

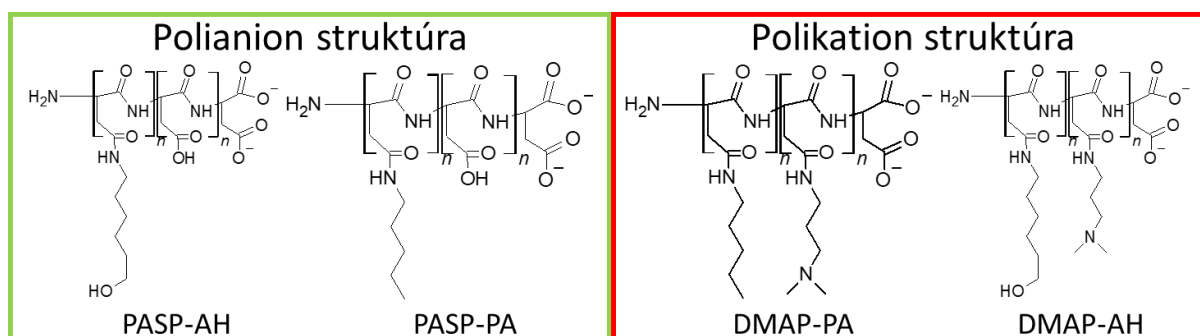
# Beszámoló az Állami Eötvös Ösztöndíjasként végzett

## Endoszómális hatóanyagszállítás a tumorterápiában poli(aminosav) alapú polielektrolit komplexek segítségével

### pályázatomról

Állami Eötvös ösztöndíjas munkámat 2022. május 1. és július 31. valamint 2022. szeptember 15. és december 15. között Prof. Anna Salvati kutatócsoportjában (University of Groningen, Faculty of Science and Engineering, Nanomedicine & Drug Targeting — Groningen Research Institute of Pharmacy) végeztem. A munka során különböző, a munka előzménye során szintetizált polielektrolitokra épülő nanorészecskék előállítását és ezek sejtek életképességére gyakorolt hatását, valamint a sejtfelvételi mechanizmusok feltárását tűztük ki célul.

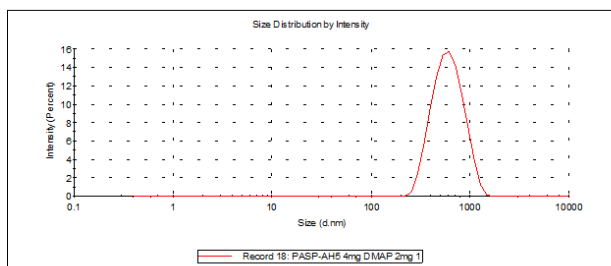
A mobilitás elején különböző poláros és apoláros oldalláncokkal rendelkező polielektrolitokra (1. ábra) épülő nanokomplexek előállítását és az előállítási paraméterek optimalizálására fókuszáltam.



**1.ábra: Különböző oldallánccal rendelkező polielektrolitok szerkezete**

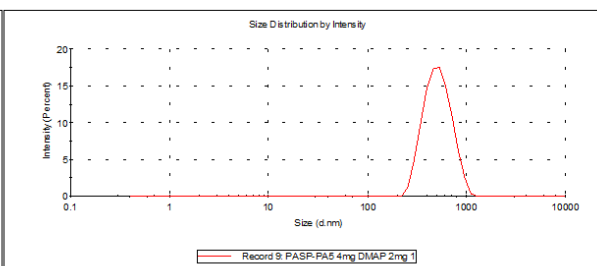
Az 1. ábrán látható polielektrolitokat különböző arányban az előző kísérletek során meghatározott 5,5-es pH-n kevertem össze és mértem a kialakult nanorészecskék méretének és zeta potenciáljának a változását. A kísérletek során a poláros (AH) oldalláncú és apoláros (PA) oldalláncú ellentétes töltésű polielektrolitokat alkalmaztam egy kísérleti összeállítás során párban. Az oldalláncok szerepe a komplexek stabilitásának növelése volt biológiailag releváns közegekben, mivel elképzeléseink szerint az oldalláncok képesek lefedni a töltéseket a részecskék felületén, ezáltal növelve a komplexek stabilitását magasabb ionkoncentráció esetében. A 2. ábra mutatja a 1:1 arányban polianiont és polikationt tartalmazó részecskék méreteloszlását, illetve a Zeta-potenciálját.

PASP-AH5/DMAP-AH5 1:1



Zeta: -15,7mV

PASP-PA5/DMAP-PA5 1:1



Zeta: -18,3mV

2. ábra: Különböző polaritású oldallánccal rendelkező polielektrolit komplexek mérete és Zeta potenciálja

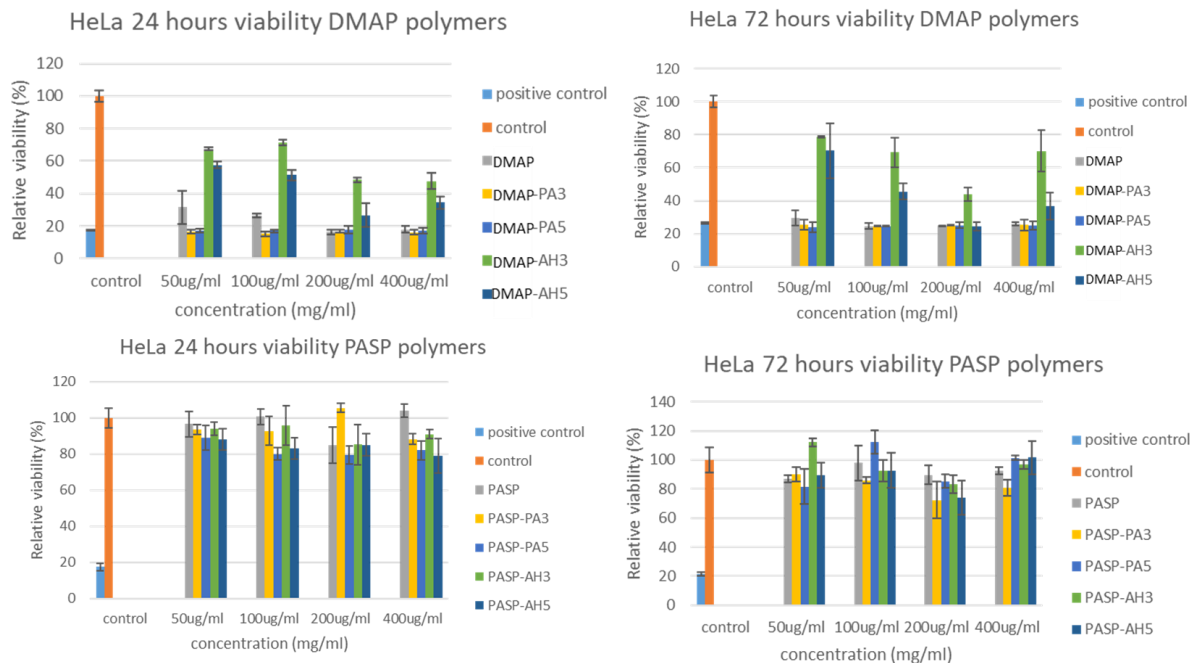
A 2. ábra mutatja, hogy az 1/1 arány esetében mindkét részecske átlagmérete 500nm körülnek adódott (AH esetében 573nm, míg PA estében 480nm), valamint mindkét részecske esetében elmondható, hogy a Zeta potenciál érték negatív értéket vett fel. Ez arra utal, hogy hiába 1/1 arányban találhatóak az ellentétes töltéssel rendelkező polielektrolitok a részecskékben a polianion helyezkedik el a részecske külső részén. Továbbiakban vizsgáltam a polielektrolitok arányának a hatását a részecskeméretre és Zeta-potenciálra, amely eredményeket az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat: Különböző molarányú komplexek mérete és Zeta potenciálja

Töltésarány	PASP-AH5/DMAP-AH5			PASP-PA5/DMAP-PA5		
	Részecskeméret (nm)	PDI (%)	Zeta-potenciál (mV)	Részecskeméret (nm)	PDI (%)	Zeta-potenciál (mV)
1(-):1(+)	573,1±117,7	30,11%	-17,6	480±177,9	23,92	-14,97
1,5(-):1(+)	240,7 ± 156,9	20,70%	-24,3	203,8±49,34	11,29	-24,50
1,7(-):1(+)	270,6 ± 158,5	20,90%	-27	195,5±57,38	15,22	-28,50
1,9(-):1(+)	261 ± 131,7	21,30%	-28,3	194,7±59,15	15,86	-28,34
2(-):1(+)	204,7 ± 86,4	18,40%	-28,2	139,3±37,38	15,12	-28,76
2,3(-):1(+)	188,8 ± 71,5	16,40%	-30,6	212,7±80,73	17,62	-29,39
2,5(-):1(+)	213,6 ± 88,5	19,40%	-27,7	223,2±49,09	18,28	-30,24

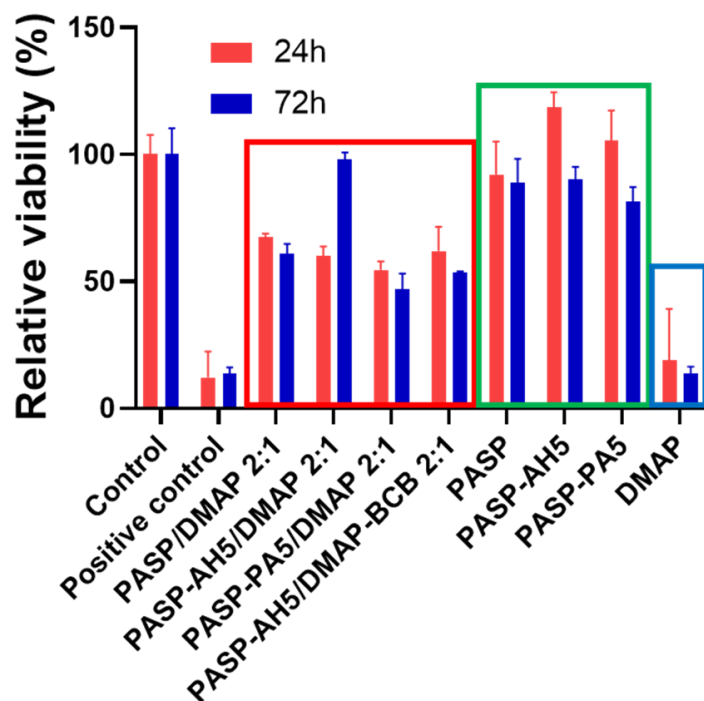
A mérési eredmények jól mutatják, hogy a polianion részarányának a növelésével a kialakult komplexek átlagos mérete nagymértékben csökken, valamint a részecskék egyre negatívabb Zeta-potenciál értékkel rendelkeznek. Ennek oka abban keresendő, hogy a polianion részarányának a növelésével egy mag/héj szerkezetű struktúra alakul ki, amelyben a polikationok belül a magban, míg a polianionok kívül a héjban helyezkednek el. Mind a méret csökkenése, mind pedig a Zeta-potenciál érték csökkenése a 2:1 arányú komplexekig megfigyelhető. Mivel a Zeta-potenciál értékének csökkenése növelheti a részecskék stabilitását, ezért az in vitro sejtes kísérletek során elsősorban a 2:1 arányú részecskékre fókuszáltam.

Az *in vitro* sejtelétképpességi és sejt internalizáció mérésekhez HeLa sejtek segítségével vizsgáltam, amelyeket széleskörűen alkalmaznak az irodalomban hasonló rendszerek tesztelése esetében. A komplexek tesztelése előtt azonban megvizsgáltam a különböző oldalláncokkal rendelkező polimerek koncentráció függő citotoxikus hatását (3. ábra).



3. ábra: Különböző polielektrolitok koncentráció függő HeLa sejtek életképességére gyakorolt hatása

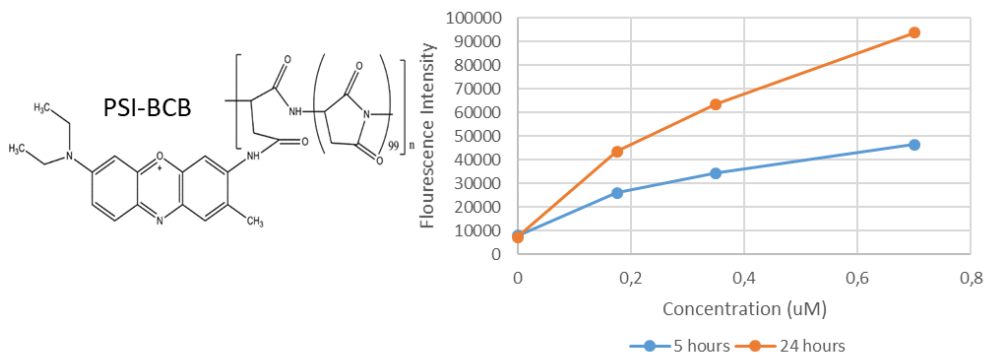
Az eredmények jól mutatják, hogy amíg polianionok nem rendelkeznek citotoxikus hatással akár 400 µg/ml koncentráció esetében sem, addig a polikationok jelentős citotoxikus hatással rendelkeznek, akár már 50 µg/ml koncentráció esetében. Ez a hatás annak köszönhető, hogy a pozitív töltések a sejtek membránjának a dezintegrációját idézik elő, amely a sejtek elhalásához vezet. Emellett megfigyelhető, hogy a citotoxikus hatás sokkal kisebb mértékű volt a hidrofíll oldalláncsal rendelkező polikationok esetében, mint a hidrofób oldallánc esetében, amely két dologgal magyarázható: a poláris oldallánc vagy megnöveli a polimer sejtek általi felvételét, vagy a hidrofíll oldallánc jobban lefedi a polimerek töltését, így azok kevésbé citotoxikussá válnak. A következő kísérletek során éppen ezért a részecskék vizsgálata esetében a koncentrációt úgy állítottam be, hogy a legkisebb, 50 µg/ml koncentrációt a polikationok koncentrációja ne haladja meg. A 4. ábrán látható a különböző összetételű komplexek esetében mért citotoxicitási értékek láthatóak.



4. ábra: különböző összetételű komplexek esetében mért citotoxicitás

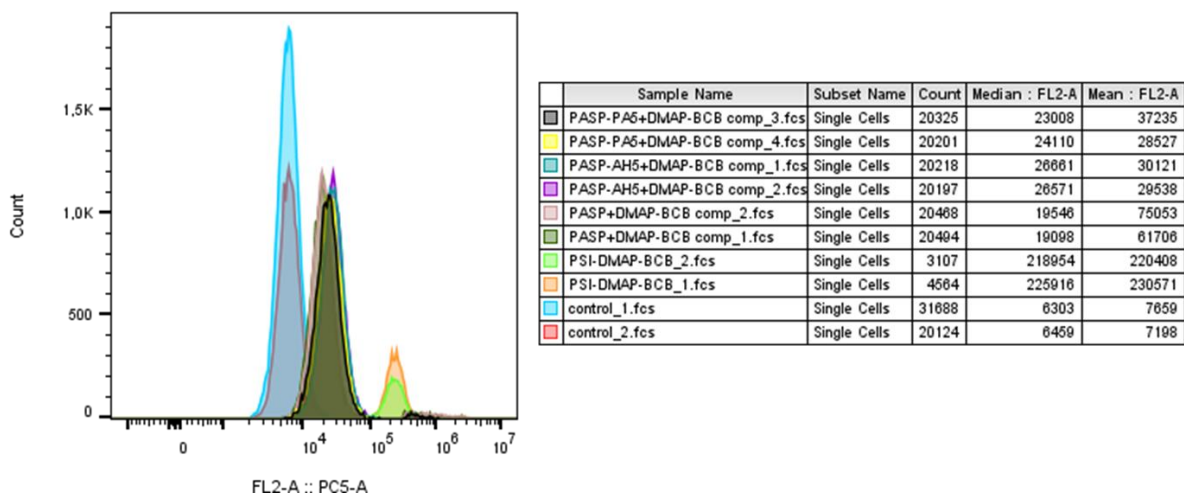
A 4. ábrán látható, hogy a komplexek esetében (piros négyszög) az életképességi mutatók javultak a polikationos mérésekhez képest, azonban a komplexek citotoxikusabbnak bizonyultak a polianionokhoz viszonyítva. Ezt az eredményt azért találtuk meglepőnek, mert a komplexek mind negatív Zeta-potenciál értékkel rendelkeznek, amelyből azt várnánk, hogy a részecskék hasonlóan citotoxikusak mint a polianionok. A nagyobb citotoxicitásból arra következtethetünk, hogy a részecskék nem stabilak a sejtes kísérletek során alkalmazott tápoldatokban, vagy legalábbis változik a részecskék struktúrája.

Az életképességi vizsgálatokkal párhuzamosan elvégeztem polimerek és részecskék sejtek általi internalizációjának vizsgálatát áramlásos citometria segítségével. A kísérletekhez a polimereket brilliant krezil kék (BCB) fluoreszcens molekulával módosítottam. A mérési eljárás validálásához a BCB-vel jelölt PSI-t különböző koncentrációban alkalmaztam és mértem a fluoreszcens intenzitást 5 és 24 óra elteltével (5.ábra). A mérés kiértékelése során a két dimenziós szórási eredmények segítségével kapukat alkalmaztam, amelyek segítségével kiválasztottam az életképes és egyedülálló sejteket, amelyek fluoreszcens jelét mértem.



5. ábra: BCB-vel jelölt PSI szerkezete és a fluoreszcens intenzitás koncentráció függvénye

Az áramlásos citometria eredmények alapján elmondható, hogy az életképes sejtek esetén mért fluoreszcens jel növekszik az alkalmazott polimer koncentrációjával, illetve az inkubációs idővel egyaránt. Ezen eredmények alapján a BCB jelölés megfelelően alkalmazható a polimerek sejtek általi internalizációjának nyomon követéséhez. A további kísérletekben megvizsgáltam a különböző, a komplexek HeLa sejtek általi felvételét (6. ábra).

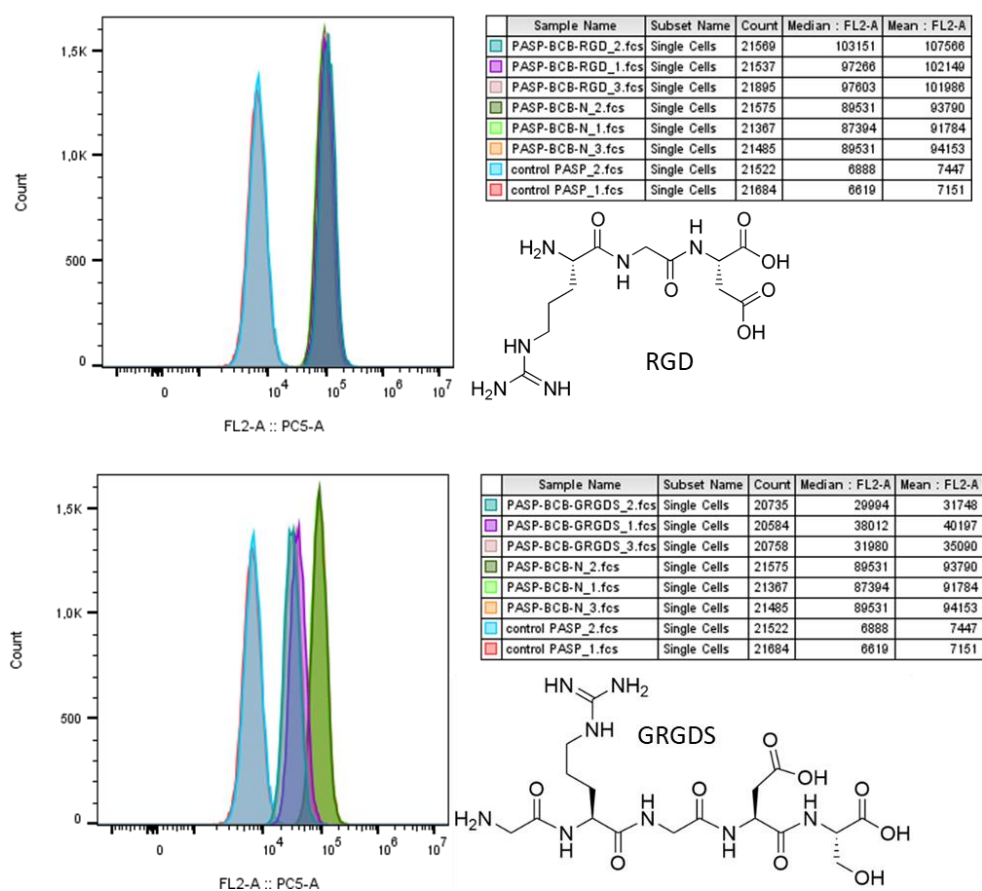


6. ábra: A különböző komplexek és PSI-DMAP polimer sejtek általi felvételének vizsgálata

Az eredmények alapján elmondható, hogy a hidrophil és hidrofób oldallánccal rendelkező polimerekből felépített komplexek (PASP-PA5+DMAP és PASP-AH5+DMAP) kismértékben megnövelik a sejtek általi felvételt az alap komplexekhez képest (PASP+DMAP) és mindegyik komplex esetében nagyobb fluoreszcens jel volt mérhető a kontrol csoporthoz képest. A komplexeket és a polikationos polimert (PSI-DMAP) összehasonlítva megfigyelhető, hogy a polikation felvétele sokkal nagyobb mértékű volt, mint a komplexek felvétele, azonban a beütésszám (counts) csökkenéséből arra lehet következtetni, hogy az életképes sejtek száma nagymértékben lecsökkent a kísérlet során. Ez az eredmény összhangban van az életképességi

vizsgálatok eredményeivel. A nagyobb felvétel annak köszönhető, hogy a polimeren található pozitív töltések permeabilizálják a sejtmembránt, ezáltal a polimerek képesek bejutni a sejtbe passzív diffúzióval.

A komplexek és polikationos szerkezetek vizsgálata mellett kísérletek végeztem különböző, célzó molekulákkal módosított polianionok sejt internalizációjának vizsgálatára. A polimereket előzetesen módosítottam két féle peptid szekvenciával (RGD és GRGDS), amelyek az irodalomban széles körben használtak nanorészecskék specifikus sejtekbe juttatására. Az áramlásos citometria eredmények a 7. ábrán láthatóak.



7. ábra: különböző targetáló peptidszekvenciákkal módosított PASP polimerek sejtek általi felvétele

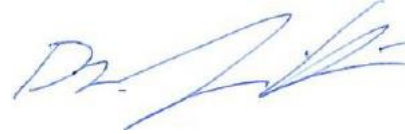
Az eredmények alapján elmondható, hogy amíg az RGD célzó ágens nem volt hatással a polimerek sejtek általi felvételére, addig a GRGDS ágens csökkentette a sejtek által felvett polimerek mennyiségét. Ebből az eredményből arra következtethetünk, hogy a GRGDS célzóágenssel ellátott polimer esetlegesen más mechanizmussal jut be a sejtbe mint a módosítatlan vagy az RGD szekvenciával módosított polimer, azonban ennek igazolására további kísérletek elvégzése lenne szükséges.

A későbbi kísérleteink során kiderült, hogy a polielektrolitokból előállított komplexek stabilitása a sejttenyésztő tápoldatban megkérdőjelezhető pár óra után. A komplexek további stabilitásának növelésére többféle keresztkötési stratégiát kipróbáltunk, azonban egyik sem járt kifejezett sikerrel. A bemutatott eredmények mellett hasonló rendszerek sejtinternalizációs folyamatait is megvizsgáltam, azonban ezen eredmények kiértékelése még folyamatban van.

Prof. Anna Salvati kutatócsoportjában eltöltött 6 hónap alatt egy széles képet kaptam arról, hogy a különböző PASP alapú polimerek milyen hatással lehetnek különböző nanorészecske rendszerek (polielektrolit komplexek, mag-héj nanorészecskék) HeLa sejtek általi felvételére. Az eredmények hasznosak lehetnek további PASP alapú nanorészecskék fejlesztése során és új mechanizmusokat tárhatnak fel polielektrolit nanorészecskék sejtfelvételi mechanizmusait illetően. Az adatok nagy része még kiértékelés alatt van, de előreláthatólag egy nemzetközi publikációban összefoglalva tervezzük leközzölni. Emellett a pályázati időszak alatt megjelent a Macromolecular Bioscience nemzetközi folyóiratban közleményem, melyben az Eötvös pályázatomat feltüntetésre került forrásként az acknowledgement szekcióban.

A publikáció url linkje: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mabi.202200397>

Budapest, 2023. január 11.



-----  
(Dr. Juriga Dávid, ösztöndíjas)