

Három-dimenziós *in vitro* multicelluláris szferoidok fejlesztése és alkalmazása tumorelleses hatóanyagok vizsgálatára

Alföldi Róbert

Ph.D. értekezés tézisei



Biológia Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar

Témavezetők:

Dr. habil. Puskás László Géza
Tudományos tanácsadó

Dr. Szebeni Gábor János
Tudományos főmunkatárs

Szeged
2021

1. Bevezetés

Mivel a daganatos megbetegedések a vezető halálokok között szerepelnek, kiemelten fontos a tumorok növekedését gátló, citosztatikus és citotoxikus szerek folyamatos fejlesztése és *in vitro* majd *in vivo* szűrése. A hatóanyagok fejlesztése mellett azokat a szűrési eljárásokat is fejlesztenünk kell, amelyeken az új molekulákat megbízhatóan tesztelni tudják. Fontos új típusú *in vitro* modelleket kidolgozni, amelyeken összetett módon tudjuk a daganatellenes szerek hatását vizsgálni nem csak a tumorsejteken, hanem olyan rendszerekben is, amelyek a tumor mikrokozonyezetét is modellezik.

A napjainkban rutinszerűen használt sejtenyésztő edényes kultúrák legnagyobb hátránya, hogy a mesterségesen kialakított, egyrétegben növe sejt sejt-sejt és sejt-ECM kapcsolatai alul reprezentáltak, így az azokon végzett hatóanyagtesztek biológiai relevanciája, valamint a tesztelt hatóanyagok klinikai hatékonysága is nehezen megjósolható és adaptálható a klinikai kutatásokban és a terápiában egyaránt.

A háromdimenziós sejtenyésztési módszerek egyik legfontosabb előnye, hogy a sejtek képesek több rétegben növekedni és ennek eredményeképpen a polaritásuk sem válik ekvatoriálissá. Ez nem csak morfológiai különbségeket fog eredményezni, hanem metabolikus folyamataik is közelebb állnak az élő szervezetben lévőhöz, így valóságosabb képet mutatnak az *in vivo* körülményekhez. Ezekben az úgynevezett multicelluláris szferoidokban a sejtek elhelyezkedésük függvényében különböző mértékben fognak tápanyaghoz, növekedési faktorokhoz, valamint oxigénhez jutni, ami sokkal jobban modellezi a valós tumor mikrokozonyezetben a kapillárisoktól eltérő távolságban lévő sejtcsoportosulásait.

A Ph.D. értekezésem gerincét annak felderítése adta, hogy megvizsgáljam melyik *in vitro* sejtenyésztési mód tudja a legpontosabban modellezni a normál *in vivo* fiziológiás szöveti állapotot, valamint azokat összehasonlítani a rutinszerűen használt hagyományos kétdimenziós sejtenyésztetekkel. Vizsgálataink során egy újfajta sejt-mátrix alapú modellrendszert állítottunk be és teszteltünk, melynek során *ex vivo* összehasonlítottuk a hagyományosan szélesztett egyrétegű sejt-kultúrában növesztett egér hasnyálmirigy-szigetek sejtéletképességét, valamint glukagon és inzulin termelését a kollagén mátrixba ágyazott háromdimenziós hasnyálmirigy-szigetekkel. További kísérleteinkben különböző mátrixban és tenyésztési körülmények között növesztett tumorsejtek átfogó vizsgálatait végeztük el. Az eltérő *in vitro* modellekben növesztett A549 humán tüdő karcinóma sejtek növekedési kinetikáját, életképességét, gén és fehérje expresszióját vizsgáltuk, majd hasonlítottuk össze az *in vivo* szubkután beültetett A549 tumorokkal. Végül két és háromdimenziós körülmények között tenyésztett humán MCF-7 és egér 4T1 emlő daganatsejtek ellenállóképességét vizsgáltuk új típusú imidazo[1,2-b]pirazol-7-karboxamid gyógyszerjelöltekkel szemben annak tisztázására, hogy az eltérő tenyésztési körülmények hogyan befolyásolják a molekulakönyvtár egyes tagjainak hatásosságát.

2. Célkitűzések

Fő célom az volt, hogy meghatározzam, melyik *in vitro* sejttenyésztési mód modellezi legpontosabban a normál fiziológiás állapotot, amelyet akár nagyáteresztőképességű vizsgálatokban is használni lehet. A különböző 3D modellek összehasonlítását is elvégeztem a rutinszerűen használt hagyományos kétdimenziós sejttenyésztetekkel.

Vizsgálataim során célul tűztem ki,

- a hagyományosan szélesztett egyrétegű sejt kultúrában növesztett egérből izolált hasnyálmirigy-szigetek sejtjeinek életképességét, glukagon és inzulin termelését összehasonlítani a RAFT kollagén mátrixba ágyazott háromdimenziós hasnyálmirigy-szigetek sejtjeivel,
- a különböző 2D és 3D tenyésztési körülmények között növesztett A549 humán tüdő karcinóma sejtek növekedési kinetikáját, életképességét, gén és fehérje expresszióját vizsgálni, majd összehasonlítani az *in vivo* szubkután beültetett A549 tumorokkal,
- humán MCF-7 és egér 4T1 emlő daganatsejtek 2D és 3D körülmények között tenyésztett formáinak életképességét megvizsgálni egy 42 komponensű hatóanyag könyvtár tesztelése során, valamint meghatározni a gyógyszerjelölt molekulák IC50 értékét 2D és 3D növesztett sejteken.

3. Alkalmazott módszerek

- Kétdimenziós sejttenyésztés
- Hasnyálmirigy-szigetek (isletek) izolálása és fenntartása
- ECM-szerű mátrixban növesztett MCS-ek előállítása RAFT™ sejttenyésztési módszerrel
- Mikrohordozók felületkezelése
- Mikrohordozók felületén növesztett és mátrix nélküli MCTS-ek előállítása szuszpenziós sejttenyésztési módszerrel
- Mátrix nélküli MCTS-ek előállítása ULA módszerrel
- Élő sejtszám meghatározás tripánkék festéssel
- Sejtek életképességének meghatározása resazurin alapú enzimaktivitás méréssel
- Apoptózis vizsgálata citofluorimetriával
- Sejtciklus analízis
- Konfokális lézer szkennig mikroszkópia
- A549 Xenograft Tumor Modell előállítása
- Génexpressziós vizsgálatok
- Egysejt tömegcitometriás (CyTOF) vizsgálatok
- Klaszteranalízis
- Statisztikai analízis

4. Eredmények

4.1. A hagyományosan szélesztett egyrétegű vagy szuszpenziós sejt kultúrában növesztett hasnyálmirigy-szigetekkel szemben a háromdimenziós kollagén mátrixba ágyazott hasnyálmirigy-szigetek életképessége jobb volt

A különböző tenyésztési körülményekkel között fenntartott hasnyálmirigy-szigetek életképességének és morfológiájának a vizsgálatát öt időpontban végeztük el a tenyésztés első, negyedik, hetedik, tizedik és tizennyolcadik napján.

A negyedik és a hetedik nap között folyamatos morfológiai változásokat tapasztalhattunk a monolayer kultúrában. A fibroblaszt-szerű sejtek lassú kivándorlását figyelhettük az idő múlásával ellentétben a RAFT™ MCS-eivel, ahol a szigetek a morfológiájukat mindvégig megőrizték. A standard szuszpenziós tenyészetben fenntartott egér hasnyálmirigy-szigetek a RAFT™ szigetekhez hasonlóan, megőrizték szferoid morfológiájukat, azonban a tenyésztés hetedik napja után a propidium-jodid pozitív nekrotikus régiók halmozódást mutattak. A 2D hasnyálmirigy-szigetek az első négy napban többnyire nekrotikusan károsodtak, amit a negyedik napig tartó masszív propidium-jodid festés igazolt is a mintáinkban, ellentétben a RAFT™-ba ágyazott szigetekkel, ahol a szferoidok főként csak szórt és alacsony intenzitású Annexin V festést mutattak a 18 napos tenyészidőszak alatt.

4.2. A háromdimenziós kollagén mátrixba ágyazott hasnyálmirigy-szigetek hormontermelése a tenyésztés 18 napja alatt végig megőrződött

A RAFT™ szigetek esetében szignifikáns növekedést tapasztaltunk az inzulin *Ins-1* génjének kifejeződésében mind az SC (* $p < 0,05$) mind a 2D tenyészethez (** $p < 0,01$) viszonyítva, továbbá az *Ins-2* gén kifejeződése is szignifikánsan magasabb volt a RAFT™ kultúrákban az SC (* $p < 0,05$) és a 2D-hez (* $p < 0,05$) képest is. Habár az immunfluoreszcens festés magas glükagon jelet mutatott a RAFT™ szferoidokban a tizedik napig, a glükagon *Gcg* génjének expressziója közel mérhetetlenül alacsony volt minden tenyésztési körülmény között.

Az inzulin és a glükagon termelés bizonyításához a szigetek indirekt immunfluoreszcens festését is elvégeztük. Míg a hetedik napra a 2D kultúra hasnyálmirigy-szigetei szétestek és inzulin, valamint glükagon termelése is lecsökkent, addig a SC-ben, és a RAFT™ szigeteiben az inzulin- és glükagon termelés intenzív jelet mutatott végig a kísérlet tizennyolcadik napjáig. A legnagyobb intenzitású hormontermelés a 18 napos kísérlet alatt pedig a RAFT™ esetében volt kimutatható. Ez az eredmény túlmutat az eddig publikált peptid amfil nanostruktúrált gélszerű vázban elért 14 napos hormontermelésen a vizsgált hormonok tekintetében.

4.3. A 3D in vitro tenyésztett A549 humán tüdő adenokarcinóma sejtek gén expressziója közelebb áll az in vivo körülményhez, mint a hagyományos 2D egyrétegű kultúra sejtjei

A 2D és 3D in vitro tenyészetek génkifejeződés vizsgálatához a xenograft tumorok és 2D sejt kultúra 624 tumorspecifikus gén expressziós mintázatának az összehasonlításából kiszűrt 60 génen felül, további két gén, az SLC2A1 (GLUT1,

glükóz transzporter) és az SLC16A3 (MCT4, tejsav transzporter) expresszióját is megvizsgáltuk.

Ahhoz, hogy az általunk vizsgált *in vitro* kultúrák közül kiderüljön, melyik modellezi legjobban az *in vivo* nem kissejtes tüdőkarcinómát, a génexpressziós adatokat hierarchikus klaszterezésnek vetettük alá. A 9 napos *in vitro* tenyészetek közül a 3D Sferoid a 3D Nutrisphere és a 3D Cytodex3 közelebb került az *in vivo* tumorokhoz, amely azt feltételezi, hogy az 62 tumorspecifikus gén expressziós mintázata alapján ezek a kultúrák jobban utánozzák a valós szöveti tumoros állapotot.

4.4. A 3D *in vitro* tenyésztett A549 humán tüdő adenokarcinóma sejtek fehérje marker profilja közelebb áll az *in vivo* xenograft tumorokhoz, mint a 2D kultúra

A tömegcitometriai vizsgálatokhoz 9 napos 2D és 3D kultúrákat használtuk, és összehasonlítottuk a korai és késői stádiumú egérből izolált xenograft A549 tumorokkal. Összesen tizenkét marker kifejeződési mintázatát határoztuk meg: TMEM45A, MCT4, CD66 (CEACAM5), GLUT1, CA9, CD24, TRA-1-60, CD326, EpCAM, Galectin-3, CD274, PD-L1 és EGFR. A reprezentatív többdimenziós adatelemzéssel (viSNE, visualization of stochastic neighbor embedding) egyesjt szinten képesek voltunk a 12 féle marker egyidejű expressziójának a mintázatát összehasonlítani a különböző tenyészetek között.

A 12 fehérje együttes expressziós mintázata alapján 3 elkülönülő szigetreszt mutattak, ahol az egyik harmad a 2D kultúra sejtjeit, a másik a 3D kultúrák sejtjeit a harmadik pedig az *in vivo* tumorok sejtjeit képviselik, minimális átfedéssel. Mind a szigetek szegmentációja, mind a területe a tenyésztési módon belüli sejtek heterogenitását tükrözte. A hagyományos, 2D *in vitro* kultúra alkotta a legkisebb kiterjedésű és szegmentálságú régiót, azaz ezek a sejtek mutatták a legkisebb heterogenitást, távol a 3D-től vagy a valós *in vivo* állapottól.

4.5. Az humán MCF-7 és egér 4T1 emlő daganatsejtek háromdimenziós körülmények között tenyésztett formái ellenállóbbak a tumorelleses hatóanyagoknak egy több komponensű hatóanyag könyvtár tesztelése során

Az Imidazo[1,2-b]pirazol-7-karboxamid vegyületek daganatellenes hatását humán MCF-7 emlő adenokarcinóma és egér 4T1 emlő karcinóma sejtek 2D és 3D tenyészetein vizsgáltuk doxorubicin pozitív kontroll mellett.

Azokat a kismolekulákat, amelyek legalább az egyik tenyészetben 10 μM alatti aktivitást mutattak, aktívnak tekintettük, amelyek 10 μM felett hatottak, azokat pedig inaktívnak, mivel ezek klinikai relevanciája nagy valószínűség szerint már kérdésessé válna a további gyógyszerfejlesztési lépések során. Ezen kritériumok alapján a 45 újonnan szintetizált kismolekulából 16 bizonyult aktívnak a kísérletben használt két emlőtumoron. Közülük hat pedig minimum két és félszeres hatáskülönbséget mutatott a sejtvonalak 2D és 3D tenyészetei között.

Az aktív molekulák hatáskülönbsége egyezik az irodalomban leírt adatokkal, azaz a multicelluláris 3 dimenziós sejtenyészetek kevésbé voltak érzékenyek mind az újonnan létrehozott aktív hatóanyagokkal, mind a pozitív kontrollként használt doxorubicinnel szemben.

5. Összefoglalás

Kutatásaim során különböző háromdimenziós *in vitro* sejtenyésztési eljárásokkal kialakított multicelluláris szferoidokat vizsgáltam annak érdekében, hogy igazoljam azok előnyeit a ma széleskörben használt kétdimenziós tenyésztőlemezekon történő tenyésztési módszerrel szemben.

5.1.

A RAFT™ alkalmazása az egér hasnyálmirigy-szigetek hosszú távú fenntartására kiváló eredményeket mutatott, mivel a szigetek integritása, speciális sejtjeinek inzulin és glükagon termelése legalább tizenhét napig *ex vivo* megmaradt. A kapott eredményeink alapján a RAFT™ ígéretes eszköznek bizonyul, mivel a klinikumban nagy igény mutatkozik az olyan terápiák iránt, ahol a cukorbetegség inzulinpótlását a szervezetükbe ültetett inzulin termelő xenograft szigetekkel tudnák pótolni. Tudomásunk szerint csoportunk közleménye volt az első a hasnyálmirigy-szigetek RAFT™ 3D *in vitro* sikeres fenntartásáról.

5.2.

A 624 gént vizsgáló nanokapilláris qRT-PCR, valamint a 62 gént vizsgáló 1536 qRT-PCR vizsgálatok az *in vivo* xenograft tumorok és a 3D A549 sejt kultúrák esetében magasabb *TMEM45A*, *SLC16A3*, *CD66*, *SLC2A1*, *CA9* és *CD24*, valamint alacsonyabb *EGFR* expressziót mutattak az egyrétegű 2D tenyészetekhez képest.

5.3.

Az alkalmazott többdimenziós egysejt fehérje profil (viSNE) kimutatta, hogy a 3D (Cytodex3 és Nutrisphere) kultúrák átmenetet jelentenek a 2D-ből az *in vivo* állapot felé a TRA-1-60, *TMEM45A*, pan-keratin, *CD326*, *MCT4*, Gal-3, *CD66*, *GLUT1* és a *CD274* kifejeződése alapján. A *CA9*, *CD24* és az *EGFR* ezzel szemben magasabb kifejeződést mutatott a 3D Cytodex3 és Nutrisphere kultúrákban, mint az *in vivo* tumorokba.

5.4.

A humán MCF-7 és egér 4T1 emlő daganatsejteket használva igazoltuk a 2D és 3D sejt kultúrák eltérő kemorezisztenciáját. Mivel a szűrés során az újonnan szintetizált imidazo [1,2-b] pirazol-7-karboxamidok potenciális tumorelles hatásának vizsgálata folyamán a 16 aktív kismolekulából 6 vegyület esetén minimum két és félszeres hatásbéli különbséget mértünk. Ezekben az esetekben 3D tenyészetek kevésbé voltak érzékenyek az adott szerre, beleértve a klinikumban széleskörűen használt és jól ismert doxorubicinre is. Ezzel az általunk létrehozott 3D kultúrákon is igazolva az irodalomban leírt hatás béli különbséget.

6. Köszönetnyilvánítás

A jelenlegi munka megvalósításához köszönetemet szeretném kifejezni:

Témavezetőimnek,

Dr. Puskás Lászlónak, aki mind emberileg, mind szakmailag példát mutatott és messzemenően támogatott a kutatásban és az eredmények publikálásában egyaránt.

Dr. Szebeni Gábornak, akihez, ha szakmailag akadályba ütköztem mindig fordulhattam, motivált és ösztönzött.

Valamint munkatársaimnak:

Balogh Józsefnek, aki a CyTOF mérések kivitelezésében és adatfeldolgozásában nyújtott szakmai segítséget.

Dr. Nagy Lajosnak, **Dr. Fehér Liliánának** és **Dr. Hackler Lászlónak**, akik szakmai segítséget nyújtottak az 1536 qRT-PCR vizsgálatok kivitelezése során.

Dr. Faragó Nórának, aki a nagy áteresztőképességű nanokapilláris qRT-PCR vizsgálatok elvégzésében nyújtott segítséget.

Mán Imolának a sejtenyésztési munkákban nyújtott segítségért.

Juhász Judit asszisztensnek a kísérleti állatokkal végzett lelkiismeretes és odaadó munkájáért.

Dr. Csabai Zsoltnak, **Dr. Knapp Leventének**, **Faragó Annának**, **Dr. Kari Beátának** és **Dr. Heinrich Lászlónak**, hogy a munkám során barátilag támogattak.

Továbbá kiemelt köszönet illeti feleségemet, **Alföldi-Zörgő Mónikát** és lányomat **Olgát**, a munkám során nyújtott önzetlen támogatásukért, végtelen türelmükért és mert hittek bennem.

Megjelent tudományos közlemények jegyzéke

Tézishez kapcsolódó tudományos közlemények:

1. **Single Cell Mass Cytometry of Non-Small Cell Lung Cancer Cells Reveals Complexity of In vivo And Three-Dimensional Models over the Petri-dish.** Alföldi R, Balog JÁ, Faragó N, Halmi M, Kotogány E, Neuperger P, Nagy LI, Fehér LZ, Szebeni GJ, Puskás LG. *Cells*. 2019 Sep 16;8(9). pii: E1093. doi: 10.3390/cells8091093. **IF(2019): 5.656**
2. **Synthesis, cytotoxic characterization, and SAR study of imidazo[1,2-b]pyrazole-7-carboxamides.** Demjén A, Alföldi R, Angyal A, Gyuris M, Hackler L Jr, Szebeni GJ, Wölfling J, Puskás LG, Kanizsai I. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2018 Jul;351(7):e1800062. doi: 10.1002/ardp.201800062. **IF(2018): 2.458**
3. **Real architecture For 3D Tissue (RAFT™) culture system improves viability and maintains insulin and glucagon production of mouse pancreatic islet cells.** Szebeni GJ, Tancos Z, Feher LZ, Alföldi R, Kobolák J, Dinnyes A, Puskás LG. *Cytotechnology*. 2017 Apr;69(2):359-369. doi: 10.1007/s10616-017-0067-6. **IF(2017): 1.461**
4. **The potential of three-dimensional tumor models and cell culturing in cancer research and diagnostics.** Alföldi R, Szebeni JG, Puskás LG. *Magy Onkol*. 2015 Dec;59(4):303-9. hungarian **IF(2015): 0.468**

Egyéb tudományos közlemények:

5. **Imidazo[1,2-b]pyrazole-7-carboxamides Induce Apoptosis in Human Leukemia Cells at Nanomolar Concentrations.** Szebeni GJ, Balog JA, Demjén A, Alföldi R, Végi VL, Fehér LZ, Mán I, Kotogány E, Gubán B, Batár P, Hackler L Jr, Kanizsai I, Puskás LG. *Molecules*. 2018 Nov 1;23(11). pii: E2845. doi: 10.3390/molecules23112845. **IF(2018): 3.060**
6. **Antiproliferative and antimetastatic characterization of an exo-heterocyclic androstane derivative against human breast cancer cell lines.** Kulmány ÁE, Frank É, Kovács D, Kirisits K, Krupitza G, Neuperger P, Alföldi R, Puskás LG, Szebeni GJ, Zupkó I. *Biomed Pharmacother*. 2021 May 19;140:111728. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111728. **IF(2020): 6.110**
7. **Imidazo[1,2-b]pyrazole-7-Carboxamide Derivative Induces Differentiation-Coupled Apoptosis of Immature Myeloid Cells Such as Acute Myeloid Leukemia and Myeloid-Derived Suppressor Cells.** Kotogány E, Balog JÁ, Nagy LI, Alföldi R, Bertagnolo V, Brugnoli F, Demjén A, Kovács AK, Batár P,

Mezei G, Szabó R, Kanizsai I, Varga C, Puskás LG, Szebeni GJ. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 20;21(14):5135. doi: 10.3390/ijms21145135. **IF(2020): 4.556**

8. **Single Cell Mass Cytometry Revealed the Immunomodulatory Effect of Cisplatin Via Downregulation of Splenic CD44+, IL-17A+ MDSCs and Promotion of Circulating IFN- γ + Myeloid Cells in the 4T1 Metastatic Breast Cancer Model.** Balog JÁ, Hackler L Jr, Kovács AK, Neuperger P, **Alföldi R**, Nagy LI, Puskás LG, Szebeni GJ. *Int J Mol Sci.* 2019 Dec 25;21(1). pii: E170. doi: 10.3390/ijms21010170. **IF(2019): 4.556**
9. **Enantioselective Synthesis of 8-Hydroxyquinoline Derivative, Q134 as a Hypoxic Adaptation Inducing Agent.** Hackler L Jr, Gyuris M, Huzián O, **Alföldi R**, Szebeni GJ, Madácsi R, Knapp L, Kanizsai I, Puskás LG. *Molecules.* 2019 Nov 23;24(23). pii: E4269. doi: 10.3390/molecules24234269. **IF(2019): 3.267**
10. **Signatures of cell death and proliferation in perturbation transcriptomics data-from confounding factor to effective prediction.** Szalai B, Subramanian V, Holland CH, **Alföldi R**, Puskás LG, Saez-Rodriguez J. *Nucleic Acids Res.* 2019 Nov 4;47(19):10010-10026. doi: 10.1093/nar/gkz805. **IF(2019): 11.501**
11. **Achiral Mannich-Base Curcumin Analogs Induce Unfolded Protein Response and Mitochondrial Membrane Depolarization in PANC-1 Cells.** Szebeni GJ, Balázs Á, Madarász I, Pócz G, Ayaydin F, Kanizsai I, Fajka-Boja R, **Alföldi R**, Hackler L Jr, Puskás LG. *Int J Mol Sci.* 2017 Oct 7;18(10). pii: E2105. doi: 10.3390/ijms18102105. **IF(2017): 3.687**
12. **Mannich Curcuminoids as Potent Anticancer Agents.** Gyuris M, Hackler L Jr, Nagy LI, **Alföldi R**, Rédei E, Marton A, Vellai T, Faragó N, Ózsvári B, Hetényi A, Tóth GK, Sipos P, Kanizsai I, Puskás LG. *Arch Pharm (Weinheim).* 2017 Jul;350(7). doi: 10.1002/ardp.201700005. **IF(2017): 2.247**
13. **The small molecule AUTEN-99 (autophagy enhancer-99) prevents the progression of neurodegenerative symptoms.** Kovács T, Billes V, Komlós M, Hotzi B, Manzéger A, Tarnóci A, Papp D, Szikszai F, Szinyákovics J, Rácz Á, Noszál B, Veszélka S, Walter FR, Deli MA, Hackler L Jr, **Alföldi R**, Huzián O, Puskás LG, Liliom H, Tárnok K, Schlett K, Borsy A, Welker E, Kovács AL, Pádár Z, Erdős A, Legradi A, Bjelik A, Gulya K, Gulyás B, Vellai T. *Sci Rep.* 2017 Feb 16;7:42014. doi: 10.1038/srep42014. **IF(2017): 4.122**
14. **Curcumin and its analogue induce apoptosis in leukemia cells and have additive effects with bortezomib in cellular and xenograft models.** Nagy LI, Fehér LZ, Szebeni GJ, Gyuris M, Sipos P, **Alföldi R**, Ózsvári B, Hackler L Jr, Balázs A, Batár P, Kanizsai I, Puskás LG. *Biomed Res Int.* 2015;2015:968981. doi: 10.1155/2015/968981. **IF(2015): 2.134**
15. **Overexpression of Hsp27 ameliorates symptoms of Alzheimer's disease in APP/PS1 mice.** Tóth ME, Szegedi V, Varga E, Juhász G, Horváth J,

Borbély E, Csibrány B, **Alföldi R**, Lénárt N, Penke B, Sántha M. Cell Stress Chaperones. 2013 Nov;18(6):759-71. doi: 10.1007/s12192-013-0428-9. **IF(2013): 2.689**

Poszterek:

1. Róbert Alföldi: **Single cell mass cytometry of non-small cell lung cancer cells reveals the complexity of in vivo and three-dimensional models over the Petri-dish.**
3rd German Mass Cytometry User Forum, Berlin, Germany, January 23-24, 2019
2. Róbert Alföldi: **Increased expression of MCT4 and GLUT-1 in early events of spheroid formation of adenocarcinomic epithelial cells A549.** Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society, Szeged, Hungary, August 28-31, 2016

Konferencia előadások:

1. Róbert Alföldi: **Single cell mass cytometry of non-small cell lung cancer cells reveals the complexity of in vivo and three-dimensional models over the Petri-dish.**
48th Annual Meeting of the Hungarian Society for Immunology, Bükkfüdő, Hungary, October 16-18, 2019


NYILATKOZAT

Alulírottak, mint **Alföldi Róbert** jelölt doktori témavezetői a ***Három-dimenziós in vitro multicelluláris szferoidok fejlesztése és alkalmazása tumorellenes hatóanyagok vizsgálatára*** című doktori értekezés témakörében készült publikációkkal és a jelölt összes tézispontjával kapcsolatban ezúton nyilatkozunk arról, hogy ezek eddig nem szerepeltek más, korábban fokozatszerzéssel lezárt, vagy az értekezés benyújtásának napján folyamatban lévő doktori eljárásban. Az értekezésben felhasznált eredmények tükrözik a jelölt önálló hozzájárulását.

Szeged, 2021. június 24.



Dr. habil. Puskás László Géza
Tudományos tanácsadó
Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Avidin Kft. ügyvezető igazgató

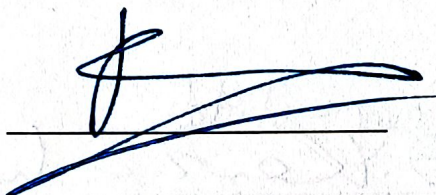


Dr. Szebeni Gábor János
Tudományos főmunkatárs
Szegedi Biológiai Kutatóközpont

NYILATKOZAT

Alulírottak, mint **Alföldi Róbert** jelölt a ***Három-dimenziós in vitro multicelluláris szferoidok fejlesztése és alkalmazása tumorelleses hatóanyagok vizsgálatára*** című doktori értekezéshez kapcsolódó *Single Cell Mass Cytometry of Non-Small Cell Lung Cancer Cells Reveals Complexity of In vivo And Three-Dimensional Models over the Petri-dish., Cells. 2019 Sep 16;8(9)*. publikáció felelős szerzője ezúton nyilatkozom arról, hogy az ehhez a publikációhoz kapcsolódó eredmények elérésében a jelölt szerepe meghatározó fontosságú volt, ezért ezeket az eredményeket eddig nem használtuk fel tudományos fokozat megszerzésekor, s ezt a jövőben sem tesszük.

Dr. Puskás László

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized 'P' followed by a long horizontal stroke and a diagonal line crossing it.

NYILATKOZAT

Alulírottak, mint **Alföldi Róbert** jelölt a **Három-dimenziós in vitro multicelluláris szferoidok fejlesztése és alkalmazása tumorelleses hatóanyagok vizsgálatára** című doktori értekezéshez kapcsolódó *Synthesis, cytotoxic characterization, and SAR study of imidazo[1,2-b]pyrazole-7-carboxamides.*, Arch Pharm (Weinheim). 2018 Jul; 351(7). publikáció első, valamint felelős szerzője ezúton nyilatkozunk arról, hogy az ehhez a publikációhoz tartozó biológiai mérések és a jelölt 4.5 tázispontjához kapcsolódó eredmények elérésében a jelölt szerepe meghatározó fontosságú volt, ezért ezeket az eredményeket eddig nem használtuk fel tudományos fokozat megszerzésékor, s ezt a jövőben sem tesszük.

Dr. Demjén András

Dr. Kanizsai Iván

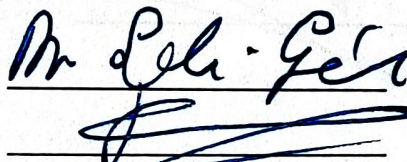
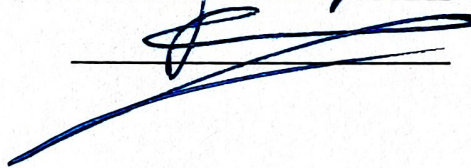
Demjén András
D. Kanizsai Iván

NYILATKOZAT

Alulírottak, mint **Alföldi Róbert** jelölt a **Három-dimenziós in vitro multicelluláris szferoidok fejlesztése és alkalmazása tumorelleses hatóanyagok vizsgálatára** című doktori értekezéshez kapcsolódó *Real architecture For 3D Tissue (RAFT™) culture system improves viability and maintains insulin and glucagon production of mouse pancreatic islet cells*, Cytotechnology. 2017 Apr;69(2):359-369 publikáció első, valamint felelős szerzője ezúton nyilatkozunk arról, hogy az ehhez a publikációhoz kapcsolódó eredmények elérésében a jelölt szerepe meghatározó fontosságú volt, ezért ezeket az eredményeket eddig nem használtuk fel tudományos fokozat megszerzésekor, s ezt a jövőben sem tesszük.

Dr. Szebeni Gábor

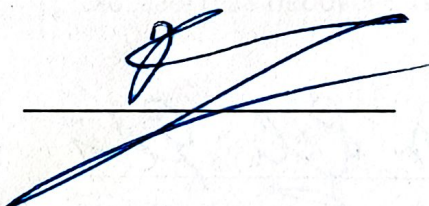
Dr. Puskás László

NYILATKOZAT

Alulírottak, mint **Alföldi Róbert** jelölt a ***Három-dimenziós in vitro multicelluláris szferoidok fejlesztése és alkalmazása tumorelleses hatóanyagok vizsgálatára*** című doktori értekezéshez kapcsolódó *The potential of three-dimensional tumor models and cell culturing in cancer research and diagnostics.*, Magy Onkol. 2015 Dec;59(4):303-9. publikáció felelős szerzője ezúton nyilatkozom arról, hogy az ehhez a publikációhoz kapcsolódó eredmények elérésében a jelölt szerepe meghatározó fontosságú volt, ezért ezeket az eredményeket eddig nem használtuk fel tudományos fokozat megszerzésekor, s ezt a jövőben sem tesszük.

Dr. Puskás László

A handwritten signature in blue ink, consisting of several sweeping, connected strokes, positioned above a horizontal line.