**DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

# FÉM NANORÉSZECSKÉK ÉS HISZTON-DEACETILÁZ INHIBITOROK TUMORELLENES HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA

**IGAZ NÓRA**

**TÉMAVEZETŐ:**
**DR. CSONTNÉ DR. KIRICSI MÓNIKA**
**EGYETEMI ADJUNKTUS**

**BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA**

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM**
**TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR**
**BIOKÉMIAI ÉS MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI TANSZÉK**

**SZEGED**

**2021**

## Bevezetés

Napjainkig a tumoros megbetegedések legelterjedtebb kezelési módjai közé tartozik a kemoterápia és a sugárkezelés. A klasszikus kemoterápia során alkalmazott tumorellenes anyagok mellett megjelentek a célzott terápiára alkalmas szerek és az antitest alapú kezelések is, viszont a tumoros megbetegedések kezelése során így is számos mellékhatás kialakulhat. A sugárterápiában nagyenergiájú ionizáló sugárzást alkalmaznak, amelyre a sejtek membránstruktúrái és az örökítőanyag a legérzékenyebbek. Az ionizáló sugárzás viszont károsíthatja a tumorok környezetében lévő egészséges szöveteket és szerveket is, amely csökkenthető lehet radioszenzitizáló szerek használatával, így redukálva a mellékhatások kialakulását és növelve a terápia hatékonyságát.

A fém nanorészecskék egyedi tulajdonságaik, mint a nagy fajlagos felület, speciális fizikai és kémiai sajátságok, az élő rendszerekkel kialakított kivételes kölcsönhatások miatt különösen ígéretes eszközök lehetnek innovatív diagnosztikai és terápiás eljárások számára, így a daganatos betegségek klinikai kezelésében is. A fém nanorészecskék közül az ezüst nanopartikulumokat (AgNP) alkalmazzák a legszélesebb körben, köszönhetően elsősorban antimikrobiális aktivitásuknak. Az arany nanorészecskéket (AuNP) viszont az

elektronikai ipar használja fel leginkább, viszont könnyen módosítható felületük és biológiailag inert sajátságuk miatt orvosbiológiai potenciáljuk is igen jelentős. Az utóbbi évtizedben jelentős kutatási aktivitás összpontosult mind az AgNP, mind az AuNP tumorellenes hatékonyságának felderítésére. Méretükből adódóan ugyanis képesek passzívan feldúsulni a tumoros szövetben, a daganatokat átszövő érhálózat fenesztrált endotélrétegének köszönhetően, majd bejutni a rákos sejtekbe. Itt az AgNP-k oxidatív stresszt és apoptózist indukálnak a felületükről leváló ezüst ionok révén. A biokompatibilis AuNP-k foto- és radioszenzitizáló aktivitásuk miatt értékesek, mivel képesek a tumorokban hipertermiát előidézni, illetve az ionizáló sugárzás hatását felerősíteni.

A hiszton-deacetiláz enzimek (HDAC) gátlószereinek tumorellenes hatása több vérképző rendszeri és szolid tumor esetén is bizonyítást nyert. Ezek a vegyületek számos hiszton és nem-hiszton fehérje acetilációját befolyásolják és képesek apoptózist indukálni a programozott sejthalál több útvonalának aktiválásán át. A HDAC inhibitorok a hisztonok acetilációjának növelésén keresztül nyitottabb kromatin szerkezetet alakítanak ki, mellyel a DNS hozzáférhetőségét növelik a károsító ágensek számára. Ezen tulajdonságuk miatt fém nanorészecskékkel és

sugárterápiával kombinációban növelhetik a terápia specifitását és hatékonyságát.

## Célkitűzések

Munkánk során két kísérleti megközelítésben vizsgáltuk a fém nanorészecskék és HDAC inhibitorok együttes tumorellenes hatását.

1. Az első kísérleti felállásban az AgNP és a HDAC inhibitor Trichostatin A (TSA) kombinációja által a rákos sejtekben indukált sejtbiológiai változásokat és azok mértékét vizsgáltuk *in vitro*.
2. A második kísérleti rendszerünkben az AuNP és a HDAC inhibitor szuberoil-anilid-hidroxámsav (SAHA) együttes radioszenzitizáló hatását tanulmányoztuk 2D és 3D tumoros sejtkultúrákon.

## Módszerek

A fém nanorészecskék tumorsejtekbe történő bejutását transzmissziós elektronmikroszkóppal detektáltuk. A HDAC inhibitorok hatására kialakuló acetilált fehérjék jelenlétét acetilált-lizin immunfestéssel vizsgáltuk, mind azok önálló alkalmazása, mind fém nanorészecskékkel kombinációban történő használatuk során.

Munkánk során az AgNP és a HDAC inhibitor TSA hatását a rákos sejtek viabilitására MTT alapú módszerrel vizsgáltuk. A nanorészecskék és a TSA közötti szinergista kölcsönhatást az életképesség vizsgálatok eredményei alapján CompuSyn szoftver segítségével állapítottuk meg. A TSA hatására létrejött hiszton acetilációt, mely a nyitottabb kromatin szerkezet kialakulására utal, Western blot módszerrel bizonyítottuk, mind az önálló TSA, mind az AgNP-vel kombinációban történő kezeléseket követően. Az AgNP és a HDAC gátló TSA hatására keletkező reaktív oxigén szabadgyökök mennyiségét DCFDA festéssel, a DNS károsodás mértékét γH2AX festéssel és a kezelések hatására indukálódó apoptózist hasított kaszpáz-3 immunfestéssel vizsgáltuk.

Az AuNP és a HDAC inhibitor SAHA radioszenzitizáló aktivitását 2D tumoros sejtkultúrákon MTT módszerrel vizsgáltuk, majd CompuSyn szoftvert alkalmaztunk a két szer közötti szinergista kölcsönhatás megállapítására. Az AuNP és SAHA radioszenzitizáló hatását a sejtek kolóniaformáló képességének meghatározásával vizsgáltuk, irradiációt követően. Az ionizáló sugárzás hatására keletkező DNS kettős szálú töréseket γH2AX kimutatásán alapuló immuncitokémiai, illetve immunhisztokémiai módszerekkel vizualizáltuk 2D tumoros sejtkultúrákon és 3D szferoidokon, miután a kultúrákat

AuNP-vel és SAHA-val kezeltük és ionizáló sugárzásnak tettük ki. A két hatóanyag szinergista radioszenzitizáló hatását a sejtek kolóniaformáló képességének meghatározásával bizonyítottuk a 3D tumoros sejtkultúrákon.

**Fontosabb eredmények, tézispontok**

1. A tumoros sejtek képesek a fém nanorészecskéket felvenni, amelyek a sejtek citoplazmájában, legtöbbször multivezikuláris testecskékben akkumulálódnak.
2. A fém nanorészecskék intracelluláris jelenléte nem befolyásolja a HDAC inhibitorok működését a tumoros sejtekben, a hisztonfehérjék acetilált állapota kialakul és megmarad AgNP vagy AuNP jelenléte mellett is.
3. Az AgNP-k és a hiszton-deacetiláz inhibitor TSA szinergista módon képesek csökkenteni a tumoros sejtek életképességét.
4. Az AgNP és TSA együttes alkalmazásának eredményeként szignifikánsan megnő a reaktív oxigén szabadgyökök mennyisége, a DNS kettős szálú törések száma, és ezáltal az apoptotizáló tumoros sejtek aránya a kezeletlen, és az önálló AgNP vagy TSA kezelésben részesült sejtekhez viszonyítva.
5. Az AuNP és a HDAC inhibitor SAHA kombinációja szinergista módon csökkenti a tumoros sejtek

életképességét és kolóniaformáló képességét ionizáló sugárzást követően.

6. Az ionizáló sugárzás hatására a daganatos sejtekben keletkező DNS kettős szálú törések száma szignifikánsan nagyobb, ha az AuNP-t és SAHA-t együtt alkalmazzuk.
7. Az AuNP és a SAHA hatóanyag kombináció radioszenzitizáló hatása nem csak 2D-ban tenyésztett tumoros sejteken, hanem 3D szferoidokon is kimutatható, mivel a két hatóanyag kombinációs alkalmazása során szignifikánsan csökken a szferoidot alkotó tumoros sejtek kolóniaformáló képessége és megnő a sejtekben a DNS károsodás mértéke az irradiált kontrollhoz és az önálló AuNP vagy SAHA kezelésekhez képest.
8. A HDAC inhibitorok (TSA, SAHA) hatására egy nyitottabb kromatin struktúra alakul ki, mely hozzáférhetőbbé teszi a DNS-t a különféle károsító hatások számára. Ezek a károsító hatások, mint például az ionizáló sugárzás jelentősen fokozhatók AuNP-k alkalmazásával, vagy citotoxikus fém nanorészecskék, mint az AgNP-k, sejtbejuttatása révén.

## Összefoglalás

Az eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy mind az AgNP és TSA kombinációja, mind pedig az AuNP és SAHA

együttes alkalmazása ionizáló sugárzás mellett szinergista módon képes csökkenteni a tumoros sejtek életképességét. Az AgNP és TSA kombinációban alkalmazva szignifikánsan megemeli a reaktív oxigén szabadgyökök mennyiségét, a DNS kettős szálú törések számát, és az apoptotizáló sejtek arányát a kezeletlen és az AgNP-, vagy TSA-kezelt tumoros sejtekben tapasztaltakhoz viszonyítva.

Az AuNP és SAHA kombinációjának alkalmazása szignifikánsan növeli az ionizáló sugárzás DNS károsító hatását és csökkenti a tumoros sejtek kolóniaformáló képességét irradiációt követően, mind 2D, mind 3D sejtkultúrában a kezeletlen és a csak AuNP-, vagy csak SAHA-kezelt mintákhoz képest.

Mindkét kísérleti elrendezésünk során kimutattuk, hogy a HDAC inhibitorok egy nyitottabb kromatin szerkezetet alakítanak ki, így a sejtek örökítőanyagát hozzáférhetőbbé téve az azt károsító ágensek számára. Ilyen károsító hatások lehetnek az HDAC inhibitorok és az AgNP kombinációjának alkalmazásakor az AgNP által indukált oxidatív stressz, illetve az ionizáló sugárzásnak az AuNP-k által felerősített DNS károsító hatása. Kísérleteinkben az AgNP és TSA szinergista tumorellenes hatását, illetve az AuNP és SAHA szinergista radioszenzitizáló aktivitását mutattuk ki.

**Publikációk listája**

MTMT azonosító: 10054252

**A dolgozat alapját képező közlemények:**

1. Nóra Igaz, Dávid Kovács, Zsolt Rázga, Zoltán Kónya, Imre Miklós Boros, Mónika Kiricsi: *Modulating chromatin structure and DNA accessibility by deacetylase inhibition enhances the anti-cancer activity of silver nanoparticles*. Colloids and Surfaces B Biointerfaces 2016; 146:670-7. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.07.004, **IF: 3,902**
2. Nóra Igaz, Krisztina Szőke, Dávid Kovács, Andrea Buhala, Zoltán Varga, Péter Bélteky, Zsolt Rázga, László Tiszlavicz, Csaba Vizler, Katalin Hideghéty, Zoltán Kónya, Mónika Kiricsi: *Synergistic radiosensitization by gold nanoparticles and the histone deacetylase inhibitor SAHA in 2D and 3D cancer cell cultures.* Nanomaterials 2020; 10(1):158. doi: 10.3390/nano10010158, **IF: 4,324**

**Egyéb tudományos közlemények:**

1. András Papp, Tamara Horváth, Nóra Igaz, Mohana Krishna Gopisetty, Mónika Kiricsi, Dániel Simon Berkesi, Gábor Kozma, Zoltán Kónya, Imola Wilhelm, Roland Patai, Tamás Ferenc Polgár, Tamás Bellák, László Tiszlavicz,

Zsolt Rázga, Tünde Vezér: *Presence of Titanium and Toxic Effects Observed in Rat Lungs, Kidneys, and Central Nervous System in vivo and in Cultured Astrocytes in vitro on Exposure by Titanium Dioxide Nanorods*. International Journal of Nanomedicine 2020; 15:9939-9960. doi: 10.2147/IJN.S275937, IF: **5,115**

2. Bettina Szerencsés*, Nóra Igaz*, Ákos Tóbiás, Zsombor Prucsi, Andrea Rónavári, Péter Bélteky, Dániel Madarász, Csaba Papp, Ildikó Makra, Csaba Vágvölgyi, Zoltán Kónya, Ilona Pfeiffer, Mónika Kiricsi: *Size-dependent activity of silver nanoparticles on the morphological switch and biofilm formation of opportunistic pathogenic yeasts.* BMC Microbiology 2020; 20(1):176. doi: 10.1186/s12866-020-01858-9, **IF: 2,989**
3. Heba Alaa Hosiny Abd Elhameed, Ditta Ungor, Nóra Igaz, Mohana Krishna Gopisetty, Mónika Kiricsi, Edit Csapó, Béla Gyurcsik: *High molecular weight poly(ethylenimine)-based water-soluble lipopolymer for transfection of cancer cells.* Macromolecular Bioscience 2020; 20(7):e2000040. doi: 10.1002/mabi.202000040, **IF: 3,416**
4. Dávid Kovács, Nóra Igaz, Annamária Marton, Andrea Rónavári, Péter Bélteky, László Bodai, Gabriella Spengler, László Tiszlavicz, Zsolt Rázga, Péter Hegyi, Csaba Vizler, Imre M. Boros, Zoltán Kónya, Mónika Kiricsi: *Core-shell*

*nanoparticles suppress metastasis and modify the tumour-supportive activity of cancer-associated fibroblasts.* International Journal of Nanobiotechnology 2020; 18(1):18. doi: 10.1186/s12951-020-0576-x, **IF: 6,518**

5. Péter Bélteky, Andrea Rónavári, Nóra Igaz, Bettina Szerencsés, Ildikó Tóth, Ilona Pfeiffer, Mónika Kiricsi, Zoltán Kónya: *Silver nanoparticles: aggregation behaviour in biorelevant conditions and its impact on biological activity.* International Journal of Nanomedicine 2019; 14:667-687. doi: 10.2147/IJN.S185965, **IF: 5,115**
6. Diána Szabó, Dávid Kovács, Valéria Endrész, Nóra Igaz, Kitti Jenovai, Gabriella Spengler, László Tiszlavicz, József Molnár, Katalin Burián, Mónika Kiricsi, László Rovó: *Antifibrotic effect of mitomycin-C on human vocal cord fibroblasts.* Laryngoscope 2019; 129(7):E255-E262. doi: 10.1002/lary.27657, **IF: 2,465**
7. Gopisetty Mohana Krishna, Dávid Kovács, Nóra Igaz, Andrea Rónavári, Péter Bélteky, Zsolt Rázga, Viktória Venglovecz, Bálint Csoboz, Imre Boros Zoltán, Kónya, Mónika Kiricsi: *Endoplasmic reticulum stress: major player in size-dependent inhibition of P-glycoprotein by silver nanoparticles in multidrug-resistant breast cancer cells.* Journal of Nanobiotechnology 2019; 17(1):9. doi: 10.1186/s12951-019-0448-4, **IF: 6,518**

8. Horváth Tamara, Papp András, Kiricsi Mónika, Igaz Nóra, Trenka Vivien, Kozma Gábor, Tiszlavisz László, Rázga Zsolt, Vezér Tünde: *Titán-dioxid-nanopálcikák tüdőre kifejtett hatásának állatkísérletes vizsgálata szubakut patkánymodellben.* Orvosi Hetilap 2019; 160(2):57-66. doi: 10.1556/650.2019.31237, **IF: 0,497**
9. Tamara Horváth, András Papp, Nóra Igaz, Dávid Kovács, Gábor Kozma, Vivien Trenka, László Tiszlavicz, Zsolt Rázga, Zoltán Kónya, Mónika Kiricsi: *Pulmonary impact of titanium dioxide nanorods: examination of nanorod-exposed rat lungs and human alveolar cells.* International Journal of Nanomedicine 2018; 13:7061-7077. doi: 10.2147/IJN.S179159, **IF: 4,471**
10. Andrea Rónavári, Nóra Igaz, Gopisetty Mohana Krishna, Bettina Szerencsés, Dávid Kovács, Csaba Papp, Csaba Vágvölgyi, Imre Miklós Boros, Zoltán Kónya, Mónika Kiricsi, Ilona Pfeiffer: *Biosynthesized silver and gold nanoparticles are potent antimycotics against opportunistic pathogenic yeasts and dermatophytes.* International Journal of Nanomedicine 2018; 13:695-703. doi: 10.2147/IJN.S152010, **IF: 4,471**
11. Ádám Baji, Tamás Kiss, János Wölfling, Dávid Kovács, Nóra Igaz, Gopisetty Mohana Krishna, Mónika Kiricsi, Éva Frank: *Multicomponent access to androstano-*

*arylpyrimidines under microwave conditions and evaluation of their anti-cancer activity in vitro.* Journal of steroid biochemistry and molecular biology 2017; 172:79-88. doi: 10.1016/j.jsbmb.2017.06.001, **IF: 4,561**

12. Andrea Rónavári*, Dávid Kovács*, Nóra Igaz*, Csaba Vágvölgyi, Imre Miklós Boros, Zoltán Kónya, Ilona Pfeiffer, Mónika Kiricsi: *Biological activity of green-synthesized silver nanoparticles depends on the applied natural extracts: a comprehensive study.* International Journal of Nanomedicine 2017; 12:871-883. doi: 10.2147/IJN.S122842, **IF: 4,320**
13. Dávid Kovács, Nóra Igaz, Csilla Keskeny, Péter Bélteky, Tímea Tóth, Renáta Gáspár, Dániel Madarász, Zsolt Rázga, Zoltán Kónya, Imre Miklós Boros, Mónika Kiricsi: *Silver nanoparticles defeat p53-positive and p53-negative osteosarcoma cells by triggering mitochondrial stress and apoptosis.* Scientific Reports 2016; 6:27902. doi: 10.1038/srep27902, **IF: 5,228**
14. Dávid Kovács, Krisztina Szőke, Nóra Igaz, Gabriella Spengler, József Molnár, Tímea Tóth, Dániel Madarász, Zsolt Rázga, Zoltán Kónya, Imre Miklós Boros, Mónika Kiricsi: *Silver nanoparticles modulate ABC transporter activity and enhance chemotherapy in multidrug resistant*

*cancer*. Nanomedicine 2016; 12(3):601-610. doi: 10.1016/j.nano.2015.10.015, **IF: 5,671**

Összesített impakt faktor: 69,581

**Témavezetői nyilatkozat**

Alulírott Dr. Csontné Dr. Kiricsi Mónika nyilatkozom arról, hogy Igaz Nóra szerepe meghatározó jelentőségű volt a „*Modulating chromatin structure and DNA accessibility by deacetylase inhibition enhances the anti-cancer activity of silver nanoparticles”* (Colloids and Surfaces B, 2016) és „*Synergistic radiosensitization by gold nanoparticles and the histone deacetylase inhibitor SAHA in 2D and 3D cancer cell cultures”* (Nanomaterials, 2020) című közleményekben. Kijelentem továbbá, hogy más jelöltnek nem adok ki hasonló tartalmú nyilatkozatot azokról az eredményekről, melyeket a jelölt fokozatszerzésében felhasznált.

...…….....

Dr. Csontné Dr. Kiricsi Mónika

Kelt: 2021. 01.11.