



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Villamosmérnöki és Informatikai Kar



Sallai Igor

**Humán leukocita szubpopulációk fenotipizálására szolgáló,  
bioszenzorokkal kompatibilis módszer kidolgozása**

Tudományos Diákköri Dolgozat

**Konzulensek**

Dr. Szittner Zoltán – Dr. Horváth Róbert

Dr. Bonyár Attila

**2022**

**Budapest**

# Tartalomjegyzék

<b>ABSZTRAKT</b> .....	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>6</b>
<b>BEVEZETÉS</b> .....	<b>7</b>
<b>1. TÉMAFELVETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS</b> .....	<b>8</b>
<b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS</b> .....	<b>9</b>
2.1. AZ IMMUNMONITOROZÁS JELENTŐSÉGE .....	9
2.2. ANTIGÉNSPECIFIKUS HUMORÁLIS IMMUNVÁLASZ .....	10
2.3. FAGOCITÓZIS .....	11
2.4. A RENDSZER SZINTŰ SZEROLÓGIA .....	12
2.5. A VÉR ALAKOS ELEMEI .....	13
2.5.1. Az immunrendszer sejtjei és legfontosabb különbségeik.....	13
2.5.2. Az adhéziós kölcsönhatások biofizikai háttere és immunrelevanciája.....	15
2.6. BIOSZENZOROK.....	16
<b>3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b> .....	<b>19</b>
3.1. FELHASZNÁLT REAGENSEK, ESZKÖZÖK .....	19
3.2. FELHASZNÁLT SEJTEK .....	19
3.3. MIKROSKÓPOS APPARÁTUS .....	19
3.4. EPIC CARDIO REZONÁNS HULLÁMVEZETŐ RÁCSOS OPTIKAI BIOSZENZOR .....	21
3.5. MÓDSZEREK .....	22
3.5.1. Epic Cardio mérés .....	22
3.5.2. Sejtek fixálása.....	23
3.5.3. Immuncitokémiai protokollok.....	23
3.5.4. Wright Giemsa hematológiai festés.....	27
3.5.5. Leukocita preapráció humán perifériás vérből.....	27
<b>4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK</b> .....	<b>29</b>
4.1. AZ EPIC CARDIO HULLÁMVEZETŐ RÁCSOS BIOSZENZORRAL VÉGZETT MÉRÉSEK .....	29
4.2. A SEJTEK FIXÁLÁSÁNAK HATÉKONYSÁGA .....	34
4.3. IMMUNCITOKÉMIAI PROTOKOLLOK ÉRTÉKELÉSE.....	36
4.4. WRIGHT-GIEMSA FESTÉS .....	40
4.5. A THP-1 SEJTEKKEL KIDOLGOZOTT PROTOKOLLOK ÖSSZEFOGLALÁSA .....	42
4.6. HUMÁN PERIFÉRIÁS VÉR EREDETŰ LEUKOCITÁKKAL VÉGZETT MÉRÉSEK.....	46
4.6.1. Az egyedi sejt hullámhossz eltolódási görbék karakterisztikáját meghatározó tényezők.....	47
4.6.2. A kevert populációjú leukociták immunfluoreszcens eredményi és bioszenzoros méréssel való egyeztetésük.....	51

<b>5. ÖSSZEFOGLALÁS-KONKLÚZIÓ.....</b>	<b>55</b>
<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....</b>	<b>56</b>
<b>6. IRODALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>57</b>
<b>ÁBRAJEGYZÉK.....</b>	<b>61</b>

## Absztrakt

A szervezet homeosztázisának fenntartása az immunrendszer feladata. A különböző stimulusok (például patogének vagy autoantigének) hatására az immunrendszer bizonyos sejtjei aktiválódnak, ezáltal sejtes és humorális immunválaszt kiváltva [1]. Az immunválasz monitorozása elengedhetetlen a különböző immunológiai kórképek pontos megértéséhez és diagnosztikájához. Az immunválasz során, az adott stimulus hatására aktiválódó és nem aktiválódó sejtek megkülönböztetésére és az aktiváció időbeli követésére kidolgozott módszer egy korszerű orvosi diagnosztikai teszt kifejlesztéséhez járulhat hozzá [2].

A modern biofizikai módszereken alapuló jelölésmentes technikák alkalmasak a humán leukociták aktivációjának szubpopulációkra specifikus értelmezésére [3]. A Nanobioszenzorika Lendület Kutatócsoport által használt Epic Cardio rezonáns rácsos hullámvezető bioszenzor térbeli és időbeli felbontása lehetővé teszi akár egyetlen sejt szintjén az immunsejtek aktivációjának kvantitatív, valós idejű nyomonkövetését [4]. A leukociták aktivációjának vizsgálata kivitelezhető a bioszenzor felületének funkcionálisával. Modellrendszerünkben a felületre adszorbeált intravénás immunglobulin (IVIG) által kiváltott frusztrált fagocitózist vizsgáltuk, melyet a monocita sejtek aktivációja során tapasztalunk. A THP-1 akut mieloid leukémiás monocita sejtvonal alkalmazásával kidolgozott protokollunkat ültetjük át a humán leukocita szubpopulációk vizsgálatára, melyek aktivációját további stimulusok: fehérjék, ligandumok, endotoxinok és immunkomplexek jelenlétében tervezzük vizsgálni.

A stimulus kiválthatja a sejtek aktivációja által kialakuló adhéziót, amely során motilitásuk, illetve morfológiájuk változása (méret, alak, szétterültség) időben és térben nagy felbontással követhető jelölésmentes módon. Hipotézisünk szerint a leukocita populációk aktiválódása a sejtípus függvényében eltérő. A jellemző biofizikai paraméterek és a kialakult felületi adhézió stabilitásának és kinetikájának mérésével megkülönböztethetővé válnak az aktiválódott immunsejtek. Az egysejtes adatok integrálásával lehetőség nyílik az adott stimulusal kiváltott sejtaktiváció értelmezésére egyedi sejt szinten, akár személyre szabottan.

Ahhoz, hogy a sejtaktivációs adatokat és hullámhossztolódási görbéket sejtípusokhoz tudjuk rendelni, a hematológiai és immuncitokémiai protokollok alkalmazása elengedhetetlen [5]. Klasszikus hematológiai (például Wright-Giemsa, May-Grünwald) és egyéb sejtorganellum festésekkel (például akridin narancs, Nile Blue) karakterizáljuk és azonosítjuk a granulocitákat, monocitákat és limfocitákat [6]. A morfológiájuk és festődésük alapján nehezen megkülönböztethető szubpopulációk beazonosítását monoklonális antitestekkel végzett immunfluoreszcens módszerek alkalmazásával érjük el. A főbb leukocita populációk: CD3<sup>+</sup> T-limfociták, CD19<sup>+</sup> B-sejtek, CD14<sup>+</sup> monociták, CD56<sup>+</sup> NK sejtek identifikációját tűzzük ki célul [7].

Az egyes betegségek során specifikusan aktiválódó leukocita szubpopulációk sikeres megkülönböztetése rezonáns rácsos hullámvezető, optikai elven működő bioszenzorokkal, egy új, megbízható, gyors, kis vegyszer és helyigényű klinikai, funkcionális immundiagnosztikai teszt megalkotását teszi lehetővé.

## Abstract

The immune system is involved in maintaining the human organism's homeostasis. In response to various stimuli (*e.g.*, pathogens or autoantigens), specific cells of the immune system are activated, thus triggering cellular and humoral immune responses [1]. Monitoring the immune response is essential for the accurate understanding and diagnosis of various immunological disorders. Differentiate between activated and non-activated cells during an immune response to a given stimulus and to measure activation over time could contribute to the development of an advanced medical diagnostic test [2].

Label-free techniques based on modern biophysical methods are suitable for subpopulation-specific analysis of human leukocyte activation [3]. The spatial and temporal resolution of the Epic Cardio resonant grating waveguide biosensor used by the Nanobiosensorics Research Group allows for quantitative, real-time monitoring of immune cell activation even at the single cell level [4]. The study of leukocyte activation can be performed by functionalizing the surface of the biosensor. In our model system, we investigated the frustrated phagocytosis induced by surface-adsorbed intravenous immunoglobulin (IVIg) during monocyte cell activation. We will transfer our protocol developed using the THP-1 acute myeloid leukemic monocyte cell line to the study of human leukocyte subpopulations, which we intend to investigate activation in the presence of various stimuli: proteins, ligands, endotoxins, and immune complexes.

The stimulus can induce cell activation, whereby changes in motility and morphology (size, shape, spatial spreading) can be detected in time with high temporal and spatial resolution in a label-free manner. We hypothesize that the activation of leukocyte populations varies depending on the cell type. By measuring the characteristic biophysical parameters and the stability and kinetics of the formed surface adhesion, it is possible to distinguish activated immune cells. By integrating single-cell data, it is potentially possible to translate stimulus-induced cell activation to the individual cell level, even in a personalised format.

To assign cell activation data and wavelength shift curves to cell types, the use of haematological and immunocytochemical protocols is essential [5]. Classical haematological (*e.g.*, Wright-Giemsa, May-Grünwald) and various cell stainings (*e.g.*, acridine orange, Nile Blue) are used to characterize and identify granulocytes, monocytes, and lymphocytes [6]. Identification of subpopulations that are difficult to distinguish based on their morphology and staining is obtained using immunofluorescence methods with monoclonal antibodies. We aim to identify the main leukocyte populations: CD3<sup>+</sup> T lymphocytes, CD19<sup>+</sup> B cells, CD14<sup>+</sup> monocytes, CD56<sup>+</sup> NK cells [7].

The successful differentiation of leukocyte subpopulations that are specifically activated in certain diseases using resonant grating waveguide optical biosensors may enable the development of a new, reliable, rapid, low reagent cost, and space-consuming clinical functional immunodiagnostic test.

## BEVEZETÉS

Vitathatatlan a jelölésmentes bioszenzorok térnyerése az immunológiai vonatkozású kutatások területén. Az ellenanyagokkal végzett jelöléses technikákkal minden esetben bizonyos mértékben módosulnak a sejtek funkcionalitását adó felületi membránprotein, -glikoprotein, vagy -proteoglikán struktúrák. A jelölésmentes technikák a legkíméletesebb vizsgálati módszernek bizonyulnak a területen, mivel kizárólag a morfológiai, motilitási, adhéziós, illetve proliferatív tulajonságait vizsgálják a minta sejtjes elemeinek. Ugyanakkor a bioszenzoros jelek értelmezése és sejtítpushoz rendelése nagy kihívást jelent. Szubpopulációk azonosítására és immunfunkcionális elemzésekre alkalmas platformok alakíthatók ki, amelyek segítségével az egyes betegségek patomechanizmusai nyomkövethetővé válnak. Továbbá a bioszenzorok nagy térbeli és időbeli felbontása lehetővé teszi az egyetlen sejt szintjén történő elemzéseket.

A szervezet védelmi vonalainak kiemelt szereplője az immunrendszer. A szervezet barrierjeit (például bőrt, nyálkahártyát) átlépő patogének az immunrendszer veleszületett sejtjes és humorális komponenseivel találkoznak először. A szervezetbe jutott elemek patogenitása a jellemző régióikból fakad; ezek lehetnek poliszacharid struktúrák, valamint specifikus fehérje domének-polipeptidek. Ezen régiók az úgynevezett patogén asszociált mintázatok (*pathogen associated molecular pattern* - PAMP). Felismerésükre specifikus receptorok fejlődtek ki a veleszületett immunrendszer sejtein, amelyeket patogén felismerő receptoroknak nevezünk (*pathogen recognition receptors* – PRR). Ugyanakkor az adaptív immunrendszer T-limfocitáinak aktiválódásához szükség van a már lebontott patogén bizonyos belső struktúráinak – például egy aminosav szekvencia részletnek – bemutatására. Mindezt az antigén prezentáló sejtek végzik (*antigen presenting cells* – APC). Az adaptív immunrendszer másik fontos celluláris alkotója a B-limfociták. Aktiválódásuk során a T-limfocitákkal ellentétben, a patogén bizonyos felületi struktúrájának specifikus felismerésére szakosodtak, amely előidézi ellenanyagtermelésüket, ezáltal beindítva az adaptív immunrendszer humorális válaszát. Az immunválasz személyre szabott monitorozása és az aktiválódó sejtek funkciójának értelmezése elengedhetetlen az élettudományi kutatások és orvosi diagnosztikumok fejlesztésének területén.

# 1. TÉMAFELVETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A humorális immunválasz során, az ellenanyagok immunkomplexeket alkotnak az általuk felismert antigénnel. Az immunkomplexeket az aktiválódó effektor sejtek specifikusan, az ellenanyagok konstans régióit (Fc fragmens), receptoraikkal képesek felismerni. Az effektor sejtek funkciójának értelmezése és egy robosztus vizsgálati platform kialakítása túlmutatna a jelenlegi klinikai szerológiai tesztek korlátain. Elképzelhető egy olyan rendszer, amelyben a szervezet egyes folyadékterei, illetve extracelluláris és intersticiális felületei modellezhetőek. A felületeket funkcionálizálhatjuk a vizsgálandó antigénnel, amelyet szérummintával kezelve és kellő ideig inkubálva, antigén-antitest komplexek kialakulását tapasztalhatjuk. Ugyanazon személy mintájából származó leukocitákat az immunkomplexeket hordozó rendszerhez adagolva, a leukociták specifikus aktiválódása válik vizsgálhatóvá. Az optikai elven működő bioszenzorok lehetővé teszik a sejtaktiváció időbeli és térbeli nagy felbontású nyomonkövetését. Az aktiválódó sejtek biofizikai paramétereinek - akárcsak a sejtadhézió stabilitásának és kinetikájának - nyomonkövetése és a mérési eredmények immunfunkcionális kiterjesztése egy újfajta immunanalitikai módszer megalkotását jelentheti.

A bioszenzoros jelek értelmezése a sejtípus függvényében a tanulmány kezdeti fázisában immuncitokémiai és egyéb hematológiai/sejtorganellum festési protokollok kidolgozását igényli [6]. A jelöléses protokollokkal azonosított sejtek szubpopulációkba sorolhatóak. Kutatásunk távlati célja jelölésmentes módon, kizárólag a bioszenzoros jelekre hagyatkozva értelmezni az immunkomplexek effektorsejtekre kifejtett hatásának immunválaszban betöltött szerepét. Ezzel lehetővé válna egy olyan vizsgálati rendszer megalkotása, amellyel személyre szabottan immunfunkcionális klinikai diagnosztikai tesztelést lehetne megvalósítani. Egy ilyen platform előnyei a minimális reagensigény és a kis mintatérfogat (~10-20  $\mu$ L perifériás vér) mellett, hogy a leukocitákat nem módosítaná, így azok további pl genetikai vagy proteomikai vizsgálata is elérhető marad.

Kutatásunk jelenlegi fázisának célkitűzése az Epic Cardio hullámvezető rácsos optikai bioszenzorral végzett mérést követő immuncitokémiai és hematológiai/sejtorganellumfestések optimalizálása. Kezdetben a THP-1 immortalizált, akut mieloid leukémiás sejt vonalat használjuk a monoklonális elsődleges és másodlagos ellenanyagokkal történő jelöléses protokollok optimális koncentrációinak és körülményeinek beállítására. További cél a sejtek fixálásának optimalizálása és a bioszenzoros jelek, hullámhosszoltolódási görbék értelmezése a sikeresen megjelölt sejtekre vonatkoztatva. A vér főbb leukocita szubpopulációit kívánjuk azonosítani a jellemző CD markereik (cluster of differentiation – CD) és a hematológiai/sejtorganellum festések alapján [7].



## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. Az immunmonitorozás jelentősége

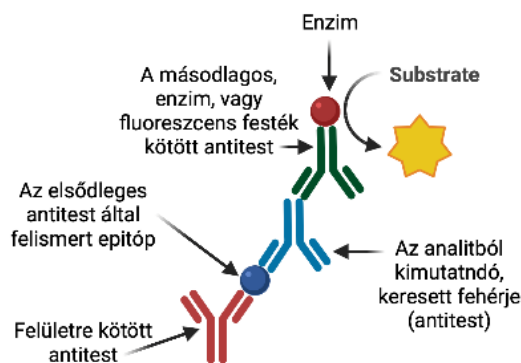
Az immunrendszer feladata a szervezet homeosztázisának fenntartása a kórokozó patogének és a megváltozott saját sejtek, például tumorossá fajult sejtek likvidálása által. Felosztható veleszületett és adaptív immunrendszerre, amelyek tartalmazznak mind sejttes elemeket, mind humorális („oldékony”) faktorokat. A sejttes elemek tovább csoportosíthatóak mieloid és limfoid eredetű sejtekre. A humorális komponensek elsősorban ellenanyagok, citokinek, kemokinek, a komplementrendszer egyes elemei, valamint egyéb fehérje természetű jelátvivő anyagok. A veleszületett és az adaptív immunrendszer egymástól nem függetleníthető, egymás működését befolyásoló összetett rendszerek.

Az antitestek kiemelt funkciót töltenek be a patogének elleni védekezésben, mivel képesek a nem saját és fertőző ágensek felismerésén és semlegesítésén keresztül az immunrendszer veleszületett és adaptív sejtjeinek aktiválására. Az antitestek Fc fragmense biztosítja, hogy a megfelelő Fc receptorral rendelkező immunsejtek felismerjék azokat. Az antitestek idiotípusát meghatározó Fab fragmens hordozza az antigének specifikus felismerésének képességét. Az aktivált sejtek (effektor sejtek) eliminálják a patogén elemet. Elengedhetetlen a védekező mechanizmus hatékonysága szempontjából a saját és nem saját struktúrák, illetve a megváltozott saját struktúrák megkülönböztetése. Sok esetben a monoklonális antitestek hatékonynak bizonyulnak egyes tumoros betegségek kezelésében, ugyanakkor a fertőzések bonyolult patomechanizmusából adódóan nem elterjedt a célzott, monoklonális terápiák széleskörű alkalmazása [1]. Az ellenanyagok Fc fragmense konstans és variábilis doménekből áll. A konstans domének (kettő vagy három) határozzák meg az ellenanyag izotípusát (IgM, IgG, IgD, IgA, IgE). A legelterjedtebben alkalmazott monoklonális antitest izotípus az IgG, mert a szérumban (fibrinogén mentes vérplazma) nagy mennyiségben van jelen, hosszú a félélet ideje, illetve döntő szerepet játszik a patogén ellenes kontrollban és a fertőző ágensek eliminálásában.

A humán populációban megjelenő komplex betegségek patomechanizmusának megértéséhez és az egyes folyamatok közti különbségek feltérképezéséhez elengedhetetlen az immunológiai folyamatok széles spektrumú monitorozása. A preklinikai kutatásokból származó eredmények transzlációja meghatározó jelentőségű az orvosi diagnosztikumok és terápiás módszerek fejlesztéséhez [8]. Multiplex rendszerben a biológiai minta komponenseinek széles skálája elemezhető valós időben és minimális mintatérfogatban. A technika lehetővé teszi egy terápiás szer alkalmazására beinduló immunválasz során megjelenő sejtek és humorális faktorok monitorozását. A veleszületett és az adaptív immunrendszer válaszainak monitorozása alapvető fontosságú az egyes betegségek elleni védetség megértéséhez. Mindazonáltal egy ilyen rendszer a pontos, standardizált protokollok kidolgozását

igényli, hogy a tényleges biológiai változások megkülönböztethetők legyenek az esetleges artefaktoktól [9].

Az egyes vakcinák expozícióját követő eltérő immunválaszok kapcsán belátható, hogy miért van szükség pontos és standardizált immunmonitorozásra. Azok a vakcinák, amelyek patogénspecifikus ellenanyagtermelődést kiváltó elölt vírust, vagy vírusalegységet tartalmaznak, mint például a DiPerTe, az immunrendszer humorális válaszát váltanak ki. Ekkor a megemelkedett ellenanyagtiter moitorozása a kézenfekvő stratégia [11]. Ilyen módszer például az ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) . Az ELISA során egy hordozó felületre ellenanyagot kötnek ki, amely a vizsgált fehérjét szelektíven ismeri fel. A vizsgált fehérjét tartalmazó mintával kezelve a felületet, a keresett fehérje kikötődik. Egy további, enzim-, vagy fluoreszcens festék-konjugált, a vizsgált fehérjére ugyancsak specifikus ellenanyaggal a vizsgált fehérje jelölhető. A konjugált enzim szubsztrátját a rendszerhez adva, a képződő termék koncentrációjából következtethetünk a vizsgált fehérje mennyiségére. Fluoreszcens konjugátum esetén pedig az emittált fény intenzitásából következtethetünk a keresett fehérje mennyiségére.



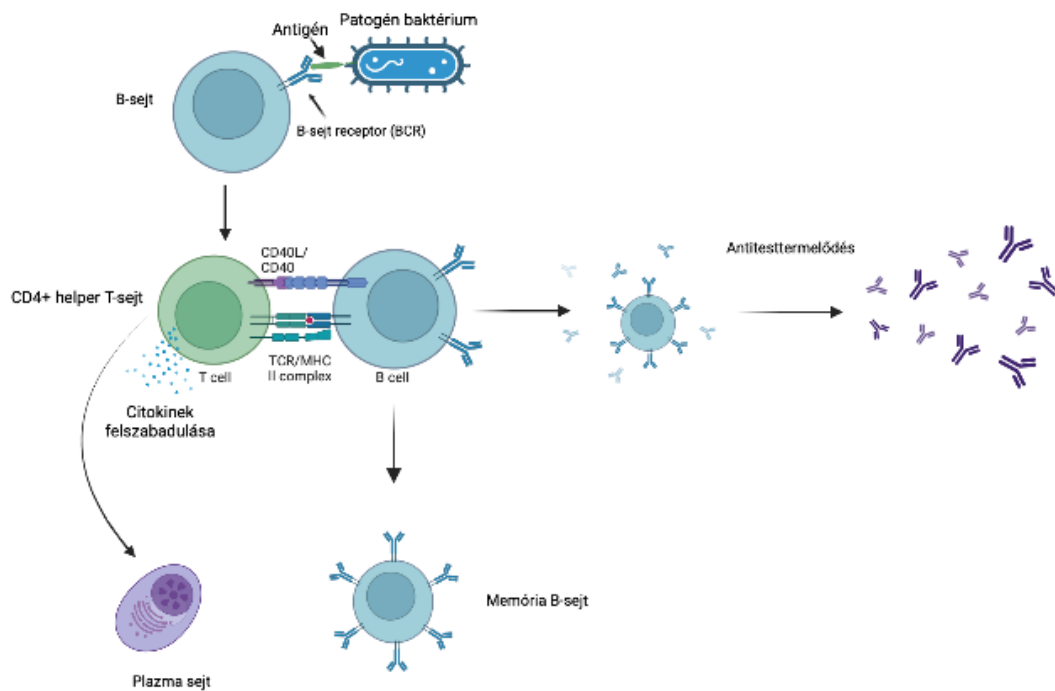
1. ábra Az ELISA módszer szemléltetése (az ábrát saját magam szerkesztettem a BioRender alkalmazás használatával)

A DNS és az RNS vakcinák inkább sejtes immunválaszt indukálnak, amelyeknél a kis mértékű kórokozóterhelés kontrollálása az elsődleges szempont, ekkor sejtspecifikus immunmonitorozási stratégia bizonyul hatékonynak, amely elvégezhető például áramlási citometria segítségével [12].

## 2.2. Antigénspecifikus humorális immunválasz

Az antigénspecifikus humorális immunválasz során először az IgM, majd az IgG típusú antitestek klonális expanziója következik be. A különböző izotípusok eltérő effektivitással aktiválják a komplementrendszer tagjait azzal, hogy Fab doménjükkel megkötik az antigént [13]. Az antigénspecifikus humorális immunválasz az effektorsejtek aktivációját idézi elő. Az effektorsejtek

felismerik a komplexált antitestek Fc doménjét Fc receptoraikkal. A sejtés immunválasz során a fagocitózisra képes sejtek is aktiválódnak; ilyen sejtek a monocitákból differenciálódó makrofágok, a dendritikus sejtek, a neutrofil granulociták és a hízósejtek. A fagocitózison keresztül az immunrendszer sejtés elemei védik a gazdaszervezetet és fenntartják az immunhomeosztázist [14]. Bizonyos esetben a B-sejtek is képesek fagocitózisra az antigén prezentáló sejtekhez hasonló módon. Ezek a B-sejtek megtalálhatóak a folliculusokban, amelyek képesek fagocitózisra [15].



2. ábra: Az antigénspecifikus humorális immunválasz kialakulása (az ábrát saját magam szerkesztettem a BioRender alkalmazás használatával)

## 2.3. Fagocitózis

A fagocitózis az edocitózis egyik formája. A fagocitotikus aktivitású immunsejtek a mikrokozonyezetük indukálta inger hatására bekebelezik a kozonyezetükben megjelenő szilárd testeket. Hivatásos fagocitáknak szokás nevezni a monocitáka, dendritikus sejteket és a granulocitákat. A fagocitózisra jellemző állabképződés az aktin-miozin motorfehérje rendszer átrendeződésének következménye. Az állabak körbe veszik a szilárd komponenst és bekebelezik, amely a sejten belüli fagoszómába jut.

A fagocitózisra képes immunsejtek egyes populációi, akárcsak a monociták, dendritikus sejtek, neutrofil granulociták felismernek bizonyos molekularészeket, ligandokat és egyéb makromolekuláris

elemeket, amelyek a patogén tulajdonságú baktériumokra jellemzőek, például ilyen molekuláris mintázatok a lipopoliszacharidok, vagy a bakteriális flagellin. A felismerés a patogén felismerő receptoraikon keresztül történik (pathogen recognition receptor – PRR), amelyek ezekre az úgy nevezett patogénnel asszociált molekuláris mintázatokra érzékenyek. A pinocitózissal (a pinocitózis során folyadék bekebelezése történik) ellentétben a fagocitózis végbemeneteléhez szükséges a receptorális kötések kialakítása. A receptorok és ligandumaik kötődésének effektivitását a receptorok affinitása és felületi sűrűségük egyaránt befolyásolja [8].

A fertőzések helyén legelőször a fagocitáló sejtek jelennek meg, így biztosítva az immunvédekezés legelső védelmi vonalát. Nem csak az idegen struktúrák bekebelezésére, hanem az apoptotikus testek által mediálva a professzionális fagociták bekebelezik az elöregedett, illetve sérült sejteket. A fagocitózishoz elengedhetetlen receptor molekulák közvetlenül, vagy opszoninokon keresztül ismerik fel a patogén struktúrákat. Az idegen struktúrák felismerését a vérben keringő ellenanyagok is végezhetik. A felismerés után a komplement kaskád egyes elemei rögzülnek az idegen struktúra felületén, amelyeket opszoninoknak neveznek. Az idegen struktúrákat felismerő IgG Fc fragensét kötik meg a fagociták Fc receptorai, valamint a komplement iC3b molekuláját ismerik fel. Az IgG által opszonizált idegen struktúrák fagocitózisa három fő lépésre osztható. Először az idegen struktúrákat beborító ligandum és a fagocitáló sejt Fc receptora közt kialakul egy kötés, majd az Fc receptorok klasztereződése indul meg, végezetül egy aktin mediált folyamat eredményeként az idegen struktúra bekebelezése befejeződik [9].

## 2.4. A rendszer szintű szerológia

A rendszer szintű szerológiai vizsgálatok, avagy a *systems serology* az adott antigén által indukált immunreakció során képződő antitestek védekezésben betöltött funkcióinak és jellemzőinek a feltárását teszi lehetővé, amely egy nagy áteresztőképességű platform fejlesztését igényli [19], [20]. Egy ilyen rendszer lehetővé teszi a nagy mintaelemszámú humán szerológiai minták automatizált és gyors elemzését. Mindazonáltal feltárhatóvá válik az ellenanyagok klonális expansziójának profilja, amely elősegíti az adott patogénnel indukált összetett immunfolyamatok részletes feltérképezését. Ezek a rendszerek általában mikrotiter lemez, vagy mikrogyöngy alapú technológiák. A nagy mintaelemszám és a szerteágazó funkcionális és biofizikai információkat hordozó szignálok detektálásához és értelmezéséhez elengedhetetlen a gépi tanulást megvalósító algoritmusokat alkalmazó korszerű bioinformatikai háttér. Az antitest izotípusa, alosztálya, valamint az Fc domén glikoziláltsága az immunfunkcióban betöltött biofizikai paraméterek, amely tulajdonságok együttesen meghatározzák az effektor funkciót [1]. Az Fc domént receptoraikkal specifikusan felismerő effektor sejteknek citotoxikus és fagocitotikus aktivitásukkal eliminálják a patogént. Ez a két mechanizmus az antitest függő sejtes

citotoxicitás (*antibody dependent cellular cytotoxicity* – ADCC) és az antitest függő sejt fagocitózis (*antibody dependent cellular phagocytosis* – ADCP) [21].

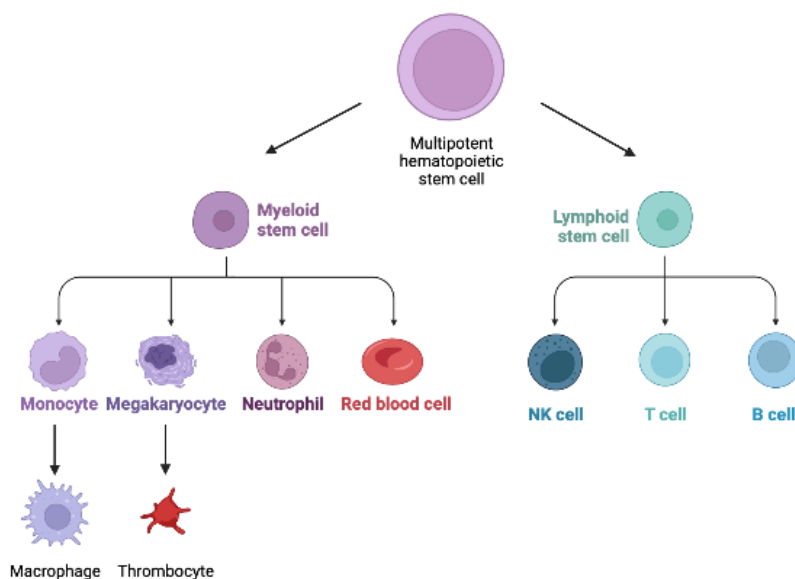
Az ellenanyagok effektor funkciójának ismerete és annak pontos jellemzése, a vakcinafejlesztés, a fertőző betegségek, a daganatos és az autoimmun betegségek diagnosztikája és terápiája szempontjából elengedhetetlen. Ezzel szemben a klasszikus szerológiai tesztek az immunológiai státusz meghatározására alkalmas módszerek, amelyek által ugyan kapunk egy képet a patológiás állapotról az ellenanyagtiter (elsősorban az IgG és IgM antitestek koncentrációja), illetve a komplementrendszer egyes elemeinek koncentrációja alapján, de a védekezésben betöltött funkciójuk, illetve az antitestspecifikus effektor funkciók rejtve maradnak. Ugyanakkor a klasszikus szerológiai vizsgálatok előnye, hogy a gyors diagnosztikai eredmény és a kis reagensigény az ellátás helyén alkalmazható technológiák kifejlesztését tette lehetővé. Az ilyen diagnosztikai módszereket *point of care* - POC névvel illették. Ilyen elven működik a komplement fixációs teszt (complement fixation test – CFT), amely a szérum vagy a cerebrospinális folyadék ellenanyag összetételét és koncentrációját vizsgálja (elsősorban az IgG koncentrációt), amelyet akut, virális eredetű fertőzések kimutatására alkalmaznak [22].

Az effektor sejtek alkalmazásával végzett immunkomplexek kimutatása és a sejtek aktivációs mechanizmusai (például fagocitózis, citokin-kemokin felszabadulás) során számos biofizikai paraméterük változik. Ezek a változók lehetnek például az sejtadhézió kinetikája és stabilitása, a sejtek motilitása, proliferációja, felületeken való szétterülésük, valamint egyéb morfológiai változások.

## 2.5. A vér alakos elemei

### 2.5.1. Az immunrendszer sejtjei és legfontosabb különbségeik

A humán vér celluláris elemei a multipotens hemopoetikus őssejtből származnak, amelyből mieloid vagy limfoid progenitor sejtek képződnek (1. ábra). A mieloid útvonalon prekurzoraikból differenciálódnak az egyes granulociták, eritrociták, trombociták, konvencionális dendritikus sejtek (cDC) és monociták (a monociták később makrofággá érhetnek) [23]. A limfoid útvonalon szintén prekurzoraikból differenciálódnak a T- és B-limfociták, a természetes ölüsejtek (natural killer – NK) és a plazmacitoid dendritikus sejtek (pDC) [23]. A továbbiakban az egyes leukocita alpopulációk legfontosabb különbségeit mutatom be röviden.



3. ábra: A hematopoesis során a multipotens hematopoetikus őssejtből differenciálódó alakos elemek (az ábrát saját magam szerkesztettem a BioRender alkalmazás használatával)

A bazofil és eozinofil granulociták elsősorban a paraziták elleni védekezésben és az allergiás reakciókban vesznek részt. A neutrofilek a veleszületett immunrendszer leukocitáinak legnagyobb szubpopulációját képviselik, képesek fagocitálni és fagolizozómáikban lebontani a baktériumokat. A lokális szöveti sérülések, gyulladások mikrokörnyezetében és rövid polipeptidek, úgynevezett citokinek és egyéb lipid mediátorok szerkeciójával kommunikálnak. A neutrofilek összehangolt mozgása és egymás közötti kommunikációja a veleszületett immunrendszer többi celluláris elemét is védekezésre utasítja. A hízósejtek a szervezet minden szövetében elvéve találhatóak. Gyulladásos folyamatokban résztvevő molekulák/faktorok felszabadításával (például hisztamin) az allergiás reakciók során aktiválódnak és a paraziták elleni védelemben is fontosak. A monociták képesek kilépni a véráramból és a szövetek között az intersticiális térben keresik a fagocitálható kóros elemeket. A monociták makrofágokká differenciálódhatnak. A makrofágok és a monociták az immunfolyamatok összehangolásában is részt vesznek, azzal, hogy értesítik a többi immunsejtet a problémáról. A makrofágok végzik az elhalt sejtek, például a vörösvérsejtek újrahasznosítását és az apoptotikus sejtörmelék eltakarítását. A dendritikus sejtek (DC-k) részt vesznek az antigénprezentációban. Az APC-k végzik a patogének, illetve tumoros sejtek feldolgozását és bizonyos fragmentumok bemutatását az adaptív immunrendszer T- és B-limfocitái számára. Az antigénprezentáció az MHC molekulákon keresztül történik. A természetes ölüsejtek (natural killer – NK) a vírusfertőzött és tumorossá fajult sejtek elpusztításában vesznek részt. Granulumaikban olyan fehérjék termelődnek, amelyek a célsejt plazmamembránját képesek átluggatni és apoptózist előidézni. Az apoptotikus sejtek nem bocsátanak ki olyan veszélyjeleket, amelyek gyulladáshoz vezetnének.

Az adaptív immunrendszer sejtjes elemeit képviselik a B- és a T-limfociták és egyes alpopulációik. A B-sejtek ellátnak antigénprezentáló funkciókat és ellenanyagokat termelnek a patogének és tumoros sejtek semlegesítésére. Az antitestek három fő funkciója a komplement-rendszer aktiválása, a semlegesítés és az opszonizáció. A B-limfociták antigéneket szelektíven felismerő receptorokat fejtenek ki, úgynevezett B-sejt receptorokat (BCR). A T-sejtek két nagy csoportba sorolhatók a felületükön expresszálandó CD molekulák alapján. Elkülöníthetünk CD4+ helper T-sejteket és CD8+ citotoxikus T-sejteket (citotoxic T-lymphocyte – CTL). A T-sejtek aktiválódásához szükséges antigénprezentációt elsősorban a DC-ek végzik. A T-sejtek részt vesznek a kórokozó elpusztításában és az immunrendszer aktiválásában egyaránt. Megakadályozzák a káros immunfolyamatokat, fenntartják a szervezet saját antigénjei szembeni immuntoleranciát, ezzel gátolva az autoimmun folyamatok kialakulását.

### 2.5.2. Az adhéziós kölcsönhatások biofizikai háttere és immunrelevanciája

A mononukleáris, fagocitózisra képes sejtek csoportját alkotják a monociták, makrofágok, és dendritikus sejtek. Közös tulajdonságuk, hogy fagocitózisra képesek. A monociták makrofág differenciációja az érpályából való kilépésüket követő szöveti impulzus hatására alakul ki. A patogéneken és tumoros sejteken kívül az apoptotikus sejtörmelék fagocitózisát is a makrofágok végzik. A szövetközi vándorláshoz adhéziós kölcsönhatások kialakítására van szükség, amelyet az epithelsejtek és az extracelluláris mátrix (ECM) felülete biztosít.

Az adhézió tanulmányozásakor fontos biofizikai paraméterek a sejtek adhézió előtti motilitása és morfológiája, illetve az adhézió kialakulása utáni – felületen megvalósuló – szétterültségük és alakjuk. Ezen biofizikai paraméterek és a sejtadhézió kinetikájának és stabilitásának monitorozása, valamint annak feltérképezése, hogy miként befolyásolják az immunsejtek védekezésben betöltött funkcióit, egy újfajta immunfunkcionális diagnosztikai módszer fejlesztéséhez járulna hozzá.

A mechanoszenzitív sejtek –akárcsak az immunsejtek– a környezetükben fellépő mechanikai szignálokat képesek mechanotranszdukciós útvonalakon biomechanikai jelekre fordítani, amelyek adott biokémiai folyamatok lefutását befolyásolják [24]. Az adhéziós erő és a fellépő egyéb mechanikai erők/kölcsönhatások kiemelt szerepet képviselnek a sejtéleti folyamatok és a környezeti hatásokra adott válaszok megértésében. Az integrinek, a glikokálix kialakításában résztvevő glikolipidek, proteoglikánok, glikoproteinek és poliszacharidok is hozzájárulnak az adhéziós kölcsönhatások kialakításához [4].

Az adhéziós molekulákat a szerkezeti különbségeik és a ligandumkötésük alapján öt nagy csoportba sorolhatjuk: integrinek, szelektinek, kadherineket, és az immunglobulin szupercsalád egyes tagjai, a nektinek és a mucinok. Ugyanakkor megjegyzendő, hogy a hagyományos sejtadhéziós molekulákon kívül egyéb molekulák, például enzimek is fontos szerepet játszanak a sejtadhéziós



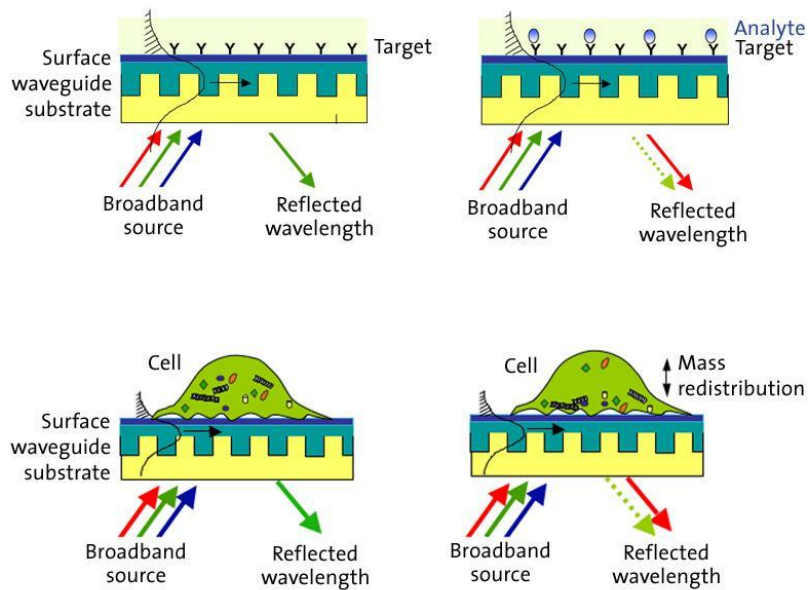
kölcsönhatások kialakulásában (például a vaszkuláris adhéziós fehérje – VAP-1) [25]. Míg az integrinek jellemzően az extracelluláris mátrixhoz kötődnek, addig a szelektinek, kadherineket és az immunoglobulin szuperfamilia egyes tagjai a sejt-sejt közötti kapcsolatok kialakításában játszanak szerepet [26]. Az immunsejteken megjelenő integrinek oldható ligandumokhoz és más sejtek ligandumaihoz is kötődnek; példaként a monociták, az adhéziós kölcsönhatások kialakítására képesek egyéb sejtekkel ellentétben, leukocitaspecifikus  $\beta_2$  integrineket expresszálnak, amely összefügg funkciójukkal. Stimuláció hatására (például gyulladáscsökkentő citokinek) a  $\beta_2$  integrinek gyorsan aktiválódnak, ezáltal a sejtek gyenge adhéziós kölcsönhatása erős kölcsönhatásba megy át [27].

A leukociták motilitásában különösen fontosak a szelektinek, például a limfociták perifériás nyirokcsomókba és a bőrbe történő vándorlásakor Legkiemelkedőbb funkciójuk a gördülő sejtadhéziós kaskád kezdeti szakaszához kapcsolódik, amelyben a szelektinek kötődése lehetővé teszi az epithél felületén történő gördülést [28].

## 2.6. Bioszenzorok

A fentebb említett, egyetlen sejt szintjén történő biofizikai paraméterek mérése mikrofluidikai rendszerek és bioszenzorok használatát igényli. Számos technológia esetén a bioszenzorok applikálva vannak a mikrofluidikai rendszerbe. Az optikai elven működő nanobioszenzorok használatával megvalósítható a sejt minták jelölés- és roncsolásmentes elemzése. A nanobioszenzorok képesek a biológiai jelenségek gyors feldolgozására. A mérési eredmények reprodukálhatósága kedvezőbb a nanoszerkezetek különleges tulajdonságainak köszönhetően, többek között a jobb elektromos vezetőképesség és az érzékeny bemenő jelre adott válasz következtében. A bioszenzor egy olyan mérőrendszer, amely képes egy anyag tulajdonságainak vizsgálatára biológiai kölcsönhatások felhasználásával. A bioszenzorok három fő eleme a bioreceptor, a jelátalakító (transzducer), és a detektor.





4. ábra: A hullámvezető rácsos optikai bioszenzorral végzett mérések elve [29]

A bioszenzorok térbeli és időbeli felbontása kiemelten fontos paraméter, mivel meghatározza, hogy a sejtes minta egysejtű, vagy szubcelluláris jellemzői és az impulzusokra adott válaszok tanulmányozhatók-e [3]. A mikroszkóppal végzett elemzések ugyan nem tartoznak a bioszenzoros technikák közé, de a bioszenzoros mérésekkel párhuzamosan általuk lehetőség nyílik a sejtek megkülönböztetésére és a bioszenzoros mérés megerősítésére. A kombinált megközelítések lehetővé teszik a sejtek heterogenitásának megfejtését és a sejtek azonosítását a bioszenzor alapú mérések követően [30].

A felületérzékeny jelölésmentes módszerek biztosítják a legalkalmasabb technológiát a sejtadhézió kinetikájának mérésére, akár csak a feületi plazmon rezonancia készülékek (SPR), vagy a digitális holografikus mikroszkóp (HoloMonitor).

A rezonáns hullámvezető rácsos (resonant waveguide grating – RWG) optikai bioszenzorok (akár csak az Epic Cardio) a lokális törésmutató változását mérik a szenzorfelület közelítőleg 150 nm-es környezetében (evaneszcens tér), így valós idejű kinetikus információt szolgáltatnak a sejtek adhéziójáról, mozgásáról és felületen való szétterüléséről [4]. Az evaneszcens mező akkor alakul ki, amikor a megvilágító fény visszaverődik a hullámvezető rács és a szenzorfelület, azaz a lyukat megtöltő folyadékfilm határáról. Ami azt jelenti, hogy az evaneszcens zóna egy elektromágneses mező, amely a szenzorfelülettől távolodva exponenciálisan lecsökken. Maga a detektor egy optikai rács, amely egy nagy törésmutatójú (refractive index – RI) hullámvezető rétegbe van beleépítve. Az optikai rács az alulról megvilágító fény spektrumának csak egy keskeny hullámhossztartományú sávját veri vissza, amely az evaneszcens tér lokális törésmutató értékétől függ (4. ábra), [4]. Egy-egy sejt felületi adhéziója során az evaneszcens tér lefedő lesz a sejt és a ligandum/ szubsztrát kölcsönhatás optikai hosszában. Az RWG

technológiák kompatibiliek a mikrotiter lemezekon megvalósítható mérésekkel. A technológia nagy áteresztő képességű mérések kivitelezésére alkalmas, ahol egyszerre többféle körülmény hatását vizsgálhatjuk ugyanabban az időpillanatban akár kevert populációjú minták esetén.

Az Epic Cardio maximális térbeli felbontása 25  $\mu\text{m}$ , ez akár javítható a bioszenzorhoz tartozó kamea, illetve az optikai tükrök beállításainak megfelelő módosításával, mindazonáltal akár az egyes sejtalkotók vizsgálatára is alkalmas. A bioszenzoros jel jellemzi a sejtek dinamikus tömegűraeloszlását a szenzorfelületen. Az egyes szenzorfelületek 2 mm X 2 mm felületűek és a szenzor egy-egy pixelének területe 25 X 25  $\mu\text{m}^2$ . A szenzor által rögzített adatok a hullámhossz eltolódási értékek. A hullámhossz eltolódási értékeket pm-es nagyságrendben képes érzékelni. A szenzor minden 3. másodpercben felvesz egy újabb hullámhossz eltolódási értéket az idő függvényében, így a mérés ideje alatt valós időben követhetjük a hullámhossz eltolódási eseményeket. Az adott antigén ellen bekövetkező humorális immunválasz során aktiválódó leukociták egyedi sejt szinten történő elemzése bioszenzorok segítségével, a személyre szabott immunmonitorozás egy új technológiáját jelentheti.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. Felhasznált reagensek, eszközök

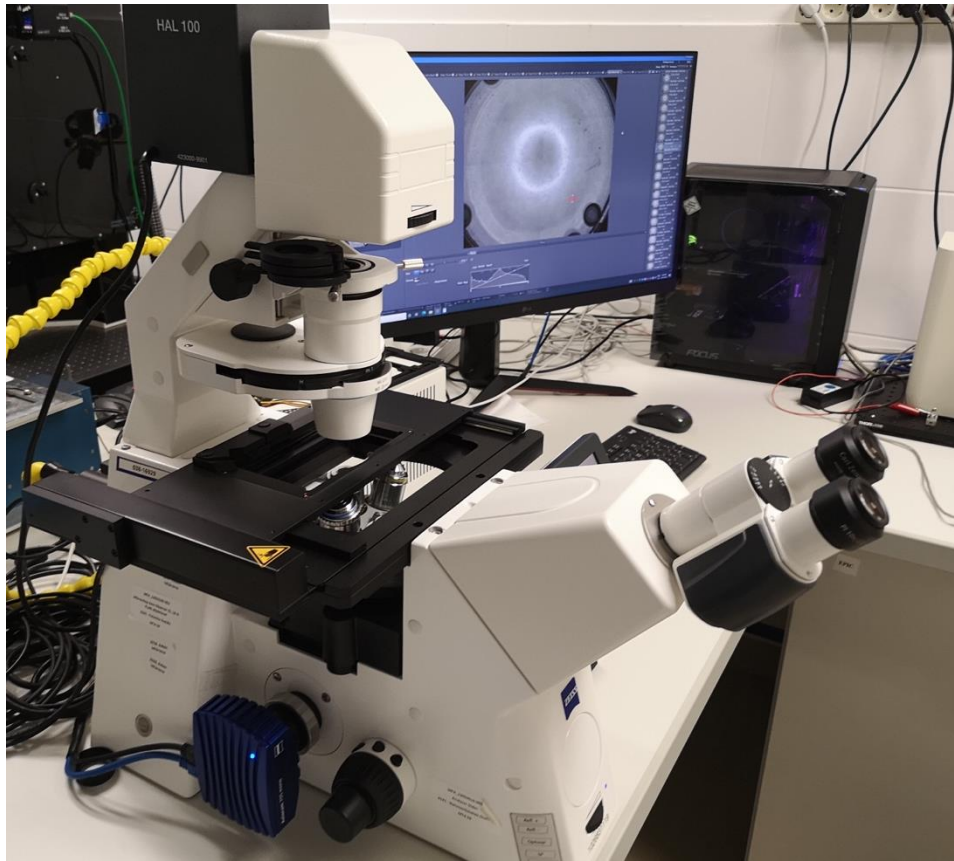
- Foszfát pufferelt sóoldat - dPBS (VWR)
- BSA-*bovine serum albumine*-szarvasmarha szérumalbumin (Sigma Aldrich)
- 10% FCS + RPMI médium (Gibco)
- Fluorofórral konjugált elsődleges monoklonális ellenanyagok (Becton Dickinson):
  - CD13-APC (klón: WM15)
  - CD65-PE (klón: VIM8)
- Fluorofórral konjugált másodlagos antitest (Milipore):
  - Kecse anti-egér IgG-FITC konjugált
- RBC lízis puffer (Roche)
- Paraformaldehid (PFA)
- Wright-Giemsa oldat (Sigma Aldrich)
- Accu-Chek® ujjbegyszűrő láncza
- Tetranátrium-etiléndiamin-tetraacetát (Na<sub>4</sub>EDTA)
- MilliQ víz
- 96 lyukú mikrotiter lemez (Sarstedt)

#### 3.2. Felhasznált sejtek

- THP-1 (ATCC® TIB-202™), humán monocita mieloid leukémiás sejtvonal, RPMI(Gibco) + 10% FCS-ben (Foetális borjú szérum, Biowest) fenntartva
- Humán perifériás vérből preparált leukociták

#### 3.3. Mikroszkópos apparátus

- Zeiss Axio Observer Z1 típusú fluoreszcens mikroszkóp (5. ábra)
- Zeiss Primo Vert fénymikroszkóp
- Zen Blue 3.5 szoftver
- Axio Vision szoftver



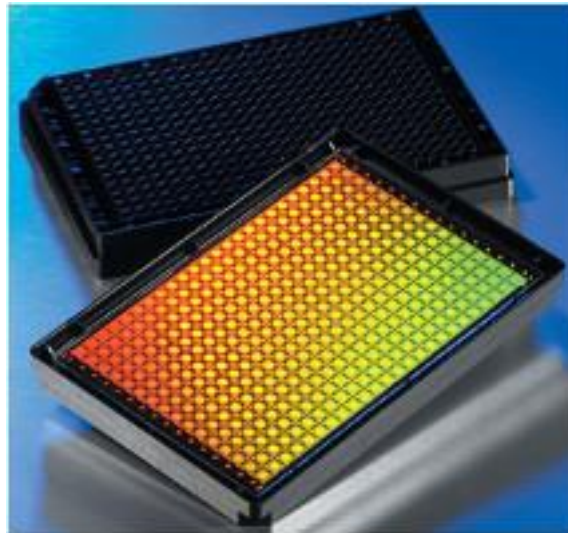
5. ábra: Zeiss Axio Observer Z1 típusú fluoreszcens mikroszkóp (a kép a Nanobioszenzorika Lendület Kutatócsoport laborjában készült)



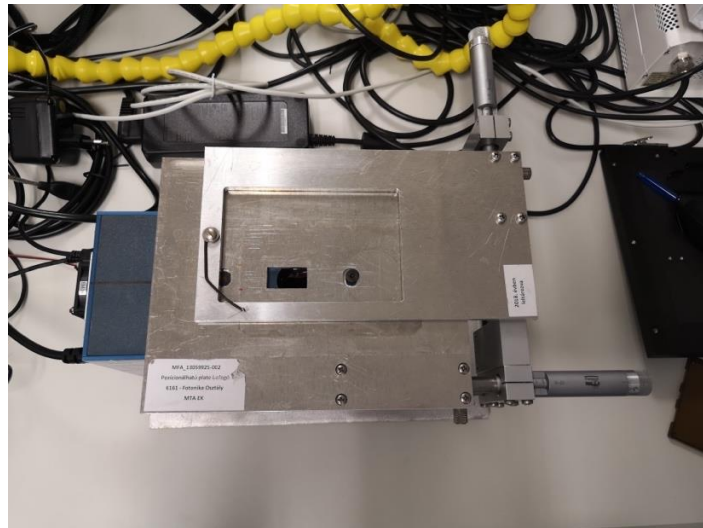
6. ábra: Zeiss Primo Vert fénymikroszkóp (a kép a Nanobioszenzorika Lendület Kutatócsoport laborjában készült)

### 3.4. Epic Cardio rezonáns hullámvezető rácsos optikai bioszenzor

- Epic Cardio RWG optikai bioszenzor (Corning Inc., Corning, NY, USA), (8. ábra)
- 384 lyukú Corning® Epic Biochemical Assay mikrotiter tálca, (7. ábra)



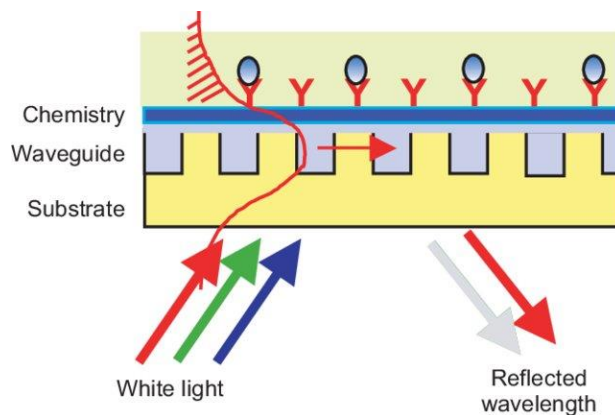
7. ábra: A Corning® Epic Biochemical Assay mikrotiter tálca [10]



8. ábra: Az általam használt Epic Cardio RWG bioszenzor (a kép a Nanobioszenzorika Lendület Kutatócsoport laborjában készült)

A 384 lyukú Epic Corning mikrotiter lemezt alulról világítjuk meg. A fény egy nagy törésmutatójú, vékony hullámvezető rétegbe csatolódik. A rétegben a fény teljes visszaverődések útján

terjed és minden visszaverődés után a fázisa eltolódik. Ezek a fáziseltolódások a megvilágító fény egy bizonyos hullámhosszkomponensét felerősítik, konstruktív interferenciát létrehozva, amely következtében ez a hullámhosszkomponens rövid ideig tovaterjed a hullámvezető rétegben. Ugyanakkor a rács a fény rezonanciafrekvenciájú komponensével szemben monokromatikus tükörként viselkedik, azaz a megvilágító fénynek csak egy rezonáns komponensét tükrözi vissza hullámvezető rétegből. Az érzékelés azon alapul, hogy a teljes visszaverődések során felerősödő és tovaterjedő hullámhosszkomponens a hullámvezető réteg felületének közvetlen környezetének törésmutatójától függ (9. ábra). Ezt a zónát az evaneszcens tér kiterjedése határozza meg. A hullámvezető réteg és a vizes borítás határfelületéről visszaverődő fény exponenciálisan csökkenő elektromágneses mezőt alakít ki, amely meghatározza az evaneszcens teret. Az evaneszcens tér törésmutatójának változása következtében változik a rezonanciafrekvencia, így a kicsatolt hullámhosszkomponens módosul [4].



9. ábra: Az Epic Cardio RWG bioszenzorral végzett mérés sémája. Minden egyes kikötődési esemény az evaneszcens tér törésmutatójának változásában nyilvánul meg, ami a teljesen visszavert rezonanciafrekvenciájú hullámhosszkomponens fáziseltolódásában mutatkozik. [11]

## 3.5. Módszerek

### 3.5.1. Epic Cardio mérés

A bioszenzor egyszerre 12 mikrotiter lyukat tud vizsgálni, 3X4-es elrendezésben.

- 1) A mikrotiter tálca előkészítése, a lyukak megjelölése egy gémpapoccsal végzett karcollással.
- 2) 50-50  $\mu\text{L}$  PBS-sel 1X mosás.
- 3) 50-50  $\mu\text{L}$  PBS adagolása a lyukakhoz, majd centrifugálás (300 x g; 5 min; RT).
- 4) A mikrotiter tálca behelyezése az Epic Cardio bioszenzor mérési platformjába, majd a mikrotiter tálca pozicionálása az Aligner program használatával.
- 5) PBS-es alapvonal felvétele, (30 min).



- 6) PBS kicsapása, majd 50-50  $\mu\text{L}$ , 100 és 10  $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$  koncentrációjú IVIG adagolása (felületkezelés), majd majd centrifugálás (300 x g; 5 min; RT).
- 7) IVIG jel felvétel az Epic Cardio-val, (25 min).
- 8) IVIG kicsapása, majd 3X mosás 50-50  $\mu\text{L}$  PBS-sel.
- 9) Blokkolás 25-25  $\mu\text{L}$  RPMI + 10% FCS oldattal, majd centrifugálás (300 x g; 5 min; RT).
- 10) Blokkolás jelének felvétele Epic Cardio-val, (20 min).
- 11) Sejtszámlálás Bürker-kamra használatával.
- 12) 25-25  $\mu\text{L}$  THP-1/humán leukocita sejtsuszpenzió adagolása ( $\sim \frac{5000 \text{ db sejt}}{25 \mu\text{L}}$ ). A sejteket RPMI + 10% FCS oldatban szuszpendáljuk, a sejtek előzetes PBS-el végzett mosását követően (centrifugálás: 300 x g; 5 min; RT).
- 13) Sejtes jel felvétele, a sejtek megjelenése az evaneszcens térben (60-120 min)

### 3.5.2. Sejtek fixálása

- 1) A bioszenzoros mérés után az egyes lyukakról mikroszkópos felvételeket készítenek.
- 2) Az 50-50  $\mu\text{L}$  sejtsuszpenzióhoz 20-20  $\mu\text{L}$  4%-os PFA adagolása.
- 3) 15 min rögzítés.
- 4) A 70  $\mu\text{L}$  felülúszó eltávolítása és a lyukak mosása 2X, 50-50  $\mu\text{L}$  PBS-sel.
- 5) A rögzített sejtek felvétele 50-50  $\mu\text{L}$  PBS-ben.
- 6) A fixált sejtekről mikroszkópos felvételeket készítenek.

### 3.5.3. Immuncitokémiai protokollok

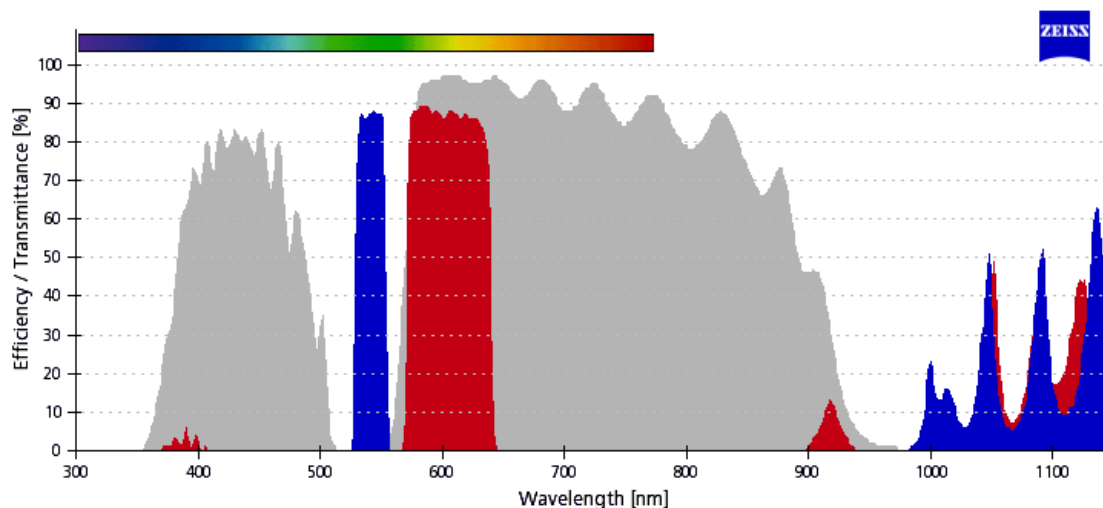
Immuncitokémiai protokollok alkalmazásával azonosíthatóak azok a sejtek, amelyek megjelentek a Corning® mikrotiter tálca evaneszcens terében és hullámhossztolódási jelet generáltak. Az immuncitokémiai protokoll optimalizálását az ellenanyagok titrálásával végeztem. Az általam vizsgált konjugátumok a következők: CD65-PE (klón: VIM8), CD13-APC (klón: WM15) és a FITC konjugált kecske anti-egér IgG másodlagos ellenanyag.

- 1) Blokkolást végzünk 50-50  $\mu\text{L}$  1 m/V%-os, PBS-sel hígított BSA oldattal (20 min).
- 2) A BSA oldat eltávolítása után 25-25  $\mu\text{L}$  elsődleges, fluorofór konjugált antitest oldatot adagolunk a sejtekhez, amellyel specifikusan jelöljük CD markereiket. Az optimális ellenanyagkoncentráció beállításához többféle hígításban is vizsgáljuk hatékonyságukat. A

gyártó által forgalmazott kiserelés 0,2  $\frac{mg}{mL}$  koncentrációjú. Minden esetben 25  $\mu L$  végtérfogatban alkalmaztam az ellenanyagoldatokat, amelyek a hígítási sorom szerint 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 6 és 12  $\mu L$  térfogatban tartalmazták a 0,2  $\frac{mg}{mL}$  koncentrációjú törzsoldatot. Mindazonáltal 1; 2; 4; 8; 16; 48 és 96  $\frac{\mu g}{mL}$  ellenanyagkoncentrációjú titrálási sor szerint vizsgáltam a fluoreszcens jelet. A hígításokat 1 m/V%-os BSA oldattal végeztem.

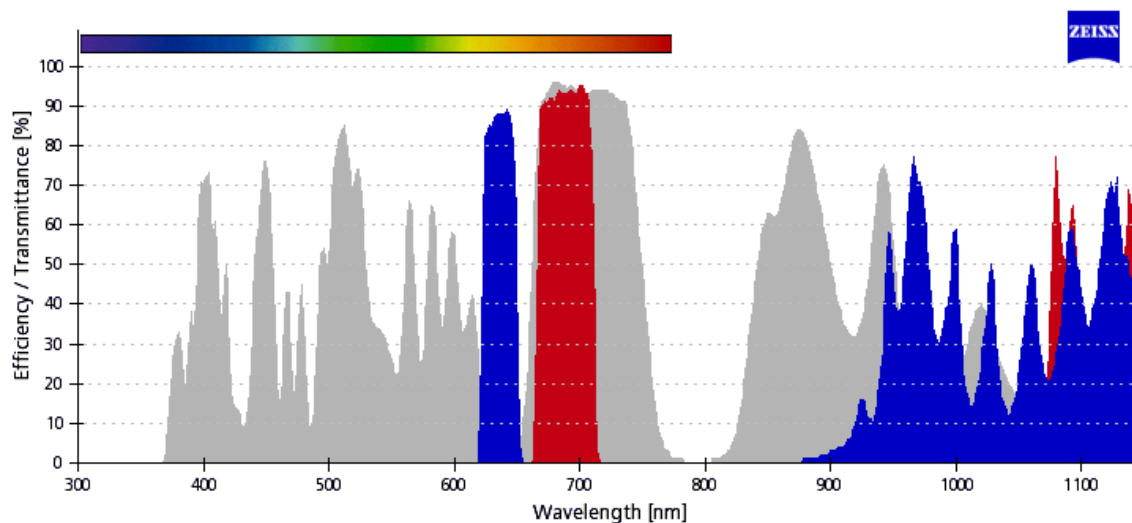
- 3) 25 percen keresztül, 4 °C-on inkubáltam az ellenanyagoldatokkal a sejteket.
- 4) A felülúszót eltávolítottam és 50-50  $\mu L$  PBS-sel mosást végeztem, majd 50-50  $\mu L$  PBS-ben vettem fel a sejteket.
- 5) Másodlagos, kecske anti-egér FITC konjugált antitest alkalmazása esetén a 3) és 4) lépések alapján járok el. A másodlagos antitestet titrálását is elvégeztem, amelyet a gyártó által ajánlott hígítási sor alapján végeztem. 1 : 25; 1 : 50; 1 : 75; 1 : 100; 1 : 125; 1 : 150; 1 : 175; 1 : 200 arányban hígítottam 1%-os BSA PBS-sel hígított oldatával (másodlagos ellenanyag : 1%-os BSA).
- 6) Axio Observer Z1 típusú fluoreszcens mikroszkóppal elemeztem a fluoreszcens jelölés hatékonyságát. A fluoreszcencia a megfelelő gerjesztési hullámhosszú megvilágítás és az alkalmazott fluorofór emissziós spektrumával átfedő fluoreszcens szűrőkocka alkalmazásával jeleníthető meg. A CD13 és a CD65 marker szimultán jelölődését vizsgáltam az APC és a PE fluorofór fényemissziójának detektálásával. Továbbá a FITC konjugált kecske anti-egér másodlagos antitest általi jelölés hatékonyságát is vizsgáltam. Az APC (15. ábra) esetén az 50-es (11. ábra), a PE (14. ábra) esetén a 43-as (10. ábra), valamint a FITC (13. ábra) esetén a 38-as (12. ábra) fluoreszcens szűrőkockát használtam.

Az alábbiakban láthatóak a fluoreszcens mikroszkóp egyes szűrőkockáihoz és a vizsgált fluorofórokhoz tartozó excitációs és emissziós spektrumok. A fluoreszcens szűrőkockákhoz tartozó spektrumokat a Carl Zeiss Microscopy LLC honlapjáról, a fluorofórokhoz tartozó spektrumokat pedig a FluoroFinder weboldalról exportáltam.

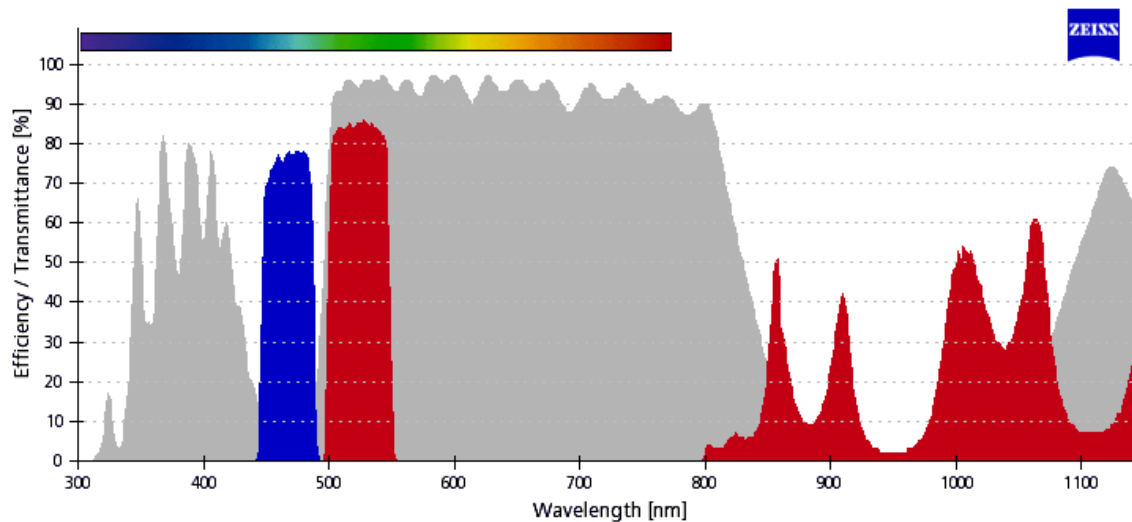




10. ábra: A 43-as fluoreszcens szűrőkocka excitációs és emissziós filtereinek transzmittancia tartományai (ex.: BP 545/25 nm, em.: BP<sup>1</sup> 605/70 nm). A diagramon késsel az excitációs, pirossal az emissziós filter transzmittancia tartományai vannak jelölve. [12]

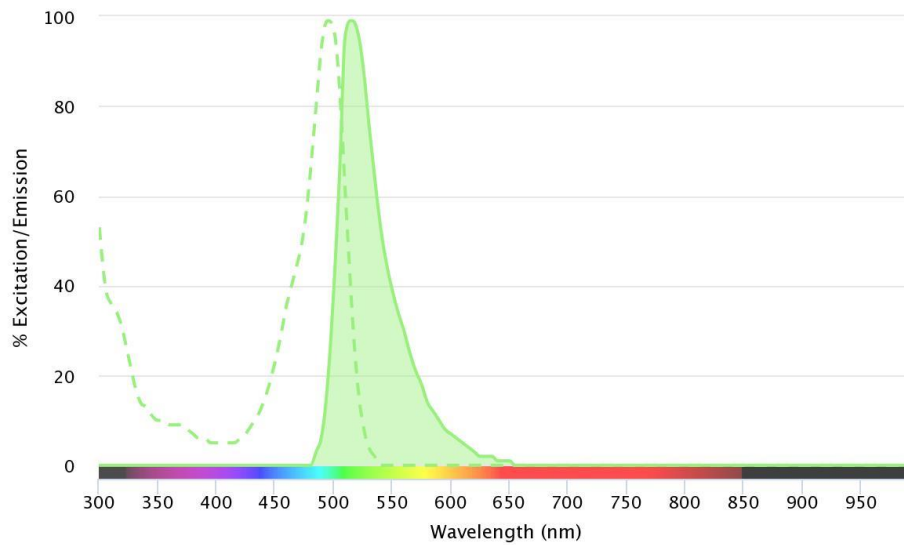


11. ábra: Az 50-es fluoreszcens szűrőkocka excitációs és emissziós filtereinek transzmittancia tartományai (ex.: BP 640/30 nm, em.: BP 690/50 nm). A diagramon késsel az excitációs, pirossal az emissziós filter transzmittancia tartományai vannak jelölve. [12]

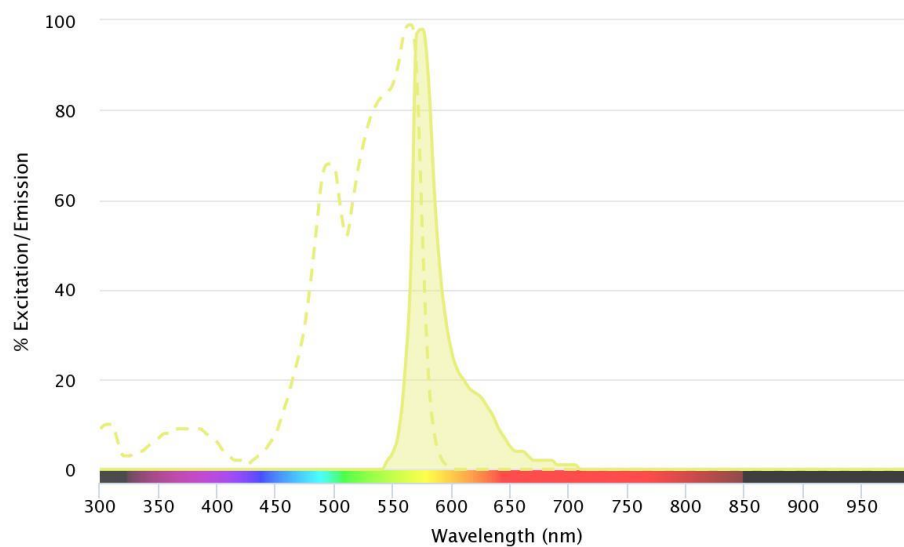


12. ábra: A 38-as fluoreszcens szűrőkocka excitációs és emissziós filtereinek transzmittancia tartományai (ex.: BP 470/40 nm, em.: BP 525/50 nm). A diagramon késsel az excitációs, pirossal az emissziós filter transzmittancia tartományai vannak jelölve. [12]

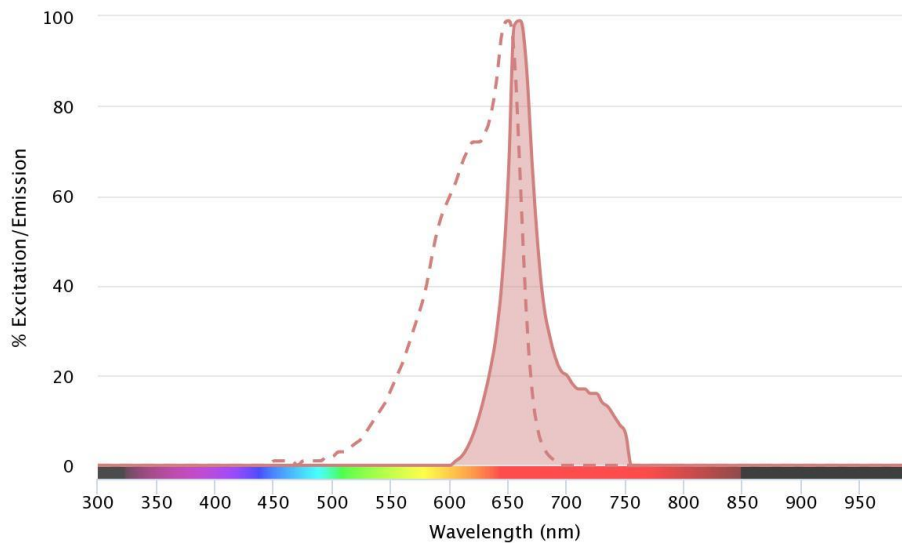
<sup>1</sup> A BP a band pass rövidítése, ami a filter típusára vonatkozik. A band pass filterek adott hullámhossztartományban transzmittálnak, például a BP 605/70 filter 570 nm és 640 nm között transzmittál.



13. ábra: A FITC fluorofór excitációs és emissziós tartománya. A szaggatott vonallal jelzett görbe alatti területhez tartozó hullámhossztartományon excitálható, míg a folytonos vonallal jelzett görbe alatti területhez tartozó hullámhossztartományon emittál a FITC. [13]



14. ábra: A PE fluorofór excitációs és emissziós tartománya. A szaggatott vonallal jelzett görbe alatti területhez tartozó hullámhossztartományon excitálható, míg a folytonos vonallal jelzett görbe alatti területhez tartozó hullámhossztartományon emittál a PE. [13]



15. ábra: Az APC fluorofór excitációs és emissziós tartománya. A szaggatott vonallal jelzett görbe alatti területhez tartozó hullámhossztartományon excitálható, míg a folytonos vonallal jelzett görbe alatti területhez tartozó hullámhossztartományon emittál az APC. [13]

#### 3.5.4. Wright Giemsa hematológiai festés

- 1) PBS felülúszó eltávolítása a sejtekről
- 2) Hígítatlanul 25-25  $\mu\text{L}$  May-Grünwald vagy Wright-Giemsa oldat adagolása.
- 3) 5 min inkubációs idő, szobahőmérséklet, óvatos rázatás.
- 4) Az oldatok lepipettázása.
- 5) 2X 50-50  $\mu\text{L}$  MilliQ (MQ) vizes mosás
- 6) A sejtek felvétele 50-50  $\mu\text{L}$  MQ vízben.
- 7) Mikroszkópos felvételek készítése birghtfield/transzmissziós üzemmódban.

#### 3.5.5. Leukocita preapráció humán perifériás vérből

A perifériás vér leukocitáinak preparációját a saját vérem használatával végeztem, a Lendület Nanobioszenzorika Kutatócsoportban a vérrel végzett kísérletek kivitelezésére kialakított Véres Laborban. A vérrel való munkavégzés során elengedhetetlen a specifikus előírások betartása. A munkafelületek fertőtlenítése, a veszélyes hulladéknak minősülő laborszerek és felhasznált reagensek semlegesítése, szeparált gyűjtése és megsemmisítése elengedhetetlen a kontrollált, szabályos munkavégzés végrehajtásához.

- A munkafelület fertőtlenítése 70%-os etil-alkohollal.
- Az érvételi testfelület fertőtlenítése antibakteriális fertőtlenítő spray-vel.
- Az ujjbegyszűrő lándzsa használatával 50-100  $\mu\text{L}$  perifériás vér pipettázása Eppendorf-csőbe.

- A vér azonnali antikoagulálása (alvadásgátlása) 20  $\mu\text{L}$  0,5 mM-os, PBS-sel hígított tetranátrium-etiléndiamin-tetraacetát ( $\text{Na}_4\text{EDTA}$ ) oldattal (Sigma Aldrich)
- 200  $\mu\text{L}$  RBC (vörösvérsejt) lízis puffer hozzáadása az antikoagulált vérhez.
- A vért és a hozzáadott reagenseket tartalmazó Eppendorf-cső állandó forgatása 10 percen keresztül.
- Centrifugálás: 2500 x g, RT, 5 min
- A lizált vörösvérsejteket tartalmazó felülúszó eltávolítása, majd a leukocitákat tartalmazó pellet fellazítása után újabb 200  $\mu\text{L}$  RBC lízis puffer adagolása.
- Centrifugálás: 2500 x g, RT, 5 min
- A lizált vörösvérsejteket tartalmazó felülúszó eltávolítása, majd a leukocitákat tartalmazó pellet fellazítása.
- A preparációt követő bioszenzoros méréshez szükséges sejtszámtól függően 10% FCS + RPMI oldatával hígítom a leukocita preparátumot.
- A szükséges hígítás kiszámításához nem végzek Bürker-kamrás sejtszámlálást, hanem az irodalmi adatokra hagyatkozva 250000-500000 sejt/ $\mu\text{L}$  sejtkoncentrációval számolok.

## 4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

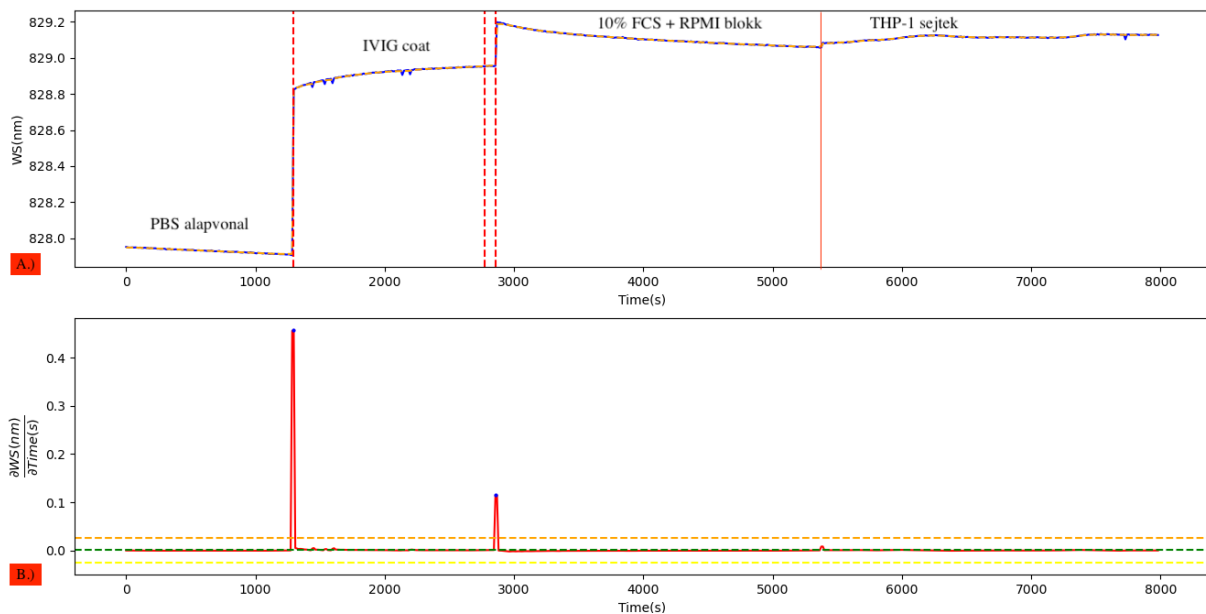
### 4.1. Az Epic Cardio hullámvezető rácson bioszenzorral végzett mérések

Kutatásunk jelenlegi fázisának célkitűzése az Epic Cardio-val végzett mérés során aktiválódó sejtek azonosítása és a bioszenzoros jelek értelmezése az egyedi sejtek szintjén. Elméletünk szerint az adott antigénnel kiváltott humorális immunválasz során az effektor sejtek aktivációját kísérő biofizikai paraméterek változása jellemzhető akár az egyedi sejtek szintjén, a nagy időbeli és térbeli felbontással rendelkező bioszenzorok használatával.

Kezdetben a THP-1 sejtvonal alkalmazásával végeztünk méréseket, ahol a PBS-el felvett alapvonal rögzítése után a szenzorfelületet IVIG-gel funkcionálisítottuk. A  $100 \frac{\mu g}{mL}$  koncentrációjú IVIG-et  $50 \mu L$  térfogatban alkalmaztuk a mikrotiter tálca összes lyukában. Az szenzorfelületre kikötődött IVIG indukálja a monocita sejtek aktivációjára jellemző frusztrált fagocitózist. Az IVIG a szenzorfelületre való kötődése során belép a szenzorfelület közelítőleg  $150 \text{ nm}$  kiterjedésű evaneszcens terébe, amely a közeg lokális törésmutatójának megváltozását idézi elő, amely következtében módosul a hullámvezető réteg rezonancia frekvenciája és a kicsatolt hullámhosszkomponens. Ezeket a hullámhossz eltolódási eseményeket rögzíti a szenzor és 12 másodpercenként dinamikus tömeg újraelosztás (dynamic mass redistribution (DMR)) fájlkat generál. A hozzávetőlegesen 30 perces coat-olás végeztével a felületre nem kötődő, oldatban maradt IVIG-et 3 X mossuk  $50-50 \mu L$  PBS-sel, mivel inhibeálná a monociták fagocitózist. Annak érdekében, hogy a sejtek aspecifikus felületi kitapadásából származó hullámhossz eltolódási eseményeket kizárjuk, az IVIG-gel végzett felületfunkcionálisítás után az üresen maradt felületi régiókat  $25-25 \mu L$  10% FCS-t tartalmazó RPMI médiummal blokkoltuk. Az FCS-ben lévő fehérjék kitöltik az üresen maradt felületszegmenseket. A 25 perces blokkolás után a sejteket hozzáadjuk az egyes lyukakhoz és körülbelül másfél, két órán át vizsgáljuk a kikötődési eseményeket.

Az bioszenzoros mérés alatt generált DMR fájlkat feldolgozását és kiértékelését egy Python kód használatával végeztem. A program futtatása során betölthető a legutolsó bioszenzoros felvételt. A felvételek maximálisan  $25 \mu m$  felbontásúak. Az egyes pixelek színét a hullámhossz eltolódási események határozzák meg. A sejtek kitapadásának kinetikája és a sejtaktiváció folyamata meghatározza a detektált hullámhossz eltolódás nagyságát, mivel ekkor a sejtek belépnek a szenzorfelület evaneszcens terébe. Ekkor a program a sejt ként felismert pixelt egy markerrel prezentálja és betölti a pixelhez tartozó hullámhossz eltolódási eseményt. A görbék felfutása és a képi információ alapján lehet döntést hozni a jel tényleges sejt eseményként történő elfogadásáról. Minden sejt ként felismert objektum validitásának ellenőrzését manuálisan kell elvégezni. A sejtek kiválogatása sokszor nem egyértelmű, mivel egy-egy pixel aktiválódása esetén a környezetében lévő további 6-8 pixel is aktiválódik. A program a sejt eseményként értelmezett hullámhossz eltolódási jelekkel dolgozik

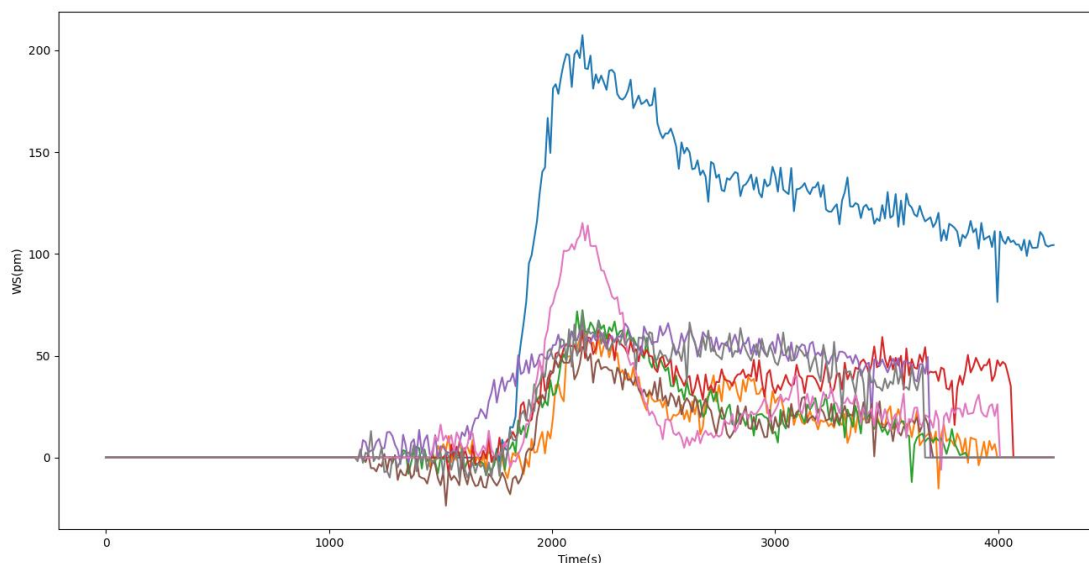
tovább. Az adott mikrotiter tálca lyukban bekövetkező hullámhosszeltolódási eseményeket a szenzor pm-es nagyságrendű érzékenységgel képes detektálni. A mérés teljes idejére nézve átlagolhatóak a görbék. Az idő függvényében ábrázolva az átlagolt hullámhosszeltolódási görbéket, a mérés egyes fázisai egyértelműen megkülönböztethetővé válnak. A fentebb ismertetett protokoll alapján felosztható PBS-es alapvonalra, IVIG felületkezelés szakaszra, blokkoló fázisra, valamint a sejtek vizsgálatának szakaszára (16. ábra). A protokoll egyes fázisai között tapasztalható hullámhosszeltolódási értékek idő szerinti parciális deriváltját ábrázolva az idő függvényében, a mérés egyes szakaszainak különbségeiről kapunk információt.



16. ábra: Az Epic Cardio bioszenzoros mérés egy lyuka esetén tapasztalható hullámhosszeltolódási görbék átlaga A.), valamint a protokoll lépései között tapasztalható különbségek B.). Az diagramokon a hullámhosszeltolódás WS (wavelength shift) rövidítéssel van jelölve.

Mivel a szenzorfelület funkcionálisát minden mérés során  $100 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$  koncentrációjú,  $50 \mu\text{L}$  IVIG-gel végeztem, a hullámhossz eltolódási görbék első három szakasza nem ad többletinformációt a mérések értékeléséhez. Ugyanakkor a sejtaktiváció egyedi sejt szinten történő elemzéséhez elengedhetetlen a hullámhossz eltolódási görbék utolsó szakaszának jellemzése. A görbék sejtes szakaszának felfutási és/vagy lecsengési karakterisztikája és a maximális hullámhossz eltolódás a nem differenciált THP-1 sejtek esetén is mutat eltéréseket.

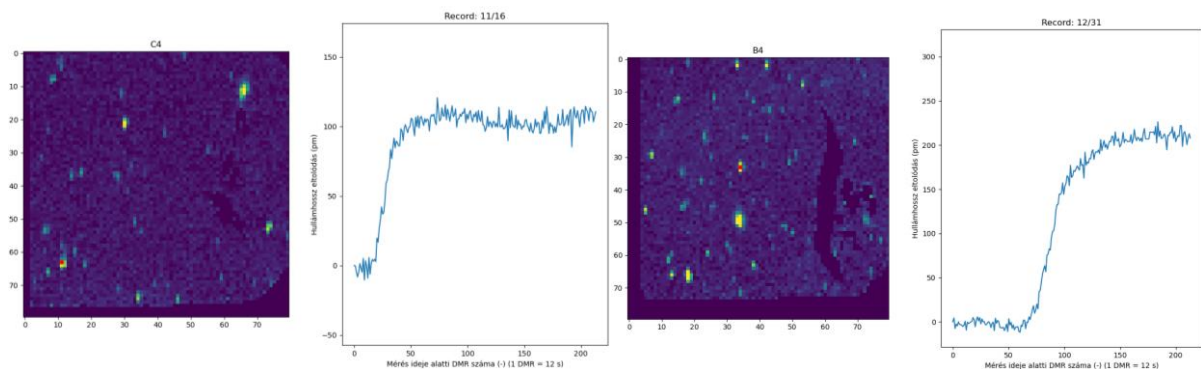
A kiértékelő program által felismert, sejtaktivációból fakadó hullámhosszeltolódási események manuális ellenőrzése után az egyedi sejteket jellemző görbék ábrázolhatók. Mivel a sejtaktiváció során tapasztalható hullámhosszeltolódás a korábbiak töredéke, érdemes a görbéket a sejtek adagolásának időpillanatában megvágni, ezzel kialakítva a sejtes alapvonalat (17. ábra).



17. ábra: Az adott lyukban felismert sejtek hullámhossz eltolódási görbéi. A mérés előzetes fázisainak levágásával alakítottam ki a sejtes alapvonalat.

A manuális ellenőrzés során a program egy markerrel megjelöli a sejként felismert pixeleket és hozzájuk rendeli a hullámhossz eltolódási görbét. A görbék karakterisztikája jellemzi a THP-1 sejtek IVIG-gel indukált aktivációját. A hullámhossz eltolódási görbék feldolgozásakor többféle karakterisztikát tapasztaltam. A mérések mind a 12 lyukának hullámhossz eltolódási görbéit tanulmányoztam, majd három kategóriát alakítottam ki a görbék alakja szerint. Azokat a görbéket azonos kategóriába soroltam, amelyek alakjukat ugyan nem változtatják, de a maximális, illetve minimális hullámhossz eltolódási értékeik távol esnek egymástól. A karakterisztika megbízható funkcionális analízise a mérések többszöri ismétlését és a sejtek biofizikai paramétereinek további elemzését igényli. A meredeken felfutó, egyszeri ugrást mutató görbék arra adnak következtetést, hogy egyetlen sejt tapadt ki a bioszenzor adott régiójában. A kitapadás akkor tekinthető stabilnak, ha a megugró hullámhossz eltolódási görbe beáll az adott hullámhossz értékre egészen a mérés végéig. A kitapadás sebességére a görbe felfutási szakaszának meredekségéből lehet következtetni. A jobban szétterülő, nagyobb szenzorfelületet beborító sejtek több pixelt is aktiválnak, amelyet a kiértékelő program sok esetben több sejként ismer fel. A szétterülő sejtekhez tartozó maximális hullámhossz eltolódási értékek kisebbek. Abban az esetben, ha a sejtek kitapadásának kinetikai görbéiben a mérés utolsó fázisában lecsengést tapasztalunk, akkor a kitapadás nem mondható stabilnak, amelyből az adott sejt elmozdulására lehet következtetni. A mérés ideje alatt készített felvételeket lépéről-lépésre végigkövetve következtetések vonhatóak le az egyes sejtek motilitására. A sejtek motilitásának pontos nyomonkövetésére az Epic Cardioval végzett mérés nem ideális, mivel nem tesz lehetővé 3 dimenziós térbeli elemzést.

Az alábbi ábrákon bemutatom a THP-1 sejtek kitapadásának kinetikáját leíró három legjellemzőbb hullámhossz eltolódási görbét. Ezek több mérés eredményeiből származnak, viszont minden esetben a fentebb említett felületkezelési paramétereket alkalmaztam. Az ábrák bal oldalán látható a mérés utolsó időpillanatában készített felvétel, amelyen a piros marker jelöli a bioszenzor adott térrészében detektált sejtet (18. ábra). Az ábrák jobb oldalán a detektált sejthez tartozó hullámhossz eltolódási görbe látható. A hullámhossz eltolódási görbéket a korábban említett módon, a sejtes alapvonalnál vágtam meg. A szenzor a mikrotiter tálca egyes lyukainak középső 2 X 2 mm-es zónája, amelyben beágyazva található a nagy törésmutatójú hullámvezető rács. Az hullámvezető rácsba bekapcsolt fény rezonancia frekvenciájú hullámhossz komponensének eltolódása pm-es tartományba esik. A szenzor a mérés ideje alatt 12 másodpercenként új hullámhossz eltolódási értéket rögzít, amelyet dinamikus tömeg újraelosztásnak szokás nevezni (DMR – dynamic mass redistribution).

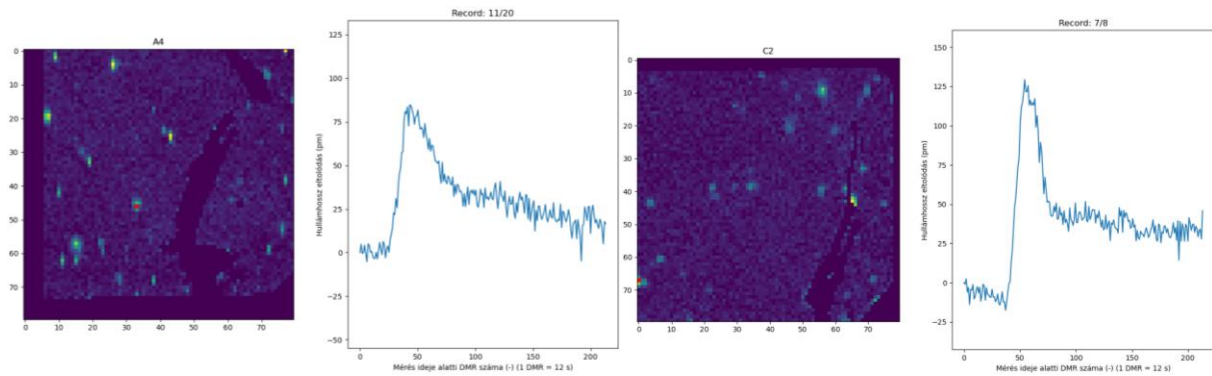


18. ábra: A C4-es és a B4-es mikrotiter tálca lyukakban tapasztalható „a” karakterisztikájú jellemző hullámhossz eltolódási görbék.

A mérést érdemes a lehető legtovább végezni, mivel sok esetben pont egy éppen bekövetkező hullámhossz felfutási esemény szakaszában állítjuk le a mérést.

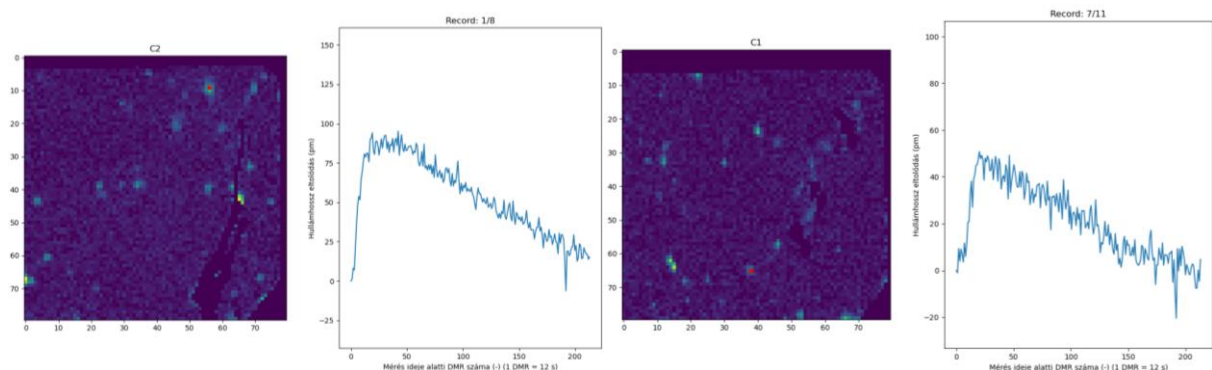
Egy másik jellemző karakterisztika esetén a görbe felfutási szakasza után a mérés utolsó fázisában a hullámhossz eltolódásban csökkenés tapasztalható (19. ábra). Ebből azt a következtetést lehet levonni, hogy a kitapadt sejt aktivációja során szétterült a felületen, amely következtében az evanescens térben a szenzorfelülettől számított vertikális kiterjedése kisebb lett, az optikai sűrűsége csökkent, amely a hullámhossz eltolódás csökkenéseként tapasztalható. Ugyanakkor a horizontális kiterjedése nőtt, amely következtében a készített felvételen több pixel aktiválódása tapasztalható, mivel nagyobb szenzorfelületet borít be a sejt. A szétterülés kinetikájára a görbe lecsengő szakaszának meredekségéből tudunk következtetni.





19. ábra: Az A4-es és a C2-es mikrotiter tálcák lyukakban tapasztalható „b” karakterisztikájú jellemző hullámhossz eltolódási görbék.

A hullámhossz eltolódási görbékben sok esetben a lecsengő fázis egészen visszaesik a sejtes alapvonalig, vagy akár még tovább csökken. Erre a karakterisztikára adhat magyarázatot a THP-1 sejtek frusztrált fagocitózisa, amely során az IVIG-hez az Fc receptoraival kötődő és aktiválódó sejtek a frusztráció következtében szekretált molekulák, például reaktív oxigén gyökök, egyes enzimek elkezdik részlegesen emészteni az IVIG coatot, ezzel az evanescens tér lokális sűrűségének csökkenésén keresztül a közeg törésmutatója is csökken, mindazonáltal a hullámhossz eltolódási görbe visszaesik a sejtes alapvonalnál felvett hullámhossz értékre (20. ábra).

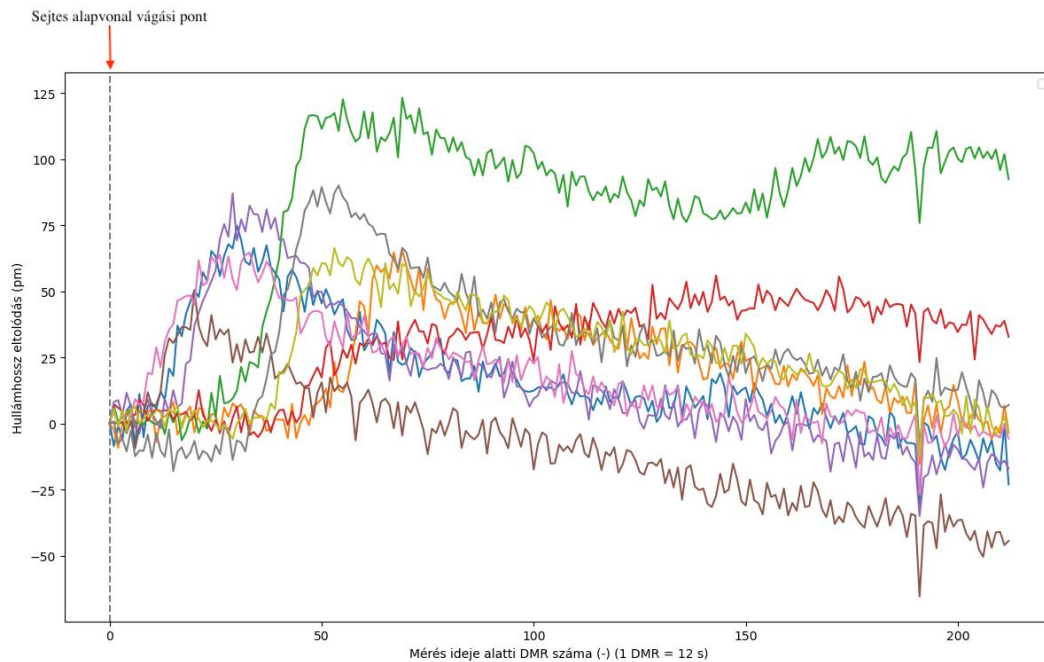


20. ábra: A C2-es és a C1-es mikrotiter tálcák lyukakban tapasztalható „c” karakterisztikájú jellemző hullámhossz eltolódási görbék.

Ahhoz, hogy egyértelmű következtetéseket vonjunk le a THP-1 sejtek aktivációja során lejátszódó biofizikai paramétereik jellemzése által, elengedhetetlen további bioszenzoros mérések kivitelezése, például a szintén optikai elven működő HoloMonitor (Digital holographic imaging) használatával. A technológia előnye, hogy hosszútávú (akár több napos) mérések kivitelezésére is alkalmas, mivel inkubátorba helyezhető, megfelelő közeget biztosítva a sejtek életképességét és szintén jelölés mentes vizsgálatok végezhetőek általa. Az Epic Cardio-val a szoros hőmérséklet szabályozás

nem kivitelezhető, amely a közeg törésmutatójának hőmérsékletfüggésén keresztül befolyással lehet a mérésre.

A THP-1 leukémiás monocita sejtvonallal végzett kísérletek eredményeit összefoglalva elmondható, hogy  $100 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$  IVIG coat-tal funkcionálizálva a szenzorfelületet minden kitapadó sejt esetén tapasztalható a frusztrált fagocitotikus aktivitással magyarázható hullámhossz eltolódási esés. Az általam elvégzett 12 párhuzamos mérés hullámhossz eltolódás eseményeinek átlagait összehasonlítva, látható a görbék utolsó fázisában megjelenő lecsengő szakasz.



21. ábra: A THP-1 sejtekkel végzett Epic Cardio bioszenzoros mérések hullámhossz eltolódási átlagait összehasonlító ábra

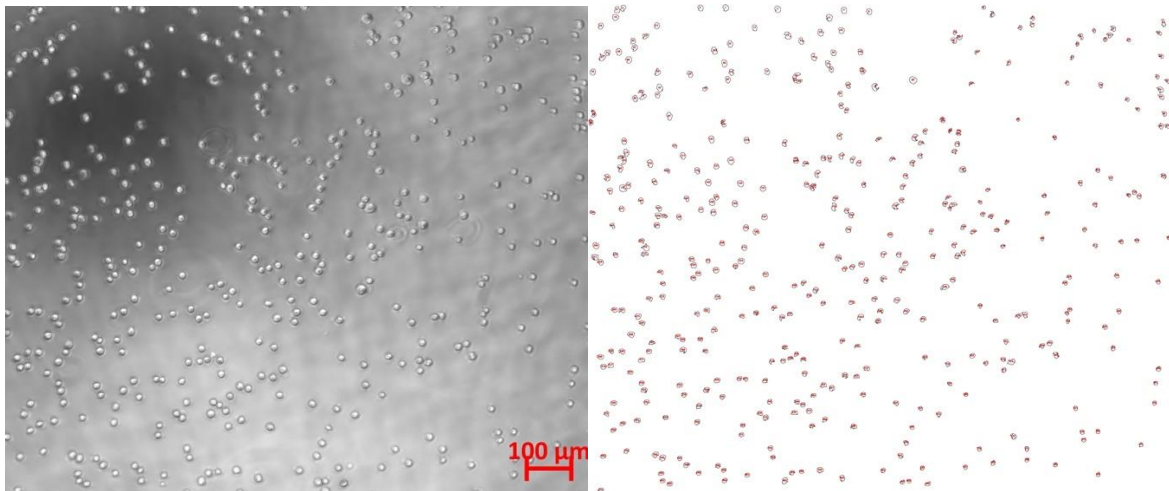
## 4.2. A sejtek fixálásának hatékonysága

Az Epic Cardio optikai hullámvezető rácson bioszenzorról végzett mérést követően 4 w/w %-os PFA-val végeztem a fixálást. A fixálás elődleges célja, hogy a bioszenzoros mérés során hullámhossz eltolódási jelet generáló sejtek a fluoreszcens ellenanyagokkal végzett specifikus jelölés és a hematológiai festések után is azonosíthatóak legyenek. Az ideális fixáló reagens nem, vagy minimálisan módosítja a sejtek specifikus felületi markereit.

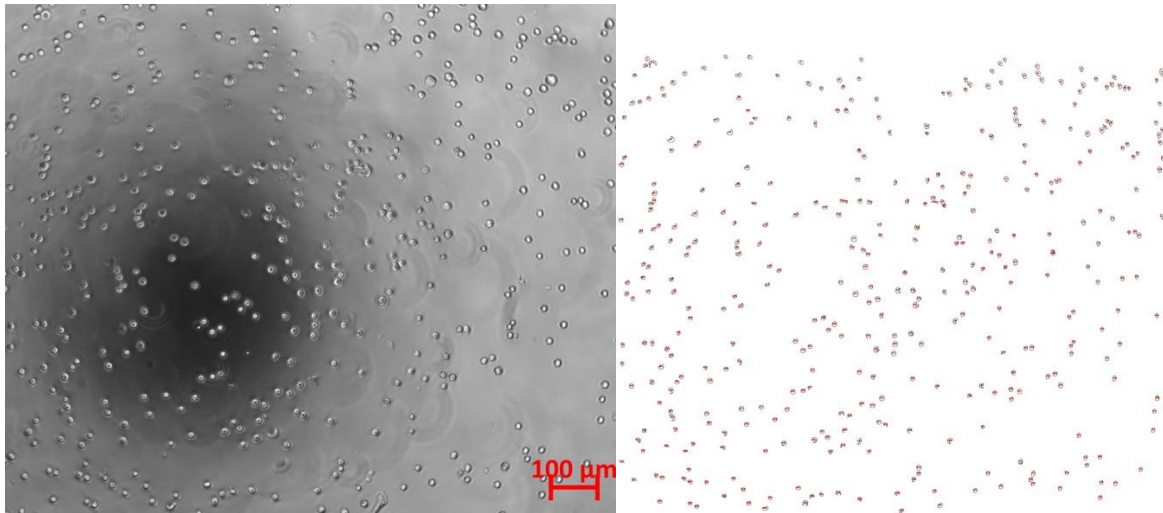
A 384 lyukú Corning mikrotiter lemez egyes lyukaiban alkalmazható, maximálisan 70  $\mu\text{L}$  térfogat limitálja a lehetőségeket. Kezdetben a sejtuszpenzió felülúszójának eltávolítása után az egyes

lyukakat színültig töltve PFA-val végeztük a fixálást, azonban ez az eljárás lényegesen módosította sejtek morfológiáját, szétterült, ellaposodott sejtek megjelenését tapasztaltam a mikroszkópos vizsgálat során. Mindezt úgy tudtam kiküszöbölni, hogy a fixáló oldatot közvetlenül a sejtszuszpenzióhoz adtam, maximálisan kihasználva a 70  $\mu\text{L}$  térfogatot. Egy további fontos tényező fixálás időtaramának optimalizálása. A túl hosszán végzett fixálás roncsolja a sejteket. A 10 percen keresztül szobahőmérsékleten végzett fixálás optimálisnak bizonyult az általam használt 4  $\frac{\text{w}}{\text{w}}\%$ -os, PBS-sel hígított PFA oldattal. Egy további kritikus paraméternek bizonyult, hogy a fixálás végeztével hányszor mossam PBS-sel a sejteket, illetve a fixáló ágenst és a sejt felülűszót milyen módon távolítsam el. Kezdetben a felülűszó kicsapásával próbálkoztam, mivel ez az eljárás a leginkább reprodukálható. A mechanikai behatás következtében jelentős csökkenést tapasztaltam a sejtszámban. Mindazonáltal a felülűszó óvatos, pipettával végzett leszívása bizonyult a leghatékonyabbnak. A sejtveszteség minimalizálása érdekében az utolsó 5  $\mu\text{L}$ -t nem pipettáztam le, amelyet 50-50  $\mu\text{L}$  PBS-sel mostam ki. A mosási lépés betartása elengedhetetlen, mivel az aldehid alapú fixálószer a fehérjék aminos-csoportjaival reagálva fluoreszcens terméket képeznek, amely a fixálást követő fluoreszcens vizsgálat eredményét befolyásolhatja.

A fixálás hatékonysága számszerűsíthető a kezdeti és az eljárás utáni sejtszám arányával. Az ImageJ program használatával megszámlálhatóak a mikroszkópos felvételen látható sejtek. Az alább két felvételt alapján demonstrálom a fixálás hatékonyságát.



22. ábra: 10X-es nagyításban, a fixálás előtt készített brightfield mikroszkópos felvétel THP-1 sejtekkel (jobb), ImageJ programmal konvertált kép (bal), amelyen a felismert sejtek számozva láthatók.



23. ábra: 10X-es nagyításban, fixálás és mosás után készített brightfield mikroszkópos felvétel THP-1 sejtekkel (jobb), ImageJ programmal konvertált kép (bal), amelyen a felismert sejtek számozva láthatók.

A fixálás előtti 410 sejtet számolt a program, míg a fixálás után 394-et, amely azt jelenti, hogy a fixálási protokollal a sejtek ~96%-a rögzül, valamint a felvételek alapján a pozíciójukban sem következik be jelentős változás.

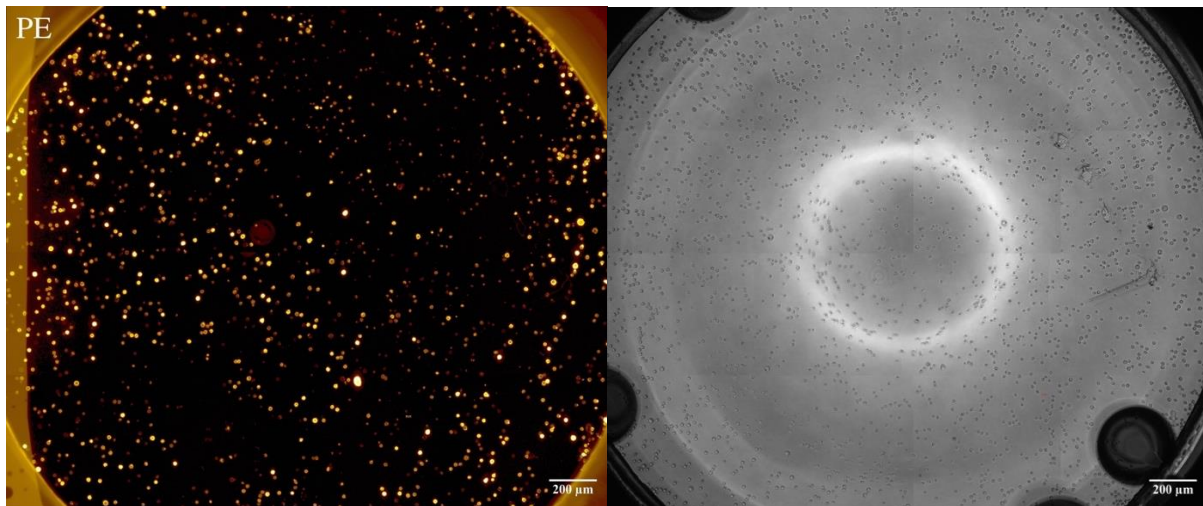
### 4.3. Immuncitokémiai protokollok értékelése

Az immuncitokémiai protokollok alkalmazásával a sejtek kémiai összetételét jellemezzük az immunrendszer „eszköztárával”, azaz specifikus antigén-antitest reakciók segítségével, amelyek láthatóvá tétele az antitesthez konjugált fluorofórok fényemisszióján keresztül történik. Az immuncitokémiai protokollok optimalizálását a THP-1 akut mieloid leukémiás sejtvonal használatával végeztem. A sejtek CD65 és CD13 markerének jelölése fikoeritrin konjugált VIM8-as és allofikocianin konjugált WM15-ös elsődleges monoklonális antitest klónnal sikeresnek bizonyult.  $25 \mu\text{L}$ ,  $200\,000 \frac{\text{sejt}}{\text{mL}}$  koncentrációjú sejtuszpenzióra optimalizáltam a protokollokat. Azt a minimális ellenanyag koncentrációt kerestem, amely alkalmazása mellett a fluorofór konjugátumot az excitációs hullámhossztartományában gerjesztve, a sejtek azonosítására alkalmas intenzitású fluoreszcens emissziót tapasztalok. Az alkalmazott monoklonális antitestek a specificitásuk ellenére kialakíthatnak a mikrotiter tálca felületén nem specifikus ionos kötéseket, illetve az Fc receptorral rendelkező sejtekhez is aspecifikus módon kötődhetnek. Az antitestek specificitásából származó fluoreszcens jelet befolyásolhatják a sejtek anyagcserefolyamatai során felszabaduló, konjugált kettős kötéseket tartalmazó molekulák, például a flavonoidok, amelyek delokalizált elektronrendszere a látható fény adott hullámhossztartományában excitálható. A gerjesztett elektronok a többletenergiát fényemisszió formájában adják le, amely az alkalmazott fluorofór emissziójának intenzitását növelheti, ha az



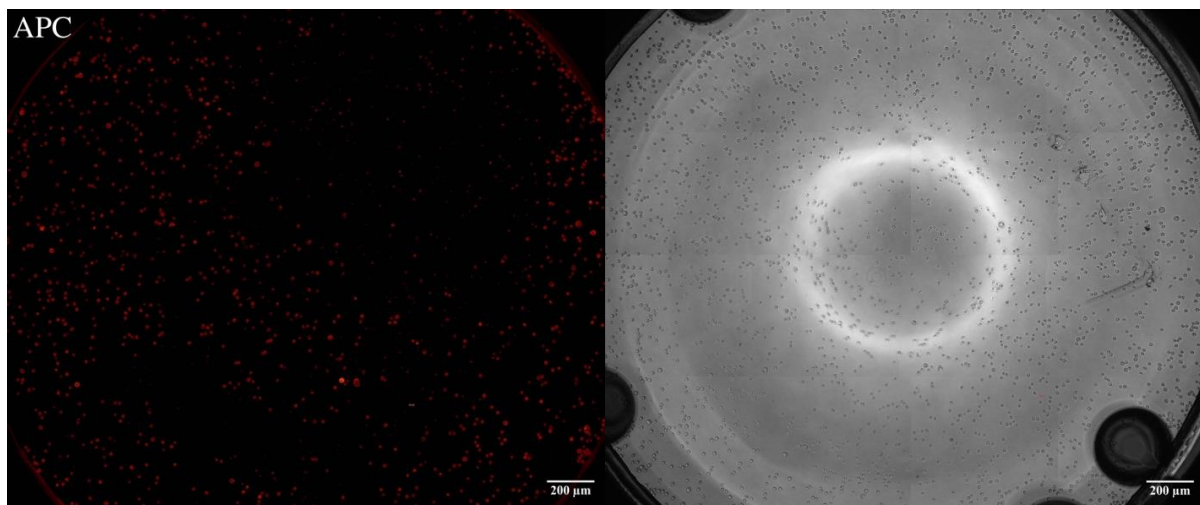
alkalmazott fluoreszcens szűrőkocka emissziós szűrőjének transzmissziós hullámhossztartományába esik. Az aspecifikus kötésekből származó perturbáló fluoreszcens jelenségeket blokkoló reagensek alkalmazásával és a jelölést követő mosási lépések betartásával lehet minimalizálni. Az általam blokkolásra alkalmazott  $1 \frac{w}{v}$  %-os, PBS-sel hígított BSA oldat és a fluoreszcens jelölést követő 2 X-es, PBS-sel végzett mosással minimalizálható a háttér fluoreszcencia intenzitása. Az ellenanyagok hígítását is a blokkoló oldattal végeztem.

Az ellenanyagok titrálása során a PE konjugált VIM8-as klón puffere már  $1 \frac{\mu g}{mL}$  koncentrációban és 25  $\mu L$  térfogatban alkalmasnak bizonyult a CD65 marker jelölésére, de alacsony fluoreszcencia intenzitást tapasztaltam és kevés sejt jelölése valósult meg 1700 ms expozíciós idő mellett. Az ellenanyagpuffer koncentrációját tovább növelve azt tapasztaltam, hogy egy telítési görbe szerint egy adott koncentráció felett már nem növelhető a fluoreszcencia intenzitás. Mindez a specificitást hordozó marker expressziós szintjétől függ. A CD65 marker jelölésére alkalmas VIM8-as klón esetén a telítési koncentráció  $16 \frac{\mu g}{mL}$ -nek bizonyult. A titrálás eredményeiből megállapítható, hogy az optimális CD65-PE (klón: VIM8) ellenanyagpuffer koncentrációja  $8 \frac{\mu g}{mL}$ , 200 000  $\frac{sejt}{mL}$  koncentrációjú THP-1 sejtszuszpenzió alkalmazása esetén. Ekkor 3500 ms expozíciós idővel készítettem monokromatikus felvételeket Zeiss Axio Observer fluoreszcens mikroszkóppal. A készített felvételeket utólagosan színeztem a PE-re jellemző fényemisszió alapján.



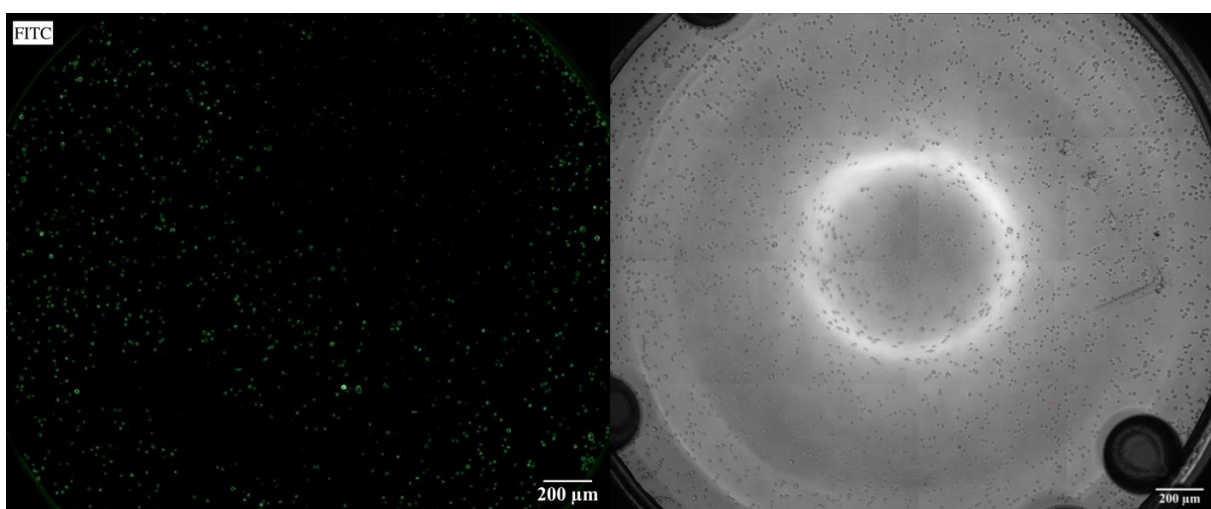
24. ábra: CD65-PE (klón: VIM8) monoklonális antitesttel megvalósított jelölés (bal). Az ellenanyag  $8 \frac{\mu g}{mL}$  koncentrációban, 25  $\mu L$  térfogatban alkalmazva, kezdetben közelítőleg 5000 db sejtet tartalmazó 200000  $\frac{sejt}{mL}$  koncentrációjú szuszpenzióhoz. Fluoreszcens mikroszkóp beállításai: 3500 ms expozíciós idő, reflexiós üzemmód, 43-as fluoreszcens szűrőkocka (ex.: BP 545/25 nm, em.: BP 605/70 nm), 4 X 4-es összeillesztett kép, 20 X-os nagyításban készített felvételek. A felvétel utólag színezve. A mintáról brightfield, transzmissziós üzemmódban készített felvétel (jobb).

A CD13 marker jelölésének optimalizálását APC konjugált WM15 monoklonális antitest klónnal a fentebb említett módon, szintén titrálással végeztem. A telítési koncentráció 24 és 48  $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$  koncentráció között jelentkezett. Megjegyzendő, hogy 48  $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$  koncentráció felett a háttér kezelhetetlenül zajossá vált és nem jelentkezett a sejtek jelöléséből származó fluoreszcencia, amely abból adódhat, hogy az e feletti koncentrációk esetén az ellenanyagok inhibeálják egymás működését, gyakorlatilag leszorítják egymást a CD13 markerről és a mosási lépés során az ellenanyagok meghatározó hányada kimosódik, így a fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatkor csak a ki nem mosódott, specifikus kötődést nem mutató ellenanyagok csekély fluoreszcenciáját tapasztaljuk. Az APC gerjesztésekor készített felvételek csak igen magas expozíciós idők mellett voltak optimálisak és akkor is elmaradtak a PE-ből származó fluoreszcencia intenzitásától és több mérés esetén a háttér intenzív fluoreszcenciáját tapasztaltam, amelynek érdekében az APC-vel végzett mérések esetén beiktattam egy plusz mosási lépést, amely által csökkenteni tudtam a háttér fluoreszcenciáját. A tapasztalataim alapján az általam beállított optimális koncentráció 48  $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ -nek adódott a CD13-APC (klón: WM15) ellenanyagpuffer esetén, amely a korábban említett módon szintén 25  $\mu\text{L}$  végtérfogatban alkalmaztam 200 000  $\frac{\text{sejt}}{\text{mL}}$  koncentrációjú THP-1 sejtuszpenzió jelölésére. Ekkor igen magas, 11 000 ms expozíciós idő alkalmazásával tudtam a sejtek azonosítására alkalmas intenzitású fluoreszcens felvételeket készíteni.



25. ábra: CD13-APC (klón: WM15) monoklonális antitesttel megvalósított jelölés (bal). Az ellenanyag 48  $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$  koncentrációban, 25  $\mu\text{L}$  térfogatban alkalmazva, kezdetben közelítőleg 5000 db sejtet tartalmazó 200000  $\frac{\text{sejt}}{\text{mL}}$  koncentrációjú szuszpenzióhoz. Fluoreszcens mikroszkóp beállításai: 11000 ms expozíciós idő, reflexiós üzemmód, 50-es fluoreszcens szűrőkocka (ex.: BP 640/30 nm, em.: BP 690/50 nm), 4 X 4-es összeillesztett kép, 20 X-os nagyításban készített felvételek. A felvétel utólag színezve. A mintáról brightfield, transzmissziós üzemmódban készített felvétel (jobb).

Másodlagos antitestek használatával indirekt jelölést végezhetünk az elsődleges antitest Fc fragmentumának specifikus jelölésén keresztül. Ezáltal egyszerre több antigén együttes jelölése valósítható meg indirekt módon, ami a fluoreszcens jel intenzitásának felerősödését eredményezi. Sikeresnek bizonyult a CD65 és CD13 markerekre specifikus elsődleges monoklonális antitestek jelölése FITC konjugált kecske anti-egér másodlagos antitestek segítségével. A gyártó (Millipore Merck) által ajánlott hígítási sorral optimalizáltam a hígítási arányt. A hígítást  $1 \frac{w}{v}$  %-os, PBS-sel hígított BSA oldattal végeztem. Az 1 : 25, 1 : 50, 1 : 75, 1 : 100, 1 : 125, 1 : 150, 1 : 175, 1 : 200 (másodlagos antitest : BSA oldat) hígítási sorral vizsgáltam a fluoreszcencia intenzitást. Tapasztalataim szerint az 1 : 50 és az 1 : 25 arányú hígítás alkalmazása mellett a sejtek azonosítására alkalmas intenzitású emissziót tapasztaltam a 38-as fluoreszcens szűrőkocka alkalmazásával. Hosszabb expozíciós idő mellett az 1 : 50-es hígítást alkalmaztam. A FITC konjugátum alulmarad az azonos hullámhossztartományban excitálható és emittáló fluorofórok fotostabilitásától (például Alexa fluorofór család). Perceken belül töredékére csökken a fluoreszcens jel intenzitása. A FITC ezen tulajdonságát szem előtt tartva a fluoreszcens mikroszkópiáig fokozott körültekintéssel ügyeltem a minta fénytől való elzárására, ezzel kiküszöbölve a véletlenszerű gerjesztéseket, valamint a mikroszkópia során minimalizáltam az excitációs fénynyaláb erősségét és a gerjesztett mintatér nagyságát. A fluoreszcens jelölés FITC konjugált másodlagos kecske anti-egér antitest alkalmazásával megvalósíthatónak bizonyult  $2 \frac{mg}{mL}$  koncentrációjú antitestoldat 1 : 50 arányú BSA oldattal végzett hígítása mellett. 25  $\mu L$  térfogatú, hígított ellenanyag oldatot alkalmazva, az oldat a másodlagos ellenanyagra vonatkoztatva  $0,4 \frac{mg}{mL}$  koncentrációjú volt. A protokollt az elsődleges ellenanyagoknál kidolgozott metodika szerint hajtottam végre. A fluoreszcens mikroszkópia során elegendőnek bizonyult 3000 ms expozíciós idő alkalmazása az optimális, kontrasztos felvétel készítéséhez.



26. ábra: A CD65-PE (klón: VIM8) és a CD13-APC (klón: WM15) monoklonális antitesttel megvalósított együttes jelölést követően, FITC konjugált kecske anti-egér másodlagos antitesttel végzett jelölés (bal). Az

*ellenanyag  $0,4 \frac{mg}{mL}$  koncentrációban,  $25 \mu L$  térfogatban alkalmazva, kezdetben közelítőleg 5000 db sejtet tartalmazó  $200000 \frac{sejt}{mL}$  koncentrációjú szuszpenzióhoz. Fluoreszcens mikroszkóp beállításai: 3000 ms expozíciós idő, reflexiós üzemmód, 38-as fluoreszcens szűrőkocka (ex.: BP 470/40 nm, em.: BP 525/50 nm), 4 X 4-es összeillesztett kép, 20 X-os nagyításban készített felvételek. A felvétel utólag színezve. A mintáról brightfield, transzmissziós üzemmódban készített felvétel (jobb).*

Kijelenthető, hogy a THP-1 sejtvonal CD65 és CD13 markereinek direkt, együttes jelölését, elsődleges monoklonális ellenanyagokkal és indirekt jelölését másodlagos ellenanyagokkal megvalósítottam, a protokollok ellenanyag igényét minimalizáltam. Az immunfluoreszcens módszerek az Epic Cardio bioszenzoros méréssel kopatibilis módon végrehajthatónak bizonyulnak 384 lyukú Corning mikrotiter tálcán.

#### **4.4. Wright-Giemsa festés**

Ebben az alfejezetben megjelenített ábrákon szerepelnek olyan mikroszkópos felvételek is, amelyek már a humán perifériás vérrel való kísérletek során készültek, amelyet minden esetben megemlítek az ábrákhoz tartozó magyarázatokban.

A Wright-Giemsa hematológiai festéssel a főbb mieloid és limfoid leukociták differenciálhatók. A festék tartalmaz bázikus és savas komponenseket. A metilénkék és oxidatív termékei, az azúr A és az azúr B bázikus, míg az eozin savas. A sejtorganelumok és a főbb leukocita szubpopulációk eltérő festődést mutatnak. A nukleinsavak negatív töltésű foszfát csoportjai a pozitív töltésű bázikus komponensekkel alakítanak ki elektrosztatikus kölcsönhatásokat. A bazofil granulociták granuluma és a citoplazma RNS molekulái ilyen módon festődnek. Az eozin a vörösvérsejteket és az eozinofil granulociták granulumait festi meg. A leukociták sejtmagja és a bazofil granulocita granulumok mély kékén; a vörösvérsejtek és az eozinofilek granuluma pirosan festődnek. A leukociták citoplazmája halványkékén festődik, amely az alacsony RNS tartalmuk következménye. A Wright-Giemsa festett monociták citoplazmája halvány lila/rózsaszín, míg a sejtmagjuk sötét lila/kék színeződést mutat.

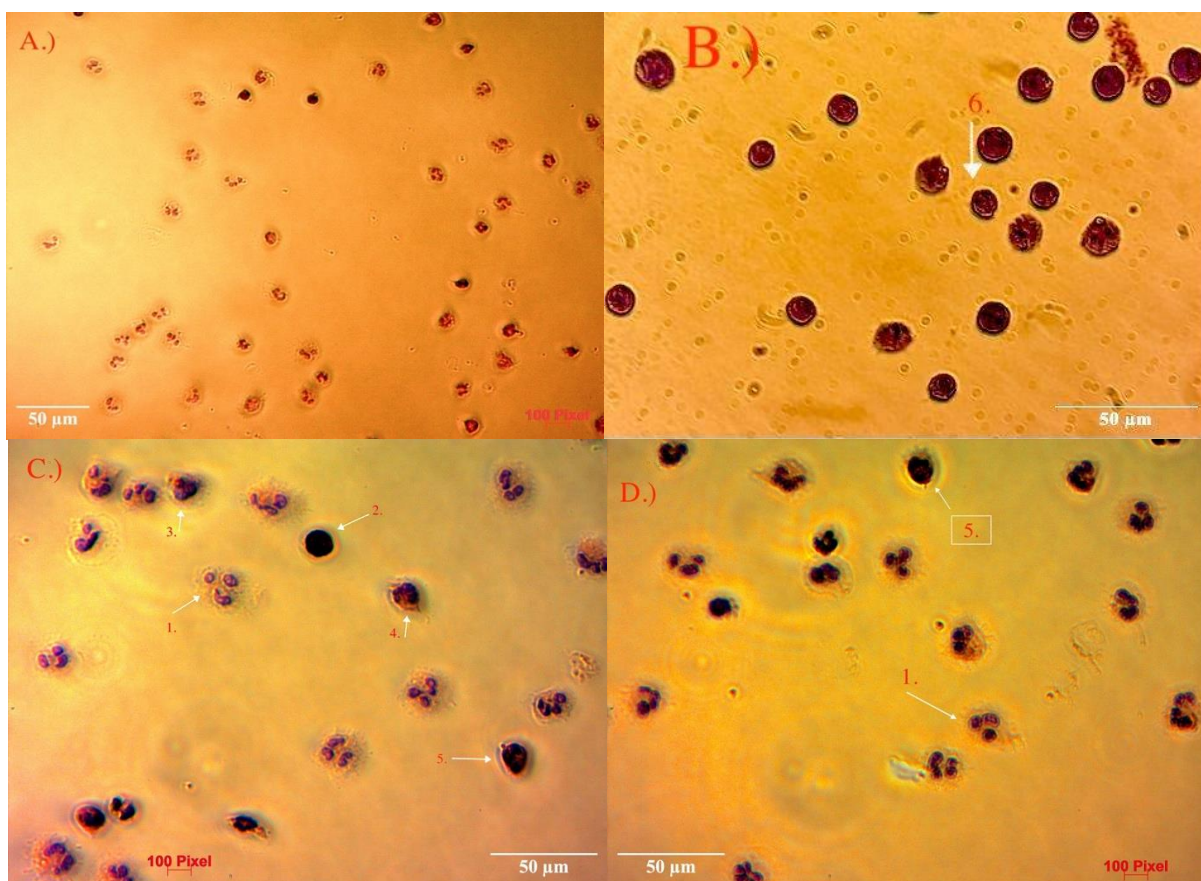
A sejtek levegőn történő szárítását követően nem szükséges a fixálást alkalmazni, mivel az oldatban lévő metanol fixálja a sejteket. A szakirodalomban nagy számban fellelhető protokollok 1:1, vagy 1:10 arányú PBS-sel végzett hígítást javasolnak. A sejtekhez már a hígított Wright-Giemsa oldatot adják és 5-10 percen keresztül végzik az eljárást. A festéket desztillált vízzel lemossák, majd halvány elfolyás megjelenéséig mossák PBS-sel. Ezt követi egy desztillált vizes mosás, majd a levegőn szárítják a megfestett kenetet [14].

Az általam alkalmazott protokoll eltér a szakirodalmi protokolloktól, mivel a festést a 384 lyukú mikrotiter lemezen végzem, minimális térfogatok alkalmazásával. A sejteket nem szárítom az festés



előtt és után sem. A Wright-Giemsa oldatot hígítatlanul adom a sjetekhez, a sejtek felülúszójának eltávolítása után. 25 µL festéket használok közelítőleg 5000 db sejt megfestéséhez. Az 5 perces festés bizonyult optimálisnak, mivel ekkor még nem tapasztalható a sejtek „túlfestődése”. A mosási lépéseket is módosítottam, mivel nem tárgylemezen, kenet formájában vizsgálom sejteket, hanem mikrotiter tálcán, amelyben nem állapítható meg a PBS-el végzett mosás során tapasztalható megfolyás, valamint a sejtek mikroszkópos vizsgálatokor mindig célszerű PBS-ben felvenni a sejteket. Azonban jelen protokoll esetén, ha PBS-ben venném fel a sejteket, akkor rövid időn belül a Wright-Giemsa festék teljes kimosódását tapasztalnám. Mindezt alapul véve 2 X alkalmazok 50-50 µL MilliQ vizes mosást és nem szuszpendálom a sejteket, hanem óvatosan lepipettázom a mosó MilliQ vizet. A protokoll végeztével MilliQ vizes közegben vizsgálom a festéssel differenciált sejteket.

A protokoll alkalmazásával azonosíthatóak a neutrofil, eozinofil és bazofil granulociták, a monociták (a THP-1 sejtek festésével optimalizáltam az eljárást) és a limfociták. Az eljárás hatékonyságát transzmissziós üzemmódban készített mikroszkópos felvételekkel demonstrálom. Az alábbi ábrákon nyilakkal és számozással jelöltem a differenciálható főbb leukocita szubpopulációkat. A jelmagyarázat a képaláírásban található (27. ábra).



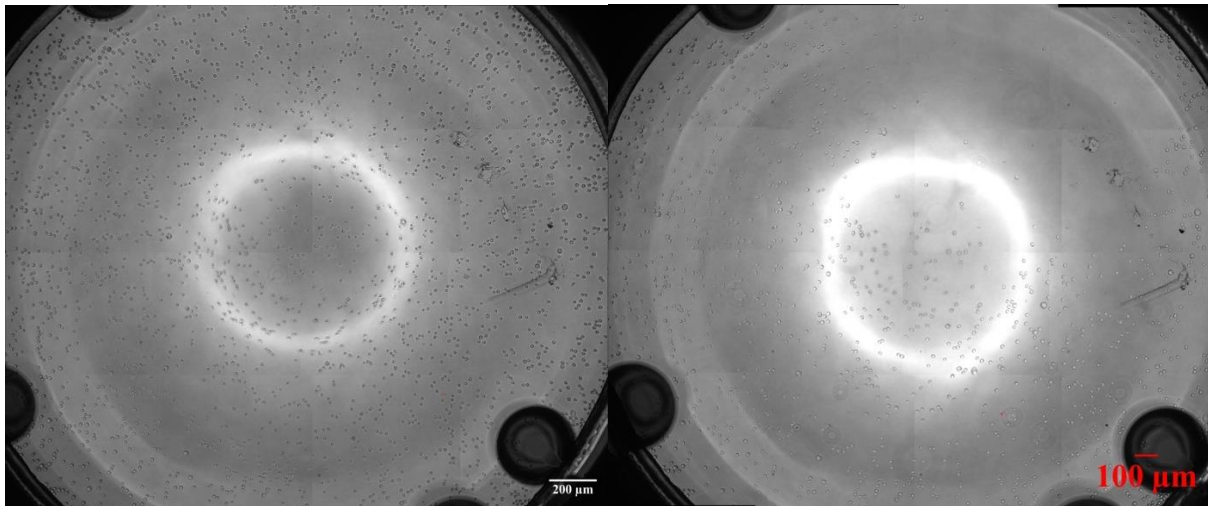
27. ábra: A Wright-Giemsa hematológiai festéssel differenciált leukocita szubpopulációk. Az A.) 20 X-os, a B.) 63 X-os, a C.) és D.) felvétel 40 X-es nagyításban készült a Zeiss Primo Vert fénymikroszkóp és az Axio Vision

*szoftver használatával. Jelmagyarázat: 1. – neutrofil granulocita, 2. – limfocita, 3. és 4. – eozinofil granulocita, 5. – bazofil granulocita, 6. – monocita.*

A granulociták felismerhetőek a citoplazmájuk erős szemcsézettsége és a lebenyezett sejtmagjuk alapján. A lebenyezettség a neutrofileknél a legszembeütőbb, 2-3 lebenyű, vese alakú sejtmagjukról könnyen felismerhetőek. Az eozinofilek megkülönböztethetőek a világoskék, rózsaszín granulált citoplazmájuk és lila sejtmagjuk alapján. A bazofil granulociták mély lila, erősen granulált citoplazmájukról, míg a limfociták a kisebb méretük, kerekded sejtmagjuk és csekély mennyiségű citoplazmájuk alapján differenciálhatók. A monociták észrevehetően nagyobb méretűek és sejtmagjuk bab alakú, amely alapján megkülönböztethetőek a granulocitáktól és limfocitáktól.

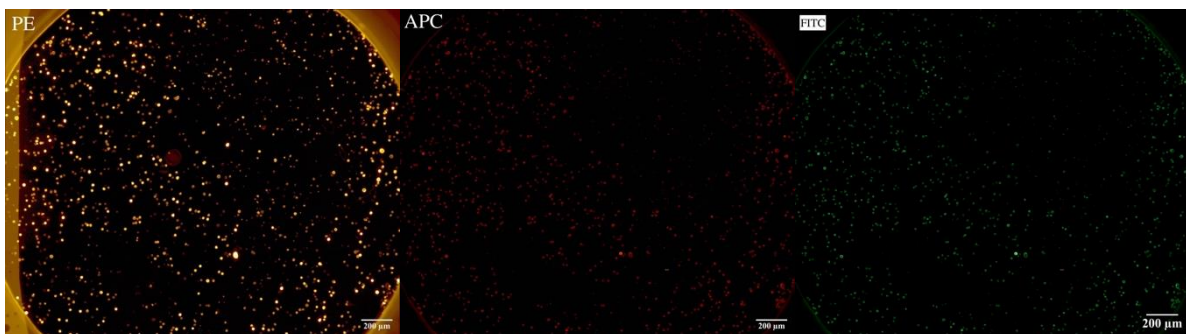
#### **4.5. A THP-1 sejtekkel kidolgozott protokollok összefoglalása**

Az alábbiakban látható a THP-1 sejtek alkalmazásával kialakított bioszenzoros, immunfluoreszcens és hematológiai festések optimalizálási lépéseit bemutató folyamatábra. Az ábrán összefoglalom a korábbi alfejezetekben leírt protokollok legfontosabb lépéseit és a mérési eredmények kiértékelésekor alkalmazott algoritmusok sémáját. A folyamatábra elősegítheti a mérési eredményeim értékelésének és a kidolgozott protokollok hatékonyságának besorolását. Az ábra bemutatása előtt viszont kitérek az immuncitokémiai, hematológiai mikroszkópos felvételek és a bioszenzoros felvételek Python kiértékelő programmal megvalósítható egymásra lapolásakor kapott eredményeimre. A mérések egyes fázisaiból származó képi adatok egyeztetése és a jelöléses módszerek Epic Cardio-val való kompatibilis megvalósítása elengedhetetlen. A jelöléses módszerek specificitásából adódóan, az azonosított sejtekhez tartozó bioszenzoros adatok (hullámhossz eltolódási görbék) értelmezhetővé válnak az adott sejttípusra és aktivációs szignálra. A sejtek fixálását követő mosási lépések során tapasztalható sejtvészesség befolyásolhatja a kevert sejtpopulációjú vér egyes leukocita szubpopulációinak sejtszámbeli megoszlását. A sejtfixálást jelenleg 4%-os PFA-val végzem, amely esetén azt tapasztaltam, hogy a hőmérséklet befolyással lehet a rögzítés hatékonyságára, mivel a legutóbbi mérések alkalmával az újonnan kialakított Véres laborban 7-8 °C-kal alacsonyabb hőmérséklet volt, mint korábban. Az ideális hőmérséklet 22-25 °C.



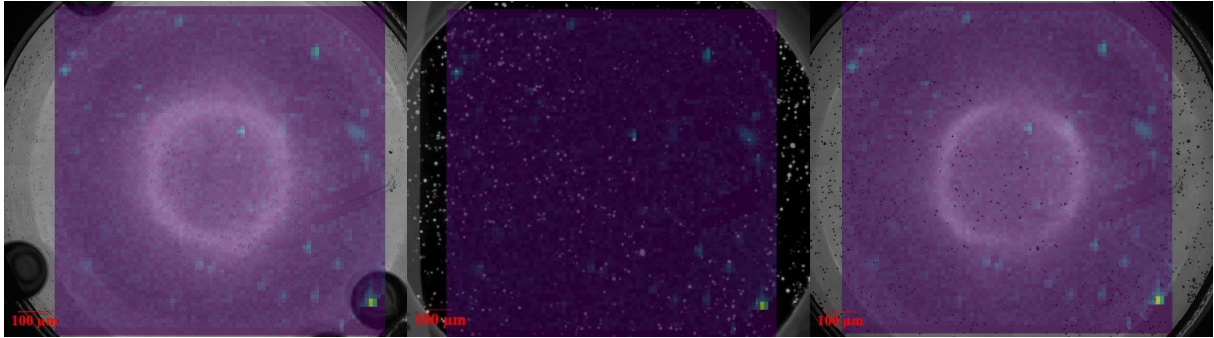
28. ábra: A bal oldali mikroszkópos felvétel a fixálás előtti, a jobb oldali a fixálás után készült. Fixálás paramétereit: 18 °C, 4%-os PBS-sel hígított PFA, 10 min fixálási idő. Mikroszkópos felvételek paramétereit: brightfield/transzmissziós üzemmód, Axio Observer Z1 mikroszkóp, Zen Blue 3.5 szoftver, 20 X-os nagyítás, 16 db 4 X 4-e, szoftveres összeillesztés.

Az alábbiakban a 3 fluoreszcens csatornában megvalósítható CD65, CD13 markerek együttes fluoreszcens jelölései láthatók.



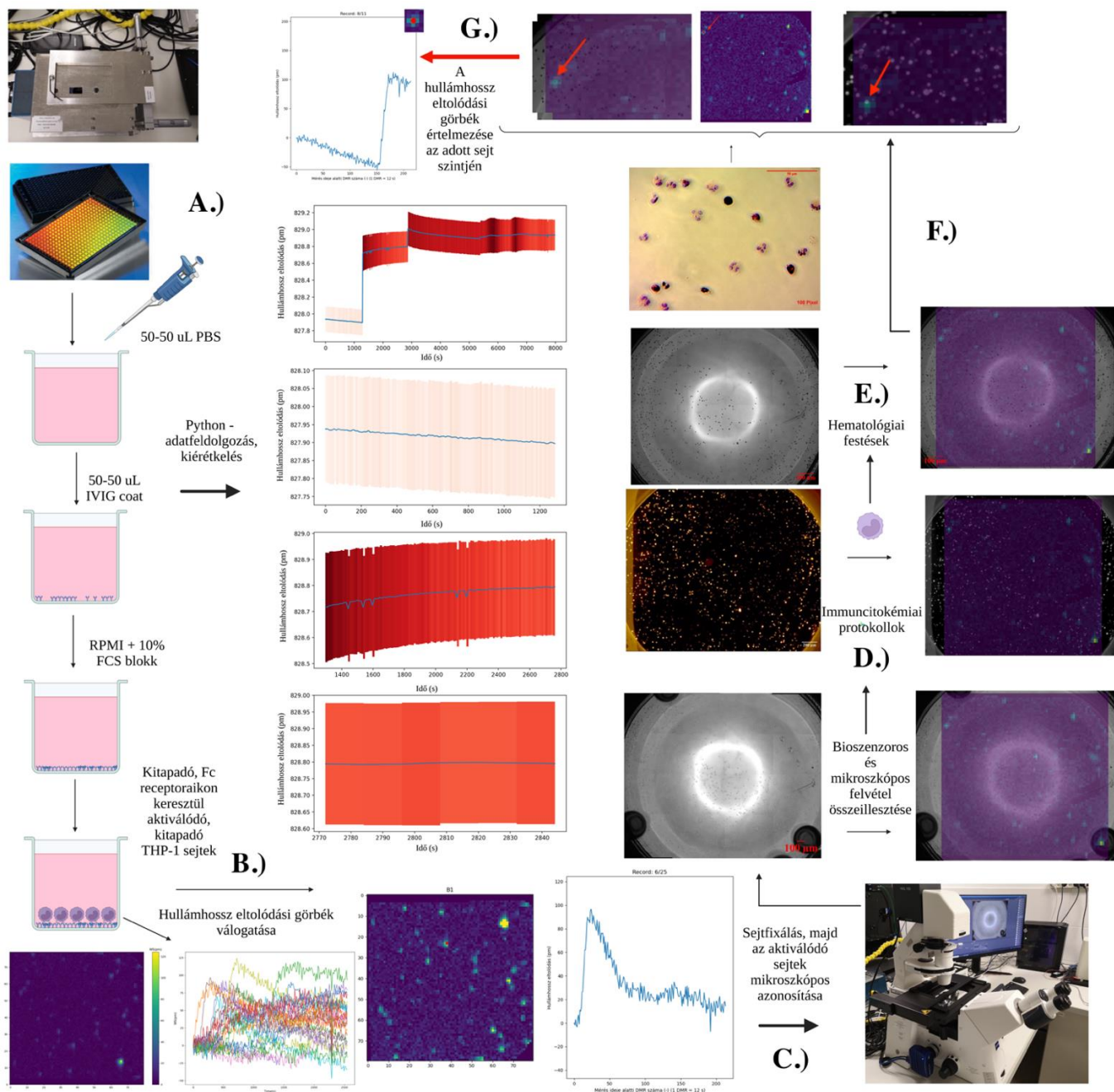
29. ábra: A három fluoreszcens csatornában megvalósított jelölés VIM8, WM15 elsődleges monoklonális és FITC konjugált kecske anti-egér másodlagos antitestekkel. PE csatorna: 3500 ms expozíciós idő, reflexiós üzemmód, 43-as fluoreszcens szűrőkocka (ex.: BP 545/25 nm, em.: BP 605/70 nm), 4 X 4-es összeillesztett kép, 20 X-os nagyításban készített felvételek. APC csatorna: 11000 ms expozíciós idő, reflexiós üzemmód, 50-es fluoreszcens szűrőkocka (ex.: BP 640/30 nm, em.: BP 690/50 nm). 3000 ms expozíciós idő, reflexiós üzemmód, 38-as fluoreszcens szűrőkocka (ex.: BP 470/40 nm, em.: BP 525/50 nm). A felvételek utólag lettek színezve.

A fixálás, az immuncitokémiai protokoll és a hematológiai festés után is megvalósítható volt a felvételek szenzoros képpel való egymásra lapolása. A bioszenzor által detektált sejtek beazonosíthatónak bizonyultak.



30. ábra: A bioszenzoros képre illesztett mikroszkópos felvételek. Bal oldalon a fixálás, középen a fluoreszcens jelölés (PE), jobb oldalon pedig a Wright-Giemsa festés után készített felvételek illesztése látható ugyanazon mikrotiter tálca lyuk esetén.

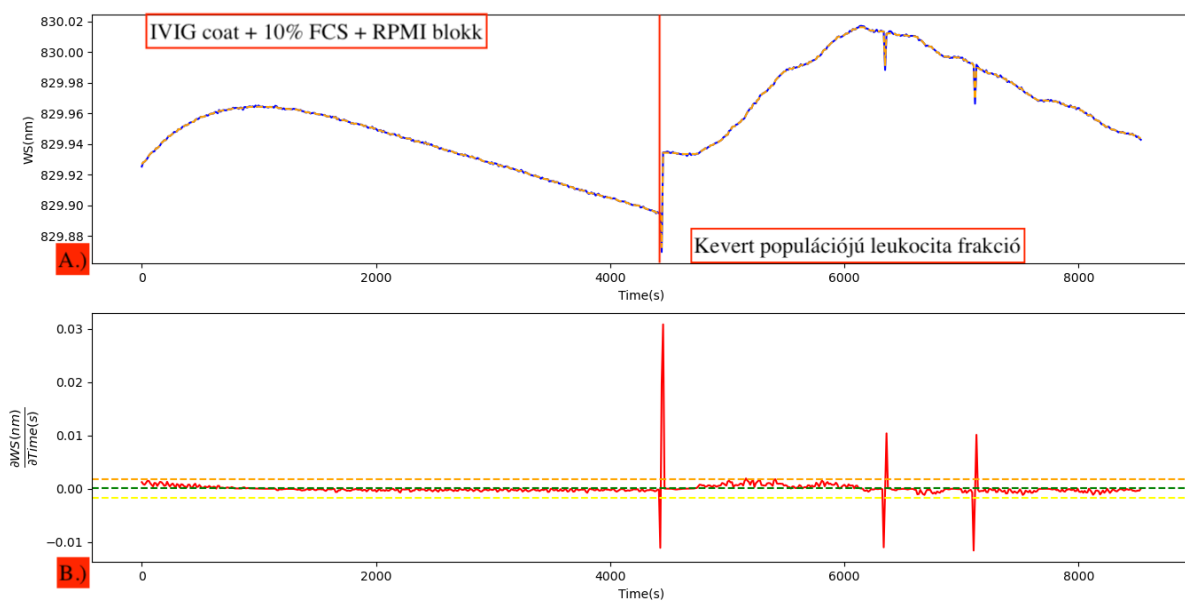




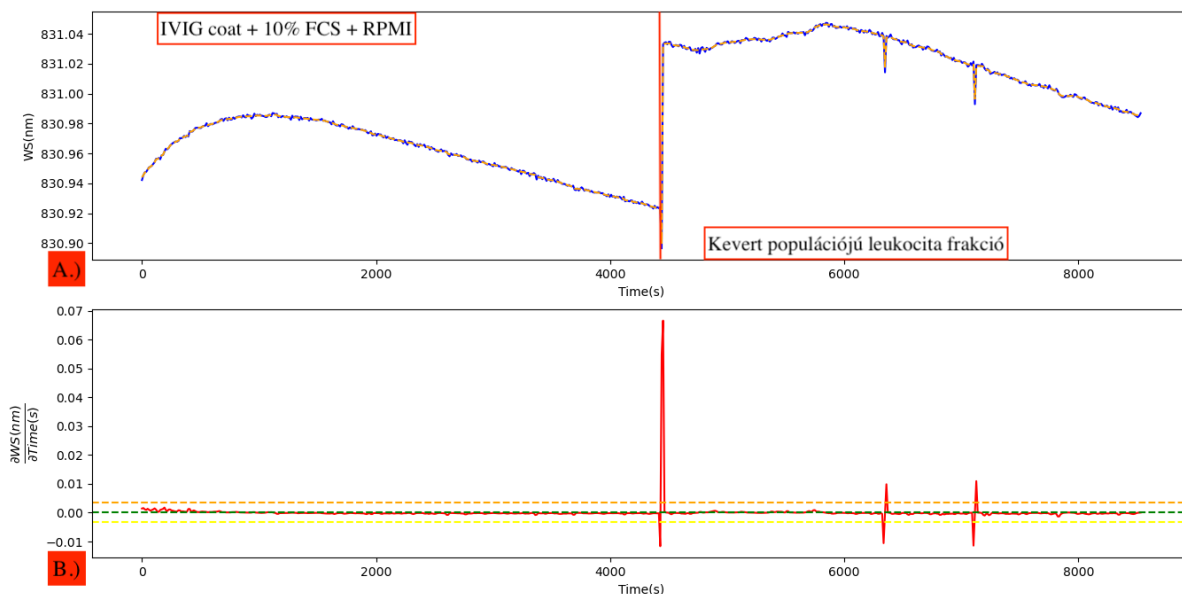
31. ábra: A korábbi alfejezetekben ismertetett protokollok egymásra épülését bemutató folyamatábra. A.) A bioszenzoros mérés egyes lépései, amelyek hatását a hullámhossz eltolódási görbékre egy Python kóddal értékeltem ki, amellyel a mérés szegmentálható. B.) A programmal generálható összes aktiválódott sejt hullámhossz eltolódási görbéje és a sejt alapvonal felvétele, valamint egyetlen, kiválasztott sejt egyedi hullámhossz eltolódási görbéje. C.) A bioszenzoros mérést követő sejtfixálás és fénymikroszkópos elemzése, valamint a bioszenzoros kép és a fénymikroszkópos felvételek illesztése. D.) Immuncitokémiai protokollok és a fluoreszcens felvételek bioszenzoros képpel való illesztése. E.) Hematológiai festés Wright Giemsa oldattal és a fénymikroszkópos felvételek illesztése a bioszenzoros képpel. F.) Az illesztett képeken a sejtek azonosítása és válogatásuk aszerint, hogy melyik fluoreszcens csatornában tapasztalható fluoreszcenciájuk, milyen a hematológiai festődésük, morfológiájuk. G.) A jelöléses protokollokkal nyert információk alapján értelmezhetjük az adott sejt aktivációját leíró hullámhossz eltolódási görbét. (Az ábra a BioRender programmal készítve)

## 4.6. Humán perifériás vér eredetű leukocitákkal végzett mérések

A bioszenzoros méréseket a 10% FCS-t tartalmazó RPMI blokkoló reagens mikrotiter tálca lyukakhoz adása után indítottam, mivel a korábbi mérésekhez képest nem változtattam a felületfunkcionalizálás paraméterein. Ebből kifolyólag nem tartottam szükségesnek az egyes hullámhossz eltolódási görbék vágását a sejtes ugrás előtt. Az mérések leukocitakonzentrációja befolyásolja a görbék sejtes szakaszának karakterisztikáját. A nagyobb koncentrációjú mérések esetén a görbék első felfutási szakaszát követően további hullámhossz eltolódási események jelentkeznek (32. ábra). A legkisebb leukocitakonzentrációval végzett mérésekre jellemzően az első felfutási szakasz után kisebb hullámhossz eltolódási növekmények tapasztalhatók (33. ábra).



32. ábra: A  $2500 - 5000 \frac{sejt}{\mu L}$  leukocita koncentrációval végzett bioszenzoros mérése során tapasztalható hullámhosszeltolódási görbék átlagos hullámhosszeltolódása az idő függvényében ábrázolva A.). A sejtes ugrások hullámhossz eltolódási eseményei között tapasztalható különbségeket leíró hullámhossz eltolódási átlagok idő szerinti parciális deriváltja az idő függvényében ábrázolva B.). Az diagramokon a hullámhosszeltolódás WS (wavelength shift) rövidítéssel van jelölve.



33. ábra: A  $312 - 625 \frac{sejt}{\mu L}$  leukocita koncentrációval végzett bioszenzoros mérés során tapasztalható

hullámhosszeltolódási görbék átlagos hullámhosszeltolódása az idő függvényében ábrázolva A.). A sejt ugrások hullámhossz eltolódási eseményei között tapasztalható különbségeket leíró hullámhossz eltolódási átlagok idő szerinti parciális deriváltja az idő függvényében ábrázolva B.). Az diagramokon a hullámhosszeltolódás WS (wavelength shift) rövidítéssel van jelölve.

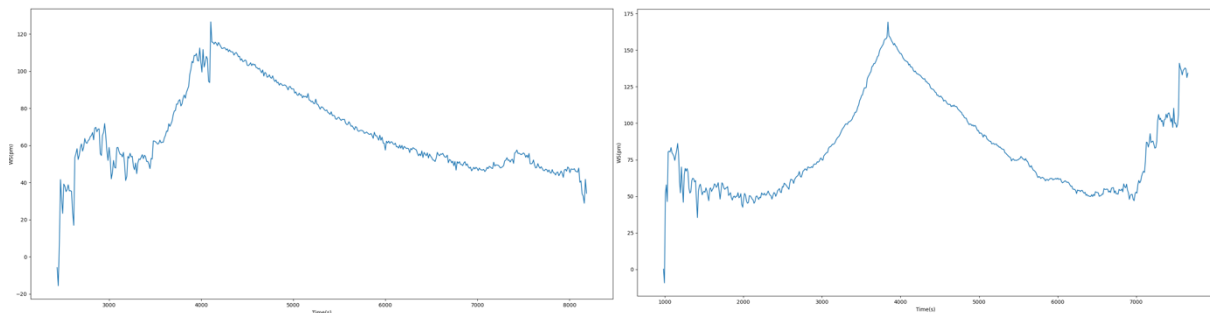
A  $312 - 625 \frac{sejt}{\mu L}$  koncentrációval végzett mérések esetén a görbe első ugrása során nagyobb különbség jelentkezik a hullámhosszeltolódásban, mint a koncentráltabb mérések során. Ez a jelenség többféle aktivitás következménye lehet. Lehetséges, hogy a hígabb mérésnél olyan sejtcsoport volt a legnagyobb számban jelen, amely olyan anyagokat szekretált, amelyek növelték az evanescens tér optikai sűrűségét. Ezek például lehetnek citokinek, antimikrobiális peptidek, vagy kemokinek.

#### 4.6.1. Az egyedi sejt hullámhossz eltolódási görbék karakterisztikáját meghatározó tényezők

A THP-1 sejtekkel végzett bioszenzoros mérésekhez képest jelentős változatosságot mutattak a vérből származó leukociták hullámhossz eltolódási görbéi. Négy féle hígítással mértem. Az irodalmi adatokra hagyatkozva  $5000 - 10000 \frac{sejt}{\mu L}$  leukocita koncentrációval számoltam, ami azt jelentette, hogy az  $50 \mu L$  antikoagulált és vörösvértest lizált vérből preparált pellet  $250000 - 500000$  db leukocitát tartalmaz. A pelletet  $1 \text{ mL}$   $10\%$  FCS-t tartalmazó RPMI-vel hígítottam, így  $250 - 500 \frac{sejt}{\mu L}$  leukocita szuszpenziót állítottam elő.  $10 \mu L$  térfogatban alkalmaztam a leukocita szuszpenziót, azaz a legtöményebb mérési sorozat esetén  $2500 - 5000 \frac{sejt}{\mu L}$  koncentrációjú oldatokkal végeztem a mérést, ezzel elméletileg betartva a THP-1 sejtek esetén alkalmazott koncentrációkat. A további három mérési

sorozat esetén felező  $1250 - 2500 \frac{\text{sejt}}{\mu\text{L}}$ ,  $625 - 1250 \frac{\text{sejt}}{\mu\text{L}}$ ,  $312 - 625 \frac{\text{sejt}}{\mu\text{L}}$  koncentrációkat alkalmaztam.

Jelen helyzetben, mivel még a vérrel végzett kísérletek korai fázisában járunk, következtetéseket tudok levonni a hullámhossz eltolódási görbék karakterisztikájából. A magas sejtszám következtében a két legkoncentráltabb szuszpenzió esetén lényegesen több sejt ként felismert hullámhossz eltolódási jelenséget detektált a bioszenzor. A nagy sejtszám azért is fontos, mert több hullámhossz eltolódási görbe elemzésével nagyobb eséllyel tudunk mintázatokat felfedezni a görbék karakterisztikájában. Időbeli eltéréssel, de több sejt megjelenése esetén a hullámhossz eltolódási görbék többszörös meredeken felfutó szakasszal rendelkeznek. A sejtekről készült felvételek egymás utáni léptetése során a sejtek mozgását tapasztaltam, amelyet a koncentráltabb sejtsuszpenzió következménye lehet, mivel kisebb térfogatokban ugyanannyi sejt nagyobb valószínűséggel alakít ki kölcsönhatásokat egymással, amely impulzusok indukálják a motilitásuk fokozódását. Azt tapasztaltam, hogy a mérés utolsó fázisában a THP-1 sejtekkel végzett kísérletekhez hasonlóan a hullámhossz eltolódási görbék többségében a sejtkoncentrációtól függetlenül megjelenik egy lecsengő szakasz (34. ábra). Ugyanakkor a nagy sejtkoncentrációval végzett mérések esetén a görbe negatív meredekségű szakaszát újabb felfutási szakaszok követik, amely azzal magyarázható, hogy nagyobb sejtszám esetén a sejtkommunikáció újabb szubpopulációk aktivációját idézi elő (34. ábra). Jelen esetben is kijelenthető, hogy a hosszabb ideig végzett mérésekkel több információt nyerhetünk a kevert populációjú mintákban bekövetkező sejtaktivációkról.

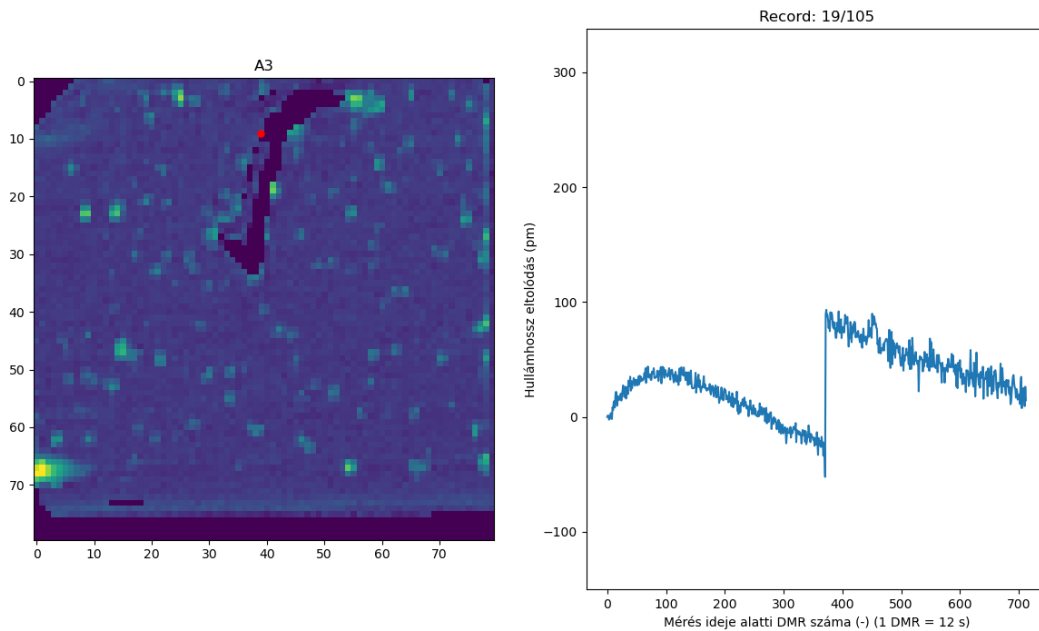


34. ábra: A mikrotiter tálca egy lyukában mérhető sejt események hullámhossz eltolódási görbéinek átlaga. A görbék a sejtes alapvonalnál lettek megvágva. A bal oldali diagramon a  $312 - 625 \frac{\text{sejt}}{\mu\text{L}}$ , a jobb oldali diagramon a  $2500 - 5000 \frac{\text{sejt}}{\mu\text{L}}$  leukocita koncentrációval végzett méréshez tartozó függvény látható.

Kevert leukocita populációknál is nagy esetszámban tapasztalható a hullámhossz eltolódási görbék egyszeres megugrása, viszont a felfutás meredeksége nem hasonlítható össze a THP-1 sejteket jellemző görbékkel, mert a két mérés időtartama jelentősen eltért, így a 12 s-onként generált DMR-ek száma is eltér. Ez korrigálható volna a kevert populációval végzett mérés egy sejtes adatainak vágásával,

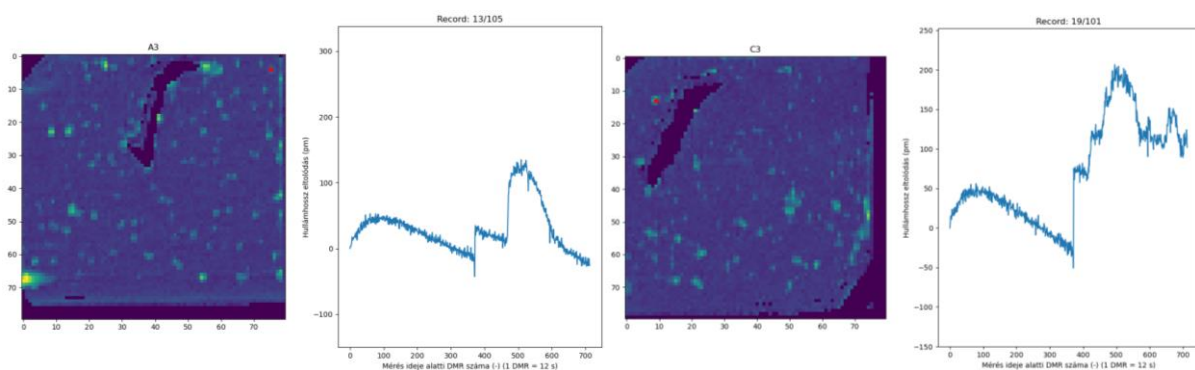


ha a sejtes szakasz időtartama azonos lett volna a két mérés során. A mérési szakaszok manuális vágásának lehetősége a kiértékelő program további fejlesztését igényli.



35. ábra: Az egyszeri felfutási szakasszal jellemezhető sejtaktivációs profil hullámhossz eltolódási görbéje.

A koncentráltabb oldatok további következménye, hogy a 25  $\mu\text{m}$  maximális térbeli felbontásra képes szenzor egy-egy pixelén nagyobb valószínűséggel aktiválódik egyszerre több sejt. Ekkor sejtcsoportok megjelenése tapasztalható, ami a pixelhez tartozó hullámhossz eltolódási görbe többszöri meredek felfutásából állapítható meg. Ez indokolja a hígabb leukocita koncentrációjú mérések tervezését. Az egy sejtes adatok hullámhossz eltolódási görbéit elemezve karakterizálhatónak bizonyult az kétszeres ugrást mutató és a többszörös ugrást mutató hullámhossz eltolódási görbék halmaza.

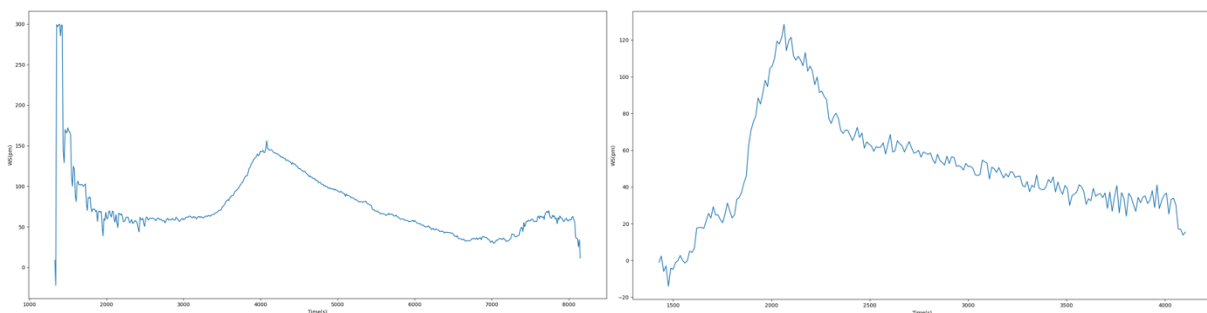


36. ábra: Az A3-as mérés esetén kettő, a C3-as mérés esetén pedig feltételezhetően három sejtes esemény által meghatározott hullámhossz eltolódási görbék karakterisztikája. Mindkét mérést  $1250 - 25000 \frac{\text{sejt}}{\mu\text{L}}$  koncentrációjú leukocita szuszpenzióval végeztem.

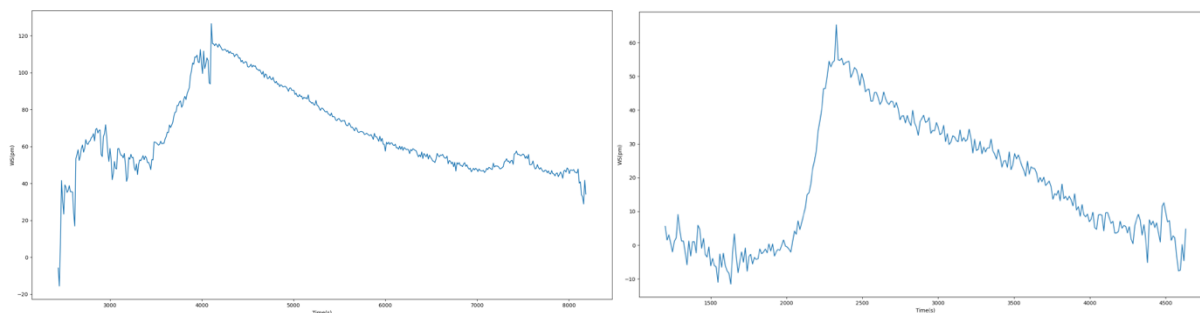
Abban az esetben, ha a görbe szakaszainak egyértelmű határolása elvégezhető, akkor az egyes szakaszok karakterisztikája sejttípushoz, vagy aktivációs mechanizmushoz rendelhető. Azonban, ha a második szakasz az első szakasz felfutásának tartományában jelentkezik, akkor nincs lehetőség a görbe szegmentálására. A 36. ábra A3-as mérés megjelenített görbéje egyértelműen két szakaszra osztható és a szakaszok a THP-1 sejteknél bemutatott „a”, illetve „b” típusba sorolhatóak. Azonban a C3-as mérés esetén még a görbe felfutási szakaszainak egyértelmű megkülönböztetése sem valósítható meg. A lecsengési fázisban jelentkező újabb felfutási esemény akkor gátolja a szegmentálást, ha még nem egyértelműen besorolható a lecsengési karakterisztikája.

A nagyobb maximális hullámhossz eltolódási görbével jellemezhető sejtek az evanescensz tér lokális törésmutatóját nagy mértékben növelik, amely a közeg lokális optikai sűrűségének növekedésének eredménye. Az egyes sejttípusok sűrűségének összehasonlítása kiindulási alapot jelenthet a jelölésmentes vizsgálatokkal detektált sejtek populációkba való besorolásához. A legkisebb sűrűségűek a limfociták és a monociták, míg a granuláltabb eozinofil és bazofil granulociták sűrűsége nagyobb, de a legnagyobb sűrűségű alakos elem a vörösvérsejt. Ebből a szempontból is fontos a vörösvérsejtek minél hatékony lizálása és a leukocita frakció mosása. Az evanescensz tér lokális sűrűségét befolyásoló tényezők között szerepel a sejttípus, valamint a sejtek aktivációja során termelődő molekulák szekréciója, például antimikrobiális peptidok, szerin proteázok.

A sejttes alapvonalhoz viszonyítva a mérések átlagos maximális hullámhossz eltolódási értéke ~150 és ~300 pm között változott és nem függ a mérés sejtkoncentrációjától, ezek az eredmények lényegesen különböznek a THP-1 sejteknél mérhető értékektől. A THP-1 sejtekkel végzett mérések sejttes alapvonalhoz viszonyított átlagos maximális hullámhossz eltolódási értékei 65 és 130 pm között változtak. Ez a megállapítás megerősítheti, hogy a sejttípusból adódó optikai sűrűségbeli különbség a hullámhossz eltolódási görbék maximumának egyik meghatározó tényezője. Az, hogy a vérből származó leukocitákkal végzett mérés során miért nem tapasztaltunk 65 pm körüli, a monocitákra jellemző alacsony maximális hullámhossz eltolódási értékeket, a monociták kis vérben mérhető koncentrációjával magyarázható. A leukocitáknak csak 2-10%-át teszik ki a monociták.



37. ábra: A kevert leukocita szuszpenzióval (bal) és a THP-1 sejtekkel (jobb) végzett mérések, sejttes alapvonalhoz viszonyított, maximális átlagos hullámhossz eltolódási görbéinek felvett maximális értéke.



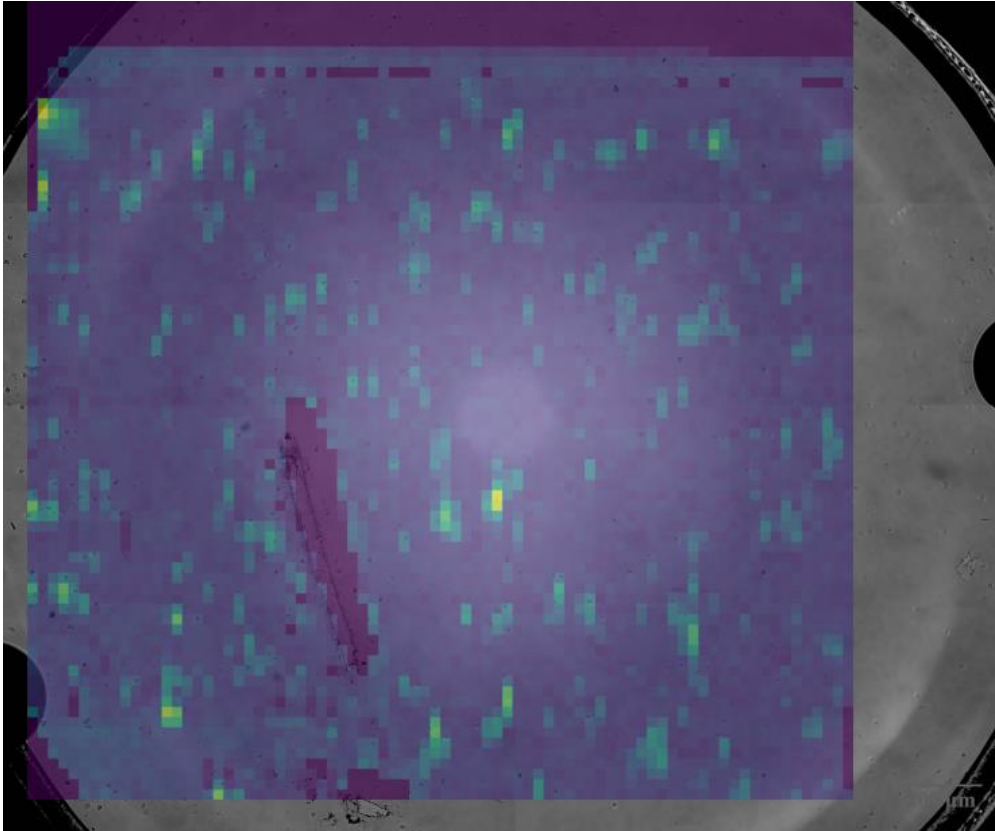
38. ábra: A kevert leukocita szuszpenzióval (bal) és a THP-1 sejtekkel (jobb) végzett mérések, sejtes alapvonalhoz viszonyított, maximális átlagos hullámhossz eltolódási görbéinek legkisebb felvett maximális értéke.

Az aktiválódó leukociták hullámhosszeltolódási görbéinek értelmezése és fenotípushoz való rendelése további kísérletek tervezését és az eddigi mérések többszöri megismétlését igényli. Azonban a hullámhossz eltolódási görbék karakterisztikájából elvont következtetések a fluoreszcens és hematológiai festések során végzett képi egyeztetések során felhasználhatók és megkönnyíthetik a sejtek beazonosítását.

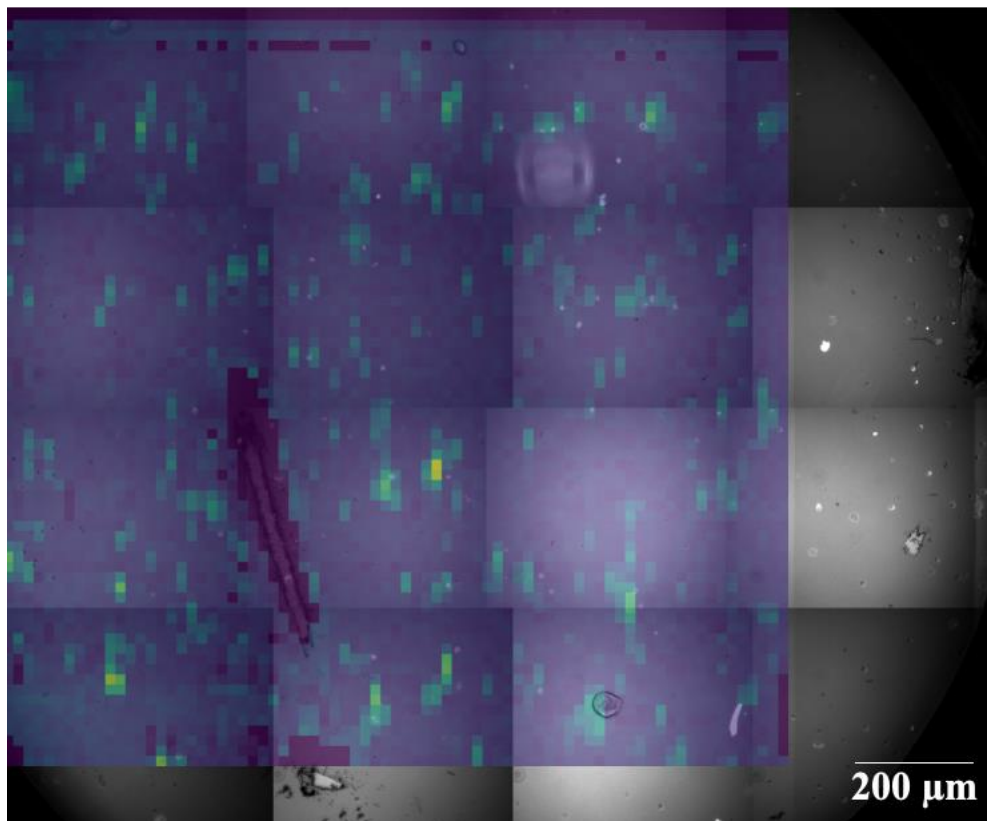
#### 4.6.2. A kevert populációjú leukociták immunfluoreszcens eredményi és bioszenzoros mérésrel való egyeztetésük

A bioszenzoros mérés során és a fluoreszcens csatornában készített felvételek egymásra illesztése a több sejtet tartalmazó mérések esetén bizonyult hatékonyabbnak. Az összeillesztéseket segíti, hogy a mikrotiter lemez felületén apró karcolást ejtettem, hogy legyen egy-egy viszonyítási pont az illesztésnél.

Az mikroszkópos felvételek kisebb felbontásra konvertálása a Python kóddal volt megvalósítható. Az összeillesztést pedig manuálisan lehetett kivitelezni a program egyik funkciójával. Az illesztést a fénymikroszkóppal készített felvételekre egyértelműbben tudtam kivitelezni. A nagyobb hullámhossz eltolódást előidéző és intenzív fluoreszcenciát mutató sejtek azonosítása kivitelezhetőnek bizonyult. A fluoreszcens jelölést a THP-1 sejteknél ismertetett módon végeztem. Jelentősen kisebb fluoreszcenciát tapasztaltam mind az APC, mind a PE csatornájában, de megfelelő expozíciós idő mellett tapasztaltam fluoreszcens jelenséget.



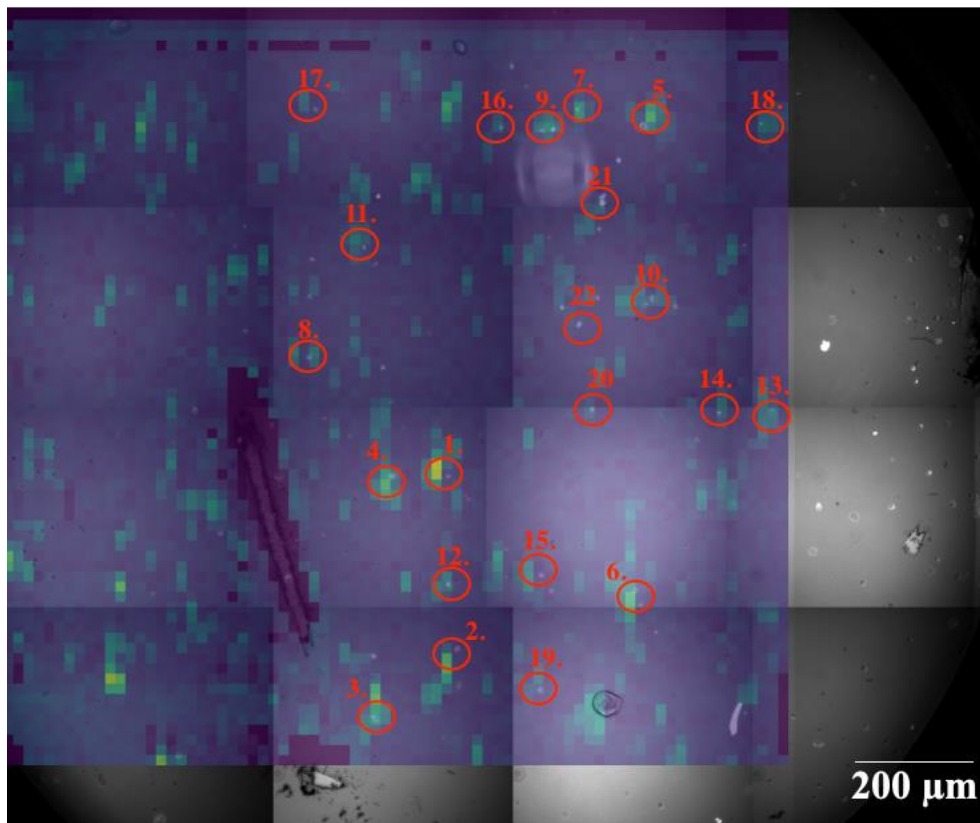
39. ábra: A bioszenzoros kép és a brightfield/transzmissziós üzemmódban készített felvétel egymásra illesztésének eredménye.



40. ábra: A bioszenzoros kép és a brightfield/transzmissziós üzemmódban készített felvétel egymásra illesztésének eredménye.

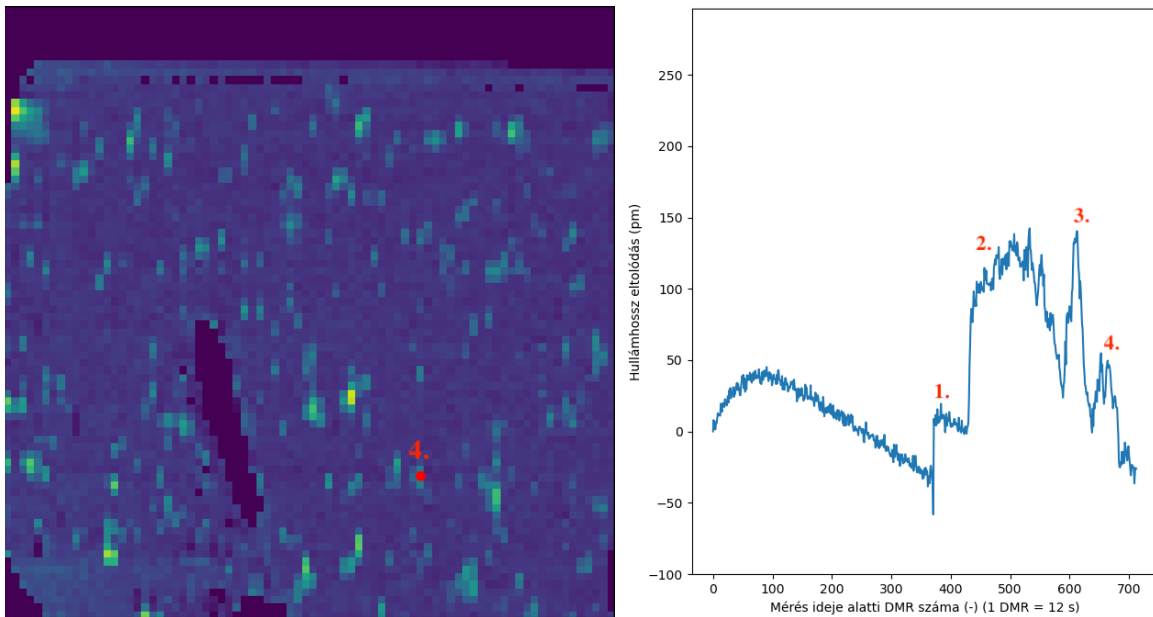
A brightfield illesztést is érdemes elvégezni, mert a fluoreszcens jelölés után nehezebb a pontos összeegyeztetés megvalósítása.

Az illesztés eredményét a PE fluorofór konjugált VIM8-as ellenanyaggal megjelölt sejtek és a hozzájuk tartozó hullámhosszeltolódási görbék összeegyeztethetősége alapján osztályoztam. A legegységesebb összeillesztést jelöltem meg 1.-ként és növekvő sorrendben haladtam a legkevésbé elfogadható illesztés felé. 22 sejt fluoreszcens és hullámhossz eltolódási jelét tudtam így összeegyeztetni.



41. ábra: A  $8 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$  CD65-PE (klón: VIM8) monoklonális antitesttel megjelölt, vérből származó leukociták azonosítása és a bioszenzoros hullámhossz eltolódási jelekkel való összeegyeztetésük. A fluoreszcens mikroszkóp beállításai: 3800 ms expozíciós idő, reflexiós üzemmód, 43-as fluoreszcens szűrőkocka (ex.: BP 545/25 nm, em.: BP 605/70 nm), 4 X 4-es összeillesztett kép, 20 X-os nagyításban készített monokromatikus felvételek.

A kategorizált sejtek hullámhossz eltolódási jeleit a bioszenzoros mérés kiértékelésekor exportált egy sejttes adatok közül válogattam ki. A 22 felismert sejtből a 4.-nek jelölt sejten keresztül demonstrálom a hullámhossz eltolódási görbe értékelését.



42. ábra: A kiválasztott sejt hullámhossz eltolódási görbéje és annak egyes szakaszai számozással jelölve

A kijelölt sejt hullámhossz eltolódási görbéjének értelmezésekor érdemes a sejt közvetlen környezetében lévő többi sejtet is tanulmányozni. Jelen esetben ez tényleg indokolt, mert a görbe felfutási szakaszából látszik, hogy az első hullámhossz eltolódásban tapasztalható ugrás után a jel nem állandósul, illetve nem követi a korábban profilozott egyszeres ugrás során bekövetkező lecsengést. A második szakasz ugrása bizonyosan egy további sejtrel való kölcsönhatásának az eredménye, de a harmadik és a negyedik szakasz értelmezése, kutatásunk jelenlegi fázisában még nem megoldott.



## 5. ÖSSZEFOGLALÁS-KONKLÚZIÓ

Sikerült a THP-1 akut mieloid leukémiás sejtvonal használatával kedvező eredményeket elérni a fejlesztés alatt álló módszerünk mind a négy kritikus kísérleti fázisában. Az Epic Cardioval végzett bioszenzoros mérések értékelése a Lendület Nanobioszenzorika Kutatócsoportban kifejlesztett Python kóddal elvégezhető, illetve további fejlesztése folyamatban van. A bioszenzoros jelek aktiváció függő, sejttípusokra standardizált jeleit értelmeztem és a sejtek kommunikációja, szétterülése, motilitása és frusztaált fagocitotikus aktivitása tekintetében következtetéseket vontam le. A hullámhossz eltolódási görbék pozitív és negatív meredekségű jellemző szegmenseit rendszereztem és görbe karakterisztikákat fedeztem fel. Megvalósíthatónak bizonyul immuncitokémiai módszerekkel két leukocita marker szimultán jelölése: a CD65 és a CD13, VIM8-as és WM15-ös monoklonális antitest klónok használatával, amelyeket FITC konjugált kecske anti-egér másodlagos antitesttel is tudunk jelölni. A hematológiai festések eredményeiből egyértelműen látszik a festés hatékonysága, meg tudtuk különböztetni a monociták, limfociták, eozinofil, bazofil és neutrofil granulocitákat. A bioszenzoros képi adatok illesztése optimális sejtszám esetén megvalósítható, így akár egyetlen sejthez hozzá tudjuk rendelni az aktivációját jellemző hullámhossz eltolódási görbét. A vér vörösvérsejtjeit lizáltuk és a leukocita frakciót rendszerünkben sikeresen használjuk kísérleteink optimalizálására, amelynek fejlesztése jelenleg is folyamatban van. A perifériás vérből fracionált leukociták egyes szubpopulációi CD65 és CD13 markerét sikeresen jelöltük a THP-1 sejtekkel kidolgozott protokoll alapján. A sejtek vizsgálata három fluoreszcens csatornában valósítható meg jelenleg, ezek kiterjesztése lesz a kutatásunk következő fázisának célkitűzése, azaz a limfocita szubpopuláció specifikus CD markerek jelölését és izotípus kontroll mérések kidolgozását tervezük

További célunk a sejtaktiváció vizsgálata a HoloMonitor optikai elven működő bioszenzorral, hosszú időintervallumú mérések

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton is szeretném megköszönni témavezetőmnek, **Dr. Szittner Zoltánnak** a számtalan tanácsot, a rendületlen lelkesítést és az állandó szakmai támogatást.

Szeretném megköszönni **Dr. Horváth Róbertnek**, a Nanobioszenzorika Kutatócsoport vezetőjének és külső konzulensemnek, hogy szakadatlanul meglátja a lehetőségeket munkánkban és azt, hogy helyet biztosított számomra kutatócsoportjában.

Köszönettel tartozom **Dr. Bonyár Attilának**, belső konzulensemnek, hogy utat mutat és segíti előrehaladásom.

Szeretnék köszönetet mondani **Béres Bálintnak**, aki nélkül nem valósult volna meg a kiértékelés.

Hálával tartozom **Janka Zsolt** hallgatótársamnak, hogy a program használatában segített.



## 6. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] L. L. Lu, T. J. Suscovich, S. M. Fortune, and G. Alter, “Beyond binding: Antibody effector functions in infectious diseases,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 18, no. 1. Nature Publishing Group, pp. 46–61, Jan. 01, 2018. doi: 10.1038/nri.2017.106.
- [2] C. Albert-Vega, D. M. Tawfik, S. Trouillet-Assant, L. Vachot, F. Mallet, and J. Textoris, “Immune functional assays, from custom to standardized tests for precision medicine,” *Frontiers in Immunology*, vol. 9, no. OCT. Frontiers Media S.A., Oct. 16, 2018. doi: 10.3389/fimmu.2018.02367.
- [3] Z. Szittner, B. Péter, S. Kurunczi, I. Székács, and R. Horvath, “Functional blood cell analysis by label-free biosensors and single-cell technologies,” *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 308. Elsevier B.V., Oct. 01, 2022. doi: 10.1016/j.cis.2022.102727.
- [4] M. Sztilkovics *et al.*, “Single-cell adhesion force kinetics of cell populations from combined label-free optical biosensor and robotic fluidic force microscopy,” *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-019-56898-7.
- [5] S. C. Bhakdi and P. Thaicharoen, “Easy employment and crosstalk-free detection of seven fluorophores in a widefield fluorescence microscope,” *Methods Protoc*, vol. 1, no. 2, pp. 1–11, 2018, doi: 10.3390/mps1020020.
- [6] R. W. Horobin and J. A. Kiernan, “CONN’S Biological Stains A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine 10th Edition.”
- [7] T. Kalina *et al.*, “CD maps—dynamic profiling of CD1–CD100 surface expression on human leukocyte and lymphocyte subsets,” *Front Immunol*, vol. 10, no. OCT, 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.02434.
- [8] Bert A. ’t Hart\* and Kees Heije, “Broad spectrum immune monitoring in immune-mediated inflammatory disorders,” *Drug Discov Today*, vol. 10, no. 20, pp. 1348–1351, Oct. 2005, doi: 10.1016/S1359-6446(05)03572-5.
- [9] H. T. Maecker, J. P. McCoy, and R. Nussenblatt, “Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 12, no. 3. pp. 191–200, Mar. 2012. doi: 10.1038/nri3158.

- [10] P. Zimmermann and N. Curtis, “Factors that influence the immune response to vaccination,” *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 32, no. 2. American Society for Microbiology, Apr. 01, 2019. doi: 10.1128/CMR.00084-18.
- [11] B. Pulendran and R. Ahmed, “Immunological mechanisms of vaccination,” *Nature Immunology*, vol. 12, no. 6. pp. 509–517, Jun. 2011. doi: 10.1038/ni.2039.
- [12] N. Pardi, M. J. Hogan, F. W. Porter, and D. Weissman, “mRNA vaccines—a new era in vaccinology,” *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 17, no. 4. Nature Publishing Group, pp. 261–279, Mar. 28, 2018. doi: 10.1038/nrd.2017.243.
- [13] A. A. Zachary and M. S. Leffell, “Detecting and monitoring human leukocyte antigen-specific antibodies,” *Human Immunology*, vol. 69, no. 10. pp. 591–604, Oct. 2008. doi: 10.1016/j.humimm.2008.06.013.
- [14] D. A. Galloway, A. E. M. Phillips, D. R. J. Owen, and C. S. Moore, “Corrigendum: Phagocytosis in the brain: Homeostasis and disease (Frontiers in Immunology (2019) 10 (790) DOI: 10.3389/fimmu.2019.00790),” *Frontiers in Immunology*, vol. 10, no. JULY. Frontiers Media S.A., 2019. doi: 10.3389/fimmu.2019.01575.
- [15] F. Montaña-Rendón, S. Grinstein, and G. F. W. Walpole, “Monitoring Phosphoinositide Fluxes and Effectors During Leukocyte Chemotaxis and Phagocytosis,” *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, vol. 9. Frontiers Media S.A., Feb. 04, 2021. doi: 10.3389/fcell.2021.626136.
- [16] F. Baschieri, K. Porshneva, and G. Montagnac, “Frustrated clathrin-mediated endocytosis—causes and possible functions,” *Journal of Cell Science*, vol. 133, no. 11. Company of Biologists Ltd, Jun. 01, 2020. doi: 10.1242/jcs.240861.
- [17] M. Kalli and T. Stylianopoulos, “Defining the role of solid stress and matrix stiffness in cancer cell proliferation and metastasis,” *Frontiers in Oncology*, vol. 8, no. MAR. Frontiers Media S.A., Mar. 12, 2018. doi: 10.3389/fonc.2018.00055.
- [18] T. Tha-In, J. Bayry, H. J. Metselaar, S. v. Kaveri, and J. Kwekkeboom, “Modulation of the cellular immune system by intravenous immunoglobulin,” *Trends in Immunology*, vol. 29, no. 12. pp. 608–615, Dec. 2008. doi: 10.1016/j.it.2008.08.004.
- [19] R. MacArron *et al.*, “Impact of high-throughput screening in biomedical research,” *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 10, no. 3. pp. 188–195, Mar. 2011. doi: 10.1038/nrd3368.

- [20] A. W. Chung and G. Alter, “Systems serology: Profiling vaccine induced humoral immunity against HIV,” *Retrovirology*, vol. 14, no. 1. BioMed Central Ltd., Dec. 21, 2017. doi: 10.1186/s12977-017-0380-3.
- [21] B. M. Gunn *et al.*, “A Role for Fc Function in Therapeutic Monoclonal Antibody-Mediated Protection against Ebola Virus,” *Cell Host Microbe*, vol. 24, no. 2, pp. 221-233.e5, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.chom.2018.07.009.
- [22] R. Vainionpää, M. Waris, and P. Leinikki, “Diagnostic Techniques: Serological and Molecular Approaches☆,” in *Reference Module in Biomedical Sciences*, Elsevier, 2015. doi: 10.1016/b978-0-12-801238-3.02558-7.
- [23] G. S. és J. P. A. Erdei, *Immunológia*. Budapest: Medicina Könyvkiadó Zrt., 2012.
- [24] A. Shinde *et al.*, “A review of single-cell adhesion force kinetics and applications,” *Cells*, vol. 10, no. 3. MDPI, pp. 1–46, Mar. 01, 2021. doi: 10.3390/cells10030577.
- [25] S. Jalkanen *et al.*, “The oxidase activity of vascular adhesion protein-1 (VAP-1) induces endothelial E- and P-selectins and leukocyte binding,” *Blood*, vol. 110, no. 6, pp. 1864–1870, Sep. 2007, doi: 10.1182/blood-2007-01-069674.
- [26] D. Samanta and S. C. Almo, “Nectin family of cell-adhesion molecules: Structural and molecular aspects of function and specificity,” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 72, no. 4. Birkhauser Verlag AG, pp. 645–658, 2015. doi: 10.1007/s00018-014-1763-4.
- [27] N. Orgovan *et al.*, “In-situ and label-free optical monitoring of the adhesion and spreading of primary monocytes isolated from human blood: Dependence on serum concentration levels,” *Biosens Bioelectron*, vol. 54, pp. 339–344, Apr. 2014, doi: 10.1016/j.bios.2013.10.076.
- [28] R. P. McEver and C. Zhu, “Rolling cell adhesion,” *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 26, pp. 363–396, Nov. 10, 2010. doi: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113238.
- [29] “Innovations in Label-Free Detection.” <https://www.biocompare.com/Editorial-Articles/354149-Innovations-in-Label-Free-Detection/> (accessed Oct. 23, 2022).
- [30] A. Arandian *et al.*, “Optical Imaging Approaches to Monitor Static and Dynamic Cell-on-Chip Platforms: A Tutorial Review,” *Small*, vol. 15, no. 28. Wiley-VCH Verlag, Jul. 12, 2019. doi: 10.1002/sml.201900737.

- [31] M. S. Trent, C. M. Stead, A. X. Tran, and J. v Hankins, "Diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis," *J Endotoxin Res*, vol. 12, no. 4, 2006, doi: 10.1179/096805106X118825.
- [32] "Corning Epic 384-well Biochemical Assay Microplate."  
<https://www.selectscience.net/products/corning-epic-384-well-biochemical-assay-microplate/?prodID=198255> (accessed Oct. 23, 2022).
- [33] M. Wu, S. Long, A. G. Frutos, M. Eichelberger, M. Li, and Y. Fang, "Interrogation of phosphor-specific interaction on a high-throughput label-free optical biosensor system Epic® system," *Journal of Receptors and Signal Transduction*, vol. 29, no. 3–4, pp. 202–210, 2009, doi: 10.1080/10799890903068474.
- [34] "Zeiss." <https://www.micro-shop.zeiss.com/en/us/>
- [35] "FluoroFinder." <https://app.fluorofinder.com/ffsv/svs/5c7fcca03542013bccb90235df4e2e89> (accessed Oct. 23, 2022).
- [36] K. Dunning and A. O. Safo, "The ultimate Wright-Giemsa stain: 60 years in the making," *Biotechnic and Histochemistry*, vol. 86, no. 2, pp. 69–75, Apr. 2011, doi: 10.3109/10520295.2010.515496.

## ÁBRAJEGYZÉK

1. ábra: Az ELISA módszer szemléltetése (az ábrát saját magam szerkesztettem a BioRender alkalmazás használatával) .....	10
2. ábra: Az antigénspecifikus humorális immunválasz kialakulása (az ábrát saját magam szerkesztettem a BioRender alkalmazás használatával) .....	11
3. ábra: A hematopoiesis során a multipotens hematopoetikus őssejtből differenciálódó alakos elemek (az ábrát saját magam szerkesztettem a BioRender alkalmazás használatával) .....	14
4. ábra: A hullámvezető rácsos optikai bioszenzorral végzett mérések elve [29].....	17
5. ábra: Zeiss Axio Observer Z1 típusú fluoreszcens mikroszkóp (a kép a Nanobioszenzorika Lendület Kutatócsoport laborjában készült).....	20
6. ábra: Zeiss Primo Vert fénymikroszkóp (a kép a Nanobioszenzorika Lendület Kutatócsoport laborjában készült).....	21
7. ábra: A Corning® Epic Biochemical Assay mikrotiter tálca [10].....	21
8. ábra: Az általam használt Epic Cardio RWG bioszenzor (a kép a Nanobioszenzorika Lendület Kutatócsoport laborjában készült) .....	21
9. ábra: Az Epic Cardio RWG bioszenzorral végzett mérés sémája. Minden egyes kikötődési esemény az evaneszcens tér törésmutatójának változásában nyilvánul meg, ami a teljesen visszavert rezonanciafrekvenciájú hullámhosszkomponens fáziseltolódásában mutatkozik. [11].....	22
10. ábra: A 43-as fluoreszcens szűrőkocka excitációs és emissziós filtereinek transzmittancia tartományai (ex.: BP 545/25 nm, em.: BP 605/70 nm). A diagramon késsel az excitációs, pirossal az emissziós filter transzmittancia tartományai vannak jelölve. [12] .....	25
11. ábra: A 50-es fluoreszcens szűrőkocka excitációs és emissziós filtereinek transzmittancia tartományai (ex.: BP 640/30 nm, em.: BP 690/50 nm). A diagramon késsel az excitációs, pirossal az emissziós filter transzmittancia tartományai vannak jelölve. [12] .....	25
12. ábra: A 38-as fluoreszcens szűrőkocka excitációs és emissziós filtereinek transzmittancia tartományai (ex.: BP 470/40 nm, em.: BP 525/50 nm). A diagramon késsel az excitációs, pirossal az emissziós filter transzmittancia tartományai vannak jelölve. [12] .....	25
13. ábra: A FITC fluorofór excitációs és emissziós tartománya. A szaggatott vonallal jelzett görbe alatti területhez tartozó hullámhossztartományon excitálható, míg a folytonos vonallal jelzett görbe alatti területhez tartozó hullámhossztartományon emittál a FITC. [13].....	26
14. ábra: A PE fluorofór excitációs és emissziós tartománya. A szaggatott vonallal jelzett görbe alatti területhez tartozó hullámhossztartományon excitálható, míg a folytonos vonallal jelzett görbe alatti területhez tartozó hullámhossztartományon emittál a PE. [13].....	26
15. ábra: Az APC fluorofór excitációs és emissziós tartománya. A szaggatott vonallal jelzett görbe alatti területhez tartozó hullámhossztartományon excitálható, míg a folytonos vonallal jelzett görbe alatti területhez tartozó hullámhossztartományon emittál az APC. [13] .....	27
16. ábra: Az Epic Cardio bioszenzoros mérés egy lyuka esetén tapasztalható hullámhosszeltolódási görbék átlaga A.), valamint a protokoll lépései között tapasztalható különbségek B.). Az diagramokon a hullámhosszeltolódás WS (wavelength shift) rövidítéssel van jelölve. ....	30

17. ábra: Az adott lyukban felismert sejtek hullámhossz eltolódási görbéi. A mérés előzetes fázisainak levágásával alakítottam ki a sejtes alapvonalat.....	31
18. ábra: A C4-es és a B4-es mikrotiter tálca lyukakban tapasztalható „a” karakterisztikájú jellemző hullámhossz eltolódási görbék.....	32
19. ábra: Az A4-es és a C2-es mikrotiter tálca lyukakban tapasztalható „b” karakterisztikájú jellemző hullámhossz eltolódási görbék.....	33
20. ábra: A C2-es és a B1-es mikrotiter tálca lyukakban tapasztalható „c” karakterisztikájú jellemző hullámhossz eltolódási görbék.....	33
21. ábra: A THP-1 sejtekkel végzett Epic Cardio bioszenzoros mérések hullámhossz eltolódási átlagait összehasonlító ábra.....	34
22. ábra: 10X-es nagyításban, a fixálás előtt készített brightfield mikroszkópos felvétel THP-1 sejtekkel (jobb), ImageJ programmal konvertált kép (bal), amelyen a felismert sejtek számozva láthatók. ....	35
23. ábra: 10X-es nagyításban, fixálás és mosás után készített brightfield mikroszkópos felvétel THP-1 sejtekkel (jobb), ImageJ programmal konvertált kép (bal), amelyen a felismert sejtek számozva láthatók.....	36
24. ábra: CD65-PE (klón: VIM8) monoklonális antitesttel megvalósított jelölés (bal). Az ellenanyag 8 µg/mL koncentrációban, 25 µL térfogatban alkalmazva, kezdetben közelítőleg 5000 db sejtet tartalmazó 200000 sejt/mL koncentrációjú szuszpenzióhoz. Fluoreszcens mikroszkóp beállításai: 3500 ms expozíciós idő, reflexiós üzemmód, 43-as fluoreszcens szűrőkocka (ex.: BP 545/25 nm, em.: BP 605/70 nm), 4 X 4-es összeillesztett kép, 20 X-os nagyításban készített felvételek. A felvétel utólag színezve. A mintáról brightfield, transzmissziós üzemmódban készített felvétel (jobb).....	37
25. ábra: CD13-APC (klón: WM15) monoklonális antitesttel megvalósított jelölés (bal). Az ellenanyag 48 µg/mL koncentrációban, 25 µL térfogatban alkalmazva, kezdetben közelítőleg 5000 db sejtet tartalmazó 200000 sejt/mL koncentrációjú szuszpenzióhoz. Fluoreszcens mikroszkóp beállításai: 11000 ms expozíciós idő, reflexiós üzemmód, 50-es fluoreszcens szűrőkocka (ex.: BP 640/30 nm, em.: BP 690/50 nm), 4 X 4-es összeillesztett kép, 20 X-os nagyításban készített felvételek. A felvétel utólag színezve. A mintáról brightfield, transzmissziós üzemmódban készített felvétel (jobb).....	38
26. ábra: A CD65-PE (klón: VIM8) és a CD13-APC (klón: WM15) monoklonális antitesttel megvalósított együttes jelölést követően, FITC konjugált kecske anti-egér másodlagos antitesttel végzett jelölés (bal). Az ellenanyag 0,4 mg/mL koncentrációban, 25 µL térfogatban alkalmazva, kezdetben közelítőleg 5000 db sejtet tartalmazó 200000 sejt/mL koncentrációjú szuszpenzióhoz. Fluoreszcens mikroszkóp beállításai: 3000 ms expozíciós idő, reflexiós üzemmód, 38-as fluoreszcens szűrőkocka (ex.: BP 470/40 nm, em.: BP 525/50 nm), 4 X 4-es összeillesztett kép, 20 X-os nagyításban készített felvételek. A felvétel utólag színezve. A mintáról brightfield, transzmissziós üzemmódban készített felvétel (jobb).....	39
27. ábra: A Wright-Giemsa hematológiai festéssel differenciált leukocita szubpopulációk. Az A.) 20 X-os, a B.) 63 X-os, a C.) és D.) felvétel 40 X-es nagyításban készült a Zeiss Primo Vert fénymikroszkóp és az Axio Vision szoftver használatával. Jelmagyarázat: 1. – neutrofil granulocita, 2. – limfocita, 3. és 4. – eozinofil granulocita, 5. – bazofil granulocita, 6. – monocita.....	41
28. ábra: A bal oldali mikroszkópos felvétel a fixálás előtti, a jobb oldali a fixálás után készült. Fixálás paraméterei: 18 °C, 4%-os PBS-sel hígított PFA, 10 min fixálási idő. Mikroszkópos felvételek paraméterei:	

<i>brightfield/transzmissziós üzemmód, Axio Observer Z1 mikroszkóp, Zen Blue 3.5 szoftver, 20 X-os nagyítás, 16 db 4 X 4-e, szoftveres összeállítás. ....</i>	<i>43</i>
<i>29. ábra: A három fluoreszcens csatornában megvalósított jelölés VIM8, WM15 elsődleges monoklonális és FITC konjugált kecske anti-egér másodlagos antitestekkel. PE csatorna: 3500 ms expozíciós idő, reflexiós üzemmód, 43-as fluoreszcens szűrőkocka (ex.: BP 545/25 nm, em.: BP 605/70 nm), 4 X 4-es összeillesztett kép, 20 X-os nagyításban készített felvételek. APC csatorna: 11000 ms expozíciós idő, reflexiós üzemmód, 50-es fluoreszcens szűrőkocka (ex.: BP 640/30 nm, em.: BP 690/50 nm). 3000 ms expozíciós idő, reflexiós üzemmód, 38-as fluoreszcens szűrőkocka (ex.: BP 470/40 nm, em.: BP 525/50 nm). A felvételek utólag lettek színezve. ....</i>	<i>43</i>
<i>30. ábra: A bioszenzoros képre illesztett mikroszkópos felvételek. Bal oldalon a fixálás, középen a fluoreszcens jelölés (PE), jobb oldalon pedig a Wright-Giemsa festés után készített felvételek illesztése látható ugyanazon mikrotiter tálca lyuk esetén. ....</i>	<i>44</i>
<i>31. ábra: A korábbi alfejezetekben ismertetett protokollok egymásra épülését bemutató folyamatábra. A.) A bioszenzoros mérés egyes lépései, amelyek hatását a hullámhossz eltolódási görbékre egy Python kóddal értékeltem ki, amellyel a mérés szegmentálható. B.) A programmal generálható összes aktiválódott sejt hullámhossz eltolódási görbéje és a sejtes alapvonal felvétele, valamint egyetlen, kiválasztott sejt egyedi hullámhossz eltolódási görbéje. C.) A bioszenzoros mérést követő sejtfixálás és fénymikroszkópos elemzése, valamint a bioszenzoros kép és a fénymikroszkópos felvételek illesztése. D.) Immuncitokémiai protokollok és a fluoreszcens felvételek bioszenzoros képpel való illesztése. E.) Hematológiai festés Wright Giemsa oldattal és a fénymikroszkópos felvételek illesztése a bioszenzoros képpel. F.) Az illesztett képeken a sejtek azonosítása és válogatásuk aszerint, hogy melyik fluoreszcens csatornában tapasztalható fluoreszcenciájuk, milyen a hematológiai festődésük, morfológiájuk. G.) A jelöléses protokollokkal nyert információk alapján értelmezhetjük az adott sejt aktivációját leíró hullámhossz eltolódási görbét.....</i>	<i>45</i>
<i>32. ábra: A 2500 – 5000 sejt <math>\mu</math>L leukocita koncentrációval végzett bioszenzoros mérése során tapasztalható hullámhossz eltolódási görbék átlagos hullámhossz eltolódása az idő függvényében ábrázolva A.). A sejtes ugrások hullámhossz eltolódási eseményei között tapasztalható különbségeket leíró hullámhossz eltolódási átlagok idő szerinti parciális deriváltja az idő függvényében ábrázolva B.). Az diagramokon a hullámhossz eltolódás WS (wavelength shift) rövidítéssel van jelölve.....</i>	<i>46</i>
<i>33. ábra: A 312 - 625 sejt <math>\mu</math>L leukocita koncentrációval végzett bioszenzoros mérés során tapasztalható hullámhossz eltolódási görbék átlagos hullámhossz eltolódása az idő függvényében ábrázolva A.). A sejtes ugrások hullámhossz eltolódási eseményei között tapasztalható különbségeket leíró hullámhossz eltolódási átlagok idő szerinti parciális deriváltja az idő függvényében ábrázolva B.). Az diagramokon a hullámhossz eltolódás WS (wavelength shift) rövidítéssel van jelölve.....</i>	<i>47</i>
<i>34. ábra: A mikrotiter tálca egy lyukában mérhető sejtes események hullámhossz eltolódási görbéinek átlaga. A görbék a sejtes alapvonalnál lettek megvágva. A bal oldali diagramon a 312 - 625 sejt <math>\mu</math>L, a jobb oldali diagramon a 2500 – 5000 sejt <math>\mu</math>L leukocita koncentrációval végzett méréshez tartozó függvény látható. ....</i>	<i>48</i>
<i>35. ábra: Az egyszeri felfutási szakasszal jellemezhető sejtaktivációs profil hullámhossz eltolódási görbéje. ...</i>	<i>49</i>
<i>36. ábra: Az A3-as mérés esetén kettő, a C3-as mérés esetén pedig feltételezhetően három sejtes esemény által meghatározott hullámhossz eltolódási görbék karakterisztikája. Mindkét mérést 1250 – 25000 sejt <math>\mu</math>L koncentrációjú leukocita szuszpenzióval végeztem. ....</i>	<i>49</i>

37. ábra: A kevert leukocita szuszpenzióval (bal) és a THP-1 sejtekkel (jobb) végzett mérések, sejtes alapvonalhoz viszonyított, maximális átlagos hullámhossz eltolódási görbéinek felvett maximális értéke. ....	50
38. ábra: A kevert leukocita szuszpenzióval (bal) és a THP-1 sejtekkel (jobb) végzett mérések, sejtes alapvonalhoz viszonyított, maximális átlagos hullámhossz eltolódási görbéinek legkisebb felvett maximális értéke.....	51
39. ábra: A bioszenzoros kép és a brightfield/transzmissziós üzemmódban készített felvétel egymásra illesztésének eredménye.....	52
40. ábra: A bioszenzoros kép és a brightfield/transzmissziós üzemmódban készített felvétel egymásra illesztésének eredménye.....	53
41. ábra: A 8 µg/mL CD65-PE (klón: VIM8) monoklonális antitesttel megjelölt, vérből származó leukociták azonosítása és a bioszenzoros hullámhossz eltolódási jelekkel való összeegyeztetésük. A fluoreszcens mikroszkóp beállításai: 3800 ms expozíciós idő, reflexiós üzemmód, 43-as fluoreszcens szűrőkocka (ex.: BP 545/25 nm, em.: BP 605/70 nm), 4 X 4-es összeillesztett kép, 20 X-os nagyításban készített monokromatikus felvételek. ....	53
42. ábra: A kiválasztott sejt hullámhossz eltolódási görbéje és annak egyes szakaszai számozással jelölve .....	54