

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**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

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Bankó Csaba okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt- és Immunbiológia doktori iskolája  
keretében

Témavezető: Dr. Bacsó Zsolt, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus  
tagok: Prof. Dr. Matkó János, az MTA doktora  
Prof. Dr. Bay Péter, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Élettudományi Központ 5306  
2019. 12.16.

Az értekezés bírálói:

Dr. Szebeni Gábor János, PhD  
Dr. Lányi Árpád, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Erdődi Ferenc, az MTA doktora  
tagok: Dr. Szebeni Gábor János, PhD  
Dr. Lányi Árpád, PhD  
Prof. Dr. Matkó János, az MTA doktora  
Dr. Rauch Tibor, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Élettudományi Központ F003-  
004-es tanterem

2022. szeptember 02. 13:00

## 1. Bevezetés

### 1.1 A fotodinámiás terápia előtérbe kerülése

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 kórokozókkal szemben felvonultatott védekező folyamatai a szervezet saját előregedett, 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. 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. A legtöbb bevett kemoterápiás szer DNS-károsító módon hat, ami a tumorsejtek apoptotikus pusztulásához vezet. A kanonikus apoptózis a normál szöveti regenerálódás, ezáltal a fiziológias 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. A daganatsejtek ellen kialakuló hatékony immunválasz sok hasonlóságot mutat a vírussal fertőzött sejtek által kiváltott sejt immunválasszal, amennyiben mind a vírus-, mind pedig a tumorelles immunválasz leghatékonyabb végrehajtó/effektor sejtjei a természetes ölüsejtek (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. Ezek a szigorúan szabályozott folyamatok indulnak be a kóros állapotok ellen, ami végeredményben a sejtek pusztulásához vezetnek. Ezt a sejtpusztulási módot nevezzük immunogén sejthalálnak. Az immunogén sejthalál feltétele a plazmamembrán permeabilizációja és néhány intracelluláris

károsodással kapcsolatos molekula (DAM) felszabadulása. Az ATP, az endoplazmatikus retikulum fehérjeje a kalretikulin, a HMGB1, a DNS-kötő nukleáris fehérje, illetve a sejtek RNS-e és DNS-e tipikus DAM-ok.

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. 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 fénnel megvilágítva, a megvilágított területeken, különböző direkt és indirekt hatásoknak köszönhetően a sejtek elpusztulnak.

## **1.2 A PDT mechanizmusa és molekuláris háttere**

A PDT egy olyan nem invazív terápiás eljárás, amely hatással lehet daganatokra, baktériumokra, vírusokra és mikrobákra egyaránt. A terápia során három dolog játszik kulcsszerepet a hatás kiváltásában: egy fotoérzékenyítő anyag, a fény és az O<sub>2</sub>. A sejtek felveszik a fotoérzékenyítő anyagot, mely fény hiányában ártalmatlan mind az egészséges, mind a malignus sejtekre nézve is. Azonban, mikor egy adott hullámhosszúságú fénnel megvilágítjuk és a fotoérzékenyítő anyag elnyel egy fotont, a stabil alap állapotból egy rövid életű gerjesztett állapotba kerül. Innen rövid idő alatt belső konverzióval (IC) az első gerjesztett állapot alsó vibrációs szintjére kerül hőleadás révén. Az alapállapotba való visszatérésre több opció lehetséges, amelyek a környezettől vagy a molekulától függően különböző valószínűséggel következhetnek be. Amikor a fotoérzékenyítőt megvilágítottuk a megfelelő hullámhosszúságú fénnel és bekövetkezett a gerjesztett állapot, a T1-es állapotból két biológiai kimenetel lehetséges. Az I-es típusú reakciónál a gerjesztett molekula reakcióba lép egy szubsztráttal és reaktív gyökök keletkeznek pl. (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, OH), amelyek reakcióba léphetnek fehérjékkel, (triptofán, tirozin, hisztidin, cisztein) lipidekkel, (telítetlen foszfolipidek és koleszterol) és nukleobázisokkal (guanin). Szénhidrátokkal nem lép kölcsönhatásba.

A II-es típusú reakció esetén a fotoérzékenyítő anyag energiát ad át az oxigénnek és triplétt állapotú oxigénből gerjesztett szingulett állapotú oxigén keletkezik. Ezt követően a reaktív gyökök vagy a szingulett állapotú O<sub>2</sub> 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 célorganelium ellen használunk. Az általánosan ismert programozott sejthalálon (apoptózis) és a hirtelen sejtelhaláson (nekrózis) kívül szerepe van az autofágiának és a paraptózisnak is.

### **1.3 A fotoérzékenyítők és a PDT generációi**

Legelterjedtebb fotoérzékenyítők közé tartoznak a porfin vázas vegyületek. A PDT során alkalmazott fotoérzékenyítőknek azonban, több típusát különböztetjük meg. Ezeket az altípusokat különböző generációkra osztjuk. Az első generációs fotoérzékenyítőket a 20. század elején használták sikeresen először. A második 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 második generációban szélesedtek a fotoérzékenyítők spektruma. Klinikailag használatban maradtak a porfirinek, azonban bevezették a chlorint, texapirint, porficéneket, purpurinokat és a phtalocianinokat. A harmadik generációs fotoérzékenyítőknél a kutatások arra fókuszálnak, hogy a gyenge oldékonyságú első és második 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 lehessen 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 farmakodinámiás ismeretekkel pedig lehetőség nyílt a kis molekulájú terápiás alkalmazásra.

## 1.4 Az akridin vázas vegyületek széleskörű biológiai funkciója és fotodinámiás terápiás hatása

Az akridin vázas vegyületek számos biológiai aktivitással rendelkeznek, kiváló pH indikátorok, antimaláriás és daganatellenes hatással is rendelkeznek. Baktériumok és paraziták azonosítására is használják, emellett apoptózis és sperma mozgékonyág vizsgálatára is alkalmasak. Az egyik legjobban karakterizált vegyület az akridin narancs (AN), melyet először kőszénkátrányból vonták ki gyenge bázikus festékként, több mint 100 évvel ezelőtt. Az AN-ot több éve használják fotoérzékenyítőként is, ugyanis hatása megegyezik a legelterjedtebb fotoérzékenyítővel, a porfin vázas vegyületekkel. Ezért fontos szerepet tölt be a PDT terápia során. Az AN-nak alacsony a molekulatömege, gyorsan, akár néhány másodperc alatt képes bediffundálni a citoplazmából a sejtmagba, ahol a DNS-hez és RNS-hez kötődik, de egyaránt hasonló gyorsasággal képes bejutni a lizoszómákba és egyéb savas vezikulákba is. Az AN képes zöld fluoreszcens jel kibocsátására, kék fény excitációt követően, lehetővé téve a tumorok makroszkópikus vizsgálatát. AN-ot nem csak in vitro körülmények között tesztelték sikeresen, hanem voltak sikeres klinikai alkalmazásai is. Az akridin vázas vegyületek szintézisét követően különböző funkciós csoport cserével különböző tulajdonságú vegyületek hozhatóak létre, melyek fokozhatják a fotodinámiás hatást. Az „intelligensebb” fluoreszcens festék előállításának egyik lehetséges megoldása lehet az AN egyik dimetil-amino-csoportjának cseréje egy multifunkcionális elektronelvonó csoporttal, például izocianiddal. Az izonitrilek sokoldalú kémiájának ellenére az izocianoakridinek területe mindeddig teljesen felderítetlen maradt. Az izocianocsoport beépítésének számos előnye van: az AN pKa 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-izocianoacridin (ICAAc) nyerhető a proflavin diklórkarbénnel történő kezelésével, amelynek eredményeként az egyik aminocsoport izonitrillé alakul át. Az Alkalmazott Kémia Tanszéken három új vegyületet szintetizáltak:

1. *3-amino-6-izocianoakridin (ICAAc)*,
2. *3-N-metilamino-6- izocianoakridin (monoMICAAC)*
3. *3-N,Ndimetilamin-6-izocianoakridin (diMICAAC)*

A diMICAAC-ban (DM) egy poláris izocianát funkciós csoport van, amely az AN-ban lévő apoláris dimetilaminocsoportot helyettesíti. A DM poláris szegmensének negatív töltésű vége kifelé orientált. Az izocianát funkciós csoporttal rendelkező vegyületek bizonyítottan fiziológias sejtkörülmények között a lizoszómák pH-szondáiként is használhatóak.

## 2. 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 organellekbe 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.

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1 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 % CO<sub>2</sub> 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.

#### 3.2 ICAAc, monoMICAAC és diMICAAC fluoreszcens tulajdonságainak összehasonlítása lézer szkennig citométerrel (LSC-vel)

A kísérletek első fázisában HeLa sejteket tenyésztettünk 8 lyukú IBIDI (Ibidi, Martinsried, Németország) kamrában. A sejtszám 30.000 sejt/cm<sup>2</sup>. Először arra voltunk kíváncsiak, hogy a három vegyületet felveszik-e a sejtek. 1,25 × 10<sup>-6</sup> M és 2,5 × 10<sup>-6</sup> M végkoncentrációkban adtunk ICAAc-ot, monoMICAAC-ot és diMICAAC-ot a sejtekhez. A sejtekhez hozzáadtunk 7,5 × 10<sup>-6</sup> M végkoncentrációban propidium jodidot. Lézer-szkennig citométerrel mind a 1,25 × 10<sup>-6</sup> M és 2,5 × 10<sup>-6</sup> 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<sup>-6</sup> M koncentrációban akut és egy órás inkubáció után, ismételt felvettünk képeket a sejtekről. Kvantitatív meghatározás esetén 1,25 × 10<sup>-6</sup> M koncentrációban adtunk vegyületeket a sejtekhez. Szintén 8 lyukú IBIDI-ben tenyésztettünk HeLa sejteket 30.000 sejt/cm<sup>2</sup> 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  $\mu\text{m}$ . A 488 nm-es excitációt követően 40x (0,75 NA) objektívet használtunk a méréshez. A jeleket 530 $\pm$ 15 nm-es emissziós szűrővel detektáltuk. A sejtek finom struktúráinak vizsgálatához szintén HeLa sejteket tenyésztettünk 8 lyukú IBIDI-ben 30.000 sejt/cm<sup>2</sup> 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.

### 3.3 Toxicitás meghatározása

A toxicitás meghatározást HeLa sejteken végeztük. AN esetében a kiindulási moláris koncentráció 3,62  $\times 10^{-5}$  M, DM esetében 3,88  $\times 10^{-5}$  M volt, melyeket ezután 10 különböző felező koncentrációban hígítottunk. Mindkét esetben a kezelési idő 24 óra volt. Az inkubációs idő elteltével MTT-t (SigmaAldrich, 0,5 mg/ml PBS-ben oldva) adtunk a sejtekhez. Minden lyukba 100  $\mu\text{l}$  MTT oldat került. Ekkor az inkubációs idő 2 óra volt 37 °C-on 5 % CO<sub>2</sub> jelenlétében sejtenyészti inkubátorban. A formazán kristályokat lyukanként 200  $\mu\text{l}$  DMSO-val oldottuk fel. A DMSO inkubációs ideje fél óra volt szintén 37 °C-on 5 % CO<sub>2</sub> jelenlétében sejtenyészti inkubátorban. Amikor feloldódtak a kristályok Synergy HT automata ELISA Plate Readerrel abszorbanciát mértünk 490 és 620 nm-en. Az abszorbancia értékeket a (kezelt sejtek abszorbanciája - kontroll sejtek abszorbanciája)  $\times 100$  képlettel határoztuk meg. 0.5 fölötti értékek az élő sejtekre, míg 0.5 alatti értékek halott sejtekre volt jellemző.

### 3.4 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 moláris koncentráció AN és 2,43  $\times 10^{-6}$  M moláris koncentrációjú DM oldatot használtunk. A kísérlet során az előbb leírt koncentrációban adtuk az oldatokat a HeLa sejtekhez. A HeLa sejtek száma 1 millió/ml volt. Sejtes esetben meghatároztuk mind a gerjesztési, mind az emissziós spektrumot. Ugyanilyen beállításokkal felvettük a spektrumokat sejt nélküli esetben is és megnéztük, hogy van-e különbség a két mérési eredmény között.

### **3.5 Emissziós spektrumok meghatározása Zeiss LSM 880 konfokális mikroszkóppal**

A kísérlet előtt 24 órával kitettük a sejteket 8 lyukú IBIDI lemezre. A sejtszám 30,000 db sejt/lyuk 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 16 bites képeket készítettünk a sejtekről, 4 csatornában vettük fel a képeket, fénymikroszkópos megvilágítással, 405 nm, 488 nm és 543 nm-es gerjesztéssel. A master feszültség az első csatornában (488 nm): 830, a második csatornában (transzmissziós kép): 672, a harmadik csatornában (405nm): 850 és a negyedik csatornában (543 nm): 850. 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 405nm-es csatornában 31  $\mu\text{m}$ , míg az 543nm-es csatornában szintén 42  $\mu\text{m}$  volt. A következő filtereket használtuk: 499-695 nm, 410-474nm, 554-629nm. A lézer intenzitások 0,02 % volt 488nm, 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 median filter 2,0 szűrőt és emeltük a kontrasztot és a fényerőt 60 %-al.

### **3.6 Lizozómális aktivitás meghatározása Zeiss LSM 880-al „Lysotracker Orange-al”**

HeLa sejteket tenyésztettünk 3db 8 lyukú IBIDI tenyésztő lemezen 12 órával a mérés előtt. A sejtszám 30,000 sejt/lyuk volt minden edényben.  $2,26 \times 10^{-6}$  M moláris koncentrációjú AN és  $2,43 \times 10^{-6}$  M moláris koncentrációjú DM oldatokkal kezeltük a sejteket. Az inkubációs idő 1 óra volt sejttenyésztő inkubátorban 5 %  $\text{CO}_2$  37 °C-on. Pozitív kontroll esetében a sejteket 30 percig kezeltük „Lysotracker Orange-al” (ab176827, CytoPainter, LysoOrange Indikátor Reagens, abcam) hasonló körülmények között. 20  $\mu\text{l}$  „Lysotracker Orange-ot” tettünk 10 ml RPMI médiumba és ebből 300  $\mu\text{l}$ -t tettünk a lyukakba majd 30 perc után képeket készítettünk a sejtekről. A gerjesztő lézer 543 nm volt. Az AN-al és a DM-al kezelt sejtek esetében az 1 óra inkubációt követően kiválasztottunk egy sejtet és képet készítettünk róla. Ez volt a megvilágítás előtti kép. Ezután ugyanerről a sejtről 1000 képet készítettünk (50s) és videót készítettünk a képekből, mely 20 frame/sec 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  $\mu\text{l}$  médiumban hígított „Lysotracker Orange-ot”. Nagyon fontos lépés volt, hogy mind a leszívást, mind a folyadék hozzáadását kellő körültekintéssel kellett végeznünk, mert nem volt szabad, hogy a sejt elmozduljon. Ezt követően 15 perc inkubálás

következett 37 °C-on. A 15 perc inkubációt követően egy képet készítettünk, melyen a megvilágított sejt és a körülötte lévő sejtek is látszódtak. Ez az állapot tükrözte a megvilágítás után a lizoszómális aktivitást a megvilágított sejtben és környezetében egyaránt. Ezt a folyamatot mind AN, mind DM kezelést követően megismételtük. Az excitáció 405nm, 488nm és 543 nm volt. A digitális „gain” 1,0 volt és a digitális „offset” 0,00 volt minden csatornában. Az emissziós filterek a következők voltak: 499-695 nm, 410-474 nm, 554-629 nm. A lézer intenzitás 0,02 % volt a 488nm, 1,8 % volt a 405 nm és 1,5 % volt az 543 nm-es gerjesztés esetén.

### **3.7 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 sejtet.  $2,26 \times 10^{-6}$  M moláris koncentrációjú AN és  $2,43 \times 10^{-6}$  M moláris koncentrációjú DM oldatokkal kezeltük a sejteket. A megvilágítási idők 0 óra, 1 óra, 3 óra, 8 óra 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 CO<sub>2</sub> szint mellett. A lámpa magassága 10 cm volt a 96 lyukú lemeztől mérve. A megvilágítási átmérő 6 cm volt. A kezeléseket kontrolljaként 1 %-os DMSO oldatot használtunk. A megvilágítási idők után MTT mérési eljárással határoztuk meg a sejtelétképességeket. Minden lyukba 100 µl MTT (Sigma Aldrich 0,5 mg/ml koncentráció PBS-ben oldva) oldat került. Ekkor az inkubációs idő 2 óra volt 37 °C-on 5 % CO<sub>2</sub> jelenlétében sejttenyésztő inkubátorban. A formazán kristályokat lyukanként 200 µl DMSO-val oldottuk fel. A DMSO-ban való feloldás inkubációs ideje fél óra volt szintén 37 °C-on 5 % CO<sub>2</sub> jelenlétében a sejttenyésztő inkubátorban. Amikor feloldódtak a kristályok Synergy HT automata ELISA Plate Readerrel abszorbanciát mértünk 490 és 620 nm-en. Az abszorbancia értékeket (a kezelt sejtek abszorbanciája – kontroll sejtek abszorbanciája)  $\times 100$  képlettel határoztuk meg. 0,5 fölötti értékek az élő sejtekre, míg 0,5 alatti értékek halott sejtekre volt jellemző.

### **3.8 Sejtelétképesség meghatározás lézer szkennig citométerrel**

HeLA sejteket 24 órával a kísérletek előtt tettük ki 8 lyukú IBIDI tenyésztő edényekbe 30,000 sejt/lyuk sejtszámban.  $2,26 \times 10^{-6}$  M moláris koncentrációjú AN és  $2,43 \times 10^{-6}$  M moláris koncentrációjú DM oldatokkal kezeltük a sejteket és minden mintához adtunk  $7,5 \times 10^{-6}$  M

végkoncentrációban propidium-jodidot. Kijelöltünk egy 2x2-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 méret 1024x768 volt. Az X-step mérete 0,5 µm volt. A visszavert fluoreszcens jeleket 3 csatornában (zöld, vörös és távoli vörös) detektáltuk 40x LWD (NA 0,6) objektívvel. 405nm, 488nm és 633 nm lézereket használtunk gerjesztésre. A detektált jeleket 14-bit magas felbontású képekké alakítottuk. Az LSC mérést követően az adott mintákról higanygőzlámpás felvételeket készítettünk CellB 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.

### 3.9 Hiszton elúciós módszer

Beágyazást megelőzően a 8 lyukú kamrák lyukait (Ibidi, Martinsried, Németország) 1 %-os alacsony olvadáspontú agarózzal vontuk be. A beágyazás idejére a sejteket és az agarózt is 37 °C-on tartottuk.  $6 \times 10^6$  sejtet kevertünk 1x PBS-ben (150 mM NaCl, 3,3 mM KCl, 8,6 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,69 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4) hígított 1 % LMP agarózzal 1:3 arányban. 22 µl sejtuszpenziót adagoltunk a lyukak közepére és a kamrákat házilag készített téglalap alakú műanyag fedőréteggel borítottuk, amelyeket egy 200 µm vastag, közepes súlyú polivinil-klorid fedőlapból vágunk ki. (Fellowes, Inc., Itasca, Illinois, USA). A sejteket 4 percig 37 °C-on tartottuk, hogy ülepedni tudjanak a bevont lyukak felszínén. Az agaróz polimerizációja után 300 µl jéghideg médiumot raktunk minden lyukba elősegítve a műanyag fedő eltávolítását. A beágyazást követően minden lyukban egy 2x2-es méretű ROI-t világítottunk meg lézerszenning citométerrel.  $2,26 \times 10^{-6}$  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 488nm-es lézert, 40x LWD objektívet, 0,5 µm-es X-step méretet alkalmaztunk. Az LMP agarózba ágyazott sejteket jéghideg 1x PBS-ben (500 µl minden lyuk) mostunk 3x3 percig. Ezt követően permeabilizáltuk a sejteket 500 µl jéghideg permeabilizáló oldattal, amelyben a detergens, 1 % (v/v) Triton X-100, amelyet 1xPBS/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 µl jéghideg 1x PBS/EDTA-val mostuk 3x3 percig. (500 µl minden lyukba) Ezt követően 60 percig különböző koncentrációjú (0 mM, 100 mM, 600 mM, 700 mM, 800 mM, 900 mM, 1000 mM és 2000 mM) NaCl-al kezeltük a magokat. A következő lépésben szintén egy 3x3 perces mosás következett 1x PBS/EDTA-val. (500 µl minden lyukba). NaCl 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. Az antitestet 150 µl 1xPBS/EDTA/1 % BSA-ban (1xPBS/EDTA mely tartalmazott 1 % borjú szérum albumint, 1:800 titer) hígítottunk. A jelölés 4 °C-on történt egész éjjel. Primer antitest jelölést követően 3x10 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 2mgP/ml-es törzskoncentrációból) antitestet használtunk. A jelölés 2 órán át történt jégen. Szekunder antitest jelölést követően 3x10 perces mosás következett 1x PBS/EDTA-val. (500 µl minden lyukba). Jelölést követően fixáltuk a mintákat 1 % formaldedid (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 (PI, 1xPBS/EDTA-ban oldva) 30 percig jégen. PI festés után egy 3x3 perces mosás következett 1x PBS/EDTA-val. (500 µl minden lyukba). A fluoreszcens intenzitásokat iCys lézer szkennig citométeren mértük le. 20x objektívvel (0,17 NA), 0,5 µm X-step mérettel 10x7-es ROI mérettel minden mintát lemértünk. ICys 7.0 szoftverrel kiértékeljük a mintákat.

### **3.10 Lizoszómák kvantitatív meghatározása ELISA HQ Plate Readerrel és LSC-vel**

A lizoszómák kvantitatív meghatározását HeLa sejteken végeztük. AN esetében a kiindulási moláris koncentráció  $3,62 \times 10^{-5}$  M, DM esetében  $3,88 \times 10^{-5}$  M volt, melyeket ezután 10 különböző felező koncentrációban hígítottunk 4 párhuzamos méréssel, Pozitív kontrollnak RPMI médiumot és 0,7 tömeg %-os glükóz PBS-t adtunk a sejtekhez 4-4 esetben. Negatív esetben szintén RPMI és glükóz PBS volt a lyukakban, viszont nem voltak sejtek. Egy másik negatív kontrollnak minősíthető kezelés volt az LLoMe (L-leucyl-L-leucin metil észter, Sigma Aldrich, 25nM cc.), amelyet 8 lyukhoz adtunk hozzá. Az LLoMe szakirodalomban utána nézve bizonyítottan csökkenti a lizoszómális aktivitást. A vegyületek hozzáadását követően az inkubációs idő 45 perc volt 37 °C-os sejtenyészítő inkubátorban 5 % -os CO<sub>2</sub> 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 AN, mind 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 „Lysotracker Orange-ot”. A hígítás a fentebb leírt módon történt. 30 perc inkubációt követően minden lyukról fényképet készítettünk Olympus DP71 kamerával. A lizoszómák arányának kinyerésére klasszikus képfeldolgozó módszereket használtunk.

Első lépésként képjavító eljárásokat hajtottunk végre a bemenő képeken. A képi zaj szűrésén túl, a hatékonyabb szegmentálás érdekében kép élesítést 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 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. Ezen hibák kijavítására az úgynevezett morfológia műveleteket használtuk. A morfológiai műveletek a szegmentálási hibák korrigálására alkalmasak és a kép előkészítését jelentik az alakzatzfelismerésre. Az apró zajok eltávolítására „erode” morfológia operátort használtuk, amellyel el lehet tüntetni a háttér területén az objektumhoz sorolt pontokat, és apróbb alakzatokat; továbbá 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 „dilata” morfológiai operátort. Az operátorok által használt strukturáló elem mérete minden képhez egyedi módon lett meghatározva a keletkezett zajok és foltok mértékétől függően.

## 4. Eredmények

### 4.1 ICAAc, monoMICAAC és diMICAAC fluoreszcens tulajdonságainak összehasonlítása lézer szkennig citométerrel (LSC-vel)

Az akut és a 30 perces inkubációt követő képeket összehasonlítva megállapítható, hogy 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. Magyarazatot adhat az is, hogy a diMICAAC gyorsabban diffundál be a citoplazmába, majd a cél organellumába mint a másik két vegyület. 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 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. 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 organellumokat. 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 esetében látható lizozómákban akkumulálódó festődési mintázatot.

### 4.2 Toxicitás

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 diMICAAC (DM) is alkalmas lehet, sejtes toxicitása alapján, terápiás eljárásra.

### **4.3 Spektrofluorimetriás mérések**

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. 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 leolvassva az is megállapítható, hogy az AN nagyobb fluoreszcencia határfokkal rendelkezik, mint a DM.

### **4.4 Emissziós spektrumok meghatározása Zeiss LSM 880 konfokális mikroszkóppal**

A spektrális képalkotás 405 nm-es gerjesztést követően kapott emissziós spektrumból kijelenthető, 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. 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. A DM jobban gerjeszthető 543 nm-ről, mint az AN.

#### **4.5 A sejtek finom struktúráinak meghatározása Zeiss LSM 880 konfokális mikroszkóppal**

A spektrális képalkotáshoz hasonló beállításokkal megvizsgáltuk a sejtek finom struktúráját is. 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 sejthető, míg a DM esetén a 488 nm-es gerjesztéshez hasonló a mintázat.

#### **4.6 Lizoszómális aktivitás meghatározása Zeiss LSM 880-al „Lysotracker Orange-al”**

A képekből megállapítható, hogy a megvilágított sejtek fluoreszcens intenzitása egyértelműen csökken. A megvilágítást követően, csak a megvilágított sejtek intenzitása csökken, a környező sejteké nem. A megvilágítás után a „Lysotracker Orange-al” 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 vezikulyszerű lizoszómákat.

#### **4.7 LED indukált fototoxicitás vizsgálat**

Kék LED megvilágítás esetén a 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 világitást követően gyakorlatilag egyik esetben sem figyelhető meg élő sejt. Összegezve elmondható, a megvilágítási időt növelve csökken az életképesség. Zöld LED megvilágítás esetében 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.

#### **4.8 Sejtéletképesség meghatározás lézer szkennig citométerrel**

A különbség a lézer-szkennig 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 időkből.

Az LSC 488 nm-es lézérének 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 középen (a „field image” képek illesztésénél, ahol a lézer nyaláb többször is áthalad egy cikluson belül) egyre több PI pozitív sejtet 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.

#### **4.9 Hiszton elúciós módszer**

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. 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.

#### **4.10 Lizozómák kvantitatív meghatározása ELISA HQ Plate Readerrel és LSC-vel**

Megállapítható, hogy a fotoérzékenyítők végkoncentrációinak emelésével csökkent a sejtekben a lizozómák száma a sejtekben. A kontrollhoz képest mind AN, mind DM esetében csökkent a lizozómák mennyisége. A lizozóma károsító LLOMe pozitív kontrol esetén szintén csökkent lizozómális aktivitás észlelhető. Sejtek nélkül, csak médium esetben egyáltalán nem sikerült lizozómális jelet detektálni. Hasonló moláris koncentráció esetében a DM nagyobb fokú lizozóma károsodást okozott mint, az AN.

## 5. 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 elektronegatív 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 (DM) festékek élő sejtek képalkotására való alkalmazhatóságát HeLa sejteken mutattuk ki  $2.5 \times 10^{-6}$  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 sejt 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  $\mu\text{M}$  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 nem nagy különbség van a két vegyület között, ezért a diMICAAC 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-teszttel vizsgáltuk a sejtek életképességét. A 2,5  $\mu\text{M}$  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 LD<sub>50</sub> fluenciája szignifikánsan különbözött a két fényérzékenyítő esetében: 11,3 J/cm<sup>2</sup> a DM és 22,2 J/cm<sup>2</sup> az AN esetében. A 95%-os konfidencia szintek a DM esetében 9,7 és 12,5 J/cm<sup>2</sup>, az AN esetében pedig 18,3 és 22,0 J/cm<sup>2</sup> 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. 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  $\mu\text{M}$  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 fiziológiás körülmények között). A DM azonban a HeLa sejtek citoplazmájában a 405 nm-es lézerefény gerjesztésénél és a kék fluoreszcencia emissziós tartományban jobban láthatóvá tette a lizoszóma típusú vezikulákat, mint az AN 543 nm-es gerjesztésnél 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 nukleóluszait, valószínűleg a riboszómális 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 sejtagnak. Ez a differenciált DNS-festés valószínűleg az AN nagyobb fluoreszcencia-kvantumhatékonyságában 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 sejtípus 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. 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 a lizoszomális festés szempontjából.

Az akut sejthalál eseményei, amikor a sejtmembrán megreped, vizualizálhatók; ezért úgy döntöttünk, hogy a fototoxikus folyamatok dinamikáját is nyomon követjük egy iCys lézerpasztázó citometriás képalkotó rendszer segítségével. 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-impermeabilis vörös DNS-festékkal, 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 sejtagnak a DNS festékekkel 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 elveszítik membránkapcsolataikat, pszeudopodiáikat és mikrovillusaikat. Ezután a sejtek zsugorodnak, membrántöredékeket veszítenek el és folyamatosan erősödő membrán blebesedés, hólyagosodás alakul ki. Kezdetben a hólyagok kisebb méretben nagyobb számmal voltak jelen, majd számuk egyre csökkent és egyre nagyobb méretűek lettek. Végül néhány bleb sejt méretűvé növekedett, és hirtelen a membránstruktúrák többsége visszahúzódott a sejtmagok felszínére, és csak nagyon kevés bleb maradt stabilan. A hólyagok kezdetben átlátszóak, majd zöldes színűek voltak. Hirtelen a zöldes blebek vöröses színűvé váltak, miközben a sejtmagok és a citoplazma is színt váltott. Az egysejtű 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 fiziológias 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 képsorozaton belül a vörös magmaradványok a halott sejtekben festődtek a legnagyobb intenzitással. Ennek ellenére hatalmas mennyiségű vöröses színű 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 propidium jodid nem festi jól az élő sejtek intakt sejtmagjait, még akkor sem, ha a membrán inpermeabilis PI-ot direkt módon a citoplazmába juttatjuk, mivel a sérülésmentes sejtmagban a DNS szorosan szuper tekeredik. 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. 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  $470 \text{ nm}$ -es gerjesztések különbözőségén kívül a frakcionált verzuus a folyamatos megvilágítás volt. Minden besugárzási periódus után az LSC esetében a sejteket a ciklikus  $488 \text{ nm}$ -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 ölü 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 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 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 kiegyenlítődési 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. Másodsor, 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. Az AN esetében az összes nukleáris, lizoszomális és blebekben 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 blebek 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 szétdiffundálnak és fényes PI-jelet eredményeznek a citoplazmában is. Később ez a telített intra-bleb 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. kaspáz aktiváció esetén. 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.

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. 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 fotodinamiás 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 képalakító 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 kromatinokban 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-keresztkötés, 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 keresztkötésének együttes hatása volt. Harmadszor, a DM jobban keresztkapcsolta 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 lizozómákban is felhalmozódik, és nagy koncentrációban a dimerképződés miatt vörös fluoreszcenciát mutat. Kék megvilágításban az AN a lizozómákat 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 „LysoTracker Orange-al”, 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. 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. 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” festékekkel festettük, és a lizoszómák fluoreszcencia-intenzitását újra felvettük. A plate reader 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 plate reader 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 dózis-válaszát 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  $\text{LD}_{50}$  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 képének 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.

## 6. Összefoglalás

A három újonnan szintetizált akridinvázas 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 lézertény gerjesztésénél intenzív zöld fluoreszcenciával jelzi a lizozómákat, 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 lézertény-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-blebek képződése, majd a fotofragmentált magi DNS lökéshullám-szerű kiáramlása jelzett. A DM ugyanakkor a HeLa sejtek lizozóma membránjának a fotopermabilizálásában mutatott nagyobb hatékonyságot. A folytonos és a frakcionált fotodinámiás sejtpusztulás közötti különbség és a háttérben rejlő sejtes mechanizmusok adatai arra utalnak, hogy a HeLa sejtekben a lizozómakárosodás javítása nagyobb kapacitással rendelkezhet, mint a DNS-károsodás javítása.

A DM specifikusabban jelzi a lizozómákat, valószínűleg a kifelé mutató negatív töltése miatt juthat be jobban a lizozómákba és mutathat nagyobb lizozóma károsító hatást, míg az AN jobban beépül a nukleinsavakba és 488 nm körül erősebb DNS fotofragmentáló tulajdonságú. Az AN lizozóma-célzás növelésével a lizozómák fotodestrukciója felerősíthető, ami fotodinámiás hatásában fokozott immunogén sejthalál indukciót okozhat.

## 7. Publikációk



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

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., Csősz, 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 tudománymetriai  
ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján  
elvégezte.

Debrecen, 2022.05.31.

