

# Új típusú poli(aszpartamid) alapú hatóanyag konjugátumok és gélek kifejlesztése orvosi és gyógyszerészeti célokra

Doktori Tézisek

**Juriga Dávid**

Semmelweis Egyetem

Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Zrínyi Miklós, MTA tagja, egyetemi tanár  
Hivatalos bírálók: Dr. Nemes Péter, DSc., egyetemi tanár  
Dr. Budai Marianna, PhD., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Török Tamás, DSc., professor emeritus  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Klebovich Imre, DSc., egyetemi tanár  
Dr. Huszthy Péter, DSc., egyetemi tanár

Budapest

2018

## 1 Bevezetés

Polimerek orvosi és gyógyszerészeti alkalmazásaira szinte számtalan példát találhatunk egészen a csomagoló anyagoktól kiindulva, a különböző implantátumok és gyógyszerformulák segédanyagain át, a korszerű sztentekig vagy hatóanyag leadó rendszerekig bezárólag. Éppen ezért nem meglepő, hogy napjaink gyógyszerészeti és orvosbiológiai kutatásainak a középpontjában is különböző polimerekre épülő anyagok állnak. Ezek közül is a két leginkább kutatott alkalmazás a gyógyszerészet területén a hatóanyag hordozó rendszerek, míg az orvosbiológiai kutatások között a mesterséges szövetépítéshez használt szövetámaszok kiépítése. Ilyen jellegű alkalmazásoknál fontos, hogy a polimer molekula biokompatibilis, vagyis a szervezetből nem váltson ki immunválaszt, és biodegradabilis, tehát a szervezet által lebontható legyen. Ezeket a polimereket nevezhetjük biopolimereknek.

Ilyen biopolimerekre épülő gyógyszerhatóanyag-hordozó rendszerek segítségével növelhetjük a hatóanyag hasznosulását a szervezetben, illetve vízoldhatóságát vagy éppen lipofilitását, valamint képesek vagyunk elérni a hatóanyag terápiás célponthoz való eljutását és szabályozott leadását. Ennek segítségével csökkenthetjük az alkalmazott hatóanyag mennyiségét így az általa kiváltott mellékhatásokat is, miközben a terápia hatékonyságát nagymértékben megnövelhetjük. A polimer-hatóanyag-hordozó rendszerek egyik csoportja a polimer-hatóanyag konjugátumok, amelyek esetében a hatóanyag kovalens kötéssel kapcsolódik a hordozó polimer molekulához. Ezek a makromolekuláris elő-hatóanyag formulák önmagukban inaktívak, a hatóanyag felszabadulása a célszervben valamilyen normál metabolikus folyamat vagy a környezet valamely tulajdonságának (pl.: pH, hőmérséklet) megváltozására adott válaszreakció hatására történhet. A

konjugátumokból elektrosztatikus szálhúzás alkalmazásával nano-szálas rendszereket állíthatunk elő, amelyek tovább növelhetik a hatóanyag hasznosulását a szervezetben.

Biopolimerekre épülő anyagokat alkalmazhatunk szövettámaszként a szövetszövet területén. A folyamat során a páciens saját reprodukcióra képes sejteinek izolálásával, majd a szövettámaszon történő szaporításával állíthatjuk elő a kívánt mesterséges szövetet, amelyet ezután visszaültethetünk a sérült területre. A szövettámaszoknak hasonló tulajdonságokkal kell rendelkeznie, mint a természetes extracelluláris mátrixnak (ECM), amely a kötőszöveti sejteket körülvevő egy kollagénből és egyéb polimerekből álló 3 dimenziós hálózat. Az ECM a kismolekulák illetve a sejtek számára átjárható, dinamikusan változó rendszer, amelynek egyik feladata, hogy a sejtek számára támasztórendszert biztosítson osztódásuk során. Ehhez hasonló anyagok a polimer hidrogélek, amelyek egy 3 dimenziós polimer térháló és az azt kitöltő víz vagy vizes oldat elegye. Ebből kifolyólag rendelkeznek mind a folyadékok (pl.: kis molekulák számára átjárhatóak), mind pedig a szilárd anyagok (pl.: alaktartóak, deformálhatóak) tulajdonságaival, így szövettámaszként alkalmazhatóak lehetnek. Mivel a hidrogélek tulajdonságait az alkalmazott polimer határozza meg, ezért fontos a megfelelő polimer kiválasztása.

A fehérjékhez hasonló kémiai szerkezetű szintetikus poli(aminosav)-ak alapjául szolgálhatnak mind konjugátumok, mind pedig hidrogélek szintéziséhez, azonban ezen biopolimerek szintetikus úton történő előállításuk nehézkes és költséges. Kutatásaim ezért az egyik egyszerűen előállítható poli(aminosav), a poli(aszparaginsav) és származékainak az előzőekben bemutatott alkalmazására fókuszáltak.

## 2 Célkitűzés

PhD kutatómunkám fő célja volt a poli(aszparaginsav) és származékainak gyógyszerészeti és orvosbiológiai alkalmazásának vizsgálata. Célkitűzéseim az alábbi pontokban foglalhatóak össze:

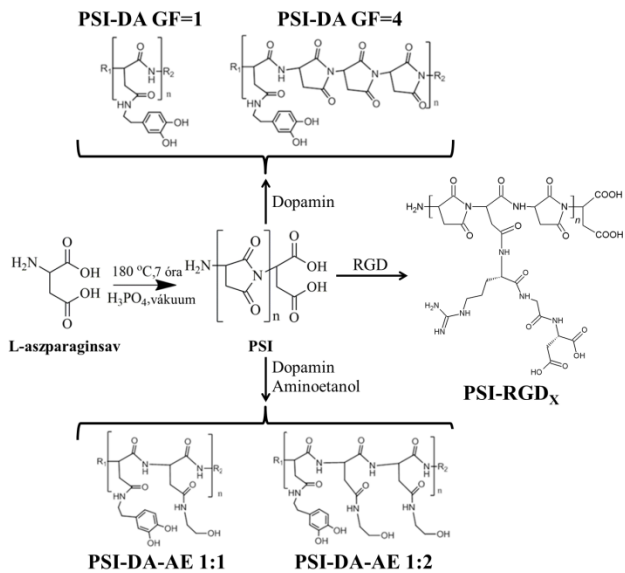
1. Különböző kémiai összetételű poli(aszpartamid)-dopamin konjugátumok szintézise és fizikai tulajdonságainak vizsgálata. A dopamin leszakadási kinetikájának feltérképezése különböző enzimek jelenlétében.
2. A konjugátumokat felhasználva nano méret tartományba eső szálas implantátumok előállítása elektrosztatikus szálhúzással. A formulázás hatásának vizsgálata a dopamin leszakadás kinetikájára, illetve a szálas rendszerek *in vitro* citotoxicitásának vizsgálata.
3. Különböző kémiai összetételű és rugalmasságú poli(aszparaginsav) alapú hidrogélek szövettámaszként való alkalmazhatósága MG-63 oszteoblaszt típusú sejtek tenyésztéséhez. A gélek stabilitásának, illetve biodegradabilitásának vizsgálata a sejtenyésztés során alkalmazott körülmények között.
4. Az előzőekben használt gélek szövettámaszként való alkalmazhatósága humán periodontális ligamentum (PDL) eredetű össejtek esetén. A kritikus paraméterek változtatása a sejtek életképességének növeléséhez.
5. Dopaminnal módosított poli(aszpartamid) alapú gélek alkalmazhatósága humán PDL össejtek tenyésztéséhez.

## 3 Módszerek

### 3.1 Poliszukcinimid (PSI) és poli(aszpartamid) alapú konjugátumok és polimerek előállítása

A poli(szukcinimid)-et L-aszparaginsav termikus polikondenzációjával állítottam elő alacsony nyomáson, 180 °C-n, foszforsav katalizátor jelenlétében (**1. ábra**). A nyers

polimert ezután dimetilformamidban oldottam majd vízben csaptam ki. A szűrést követően a polimert nagy mennyiségű vízzel mostam a semleges pH eléréséig. Előzetes eredményeink alapján a PSI átlagos molekulatömege 26 és 31 kDa közé esett [1-3].



1.ábra: PSI szintézise és módosítása dopaminnal, dopaminnal és aminoetanollal, illetve RGD tripeptiddel

A PSI-ben található ismétlődő egység, a szukcinimid gyűrű könnyedén módosítható primer amin csoportot tartalmazó vegyületekkel szobahőmérsékleten. Ennek köszönhetően, amin csoportot tartalmazó hatóanyag alkalmazásával poli(aszpartamid) alapú polimer-hatóanyag konjugátumokat szintetizálhatunk. Kutatómunkám során dopamin hatóanyagot kapcsoltam a PSI lánchoz különböző mennyiségben, illetve a dopamin mellett 2-aminoetanolt alkalmaztam a konjugátum vízoldhatóságának növelésére (**1. ábra**). A minták nevében található GF (graftolási fok) a monomer/dopamin mólarányát jellemzi. A dopamin tartalmú

konjugátumokon kívül Arg-Gly-Asp (RGD) tripeptiddel különböző mértékben módosított polimereket is szintetizáltam, amelyeket poli(aszparaginsav) gélek előállításához használtam fel (1. ábra). Az előállított polimerek kémiai szerkezetét FTIR-ATR illetve  $^1\text{H-NMR}$  és  $^1\text{H-}^1\text{H}$  COSY NMR technikákkal igazoltam.

### **3.2 Dopaminnal módosított konjugátumok formulázása elektrosztatikus szálképzéssel**

A házilag elkészített elektrosztatikus szálképzéshez használt készülék egy fecskendőből, tompa fém Hamilton tűhegyből, egy fecskendőpumpából és egy egyenáramú tápegységből állt. A pozitív pólus (13-15 kV) a fémtűre, míg a negatív pólus egy a tűvel szemben elhelyezett alufóliával beborított gyűjtő lemezre volt kapcsolva [3]. Az elektrosztatikus szálképzés során a minták oldhatóságától és kémiai összetételétől függően különböző oldószereket illetve oldószer keverékeket alkalmaztam a konjugátumok különböző koncentrációjú oldatának elkészítéséhez. A tű és az alumínium gyűjtőlap távolsága minden minta esetében 15 cm volt. Az elkészített szálas rendszereket ezután pásztázó elektronmikroszkópiával, kétfoton és atomerő mikroszkópiával vizsgáltam. A szálas minták kémiai összetételét FTIR-ATR spektroszkópiával jellemeztem.

### **3.3 Por illetve szálas konjugátumok fizikai tulajdonságainak (oldhatóság, oldhatóság kinetika, lipofilitás, membrán permeabilitás) jellemzése**

A por állagú konjugátumok oldhatóságának meghatározásához 0,1 g konjugátumot helyeztem 11 mL ultra tiszta vízbe, majd mértem az oldatok abszorbanciáját spektrofotométerrel 280 nm-n 24 és 48 óra után. A minták

lipofilitásának vizsgálatához elkészítettem a minták telített vizes oldatát majd ugyanolyan térfogatú n-oktanollal kevertem össze az oldatot egy rázóüvegsérben. A keveréket összeráztam majd 24 és 48 óra után meghatároztam spektrofotometriás mérésrel a koncentrációkat a két fázisban, amelyek aránya megadja a minták lipofilitását. Mivel a csak dopamin tartalmú konjugátumok oldhatósága függ az időtől, ezért meghatároztam a por illetve nano-szálás konjugátumok oldhatóság kinetikáját vízben, illetve pH=7,5-es foszfát pufferben (PBS). Ehhez por minták esetében 0,3 g míg szálás minták esetében 0,05 g mintát helyeztem a közegbe és 48 óráig mértem az oldat abszorbanciáját. A membrán permeabilitás jellemzéséhez PAMPA technikát alkalmaztam. Ehhez 0,5 mg szálás mintát helyeztem a mikrotiter lemezbe, membrán modellként pedig izolecitin dodekánban készített 20 m/m%-s oldatát használtam. A membrán permeabilitás jellemzéséhez mértem a konjugátumok koncentrációját a membrán mindkét oldalán 4 és 28 óra elteltével spektrofotometriás úton.

### **3.4 Dopamin leszakadási kinetikájának meghatározása por, illetve szálás konjugátumokról**

A dopamin leszakadási kinetikájának a méréséhez a por, illetve szálás konjugátumokat egy 3,5 kDa-s dializáló hártyába helyeztem. Ezután a mintákra 6 mL PBS illetve Bromelain vagy  $\alpha$ -Kimotripszin PBS-ben készített oldatát (3 mg/mL) helyeztem, míg a dializáló hártyán kívülre 60 mL PBS-t töltöttem. A leszakadt dopamin mennyiségét a külső folyadék spektrofotometriás vizsgálatával határoztam meg 48 órán keresztül.

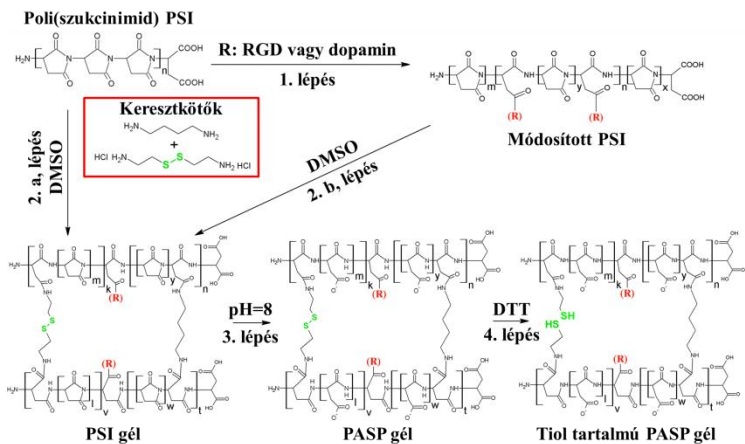
### **3.5 Szálas konjugátumok citotoxicitásának vizsgálata**

A szálas konjugátumok citotoxicitásának vizsgálatához humán eredetű periodontális ligament (PDL) őssejteket alkalmaztam. A kísérletek során 10000 sejt/cm<sup>2</sup> sejtsűrűséggel dolgoztunk 96 lyukú mikrotiter lemezen. Az első kísérlet sorozatban 1  $\mu$ M - 1 mM koncentráció tartományban vizsgáltuk a szabad dopamin, illetve a PSI-DA-AE 1:2 konjugátumra kötött dopamin hatását a sejtek életképességére és morfológiájára. A sejtek életképességét 1 és 3 nap után WST-1 reagenssel határoztam meg, míg morfológiáját fáziskontraszt mikroszkóppal vizsgáltam. A második kísérlet sorozatban a különböző szálas konjugátumok hatását vizsgáltam azonos koncentráción (250  $\mu$ M), azonban itt a sejtek morfológiáját kétfoton mikroszkóppal tanulmányoztam.

### **3.6 Poli(aszparaginsav) alapú gélek szintézise**

Mivel a PSI könnyedén reakcióba vihető primer amin csoportokat tartalmazó vegyületekkel, így diaminokkal keresztkötések hozhatóak létre a polimer láncok között géleket szintetizálva. A PSI illetve a módosított PSI keresztkötéséhez két féle diamint, 1,4-diamonbutánt (DAB) illetve cisztamint (CYS) alkalmaztam. A PSI géleket ezután enyhe lúgos hidrolízisnek tettem ki, így poli(aszparaginsav) (PASP) géleket kaptam. A gélekben ezután a tiol csoportokat ditiotritol (DTT) alkalmazásával alakítottam ki. Munkám során létrehoztam különböző mértékben dopamint, RGD-t, illetve tiol oldalláncot tartalmazó PASP géleket (**2. ábra**).





2.ábra: Módosítatlan és módosított PSI, PASP, illetve tiol tartalmú PASP gélek szintézisének lépései

### 3.7 PASP gélek degradációjának vizsgálata

A különböző keresztkötőket tartalmazó PASP gélek degradációját két kísérletben végeztem. Először a sejtenyésztéshez használt illetve a sejtek által termelt enzimek (Diszpáz, Tripszin-EDTA, Kollagenáz II) jelenlétében vizsgáltam hidrogél korongok tömegváltozását 48 napig. A második kísérlet sorozatban gél hengereket készítettem és vizsgáltam a tömegük, illetve a rugalmassági moduluszuk változását a sejtenyésztés során alkalmazott tápoldat jelenlétében 18 napig.

### 3.8 PASP gélek szövettámaszként való alkalmazhatóságának vizsgálata

A gélek szövettámaszként való alkalmazhatóságához két féle sejtet (MG-63 humán oszteoszarkóma sejt, illetve humán PDL őssejt) használtam. A mérésekhez géلكorongokat készítettem, amelyek felszínére 20000 sejtet ültettem ki 200  $\mu\text{L}$  szuszpenzióban. MG-63 sejtek esetében az 1., 3., és 6., napon míg PDL őssejtek esetében az 1., 3., 7., és 14., napon

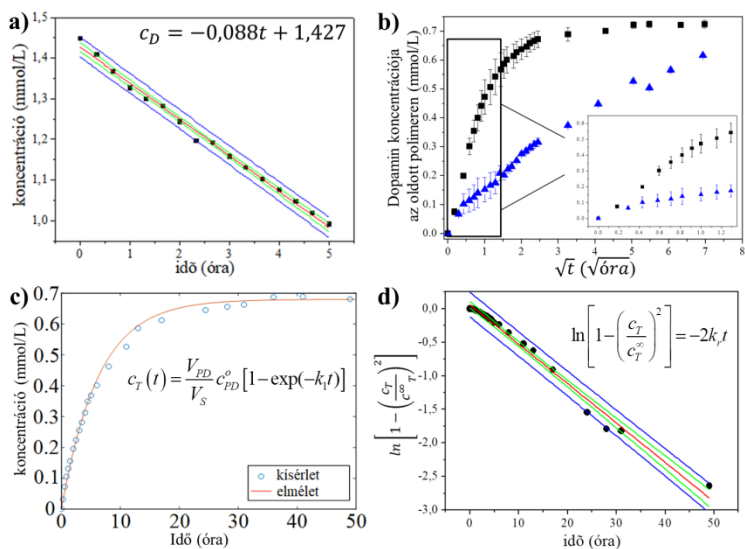
mértem a sejtek életképességét WST-1 módszerrel. A sejtek morfológiáját fáziskontraszt, míg a gél és a sejtek 2 és 3 dimenziós szerkezetét kétfoton mikroszkóp segítségével határoztam meg.

## 4 Eredmények

### 4.1 Dopamin leszakadás kinetikájának leírása por konjugátumok esetében (T1)

A dopamin leszakadási kinetikájának leírásához a szintetizált konjugátumokat két csoportra osztottuk: az aminoetanolt is tartalmazó minták pillanatszerűen oldódtak vízben, míg a csak dopamint tartalmazó minták oldhatósága függött az időtől. Mivel a dopamin leszakadása az oldat fázisban lévő konjugátumról történik, ezért az első esetben egy 1 lépéses hidrolízisről, míg a második esetben egy konszekutív folyamatról (oldódás majd hidrolízis) beszélhetünk. Így az első eset felhasználható arra, hogy meghatározzuk a leszakadási reakció rendjét, míg a második esetben pedig megállapíthatjuk, hogy a polimer oldhatósága vagy a dopamin leszakadása a sebesség meghatározó lépés. Azonban a dopamin bomlik a reakció körülményeken, ezért a reakció időbeli lefutásának ismerete elengedhetetlen a pontos kinetikai modell kidolgozásához. A 3. ábrán látható, hogy a dopamin bomlása lineárisan függ az időtől, így ez egy nulladrendű reakcióval írható le (**3. a ábra**). A csak dopamint tartalmazó konjugátumok oldhatósága lineárisan függ az idő négyzetgyökétől, ezért az oldhatóság kinetikáját a Higuchi féle oldhatóság kinetika jellemzi (**3. b ábra**). A dopamint és aminoetanolt is tartalmazó konjugátumok esetében, amennyiben a reakció sebessége egyenesen arányos a leszakadt dopamin mennyiségével folyamat elsőrendű kinetika szerint játszódik le. A 3. c ábrán látható differenciálegyenlet ezt az esetet szemlélteti, és látható, hogy az elméleti és a

kísérleti adatok jó egyezést mutatnak. Rosszul oldódó konjugátumok esetében a dopamin leszakadás egy Higuchi féle diffúzióval és az azt követő elsőrendű leszakadási kinetikával írható le. Ezt végtelenül hosszú mérési időkre megoldva a 3. d ábrán lévő egyenletet kapjuk, ahol látszik, hogy a logaritmikus tagot ábrázolva az idő függvényében a mérési pontokra jó egyezéssel egyenes illeszthető, amely igazolja a kinetikai leírás helyességét (3. d ábra).

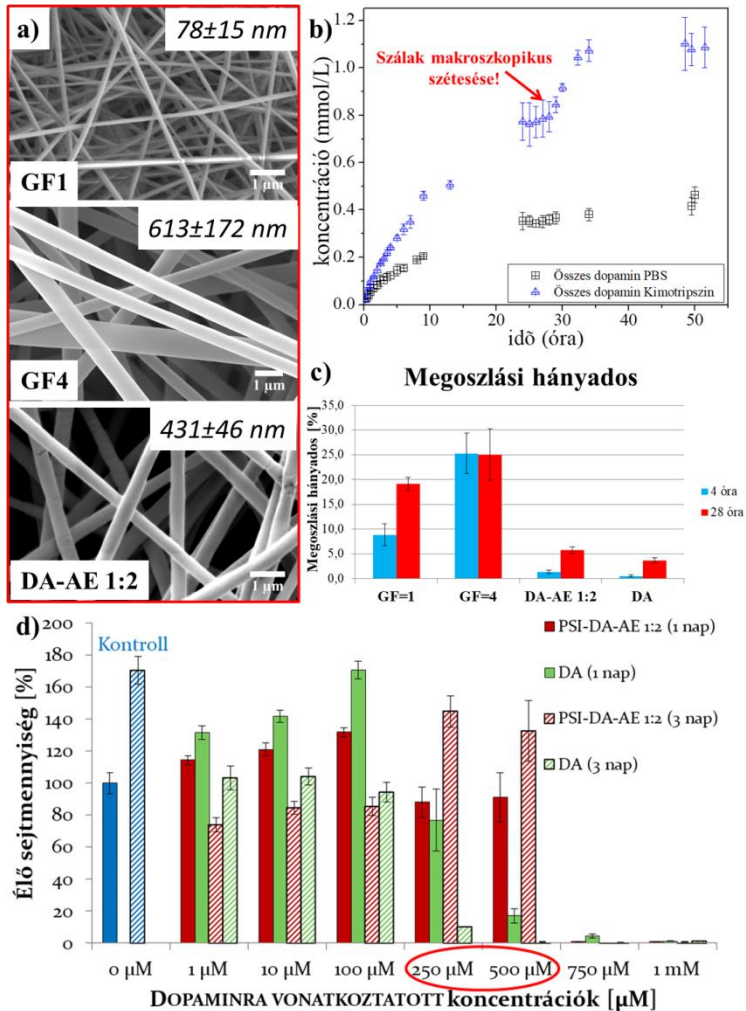


3.ábra: a) dopamin bomlási kinetikája, b)GF=1 és 4 konjugátumok oldhatóságának függése az idő négyzetgyökétől, c) dopamin leszakadásának időfüggése jól oldódó konjugátumok esetében, d) kinetikai konstans meghatározása rosszul oldódó konjugátum esetében

## 4.2 Elektrosztatikus szálhúzással előállított dopamin tartalmú konjugátumok vizsgálata (T2)

A pásztázó elektronmikroszkópiás felvételeken látható, hogy homogén, hibahely mentes szálakat állítottam elő a konjugátumokat felhasználva, amelyek átmérője a

nanométeres tartományba esik (**4. a ábra**). A formulázás hatással lehet a konjugátumok oldhatóság kinetikájára, amely befolyásolhatja a dopamin leszakadás kinetikáját. A dopamin leszakadás kinetikai mérésekből látható, hogy a dopamin jóval gyorsabban szabadul fel a szálas konjugátumokról, mint a por állagú minták esetében (**4. b ábra**). Emellett az is megfigyelhető, hogy a dopamin leszakadása 26 óra elteltével hirtelen megnő, amely  $\alpha$ -Kimotripszin jelenlétében jelentősebb, mint PBS-ben. Ez a hirtelen koncentráció növekedés a szálas konjugátumok makroszkopikus szétesésének és hirtelen feloldódásának lehet a következménye (**4. b ábra**). Látható, hogy az  $\alpha$ -Kimotripszin jelenléte nagymértékben meggyorsítja a dopamin leszakadását illetve megnöveli a felszabadult dopamin mennyiségét (**4. b ábra**). A hatóanyag hasznosulását a sejtmembránon való átjutása is befolyásolja. A PAMPA vizsgálatok alapján elmondható, hogy a dopamin mesterséges membránon való átjutását, a csak dopamint tartalmazó konjugátumok (GF=1 és 4) nagymértékben megnövelik, a DA-AE és a szabad dopaminhoz képest. Ez annak köszönhető, hogy ezek a konjugátumok kevesebb hidroxil csoport oldalláncot tartalmaznak, mint a PSI-DA-AE 1:2. A GF=4-es és a GF=1-es minta közötti különbséget feltehetően szintén ez okozza (**4. c ábra**). A citotoxicitási vizsgálatok alapján elmondható, hogy sem a dopamin sem a konjugátumra kötött dopamin nem citotoxikus 1-100  $\mu$ M koncentráció tartományban. 250 és 500  $\mu$ M koncentrációnál azonban a dopamin már citotoxikus hatású, azonban a konjugátumra kötött dopamin még ebben a tartományban sem csökkenti a PDL őssejtek életképességét. Magasabb koncentrációnál mind a szabad mind pedig a kötött dopamin citotoxikus (**4. d ábra**).

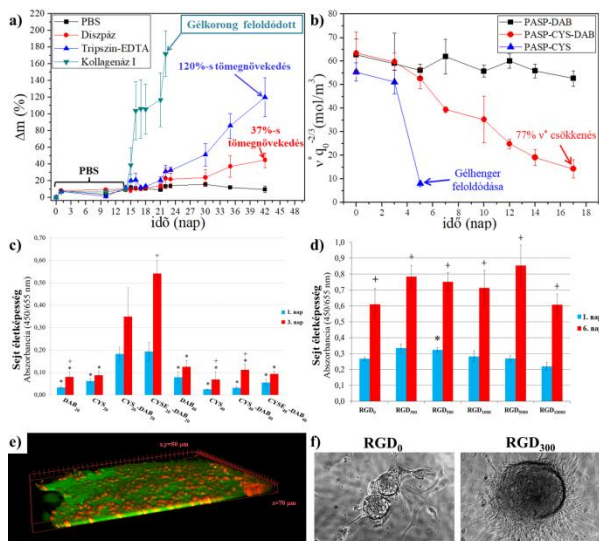


4.ábra: a) szálak SEM felvételei, b) dopamin leszakadás időfüggése GF=1-s szálak konjugátum esetében, c) konjugátumok megoszlási hányadosa PAMPA mérésnél illetve d) citotoxicitás mérés eredményei

### 4.3 MG-63 oszteoszarkóma sejtek tenyésztése különböző PASP géleken illetve a gélek stabilitása (T3)

Az 5. a ábrán látható, hogy a csak cisztamin keresztkötőt tartalmazó PASP gélkorongok PBS-ben stabilak, hiszen tömegük nem változik 42 nap után sem. Tripszin-EDTA, illetve Diszpáz jelenlétében a korongok tömege monoton növekszik, ami kismértékű degradációra utal. Kollagenáz II jelenlétében a korongok tömege nagymértékben megnőtt már pár nap után majd a gélkorongok teljesen feloldódtak (**5. a ábra**). A gélek degradációja jellemezhető mind a rugalmassági moduluszuk, mind pedig a duzzadásfokuk változásával. A hálóláncok koncentrációja ( $v^*$ ) a két értékből meghatározható, a mechanikai tulajdonságokat jobban reprezentáló mennyiség. A tápoldatban a gélhengerek hálólánc koncentrációja a csak DAB keresztkötőt tartalmazó gélek esetében nem változott, míg a csak CYS keresztkötőt tartalmazó gélek már 5 nap után feloldódtak. A vegyesen CYS és DAB keresztkötőt tartalmazó gélek hálólánc koncentrációja lecsökkent, azonban a gélek nem oldódtak fel, amiből a diszulfid hidak felnyílására következtethetünk (**5. b ábra**). A különböző géleken mért életképességi mutatókból látható (**5. c ábra**), hogy a sejtek megtapadását és életképességét a tiol csoportok jelenléte és a gélek rugalmassági moduluszának növekedése (PASP-CYSE<sub>20</sub>-DAB<sub>20</sub>) nagymértékben megnöveli. Emellett elmondható, hogy a sejtek életképessége a 3. napra megnövekedett mindegyik minta esetében. A kétfoton mikroszkópos kép alapján elmondható, hogy a sejtek képesek bejutni a tiol tartalmú gélkorong belsejébe (**5. e ábra**). Az RGD-vel módosított tiol tartalmú gélek életképességi mutatói alapján megfigyelhető, hogy az RGD mennyisége illetve jelenléte a gélekben nincs jelentős hatással az életképes

sejtek mennyiségére sem 1 sem pedig 6 nap után (**5. d ábra**). A fáziskontraszt mikroszkópos felvételek azonban mutatják, hogy az RGD jelenléte segíti a sejtek klaszterekbe rendeződését, ami egyfajta oszteogén viselkedésre utal (**5. f ábra**).

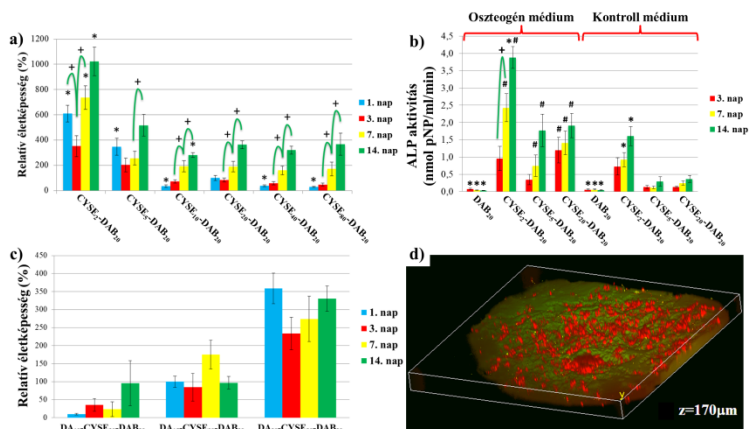


5.ábra: PASP-CYS géllorongok tömegváltozása különböző enzimek jelenlétében (a), géll hengerek degradációja tápoldatban (b), sejtek életképessége különböző PASP (c) és RGD tartalmú géleken (d), Sejtek háromdimenziós elhelyezkedése a géllorongon 2 foton mikroszkópiával vizsgálva (e) és klaszterekbe rendeződése fáziskontraszt mikroszkópos felvételeken(f)

#### 4.4 PDL őssejtek tenyésztése különböző tiol csoportot tartalmazó PASP géleken (T4)

A 6. a ábra alapján elmondható, hogy a tiol csoportok mennyiségének a növelése pozitív hatással van a sejtek letapadására, illetve a proliferációjára. Látható, hogy az életképes sejtek mennyisége a 14. napra nagymértékben megnő minden minta esetében. Az oszteogén irányú differenciációs kísérletek alapján elmondható, hogy

nagymennyiségű tiol csoport a sejtek spontán oszteogén irányú differenciációját indukálja (6. b ábra).



6. ábra: PDL őssejtek életképessége különböző tiol tartalmú géleken (a), PDL őssejtek indukált és spontán oszteogén irányú differenciációja (b), PDL őssejtek életképessége különböző dopamin tartalmú géleken (c) és 3 dimenziós elhelyezkedése dopamin tartalmú gélkorongon (d)

## 4.5 PDL őssejtek tenyésztése különböző mennyiségben dopamint tartalmazó géleken

A legnagyobb életképességi mutatót a minden 20. monomeren dopamin oldalláncot tartalmazó gél esetében mértük (6. c ábra). A dopamin emellett indukálta a sejtek vertikális migrációját és proliferációját, amit a 6. d ábrán látható 3 dimenziós kétfoton kép igazol. A sejtek 170 μm mélyen képesek voltak behatolni a gél mátrixba, ami közel 5-6 sejtréteget jelent.

## 5 Következtetések

Biopolimerekre épülő polimer-hatóanyag konjugátumok illetve hidrogélek egyre inkább a gyógyszerészeti és orvosbiológiai kutatások középpontjában állnak. Ilyen jellegű alkalmazásokra a poli(aminosav)-ak



megfelelőek lehetnek, hiszen szerkezetük nagymértékben hasonlít a szervezetben is megtalálható fehérjékhez. Kutatómunkámban sikeresen állítottam elő poli(aszparaginsav)-ra épülő dopamin tartalmú hatóanyag konjugátumokat, illetve vizsgáltam poli(aszparaginsav) gélek szövetáttámaszként való alkalmazhatóságát.

A konjugátumok esetében a dopamin leszakadási kinetikáját vizsgáltam, amely nagymértékben függ a konjugátum dopamin tartalmától, oldhatóságától illetve különböző enzimek jelenlététől. A kinetika jellemzéséhez egy részletes kinetikai leírást dolgoztam ki, mind jó, mind pedig rossz vízoldhatósággal rendelkező konjugátumokra. A 3. c ábrán látható, hogy jó vízoldhatósággal rendelkező konjugátumok (PSI-DA-AE) esetében a kísérleti adatok és az elméleti modell jó egyezést mutat. A diffúzióval egybekötött leszakadási kinetika jól használható, rosszul oldódó konjugátumok esetében a hatóanyag leszakadási kinetikájának leírására (**3. d ábra**). Az elektrosztatikus szálképzés segítségével homogén, hibahelyektől mentes nano-szálak konjugátumokat állítottam elő (**4. a ábra**). A formulázással a dopamin leszakadás kinetikája meggyorsítható, ami a megnövekedett fajlagos felületnek köszönhető. A szálak makroszkopikus szétesésével egy két lépcsős hatóanyag leadás érhető el (**4. b ábra**). A konjugátumok megnövelik a dopamin membránon való átjutását, mivel lipofilebbek, mint a szabad dopamin (**4. c ábra**). Emellett látható, hogy a konjugátumra kötött dopamin kevésbé citotoxikus, mint a szabad dopamin (**4. d ábra**).

Poli(aszparaginsav) gélek mechanikai illetve kémiai összetétele nagy hatással van mind az MG-63, mind pedig a PDL őssejtek életképességére és a gélen történő elhelyezkedésére. A gél keménységét növelve, és tiol csoportokat létrehozva a polimer láncon az MG-63 sejtek

adhéziója és proliferációja nagymértékben megnövekszik (**5. c ábra**). Ez abból adódik, hogy az MG-63 sejtek kemény szöveti sejtek, így a keményebb szövettámaszon jobban képesek szaporodni. A sejtek képesek beintegrálódni a polimer térhálóba (**5. e ábra**), illetve az RGD jelenléte a polimer gélben indukálja a sejtek klaszterekbe való szerveződését, ami oszteogén viselkedésre utal (**5. d és f ábra**). A degradációs kísérletek azt mutatják, hogy a csak cisztamint tartalmazó gélek mind enzimek jelenlétében, mind pedig a sejtenyésztés során alkalmazott tápoldatban feloldódnak (**5. a és b ábra**). A gélek feloldódása a tiol csoportok felnyílásának a következménye, amit mind a kollagenáz II, mind pedig a tápoldatban található L-cisztein jelenléte indukál. A PDL őssejtek esetében a tiol csoportok további növelésével tovább növelhető a sejtek adhéziója (**6. a ábra**). Emellett látható, hogy a sejtek száma a 14. napig növekszik, amiből arra következtethetünk, hogy a tiol csoportok elősegítik a sejtek proliferációját is. A PDL őssejtek képesek oszteogén irányba differenciálódni a géleken, amelyet nagymennyiségű tiol csoport jelenléte önmagában indukál (**6. b ábra**). A dopamin jelenléte is jótékony hatással van a sejtek életképességére (**6. c ábra**), amennyiben minden 20. monomer tartalmaz dopamint. A nagyobb mennyiségű dopamin alkalmazásával (GF=10 vagy 15) csökken a gélek keménysége, illetve a dopamin a citotoxikus koncentráció felé emelkedik a gélekben, ami sejthalálhoz vezet. A dopamin emellett képes indukálni a sejtek vertikális migrációját, így a sejtek képesek beintegrálódni akár 5-6 sejtréteg vastagságban a polimer mátrixba (**6. d ábra**).

A dolgozat új tudományos eredményei a következő pontokban foglalhatók össze:

1. Sikeresen állítottam elő olyan poli(aszpartamid)-dopamin konjugátumokat, amelyek elnyújtott hatóanyag leadást biztosítanak. (T1)

2. Sikeresen dolgoztam ki egy hatóanyag leszakadási kinetikai leírást kovalens polimer-hatóanyag konjugátumokra, amely használható lehet mind rossz, mind pedig jó vízoldhatóságú konjugátumok esetében. (T1)

3. Sikeresen állítottam elő homogén, nano-szálas poli(aszpartamid)-dopamin konjugátumokat, amely formulázása nagy hatással van a hatóanyag leszakadás kinetikájára. Az irodalomban elsőként vettem össze a hatóanyag leszakadás kinetikáját tömb, illetve szálas konjugátumok esetén. (T2)

4. Bebizonyítottam a poli(aszpartamid)-dopamin konjugátumok biokompatibilitását humán PDL őssejtek használatával. (T2)

5. Meghatároztam poli(aszparaginsav) gélek azon paramétereit, amelyek növelik a stabilitásukat, illetve csökkentik biodegradabilitásukat az in vitro sejtenyésztés körülményein. (T3)

6. Megállapítottam, hogy a gélek keménységének a növelése és a tiol csoportok jelenléte előnyös hatással van mind MG-63 mind pedig humán PDL őssejtek életképességére és morfológiájára. Bebizonyítottam, hogy az RGD peptid szekvencia nem csak a sejtek letapadását, de klaszterekbe való rendeződését is indukálja. (T3)

7. Ráműtattam, hogy a tiol csoport mennyiségének a növelésével a gélekben előidézhető PDL őssejtek spontán oszteogén irányú differenciációja. (T4)

8. Megállapítottam, hogy a dopamin beépítésével a gélekbe a PDL őssejtek horizontális migrációja előidézhető illetve növelhető a gélek sejtek általi degradációja. (T5)

## 6. Publikációk

### 5.1 Értekezéshez kapcsolódó közlemények

- [1] Juriga D, László I, Ludányi K, Klebovich I, Chae CH, Zrínyi M, (2018) Kinetics of dopamine release from poly(aspartamide)-based prodrugs. *Acta Biomaterialia*, online elérhető, IF<sub>2017</sub>: 6,319  
doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.06.030>,
- [2] Juriga D, Nagy K, Jedlovszky-Hajdú A, Perczel-Kovács K, Chen YM, Varga G, Zrínyi M (2016) Biodegradation and Osteosarcoma Cell Cultivation on Poly(aspartic acid) Based Hydrogels. *ACS Appl Mater Interfaces* 8:23463–23476. IF<sub>2016</sub>: 7,504

### 5.2 Értekezéshez nem kapcsolódó közlemények

- [3] Molnar K, Juriga D, Nagy PM, Sinko K, Jedlovszky-Hajdu A, Zrínyi M (2014) Electrospun poly(aspartic acid) gel scaffolds for artificial extracellular matrix. *Polym Int* 63:1608–1615. IF<sub>2014</sub>: 2.409
- [4] Zrínyi M, Gyenes T, Juriga D, Kim J-H (2013) Volume change of double cross-linked poly(aspartic acid) hydrogels induced by cleavage of one of the crosslinks. *Acta Biomater* 9:5122–31. IF<sub>2013</sub>: 5,684