

**Funkcionalizált hibrid aerogél mikrorészecskék tumorel-
lenes hatásának vizsgálata nyirokutakon terjedő tumor
sejteken**

Király Gábor

Témavezetők: Prof. Dr. Juhász István

Dr. Szemán-Nagy Gábor



Debreceni Egyetem

Fogorvostudományi Doktori Iskola

Debrecen, 2019

Funkcionalizált hibrid aerogél mikrorészecskék tumorelles hatásának vizsgálata nyirokutakon terjedő tumor sejteken

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Király Gábor

OKLEVELES BIOTECHNOLÓGUS

Készült a Debreceni Egyetem Fogorvostudományi Doktori Iskolája keretében

TÉMAVEZETŐK: PROF. DR. JUHÁSZ ISTVÁN, PhD
DR. SZEMÁN-NAGY GÁBOR, PhD

A Doktori Szigorlati Bizottság Elnöke: PROF. DR. MÁRTON ILDIKÓ, AZ MTA DOKTORA

A Doktori Szigorlati Bizottság Tagjai: DR. BALTÁS ESZTER, PhD
PROF. DR. HEGEDŰS CSABA, PhD

A Doktori Szigorlat Időpontja, helyszíne: 2019.07.11. 11:00; DE FOK 228. tanterem

Az Értekezés Bírálói: PROF. DR. SOÓS GYÖNGYVÉR, PhD
PROF. DR. BÁNYAI ISTVÁN, AZ MTA DOKTORA

A Bírálóbizottság Elnöke: PROF. DR. MÁRTON ILDIKÓ, AZ MTA DOKTORA

A Bírálóbizottság Tagjai: PROF. DR. SOÓS GYÖNGYVÉR, PhD
PROF. DR. BÁNYAI ISTVÁN, AZ MTA DOKTORA
PROF. DR. HEGEDŰS CSABA, PhD
DR. BALTÁS ESZTER, PhD

Az Értekezés Védésének Időpontja: 2019.07.11. 13:00

Az Értekezés Védésének Helye: DEÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme

1. BEVEZETÉS

Peritoneális tumorok őrszem nyirokcsomói

Napjainkban a fejlett diagnosztikai és terápiás eljárások ellenére a metasztázisok a daganatos megbetegedésekkel összefüggő halálozások nagy arányát teszik ki, illetve ez a komplex folyamat a tumorbiológia legkevésbé megértett aspektusa. Daganatos áttét kialakulásához a tumor sejtnek le kell válnia az elsődleges tumorból, és be kell lépnie a vér- vagy nyirokkeringésbe. Ezt követően extravazáció által a tumor sejt a kapillárisokból kilépve a távoli szervbe jut, és osztódni kezd. A metasztázisról a mag-talaj hipotézis révén bebizonyosodott, hogy szabályozott folyamat, vagyis a tumor sejt és távoli szerv kölcsönhatása irányítja. A nyirokúton történő metasztázis esetén a daganatos sejtek az elsődleges tumorból a legközelebbi nyirokcsomókba jutnak, és ott képeznek áttétet. A tumor sejteknek a nyirokúton közvetítésével nyirokcsomókba történő jutása az őrszem nyirokcsomó elméletet hozta létre. Az őrszem nyirokcsomó elmélet szerint az első nyirokcsomó a tumor helyétől nyirokelfolyást kap, mely így a nyirok terjedésén keresztül tumor sejteket fog tartalmazni. Az őrszem nyirokcsomónak a primer tumorhoz való elhelyezkedése, valamint a mai modern képalkotó rendszerek (MRI – mágneses rezonancia képalkotás, CT – számítógépes tomográfia) alkalmazása ma már általános annak eldöntésében, hogy a nyirokcsomó tartalmaz-e áttétet, vagy sem. A hasüregi tumorok esetén a szóba jöhető őrszem nyirokcsomók a főbb hasüregi szervekhez asszociáltak, azonban peritoneális tumorok esetén nem csak a daganat közelében, hanem a test távolabbi részeiben is kialakulhat őrszem nyirokcsomó. Leginkább gyomordaganat esetén megfigyelhető, hogy a daganatos sejtek a hasüregből a *mediastinalis* régióban lévő nyirokcsomókba jutnak, és ott képeznek áttétet.

Állatmodellek a hasüregi nyirokelfolyás és áttétképzés vizsgálatára

Számos állatmodellben leírták már a hasüregi nyirokelfolyási utakat, azonban továbbra is vita tárgyát képezi az a megállapítás, hogy a hasüregnek van-e előre meghatározott nyirokelfolyási mintázata. Hörcsögök hasüregébe Evans kék festéket, illetve radioaktívan jelölt albumint injektálva látható volt, hogy a részecskék a *mediastinalis* és hasüregi nyirokcsomókban jelentek meg. Specifikus peritoneális nyirokelvezetést patkány modellben különböző méretű nyirok nyomkövetők (tracer-ek) és infravörös közeli képalkotás alkalmazásával írtak le, a regionális őrszem nyirokcsomókon kívül a felső *mediastinalis* nyirokcsomókban is tapasztalható volt áttét jele. Bárány állatmodellben a hasüregből 3 fő nyirokutat írtak le, melyekben a hasüregből a különböző kolloid, illetve festék részecskékhez hasonlóan a tumor sejtek is a diafragmán keresztül *mediastinalis* irányba jutottak tovább, és *parasternalis* nyirokereken keresztül a paratimikális nyirokcsomókba jutottak el.

Citosztatikumok célbajuttatására alkalmazható gyógyszerleadó rendszerek

A daganatos megbetegedések kezelésében nagyrészt olyan mellékhatásokkal és korlátozott hatékonysággal rendelkező toxikus gyógyszereket alkalmaznak, melyek legnagyobb hátránya a célspecifikusság hiánya. Hasüregi eredetű daganatok citosztatikumokkal történő kezelése esetén további hátrány még, hogy nagy dózistartományt kell alkalmazni, illetve az i.p. beadott gyógyszerek penetrációs távolsága csupán 2-3 mm. A konvencionális daganatterápiában a metotrexát (MTX) egy hatékony daganatellenes szer, azonban számos mellékhatással rendelkezik. A MTX felszívódása a növekvő koncentrációval telítődési kinetikát követ a gyomor-bél traktusban, biológiai hozzáférhetősége a tumorhoz dózis függő, nagy MTX dózisok alkalmazása esetén a beadott MTX nagy részét a vesék rövid időn belül kiszűrik. Ennek eredményeként pedig rövid plazma felezési idő

(5-8 óra) és alacsony hatóanyag koncentráció jellemzi a célszövetekben. A MTX leadásának célzottá tételéhez számos módszert alkalmaztak már: a gyógyszer lipidekbe történő csomagolása, hidrofil zselatin mikrogömbökbe való kötése, illetve a kilomikronokra hasonlító emulzióban való alkalmazása mind javították a gyógyszer biohasznosulását és célspecifikusságát.

Aerogélek és hibrid aerogélek, mint gyógyszerhordozó rendszerek

Az aerogélek, mint porózus rendszerek a nagy belső felületük, felület/térfogat arányuk, nagy pórus térfogatuk és egységes pórusméretük miatt ideális jelöltek gyógyszerhordozó anyagként történő alkalmazáshoz. Mivel a szilika aerogélek biológiailag nem bonthatóak le, illetve alkalmazásukból következő mellékhatások (gyulladás, szilikózis) miatt a kutatások a szerves részt is tartalmazó hibrid aerogélek felé fordultak. Hibrid aerogélek esetében a nagy felülettel rendelkező szerves alkotó, és a szerves rész biodegradabilitásának a kombinációja olyan új anyagot eredményezett, mely alkalmassá tette őket hordozó anyagként történő alkalmazáshoz. Számos közleményben a gyógyszermolekulák aerogélekből történő felszabadulását a célzott szövetnek a normálistól való eltérő tulajdonságaira alapozták. Ilyen lehet a cél szövet megváltozott pH-ja, megnövekedett enzimműködés, redox változások vagy kompetitív gátlás.

Daganatkezeléssel kapcsolatos vizsgálatokban különböző, a normális sejtektől eltérő, megnövekedett intracelluláris enzimaktivitásokat használtak fel a hibrid aerogélekből való gyógyszer felszabadításhoz: például doxorubicinnel (DOX) funkcionizált mezopórusos szilika nanorészecskék alkalmazása esetén a részecskék a májdaganatban akkumulálódtak, a gyógyszer felszabadulásért a hepatocelluláris karcinóma sejtek fokozott mátrix metalloproteáz (MMP-9) aktivitása volt felelős.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Korábbi vizsgálatainkból ismert volt, hogy patkány állatmodellben az intraperitoneálisan (i.p.) beadott tus kolloid szemcsék, illetve a daganatos sejtek a rekeszizmon keresztül átjutottak, és a felső mediastinalis, paratimikális nyirokcsomókban jelentek meg. Munkánk első részében egér állatmodellben az i.p. beadott kolloid részecskéknek és az SCC VII egér karcinóma sejtek paratimikális nyirokcsomókban történő megjelenésének, és az áttét képzés vizsgálatát tűztük ki célul. Ezen vizsgálatokhoz a következő kísérleteket kívántuk elvégezni:

- 1) Vizsgálni kívántuk, hogy az egér eredetű karcinóma (SCC VII) tumor sejt szuszpenziót egereknek i.p. beadva a tumor sejtek a peritoneumból a nyirokkeringés útján a timuszban található őrszem nyirokcsomóba jutnak-e, illetve adnak-e áttétet. A tumor terjedési útvonalat makroszkóposan (i.p. beadott kolloid tusszemcsék terjedési útvonala vizsgálatával), valamint mikroszkóposan (szövetteni festéssel és immunhisztokémiai jelöléssel) kívántuk megvizsgálni.
- 2) A kísérleti egér állatmodellben használt SCC VII sejtek kezelésére metotrexátot (MTX), mint modell citosztatikumot alkalmaztunk. *In vitro* vizsgálatokban igazolni kívántuk a MTX genotoxikus, mikronukleusz képző hatását a tumor sejteken citotoxikológiai assay segítségével, és a sejtek kromatin kondenzációs intermedierjeinek, illetve a kialakult kromatinstruktúrák vizsgálatával.

A hibrid, biodegradábilis anyagot tartalmazó aerogél mikrorészecskékkel, mint gyógyszerleadó rendszerrel a következő kísérleteket terveztük elvégezni:

- 3) Igazolni kívántuk, hogy az újonnan szintetizált, hibrid szilika-zselatin aerogél mikrorészecskék (H-AG) biokompatibilisek a sejtekkel *in vitro*, mely vizsgálatokhoz a hosszú távú megfigyelésre alkalmas time-lapse videómikroszkópiát használtuk.
- 4) A MTX-al funkcionizált H-AG mikrorészecskékből (MFH-AG) történő gyógyszer felszabadulást különböző sejtmentes és sejteket tartalmazó médiumban kívántuk megfigyelni. Végül a MFH-AG mikrorészecskék tumor sejt növekedés gátlását vizsgáltuk SCC VII, illetve humán eredetű HL-60 és HaCaT sejtvonalakon, melyekhez MTT viabilitás vizsgálatot alkalmaztunk.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejtenyésztés

A kísérleteket egér eredetű karcinóma (SCC VII), illetve humán eredetű (HaCaT (keratinocita), HL-60 (leukémia)) sejtenyészetekkel végeztük el. A SCC VII sejteket DMEM-HAM'S F12 médiumban tenyésztettük 2mM L-glutamin, 23 mM nátrium-bikarbonát, 100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin, 1% nem esszenciális aminosav keverék és 10% hőinaktivált főtális borjú szérum hozzáadása mellett. A HaCaT sejtenyészetet 2 mM L-glutamint, 23 mM NaHCO₃-ot, 100 U/mL penicillint, 100 U/mL streptomycint, 1%-os nem esszenciális aminosav keveréket és 10% borjú szérum albumint tartalmazó DMEM tápfolyadékban, a HL-60 sejtenyészetet pedig az előzőhöz hasonló összetételű RPMI 1640-es tápfolyadékban tenyésztettük.

Egér kísérletek

A vizsgálatokat hím és nőstény (5-5) C3H/HeJ egereken végeztük el, az állatokat konvencionális laboratóriumi körülmények között tartottuk, szemi-szintetikus diétát (Charles River Mo Kft, Gödöllő, Magyarország) és *ad libitum* csapvizet kaptak. A kísérletek során a metasztázis útvonal vizsgálatához a 8-10 hetes állatoknak először tustintát adtunk i.p. 0,2 ml-ben, majd 48 óra elteltével az állatokat felboncoltuk. A SCC VII egér karcinóma sejteket ($1,5 \times 10^5$) szintén 0,2 ml térfogatban oltottuk i.p. az állatokba, majd 30 nap elteltével az egereket nyaki diszlokációval áldoztuk fel. A boncolás során megnyitottuk a hasüreget az elsődleges tumor, illetve a *mediastinum*ot a tímusz eltávolításához. Az egér boncolás során a felvételeket LED megvilágítású, 5 megapixeles felbontású kamerával készítettük.

Szövetteni vizsgálatok, immunhisztokémiai jelölés

Az egerek boncolása után a paratimikális nyirokcsomókat tartalmazó tímuszt 4%-os formaldehidben fixáltuk. A mintákat paraffinba ágyasztuk, metszettük, majd hematoxylin-eozin festést alkalmaztunk rajtuk. A hasüregben kialakult primer tumor, valamint a tímuszon belüli, áttéteket tartalmazó nyirokcsomók szövettani vizsgálatát a Kenézy Gyula Kórház Pathológiai Osztályán végeztük el. A formalin fixált, paraffinba ágyazott egér eredetű nyirokcsomókban lévő karcinóma sejtek jelöléséhez citokeratin 14 (LL002, Biocare Medical, Pcheco, CA, USA) pozitív sejtek immunhisztokémiai vizsgálatát végeztük el. A metszetekről a felvételek elkészítéséhez LEICA DM 2000 mikroszkópot használtunk.

Kromatin struktúrák izolálása, fluoreszcens mikroszkópia

A kontroll és a különböző koncentrációjú (0,1-1-10-100 μM) MTX-al kezelt SCC VII sejteken először reverzibilis permeabilizálást alkalmaztunk, mely átmenetileg megnyitotta a sejtmembránt. Ehhez T-150 dextrán tartalmú hipotóniás puffert használtunk, majd a sejteket 10% FBS tartalmú sejtenyészítő tápfolyadékban regeneráltuk. Ezt követően a sejt szám függvényében a médiumhoz 0,2 ng/ml koncentrációjú colcemidet adtunk (metafázisos blokk), melyet 2 órás inkubáció követett. A sejteket ezt követően PBS-el mostuk át 2 alkalommal. Ezután a sejtek ozmotikus duzzasztásához swelling puffert használtunk, 10 percig 37 °C-on történt az inkubáció. A duzzasztó puffert centrifugálással (5 perc, 500g) távolítottuk el. Az magizolálás során a pellet sejtjeihez lassan 1 ml jégecet:metanol (1:3) elegyet adtunk, a sejtmagokat ezzel a fixálószerrel mostuk kétszer, majd 2 ml fixáló elegyben vettük fel őket. A fixáló oldatban felvett sejteket kb. 30 cm magasról mikroszkóp fedőlemezre cseppentettük Pasteur-pipetta segítségével, ezt követően a lemezeket szobahőmérsékleten hagytuk száradni éjjelre. PBS-sel történő

átmosást követően a lemezeket felszálló alkoholsorban (70%, 90%, 95%, 100%) dehidráltuk. A tárgylemezeken lévő dehidrált mintákat 20 μ l DAPI-Antifade keverékkel festettük meg, majd fedőlemezzel lefedtük őket. A minták befotózásához fluoreszcens mikroszkópot (Nikon Eclipse E800 Nikon Corporation, Tokyo) használtunk.

Mikronukleusz vizsgálat Giemsa-festéssel

A MTX által indukált mikronukleusz képződés bizonyítására Giemsa festést alkalmaztunk. A mikroszkópos megfigyeléshez a sejtszuspenziót óvatosan a tiszta tárgylemezekre pipettáztuk, levegőn szárítottuk és 3%-os Giemsa-oldattal festettük, majd a tárgylemezekre fedőlemezt helyeztünk.

Hibrid szilika-zselatin (H-AG) és metotrexáttal funkcionizált hibrid szilika-zselatin (MFH-AG) mikrorészecskék előállítása

Zselatin-metotrexát konjugátum előállítása

A zselatint (0,5 g) feloldottuk 30 ml 0,05 M NaHCO₃-ban, majd hozzáadtuk a 150 mg MTX-ot tartalmazó, 15 ml 0,05 M NaHCO₃ oldatot. Az oldat pH-ját HCl oldat segítségével pH 6-ra állítottuk be, majd szobahőmérsékleten 2 órán át 300 rpm-en kevertettük. Ezt követően 1-etil-3-(3-diaminopropil)-karbodiimid hidrokloridot (750 mg) adtunk a keverékhez és tovább hagytuk kevertetni éjjelre. A konjugátum tisztításához foszfát puffert tartalmazó (0,05 M, pH 7.4) 7000 MWCO SnakeSkin dialíziscsővet használtunk. A puffert 24 óra után lecseréltük, és további 5 dializáló ciklust alkalmaztunk. Végül a száraz zselatin-MTX konjugátumot liofilezással kaptuk meg.

Metotrexáttal funkcionizált hibrid aerogél előállítása

A zselatin-MTX konjugátumot (0,55 g) és 70 mg $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -ot 20 ml desztillált vízben oldottuk be, a folyadék szobahőmérsékletre történő lehűtése után 7 ml metanolban 3 ml tetrametil-ortoszilikátot (TMOS) oldottunk fel, és hozzáadtuk a diszperziós közeghez. A reakcióelegyet erőteljesen kevertettük, és henger alakú műanyag formába öntöttük az algogél képződéséhez. 24 óra elteltével az algogélt eltávolítottuk az öntőformából, majd egy perforált alumínium tartályba helyeztük a többlépcsős oldószercseréhez. Először az algogélt 24 órára tiszta metanolba helyeztük, majd a metanol tiszta acetonnal cseréltük 4 lépésben, 24 órán keresztül. Az acetont további 3 alkalommal cseréltük friss oldószere. Az extraháláshoz használt oldószerekben nem észleltünk MTX kioldódást. Végül a gélt szuperkritikus CO_2 (14 MPa, 80 °C) segítségével szárítottuk ki. A hibrid aerogél (MFH-AG) összetételét termikus analízis segítségével 65 m/m% szilikára és 35 m/m% zselatin-MTX-re becsültük.

Az aerogélek karakterizálása

MFH-AG részecskék elektronmikroszkópos és porozitás vizsgálata

A pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) felvételeket Hitachi S-4300 (Hitachi, Tokyo, Japán) mikroszkóp segítségével készítettük el. A monolitból frissen levágott aerogél darabokat szén szalagokra rögzítettük, és 5-6 atomréteg vastag, aranyozott vezetőréteggel borítottuk, illetve 10-30 kV-os gyorsítófeszültséget alkalmaztunk.

Az aerogél minták fajlagos felületét, pórus méret eloszlását és fajlagos pórus térfogatát N_2 adszorpciós/deszorpciós porozimetria (Quantachrome Nova 2200e) alkalmazásával mértük meg 80 °C-on 24 órás gáztalanítást követően. A fajlagos

felületet a többpontos BET módszer alkalmazásával számítottuk ki. A pórusméret eloszlását BJH módszerrel számoltuk ki a deszorpciós görbéből.

MFH-AG részecskék sterilizálása és kondicionálása

A MFH-AG mikrorészecskéket az *in vitro* kísérletek előtt 48 órán keresztül sterilizáltuk UV-sugárzás segítségével. A kitapadási, adhézions kísérletekhez 1-2 mm vastag részecskéket használtunk, míg a migrációs vizsgálatokhoz rostált, kerek ($d < 125 \mu\text{m}$) részecskéket használtunk fel. A sterilizálást követően az aerogél részecskéket 3 órán át sejtnemes médiumba helyeztük, majd a részecskéket átpestáztuk a sejteket tartalmazó sejtenyésző edénybe.

Time-lapse videómikroszkópia és digitális képanalízis

A biokompatibilitási vizsgálatokhoz a hosszú távú megfigyelésre alkalmas time-lapse videómikroszkópot használtuk: a sejtenyésző inkubátorba helyezett 4 db közeli infravörös (960 nm) megvilágítással rendelkező videómikroszkóppal a sejtenyészőket hosszú távon figyelhetjük meg. A videómikroszkópos rendszerrel készített képszekvenciákon képelemző módszerekkel kvalitatív és kvantitatív információkat nyertünk ki, mely nagy időbeli felbontású adatokat biztosított a toxikus folyamatok dinamikai vizsgálatához.

MFH-AG részecskeméret eloszlás vizsgálat

A SCC VII sejtek és a MFH-AG mikrorészecskék méreteloszlását hemocitóméter és digitális képanalízis segítségével határoztuk meg. A képeket 1,3 megapixeles USB mikroszkóp kamerával (MicroQ-W Pro) készítettük, és az ImageJ programot használtuk a sejtek és a mikrorészecskék méreteloszlásának a meg-

határozásához. Az eredmények kiértékeléséhez Excel programot (Microsoft Office) használtunk. Ezen kívül a MFH-AG mikrorészecskék méreteit lézerdiffrakciós méreteloszlás (Mastersizer 2000, MALVERN Instruments) meghatározásával is megmértük. A MFH-AG részecskék méretében bekövetkező változások követéséhez 2 órán keresztül, 10 percenként végeztük a méréseket.

A MFH-AG részecskéből történő MTX felszabadulásának vizsgálata

A funkcionizált hibrid aerogél mikrorészecskéből történő MTX felszabadulásának vizsgálatát először sejtnemes pufferekben és sejtenyésző médiumokban vizsgáltuk. A MFH-AG részecskéket 72 órán át különböző vizes közegben áztattuk, a részecskék koncentrációja mindig 1 mg/ml volt. A mérésekhez először 3féle pufferoldatot használtunk: 0,01 mólos HCl oldatot, acetát puffert (pH 5.0) és PBS-t (pH 7.4). Ezek mellett a kioldódást DMEM-HAM'S F12 tápfolyadékban is vizsgáltuk, mely 2 mM L-glutaminnal, 23 mM NaHCO₃-mal, 100 U/ml penicillinnel, 100 U/ml streptomocinnel, 1% nem esszenciális aminosav keverékkel, valamint 10% magzati borjú szérummal (FBS) volt kiegészítve.

A SCC VII tumor sejtek és a MFH-AG részecskék együtt inkubálása során 5 vizsgálati csoportot használtunk: 1) a sejtenyészetek felülúszóinak szabad MTX tartalmát a tenyészetek MFH-AG részecskékkel történő inkubálása után mértük meg. 2) A SCC VII sejtek felülúszóját is felhasználtuk a MFH-AG részecskéből történő MTX felszabadulás tesztelésére. Kiegészítésként 1 %-os zselatinnal bevont sejtenyésző edényen tenyésztettük a SCC VII sejteket 72 órán keresztül, majd a sejteket ezt követően összegyűjtöttük és szonikáltuk őket. 3) Az intakt sejtenyészet felülúszóját, illetve 4) a szonikálás után kapott lizátumot külön-külön inkubáltuk a MFH-AG részecskékkel a MTX felszabadulás tesztelésére. 5)

A mikrorészecskéket 24 órán keresztül cathepsin-B (PBS-ben, 1 U) enzimmel inkubáltuk a MFH-AG enzimatikus emésztésének teszteléséhez. A felszabadult MTX mennyiségét minden kísérletben UV-Vis spektrofotometriával mértük meg az egyes minták standard addíciós módszerével.

Sejtek életképességének meghatározása MFH-AG mikrorészecskékkel történő kezelés után

A különböző tumoros (SCC VII, HL-60) és nem tumoros sejtek (HaCaT) életképesség vizsgálatát 96-lyukú lemezekon végeztük el. A kísérletek során az inkubációs idők (24, 48 és 72 óra) letelte után a sejteket 2 alkalommal PBS-sel mostuk (100 μ l), majd hozzáadtunk 100 μ l MTT reagenst (MTT koncentráció: 0,5 mg/ml), ezután a lemezeket 3 órára visszahelyeztük a sejtenyésző inkubátorba. Ezt követően az MTT oldatot eltávolítottuk, a létrejött formazán kristályokat 200 μ l DMSO-ban (dimetil-szulfoxid) oldottuk fel, majd fél órás inkubálás után a lemezeket 570 nm-en fotometráltuk. A kezelt sejtek életképességét a kontroll sejtek életképességéhez viszonyítva százalékos (%) értékben fejeztük ki.

Statisztika

A bemutatott eredmények legalább három, különböző napon elvégzett, egymástól független kísérletek adatait mutatják be. Az eredményeket átlagérték \pm szórás (standard deviáció) formában adtuk meg. A statisztikai analízist t-próbával, vagy többszörös összehasonlítás esetén ANOVA módszerrel végeztük el. A statisztikai analízist GraphPadPrism 6 Windows szoftverrel (Graphpad szoftver, San Diego California, USA) végeztük. A * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ eredményeket tekintettük szignifikáns módon eltérőnek.

4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

A peritoneum-paratimikális nyirokcsomó komplex vizsgálata metasztázis egér modellben *in vivo*

4.1. A tus szemcsék intraperitoneális (i.p.) oltása után a kolloid részecskék megjelentek a tímuszban, és a paratimikális nyirokcsomókban

Munkánk első részében C3H egereknek i.p. beadott kolloid tus szemcsék megjelenésének vizsgálatát végeztük el a tímuszban és paratimikális nyirokcsomókban. Az oltásokat 48 órát követően az állatok boncolása során látható volt a tímusz 2 oldalán a paratimikális nyirokcsomókban a tus szemcsék akkumulálódása. A részecskék a tímusz 2 felső részén található, egymással szimmetrikusan elhelyezkedő nagyobb, illetve az ezek alatt található 2 kisebb paratimikális nyirokcsomókban dúsultak fel. Szövetteni metszeteken hematoxylin-eozin festéssel szintén tapasztalható volt a tus szemcsék jelenléte a tímusz cortex régiójában.

4.2. Az egér eredetű SCC VII karcinóma sejtek a C3H egerek hasüregébe oltva áttétet adtak a paratimikális nyirokcsomókba

A C3H egereket i.p. oltottuk SCC VII sejtuszpenzióval ($1,5 \times 10^5$ sejt szám), majd 30 nap elteltével a kialakuló primer tumort izoláltuk a hashártyáról, a hasüregi szerveken kialakult tumorokat, valamint az áttétet tartalmazó tímuszt eltávolítottuk az egerekből. A boncolás során a tímusznak a megnagyobbodását, valamint gyulladt, vöröses színű elváltozását tapasztaltuk. Hematoxylin-eozin festéssel mind morfológiailag, mind színben jól elkülöníthetőek voltak az egészséges nyirokszövet bazofil festődésű sejtjeitől a daganatos szövet eozinofil festődésű sejtjei. A tumoros szövetre magas sejtdenzitás és osztódó

sejtmagok nagy száma volt jellemező. A tumor sejtek jelenlétét a nyirok szövetben immunhisztokémiai jelöléssel (citokeratin 14) is bizonyítottuk, mely során a tumoros sejtek sötétbarnára festődtek.

Kromatin kondenzálódási intermedierek vizsgálata metotrexáttal (MTX) történő kezelést követően

4.3. Igazoltuk a MTX hatására kialakult genotoxicitást a SCC VII sejtek magjaiban reverzibilis permeabilizálást követően

A reverzibilisen permeabilizált SCC VII sejteken 1 μM -os MTX kezelést követően a SCC VII sejtek magjában 4 főbb kromatin elváltozás volt megfigyelhető: a) mikronukleusz szerű formák; b) a fibrilláris kromatin kijutása a sejtmag egy- vagy több pontján, mely a membrán károsodására utal, itt nem egyetlen mikronukleusz képződéséről van szó; c) egy vagy több kis lyuk megjelenése a magmembránban a MTX által okozott membrán károsodást mutatja; d) kiterjedt membrán károsodás nagyméretű lyukakkal a membránon. MTX kezelést követően a kromatin kondenzálódás nem érte el a metafázist és a szalagformák kialakulása után gátlódott, valószínűleg az elégtelen szupertekercselődés miatt.

4.4. Mikronukleuszok kialakulását Giemsa-festéssel vizsgáltuk

Az exponenciálisan növekvő SCC VII sejteket 9 óráig kezeltük különböző koncentrációjú MTX-al (10 és 100 μM), ezt követően izoláltuk a sejtmagokat és megfestettük őket. A kontroll sejtmagokhoz képest jól látható volt a 10 μM -os MTX-al kezelt sejtek sejtek apoptotikus sejtmagjai, illetve 100 μM -os MTX kezelést követő sejtmagok nagyméretű mikronukleuszokkal.

4.5. A MTX által indukált mikronukleusz képződést nem permeabilizált sejtekben is bizonyítottuk

Az SCC VII sejtmagokban permeabilizálás nélkül az interfázisos kromoszómák nem voltak láthatóak, azonban MTX kezelés 0,1 és 100 μM közötti koncentrációk esetén mikronukleuszokat generált. Alacsony (0,1-1 μM) MTX koncentrációk esetén kis mikronukleuszok képződtek, az apoptotikus koncentrációk (1-10 μM) esetén a makronukleuszok mérete csökkent, a nekrotikus koncentráció (100 μM) pedig megnövelte a makronukleuszok méretét és a sejtmagok töredezését okozta. A MTX koncentrációk növelésével dózis-hatás összefüggést tapasztaltunk, a mikronukleuszok száma növekedett. Az eredmények alapján elmondható, hogy a mikronukleuszok kialakulásának nem csak a kromatin foldingban van szerepe, hanem a genotoxicitás indikátora is.

A vizsgálatokban alkalmazott hibrid szilika-zselatin aerogélek karakterizálása

4.6. Pásztázó elektronmikroszkópos és N_2 adszorpciós-deszorpciós porozimetriás vizsgálatok

A metotrexáttal funkcionizált hibrid szilika-zselatin aerogél mikrorészecskékről (MFH-AG) készített elektronmikroszkópos képeket 20.000-szeres nagyítással készítettük el. A felvételeken látható volt a részecskék egységes pórus mérete, továbbá nem volt megfigyelhető szignifikáns szerkezetbeli eltérés az azonos módon szintetizált szilika-zselatin hibrid aerogélekhez képest. A szilika-zselatin aerogél alapváza gömb alakú blokkokból állt, melyeknek átlagos átmérője kb. 100 nm volt. A porozimetriás mérések alapján megállapítható, hogy a MTX beépülése a hibrid aerogélekbe nem okozott strukturális változásokat.

4.7. A MFH-AG mikrorészecskék és a SCC VII sejtek méreteloszlása

A SCC VII sejtek és a MFH-AG mikrorészecskék méreteinek meghatározásakor azt tapasztaltuk, hogy az aerogél monolitból nyert 2-3 mm-es darabokat vizes közegbe helyezve közel 2 óra alatt a részecskék közel sejt méretűre esnek szét. A részecskéket a szöveti homogenizátorral történt kezelés és szonikálást követően a részecskék ($12,13 \pm 1,5 \mu\text{m}$) közel a SCC VII sejtekhez hasonló méretűre estek szét ($14,5 \pm 1,6 \mu\text{m}$).

A H-AG és MFH-AG mikrorészecskék és sejttenyészetek vizsgálata

4.8. Bizonyítottuk, hogy a hibrid szilika-zselatin aerogél mikrorészecskék (H-AG) biokompatibilisek sejttenyészetekkel *in vitro*

Az aerogél mikrorészecskék biokompatibilitási vizsgálatát a sejttenyészetek hosszútávú megfigyelésére alkalmas time-lapse videómikroszkópiával végeztük el. Az adhézión kísérletek során a SCC VII sejteknek a hibrid (H-AG) aerogél felszínén történő kitapadási ideje közel kétszerese volt a kontroll sejtek kitapadási idejének. Sejtmigrációs kísérletekben a SCC VII sejtek H-AG mikrorészecskék jelenlétében hosszabb utat tettek meg és gyorsabb sebességgel mozogtak, mint a kontroll sejtek, illetve a sejtek az aerogél részecske irányába migráltak. A sejtek irányított mozgása a H-AG részecskékben lévő zselatin tartalom kemoattraktáns tulajdonságának volt tulajdonítható. Az adhézión és migrációs kísérletekben nem volt megfigyelhető apoptózis, illetve nekrozis, így az eredmények alapján igazoltuk a H-AG részecskék biokompatibilitását.

4.9. A MFH-AG mikrorészecskékből sejtmertes pufferben, illetve médiumban nem volt tapasztalható MTX felszabadulás, SCC VII sejtek jelenlétében igen

A metotrexáttal funkcionizált H-AG részecskékből történő hatóanyag felszabadulást először különböző pH-jú pufferekben (0,01 M-os HCl oldat, a pH 5 acetát puffer, illetve a pH 7,4 PBS), illetve a sejttenyésztő médiumban mértük meg. Mind a pufferekben, mind a sejttenyésztő médiumban 72 órás inkubációt követően a felszabadult MTX mennyisége kimutatási határ alatt volt. A MFH-AG részecskéket sejtekkel, illetve a sejtek felülúszójával együtt inkubálva 8,6%-os és 12%-os MTX felszabadulást mértünk. A MFH-AG részecskéknél az 1%-os zselatin bevonaton felnevesztett sejtek felülúszójával, valamint a sejtek szonikálása után kapott sejtlizátummal történő inkubálás eredményeként 8,7%-os, illetve 11,6%-os MTX felszabadulást tapasztaltunk. A MFH-AG részecskékből Cathepsin-B enzim hatására 4,6%-os MTX felszabadulást mértünk. Az eredmények alapján kijelenthető, hogy a sejtek jelenléte és enzimaktivitása szükséges volt a MTX aerogél részecskékből történő felszabadításához. A tumor sejtek által *in situ* szintetizált kollagenáz enzim volt a felelős a hatóanyag felszabadulásnak.

4.10. A MFH-AG mikrorészecskék különböző citotoxicitást mutattak az eltérő kollagenáz aktivitású sejtvonalak esetén

A MTX felszabadulási kísérletek eredményei alapján a MFH-AG részecskéket tumoros és nem tumoros, eltérő kollagenáz aktivitással rendelkező sejttenyésztetekkel inkubáltuk együtt. A 0,2 mg/ml-es MTX és a 2 mg/ml-es MFH-AG koncentrációk tömegkvivalens hatóanyagot tartalmaztak a vizsgálatok során. 24 órás inkubáció után mindhárom sejttípus esetén növekedés gátlást tapasztaltunk. Csak a HL-60 sejtek esetén volt tapasztalható szignifikáns különbség a 0,2

mg/ml-es MTX és 2 mg/ml-es koncentrációk között. 48 órás kezelés hatására a HaCaT és HL-60 sejtek esetén a 0,2 mg/ml-es MTX és 2 mg/ml-es MFH-AG koncentrációk esetén szignifikáns citotoxicitás volt látható. A HL-60 sejtek toxicitása dózis függő módon jelent meg. A 72 órás kezelés végére a HL-60 sejtek mortalitása az összes koncentrációnál magasabb volt, mint 80%. A SCC VII és HaCaT sejtvonalaknál közel 30%-os viabilitás csökkenés volt látható a legmagasabb MFH-AG koncentrációnál. 72 óra elteltével egyik sejtvonala esetén sem volt különbség a 0,2 mg/ml MTX és 2 mg/ml MFH-AG koncentrációk között.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk első részében egér állatmodellben vizsgáltuk a hasüregből, nyirokuta-
kon keresztül történő metasztázis kialakulását a felső *mediastinalis*
nyirokcsomókban. Kimutattuk, hogy az intraperitoneálisan oltott tus szem-
csékhez hasonlóan az egér daganatos sejtek is a diafragmán keresztül jutottak át,
és megjelentek a paratimikális nyirokcsomókban. Hematoxylin-eozin és immu-
nisztokémiai festési módszerekkel bizonyítottuk, hogy a paratimikális
nyirokcsomók a hasüregi daganatok áttétes sejtjeit tartalmazzák, a hasüregi
metasztázisok őrszem nyirokcsomói. A leírt egér metasztázis modell alkalmas le-
het a nyirokmetasztázisok terápiájára potenciálisan alkalmas különböző anti-
tumor ágensek és/vagy gyógyszerhordozó anyagok tesztelésére.

A kutatás második részében metotrexát (MTX), mint modell citosztatikum
hatását vizsgáltuk az egérmodellben alkalmazott SCC VII daganatos sejtek kroma-
tin kondenzálódási folyamataira. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy ala-
acsony koncentrációban (0,1-1 μM) kis méretű mikronukleuszok képződtek, ma-
gasabb koncentrációk esetén pedig apoptotikus (1-10 μM) és nekrotikus (100
 μM) elváltozásokat tapasztaltunk. Ki kell azonban emelni, hogy a mikronukleusz
képződés, amely a citotoxicitás indikátora, a kromatin kondenzálódás normál in-
termedierjei közé tartozik, oka pedig a nukleáris membrán nyílásain átjutó kro-
matin struktúrák lehetnek.

Vizsgálataink harmadik részének célja az volt, hogy az újonnan szintetizált H-AG
mikrorészecskéket, mint gyógyszerleadó anyagokat vizsgáljuk. A MTX-el nem
funkcionalizált hibrid aerogél részecskék sejtekkel való biokompatibilitásának
vizsgálatához time-lapse videómikroszkópos rendszert használtuk. A biokompa-
tibilitási eredmények alapján elmondható volt, hogy a H-AG mikrorészecskék

serkentették a sejtek osztódását, a tumor sejtek kitapadtak a részecskék felszínére és migrációs vizsgálatokban a daganatos sejtek a részecskék felé mozogtak. Ezek alapján célszerűnek tűnt egy olyan aerogél alapú rendszer létrehozása, amely tumorellenes hatóanyagot tartalmaz. Az aerogél részecskéket MTX-al funkcionizáltuk (MFH-AG), és különböző kollagenáz aktivitású sejtvonalakon teszteltük a részecskék citotoxikus hatását. A közel sejtméretű MFH-AG részecskék (2 mg/ml-es koncentráció esetén) a szabad, vizes közegben lévő 0,2 mg/ml-es koncentrációjú MTX-al ekvivalens hatást mutatott, a gyógyszer felszabadulás feltétele pedig a sejtek eltérő kollagenáz enzim aktivitása volt.



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikacio@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/147/2019.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Király Gábor
Neptun kód: E7QICV
Doktori Iskola: Fogorvostudományi Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Szemán-Nagy, G., **Király, G.**, Veres, P., Lázár, I., Fábán, I., Bánfalvi, G., Juhász, I., Kalmár, J.:
Controlled release of methotrexate from functionalized silica-gelatin aerogel microparticles applied against tumor cell growth.
Int. J. Pharm. 558, 396-403, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.01.024>
IF: 3.862 (2017)
2. **Király, G.**, Hargitai, Z., Kovács, I., Szemán-Nagy, G., Juhász, I., Bánfalvi, G.: Metastatic Spread from Abdominal Tumor Cells to Parathymic Lymph Nodes.
Pathol. Oncol. Res. 25 (2), 625-633, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-018-0492-7>
IF: 1.935 (2017)
3. Veres, P., **Király, G.**, Szemán-Nagy, G., Lázár, I., Fábán, I., Kalmár, J.: Biocompatible silica-gelatin hybrid aerogels covalently labeled with fluorescein.
J. Non-Cryst. Solids. 473, 17-25, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2017.07.016>
IF: 2.488
4. **Király, G.**, Simonyi, A. S., Turáni, M., Juhász, I., Szemán-Nagy, G., Bánfalvi, G.: Micronucleus formation during chromatin condensation and under apoptotic conditions.
Apoptosis. 22 (2), 207-219, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-016-1316-4>
IF: 3.967





**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikacio@lib.unideb.hu

További közlemények

5. Pócsi, I., **Király, G.**, Bánfalvi, G.: Antineoplastic potential of mycotoxins.
Acta Microbiol. Immunol. Hung. 65 (3), 267-307, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/030.65.2018.015>
IF: 1.107 (2017)
6. Nagy, E., Erdei, I., Farkas, M., Péter, Z., Várvölgyi, T., **Király, G.**, Juhász, I.: A sejterápia lehetőségei az égés kezelésében: debreceni tapasztalatok.
Bőrgyógyász. Venerol. Szle. 93 (3), 114-118, 2017.
7. Turáni, M., Bánfalvi, G., Péter, Á., Kukoricza, K., **Király, G.**, Tólas, L., Táncoz, B., Dezső, B., Nagy, G., Kemény-Beke, Á.: Antibiotics delay in vitro human stem cell regrowth.
Toxicol. Vitro. 29 (2), 370-379, 2015.
IF: 3.338
8. Szemán-Nagy, G., Benkő, I., **Király, G.**, Vörös, O., Táncoz, B., Sztrik, A., Takács, T., Pócsi, I., Prokisch, J., Bánfalvi, G.: Cellular and nephrotoxicity of selenium species.
J. Trace Elem. Med. Biol. 30, 160-170, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2014.12.011>
IF: 2.55
9. Bányai, E., Balogh, E., Fagyas, M., Arosio, P., Hendrik, Z., **Király, G.**, Szemán-Nagy, G., Táncoz, B., Pócsi, I., Balla, G., Balla, J., Bánfalvi, G., Jeney, V.: Novel functional changes during podocyte differentiation: increase of oxidative resistance and H-ferritin expression.
Oxid. Med. Cell. Longev. 2014, 1-10, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/976394>
IF: 3.516
10. Scharfenberger, L., Hennerici, T., **Király, G.**, Kitzmüller, S., Vernooij, M., Zielinski, J. G.: Transgenic mouse technology in skin biology: generation of complete or tissue-specific knockout mice.
J. Invest. Dermatol. 134 (1), 1-5, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2013.457>
IF: 7.216
11. **Király, G.**, Szemán-Nagy, G., Turáni, M., Bánfalvi, G.: Tumor Cell Fusion and Multipolar Trivision.
J. Cancer Res. Therap. Oncol. 2 (102), 1-5, 2014.





**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400

Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

12. Szemán-Nagy, G., **Király, G.**, Turáni, M., Bánfalvi, G.: Cell Trivision of Hyperploid Cells.

DNA Cell Biol. 32 (12), 676-684, 2013.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/dna.2013.2147>

IF: 1.991

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 31,97

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
12,252**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2019.05.29.



AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ KONFERENCIA PREZENTÁCIÓK ÉS POSZTEREK

Király G., Szemán-Nagy G, Veres P, Kalmár J, Bánfalvi G, Juhász I. **The application of functionalised aerogel particles against a lymph spreading tumor cell line.** MEDPécs 2018, Medical Conference for PhD students and Experts of Clinical Sciences, 27th of October 2018

Király G., Kalmár J, Veres P, Fehér A, Gubó P, Szemán-Nagy G, Juhász I. **Anti-tumor activity of methotrexate functionalized silica-gelatin aerogel microparticles. Fiatal Biotechnológusok III. Országos Konferenciája 2018**

EGYÉB KONFERENCIA PREZENTÁCIÓ ÉS POSZTER

Király G., Turáni M, Ungvári O, Szemán-Nagy G, Kemény-Beke Á, Juhász I. **Limb cell monolayer regeneration: Videomicroscopy and Digital Image Analysis in a Corneal Surface Regeneration Model.** Wound Care from Innovations to Clinical Trials (WCICT 2017), 20-21 June 2017. Manchester UK. Poster presentation

Tóth M, Király G., Szemán-Nagy G. **Wavelength-dependent phototoxicity on cultured mammalian cells.** 12th Multinational Congress on Microscopy. Poster presentation