

PÁZMÁNY PÉTER KATOLIKUS EGYETEM

Információs Technológiai és Bionikai Kar

Roska Tamás Műszaki és Természettudományi Doktori Iskola



Bányai Gréta Lilla

**A sejtmigráció dekódolása - módszertani választások
hatása a biológiai értelmezésre**

A PhD Disszertáció Tézisei

Témavezető:

Garay Tamás Márton, PhD

Budapest, 2025

BEVEZETÉS

A sejtmigráció alapvető biológiai folyamat, amely központi szerepet játszik az embrionális fejlődésben, a szöveti regenerációban, az immunrendszer működésében, valamint számos kóros állapotban, mint a daganatos invázió és az áttétképzés során is (Friedl és Gilmour, 2009; Shellard és Mayor, 2020). Rosszindulatú megbetegedésnél a tumorsejtek migrációs képessége döntően meghatározza a primer daganatból való kijutást, a környező szövetekbe történő betörést, valamint a távoli áttétek kialakulását, amelyek a daganatos halálozás túlnyomó többségéért felelősek (Majidpoor és Mortezaee, 2022; Bergers és Fendt, 2021). Ennek következtében a sejtmigráció kvantitatív vizsgálata a kísérletes daganatkutatás egyik alapvető elemévé vált.

A sejtmigráció több, egymással összehangolt molekuláris mechanizmus szabályozásából ered, beleértve a citoskeleton dinamikus átrendeződését, a sejt-szubsztrát adhézió folyamatos szabályozását, a membránreceptorok közvetítette jelátvitelt, valamint az erő kifejtést a sejt elülső és hátsó pólusán (Ridley és mtsai, 2003). Ezek a molekuláris folyamatok együttesen határozzák meg a migráció két alapvető komponensét: a sejtmozgás sebességét valamint az irányváltás gyakoriságát (Shellard és Mayor, 2020). Fontos kiemelni, hogy e komponensek nem feltétlenül szabályozódnak párhuzamosan. Az érintett jelátviteli útvonalaktól vagy farmakológiai beavatkozásoktól függően a sebesség és az iránytartás egymástól függetlenül is megváltozhat, ami összetett és esetenként kontrainuitív migrációra gyakorolt hatást láthatunk (Weiger és mtsai, 2013).

Kísérletes szinten a sejtmigráció *in vitro* vizsgálata számos eltérő assay-formátummal történhet, amelyek e sokrétű folyamat különböző aspektusait ragadják meg.

Alacsony sejtsűrűségű, kétdimenziós környezetben végzett single-cell migrációs vizsgálatok lehetővé teszik az autonóm sejtmozgás elemzését. Bár ez a megközelítés nem képes visszaadni az *in vivo* szöveti környezetek szerkezeti és biokémiai komplexitását, legnagyobb előnye abban rejlik, hogy a tiszta sejtmozgás vizsgálatát teszi lehetővé, kiegészítve a sejt specifikus jellemzőinek elemzésével, valamint nagyrészt független olyan zavaró tényezőktől, mint a proliferáció, a sejt-sejt kölcsönhatások vagy a nagy sejtsűrűség miatti mechanikai korlátok (Svensson és mtsai, 2018).

A single-cell migráció különböző követési stratégiákkal kvantifikálható, beleértve a manuális, félautomata és teljesen automata módszereket, amelyek mindegyike sajátos előnyökkel és korlátokkal rendelkezik (Piccinini és mtsai, 2016). Az automata megközelítések nagy áteresztőképességet biztosítanak, ugyanakkor érzékenyek a képminőségre, a szegmentációs hibákra és a sejtmorfológiára, míg a manuális követés nagy pontosságot nyújt, az időhatékonyság rovására. Az trajektóriák meghatározását követően számos kvantitatív migrációs paraméter számítható. A disszertációban e paramétereket három csoportba soroltuk: elmozdulás-alapú, útvonal-alapú és irányultság-alapú leírókba (Masuzzo és mtsai, 2016; Svensson és mtsai, 2018). Az elmozdulás-alapú paraméterek elsősorban a hosszú távú térbeli szóródást jellemzik, az útvonal-alapú paraméterek az azonnali mozgásdinamikát (például a sebességet), míg az irányultsági mutatók a trajektóriák szervezettségét és perzisztenciáját írják le. Mivel e paramétercsoportok a

migráció eltérő aspektusait kvantifikálják, a kezelések hatásai eltérően jelenhetnek meg attól függően, hogy mely paramétert választjuk. Következésképpen egy korlátozott paraméterkészletre épülő elemzés csupán részleges, esetenként félrevezető képet adhat a migrációs viselkedésről.

A kollektív migrációs assayek a sejtek összehangolt mozgását vizsgálják populációs kontextusban (Hohmann és mtsai, 2022). Ezek közül technikai egyszerűségük miatt a ‘gap-closure’ (tarfolt-záródás) típusú vizsgálatok a legelterjedtebbek. A klasszikus scratch assay során egy konfluens sejtréteg mechanikai sértésével hoznak létre sejtmentes területet, majd a migrációt a sebzáródás dinamikájából következtetik (Liang és mtsai, 2007). Ez a megközelítés azonban számos zavaró tényezőt vezet be, beleértve a sejtek károsodását, az intracelluláris molekulák felszabadulását és a mátrixhoz kötött fehérjék expozícióját, amelyek a kezelés hatásától függetlenül is befolyásolhatják a migrációt (Pijuan és mtsai, 2019). A sejt-kizáráson alapuló assayek során fizikai gátak – például szilikon betétek – segítségével alakítanak ki sejtmentes területeket anélkül, hogy sérülnének a sejtek. Ez a módszer reprodukálhatóbb tariffolt-geometriát eredményez, és elkerüli a sérüléshez köthető hatásokat (Shiode és mtsai, 2017). Mindazonáltal mindkét gap-closure assay esetében a záródás dinamikáját nemcsak a migráció, hanem a proliferáció és a sejtméret is befolyásolja. Fontos megjegyezni, hogy a sejtméretet az adatelemzés során ritkán veszik figyelembe, annak ellenére, hogy közvetlen hatással van a látszólagos záródási sebességre (Pijuan és mtsai, 2019).

Egy további gyakran alkalmazott migrációs módszer a transwell assay, amely irányított komponenssel vezet be azáltal, hogy a sejtek porózus membránokon keresztül vándorolnak egy kemoattraktáns irányába, ezért gyakran korlátozott, kvázi-háromdimenziós vizsgálatként értelmezik (Justus és mtsai, 2014). Ez az assay a migráció olyan aspektusát ragadja meg, amelyet a kétdimenziós felszíni módszerek nem fednek le. Ugyanakkor a transwell méréseket erősen befolyásolja a sejtméret, a deformálhatóság és a sejtek mechanikai tulajdonságai, ami megnehezíti a valódi motilitásváltozások elkülönítését a fizikai korlátok módosulásától (Zaki és mtsai, 2019). Továbbá a transwell assayek jellemzően végponti méréseket szolgáltatnak, így a migráció időbeli változásai közvetlenül nem vizsgálhatók, szemben a videomikroszkópián alapuló módszerekkel.

A fenti módszereken túl léteznek háromdimenziós migrációs modellek is, amelyek extracelluláris mátrixkomponensek és térbeli viszonyok bevezetésével igyekeznek az *in vivo* környezetet jobban megközelíteni; ezek azonban nem képezték a disszertáció fókuszát.

Végezetül, a migrációs assayek és analitikai megközelítések egyre növekvő módszertani sokfélesége jelentős kihívást jelent az adatok értelmezése és a különböző tanulmányok közötti összehasonlíthatóság szempontjából. Mivel az egyes assayek eltérő, gyakran nem átfedő kvantitatív leírókat eredményeznek, az eltérő kísérleti rendszerekből származó eredmények közvetlen összevetése sok esetben nem lehetséges (Masuzzo és mtsai, 2016). Ebben a kontextusban a gépi tanulási megközelítések ígéretes eszközöket kínálnak heterogén adatahalmazok integrálására és olyan mintázatok azonosítására, amelyek hagyományos, paraméteralapú elemzésekkel nem feltétlenül tárhatók fel (Way és mtsai, 2021).

CÉLKITŰZÉSEK

A sejtmigráció számos kísérletes és számítógépes megközelítéssel vizsgálható, amelyek a motilitás eltérő aspektusait ragadják meg, és különböző biológiai mechanizmusokat tükröznek. Ez a módszertani sokféleség egyszerre jelent előnyt és kihívást: miközben lehetőséget biztosít a migráció több nézőpontból történő vizsgálatára, jelentős variabilitást vezet be az adatgyűjtés és az értelmezés szintjén. Az assayek megválasztásán túl az alkalmazott analitikai keretrendszer – különösen a migrációs paraméterek kiválasztása és számítása – alapvetően befolyásolja a kapott eredményeket. Ez különösen szembetűnő a single-cell követésen alapuló vizsgálatok esetében, ahol számos kvantitatív leíró számítható, amelyek eltérő mértékben érzékenyek a sejtválasz különböző aspektusaira, például a sebességre, az iránytartásra vagy a morfológiai plaszticitásra.

A disszertáció átfogó célja annak feltárása volt, hogy a módszertani és analitikai döntések miként befolyásolják a sejtmigráció kvantitatív és biológiai értelmezését. Ennek megfelelően a következő vizsgálatokat végeztük:

- Gyakran alkalmazott single-cell migrációs paraméterek érzékenysége, megismételhetőségének és robusztusságának értékelése nagyléptékű videomikroszkópos adathalmazokon, különböző követési stratégiák (manuális, félautomata és zajszűrt félautomata) alkalmazásával.
- A paramétervariabilitást meghatározó tényezők feltárása kétdimenziós random walk szimulációs keretrendszer segítségével, amelyben a migrációs sebesség és az iránytartás kontrollált, egymástól független módosításával vizsgáltuk a kvantitatív leírók viselkedését.
- A sejtre jellemző morfológiai tulajdonságok és a motilitás közötti kapcsolat elemzése, sejtvonal-specifikus morfológiai és viselkedési paraméterek korrelációs vizsgálatával, annak feltárására, hogy a sejtspecifikus jellemzők miként alakítják mind a migrációs viselkedést, mind a követési teljesítményt single-cell migráció esetén.
- Különböző migrációs assayek, beleértve a single-cell, scratch/sejtkizárásos és transwell módszereket, viselkedésének és értelmezési tartományának összehasonlítása nintedanibbal végzett farmakológiai moduláció mellett, melanoma sejteken.
- Az analitikai szinteken nyert eredmények integrálása módszertani ajánlások megfogalmazása érdekében, a sejtmigráció standardizált és biológiailag értelmezhető kiértékelésének támogatására.

A munka nem egyetlen ‘optimális’ assay vagy leíró azonosítására törekedett, hanem egy integratív keretrendszer kialakítására, amely bemutatja, miként járulnak hozzá az eltérő kísérletes és számítógépes megközelítések egy a kontextust jobban szem előtt tartó, árnyaltabb sejtmotilitás-értelmezéshez a daganatkutatásban.

MÓDSZEREK

A disszertáció két, egymást kiegészítő adathalmaz elemzésére épül, amelyek eltérő, ugyanakkor szorosan összefüggő nézőpontokból vizsgálják a sejtmigrációt.

Az első adathalmaz egy nagyszámú kétdimenziós single-cell migrációs felvételt tartalmazó gyűjtemény, több különböző daganattípusból származó sejtvonalakkal és számos farmakológiai kezeléssel. Az adathalmazt arra használtuk, hogy szisztematikusan feltárjuk a single-cell migráció során leggyakrabban alkalmazott paraméterek egymáshoz való viszonyát, valamint az analitikai döntések hatását a kvantitatív kimenetekre. A time-lapse videomikroszkópos felvételekből származó trajektóriákat elmozdulás-, útvonal- és irányultság-alapú migrációs leírókkal elemeztük. Paramétercsoportonként három reprezentatív mutatót számítottunk: átlagos négyzetes elmozdulást (MSD), nettó és maximális elmozdulást (elmozdulás-alapú); teljes megtett utat, sebességet és átlagos sebességet (útvonal-alapú); valamint direkcionalitási rátát, átlagos kanyarodási szöget és a kanyarodási vektor nullátmeneteit (direkcionalitás-alapú).

A biológiai hatások és az analitikai torzítások elkülönítésére random walk szimulációs keretrendszert alkalmaztunk. Ez a modell kontrollált, zavaró tényezőktől mentes környezetet biztosított, amelyben a migrációs sebesség és az iránytartás egymástól függetlenül modulálható volt, lehetővé téve a kísérletesen megfigyelt paraméterválaszok mechanisztikus értelmezését.

A követési módszertan migrációs kimenetekre gyakorolt hatásának vizsgálatához ugyanazon single-cell adathalmazokat manuális és félautomata követési megközelítésekkel is elemeztük. Mivel a félautomata követés inherensen érzékeny az intenzitásfluktuációkból és a szegmentáció bizonytalanságából származó zajra, egy kiegészítő zajsztűrési lépést alkalmaztunk a kis amplitúdójú, nem biológiai eredetű elmozdulások eltávolítására. E háromféle követésből származó migrációs paramétereket összehasonlítottuk a paraméterek robusztusságának és megismételhetőségének értékelése céljából. Emellett elemeztük a migrációs paraméterek és a sejtvonalakra jellemző specifikus tulajdonságok közötti összefüggéseket, beleértve a sejtméretet, a sejtszámot, a lefedettséget, a kolonizációs jellemzőket, valamint számos morfológiai paramétert.

A második adathalmaz humán melanoma sejtvonalakon végzett migrációs vizsgálatok eredményeiből állt, amelyek célja különböző *in vitro* migrációs assayek összehasonlítása volt azonos farmakológiai körülmények között. A multikináz-gátló nintedanib szolgált modell antimigrációs hatóanyagként. A migrációt több, egymást kiegészítő módszerrel vizsgáltuk, beleértve a single-cell követést, a konfluens sejtréteg mechanikai megsértésén alapuló scratch assayt, a sejtkárosodás nélküli, egységes sejtmentes zónákat kialakító szilikon betétet használó sejtkizárásos assayt, valamint az irányított, végponti mérésen alapuló transwell migrációs vizsgálatokat. Az egyes assayekből származó kvantitatív migrációs kimeneteket összehasonlítottuk annak értékelésére, hogy az assay formátuma miként befolyásolja a migrációs gátlás látszólagos mértékét és értelmezését. Ezen túlmenően gépi tanuláson alapuló klasszifikációs megközelítéseket alkalmaztunk az assayekből származó jellemzőhalmazokra, megvizsgálva, hogy ezek milyen hatékonysággal képesek megkülönböztetni a kezelt és a kontroll mintákat.

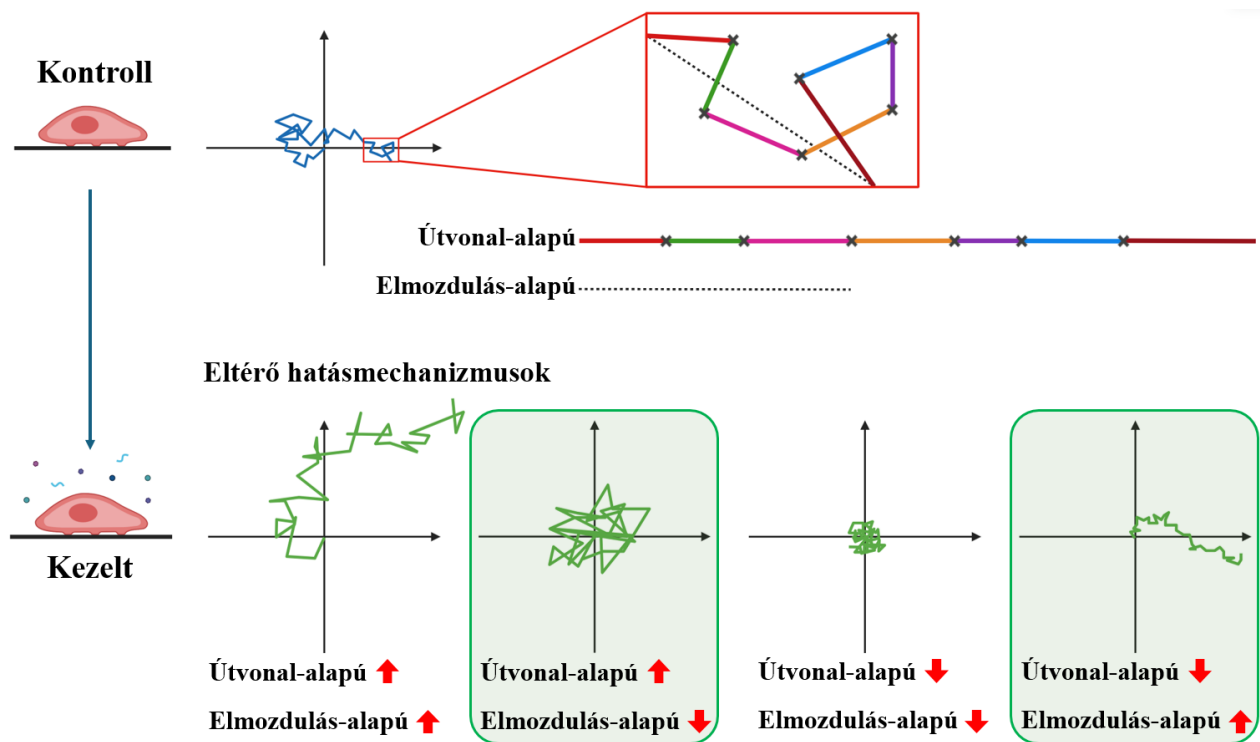
ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

I. TÉZISEK A SINGLE-CELL MIGRÁCIÓS PARAMÉTEREK VIZSGÁLATÁRÓL

- 1) Megmutattam, hogy az elmozdulásalapú és útvonalalapú migrációs paraméterek ugyanazon farmakológiai kezelés hatására eltérő, akár ellentétes irányú változásokat is mutathatnak. Igazoltam továbbá, hogy az azonos sejtpályákból származtatott paraméterek bizonyos esetekben jobban korrelálnak más migrációs assay-k eredményeivel, mint egymással, ami arra utal, hogy a sejtmigráció eltérő mechanisztikus aspektusait írják le.

A munka során alkalmazott valamennyi követési stratégia esetében azonosítottunk olyan kezelési körülményeket, amelyekben az elmozdulás-alapú és az útvonal-alapú migrációs paraméterek a kontrollhoz képest ellentétes irányban változtak (1. ábra). Fontos megállapítás, hogy ezek a diszkordáns válaszok függetlenek voltak az alkalmazott követési módszertől, ami arra utal, hogy nem módszertani zajból erednek, hanem valódi biológiai hatásokat tükröznek. Ezek a mintázatok akkor jelennek meg, amikor a farmakológiai beavatkozások eltérően befolyásolják a migrációs sebességet és az iránytartást, a sejtmozgás két, részben független komponensét. Mivel az útvonal-alapú paraméterek elsősorban az azonnali mozgásintenzitás változásait tükrözik, míg az elmozdulás-alapú paraméterek erősen függenek a trajektóriák szervezettségétől és az iránytartástól, olyan kezelések esetén, amelyek lassítják a sejtek mozgását, miközben stabilizálják az irányultságot, az útvonal hossza csökkenhet, miközben a nettó elmozdulás növekszik. Ennek a szétkapcsolódásnak jelentős biológiai következményei vannak. Ilyen körülmények között a sejtek az útvonal-alapú leírók alapján kevésbé motilisnak tűnhetnek, miközben valójában megtartják vagy akár fokozzák is képességüket arra, hogy – egyenesebb trajektóriák révén – nagyobb távolságokat érjenek el. Fiziológiás kontextusban ez a vaszkuláris struktúrák hatékonyabb elérését és fokozott disszeminációs potenciált jelenthet, annak ellenére, hogy a migrációs sebesség látszólag csökken. Ezek az eredmények bemutatják, hogy a részleges paraméterjelentés hiányos és potenciálisan félrevezető képet ad a migrációs viselkedésről, és hangsúlyozzák az integrált paraméterértékelés szükségességét (Bányai és mtsai, 2026).

Ezen túlmenően azt is megfigyeltük, hogy az egyes single-cell paraméterek alapján becsült migrációs változások iránya és mértéke gyakran közelebb állt más migrációs assay-formátumok eredményeihez, mint ugyanazon trajektóriákból származó alternatív leírókhoz. Ez a megfigyelés tovább erősíti azt a következtetést, hogy a migrációs paraméterek a motilitás eltérő aspektusait ragadják meg, és hogy az analitikai döntések alapvetően meghatározzák a biológiai értelmezést (Bányai és mtsai, 2026; Németh és mtsai, 2025).



1. ábra. A migrációs paraméterek válaszlátásának szemléltetése a sebesség és az iránytartás differenciált szabályozása mellett, kiemelve a diszkordáns eseteket

2) Megállapítottam, hogy a migrációs paramétercsoportok szisztematikus összehasonlítása egyértelmű kompromisszumokat tár fel az érzékenység és a robusztusság között mindhárom paramétercsoport esetében.

Az elmozdulás-alapú, útvonal-alapú és irányultsághoz kapcsolódó migrációs paraméterek szisztematikus összehasonlítása egyértelmű kompromisszumokat tárt fel az érzékenység és a robusztusság között. Az útvonal-alapú metrikák bizonyultak a legérzékenyebbek a kezelés által kiváltott változások detektálására, ezért jól alkalmazhatók finom hatások kimutatására, azonban ezt az érzékenységet kifejezett fogékonyság kísérte a követési zajra és az értékelési stratégiára. Ezzel szemben az elmozdulás-alapú paraméterek mutatták a legnagyobb robusztusságot. E paramétercsoporton belül a maximális elmozdulás köztes viselkedést mutatott: már mérsékelt kezelési hatások kimutatására is alkalmasnak bizonyult, miközben kevésbé volt érzékeny a félautomata követésből származó zajra, mint más útvonal-alapú mutatók. Az irányultsághoz kapcsolódó paraméterek nem irányított migrációs körülmények között korlátozott megbízhatóságot mutattak, ezen csoporton belül az direkcionális ráta bizonyult a legnagyobb magyarázó erejűnek.

Ezek az eredmények együttesen azt mutatják, hogy a paraméterválasztás szükségszerűen egyensúlyozást jelent az érzékenység és a robusztusság között, és azt a biológiai kérdéshez és az analitikai kontextushoz kell igazítani, nem pedig univerzálisan alkalmazni (Bányai és mtsai, 2026).

- 3) Kimutattam, hogy a sejtekre jellemző tulajdonságok – beleértve a morfológiát, a konfluenciát, a lokális sejtsűrűséget és a lefedettséget – jelentősen befolyásolják mind a migrációs paraméterek abszolút értékeit, mind azok variabilitását, valamint eltérően hatnak a manuális és a félautomata követés kimeneteire.

A korrelációs elemzések azt mutatták, hogy a sejtre jellemző morfológiai tulajdonságok a migráció kvantifikálásának fő biológiai varianciaforrásai. A nagyobb és megnyúlt sejtek következetesen nagyobb nettó elmozdulást és hatékonyabb mozgást mutattak, míg a kerekded, egyeneletes körvonalú (szolid), illetve kolóniaképző fenotípusok csökkent motilitást és alacsonyabb iránytartást mutattak. Ezek az összefüggések jól illeszkednek a sejt-morfológia, a citoszkeletális szerveződés és a migrációs típus (e.g.: amöboid, epiteliális) közötti ismert kapcsolatokhoz, és arra utalnak, hogy a migrációs paraméterek nem pusztán a mozgást, hanem a morfológiai állapotot is kódolják (Bányai és mtsai, 2026).

A biológiai hatásokon túl a sejtre jellemző tulajdonságok a követés pontosságát és megismételhetőségét is befolyásolták. A kerek, alacsony motilitású sejtek nagyobb eltéréseket eredményeztek a manuális és a félautomata követés között a szegmentációhoz kapcsolódó pozícióingadozás miatt, míg a megnyúlt sejtek egyértelműbb morfológiai támpontokat biztosítottak, és robusztusabb trajektóriákat eredményeztek valamennyi módszer esetén. Fontos megfigyelés, hogy a zajszűrés nagyrészt megszüntette ezeket a morfológiafüggő eltéréseket. Kezelési körülmények között a sejtszám és a lefedettség váltak a maradék variabilitás fő meghatározó tényezőivé, ami arra utal, hogy a követés robusztussága egyaránt függ a sejtek fenotípusától és a kísérleti elrendezéstől (Bányai és mtsai, 2026).

II. TÉZISEK A KÜLÖNBÖZŐ MIGRÁCIÓS ASSAYEK ÖSSZEHASONLÍTÁSÁRÓL

- 4) Kimutattam, hogy a gap-closure assay-ek kimeneteit jelentősen befolyásolja az assay típusa és a sejtek általános jellemzői; a migrációs readoutok különösen érzékenyek a sejtméretre, ami elengedhetetlenné teszi a normalizálást, továbbá eltérő záródási dinamikát eredményez a scratch és a sejt-kizárásos assay-formátumok között.

A gap-closure assayek elemzése kimutatta, hogy a kollektív migráció látszólagos különbségei gyakran az assay-specifikus geometriai és mechanikai korlátokból erednek, nem pedig a sejtek saját motilitási képességéből. A scratch assayekben az egyenetlen sebgeometria és a mechanikai sejt-károsodás jelentős variabilitást és fokozott záródási dinamikát eredményezett, valamint jelentős érzékenységet mutatott a sejtméretre és a morfológiára. Ezzel szemben a zónaexklúziós assayek standardizáltabb kollektív migrációs readoutot biztosítottak, ahol a sejtméretre történő normalizálás csak minimálisan módosította a sejtvonalak egymáshoz viszonyított sebességét. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a gap-closure assayek alapvetően eltérnek abban, hogy a migráció mely aspektusát hangsúlyozzák, és hogy az assay megválasztása döntően meghatározza, hogy a kollektív mechanika vagy az intrinszikus migrációs képesség dominálja-e a kimenetet (Németh és mtsai, 2025).

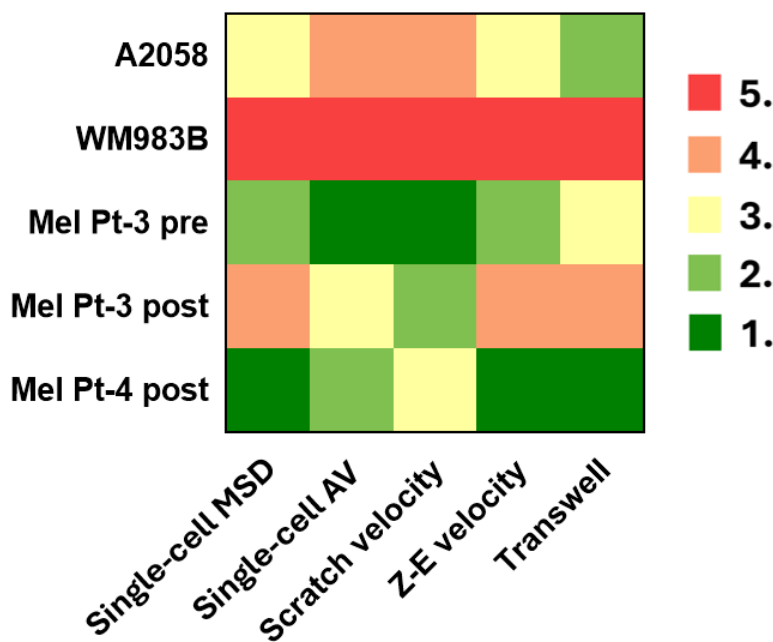
- 5) Megállapítottam, hogy a transwell assay-ek mutatják a legnagyobb divergenciát a migrációs viselkedésben az egyes assay-formátumok között, és rámutattam arra, hogy farmakológiai kezelések bizonyos körülmények között látszólagos migrációs növekedést eredményezhetnek a sejtméret és a sejt-morfológia megváltoztatásán keresztül.

A kétdimenziós migráción alapuló assayekkel való összehasonlítás során a transwell mérések tértek el legmarkánsabban a többi formátumtól, ami a pórusokon történő áthaladás során érvényesülő sejtméret-, alak- és mechanikai adaptabilitás-függőségükből fakad. Farmakológiai gátlás mellett a transwell assayekben látszólagos migrációnövekedés is megfigyelhető volt a csökkentett motilitás ellenére, ami arra utal, hogy a kezelés által kiváltott morfológiai és méretbeli változások önállóan is elősegíthetik a membránon való átjutást. Mivel a transwell assayek a motilitást a korlátozott térben érvényesülő mechanikai szűréssel integrálják, és kizárólag végponti információt szolgáltatnak, kimeneteik összetett migrációs mintázatot tükröznek, nem pedig közvetlenül a migrációs sebességet vagy az iránytartást (Németh és mtsai, 2025).

- 6) Kimutattam, hogy az egysejtes követés nyújtja a leginformatívabb és mechanisztikusan legjobban értelmezhető képet a gyógyszerhatásokról, mivel a motilitási paraméterek mellett a sejtek morfológiai tulajdonságainak elemzését is lehetővé teszi, és gépi tanulási elemzéssel kombinálva a legnagyobb diszkriminációs teljesítményt érte el (az ML-elemzések Dr. Köllöd Csabával együttműködésben készültek).

Az összes vizsgált assay-formátum közül a single-cell követés biztosította a kezelések által kiváltott migrációs változások legjobban értelmezhető reprezentációját, mivel lehetővé tette a motilitási és a sejt specifikus jellemzők egyidejű kvantifikálását. Mivel a sejtek izoláltan mozognak, ezek a vizsgálatok megőrzik azokat az alak- és méretinformációkat, amelyek kollektív vagy behatároló környezetben torzulnak vagy elvesznek. A single-cell adatokból származó jellemzők gépi tanulási klasszifikátorokba történő integrálása a kezelt és a kontroll állapotok elkülönítésében a legmagasabb pontosságot eredményezte, ami arra utal, hogy az assayek érzékenysége nem egyetlen migrációs metrikán múlik, hanem azon a képességen, hogy többdimenziós fenotípusos változásokat képesek-e megragadni (Németh és mtsai, 2025).

Az assay- és paraméterfüggő különbségeket a 2. ábra foglalja össze, amely bemutatja, hogy a melanoma sejtvonalak migrációs képességeik alapján felállított rangsora miként változik az egyes kísérleti formátumok és a single-cell leírók függvényében.



2. ábra. Eltérő sorrend a meghatározott migrációs képességben a különböző assayek és single-cell paraméterválasztások esetén

MÓDSZERTANI KÖVETKEZTETÉSEK ÉS GYAKORLATI MEGFONTOLÁSOK

A munka elsődleges célja annak szisztematikus értékelése volt, hogy a különböző migrációs assayek és kvantifikációs stratégiák miként befolyásolják a sejtmotilitás értelmezését azonos biológiai perturbációk mellett. A módszerek teljesítményének közvetlen összehasonlításán túl célunk az volt, hogy a területen dolgozók számára egy gyakorlati keretrendszert biztosítsunk az egyes assayekhez kapcsolódó erősségek, korlátok és lehetséges torzítási források egyértelmű bemutatásával. Az alábbi összefoglalás a disszertáció legfontosabb kísérletes és számítógépes eredményeit tömöríti olyan iránymutatássá, amely támogatja az átgondolt assayválasztást, paraméterkijelölést és eredményértelmezést.

Migrációs assay		Fő erősségek	Fő korlátok	Ajánlott alkalmazási terület
Single-cell migráció		Tisztán motilitás és sejtrel jellemző paraméterek kvantifikálása; a kezelési hatások robusztus és jól értelmezhető elkülönítése	Munka- és adatigényes; korlátozott skálázhatóság	Anyag-hatások mechanisztikus vizsgálata single-cell szinten
Parameter-csoportok (single-cell migráció)	Elmozdulás-alapú	Robusztus a követési módszerekkel szemben; alacsony zajérzékenység	Alacsony érzékenység kis kezelési hatásokra; morfológiafüggő	Kísérletek közötti összehasonlítás; nettó migrációs kapacitás értékelése
	Útvonal-alapú	Nagyon érzékeny perturbációkra; a motilitás dinamikáját ragadja meg	Zajérzékeny; erősen követésfüggő	Gyenge kezelés-hatások detektálása; motilitásdinamika elemzése
	Irányultság-alapú	A trajektóriák szervezettségét és diszkordáns readoutokat magyarázza	Kis érzékenység; önmagában nehezen értelmezhető	Kezelések mechanisztikus hatásainak értelmezése
Scratch assay		Egyszerű, gyors kivitelezhetőség; magas látszólagos záródási dinamika	Nagy variabilitás a gap-geometriában; sérülés indukálta parakrin hatások; erős sejtméret-függőség	Előkísérletek, nagy áteresztőképességű vizsgálatok, körültekintő értelmezéssel és sejtméret-normalizálással
Sejtkizárásos assay		Egységes, reprodukálható gap-ek; minimális sejtkárosodás	Lassabb záródás; sejtvonal-függő érzékenység	Kontrollált kollektív migráció jól reprodukálható vizsgálatára
Transwell assay		Kemotaxis és korlátozott térben zajló migráció vizsgálata	Erősen morfológia- és sejtméret-függő; végponti readout	Kemotaxis- és invázióvizsgálatok (morfológiai kontextus fontos!)

1. táblázat. Gyakorlati megfontolások a migrációs assayek és a paraméterválasztás során

PUBLIKÁCIÓS LISTA

A disszertációhoz kapcsolódó folyóiratcikkek:

- 1) Bányai, G. L., Naszlady, M. B., Juhász, J., Horváth, A., Hegedűs, B. & Garay, T. (2026). Revisiting single-cell migration parameters from 2D video microscopic measurements. *European Journal of Cell Biology*, 105, 151524.
- 2) Németh, A., Bányai, G. L.*, Andrászek, M., Dobos, N. K., Köllöd, C., Garay, T. (2025). Comparison of in vitro migration assays evaluating nintedanib's migration inhibitory effects on melanoma cells. *Scientific Reports*, 15, 42599.

További folyóiratcikkek:

- 1) Németh, A., Ekström, K., Crescitelli, R., Bagge, R. O., Bányai, G. L., Rák, Á., Cserey, G., Bölükbas, S., Visnovitz, T., Hegedűs, B., Garay, T. Machine learning-enhanced analysis of extracellular vesicle profiles in pleural effusions for cancer diagnosis. *MedComm – Under revision*.
- 2) Németh, A., Bányai, G. L., Dobos, N. K., Kós, T., Gaál, A., Varga, Z., Buzás, E. I., Khamari, D., Dank, M., Takács, I., Szász, A. M., Garay, T. (2024). Extracellular vesicles promote migration despite BRAF inhibitor treatment in malignant melanoma cells. *Cell Communication and Signaling*, 22(1), 282. <https://doi.org/10.1186/s12964-024-01660-4>
- 3) Jász, B., Balogh, T., Ambrus, S., Schmidt, P., Bányai, G. L., Körmendi, S., Jász, M. (2024). Pure rotation in the temporomandibular joint during jaw opening? A digital motion analysis. *BDJ Open*, 10(1), 32. <https://doi.org/10.1038/s41405-024-00213-8>

PhD doktori értekezések összefoglaló kötetében megjelent közlemények:

- 1) Bányai, G. L. (2025). Exploring diffusion-driven variations in extracellular vesicles from cancer patients using microfluidic systems. *PhD Proceedings – Annual Issues of the Doctoral School, Faculty of Information Technology and Bionics*, 20, 23–26.
- 2) Bányai, G. L. (2024). Exploring the correlation between migration parameters and cell characteristics. *PhD Proceedings – Annual Issues of the Doctoral School, Faculty of Information Technology and Bionics*, 19, 23–26.
- 3) Bányai, G. L. (2023). Comparison of commonly used single-cell migration parameters. *PhD Proceedings – Annual Issues of the Doctoral School, Faculty of Information Technology and Bionics*.
- 4) Bányai, G. L. (2022). Quantitative analysis of single-cell trajectories. *PhD Proceedings – Annual Issues of the Doctoral School, Faculty of Information Technology and Bionics*, 17, 17.

Konferencia posztterek:

- 1) Bányai, G. L., Merényi, A., Szabó, A., Németh, A., Gaál, A., Pongor, C., Garay, T. (2025). Utilizing microfluidic techniques to differentiate cancer patient samples based on extracellular vesicle profiles. ISEV2025, Vienna, Austria.
- 2) Németh, A., Ekström, K., Crescitelli, R., Bagge, R. O., Bányai, G. L., Rák, Á., Cserey, G., Bölükbas, S., Visnovitz, T., Hegedűs, B., Garay, T. (2025). Diagnostic potential of pleural fluid-derived extracellular vesicles in differentiating pleural-associated diseases using machine learning. ISEV2025, Vienna, Austria.
- 3) Németh, A., Kós, T., Bányai, G. L., Gaál, A., Varga, Z., Dank, M., Takács, I., Szász, A. M., Garay, T. (2022). Effects of extracellular vesicles on vemurafenib sensitivity in syngeneic melanoma cell lines. ISEV2022, Lyon, France.
- 4) Németh, A., Kós, T., Bányai, G. L., Gaál, A., Varga, Z., Dank, M., Takács, I., Szász, A. M., Garay, T. (2022). Can extracellular vesicles transmit vemurafenib resistance in melanoma cells in vitro? EACR Congress 2022, Seville, Spain.
- 5) Bányai, G. L., Dobos, N. K., Németh, A., Merényi, A., Szabó, A., Gaál, A., Pongor, C., Garay, T. (2025). Microfluidic profiling of extracellular vesicle fractions reveals systemic changes in cancer patients. HSEV2025, Budapest, Hungary.
- 6) Bányai, G. L., Merényi, A., Szabó, A., Gaál, A., Pongor, C., Garay, T. (2025). Identifying tumor-associated differences in extracellular vesicle populations using microfluidic techniques. Semmelweis Scientific Days 2025, Budapest, Hungary.
- 7) Németh, A., Simon, A., Bányai, G. L., Garay, T. (2025). Extracellular vesicle pretreatment enhances melanoma cell migration despite dual MAPK pathway inhibition. PhD Scientific Days 2025, Budapest, Hungary.
- 8) Bányai, G. L., Szabó, A., Gaál, A., Pongor, C., Garay, T. (2024). Microfluidic techniques for extracellular vesicle analysis in clinical diagnostics. EACR Conference “Liquid Biopsies”, Lyon, France.
- 9) Bányai, G. L., Szabó, A., Gaál, A., Pongor, C., Merényi, A. G., Garay, T. (2024). Advancing extracellular vesicle characterization: Microfluidic approaches for cancer diagnostics. UKEV2024, Newcastle upon Tyne, United Kingdom.
- 10) Bányai, G. L., Szabó, A., Gaál, A., Pongor, C., Kós, T., Garay, T. (2024). Microfluidic-based methods for the analysis of extracellular vesicles in liquid biopsies. HSEV, Budapest, Hungary.
- 11) Kvasznicza, J., Magyar, R., Bányai, G. L., Szőcs, L., Németh, A., Garay, T. (2024). Cyclodextrins affect extracellular vesicle production in melanoma cells in vitro. HSEV2024, Budapest, Hungary.

- 12) Németh, A., Bányai, G. L., Dobos, N. K., Kós, T., Gaál, A., Varga, Z., Buzás, E. I., Khamari, D., Dank, M., Takács, I., Szász, A. M., Garay, T. (2024). Extracellular vesicles promote migration despite BRAF inhibitor treatment. HSEV2024, Budapest, Hungary.
- 13) Bányai, G. L., Naszlady, M. B., Juhász, J., Garay, T. (2024). Analysis of migration parameter sensitivity. Applied Mathematics Conference (AMK), Szeged, Hungary.
- 14) Bányai, G. L., Szabó, A., Gaál, A., Pongor, C., Kós, T., Garay, T. (2023). Microfluidics as a tool for analyzing the size distribution of plasma-derived microsomal fractions. ASEV – Small New World 2.0, Graz, Austria.
- 15) Choi, J., Görög, D., Gaál, A., Khamari, D., Buzás, E. I., Németh, A., Garay, T., Bányai, G. L. (2023). Investigating the effects of extracellular vesicles on proliferation and migration in syngeneic colorectal cancer cell lines. ASEV – Small New World 2.0, Graz, Austria.
- 16) Németh, A., Bányai, G. L., Dobos, N. K., Kós, T., Gaál, A., Varga, Z., Szász, A. M., Garay, T. (2023). Extracellular vesicles can promote migration and transfer vemurafenib resistance among melanoma cells. ASEV – Small New World 2.0, Graz, Austria.
- 17) Kvasznicza, J., Magyar, R., Bányai, G. L., Rohan, Z., Szócs, L., Németh, A. (2023). Cyclodextrins affect extracellular vesicle production in melanoma cells in vitro. ASEV – Small New World 2.0, Graz, Austria.
- 18) Bányai, G. L., Naszlady, M. B., Németh, A., Molnár, E., Rittler, D., Hegedűs, B., Garay, T. (2022). Is an increase or decrease in cell migratory activity merely a consequence of parameter selection? Semmelweis Symposium 2022, Budapest, Hungary.
- 19) Németh, A., Bányai, G. L., Dobos, N. K., Kós, T., Gaál, A., Varga, Z., Buzás, E. I., Khamari, D., Dank, M., Takács, I., Szász, A. M., Garay, T. (2022). Extracellular vesicles in vemurafenib resistance in melanoma cells. Semmelweis Symposium 2022, Budapest, Hungary.

IRODALOMJEGYZÉK

- Bergers, G., & Fendt, S. M. (2021). The metabolism of cancer cells during metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 21(3), 162–180. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00320-2>
- Friedl, P., & Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(7), 445–457. <https://doi.org/10.1038/nrm2720>
- Hohmann, T., Hohmann, U., Dahlmann, M., Kobelt, D., Stein, U., & Dehghani, F. (2022). MACC1-induced collective migration is promoted by proliferation rather than single cell biomechanics. *Cancers*, 14(12). <https://doi.org/10.3390/cancers14122857>
- Justus, C. R., Leffler, N., Ruiz-Echevarria, M., & Yang, L. V. (2014). *In vitro* cell migration and invasion assays. *Journal of Visualized Experiments*, (88), 51046. <https://doi.org/10.3791/51046>
- Liang, C. C., Park, A. Y., & Guan, J. L. (2007). *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nature Protocols*, 2(2), 329–333. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>
- Majidpoor, J., & Mortezaee, K. (2022). Key promoters of tumor hallmarks. *International Journal of Clinical Oncology*, 27(1), 45–58. <https://doi.org/10.1007/s10147-021-02074-9>
- Masuzzo, P., Van Troys, M., Ampe, C., & Martens, L. (2016). Taking aim at moving targets in computational cell migration. *Trends in Cell Biology*, 26(2), 88–110. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.09.003>
- Piccinini, F., Kiss, A., & Horvath, P. (2016). CellTracker (not only) for dummies. *Bioinformatics*, 32(6), 955–957. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv686>
- Pijuan, J., Barceló, C., Moreno, D. F., Maiques, O., Sisó, P., Marti, R. M., Macià, A., & Panosa, A. (2019). *In vitro* cell migration, invasion, and adhesion assays: from cell imaging to data analysis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 107. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00107>
- Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parsons, J. T., & Horwitz, A. R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, 302(5651), 1704–1709. <https://doi.org/10.1126/science.1092053>
- Shellard, A., & Mayor, R. (2020). All roads lead to directional cell migration. *Trends in Cell Biology*, 30, 852–868.
- Shiode, Y., Morizane, Y., Matoba, R., Hirano, M., Doi, S., Toshima, S., et al. (2017). A novel cell exclusion zone assay with a barrier made from room temperature vulcanizing silicone rubber. *Scientific Reports*, 7, 17383. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17646-6>

- Svensson, C.-M., Medyukhina, A., Belyaev, I., Al-Zaben, N., & Figge, M. T. (2018). Untangling cell tracks: Quantifying cell migration by time-lapse image data analysis. *Cytometry Part A*, 93, 357–370. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23249>
- Way, G. P., Kost-Alimova, M., Shibue, T., Harrington, W. F., Gill, S., Piccioni, F., Becker, T., Shafqat-Abbasi, H., Hahn, W. C., Carpenter, A. E., Vazquez, F., & Singh, S. (2021). Predicting cell health phenotypes using image-based morphology profiling. *Molecular Biology of the Cell*, 32(9), 995–1005. <https://doi.org/10.1091/mbc.E20-12-0784>
- Weiger, M. C., Vedham, V., Stuelten, C. H., Shou, K., Herrera, M., Sato, M., Losert, W., & Parent, C. A. (2013). Real-time motion analysis reveals cell directionality as an indicator of breast cancer progression. *PLoS ONE*, 8(3), e58859. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058859>
- Zaki, O. S. S., Kanesan, L., Leong, M. Y. D., & Vidyadaran, S. (2019). The influence of serum-supplemented culture media in a transwell migration assay. *Cell Biology International*, 43(10), 1201–1204. <https://doi.org/10.1002/cbin.11122>