

DRUG-CONTAINING IMPLANTABLE  
ELECTROSPUN MESHES BASED ON DIFFERENT  
BIOCOMPATIBLE POLYMERS

*Biokompatibilis polimerekből elektrosztatikus szálképzéssel előállított implantálható,  
hatóanyag-hordozó rendszerek*

Tézisfüzet

**Juriga-Tóth Krisztina**

Semmelweis Egyetem  
Elméleti és Transzlációs orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. S. Nagy Krisztina, Ph.D.  
Konzulens: Dr. Jedlovsky-Hajdú Angéla, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Ludányi Krisztina, Ph.D.  
Dr. Nagy Zsombor Kristóf, Ph.D.

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Alpár Alán, MD, D.Sc.  
Tagok: Dr. Kovács Mihály, D.Sc.  
Dr. Cervenák László, Ph.D.

Budapest  
2023

## 1. Bevezetés

A polimerek egymáshoz kémiai kötésekkel kapcsolódó, ismétlődő monomer egységekből álló, rendszerint nagy molekulatömeggel rendelkező makromolekulák. Eredetüket tekintve lehetnek természetesek, illetve mesterségesek. A két halmaz közös metszeteként tekinthetünk a természetben megtalálható, monomer egységekből felépülő, de szintetikus úton előállított biopolimerekre.

Napjainkra a gyógyszerészeti kutatások középpontjába kerültek az olyan intelligens, biopolimer-alapú, hatóanyag-hordozó rendszerek, melyek funkciójuk betöltése után részegységeikre bomolva nem csak az emberi szervezet anyagcsere folyamataiba képesek bekapcsolódni, hanem immunológiai szempontból sem jelentenek kockázatot.

A limitált mennyiségben előforduló és bonyolult extrakciós lépéseket igénylő, természetben előforduló biopolimerekkel szemben, a laboratóriumban előállítható biopolimerek (pl. polivinil-alkohol, poliszukcinimid,  $\epsilon$ -polikaprolkaton) szintézise nagy mennyiségben és rendszerint költséghatékonyan kivitelezhető, ezért nagyobb perspektívát jelentenek az orvosbiológiai alkalmazások tekintetében. Biokompatibilitásuknak és biodegradabilitásuknak köszönhetően a szintetizált biopolimerek alkalmazásakor csak enyhe mellékhatások várhatóak, továbbá irányított és szabályozott hatóanyag-leadás érhető el. Ezenkívül a segítségükkel megváltoztathatók a hatóanyag különböző fizikokémiai tulajdonságai, így vízdékonysága is, ami különösen az apoláros hatóanyagok esetében (pl. prednizon, doxorubicin) nagy jelentőségű, hiszen ezáltal azok biohasznosulása is kedvezőbb lehet.

A polimer-alapú hatóanyag-hordozó rendszerek egyik altípusát képezik a polimer-hatóanyag konjugátumok, melyek esetén a hatóanyag a polimerhez kovalens kémiai kötésekkel kapcsolódik. Az így előállított rendszerek sokkal stabilabbak, mint azok, melyekben csak fizikai kölcsönhatáson alapul a

hatóanyag és a polimer kapcsolata. A konjugátumok esetében a polimerlánc képes megvédeni és inaktív (prodrug) formában tartani a hatóanyagot, ami gyorsan lebomló hatóanyagok esetében (pl. dopamin) nagyon előnyös lehet.

Különböző viszkózus polimeroldatokból elektrosztatikus szálképzés segítségével nagy fajlagos felülettel rendelkező nano- és mikrométeres mérettartományba eső szálátmérővel rendelkező hálós rendszerek állíthatóak elő. Az alkalmazott polimer kémiai szerkezete, oldhatósága és molekulatömege mellett a polimeroldatok viszkozitása, koncentrációja, felületi feszültsége, és vezetőképessége nagymértékben befolyásolja a szálképzésre való alkalmasságukat. A hatóanyagok a szálak belsejébe vagy felületére történő juttatására számos elektrosztatikus szálképzési stratégia létezik. A hatóanyagot egyszerűen összekeverhetjük a polimeroldattal a szálképzés előtt azonos oldószerben, de akár adszorbeáltathatjuk is a szálak felületére különböző immerziós technikák segítségével. Elektrosztatikus szálképzéssel a polimer-hatóanyag konjugátumok is formulázhatók. Ebben az esetben a polimer-hatóanyag konjugátumnak megfelelő oldószert kell találnunk ahhoz, hogy szálak struktúráját állítsunk elő. Elektrosztatikus szálképzéssel a polimer-hatóanyag konjugátumok biohasznosulása tovább fejleszthető, mivel a nano- és mikrométeres mérettartományba eső szálátmérővel rendelkező rendszerek nagy fajlagos felületüknek köszönhetően megváltoztathatják a hatóanyag oldhatósági tulajdonságait, így kioldódási profilját is.

Munkám során hatóanyagként dopamint (DA), doxorubicint (Dox) és prednizont (Pred) alkalmaztam, míg polimerként polivinil-alkoholt (PVA), poliszukcinimidet (PSI), illetve  $\epsilon$ -polikaprolaktont (PCL).

## 2. Célkitűzések

PhD kutatómunkám célja implantálható, nanoszálás, polimer-alapú, hatóanyag-hordozó rendszerek előállítása későbbi orvosi biológiai felhasználás céljára. További céloom volt az előállított rendszerek fizikokémiai és mechanikai tulajdonságainak vizsgálata a különböző sejtkultúrákra gyakorolt hatása mellett.

Fő célkitűzéseim az alábbi pontokban foglalhatók össze:

1. Nanoszálás poliszukcinimid-dopamin (PSI-DA) konjugátumok (kémiai kötés) előállítása elektrosztatikus szálképzéssel, illetve a különböző graftolási fok hatásának vizsgálata a hálók átlagos szálátmérőjére, és mechanikai tulajdonságaira.
2. Nanoszálás PSI-DA konjugátumok oldhatóságának vizsgálata, illetve a graftolási fok hatásának vizsgálata a DA-felszabadulásra.
3. Nanoszálás PSI-DA konjugátumok hatásának vizsgálata releváns sejtkultúrák (primer sejtkultúra és idegi eredetű sejtvonal) életképességére *in vitro* körülmények között. A konjugátumok sejtekbe történő bejutásának vizsgálata.
4. Prednizonnal töltött polivinil-alkohol-, PSI- és  $\epsilon$ -polikaprolakton-alapú nanoszálás hálók létrehozása. A különböző mennyiségű prednizon szálátmérőre, illetve mechanikai tulajdonságokra gyakorolt hatásának elemzése, a különböző polimerek hatóanyag-felszabadulásra gyakorolt hatásának vizsgálata mellett. Prednizon-tartalmú szálás rendszerek potenciális gyulladáscsökkentő-hatásának feltérképezése *in vitro* körülmények között.
5. PSI-alapú, doxorubicinnel töltött (Dox/PSI) és konjugált (PSI-Dox) nanoszálás hálók létrehozása. A hatóanyag-konjugálás, illetve töltés hatásának összehasonlítása a hatóanyag-felszabadulás, a potenciális *in vitro* citotoxicitás és a sejtekbe történő bejutás tekintetében.

### 3. Módszerek

#### 3.1. Nanoszálal hatóanyag tartalmú polimerek előállítás

A hatóanyag polimerszálakba juttatása tekintetében az elektrosztatikus szálképzés során két fő stratégiát alkalmaztam:

- a hatóanyagot előzetesen konjugáltam kémiai kötésekkel a polimerhez (poliszukcinimidhez) a szálhúzás előtt,
- a hatóanyagot a polimer oldathoz kevertem rögtön a szálhúzás előtt.

Polimer-hatóanyag konjugátumok:

PSI-DA **GF1** (GF: grafitolási fok); PSI-DA **GF2**; PSI-DA **GF4**;  
PSI-DA-AE **1:2** (AE: aminoetanol); **PSI-Dox** konjugátum.

Hatóanyaggal töltött szálal rendszerek:

Pred/**PVA**; Pred/**PSI**; Dox/**PSI**; Pred/**PCL**.

A különböző polimerek, hatóanyagok, illetve polimer-hatóanyag konjugátumok fizikokémiai tulajdonságainak megfelelő oldószert alkalmaztam (dimetil-szulfoxid, dimetil-formamid, tetrahidrofurán, etanol, víz) az elektrosztatikus szálhúzásra alkalmas viszkózus oldat előállításá érdekében.

Az elektrosztatikus szálképző készülék három részegységből áll: nagyfeszültségű tápegység (feszültség: 10-20 kV), pumpára csatlakoztatott fém tű (térfogatáram: 0,3-1 ml/h), és a földelt, alufóliával borított céltárgy (10-15 cm távolságban), amelyre a képződött szálal érkeznek.

#### 3.2. A szálal struktúrák fizikokémiai és mechanikai jellemzése

A hatóanyag jelenlétét, illetve az elektrosztatikus szálképzés kémiai szerkezetre gyakorolt hatását Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópiával (FT-IR, *Jasco FT/IR-4700A, ATR Pro ONE, JASCO Ltd.*) vizsgáltam.

A PSI-Dox konjugátum esetében a módosítás sikerességét mágneses magrezonancia spektroszkópiával (NMR, *Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA*) is vizsgáltam.

Az elektrosztatikus szálképzés hatóanyag kristályszerkezetére gyakorolt hatását röntgendiffrakcióval (XRD, *PANalytical X'Pert3 Powder diffractometer, Malvern Panalytical B.V., The Netherlands*) határoztam meg a prednizonnal töltött szálak (Pred/PVA, Pred/PSI, Pred/PCL) esetén.

A szálas struktúrák morfológiáját és a szálak átlagos átmérőjét pásztázó elektronmikroszkópiával (SEM, *Quanta400F*) készült felvételek alapján határoztam meg.

A hálók mechanikai tulajdonságait egyirányú, elmozdulás kontrollált húzást biztosító készülékkel vizsgáltam (*Instron 5942, USA*).

### **3.3. Hatóanyag tartalmú szálas rendszerek oldhatóságának és hatóanyag kioldódási profiljának vizsgálata**

Vizsgáltam a PSI-DA hatóanyag-hordozó konjugátumok oldhatósági kinetikáját, valamint a DA, Dox és Pred-tartalmú hálók esetén a hatóanyag felszabadulásának kinetikáját biológiailag releváns körülmények között.

A PSI-DA konjugátumok oldhatóság-vizsgálata során, illetve a Pred-nal töltött PVA (Pred/PVA), PSI (Pred/PSI), PCL (Pred/PCL), valamint a Dox-nal töltött PSI (Dox/PSI) szálak esetén a hatóanyag felszabadulás vizsgálat során a szálas mintákat egy selyem filterbe helyeztem.

A hatóanyag felszabadulás vizsgálata során a konjugátumok (PSI-DA és PSI-Dox), illetve a Dox-szal töltött PSI szálak (Dox/PSI) esetében, a szálas mintákat dialízis membránba helyeztem (3,5 kDa), a membránon átjutó hatóanyag abszorbanciáját UV-Vis spektrofotométerrel határoztam meg (*Agilent 8453, Agilent Technologies, USA*).

A kioldóközeg PSI-DA konjugátumok esetén 37°C-os, pH 7,4-es foszfát pufferoldat (PBS) volt. Ebben az esetben a DA felszabadulását  $\alpha$ -kimotripszin enzim jelenlétében is vizsgáltam.

A Pred és Dox-tartalmú minták esetén (Pred/PVA, Pred/PSI, Dox/PSI, Pred/PCL, PSI-Dox) a pH 7,4-es PBS oldat mellett,

pH 6,5-ös PBS oldatban is vizsgáltam a hatóanyag felszabadulás profilját.

### **3.4. Hatóanyag tartalmú szálas minták sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata *in vitro* körülmények között**

A PSI-DA konjugátumok sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálatához humán foggyökérhártya eredetű összejt (PDLSC) tenyészeteket és humán neuroblasztóma eredetű SH-SY5Y sejt vonalat használtam.

Ezeket a sejt típusokon a dopamin 1-es és 2-es receptorok (D1R, D2R) jelenlétét immuncitokémiai módszerrel, fluoreszcens mikroszkóp segítségével (*Nikon Eclipse E600, Nikon Instruments*) vizsgáltam, a sejtek konjugátumok jelenlétében mutatott életképességét WST-1 reagens segítségével határoztam meg.

A Pred (Pred/PVA, Pred/PSI, Pred/PCL) és Dox-tartalmú (Dox/PSI és PSI-Dox) szálas minták esetében MDA-MB-231 tripla negatív emlőtumor sejtek életképességét CellTiter Glo reagens segítségével határoztam meg.

A sejtek morfológiáját különböző mikroszkópos technikákkal (fáziskontraszt mikroszkópia (*Nikon Eclipse TS100, Nikon, Japan; Axio Observer A1, Zeiss, Germany*), kétfoton mikroszkópia (*Femto2d, Femtonics, Hungary*)) figyeltem meg.

A konjugátumok (PSI-DA és PSI-Dox) sejtek által történő internalizációját konfokális mikroszkóp segítségével (*Nikon Eclipse Ti2*), illetve áramlási citometriával (*CytoFLEX S, Beckman Coulter, Inc. USA*) vizsgáltam.

A Pred-tartalmú szálas minták (Pred/PVA, Pred/PSI, Pred/PCL) MDA-MB-231 sejtek citokin-termelésére gyakorolt hatását LEGENDplex kit-tel vizsgáltam (*BioLegend LEGENDplex (13 plex), San Diego, USA*), áramlási citometria segítségével.

## 4. Eredmények

### 4.1. Fizikokémiai és mechanikai karakterizálás (T1., T4.)

Az FT-IR eredmények alapján a különböző graftolási fokkal rendelkező PSI-DA konjugátumok, illetve a PSI-DA-AE 1:2 konjugátum esetén a módosítás sikeres volt, illetve az elektrosztatikus szálképzéssel történő formulázás nem befolyásolta a konjugátumok kémiai szerkezetét (KT1).

A Pred-tartalmú PVA, PSI és PCL hálók esetén az FT-IR eredmények alátámasztják a Pred jelenlétét a szálakban. A Dox-tartalmú minták esetében (PSI-Dox konjugátum és Dox-nal töltött PSI szálak (Dox/PSI)) bizonyítottuk a Dox jelenlétét a szálakban, a konjugáció sikerességét a <sup>1</sup>H-NMR spektrum igazolja. A XRD mérések eredményei alapján az elektrosztatikus szálképzés hatására a Pred kristályos szerkezete amorffá alakul (KT2). A SEM és 2-foton mikroszkópos felvételek alapján elmondható, hogy a polimerhez konjugált DA növekvő mennyisége kisebb átlagos szálátmérőt eredményez (1. táblázat) (KT1).

1. táblázat: PSI-DA konjugátumok szálátmérője és mechanikai paraméterei.

Minta	Szálátmérő [nm]	Fajlagos teherbírás [Nm <sup>2</sup> ·g <sup>-1</sup> ]	Kezdeti modulusz [N·mm <sup>-1</sup> ]
PSI-DA GF4	613 ± 172	0.039 ± 0.008	0.448 ± 0.061
PSI-DA GF2	179 ± 27	0.022 ± 0.007	0.490 ± 0.066
PSI-DA GF1	78 ± 15	0.010 ± 0.005	0.303 ± 0.130

A mechanikai vizsgálatok alapján a PSI-DA konjugátumok esetén a magasabb DA-tartalom (GF4<GF2<GF1) csökkenő fajlagos teherbíróképességet eredményez, azonban a hálók kezdeti modulusz értéke független a dopamin-tartalomtól (KT1).

A Pred bejuttatása PSI és PCL szálakba nem befolyásolja jelentősen az átlagos szálátmérőt, viszont PVA esetében az átlagos szálátmérő nő az alkalmazott Pred mennyiségével (2. táblázat) (KT2).



**2. táblázat:** Prednizon-tartalmú PVA, PSI és PCL szálak szálátmérője és mechanikai paramétereit.

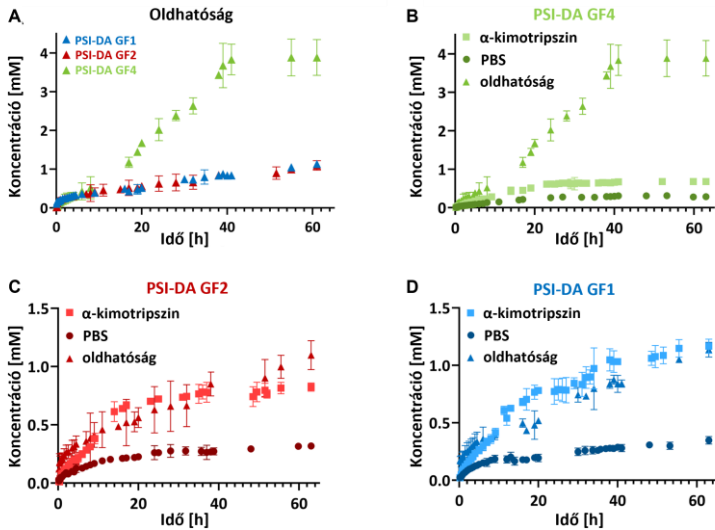
Polimer	Pred-tartalom	Szálátmérő [nm]	Fajlagos teherbírás [Nm <sup>2</sup> ·g <sup>-1</sup> ]	Kezdeti modulusz [Nm <sup>2</sup> ·(mm·g <sup>-1</sup> )]
PVA	Neat	157 ± 61	0.151 ± 0.006	2.794 ± 0.339
	0.5%	212 ± 56	0.164 ± 0.009	1.972 ± 0.212
	1%	497 ± 117	0.081 ± 0.005	0.650 ± 0.104
PSI	Neat	584 ± 113	0.233 ± 0.009	0.701 ± 0.019
	0.5%	426 ± 84	0.126 ± 0.005	1.680 ± 0.099
	1%	616 ± 102	0.136 ± 0.009	2.373 ± 0.270
PCL	Neat	583 ± 255	0.018 ± 0.004	0.007 ± 0.001
	0.5%	546 ± 261	0.139 ± 0.004	0.043 ± 0.003
	1%	610 ± 299	0.165 ± 0.012	0.050 ± 0.006

A Pred-tartalmú szálak tekintetében PVA esetén magasabb Pred koncentráció alacsonyabb fajlagos teherbíró képességhez, kezdeti moduluszhoz és maximális megnyúláshoz vezet. PSI esetében a növekvő Pred-tartalom hatására a fajlagos teherbíróképesség csökken, de a kezdeti modulusz növekszik. PCL esetén az alkalmazott Pred mennyisége egyenesen arányosan növeli a fajlagos teherbíró képességet, a kezdeti moduluszt és a maximális megnyúlást (**KT2**).

Dox bejuttatásának hatására a PSI szálak átlagos átmérője csökken (Dox/PSI: 467 ± 107 nm; PSI-Dox (545 ± 90 nm) a hatóanyagmentes PSI szálakhoz (584 ± 113 nm) képest, de a különbség nem jelentős (**KT2**).

#### **4.2. Hatóanyag-tartalmú szálak rendszerek oldhatóságának és hatóanyag-kioldódási profiljának vizsgálata (T2., T5., T4.)**

A hidrofób poliszukcinimid oldhatósága szignifikánsan nő a dopamin-konjugálás következtében: 42,3%; 7,6% és 6,6% oldódott be a PSI-DA GF4, GF2, GF1 konjugátumokból (**1. ábra**).

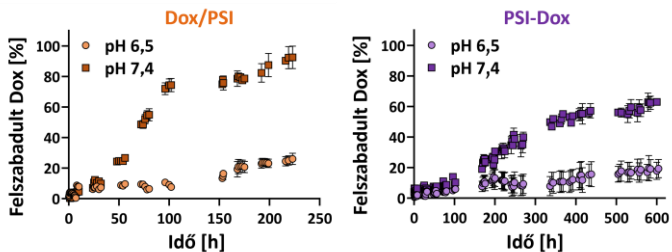


**1. ábra:** PSI-DA szálas konjugátumok oldhatósága foszfát pufferben (A) és DA-felszabadulási profilja (B, C, D).

A GF4-es konjugátum esetén a szabad szukcinimid gyűrűk hidrolízise 8 óra elteltével hirtelen megemelte a beoldódott konjugátum mennyiségét. A PSI-DA konjugátumok elnyújtott hatóanyag felszabadulást biztosítanak 7,4-es pH-jú PBS-ben: a GF4-es konjugátumról szabadul fel a legtöbb dopamin 65 óra elteltével (20,5%), ezt követi a GF2 (14,5%) és a GF1 (13,4%) konjugátum. A kinetikai vizsgálat alátámasztja, hogy a dopamin-felszabadulás a szálak felületéről történik és nem a konjugátumok beoldódása a limitáló lépés (**KT1**). A DA-felszabadulás  $\alpha$ -kimotripszin enzim jelenlétében 65 óra elteltével: 49,2% (GF4); 38,1% (GF2); 45,1% (GF1) szignifikánsan magasabb, mint enzimmentes környezetben (**KT1**).

A PSI-Dox konjugátum esetében a hatóanyag és a polimer közötti kémiai kötés észrevehetően elnyújtottabb Dox-felszabadulást biztosít (200 h után pH 6,5 esetén 13,8%, míg

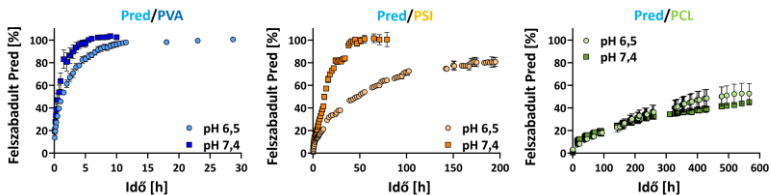
pH 7,4 esetén 30,7%) a Dox-nal töltött szálakhoz (Dox/PSI) képest (200 h elteltével pH 6,5 esetén 23,2%, míg pH 7,4 esetén 87,5%) (2. ábra) (KT2).



2. ábra: Hatóanyag felszabadulás Dox-na töltött PSI szálak (Dox/PSI) és Dox-nal konjugált PSI szálak (Dox-PSI) esetén.

Mind a konjugálás, mind a töltés esetén a hatóanyag felszabadulás gyorsabb és teljesebb pH 7,4-es pufferoldatban, mint pH 6,5-ös oldatban (KT2).

A hidrofíl PVA kezdetben pillanatszerű, majd rövid időn belül végbemenő (6-8 h) Pred-felszabadulást biztosít, míg a hidrofób PSI és PCL elnyújtottabb hatóanyag leadási profillal rendelkezik (3. ábra) (KT2).

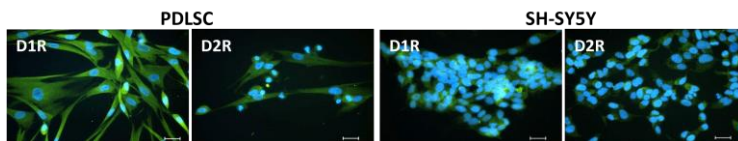


3. ábra: Pred-felszabadulás Pred-nal töltött PVA, PSI és PCL hálóból.

A PVA és PSI esetén a pH 7,4-es pufferoldatban a Pred-felszabadulás gyorsabb (6 h elteltével: 100% (PVA); 27,4% (PSI)), mint a pH 6,5 pufferoldatban (6 h elteltével 86,8% (PVA) és 15,3% (PSI)), viszont PCL esetében nem számottevő ez a különbség (KT2).

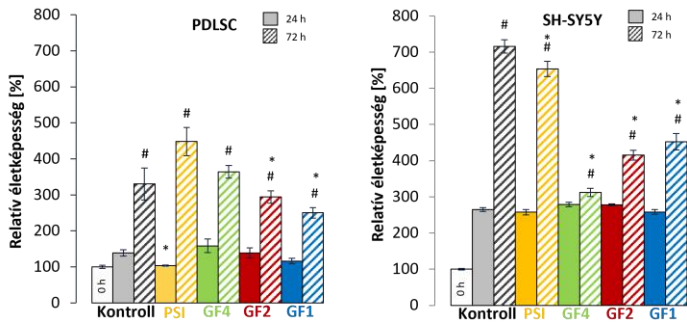
#### 4.3. Hatóanyag tartalmú szálas minták sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata *in vitro* körülmények között (T3., T4., T5.)

Az immuncitokémiai vizsgálat alapján megállapítható, hogy mind a PDLSC sejtek, mind az SH-SY5Y sejtek tartalmaznak D1R és D2R dopamin receptorokat, így alkalmasak a DA-tartalmú szálas minták vizsgálatára (4. ábra) (KT1).



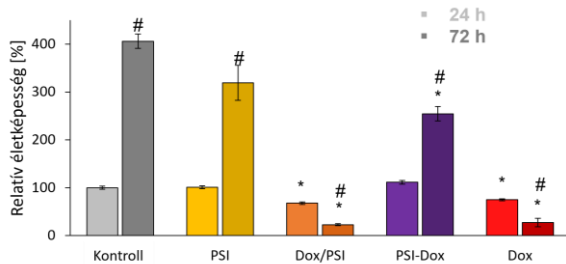
4. ábra: D1R és D2R receptorok jelenlétének immuncitokémiai vizsgálata PDLSC és SH-SY5Y sejteken. A sejtmag kékekkel látható (DAPI), míg a DA receptorok zölddel, a sejtek citoplazmájában. Mércse: 20  $\mu\text{m}$  minden esetben.

Az *in vitro* életképesség vizsgálatok alapján a PSI-DA-AE 1:2 konjugátum a szabad dopaminhoz képest magasabb koncentrációban alkalmazható citotoxikus hatás nélkül a humán foggyökérhártya eredetű őssejt (PDLSC) tenyészetek és az SH-SY5Y humán neuroblasztóma sejtvonal esetében. 200  $\mu\text{M}$  DA 72 óra alatt elpusztítja az összes PDLSC sejtet, illetve gátolja az SH-SY5Y sejtek növekedését. Ezzel szemben 200  $\mu\text{M}$  PSI-DA-AE 1:2 konjugátum nem toxikus a PDLSC sejtekre nézve és nem csökkenti az SH-SY5Y sejtek proliferációs képességét. Ezen felül mind a PDLSC, mind a SH-SY5Y sejtek képesek proliferálni a szálas PSI-DA konjugátumok jelenlétében a kezelés 24 órájáról a kezelés 72 órájára még relatív magas, 300  $\mu\text{M}$  DA-ra vonatkoztatott koncentrációban alkalmazva is (5. ábra) (KT1).



**5. ábra:** Szálas PSI-DA konjugátumok PDLSC és SH-SY5Y sejtekre gyakorolt hatása 24 és 72 h kezelés követően. \*Szignyifikáns különbség az adott napi kontrollhoz képest. #Szignyifikáns különbség a 24 órás kezeléshez képest.

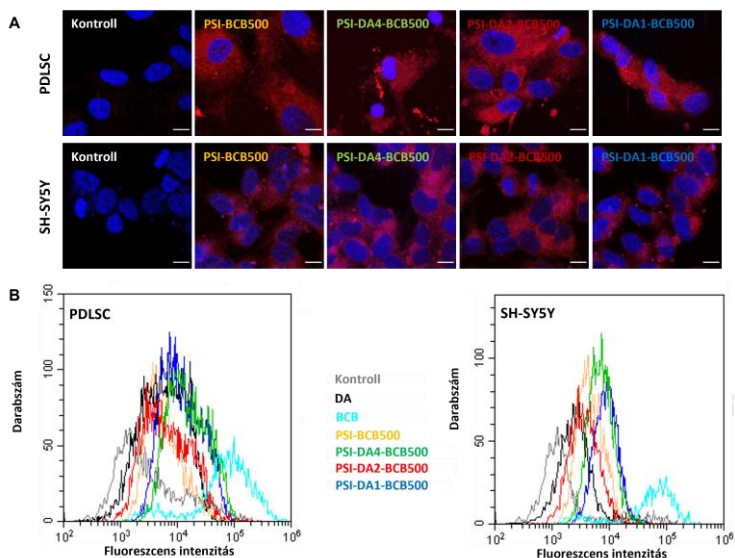
A konjugátumok elnyújtott hatóanyag leadásának köszönhetően nem csak a DA-tartalmú konjugátumok esetében érvényes az a megállapítás, hogy a sejtek konjugált formában nagyobb koncentrációban képesek tolerálni az alkalmazott, szabad formában citotoxikus hatóanyagot, hanem Dox-szal konjugált minta esetében is (**6. ábra**).



**6. ábra:** Szálas Dox-tartalmú minták MDA-MB-231 sejtekre gyakorolt hatása 24 és 72 h kezelés követően. \*Szignyifikáns különbség az adott napi kontrollhoz képest. #Szignyifikáns különbség a 24 órás kezeléshez képest.

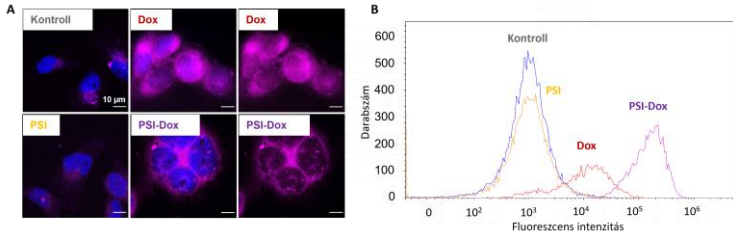
Az ugyanakkora koncentrációban (1  $\mu$ M) alkalmazott szálas PSI-Dox konjugátum kevésbé citotoxikus (relatív életképesség: 111% és 254% 24 és 72 óra után) az MDA-MB-231 sejtekre nézve, mint a Dox-nel töltött PSI hálók (Dox/PSI)

(relatív életképesség: 68% és 23% 24 és 72 kezelés után) (KT2).



**7. ábra:** Széles PSI-DA konjugátumok internalizációjának vizsgálata konfokális mikroszkópiával (A) és áramlási citometriával (B). Mércse: 10  $\mu$ m minden esetben (A).

A **7. A ábrán** homogén (vörös) fluoreszcens jel figyelhető meg a sejtek citoplazmájában, ami a PSI-DA konjugátumok internalizációját bizonyítja. A PSI-DA konjugátumok sejtek általi felvétele kvantifikálható áramlási citometriával (**7. B ábra**). Az eredmények alapján a brillantkrezilkék (BCB) festékkel jelölt konjugátumok fluoreszcens intenzitása a kezeltlen sejtek (Kontroll) és a csak festékkel kezelt (BCB) sejtek között található, ami a konjugátumok PDLSC és SH-SY5Y sejtekbe történő bejutását igazolja (KT1).



**8. ábra:** Szálás PSI-Dox konjugátum internalizációjának vizsgálata konfokális mikroszkópiával (A) és áramlási citometriával (B). Mércse: 10 µm minden esetben (A).

PSI-Dox konjugátummal kezelt sejtek esetében a Dox bejutását jelző (lila) fluoreszcens jel szintén megfigyelhető az MDA-MB-231 sejtek esetében is. Habár a PSI-Dox konjugátum elősegíti a Dox internalizációját az áramlási citometria eredmények alapján (**8. B ábra**), szignifikánsan kevesebb hatóanyag képes bejutni a sejtek magjába (**8. A ábra**), tehát a konjugált formában lévő Dox nem képes erős citotoxikus hatás kifejtésére (**KT2**).

A citokin-profil vizsgálat alapján a Pred csökkenti 6 féle, az MDA-MB-231 sejtek által termelt citokin (IL-1 $\beta$ ; IL-6; IL-10; IL-18; IL-33; MCP-1) szintjét, ami igazolja a gyulladáscsökkentő hatását az implantálható nanoszálak struktúrák esetén is. 400 µM Pred-nal történő kezelés esetén a relatív citokin-szint a felsorolt citokinekre: 49,2; 56,8; 68,0; 81,5; 63,9; 55,6% (**KT2**).

## 5. Következtetések

A biokompatibilis, elektrosztatikus szálképzéssel előállított, nanoszálás hatóanyag hordozó rendszerek nagy fajlagos felületüknek és a hatóanyag emelkedett biohasznosulásához vezető amorf kristályszerkezetüknek köszönhetően ígéretes jelöltek lehetnek különböző gyógyszeres terápiák esetén. A hatóanyag polimerhez történő konjugálásával elkerülhető a hatóanyag inaktiválódása a funkciójának betöltése előtt, valamint degradációja és gyors kiürülése is a szervezetből.

A fentebb bemutatott eredmények alapján elmondható, hogy az előállított különféle komplex polimer-hatóanyag rendszerek biokompatibilitásuknak és szabályozható hatóanyag leadó képességüknek köszönhetően a későbbiekben alkalmazhatóak lehetnek klinikai terápiában, lokálisan kifejtve hatásukat. Ezek a nanoszálás rendszerek megnövelhetik a gyógyszeres terápia hatékonyságát, ugyanis segítségükkel csökkenthető az alkalmazott dózis mennyisége, illetve használatuk során kevesebb mellékhatással kell számolunk a tradicionális gyógyszerekhez viszonyítva.

Disszertáció főbb, új tudományos eredményei a következő pontokban foglalhatók össze:

**T1.:** Sikeresen előállítottam dopaminnal (DA) konjugált poliszukcinimidet (PSI-DA) különböző grafitolási fokokkal (GF: 1, 2, 4) elektrosztatikus szálképzéssel. A polimerhez konjugált dopamin növekvő mennyisége kisebb átlagos szálmérőt eredményez (GF4:  $613 \pm 172$  nm; GF2:  $179 \pm 27$  nm; GF1:  $78 \pm 15$  nm), mely alacsonyabb fajlagos teherbíró képességgel jár (GF4:  $0,039 \pm 0,008$  Nm<sup>2</sup>·g<sup>-1</sup>; GF2:  $0,022 \pm 0,007$  Nm<sup>2</sup>·g<sup>-1</sup>; GF1:  $0,010 \pm 0,005$  Nm<sup>2</sup>·g<sup>-1</sup>). A hálók kezdeti modulusz értéke független a dopamin-tartalomtól, az értékek 0,3 és 0,5 N·mm<sup>-1</sup> között találhatók az összes PSI-DA konjugátum esetében (**KT1**).

**T2.:** A hidrofób poliszukcinimid oldhatósága szignifikánsan nő a dopamin katekol-csoportjának következtében: 42,3%;



7,6% és 6,6% oldódott be a GF4, GF2, GF1 konjugátumokról ilyen sorrendben. A GF4-es konjugátum esetén a szabad szukcinimid gyűrűk hidrolízise 8 óra elteltével hirtelen megemeli a beoldódott konjugátum mennyiségét. A PSI-DA konjugátumok elnyújtott hatóanyag felszabadulást biztosítanak foszfát pufferben: a GF4-es konjugátumról szabadul fel a legtöbb dopamin 65 óra elteltével (20,5%), ezt követi a GF2 (14,5%) és a GF1 (13,4%) konjugátum. A kinetikai vizsgálat alátámasztja, hogy a dopamin-felszabadulás a szálak felületéről történik és nem a konjugátumok beoldódása a limitáló lépés. A dopamin-felszabadulás  $\alpha$ -kimotripszin enzim jelenlétében 65 óra elteltével: 49,2% (GF4); 38,1% (GF2); 45,1% (GF1) szignifikánsan magasabb, mint enzimmentes környezetben (**KT1**).

**T3.:** Bebizonyítottam, hogy a PSI-DA-AE 1:2 konjugátum a szabad dopaminhoz képest magasabb koncentrációban alkalmazható citotoxikus hatás nélkül a humán foggyökérhártya eredetű őssejt (PDLSC) és az SH-SY5Y humán neuroblasztóma sejtvonal esetében. 200  $\mu$ M DA 72 óra alatt elpusztítja az összes PDLSC sejtet, illetve gátolja az SH-SY5Y sejtek növekedését. Ezzel szemben 200  $\mu$ M PSI-DA-AE 1:2 konjugátum nem toxikus a PDLSC sejtekre nézve és nem csökkenti az SH-SY5Y sejtek proliferációs képességét. Ezen felül mind a PDLSC, mind a SH-SY5Y sejtek képesek proliferálni a szálas PSI-DA konjugátumok jelenlétében a kezelés 24 órájáról a kezelés 72 órájára (300  $\mu$ M DA-ra vonatkoztatott koncentrációban alkalmazva).

Immuncitokémiai módszerrel megállapítottam, hogy a PDLSC sejtek rendelkeznek D1R és D2R dopamin receptorokkal. Áramlási citometriával és konfokális mikroszkópiával kimutattam, hogy a PSI-DA konjugátumok képesek bejutni mind a PDLSC mind az SH-SY5Y sejtekbe (**KT1**).

**T4.:** Megállapítottam, hogy a prednizon (Pred) poliszukcinimid (PSI) és  $\epsilon$ -polikaprolakton (PCL) szálakba

történő juttatása nem befolyásolja jelentősen az átlagos szálátmérőt (PSI: 420-460 nm; PCL: 540-610 nm). Polivinil-alkohol (PVA) esetében az átlagos szálátmérő egyenesen arányos az alkalmazott Pred mennyiségével:  $157 \pm 61$  (0% Pred);  $212 \pm 56$  (0,5% Pred) és  $497 \pm 117$  nm (1% Pred). Magasabb Pred koncentráció alacsonyabb fajlagos teherbíró képességhez ( $0,151 \pm 0,006$  (0% Pred);  $0,164 \pm 0,009$  (0,5% Pred) és  $0,081 \pm 0,005$   $\text{Nm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  (1% Pred)), kezdeti moduluszhoz ( $2,794 \pm 0,339$  (0% Pred);  $1,972 \pm 0,212$  (0,5% Pred) és  $0,650 \pm 0,104$   $\text{Nm}^2 \cdot (\text{mm} \cdot \text{g}^{-1})$  (1% Pred)) és maximális megnyúláshoz ( $7,8 \pm 0,7$  (0% Pred);  $3,8 \pm 0,2$  (0,5% Pred) és  $2,6 \pm 0,2$  mm (1% Pred)) vezet.

PSI esetében a növekvő Pred-tartalom hatására (0; 0,5; 1%) a fajlagos teherbíróképesség csökken ( $0,233 \pm 0,009$ ;  $0,126 \pm 0,005$ ;  $0,136 \pm 0,009$   $\text{Nm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ), de a kezdeti modulusz növekszik ( $0,701 \pm 0,0019$ ;  $1,680 \pm 0,099$ ;  $2,373 \pm 0,270$   $\text{Nm}^2 \cdot (\text{mm} \cdot \text{g}^{-1})$ ).

PCL esetén az alkalmazott Pred mennyisége (0; 0,5; 1%) egyenesen arányosan növeli a fajlagos teherbíró képességet ( $0,018 \pm 0,004$ ;  $0,139 \pm 0,004$ ;  $0,165 \pm 0,012$   $\text{Nm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ), a kezdeti moduluszt ( $0,007 \pm 0,001$ ;  $0,043 \pm 0,003$ ;  $0,050 \pm 0,006$   $\text{Nm}^2 \cdot (\text{mm} \cdot \text{g}^{-1})$ ) és a maximális megnyúlást ( $7,6 \pm 0,3$ ;  $35,4 \pm 0,9$ ;  $44,8 \pm 0,7$  mm).

A hidrofíli PVA kezdetben pillanatszerű, majd rövid időn belül végbemenő (6-8 h) Pred-felzabarádulást biztosít, míg a hidrofób PSI és PCL elnyújtottabb hatóanyag leadási profíllal rendelkezik. A PVA és PSI esetén a pH 7,4-es pufferoldatban a Pred-felzabarádulás gyorsabb (6 óra elteltével: 100% (PVA); 27,4% (PSI)), mint a pH 6,5 pufferoldatban (6 óra elteltével 86,8% (PVA) és 15,3% (PSI)), viszont PCL esetében nem számottevő ez a különbség.

A Pred csökkenti 6, MDA-MB-231 sejtek által termelt citokin (IL-1 $\beta$ ; IL-6; IL-10; IL-18; IL-33; MCP-1) szintjét, ami igazolja a gyulladáscsökkentő hatását az implantálható nanoszálak struktúrák esetén. (400  $\mu\text{M}$  Pred-nal történő

kezelés esetén a relatív citokin-szint a felsorolt citokinekre: 49,2; 56,8; 68,0; 81,5; 63,9; 55,6%.) (KT2).

**T5.:** Sikeresen konjugáltam doxorubicint (Dox) PSI polimerhez (PSI-Dox konjugátum), majd elektrosztatikus szálképzéssel nanoszálakat formuláltam ezekből, illetve doxorubicinnel töltött PSI-szálakból (Dox/PSI).

A PSI-Dox konjugátum esetében a hatóanyag és a polimer közötti kémiai kötés észrevehetően elnyújtottabb Dox-felszabadulást biztosít (200 óra után pH 6,5 esetén 13,81%, míg pH 7,4 esetén 30,67%) a Dox-nal töltött szálakhoz képest (200 óra elteltével pH 6,5 esetén 23,15%, míg pH 7,4 esetén 87,53%). Mind a konjugálás, mind a töltés esetén a hatóanyag-felszabadulás gyorsabb és teljesebb pH 7,4-es pufferoldatban, mint pH 6,5-ös oldatban, ami a PSI hidrolízisének a következménye.

Az ugyanakkora koncentrációban (1  $\mu$ M) alkalmazott szálas PSI-Dox konjugátum kevésbé citotoxikus (relatív életképesség: 111% és 254% 24 és 72 óra után) MDA-MB-231 sejtekre nézve, mint a Dox-nal töltött PSI hálók (Dox/PSI) (relatív életképesség: 68% és 23% 24 és 72 kezelés után), ami az elnyújtott hatóanyagleadás, illetve a különböző, sejtek általi internalizációs mechanizmus következménye.

Habár a PSI-Dox konjugátum elősegíti a Dox internalizációját az MDA-MB-231 sejtek esetében, szignifikánsan kevesebb hatóanyag képes bejutni a sejtek magjába, ezért a konjugált formában lévő Dox nem képes erős citotoxikus hatás kifejtésére (KT2).

## 6. Publikációk

### Értekezéshez kapcsolódó közlemények:

**KT1:** Tóth K., S. Nagy K., Güler Z., Juhász Á. Gy., Pállinger É., Varga G., Sarac A. S., Zrínyi M., Jedlovszky-Hajdú A., and Juriga D. Characterization of Electrospun Polysuccinimide-Dopamine Conjugates and Effect on Cell Viability and Uptake. *Macromolecular Bioscience*. 2023; 2200397.

**KT2:** Tóth K., Fekete N., Simon V. K., Tóth B., Kovács Á. F., Pállinger É., Antal I., Kőhidai L., Jedlovszky-Hajdú A., Juriga D., S. Nagy K. Different implantable electrospun meshes for simultaneous application of prednisone and doxorubicin. *Journal of Molecular Liquids*. 2023; 121854.

### Értekezéshez nem kapcsolódó közlemények:

Juriga D, Kálmán E., Tóth K., Barczikai D., Szöllősi D., Földes A., Varga G., Zrínyi M., Jedlovszky-Hajdú A., S. Nagy K. Analysis of Three-Dimensional Cell Migration in Dopamine-Modified Poly(aspartic acid)-Based Hydrogels. *GELS*. 2022; 8 (2) Paper 65.

Mészáros L., Tatár B., Tóth K., Földes A., S. Nagy K., Jedlovszky-Hajdú A., Tóth T., Molnár K. Novel, Injection Molded All-Polyethylene Composites for Potential Biomedical Implant Applications. *Journal of Materials Research and Technology*. 2022; 17:743-755.

S. Nagy K., Tóth K., Pállinger É., Takács A., Kőhidai L., Jedlovszky-Hajdú A., Máthé D., Kovács N., Veres D. S., Szigeti K., Molnár K., Krisch E., Puskás J. E. Folate-Targeted Monodisperse PEG-Based Conjugates Made by Chemo-Enzymatic Methods for Cancer Diagnosis and Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22 (19) Paper 10347.