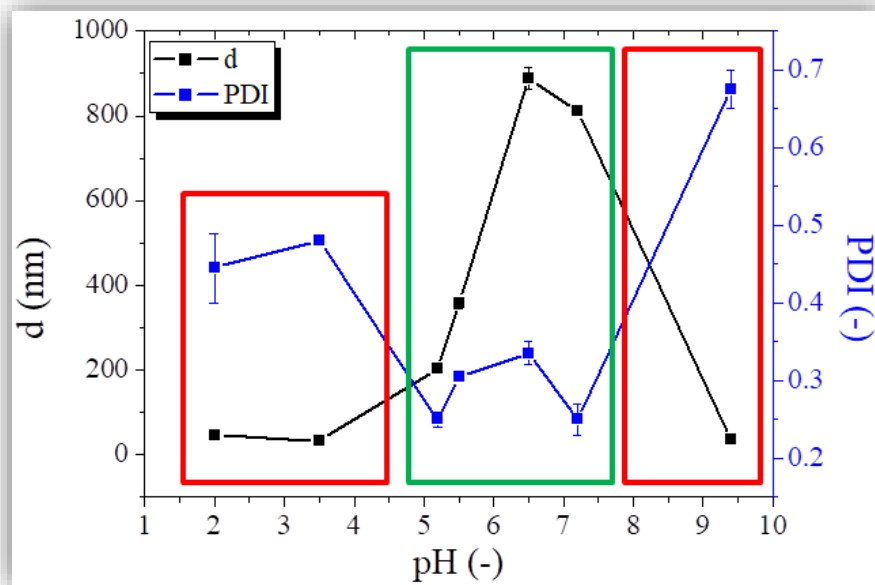


**Beszámoló az Állami Eötvös Ösztöndíjasként végzett**  
**Újtípusú biodegradábilis poli(aminosav) alapú polielektrolit**  
**komplexek alkalmazása endoszomális hatóanyagszállításban**  
**pályázatokról**

Állami Eötvös ösztöndíjas munkámat 2021. április 1. és augusztus 31. között Prof. Anna Salvatival együttműködve (University of Groningen, Faculty of Science and Engineering, Nanomedicine & Drug Targeting — Groningen Research Institute of Pharmacy) végeztem. A Covid-19 járvány miatt a University of Groningen nem tudott személyesen fogadni, így a munkát táveggyüttműködés keretein belül valósítottuk meg. Ennek során havonta 2 alkalommal videóhívás keretein belül konzultáltunk az eredményekről és a további kísérletekről.

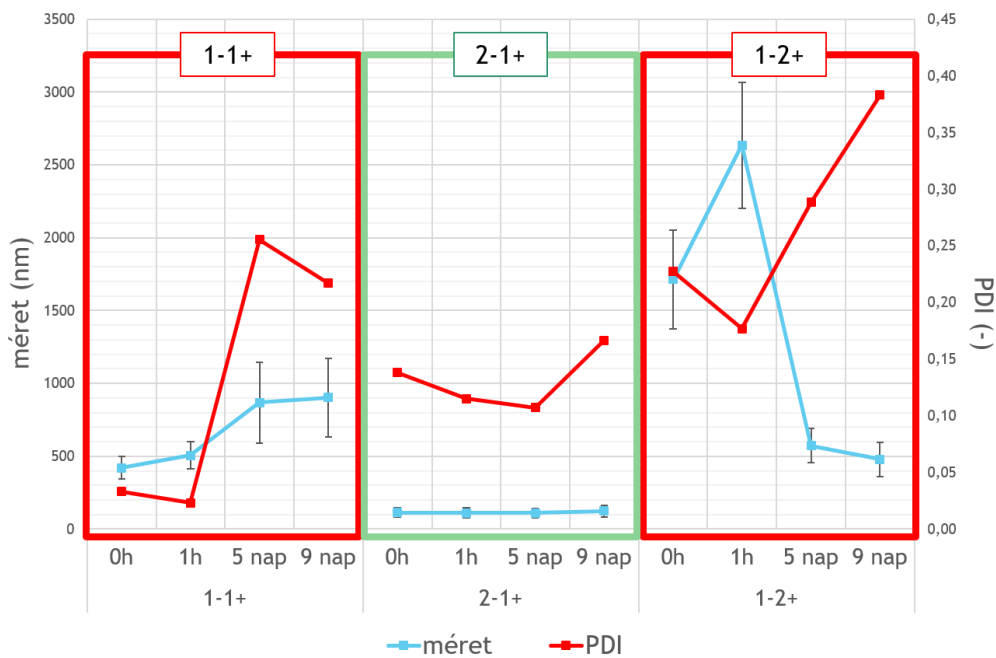
Mivel a kísérleteket a Semmelweis Egyetemen végeztem, ezért a munkatervben ismertetett *in vitro* sejtes kísérleteket nem állt módomban elvégezni. Emellett a munkatervben említett hatóanyag (doxorubicin) beszerzése nehézségekbe ütközött, így nem volt lehetőségem polielektrolit-doxorubicin konjugátumok szintézisére. A munka során főként a polielektrolit komplexek (PEC-ek) stabilitásának növelésével foglalkoztam, illetve a munkatervben megjelölthöz képest más sejtvonalat (155BR Human Fibroblast) alkalmazva vizsgáltam a PEC-ek előállításához használt polielektrolitok hatását a sejtek életképességére. Célom volt újtípusú polielektrolitok szintézise (negatív töltésű poliaszparaginsav (PASP) és pozitív töltésű polikation (PSI-DMAP)), amelyek alkalmazhatóak lehetnek a PEC-ek stabilitásának növelésére, valamint a polielektrolit arány hatásának a vizsgálata a PEC-ek stabilitására.

Előzetes eredményeink azt mutatták, hogy a poli(aszpartamid) alapú PEC-ek szintéziséhez a 5-8 pH tartomány a legkedvezőbb (1. ábra). Ebben a pH tartományban mind a polikation, mind pedig a polianion megfelelő töltéserőséggel rendelkezik ahhoz, hogy a két polielektrolit oldat összekeverésével nanométeres tartományba eső PEC-ek alakuljanak ki.



**1.ábra: PEC-ek átlagos méretének (d) és polidiszperzitási indexének (PDI) változása a reakcióközeg pH-jának függvényében**

Ezek alapján pH 5-ös közeget alkalmazva kapjuk a legkisebb méretű és legszűkebb méreteloszlással rendelkező részecskéket. Éppen ezért a polianion/polikation arány változtatásának hatását a részecskék méretére és zeta potenciál értékére pH 5-ös körülmények között végeztem el (2. ábra és 1. táblázat).



**2.ábra: PEC-ek méretének és PDI-jének függése az ellentétes töltésű polimerek molarányától az előállításuk után különböző időpontokban**

A 2. ábrán bemutatott eredmények alapján elmondható, hogy kialakult PEC-ek mérete nagymértékben függ az ellentétes töltésű polielektrolitok molarányától. Amennyiben két mól polianiont keverünk 1 mól polikationhoz a kialakult PEC-ek mérete nagymértékben lecsökken és nem változik az előállítástól számított 9. npra sem. Emellett az is megfigyelhető, hogy a PDI minden mérési napon 0,2 alatt van, ami arra utal, hogy a kialakult komplexek mérete szűk tartományon belül mozog.

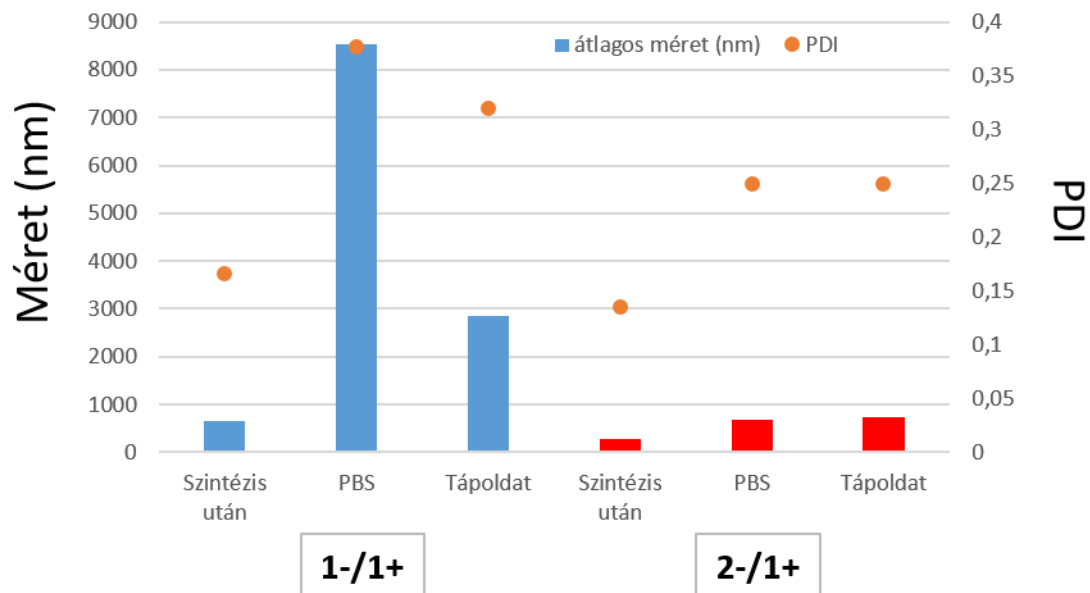
**1. Táblázat: Különböző PEC-ek zeta-potenciál értéke a szintézisük után**

ZETA POTENCIÁL		ZETA (mV)
Polimer	PASP (polianion)	-12,21
	PSI-DMAP (polikation)	44,67
	PSI-DMAP-DA10 (polikation konjugátum)	45,59
PEC	1-1+	-12,83
	2-1+	-24,59
	1-2+	26,56

A táblázatban bemutatott adatok alapján elmondható, hogy a kialakult komplexek zeta-potenciál értéke nagymértékben függ az alkalmazott polielektrolitok molarányától. A komplexek zeta-potenciál értékeit összevetve a kiindulási polielektrolitokéval megfigyelhető, hogy amennyiben az ellentétes töltésű polielektrolitokat 1:1 arányban alkalmaztuk a zeta-potenciál érték megegyezett a kiindulási polianion zeta-potenciál értékével. Ebből arra következtethetünk, hogy a PEC-ben a PASP helyezkedik el kívül és a PSI-DMAP pedig belül. A 2-/1+ arány esetében a zeta-potenciál érték kétszeresére változott, amiből arra következtethetünk, hogy ebben az esetben két PASP molekula helyezkedik a PEC felületén. Ez valószínűleg a polikation nagyobb térkitöltése miatt lehetséges. A megnövekedett stabilitás a negatívabb zeta-potenciál értéknek köszönhető, illetve a negatívabb zeta-potenciál elősegítheti a PEC-ek sejtekbe való bejutását és az endoszómában történő szétesését is.

A PEC-ek szintézisét nagymértékben befolyásolja a töltéssel rendelkező molekulák koncentrációja. Magas ionkoncentráció megakadályozhatja a PEC-ek szintézisét, hiszen leárnyékolják a polimer molekulán lévő töltéseket. Éppen ezért a szintézis közegben a lehető legalacsonyabb ionkoncentrációt alkalmaztam. A kialakult PEC szuszpenzió azonban így nem alkalmazható *in vitro* kísérletekhez, ezért vizsgáltam a PEC-ek stabilitását a sejtes kísérletek

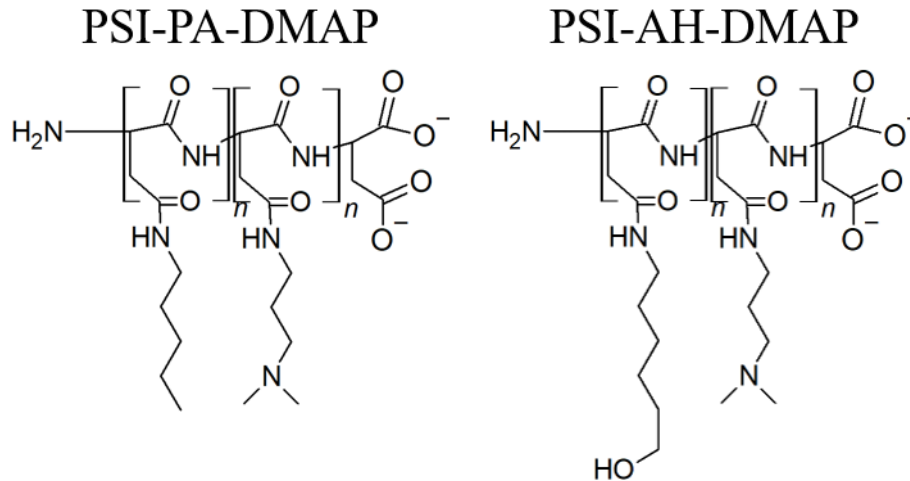
során alkalmazott tápoldatban valamint a tápoldat alapját képező foszfát pufferben (PBS) (3. ábra).



**3.ábra: Különböző PEC-ek méretének és PDI-jének változása PBS-ben és tápoldatban**

A 3. ábrán látható eredmények jól mutatják, hogy a 2-/1+ aránnyal rendelkező komplex kiindulási mérete kisebb mint az 1-/1+ aránnyal rendelkező komplexé. Emellett megfigyelhető, hogy az 1-/1+ arányú komplexek nagymértékű aggregációt szenvednek PBS-ben, illetve tápoldatban, míg ez sokkal kisebb mértékű a 2-/1+ arányú komplex esetében. Ennek valószínűsíthető oka a negatívabb zeta-potenciál érték, ami nagyobb stabilitást biztosít a PEC-eknek. Azonban az aggregáció még itt is jelentős, a 290nm-es átlagos átmérő PBS-ben 673nm-re, míg tápoldatban 738nm-re növekszik. Azonban az eredmények arra engednek következtetni, hogy az arány pontosításával létrehozható lehet egy olyan rendszer, amely izotóniás körülményeken is stabil marad.

A stabilitás növelésének céljából a pozitív töltéssel rendelkező polimereken további módosítást hajtottam végre. A stabilitás növeléséhez 1-aminohexanolt, illetve 1-pentilamint alkalmaztam a pozitív töltést biztosító DMAP mellett (3. ábra).



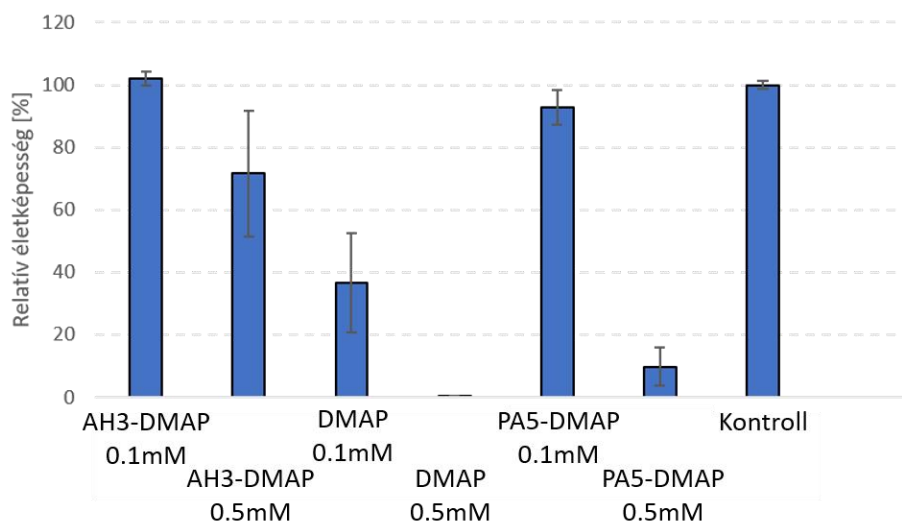
**3.ábra: Pentilaminnal (PSI-PA-DMAP) és aminohexanollal (PSI-AH-DMAP) módosított polikationos polimerek**

A polimeren található alkilláncn (PSI-PA-DMAP), illetve hosszúlancú alkoholos oldalcsoport (PSI-AH-DMAP) növelhetik a polielektrolit komplexek stabilitását azáltal, hogy a PEC felületén lévő töltéseket leárnyékolják. Az oldalcsoportok mennyiségét a szintézisek során változtattam, ezáltal minden 3., 5., és 10. monomert módosítottam az adott oldalcsoporttal. A többi szukcinimid monomert ezután a pozitív töltést biztosító DMAP-al módosítottam. A polimerek citotoxicitását *in vitro* sejtes kísérletekkel vizsgáltam.

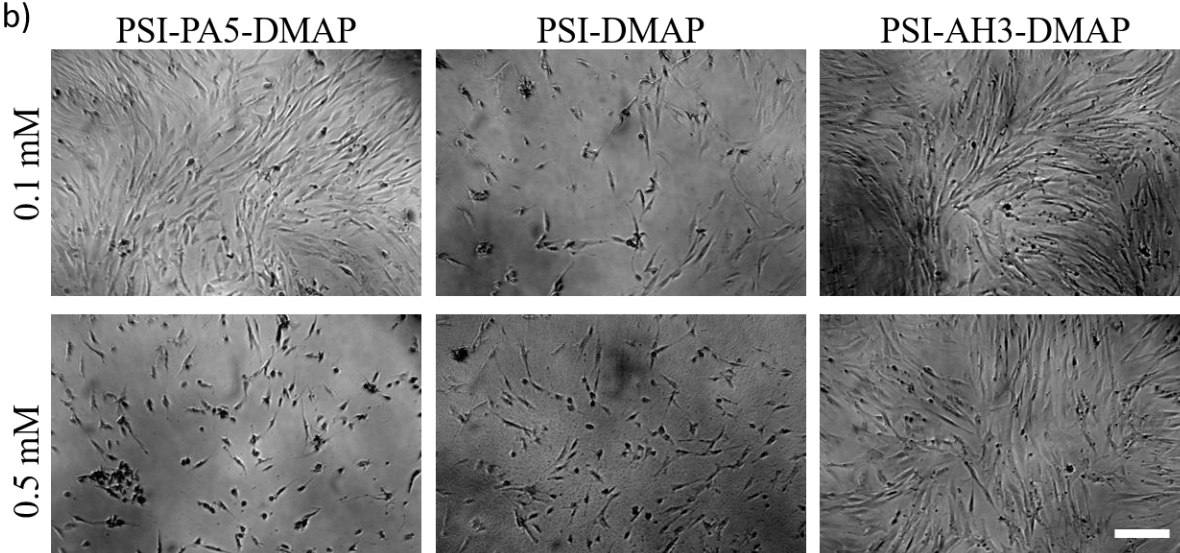
*In vitro* sejtes kísérletek során vizsgáltam az előzőekben bemutatott polielektrolitok hatását a sejtek életképességére és morfológiájára (4. ábra).

a)

Életképesség (72 h)



b)



**4.ábra: 155 BR Human fibroblaszt sejtek életképessége (a) és fázis kontraszt mikroszkópos felvétele (b) 72 órával a kiültetés után, különböző polikationok jelenlétében. A polimerek elnevezésében a számok az aminoszerek mennyiségét mutatják (AH esetében minden 3., míg PA esetében minden 5. monomer volt módosítva). Az ábrán látható scale bar 100  $\mu\text{m}$ -nek felel meg.**

A 4. a, ábrán megfigyelhető, hogy a polikationok kémiai szerkezete, illetve koncentrációja nagymértékben befolyásolja az életképes sejtek mennyiségét. Megfigyelhető, hogy az oldallánc módosítás, mind pentilaminnal mind pedig aminoszerekkel, csökkentette a polikationok citotoxicitását mindkét koncentráció esetében. Ez valószínűleg a kisebb ionerősségnek tudható be. Az eredmények alapján az is elmondható, hogy a koncentráció növelése minden esetben csökkentette az életképes sejtek mennyiségét (4. a, ábra). Ezt a 4. b, ábrán látható fáziskontraszt mikroszkóp felvételek is igazolják. A változás az aminoszerekkel módosított minta esetében

volt a legkisebb, amely szintén a kevesebb kationos csoportnak, valamint a polimer polárosabb jellegének tulajdonítható. Emellett megfigyelhető, hogy 0,1mM-os koncentráció mellett mind a PSI-AH3-DMAP, mind pedig a PSI-PA5-DMAP polimerek esetében a kontrollhoz közel azonos életképesség volt mérhető, amely mutatja, hogy ez a két polikation nem citotoxikus ebben a koncentrációban. Ezek alapján elmondható, hogy a módosítás nem csak a PEC stabilitására lehet hatással, de az egészséges sejtekre gyakorolt citotoxikus hatás is csökkenthető. Ezen módosított polimerek PEC készítésében történő alkalmazását jövőbeni kísérletek során tervezem.

A projekt során kapott eredmények alapján elmondható, hogy a poliaszpartamid alapú polikationok és a negatív töltésű poli(aszparaginsav) alkalmazásával előállíthatóak nanométer mérettartományba eső PEC-ek. Ezek stabilitása nagymértékben függ a szintézis során alkalmazott pH-tól valamint a negatív és pozitív töltésű polimerek arányától. Amennyiben 2-/1+ molarányt alkalmazunk a kialakult PEC-ek kisebb mérettel rendelkeznek, valamint a kialakult nanoszuszpenzió 9 nap után is stabil. Ezek a részecskék negatívabb zeta-potenciál értékkel rendelkeznek, amely elősegíti sejtbe történő bejutásukat, valamint növeli stabilitásukat izotóniás körülményeken. A polikationokon alkalmazott stabilitást növelő oldalcsoportok csökkentik a polimerek citotoxicitását, amely növelheti a PEC szelektív hatását terápia esetén.

Budapest, 2021. szeptember 28.



---

(Dr. Juriga Dávid, ösztöndíjas)