



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Villamosmérnöki és Informatikai Kar

Természetes eredetű hatóanyagok sejtadhézióra gyakorolt hatásának feltárása

36. Országos Tudományos Diákköri Konferencia 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 gyógyszerkutatás területén, ugyanis e vegyületek kémiai sokszínűségük és széles bioaktivitásuk miatt ígéretes új struktúrákkal szolgálnak, mintaként használhatók új, potenciális gyógyszerjelölt molekulák kifejlesztésében [1].

A sejtadhézió olyan alapvető biológiai folyamat, amely során a sejt képes egy másik sejthez kapcsolódni vagy képes önmagát a megfelelő aljzathoz rögzítenie. A sejtadhézió során megkülönböztetünk sejtek közötti, és a sejt és a sejten kívüli állomány, az extracelluláris mátrix (extracellular matrix, ECM) közötti adhéziót. A sejtadhézió alapvető a sejtek túlélésében, kulcsfontosságú számos létfontosságú sejtélettani folyamatban, mint például a sejt növekedésében, vándorlásában, differenciálódásában, a sejtek közötti kommunikációban. Az adherens sejtek (például rákos sejtek) adhézió hiányában elpusztulnak [2],[3]. Az extracelluláris mátrix egyik komponense a fibronektin, melynek jelentős szerepe van a sejtek adhéziójában.

Bizonyos hatóanyagok befolyásolják a sejtek adhézióját, ezáltal jelentős hatással lehetnek a sejtek működésére, a bioaktív anyagok rákos sejtek adhéziójára gyakorolt hatásának mérése pedig hatékony eszköz lehet a daganatellenes gyógyszerek tervezésében [2],[4]–[8].

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, fibronektin bevonaton. Egy másik, szintén jelölésmentes technikával, Holomonitor M4 transzmissziós mikroszkóppal a már felülethez tapadt sejtek hatóanyagok hozzáadására történő sejtélettani változásáról, köztük a sejtadhézióról kaptam információt. E mérések során nem alkalmaztam fibronektin bevonatot, a mérés polisztirol felületen történt. Kiegészítő mérésként a fent említett jelölésmentes optikai bioszenzor technikával megvizsgáltam a hatóanyagok fibronektin felületre gyakorolt kölcsönhatását is. A kísérletet HeLa rákos sejtvonalon végeztem el.

Az alkalmazott technikák által szolgáltatott adatokból számos sejtélettani folyamat valós időbeli lefolyását lehet nagy érzékenységgel, jelölésmentesen követni élő sejteken. A

módszerrel több párhuzamos mérés valósítható meg egy időben, a mérés során a wellékben egyénileg, egyidejűleg tudtam vizsgálni a sejtek kitapadását. Az alább bemutatott módszer egy viszonylag könnyű és gyors eljárásnak bizonyul az új hatóanyagok tesztelésére.

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].

Cell adhesion is a fundamental biological process whereby a cell is able to attach to another cell or is able to attach itself to the appropriate substrate. Two types of cell adhesion are distinguished: adhesion between cells and adhesion between a cell and the extracellular matrix (ECM). Cell adhesion is essential for cell survival as a key to many vital cellular processes, such as cell growth, migration, differentiation and intercellular communication. Cancer cells die in the absence of cell adhesion [2],[3]. Fibronectin is one of the components of the extracellular matrix, which has a major role in cell adhesion.

Certain compounds affect cell adhesion resulting a significant impact on cell function. Measuring the effect of bioactive substances on cancer cell adhesion can be a powerful tool for the design of anticancer drugs [2],[4]–[8].

In my work 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.

From the data provided by the techniques used, the real-time progression of many cellular life processes can be monitored label-free on living cells with high sensitivity. The method allows multiple parallel measurements to be performed simultaneously. The method described below is a relatively easy and quick way to test new active substances.

Rövidítésjegyzék

DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	Dulbecco módosított Eagle táptalaj
DMSO	dimethyl-sulfoxide	dimetil-szulfoxid
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline	Dulbecco foszfátpufferelt sóoldat
ECM	extracellular matrix	extracelluláris mátrix
FBS	fetal bovine serum	magzati borjúsérum
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution	Hanks sóoldat
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	4-(2-hidroxietil)-1-piperazin etánszulfonsav
RGD	arginine-glycine-aspartic acid	arginin-glicin-aszparaginsav
RWG	Resonant Waveguide Grating	rezonáns rácsos hullámvezető

Tartalom

1	Bevezetés.....	7
2	Irodalmi áttekintés	8
2.1	A sejtadhézió és jelentősége	8
2.2	Fibronectin.....	8
2.3	HeLa sejtvonal	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 sejtvonal, sejtpaszázás	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	28
	Hivatkozásjegyzék.....	29
	Mellékletek	32

1 Bevezetés

A sejtadhézió olyan alapvető biológiai folyamat, amely során a sejt képes egy másik sejthez kapcsolódni vagy képes önmagát a megfelelő aljzathoz rögzítenie. A sejtadhézió során megkülönböztetünk sejtek közötti, és a sejt és a sejten kívüli állomány, az extracelluláris mátrix (extracellular matrix, ECM) közötti adhéziót. A sejtadhéziónak fontos szerepe van a sejtek túlélésében, növekedésében, vándorlásában, differenciálódásában, a sejtek közötti kommunikációban, génexpresszióban, immunitásban, de még a metasztázisban is. A fibronectin az extracelluláris mátrix egyik komponense, melynek jelentős szerepe van a sejtadhézió folyamatában.

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 tumorelles hatóanyagoknál kiemelt jelentőségű az áttétképződések megakadályozása miatt [8].

Munkám során különféle, természetes eredetű kismolekulás hatóanyagok sejtadhézióra gyakorolt hatását tártam fel jelölésmentes technikákkal fibronectin bevonatú, illetve kezeletlen felületen. Az élő sejtek adhéziós kinetikáját különböző természetes eredetű hatóanyagok jelenlétében egy evanescens tér alapú jelölésmentes optikai bioszenzorral, a rezonáns rácsos hullámvezető (Resonant Waveguide Grating, RWG) módszerrel követtem, míg a már felülethez tapadt sejtek hatóanyagok hozzáadására történő sejtélettani változásiról egy másik, szintén jelölésmentes technikával, Holomonitor M4 transzmissziós mikroszkóppal kaptam információt. A fent említett jelölésmentes optikai bioszenzor technikával kiegészítő mérésenként megvizsgáltam a hatóanyagok fibronectin felületre gyakorolt kölcsönhatását is. A kísérletet HeLa rákos sejtvonalon végeztem el.

A módszerek által szolgáltatott adatokból számos sejtélettani folyamat időbeli lefolyását lehet nagy érzékenységgel követni, a hatóanyagok hatására végbemenő folyamatokról valós idejű kinetikai adatok szolgálnak információval [8]–[11].

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 sejtvázat átszervezve kiterül, és felveszi a sejt típusra jellemző morfológiát [12]. 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 [7].

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, kadherine, szelektinek és az immunoglobulin szupercsaládba tartozó sejtadhéziós molekulák. Az extracelluláris mátrix komponensei (például fibronectin, vitronectin, kollagén) és a sejt közötti kapcsolat kialakításáért az integrinek felelősek [13].

A rákos sejtek terjedésében is kulcsfontosságú a sejtadhézió a metasztázis, áttétképződés miatt. A sejtadhézió hiányában az adherens sejtek nem képesek tovább szaporodni, elpusztulnak [2],[3].

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 tumorelles hatóanyagoknál kiemelt jelentőségű az áttétképződések megakadályozása miatt. A bioaktív anyagok rákos sejtek adhéziójára gyakorolt hatásának mérése hatékony eszköz lehet a daganatellenes gyógyszerek tervezésében [8].

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) [3].

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 [14][15].

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 [15].

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].

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, jelölésmentes módszerekkel.

A jelölésmentes technikák 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 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. Egy másik, szintén jelölésmentes technikával, Holomonitor M4 transzmissziós mikroszkóppal a már felülethez tapadt sejtek hatóanyagok hozzáadására történő sejtélettani változásáról, köztük a sejtadhézióról kaptam információt. E 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 bioaktív anyagok rákos sejtek adhéziójára gyakorolt hatásának mérése hatékony eszköz lehet a daganatellenes gyógyszerek tervezésében [2],[4]–[8].

3.1 Vizsgált hatóanyagok

A mérések alkalmával 9 természetes eredetű hatóanyagot vizsgáltam, mely vegyületek a turbolya nemzetségbe tartozó növényekben található. Ezen kismolekulás hatóanyagok ($M = 300\text{--}500\text{ g/mol}$) 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-szervezettani 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.

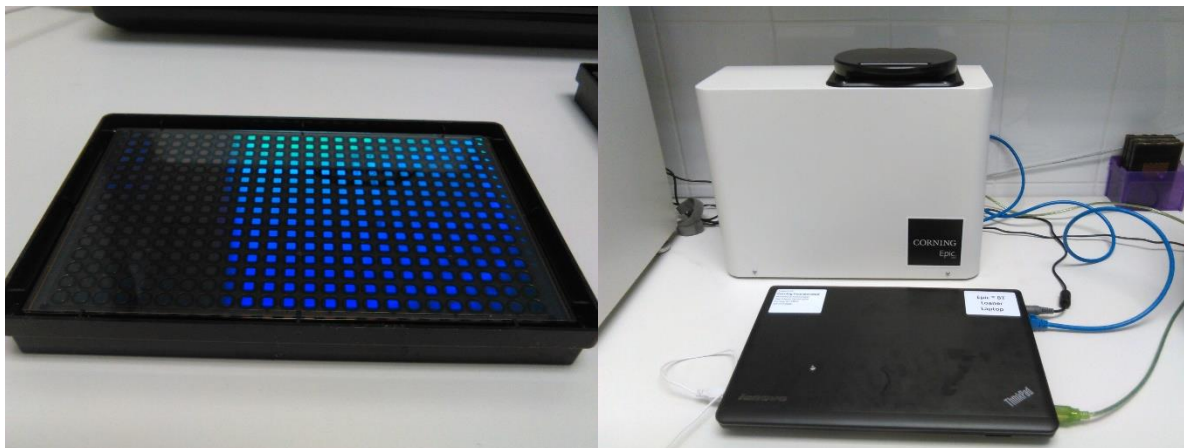
S1, S2, S3, AS éter és AS metanol

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).

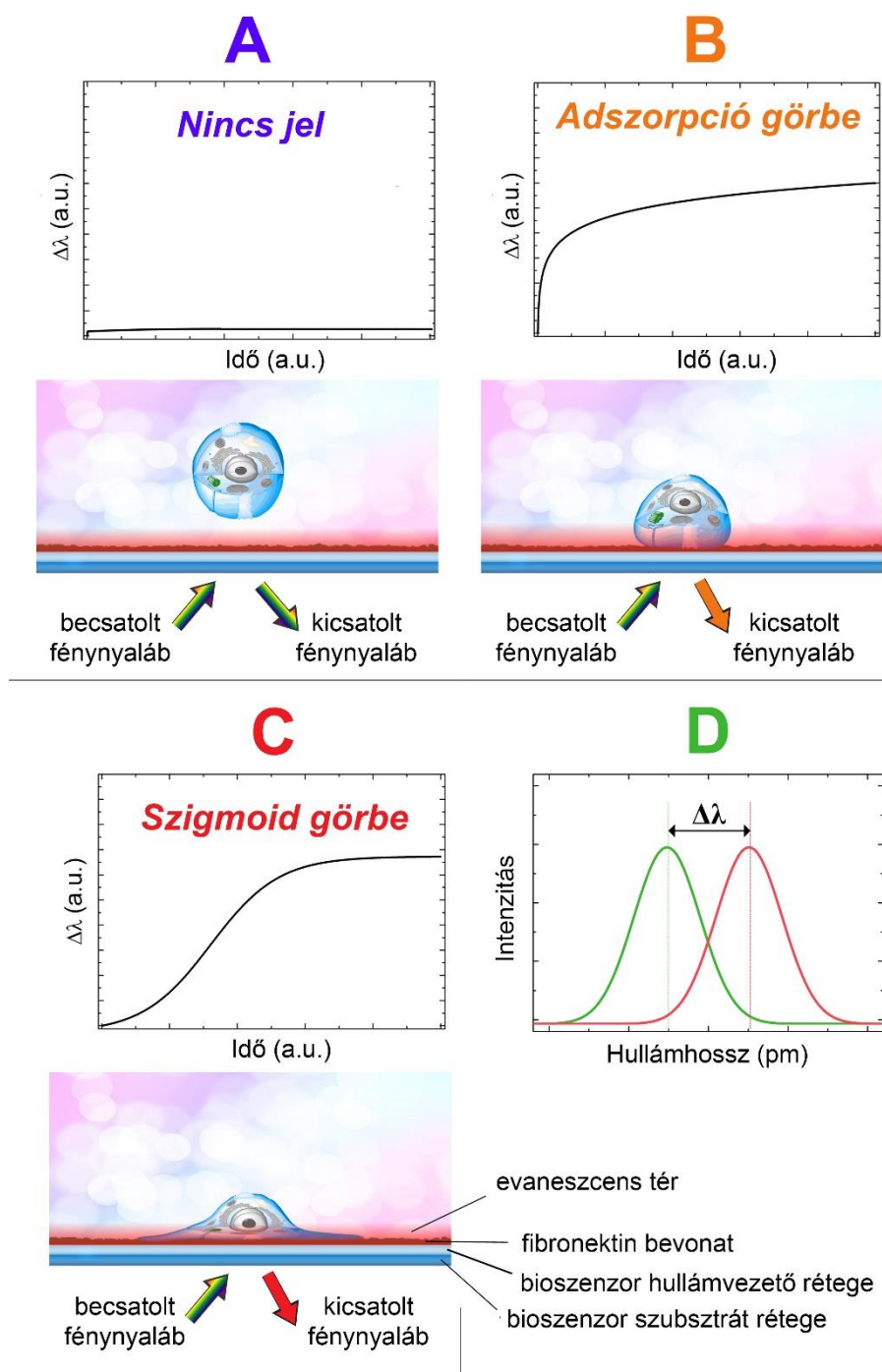


1. ábra: A bal oldali képen a méréshez használt mikrolemez látható, a jobb oldali képen az Epic BT mérőműszer.

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 [9],[11],[16]–[20].

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 [9],[11],[16]–[18],[21].

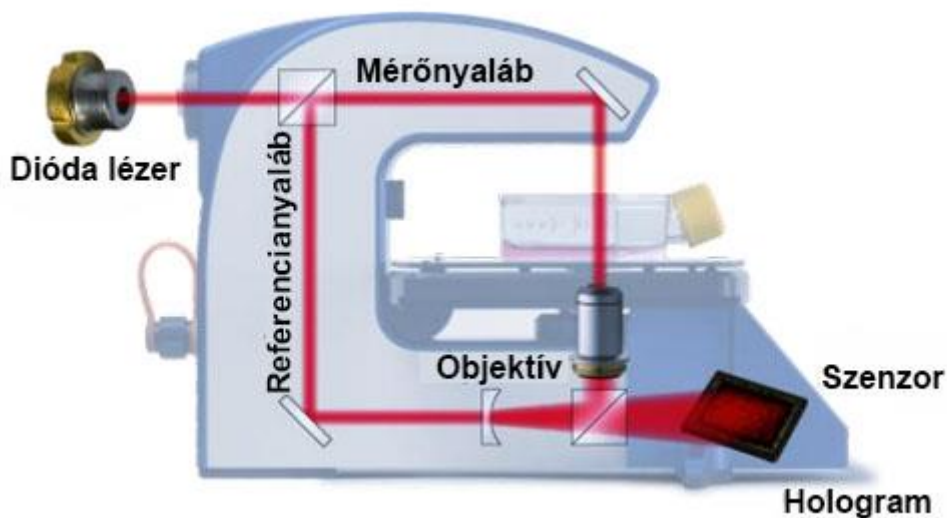
A 2. ábra hullámvezető bioszenzorral mért várható jeleket ábrázol különböző sejt – felület kapcsolat esetén.



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 adszorpciós 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 [16].

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 fényt a minta bizonyos mértékben visszaveri vagy átereszt, 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 [22]–[24]. 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-hidroxietil)-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, sejtpasszálás

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 tenyészcsészből. A folyamat első lépéseként DPBS 1 ml oldatát átfolyattam a Petri csésze felületén, ez a lépés a melléktermékek, sejttörmelékek eltávolítására szolgált. Következő lépésben két percre 1 ml Tripszin-EDTA oldatot pipettáztam a sejtekre. A tripszin egy proteáz, mely a fokális adhézis 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 kapcsolatok felbonthatók. 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 megszámoltam, 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 fibronectin 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 welllekből eltávolítottam a puffert.
3. A hatóanyag különböző koncentrációjú oldatait és a hozzá tartozó DMSO kontroll oldatokat a megfelelő welllekbe pipettáztam (30-30 μ l). A további welllekbe 30-30 μ l puffer került. A mérés 90 percig tartott.
4. A következő lépésben 12000 sejt/well pipettázása (30 μ l) történt a welllekbe, a sejt nélküli welllekbe 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 welllek 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.

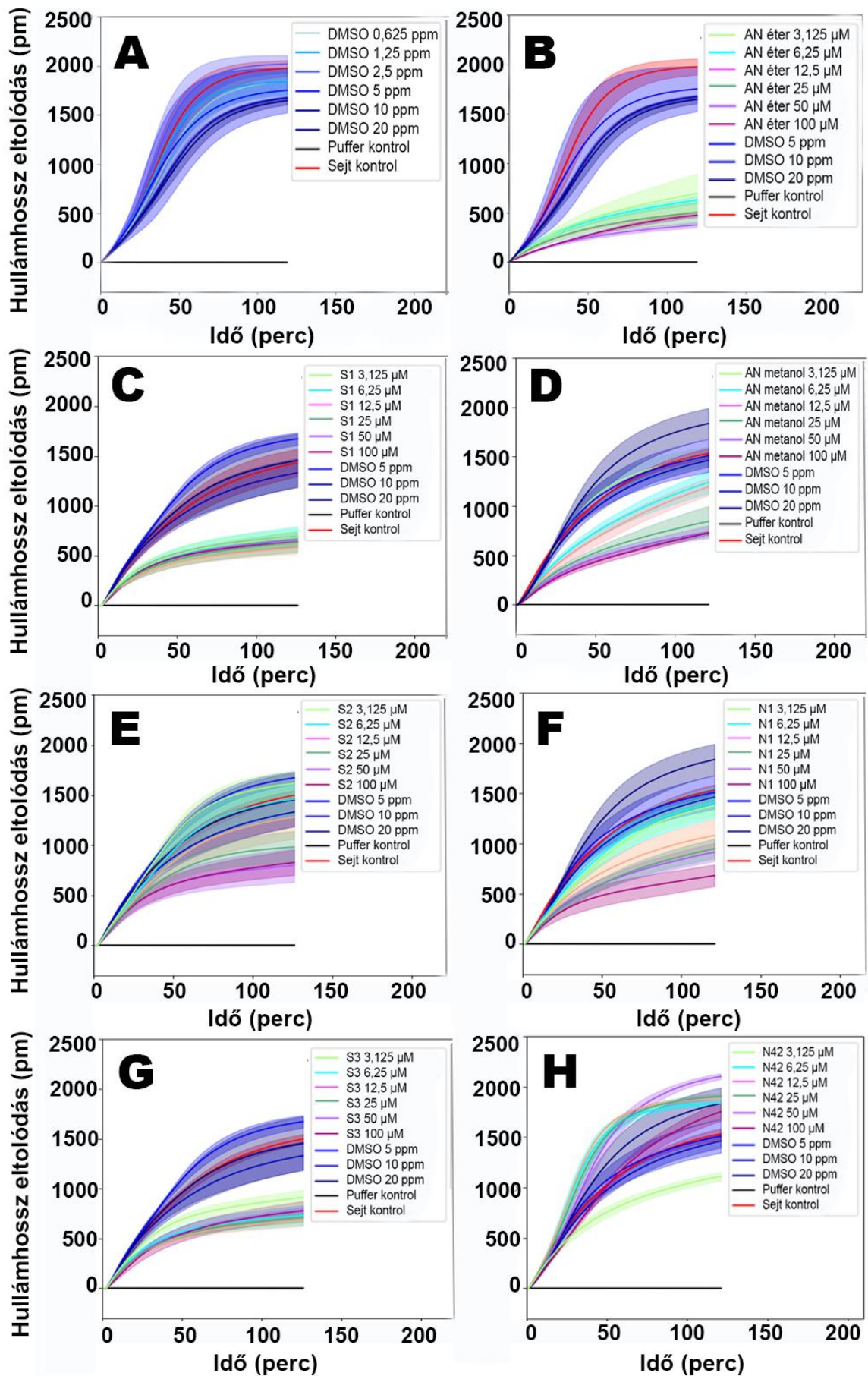
A mérés felvétele a Hstudio M4 programmal történt.

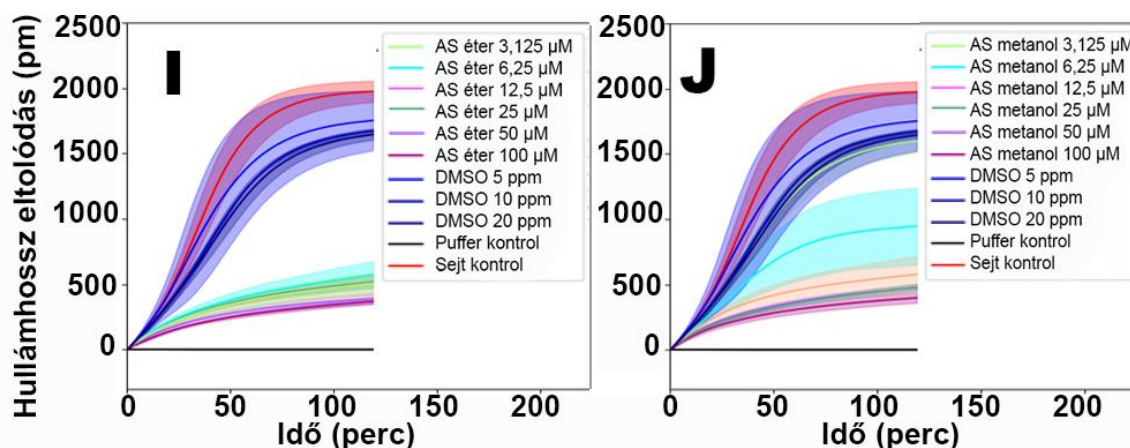
6 Eredmények és értékelésük

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.

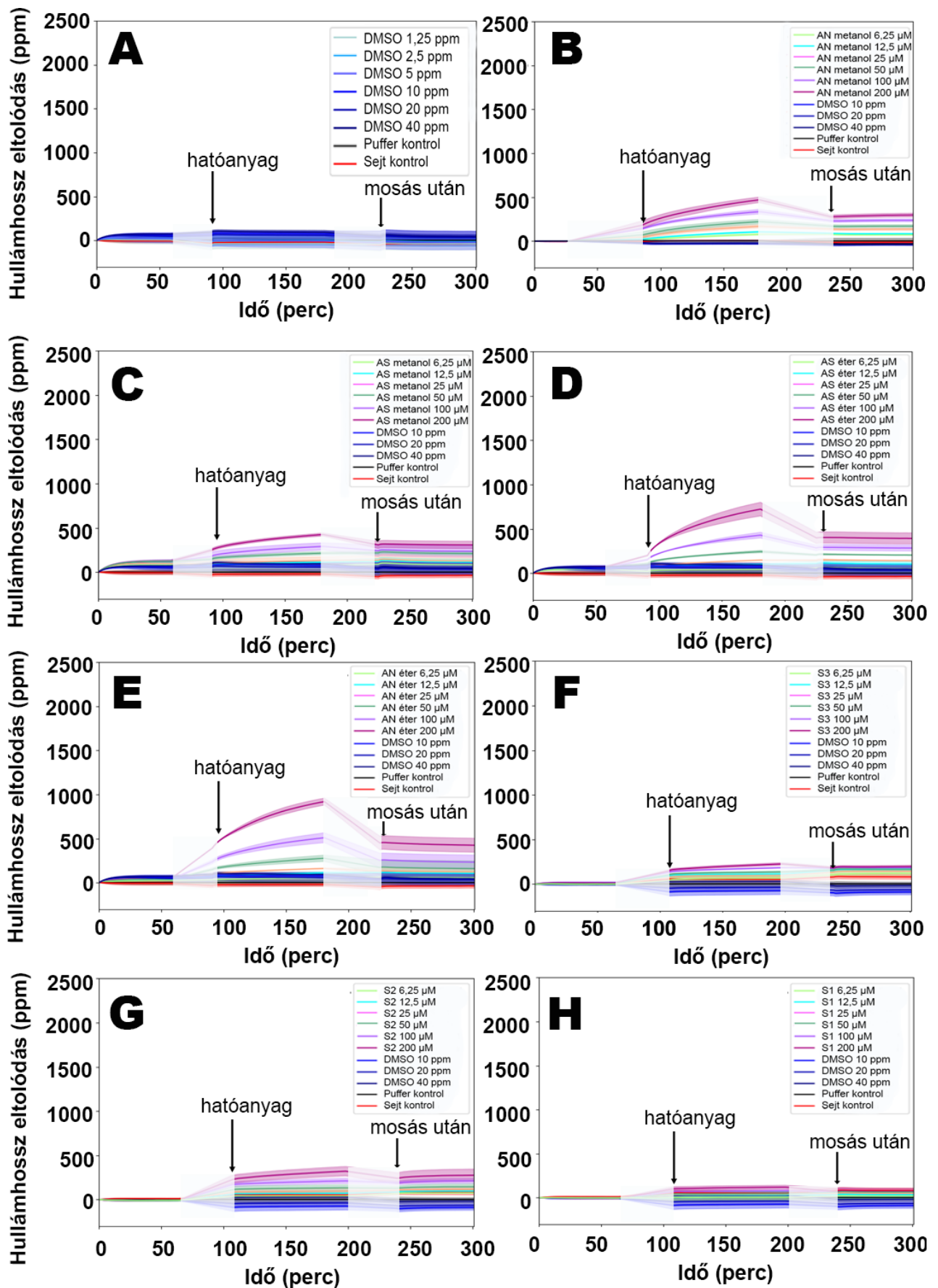
A kiértékelés során kapott eredményeket az 1. táblázatban foglaltam össze, a sejtadhéziós jelek a 4. ábrán láthatóak. Egy hatóanyagot akkor tekintettem sejtadhéziót befolyásoló hatásúnak, ha az adott sejt DMSO kontroll sejtadhéziós görbétől jelentős mértékben eltért. Koncentrációfüggést abban az esetben 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.

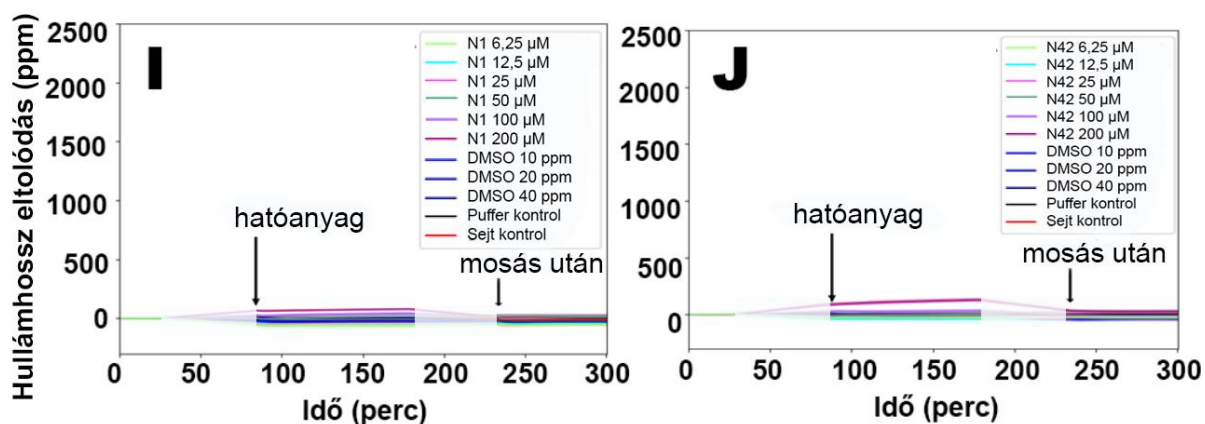




4. ábra: A mért hullámhossz eltolódás az idő függvényében (az összes sejtes kinetikai jel a 0-ba tolásával). A: DMSO kontroll, B: AN éter, C: S1, D: AN metanol, E: S2, F: N1, G: S3, H: N42, I: AS éter, J: AS metanol jelölésű hatóanyagok hatására mért sejtadhéziós görbék.

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 fibronektin 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 fibronektin 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 fibronektinnel 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. Az első nyíl a megfelelő hatóanyag oldatok fibronectin felületre kerülése utáni, a második nyíl az oldatok felületről lemosása utáni első mérési pontot jelölik. A halványított sávok időtartama alatt a mérés szüneteltetve volt a pipettázás és mosás miatt.

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

Hatóanyagok jelölése	HeLa sejtekre gyakorolt hatás	Kölcsönhatás a fibronektin felülettel
S1	sejtdhézió gátló hatás	van
S2	sejtdhézió gátló hatás, koncentrációfüggés	van
S3	sejtdhézió gátló hatás	van
N1	sejtdhézió gátló hatás, koncentrációfüggés	nincs
N42	sejtdhézió gátló hatás	nincs
AN metanol	sejtdhézió gátló hatás, koncentrációfüggés	van
AN éter	sejtdhézió gátló hatás, koncentrációfüggés	van
AS metanol	sejtdhézió gátló hatás, koncentrációfüggés	van
AS éter	sejtdhézió gátló hatás, 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 sejtelettani folyamatok időbeni lefolyását nagy érzékenységgel tudtam követni.

A mérések alkalmával 9 természetes eredetű hatóanyagot vizsgáltam, mely vegyületek a turbolya nemzetségbe tartozó növényekben található. 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 sejtelettani változásáról, köztük a sejtadhézióról kaptam információt. A sejtadhéziós kinetikát fibronektin bevonaton mértem és 6 koncentrációt vizsgáltam 6,25 μM és 200 μM között (a sejtszuspenzió hozzáadásakor a koncentrációk feleződnek), a holografikus mikroszkóppal történő mérések során nem alkalmaztam fibronektin 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 fibronektin 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 fibronektin felülettel, a hatóanyag nem mosódott le a felületről, illetve az S1, S2 és S3 hatóanyagok a fibronektinnel 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 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. Az eredmények oka lehet, hogy a hatóanyag molekulák köthetnek a fibronectinhez, így elfoglalva annak kötőhelyeit, azonban még további vizsgálatok szükségesek lehetnek ennek pontosítására. A vizsgált hatóanyagok feltételezhetően csak a sejtadhéziót befolyásolják a fibronectin 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 fibronectin 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 fibronectin 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.

Az alkalmazott technikák által szolgáltatott adatokból számos sejtelettani folyamat valós időbeli lefolyását lehet nagy érzékenységgel, jelölésmentesen követni élő sejteken. A módszerrel több párhuzamos mérés valósítható meg egy időben, a mérés során a welllekben egyénileg, egyidejűen tudtam vizsgálni a sejtek kitapadását.

Az alább bemutatott módszer egy viszonylag könnyű és gyors eljárás az új hatóanyagok tesztelésére és kiszűrésére. A kiválasztott, sejtvonalakon már hatásosnak bizonyult vegyületek esetében később további kísérletekkel kell igazolni, hogy alkalmasak-e különböző betegségek gyógyítására.

Jövőbeli terveim közé tartozik a kísérletsorozat folytatása a diplomamunkám keretein belül. 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 vizsgálatok jellege miatt a nagyszámú mintán akár statisztikai vizsgálat is végezhető. 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, Dec. 2021, doi: 10.3390/biomedicines9121781.
- [2] 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, 2015, doi: 10.3390/ijms160818149.
- [3] 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.
- [4] W. H. Talib and A. M. Mahasneh, “Antiproliferative activity of plant extracts used against cancer in traditional medicine,” *Sci Pharm*, vol. 78, no. 1, pp. 33–45, 2010, doi: 10.3797/scipharm.0912-11.
- [5] V. Srivastava *et al.*, “Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads,” *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol. 13, no. 21, pp. 5892–5908, Nov. 01, 2005. doi: 10.1016/j.bmc.2005.05.066.
- [6] K. T. Yip *et al.*, “Small Molecules Antagonise the MIA-Fibronectin Interaction in Malignant Melanoma,” *Sci Rep*, vol. 6, May 2016, doi: 10.1038/srep25119.
- [7] T. Okegawa *et al.*, “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.
- [8] 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.
- [9] N. Orgovan *et al.*, “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.
- [10] Y. Fang *et al.*, “Resonant waveguide grating biosensor for living cell sensing,” *Biophys J*, vol. 91, no. 5, pp. 1925–1940, 2006, doi: 10.1529/biophysj.105.077818.

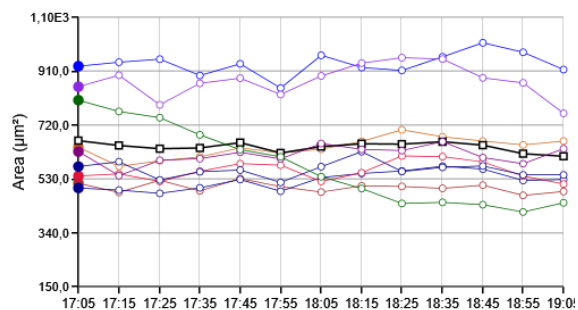
- [11] Fang Ye, *Label-Free Biosensor Methods in Drug Discovery*. Humana Press, 2015.
[Online]. Available: <http://www.springer.com/series/7653>
- [12] Nicolett Kanyo, “Rákos sejtek adhéziójának vizsgálata optikai bioszenzorral: a glikokálix enzimatis emésztésének hatásai,” Diplomamunka, 2019.
- [13] R. Ungai-Salánki *et al.*, “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.
- [14] B. P. Lucey *et al.*, “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.
- [15] Á. Dobos, “Hela sejtek tenyésztése és kiatapadásuk vizsgálata polifenol jelenlétében,” Szakdolgozat, 2013.
- [16] 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.
- [17] E. Farkas *et al.*, “Label-free optical biosensor for real-time monitoring the cytotoxicity of xenobiotics: A proof of principle study on glyphosate,” *J Hazard Mater*, vol. 351, pp. 80–89, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.jhazmat.2018.02.045.
- [18] K. Kliment *et al.*, “Label-free real-time monitoring of the BCR-triggered activation of primary human B cells modulated by the simultaneous engagement of inhibitory receptors,” *Biosens Bioelectron*, vol. 191, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.bios.2021.113469.
- [19] I. Kurucz *et al.*, “Label-free optical biosensor for on-line monitoring the integrated response of human B cells upon the engagement of stimulatory and inhibitory immune receptors,” *Sens Actuators B Chem*, vol. 240, pp. 528–535, Mar. 2017, doi: 10.1016/j.snb.2016.09.015.
- [20] A. Saftics *et al.*, “Data evaluation for surface-sensitive label-free methods to obtain real-time kinetic and structural information of thin films: A practical review with related software packages,” *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 294. Elsevier B.V., Aug. 01, 2021. doi: 10.1016/j.cis.2021.102431.

- [21] M. L. Debreczeni *et al.*, “Human primary endothelial label-free biochip assay reveals unpredicted functions of plasma serine proteases,” *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-60158-4.
- [22] P. B. Éva, “Élő sejtek és kopolimer bevonatok kezelése zöld tea polifenollal (EGCg): dinamikai vizsgálatok jelölés mentes bioszenzorokkal,” Doktori (PhD) értekezés, 2016.
- [23] B. Peter *et al.*, “Incubator proof miniaturized Holomonitor to in situ monitor cancer cells exposed to green tea polyphenol and preosteoblast cells adhering on nanostructured titanate surfaces: validity of the measured parameters and their corrections,” *Biomedical Optics*, vol. 20, no. 6, 2015, doi: 10.1117/1.JBO.20.
- [24] I. Székács *et al.*, “Label-free optical biosensors for monitoring cellular processes and cytotoxic agents at interfaces using guided modes and advanced phase-contrast imaging techniques,” in *Advanced Sciences and Technologies for Security Applications*, Springer, 2016, pp. 443–468. doi: 10.1007/978-3-319-28926-7_21.

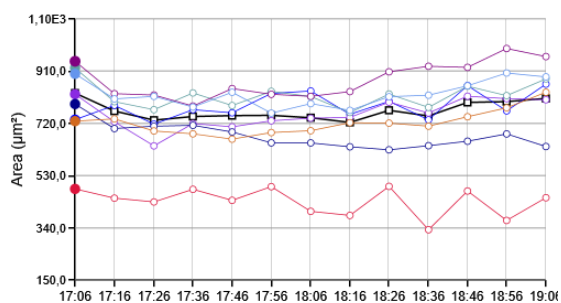
Mellékletek

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

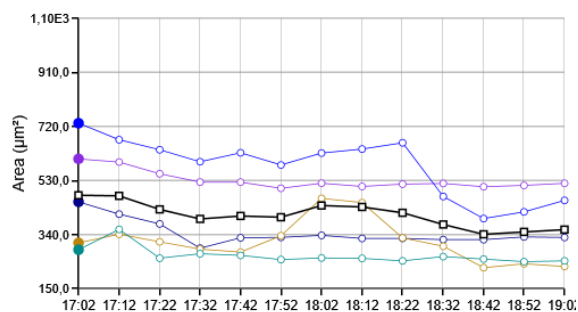
DMSO kontroll



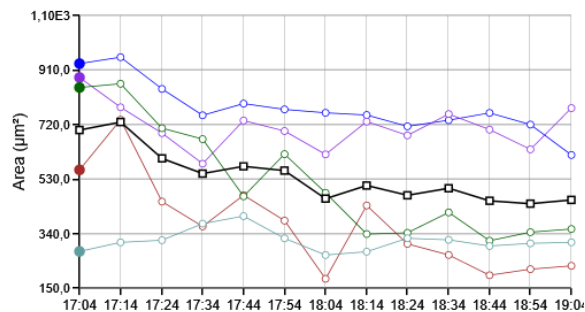
Puffer kontroll



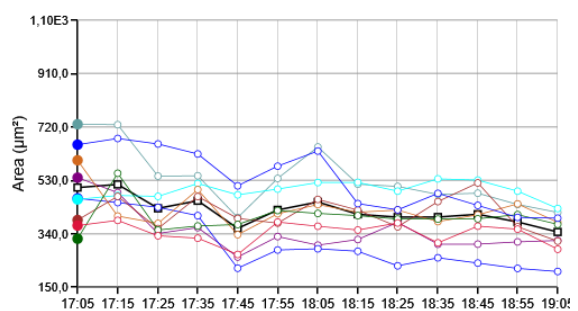
S1



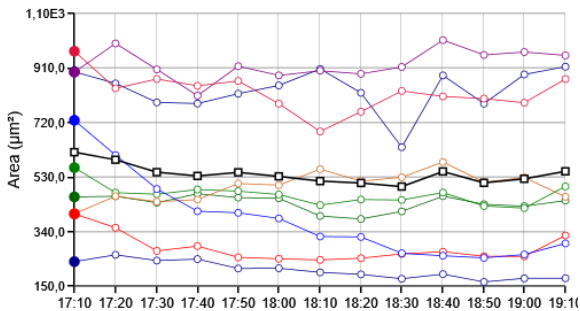
AN éter



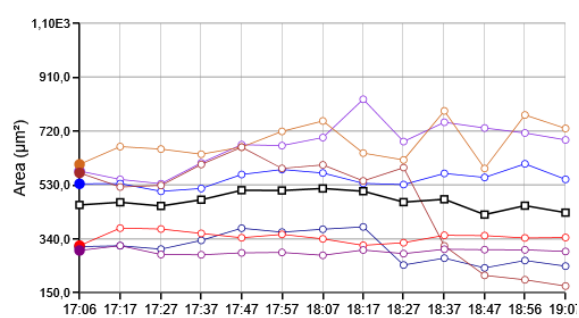
S2



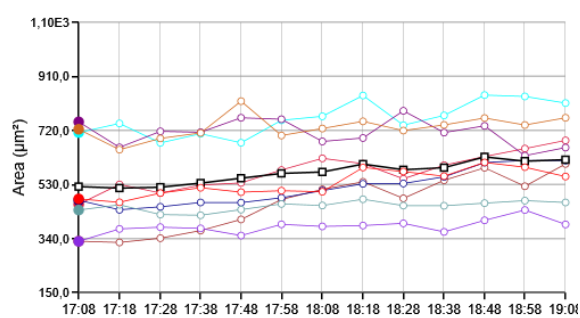
AN metanol



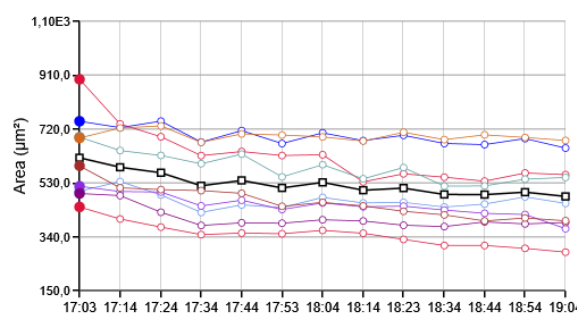
S3



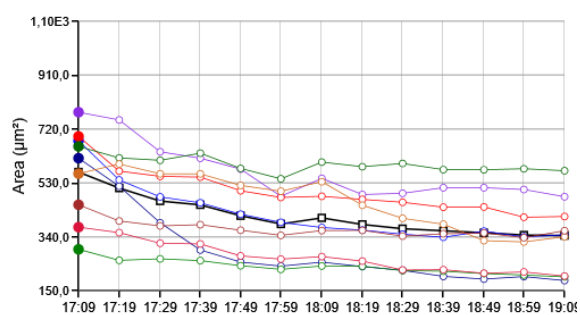
N1



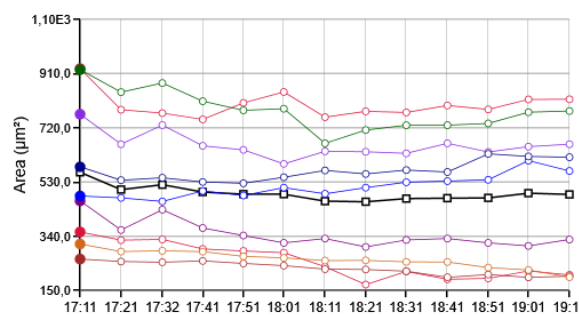
AS éter



N42

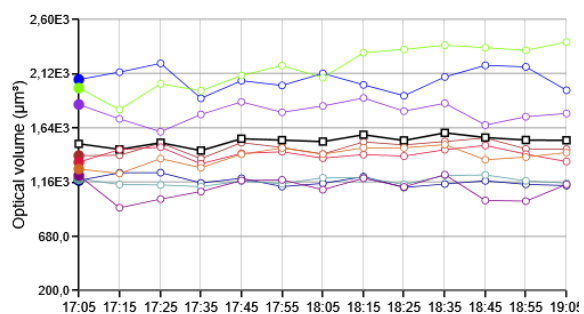


AS metanol

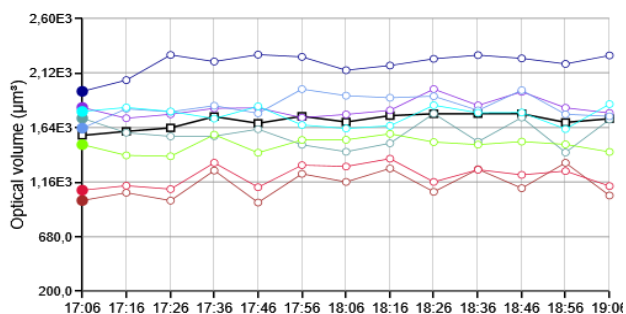


2. számú melléklet: Az optikai térfogat [μm^3] változása a HeLa sejtvonal hatóanyagokkal kezelése után

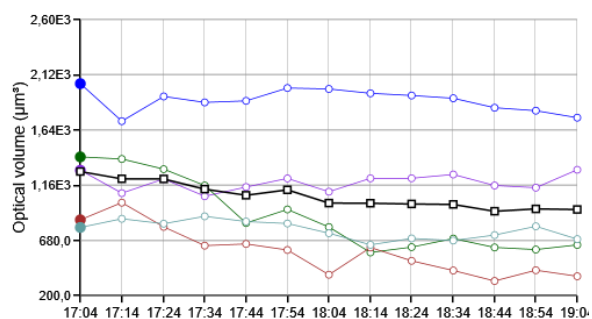
DMSO kontroll



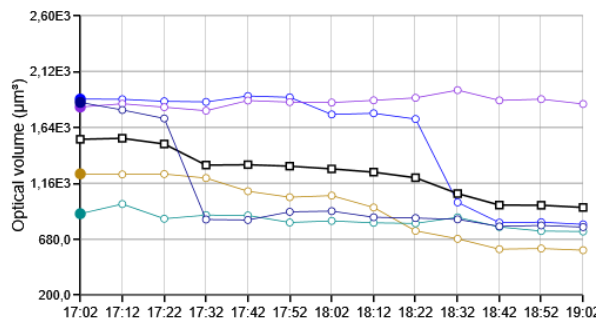
Puffer kontroll



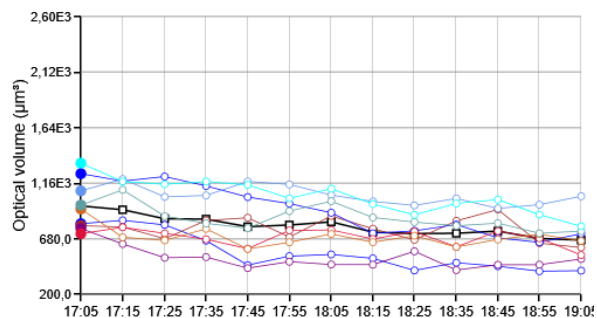
S1



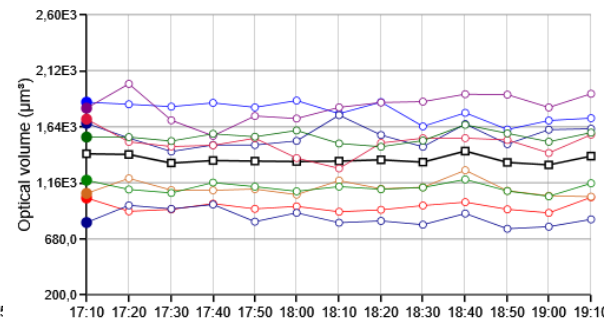
AN éter



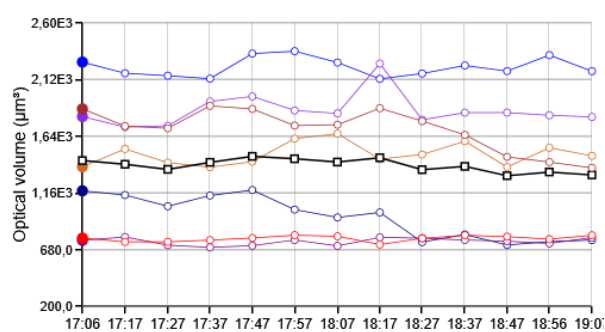
S2



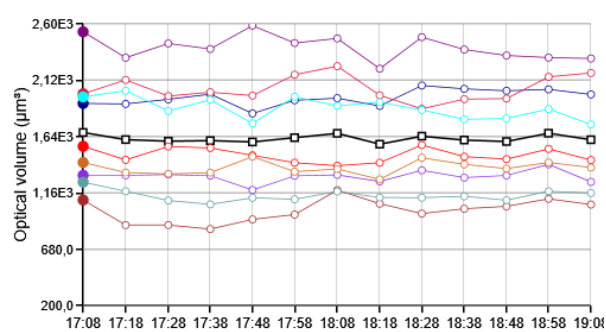
AN metanol



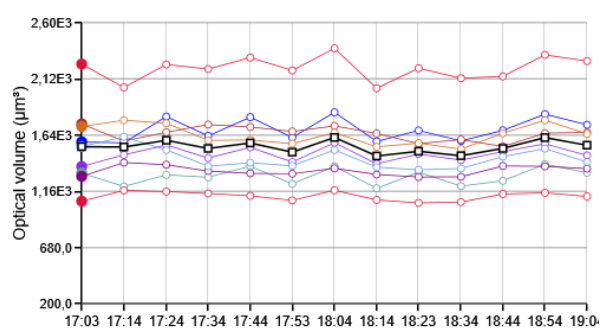
S3



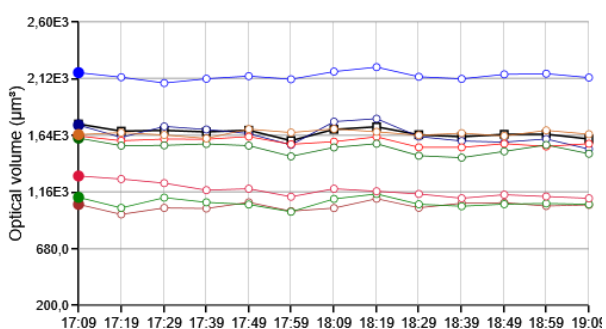
N1



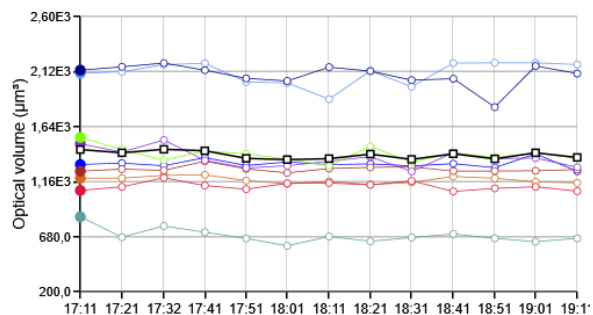
AS éter



N42

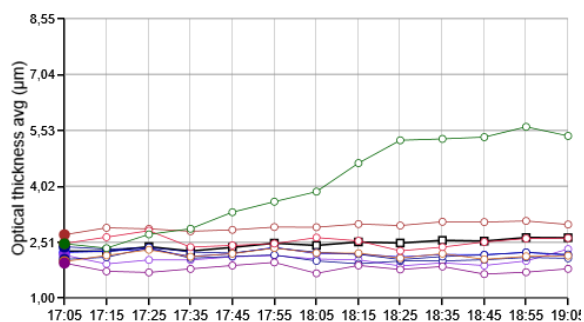


AS metanol

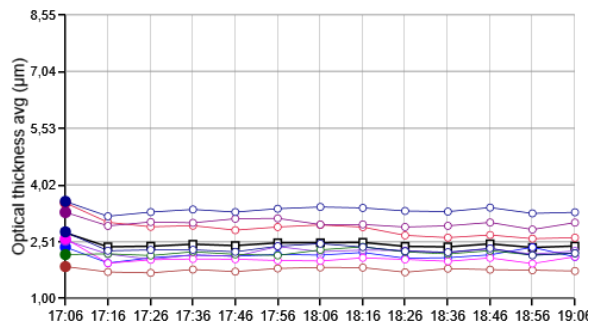


3. számú melléklet: Az átlagos optikai vastagság [μm] változása a HeLa sejtvonal hatóanyagokkal kezelése után

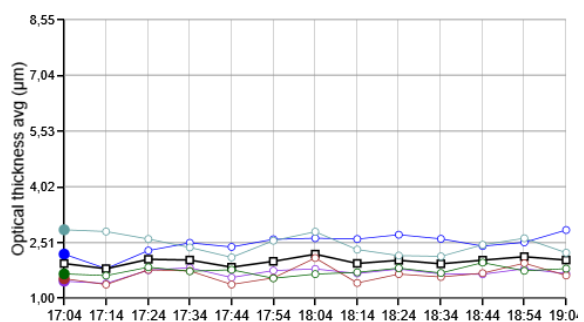
DMSO kontroll



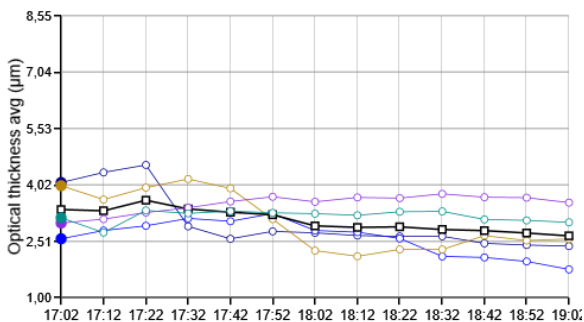
Puffer kontroll



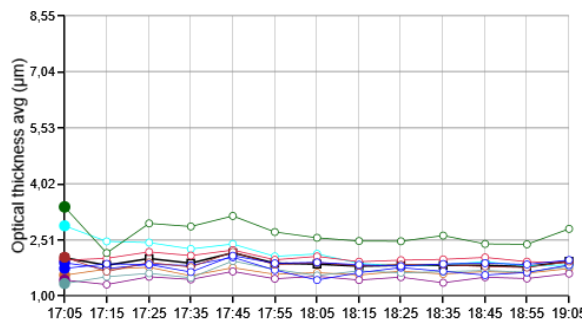
S1



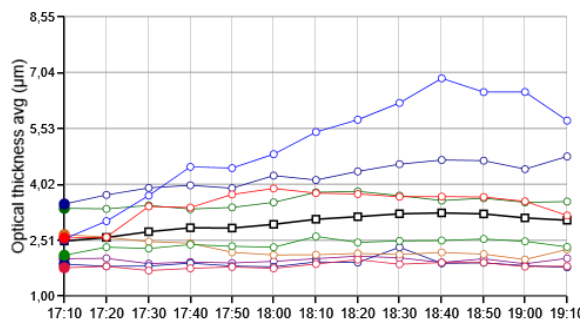
AN éter



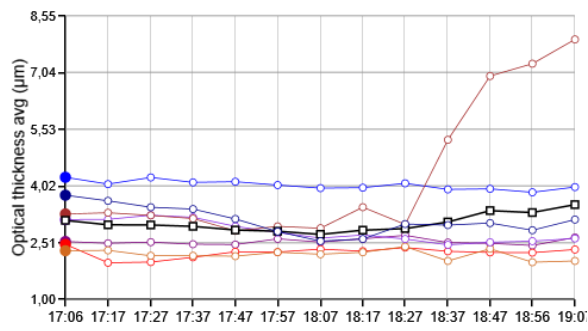
S2



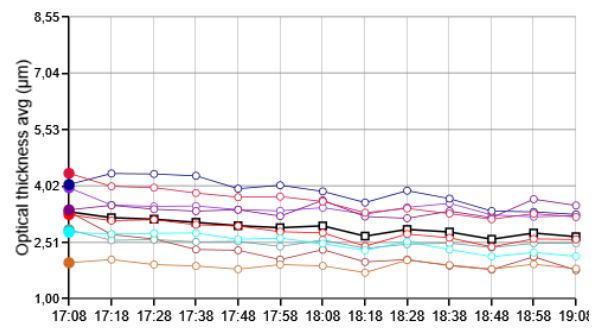
AN metanol



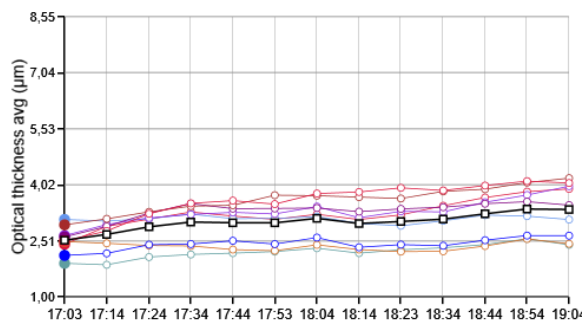
S3



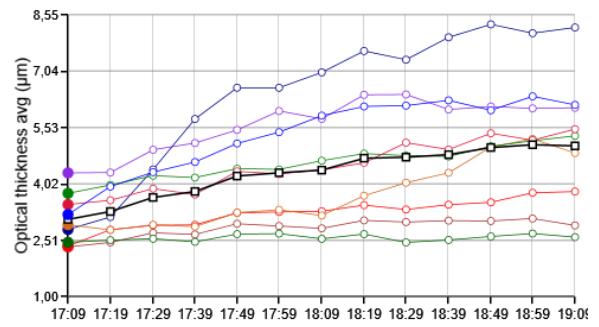
N1



AS éter



N42



AS metanol

