

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A FÉM NANORÉSZECSKÉK SZEREPE A TUMORSEJTEK ÉS MAKROFÁGOK KÖZÖTTI KOMMUNIKÁCIÓ SZABÁLYOZÁSÁBAN

ADAMECZ DÓRA IZABELLA

**TÉMAVEZETŐK:
DR. CSONTNÉ DR. KIRICSI MÓNICA
(HABILITÁLT EGYETEMI DOCENS)**

**DR. IGAZ NÓRA
(EGYETEMI ADJUNKTUS)**

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



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

SZEGED

2025

Bevezetés

A makrofágok a veleszületett immunrendszer sokoldalú effektor sejtjei, amelyek rendkívüli plaszticitással alkalmazkodnak az eltérő környezeti stimulusokhoz. Ezt a tulajdonságukat polarizációnak nevezzük. Polarizációjuk eredményeként két fő funkcionális fenotípust különböztetünk meg, a klasszikusan aktivált M1 és az alternatív módon aktivált M2 makrofágokat. Az M1 makrofágok pro-inflammatórikus jelekre aktiválódnak, fokozottan termelnek gyulladásos citokineket és kemokineket, valamint nitrogén-monoxidot és reaktív oxigénszármazékokat, amelyek révén hatékonyan eliminálják a kórokozókat, támogatják az adaptív immunválaszt, valamint a tumorelles immunfolyamatokat. Ezzel szemben az M2 makrofágok gyulladáscsökkentő és regeneratív szerepet töltenek be, ugyanakkor immunmoduláló citokineket, növekedési faktorokat és enzimeket szekretálnak, támogatva a sebgyógyulást, szöveti regenerációt, valamint a tumor-asszociált folyamatokat.

A tumor mikrokörnyezete (TME) egy dinamikus rendszer, amely tumorsejtekből, környező sejtekből (pl. fibroblasztok, makrofágok) és nem-sejtes elemekből (pl. extracelluláris mátrix, szolubilis faktorok) áll. Az itt végbemenő sejtek közötti kölcsönhatások kulcsszerepet játszanak a daganat

növekedésében, áttétképzésében és a terápiarezisztencia kialakulásában.

A tumor-asszociált makrofágok (TAM-ok) szöveti makrofágokból és csontvelői monocitákból származnak, és a TME-ben elsősorban tumorsejtek hatására átprogramozódnak, elveszítve tumorelles funkcióikat. A TAM-ok nem sorolhatók be egyértelműen az M1/M2 fenotípusokba, inkább egy folyamatos polarizációs spektrumon helyezkednek el. Az M1-szerű TAM-ok gyulladásoktő mediátorokat termelnek, támogatják az immunválaszt és gátolják a tumorprogressziót, míg az M2-szerű TAM-ok – amelyek jelenléte a tumorigenezis előrehaladtával válik dominánssá – gyulladásokcsökkentő, immunszuppresszív és pro-angiogén faktorokat szekretálnak, így elősegítik a daganat növekedését, áttétképzést és a tumorelles terápia elleni rezisztencia kialakulását. Mivel a TAM-ok meghatározó szerepet játszanak a TME alakításában, célzott modulációjuk (eliminációjuk vagy M1 irányú átprogramozásuk) ígéretes stratégia a daganatellenes terápia hatékonyságának fokozására.

A fém nanorészecskék, különösen az arany (AuNP) és ezüst nanopartikulumok (AgNP), egyre nagyobb jelentőséget kapnak a diagnosztika és a gyógyászat területén, köszönhetően a kiváló fizikai-kémiai tulajdonságaiknak, egyszerű szintézisüknek és könnyen módosítható felületüknek. Különösen előnyös lehet az

alkalmazásuk a daganatos megbetegedések kezelésében, hiszen a nanorészecskék képesek passzívan felhalmozódni a tumorszövetben, a tumorokban található erek fenesztrált endotéljének köszönhetően, illetve felszínüket célzó molekulákkal – pl. folsavval – módosítva a tumorsejtek aktív targetálására is alkalmassá válnak. A nanorészecskék használhatóak hatóanyagok szállítására, illetve egyes fém nanorészecskék, mint az AgNP és AuNP, közvetlen tumorelles hatású is kifejtnek.

Az AgNP-k és AuNP-k képesek kölcsönhatásba lépni az immunrendszerrel, valamint modulálni az immunválaszt, amely gyulladásos vagy immunszuppresszív jellegű lehet. Ez függhet a részecskék méretétől, töltésétől, alakjától és felszíni bevonatuktól. Az AgNP-k jellemzően erősebb immunstimuláló hatású fejtnek ki, fokozva a reaktív oxigén szabadgyök termelést és citokin expressziót, amellyel M1-szerű makrofág-polarizációt indukálhatnak. Az AuNP-k hatása nagyban függ a felszínükhöz konjugált molekuláktól, azonban szintén elősegíthetik az M1 irányú polarizációt. A nanorészecskék tumorelles hatása részben az immunrendszer aktiválásából, részben a TAM-ok M1 irányú átprogramozásából ered. Ugyanakkor a nanopartikulumok tumor-sztróma interakciókra és a tumorsejtek makrofág-átprogramozó mechanizmusaira gyakorolt hatásai még kevésbé ismertek.

Célkitűzések

Célul tűztük ki annak elemzését, hogy az AuNP-k és AgNP-k hogyan befolyásolják a tumorsejtek és makrofágok között működő kommunikációt. Azt kívántuk feltérképezni, hogy az AuNP-k és AgNP-k közvetett módon, azaz a tumor sejtek modulálásán keresztül, hatással vannak-e a makrofágok sejtbiológiai és funkcionális folyamataira, azok tumor-támogató aktivitására. Két leegyszerűsített *in vitro* kísérleti rendszerben vizsgáltuk a fém nanorészecskék hatását a tumorsejtek és makrofágok közötti kommunikációra.

1. Az első modellrendszerben a tumorsejtek által kondicionált médium (KM) hatását vizsgáltuk makrofág sejteken. A KM-okat kezeletlen, illetve vagy AuNP-vel vagy AgNP-vel kezelt tumorsejtekről származó médiumokból állítottuk elő, amelyekkel a későbbiekben a makrofág sejteket kezeltük. Ebben a rendszerben egy egyirányú sejt-kommunikációt vizsgáltunk, amelyben a tumorsejtek által szekretált szolubilis faktorok hatnak a makrofágokra.
2. A második modellrendszerben a tumor sejtek makrofág sejtekre gyakorolt moduláló hatását indirekt ko-kultúrában vizsgáltuk, amelyben a két sejt-típus egymástól a sejtek által nem, de szolubilis faktorokra átjárható membránnal van elválasztva. Ebben az esetben parakrin, kétirányú

kommunikáció valósul meg a két sejttípus között, hiszen egy időben, egy közegben zajlik a sejttenyésztés.

Tanulmányozni kívántuk, hogy

- az alkalmazott AuNP és AgNP toxikusak-e az egér eredetű, 4T1 emlő karcinóma sejteken és kiválasztani a legmegfelelőbb nanorészecske kezelési koncentrációt;
- a tumorsejtek képesek-e ezeket a nanorészecskéket felvenni a környezetükből;
- változik-e és ha igen, milyen irányban az egyes makrofágokra jellemző polarizációs markerek expressziója;
- változik-e a makrofágok által szekretált vízdékony faktorok mennyisége a nanorészecske-kezelt tumorsejtek hatására;
- befolyásolják-e a nanorészecskékkel kezelt tumorsejtek a makrofágok migrációs aktivitását és a makrofágok által szekretált, migrációhoz köthető fehérjék mennyiségét.

Módszerek

A kísérleteink során alkalmazott AuNP és AgNP citotoxicitását MTT-esszével vizsgáltuk. A nanorészecskék sejtekbe történő bejutását transzmissziós elektronmikroszkóppal detektáltuk. Vizsgálatainkhoz kétféle makrofág sejtet

alkalmaztunk, az immortalizált J774 sejtvonalat, illetve primer makrofágokat. A primer BMDM makrofág sejt kultúrát egérsontvelőből izolált monocitákból hoztuk létre általunk készített L929-kondicionált médium felhasználásával. A primer sejtek differenciálódásának sikerességét áramlási citométerrel validáltuk.

Két *in vitro* modellrendszert állítottunk fel, az egyikben a kezeletlen, AuNP- vagy AgNP-kezelt tumorsejtekről származó KM-ok segítségével vizsgáltuk a tumorsejtek indirekt hatását a makrofág sejtekben, míg a másikban indirekt ko-kultúrát készítettünk, amiben a tumorsejteket 0.4 μm pórusméretű inszertekre növesztettük, amiket a makrofágok tenyésztetere helyezettünk. MTT esszével tanulmányoztuk az *in vitro* rendszerekben lévő sejtek életképességét. A KM-mal kezelt, valamint a ko-kultúrában növesztett immortalizált és primer makrofágokból RNS-t izoláltunk, majd RT-qPCR méréssel vizsgáltuk a célgének expresszióját.

A két *in vitro* rendszerben vizsgált makrofágok felülírójából meghatároztuk az MMP-aktivitást egy fluoreszcencián alapuló kit segítségével, míg a migrációhoz köthető fehérjéknek a koncentrációját ELISA módszerrel mértük meg. A makrofágok által szekretált faktorok széleskörű vizsgálatát Proteome Profiler Array-vel végeztük. A J774 immortalizált makrofágok migrációját Wound-healing esszével vizsgáltuk meg.

Fontosabb eredmények, tézispontok

1. Toxicitási vizsgálatokkal kiválasztottuk a megfelelő AuNP és AgNP koncentrációkat a további kísérletekhez, és kimutattuk, hogy a fém nanorészecskék ebben a koncentrációban alkalmazva bejutnak a tumoros sejtekbe, ahol a citoplazmában felhalmozódnak.
2. Sikeresen létrehoztuk és fenntartottuk primer makrofágok tenyészetét, amelyből felépítettünk két *in vitro* modellrendszert, melyben az emlőtumorsejtek és a makrofágok kommunikációját vizsgálni tudtuk.
3. Bizonyítottuk, hogy a létrehozott *in vitro* tumorsejt-makrofág modellek nem toxikusak sem a primer, sem pedig az immortalizált makrofágokra.
4. Kimutattuk, hogy a tumorsejtek jelenléte - az indirekt kultúrában, vagy a tumorsejtek által KM révén – miatt megemelkednek a vizsgált makrofág sejtekben az M2-szerű TAM markerek (citokinek, kemokinek, enzimek) expressziója mind mRNS mind fehérje szinten.
5. Kimutattuk, hogy amennyiben a tumorsejteket AuNP-vel vagy AgNP-vel kezeljük, akkor szignifikánsan visszaszorul az M2 markerek expressziója a makrofág sejtekben mindkét *in vitro* rendszerben.

6. Meghatároztuk számos, a sejtmigrációhoz köthető fehérje mennyiségét J774 és BMDM sejtekben és kimutattuk, hogy a tumorsejtek hatására megnőtt a makrofágok által szekretált fehérjék koncentrációja. Ha a tumorsejteket nanorészecskékkel kezeltük, akkor viszont ezeknek a migrációhoz szükséges fehérjéknek a szekréciója jelentősen csökkent mind a primer mind az immortalizált makrofágok esetén.

7. Igazoltuk, hogy a tumorsejtek hatására megemelkedik a makrofágok MMP aktivitása és migrációs képessége, ezeknek a jellegeknek a megjelenése azonban elmarad a makrofágokban, ha a velük ko-kultúra vagy KM révén kapcsolatba kerülő tumorsejteket AuNP-vel vagy AgNP-vel kezeltük.

8. Megállapítottuk, hogy a nanorészecskék modulálni tudják a tumorsejtek és a makrofágok közötti kommunikációt, és a tumorsejtek AuNP és AgNP kezelése hatékonyan képes visszaszorítani a tumorsejteknek a makrofágokra kifejtett „átprogramozó” hatását.

Összefoglalás

Kutatásunk során kimutattuk, hogy a tumorsejtek képesek modulálni az immortalizált és primer makrofág sejtek működését, mind tumorsejt KM-okon keresztül, mind indirekt

ko-kultúrában makrofág sejtekkel, amely hatást a tumorsejtek fém nanorészecske kezelése képes volt meggátolni.

Kutatásunk során kimutattuk, hogy a tumorsejtek által termelt faktorok és jelenlétük M2-szerű, tumor-támogató markerek (pl. CCL2, CCL3, CCL22, COX2, NOS2, MMP9/2, IL-23) expresszióját fokozzák a makrofágokban, elősegítve a tumorprogressziót és immunszuppresszív mikrokörnyezet kialakulását. Ezzel szemben a fém nanorészecskékkal kezelt tumorsejtek esetében ezek a hatások mRNS- és fehérjeszinten is jelentősen csökkentek. A kezelés továbbá mérsékelte a makrofágok migrációját, MMP aktivitását és kemokin-termelését. Mind AuNP-k, mind AgNP-k hatékonyan gátolták a tumorsejtek által indukált TAM-M2 polarizációt mind az immortalizált J774, mind a primer BMDM makrofág sejtekben.

Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy az AuNP-k és AgNP-k ígéretes anyagoknak bizonyultak a tumor és a sztrómasejtek közötti kölcsönhatások befolyásolására. A sztrómasejtek tumorsejtek általi „átprogramozásának” ellensúlyozására, valamint a makrofágok daganatfejlődést támogató szerepének mérséklésére, ezáltal új lehetőségeket teremtve a jövőbeni nano-alapú tumorterápiás módszerek fejlesztéséhez.

Summary

Macrophages in the tumor microenvironment (TME) are highly plastic and can polarize into either M1-like pro-inflammatory, anti-tumor, or immunosuppressive, tumor-supporting M2-like phenotypes. Tumor-associated macrophages (TAMs) typically exhibit M2-like characteristics, which promote tumor progression.

Metal nanoparticles, especially gold (AuNP) and silver (AgNP) nanoparticles, are gaining increasing importance in medicine, particularly in cancer therapy. Due to their excellent physicochemical properties, simple synthesis, and easily modifiable surfaces, they have become promising therapeutic and diagnostic tools. They can be advantageous in cancer treatment because nanoparticles can passively accumulate in tumor tissues. When modified with targeting molecules, they can actively deliver therapeutic agents directly into tumor cells. Additionally, some AuNPs and AgNPs have direct anti-tumor effects by inducing apoptosis and inhibiting tumor cell proliferation and growth. AgNPs and AuNPs interact with the immune system, triggering both inflammatory and immunosuppressive responses, which depend greatly on their size, charge, shape, and surface coating. Additionally, they can promote the polarization of the M1 phenotype.

Our study demonstrated that tumor cell-derived conditioned media and co-culturing with tumor cells induced M2-like

polarization in macrophages, but pre-treating the tumor cells with AuNPs or AgNPs significantly reduced these pro-tumoral effects. Nanoparticles decreased key chemokines (CCL2, CCL3), MMPs, and cytokines, thereby limiting macrophage migration and invasiveness. Both nanoparticles modulated tumor–macrophage interactions, with AuNPs showing high potential due to their biocompatibility. J774 and BMDM macrophages responded similarly, supporting the robustness of the findings and suggesting similar outcomes while applying other macrophage models, including *in vivo* TAMs found in the TME. These results highlight TAMs as potential targets for nanoparticle-based cancer therapies, though further research is needed to clarify mechanisms.

Publikációk listája

MTMT azonosító: 10069999

A fokozatszerzéshez felhasznált közlemények listája:

1. Dóra Izabella Adamecz, Éva Veres, Csaba Papp, Hédi Árva, Andrea Rónavári, Annamária Marton, Csaba Vizler, Attila Gácsér, Zoltán Kónya, Nóra Igaz, Mónika Kiricsi: *Gold and Silver Nanoparticles Efficiently Modulate the Crosstalk Between Macrophages and Cancer Cells*. Int J Nanomedicine 2025; 20:4777-4802 doi.org/10.2147/IJN.S508171 IF: 7,7

2. Ferenc István Nagy, Dóra Izabella Adamecz, Ádám Baji, Ágnes Kiricsi, Ildikó Huliák, Andrea Rónavári, Zoltán Kónya, Éva Frank, Mohana Krishna Gopisetty, Mónika Kiricsi: *Semi-Synthetic Dihydrotestosterone Derivatives Modulate Inherent Multidrug Resistance and Sensitize Colon Cancer Cells to Chemotherapy*. *Pharmaceutics* 2023; 15, no. 2: 584. doi.org/10.3390/pharmaceutics15020584 **IF: 5,5**

Egyéb tudományos közlemények listája:

1. Kovács Ferenc, Dóra Izabella Adamecz, Ferenc István Nagy, Benedek Papp, Mónika Kiricsi, Éva Frank: *Substitutional Diversity-Oriented Synthesis and In Vitro Anticancer Activity of Framework-Integrated Estradiol-Benzisoxazole Chimeras*. *Molecules* 2022; 27, no. 21: 7456. doi.org/10.3390/molecules27217456 **IF: 4,6**
2. Barnabás Molnár, Mohana Krishna Gopisetty, Ferenc István Nagy, Dóra Izabella Adamecz, Zsolt Kása, Mónika Kiricsi, Éva Frank: *Efficient access to domain-integrated estradiol-flavone hybrids via the corresponding chalcones and their in vitro anticancer potential*. *Steroids* 2022; Volume 187, 109099, ISSN 0039-128X, doi.org/10.1016/j.steroids.2022.109099 **IF: 2,3**
3. Mohana Krishna Gopisetty, Dóra Izabella Adamecz, Ferenc István Nagy, Ádám Baji, Vasiliki Lathira, Márton Richárd Szabó, Renáta Gáspár, Tamás Csont, Éva Frank, Mónika Kiricsi: *Androstano-arylpyrimidines: Novel small molecule inhibitors of MDRI for sensitizing multidrug-resistant breast cancer cells*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2021; Volume 156, 2021, 105587, ISSN 0928-0987, doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105587 **IF: 4,7**

4. Ferenc Kovács, Mohana Krishna Gopisetty, Dóra Izabella Adamecz, Mónika Kiricsi, Éva Enyedy, Éva Frank: *Synthesis and conversion of primary and secondary 2-aminoestradiols into A-ring-integrated benzoxazolone hybrids and their in vitro anticancer activity*. RSC Advances 2021; 13885–13896, Volume 11, 23, doi.org/10.1039/D1RA01889B **IF: 4,6**
5. Andrea Rónavári, Nóra Igaz, Dóra Izabella Adamecz, Bettina Szerencsés, Csaba Molnár, Zoltán Kónya, Ilona Pfeiffer, Mónika Kiricsi: *Green Silver and Gold Nanoparticles: Biological Synthesis Approaches and Potentials for Biomedical Applications*. Molecules 2021; 26, no. 4: 844. doi.org/10.3390/molecules26040844 **IF: 4,6**
6. Molnár Barnabás, Mohana Krishna Gopisetty, Dóra Izabella Adamecz, Mónika Kiricsi, Éva Frank: *Multistep Synthesis and In Vitro Anticancer Evaluation of 2-Pyrazolyl-Estradiol Derivatives, Pyrazolocoumarin-Estradiol Hybrids and Analogous Compounds*. Molecules 2020; 25, no. 18: 4039. doi.org/10.3390/molecules25184039 **IF: 4,6**
7. Gergő Mótyán, Ádám Baji, Małgorzata Anna Marć, Mohana Krishna Gopisetty, Dóra Izabella Adamecz, Mónika Kiricsi, Éva Enyedy, Éva Frank: *Microwave-Assisted Synthesis, Proton Dissociation Processes, and Anticancer Evaluation of Novel D-Ring-Fused Steroidal 5-Amino-1-Arylpyrazoles*. Applied Sciences 2020; 10, no. 1: 229. doi.org/10.3390/app10010229 **IF: 2,5**

Összesített impakt faktor: 41,1

Nyilatkozat

Alulírott Nagy Ferenc István (SZTE TTIK Biokémia és Molekuláris Biológiai Tanszék, Experimentális Kemoterápia és Nanomedicina Kutatócsoport), az Adamecz Dóra Izabella doktori fokozatszerzési eljárásának alapját képező társszerzős publikáció (Ferenc István Nagy, Dóra Izabella Adamecz, Ádám Baji, Ágnes Kiricsi, Ildikó Huliák, Andrea Rónavári, Zoltán Kónya, Éva Frank, Mohana Krishna Gopisetty, and Mónika Kiricsi: *Semi-Synthetic Dihydrotestosterone Derivatives Modulate Inherent Multidrug Resistance and Sensitize Colon Cancer Cells to Chemotherapy*. *Pharmaceutics* 2023; 15, no. 2: 584. doi.org/10.3390/pharmaceutics15020584) elsőszerzőjeként nyilatkozom, hogy a jelöltnek meghatározó szerepe volt a fent említett közlemény létrehozásában.

A tanulmány elsőszerzőjeként én, illetve a tanulmány felelős szerzőjeként Dr. Csontné Dr. Kiricsi Mónika (SZTE TTIK Biokémia és Molekuláris Biológiai Tanszék, Experimentális Kemoterápia és Nanomedicina Kutatócsoport) hozzájárulunk ahhoz, hogy a publikációt a jelölt felhasználja az SZTE TTIK Biológia Doktori Iskola doktori fokozatszerzési eljárásához szükséges társszerzős közleményként, és egyúttal kijelentjük, hogy a fenti publikációt más társszerző nem használta fel társszerzős közleményként tudományos fokozat megszerzéséhez, és ezt a jövőben sem fogja megtenni.

Szeged, 2025.08.01.

.....
Nagy Ferenc István
elsőszerző

.....
Dr. Csontné Dr. Kiricsi Mónika
felelős szerző