



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Villamosmérnöki és Informatikai Kar



Természetes eredetű hatóanyagok sejtadhézióra gyakorolt hatásának feltárása

Tudományos Diákköri dolgozat

Tóth Kinga

Egészségügyi mérnök MSc hallgató

Külső konzulens:

Dr. Péter Beatrix

ELKH EK MFA, Nanobioszenzorika Lendület Kutatócsoport

Belső konzulens:

Dr. Bonyár Attila

BME Elektronikai Technológia Tanszék

Kivonat

Munkám során különféle, természetes eredetű kismolekulás hatóanyagok sejtadhézióra gyakorolt hatását tártam fel.

A természetes eredetű hatóanyagok biomolekuláris kölcsönhatásának vizsgálata a mai napig központi kérdés a biokémia és gyógyszerkutató területén, ugyanis e vegyületek kémiai sokszínűségük és széles bioaktivitásuk miatt ígéretes új struktúrákkal szolgálnak, mintaként használhatók új, potenciális gyógyszerjelölt molekulák kifejlesztésében [1].

A sejtadhézió gátlása tumorellenes hatóanyagoknál kiemelt jelentőségű az áttétképződések megakadályozása miatt. A bioaktív anyagok rákos sejtek adhéziójára gyakorolt hatásának mérése hatékony eszköz lehet a daganatellenes gyógyszerek tervezésében [2]. A sejtadhézió során megkülönböztetünk sejtek közötti, és a sejt és a sejten kívüli állomány, az extracelluláris mátrix (extracellular matrix, ECM) közötti adhéziót. Az extracelluláris mátrix egyik komponense a fibronectin, melynek jelentős szerepe van a sejtek adhéziójában, növekedésében, vándorlásában és differenciálódásában. Bizonyos hatóanyagok befolyásolják a sejtek adhézióját, ezáltal jelentős hatással lehetnek a sejtek működésére.

A különféle biomolekuláris kölcsönhatások vizsgálatára kifejezetten alkalmasak a jelölésmentes optikai bioszenzor technikák, melyek előnye, hogy a kölcsönhatásokat esetlegesen befolyásoló jelölések nélkül végezhetjük méréseinket. A természetes eredetű vegyületek általában kis molekulatömegűek, ahol a jelölés problémás vagy akár kivitelezhetetlen is lehet [1].

A sejtadhézió vizsgálatát egy evaneszcens tér alapú jelölésmentes optikai bioszenzorral, a rezonáns rácsos hullámvezető (Resonant Waveguide Grating, RWG) módszerrel végeztem el, mely valós idejű kinetikai adatokat szolgáltatott a hatóanyagok hatására végbemenő folyamatokról. A mérés során fibronectin bevonatú mikrolemezt használtam. A Holomonitor M4 mikroszkóppal a már felülethez tapadt sejtek hatóanyagok hozzáadására történő sejtélettani változásiról, köztük a sejtadhézióról kaptam információt. A mikroszkóppal történő mérések során nem alkalmaztam fibronectin bevonatot, a mérés polisztirol felületen történt. Kiegészítő mérésként a fent említett jelölésmentes optikai bioszenzor technikával megvizsgáltam a hatóanyagok fibronectin felületre gyakorolt kölcsönhatását is. A kísérletet HeLa rákos sejtvonalon végeztem el.

A kiértékelés során vizsgáltam a hatóanyagok oldószereként alkalmazott DMSO hatását. A hatóanyag oldatok DMSO koncentrációjával megegyező DMSO tartalmú kontroll oldatok nem mutattak koncentrációfüggő jelleget a sejtadhéziót illetően és a DMSO nem lépett kölcsönhatásba a felülettel.

Általánosságban elmondható, hogy a hatóanyagok a fibronectin felületen különböző mértékben sejtadhézió gátló tulajdonsággal rendelkeztek, egyes hatóanyagok esetében megfigyelhető koncentrációfüggés is.

A kiegészítő mérések során azt tanulmányoztam, hogy az egyes hatóanyagok kölcsönhatásba lépnek-e a felülettel, valamint lemoshatók-e a felületről. Az eredmények alapján egyes hatóanyagok kölcsönhatásba lépnek a fibronectin felülettel és nem mosódnak le a felületről, még más hatóanyagok bizonyos szinten szintén kölcsönhatásba lépnek a felülettel, azonban a felületről való lemosódás tényét az adatok alapján nem lehet egyértelműen megállapítani.

A mikroszkóppal történt mérés kiértékelésekor a terület, az optikai térfogat és az átlagos optikai vastagság paramétereit figyeltem, mely adatokból a sejtadhéziós tulajdonságokra tudtam következtetni. Az eredmények azt mutatják, hogy a hatóanyagokkal kezelt sejtek és a kontroll sejtek esetén a felsorolt paraméterekben nincs jelentős eltérés.

A kapott eredmények azt mutatják, hogy a fibronectin bevonaton történt mérés során a vizsgált hatóanyagok sejtadhéziót gátló hatással bírnak, viszont a bevonat nélküli polisztirol felületen, a már letapadt sejteken végzett mérés során az eredmények alapján a hatóanyagok nincsenek a sejtadhézióra jelentős hatással. Ennek oka lehet, hogy a hatóanyagmolekulák köthetnek a fibronectinhez, így elfoglalva annak kötőhelyeit, azonban még további vizsgálatok szükségesek lehetnek ennek pontosítására. A vizsgált hatóanyagok feltételezhetően csak a sejtadhéziót befolyásolják fibronectin felületen, a sejtekre valószínűleg nincsenek citotoxikus hatással.

Az alább bemutatott módszer egy viszonylag könnyű és gyors eljárás az új hatóanyagok tesztelésére. A dolgozatban szereplő kísérletet HeLa rákos sejtvonalon végeztem, mely sejtvonal a mai napig leggyakrabban használt modellorganizmus. A kísérleteket más, egészséges sejtvonallal elvégezve és az eredményeket összehasonlítva fény derülhet a vizsgált hatóanyagok esetleges rákellenes hatására.

Abstract

In my work, I investigated the effects of various natural compounds on cell adhesion.

Studying biomolecular interactions of naturally occurring active compounds is still essential in the field of biochemistry and drug discovery, as these compounds provide new structures with promising effects due to their broad chemical diversity and bioactivity spectrum and can be used as a template model for the development of new potential drug candidate molecules [1].

Inhibition of cell adhesion is of particular importance for antitumour agents to prevent metastasis. Measuring the effect of bioactive substances on cancer cell adhesion can be a powerful tool for the design of anticancer drugs [2]. Two types of cell adhesion are distinguished: adhesion between cells and adhesion between a cell and the extracellular matrix (ECM). Fibronectin is one of the components of the extracellular matrix, which has a major role in cell adhesion, growth, migration and differentiation. Certain compounds affect cell adhesion resulting a significant impact on cell function.

The advantage of label-free optical biosensors is that we can perform our measurements without the need for labelling that may affect biomolucular interactions. Natural compounds usually have small molecular weight where labeling can be problematic or even impossible [1].

I used an evanescent field-based label-free optical biosensor, the Resonant Waveguide Grating (RWG) method to record the cell adhesion kinetics in the presence of the active compounds on fibronectin-coated surface. Another technique, the Holomonitor M4 microscope was used to obtain information on cellular changes, including cell adhesion, in response to the addition of active substances to cells already adherent to the surface. This measurement was performed on a polystyrene surface without fibronectin coating. As a complementary measurement, I also investigated the interaction of the active substances on the fibronectin surface using the above mentioned label-free optical biosensor technique. The experiments were performed on living HeLa cancer cell line.

During the evaluation I revealed the effect of DMSO, which was a crucial step as DMSO was used as the solvent for the active substances. Control solutions containing the same concentration of DMSO as the drug solutions did not show any concentration-dependent character for cell adhesion and DMSO did not interact with the surface.

In general, the active compounds exhibited different degrees of antiproliferative effects on fibronectin surface, regarding some compounds I observed also concentration dependence.

In additional measurements, I studied whether each of the active substances interacted with the surface and whether they could be washed off the surface. The results show that some of the active substances interact with the fibronectin surface and do not wash off the surface, and other active substances also interact with the surface to some extent, but the fact that they wash off the surface cannot be clearly established from the data.

Furthermore, using the Holomonitor technique, I observed how the active substances affect certain parameters including area, optical volume and average optical thickness, from which data the cell adhesion properties could be inferred. I found that there is no significant difference in these parameters between drug-treated cells and control cells.

The results show that on a fibronectin-coated surface the tested compounds have antiproliferative effects, whereas on an uncoated polystyrene surface, the results show that the compounds do not have a significant effect on the adherent cells. This may be due to the fact that the drug molecules can bind to fibronectin, thus occupying its binding sites, further studies needed for clarification. It is assumed that the tested active substances only affect cell adhesion at the fibronectin surface and probably have no cytotoxic effect on cells.

The method described below is a relatively easy and quick way to test new active substances. The experiment in this thesis was performed on HeLa cancer cell line, which is the most used model organism to date. By performing the experiments on other healthy cell lines and comparing the results, the potential anticancer effects of the tested agents can be elucidated.

Tartalom

1	Bevezetés.....	7
2	Irodalmi áttekintés	8
2.1	A sejtadhézió és jelentősége	8
2.2	Fibronektin.....	8
2.3	HeLa sejtvonat	9
3	Célkitűzések	10
3.1	Vizsgált hatóanyagok	11
4	Alkalmazott technikák	12
4.1	Az Epic BenchTop jelölésmentes optikai bioszenzor technika	12
4.2	Holomonitor M4 transzmissziós mikroszkóp	14
5	Anyagok és módszerek	15
5.1	Felhasznált anyagok	15
5.2	Felhasznált HeLa sejtvonat, sejtpaszálás	15
5.3	Mérések Epic BT bioszenzorral	16
5.3.1	Alkalmazott hígítási sor.....	16
5.3.2	Mérés menete	16
5.4	Mérések Holomonitor M4 mikroszkóppal.....	17
5.4.1	Alkalmazott hígítási sor.....	17
5.4.2	Mérés menete	17
6	Eredmények és értékelésük	18
7	Összefoglalás.....	25
	Köszönetnyilvánítás	27
	Hivatkozásjegyzék.....	28
	Mellékletek	30

1 Bevezetés

A sejtek szervezetünk legkisebb egységei, melyek szövetekké szerveződnek az úgynevezett sejtadhézió révén. A sejtadhézió során megkülönböztetünk sejtek közötti, és a sejt és a sejten kívüli állomány, az extracelluláris mátrix (extracellular matrix, ECM) közötti adhéziót. Az extracelluláris mátrix egyik komponense a fibronectin, melynek jelentős szerepe van a sejtek adhéziójában, növekedésében, vándorlásában és differenciálódásában.

Bizonyos hatóanyagok befolyásolják a sejtek adhézióját, ezáltal befolyásolhatják a sejtek egymással és az extracelluláris mátrixszal történő kommunikációját is, így jelentős hatással lehetnek a sejtek működésére. A sejtadhézió gátlása tumorelleses hatóanyagoknál kiemelt jelentőségű az áttétképződések megakadályozása miatt. A bioaktív anyagok rákos sejtek adhéziójára gyakorolt hatásának mérése hatékony eszköz lehet a daganatellenes gyógyszerek tervezésében [2].

Munkám során egy evaneszcens tér alapú jelölésmentes optikai bioszenzorral, a rezonáns rácsos hullámvezető (Resonant Waveguide Grating, RWG) módszerrel valós időben vizsgáltam az élő sejtek adhéziós kinetikáját különböző természetes eredetű hatóanyagok jelenlétében, fibronectin bevonaton.

A módszer által szolgáltatott adatokból számos sejtélettani folyamat időbeli lefolyását lehet nagy érzékenységgel követni. A jelölésmentes optikai bioszenzorok előnye, hogy a biomolekuláris kölcsönhatásokat esetlegesen befolyásoló jelölések nélkül végezhetjük méréseinket. E technikák analitikai jelentősége vitathatatlan napjainkban az orvosi biológiai kutatások, egészségügy, gyógyszeripar és a környezetvédelem területén.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 A sejtadhézió és jelentősége

A sejtek szervezetünk legkisebb egységei, melyek szövetekké szerveződnek az úgynevezett sejtadhézió révén. A sejtadhézió olyan alapvető biológiai folyamat, amely során a sejt specifikus receptor–ligandum kapcsolatain keresztül önmagát képes a megfelelő aljzathoz rögzíteni vagy képes másik sejthez kapcsolódni, és így szöveteket létrehozni. Az adhézió során a sejt sejtvezát átszervezve kiterül, és felveszi a sejt típusra jellemző morfológiát [3]. Emellett még kiemelkedő szerepet játszik többek között az immunitás, a sejtek közötti kommunikáció, a génexpresszió, a túlélés, a proliferáció és a rák metasztázis folyamatában is [4].

A sejtadhézió során megkülönböztetünk sejtek közötti, és a sejt és a sejten kívüli állomány, az extracelluláris mátrix (extracellular matrix, ECM) közötti adhéziót. A sejtadhézió a sejt felszínén található receptor molekulák segítségével valósul meg, ilyen molekulák az integrinek, kadherineik, szelektinek és az immunoglobulin szupercsaládba tartozó sejtadhéziós molekulák. Az extracelluláris mátrix komponensei (például fibronectin, vitronektin, kollagén) és a sejt közötti kapcsolat kialakításáért az integrinek felelősek [5].

A rákos sejtek terjedésében is kulcsfontosságú a sejtadhézió a metasztázis, áttétképződés miatt. A sejtadhézió hiányában az adherens sejtek nem képesek tovább szaporodni, elpusztulnak [6], [7]

Bizonyos hatóanyagok befolyásolják a sejtek adhézióját, ezáltal befolyásolhatják a sejtek egymás és az extracelluláris mátrixszal történő kommunikációját is, így hatással lehetnek a sejtek működésére. A sejtadhézió gátlása tumorelleses hatóanyagoknál kiemelt jelentőségű az áttétképződések megakadályozása miatt. A bioaktív anyagok rákos sejtek adhéziójára gyakorolt hatásának mérése hatékony eszköz lehet a daganatellenses gyógyszerek tervezésében [2].

2.2 Fibronectin

A fibronectin az extracelluláris mátrixban található glikoprotein, valamint a plazma (300 µg/ml) és más testnedvek oldott alkotóeleme is. A fibronectin általában dimerként van jelen, mely két közel azonos, körülbelül 250 kDa-os alegység kovalens kapcsolódásából áll. E glikoprotein a sejtek extracelluláris mátrixszal történő kölcsönhatások széles skáláját közvetíti,

emellett jelentős szerepe van a sejtek adhéziójában, vándorlásában, növekedésében és differenciálódásában. A fibronectin kritikus fontosságú a gerincesek fejlődésében. Bár már régóta tanulmányozzák, még mindig izgalmas felfedezések tárgya (például új integrin- és heparin kötőhelyek megtalálása) [7].

2.3 HeLa sejtvonala

A HeLa sejteket 1951-ben izolálták egy Henrietta Lacks nevű méhnyakrákban elhunyt nő daganatos sejtjeiből. Ez volt az első sikeres kísérlet humán eredetű sejtek *in vitro* fenntartására és szaporítására. A sejtvonala gyors osztódási sebessége és túlélőképessége miatt, a mai napig leggyakrabban használt modellorganizmus [8][9].

Meghatározott számú osztódás után az egészséges sejtek elpusztulnak, azonban a HeLa sejtek szinte halhatatlanok. E tulajdonságukat a bennük található telomeráz enzim nagy aktivitásának köszönhetik. A telomeráz enzim a DNS végén található telomer szakasz fenntartásáért felelős, melynek kopása a sejthalálhoz, apoptózishoz vezet. A HeLa sejtek genomja is jelentősen eltér az egészséges humán genomtól. A méhnyakrákos megbetegedések jelentős többségéért a géntranszferrel beépült HPV18 (Human Papilloma Virus) DNS-e felelős [9].

3 Célkitűzések

A természetes eredetű hatóanyagok vizsgálata a mai napig fontos kérdés a biokémia és gyógyszerkutatás területén, ugyanis e vegyületek kémiai sokszínűségük és széles bioaktivitásuk révén ígéretes, eddig nem látott struktúrákkal rendelkezhetnek, és így mintaként szolgálhatnak új, potenciális gyógyszer molekulák és terápiás szerek kifejlesztésében [1].

A sejtadhézió gátlása tumorellenes hatóanyagoknál kiemelt jelentőségű az áttétképződések megakadályozása miatt. A bioaktív anyagok rákos sejtek adhéziójára gyakorolt hatásának mérése hatékony eszköz lehet a daganatellenes gyógyszerek tervezésében [2]. Bizonyos hatóanyagok befolyásolják a sejtek adhézióját, ezáltal befolyásolhatják a sejtek egymással és az extracelluláris mátrixszal történő kommunikációját is, így jelentős hatással lehetnek a sejtek működésére.

A különféle biomolekuláris kölcsönhatások vizsgálatára kifejezetten alkalmasak a jelölésmentes optikai bioszenzor technikák, melyek előnye, hogy a kölcsönhatásokat esetlegesen befolyásoló jelölések nélkül végezhetjük méréseinket. A természetes eredetű vegyületek általában kis molekulatömegűek, ahol a jelölés problémás vagy akár kivitelezhetetlen is lehet [1].

Munkám során különféle természetes eredetű kismolekulás hatóanyagok sejtadhézióra gyakorolt hatását tártam fel. A hatóanyagokat hazai gyógynövényekből izolálták az Eötvös Lóránd Tudományegyetem kutatói. A kutatásom fő célja, hogy az új kivonatok közül kiszűrjük az esetlegesen rákellenes hatással rendelkezőket gyors, nagy áteresztőképességű bioszenzor módszerekkel.

A sejtadhézió vizsgálatát Epic BT jelölésmentes optikai bioszenzor technikával végeztem el, mely valós idejű kinetikai adatokat szolgáltatott a hatóanyagok hatására végbemenő folyamatokról. A mérés során fibronectin bevonatú mikrolemezt használtam. A Holomonitor M4 mikroszkóppal a már felülethez tapadt sejtek hatóanyagok hozzáadására történő sejtéletteni változásiról, köztük a sejtadhézióról is információt kaptam. A mikroszkóppal történő mérések során nem alkalmaztam fibronectin bevonatot. Kiegészítő mérésenként vizsgáltam a hatóanyagok fibronectin felületre gyakorolt kölcsönhatását is. A kísérletet HeLa sejtvonalon végeztem el.

3.1 Vizsgált hatóanyagok

A mérések alkalmával 9 természetes eredetű hatóanyagot vizsgáltam, mely vegyületek a turbolya nemzetségbe tartozó növényekben található. Ezen kismolekulás hatóanyagok ($M = 300\text{--}500$ g/mol) deoxipodofillotoxin- vagy rokon származékok, az irodalomban kevés adat található róluk. Valószínűleg erős antiproliferatív (sejtosztódást és sejtnövekedést gátló, daganatellenes) tulajdonsággal bírnak. A hatóanyagokat az ELTE Növény szerzettani Tanszékétől kaptuk (Dr. Boldizsár Imrétől és Dr. Bősze Szilviától (ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport). Szerkezetüket nagyfelbontású tömegspektrometriás és tandem-tömegspektrometriás adataik alapján azonosították. Ezen hatóanyagok még kísérleti fázisban vannak, hatásuk még nincs publikálva, így jelen dolgozat keretei között az alábbi jelölésekkel hivatkozom ezen anyagokra.

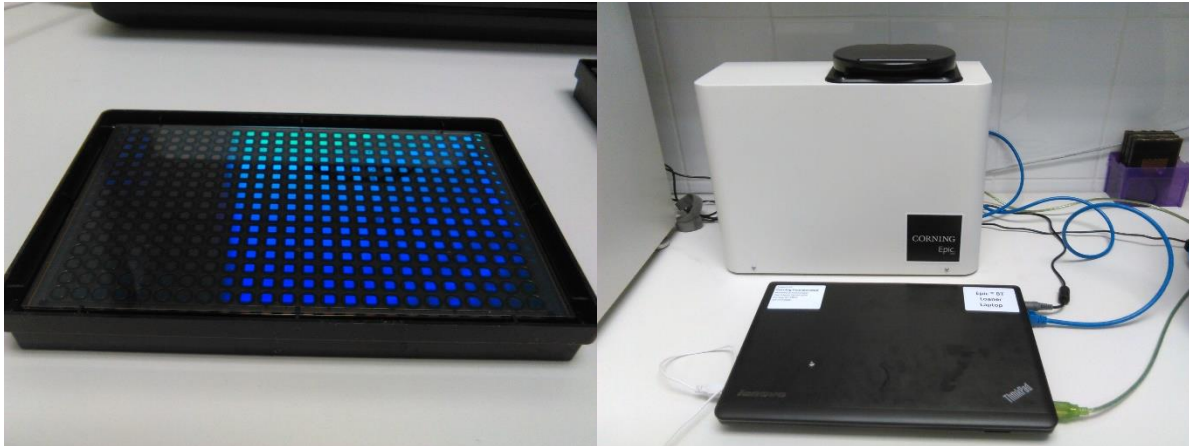
S1, S2, S3, AS éter és AS metanol

N1, N42, AN éter és AN metanol

4 Alkalmazott technikák

4.1 Az Epic BenchTop jelölésmentes optikai bioszenzor technika

Az Epic BenchTop (Corning, NY, USA, továbbiakban Epic BT) rezonáns rácsos hullámvezető (Resonant Waveguide Grating, RWG) optikai bioszenzor 96-lyukú és 384-lyukú mikrolemezekkel működik (1. ábra).

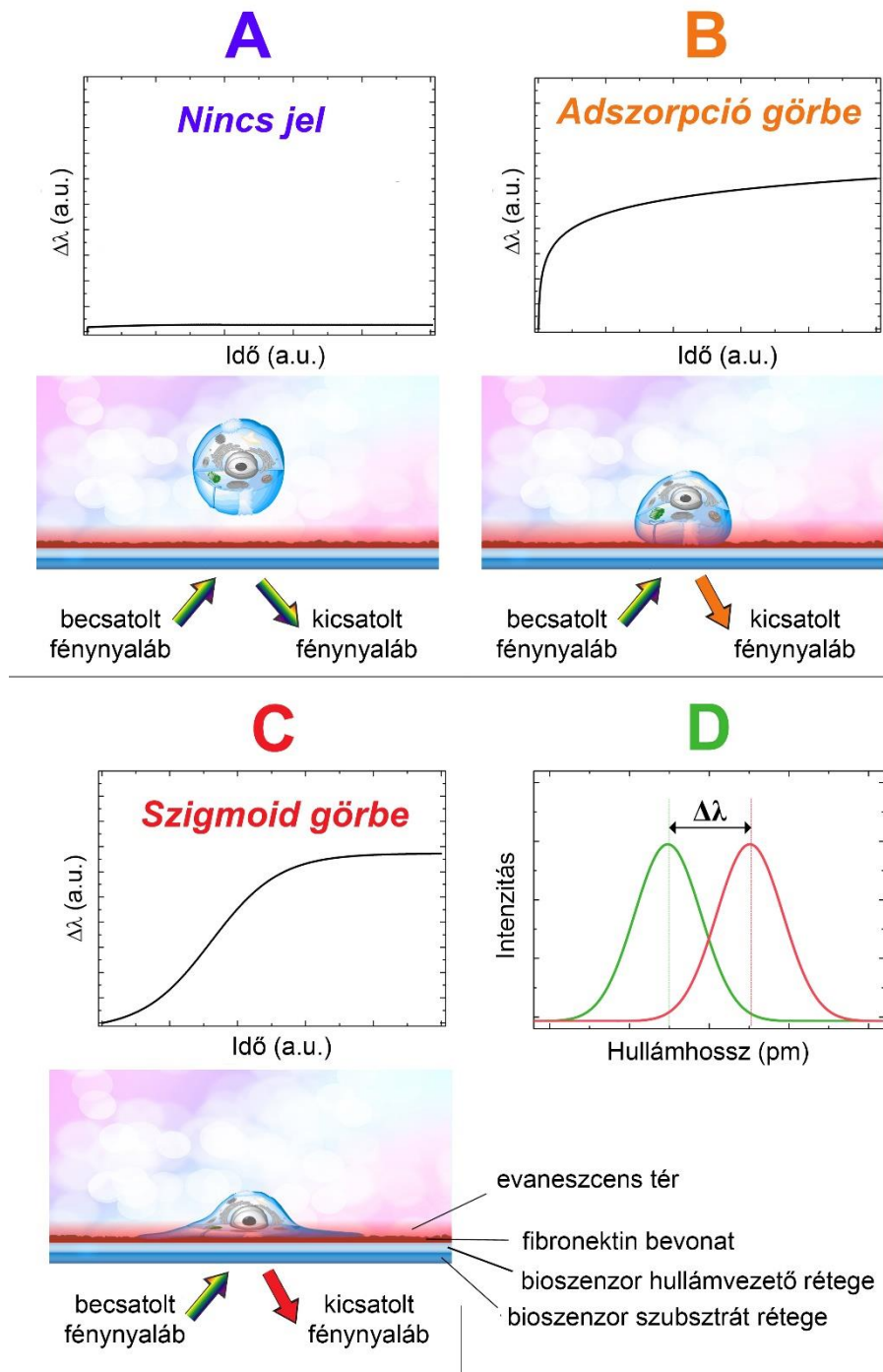


1. ábra: A bal oldali képen a méréshez használt mikrolemez látható, a jobb oldali képen az Epic BT mérőműszer.

A mikrolemez alján üveg szubsztráton egy nagy törésmutatójú, biokompatibilis niobium-pentoxid optikai hullámvezető réteg található. A műszer alapelve az evaneszcens tér jelenségén alapul. A hullámvezető rétegbe optikai rácson keresztül megfelelő szögben becsatolt fény a rétegben teljes visszaverődések sorozatával terjed. A felület felett körülbelül 150 nm vastagságban kialakul egy úgynevezett evaneszcens tér, mely intenzitása a hullámvezető felületétől távolodva exponenciális lecsengésű. E tér exponenciális sajátossága miatt a mérőfelület közvetlen közelében lévő változásokat tudjuk detektálni. A műszer a rezonáns hullámhosszt detektálja egy metál-oxid félvezető kamerával (CMOS), a kamera felbontása $90 \times 90 \mu\text{m}^2$. A kicsatolt fény hullámhosszának eltolódása arányos a felületre tapadt molekulák, sejtek miatt bekövetkező törésmutató változással [10], [11].

A lemezen található összes lyukhoz egy 4 mm^2 területű négyzet alakú mérőfelület tartozik. Mindegyik lyuk (well) esetében beágyaztak egy-egy optikai rácst a hullámvezető rétegbe, így a műszerrel az egyes lyukakat egyidejűleg és egyénileg is tudjuk vizsgálni [10], [11].

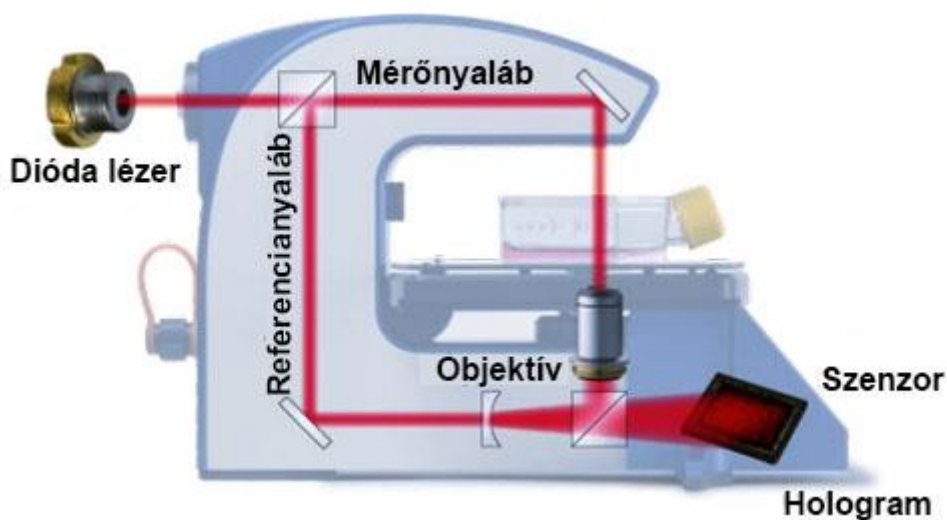
A 2. ábra hullámvezető bioszenzorral mért várható jeleket ábrázol különböző sejt – felület kapcsolat esetén.



2. ábra: Az A ábrán a bioszenzor nem érzékeli a sejtet, mivel az az evaneszcens téren kívül, felette helyezkedik el. A B ábrán a sejt a felületre tapad, azonban nem terül ki. Ebben az esetben adszorpció jellegű kinetikai görbét kapunk. A C ábrán a sejt kiterül, így a sejtadhézióra jellemző tipikus szigmoid lefutású görbét láthatunk. A D ábra a ki- és becsatolt fénynyaláb hullámhosszának különbségét, a műszer által detektált hullámhossz változást ábrázolja. Az ábra Péter és munkatársai publikációja alapján készült [10].

4.2 Holomonitor M4 transzmissziós mikroszkóp

A Holomonitor M4 transzmissziós holografikus mikroszkóp (Phase Holographic Imaging AB, Lund, Svédország) egy nagy felbontású képalkotó technika, amely valós idejű képalkotást és a sejtmorfológiai és fiziológiai paraméterek kvantitatív mérését teszi lehetővé a megfigyelt sejtek megjelölése nélkül. A mérési elrendezés a 3. ábrán látható. A technika a mérőnyaláb és a referencianyaláb közti fáziseltolódás elvén alapszik. A besugárzott lézert a minta bizonyos mértékben visszaveri vagy átrefringszi, a fáziseltolódás mértékét a minta optikai vastagsága határozza meg. Az optikai vastagság függ a vizsgálandó törésmutatótól és a tárgy fizikai vastagságától (3. ábra). A módszerrel a vizsgálni kívánt minta optikai vastagság nanométeres pontossággal mérhető [12]. Az eszközzel 3D-s felvételeket is készíthetünk.



3. ábra: A Holomonitor M4 sematikus ábrája. A lézernyaláb mérő- és referencianyalábra oszlik. A mintán és az objektíven áthaladt mérőnyaláb egyesül a referencianyalábbal, fáziseltolódást detektálunk. Az ábra a hivatalos weboldalon talált ábra alapján készült [1].

5 Anyagok és módszerek

5.1 Felhasznált anyagok

- vizsgált kismolekulás hatóanyagok (S1, S2, S3, AS éter és AS metanol, valamint N1, N42, AN éter és AN metanol jelölésekkel)
- puffer: 20mM HBSS-HEPES (49 ml HBSS+ 1 ml 1M HEPES, pH 7.4) (HBSS: Hanks' Balanced Salt Solution (Sigma), HEPES: 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin etánszulfonsav 1M, (Biochrom))
- dimetil-szulfoxid (DMSO), (VWR International)
- HeLa sejtek fenntartásához használt táp: DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 10% magzati borjúsérummal (FBS), (Biowest SAS, France) 4 mM L-glutaminnal, 100 U/mL penicillinnel, 100 µg/mL sztreptomocinnel (Merck) és 0,25 µg/mL amphotericin B-vel kiegészítve
- DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline) (Gibco, UK)
- Tripszin-EDTA

5.2 Felhasznált HeLa sejt vonal, sejt passzálás

A felhasznált HeLa sejteket (ECACC 93021013 humán méhnyakráksejtek) rutinszerűen Petri-csészében (Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Austria), inkubátorban (37 °C, 5% CO²) tenyésztették. A sejtek táptalaja DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) volt.

A konfluens sejteket a passzálás során vettem fel a tenyészcsészéből. A folyamat első lépéseként DPBS 1 ml oldatát átfolyattam a Petri csésze felületén, ez a lépés a melléktermékek, sejt törmelék eltávolítására szolgált. Következő lépésben két percre 1 ml Tripszin-EDTA oldatot pipettáztam a sejtekre. A tripszin egy proteáz, mely a fokális adhézión komponensekre van hatással, a másik komponens, az EDTA egy kelátképző, mely főként a Ca²⁺ ionokkal és Mg²⁺ ionokkal képez kelátot, így gátolja a sejtek ionigényes folyamatait, a sejt-sejt kapcsolat felbontható. A meggyengített tapadású sejteket a HeLa sejtek tápjával, DMEM-mel felfuszpendáltam.

A sejtes szuszpenziót 300 G-n 5 percig centrifugáltam, a sejtek kitapadásával átellenes oldalon leöntöttem a felülúszót. Ezt a lépést 1 ml HBSS-HEPES pufferrel is megismételtam.

A sejteket Bürker-kamra segítségével megszámláltam, majd a szükséges sejtszám alapján megfelelő térfogatú HBSS-HEPES pufferrel hígítottam a sejtes szuszpenziót.

5.3 Mérések Epic BT bioszenzorral

5.3.1 Alkalmazott hígítási sor

A hatóanyagokat DMSO-ban oldottam (törzsoldat, 50 mM), majd a hígításhoz HBSS-HEPES puffert használtam. A törzsoldatból készített 200 μ M-os oldatot felező hígítással egészen 6,25 μ M-ig hígítottam.

DMSO kontroll esetén 0,004% DMSO tartalmú oldatokat készítettem, ez a 200 μ M-os oldat DMSO tartalmával megegyező koncentráció. Az oldatokat felező hígítással állítottam elő 0,000125% DMSO koncentrációig.

5.3.2 Mérés menete

A mérés során 384-lyukú fibronektin bevonatú mikrolemezt használtam.

Mérési lépések a sejtadhézió vizsgálatára:

1. HBSS-HEPES (30 μ l) pufferrel felvettem az alapvonalat. A buborékok miatt centrifugálás (100 G, kb. 5-10 másodperc) is szükséges. Megvártam, amíg beáll az alapvonal.
2. A wellekből eltávolítottam a puffert.
3. A hatóanyag különböző koncentrációjú oldatait és a hozzá tartozó DMSO kontroll oldatokat a megfelelő wellekbe pipettáztam (30-30 μ l). A további wellekbe 30-30 μ l puffer került. A mérés 90 percig tartott.
4. A következő lépésben 12000 sejt/well pipettázása (30 μ l) történt a wellekbe, a sejt nélküli wellekbe puffer került. A mérés 2 óráig történt.
5. A mérés végén a sejtekről képet készítettem Axio Observer Z1 (Carl Zeiss) inverz fénymikroszkóppal.

A mérés kezdetén a wellek ellenőrzése AutoAlign programmal, a mérés felvétele EpicImager programmal történt.

Megjegyzendő, hogy a mérés során a hatóanyag és DMSO kontroll koncentrációk feleződnek a sejtszuszenzió hozzáadása miatt.

Mérési lépések a hatóanyag-fibronektin kölcsönhatás vizsgálatára:

1. HBSS-HEPES (30 μ l) pufferrel felvettem az alapvonalat. A buborékok miatt centrifugálás (100 G, kb. 5-10 másodperc) is szükséges. Megvártam, amíg beáll az alapvonal (~1 óra).
2. A welléből eltávolítottam a puffert.
3. A felületről lemosni kívánt hatóanyag különböző koncentrációjú oldatait és a hozzá tartozó DMSO kontroll oldatokat a megfelelő wellékbe pipettáztam (30-30 μ l). A további wellékbe 30-30 μ l puffer került. A buborékok miatt centrifugálás (100 G, kb. 5-10 másodperc) is szükséges. A mérés 90 percig tartott.
4. A welléből eltávolítottam az oldatokat. Az oldatot tartalmazó welléket négyszer átmostam pufferrel, majd a wellékbe 30-30 μ l puffer került. A buborékok miatt centrifugálás (100 G, kb. 5-10 másodperc) is szükséges.

A mérés kezdetén a wellék ellenőrzése AutoAlign programmal, a mérés felvétele EpicImager programmal történt.

5.4 Mérések Holomonitor M4 mikroszkóppal

5.4.1 Alkalmazott hígítási sor

A hatóanyagokat DMSO-ban oldottam (törzsoldat, 50 mM), majd HBSS-HEPES pufferrel a törzsoldatból 200 μ M-os oldatot készítettem. DMSO kontroll esetén 0,004% DMSO tartalmú oldat szolgált.

5.4.2 Mérés menete

A mérés során 24-lyukú bevonat nélküli mikrolemezt használtam.

Mérési lépések:

1. A wellékbe 25000 sejt/well pipettázása (150 μ l tápban) történt. A táp a sejtvonalaknak megfelelő. A 24-lyukú mikrolemezt 2 órára inkubátorba helyeztem, hogy a sejtek letapadjanak a felületre.
2. Megtörtént a táp eltávolítása.
3. 100 μ l HBSS-HEPES és 100 μ l 200 μ M koncentrációjú hatóanyag oldat került a sejtekre.
4. A mérés 2 óráig tartott, 10 percenként kép készült a wellékről.

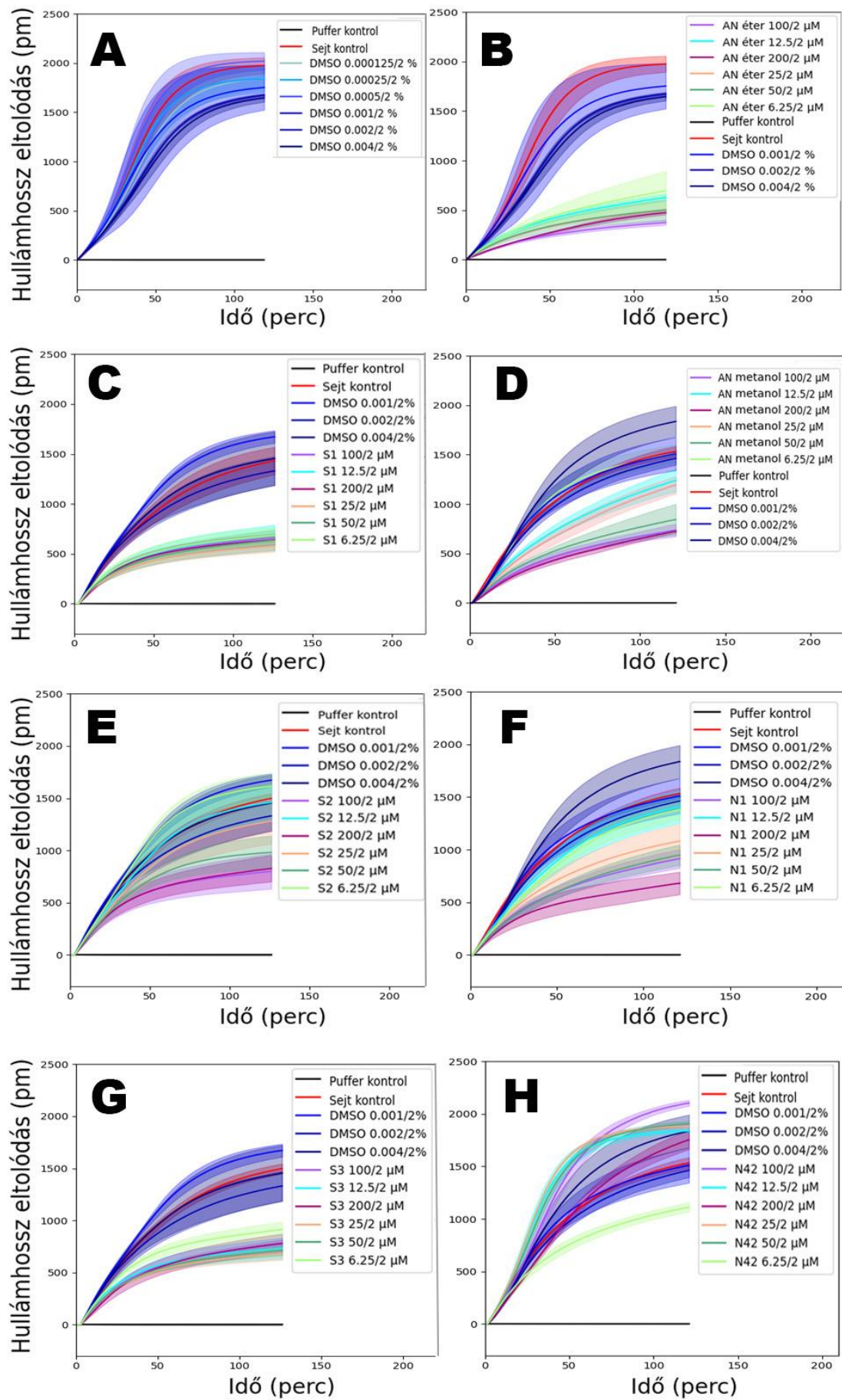
A mérés felvétele a Hstudio M4 programmal történt.

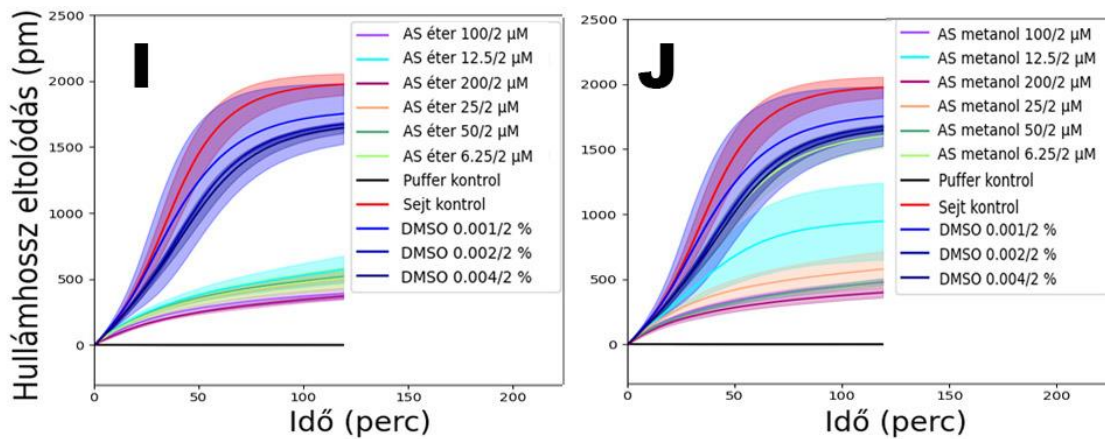
6 Eredmények és értékelésük

Az Epic BT bioszenzorral végzett mérés után a hullámhossz eltolódást ábrázoltam az idő függvényében. A hullámhossz megváltozásából a kitapadás mértékére következtethetünk. A sejtadhézióra gyakorolt hatás vizsgálatánál a sejtek bepipettázása utáni első mérési pontot vettem a nulladik időpillanatnak, így a kapott görbék csak a sejtadhéziót ábrázolták (1. számú melléklet). A kiértékelés során vizsgáltam a DMSO kontrollok hatását is. A hatóanyag oldatok DMSO koncentrációjával megegyező DMSO tartalmú oldatok nem mutattak koncentrációfüggő jeleget a sejtadhéziót illetően, a DMSO nem lépett kölcsönhatásba a fibronektin felülettel.

Általánosságban elmondható, hogy a hatóanyagok a fibronektin felületen különböző mértékben sejtadhézió gátló tulajdonsággal rendelkeztek, a kontroll mintához képest kisebb hullámhossz eltolódást detektáltunk. Egyes hatóanyagok esetében megfigyelhető koncentrációfüggés is, ekkor kivétel nélkül a magasabb koncentrációjú oldatok esetében kisebb jelet mértem, vagyis a nagyobb koncentrációjú oldat hatására a sejtadhézió jelentősebben csökken.

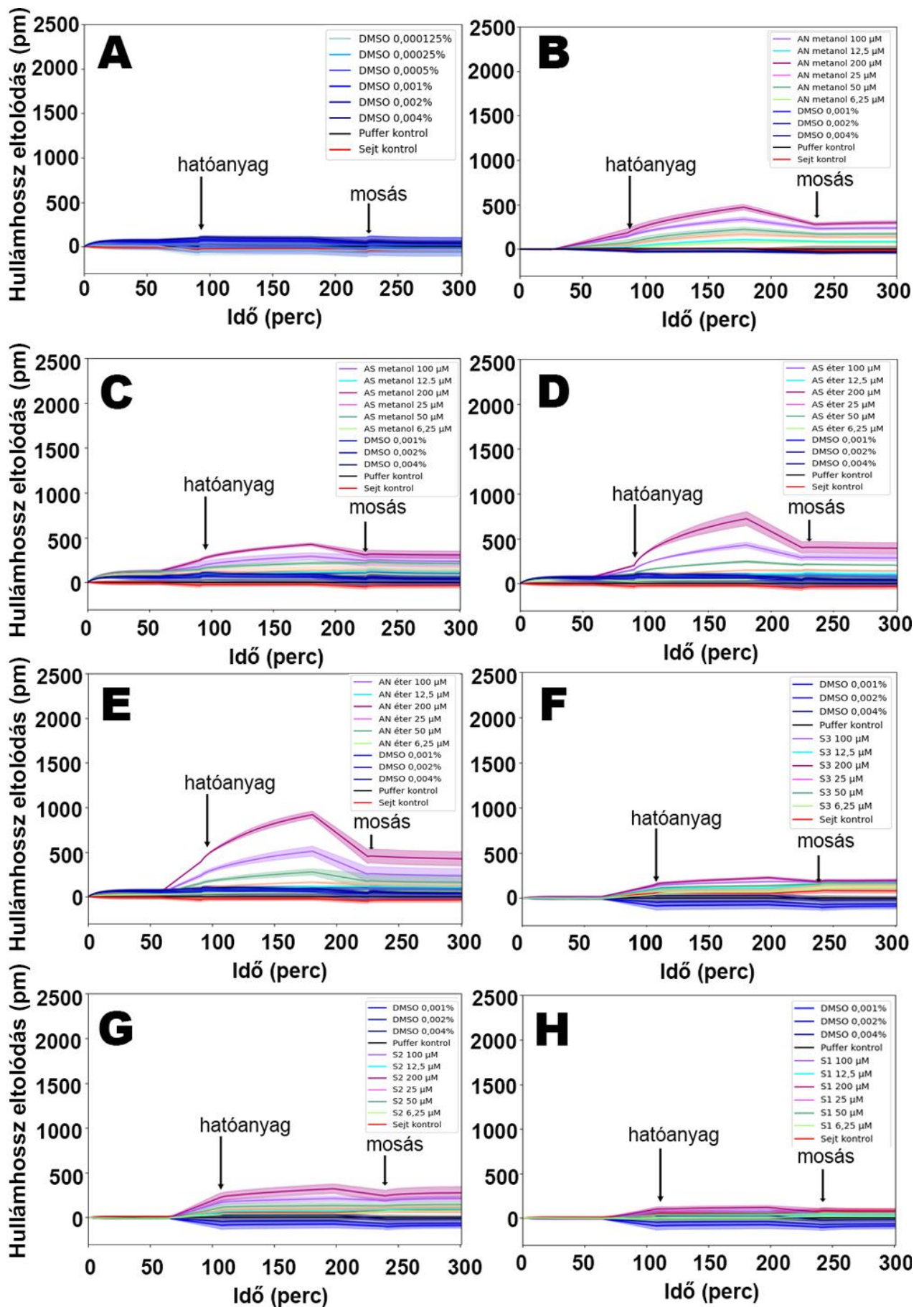
A kiértékelés során kapott eredményeket az 1. táblázatban foglaltam össze, a sejtadhéziós jelek a 4. ábrán láthatóak. Egy hatóanyagot akkor tekintettem sejtadhéziót befolyásoló hatásúnak, ha az adott sejt DMSO kontroll sejtadhéziós görbéitől jelentős mértékben eltért. Koncentrációfüggést abban az esetben feltételeztem, amikor a hatóanyag különböző koncentrációs oldataival kezelt sejtek jelei koncentráció szerint sorban követték egymást, jól elkülöníthetően. Amennyiben a sejtadhézióra koncentrációtól függetlenül volt hatással a hatóanyag, a kapott jelek közel azonos nagyságúak voltak, a kontrolltól jól elkülönültek.

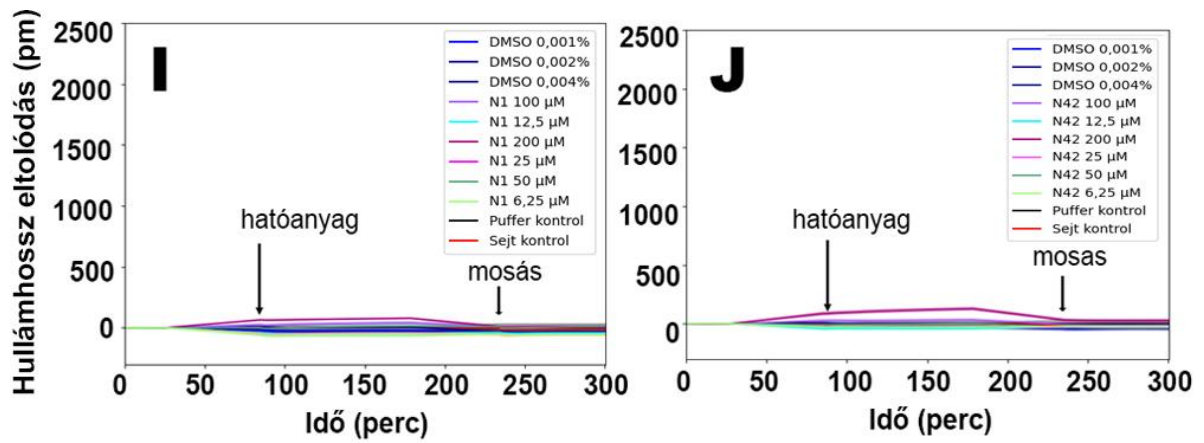




4. ábra: A mért hullámhossz eltolódás az idő függvényében (az összes sejtes kinetikai jel a 0-ba tolásával). A: DMSO kontroll, B: AN éter, C: S1, D: AN metanol, E: S2, F: N1, G: S3, H: N42, I: AS éter, J: AS metanol jelölésű hatóanyagok hatására mért sejtadhéziós görbék.

További kísérletben megvizsgáltam, hogy az egyes hatóanyagok kölcsönhatásba lépnek-e a felülettel, valamint lemoshatók-e a felületről. Ha a hatóanyag felületre történő pipettázást követően mért jel elérte a 200 pm-t a legmagasabb koncentrációkat illetően, akkor feltételezhető, hogy valamilyen kölcsönhatásba lépett a fibronectin felülettel. A felületről lemosódás valószínűségét a hatóanyag wellekből történő kimosása után bekövetkező jelcsökkenés mértékéből állapítottam meg. A kiértékelés során kapott eredményeket az 1. táblázatban foglaltam össze. A vizsgált hatóanyagok mérési jelei az 5. ábrán láthatóak. Az eredmények alapján az AN metanol, AN éter, AS metanol és AS éter hatóanyagok kölcsönhatásba lépnek a fibronectin felülettel. Ezen hatóanyagok esetében a felületről történő lemosást követően is magas jeleket detektáltam, valószínűleg nem mosódott le a hatóanyag a felületről. Az N1 és N42 hatóanyagok esetében nem tapasztaltam sejtadhézió gátló hatást, a hatóanyag bepipettázása után mért jelek alacsonyak, a legmagasabb koncentráció kivételével belesimulnak az alapvonalba. A legmagasabb koncentrációjú hatóanyag lemosódik a felületről. Az S1, S2 és S3 hatóanyagok a fibronectinnel bizonyos szinten kölcsönhatásba lépnek, azonban a felületről való lemosódás tényét az adatok alapján nem lehet egyértelműen megállapítani a nagy szórás és az alapjel eltolódása miatt.





5. ábra: A mért hullámhossz eltolódás az idő függvényében. A kinetikai görbéken látható a hatóanyagok hozzáadása és lemosása. A: DMSO kontroll, B: AN metanol, C: AS metanol, D: AS éter, E: AN éter, F: S3, G: S2, H: S1, I: N1, J: N42 jelölésű hatóanyagok esetén mért jelek a hatóanyagok és a felület kölcsönhatásának vizsgálata során.

1. táblázat: A hatóanyagok sejtadhézióra gyakorolt közvetlen hatása a HeLa sejtvonalon és a hatóanyagok kölcsönhatása a fibronektin felülettel

Hatóanyagok jelölése	HeLa sejtekre gyakorolt hatás		Kölcsönhatás a fibronektin felülettel
	Hatás	Koncentrációfüggés	
S1	van hatás	nincs koncentrációfüggés	van
S2	van hatás	van koncentrációfüggés	van
S3	van hatás	nincs koncentrációfüggés	van
N1	van hatás	van koncentrációfüggés	nincs
N42	van hatás	nincs koncentrációfüggés	nincs
AN metanol	van hatás	van koncentrációfüggés	van
AN éter	van hatás	van koncentrációfüggés	van
AS metanol	van hatás	van koncentrációfüggés	van
AS éter	van hatás	van koncentrációfüggés	van

A Holomonitor M4 transzmissziós mikroszkóppal történt mérés kiértékelésekor a terület [μm^2], optikai térfogat [μm^3] és átlagos optikai vastagság [μm] paramétereket vizsgáltam. A kiértékelés során átlagosan 5-9 sejtet követtem nyomon. A kapott mérési görbék az 1-3. számú mellékletekben találhatóak, a vastagabb fekete görbe a kiértékelt adatok átlagát jelöli.

A terület és az átlagos optikai vastagság változásából a hatóanyagok letapadt sejtekre gyakorolt esetleges hatására lehet következtetni. A felületre tapadt sejtek területének jelentős időbeli csökkenése esetén feltételezhetnénk, hogy a sejtek adhézió hiányában felgömbölyödnek, ekkor az átlagos optikai vastagság jel nagymértékben nőne az idő függvényében. A kapott eredmények alapján azonban nem tapasztaltam nagymértékű eltérést a kontroll jelekhez képest, sem a területet, sem az átlagos optikai vastagságot illetően. Az optikai térfogat görbék is konstansnak vehetőek.

Az eredmények azt mutatják, hogy a fibronectin bevonaton történt mérés során a vizsgált hatóanyagok sejtadhéziót gátló hatással bírnak, viszont a polisztirol felületre (tissue culture plate) letapadt sejteken végzett mérés során az eredmények alapján a hatóanyagok nincsenek a sejtadhézióra jelentős hatással.

A fent bemutatott eredmények oka lehet, hogy a hatóanyagmolekulák köthetnek a fibronectinhez, így elfoglalva annak kötőhelyeit, azonban még további vizsgálatok szükségesek lehetnek ennek pontosítására. A vizsgált hatóanyagok feltételezhetően csak a sejtadhéziót befolyásolják fibronectin felületen, a sejtekre valószínűleg nincsenek citotoxikus hatással.

7 Összefoglalás

Munkám során jelölésmentes optikai bioszenzorokkal vizsgáltam természetes eredetű kismolekulás hatóanyagok sejtadhézióra és sejtmozgásra gyakorolt hatását. A kísérletekben 9 hatóanyagot alkalmaztam a HeLa sejtvonalon, a sejtlelettani folyamatok időbeni lefolyását nagy érzékenységgel tudtam követni.

A mérések alkalmával 9 természetes eredetű hatóanyagot vizsgáltam, mely vegyületek a turbolya nemzetségbe tartozó növényekben találhatóak. Ezen kismolekulás hatóanyagok deoxipodofillotoxin- vagy rokon származékok, valószínűleg erős antiproliferatív (sejtosztódást és sejtnövekedést gátló, daganatellenes) tulajdonsággal bírnak.

A sejtadhéziós kinetikát egy evaneszcens tér alapú jelölésmentes optikai bioszenzorral, a rezonáns rácsos hullámvezető (Resonant Waveguide Grating, RWG) módszerrel rögzítettem a hatóanyagok jelenlétében. A Holomonitor M4 mikroszkóppal a már felülethez tapadt sejtek hatóanyagok hozzáadására történő sejtlelettani változásiról, köztük a sejtadhézióról kaptam információt. A sejtadhéziós kinetikát fibronectin bevonaton mértem és 6 koncentrációt vizsgáltam 6,25 μM és 200 μM között (a sejtszuszpenzió hozzáadásakor a koncentrációk feleződnek), a holografikus mikroszkóppal történő mérések során nem alkalmaztam fibronectin bevonatot, a mérés polisztirol felületen történt 200 μM koncentrációjú oldatokkal.

A Holomonitor technikával megfigyeltem, hogy a hatóanyagok hogyan befolyásolják a terület, optikai térfogat és átlagos optikai vastagság paramétereit, mely adatokból a sejtadhéziós tulajdonságokra tudtam következtetni. Az eredmények azt mutatják, hogy a hatóanyagokkal kezelt sejtek és a kontroll sejtek esetén a felsorolt paraméterekben nincs jelentős eltérés.

A fent említett jelölésmentes optikai bioszenzor technikával kiegészítő méréseket végeztem, mely mérések során vizsgáltam, hogy az egyes hatóanyagok kölcsönhatásba lépnek-e a felülettel, valamint lemoshatók-e a felületről. A hatóanyagok 6,25 μM és 200 μM közötti koncentrációjú oldatait vizsgáltam. Ha a hatóanyag felületre történő pipettázást követően mért jel elérte a 200 pm-t a legmagasabb koncentrációkat illetően, akkor feltételezhető, hogy valamilyen kölcsönhatásba lépett a fibronectin felülettel. A felületről lemosódás valószínűségét a hatóanyag wellekből történő kimosása után bekövetkező jelcsökkenés mértékéből állapítottam meg. Az eredmények alapján az AN metanol, AN éter, AS metanol és AS éter hatóanyagok kölcsönhatásba lépnek a fibronectin felülettel, a hatóanyag nem mosódott le a felületről, illetve az S1, S2 és S3 hatóanyagok a fibronectinnel bizonyos

szinten kölcsönhatásba lépnek, azonban a felületről való lemosódás tényét az adatok alapján nem lehet egyértelműen megállapítani a nagy szórás miatt és az alapvonal vándorlás miatt. Az N1 és N42 hatóanyagok a hatóanyag bepipettázása után mért jelek alacsonyak, a legmagasabb koncentráció kivételével belesimulnak az alapvonalba, így a kölcsönhatás tényét nem tudtam egyértelműen megállapítani.

Az eredmények azt mutatják, hogy a fibronektin bevonaton történt mérés során a vizsgált hatóanyagok sejtadhéziót gátló hatással bírnak, viszont a bevonat nélküli polisztirol felületen, a már letapadt sejteken végzett mérés során az eredmények alapján a hatóanyagok nincsenek a sejtadhézióra jelentős hatással. Az eredmények oka lehet, hogy a hatóanyag molekulák köthetnek a fibronektinhez, így elfoglalva annak kötőhelyeit, azonban még további vizsgálatok szükségesek lehetnek ennek pontosítására. A vizsgált hatóanyagok feltételezhetően csak a sejtadhéziót befolyásolják a fibronektin felületen, a sejtekre valószínűleg nincsenek citotoxikus hatással.

A kiértékelés során vizsgáltam a DMSO kontrollok hatását is. A hatóanyag oldatok DMSO koncentrációjával megegyező DMSO tartalmú oldatok nem mutattak koncentrációfüggő jelleget a sejtadhéziót illetően. A DMSO nem lép kölcsönhatásba a fibronektin felülettel.

A hatóanyagok hatására mért sejtadhéziós görbék a 4. ábrán, a hatóanyagok hozzáadása és lemosása során mért kinetikai görbék az 5. ábrán láthatók. A hatóanyagok sejtadhézióra gyakorolt hatását és a hatóanyagok kölcsönhatását a fibronektin felülettel az 1. táblázatban foglaltam össze. A Holomonitor technikával megfigyelt paraméterek (terület, optikai térfogat és átlagos optikai vastagság) változása a hatóanyagok hozzáadását követően az 1-3. számú mellékletekben találhatóak.

Jövőbeli terveim közé tartozik a kísérletsorozat folytatása a diplomamunkám keretein belül. Az alább bemutatott módszer egy viszonylag könnyű és gyors eljárás az új hatóanyagok tesztelésére. A dolgozatban szereplő kísérletet HeLa rákos sejtvonalon végeztem, mely sejtvonal a mai napig leggyakrabban használt modellorganizmus. A kísérleteket más, egészséges sejtvonallal elvégezve és az eredményeket összehasonlítva fény derülhet a vizsgált hatóanyagok esetleges rákellenes hatására. A dolgozatomban bemutatott, bioszenzoros méréseket alkalmazó módszer így segítségül szolgálhat új, potenciális gyógyszerjelölt molekulák gyorsabb tesztelésében és kifejlesztésében.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Péter Beatrixnak, a dolgozatom elkészítése során nyújtott, szakmai és baráti tanácsokért, lelkiismeretes munkájáért. Köszönettel tartozom Dr. Horváth Róbertnek, a Nanobioszenzorika Lendület Kutatócsoport vezetőjének, amiért kísérleteimet elvégezhettem, valamint Dr. Bősze Szilviának és Dr. Boldizsár Imrének a hatóanyagok izolálásáért és átadásáért. Köszönet illeti belső konzulensemét, Dr. Bonyár Attilát hozzájárulásáért.

Hivatkozásjegyzék

[i1] <https://phiab.com/>

(2021.11.28.)

- [1] B. Péter *et al.*, “Natural compounds as target biomolecules in cellular adhesion and migration: From biomolecular stimulation to label-free discovery and bioactivity-based isolation,” *Biomedicines*, vol. 9, no. 12., 2021. doi: 10.3390/biomedicines9121781.
- [2] B. Peter *et al.*, “Green tea polyphenol tailors cell adhesivity of RGD displaying surfaces: Multicomponent models monitored optically,” *Sci Rep*, vol. 7, no. February, pp. 1–16, 2017, doi: 10.1038/srep42220.
- [3] Nicolett Kanyo, “Rákos sejtek adhéziójának vizsgálata optikai bioszenzorral: a glikokálix enzimikus emésztésének hatásai”, diplomamunka, 2019.
- [4] T. Okegawa, R. C. Pong, Y. Li, and J. T. Hsieh, “The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy,” *Acta Biochim Pol*, vol. 51, no. 2, pp. 445–457, 2004, doi: 10.18388/abp.2004_3583.
- [5] R. Ungai-Salánki, B. Peter, T. Gerecsei, N. Orgovan, R. Horvath, and B. Szabó, “A practical review on the measurement tools for cellular adhesion force,” *Adv Colloid Interface Sci*, vol. 269, pp. 309–333, 2019, doi: 10.1016/j.cis.2019.05.005.
- [6] A. A. Khalili and M. R. Ahmad, “A Review of cell adhesion studies for biomedical and biological applications,” *Int J Mol Sci*, vol. 16, no. 8, pp. 18149–18184, 2015, doi: 10.3390/ijms160818149.
- [7] R. Pankov and K. M. Yamada, “Fibronectin at a glance,” *J Cell Sci*, vol. 115, no. 20, pp. 3861–3863, 2002, doi: 10.1242/jcs.00059.
- [8] B. P. Lucey, W. A. Nelson-Rees, G. M. Hutchins, and • Henrietta, “Historical Perspective Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination,” *Arch Pathol Lab Med—Vol HeLa Cells and Cell Culture Contamination—Lucey et al*, vol. 133, 2009.
- [9] Á. Dobos, “Hela sejtek tenyésztése és kiatapadásuk vizsgálata polifenol jelenlétében,” szakdolgozat, 2013.
- [10] B. Peter *et al.*, “High-Resolution Adhesion Kinetics of EGCG-Exposed Tumor Cells on Biomimetic Interfaces: Comparative Monitoring of Cell Viability Using Label-Free

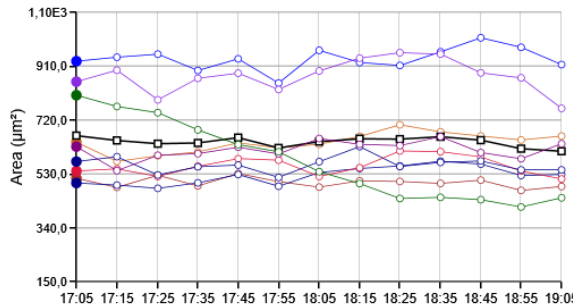
Biosensor and Classic End-Point Assays,” *ACS Omega*, vol. 3, no. 4, pp. 3882–3891, 2018, doi: 10.1021/acsomega.7b01902.

- [11] N. Orgovan, B. Peter, S. Bosze, J. J. Ramsden, B. Szabó, and R. Horvath, “Dependence of cancer cell adhesion kinetics on integrin ligand surface density measured by a high-throughput label-free resonant waveguide grating biosensor,” *Sci Rep*, vol. 4, 2014, doi: 10.1038/srep04034.
- [12] B. Péter, “Élő sejtek és kopolimer bevonatok kezelése zöld tea polifenollal (EGCg): dinamikai vizsgálatok jelölés mentes bioszenzorokkal” doktori (PhD) értekezés, 2016.

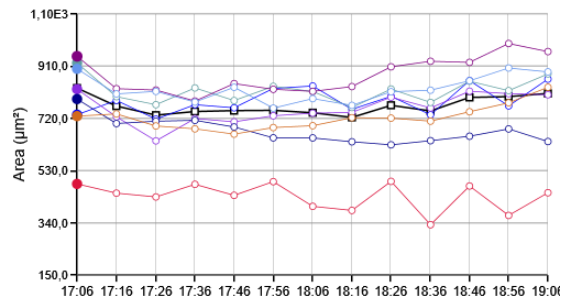
Melléklet

1. számú melléklet: A felületre tapadt sejterület [μm^2] változása a HeLa sejtvonal hatóanyagokkal kezelése után

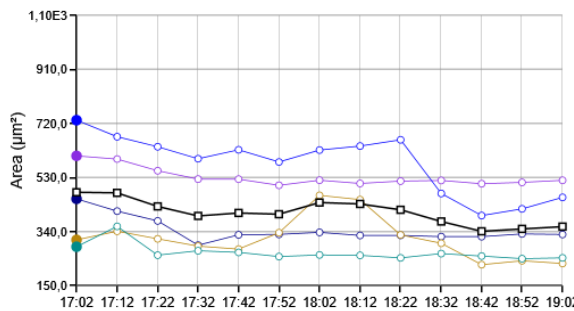
DMSO kontroll



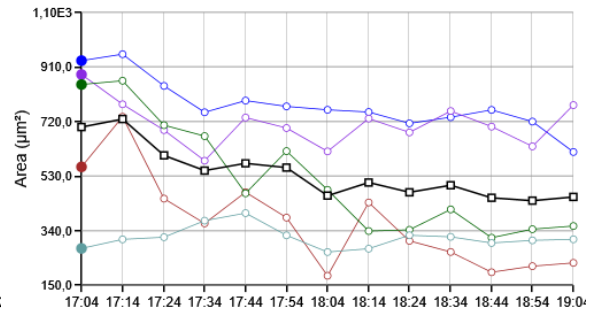
Puffer kontroll



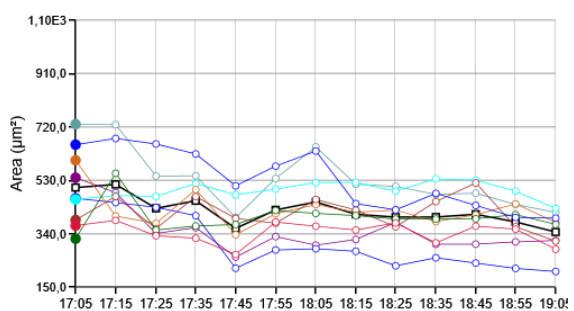
S1



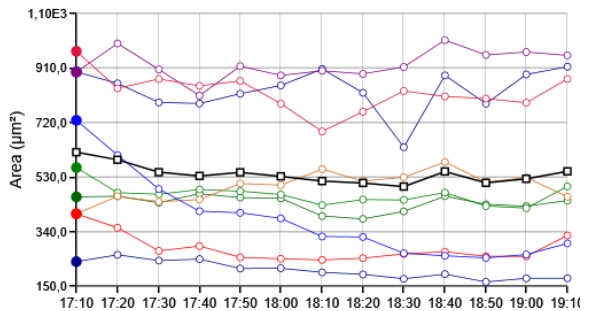
AN éter



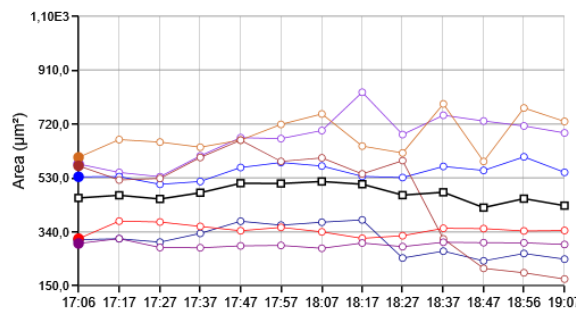
S2



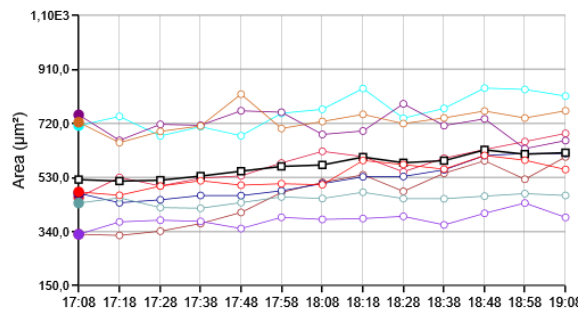
AN metanol



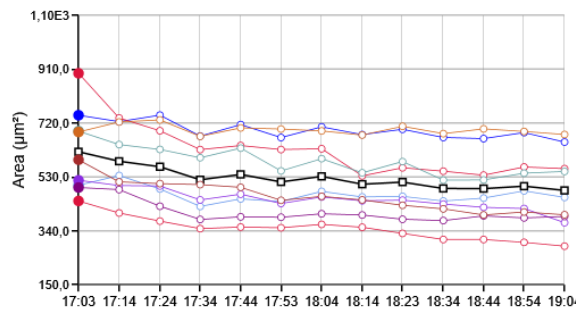
S3



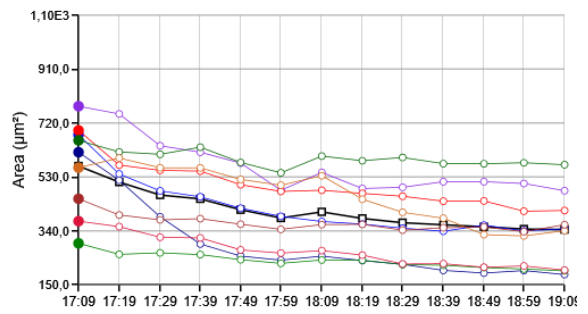
N1



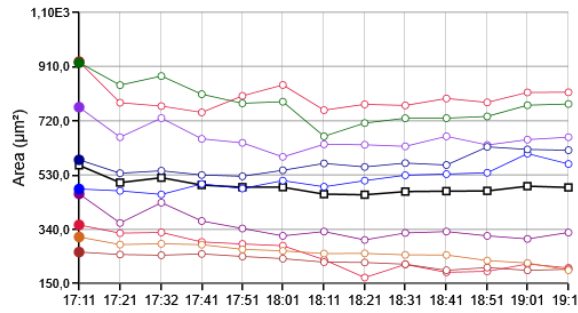
AS éter



N42

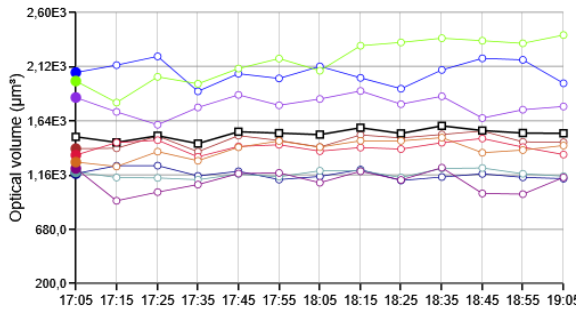


AS metanol

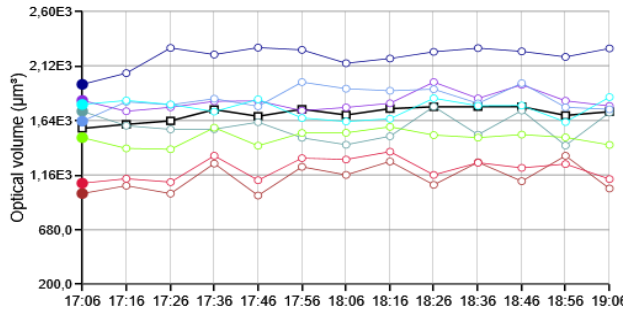


2. számú melléklet: Az optikai térfogat [μm^3] változása a HeLa sejtvonal hatóanyagokkal kezelése után

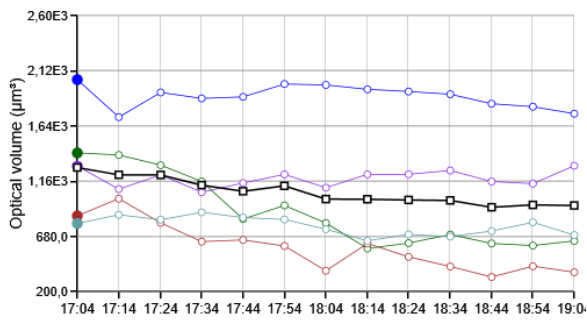
DMSO kontroll



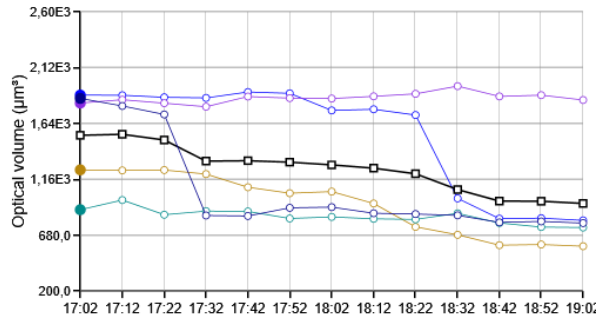
Puffer kontroll



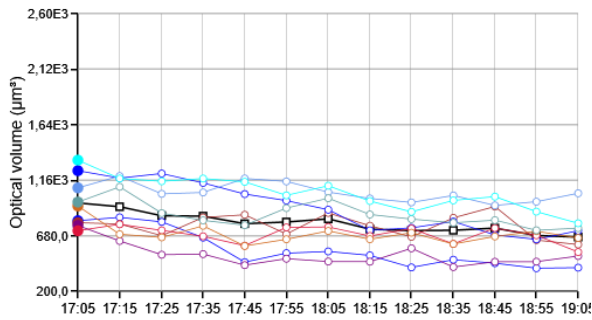
S1



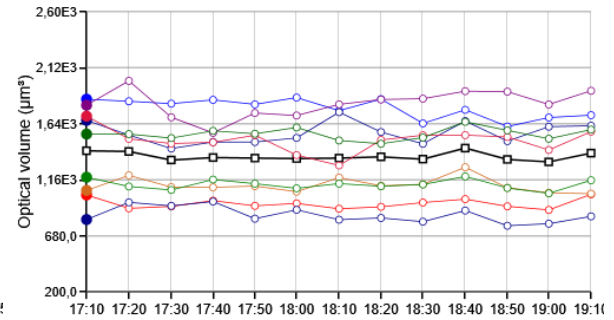
AN éter



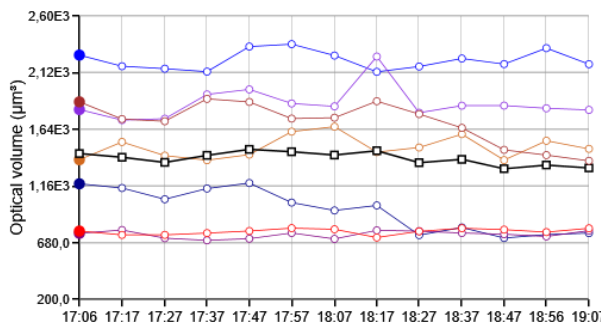
S2



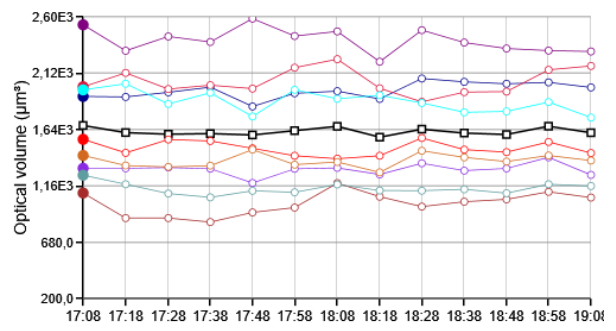
AN metanol



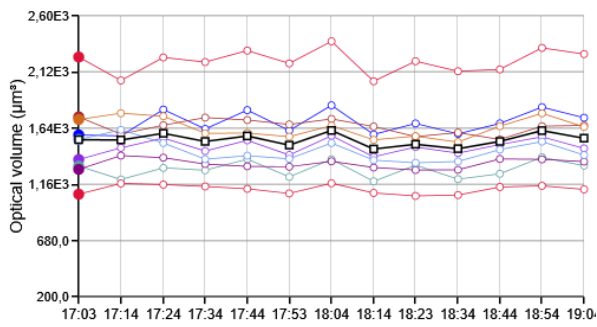
S3



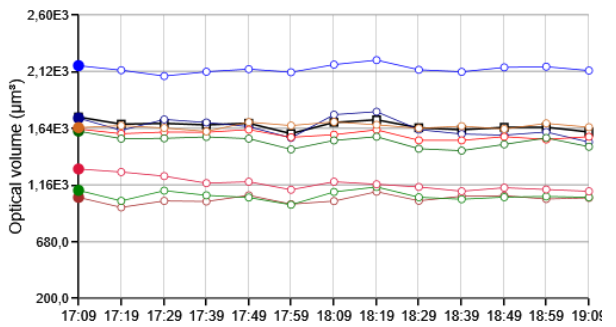
N1



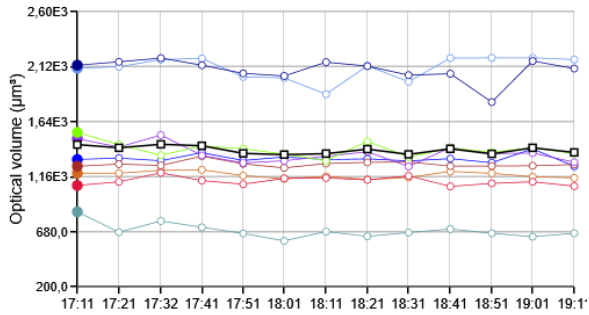
AS éter



N42

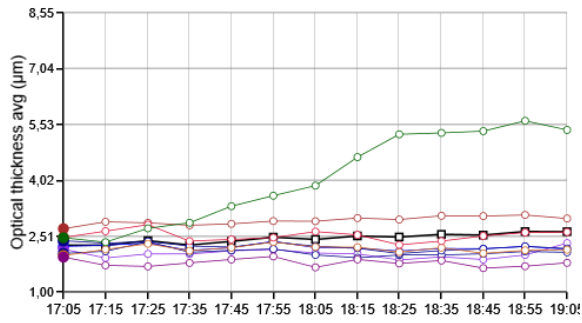


AS metanol

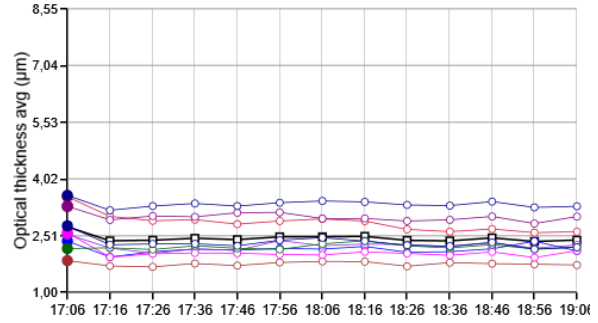


3. számú melléklet: Az átlagos optikai vastagság [μm] változása a HeLa sejtvonal hatóanyagokkal kezelése után

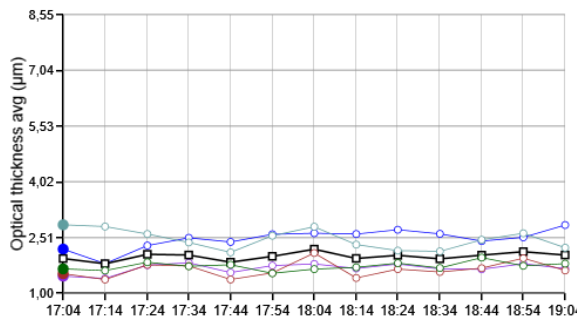
DMSO kontroll



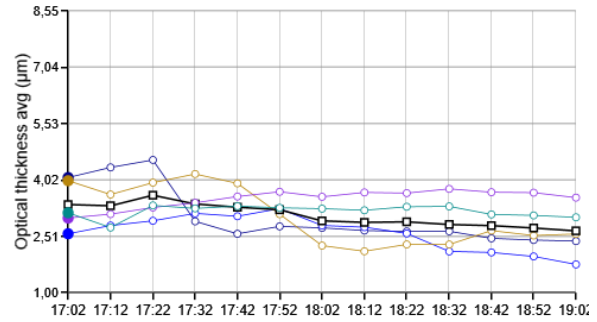
Puffer kontroll



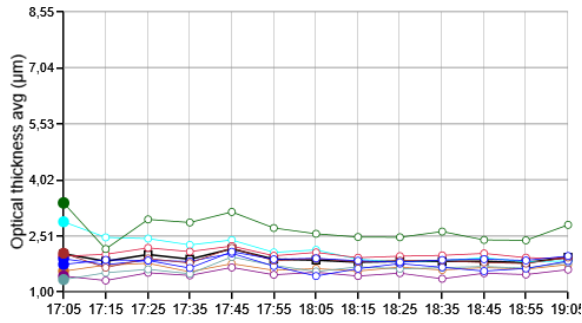
S1



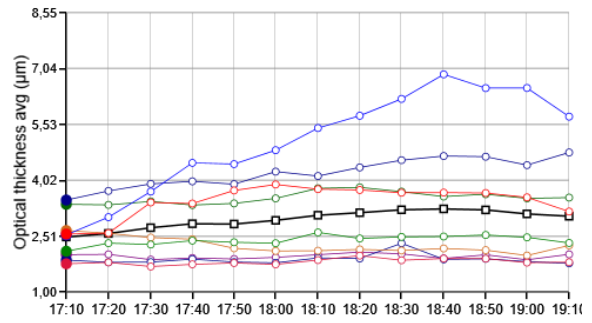
AN éter



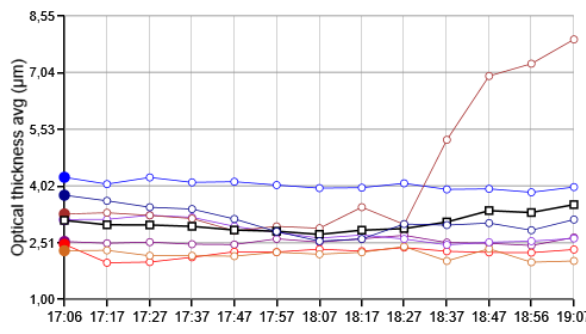
S2



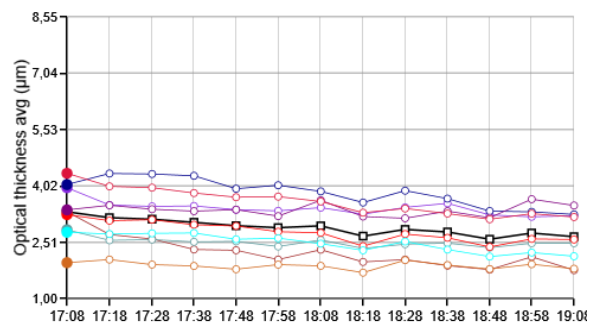
AN metanol



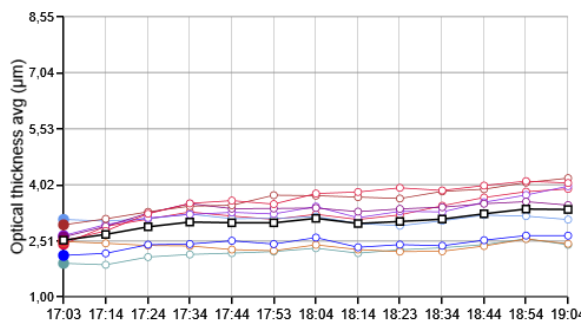
S3



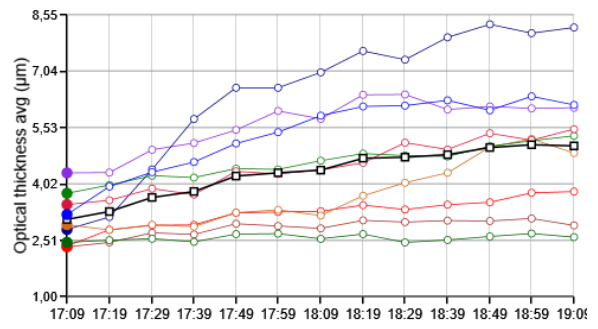
N1



AS éter



N42



AS metanol

