

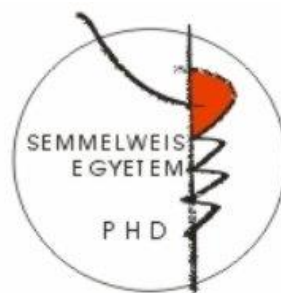
POTENCIÁLIS TUMORELLENES RÉZKELÁTOROK KOMPLEX VIZSGÁLATA

Doktori tézisek

Gaál Anikó

Semmelweis Egyetem

Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szoboszlai Norbert, Ph.D., egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók:

Dr. Tábi Tamás, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Laczka Csilla, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Török Tamás, D.Sc., ny. egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Oltiné Varga Margit, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Völgyi Gergely, Ph.D., egyetemi docens

Budapest

2020

1. Bevezetés

A rákos megbetegedések világszerte a második leggyakoribb haláloknak számítanak. Az előrehaladott stádiumú betegségek kezelése továbbra is jelentős klinikai probléma, annak ellenére, hogy számos tumorterápiás gyógyszer áll rendelkezésre, a legkülönbözőbb daganatellenes hatásmechanizmussal. A ciszplatin ([cisz-diammin-dikloro-platina(II)-komplex]) felfedezése alapozta meg a fém alapú vegyületek alkalmazását számos ráktípus, köztük hererák, petefészekrák vagy mellrák kezelésére. A második és harmadik generációs platina (Pt) alapú gyógyszereket fejlesztették ki annak érdekében, hogy csökkentsék a ciszplatin toxicitását és a kezeléssel szemben fellépő rezisztenciát. További Pt-alapú vegyületek fejlesztése intenzív kutatások tárgyát képezi. Ezzel párhuzamosan alternatív fém alapú komplexeket alkalmazása is felmerült. A rézzel (Cu) kelátképző vegyületek, illetve rézkomplexek használata is felmerült, tekintettel ezek nagyfokú *in vitro* toxicitására. A réz kelátképző ligandumok jellemző példái a ditiokarbamát, 8-hidroxi-kinolin, tioszemikarbazon és fenantrolin szerkezetek származékai. Ezek a ligandumok stabil és erősen toxikus rézkomplexeket képeznek, amelyek hatékonyságot mutatnak, még a multidrogrezisztens sejtvonalakon is. A Cu esszencialitása részben kapcsolódik, hogy a Cu részt vesz az alapvető elektronátadási folyamatokban a Cu(II) redukcióján keresztül. Ugyanez az elektroncserélő reakció ugyanakkor szabad gyököket is generál, amelyek károsak lehetnek a sejtekre. A sejtek hatékonyan védik az intracelluláris környezetet azáltal, hogy megkötik a rézionokat, így elrejtik a sejtes alkotóelemektől, ezáltal megakadályozzák a szabad ionos réz felhalmozódását. A rézkelátorok megkerülhetik ezeket a védekező folyamatokat. Az a mechanizmus, amellyel a réz növeli egyes kelátképző vegyületek toxicitását, nem ismert. A réz kelátképző ionoforok toxicitását általában a réz jelentős intracelluláris felhalmozódása kíséri, amely feltehetőleg sejthalál mechanizmusokat indukál.

A különböző gyógyszerhordozó nanorendszerek, például a liposzómák felhasználhatók rézkomplexek előállítására. A liposzómák különféle méretben állíthatók elő, a kívánt *in vivo* alkalmazástól függően, és a molekulák széles skálája liposzómázható. A 100 nm átmérőjű liposzómákról kimutatták, hogy jelentősen hosszabb ideig maradnak a keringésben, mint a nagyobb méretű liposzómák. A legtöbb nanohordozó Az EPR effektus miatt a rosszindulatú szöveteket célozza az egészséges szövetekkel szemben, még célzó ligandum hiányában is. Bár számos Cu-komplexet szintetizáltak rákellenes

szerekként, *in vivo* hatékonyságuk megkérdőjelezhető, és a klinikai vizsgálat alatt jelenleg nincsenek ígéretes rézkomplexek. A klinikai fejlesztés fő problémája a rézkomplexek nagyfokú toxicitása és kis szelektivitása. Mind a szelektív célzás, mind pedig a toxicitás csökkentése megvalósítható nanoformulációs stratégiákkal, amelyekhez további homing (célzó) rendszer kapcsolható. A liposzómás kapszulák megoldást nyújthatnak a citotoxikus rézkomplexek koncentrációjának növelésére a daganatban, miközben csökkentik a vérkoncentrációt, és ezáltal csökkentik az általános toxicitást. Az aktív célzás például termoszenzitív liposzómák és enyhe hipertermia alkalmazásával érhető el a nemkívánatos toxicitás további csökkentése és a gyógyszerbejuttatás fokozása érdekében.

2. Célkitűzés

Doktori munkám során célul tűztem ki különböző alapszerkezettel rendelkező (tioszemikarbazon, fenantrolin, ditiokarbamát, kinolin és tiokarbazon) kelátor jellegű struktúrák citotoxikus hatásának szisztematikus vizsgálatát réz(II) ionokkal összefüggésben, alátámasztva minden esetben az intracelluláris rézfelhalmozódás mérésével. Az intracelluláris fémtartalmakat nemcsak réz, hanem vas és cink tekintetében elemeztem. Emellett választott vegyületek liposzómás célbajuttatására kerestem megoldásokat rézionok jelenlétében.

Célkitűzéseim alapján három irányt vettem kísérleteim. Egyrészt kísérleteket állítottam fel annak tanulmányozására, hogy fiziológias körülmények között, humán sejtvonalakon és testi sejteken vizsgálva a kelátor és fémkomplexei milyen hatással vannak a sejtek fémhomeosztázisra, vagyis különböző kezelések hogyan változtatják meg az intracelluláris fémkoncentrációkat. Másrészt különböző *in vitro* teszteket végeztem mind a kelátor, mind a kelátor fémkomplexeinek tekintetében, vizsgálva az anyagok és komplexeik citotoxicitását és ennek mechanizmusát. Harmadrészt pedig a vizsgált kelátor jellegű struktúrák *in vivo* alkalmazhatóságát vizsgáltam, melyhez liposzómás célbajuttatást dolgoztam ki réz(II) ionok jelenlétében.

3. Módszerek

3.1. Vegyszerek

Kísérletekhez használt Milli-Q nagy tisztaságú víz $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ fajlagos ellenállású volt. (Merck-Millipore, Molsheim, Franciaország). Minden alkalmazott vegyszer és reagens analitikai tisztaságú volt. A különböző kelátor jellegű struktúrák (*Táblázat 1*) a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) termékei. A Q4 kelátort Dr. Szakács Gergely adományozta. A vegyületek DMSO-ban oldva kerültek felhasználásra, kivételt képez a neokuproin sósavas sója, ami Milli-Q vízben került feloldásra a liposzómák készítéséhez. A felhasznált lipidek: HSPC (hidrogénezett szója-foszfátidilkolin), DPPC (dipalmitoil-foszfátidilkolin) és disztearil-sn-glicero-foszfátidil-etanolamin-polietilén-glikol (DSPE-PEG) az Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA) termékei.

3.2. *In vitro* vizsgálatok

3.2.1. *Sejtvonalak és sejtenyésztés*

A következő rákos sejtvonalakon történtek kísérletek: HT-29, HCT-15, HCT-116 humán vastagbél adenokarcinóma, C-26 egér vastagbél karcinóma; A-375 melanoma; MCF-7, MDA-MB-231 és ZR-75-1 emlő adenokarcinómák; Caov-3 és OVCAR-3 humán petefészek karcinóma; PANC-1 hasnyálmirigy; H358 tüdő és HT-1080 fibroszarkóma. A sejtvonalakat az ATCC-től kerültek beszerzésre (Manassas, Virginia, USA). A sejtes kísérletek a Semmelweis Egyetem II. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében, az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport laboratóriumában és Természettudományi Kutatóközpont Enzimológiai Intézetében kerültek kivitelezésre. Normál testi sejtes kontrollként alvadásgátló perifériás vérből izolált monomorfonukleáris sejteket (PBMC) használtunk, amiket Ficolos gradienscentrifugálással nyertünk ellenőrzött donorokból. A sejtvonalak DMEM tápfolyadékban kerültek tenyésztésre (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 4500 mg/L glükóztartalommal, 10% FBS (fetal bovine serum) hozzáadásával), 37°C -on, 5% CO_2 atmoszférában. A sejtek passzálása tripszin-EDTA oldat segítségével (5,0 g/L sertés-tripszin és 2,0 g/L $\text{EDTA}\cdot 4\cdot\text{Na}$, 0,9 v/v %-os NaCl oldatban került kivitelezésre.

3.2.2. *In vitro* citotoxikus hatást jellemző IC_{50} értékek meghatározása

A citotoxikus hatást jellemző IC_{50} értékek (sejtek 50%-a élő a kontroll sejtekhez viszonyítva a kezelés hatására) meghatározására PrestoBlue, szulforodamin B (SRB),

MTT (3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid) teszteket alkalmaztam, amelyeket gyártói instrukciók alapján ill. a különböző laborokban publikált módon végeztem 96 well sejtenyésztő lemezekben.

3.3. *In vitro* citotoxikus hatás mechanisztikus vizsgálatai

3.3.1. *Apoptózis vizsgálata*

Az kelátorok által kiváltott apoptózis áramlási citometriával (FACS) került tanulmányozásra annexin-V és propídium-jodid kettős jelöléssel.

3.3.2. *Reaktív oxigén gyökök (ROS) mérése*

A reaktív oxigén gyökök felszabadulásának mérése 2',7'-diklorodihidrofluorescein-diacetát (H₂DCF-DA) segítségével történt szintén áramlási citometriás méréssel.

3.4. Intracelluláris fém tartalmak mérése

3.4.1. *Minta előkészítés*

A sejtvonalak 6 lyukú tenyésztő lemezekben (1 millió sejt/lyuk) kerültek plátelésre, majd 80%-os konfluencia szintig növesztve. Általában 4 órás kezelési időt után következett a minta előkészítés (az ettől való eltérések jelölve). A letapadó sejtekből tripszin-EDTA segítségével, hatását FBS-es médiummal felfüggesztve sejtszuszpenzió készült, amik Eppendorf csövekbe kerültek. Kétszeri mosás következett 1-1 ml DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline) foszfát pufferolt sóoldattal centrifugálást alkalmazva (300 g, 5 perc). A sejtszámolást a második centrifugálás előtt Bürker kamra vagy sejtszámoló automata segítségével történt. A sejtek életképességét 0,04%-os tripánkék kizárási teszttel került ellenőrzésre. Az utolsó centrifugálást követően, a DPBS eltávolítása után a sejtekhez 20 µl 30%-os H₂O₂, 80 µl 65%-os HNO₃ és 15 µl 10 µg/ml koncentrációjú Ga oldatot került, majd 24 órás (részleges) feltárás következett.

3.4.2. *Totálreflexiós Röntgenfluoreszcens Spektrometria (TXRF)*

A TXRF meghatározások a TXRF 8030C (Atomika Instruments GmbH, Oberschleissheim, Németország) spektrométerrel történetek. A készülék Mo/W anódú, 2,5 kW teljesítményű röntgensóval, dupla W/C multilayer monokromátorral rendelkezik. A Mo cső esetében a gerjesztési energia 17,4 keV (Mo K α). A mintában lévő elemek karakterisztikus röntgensugárzását egy 80 mm² aktív területű, 150 eV felbontású Si(Li) detektor analizálja. A röntgensőre 50 kV feszültséget kapcsolunk a mérések során, az áramerősséget a műszer pedig automatikusan változtatta a detektor holtidejének (dead time) és a teljes analízisidőnek a figyelembevételével. A mérési idő 500 s volt.

Belső standardként Ga –ot használtunk. A mintából 2 µl-t került felcseppentésre a TXRF mérésekhez használt tisztított és ellenőrzött kvarclapokra, és a csepp laboratóriumi kerámia főzőlapon (Cole Palmer, USA) került beszárításra (80 °C). A Fe, Cu, és Zn és a belső standard Ga meghatározására 6,403 keV, 8,047 keV, 8,638 keV, 9,251 keV energiájú K α vonalaikat használtuk fel.

3.5. Liposzóma preparálás

3.5.1. Liposzóma preparálás lépései

A pegilált liposzómák lipid film hidratációs technikával készültek, pH-gradiens alkalmazásával.

A hipertermiás kezelésre is alkalmas liposzómák optimalizációja is megtörtént különböző lipidarányokat (DPPC és HSPC különböző tömegszázalékos arányai) alkalmazva (HEAT SENS LIPO), melynek tumorelles hatása összehasonlításra került a nem-termoszenzitiv (HEAT RES LIPO) liposzómával.

3.5.2. Liposzómák jellemzése

A liposzómák jellemzése a következő módokon valósult meg:

- részecskeméret és polidiszperzitas meghatározásra: dinamikus fényszórás mérést (DLS) és mikrofluidikus ellenállás-impulzus mérés (MRPS) segítségével,
- fázisátalakulási hőmérséklet mérése differenciális pásztázó kalorimetria (DSC) módszerrel,
- koncentráció meghatározás és liposzómák stabilitásának vizsgálata UV-látható spektrofotometriás (UV-Vis) módszerrel a hatóanyag abszorpciós maximumához kapcsolódóan,
- liposzómákban jelenlévő kötések és ezek változásának vizsgálata infravörös spektroszkópiával (IR).

3.6. *In vivo* kísérletek

3.6.1. Állatmodell

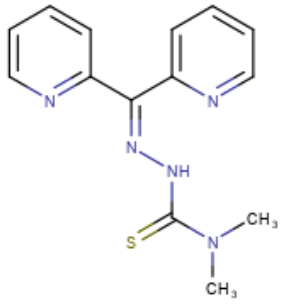
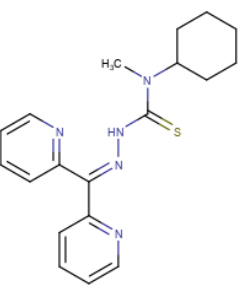
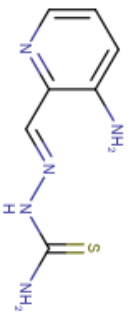
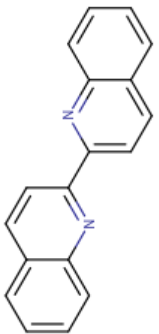
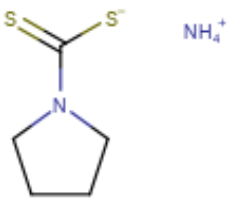
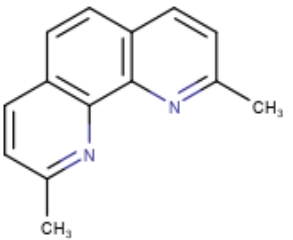
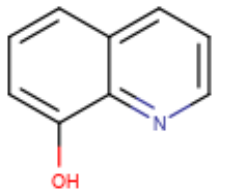
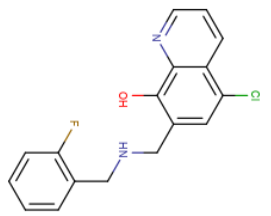
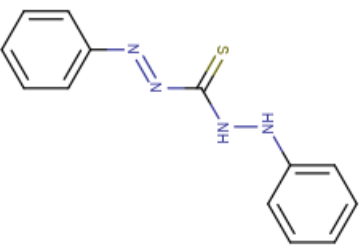
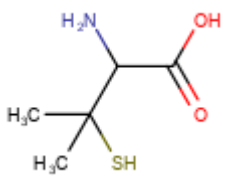
2*10⁶ egér vastagbél-karcinóma (C-26) sejtet injektáltunk 6–9 hetes hím BALB / c egerek bal oldali oldalába szubkután (s.c.) specifikus kórokozó-mentes kolóniánkból 0,2 ml szérumentes tápközegben. Két héttel az injekció beadása után (amikor a tumorok

mérhetőek voltak) az egereket véletlenszerűen és egyenlő arányban osztottuk csoportokba (10 egér/csoport). A kezelt csoportok 10 µl liposzómát kaptak 1 g testtömegre vonatkozóan intravénásán (i.v.). A komplex (Cu:neokuproin) koncentrációját 1 mM-nak adódott, így 2,8 mg / kg „hatóanyag” mennyiséget kaptunk a termoszenzitív készítményre vonatkozóan. A liposzómás hatóanyag dózisa a nem termoszenzitív készítményben 2,6 mg / kg volt. A kontrollok ekvivalens mennyiségű 0,9% -os nátriumklorid infúziót kaptak. Minden állat adatai elemzésre kerültek. A testtömegek változásai is mérésre kerültek minden állat és kísérlet esetében. A daganatellenes hatásokat a tumorok méretének heti kétszer történő mérésével regisztráltuk kaliberrel mérve. A tumorok térfogata (mm³) a következő módon került számolásra: hosszúság × szélesség² × (π / 6). Tizennyolc nappal az első kezelés után a tumorok eltávolításra kerültek, majd szárítószekrényben állandó tömegig szárítva analitikai mérlegen lettek mérve. A statisztikai elemzés Graph Pad Prism 8 szoftverrel, egyutas ANOVA teszttel történt. Az állatkísérletek az Országos Onkológiai Intézet Kísérleti Farmakológiai Tanszékén történtek. Az állatkísérleteket a szabványoknak megfelelően végezték (engedély száma: PEI / 001 / 2574–6 / 2015). A Magyar Állategészségügyi és Állatjóléti Igazgatóság az állatkísérletekre vonatkozó protokollokat az EU irányelveinek megfelelően jóváhagyta.

3.6.2. *Hipertermia*

A tumorok hipertermiás kezelése történt acélból, hogy két kezelt állatcsoportban megvizsgáljuk a liposzómák hőmérséklettől függő felszabadulását. Az állatokat érzéstelenítést követően desflurannal altattuk (9% desfluran 30% oxigén/levegő elegyében). A tumorok helyi enyhe hipertermiája (40–42° C) egyedi készítésű hőátadó eszközzel (fém rúd segítségével) lett kivitelezve, amelyet egy hőmérséklet-szabályozott vízfürdőhöz kötöttünk. Az intratumorális hőmérsékletet optikai érzékelőkkel (Luxtron FOT Lab Kit, LumaSense Technologies, Inc., Kaliforniai Santa Clara, Kalifornia, USA) mértük, és 41–42 ° C (± 0,5 ° C) hőmérsékleten tartottuk 20 percen keresztül. Az alkalmazott hőmérséklet (41–42 ° C) meghaladja a termoszenzitív liposzóma (HEAT SENS LIPO) fázisátalakulási hőmérsékletét.

Táblázat 1: A disszertációban vizsgált kelátor jellegű struktúrák. A választott vegyületek között tioszemikarbazon, fenantrolin, kinolin, tiokarbazon és ditiokarbamát alapszerkezetek szerepelnek. A D-penicillamin mint extracelluláris kelátor a rézelvonásban játszik szerepe, ezért kontrollként szerepel az egyes kísérletekben.

				
Dp44mT di-2-piridilketon-4,4,- dimetil-3-tioszemikarbazon	DpC di-2-piridilketon-4- ciklohexil-4-metil-3- tioszemikarbazon	Triapin 3-aminopiridin-2- karboxaldehyd tioszemikarbazon, 3-AP, PAN-811	2,2'-bikinolin 2,2'-bikinolin, Kuproin	APDTC ammónium pirrolidin ditiokarbamát PDC, PDTC
				
neokuproin 2,9-dimetil-1,10- fenantrolin	oxin 8-hidroxikinolin, oxin	Q4 5-kloro-7-((2- fluorobenzilamino)metil)kin olin-8-ol	ditizone difeniltiokarbazon	D-penicillamin 3,3-dimetil-D-cisztein

4. Eredmények

4.1. Az intracelluláris réztartalom szignifikánsan megemelkedett 50 μM Dp44mT hatására és közel 30x-os növekedés volt mérhető 2 μM CuSO_4 oldat és 5 μM Dp44mT kelátorral történő egyidejű kezelés esetén 8 különböző sejtvonalon vizsgálva.

A vaskelátorként szintetizált Dp44mT intracelluláris fémtartalmakra gyakorolt hatását vizsgálva 50 μM -os koncentrációban megállapítható, hogy a Cu mennyisége minden egyes vizsgált sejtvonalon jelentősen emelkedett, és az intracelluláris Zn tartalom csökkent. A vas mennyisége viszont rendszertelenül változott az egyes sejtvonalakon. Ha a táptalajhoz 2 μM -os koncentrációban Fe(II), Cu(II) és Zn(II) ionok is kerültek 5 μM -os Dp44mT-vel együtt inkubálva a következő megállapítások tehetőek: nagymértékű rézfelhalmozódás következett be kivétel nélkül minden sejtvonalon, a kontrollhoz viszonyítva akár 2-4000 x-es koncentrációnövekedés is tapasztalható volt. Az intracelluláris Fe mennyisége továbbra sem csökkent, sőt általában kis mértékű emelkedés volt mérhető, a cink mennyisége viszont ismét csökkenő tendenciát mutatott.

4.2. Co(II) ionokkal csökkenthető a Dp44mT által kiváltott rézfelhalmozódás és a Dp44mT citotoxicitása.

Co(II), Ni(II) és Fe(II) ionok szerves formáit a 2 μM -os Cu(II) kezeléssel együtt alkalmazva kompetíciós vizsgálatok kerültek kivitelezésre mind az intracelluláris rézmennyiségek (TXRF mérés), mint az *in vitro* citotoxikus hatás tekintetében (MTT teszt). Az A mérési eredmények alapján a sejtbe bejutott réz mennyisége egyértelműen csökken a stabilis komplexet képező Co(II) koncentrációjának növelésével. A Fe(II) ionok esetében csak nagyobb koncentrációknál csökkent kis mértékben az intracelluláris rézkoncentráció, a Ni(II) egy köztes állapotot képviselt.

Az előzőekben említett három fémnek (Fe(II), Ni(II), Co(II)) az 5 μM Dp44mT ill. 2 μM Cu(II) és 5 μM Dp44mT *in vitro* citotoxicitására való hatása is vizsgálatra került. Az első esetben (5 μM Dp44mT) az *in vitro* citotoxikus hatás jelentős mérséklése/felfüggesztése volt tapasztalható, a Co(II) esetében már egészen kis, 6 μM -os koncentrációban. A Fe(II) esetében csak 200 μM -os koncentrációban tapasztaltuk az életképesség kismértékű növekedését, míg a Ni(II) itt is egy köztes állapotot képvisel: egy bizonyos tartományon belül nő az életképesség, de nagyobb koncentrációnál toxikusnak bizonyult. A második esetben, ahol 2 μM Cu(II) is jelen volt a kísérletekben, citotoxikus hatás nagymértékű csökkenése már kizárólag a Co(II)

ionok jelenlétében következett be, ebben az esetben nagyobb Co(II) koncentráció szükséges (25 μM), de ez a stabilitási adatok ismeretében várható volt.

4.3. Az Dp44mT által kiváltott intracelluláris rézfelvétel és citotoxicitás mértéke egyértelműen függ az extracelluláris réz(II) koncentrációtól.

A rézkoncentrációt növelve (0,8-100 μM) adott Dp44mT koncentráció (0,065 μM) mellett, jelentős mértékben csökken a sejtek életképessége. TXRF méréseket kivitelezve megállapítható ezenfelül, hogy 5 μM koncentrációjú Dp44mT mellett a rézkoncentrációt növelve (0,1 – 100 μM) az intracellulárisan mérhető Cu mennyisége nő, a bejutott rézmennyiségek telítési görbe jellegű tendenciát mutatnak.

4.4. Kis koncentrációjú (0,1 μM) Dp44mT is képes nagymértékű rézfelhalmozódás kiváltására.

2 μM réz jelenlétében kis mennyiségű, 0,1 μM -os kelátor koncentrációnál a kontroll sejtekhez képest akár több mint 1000 %-os rézfelhalmozódás is tapasztalható volt a Dp44mT, Neokuproin és APDTC esetében. Tehát ezek a kelátorok nagyon hatékonyak, hiszen kis mennyiségű kelátor is képes nagymértékű rézfelhalmozódást okozni.

4.5. Részletesen vizsgáltam a sejtek rézfelvétel és rézdepléció adatait a következő kelátor jellegű struktúrák esetében: Dp44mT, neokuproin, APDTC, oxin, bikinolin és ditizon.

Különböző kelátor és rézkoncentrációk ill. különböző Cu-kelátor arányok általi rézakkumuláció részletes adatait mutattam be.

4.6. Vizsgáltam a réz intracelluláris lokalizációját Dp44mT és oxin esetében $\mu\text{-XRF}$ technikát alkalmazva. A Cu és Zn kolokalizációját mutattam ki a sejt-magban HT-29 sejt-vonal esetében Dp44mT és réz(II) egyidejű kezelés hatására (korrelációs koefficiens: 0,85).

A Cu és a Zn kolokalizációja több esetben is megfigyelhető volt $\mu\text{-XRF}$ spektroszkópiával. Pearson korrelációs beállításokkal a Dp44mT kelátképző Cu (II) ionok jelenlétében történő kezelés hatására a Cu-Zn kolokalizáció 0,85 értékű korrelációs koefficienssel volt jellemezhető.

4.7. Minden esetben hasonlóságokat mutat a rézfelvétel a vizsgált kelátor jellegű struktúrák esetében, míg más fémeknél ilyen jellegű felhalmozódás nem mutatható ki, kivéve a kadmiumot, mely esetén hasonló jellegű fémakkumuláció látható.

Hozzáadott kadmium ionok a Dp44mT és az APDTC kelátorok a Cd intracelluláris akkumulációját okozzák. Co, Ni és Hg esetében intracelluláris fémfelhalmozódását nem volt mérhető, azonban bizonyos kelátorok esetében a következő fémekre: Pb, Zn és Fe kismértékű fémakkumuláció következett be.

4.8. A különböző kondíciók mellett vizsgálva hasonló intracelluláris rézfelhalmozást mutató kelátorok jelentősen különböző mértékben citotoxikusak.

Bemutattam, hogy a különböző toxicitású vegyületek hasonló intracelluláris Cu-tartalmakat indukáltak. A Dp44mT, a neocuproine és az APDTC stabil 1:1 arányú komplexet képeznek rézzel és ezek a ligandumok hasonló módon is halmozzák fel a rézet a sejtekben. Ugyanakkor jelentős különbségeket lehet megfigyelni toxicitásuk szempontjából.

4.9. Cink depléció is megfigyelhető a réz akkumuláció mellett, ennek mértéke azonban különböző a vizsgált sejtvonalakon.

Sejtvonalpárokon (MCF-7 és MDA-MB-231 emlő-, és HT-29 és HCT-116 kolon adenokarcinómák) vizsgálva a cinkdepléció mértékét, a sejtpárok egyik, a kelátorkezelésekre érzékenyebb sejtvonalaiban (MDA-MB-231 és HCT-116) a cinkdepléció mértéke jelentősen nagyobb volt.

4.10. Réz(II) koncentráció függő apoptózis mutatható ki már 20 perc után Dp44mT és oxin kezelések esetében.

Az apoptotikus folyamatok beindulása gyorsan detektálható volt, a réz(II) koncentrációját növelve emelkedett az apoptotikus jeleket mutató sejtek aránya, gyors citotoxikus hatást jelezve.

4.11. A kelátképző szerek - a neocuproin kivételével - helyreállították a szabad Cu(II) által kiváltott DNS-károsodást.

Cu(II) ionokat adva a DNS mintához, majd titrálva a vizsgált kelátképzőkkel, a DNS CD-spektrumában az interkalációra utaló változást csak a Cu(II) és a neocuproin rendszer esetében volt megfigyelhető.

4.12. Kidolgoztam egy módszert neokuproin és a Cu(II)-ionok feleslegét tartalmazó liposzómák preparálására. Bemutattam egy termoszenzitív (hipertermiás kezeléssel való kombinációra alkalmas) és egy „termorezisztens” összetételű liposzómát, amelyek alkalmasnak bizonyultak *in vivo* alkalmazásra.

Lipid film hidratációs technikával, hőtornát és extrudálást alkalmazva általános liposzóma készítési protokollt követtem. Számos gradiens módszer használható fel ezen belül a hatóanyag betöltésére. Ezek közül a pH-gradiens alkalmazásával sikerült monodiszperz, stabil liposzómás rendszereket preparálnom. A termoszenzitív liposzóma optimalása során számos összetételt vizsgálva meghatározható volt az a lipidösszetétel, ami az állat testhőmérsékletén még nem, de a hipertermiás kombinációban eléri a fázisátalakulási hőmérsékletét, ami által a liposzóma permeabilitása megnő, ezáltal kiváltható célzottan a tumorelles hatás.

4.13. A bemutatott két liposzóma indukálja az intracelluláris réz felhalmozódását és ezzel összefüggésben *in vitro* citotoxikus hatást vált ki. *In vivo* tumorelles hatás BALB/C C-26 kolorektális tumormodellel mindkét liposzóma esetében kimutatható volt. A termoszenzitív liposzóma hatékonyabbnak bizonyult melegítés nélkül is *in vivo*, és hipertermiás kezeléssel kombinálva lehetővé tette az alkalmazott dózis csökkentését.

A HEAT SENS LIPO és a HEAT RES LIPO különböző térfogataival kezelve a C-26 sejtvonalat 4 órás kezelési idővel, TXRF mérések adataiból arra következtethetünk, hogy a 70%DDP:30%HSPC tartalmú PEGilált liposzóma, a HEAT SENS LIPO esetében nagyobb mértékű a bekövetkezett intracelluláris rézakkumuláció. Az *in vivo* tumorelles hatás vizsgálata BALB/C C-26 tumorokat hordozó egérmodellel a két liposzómát összehasonlítva 65% (HEAT SENS LIPO) and 50% (HEAT RES LIPO) tumor térfogat csökkenés volt tapasztalható. A HEAT SENS LIPO hipertermiával való kombinációját vizsgálva megállapítható, hogy a hipertermia nem fokozza a teljes dózisú liposzóma tumorelles hatását, viszont a dózis a felére csökkenthető a célzott hatóanyagleadással (hipertermia).

5. Következtetések

A platina tartalmú rákellenes vegyületek klinikai sikere óta jelentős figyelem fordult a különböző átmenetifém-komplexek illetve kelátor jellegű struktúrák kutatásának irányába, melyek során számos új hatásmechanizmust fedeztek fel. Számos közülük klinikai vizsgálatokba is bekerült.

Doktori kutatásaim során tumorellenes kelátorokat, közöttük tioszemikarbazon-, tiokarbazon-, tiokarbamát-, kinolin- és fenantrolin-vázás struktúrákat vizsgáltam. Bemutattam, hogy a vizsgált kelátorok nagymértékű rézfelhalmozódást okoznak a sejtekben, még kis kelátorkoncentrációnál is képesek szabad réz jelenlétében a saját mennyiségük többszörösét felhalmozni, és az réztartalom a sejtmagokban diffúz módon jelenik meg. Kimutattam, hogy a felhalmozott réz mennyisége a sejten belül akár harmincszorosa is lehet a kontrollnak, és bizonyítottam, hogy önmagában a rézfelhalmozódás és a toxicitás között nincs szoros összefüggés. Megfigyeltem, hogy a hatékonyabb vegyületek esetén a réztartalom nem távolítható el a sejtekből, továbbá a cink depléciója is megfigyelhető. Bizonyítottam, hogy a vaskelátorként ismert Dp44mT is rézfelhalmozódást okoz megfelelő mennyiségű réz jelenlétében, ami kobalt ionokkal felfüggeszthető. A réz lokalizációja Dp44mT esetén jelentős egybeesést mutat a cinkkel. Bemutattam, hogy citotoxikus hatásuk szabad réz(II) jelenlétében nagymértékben növelhető és rézfüggő apoptózis mutatható ki már 20 perc elteltével. Megállapítottam, hogy in vitro citotoxikus hatásuk nem függ a sejtvonal típusától, számos különböző tumor sejtvonalon, rezisztens tumor modelleket is vizsgálva hasonlóan toxikusnak mutatkozik. Bemutattam, hogy megvizsgálva a toxikus fémeket, a rézfelhalmozódáshoz hasonló folyamat csak kadmium esetében játszódik le, de az is jóval kisebb mértékben.

Számos tumorellenes komplex vegyület, vagy kelátor nem rendelkezik a megfelelő farmakológiai paraméterekkel a sikeres in vivo alkalmazhatósághoz. A liposzómás formulációk számos előnye mutatkozott meg a kemoterápiás szerek in vivo alkalmazhatóságának tekintetében. Réz-ionofór (neokuproin) tartalmú liposzómák preparálásához módszereket dolgoztam ki és javasoltam. A célzott hatóanyag felszabadítás (kombináció hipertermiás kezeléssel) céljából termoszenzitív liposzóma formulálását is megvalósítottam. A neokuproin-Cu(II)-t tartalmazó liposzómák hatékonynak bizonyult in vivo (BALB/c C-26 kolon adenokarcinóma) egér tumormodellel, mivel szignifikáns tumornövekedés-gátlást figyeltem meg minden esetben. A hipertermiás kezelés a termoszenzitív liposzóma alkalmazása során lehetővé tette a dózis csökkentését.

6. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezéshez kapcsolódó közlemények

Gaál A, Orgován G, Polgári Z, Réti A, Mihucz VG, Bősze, S, Szoboszlai N, Strelí C (2014) Complex forming competition and *in-vitro* toxicity studies on the applicability of di-2-pyridylketone-4, 4,-dimethyl-3-thiosemicarbazone (Dp44mT) as a metal chelator. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 130: 52–58. IF: 3,444

Gaál A, Mihucz VG, Bősze S, Szabó I, Baranyi M, Horváth P, Strelí C, Szoboszlai N (2018) Comparative *in vitro* investigation of anticancer copper chelating agents. *Microchemical Journal*, 136: 227–235. IF: 3,206

Gaál A, Orgován G, Mihucz VG, Pape I, Ingerle D, Strelí C, Szoboszlai N (2018) Metal transport capabilities of anticancer copper chelators. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 47: 79–88. IF: 2,895

Gaál A, Garay TM, Horváth I, Máthé D, Szöllősi D, Veres DS, Mbuotidem J, Kovács T, Tóvári J, Bergmann R, Strelí C, Szakács G, Mihály J, Varga Z, Szoboszlai N (2020) Development and *in vivo* application of a water-soluble anticancer copper ionophore system using a temperature-sensitive liposome formulation. *Pharmaceutics*, 12: 466; IF: 4,773

Az értekezéshez nem kapcsolódó közlemények

Majer Z, Bősze S, Szabó I, Mihucz VG, **Gaál A**, Szilvágyi G, Pepponi G, Meirer F, Wobruschek P, Szoboszlai N, Ingerle D, Strelí C (2015) Study of dinuclear Rh(II) complexes of phenylalanine derivatives as potential anticancer agents by using X-ray fluorescence and X-ray absorption. *Microchemical Journal*, 120: 51–57. IF: 2,893

Cserepes M, Türk D, Tóth S, Pape VFS, **Gaál A**, Gera M, Szabó JE, Kucsma N, Várady G, Vértessy BG, Strelí C, Szabó PT, Tóvári J, Szoboszlai N, Szakács G (2020) Unshielding Multidrug Resistant Cancer through Selective Iron Depletion of P-Glycoprotein-Expressing Cells. *Cancer Research*, 80: 663–674. IF: 8,378