

Doktori (PhD) értekezés tézisei

β -ciklodextrinek celluláris hatásainak vizsgálata

Dr. Rusznyák Ágnes

Témavezető: Dr. Fenyvesi Ferenc



DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2022

β -ciklodextrinek celluláris hatásainak vizsgálata

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta: Dr. Rusznyák Ágnes okleveles gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok doktori iskolája
(Farmakológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Fenyvesi Ferenc

Az értekezés bírálói: Kormosné Dr. Goda Katalin Klára, PhD
Dr. Sohajda Tamás, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, MTA doktora
tagok: Kormosné Dr. Goda Katalin Klára, PhD
Dr. Sohajda Tamás, PhD
ifj. Dr. Regdon Géza, PhD
Dr. Balogh György Tibor, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem In Vitro Diagnosztikai Tömb előadóterme

2022. július 4. 13:00 óra

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	3
2. Célkitűzés	7
3. Anyagok és módszerek.....	8
4. Eredmények	10
4.1. Ciklodextrinek celluláris hatásai.....	10
4.1.1 Citotoxicitás	10
4.1.2 Celluláris internalizáció	10
4.1.3 NF-kappaB útvonalra gyakorolt hatás.	11
4.1.4 Autofágiára gyakorolt hatás	11
4.1.5 Lizoszómák a sejtekben	11
4.2. Ciklodextrin polimerek siRNS hordozóképessége	12
4.2.1 Az előállított polyplexek tulajdonságai.....	12
4.2.2 Polimerek sejtproliferációra gyakorolt hatása	13
4.2.3 Polyplexek celluláris internalizációja	13
5. Megbeszélés	14
5.1. Celluláris hatás vizsgálatok eredményeinek megbeszélése	14
5.2. siRNS hordozó képesség vizsgálat eredményeinek megbeszélése	16
6. Összefoglalás.....	18
7. A jelölt saját közleményeinek a Kenézy Élettudományi Könyvtár által ellenőrzött jegyzéke.....	19
8. Köszönetnyilvánítás.....	22

1.Bevezetés

A ciklodextrinek széles körben alkalmazott segédanyagok. Különböző iparágak, mint például a gyógyszer-, élelmiszer-, kozmetikai-, diagnosztikum-, robbanószer- és a műanyagipar is különféle módon használja fel ezen segédanyagokat. A ciklodextrineket főként a gyógyszer-és élelmiszeriparban alkalmazzák oldékonyság növelésre, a biológiai hasznosíthatóság növelésére, stabilizálásra, valamint a kellemetlen ízek elfedésére és az irritáló hatások csökkentésére.

Több, jelenleg is forgalomban lévő készítményben találkozhatunk ciklodextrinnekkel. Ilyen például az Abilify injekció, amely szulfobutilált-béta-ciklodextrint (SBECD), vagy a Voltaren Ophta CD szemcsepp, amely hidroxipropil-gamma-ciklodextrint tartalmaz. Mindemelett a ciklodextrineket antidótumként is alkalmazzák: a Bridion nevű készítmény, amely Suggamadexet tartalmaz a rokurónium vagy a vekurónium izomrelaxáns hatását képes felfüggeszteni. Az élelmiszeripar is egyre szélesebb körben használja fel ezen segédanyagokat: például Franciaországban és Belgium kihasználva a ciklodextrinek koleszterin kivonó képességét, β -ciklodextrin felhasználásával csökkentett koleszterintartalmú vaját állítanak elő.

A ciklodextrinek, mint oldékonyságot és felszívódást fokozó segédanyagok, már régóta megtalálhatóak a gyógyszerkönyvben. A hidroxipropil-béta-ciklodextrint 2010-ben a Food and Drug Administration (FDA), majd 2011-ben a European Medicines Agency (EMA) felvette a C-típusú Niemann Pick szindróma kezelésére szánt lehetséges gyógyszerek közé. Mindemellett kimutatták, hogy a HBPCD neuroprotektív hatású lehet Alzheimer-kórban.

A ciklodextrinek kutatása 1891-ben kezdődött Franciaországban, majd az 1950-es évek elejétől kezdtek el intenzívebben foglalkozni, ezen molekulák előállításával, izolálásával és karakterizálásával. A ciklodextrineket részlegesen előhidrolizált keményítőből állíthatjuk elő. Kémiai szerkezetük alapján három nagy csoportra oszthatóak: az α -ciklodextrinek 6, a β -cyclodextrin 7, még a γ -cyclodextrin 8 glükopiranoz egységből épülnek fel, α -1,4- glikozidos kötésekkel összekapcsolva. A molekulák belső ürege apoláris, még a külső felszíne poláros, azaz vízben jól oldódó. Ez az egyedi sajátságuk lehetővé teszi, hogy más molekulákat magukba zárjanak, azaz molekuláris kapszulaként viselkedjenek. A ciklodextrin molekulákon számos szabad hidroxilcsoport található- a β - ciklodextrinen 21 darab- melyeket különféle szubsztituensekkel láthatjuk el. Ez a szubsztituálás leggyakrabban hidroxialkilezés (HPBCD), metilezés (RAMEB), acetilezés vagy szulfobutilezés. A szubsztituált ciklodextrineket a szubsztitúciós fokkal jellemezzük (degree of substitution, DS), mivel a szubsztituálás általában random módon történik. A ciklodextrin gyűrűn található szabad hidroxilcsoportok funkcionális módosításával és kovalens kötésekkel lehetőségünk van nagyobb struktúrák kialakítására is. Ciklodextrin polimerről akkor beszélünk, ha egy molekulán belül több ciklodextrin monomer található. A polimerek

megnövelt lehetőséget kínálnak a ciklodextrinek alkalmazhatóságára, hiszen növelik a lehetőségét a hatóanyag és ciklodextrin ürege közötti interakcióra.

A ciklodextrineknek jól ismert biológiai hatásai vannak, melyek nagymértékben meghatározzák alkalmazhatóságukat és biztonságosságukat. Komplexképző tulajdonságaiknak köszönhetően képesek a sejtmembránban is megtalálható, természetes hidrofób molekulákat is komplexálni, mely hatásuk korrelációt mutat a citotoxicitásukkal. Az α -ciklodextrin a foszfolipideket, még a β -ciklodextrin a koleszterint képes kivonni a sejtmembránból. A lipid szolubilizáció mértéke függ a ciklodextrin molekula sajátságaitól, így a gyűrű méretétől, valamint szubsztituáltságától. **Kiss T. és munkatársai** bebizonyították, hogy összefüggés van a β -ciklodextrinek citotoxicitása, hemolitikus aktivitása és a koleszterin szolubilizáló tulajdonságaik között. A sejtmembrán koleszterin tartalmának csökkenése, ezáltal a szerkezetének megváltozása számos következménnyel járhat. A koleszterin kivonása, komplexálása a β -ciklodextrin által csökkentheti a sejtmembránban található efflux transzporterek, így az ABC transzporterek funkcióját, melyek fontos szerepet töltenek be az intesztinális barrierben, azáltal, hogy visszapumpálja a szubsztrátját az intesztinális lumenbe, gátolva ezzel az abszorpcióját.

Ahhoz, hogy a ciklodextrinek fent említett biológiai és neuroprotektív hatásukat kifejtsék, át kell jutniuk a sejtmembránon. Nagy molekulaméretüknek és hidrofil karakterisztikájuknak köszönhetően nem képesek passzív diffúzióval átjutni a sejtmembránon. A biológiai barrieren történő átjutásra, valamint a lipofil hatóanyag penetrációjának fokozására több mechanizmust is leírtak már. Az első ilyen mechanizmus a felszívó hámon kifejtett hatás. Ez a már fentebb említett, a ciklodextrinek koleszterin komplexáló tulajdonságával van kapcsolatban. A második mechanizmus az aktív transzporterek gátlása, a harmadik mechanizmus pedig az általunk is vizsgált endocitotikus folyamat. Ezen mechanizmus a sejtek egyik legfontosabb képessége, hiszen a sejt így is kommunikál a környezetével. Az endocitózis során a felvételre került hatóanyag, kutatásunk esetében a ciklodextrin egy úgynevezett primer endoszómába kerül, melyben elszállítódik a korai endoszómákhoz. Az endoszómális érés során a korai endoszómából késői endoszóma lesz, amely fuzionál a lizoszómával, ahol majd az endoszóma tartalma degradációra kerül. Az endocitózisnak két nagy típusa ismert: az egyik a fagocitózis, mely során elsősorban fagociták (makrofágok, dendritikus sejtek és monociták) képesek felvenni szilárd részecskéket. A másik a pinocitózis, amely a vezikulák mérete, a formulációjuk mechanizmusa, valamint a folyamatban részt vevő fehérjék alapján további csoportokra osztható. Így megkülönböztetünk: macropinocitózist, klatrin-mediált endocitózist, caveola-mediált, valamint klatrin-és caveola-független endocitózist.

A nukleáris faktor kappa B (NF- κ B) transzkripció faktor család fontos szabályozója szervezetünk immunrendszerének fejlődésében, valamint az immunválaszok, gyulladás kialakulásában. Ez a dimer transzkripció faktor központi szerepet játszik a veleszületett és az adaptív immunitás kialakításában, a sejtek differenciálódásában, proliferációjában és túlélésében. Az NF- κ B öt fehérje monomerből áll. Ez az öt fehérje a p65 vagy RelA, a RelB, a cRel, a p50 és a p52

alegység, melyek normál esetben, inaktív formában a citoplazmában találhatóak meg, azonban, ha a sejtmagba transzlokálódnak, ott kötődnek a DNS-hez. A ciklodextrinek NF-kappa B útvonalra gyakorolt hatását eddig még csak makrofágokon vizsgálták. **Motoyoma és munkatársai** azt találták, hogy a dimetil- alfa- ciklodextrin antagonizálja az LPS (lipopoliszacharid) indukálta makrofágok stimulációját.

Az autofágia a citoplazmatikus komponensek lizoszómán belüli lebontását jelenti. Ez egy önmérsztő folyamat, melynek célja a károsodott, aggregálódott fehérjék, a kórosan működő endoplazmatikus retikulum, peroxiszóma vagy mitokondrium eltávolítása a sejtéből. A folyamatnak számos fiziológiai és patofiziológiai folyamatban van kulcsfontosságú szerepe, mint például az energiaháztartás, az öregedés gátlása és a mikroorganizmusok eliminációja a sejtekből. Az autofágiának három fő típusát különböztetjük meg: a makro-, mikro- és chaperon- mediált autofágiát. A makroautofágia során a citoplazmatikus komponensek az autofagoszómán keresztül elszállítódnak a lizoszómába, ahol degradációra kerülnek. A folyamat induktora leggyakrabban valamely esszenciális tápanyag, általában az aminosavak hiánya. A folyamat első lépése egy izolációs membrán vagy más néven fagofór képződése, mely egy kettős rétegű lipidmembrán, amely az endoplazmatikus retikulumból, a Golgi készülékből vagy az endoszómákból származik. A következő lépés a fagofór multimerizációja, melyben fontos szerepe van az Atg5-Atg12 konjugációjának és interakciójának az Atg16-tal. Ezt követően a mikrotubulus asszociált fehérje könnyű lánc (LC3B) szintézise valósul meg. Ezután a target felvételre kerül az autofagoszómába. Ez általában véletlenszerűen történik. A folyamat utolsó lépése az autofagoszóma fúziója a lizoszómával, ahol a target a lizoszómális proteázok által proteolitikus lebontásra kerül. A fúzió következtében kialakult kompartmentet autolizoszómának nevezzük. **Kameyama és munkatársai** leírták, hogy a folát kapcsolt metil-béta-ciklodextrin indukálja a mitokondriumok szelektív eliminációját a mitofágiát. **Sun és munkatársai** azt találták, hogy a hidroxipropil-béta-ciklodextrin 20 mM-os koncentrációban gátolja az AKT/mTOR útvonalat, az autofagoszómák fúzióját a lizoszómával, ezáltal az autofagoszómák felhalmozódását HepG2 sejtekben. A ciklodextrinek befolyásolhatják a sejtmembrán működését, kölcsönhatásba léphetnek különböző fehérjékkel, úgy mint az AMP-aktiválta protein- kinázok, β -amiloid fehérje vagy KV1.3 ioncsatorna. A kölcsönhatás következtében ezen fehérjék károsodása is felmerülhet és ezáltal az autofágia indukálódhat a sejtekben.

Az siRNS vagy más néven rövid interferáló ribonukleinsav, egy általában 20-27 bázispárból álló kettős szálú, nem kódoló DNS molekula, melynek a géncsendesítésben van szerepe. Manapság az siRNS alapú terápiák egyre nagyobb szerepet kapnak a különböző betegségek kezelésében. Számos siRNS- alapú terápia áll fejlesztés alatt az örökletes betegségektől a rákos megbetegedések kezeléséig. Ahhoz, hogy a terápia sikeres legyen egy biztonságos és hatékony szállító rendszerre van szükség, hiszen a molekula transzfektálása, azaz bejuttatása a sejtekbe számos kihívás elé állítja a kutatókat. Az siRNS nagy molekulamérete és polianionos jellege (negatív töltésű) miatt a módosítatlan molekula nem tud könnyen bejutni a sejtekbe, valamint a véráramban instabil és immunogén lehet. Ezen probléma kiküszöbölésére számos

rendszer áll rendelkezésre, illetve fejlesztés alatt. Ezeket a rendszereket úgy kell kialakítani, hogy biztonságot nyújtsanak a proteázok ellen, kibújjanak az immunrendszer elől, bejussanak a célsejtekbe és bejuttassák az siRNS-t a RISC komplexbe. A különböző rendszerek általában receptor mediált endocitózissal kerülnek felvételre a sejtekbe, melyet különböző target ligandok beépítésével érnek el, melyet a sejtek felszínén lévő receptorok ismernek fel. Ezek a rendszerek lehetnek kationos ciklodextrin polimer alapúak, lipid nanopartikulumok vagy siRNS-ligand konjugátumok. Az RNS-mediált interferencia (RNAi) egy egyszerű és gyors géncsendesítési módszer. A folyamat első lépése, hogy a duplaszálú RNS molekulából a Dicer enzim hatására, kisméretű (21-25 bázispár) RNS molekulák lesznek. Ezt követően az siRNS kapcsolódik az Argonaute (Ago) fehérjéhez, így kialakítva az RNS-indukálta csendesítő komplexet (RISC). A RISC komplexben az siRNS vezető szála, azaz a target mRNS-sel komplementer szála épül be, a másik lebontása kerül. A komplex ezután felismeri a target mRNS-t és ahhoz kapcsolódva, annak degradációját okozva, gátolja a transzlációt. A ciklodextrineket már régóta alkalmazzák az siRNS hordozójaként is. Az első ciklodextrin polimer alapú hordozórendszert plazmid DNS szállítására 1999-ben mutatták be. **Gonzalez és munkatársai** leírták, hogy az újonnan szintetizált kationos béta-ciklodextrin polimerrel végzett *in vitro* transzfekciók összehasonlíthatóak a polietilén-iminnel vagy Lipofectaminnal végzett transzfekciókkal. Azóta a ciklodextrin polimer alapú siRNS hordozórendszerek fejlesztése fellendült, a kezelendő betegségek, a támadáspontok köre pedig szélesedett.

2. Célkitűzés

PhD értékezésem céljaul tűztük ki, a különböző ciklodextrin származékok celluláris és intracelluláris hatásainak vizsgálatát Caco-2 intesztinális epitél és HeLa méhnyakrák sejtvonalon. Célunk volt a különböző fluoreszcens festékekkel (fluoreszceinnel és rhodaminnal) jelölt hidroxipropil-béta (HPBCD) és random metilezett béta ciklodextrin (RAMEB) származékok celluláris internalizációjának vizsgálata, az endocitózis mechanizmusának pontosabb felderítése különböző gátlószerek alkalmazásával. Mindemelett célul tűztük ki a ciklodextrinek intracelluláris hatásainak vizsgálatát, mint az NF-kappaB útvonalra és autofágiára gyakorolt hatásuk, valamint a sejtekben található lizoszómák vizsgálatát. A ciklodextrin sejten belüli sorsa eddig kevésbé felderített, ezért fontosnak tartottuk az endocitózist követő történések tanulmányozását és összehasonlítását két különböző sejtvonalon.

Kutatómunkám másik célja ciklodextrin polimer származékok siRNS hordozóképeségének vizsgálata Caco-2 intesztinális epitél sejteken. Az ismert, hogy a ciklodextrinek ednocitózissal felvételre kerülnek a sejtekbe, illetve, hogy nagyméretű molekulákat is képesek komplexálni, ezáltal bejuttatni a sejtekbe, ahol különböző biológiai hatásokat válthatnak ki. Ezért a makromolekulák komplexálásának és endocitózisának vizsgálatára az siRNS-t választottuk, mellyel későbbi vizsgálataink során a GAPDH és Pgp expressziójára gyakorolt hatását szeretnénk vizsgálni. Ehhez különböző molarányú poliplexeket képezünk GAPDH siRNS-sel és vizsgáljuk a poliplex tulajdonságait dinamikus fényszórás fotometriával, valamint celluláris internalizációját konfokális mikroszkópos technikával.

3. Anyagok és módszerek

A Caco-2 és HeLa sejtvonalak a European Collection of Cell Cultures-től (ECACC, UK) származnak, és módosított DMEM sejtenyészítő tápközegeben tenyésztettük. A (2-hidroxipropil)- β -ciklodextrin (HPBCD), a random metil- β -ciklodextrin (RAMEB) és ezek rodamin (Rho) és fluoreszcein (FITC) jelölt analógjai a CycloLab Ltd. (Budapest, Magyarország) termékei voltak.

A különböző koncentrációjú (50 μ M, 500 μ M, 1 mM, 10 mM és 50 mM) hidroxipropil-béta- (HPBCD) és random-metil-béta-ciklodextrin (RAMEB) származékok citotoxicitás 24 óráig, a különböző koncentrációjú (50 nM és 100 nM) ciklodextrin polimerek sejtprolifерációra gyakorolt hatását 2 napig vizgáltuk RTCA módszerrel.

A fluoreszcensen jelölt ciklodextrin származékok celluláris internalizációját fluoreszcens mikroszkóppal vizgáltuk. A kísérletek során a Caco-2 és HeLa sejteket 30 percig, 37 °C-on inkubáltuk az 50 μ M koncentrációjú fluoreszcens ciklodextrin származékok oldatival, majd fixálást és sejtmagfestést követően fluoreszcens mikroszkóppal vizgáltuk a mintáinkat. Az endocitózis pontos mechanizmusát áramlási citometriával vizgáltuk különböző endocitózis gátlószerek felhasználásával. Az alkalmazott gátlószerek: wortmannin 50 nM, genistein 200 μ M, filipin 1 μ g/ml, nocodazole 10 μ M, LY294002 50 μ M és rottlerin 1 μ g/ml. A kísérletek során a sejteket előinkubáltuk a gátlószerekkel 40 percig, 37 °C vagy 4 °C-on, majd további 30 percig inkubáltuk az 50 μ M koncentrációjú fluoreszcens ciklodextrin származékok oldatival. Ezt követően a sejteket mostuk, az elhalt sejteket megfestettük propidium- jodiddal, majd a celluláris fluoreszcencia intenzitást áramlási citométerrel mértük. A Caco-2 sejtek esetében a méréseket Dr. Nagy Béla és Dr. Fejes Zsolt Ph.D. végezte el.

A ciklodextrinek hatását az NF- κ B útvonalra fluoreszcens mikroszkóppal vizgáltuk. A kísérletek során a sejteket 30 percig, 37 °C-on inkubáltuk 50 μ M HPBCD vagy RAMEB, illetve pozitív kontroll esetén 50 ng/ml TNF- α oldatokban. Ezt követően a sejteket fixáltuk, a nem specifikus kötőhelyeket blokkoltuk, majd elsődleges és fluoreszcensen jelölt másodlagos antitesttel jelöltük a p65-ös alegységet, végül pedig megfestettük a sejtmagokat. A mintáinkat fluoreszcens mikroszkóppal vizgáltuk, mely során az NF- κ B p65 alegység sejtmagi transzlokációját monitoroztuk.

A ciklodextrinek autofágiára gyakorolt hatását kvalitatívan és kvantitatívan is vizgáltuk. A kvalitatív vizsgálatok során a sejteket 24 óráig, 37 °C-on inkubáltuk 50 μ M HBPCD vagy RAMEB, illetve pozitív kontroll esetén 100 μ M chloroquine oldatban. Ezt követően a sejteket fixáltuk, permeabilizáltuk, majd az autofagoszómák membránjában lévő LC3B molekulát elsődleges és fluoreszcensen jelölt másodlagos antitestekkel jelöltük (LC3B Antibody Kit for Autophagy, Thermo Fisher Scientific), végül pedig megfestettük a sejtmagokat. A mintákat ezt követően fluoreszcens mikroszkóppal vizgáltuk. A kvantitatív mérések során a sejteket 24 óráig, 37 °C-on inkubáltuk 50 μ M HBPCD vagy RAMEB, illetve pozitív kontroll esetén 100 μ M chloroquine oldatban. Ezt követően az autofagoszómák membránját fluoreszcens festékkel (CYTO-ID ® Autophagy Detection Kit, Enzo Life Sciences festettük meg a kit

előírása alapján, majd a celluláris fluoreszcencia intenzitást microplate reader-rel mértük.

A Caco-2 és HeLa sejtekben jelenlévő lizoszómákat fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk, mely során a sejteket 30 percig, 37 °C-on inkubáltuk az 50 µM koncentrációjú jelöletlen vagy fluoreszcensen jelölt HPBCD vagy RAMEB oldatokban, ezt követően pedig a lizoszómák membránját LysoTracker® (Thermo Fisher Scientific) segítségével festettük meg. A sejtmagfestést követően a mintáinkat kvalitatív vizsgálatok esetén fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk, kvantitatív vizsgálatok esetén pedig a celluláris fluoreszcencia intenzitást áramlási citométerrel mértük.

A formulált polyplexek tulajdonságait dinamikus fényszórás (DLS) és zéta potenciál méréssel ZetaSizer Nano műszer (Malvern) segítségével vizsgáltuk. A kísérletek során 100 µM koncentrációjú oldatokat használtunk. A detektálás 175°-os szögben zajlott, a termosztát 25 °C-ra volt állítva. A különböző oldatok méreteloszlását és polidiszperzitását (PDI) háromszor mértük le. A zéta potenciál mérés High Concentration Zeta Cell- ben történt változó feszültségű árammal.

A polyplexek tulajdonságait gélelektroforézissel is vizsgáltuk, amelyet Dr. Gyöngyösi Alexandra és Dr. Lekli István végeztek el. A kísérletek során 100 és 500 nM koncentrációjú siRNS-t alkalmaztunk, mellyel különböző molarányú polyplexeket formuláltunk QABCDP polimerrel. Az elektroforézist 1 órán keresztül, 80 V-on hajtottuk végre, majd a mintákat ChemiDoc Touch (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) készülékkel detektáltuk.

A polyplexek celluláris internalizációját konfokális mikroszkóppal és áramlási citometriával vizsgáltuk. A konfokális mikroszkópos felvételeket Dr. Vámosi György készítette. A kísérletek során a sejteket 30 percig, 4 vagy 24 óráig inkubáltuk a különböző molarányú, 5 µM fluoreszcensen jelölt siRNS koncentrációjú polyplex oldatokban. Ezt követően a sejteket fixáltuk, a sejtmagokat megfestettük, majd mintáinkat konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk, vagy a celluláris fluoreszcencia intenzitást áramlási citométerrel mértük.

4. Eredmények

4.1. Ciklodextrinek celluláris hatásai

4.1.1 Citotoxicitás

A különböző koncentrációjú hidroxipropil-, és random metilezett béta-ciklodextrin oldatok Caco-2 intesztinális epitél és HeLa méhnyakrák sejtekre gyakorolt citotoxikus hatásait RTCA módszerrel vizsgáltuk. A HPBCD esetében csak az 50 mM-os, még RAMEB esetében már a 10 mM-os koncentráció is toxikus volt mindkét sejtvonalra.

A későbbi kísérleteink során a sejteket 30 percig inkubáltuk a ciklodextrin oldatokkal, ezért így is ábrázoltuk az RTCA által számolt normalizált sejtindeket 30 percnél. Azt találtuk, hogy 30 perces kezelés során, mind Caco-2, mind pedig HeLa sejtvonalon csak az 50 mM-os RAMEB mutatott toxikus hatásokat a kontroll, kezeletlen sejtekhez képest. A későbbi vizsgálataink során, nem toxikus 50 μ M-os koncentrációt és 30 perces inkubációs időt alkalmaztunk.

4.1.2 Celluláris internalizáció

A fluoreszcenciával és rhodaminnal jelölt HBPCD celluláris internalizációját és intracelluláris lokalizációját Caco-2 és HeLa sejtvonalon fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A sejtmembrán mentén és a sejtmag körül is kisebb illetve nagyobb ciklodextrin tartalmú vezikulumokat detektáltunk. A fluoreszcens jelölés nem befolyásolja ezen származékok endocitózisát, mindkét festékkel jelölt molekulatípus bejutott a sejtek citoplazmájába.

Eredményeinket megerősítettük áramlási citometriával. Caco-2 sejtek esetén a méréseket Dr. Nagy Béla és Dr. Fejes Zsolt végezték el. Ehhez néhány mintát előkezeltünk az endocitózis különféle gátlószereivel, majd 50 μ M-os FITC-HPBCD vagy FITC-RAMEB oldatokkal kezeltük 0 °C vagy 37 °C-on. A kísérlet végén az elhalt sejteket megfestettük propidium-jodiddal, majd a celluláris fluoreszcencia intenzitást áramlási citométerrel mértük. A gátlószerekkel előkezelt minták esetén mért fluoreszcencia intenzitást a kezeletlen minták esetén mért fluoreszcencia intenzitáshoz hasonlítottuk. Caco-2 intesztinális epitél sejtek esetén mind a hűtés, mind pedig a rottlerin, amely a macropinocitózis gátlószere szignifikánsan gátolta a ciklodextrin származékok endocitózisát. A többi vizsgált gátlószernak nem volt szignifikáns gátló hatása a származékok celluláris internalizációjára, azonban a klórpromazin-hidroklorid érdekes módon szignifikánsan növelte mind a FITC-HPBCD, mind a FITC-RAMEB felvételét a sejtekbe. HeLa sejtek esetében csak a hűtés gátolta szignifikánsan a ciklodextrinek endocitózisát, még a többi vizsgált endocitózis gátlószernak nem volt szignifikáns gátló hatása sem FITC-HPBCD, sem pedig FITC-RAMEB esetén. Érdekes módon a rottlerin FITC-RAMEB esetén szignifikánsan növelte a celluláris internalizációt.

4.1.3 NF-kappaB útvonalra gyakorolt hatás

Ebben a kísérletben a HPBCD és RAMEB hatásait teszteltük az NF- κ B gyulladásoz útvonalra. Az NF- κ B p65-ös alegységét anti-p65 antitesttel jelöltük, még a sejtmagokat DAPI festékkel. Az útvonal lehetséges aktiválódását a különböző ciklodextrin származékok által fluoreszcens mikroszkópiával tettük láthatóvá. A sejteket előkezeltük 50 μ M-os ciklodextrin oldatokkal, majd elsődleges és másodlagos antitest oldatokkal. Ebben az esetben a kezeltlen kontroll mintákhoz képest zöld jelet csak a citoplazmában detektáltunk. A ciklodextrinek nem aktiválták a p65-ös alegység transzlokációját a citoplazmából a sejtmagba sem Caco-2, sem pedig HeLa sejteken, tehát ezen származékok nem indukálnak gyulladásoz folyamatokat a sejtekben. Pozitív kontroll esetében a sejteket előzetesen 50 ng/ml koncentrációjú TNF- α oldattal inkubáltuk, majd az elsődleges és másodlagos antitest oldatokkal. Ez esetben zöld jelet detektáltunk a sejtmagokban is, ami azt jelenti, hogy a TNF- α indukálja a p65-ös alegység transzlokációját, ezáltal gyulladásoz folyamatokat.

4.1.4 Autofágiára gyakorolt hatás

Vizsgáltuk a HPBCD és RAMEB autofágiára gyakorolt hatását. Elsőként kvalitatívan teszteltük fluoreszcens mikroszkópiával, mely során az autofagoszómák membránjában található LC3B molekulát jelöltük anti-LC3B antitesttel, még a sejtmagokat DAPI festékkel festettük meg. Rho-HPBCD és Rho-RAMEB kezelések után az autofagoszómák jelenléte detektálható volt, hasonlóan a kontroll mintához mind Caco-2, mind pedig HeLa sejteken. Ugyanakkor a pozitív kontrollként alkalmazott chloroquine kezelés esetében intenzívebb autofagoszóma képződést tapasztaltunk mindkét sejtvonal esetén, mint a ciklodextrin kezelések estében. Kísérleteinket azért végeztük rhodaminnal jelölt ciklodextrin származékokkal, hogy meghatározzuk a ciklodextrinek lokalizációját a sejtekben. Néhány intracelluláris vezikulában az LC3B zöld, illetve a rhodaminnal jelölt ciklodextrin piros jelét kolokalizálódva (sárga jel) detektáltuk, ami arra utal, hogy ezen származékok csak kis mennyiségben lokalizálódnak az autofagoszómákban.

Ezt követően eredményeinket kvantitatív mérésekkel igazoltuk. Az autofagoszómák membránját CYTO-ID® Green Detection Reagent-tel, még a sejtmagokat Hoechst 33342 festékkel festettük meg. A fluoreszcencia intenzitást microplate leolvasóval-rel mértük, az eredményeket normalizáltuk a sejtszámra és relatív fluoreszcencia intenzitásként fejeztük ki. A ciklodextrinekkel való kezelés a kontroll mintához képest nem indukálta szignifikánsan az autofagoszómák képződését, még a chloroquinnel kezelt minta esetén mért fluoreszcencia intenzitás szignifikánsan nagyobb volt, mint a kontroll minta esetén ($p < 0,01$).

4.1.5 Lizoszómák a sejtekben

Vizsgáltuk a Rho-HBPCD és Rho-RAMEB Caco-2 sejtekben, valamint a FITC-HPBCD és FITC-RAMEB HeLa sejtekben található lizoszómákra gyakorolt hatását. Először kvalitatív vizsgálatokat végeztünk fluoreszcens mikroszkópiával. A ciklodextrin kezeléseket követően a lizoszómák jelenléte kimutatható volt a sejtekben,

hasonlóan a kontroll mintához. A zöld és a piros jel számos intracelluláris vezikulumban kolokalizálódik (sárga jel), ami azt jelenti, hogy ezen származékok celluláris internalizációját követően szignifikáns mennyiség detektálható a lizoszómákban, mind Caco-2, mind pedig HeLa sejtvonalon.

Eredményeinket áramlási citometriával igazoltuk. Jelöletlen HPBCD és RAMEB kezelést követően a LysoTracker lizoszómális festés intenzitása (piros fluoreszcencia) hasonló a csak LysoTrackerrel kezelt mintához, mind Caco-2, mind pedig HeLa sejteken. A FITC-HPBCD és FITC-RAMEB kezeléseket követően csak a zöld fluoreszcencia intenzitása emelkedett meg, piros fluoreszcencia intenzitást nem érzékeltünk. A fluoreszceinnel jelölt ciklodextrin származékokkal és a LysoTracker festékekkel kezelt minták esetében a lizoszómális festés piros fluoreszcencia intenzitása nem haladta meg szignifikánsan a csak LysoTrackerrel festett mintákat.

4.2 Ciklodextrin polimerek siRNS hordozóképessége

4.2.1 Az előállított polyplexek tulajdonságai

A polimer oldatok, az siRNS oldat, valamint az siRNS: polimer 1:1 és 1:2 molarányú polyplexek tulajdonságait DLS (Dinamic Light Scattering) technológiával vizsgáltuk. Malvern Zetasizer Nano műszerrel mértük a méreteloszlást. A GAPDH siRNS hidrodinamikai átmérője 336,26 nm. A különböző polimerek méreteloszlása változó: a QABCD polimer hidrodinamikai átmérője 85,96 nm, az NHBCD polimeré 19,586 nm, még a PEI mérete 4693,8 nm. Mindhárom polimer esetében mind az 1:1 mind az 1:2 molarányú polyplexek mérete a polimer és az siRNS mérete közé esik. Ebből arra következtetünk, hogy a különböző polimerekkel sikeresen képeztünk polyplexekeket. Az siRNS méretcsökkenésének az lehet az oka, hogy a pozitív töltésű polimer a negatív töltésű siRNS-sel találkozva kondenzálja azt.

A polimerek, az siRNS, valamint a különböző poliplexek zéta- potenciálját Malvern Zetasizer Nano műszerrel High Concentration Zeta Cell-ben változó feszültségű árammal mértük. Az siRNS negatív zéta-potenciállal, még a polimerek minden esetben pozitív határfelületi potenciállal rendelkeznek. A formulált polyplexek esetében pozitív zéta-potenciál értéket mértünk, amely egyik esetben sem volt magasabb a polimer határfelületi potenciáljától. Ebből arra következtetünk, hogy a komplexálásunk sikeres volt.

A poliplexek tulajdonságát gélelektroforézissel is vizsgáltuk. A gélelektroforézist Dr. Gyöngyösi Alexandra és Dr. Lekli István végezték el. A méréseket először a 100 nM koncentrációjú siRNS-sel végeztük el, mivel az siRNS-t általában 50 -100 nM koncentrációban alkalmazzák. Ezen eredményeink alapján elmondható, hogy habár a detektált jel intenzitása alacsony volt, az siRNS önmagában elmozdul a frontvonalról. 100 nM koncentrációjú siRNS esetén a 128:1 polimer:siRNS molarányú polyplex tökéletesen megkötötte azt. 500 nM koncentrációjú siRNS esetén már a 64:1 molarányú poliplex is tökéletesen megkötöti az siRNS-t, az nem mozdul a frontvonalról.

4.2.2 Polimerek sejtproliferációra gyakorolt hatása

A különböző koncentrációjú polimer oldatok Caco-2 sejtek sejtproliferációjára gyakorolt hatását RTCA módszerrel vizsgáltuk. Az alkalmazott polimerek proliferációra gyakorolt hatását 50 és 100 nM-os koncentrációban vizsgáltuk. Ahogy az ábrán is látható a polimerek nem befolyásolják az intesztinális epitel sejtek proliferációját, arra nem gyakorolnak negatív hatást. Ezzel szemben a pozitív kontrollként alkalmazott 1% Triton X-100 gátolta a proliferációt.

A további kísérleteink során maximum 2 napig kezeltük a sejteket, ezért a 2. napon mért normalizált sejtdex értékeket külön is vizsgáltuk, ábrázoltuk. Ezek alapján elmondható, hogy 2 napos kezelést követően az alkalmazott polimerek nem gyakorolnak szignifikáns hatást a Caco-2 sejtek sejtproliferációjára. A Triton X-100 minden időpontban szignifikánsan gátolta a sejtproliferációt.

4.2.3 Polyplexek celluláris internalizációja

A különböző polyplexek celluláris internalizációját konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A konfokális mikroszkópos felvételeket Dr. Vámosi György készítette. Ahogy az ábrán is megfigyelhető, a csak siRNS-sel kezelt minták esetén nem detektáltunk piros jelet a citoplazmában, tehát nem kerül felvételre a fluorofórral jelölt siRNS a sejtekbe. Ugyanez mondható el az NH polimerrel formulált polyplexek esetén is. A Q polimerrel formulált polyplexek esetén piros és zöld jelet is detektáltunk a citoplazmában. Ez alapján elmondható, hogy mind a FITC-konjugált Q polimer, mind az siRNS felvételre kerül a sejtekbe. Sárga jellel kolokalizáció figyelhető meg, amiből arra következtetünk, hogy a ciklodextrin polimer és az siRNS egy helyen találhatóak meg a citoplazmában. PEI-vel formulált polyplexek esetén piros jelet csak a sejthatárok mentén detektáltunk, amiből arra következtetünk, hogy ezen polyplexek vagy kikötődtek a sejtmembránhoz, vagy a sejtmembránban, nagyobb aggregátumokban, membrán lefűződéseken találhatóak meg. 4 és 24 órás inkubációt követően a 2:1 molarányú QABCDP polyplex esetén a zöld és a piros jel kolokalizációban található meg, amiből arra következtetünk, hogy a polyplex hosszú inkubációs időt követően is megtalálható a sejtekben. 32:1 molarányú polyplex esetén sem 4, sem pedig 24 óra után nem detektáltunk piros jelet, amiből arra következtetünk, hogy ez a polyplex nem kerül felvételre a sejtekbe.

5. Megbeszélés

5.1 Celluláris hatás vizsgálatok eredményeinek megbeszélése

A ciklodextrinek manapság egyre szélesebb körben alkalmazott segédanyagok számos iparágban, valamint egyre több forgalomba kerülő gyógyszerben is megtalálhatóak. Mindemellett a hidroxipropil-beta-ciklodextrin önállóan alkalmazott gyógyszer a C típusú Niemann-Pick szindróma kezelésében. A széleskörű felhasználás, a biztonságos alkalmazhatóság érdekében fontos ismerni ezen segédanyagok celluláris, valamint a főbb intracelluláris útvonalakra gyakorolt hatását. Kutatómunkánk első részében célul tűztük ki a két leggyakrabban alkalmazott ciklodextrin származék, a hidroxipropil-beta-, (HPBCD), valamint a random metilezett-beta-ciklodextrin (RAMEB) celluláris internalizációjának és intracelluláris hatásainak vizsgálatát Caco-2 és HeLa sejtvonalon.

Elsőként a fent említett származékok citotoxicitását vizsgáltuk, rövid, 30 perces inkubálást követően. Kutatócsoportunk korábban már vizsgálta ezen származékok citotoxicitását Caco-2 sejtvonalon MTT módszerrel, mely alapján elmondható, hogy 30 perces inkubációt követően a RAMEB IC_{50} értéke $30,0 \pm 2.78$ mM, még a HPBCD IC_{50} értéke >200 mM. Kapott eredményeink alapján elmondható (összhangban korábbi eredményeinkkel), hogy RTCA módszerrel vizsgálva mind Caco-2 intesztinális epitél, mind pedig HeLa méhnyakrák epitél sejtek esetében a RAMEB már 10 mM, a HPBCD pedig 50 mM koncentrációban toxikus volt a sejtek számára. A két módszer esetén kapott eltérő értékek a módszerek különbözőségéből adódnak. Az RTCA módszer a sejtek morfológiai változásait és az elektródokkal való membránkölsönhatást érzékeli, ami egy korábbi és kisebb koncentrációra is érzékeny esemény az MTT által mért mitokondriális károsodásnál. További kísérleteink során 50 μ M nem toxikus koncentrációt alkalmaztunk.

Kutatócsoportunk korábban már kimutatta, hogy a fluoreszcenccel jelölt RAMEB fluid fázisú endocitózissal felvételre kerül Caco-2 sejtekben, azonban a különböző fluoreszcens jelöléseket ugyanazon ciklodextrin származékok esetén még nem hasonlították össze. Fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálva kimutattuk, hogy a fluoreszcenccel és rhodaminnal jelölt HPBCD, valamint RAMEB felvételre kerül mind Caco-2, mind pedig HeLa sejtvonalon. A vizsgált származékok kisebb vezikulumokban a sejtmembrán mentén, még nagyobb vezikulumokban a sejtmag körül lokalizálódnak. Eredményeink alapján elmondható, hogy a fluoreszcens jelölés nem befolyásolja a ciklodextrin származékok endocitózisának kialakulását, melyre magyarázat lehet a két festékmolekula hasonló szerkezete: mindkettő karboxifenil-xantén származék. Az endocitózis pontos mechanizmusát különböző gátlószerek alkalmazásával áramlási citométerrel vizsgáltuk. Mindkét sejtvonal esetén a vizsgált ciklodextrin származékok- FITC-HPBCD és a FITC-RAMEB- endocitózisa hőmérséklet függő, hiszen a sejtek $+0$ °C-on való inkubálása szignifikánsan gátolta a ciklodextrinek endocitózisát. Az endocitózis mechanizmusában a két sejtvonalon eltérő mechanizmust tapasztaltunk. Eredményeink alapján arra következtetünk, hogy Caco-

2 intesztinális epítél sejteken az endocitózis fő mechanizmusa a macropinocitózis, még HeLa sejtvonalon feltehetően több egyidejű folyamat. A rottlerin szignifikánsan gátolta mindkét származék endocitózisát Caco- 2 sejtvonalon. Érdekes módon tapasztaltuk, hogy a wortmannin és az LY294002, melyek szintén a macropinocitózis gátlószerei nem gyakoroltak hatást a ciklodextrinek celluláris internalizációjára. Ez azzal magyarázható, hogy a fent említett gátlószereknek eltérő a hatásmechanizmusa. A rottlerin egy protein kináz C inhibitor, még a wortmannin és az LY294002 a foszfatidilinozitol-3-kinázt gátolják. A filipin, amely a caveola- mediált endocitózis gátlószere, nem gátolta szignifikánsan a ciklodextrinek endocitózisát. A nocodazole, amely megzavarja a mikrotubulusokat nem befolyásolta a celluláris internalizációt. A klórpromazin-hidroklorid, amely egy antipszichotikum, gátolja a klatrin-függő endocitózist. Ezen gátlószer hatása erősen sejttípus függő. Intesztinális epítél sejteken ezen gátlószer szignifikánsan növelte mindkét ciklodextrin származék endocitózisát; a FITC- RAMEB internalizációját nagyobb mértékben. Ennek az lehet az oka, hogy a klatrin-függő endocitózis gátlása más útvonalakat serkenthet, vagy pedig ez az amfipatikus molekula növeli a sejtmembrán fluiditását, ezáltal növelve az endocitózist. A klórpromazin által növelt membrán fluiditás összhangban van azzal, hogy a ciklodextrinek képesek kivonni a koleszterint a sejtmembránból. A FITC-RAMEB nagyobb mértékű internalizációjára, az lehet a magyarázat, hogy a RAMEB-nek nagyobb koleszterin szolubilizáló kapacitása van, mint a HPBCD-nek, hozzájárulva a membránfluiditás növeléséhez. HeLa sejteken azt találtuk, hogy a klórpromazin nem befolyásolja a ciklodextrin endocitózis mértékét. Eredményeinkkel ellentétben Plazzo és munkatársai fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálva azt találták, hogy a klórpromazin gátolja az endocitózis folyamatát HeLa sejteken, a sejtmembrán közelében tartja a fluoreszcein jelölt metil-béta-ciklodextrin tartalmú vezikulákat. Az eltérő eredményre az lehet a magyarázat, hogy fluoreszcens mikroszkópiával vizsgálva a vezikulák pontos lokalizációját tudták vizsgálni, míg áramlási citométerrel a teljes sejt fluoreszcenciát mérjük. Ezért habár a ciklodextrinek internalizáció után a sejtmembrán közelében maradnak, mi citométerrel azt is mértük, de a vezikulák pontos helyét nem tudtuk meghatározni. HeLa sejtvonalon, érdekes módon a rottlerin szignifikánsan emelte a FITC-RAMEB endocitózisát, a fent említett többi gátlószernek nem volt hatása a ciklodextrin endocitózisára. Kapott eredményeink azt mutatják, hogy a ciklodextrinek celluláris internalizációját tekintve jelentős különbségek vannak a két sejttípus között. Ez a különbség alkalmas lehet sejttípus szelektív celluláris internalizáció által közvetített gyógyszerbejuttatásra, szelektív támadáspontú ciklodextrin alapú gyógyszerfejlesztésekhez. A két származék felvétele közötti különbség az általunk vizsgált két származék biológiai aktivitásával magyarázható: a HPBCD egy hidrophil, még a RAMEB egy lipofil ciklodextrin származék, melynek nagyobb koleszterin szolubilizáló affinitása van.

Az NF-kappa B útvonal egy gyulladásos útvonal a sejtekben, mely során a p65 alegység sejtmagi transzlokációja kulcsfontosságú esemény a gyulladásos reakciókban. Ez a folyamat hozzájárulhat az epiteliális barrierék megnyílásához is a jelátviteli útvonalak szintjén. A nanoméretű gyógyszerhordozók fejlesztésénél és

tesztelésénél mindig felmerül az immunogenitás és a gyulladásos folyamatok indikálásának kérdése. Az NF-kappa B útvonal vizsgálatával célunk volt a ciklodextrinekről meglévő tudásunk ilyen irányú bővítése is. Kutatócsoportunk már korábban kidolgozott egy módszert az NF-kappa B útvonal vizsgálatára. Kísérleteink során a fent említett p65 alegységet jelöltük immunfluoreszcens módszerekkel- a kutatócsoportunk által kidolgozott módszer alapján- és nyomon követtük sejtmagi transzlokációját. Azt találtuk, hogy a hidroxipropil-beta-, valamint a random-metilezett-beta-ciklodextrin 50 μ M- os nem toxikus koncentrációban nem aktiválja ezt a gyulladásos útvonalat sem Caco-2, sem pedig HeLa sejtvonalon, valamint a folyamatos celluláris felvétel sem okozza az útvonal aktiválását.

Az autofágia egy önmérsztő folyamat, melynek fontos szerepe van a diszfunkcionális és felesleges sejtkomponensek lebontásában és újrahazsnosításában. Kameyama és munkatársai azt találták, hogy a folát-kapcsolt metil-beta-ciklodextrin indukálja az autofágia egy speciális fajtáját, a mitofágiát. A mitofágia nem más, mint a kórosan működő mitokondriumok eltávolítása a sejtekből. Ezzel ellentétben mi azt találtuk, hogy habár az autofagoszómák detektálhatóak, megtalálhatóak mind az intesztinális epitél sejtekben, mind pedig a HeLa sejtekben hidroxipropil-beta és random-metilezett-beta-ciklodextrin kezelést követően, azonban ezen származékok nem növelik az autofagoszómák mennyiségét a sejtekben a kontroll mintához képest. Mindemellett fluoreszcens mikroszkópiával vizsgálva azt találtuk, hogy a rhodaminnal jelölt HPBCD és RAMEB kis mennyiségben bejut az autofagoszómákba, melyre a ciklodextrin piros és az autofagoszóma zöld jelének kolokalizációjából következtetünk. Mindezen eredményekből arra következtetünk, hogy a HPBCD és RAMEB 50 μ M-os, nem toxikus koncentrációban nem okozza a sejtkomponensek olyan károsodásait, amely az autofágiához vezetne.

A lizoszómák olyan sejtkompartmentek, amelyekben a kémhatás savas, mely aciditás szükséges a benne lévő enzimek működéséhez. A lizoszómáknak szintén fontos szerepe van a felesleges, kórosan működő sejtkomponensek lebontásában. Az autofágia utolsó lépéseként a képződött autofagoszóma fúzionál a lizoszómával, ahol a bekebelezett komponensek degradálódnak. Érdekesen tapasztaltuk, hogy az általunk vizsgált két ciklodextrin származék- a HPBCD és RAMEB- az autofagoszómákba csak kismértékben, még a lizoszómákba szignifikáns mennyiség felvételre kerül. A Caco-2 sejtekben nagyobb lizoszómális vezikulákat, magasabb ciklodextrin tartalommal detektáltunk, mint a HeLa sejtekben. Ez a különbség a két sejtvonal között, alkalmas lehet lizoszómális célzott terápiák fejlesztéséhez a rák kezelésében.

5.2 siRNS hordozó képesség vizsgálat eredményeinek megbeszélése

Manapság az RNS alapú technológiáknak, így az siRNS alapú készítményeknek is egyre nagyobb szerepe van különböző betegségek kezelésében, illetve a diagnosztikában. Kutatómunkám második részében célul tűztük ki két ciklodextrin polimer, valamint a polietilén- imin siRNS hordozóképességének vizsgálatát. Ennek a

kutatásnak abban van nagy jelentősége, hogy az siRNS- t nehéz bejuttatni a sejtekbe, valamint az intracelluláris szállítása is kihívás elé állítja a kutatókat. Kísérleteink során modellként a GAPDH siRNS-t használtunk, mert ehhez könnyen hozzá lehet jutni, illetve a GAPDH a sejtekben, egy nagymértékben expresszáldó háztartási fehérje, így a hatás vizsgálata is könnyen kivitelezhető.

Elsőként különböző molarányú polyplexeket formuláltunk GAPDH siRNS- sel. 1:1 és 2:1 molarányú komplexeket formuláltunk melyeknek DLS technológiával vizsgáltuk a méreteloszlását és zéta-potenciálját. Kapott eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a polyplex formulálás sikeres volt, hiszen az siRNS mérete csökkent, negatív zéta-potenciálja eltűnt. A formulált polyplexek tulajdonságát gélelektroforézissel vizsgálva koncentráció függést tapasztaltunk. 100 nM koncentrációjú siRNS esetén a 128:1 molarányú, míg 500 nM koncentrációjú siRNS esetén már a 64:1 molarányú QABCDP polyplex is a frontvonalon maradt, azaz a polimer teljes mértékben megkötötte az siRNS-t.

Ezt követően vizsgáltuk az alkalmazott polimerek sejtproliferációra gyakorolt hatását. Eredményeink alapján elmondható, hogy az alkalmazott koncentrációkban 50 és 100 nM sem a polimerek, sem az siRNS, nem gyakorolnak negatív hatását a sejtproliferációra. A további kísérleteink során legfeljebb 2 napig inkubáltuk a sejteket a polyplexekkel, így vizsgáltuk a polimerek sejtproliferációra gyakorolt hatását ezen időpontokban is. Ez alapján elmondható, hogy a polimerek 2 napot követően sem gyakorolnak negatív hatást a Caco- 2 sejtek proliferációjára.

Kutatócsoportunk már korábban vizsgálta, hogy a különböző ciklodextrin származékok felvételre kerülnek-e a sejtekbe. Ahogy fent említettem az siRNS transzfektálása kihívás a kutatók számára. Fluoreszcens mikroszkópiával vizsgáltuk, hogy a formulált polyplexek felvételre kerülnek a Caco-2 sejtekbe. Érdekesen tapasztaltuk, hogy a három vizsgált polimer között szignifikáns eltéréseket találtunk. A QABCD polimerrel formulált polyplexek bejutnak a sejtekbe, a citoplazmában kisebb, nagyobb vezikulumokban lokalizálódnak. Ugyanitt elmondható az is, hogy 30 perces inkubálást követően az siRNS és a polimer egy helyen található meg a citoplazmában. NH polimerrel formulált polyplexek nem kerülnek felvételre a sejtekbe. A két ciklodextrin polimerrel formulált polyplexek közti eltérés adódhat a polimerek tulajdonságaiból. A QABCD egy kvaterner-amino, még az NH egy mono-amino módosított polimer. A polietiléniminnel formulált polyplexek pedig feltételezhetően kikötődnek a sejtmembránhoz, kisebb, nagyobb membránlefűződéseken találhatóak meg. Eredményeinket megerősítettük áramlási citometria, kvantitav mérésekkel is, mely alapján szintén elmondható, hogy csak a QABCD polimerrel formulált polyplexek kerülnek felvételre a sejtekbe.

6. Összefoglalás

A ciklodextrinek széles körben alkalmazott segédanyagok a lipofil hatóanyagok biohasznosíthatóságának növelésében, valamint már önálló gyógyszerként is alkalmazzák a hidroxipropil-beta-ciklodextrint. Azonban az alkalmazott származékok biztonságos alkalmazhatósága érdekében elsőként vizsgáltuk a ciklodextrinek intracelluláris hatásait. Kutatócsoportunk korábban már kimutatta, hogy a származékok endocitózissal felvételre kerülnek a sejtekbe, azonban a különböző fluoreszcens jelöléseket ugyanazon származék esetén nem hasonlították össze. Eredményeink alapján elmondható, hogy a fluoreszcens jelölés nem befolyásolja a HPBCD és RAMEB celluláris internalizációját. Endocitózis után kisebb vezikulumokban a sejtmembrán mentén, nagyobb vezikulumokban pedig a sejtmag körül lokalizálódnak, mindkét sejtvonalon. Caco-2 sejtek esetében az endocitózis fő mechanizmusa a macropinocitózis, még HeLa sejtek esetében feltételezhetően több egyidejű folyamat. Ezen származékok nem okozzák a p65 alegység transzlokációját a sejtmagba, tehát nem indukálják az NF-kappa B gyulladásos útvonalat. A kontroll mintához képest nem indukálják az autofagoszómák képződését, kis mennyiségben megtalálhatóak azokban. A HPBCD és a RAMEB sem indukálja a lizoszómák képződését, azonban felvételre kerülnek a lizoszómákba. Caco-2 sejtekben nagyobb méretű és nagyobb ciklodextrin tartalmú lizoszómák figyelhetők meg, mint HeLa sejtek esetében.

Az utóbbi években az siRNS alapú terápiák nagy fejlődésen mentek keresztül, számos hordozórendszer található meg a piacon vagy áll fejlesztés alatt, azonban az siRNS transzfektálása a sejtekbe kihívást jelent. A ciklodextrin polimereket már régóta alkalmazzák az ilyen hordozórendszerek kialakítására. Kutatásunk során célunk volt két kationos ciklodextrin polimer, valamint a polietilén-imin siRNS hordozóképeségének összehasonlítása. Eredményeink alapján elmondható, hogy mindhárom polimer képes kötni az siRNS-t. Komplexálást követően megváltozott az siRNS mérete és határfelületi potenciálja. Az általunk vizsgált polimerek nem gyakorolnak negatív hatást a Caco-2 intesztinális epitel sejtek proliferációjára. A különböző polyplexek eltérő celluláris internalizációt mutatnak. A QABCDP polyplexek felvételre kerülnek a sejtekbe, ahol a citoplazmában kisebb-nagyobb vezikulumokban lokalizálódnak. Az NHBCDP polyplexek nem kerülnek felvételre, még a PEI polyplexek a sejtmembrán mentén, sejtmembrán lefűződésekben találhatóak meg. További terveink között szerepel a formulált polyplexek GAPDH és Pgp fehérje expressziójára gyakorolt hatásuk vizsgálata.

7. A jelölt saját közleményeinek a Kenézy Élettudományi Könyvtár által ellenőrzött jegyzéke



**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

Nyilvántartási szám: DEENK/110/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Rusznyák Ágnes

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Rusznyák, Á.**, Palicskó, M., Malanga, M., Fenyvesi, É., Sente, L., Váradi, J., Bácskay, I., Vecsernyés, M., Réti-Nagy, K., Vasvári, G., Haimhoffer, Á., Fenyvesi, F.: Cellular Effects of Cyclodextrins: studies on HeLa Cells.
Molecules. 27 (5), 1589, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27051589>
IF: 4.411 (2020)
2. **Rusznyák, Á.**, Malanga, M., Fenyvesi, É., Sente, L., Váradi, J., Bácskay, I., Vecsernyés, M., Vasvári, G., Haimhoffer, Á., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Nagy, B. J., Fejes, Z., Fenyvesi, F.: Investigation of the Cellular Effects of Beta- Cyclodextrin Derivatives on Caco-2 Intestinal Epithelial Cells.
Pharmaceutics. 13 (2), 1-14, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics13020157>
IF: 6.321 (2020)

További közlemények

3. Le Khanh, H. P., Nemes, D., **Rusznyák, Á.**, Ujhelyi, Z., Fehér, P., Fenyvesi, F., Váradi, J., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: Comparative Investigation of Cellular Effects of Polyethylene Glycol (PEG) Derivates.
Polymers. 14, 1-15, 2022.
IF: 4.329 (2020)
4. Szilágyi, B., Fejes, Z., **Rusznyák, Á.**, Fenyvesi, F., Pócsi, M., Halmi, S., Griger, Z., Kunapuli, S. P., Kappelmayer, J., Nagy, B. J.: Platelet Microparticles Enriched in miR-223 Reduce ICAM-1-Dependent Vascular Inflammation in Septic Conditions.
Front. Physiol. 12, 1-14, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2021.658524>
IF: 4.566 (2020)





5. Haimhoffer, Á., Dossi, E., Béres, M., Bácskay, I., Váradi, J., Afsar, A., **Rusznayk, Á.**, Vasvári, G., Fenyvesi, F.: Preformulation Studies and Bioavailability Enhancement of Curcumin with a 'Two in One' PEG-[beta]-Cyclodextrin Polymer.
Pharmaceutics. 13 (10), 1-18, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics13101710>
IF: 6.321 (2020)
6. Fejes, Z., Pócsi, M., Takai, J., Erdei, J. Z., Tóth, A., Balogh, E., **Rusznayk, Á.**, Fenyvesi, F., Nagy, A., Kappelmayer, J., Jeney, V., Nagy, B. J.: Preterm Intraventricular Hemorrhage-Induced Inflammatory Response in Human Choroid Plexus Epithelial Cells.
Int. J. Mol. Sci. 22 (16), 1-20, 2021.
IF: 5.923 (2020)
7. Haimhoffer, Á., Vasvári, G., Trencsényi, G., Béres, M., Budai, I., Czomba, Z., **Rusznayk, Á.**, Váradi, J., Bácskay, I., Ujhelyi, Z., Fehér, P., Vecsernyés, M., Fenyvesi, F.: Process Optimization for the Continuous Production of a Gastroretentive Dosage Form Based on Melt Foaming.
AAPS PharmSciTech. 22 (5), 1-9, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1208/s12249-021-02066-y>
IF: 3.246 (2020)
8. Fenyvesi, F., Nguyen, T. L. P., Haimhoffer, Á., **Rusznayk, Á.**, Vasvári, G., Bácskay, I., Vecsernyés, M., Ignat, S. R., Dinescu, S., Costache, M., Ciceu, A., Hermenean, A., Váradi, J.: Cyclodextrin Complexation Improves the Solubility and Caco-2 Permeability of Chrysin.
Materials. 13 (16), 3618-3629, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ma13163618>
IF: 3.623
9. Szilágyi, B., Fejes, Z., Pólska, S., Pócsi, M., Czimmerer, Z., Patsalos, A., Fenyvesi, F., **Rusznayk, Á.**, Nagy, G., Kerekes, G., Berhész, M., Szűcs, I., Kunapuli, S. P., Kappelmayer, J., Nagy, B. J.: Reduced miR-26b Expression in Megakaryocytes and Platelets Contributes to Elevated Level of Platelet Activation Status in Sepsis.
Int. J. Mol. Sci. 21 (3), 1-22, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21030866>
IF: 5.923
10. Haimhoffer, Á., **Rusznayk, Á.**, Réti-Nagy, K., Vasvári, G., Váradi, J., Vecsernyés, M., Bácskay, I., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Fenyvesi, F.: Cyclodextrins in Drug Delivery Systems and Their Effects on Biological Barriers.
Sci Pharm. 87 (4), 33-53, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/scipharm87040033>





11. Váradi, J., Hermenean, A., Gesztelyi, R., Jeney, V., Balogh, E., Majoros, L., Malanga, M., Fenyvesi, É., Szente, L., Bácskay, I., Vecsernyés, M., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Vasvári, G., Árvai, I., **Rusznay, Á.**, Balta, C., Herman, H., Fenyvesi, F.: Pharmacokinetic Properties of Fluorescently Labelled Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin. *Biomolecules*. 9 (10), 1-13, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biom9100509>
IF: 4.082
12. Hajdu, I., Angyal, J., Szikra, D. P., Kertész, I., Malanga, M., Fenyvesi, É., Szente, L., Vecsernyés, M., Bácskay, I., Váradi, J., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Vasvári, G., **Rusznay, Á.**, Trencsényi, G., Fenyvesi, F.: Radiochemical synthesis and preclinical evaluation of ⁶⁸Ga-labeled NODAGA-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (⁶⁸Ga-NODAGA-HPBCD). *Eur. J. Pharm. Sci.* 128, 202-208, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2018.12.001>
IF: 3.616
13. Vasvári, G., Kalmár, J., Veres, P., Vecsernyés, M., Bácskay, I., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Haimhoffer, Á., **Rusznay, Á.**, Fenyvesi, F., Váradi, J.: Matrix systems for oral drug delivery: formulations and drug release. *Drug Discov. Today Technol.* 548, 1-10, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ddtec.2018.06.009>

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 52,361

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 10,732

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, 2022.03.08.



8. Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönetet mondok Dr. Fenyvesi Ferenc témavezetőmnek, hogy 2016-ban még TDK hallgatóként lehetőséget adott a Gyógyszertechnológiai tanszéken kísérleti munka végzésére és azóta is folyamatosan segített és támogatott. Köszönöm, hogy lehetővé tette a munkám megírását, témavezetése alatt bármikor számíthattam tanácsaira, ötleteire és szaktudására.

Köszönetet mondok Prof. Dr. Bácskay Ildikónak és Prof. Dr. Vecsernyés Miklósnak, hogy lehetőséget biztosítottak a Gyógyszertechnológiai Tanszéken kísérleti tudományos munka végzésére.

Köszönettel tartozok a Gyógyszertechnológiai Tanszék munkatársainak Dr. Váradi Juditnak, Dr. Ujhelyi Zoltánnak, Dr. Fehér Pálmának, Dr. Vasvári Gábornak, Dr. Réti-Nagy Katalinnak, Dr. Nemes Dánielnek, Dr. Sinka Dávidnak, Dr. Arany Petrának, Dr. Pető Ágotának, Dr. Kósa Dórának, Dr. Haimhoffer Ádámnak, Dr. Józsa Lizának, Pardi Sándornénak, Horányiné Körei Máriának, Szilágyi Erikának, Gulyás Évának, Nagyné Vaszily Máriának, Lakatos Szilviának, Sipos Szilviának, Nagy Tündének, Bátoriné Pataki Brigittának, amiért munkájukkal és szakmai támogatásukkal hozzájárultak eredményeimhez.

Köszönettel tartozom továbbá a Gyógyszerhatástan Tanszék munkatársainak, Dr. Lekli Istvánnak és Dr. Gyöngyösi Alexandrának, akik támogatásukkal és szakmai tudásukkal segítették munkámat.

Köszönetet mondok Dr. Nagy Bélának és Dr. Fejes Zsoltnak, az áramlási citometria iránti érdeklődésemért, Dr. Vámosi Györgynek a konfokális mikroszkópiai vizsgálatokban nyújtott segítségükért, valamint szakmai tanácsaikért.

Végül, de nem utolsó sorban, óriási hálával tartozok Családomnak, akik kitartóan támogatnak és segítenek egész életemben.

Támogatás

A tanulmány elkészítését az EFOP-3.6.1-16-2016-00022 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

A disszertáció alapjául szolgáló kutatást az Innovációs és Technológiai Minisztérium által meghirdetett Tématerületi Kiválósági Program (TKP2020-IKA-04) támogatta.

A tanulmány a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (Budapest, Magyarország) FK_17 (FK124634) számú kutatási támogatásával készült.

Az disszertáció elkészítését a GINOP-2.3.4-15-2020-00008 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg.