-4-unszubsztituált akridinen, ill. 9-isotiocianát-2,4-unszubsztituált akridinen kondenzációt különböző aminokkal. A második reakció végterméke 41%-os gyulladáscsökkentő hatást mutatott, ami jobb volt az akkor legelterjedtebb Ibuprofen 39%-os gyulladás csökkentő hatásától [72]. Chandra és munkacsoportja szintetizált acridinil pyrazolin származékokat, amelyek gyulladás csökkentő és fájdalomcsillapító hatással is rendelkeztek 25-100 mg/kg dózisban [73]. Kumar és munkacsoportja szintetizált quinolin-akridin hibrideket, amelyek szintén hatásosak voltak *Plasmodium falciparum* ellen [74]. Patel és munkatársai rájöttek, hogy difenilamin kondenzációja 2-oxo-2H szubsztituált króm-4-yl ecetsavval Zn-klorid jelenlétében, olyan végterméket eredményez, ami szintén antimikrobiális és daganatellenes hatást mutatott [75]. Chen és munkatársai szintetizáltak egy 9-anilinoakridint, amely *in vitro* körülmények között emberi limfoblasztikus leukémia sejtvonalon olyan citotoxikus hatást váltott ki, mint a taxol [76]. Opegard és munkatársai 9-aminoakridin származékkal hasnyálmirigy daganatos sejtekben sikeresen indukáltak apoptózist [77]. Azim és munkatársai akridinil származékokat kombináltak aszparaginsav inhibitorokkal, melynek eredményeképpen nanomolos koncentrációban is sikerült gátolni a *Plasmodium* gametogenezist [78]. Giorgio és munkatársai proflavinból olyan diaminoakridin származékokat szintetizáltak, amely antileishmániás hatással bírt [79]. Goodell és munkatársai bebizonyították, hogy akridin származékok és carboxamid szubsztitúciója antiherpes ellenes hatást okoz, mivel gátolja a topoizomeráz II relaxációját szupercsavart DNS esetében [80]. Klinikai kísérletekben is sikeresen alkalmaztak akridin vázas vegyületeket. Az amsacrin sikeres kezelésnek bizonyult akut promyelocisztikus leukémiában, valamint felnőttkori akut limfoblasztikus és felnőttkori myeloid leukémiában is [81].

2.4.1. Az akridinek interakciója a DNS-el

Az okok, ami miatt az akridin származékokat széleskörben használják kemoterápiás szerként az a biológiai stabilitás, a közvetlen DNS-hez kötődés, mellyel megzavarhatják a sejt funkcióit, és magát az alapvegyületet, készen, előre megszintetizált állapotban is be lehet szerezni [82]. Köztudott, hogy az akridin vázas vegyületek a DNS-hez jól kötődnek. Az akridin narancs interkalálódik, tehát a polyaromás kromofór beépül a dupla-helikális DNS bázispárjai közé, és egymásra kölcsönösen hatva töltés-transzfer lesz az aromás rendszer és a DNS bázispárjai között. Ez a DNS letekeredését fogja eredményezni, amit először a proflavinnal sikerült igazolni [83]. Később ugyanezt a hatást bebizonyították más, akridin vázas

vegyületekről is [84]. A DNS-be való interkalódás szükséges feltétele az akridin vázas vegyületek effektív antitumor hatásának. Az affinitás a kemoterápiás hatást befolyásolja és a kötődés kinetikája is meghatározó tényező a biológiai aktivitásban. Elmondható az akridin vázas vegyületekről, hogy mind két komponensű drog/DNS, mind három komponensű drog/DNS/topo komplexek kialakítására is képesek [85].

Ezek alapján látható, hogy az akridin származékok változatos kémiai és farmakológiai tulajdonságokkal rendelkeznek, melyeknek köszönhetően biológiai jelentőségük igen széles spektrumon helyezkedik el. Összegzésként elmondható, hogy az akridin vázas vegyületeknek vannak antibakteriális, antiprotozoális, fertőtlenítő, genotoxikus és citotoxikus hatásai is.

2.5. Az akridin narancs bemutatása

Az akridin narancsot (AN, kémiai struktúra: $C_{17}H_{20}N_3 \cdot 1/2ZnCl_2$, Cas No.10127-02-3) először köszénkátrányból vonták ki gyenge bázikus festékként több mint 100 évvel ezelőtt. Az akridin narancs, az előző részben bemutatott akridin vázas vegyületekhez méltóan, szintén számos biológiai aktivitással rendelkezik. RNS-re és DNS-re specifikus fluoreszcens festék, kiváló pH indikátor, antimaláriás és daganatellenes hatással is rendelkezik. Széles körben használják baktériumok és paraziták azonosítására, emellett apoptózis és sperma mozgékonyág vizsgálatára is alkalmas. Az AN-ot több éve használják fotoérzékenyítőként is, ezért fontos szerepet tölt be a PDT terápia során [86-92]. Az AN-nak alacsony a molekulatömege (369,94 Da), és fiziológiás pH melletti hidrofobicitása miatt képes bediffundálni az élő sejtek sejtmagjába, ahol a DNS-hez és RNS-hez kötődik. Élő sejtekben, és főleg élő tumor sejtekben ugyanakkor gyorsabban jut be a lizoszómákba és egyéb savas vezikulákba is, ahol a pH változás miatt megszerzett töltése miatt addig marad csapdázódva, amíg az organelumok membránja intakt [93].

Az AN képes zöld fluoreszcens jel kibocsátására, kék fény excitációt követően, lehetővé téve a tumorok makroszkópikus vizualizálását. Ezt a tulajdonságát használta ki Kusuzaki és munkacsoportja, amikor egér oszteoszarkóma sejteken vizsgálták az AN hatását. Az AN-PDT-nak erős citocid hatása van egér oszteoszarkóma sejtekre, beleértve a multidrog rezisztens oszteoszarkóma sejteket is. Az AN 72 órás kezelést követően meggátolta a tumor növekedését. In vivo körülmények között egér oszteoszarkóma sejtekre, az AN-RDT-t (amely AN kezelés utáni alacsony dózisú röntgen besugárzást jelent; kevesebb mint 5 Gy) követően hasonló sejtkárosító hatást mutatott, mint az AN-PDT [94, 95]. Számos malignus eredetű

elváltozásban vizsgálták az AN hatásmechanizmusát. Egy példa erre, hogy az AN, kezelés után gyorsan be tud jutni, mind az oszteosarkóma daganatokba, mind az izomszövetekbe, azonban az izomszövetből viszonylag gyorsan, kb. 2 óra alatt kiürül. Ezzel ellentétben a tumoros sejtekből az AN kiürülése lassabb, mint az izomszövetek esetében. Az AN tehát kötődik a savas struktúrákhoz, mint például a lizoszómákhoz, vagy éppen a DNS-hez és az RNS-hez, savasságuktól függően. Kísérletek igazolták, hogy a legtöbb malignus eredetű szarkóma savasabb, mint benignus változatok, vagy éppen a normál lágy szövetek. Ennek hátterében a rosszindulatú tumorok hipoxiásabb környezete és felgyorsult metabolizmusa áll, mely miatt nagyobb mennyiségű protonot termelnek. A proton felesleg a proton pumpáknak köszönhetően a lizoszómákba vagy az extracelluláris folyadékba szekretálódik. Az AN lizoszómákba való bejutása után, a savas vezikulákban lévő protonok nagy mennyisége miatt ionizálódik, ami megakadályozza gyors eliminációját a tumoros sejtekből [96, 97].

Klinikai kísérletekben is összehasonlították az AN-RDT-t és az AN-PDT-t. 1999 júliusától 2005 februárjáig 32 beteg esetében 33 muszkuloszkeletális léziót kezeltek intralezióan vagy marginális excízióval és ezeket kombinálták AN-PDT-vel és AN-RDT-vel. Minden beteget kezelést követően egy évtől tovább figyeltek meg. A 33 lézióból 21 volt primer lézió, 10 visszatérő lézió és 2 metasztázis. A nemek aránya 19 férfi és 13 nő volt, 1-től 82 éves korig. A megfigyelési periódus 12 hónaptól 72 hónapig tartott. Minden esetben magas kockázatú malignus szarkóma volt a diagnózis. Csak egy esetben fordult elő helyi lokális tumor kiújulás, 4,8 % helyi lokális rátával. 2 beteg elhunyt tüdő metasztázisok következtében. Ezen kívül minden beteg felépült majdnem normális végtag funkcióval [98, 99].

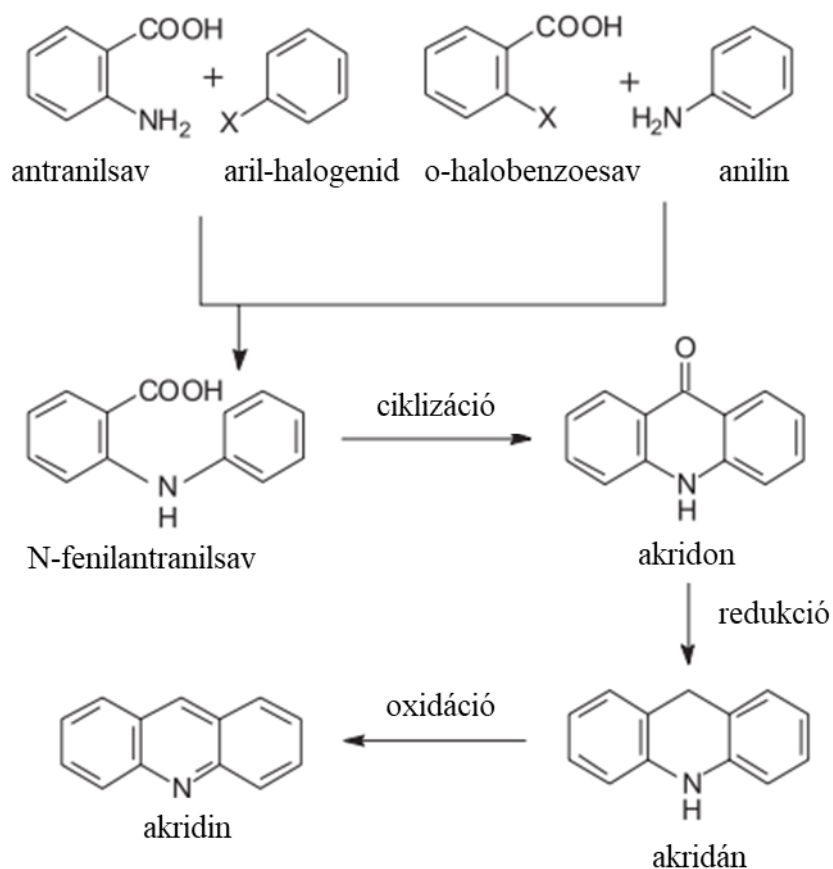
Összegezve az előbbi gondolatokat, az AN -hatékonyságát, eddig nem csak in vitro körülmények között tesztelték, hanem voltak sikeres klinikai alkalmazásai is.

2.6. Az akridin vázas vegyületek szintézise

Az akridint, hígított kénsavban, kőszénkátrányból választják el rázattal és a kénsavból kicsapódott termékhez kálium-dikromátot adnak. A keletkező akridin- dikromátot utolsó lépésként ammóniában bomlasztják el. Az akridin és homológjai gyenge bázikus jelleggel bíró stabil vegyületek lesznek. Az akridin pK_a értéke 5,6, amely hasonló a pyridinhez. Számos módszer áll rendelkezésre, amellyel akridint vagy akridin származékot, akridinont lehet előállítani [100].

- Ullman szintézis:

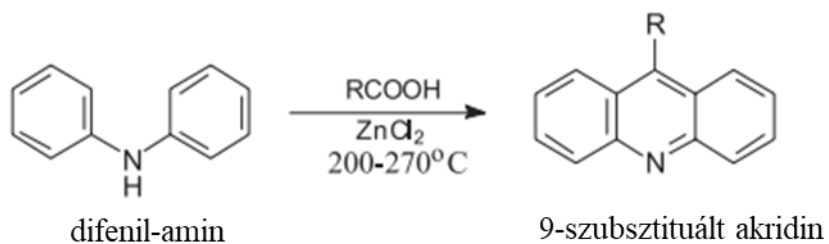
Primer amin kondenzációja aromás aldehid vagy aromás karboxil-savval egy erős ásványi sav (H_2SO_4/HCl) jelenlétében dehidrogenizációt okoz, ami akridin hozamot eredményez.



A 2.3. ábrán az Ullman szintézis látható, amely szintézis akridint eredményez [101].

- Bernthsen szintézis:

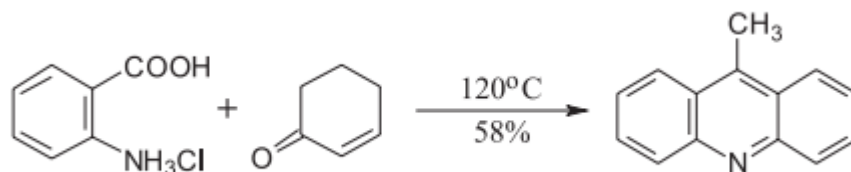
A Bernthsen szintézis magában foglalja a difenilamin karboxil-savval való reakcióját cink-klorid jelenlétében, amely egy akridin formációt eredményez.



A 2.4. ábrán az Bernthsen szintézis látható, amely szintézis 9 szubsztituált akridint eredményez [102].

- Friedlander szintézis:

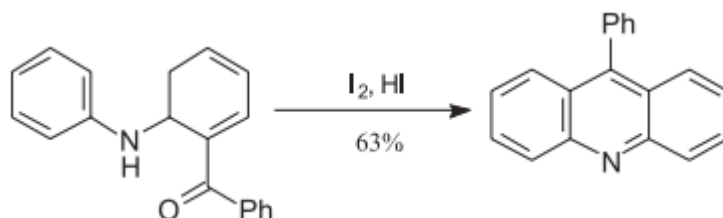
Ebben a szintézisben antranilsav sóját kezelik cyclohex-2-enonnal 120 Celcius fokon, amely hatására kialakul a 9-metilakridin.



A 2.5. ábrán a Friedlander szintézis látható, amely szintézis 9-metilakridint eredményez.

- C-acilált difenilaminból:

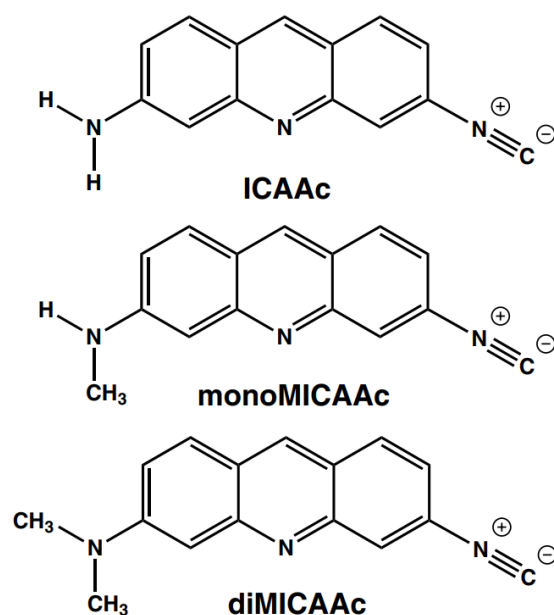
Ebben a reakcióban difenilamint hevítenek I₂/HI jelenlétében, amely 9-fenilakridint eredményez.



A 2.6. ábrán a C-acilált reakció látható, amely szintézis 9-fenilakridint eredményez [103].

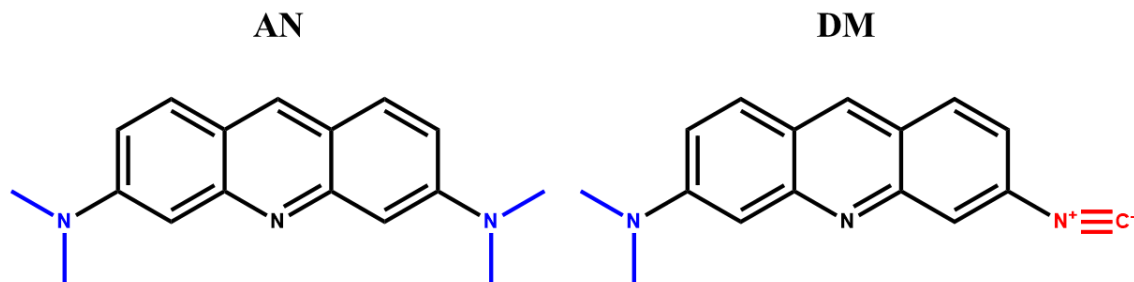
2.7. Az új vegyületek bemutatása

Mint azt az előző részben láthattuk, akridin vázat számos reakció eredményeképpen kaphatunk. Az akridin vázas vegyületek szintézisét követően különböző funkciós csoport cserével különböző tulajdonságú vegyületek hozhatóak létre, melyek fokozzák a fotodinámiás hatást. A következő ábrán az Alkalmazott Kémiai Tanszék által szintetizált három új vegyületet láthatjuk [104].



Az 2.7. ábrán 3-amino-6-izocianoakridin (**ICAAC**), a 3-N-metilamino-6-izocianoakridin (**monoMICAAC**) és a 3-N,N-dimetilamin-6-izocianoakridin (**diMICAAC**) szerkezeti képlete látható.

Egy „intelligensebb” fluoreszcens festék előállításának lehetséges megoldása az AN egyik dimetil-amino-csoportjának cseréje egy multifunkcionális elektrofil csoporttal, például az izocianiddal. Az izonitrilek sokoldalú kémiájának ellenére az izocianoakridinek területe mindeddig teljesen felderítetlen maradt. Az izocianocsoport beépítésének számos előnye van: az AN pK_a értékét 10,5-ről 7,0 körüli értékre csökkentheti, így egy erőteljes, reaktív C-N kötés sokoldalú bázisként szolgálhat számos szerves reakcióhoz. Az izonitrilek könnyen képeznek komplexeket az átmenetifém-ionokkal. 3-amino-6-izocianoakridin (ICAAC) nyerhető a proflavin diklórkarbénnel történő kezelésével, amelynek eredményeként az egyik aminocsoport izonitrillé alakul át. A következő ábrán pedig a DM-et hasonlítjuk össze az AN-al:



Az 2.8. ábrán Az akridin-narancs 3,6-bisz-dimetilamino-akridin (AN) és a diMICAAC 3-N,N-dimetilamino-6-izocianoakridin (DM) kémiai szerkezete látható

Az AN molekulatömege: 265,35 g/mol, molekula formulája: C₁₇H₁₉N₃, kémiai neve: 3,6-bisz(dimetilamino)akridin; vagy 3-N, 3-N, 6-N, 6-N, 6-N-tetrametilakridin-3,6-diamin.

A DM molekulatömeg: 247,29 g/mol, molekuláris képlet: C₁₆H₁₃N₃, és kémiai név: 3-N,N-dimetilamino-6-izocianoakridin. A DM-et a Bernthsen-szintézis alkalmazásával szintetizáltuk. A DM-ben egy poláris izocianát funkciós csoport van, amely az AN-ban lévő apoláris dimetilamino csoportot helyettesíti. A DM poláris szegmensének negatív töltésű szénatomot tartalmazó vége kifelé orientált. Kémiai vizsgálatok kimutatták, hogy az izocianát funkciós csoporttal rendelkező vegyületek új sorozata szolvatokróm fluoreszcens tulajdonságokkal rendelkezik, és a sejtek fiziológias körülményei között a lizoszómák pH-szondáiként használhatóak. Ezért arra voltunk kíváncsiak, hogy a DM hatékony lizoszomális szonda lehet-e élő humán sejtek esetében.

3. Célkitűzések

A PDT-re alkalmas szerek egyre szélesebb körben kerülnek felhasználásra, mind diagnosztikai, mind terápiás alkalmazásban. Ilyen potenciális PDT szerek a Debreceni Egyetem Alkalmazott Kémia Tanszéke által szintetizált akridin vázas vegyületek. Ezen új vegyületek fizikai és kémiai tulajdonságait szeretnénk jobban megismerni, célul tűztük ki annak kiderítését, hogy a három újonnan szintetizált vegyület közül melyek alkalmasak élő sejtek kezelésére megvilágítás nélküli körülmények között, illetve össze szeretnénk hasonlítani az előző módon kiválasztott szer vagy szerek fototoxicitási tulajdonságait a szakirodalomban már jól karakterizált vegyület, az akridin narancs sejszintű fototoxicitásával.

Ehhez az alábbi célokat tűztük ki:

- Meg szeretnénk ismerni az újonnan szintetizált vegyületek releváns optikai tulajdonságait, pl. abszorpciós, és emissziós spektrumokat. Ezeket a kísérleteket spektrofluorimetriával szeretnénk kivitelezni.
- Ismert, hogy több akridin vázas vegyület toxikus, mely kizárja PDT-re való alkalmazhatóságukat. Ezért szükség van a vegyületek toxicitásának meghatározására. A toxicitást MTT módszerrel szeretnénk meghatározni.
- Szeretnénk megismerni a fluorofórok sejteken belüli eloszlását és felvételük kinetikáját. A kinetikai kísérletekhez konfokális és lézer-pásztázó citometriát tervezünk használni.
- Meg kívánjuk határozni a vegyületek fototoxicitási tulajdonságait. A fototoxicitást folytonos és frakcionált megvilágítás esetében is szeretnénk megvizsgálni.
- A fototoxicitás sejszintű hatásmechanizmusát is tanulmányozni szeretnénk.
- Az akridin narancs igazoltan be tud jutni a sejtek lizoszómáiba és a sejtmagba egyaránt. Arra is kíváncsiak vagyunk, hogy az új vegyületek, milyen organelumokba tudnak bejutni. Ezeket a kísérleteket szintén mikroszkópos eljárással szeretnénk meghatározni.
- Szeretnénk megvizsgálni a vegyületek kromatinra gyakorolt hatását. A QUINESIN módszert szeretnénk használni a kromatin szintű vizsgálatokra.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Alkalmazott sejtvonalak és tenyésztésük

A kísérletek során felhasznált sejtek egy részét (SKBR-3, HeLa és OCM-1) az American Type Culture Collections-től (ATCC, Manassas, VA) szereztük be, míg a 3T3-MDR-t (NIH 3T3 MDR1 G418) ajándékba kaptuk M. Gottesman-tól. Az SKBR-3 egy trastuzumab-szenzitív humán emlőtumor, a HeLa egy humán méhnyakrák, az OCM-1 humán melanóma eredetű (ocular choroidal melanoma), míg a 3T3-MDR, egy MDR1 gén transzdukált egér fibroblaszt sejtvonal. A sejteket specifikációjuknak megfelelően 10 % fetális borjú szérumot (FCS, BioTech, Budapest, Hungary), 2 mM glutamint (Sigma Aldrich, Budapest, Hungary), 10 U/ml penicillint (Sigma Aldrich, Budapest, Hungary) és 10 µg/ml Streptomycint (Sigma Aldrich, Budapest, Hungary) vagy gentamycint (50 µg/ml) és fenol vörös indikátort (LiveTech, Montizello, Italy) tartalmazó DMEM-ben vagy RPMI-ben tenyésztettük, korai konfluens állapotig 37 °C-on 5 % CO₂ jelenlétében. Minden sejtvonalat két naponta passzáltunk, a HeLa és az OCM-1 sejteket RPMI médiumban, míg az SKBR-3-at és a 3T3-MDR-t DMEM médiumban tartottunk fent. A sejtek tesztelve voltak Mycoplasma-ra.

4.2 A három vegyület fluoreszcens tulajdonságainak összehasonlítása

A kísérletek első fázisában HeLa sejteket tenyésztettünk 8 lyukú IBIDI (Ibidi, Martinsried, Németország) kamrában. A sejtszám 30.000 sejt/cm². Először arra voltunk kíváncsiak, hogy a három vegyületet felveszik-e a sejtek. 1,25 × 10⁻⁶ M és 2,5 × 10⁻⁶ M végkoncentrációkban adtuk ICAAc-ot, monoMICAAC-ot és diMICAAC-ot a sejtekhez. A sejtekhez hozzáadtunk 7,5 × 10⁻⁶ M végkoncentrációban propidium jodidot. Lézer-szenking citométerrel mind a 1,25 × 10⁻⁶ M és 2,5 × 10⁻⁶ M koncentrációk esetében 4x4-es „field imageket” készítettünk 30 perces inkubációt követően. A felbontás 1024x768 pixel volt. A négyzet alakú pixelek szélessége 0,25 µm. 488 nm-es lézer excitációt követően 40x (0,75 NA) objektívet használtunk a méréshez. A jeleket három csatornában detektáltuk (kék, zöld és távoli vörös). Ezt követően 1,25 × 10⁻⁶ M koncentrációban akut és egy órás inkubáció után, ismételt felvettünk képeket a sejtekről.

Kvantitatív meghatározás esetén 1,25 × 10⁻⁶ M koncentrációban adtuk vegyületeket a sejtekhez. Szintén 8 lyukú IBIDI-ben tenyésztettünk HeLa sejteket 30.000 sejt/cm² sejtszámmal. Harminc perces inkubációt követően 4x3-as mezőből álló mozaikos képet

készítettünk a sejtekről. Egy képmező felbontása 1000x768 pixel volt, az X-pixel szélesség: 0,25 μm . A 488 nm-es excitációt követően 40x (0,75 NA) objektívet használtunk a méréshez. A jeleket 530 \pm 15 nm-es emisszós szűrővel detektáltuk.

A következő kísérletekben arra voltunk kíváncsiak, hogy az élő sejtek, a festék felvételét követően a vegyületek milyen struktúrákat tudnak megfesteni.

A sejtek finom struktúráinak vizsgálatához szintén HeLa sejteket tenyésztettünk 8 lyukú IBIDI-ben 30.000 sejt/cm² sejtszámmal. 1,25 $\times 10^{-6}$ M koncentrációban 30 perces inkubációt követően felvételeket készítettünk a sejtekről. Olympus IX-71-es invert fluoreszcens mikroszkóp kameráját használtunk a képek elkészítéséhez. A képeket transzmissziós, kék, zöld és piros emissziós csatornában vettük fel.

4.3. Toxicitás meghatározása

A toxicitás meghatározásához Corning Costar 96 lyukú tenyésztő edényekbe HeLa sejteket tettünk ki 10.000/lyuk sejtszámban a kísérlet előtt egy nappal. Másnap reggel a sejteket kezeltük 3,62 $\times 10^{-5}$ M, 1,81 $\times 10^{-5}$ M, 9,04 $\times 10^{-6}$ M, 4,52 $\times 10^{-6}$ M, 2,26 $\times 10^{-6}$ M, 1,13 $\times 10^{-6}$ M, 5,65 $\times 10^{-7}$ M, 2,83 $\times 10^{-7}$ M, 1,41 $\times 10^{-7}$ M moláris koncentrációjú AN-al négy párhuzamosban és 3,88 $\times 10^{-5}$ M, 1,94 $\times 10^{-5}$ M, 9,71 $\times 10^{-6}$ M, 4,85 $\times 10^{-6}$ M, 2,43 $\times 10^{-6}$ M, 1,21 $\times 10^{-6}$ M, 6,07 $\times 10^{-7}$ M, 3,03 $\times 10^{-7}$ M, 1,52 $\times 10^{-7}$ M moláris koncentrációjú DM-al szintén négy párhuzamosban 24 óráig. Az inkubációs idő elteltével MTT-t (3-(4,5-dimetil-tiazolil-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium-bromidot, azaz sárga tetrazóliumot, Sigma Aldrich, Budapest, Hungary, 0,5 mg/ml PBS-ben oldva) adtunk a sejtekhez. Az MTT-t széleskörűen használják különböző állati és humán eredetű sejtvonalak esetén citotoxicitás meghatározására. A sárga tetrazóliumot a metabolikusan aktív sejtekben a NAD(P)H-függő oxidoreduktáz enzimek oldhatatlan formazánokká redukálják. A kapott intracelluláris lila formazánt szolubilizálhatjuk és spektrofotometriás úton meghatározhatjuk az abszorbanciát. Minden sejt esetében meghatározzuk a sejtszám és a termelt jel közötti lineáris kapcsolatot, ezáltal lehetővé téve a sejtproliferáció sebességében bekövetkező változások pontos számszerűsítését. Minden lyukba 100 μl MTT oldat került. Ekkor az inkubációs idő 2 óra volt 37 °C-on 5 % CO₂ jelenlétében sejttenyésztő inkubátorban. A formazán kristályokat lyukanként 200 μl DMSO-val oldottuk fel. A DMSO inkubációs ideje fél óra volt szintén 37 °C-on 5% CO₂ jelenlétében sejttenyésztő inkubátorban. Amikor feloldódtak a kristályok Synergy HT automata ELISA plate olvasóval abszorbanciát mértünk 490 és 620 nm-en. A keresett abszorbancia értékeket a háttér levonása

után a kezelt sejtek abszorbanciája osztva a kezeletlen kontroll sejtek abszorbanciája szorozva 100 képlettel határoztuk meg. 0,5 fölötti érték az élő sejtekre, míg 0,5 alatti érték halott sejtekre volt jellemző.

4.4. Spektrofluorimetriás mérések

Az UVVis spektrumokat Jasco FP-8200 spektrofotométerrel vettük fel. A készülék Xe lámpával rendelkezik. A mérésekhez 1 cm optikai hosszúságú kvarc küvettákat használtunk. A gerjesztési és emissziós spektrumokat 20 °C hőmérsékleten rögzítettük 2,5 nm es gerjesztési és 5,0 nm-es emissziós sáv szélességen. A pásztázási sebesség 200 nm/perc volt „normál érzékenység” mellett. Minden küvettába 3 ml oldatot pipettáztunk. $2,26 \times 10^{-6}$ M koncentráció AN és $2,43 \times 10^{-6}$ M koncentrációjú DM oldatot használtunk. A kísérlet során az előbb leírt koncentrációban adtuk az oldatokat HeLa sejtekhez. A HeLa sejtek száma 1 millió/ml volt. Sejtes esetben meghatároztuk mind az abszorpciós, mind az emissziós spektrumot. Ugyanilyen beállításokkal felvettük a spektrumokat sejt nélküli esetben is és megnéztük, hogy van-e különbség a két eset között.

4.5. Konfokális mikroszkópia

4.5.1. Spektrális képalkotás

A kísérlet előtt 24 órával kitettük a sejteket 8 lyukú IBIDI plate-re. A sejtszám $30.000/\text{cm}^2$ volt. $2,26 \times 10^{-6}$ M moláris koncentrációjú AN és $2,43 \times 10^{-6}$ M moláris koncentrációjú DM oldatokkal kezeltük a sejteket. A kezelési idő 2 óra volt. Kezelést követően Zeiss LSM 880 típusú konfokális mikroszkóppal, 40x (NA 1,3) objektívvel 16 bites képeket készítettünk a sejtekről. 4 csatornában vettük fel a képeket, 405 nm, 488 nm és 543 nm-es gerjesztéssel. Az X és Y méret 1832 pixel volt a négy csatornában. A „master” feszültség az 1. csatornában (488 nm): 830 V, a 2. csatornában (fénymikroszkóp): 672 V, a 3. csatornában (405 nm): 850 V és a 4. csatornában (543 nm): 850 V. A digitális erősítés 1.0, míg a digitális eltolás 0.00 volt minden csatornában. A 488 nm es csatornában a „pinhole” $42 \mu\text{m}$, a 405 nm-es csatornában $31 \mu\text{m}$, míg az 543 nm-es csatornában szintén $42 \mu\text{m}$ volt. Rendre, 16, 11, és 8 képből álló 18 nm széles emissziós ablakokban a következő teljes emissziós tartományokban készítettünk spektrális képeket: 499-695 nm, 410-474 nm, 554-629 nm. A lézer intenzitások 0,02 % volt 488 nm, 1,8 % 405 nm és 1,5 % 543 nm esetén. A sejtek finom struktúráinak meghatározásakor és a spektrumok vizsgálatánál is ugyanezek voltak a beállítások, viszont a

képek jobb láthatósága szempontjából alkalmaztunk egy medián filter 2.0 szűrőt és emeltük a kontrasztot és fényerőt 60 %-kal.

4.5.2 Lizoszóma membrán fotolízis konfokális mikroszkópiával

HeLa sejteket tenyésztettünk három darab 8 lyukú IBIDI tenyésztő platen 12 órával a mérés előtt. A sejtszám 30.000 sejt/cm^2 volt minden edényben. $2,26 \times 10^{-6} \text{ M AN}$ és $2,43 \times 10^{-6} \text{ M}$ koncentrációjú DM oldatokkal kezeltük a sejteket. Az inkubációs idő egy óra volt sejttenyésztő inkubátorban 5 % CO_2 37 °C-on. Pozitív kontroll esetében a sejteket 30 percig kezeltük lizoszóma specifikus fluoreszcens festékkel (ab176827 CytoPainter LysoOrange Indikátor Reagens, abcam) hasonló körülmények között. 20 μl festéket tettünk 10 ml RPMI médiumba és ebből 300 μl -t tettünk a lyukakba. 30 perc után képeket készítettünk a sejtekről. A gerjesztő lézer 543 nm volt. Az AN és a DM kezelt sejtek esetében az egy óra inkubációt követően kiválasztottunk egy sejtet és képet készítettünk róla. Ez volt a megvilágítás előtti kép. Ezután ugyanerről a sejtről 1000 képet készítettünk (50 sec időtartamban) és videót készítettünk a képekből, mely 20 fps készült. Ezután a sejtről ismét készítettünk egy képet, amely kép a megvilágítás utáni állapotot tükrözte. A megvilágítás utáni kép után óvatosan leszívtuk a folyadékot és hozzáadtunk 300 μl médiumot, mely megfelelő hígításban tartalmazta a lizoszóma specifikus festéket. Nagyon fontos volt, hogy mind a leszívást, mind a folyadék hozzáadását kellő körültekintéssel végezzük, nehogy a sejtek elmozduljanak. Ezt követően 15 perc inkubálás következett 37 °C-on. A 15 perc inkubációt követően egy további képet készítettünk, melyen a megvilágított sejt és a körülötte lévő sejtek is látszódtak. Ez az állapot tükrözte a megvilágítás után a lizoszóma állapotát a megvilágított sejtben és környezetében egyaránt. Ezt a folyamatot mind AN, mind DM kezelést követően megismételtük. Az X és Y méret 1832 pixel volt mind a négy csatornában. Az excitáció 405 nm, 488 nm és 543 nm volt. Az emissziós filterek a következők voltak: 460/20 nm, 530/20 nm, 580/20 nm.

4.6. LED indukált fototoxicitás vizsgálat

A fototoxicitás kinetikájának meghatározására LED indukált megvilágítást használtunk. A kísérletekben HeLa sejteket tettünk ki 96 lyukú tenyésztő edényekbe lyukanként 10.000 sejt/lyuk sejtszámmal. $2,26 \times 10^{-6} \text{ M AN}$ és $2,43 \times 10^{-6} \text{ M}$ koncentrációjú DM oldatokkal kezeltük a sejteket. A megvilágítási idők 0, 1, 3, 8 és 24 óra volt, mely kezelési idők alatt 470 nm-es kék és 525 nm-es LED lámpákkal világítottuk meg a sejteket. A megvilágítás idején a lámpát és a tenyésztő edényeket 37 °C-os sejttenyésztő inkubátorba helyeztük 5 %-os

CO₂ szint mellett. A lámpa magassága 10 cm volt a 96 lyukú plate-től mérve. A megvilágítási átmérő 6 cm volt. Kontrollként 1 %-os DMSO oldatot használtunk. A megvilágítási idők után MTT módszerrel határoztuk meg a sejtek életképességét. Minden lyukba 100 µl MTT (Sigma Aldrich, Budapest, Hungary, 0,5 mg/ml koncentráció PBS-ben oldva) oldat került. Ekkor az inkubációs idő 2 óra volt 37 °C-on 5% CO₂ jelenlétében sejtenyészti inkubátorban. A formazán kristályokat lyukanként 200 µl DMSO-val oldottuk fel, fél órás inkubációs idővel, hasonló körülmények között. Amikor feloldódtak a kristályok Synergy HT automata ELISA mikrotálca leolvasóval abszorbanciát határoztuk meg a már korábban leírt módon.

4.7. Sejtenkénti életképesség meghatározás lézer-szkenning citométerrel

A lézer-szkenning citométert használhatjuk fluoreszcensen jelölt élő sejtek sejtkárosodásának meghatározására. Az iCys képalkotó rendszer áll egy gerjesztő, egy detektáló részből és egy Olympus IX-71 típusú invert fluoreszcens mikroszkópból. Magát a rendszert egy számítógép vezérli. A rendszer tartalmaz négy: 405 nm, 488 nm, 561 nm és 633 nm-es szilárdtest lézert. Két fotodiódával a kromatikus abszorbanciát, a fluoreszcens jelek detektálására pedig PMT detektorokat használunk. Maga a képalkotás a lézerefény megvilágítást követően pontról-pontra történik. Az LSC készülékhez tartozik egy IBIDI inkubátor, amely alkalmas sejtenyészti inkubátorban megszokott 37 °C-os, 5% -os CO₂ szint megteremtésére. A sejteket 24 órával a kísérletek előtt tettük ki 8 lyukú IBIDI tenyésztő edényekbe 30.000 sejt/lyuk sejtszámban. $2,26 \times 10^{-6}$ M koncentrációjú AN és $2,43 \times 10^{-6}$ M koncentrációjú DM oldatokkal kezeltük a sejteket és minden mintához adtunk $7,5 \times 10^{-6}$ M végkoncentrációban propidium jodid. Kijelöltünk egy 2×2-es méretű ROI-t és 63 ciklusban képeket vettünk fel ugyanazokról a területekről. 1 ciklus hossza 5 perc, így a teljes mérési idő 5 óra 15 perc volt. A felbontás 1000x768 pixel volt. Az X-step méret 0,5 µm volt. A fluoreszcens jeleket három csatornában (zöld, vörös és távoli vörös) detektáltuk 40x LWD (NA 0,6) objektívvel. 405 nm, 488 nm és 633 nm lézereket használtunk gerjesztésre. A PMT beállítások a következők voltak: zöld csatorna: feszültség 13 V, erősítés 100%, offset -0.15 V, vörös csatorna: feszültség 26 V, erősítés 100%, offset -0.15 V, távoli vörös csatorna: feszültség 37 V, erősítés 100%, offset -0.35 V. A detektált jeleket 14-bit magas felbontású képekké alakítottuk. A konvencionális transzmissziós képek készítése mellett az alábbi szűrőket használtuk: UV/kék (480/40 nm), kék/zöld (530/30 nm), zöld/piros (650/50 nm).

Az LSC mérést követően az adott mintákról higanygőzlámpás felvételeket készítettünk Cell[^]B programmal. 40x objektívet (0,75 NA) használtunk. Az expozíciós idő fénymikroszkóp

esetén 100 ms, míg a többi filter esetében 588 ms volt ISO 200-al.

4.8. Hiszton elúciós vizsgálat

4.8.1. Beágyazás

Beágyazást megelőzően a 8 lyukú kamrák welljeit (Ibidi, Martinsried, Németország) 1 %-os alacsony olvadáspontú agarózzal vontuk be. 150 μ l desztillált vízben hígított agarózt tettünk minden lyukba, amelyet azonnal eltávolítottunk, hogy egy vékony agaróz réteg maradjon a felületen, majd jégen két percig polimerizálódni hagytuk. Ezt követően 37 °C-on tartottuk, míg a lyukak felülete megszáradtak. Ezt a beágyazási lépést még egyszer megismételtük minden lyukban. A beágyazás idejére a sejteket és az agarózt is 37 °C-on tartottuk. 6×10^6 sejtet kevertünk 1x PBS-ben (150 mM NaCl, 3,3 mM KCl, 8,6 mM Na₂HPO₄, 1,69 mM KH₂PO₄, pH 7,4) hígított 1 % LMP agarózzal 1:3 arányban. 22 μ l sejtszuszpenziót adagoltunk a lyukak közepére és a kamrákat házilag készített téglalap alakú műanyag fedőréteggel borítottuk, amelyeket egy 200 μ m vastag, közepes súlyú polivinil-klorid fedőlapból vágtak ki. (Fellowes, Inc., Itasca, Illinois, USA). A sejteket 4 percig 37 °C-on tartottuk, hogy ülepedni tudjanak a bevont wellék felszínén. Az agaróz polimerizációja után 300 μ l jéghideg médiumot raktunk minden lyukba elősegítve a műanyag fedő eltávolítását. A beágyazást követően a korábbi LSC mérésekhez hasonlóan minden lyukban egy 2 \times 2-es méretű ROI-t világítottunk meg és készítettünk felvételeket. Egy képmező felbontása 1024 \times 768 pixel volt, az X-pixel szélesség: 0,25 μ m. $2,26 \times 10^{-6}$ M moláris koncentrációjú AN és $2,43 \times 10^{-6}$ M moláris koncentrációjú DM oldatokkal kezeltük a sejteket. A megvilágítási idő 2 óra volt. A megvilágításhoz 488 nm-es lézert 40x LWD objektívet, 0,5 μ m-es X-step méretet alkalmaztunk.

4.8.2 Permeabilizálás, hiszton elúció NaCl-al és immunfluoreszcens jelölés

Az LMP agarózba ágyazott sejteket jéghideg 1x PBS-ben (500 μ l minden lyukba) mostunk 3 \times 3 percig. Ezt követően permeabilizáltuk a sejteket 500 μ l jéghideg permeabilizáló oldattal, amelyben a detergens, 1 % (v/v) Triton X-100, amelyet 1x PBS/EDTA-ban (5 mM EDTA PBS-ben) oldottunk fel. A kezelési idő 10 perc volt jégen. Ezt a lépést megismételtük még egyszer minden lyukban. Permeabilizálás után a sejtmagokat 500 μ l jéghideg 1x PBS/EDTA-val mostuk 3 \times 3 percig (500 μ l minden lyukba). Ezt követően 60 percig emelkedő koncentrációjú (0, 100, 600, 700, 800, 900, 1000 és 2000 mM) NaCl-al kezeltük a magokat. A következő lépésben szintén egy 3 \times 3 perces mosás következett 1x PBS/EDTA-val (500 μ l

minden lyukba). A NaCl elúciós kezelést követően a sejtekhez blokkoló puffert adtunk. Minden lyukba 500 µl-t, amelyben 5%-os (m/v) Blotto Non-Fat Dry Milk (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, USA) tejpor volt feloldva 1x PBS/EDTA-ban. A nem specifikus kötődés megelőzésére a blokkoló lépés 30 perc volt. Blokkolás után a sejtmagokat 500 µl jéghideg 1x PBS/EDTA-val mostuk 3x3 percig (500 µl minden lyukba). Ezt követte az indirekt antitest jelölés, mely lépésben primer antitestként egy poliklonális nyúl IgG anti-H2A (Abcam, Cambridge, UK; 0.4 mg/ml, ab 18255) antitestet használtunk 1:800 titerben. Az antitestet 150 µl 1xPBS/EDTA/1% BSA-ban (1x PBS/EDTA mely tartalmazott 1% borjú szérum albumint) hígítottuk. A jelölés 4 °C-on történt egész éjjel. Primer antitest jelölést követően 3×10 perces mosás következett 1x PBS/EDTA-val (500 µl minden lyukba). Szekunder antitestként Alexa Fluor 647 konjugált kecskében termeltetett nyúl ellenes IgG (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, 1:800 titer, 1xPBS/EDTA-ban oldva 2mg/ml-es törzs koncentrációból) antitestet használtunk. A jelölés 2 órán át történt jégen. Szekunder antitest jelölést követően 3×10 perces mosás következett 1x PBS/EDTA-val (500 µl minden lyukba). Jelölést követően fixáltuk a mintákat 1% formaldehid (PBS-ben oldott) végkoncentrációjú fixáló oldattal 4 °C-on egész éjjel. Fixálás után egy 3x3 perces mosás következett 1x PBS/EDTA-val (500 µl minden lyukba). Mosást követően 5 µg/ml végkoncentrációjú propidium jodiddal festettük a magokat (a PI 1×PBS/EDTA-ban oldva) 30 percig jégen. PI festés után ismét egy 3x3 perces mosás következett 1x PBS/EDTA-val (500 µl minden lyukba). A fluoreszcens intenzitásokat iCys lézer-szkenning citométeren mértük le a korábban 40x objektívvel levilágított területeken, de most 20x objektívvel (0,17 NA), 0,5 µm X-step mérettel 10x7 es ROI mérettel. Így nemcsak a fotodestruált sejteket, hanem érintetlen sejteket is lemértünk minden mintán. iCys 7.0 szoftverrel kiértékeljük a mintákat. R2 kapuval kapuztuk a 2×2-es előzetesen megvilágított területeket, míg R3-al kapuztuk a megvilágítatlan területeket. 488 nm-es lézert használtunk a gerjesztésre. Két csatornában kaptuk meg a jeleket (zöld és távoli vörös). A csatornák beállításai a következők voltak: zöld csatorna, feszültség 24 V, erősítés 100%, offset -0.15 V, távoli vörös csatorna: feszültség 35 V, erősítés 100%, offset -0.05 V.

4.9. Lizoszóma károsodás meghatározása

4.9.1 Mikrotálca leolvasó és LSC mérések

A mérések előtt 1 nappal 10.000 sejt/lyuk sejtszámmal HeLa sejteket tettünk ki 96 lyukú Corning Costar típusú tenyésztő edényre. A sejteket kezeltük $3,62 \times 10^{-5}$ M, $1,81 \times 10^{-5}$ M,

$9,04 \times 10^{-6}$ M, $4,52 \times 10^{-6}$ M, $2,26 \times 10^{-6}$ M, $1,13 \times 10^{-6}$ M, $5,65 \times 10^{-7}$ M, $2,83 \times 10^{-7}$ M, $1,41 \times 10^{-7}$ M moláris koncentrációjú AN-al négy párhuzamossal és $3,88 \times 10^{-5}$ M, $1,94 \times 10^{-5}$ M, $9,71 \times 10^{-6}$ M, $4,85 \times 10^{-6}$ M, $2,43 \times 10^{-6}$ M, $1,21 \times 10^{-6}$ M, $6,07 \times 10^{-7}$ M, $3,03 \times 10^{-7}$ M, $1,52 \times 10^{-7}$ M moláris koncentrációjú DM-al szintén négy párhuzamossal. Élő sejt kontrollnak RPMI médiumot és 0,7 tömeg %-os glükóz PBS-t adtunk a sejtekhez 4-4 esetben. A háttér meghatározásához szintén RPMI és glükóz PBS volt a wellekben, viszont nem voltak sejtek. Lizoszóma membrán károsításra LLOMe (L-leucyl-L-leucin metil észter, Sigma Aldrich, Budapest, Hungary, 25nM cc.) kezelést alkalmaztunk, amelyet 8 lyukhoz adtunk. A vegyületek hozzáadását követően az inkubációs idő 45 perc volt 37 °C-os sejttenyésztő inkubátorban 5%-os CO₂ szint mellett. A 45 perces inkubációt követően lemértük a minták fluoreszcens intenzitásait BioTek Synergy HT fluoreszcens mikroplate olvasóval. A gerjesztési szűrő 485/20 volt mind az AN, mind a DM esetében. Az emissziós szűrő az AN esetében 528/20 nm, DM esetében 590/20 nm volt. Ezt követően 10x lemértük az intenzitásokat minden lyukban, felülről megvilágítva. Megvilágítást követően leszívtuk a folyadékot a sejtekről és hozzáadtunk 300 µl médiumban hígított CytoPainter LysoOrange lizoszóma specifikus festéket. A hígítás a fentebb leírt módon történt. 30 perc inkubációt követően minden lyukról fényképet készítettünk Olympus DP71 kamerával.

4.9.2 Képanalízis

A lizoszóma károsodás mértékének képi megállapítására klasszikus képfeldolgozó módszereket használtunk. Első lépésként képjavítást hajtottunk végre a bemenő képeken. A képi zaj szűrésén túl, a hatékonyabb szegmentálás érdekében képélesítést hajtottunk végre „unsharp masking”-nak nevezett eljárást használva. A képjavítást követően a sejtek szegmentálása történt meg. A szegmentálás során egy bináris képet alakítunk ki, amelyen elkülönül az objektum és a háttér, azaz az eljárás során a sejtek háttértől való elválasztását hajtottuk végre. Az átfedések és mintában lévő apró szennyeződések kiküszöbölése összetett szegmentálási eljárást igényelt. Első lépésben egy „adaptive threshold” algoritmussal történt a sejtek és a háttér szétválasztása. Ennek eredménye még egy enyhén zajos és néhol hiányos, lyukas régiókat tartalmazó szegmentált bináris kép lett. Ezen hibák kijavítására az úgynevezett morfológia műveleteket használtuk. A morfológiai műveletek a szegmentálási hibák korrigálására alkalmasak és a kép előkészítését jelentik az alakzat felismerésre. Az apró zajok eltávolítására „erode” morfológia operátort használtuk, amellyel el lehet tüntetni a háttér területén az objektumhoz sorolt pontokat, és apróbb alakzatokat; továbbá ez az összeolvadt objektumok szétválasztására is alkalmas. Az erode operátor mellett az „opening” morfológia

műveletet is használtuk hasonló célra, az objektumok (sejtek) méretének megőrzését szem előtt tartva. A szegmentálás, valamint erode és opening műveletek után is keletkezhetnek lyukak az objektumok széleinél és belsejében is. Ezen lyukak befoltozására használtuk a „dilate” morfológiai operátort. Az operátorok által használt strukturáló elem mérete minden képhez egyedi módon lett meghatározva a keletkezett zajok és foltok mértékétől függően.

A megfelelő sejtes régiók kinyerését követően a sejtekhez viszonyított relatív lizoszóma arány került meghatározásra. Mivel sejteken belül a lizoszómák világos régiókként jelennek meg, a sejten belüli magas intenzitás értékű pixel régiókkal azonosíthatóak. Ahhoz, hogy ki tudjuk válogatni ezen magas intenzitású régiókat szükséges egy küszöbérték meghatározása minden sejt (összefüggő sejtrégió) esetén. Ehhez különböző mérőszámokat vettünk figyelembe. Első ilyen az átlagos pixel intenzitás érték. Nem elegendő azonban azt mondani, hogy ezen átlag érték fölötti pixel intenzitással rendelkező régiókat tekintjük lizoszómáknak. A valósághoz közelebb kerülünk, ha figyelembe vesszük az egyes sejtek pixeleinek homogenitását. Más arányban kell figyelembe vennünk egy viszonylag homogén pixel értékekből álló sejt esetén a lizoszóma detektálására használt küszöböt, mint egy nagy intenzitás változással rendelkező, inhomogén sejt esetén. A homogenitás mérésénél az egyes sejtek intenzitás hisztogramjából számított „homogeneity” és „entropy” elsődleges statisztikai leírókat, valamint az együttes előfordulási (co-occurrence matrix) mátrixból származtatott másodlagos statisztikai jellemzőket használtuk.

Magasabb intenzitás változás van a sejt széle (sejt membrán) és közvetlen környezete között, valamint a szegmentált régió kilóghat a tényleges sejt területéről, ezért ezeknek a hibáknak a kiküszöbölésére a sejt széleihez közeli pixeleket nem vettük figyelembe. Ehhez „Euklideszi távolság transzformációnak” (the Euclidean distance transform of the binary image BW) nevezett eljárással távolság térképet készítettünk, amely során a sejt közepéhez közelebb eső pixelekhez magasabb értéket rendelünk, mint a sejt széléhez közelebbi pixelekhez.

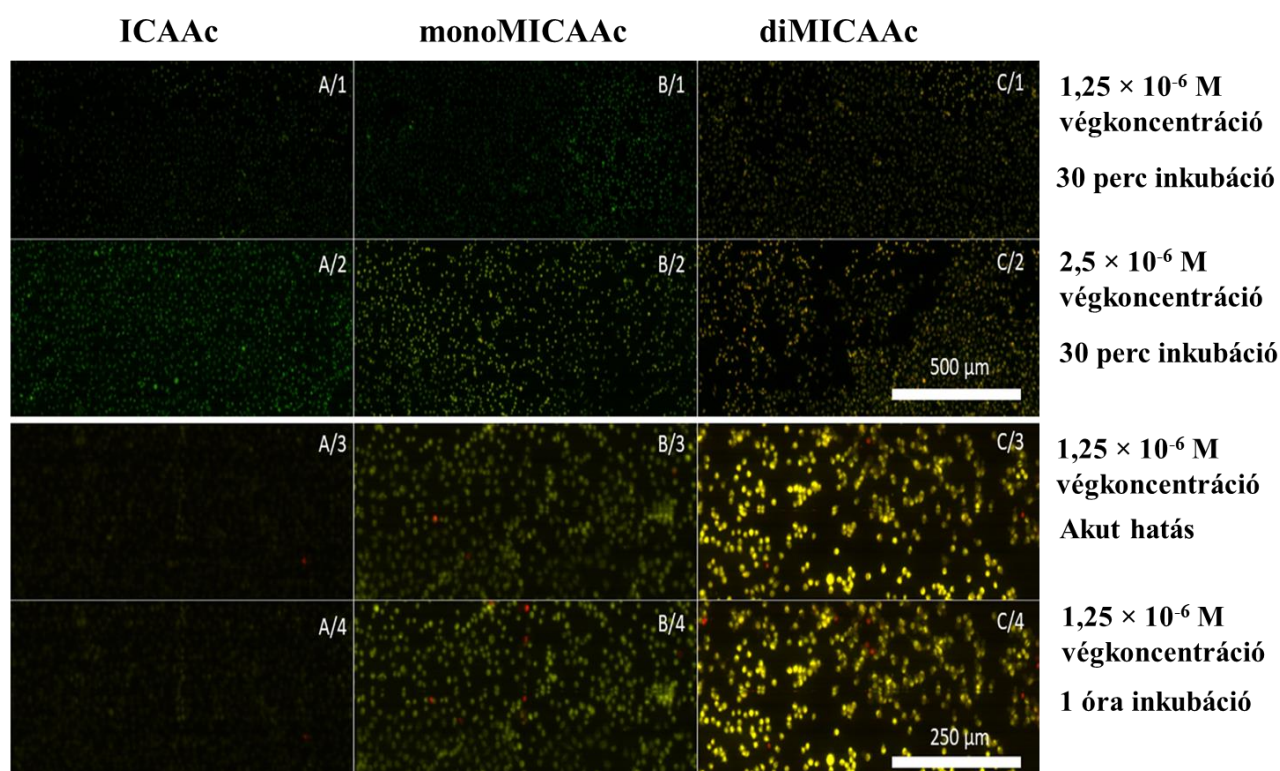
A lizoszóma régiók jobb körül határolása érdekében gradiens térképet készítettünk és ezt is figyelembe vettük a lizoszómák kiválasztásánál. A képi gradiens egy adott pixel esetén megmutatja a legnagyobb változás irányát és nagyságát. A lizoszóma régiók ott kezdődnek, ahol magas az intenzitás változás nagysága (amelyet a gradiens magnitúdó ad meg) és a változás meredek felfelé irányuló (a gradiens iránya adja meg). Ez tulajdonképp az éldetektálásnál használt eljáráshoz hasonló. A sejtcsoportok homogenitását és a gradiens

térképből kinyert információkat is figyelembe véve meg tudtuk határozni az egyes sejtcsoportok esetén az átlag intenzitás bizonyos százalékaként az ideális küszöbértéket, amelynél magasabb pixel intenzitású régiókat lizoszómáknak tekinthetünk a sejten belül. Egy adott képen a lizoszóma arányt a lizoszóma régiók összes pixel számának és az sejtek összes pixel számának hányadosaként definiáltuk.

5. Eredmények

5.1. Az új vegyületek fluoreszcens tulajdonságának vizsgálata

A kísérletek első fázisában az új vegyületek fluoreszcens jelölésének az intenzitását szeretnénk volna megismerni. 8 lyukú IBIDI edényben tenyésztett HeLa sejteket $1,25 \times 10^{-6}$ M és $2,5 \times 10^{-6}$ M végső koncentrációban kezeltünk ICAAc-al, monoMICAAC-al és diMICAAC-al. Lézer-szkenning citométerrel felvételt készítettünk a sejtekről 30 perces inkubációt követően. Ezt mutatjuk az első és második sorban. A harmadik és negyedik sorban az $1,25 \times 10^{-6}$ M-os végkoncentrációjú vegyületekkel kezelt sejtek akut és 1 órás inkubációt követő képei láthatóak.

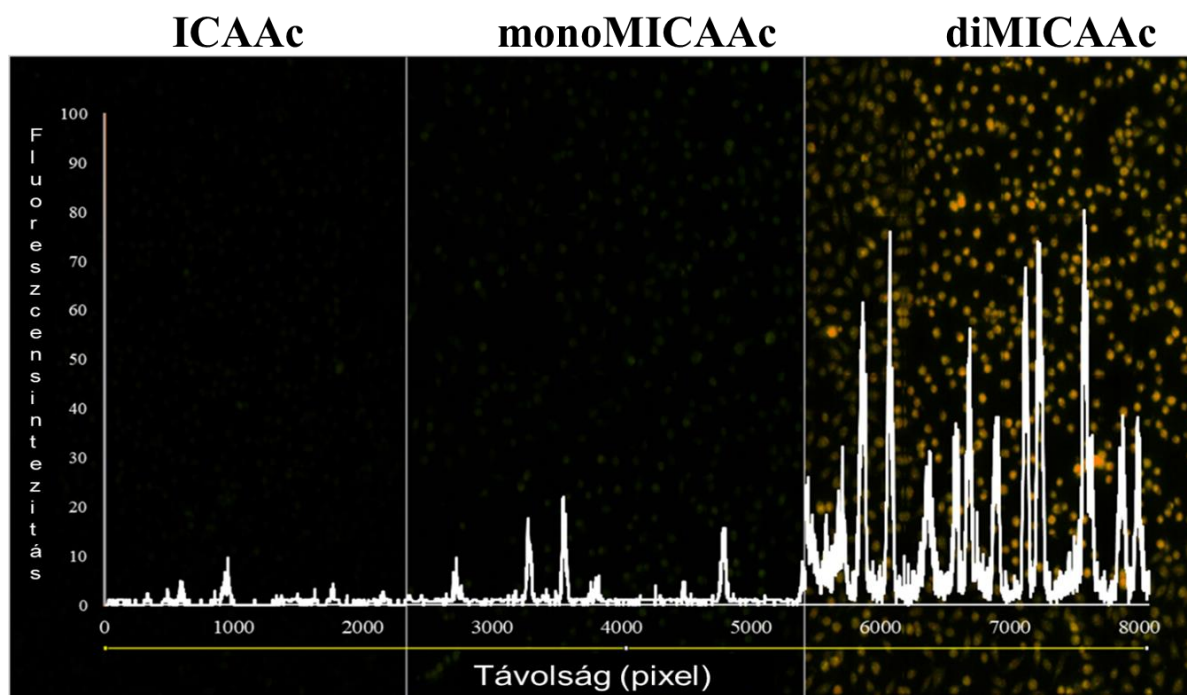


Az 5.1. ábrán jól látható, hogy mindkét koncentrációban az ICAAc és a monoMICAAC halványabb fluoreszcenciával rendelkezik, mint a diMICAAC. A diMICAAC festéket jobban fel tudták venni a sejtek, mint az előző két anyagot.

Az ICAAc rendelkezik a leggyengébb fluoreszcens tulajdonsággal a három vegyület közül. A monoMICAAC és a diMICAAC mind a két koncentrációban nagyobb intenzitással festették meg a sejteket, amely annak köszönhető, hogy jobban be tudtak jutni a sejtekbe. Az ICAAc számára valószínűleg több inkubációs idő szükséges a vegyület felvételére. A három vegyület közül a diMICAAC festette meg a sejteket a legnagyobb intenzitással.

5.2. A diMICAAC fluoreszcencia intenzitása a legmagasabb

A következő kísérletben a három vegyület fluoreszcens tulajdonságának kvantitatív összehasonlítását végeztük. Ábrázoltuk az előző pontban készített képek vonalmenti intenzitás profilját.

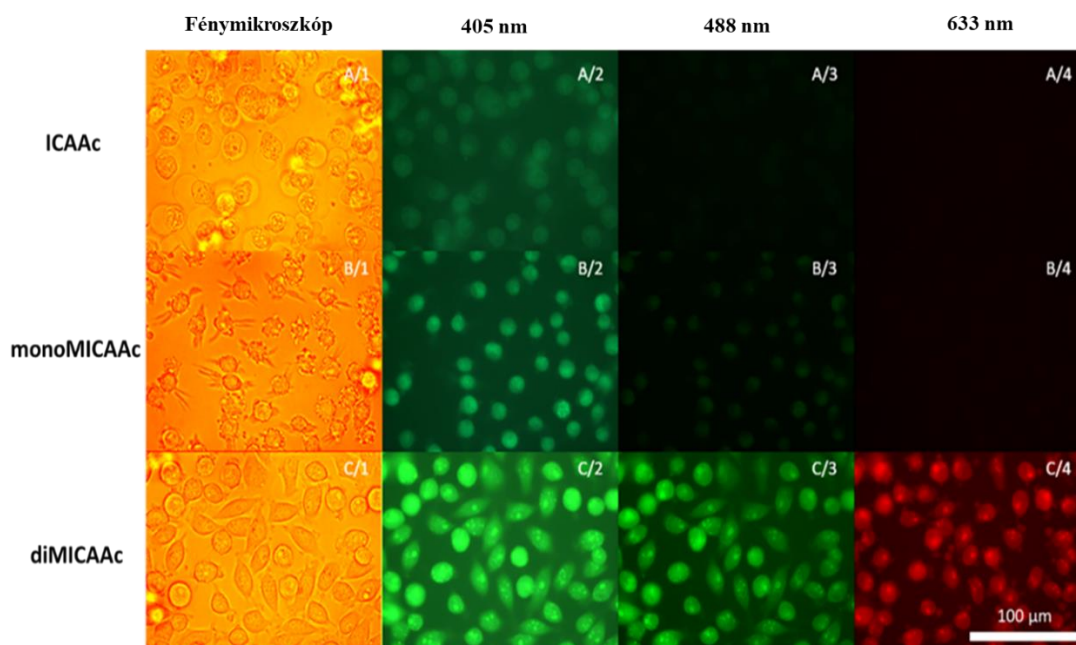


Az 5.2. ábrán az élő sejtek festődésének kvantitatív összehasonlítását láthatjuk, melyet LSC-vel végeztünk. 488 nm-es gerjesztés mellett 530 ± 15 nm-es emissziós szűrő használatával készültek a “well imagek”. A sárga vonal mutatja a képeken azokat a részeket, amelyeknek a fluoreszcens intenzitását ábrázoltuk az y tengelyen.

A diMICAAC sejteken belüli mikroszkópos fluoreszcencia intenzitása 50 körüli értékkel jellemezhető, míg az ICAAc 3, a monoMICAAC pedig 5 körüli átlagos fluoreszcencia intenzitással. Azaz a diMICAAC legalább egy nagyságrenddel nagyobb mikroszkópos fluoreszcencia intenzitással rendelkezik a másik két festékhez viszonyítva. Ezt okozhatja az, hogy a másik két anyagot nem veszik fel a sejtek olyan mennyiségben, mint a diMICAAC-ot, vagy mint festékmolekula a diMICAAC stabilabb vegyület az előző kettőnél. Magyarán az is, hogy a diMICAAC gyorsabban diffundál be a citoplazmába, majd a cél organelumába mint a másik két vegyület.

5.3. A diMICAAC jobb vitális festék, mint a másik két vegyület

A következő kísérletben kíváncsiak voltunk a sejtek finom struktúrájára festődést követően. 8 lyukú IBIDI edényben $30.000/\text{cm}^2$ sejtszámmal HeLa sejteket tenyésztettünk és $1,25 \times 10^{-6}$ M koncentrációban kezeltük ICAAc-al, monoMICAAC-al és diMICAAC-al.



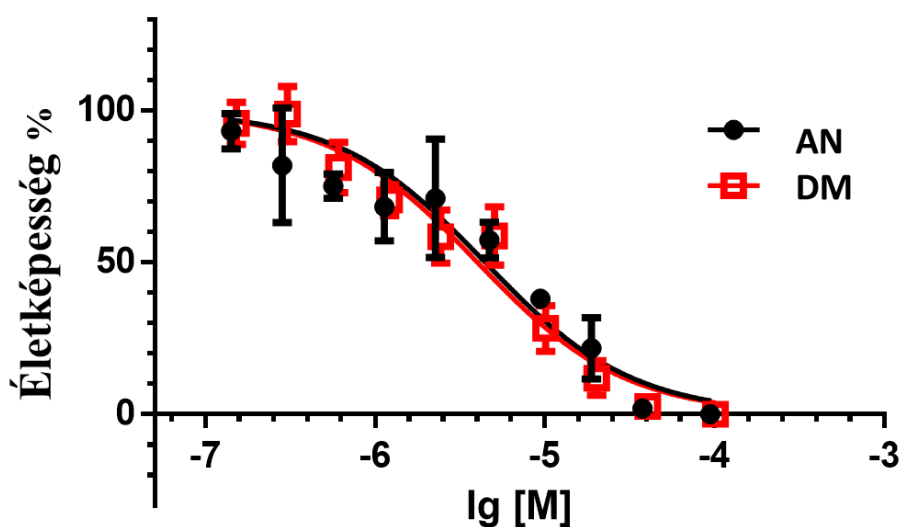
Az 5.3. ábra mutatja, hogy a három vizsgált vegyület hogyan képes megfesteni élő sejteket. Bal oldalon megfigyelhetők a transzmissziós mikroszkópos felvételek, tőle jobbra sorrendben az UV/kék, kék/zöld és legvégül a zöld/piros fluoreszcens képek (gerjesztés/emisszió).

A transzmissziós felvételeken jól látható, hogy a sejtek morfológiája a diMICAAC esetében a legszebb, így valószínűleg a három anyag közül a diMICAAC a legkevésbé toxikus. Az ábrán megfigyelhető még, hogy az ICAAc és a monoMICAAC élő sejtek jelölésében sem elég hatékony, az UV-nél nagyobb hullámhosszú gerjesztéseknél nem látható mikroszkópos emisszió, ezzel ellentétben a diMICAAC esetén igen. A 2. oszlopot megfigyelve (A/2, B/2 és C/2) elmondható, hogy az ICAAc inkább a sejtmembránhoz kötődik. A monoMICAAC ugyan elég halványan, de képes a sejtmagba bejutva DNS-t festeni és a citoplazmában, valószínűleg aspecifikusan fehérjékhez kötődve citoplazmát jelölni. A diMICAAC viszont intenzíven fest szubcelluláris organelleket. A legintenzívebben a sejtmagvacskák válnak láthatóvá, így ez

a vegyület képes bejutni a sejtmagba és ott DNS-hez vagy RNS-hez kötődni. Ugyanakkor a diMICAAC 4. oszlopban mutatott festődési mintázat kicsit más, elképzelhető, hogy ez a lizoszómákban akkumulálódó festődésre jellemző.

5.4. A diMICAAC toxicitása hasonló, mint az akridin narancsé

Mivel az előző kísérletekből kiderült, hogy a legígéretesebb vegyületnek a diMICAAC tűnt, ezért a továbbiakban ezt a vegyületet szeretnénk volna összehasonlítani, egy a szakirodalomban már jól ismert vegyülettel, esetünkben az akridin narancssal. A további kísérleteinkben szintén HeLa sejteket használva MTT vizsgálattal meghatároztuk az AN és a DM toxicitását.



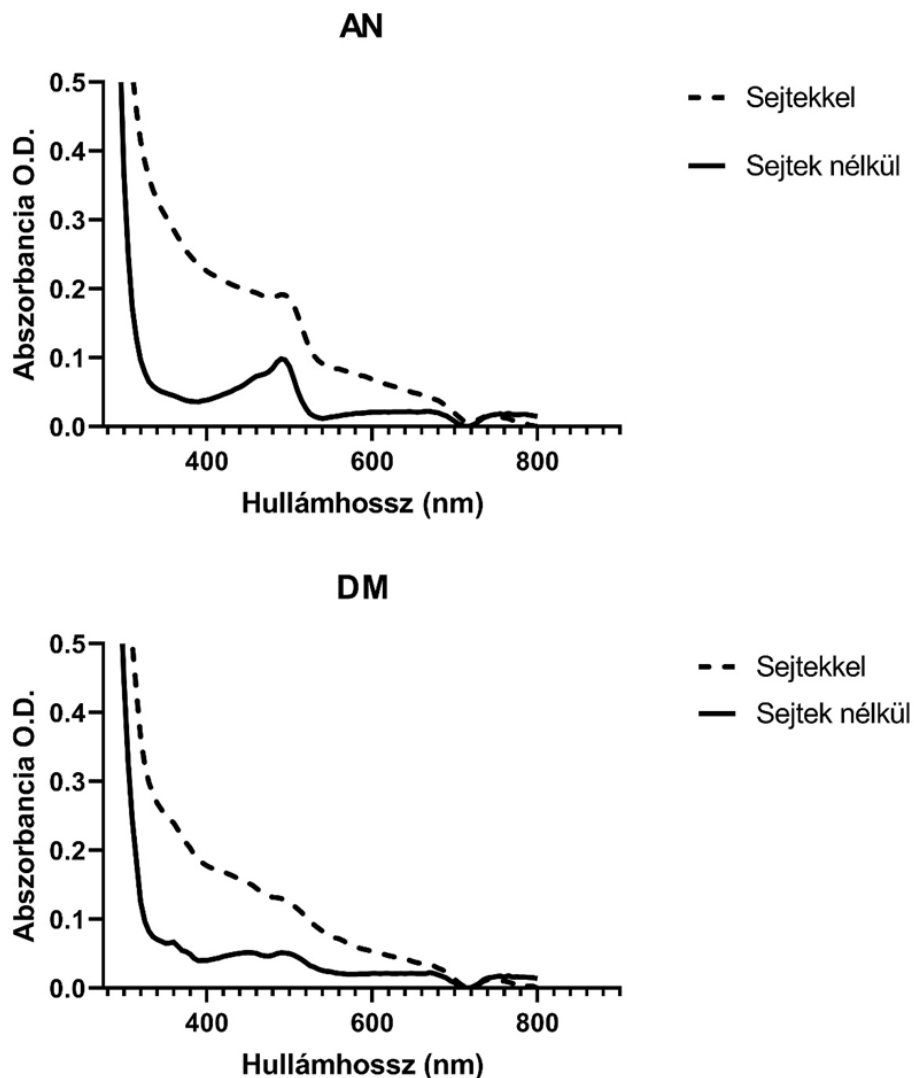
5.4. ábra. Az akridin narancs és a diMICAAC vegyületek dózis-hatás görbéje. Az életképeességet MTT módszerrel határoztuk meg, mely százalékos értékben mutatja a csökkenő életképeességet a növekvő festék mennyiségek mellett fokozódó toxicitásnak megfelelően.

A kapott eredményekből látható, hogy az akridin narancs bizonyos koncentrációkban toxikusabb, mint a diMICAAC, azonban szignifikáns különbség nem tapasztalható a két vegyület között. A festékek LD₅₀ toxicitási értéke $4,4 \times 10^{-6}$ M volt az AN, míg $4,01 \times 10^{-6}$ M a DM esetén. A 95% konfidenciaszintek AN: $3,43 \times 10^{-6}$ - $5,76 \times 10^{-6}$ M, DM: $3,33 \times 10^{-6}$ -

$4,83 \times 10^{-6}$ M. Mivel az AN-ot a WHO kivette a daganatokat okozó vegyületek közül, ezért használható fotodinámiás terápiás szerként. Továbbá sejtes toxicitásukat tekintve a két vegyület nagyon hasonlóan viselkedik, ezért a DM is alkalmas lehet, sejtes toxicitása alapján, terápiás eljárásra.

5.5. A két vegyület abszorpciós maximuma 488 nm

A következő kísérletekben összehasonlítottuk a két vegyület abszorpciós és emissziós tulajdonságait spektrofotometriával. Ezekben a kísérletekben szintén HeLa sejteket használtunk.

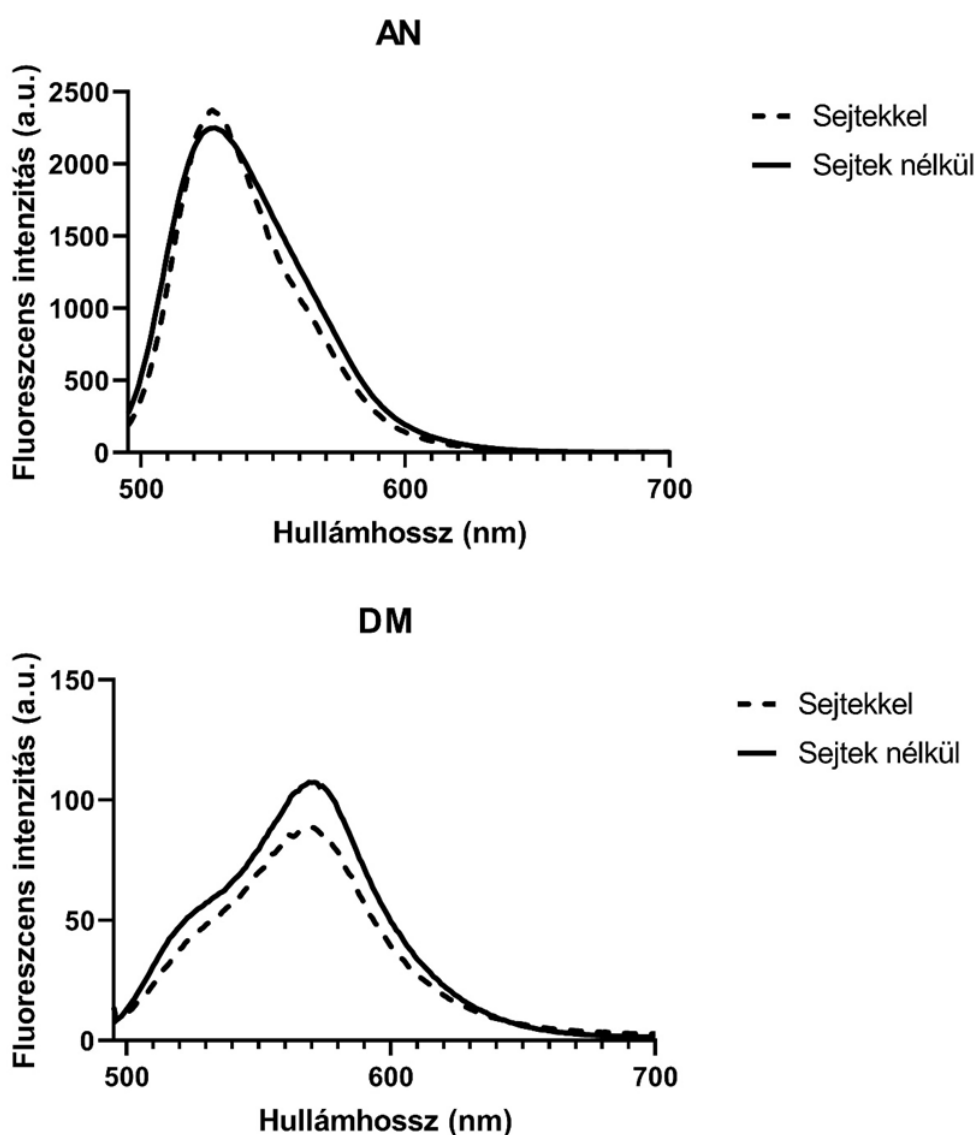


5.5. ábra. Az AN és a DM vegyületek abszorpciós spektrumai, melyeket Jasco FP-5200 spektrofotométer segítségével határoztuk meg.

Eredményeinkben nem láthatunk hullámhossz eltolódást a sejtes és sejt nélküli spektrumokat összehasonlítva. A lokális abszorpciós maximum mindkét esetben 488 nm-nél volt. A sejtek jelenlétében jelentősen megnőtt a fényszórás.

5.6. A diMICAAC emissziós spektruma jobbra tolódott

Az emissziós spektrumok vizsgálatának körülményei hasonlóak voltak, mint az abszorpciós vizsgálatnál.

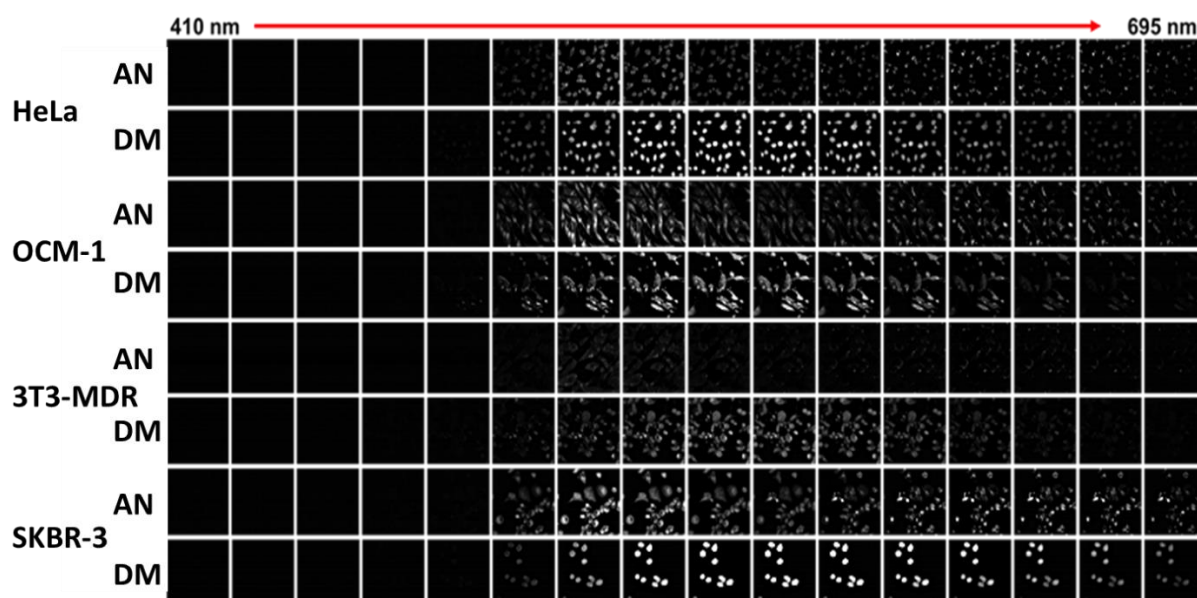


5.6. ábra. Az AN és a DM vegyületek emissziós spektrumai, melyeket Jasco FP-5200 spektrofluoriméter segítségével határoztunk meg.

Az emissziós spektrumokat megvizsgálva megállapíthatjuk, hogy az AN esetén az emissziós maximum 530 nm-nél van, ezzel ellentétben a DM esetében a maximum jobbra tolódva, kb. 570 nm-nél látható. Sejt és sejt nélküli eseteket összehasonlítva nincs eltolódás. A skálákat leolvastva az is megállapítható, hogy az AN nagyobb fluoreszcencia hatásfokkal rendelkezik, mint a DM.

5.7. Az AN és a DM spektrális képképzése sejteken 405 nm-es gerjesztéssel

Zeiss LSM 880-as konfokális mikroszkóppal, spektrális képképzéssel szintén megvizsgáltuk a fluoreszcenciás paramétereit a vegyületeknek. HeLa, OCM-1, 3T3-MDR és SKBR-3 sejtvonalakat használtunk. A sejt számok minden esetben 30.000 sejt/lyuk volt. A vegyületek hozzáadását követően az inkubációs idő 2 óra volt. $2,26 \times 10^{-6}$ M moláris koncentrációjú AN és $2,43 \times 10^{-6}$ M moláris koncentrációjú DM oldatokkal kezeltük a sejteket.



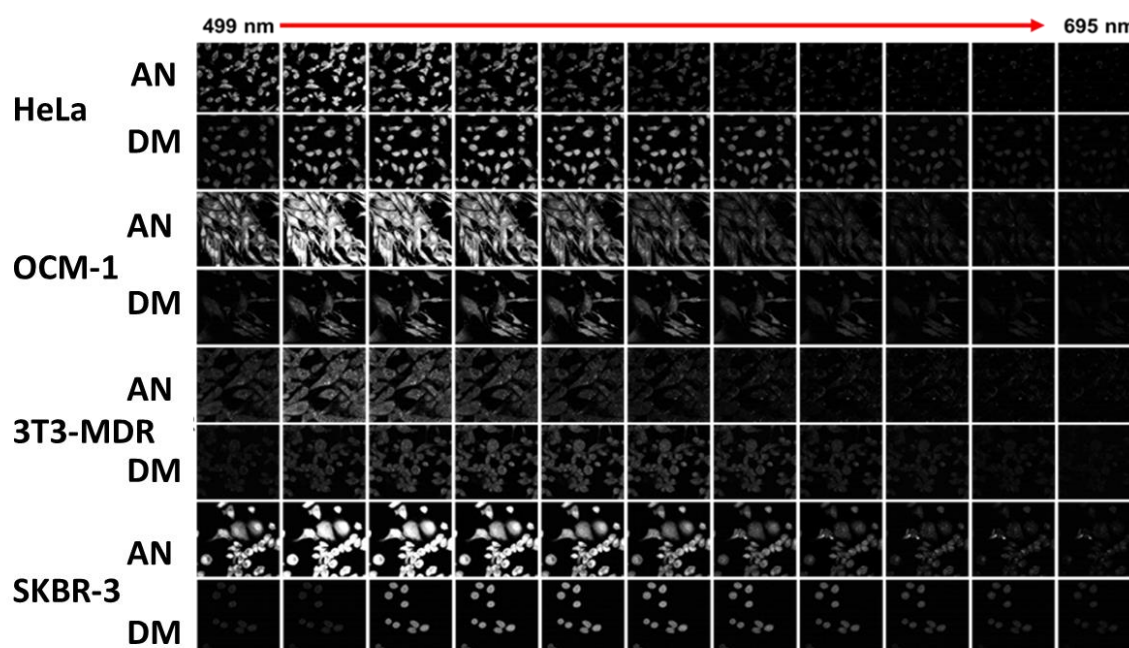
Az 5.7. ábrán 405 nm-es gerjesztést követően láthatjuk a spektrális képeket HeLa, OCM-1, 3T3-MDR és SKBR-3 sejtek esetében. A képek 18 nm széles ablakokban mutatják a 410 nm-től 695 nm-ig terjedő emissziós tartományt.

Ebben a fotómontázsban a fényerőt 60 %-al megemeltük a jobb láthatóság kedvéért. Az ábrát megfigyelve kijelenthetjük, hogy a DM emissziós spektruma szélesebb, mint az AN-é. Az emissziós maximum jobbra tolódva helyezkedik el DM esetén. Az is megfigyelhető, hogy a különböző sejtek különböző mértékben vették fel a vegyületeket. Az SKBR-3, OCM-1 és HeLa sejtek vették fel nagyobb mértékben, míg a 3T3-MDR esetén feltehetőleg a P-

glycoprotein ABC transzporternek köszönhetően a festékek kisebb mennyiségben kerültek felvételre, mivel ez a széles hidrofób molekula spektrumú transzporter kipumpálta őket az extracelluláris térbe.

5.8. A két vegyület spektrális képalkotása 488 nm-es gerjesztéssel

Elvégeztük a kísérletet 488 nm-es gerjesztést követően is melynek eredményét a következő fotómontázs mutatja be.

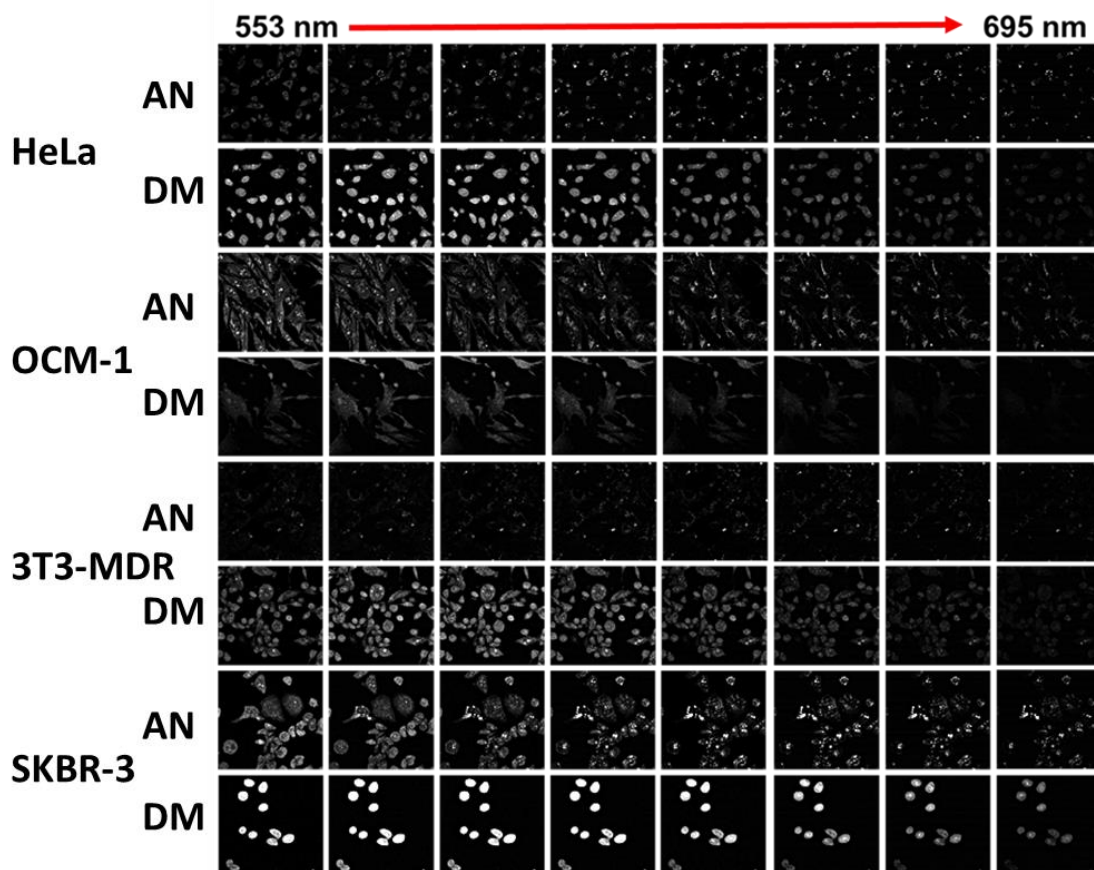


Az 5.8. ábrán 488 nm-es gerjesztést követően láthatjuk a spektrális képeket HeLa, OCM-1, 3T3-MDR és SKBR-3 sejtek esetében. A képek 18 nm széles ablakokban mutatják a 499 nm-től 695 nm-ig terjedő spektrumot.

Az ábrát megfigyelve kijelenthetjük, hogy az AN és a DM is jobban gerjeszthető 488 nm-en, mint 405 nm-es gerjesztést követően. Az emissziós maximum szintén jobbra tolódva helyezkedik el a DM esetén. Itt is megfigyelhető, hogy a sejtek különböző mennyiségben vették fel a vegyületeket. Az AN általában jobban festi ezen hullámhossz mellett a sejteket. A vegyületeket sorrendben az SKBR-3, az OCM-1 és a HeLa sejtek vették fel a nagyobb mértékben, míg a 3T3-MDR esetén a P-glycoprotein miatt kevesebb festék tudott bejutni.

5.9. A két vegyület spektrális képalkotása 543 nm-es gerjesztéssel

A következő montázson az 543 nm-es gerjesztést követő spektrális képeket láthatjuk.

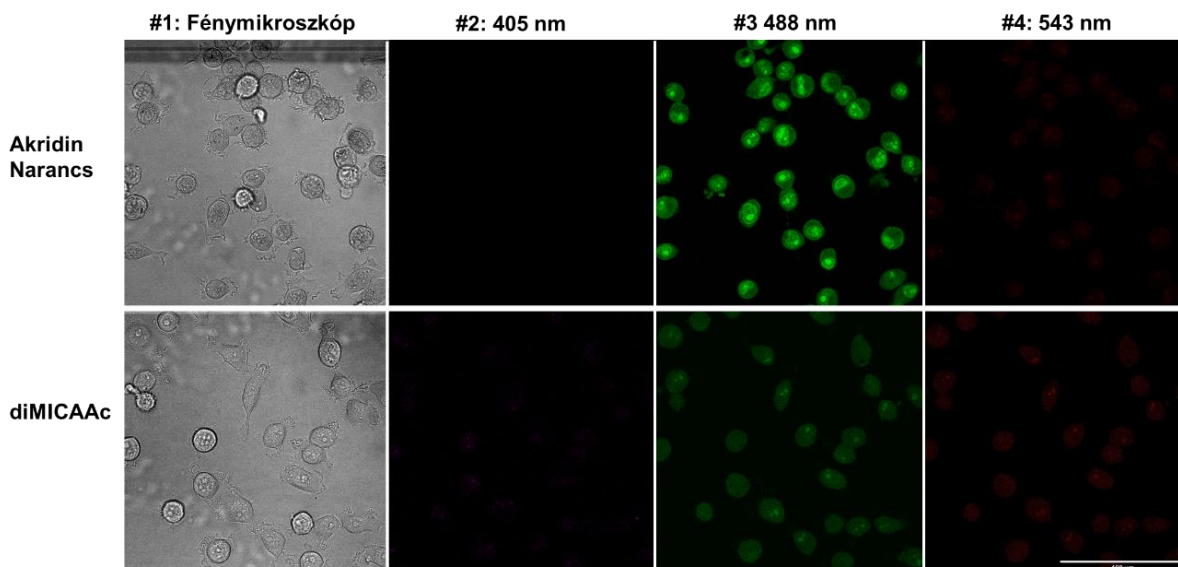


Az 5.9. ábrán 543 nm-es gerjesztést követően láthatjuk a spektrális képeket HeLa, OCM-1, 3T3-MDR és SKBR-3 sejtek esetében. A képek 18 nm ként mutatják az 553 nm-től 695 nm-ig terjedő emissziós hullámhossz tartományt.

A jobb láthatóságért itt is fokoztuk a fényerőt 60 %-al. Az emissziós maximum szintén jobbra tolódva helyezkedik el DM esetén, hiszen a DM jobban gerjeszthető 543 nm-ről, mint az AN. Az is megfigyelhető, hogy a sejtek ebben az esetben is az előzőekben jellemzethez hasonló mintázat alapján vették fel a vegyületeket.

5.10. Az AN fluoreszcencia intenzitása nagyobb, mint a DM-é

Zeiss LSM 880-al megvizsgáltuk a sejtek finom strukturális szerkezetét AN és DM kezelést követően. $2,26 \times 10^{-6}$ M moláris koncentrációjú AN és $2,43 \times 10^{-6}$ M moláris koncentrációjú DM oldatokkal kezeltük a sejteket. A kezelés időtartama 2 óra volt. Az eredményt a következő montázsban mutatjuk be:

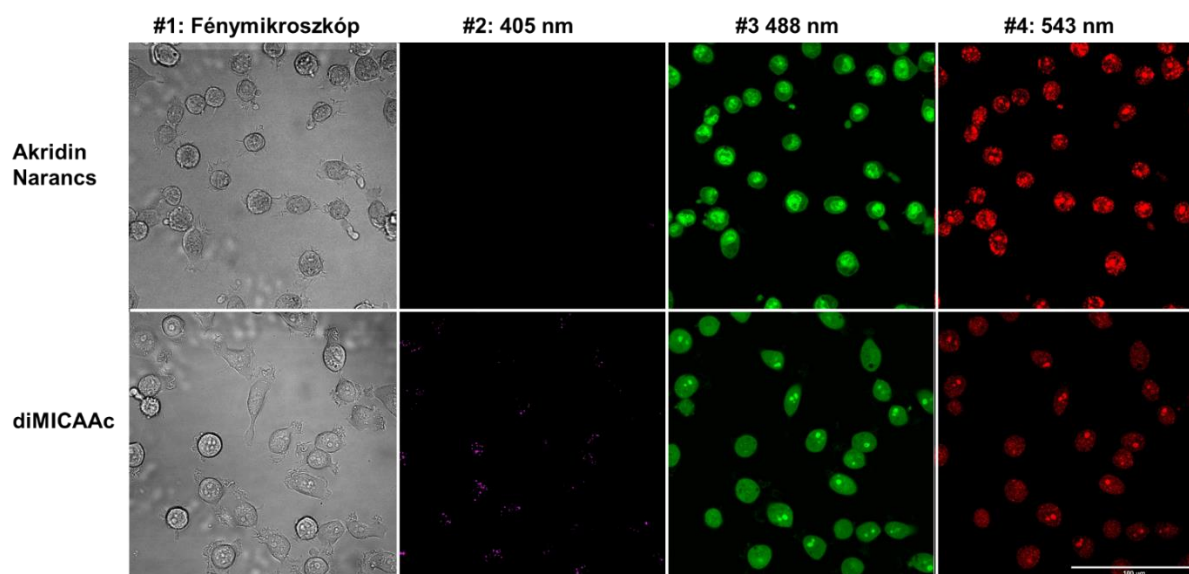


Az 5.10. ábrán a sejtek áttekintő képeit láthatjuk azonos lézer- és detektor erősítési beállításokkal transzmissziós üzemmódban, és 405, 488 és 543 nm-es lézer gerjesztést követően a kék, zöld és vörös emissziós tartományokban HeLa sejtek esetében. Méret marker: 100 µm.

A transzmissziós kép elemzése alapján valószínűsíthető, hogy az AN 2 órás kezelést követően nagyobb toxicitással rendelkezik, ugyanis megfigyelhető, hogy a sejtek felváltak és bizonyos helyeken membrán lefűződéseket is megfigyelhetünk, míg a DM esetében több szabályosan elterülő letapadt sejt maradt. A gerjesztési maximum jól láthatóan 488 nm-él van mindkét esetben. Az AN fluoreszcencia paraméterei kedvezőbbek, ugyanis azonos beállítás mellett magasabb az AN intenzitása.

5.11. Különböző szubcelluláris lokalizáció

A nagyfelbontású konfokális mikroszkópiával készített optimalizált detektor beállításokkal készített képeken a képek kontrasztján és fényerején javítottunk, ugyanis alkalmaztunk a képekre egy median 2.0-ás szűrőt és 60 %-al megemeltük a fényerőt is. Így figyeltük meg a festett sejtek intracelluláris finom struktúráját.

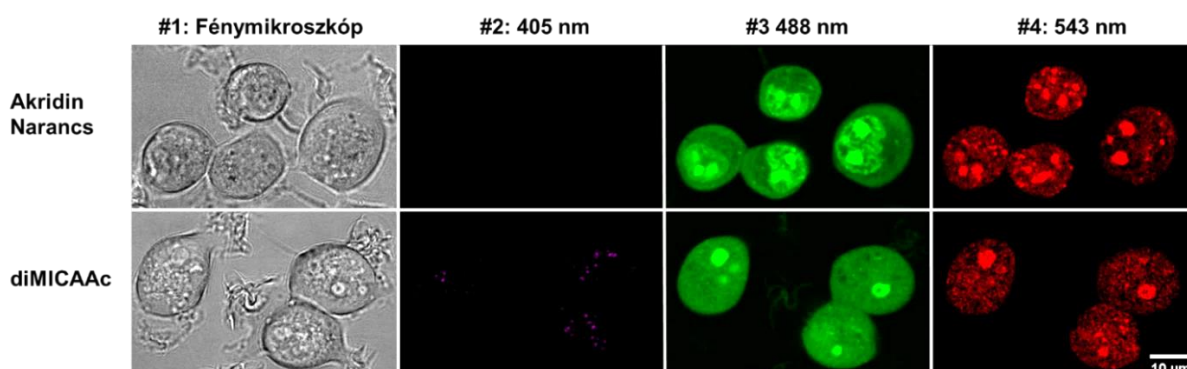


Az 5.11. ábrán a sejtek áttekintő konfokális mikroszkópos képeit láthatjuk képenként optimalizált, különböző detektor erősítési beállításokkal transzmissziós üzemben és 405, 488 és 543 nm-es lézer gerjesztést követően a kék, zöld és vörös emissziós tartományokban az 5.10. ábrán megfigyelhető ugyanazokon a HeLa sejteken. Méret marker: 100 µm.

A 5.11. ábrán a különböző gerjesztések esetén más-más mintázatot figyelhetünk meg a két vegyület esetében. A DM gerjeszthető 405 nm-en és itt kis méretű vezikulákat azonosíthatunk a képen, melyek különböznek a 488 nm-es gerjesztéssel látható sejtmagvacskáktól. Azt gondoljuk, hogy ezek savas vezikulák és lizoszómák. Ha összehasonlítjuk a 488 nm-es gerjesztést követően a két anyagot, megállapíthatjuk, hogy az AN egyértelműen bejutott a sejtmagba. A DM esetén egyenletesen van festve a citoplazma, a sejtmagban pedig a sejtmagvacskák látszanak intenzíven, de halványan a sejtmag kontúrja is kivehető. Az irodalomból ismert, hogy 543 nm-es gerjesztéssel vörös emissziós tartományban az AN-nál a lizoszómák és egyéb savas vezikulomok jeleníthetők meg, de itt még a citoplazma is sejtethető, míg a DM esetén a 488 nm-es gerjesztéshez hasonló a mintázat.

5.12. Az AN teljes sejtmagot, míg a DM nukleóluszt jelöl

A következő montázon a 5.11. ábrából kivágott és nagyított képeket láthatjuk.

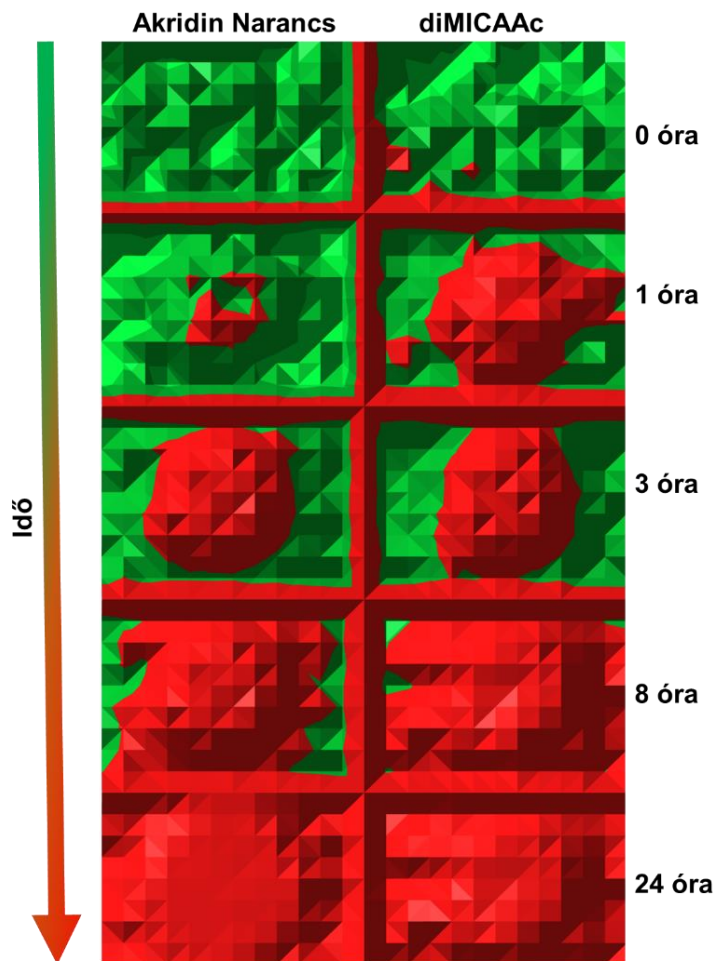


Az 5.12. ábrán a 5.11. ábrából kivágott és felnagyított részletet láthatunk.

Ez az ábra a 488 nm-es gerjesztésénél egyértelművé teszi, hogy az AN bejut a sejtmagba és megfesti azt. 405 nm-en a DM esetében jól azonosíthatóak a kis méretű vezikulák, de 488 nm-en a DM eléggé homogéneen festi a sejteket, míg a sejtmagvacskákat intenzívebben jelöli. Az AN esetében a citoplazmatikusan ábrázolódó lizoszómák és a savas vezikulák láthatóak jól az 543 nm-es gerjesztéssel.

5.13. Fototoxicitás kék LED folyamatos megvilágítást követően

A következő kísérletben kék LED fény (490 nm) által indukált fotokinetikát határoztunk meg, ugyanis kíváncsiak voltunk a vegyületek fototoxicitására. 96 lyukú edény minden welljébe 10.000 HeLa sejtet tettünk ki. $2,26 \times 10^{-6}$ M koncentráció AN és $2,43 \times 10^{-6}$ M koncentrációjú DM oldatokkal kezeltük a sejteket. Kontrollként 1 %-os DMSO-t használtam. A megvilágítási időt növeltük, majd MTT módszerrel határoztuk meg a sejtek életképességét.

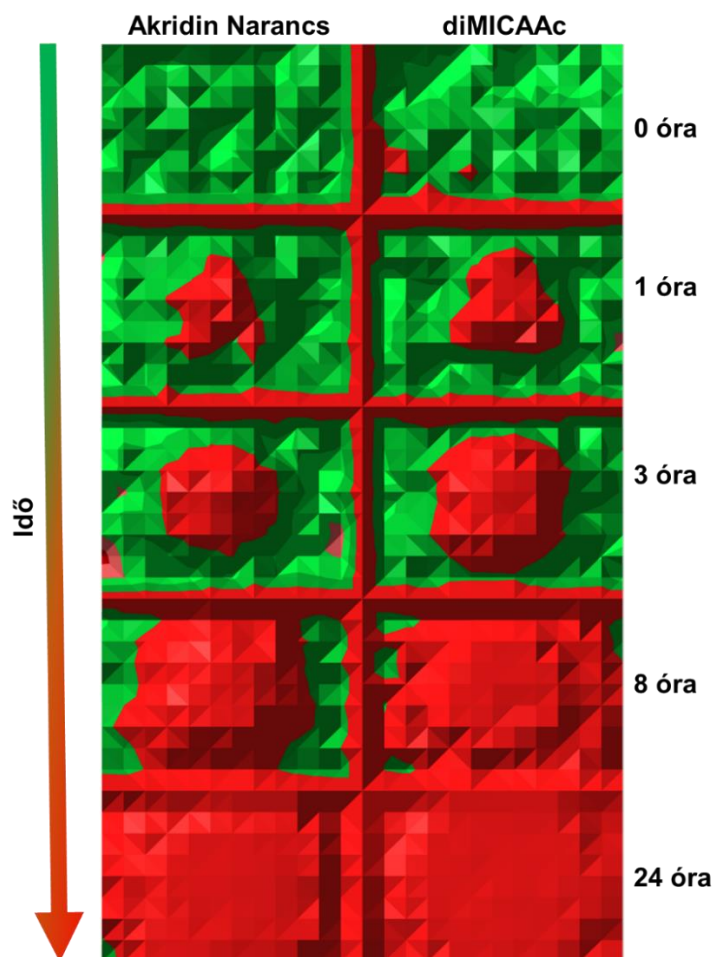


Az 5.13. ábrán a két festék folyamatos kék megvilágítás hatására mutatott fototoxicitási kinetikája látható HeLa sejtekben MTT életképesség tesztel meghatározva. A 10 darab 96 lyukú plate welljeink az abszorbanciája alapján számolva zöld színnel az élő sejteket jelöltük, míg piros színnel a halott sejteket ábrázoltuk kék LED-el történt megvilágítást követően. Fentről lefelé haladva nő a megvilágítási idő.

Megvilágítás nélküli kontroll esetben a vegyületek a fototoxicitáshoz használt koncentrációban nem mutattak toxicitást (0 órás megvilágítás). Az ábrán megfigyelhető, hogy 1 órás megvilágítást követően a DM fototoxikus hatása hamarabb jelentkezik. 3 órás megvilágítás esetében nagyjából hasonló fototoxikus hatás látható mindkét esetben, míg 8 órás megvilágítást követően a DM ismét fototoxikusabbnak tűnik, mint az AN. 24 órás világítást követően gyakorlatilag egyik esetben sem figyelhető meg élő sejt. Összegezve elmondható, hogy mindkét festék jelenlétében a megvilágítási időt növelve csökken az életképesség.

5.14. Folyamatos zöld LED megvilágítással hasonló a fototoxicitás

A kék megvilágítást követően kíváncsiak voltunk a fototoxikus hatásra zöld LED megvilágítás esetében is. A kísérleti körülmények hasonlóak voltak, mint a fent leírt esetben, azonban itt 525 nm-es LED lámpát használtunk a megvilágításra.

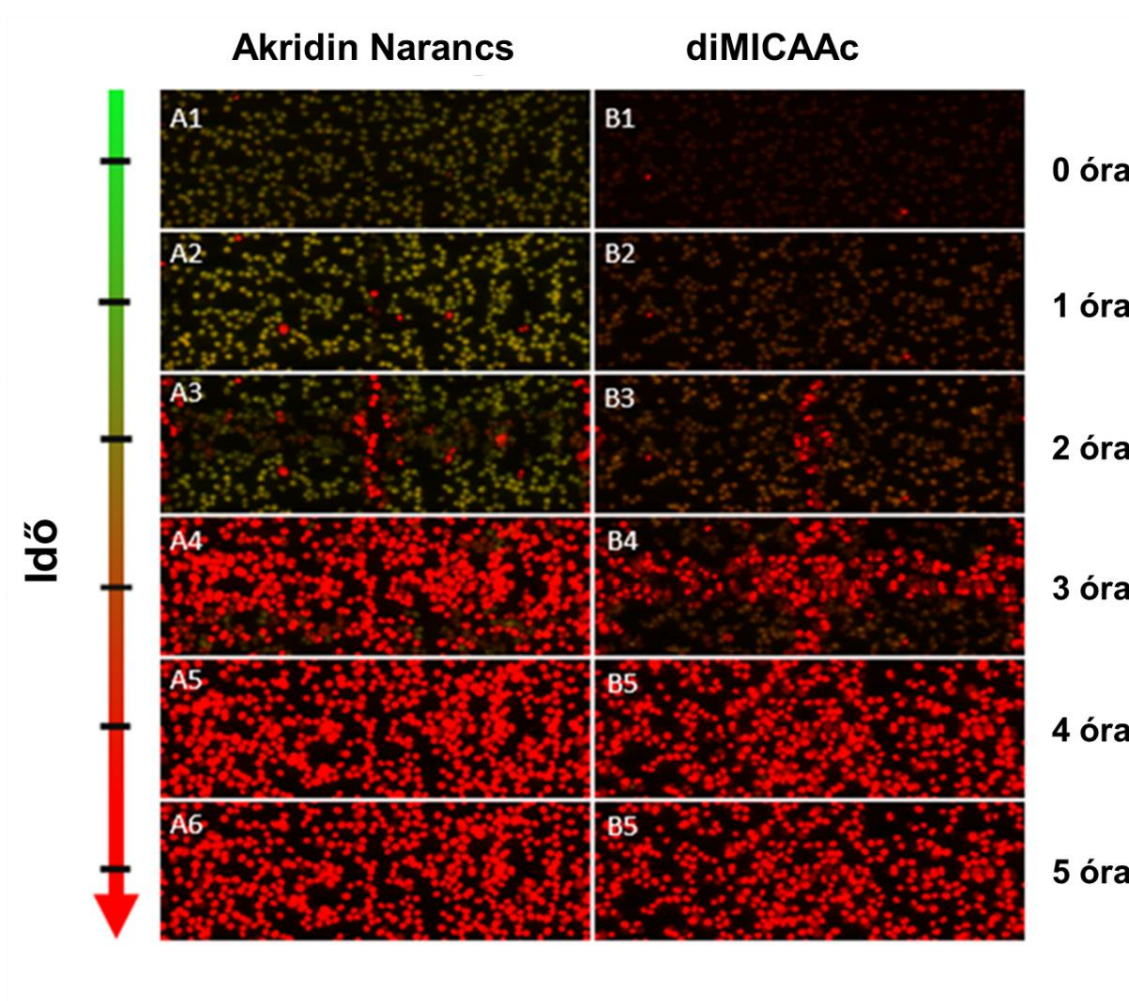


Az 5.14. ábrán a két vegyület folyamatos zöld megvilágítás esetén mutatott fototoxicitási kinetikáját mutatjuk HeLa sejteken MTT életképesség alapján. A 10 darab 96 lyukú plate welljeink az abszorbanciája alapján számolva zöld színnel az élő sejteket jelöltük, míg piros színnel a halott sejteket ábrázoltuk a zöld LED-el történt megvilágítást követően. Fentről lefelé haladva nő a megvilágítási idő.

A DM kicsit nagyobb mértékű fototoxicitását láthatjuk 1 és 3 órás megvilágítást követően. 8 órás megvilágítást követően szinte minden sejt elpusztul, de itt is fototoxikusabb a DM. 24 órás világítást követően gyakorlatilag a sejtek teljesen elpusztulnak.

5.15. Frakcionált lézer megvilágítással az AN gyorsabb fototoxicitás mutat

Lézer-szkenning citométerrel szintén megvizsgáltuk a sejtek életképességét. $2,26 \times 10^{-6}$ M moláris koncentrációjú AN és $2,43 \times 10^{-6}$ M moláris koncentrációjú DM oldatokkal kezeltük a sejteket, továbbá PI-t adtunk hozzájuk $7,5 \times 10^{-6}$ M koncentrációban. A kísérlethez HeLa sejteket használtunk 30.000 sejt/well sejtszámban. 488 nm-es lézert használtunk a megvilágításhoz. 63 ciklusban vettünk fel képeket 5 perc/ciklus időtartamban. A kezelési idő így 5 óra 15 perc volt.



Az 5.15. ábra az LSC mérést kísérő fototoxicitási kinetikát mutatja egyedi HeLa sejtek életképesség vesztésén keresztül nyomon követve. Az eredetileg halványan festődő élő sejtek membránjának a károsodásakor a külső térből a propidium jodid DNS festék beáramlik a sejtekbe, majd a sejtek magjába, aminek hatására a magok intenzív piros színben mutatkoznak meg. Bal oldalon az AN, míg jobb oldalon a DM kezelés képei láthatóak növekvő időtartamú mérések után. A képek úgynevezett „well image-k”, mely képek minden esetben 2×2 „field image”-ből mozaikszerűen épülnek fel. Egy kép teljes szélessége $500 \mu\text{m}$.

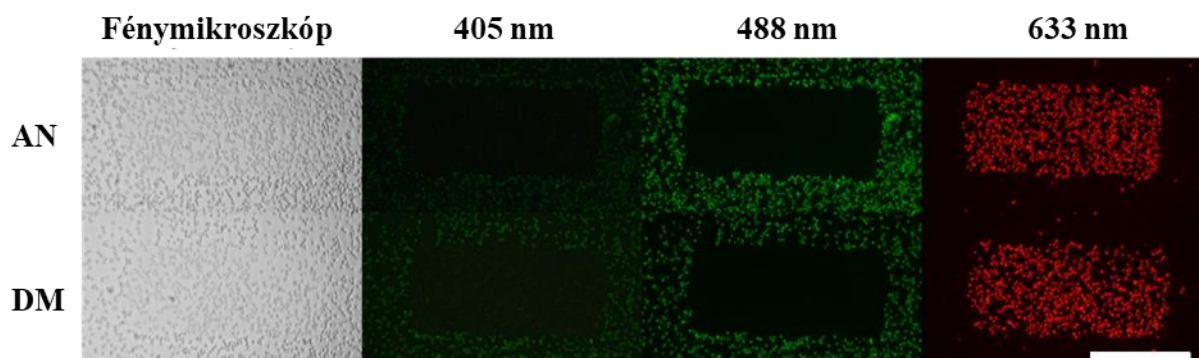
A különbség a lézer-szkenning citometriás mérések és a LED lámpás kísérletek között a megvilágítás folytonosságában volt. Míg a LED használata esetében a kezelési időben folyamatosan történt a megvilágítás, addig az LSC esetén csak a képek készítésének idején történt megvilágítás, amely esetünkben ciklusonként 2,9 s megvilágítási időt jelentett. Tehát a LED lámpa folyamatos megvilágításával szemben, az LSC megvilágítást frakcionáltan 5 percenként adagoltuk a ciklusonkénti 2,9 s megvilágítási időkben.

Az LSC 488 nm-es lézerének teljesítménye folytonos megvilágítás esetében $0,30 \text{ mW} \pm 0,05$ (átlag \pm SD) volt, ami $0,32 \text{ W/cm}^2$ fény teljesítménynek felelt meg a mintánál. Ezzel ellentétben a LED megvilágításnál ugyanez a fény teljesítmény kevesebb: $4,45 \text{ mW/cm}^2$ volt.

A PI-ról tudjuk, hogy csak élettelen sejtek vagy erősen károsodott sejtek membránján képes átjutni. 0 óránál láthatjuk, hogy az AN fluoreszcens intenzitása nagyobb, mint a DM-é. 1 órát követően AN esetében a kép közepén („well image”) pár helyen kezdenek feltűnni az intenzív PI festődésű pusztuló sejtek. 2 óránál közepén (a „field image” képek illesztésénél, ahol a lézer nyaláb többször is áthalad egy cikluson belül) egyre több PI pozitív sejt figyelhetünk meg. 3 óránál szembetűnő, hogy az AN esetén gyakorlatilag minden sejt elpusztul, köszönhetően annak, hogy az AN frakcionált megvilágítás esetén fototoxikusabb vegyület, mint a DM. 4 órától kezdve minden sejt meghal mindkét esetben.

5.16. Csak a megvilágított területeken halnak el a sejtek

Az LSC mérést követően felvételeket készítettem az általunk bevilágított területeknél kicsit nagyobb területekről hagyományos és higanygőz lámpás fluoreszcens megvilágítással.

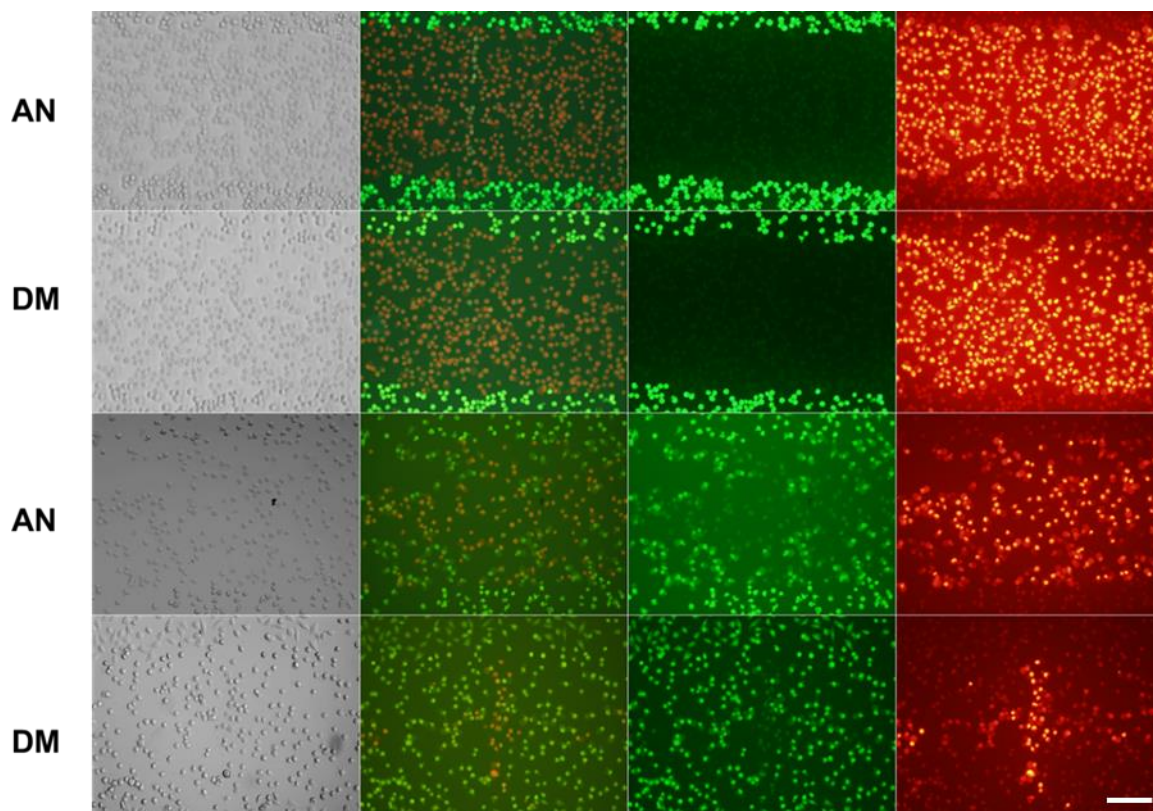


Az 5.16. ábrán láthatjuk az megvizsgált 2×2 „field image”-ből álló hagyományos és higanygőz lámpás fluoreszcencia mikroszkópos, UV/kék, kék/zöld és zöld/piros (gerjesztés/emisszió) képeket AN és DM esetében. Méret marker: $250 \mu\text{m}$.

A mikroszkópos képeken látható, hogy a középső „well image” területeken megvilágított sejtek károsodtak. UV gerjesztéssel a kvantumhatásfok alacsonyabb, mint kék gerjesztéssel. Kék gerjesztést követően láthatjuk a legjobban, hogy a „well image” területeken kívül is felvették a sejtek, mind az AN-ot, mind a DM-ot. Az LSC megvilágítást követően, csak itt, a bevilágítási ablakon kívül láthatóak intenzív zöld színnel a sejtek. A piros csatornában azokat a sejteket láthatjuk, amelyek felvették a PI-t, tehát ezek a sejtek halottak. Megállapíthatjuk a képekből, hogy minden sejt felvette az általunk használt vegyületeket és csak azok a sejtek haltak meg amelyek a megvilágított területeken belül helyezkedtek el.

5.17. A festékek mennyiségével arányos a fototoxicitás

A következő montázon higanygőzlámpás felvételeket láthatunk, amelyet Olympus IX-71-es mikroszkóppal készítettünk. HeLa sejteket kezeltünk AN-al $2,26 \times 10^{-6}$ M és $1,13 \times 10^{-6}$ M végkoncentrációban és DM-al $2,43 \times 10^{-6}$ M, $1,21 \times 10^{-6}$ M végkoncentrációban. Minden mintához adtunk $7,5 \times 10^{-6}$ M végkoncentrációban propidium jodidot. A képek szintén egy LSC-s életképesség vizsgálat után lettek felvéve, tehát 63 ciklusban az 5 órás megvilágítást követően készítettem a felvételeket.



Az 5.17. ábrán két különböző festék koncentrációval előidézett fototoxicitást mutatunk

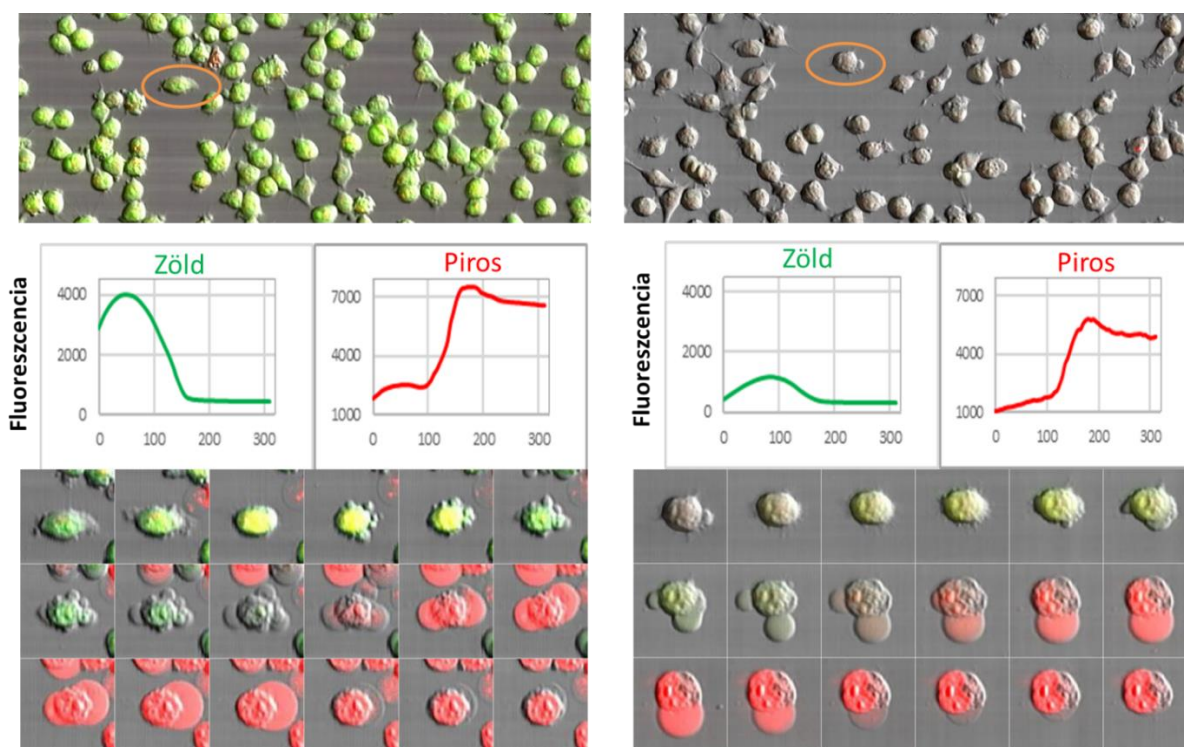
be. A felső két sorban magasabb, míg az alsó két sorban alacsonyabb koncentrációjú festéket használtunk. A megvilágítás 2×2 „field image” területen történt, aminek a hagyományos és higanygőz lámpás fluoreszcencia mikroszkópos, UV/kék, kék/zöld és zöld/piros (gerjesztés/emisszió) képeit mutatom be AN és DM esetében. Méret marker $50 \mu\text{m}$.

Fentről lefelé haladva az első két sorban láthatjuk az AN $2,26 \times 10^{-6}$ M és DM $2,43 \times 10^{-6}$ M koncentrációjú kezeléseket, míg az alsó két sorban AN $1,13 \times 10^{-6}$ M és DM $1,21 \times 10^{-6}$ M végkoncentrációjú mintákat. Ami szembetűnő, hogy a kisebb koncentrációknál kevesebb a halott sejt, hasonló megvilágítás esetén. Az AN $2,26 \times 10^{-6}$ M és DM $2,43 \times 10^{-6}$ M koncentráció esetén hasonló mértékű fototoxicitással rendelkeznek. AN $1,13 \times 10^{-6}$ M és DM $1,21 \times 10^{-6}$ M végkoncentráció esetében az AN esetén több halott sejtet láthatunk. A különbséget a LED indukálta fototoxicitáshoz képest két dologra, egy spektrális és egy időbeli dologra vezethetjük vissza. Egyrészt az LSC 488 nm-es lézer gerjesztést használ, míg a LED lámpák kicsit más hullámhossz maximumon gerjesztettek (kék: 470 nm, zöld: 530 nm) és a LED lámpák szélesebb spektrumban világítják meg a sejteket a maximum két oldalán. Másrészt az LSC esetén nem folyamatos a megvilágítás, ugyanis 5 percenként a képek felvételének idejére, kb. 3 másodpercig, világítjuk csak meg a mintát. A LED lámpa esetén ténylegesen az adott kezelési ideig folytonosan történik a megvilágítás.

5.18. Az AN fototoxikusabb frakcionált besugárzással

Szerettük volna tudni egyedi sejt szinten, hogyan veszik fel a sejtek a fotoérzékenyítőket és milyen morfológiai és membrán permabilizációs változások történnek eközben. Ezért elkészítettük a fluoreszcens vegyületek és a PI felvétel képi kinetikáját az iCys

7.0 és a Fiji szoftverek segítségével egyedi sejtekben.



Az 5.18. ábrán a sejtek fotodestrukciós festődési kinetikáját láthatjuk propidium jodid jelenlétében, mégpedig bal oldalon az AN, míg jobb oldalon a DM esetében. A felső sor egy-egy képének teljes szélessége 250 μm . Itt jelöltük meg azt a sejtet, aminek a festési kinetikájának a képeit láthatjuk az alsó sorokban. A középső sor grafikonjai a felső képen látható összes sejt együttes festési kinetikájának a változását mutatja. A fluoreszcencia intenzitásokat ábrázoltuk a 63 ciklusnak megfelelő idő függvényében (min).

Az ábrán jól látható, hogy a vegyületek hozzáadását követően először a citoplazma, majd a magok is egyre intenzívebben veszik fel a fotoérzékenyítő festékeket. Az AN kvantumhatásfoka nagyobb, mint a DM-é, ezért itt nagyobb intenzitásban látjuk a színváltozásokat, ugyanakkor ez el is fedi bizonyos mértékben a DM festék esetén jobban követhető sejten belüli morfológiai változásokat. A sejtek festését követően (festéssel való inkubáció) beáll egy sejten belüli festék egyensúly. Ahogy elkezdünk 5 percenként a megvilágításokkal képeket készíteni róluk, először egy új festék egyensúlyt látunk, amikor a festékek a sejtmagban intenzív zöld színben akumulálódnak. Ez a folyamat már a megvilágítás miatti szinglet oxigén károsodás eredménye, ami károsítja mind a lizoszóma membránt, mind a kromatint, mind a citoplazma membránt. Az idő előrehaladtával a károsodás mértéke megnő, és egy pontban a sejtől kiürülnek a fotoszenzitiváló festékek, majd a PI elkezd

bejutni a sejtbe. A PI festés eleinte szemmel látható a citoplazmában is, majd egy idő után a magi DNS festéssel telítődik. A citoplazmatikusan intenzív PI festődés az oxidatív károsodás eredményeképpen fragmentálódó DNS-nek a magból történő ürülésére utal. AN esetén ez a folyamat gyorsabban megtörténik.

5.19. A membrán permeabilizálási PI kinetika statisztikai elemzése

Az egyedi sejtek PI kinetikájának kiértékelés esetén azt tapasztaltuk, hogy az AN gyorsabban teszi átjárhatóvá a sejtek citoplazma membránját, tehát öli meg a sejteket, mint a DM. Ezt statisztikailag is látni szeretnénk volna, ezért több sejtről is adatot gyűjtöttünk és kiszámítottuk a fototoxicitási kinetikát jellemző gyors PI emelkedés megkezdődésének átlagos idejét és a szórását.

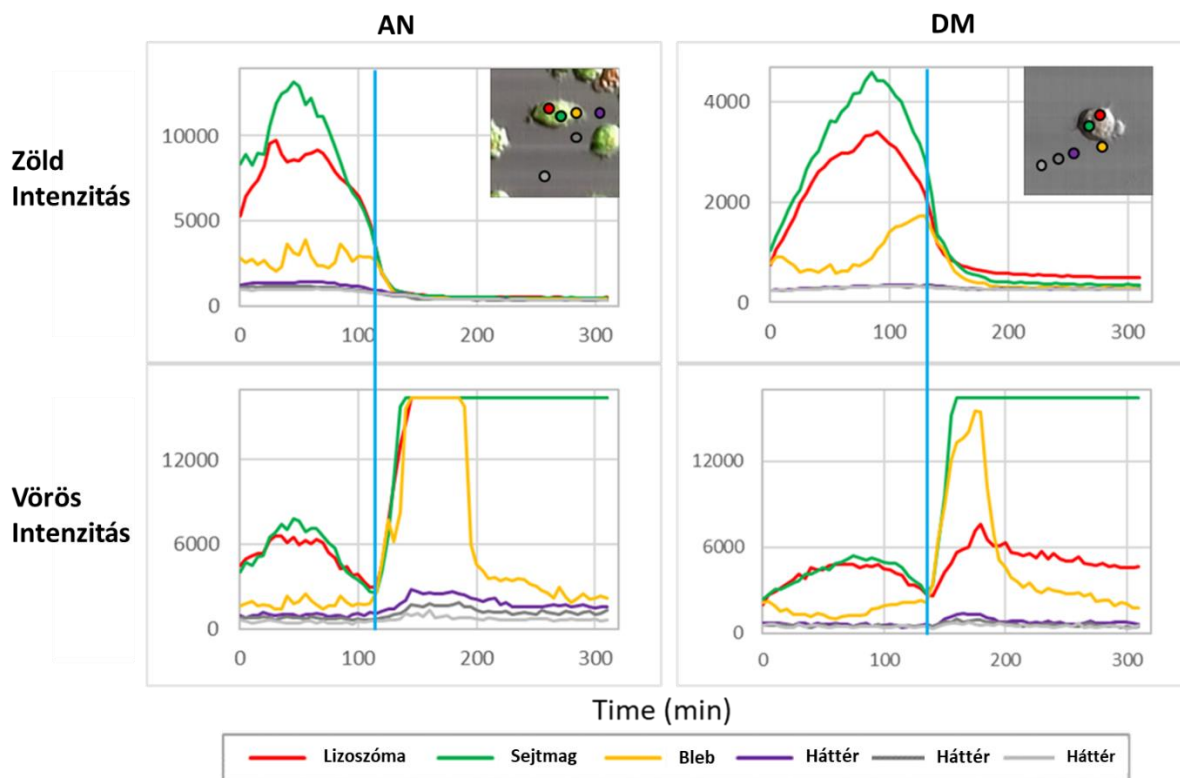
Fototoxicitási idő (óra)	Akridin narancs	diMICAAC
Átlag	2.4	2.9
SD	0.3	0.28
n	175	164

Az 5.1. táblázatban AN esetén 175 db sejtről, DM esetén 164 db sejtről készítettünk statisztikát a fototoxicitási kinetika meghatározásához.

A táblázatban bemutatjuk az átlagos ölési időt és ennek a szórását. Láthatjuk, hogy AN esetén átlagosan 28,8 ciklusra (2,4 óra) már jelentkezik a károsodás és a PI be tud jutni a sejtekbe, míg DM esetén, ez átlagosan 34,6 ciklus (2,9 óra). A statisztika azt mutatja, hogy az AN frakcionált lézer megvilágítást követően gyorsabb fototoxikus kinetikával tud a sejtekre hatni, mint a DM. A p érték kisebb volt mint 0.0001, t-próbával vizsgálva.

5.20. A PI festődés kinetikája frakcionált megvilágítás esetén

Szerettük volna meghatározni a PI DNS-festék sejtben belüli és kívüli mintázatának pontos kinetikáját. A következő ábrán egy képet láthatunk az LSC-s életképesség vizsgálatról AN és DM kezelést követően. A zöld csatornában, ami a fényérzékenyítő jelét mutatja, kiválasztottunk egy sejtet, ezután nyomon követtük mind a zöld, mind a vörös intenzitások változását, mely utóbbi a DNS-festő PI intenzitását jelezte a vörös csatornában.



Az 5.20. ábra felső képén egy HeLa sejtet láthatunk AN és DM kezelést követően. 63 ciklusban történt a megvilágítás. A kép az 1. ciklust ábrázolja, amelyen hat kör alakú vizsgálati helyet (ROI) jelöltünk ki színekkel azonosítva őket: egyet a sejten belül a lizozómák területén (piros), egyet a sejtmagon belül (zöld), egyet a későbbi membrán lefűződés helyén (sárga), és három egyre távolodó pontot a sejt környezetében (lila, sötétszürke, világosszürke), ami a sejttől távolodó hátttereket ábrázolja. Az ábra felső sorában a zöld csatornában mért intenzitásokat (fényérzékenyítő festékek), míg az alsó sorban a távoli vörös csatornában mért intenzitásokat (PI) mutatjuk. Bal oldalon az AN, jobb oldalon a DM.

Az 5. 20. ábrán jól látható, hogy amint a sejteket megfestettük a fényérzékenyítő festékekkel, a 63 ciklus során először emelkedik a zöld csatornában az intenzitás. Ahogy időben előre haladunk, a ciklusok száma növekszik, világítjuk a sejtet, a károsító folyamatok mind a lizozómát, mind a sejtmagot és a sejt felszíni membránt is károsítják. Amint a sejtmembrán permeabilitása megnő, a PI be tud jutni a sejtbe (kék függőleges vonal). Az AN esetében ennél a sejtnek ez a szám 23 ciklus. Ahogy a membrán permeabilitása megnőtt a PI intenzitása folyamatosan növekszik, az AN festék pedig kiürül a sejtől és lecsökken a zöld intenzitás. A sejtmag károsodásánál fragmentálódik a DNS. Ezek a DNS fragmentek először kijutnak a sejt magból, bejutnak a membrán lefűzésekbe, majd kiürülnek a sejtől. Az ábra bal alsó részében láthatjuk a vörös csatornában mért intenzitásokat sejtben belül, a sejt környezetében és

a háttérben. A 23 ciklust követően először és legjobban a magban, majd a hólyagokban, és a sejt közelében, a háttérben is megemelkedik a PI intenzitása. Időben késleltetve és arányosan egyre kevésbé a távolság növekedésével. DM esetében is hasonló folyamatot láthatunk, de még egyértelműbben, mint azt az AN esetében. A különbség a két vegyület fototoxikus hatása között, hogy a DM-nél a membrán károsodás időben később jelentkezik, tehát a membrán permeabilitása nem a 23. ciklusban, hanem a 27. ciklusban figyelhető meg. Az ábra jobb alsó részén (DM, vörös csatorna) jobban megfigyelhető, hogy a fragmentálódott DNS valóban kijut a sejt környezetébe és emeli a háttér intenzitását. A lizoszómákon jelentkező fototoxicitási változások a képek kisebb felbontása miatt nem értékelhetőek egyértelműen ezekben a kísérletekben. Viszont a fototoxicitás hatására a sejtmagból ürülő DNS fragmentumokat, tudtunkkal elsőként vizualizáltuk.

5.21. Hiszton fehérjék elúciójának vizsgálata

Az AN fényérzékenyítőről jól ismert DNS károsító hatása. Ennek során az AN indukálta fotooxidáció, ahogyan az előző kísérletekben láttuk, DNS töréseket hoz létre. De a fotooxidáció során kovalens keresztkötések is létrejöhetnek a kromatin DNS-DNS, DNS-fehérje és fehérje-fehérje molekulái között. Ezért kíváncsiak voltunk arra, hogy egy a kromatin fehérjéinek a magban való rögzítettségét monitorozó nukleoszóma stabilitás vizsgálattal találunk-e különbséget az AN és a DM hatásában.

A nukleoszómák DNS-hez való dinamikus rögzítettsége fontos a sejtek transzkripció, proliferációs és differenciációs folyamatainak szabályozása során. A nukleoszómák stabilitási jellemzőt in vitro értékelik vagy úgy, hogy rekonstruált vagy izolált nukleoszómákat tesznek ki különböző stressz körülménynek és mérik integritásukat, vagy élő sejtekben vizsgálják mobilitási jellemzőiket. Ezek a jellemzők pedig bemutatják, hogy különböző hatásokra milyen molekuláris változások történnek az adott rendszerben. Egyik példa erre, ha a NaCl koncentrációjának emelésével csökkenthetjük a kromatin stabilitását, elősegítve ezzel a hiszton fehérjék magi elúcióját. Egy másik idevágó példa, amikor a DNS-be interkalálódó molekulák módosítják a DNS csavarodottságából adódó feszülését, és ez vezet ugyancsak a magi fehérjék magból való távozásához [105]. A következő kísérletekben arra voltunk kíváncsiak, hogy AN és DM kezelést követően látunk-e különbséget a H2A hiszton fehérje elúciójában a megvilágított és a nem megvilágított területek között. A kísérletekben HeLa sejteket használtunk. $2,26 \times 10^{-6}$ M moláris koncentrációjú AN és $2,43 \times 10^{-6}$ M moláris koncentrációjú DM oldatokkal kezeltük a sejteket. Kezelést követően az LSC-s méréseknél definiált méretű

területet világítottunk meg.

700 mM NaCl

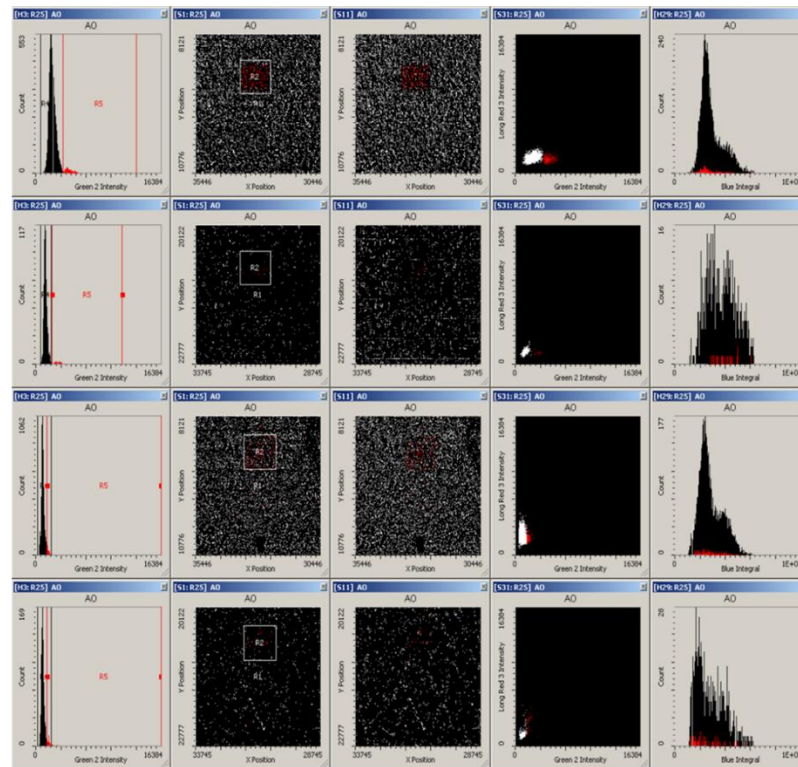
AN

2000 mM NaCl

700 mM NaCl

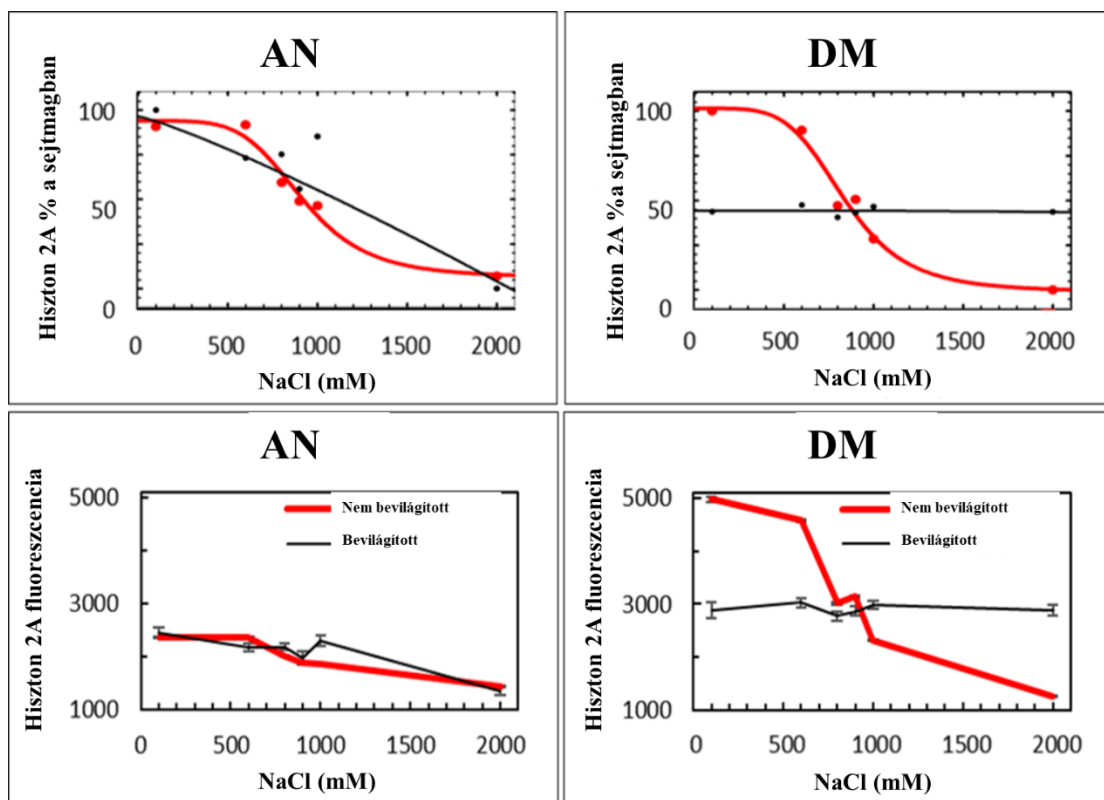
DM

2000 mM NaCl



Az 5.21. ábrán a megvilágítást követő 700 mM és 2000 mM sókoncentrációs kezelés utáni eredményeket mutatjuk be a két fényérzékenyítő festék esetén. Az ábra azt szemlélteti, hogyan tudtuk elkülöníteni a megvilágított és nem megvilágított sejteket. Piros pontokkal mutatjuk a bevilágított területeken lévő DNS festett magokat, melyeket az R2 kapuval jelöltük. Az összes többi sejt magja, ami az R2 kapun kívül esik, ezek jelentik a nem megvilágított területet.

A „beégetést” követően különböző sókoncentrációkkal kezeltük a sejteket, majd az iCys szoftver segítségével a távoli vörös csatornában azonosítottuk a sejtek hiszton mennyiségét jelentő fluoreszcenciás értékeket (ez látható az 5.21. ábra 4. oszlopának y-tengelyén). Meghatároztuk a sejtszámot, a sejtciklust, mely utóbbi az 5.21. ábra 5. oszlopáról olvasható le. A következő ábrán az összesített kezelés eredményét mutatjuk be, amely tartalmazza az összes sókoncentrációs kezelés eredményét.



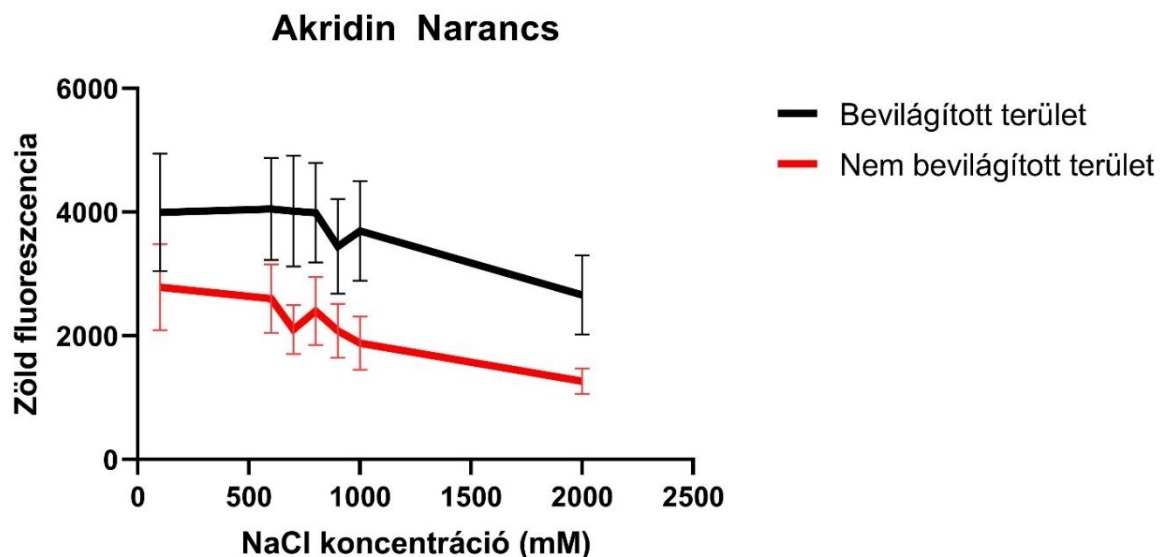
Az 5.22. ábra bal oldali felső és alsó részén az AN, jobb oldali felső és alsó részén a DM hiszton fluoreszcencia intenzitásait láthatjuk az emelkedő NaCl koncentrációk függvényében. A piros vonal a megvilágítatlan területeket mutatja, míg a fekete vonal a megvilágított területeket ábrázolja. A felső két ábrán a hiszton H2A mennyiségét százalékosan ábrázoltuk a kezdeti sómentes állapothoz (100 %) viszonyítva, fényérzékenyítők jelenlétében.

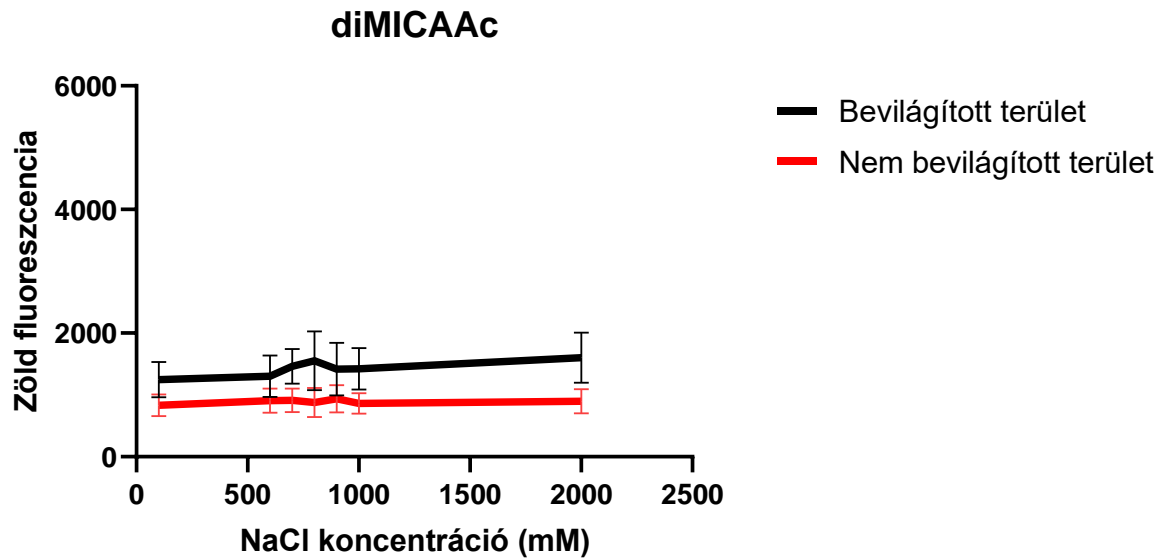
Amikor a megvilágítatlan HeLa sejteket az AN vagy DM interkalátorokkal kezeltük, a hiszton H2A fehérjék a sókoncentráció növekedésével szigmoid görbe szerinti mintázatnak megfelelően ürültek ki a sejtmagból (piros jelzés az 5.22. ábrán). Az alsó sor ábráin az is jól megfigyelhető, hogy a DM esetén nagyobb mennyiségű kezdeti hiszton fehérje intenzitást mértünk a 100 és 600 mM koncentrációk esetében. Mindkét esetben látható, hogy a NaCl koncentrációjának emelésével tendenciózusan csökkenő hiszton fehérje mennyiségeket detektáltunk. Ez a DM esetében szembetűnő ugyanis nagyságrendben kisebb hiszton mennyiség maradt a sejtben a legnagyobb sókoncentrációs kezelést követően a megvilágítatlan területen. A DM megvilágított terület hiszton mennyisége nagyságrendben azonos maradt a legkisebb és legnagyobb sókoncentráció esetében egyaránt. Az AN esetén a megvilágított és megvilágítatlan területeken is csökkent a hiszton fehérje mennyisége a DM festékhez képest, ami egyrészt az jelentheti, a bevilágítatlan esetben, hogy az AN hatékonyabb interkalátor festék révén már a DNS-hez kötődve előidézi a hisztonfehérjék elúcióját, másrészt a bevilágítási

esetben nagyobb mértékben károsítja a DNS-t, mint a DM. Összességében megállapítható, hogy megvilágítást követően a hiszton fehérjék rögzültek a kromatinhoz a DM esetén, míg a nem megvilágított részen a sókoncentráció emelésével a hisztonok eluálhatóak voltak mind a DM mind az AN esetében, hiszen csökkenő hiszton mennyiségeket detektáltunk. Továbbá megállapíthatjuk, hogy az AN intenzívebb DNS károsítást okoz frakcionált besugárzás esetén, mint a DM.

5.23. A fényérzékenyítők kromatin kapcsolatának vizsgálata

Az előző kísérletekben a hiszton fehérjék intenzitásain kívül a zöld csatornában is megvizsgáltuk a különbségeket, amely a fotoérzékenyítők tulajdonságainak meghatározásában volt hasznos. A kísérleti körülmények az előző ábrán leírtakkal megegyezőek voltak.





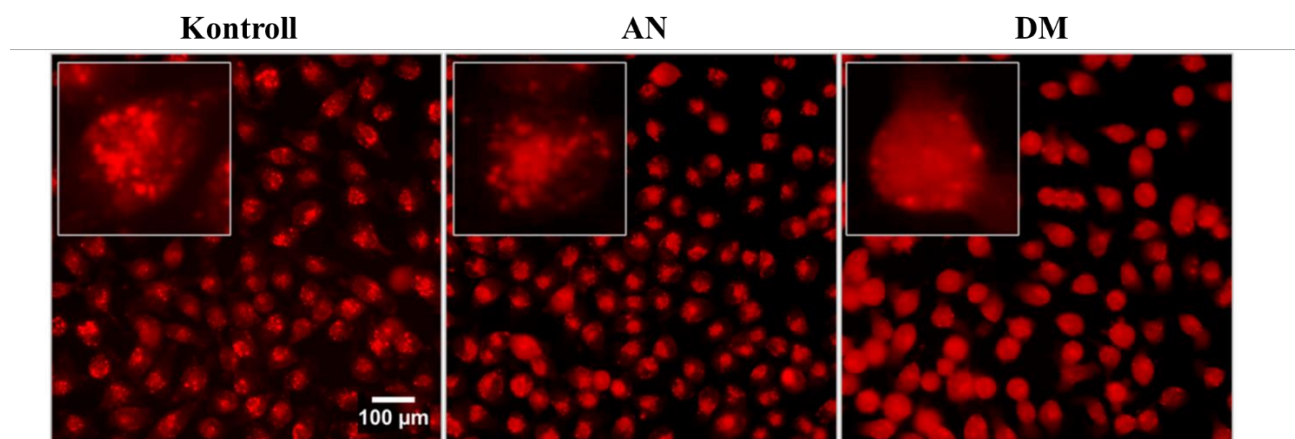
Az 5.23. ábra felső részén az AN, alsó részén a DM zöld csatornában mért intenzitásait láthatjuk emelkedő NaCl koncentrációk függvényében. Piros vonallal itt is a megvilágítatlan területeket ábrázoltuk, míg fekete vonallal a „beégetett” területeket ábrázoltuk.

Az AN ebben az esetben is magasabb intenzitásokat mutatott, mely igazolja, mint fluorofór az AN jobb fluoreszcens paramétereit. Mindkét esetben a megvilágított területeken magasabbak voltak a jelek a bevilágítatlan területekhez képest. Az AN-nál láthatunk bizonyos fokú intenzitás csökkenést magasabb sókoncentrációk felé. DM esetén a zöld intenzitás a NaCl koncentrációjának emelése ellenére is közel azonos marad a fotoérzékenyítő intenzitása. A bevilágított intenzitások magasabbak voltak és ez a festékek a kromatinhoz való kovalens rögzítődését jelentheti, amit a fotooxidáció vált ki.

5.24. A festékek hatása a lizoszómák integritására

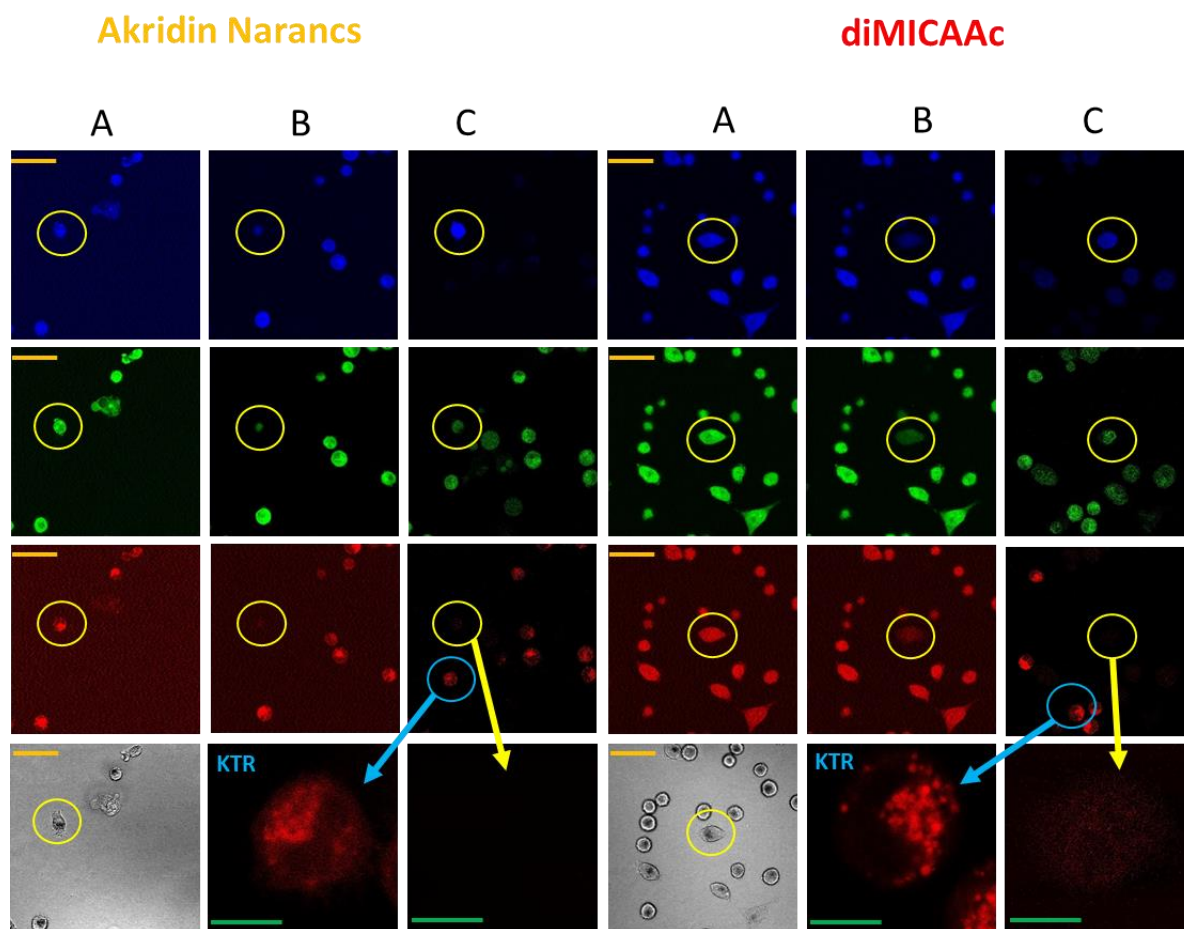
Kíváncsiak voltunk rá, hogy amit a sejtek finomstruktúráinak vizsgálatokor láttunk a mintázatokban, azok a vezikulák valóban lizoszómák-e, ezért egy ismert lizoszómában akkumulálódó markert, a „Lysotracker Orange” festéket, használtunk az AN és DM

kezeléseket követően HeLa sejteken.



Az 5.24. ábrán láthatjuk „LysoTracker Orange” festés után a HeLa sejteket, melyek megvilágításnak voltak kitéve kezeletlen kontroll, illetve AN és DM kezelést követően. 15 perc inkubációt követően készültek a képek 543 nm-es gerjesztést követően.

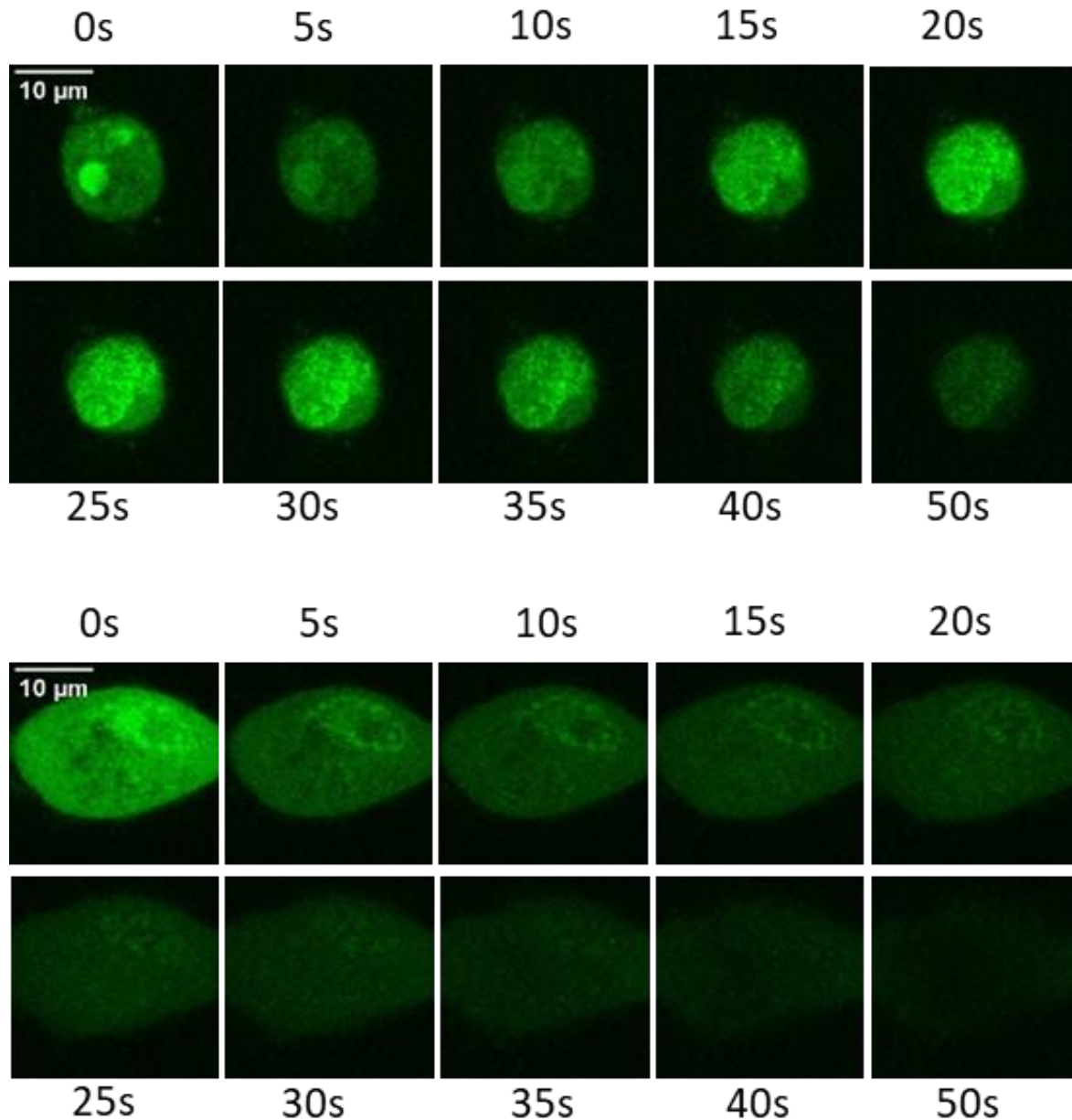
A képeken jól látszik, hogy a „LysoTracker Orange” valóban megjelölte a lizoszómákat kontroll esetben, míg a fényérzékenyítők jelentősen csökkentették a megjelölhető foltszerűen festődő lizoszómák mennyiségét. AN esetében nagyobb számú lizoszóma maradt, mint a DM esetében, a fényérzékenyítő kezeléseket követően. A további kísérletekben kiválasztottunk egy sejtet, melyet hosszabban megvilágítva kíváncsiak voltunk, hogy mi történik a lizoszómákkal. A következő ábrán ennek az eredményét mutatjuk be.



Az 5. 25. ábrán HeLa sejtek láthatóak, melyek AN és DM kezelést kaptak. Három emissziós és egy transzmissziós csatornán készítettünk képeket a sejtekről. Sárga körrel emeltük ki az általunk kiválasztott és megvilágított sejtet. Kék körrel jelölve látható egy kontroll sejt, amelyet nem világítottunk meg. A narancssárga vonal 50 μm , míg a zöld vonal 10 μm méretet jelent. „A” oszlop jelenti a fotoérzékenyítővel kezelt és megvilágítás előtti, „B” oszlop jelenti a megvilágítás utáni, míg „C” oszlop jelenti a megvilágítás utáni és „LysoTracker Orange” jelölt eseteket.

A képekből megállapítható, hogy a megvilágított sejtek fluoreszcencia intenzitása egyértelműen csökken. A megvilágítást követően, csak a megvilágított sejtek intenzitása csökken, a környező sejteké nem. A megvilágítás után a „LysoTracker Orange” nem tudja megjelölni a lizoszómákat, mivel az AN és a DM előzőleg már bejutott a sejtekbe és a megvilágítást követően károsították a lizoszóma membránját. A kontroll képeken jól látható, hogy a nem megvilágított sejtekben a „LysoTracker Orange” szépen jelöli a membránjában

nem károsodott kis vezikulaszerű lizoszómákat. A kísérlet következő részében egy sejtről készítettünk 1000 képet, mely képekből 20 fps-el videót készítettünk. A videó adott idő intervallumában a képekről montázst készítettünk, amelyet a következő ábrán szemléltetünk:



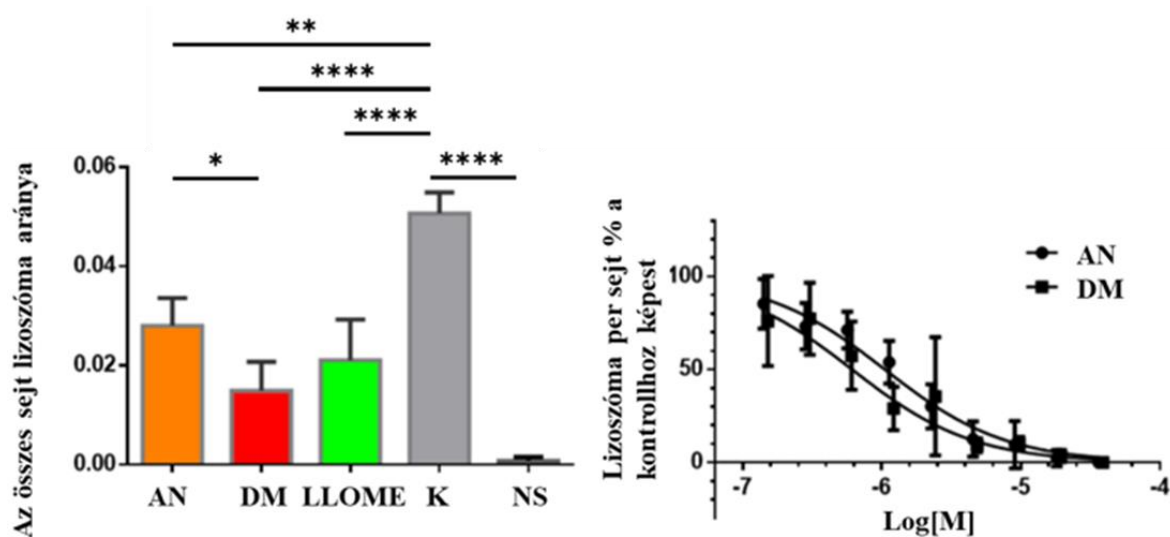
Az 5.26 ábra felső részén az akridin narancssal kezelt sejtről láthatjuk a képeket, míg az ábra alsó részén a diMICAAC-al kezelt sejtről láthatjuk a képeket adott idő pillanatban 50 s megvilágítás során.

Megfigyelhetjük a képeken, hogy az akridin narancs esetében a megvilágítás során először csökken az intenzitás, majd újra felerősödik, végül az 50s végére teljesen kiég a

festékünk. Ezt a felerősödést a videóban kis tűzijátékszerű felvillanások okozták. A diMICAAC-nál ez a jelenség sokkal kisebb mértékben jelenik meg, szinte észrevétlen. A kísérlet következő fázisában szeretnénk volna kvantitatívan meghatározni a lizoszómák arányát.

5.25. Lizoszóma károsodás kvantitatív meghatározása

A kísérlet során hígítási sort készítettünk. HeLa sejteket kezeltünk AN-al és DM-al. Bevilágítást követően LysoOrange-al jelöltük a sejteket. Ezt követően felvételeket készítettünk a sejtekről Olympus IX71 fluoreszcens mikroszkóppal. A képek kiértékelése után pedig oszlopdiagrammon ábráztuk a lizoszómák sejtenkénti mennyiségét.



Az 5.27. ábrán a lizoszómák kvantitatív meghatározásának eredménye látható

A bal oldali ábrán azt a moláris koncentrációt ábráztuk, ahol a legnagyobb különbséget láttuk az AN és a DM között (1×10^{-6} M). Megállapítható, hogy a fotoérzékenyítők végkoncentrációinak emelésével mind AN, mind DM esetében csökkent a sejtekben a lizoszómák mennyisége a kontrollhoz képest. A lizoszóma károsító LLOME pozitív kontrol esetén szintén csökkent lizoszómális aktivitás észlelhető. Sejtek nélkül, csak médium esetben egyáltalán nem sikerült lizoszómális jelet detektálni. Hasonló moláris koncentráció esetében a DM nagyobb fokú lizoszóma károsodást okozott mint, az AN.

6. Megbeszélés

Új, többfunkciós amino-izocianoakridineket (ICAAc, monoMICAAC és diMICAAC) állítottunk elő 3,6-diaminoakridin és diklórkarbén reakciójával. Az így kapott fluorofórok a molekulák dipólusos természetének ($\Delta\mu = 5,6-8,9$ Debye között változik) köszönhetően hangolható szolvatokróm viselkedést mutattak ($\Delta\lambda_{em} = 53-63$ nm). Az elektronelvonó izonitrilcsoport alkalmazása csökkent bázicitást ($pK_a=7,05-7,58$) eredményezett, ami az egyedi pH-érzékeny vibrációs abszorpciós sávokkal együtt ígéretes pH-szondákká teszi a vegyületeket fiziológias pH-tartományban. Továbbá, az izocianocsoport kiváló ligandja az Ag(I)-vel való komplexképzésnek, így a festékeink optikai viselkedése is javítható, ionokkal akár finomhangolhatóvá válnak. Az ICAAc, a monoMICAAC és a diMICAAC festékek élő sejtek képalkotására való alkalmazhatóságát HeLa sejteken mutattuk ki 2.5×10^{-6} M és $1,25 \times 10^{-6}$ M végkoncentrációban. A DM-al kezelt sejtek mutatták a legjobban megőrzött morfológiát. A kísérletek első fázisában, az általunk készített képekből azt a következtetést lehet levonni, hogy a DM kötődik a sejtmembránhoz, be tud jutni különböző intracelluláris vezikuláris struktúrákba, a DNS-hez és RNS-hez kis mértékben kötődik. Mindhárom vegyület jól alkalmazható hagyományos epifluoreszcens képalkotásra UV gerjesztés mellett is. Továbbá, violakék gerjesztés mellett a DM kiválóan alkalmazható a sejtek pH szondájaként epifluoreszcens és a lézer megvilágítás esetén, mint például az áramlás- és képalkotó citometriai, vagy a konfokális lézeres pásztázó vizsgálatokban.

A kísérletekből láthattuk, hogy a 3 vegyület közül a DM tűnt a legígéretesebb vegyületnek, így a kísérletek további fázisában ezt a fluorofórt hasonlítottuk össze egy, a szakirodalomban már rendkívül pontosan karakterizált anyaggal, az AN-al. Annak tisztázása érdekében, hogy ez az egyszerű kémiai módosítás, amelyet már bemutattunk, hogyan változtatta meg a sejtes alkalmazásokban felhasználható DM fluoreszcencia tulajdonságait, összehasonlítottuk a festékek fényelnyelési és fluoreszcencia fényemissziós spektrumát vizes közegben (PBS pH 7,4) HeLa sejtek hiányában és jelenlétében. Sejtek nélkül a DM szélesebb és viszonylag lapos abszorpciós spektrummal rendelkezik a 400-500 nm-es gerjesztési tartományban, míg az AN éles és kétszer olyan magas gerjesztési maximummal rendelkezik, közel a 488 nm-es lézervonalhoz. A sejtek jelenléte nem változtatta meg a festékek abszorpciós spektrumát; a sejtek fényszórása azonban jelentősen csillapította a gerjesztő fény intenzitását. Figyelemre méltó, hogy amikor a sejteket 480 nm-en gerjesztettük, az AN körülbelül hússzor nagyobb fluoreszcencia-emissziós maximumot mutatott 530 nm körül, mint a DM. Ehhez a

csúcshoz képest a DM emissziós maximuma mintegy 40 nm-rel vörös felé tolódott. A sejtek jelenléte nem változtatta meg jelentősen a festékek emissziós spektrumát. A toxicitási kísérletekből meghatároztuk, hogy az LD₅₀ toxicitási érték humán HeLa sejtekben mindkét festék esetében 4 µM volt körülbelül 10%-os különbséggel ($4,4 \times 10^{-6}$ M az AN és $4,0 \times 10^{-6}$ M a DM esetén, 95%-os konfidencia szinten az AN $3,4 \times 10^{-6}$ M és $5,8 \times 10^{-6}$ M, a DM: $3,3 \times 10^{-6}$ M és $4,8 \times 10^{-6}$ M közötti értéket mutatott). Ez alapján kijelenthető, hogy toxicitásban nincs nagy különbség van a két vegyület között, ezért a DM továbbra is alkalmas lehet PDT terápiás eljárásban.

Az AN ismert fotoérzékenyítő tulajdonsággal rendelkezik; ezért kíváncsiak voltunk, hogy ez a tulajdonság megváltozik-e a DM-ben. A fényérzékenyítővel kezelt HeLa sejteket 470 nm-es LED-fénnyel világítottuk meg, a festékek abszorpciós maximumához közeli hullámhosszon, növekvő ideig (0, 1, 3, 8 és 24 óra). Ezt követően MTT-tesztel vizsgáltuk a sejtek életképességét. A 2,5 µM DM-mel vagy AN-al kezelt sejtek fele elpusztult a folyamatos fényexpozíció 42, illetve 76 percéig, tehát a DM hamarabb indította el a HeLa sejtek pusztulását, mint az AN. A kék fény megvilágítás LD₅₀ fluenciája szignifikánsan különbözött a két fényérzékenyítő esetében: $11,3 \text{ J/cm}^2$ a DM és $22,2 \text{ J/cm}^2$ az AN esetében. A 95%-os konfidencia szintek a DM esetében 9,7 és $12,5 \text{ J/cm}^2$, az AN esetében pedig 18,3 és $22,0 \text{ J/cm}^2$ voltak. Ezek alapján kijelenthető, hogy a DM fototoxikusabb, mint az AN folyamatos kék fényben történő kék LED megvilágítás esetén.

Ismeretes, hogy az AN megfelelő lizoszómális pH szonda vörös fluoreszcens emisszióval, zöld fény gerjesztésével [106]. Következésképpen az új vegyület optikai tulajdonságaira voltunk kíváncsiak. Több mikroszkópos vizsgálatot végeztünk, és arra a következtetésre jutottunk, hogy a két festékanyag rövid távú jelölés esetén (15-30 perc, 37°C-on, mediumban) ugyanabban az 1-3 µM koncentráció tartományban összehasonlíthatóan jól fest humán sejteket. A konfokális vizsgálatok azt mutatták, hogy a sejtek nem mutatják a toxicitás morfológiai jeleit ezekben a rövid távú alkalmazásokban (3-4 óra fiziológias körülmények között). A DM azonban a HeLa sejtek citoplazmájában a 405 nm-es lézert fény gerjesztésénél és a kék fluoreszcencia emissziós tartományban jobban láthatóvá tette a lizoszóma típusú vezikulákat, mint az AN 543 nm-es gerjesztésénél és a vörös emissziós tartományban, továbbá a DM, szemmel megítélve, kicsit kisebb vezikuláris struktúrákat azonosított, az AN-hez képest.

A 488 nm-es gerjesztésnél és zöld fluoreszcencia emissziós tartományban az AN sokkal

hatékonyabban festett és fényesebb fluoreszcenciát mutatott, mint a DM. Ezen a 488 nm-es hullámhosszon mindkét festék a legjobban az élő sejtek nukleoluszait, valószínűleg a riboszomális RNS-t festette meg. Érdekes módon az AN-al ellentétben a DM nem különböztette meg a nukleáris DNS-t a sejtek egyéb citoplazmatikus régióitól. Az AN folyamatosan erősödő módon festette a DNS-t, ami valószínűleg párhuzamba állítható azzal, hogy a megvilágító fény egyre inkább stresszeli a sejteket, egyre nagyobb fototoxicitást okozva a sejtnek. Ez a differenciált DNS-festés valószínűleg az AN nagyobb fluoreszcencia-kvantumhatékonyágában és a DM kisebb mértékű DNS kötődésében gyökerezik. Magasabb festék koncentrációkat alkalmazva sem az AN, sem a DM nem tudta megkülönböztetni sem a lizoszómákat, sem a nukleoluszokat, mivel mindkét festék minden komponenst hasonló mértékben festett meg.

Két további humán és egy egér sejtvonallal (SK-BR-3, OCM-1, NIH-3T3-G185) végeztünk konfokális spektrális képalkotást, hogy megnézzük, más szöveti és faji eredetű sejtek is megfestődnek-e, és hogy ugyanolyan vagy eltérő festődési mintázatot mutatnak-e, mint a humán HeLa sejtek. A spektrális képalkotás alátámasztotta, hogy minden humán és egér sejt típus hasonló spektrális mintázattal festődött, és a festődés nem függött alapvetően a sejtek eredetétől. A sejtek festődésének általános intenzitása azonban nagyon eltérő volt, ami alátámasztja azt az elképzelést, hogy a festékszállításban különböző membránhordozók és transzporterek vesznek részt a két festék esetében. Az NIH-3T3-G185 egérsejtek a humán MDR1 multidrog-transzporter gén stabil transzfektánsai. A legtöbb tumor ABC transzportereket fejez ki a plazmamembránban és ezt a terápiás szer koncentrációjának kiválasztásánál figyelembe kell venni. Ezek a sejtek nagyobb intenzitást mutattak a DM-nél, ami arra utal, hogy az AN a humán ABCB1 membrántranszporter jobb szubsztrátja, mint a DM. A DM ezen tulajdonsága előnyös lehet a lizoszomális festés szempontjából és növeli a DM felhasználhatóságát az AN-nel szemben terápiás szempontból.

Az akut sejthalál eseményei, amikor a sejtmembrán integritása sérül, vizualizálhatóak; ezért úgy döntöttünk, hogy a fototoxikus folyamatok dinamikáját is nyomon követjük egy iCys lézerpasztázó citometriás képalkotó rendszer segítségével. A sejtek vizualizálása egy látómező pásztázásával történt, körülbelül 5 óra sejtfigyelést és 180 másodperc teljes lézertényező expozíciót jelentett frakcionált módon. Mivel a fluenciát a minta szintjén mértük, kényelmesen szabályozhattuk a sejteket érő megvilágítási energiát az alkalmazott ciklusok számának nyomon követésével. A sejtek elhalásakor bekövetkező membránrepedés kimutatására a

fotoszenzibilizátorokat tartalmazó közeget kiegészítettük egy membrán-impermeábilis vörös DNS-festékkel, propidium joddal. A teljes folyamat rögzítése után nagylátószögű fluoreszcens képeket készítettünk. A megfigyelési folyamat végén azonban a kép közepén lévő letapogatott és ennek következtében megvilágított sejtek a membrán integritásának elvesztése miatt elvesztették zöld fényérzékenyítő festődésüket, és a sejtmagok a DNS festékkel vörösre festődtek. A transzmissziós képeken a sejtek kontúrjai felismerhetők voltak a látómező közepén és a perifériáján egyaránt. A képek bizonyították, hogy a besugárzott fényenergia lokalizáltan és kvantitatív módon adagolható, a nem megvilágított sejtek pedig eredendően negatív kontrollt biztosítanak.

A ciklusosan készített felvételekből videofilmet készítettünk. Láthattuk a fényérzékenyítők felhalmozódását a sejtekben, ahol az AN, amelynek nagyobb a fluoreszcencia kvantumhatékonysága, mint a DM-nek, erősebben festette a sejteket. A DM kisebb kvantumhatékonysága előnyös volt a PI sejteken belüli megjelenésének jobb megkülönböztethetősége szempontjából. Kezdetben a sejtek többsége élő volt, és csak nagyon kevés elhalt sejt festődött vörösre. Először az edény aljához rögzített sejtek elvesztik membránkapcsolataikat, pszeudopódiumaikat és mikrovillusaikat. Ezután a sejtek zsugorodnak, membrántöredékeket veszítenek el és folyamatosan erősödő membrán lefűzödések, hólyagosodás alakul ki. Kezdetben a hólyagok kisebb méretben nagyobb számmal voltak jelen, majd számuk egyre csökkent és egyre nagyobb méretűek lettek. Végül néhány lefűzödés sejtméretűvé növekedett, és hirtelen a membránstruktúrák többsége visszahúzódott a sejtmagok felszínére, és csak nagyon kevés hólyag maradt stabilan. A hólyagok kezdetben átlátszóak, majd zöldes színűek voltak. Hirtelen a zöldes lefűzödések vöröses színűvé váltak, miközben a sejtmagok és a citoplazma is színt váltott. Az egysejt szintű változások szinkronban, kis időbeli szórással alakultak ki; következésképpen a fotoérzékenyítők megvilágítás hatására sejtváltozásokat indítottak be.

A fototoxicitás kinetikájának meghatározására végzett kísérletek azt mutatják, hogy az AN fototoxicitás kinetikája gyorsabb frakcionált 488 nm-es lézer megvilágításban. Ismert, hogy fiziológiai körülmények között a kromatin a sejtmagban marad, kivéve, ha valamilyen okból kifolyólag a sejtmagmembrán károsodik, és a nukleáris DNS olyan méretűre fragmentálódik, hogy szabadon kioldódhat a sejtmagból. Nyilvánvaló volt, hogy a nagy makromolekulák a sejtmagban maradnak, mivel végül a teljes képsorozatban belül a vörös magmaradványok a halott sejtekben festődtek a legnagyobb intenzitással. Ennek ellenére

hatalmas mennyiségű PI-dal festődő vörös tartományban emittáló DNS távozott a sejtekből, valószínűleg kisebb méretű fragmentumokra szétesett módon, amikor is a DNS-fragmentumok át tudtak hatolni a fény által károsított fenesztrált sejtmag- és citoplazmamembránokon. A sejtekből elveszett DNS-t fluoreszcens képek segítségével kívántuk számszerűsíteni. Volt azonban egy akadály, ami ezt a célt nem tette lehetővé. A PI nem festi jól az élő sejtek intakt sejtmagjait, még akkor sem, ha a membrán inpermeábilis PI-ot direkt módon a citoplazmába juttatjuk, mivel a sérülésmentes sejtmagban a DNS szorosan feltekeredett kromatin formában található. Hasonlóképpen ez lehet az oka annak, hogy az AN nem fest jól DNS-t élő sejtekben. Az ép DNS-nek lazává kell válnia, hogy a festékek szabadon behatolhassanak, ami vagy egy “letekerő” vegyület alkalmazásával, vagy egy bizonyos számú DNS-szál hasítás összegyűjtésével oldható meg [105]. Az egysejtes kinetika képkockáiban a zöld-piros színváltás azt sugallta, hogy a fotokárosodott DNS a sejtmagból felszabadul, melyet a membránt-át-nem-járó DNS-festékekkel, a PI-al láthatóvá lehet tenni, akkor, ha a sejtmembrán is átjárhatóvá válik a PI számára a fotokárosodás miatt. Ezért a képek relatív festéktartalmát a zöld és a vörös szín intenzitása alapján kvantifikáltuk. A képek azt mutatták, hogy a DNS-festés a magokban egyre intenzívebbé vált. Ez azt bizonyította, hogy az AN és a DM elvesztése és a PI általi DNS-festés, időben egyértelműen követték egymást és ezek csak kisebb átfedést mutattak. Az is érdekes, hogy az AN által kiváltott változások megelőzték a DM által kiváltott változásokat.

A sejteket minden ciklusban $0,9 \text{ J/cm}^2$ -es fluenciával világítottuk meg egy ciklus $2,9$ másodperces pásztázása alatt. A DM esetében 28 , míg az AN esetében 24 ciklusra volt szükség a sejtpusztuláshoz, és ezek az expozíciós ciklusszámok $26,3 \text{ J/cm}^2$, illetve $22,5 \text{ J/cm}^2$ fluenciának feleltek meg. Ez a megfigyelés ellentétben volt a LED-es megvilágítás eredményével, ahol a DM halálosabb volt a sejtek számára. Az LSC-lézeres és a LED-es megvilágítás közötti különbség a 488 és 470 nm -es gerjesztések különbözőségén kívül a frakcionált kontra folyamatos megvilágítás volt. Minden besugárzási periódus után az LSC esetében a sejteket a ciklikus 488 nm -es lézeres megvilágítások között körülbelül öt percig sötétben maradtak. Ez lehetővé tette, hogy a sejtek minden egyes besugárzási ciklus után bizonyos szintig regenerálódjanak. A két vegyület ölé hatásának megfordulása a frakcionált és a folyamatos megvilágítás között arra utal, hogy a vegyületek elsődleges sejt-célpontjai eltérőek.

Kiértékeljük a pixelintenzitások térbeli és időbeli mintázatát a sejteken belül és a sejtek

környezetében. Az AN esetén tapasztalható változások sokkal hevesebbek voltak és a zöld-vörös váltás korábban kezdődött, mint a DM esetében. A két fényérzékenyítő dinamikájának az összehasonlításában a magvörös fluoreszcencia minimális értékére beállított kék függőleges vonal segített, ami azt a mérőöldkövet jelöli, amikor a PI beáramlásakor megkezdődik a magokban a végső fényesedési periódusát. A legfényesebb PI jelek a plazmamembrán permeabilizációjával kezdődtek, ami a zöld fluoreszcencia intenzitás csökkenésének inflexiós pontjával és azzal a felfutó PI jel kezdetével esett egybe, ami a végén telítésbe menve hatalmasra nőtt, tükrözve a nukleáris DNS propidium jodiddal való elárasztását. A fluoreszcencia mennyiségi adatok elemzésével számos további izgalmas dologra is felfigyelhettünk. Először is, a zöld-piros átfedési időszak néhány ciklusnyi időt vett igénybe, amit itt percekben (időegység az abszcisszán) jeleztünk. Ez azt jelenti, hogy mind a fényérzékenyítő-vesztés, mind a PI-növekedés időben kissé késleltetve van a citoplazmán belül, bármilyen mechanizmus is felelős ezért. Ez a késleltetés nem lehet fényszórás vagy késleltetett fluoreszcencia jelenség, mivel a fényszórás a femtoszekundum töredékein belül, a fluoreszcencia pedig nanoszekundumokon belül befejeződik. Nem lehet egyszerű festékdifúzió miatti késleltetés, mivel a koncentráció különbségek másodperceken belül kiegyenlítődnének ezeken a sejteken belüli távolságokon. Ezért a legvalószínűbb magyarázat az, hogy ezek az események az akut DNS- és membránkárosodással küzdő haldokló sejtek életjel maradványainak részben aktív kiegyenlítő lépéseit tükrözik. Ezek az egyensúlyra vezető lépések lehetnek pl. a fényérzékenyítők citoplazmatikus vagy membránfehérjékhez való kötődése vagy a festékek transzmembrán transzportja vezikulákba, illetve az azokba való bezártságból való kiszabadulás. Másodszor, az AN kinetika a hevesebb és masszívabb PI-változások miatt erőteljesebb DNS-károsodásra utal. A PI-görbék érintői és amplitúdói is robusztusabb változásokat mutatnak az AN esetében, mint a DM esetében. A fluoreszcencia-változások mértéke valójában nem hasonlítható össze a DNS-tartalom tekintetében, mivel az AN és a DM kvantumhatásfokai jelentősen különböznek egymástól. (5.20. ábra) Az AN esetében az összes nukleáris, lizoszomális és membrán lefűződésben megfigyelhető vörös jel gyorsan telítődik, ellentétben a DM-el, ahol csak a nukleáris jel tetőzik. A sejtek környezetében megjelenő vörös háttérjelek még pontosabban jelzik az AN szenzibilizált sejtekből származó DNS-fragmentumok nagyobb mértékű általános felszabadulását, melyek a DM görbéknél nagyobb amplitúdóval rendelkeznek. Harmadszor, mindkét fényérzékenyítő esetén kapott PI kinetikai görbékből felismerhető a DNS lökéshullámszerű hirtelen felszabadulása.

Az intakt sejtekben eleinte nincsen nukleáris PI jel, a hólyagok viszont a PI erős DNS-

jelével átmenetileg megtelnek. Ez arra utal, hogy a fény és a fényérzékenyítők akut DNS-károsodást okoznak a magban, és a kissebbé és lazábbá váló DNS-fragmentumok szétfundálnak és fényes PI-jelét eredményeznek a citoplazmában is. Később ez a telített intra-membrán lefűződés DNS-jel szinte a háttérjelek szintjére csökken, ami világossá teszi a DNS-hullám átmeneti jellegét mind térben, mind időben. Megfigyelhető a háttérjelek távolságfüggése is, amely a távolabbi helyeken csökkenő, lépcsőzetes amplitúdókat mutat.

Korábbi publikációkban eddig nem láttunk a DNS-fragmentumok sejtekből történő felszabadulásának ilyen valós idejű megfigyelését. A sejtekből történő DNS-felszabadulás történhet DNS-károsodás vagy pl. apoptotikus körülmények hatására, vagy akár lokálisan is pl. kaszpáz aktiváció esetén [107]. Az általunk használthoz hasonló kísérleti elrendezések jó modelljei lehetnek a DNS-felszabadulás mechanizmusának a meghatározására fotokárosítás vagy ehhez szorosan kapcsolódó más természetes körülmény esetén is. A sejtmagi hirtelen DNS-károsodást, amely a DNS-fragmentumok extracelluláris felszabadulásához és a környezetbe történő szétterjedéséhez vezet, a Pierzynska-Mach és munkatársai által megfigyelt jelenség még tovább fokozhatja. Azt figyelték meg ugyanis, hogy az AN telt savas lizoszómák a programozott sejthalál során a magmembránnak a mélyen a sejtmagba merülő betüremkedéseibe vándorolnak be [106].

Kíváncsiak voltunk, mi történik a hisztonfehérjékkel a fénykárosodás során, amikor a DNS eltűnik a sejtmagból. Nemrégiben Prof. Dr. Szabó Gábor és munkacsoportja kifejlesztett egy metodikát, a QUINESIn-t, amely végső soron a genomiális DNS szuperhelicitását jellemzi a hisztonok és a DNS magi mennyiségének képi mérése révén egyedi sejtekben [105]. Ezekből a mérésekből tudtuk, hogy magas sótartalmú kezeléssel vagy megfelelő interkalátor festékek alkalmazásával a hiszton H2A fehérjék más hisztonokhoz képest könnyebben ürülnek ki a sejtmagból. A módszert kis módosítással alkalmazni tudtuk a fotodinamias hatás vizsgálatára.

Röviden, a kísérlet elején a sejteket fényérzékenyítővel festettük meg és az egysejtes gélelektroforézishez hasonlóan agarózgélbe ágyasztuk be egy IBIDI tárgylemezen. Ezután a sejteket a gélben meghatározott dózisu kék lézerrel világítottuk meg fiziologiás körülményeket fenntartva, az iCys képkalkoló rendszer segítségével. Ezt követően a sejtmembránokat neutrális pH mellett lizáltuk az agarózban, majd növekvő koncentrációjú NaCl-oldatok alkalmazásával a hisztonokat a kromatinból kieluáltuk. Végül a sejtmagokban maradt hisztonokat fluoreszcensen jelölt antitestekkel festettük meg és az IBIDI-kamrában lévő sejteket lézerpásztázó citometriával vizualizáltuk és számszerűsítettük. A különböző IBIDI-kamrákban

növekvő koncentrációjú NaCl-oldatokat használtunk a hisztonok arányos eltávolítására. A technika normál kromatinban szigmoidális hiszton kilökődési görbéket eredményezett. Amikor a sejteket megvilágítottuk, megfigyeltük, hogy a só által kiváltott hisztonkiürülés standard szigmoid alakja megváltozott.

A mért változások azt jelezték, hogy a kromatinhoz való hiszton-keresztükötés, a DNS-fragmentáció, a DNS elvesztése a sejtmagokból és a sejtmagok későbbi hisztonvesztése mind az AN, mind a DM érzékenyített fotodinamikus kezelés során bekövetkezett, bár eltérő szinten. Először is, a DNS-interkaláló AN által végzett hisztonkilökődés kifejezettebb volt, mint a DM esetén. Másodszor, az AN esetében a jelentősebb hisztonvesztés a DNS súlyosabb fragmentálódásának és az azt követő DNS-vesztésnek, a DNS-interkaláló festékek általi hisztonkilökődésnek és az ugyanezen festék által a fehérjék DNS-hez történő keresztükötésének együttes hatása volt. Harmadszor, a DM jobban keresztükötötte a H2A-t a DNS-hez és kevésbé fragmentálta a DNS-t, mint az AN. Továbbá a sejtciklusban nem volt fázisszelektív felhalmozódása a fotoszenzibilizátoroknak. Összefoglalva a QUINESIn-kísérletekből levont következtetéseket, a frakcionált megvilágításban az AN jelentősebben károsította a kromatint, mint a DM.

Ismeretes, hogy az AN az élő lizoszómákban is felhalmozódik, és nagy koncentrációban a dimerképződés miatt vörös fluoreszcenciát mutat. Kék megvilágításban az AN a lizoszómákat is károsítja, és az már kevésbé ismert, hogy ez egy különlegesen látványos tüzijátékszerű villogási jelenséggel társul. Kíváncsiak voltunk, hogy a DM által megjelölt és 405 nm-es gerjesztéssel fluoreszcenciát mutató vezikulák lizoszómák-e, és hogy a DM fotokezelés károsítja-e a lizoszómákat, mint az AN.

Kísérletet állítottunk össze az AN, a DM és a “LysoTracker Orange” egyidejű vizualizálására, miközben ugyanazt a térbeli és időbeli megvilágítást alkalmaztuk. Eredményeink azt mutatták, hogy mind az AN, mind a DM megfestette a lizoszómákat, és mindkét festék fotokárosodást okozott. A kontrollált besugárzás alkalmazása előtt mindhárom fluorofór hasonló vezikuláris struktúrákat tett láthatóvá a sejteken belül. A lokalizált megvilágítás után az AN és a DM festékek fluoreszcenciája eltűnt a sejtekben, és a “LysoTracker Orange” nem tudta láthatóvá tenni a lizoszómákat az AN vagy DM jelölt sejteken belül sem. A nem megvilágított, de fotoérzékenyítőket tartalmazó sejtekben lévő lizoszómák azonban megfestődtek LysoOrange-ral, ami azt jelentette, hogy a lizoszómák fény nélkül épek maradtak. Ugyanakkor a fény mind az AN, mind a DM esetében lizoszómakárosodást okozott.

A látványos felvillanások, amelyek a lizoszómák károsodását jelezték az AN-festett sejtek megvilágítása során, a DM-festett sejteknél is megfigyelhetőek voltak. Bár a DM festett sejtekben a jelenség kevésbé volt látványos, mivel a festék kvantumhatásfoka jóval alacsonyabb. A DM kezelt sejtek esetén látható fotobleaching-görbén felismerhető volt egy észrevehető púp. (5.26. ábra) Ez az enyhe emelkedés hasonló az AN fotobleaching-görbéjének nagy púpjához, amely a metakromatikus-lizoszómából felszabaduló fluorofórok dequenchingjének a következménye.

Ennél a módszernél a fotodestrukció kezdetének ideje fordítottan arányos a membrán érzékenységgel. A fotodestrukció időzítésének mérése alkalmassá teszi ezt a technikát a lizoszómák peroxidációval szembeni stabilitásának sejtbiológiai vizsgálatára [108, 109]. A módszert eddig nem ellenőrizték más festékekkel. Mivel a mi módosított DM molekulánk hasonló lizoszóma pusztulást mutatott, ez alátámasztja az AN hatásának értelmezését és megerősíti a módszer alkalmazhatóságát. Ezek alapján kijelenthető, hogy mind az AN, mind a DM festékek fénymegvilágítás által kiváltott lizoszóma-permeabilizációt okoztak.

Annak igazolására, hogy a DM a lizoszómák fotokárosodását is okozza, a károsodás mértékét koncentrációfüggő módon kívántuk számszerűsíteni. Ezután a sejteket kék fényrel folyamatosan megvilágítottuk egy hagyományos lemezes leolvasási kísérletben. Ezután a sejteket “LysoTracker Orange” festékkel festettük, és a lizoszómák fluoreszcencia-intenzitását újra felvettük. A mikrotálca leolvasó eredményei nem voltak meggyőzőek, de az LSC rendszerünk színes kamerájával epifluoreszcens mikroszkópos felvételeket készítettünk a mintákról (a lyukakban), és a felvételeket sejtenkénti képelemzéssel értékeltük ki. A lizoszómák a festékkoncentrációval korrelálva lizálódtak, de a sejtek épek maradtak. Ez lehetett az oka a hagyományos mikrotálca leolvasó eredmények sikertelenségének. Az egysejtes szinten kiértékelt wellek egyszerű képei azonban helyesen azonosították a lizoszómák károsodási állapotát. A fényérzékenyítővel nem festett sejtek a “LysoTracker Orange” által megfestett pontszerű lizoszómákat tartalmaztak alacsony citoplazmatikus háttérrel. Amikor fotoérzékenyítővel történő megvilágítást alkalmaztunk, a pontszerű lizoszómák száma csökkent, míg a citoplazmatikus háttér fluoreszcencia nőtt a fotoérzékenyítő koncentráció növekedésének köszönhetően. Az LLOMe, a lizoszóma membránbontás pozitív kontrollja hasonló egysejtes képeket adott, mint az AN vagy a DM. Az egyes sejtek átlagos lizoszóma tartalmát a “LysoTracker Orange” festett sejtek fluoreszcencia képeit alkalmazva értékeltük ki. A kezelt sejtekben a lizoszómák átlagos fluoreszcencia-intenzitása jelentősen

alacsonyabb volt, mint a kontroll sejteké. Ezután illesztettük a lizoszóma-inaktiváció dózisválaszát az egyes sejtekben, ami azt mutatta, hogy a DM kifejezettebb lizoszóma-károsodást okoz. E paraméter alapján kiszámítottuk az AN félhatékony dózist, amely $1,1 \mu\text{M}$ volt, míg a DM esetében $0,6 \mu\text{M}$. Az LD_{50} értékek átlagának 95%-os konfidenciaintervalluma $0,9 \mu\text{M}$ és $1,3 \mu\text{M}$, illetve $0,5 \mu\text{M}$ és $0,7 \mu\text{M}$ volt az AN és a DM esetében. A görbeillesztés statisztikailag szignifikáns különbséget mutatott ($p=0,0003$). További képalkotási paramétereket is megvizsgáltunk, mint például a sejtek átlagos intenzitását, a sejtek fluoreszcencia-intenzitásának standard eltérését, a sejtek képeinek entrópiáját és energiáját, amelyek mind ugyanazt a tendenciát jelezték.

Ezek az adatok arra utaltak, hogy a DM jobban károsította a lizoszómákat, mint az AN. Így az akridingyűrűben aszimmetrikusan lokalizált poláris izocianocsoport növelheti a DM lizoszomális célzott hatását. Valószínűleg a kifelé irányuló negatív töltés növelte a lizoszómákhoz való kötődési képességet. Az is figyelemre méltó, hogy a folyamatos megvilágítás a frakcionált megvilágításhoz képest eltolta a sejt-károsodás mértékét. A folyamatos besugárzás növelte a lizoszóma-bontás tendenciáját, míg a frakcionálásban a DNS-károsodás dominált. Ezek a tendenciák arra utalnak, hogy a lizoszomális membránjavító mechanizmusok nagyobb kapacitással rendelkezhetnek, mint a DNS-károsodás javítási mechanizmusainak. Ennek az elképzelésnek a bizonyítása további kísérleteket igényel.

7. Összefoglalás

A három újonnan szintetizált akridinvázis vegyület közül a DM tűnt a legígéretesebb sejtjelölő és fotoérzékenyítő anyagnak, mivel egyrészt ez rendelkezett a legoptimálisabb optikai tulajdonságokkal, másrészt ez őrizte meg legnagyobb mértékben a sejtek morfológiáját és volt a legkevésbé toxikus fény hiányában. Az AN és a DM összehasonlításánál kijelenthető, hogy mindkét vegyület abszorpciós maximuma 488 nm-nél van. Az emissziós spektrumokat összehasonlítva a DM szélesebb emissziós spektrummal rendelkezik. Az emissziós maximumot tekintve a DM esetében van egy 30 nm-es jobbra tolódás az AN-hoz képest.

Az élő sejtekben a DM 405 nm-es lézerefény gerjesztésénél intenzív zöld fluoreszcenciával jelzi a lizoszómákat, kisebb háttérfluoreszcenciával, mint az AN. A DM optimális gerjesztési és fluoreszcencia emissziós tartományában nincsen kimutatható DNS- vagy RNS-jel, de a sejtek citoplazmatikus jelölődése és a megtartott morfológiája hatékony sejtjelölővé teszi.

A 470 nm-es folyamatos LED-lámpás megvilágítás esetén a DM nagyobb fototoxicitással rendelkezett, mint az AN, míg 488 nm-es frakcionált lézer megvilágítás esetén a fototoxicitási tendencia megfordult; fénybesugárzás nélkül azonban nem volt jelentős különbség a két vegyület toxicitásában.

A 488 nm-es lézerefény-megvilágítás sejtszintű és molekuláris hatásait kvantitatívan összehasonlítva az AN hatékonyabb DNS-károsítónak bizonyult, valószínűleg az AN szimmetricitása miatt lehet hatékonyabb DNS károsító, mivel nagyobb lehet a DNS kötődése. A 488 nm-es frakcionált besugárzás esetén az AN hamarabb okozott sejthalált, amit előbb a sejtmembrán lefűződéses képződése, majd a fotofragmentált magi DNS lökéshullám-szerű kiáramlása jelzett. A DM ugyanakkor a HeLa sejtek lizoszóma membránjának a fotopermabilizálásában mutatott nagyobb hatékonyságot. A folytonos és a frakcionált fotodinamias sejtpusztulás közötti különbség és a háttérben rejlő sejtes mechanizmusok adatai arra utalnak, hogy a HeLa sejtekben a lizoszómakárosodás javítása nagyobb kapacitással rendelkezhet, mint a DNS-károsodás javítása.

A PDT aspektusában a munkánk azt mutatja, hogy a DM specifikusabban jelzi a lizoszómákat, valószínűleg a kifelé mutató negatív töltése miatt juthat be jobban a lizoszómákba és mutathat nagyobb lizoszóma károsító hatást, míg az AN jobban beépül a nukleinsavakba és 488 nm körül erősebb DNS fotofragmentáló tulajdonságú. Az AN lizoszóma-célzás növelésével a lizoszómák fotodestrukcója felerősíthető, ami fotodinamias hatásában fokozott immunogén sejthalál indukciót okozhat. A munkánkban kapott PDT mechanizmus módosítási stratégiát érdemes lehet követni, mert ez fokozhatja a tumorterápiák hatékonyságát.

8. Summary

Of the three newly synthesized acridine-based compounds, DM appeared to be the most promising cell marker and photosensitizer, as it had the most optimal optical properties, preserved cell morphology to the greatest extent, and was the lowest toxic in the absence of light. When comparing AN and DM, it can be stated that the absorption maximum of both compounds is 488 nm. Comparing the emission spectra, DM has a broader emission spectrum. In terms of emission maximum, there is a shift of 30 nm to the right for DM compared to AN.

DM labels lysosomes with intense green fluorescence when excited by 405 nm laser light in living cells, with more negligible background fluorescence than AN. No DNA or RNA signal is detectable in DM's optimal excitation and fluorescence emission range, but the cytoplasmic labeling of cells and its retained morphology make it an efficient cell tracer.

Under continuous LED illumination at 470 nm, DM was more phototoxic than AN, whereas under fractional laser illumination at 488 nm, the phototoxicity trend was reversed; however, without light irradiation, there was no significant difference in toxicity between the two compounds.

Quantitatively comparing the cellular and molecular effects of 488 nm laser light illumination, AN was found to be a more efficient DNA damaging agent, probably due to AN's symmetry, which may be a more efficient DNA damaging agent as it may have a higher DNA binding. In the case of fractionated irradiation at 488 nm, AN caused cell death sooner, as indicated first by the formation of cell membrane blebbing and then by the shock wave-like efflux of photo-fragmented nuclear DNA. DM, however, showed greater efficiency in photo-permeabilizing the lysosomal membrane of HeLa cells. The difference between continuous and fractionated photodynamic cell death and the underlying cellular mechanisms data suggest that repair of lysosome damage in HeLa cells may have a greater capacity than repair of DNA damage.

In the aspect of PDT, our work showed that DM is more specific in lysosomes labeling, probably due to its outward negative charge, which may penetrate better into lysosomes and show more significant lysosome damaging effects. At the same time, AN is more incorporated into nucleic acids and has more substantial DNA photo-fragmentation properties around 488 nm. By increasing the lysosome targeting of AN, the photo destruction of lysosomes can be enhanced, resulting in enhanced immunogenic cell death induction in its photodynamic effect. The PDT mechanism modification strategy obtained in our work may be worth pursuing as it may enhance the efficacy of tumor therapies.

9. Irodalomjegyzék

1. Rosenberg, S.A., *A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens*. Immunity, 1999. **10**(3): p. 281-7.
2. Ahmed, A. and S.W.G. Tait, *Targeting immunogenic cell death in cancer*. 2020. **14**(12): p. 2994-3006.
3. Krysko, D.V., et al., *Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(12): p. 860-75.
4. Rajnavölgyi, E. and A. Lányi, *Role of CD4+ T lymphocytes in antitumor immunity*. Adv Cancer Res, 2003. **87**: p. 195-249.
5. Tan, Y., et al., *Pyroptosis: a new paradigm of cell death for fighting against cancer*. 2021. **40**(1): p. 153.
6. Fucikova, J. and O. Kepp, *Detection of immunogenic cell death and its relevance for cancer therapy*. 2020. **11**(11): p. 1013.
7. Galluzzi, L., et al., *Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018*. Cell Death Differ, 2018. **25**(3): p. 486-541.
8. Byvaltsev, V.A., et al., *Acridine Orange: A Review of Novel Applications for Surgical Cancer Imaging and Therapy*. Front Oncol, 2019. **9**: p. 925.
9. Kroemer, G., et al., *Immunogenic cell death in cancer therapy*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 51-72.
10. Zhou, J. and G. Wang, *Immunogenic cell death in cancer therapy: Present and emerging inducers*. 2019. **23**(8): p. 4854-4865.
11. Kasikova, L., et al.
12. Allison, R.R., H.C. Mota, and C.H. Sibata, *Clinical PD/PDT in North America: An historical review*. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2004. **1**(4): p. 263-77.
13. Sharman, W.M., C.M. Allen, and J.E. van Lier, *Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications*. Drug Discov Today, 1999. **4**(11): p. 507-517.
14. Josefsen, L.B. and R.W. Boyle, *Unique diagnostic and therapeutic roles of porphyrins and phthalocyanines in photodynamic therapy, imaging and theranostics*. Theranostics, 2012. **2**(9): p. 916-66.
15. Kessel, D. and N.L. Oleinick, *Cell Death Pathways Associated with Photodynamic Therapy: An Update*. Photochem Photobiol, 2018. **94**(2): p. 213-218.
16. Debele, T.A., S. Peng, and H.C. Tsai, *Drug Carrier for Photodynamic Cancer Therapy*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(9): p. 22094-136.
17. Bonnett, R. and M. Berenbaum, *Porphyrins as photosensitizers*. Ciba Found Symp, 1989. **146**: p. 40-53; discussion 53-9.
18. Castano, A.P., T.N. Demidova, and M.R. Hamblin, *Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death*. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2005. **2**(1): p. 1-23.
19. Ma, J. and L. Jiang, *Photogeneration of singlet oxygen (1O_2) and free radicals (Sen^{*-} , O_2^{*-}) by tetra-brominated hypocrellin B derivative*. Free Radic Res, 2001. **35**(6): p. 767-77.
20. Staicu, A., et al., *Studies about phthalocyanine photosensitizers to be used in photodynamic therapy* Romanian Reports in Physics,, 2013. **65**(3): p. 1032–1051.
21. Agarwal, M.L., et al., *Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y*

- mouse lymphoma cells*. *Cancer Res*, 1991. **51**(21): p. 5993-6.
22. Liu, X., et al., *Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c*. *Cell*, 1996. **86**(1): p. 147-57.
 23. Kim, H.R., et al., *Enhanced apoptotic response to photodynamic therapy after bcl-2 transfection*. *Cancer Res*, 1999. **59**(14): p. 3429-32.
 24. Luo, Y. and D. Kessel, *Initiation of apoptosis versus necrosis by photodynamic therapy with chloroaluminum phthalocyanine*. *Photochem Photobiol*, 1997. **66**(4): p. 479-83.
 25. Yin, Z., C. Pascual, and D.J. Klionsky, *Autophagy: machinery and regulation*. *Microb Cell*, 2016. **3**(12): p. 588-596.
 26. Kessel, D. and J.J. Reiners, Jr., *Apoptosis and autophagy after mitochondrial or endoplasmic reticulum photodamage*. *Photochem Photobiol*, 2007. **83**(5): p. 1024-8.
 27. Kessel, D.H., M. Price, and J.J. Reiners, Jr., *ATG7 deficiency suppresses apoptosis and cell death induced by lysosomal photodamage*. *Autophagy*, 2012. **8**(9): p. 1333-41.
 28. Reiners, J.J., Jr., et al., *Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy*. *Autophagy*, 2010. **6**(1): p. 7-18.
 29. Xue, L.Y., et al., *Protection by Bcl-2 against apoptotic but not autophagic cell death after photodynamic therapy*. *Autophagy*, 2008. **4**(1): p. 125-7.
 30. Sperandio, S., et al., *Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix*. *Cell Death Differ*, 2004. **11**(10): p. 1066-75.
 31. Yoon, M.J., et al., *Release of Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum and its subsequent influx into mitochondria trigger celastrol-induced paraptosis in cancer cells*. *Oncotarget*, 2014. **5**(16): p. 6816-31.
 32. Macdonald, I.J. and T.J. Dougherty, *Basic principles of photodynamic therapy*. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2001. **5**(2): p. 105-129.
 33. Sternberg, E., D. Dolphin, and C. Brückner, *Porphyrin-based Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy*. *Tetrahedron*, 1998. **54**: p. 4152-4202.
 34. Silva, J.N., et al., *Photodynamic therapies: principles and present medical applications*. *Biomed Mater Eng*, 2006. **16**(4 Suppl): p. S147-54.
 35. Dougherty, T.J., et al., *Photodynamic Therapy*. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 1998. **90**(12): p. 889-905.
 36. Bonneau S and V.-B. C, *Tetrapyrrole photosensitisers, determinants of subcellular localisation and mechanisms of photodynamic processes in therapeutic approaches* *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2008. **18**: p. 1011-1025.
 37. Hudson, R., et al., *The development and characterisation of porphyrin isothiocyanate-monoclonal antibody conjugates for photoimmunotherapy*. *Br J Cancer*, 2005. **92**(8): p. 1442-9.
 38. Malatesti, N., et al., *Synthesis and in vitro investigation of cationic 5,15-diphenyl porphyrin-monoclonal antibody conjugates as targeted photodynamic sensitizers*. *Int J Oncol*, 2006. **28**(6): p. 1561-9.
 39. Josefsen, L.B. and R.W. Boyle, *Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers*. *Met Based Drugs*, 2008. **2008**: p. 276109.
 40. Nyman, E.S. and P.H. Hynninen, *Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy*. *J Photochem Photobiol B*, 2004. **73**(1-2): p. 1-28.
 41. Detty, M.R., S.L. Gibson, and S.J. Wagner, *Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy*. *J Med Chem*, 2004. **47**(16): p. 3897-915.

42. Aveline, B.M., T. Hasan, and R.W. Redmond, *The effects of aggregation, protein binding and cellular incorporation on the photophysical properties of benzoporphyrin derivative monoacid ring A (BPDMA)*. J Photochem Photobiol B, 1995. **30**(2-3): p. 161-9.
43. Morgan, A.R., et al., *New sensitizers for photodynamic therapy: controlled synthesis of purpurins and their effect on normal tissue*. J Med Chem, 1989. **32**(4): p. 904-8.
44. Kubler, A.C., et al., *Photodynamic therapy of primary nonmelanomatous skin tumours of the head and neck*. Lasers Surg Med, 1999. **25**(1): p. 60-8.
45. Ball, D.J., et al., *The characterisation of three substituted zinc phthalocyanines of differing charge for use in photodynamic therapy. A comparative study of their aggregation and photosensitising ability in relation to mTHPC and polyhaematoporphyrin*. J Photochem Photobiol B, 1998. **45**(1): p. 28-35.
46. Ali, H. and J.E. van Lier, *Metal complexes as photo- and radiosensitizers*. Chem Rev, 1999. **99**(9): p. 2379-450.
47. Woodburn, K.W., et al., *Photodynamic therapy of B16F10 murine melanoma with lutetium texaphyrin*. J Invest Dermatol, 1998. **110**(5): p. 746-51.
48. Szeimies, R.M., et al., *9-Acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(beta-methoxyethyl)-porphycene (ATMPn), a novel photosensitizer for photodynamic therapy: uptake kinetics and intracellular localization*. J Photochem Photobiol B, 1996. **34**(1): p. 67-72.
49. Ochsner, M., *Light scattering of human skin: a comparison between zinc (II)-phthalocyanine and photofrin II*. J Photochem Photobiol B, 1996. **32**(1-2): p. 3-9.
50. Zharkova, N.N., et al., *Fluorescence observations of patients in the course of photodynamic therapy of cancer with the photosensitizer PHOTOLENS*. International Symposium on Biomedical Optics Europe '94. Vol. 2325. 1995: SPIE.
51. Shopova, M., et al., *Hydrophobic Zn(II)-naphthalocyanines as photodynamic therapy agents for Lewis lung carcinoma*. J Photochem Photobiol B, 1994. **23**(1): p. 35-42.
52. Brasseur, N., et al., *Photodynamic activities and skin photosensitivity of the bis(dimethylhexylsiloxy)silicon 2,3-naphthalocyanine in mice*. Photochem Photobiol, 1995. **62**(6): p. 1058-65.
53. Brunner, H., H. Obermeier, and R.M. Szeimies, *Platin(II)-Komplexe mit Porphyrinliganden: Synthese und Synergismen bei der photodynamischen Tumorthherapie*. Chemische Berichte, 1995. **128**(2): p. 173-181.
54. Mantareva, V., et al., *Photodynamic activity of water-soluble phthalocyanine zinc(II) complexes against pathogenic microorganisms*. Bioorg Med Chem, 2007. **15**(14): p. 4829-35.
55. Ding, L., et al., *Anti-human immunodeficiency virus effects of cationic metalloporphyrin-ellipticine complexes*. Biochem Pharmacol, 1992. **44**(8): p. 1675-9.
56. Ding, L., G. Etemad-Moghadam, and B. Meunier, *Oxidative cleavage of DNA mediated by hybrid metalloporphyrin-ellipticine molecules and functionalized metalloporphyrin precursors*. Biochemistry, 1990. **29**(34): p. 7868-75.
57. Cauchon, N., et al., *Photodynamic activity of substituted zinc trisulfophthalocyanines: role of plasma membrane damage*. Photochem Photobiol, 2006. **82**(6): p. 1712-20.
58. Dozzo, P., et al., *Synthesis, characterization, and plasma lipoprotein association of a nucleus-targeted boronated porphyrin*. J Med Chem, 2005. **48**(2): p. 357-9.
59. Cincotta, L., et al., *Benzophenothiazine and benzoporphyrin derivative combination phototherapy effectively eradicates large murine sarcomas*. Photochem Photobiol, 1996. **63**(2): p. 229-37.
60. Villanueva, A., et al., *A new protocol in photodynamic therapy: enhanced tumour cell death by*

- combining two different photosensitizers*. Photochem Photobiol Sci, 2010. **9**(3): p. 295-7.
61. Acedo, P., et al., *Two combined photosensitizers: a goal for more effective photodynamic therapy of cancer*. Cell Death Dis, 2014. **5**(3): p. e1122.
 62. Georgakoudi, I. and T.H. Foster, *Effects of the subcellular redistribution of two Nile blue derivatives on photodynamic oxygen consumption*. Photochem Photobiol, 1998. **68**(1): p. 115-22.
 63. Saggiu, S., et al., *Lysosomal signaling enhances mitochondria-mediated photodynamic therapy in A431 cancer cells: role of iron*. Photochem Photobiol, 2012. **88**(2): p. 461-8.
 64. Wainwright, M., *Acridine-a neglected antibacterial chromophore*. J Antimicrob Chemother, 2001. **47**(1): p. 1-13.
 65. W.A., D., et al., *Antitumour Acridines*. In: Neidle S., Waring M.J. (eds) *Molecular Aspects of Anti-Cancer Drug Action. Topics in Molecular and Structural Biology*. https://doi.org/10.1007/978-1-349-06010-8_1, 1983. **Palgrave, London**.
 66. Gniazdowski, M., *Szmigiero*. Gen Pharmacol, 1995. **3**.
 67. Gniazdowski, M. and L. Szmigiero, *Nitracrine and its congeners--an overview*. Gen Pharmacol, 1995. **26**(3): p. 473-81.
 68. S., H. and K.V. K., *Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, 2005 (Vallabh Prakashan, Delhi): p. 364-365, 473-475.
 69. <http://en.wikipedia.org/wiki/Acriflavine>. 2005-08-16.
 70. Takemura, Y., et al., *Studies on the inhibitory effects of some acridone alkaloids on Epstein-Barr virus activation*. Planta Med, 1995. **61**(4): p. 366-8.
 71. Tomar, V., et al., *Synthesis of new chalcone derivatives containing acridinyl moiety with potential antimalarial activity*. Eur J Med Chem, 2010. **45**(2): p. 745-51.
 72. Sondhi, S.M., et al., *Synthesis, anti-inflammatory and anticancer activity evaluation of some novel acridine derivatives*. Eur J Med Chem, 2010. **45**(2): p. 555-63.
 73. Chandra, T., et al., *Synthesis of substituted acridinyl pyrazoline derivatives and their evaluation for anti-inflammatory activity*. Eur J Med Chem, 2010. **45**(5): p. 1772-6.
 74. Kumar, A., et al., *Synthesis of 9-anilinoacridine triazines as new class of hybrid antimalarial agents*. Bioorg Med Chem Lett, 2009. **19**(24): p. 6996-9.
 75. Patel, M.M., M.D. Mali, and S.K. Patel, *Bernthsen synthesis, antimicrobial activities and cytotoxicity of acridine derivatives*. Bioorg Med Chem Lett, 2010. **20**(21): p. 6324-6.
 76. Chen, C.H., et al., *Synthesis and in vitro cytotoxicity of 9-anilinoacridines bearing N-mustard residue on both anilino and acridine rings*. Eur J Med Chem, 2009. **44**(7): p. 3056-9.
 77. Opegard, L.M., et al., *Novel acridine-based compounds that exhibit an anti-pancreatic cancer activity are catalytic inhibitors of human topoisomerase II*. Eur J Pharmacol, 2009. **602**(2-3): p. 223-9.
 78. Azim, M.K., et al., *Identification of acridinyl hydrazides as potent aspartic protease inhibitors*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2008. **18**(9): p. 3011-3015.
 79. Giorgio, C., et al., *Synthesis and antileishmanial activity of 6-mono-substituted and 3,6-disubstituted acridines obtained by acylation of proflavine*. European journal of medicinal chemistry, 2007. **42**: p. 1277-84.
 80. Goodell, J.R., et al., *Synthesis and evaluation of acridine- and acridone-based anti-herpes agents with topoisomerase activity*. Bioorg Med Chem, 2006. **14**(16): p. 5467-80.
 81. Cassileth, P.A. and R.P. Gale, *Amsacrine: a review*. Leuk Res, 1986. **10**(11): p. 1257-65.

82. Denny, W.A. and E.D.E.V. Wilman), *The Chemistry of Antitumour Agents*. Blackie&Co., London, 1990. **1**.
83. Lerman, L.S., *Structural considerations in the interaction of DNA and acridines*. J Mol Biol, 1961. **3**: p. 18-30.
84. Waring, M.J., *DNA-binding characteristics of acridinylmethanesulphonanilide drugs: comparison with antitumour properties*. Eur J Cancer, 1976. **12**(12): p. 995-1001.
85. Denny, W.A., *Acridine derivatives as chemotherapeutic agents*. Curr Med Chem, 2002. **9**(18): p. 1655-65.
86. Lewis, M.R. and P.P. Goland, *In vivo staining and retardation of tumors in mice by acridine compounds*. Am J Med Sci, 1948. **215**(3): p. 282-9.
87. Korgaonkar, K.S. and J.V. Sukhatankar, *ANTI-TUMOUR ACTIVITY OF THE FLUORESCENT DYE, ACRIDINE ORANGE, ON YOSHIDA SARCOMA (ASCITES)*. Br J Cancer, 1963. **17**(3): p. 471-3.
88. Zdolsek, J.M., G.M. Olsson, and U.T. Brunk, *Photooxidative damage to lysosomes of cultured macrophages by acridine orange*. Photochem Photobiol, 1990. **51**(1): p. 67-76.
89. Sastry, K.S. and M.P. Gordon, *The photodynamic inactivation of tobacco mosaic virus and its ribonucleic acid by acridine orange*. Biochim Biophys Acta, 1966. **129**(1): p. 32-41.
90. Giorgio, A., et al., *Detection of microorganisms in clinical specimens using slides prestained with acridine orange (AOS)*. Microbiologica, 1989. **12**(1): p. 97-100.
91. Rickman, L.S., et al., *Rapid diagnosis of malaria by acridine orange staining of centrifuged parasites*. Lancet, 1989. **1**(8629): p. 68-71.
92. Kapuscinski, J., Z. Darzynkiewicz, and M.R. Melamed, *Interactions of acridine orange with nucleic acids. Properties of complexes of acridine orange with single stranded ribonucleic acid*. Biochem Pharmacol, 1983. **32**(24): p. 3679-94.
93. Kusuzaki, K., et al., *Intracellular binding sites of acridine orange in living osteosarcoma cells*. Anticancer Res, 2000. **20**(2a): p. 971-5.
94. Kusuzaki, K., et al., *Photodynamic inactivation with acridine orange on a multidrug-resistant mouse osteosarcoma cell line*. Jpn J Cancer Res, 2000. **91**(4): p. 439-45.
95. Kusuzaki, K., et al., *Total tumor cell elimination with minimum damage to normal tissues in musculoskeletal sarcomas following photodynamic therapy with acridine orange*. Oncology, 2000. **59**(2): p. 174-80.
96. Zelenin, A.V., *Fluorescence microscopy of lysosomes and related structures in living cells*. Nature, 1966. **212**(5060): p. 425-6.
97. Matsubara, T., et al., *Acridine orange used for photodynamic therapy accumulates in malignant musculoskeletal tumors depending on pH gradient*. Anticancer Res, 2006. **26**(1a): p. 187-93.
98. Zagars, G.K., et al., *Prognostic factors for patients with localized soft-tissue sarcoma treated with conservation surgery and radiation therapy: an analysis of 1225 patients*. Cancer, 2003. **97**(10): p. 2530-43.
99. Duffaud, F., et al., *Recurrences following primary osteosarcoma in adolescents and adults previously treated with chemotherapy*. Eur J Cancer, 2003. **39**(14): p. 2050-7.
100. S., E.T.H., *The Chemistry of Heterocycles. Structure, Reactions, Syntheses and Applications*. . 1995: p. 354-358.
101. D.J., A., *Burgers Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. New York 2007. **1**(John Wiley and Sons): p. 890.
102. Bruce F.C., R.N.S., Graham J.A., J. Med. Chem. , 1974. **17**: p. 923.

103. R.M., A., *Introduction to the Chemistry of Heterocyclic Compounds*. Wiley Interscience, New York 2008: p. 332-335.
104. Nagy, M., et al., *Amino-isocyanoacridines: Novel, Tunable Solvatochromic Fluorophores as Physiological pH Probes*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 8250.
105. Imre, L., et al., *Nucleosome stability measured in situ by automated quantitative imaging*. 2017. **7**(1): p. 12734.
106. Pierzyńska-Mach, A., P.A. Janowski, and J.W. Dobrucki, *Evaluation of acridine orange, LysoTracker Red, and quinacrine as fluorescent probes for long-term tracking of acidic vesicles*. *Cytometry A*, 2014. **85**(8): p. 729-37.
107. Telford, W.G., A. Komoriya, and B.Z. Packard, *Detection of localized caspase activity in early apoptotic cells by laser scanning cytometry*. *Cytometry*, 2002. **47**(2): p. 81-8.
108. Zdolsek, J.M., *Acridine orange-mediated photodamage to cultured cells*. *Apmis*, 1993. **101**(2): p. 127-32.
109. Appelqvist, H., et al., *Sensitivity to lysosome-dependent cell death is directly regulated by lysosomal cholesterol content*. *PLoS One*, 2012. **7**(11): p. e50262.

10. Tárgyszavak

Tárgyszavak:

- Akridin narancs
- diMICAAC
- Fototoxicitás
- Toxicitás
- Fotodinámiás terápia
- Lézer-szkenning citometria
- Konfokális mikroszkópia
- Lizoszóma
- Sejtmag
- Propidium jodid
- LED indukált fotokinetika
- Spektrofluorimetria

Keywords:

- Acridine Orange
- diMICAAC
- Phototoxicity
- Toxicity
- Photodynamic therapy
- Laser Scanning Cytometry
- Confocal Microscopy
- Lysosome
- Nucleus
- Propidium iodide
- LED induced photokinetics
- Spectrofluorometry

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Bacsó Zsoltnak, hogy témavezetőként gyakorlati és elméleti tanácsaival 2012 óta folyamatosan támogatta és segítette fejlődésemet, előrehaladásomat, valamint doktori értekezésem elkészítését.

Szeretném megköszönni a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet vezetőjének, Prof. Dr. Panyi Györgynek, hogy lehetőséget adott arra, hogy az Intézetben dolgozhassam.

Továbbá szeretném megköszönni Prof. Dr. Szöllösi Jánosnak, hogy munkacsoportjában dolgozhattam és hasznos tanácsaival segítette doktori tézisem elkészülését és biztosította számomra a folyamatos magas színvonalú munka és szakmai fejlődés lehetőségét.

Köszönet illeti Dr. Szemán-Nagy Gábort, Tiba Attilát, Prof. Dr. Hajdu András, Prof. Dr. Vereb Györgyöt, Rebenku Istvánt, Dr. Imre Lászlót, Nagy Edinát, Nagy Cecíliát, Vágóné Toldi Hajnalkát, Vezendiné Nagy Adélt és Bagosi Adrienn, Prof. Dr. Jenei Attilát, Kormos Józsefet és Dr. Nizsalócki Enikőt a kísérletek technikai kivitelezésében nyújtott segítségükért, tanácsaikért, baráti támogatásukért.

Köszönettel tartozom az Alkalmazott Kémia Tanszék vezetőjének, Prof. Dr. Kéki Sándornak, Dr. Nagy Miklósnak, hogy megszintetizálták az általam használt vegyületeket és ezzel lehetővé tették doktori disszertációm témáját. Köszönet illeti továbbá Dr. Nagy Zsolt Lászlót, akivel együtt végeztünk számos kísérletet és munkájával nagyban hozzájárult a disszertáció létrejöttéhez.

Hálával tartozom Családomnak, Édesanyámnak, Édesapámnak, Nagymamámnak és Testvéremnek a mérhetetlen szeretetért, támogatásért és türelemért, amelyet tanulmányaim és munkám során kaptam. Az ő segítségük nélkül ez a disszertáció nem valósulhatott volna meg.

A disszertáció elkészítéséhez szükséges kísérletek elvégzését támogatta az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 az Európai Unió és az Európai Szociális Alap támogatásával.



Nyilvántartási szám: DEENK/292/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Bankó Csaba

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Bankó, C.**, Nagy, Z. L., Nagy, M., Szemán-Nagy, G., Rebenku, I., Imre, L., Tiba, A., Hajdu, A., Szöllősi, J., Kéki, S., Bacsó, Z.: Isocyanide Substitution in Acridine Orange Shifts DNA Damage-Mediated Phototoxicity to Permeabilization of the Lysosomal Membrane in Cancer Cells. *Cancers (Basel)*. 13 (22), 1-24, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers13225652>
IF: 6.639 (2020)
2. 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.
IF: 3.998

További közlemények

3. Lénárt, K., **Bankó, C.**, Ujlaki, G., Póliska, S., Kis, G., Csósz, É., Miklós, A., Bacsó, Z., Bai, P., Fésüs, L., Mádi, A.: Tissue Transglutaminase Knock-Out Preadipocytes and Beige Cells of Epididymal Fat Origin Possess Decreased Mitochondrial Functions Required for Thermogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 23 (9), 1-21, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23095175>
IF: 5.923 (2020)
4. Sággy, T., Köröskényi, K., Hegedűs, K., Antal, M., **Bankó, C.**, Bacsó, Z., Papp, A., Stienstra, R., Szondy, Z.: Loss of Transglutaminase 2 Sensitizes for Diet-Induced Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance due to Enhanced Macrophage c-Src Signaling. *Cell Death Dis.* 10, 1-14, 2019.
IF: 6.304





5. Budai, Z., Ujlaky-Nagy, L., Kis, G., Antal, M., **Bankó, C.**, Bacsó, Z., Szondy, Z., Sarang, Z.:
Macrophages engulf apoptotic and primary necrotic thymocytes through similar
phosphatidylserine-dependent mechanisms.
FEBS Open Bio. 9, 446-456, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/2211-5463.12584>
IF: 2.231
6. 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.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2018.01.012>
IF: 3.067
7. Czimmerer, Z., Dániel, B., Horváth, A., Ruckerl, D., Nagy, G., Kiss, M., Peloquin, M., Budai, M. M.,
Cuaranta-Monroy, I., Simándi, Z., Steiner, L., Nagy, B. J., Póliska, S., **Bankó, C.**, Bacsó, Z.,
Schulman, I. G., Sauer, S., Deleuze, J. F., Allen, J. E., Benkő, S., Nagy, L.: The Transcription
Factor STAT6 Mediates Direct Repression of Inflammatory Enhancers and Limits Activation
of Alternatively Polarized Macrophages.
Immunity. 48 (1), 75-90, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2017.12.010>
IF: 21.522

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 49,684

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
10,637**

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, 2022.05.31.

