



Pázmány Péter Katolikus Egyetem
Információs Technológiai és Bionikai Kar

Ciklodextrinek onkológiai felhasználhatóságának vizsgálata humán sejteken

37. OTDK Biológia Szekció

Kvasznicza Júlia
Molekuláris Bionika mérnöki BSc

2025

Témavezetők: Dr. Garay Tamás Márton

Kivonat

A ciklodextrinek (CD) a természetben is előforduló ciklikus oligoszaharidok. A CD-k toroidális szerkezetük lehetővé teszi a lipidek és az apoláris gyógyszer-molekulák kapszulázására. A természetben előforduló gyógyszer-hatóanyagok fellendülésével a CD-ket gyógyszeripari alkalmazásokban is használják. Kiemelten az apoláris hatóanyagok oldódásának fokozására. Az extracelluláris vezikulák (EV-k) jelentős hatást gyakorolnak a tumor áttétképződésre és a gyógyszerrezisztencia mechanizmusaira, így a sejtek közötti kommunikáció létfontosságú alkotóelemét képezik.

A CD-k képesek kölcsönhatásba lépni a membránlipidekkel, potenciálisan befolyásolhatják az EV-k transzportját is, így közvetetten módosíthatják a tumorsejtek közötti intercelluláris kommunikációt. Ennek következtében szerepet játszhatnak a tumorok fejlődésének, növekedésének és disszeminációjának különböző fázisaiban.

Ezzel összhangban kutatásom célja a ciklodextrinek hatásainak vizsgálata az EV-k felszabadulására és dokkolására humán tumor- és nem tumoros sejtekben in vitro körülmények között. Megfigyeléseinket négy melanoma sejtvonalon végeztük. Továbbá kutatásainkat két nem tumoros sejtvonalra is kiterjeztettük a CD-kezelés átfogóbb tanulmányozásának érdekében.

A CD kezelés szenzitivitását SRB assay-vel határoztuk meg. Az általunk vizsgált CD-k jellemzően jól tolerálhatónak bizonyultak a vizsgált sejtvonalakon (HaCaT, HEK293, WM983A, WM983B és A2058). Az EV karakterizálás során összfehérje mennyiséget, összlipid mennyiséget, medián részecske méretet és részecske mennyiséget vizsgáltunk. A CD-kezelések nem befolyásolták jelentősen az EV-k méretét és mennyiségét, de az EV frakció fehérjetartalma CD-enként eltérően változott, míg a CD kezelt EV-k lipid-részecske méretaránya a kontrollhoz képest csökkent. Tömegspektrometriával vizsgáltuk a CD-k eloszlását a WM983A és WM983B sejtvonalak által termelt EV-kben. A molekulák jelenléte hasonló eloszlást mutatott a sejtvonalakban, de eltérő mintázatot adott a különböző ciklodextrinek (DIMEB95, RAMEB és α CD) esetében. Videomikroszkópos kísérlettel elemeztük a tumoros környezetből származó, kezeletlen és CD (RAMEB és CRYSMEB) jelenlétében termelt EV-k migrációra gyakorolt hatását Mel Pt4 és HaCaT sejtvonalakon. Az EV-k nem befolyásolták a sejtek életképességét, és csak csekély hatással voltak a migrációra. Összességében eredményeink arra engednek következtetni, hogy a CD-k jótékony szerepet játszhatnak az EV-közvetített sejtközi kommunikációt célzó onkológiai terápiákban.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	1
1.1. Irodalmi háttér	1
1.2. Ciklodextrinek	1
Natív és módosított ciklodextrinek	2
A projekt során vizsgált ciklodextrinek	2
1.3. Extracelluláris vezikulák	5
1.4. A lipidek szerepe a rák progressziójában és metasztázisában	6
2. Módszerek	8
2.1. Vizsgált sejtvonalak bemutatása	8
2.2. Sejtek fenntartása és életképességi vizsgálatok	8
2.3. Extracelluláris vezikulák termeltetése	10
2.4. A termelt extracelluláris vezikulák karakterizálása	12
2.5. A ciklodextrinek felhalmozódása a CD kezelés során	14
Nagynyomású folyadékkromatográfia - tömegspektrometria [HPLC-MS] . . .	14
2.6. Videómikroszkópos mérések	15
3. Eredmények	17
3.1. A ciklodextrinek tumorsejtek életképességére és proliferációjára gyakorolt hatásának vizsgálata	17
3.2. A vizsgált ciklodextrinek életképességi vizsgálata nem-tumoros sejteken .	19
3.3. A ciklodextrinek hatásának vizsgálata a sejtek által termelt extracelluláris vezikulák mennyiségére és összetételére	21
3.4. A ciklodextrinek eloszlásának vizsgálata tumor sejtek tenyészeiben . . .	23
3.5. Tumoros környezetből származó EV-k életképesség és migrációra gyakorolt hatása	24
4. Diskusszió	27
4.1. A ciklodextrinek nem-tumoros és tumoros sejtek életképességére gyakorolt hatása	27
4.2. A ciklodextrinek hatásának vizsgálata a sejtek által termelt extracelluláris vezikulák mennyiségére és összetételére	28
4.3. A ciklodextrinek eloszlásának vizsgálata tumor sejt tenyészetben	29

4.4. Tumoros környezetből származó EV-k életképességre és migrációra gyakorolt hatása	30
5. Összefoglalás	32
Felhasznált irodalom	36

1. Bevezetés

1.1. Irodalmi háttér

A ciklodextrinek (CD) torroidális szerkezetű oligoszaharidok, melyekről kimutatták, hogy kölcsönhatásba lépnek a koleszterinnel és más szterolokkal, olyan zárványkomplexekeket alkotva, amelyek megváltoztathatják a koleszterin oldhatóságát, felszívódását és metabolizmusát[1]. A CD-k továbbá képesek foszfolipideket, koleszterint és fehérjéket kivonni a biológiai membránokból. Ez a hatás függ a membrán szerkezetétől és összetételétől, valamint a CD típusától és koncentrációjától. Meghatározott körülmények között, a CD-k befolyásolhatják a liposzómák és sejtek membránfolyékonyságát, permeabilitását és stabilitását [2].

Az extracelluláris vezikulák (EV) lipid-kettősréteggel határolt szerkezetek, melyek részt vesznek a szervezet sejtjei között zajló intercelluláris kommunikációban. A koleszterinben gazdag EV-k hozzájárulhatnak a rákos sejtek disszeminációjához és az új tumorok kialakulásához távoli helyeken. Az EV-k által hordozott koleszterin és egyéb lipidek elősegíthetik a tumor mikro környezetének átalakulását, amely kedvez a metasztatikus sejtek túlélésének és növekedésének.

Mivel a CD-k képesek kölcsönhatásba lépni a membránlipidekkel, hatással lehetnek az EV transzportra is, ezáltal befolyásolhatják a tumorsejtek intercelluláris kommunikációját. Ez új perspektívákat nyithat a rák kezelésében és diagnosztikájában.

1.2. Ciklodextrinek

A CD-k a poliszacharidok egy családja, melynek tagjai α -1,4 glikozidos kötésekkel összekapcsolt glükózegységekből állnak, amivel egy toroid, azaz fánk alakú szerkezetet vesznek fel. Ezek a gyűrűs oligoszacharidok, jól ismertek biológiai lebonthatóságukról [3], biokompatibilitásukról, csekély toxicitásukról, valamint különleges belső hidrofób üreg és külső hidrofíl köpeny szerkezeti jellemzőikről. Tehát a CD-k általában biztonságosnak és biokompatibilisnek tekinthetők és széles körben használják őket a gyógyszeriparban segédanyagként, gyógyszer és egyéb funkcionális összetevők hordozó rendszereként. Mivel zárványkomplexekeket képeznek, javíthatják a vendégmolekulák stabilitását, oldhatóságát, biológiai hozzáférhetőségét és egyéb fizikai-kémiai tulajdonságaikat. Potenciális hatóanyagok a hidrofób gyógyszerek oldhatóságának növelésére. Azonban arról még keveset tudunk, hogy a hatóanyagot nem tartalmazó CD-k hogyan gyakorolnak hatást a sejtekre, vagy milyen hatást gyakorolnak a szervezetre.

Natív és módosított ciklodextrinek

A leggyakrabban használt ciklodextrinek közé tartoznak a 6, 7 vagy 8 glükopiranoz egységből álló α -, β - és γ -ciklodextrinek. Ezek a molekulák a glükózegységek számán túl konformációjukban is különböznek egymástól. A méret szerinti összehasonlításon kívül, két főtipust különítünk el a natív ciklodextrinek és a ligandummal ellátott ciklodextrin származékokat. Ezen felül semleges, ionos vagy random szubsztituált csoportosításuk létezik. A szubsztituensek töltése alapján megkülönböztetünk pozitív, negatív és semleges CD-ket. Ilyen tekintetben beszélhetünk semleges CD származékokról (hidroxipropil, acetyl, metil) illetve ionizálható CD származékokról (CM, amino, szulfát) [4]. A CD-k szubsztituenseiken alapuló csoportosítását az 2.1 táblázat foglalja össze.

Ciklodextrin töltése	Elválasztható enantiomer	Ciklodextrin származékok
semleges	ionos	α -, β -, γ - CD, acetilezett, DIMEB, HP
negatív	ionos és semleges	karboxi-alkil, szulfatált, foszfátalt
pozitív	ionos és semleges	amino: primer, szekunder, terciár és kvaterner

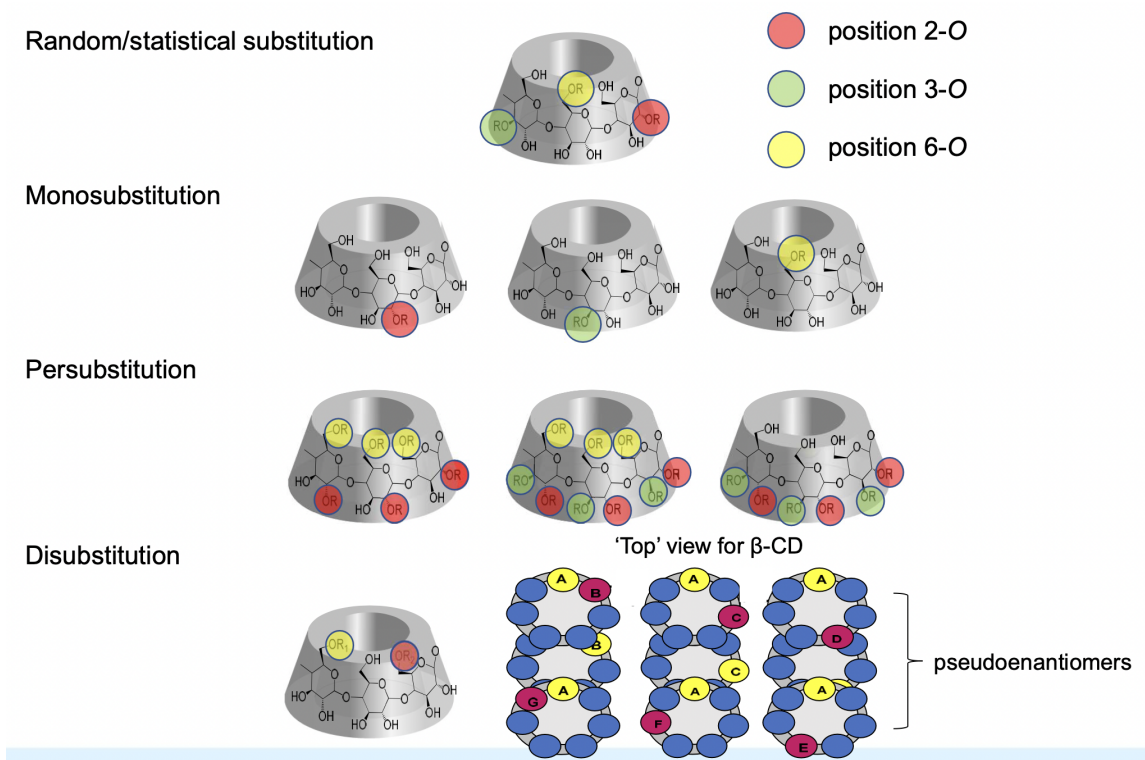
1.1. táblázat. A ciklodextrin módosulatók töltés szerinti csoportosítása.

A CD-ket meghatározza, hogy milyen ligandokat és hova kapcsolnak az alap-molekulára. A szubsztituensek lehetséges helyzetét, mintázatát az 1.1 ábra mutatja be. A natív CD molekula módosításának célja lehet a stabilitási állandó megváltoztatása, valamint a „belső” szelektivitás növelése. Ezen kívül fontos lehet a mozgékony-különbség fokozása a szabad és a komplexált formák között is.

A módosított CD-k egyik fő jellemzője a szubsztitúciós fok (SD), amely a ciklodextrin gyűrűn átlagosan jelen lévő szubsztituensek számát jelöli. Kutatásaink során ennek a szerepét a HPBCD-k (CD_1 és CD_2) hatásának összehasonlításával vizsgáltuk, melyeknek szerkezeti képlete megegyezik, csak az SD számukban különböznek. Érdekes megjegyezni, hogy Varga Erzsébet vizsgálata során az SD érték növekedésével csökkent a β -CD-k által oldhatóvá tett különböző gyógyszermolekulák mennyisége vizes HPBCD oldatban [4].

A projekt során vizsgált ciklodextrinek

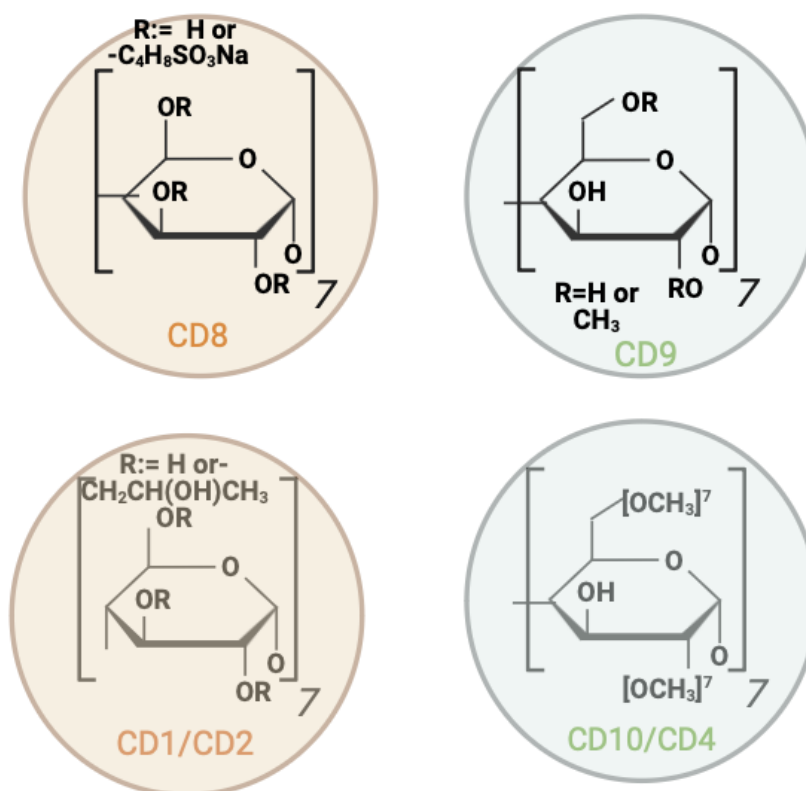
A Cyclolab Kft.-vel együttműködésben megvalósuló kutatás során összesen 10 natív és módosított ciklodextrint vizsgáltunk, melyek főbb tulajdonságait az 1.2 táblázat és az 1.2 ábra mutatja be. A projekt során mind α - és β -, mind pozitív, semleges és negatív, mind pedig 2-O és 6-O szubsztituált CD származékokat vizsgáltunk.



1.1. ábra. Ciklodextrinek lehetséges szubsztitúciós mintázata és elnevezése. [4]

sorszám	név	rövidítés	'SD csoport'	szubsztituensek helyzete
CD_1	(2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin(DS-6.3)	[HPBCD]	[6-6,3]	2-O
CD_2	(2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin(DS-4.5)	[HPBCD]	[0-4,5]	2-O
CD_3	Carboxymethyl- α -cyclodextrin sodium salt(DS-3.5)	[CMACD]	[0-4,5]	random
CD_4	Heptakis(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin (DS-14)	[DIMEB-50]	[12-14]	2-O és 6-O
CD_5	Methylated β -cyclodextrin(DS-3)	[CRYSMEB]	[0-4,5]	random
CD_6	α -cyclodextrin		[0-4,5]	nincs
CD_7	Hexakis(6-deoxy-6-amino)- α -cyclodextrin	[HAACD]	[6-6,3]	6-O
CD_8	Sulfobutylated- β -cyclodextrin sodium salt(DS-6)	[SBECD]	[6-6,3]	random
CD_9	Random Methyl- β -cyclodextrin(DS-12)	[RAMEB]	[12-14]	random
CD_{10}	Heptakis(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin (DS-14)	[DIMEB-95]	[12-14]	2-O és 6-O

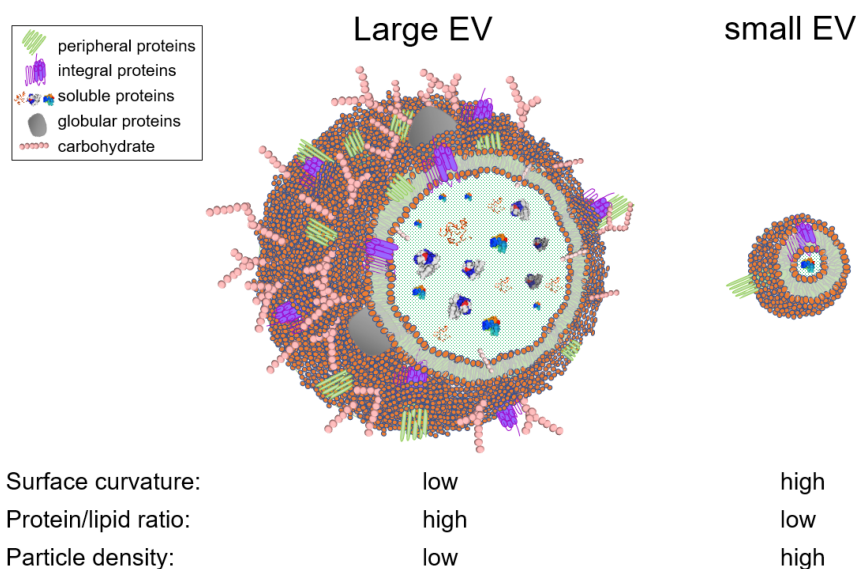
1.2. táblázat. A kutatásunkba bevont ciklodextrinek SD csoportjaik és szubsztitútenseik elhelyezkedéseik.



1.2. ábra. Hat a [5] forásban és kísérleteinkben is szereplő ciklodextrin CD_1/CD_2 , CD_8 , CD_9 és CD_{10}/CD_4 szerkezeti képlete ligandumjaik alapján. A zöldel ábrázolt molekulák metilezett származékok.

1.3. Extracellurális vezikulák

Az extracelluláris vezikulák (EV) egy gyűjtőfogalom, a sejttenyésztési folyadékokban és a testváladékokban található különböző típusú vezikulákat foglalja magába, amelyek átmérője nanométertől 5 mikronig terjedhet. Ez a heterogenitás olyan tényezőktől függ, mint az EV-ket termelő sejtek típusa, a fiziológiai állapot és az elválasztási módszer. A méret befolyásolja a felszíni rakományt és az intravezikuláris tartalmat is. A nagyobb EV-k nagyobb mennyiségű és többféle fehérjét valamint lipidet hordozhatnak (1.3 ábra) [6]. Fontos megjegyezni, hogy az EV-k a fehérjéken és a lipideken kívül más biomolekulákat is tartalmazhatnak, mint például nukleinsavakat, kismolekulákat peptideket.



1.3. ábra. A részecskeméretnek az EV-k összetételére és fiziokémiai tulajdonságaira gyakorolt hatása[6].

Az EV-k izolálhatóak különböző biológiai folyadékokból, és tartalmuk értékes biomarkereként szolgál a rák diagnózisában, prognózisában, a rák progressziójának nyomon követésében és a kezelési válaszok értékelésében. A tumorok által szekretált EV-k döntő szerepet játszanak a sejtek közötti kommunikációban, megkönnyítve a fehérjék, lipidek és metabolitok cseréjét különböző fiziológiás és patológiás állapotokban. Ezek az EV-k a tumorokból származó specifikus molekulákat hordoznak, amelyek tükrözik a kiindulósejtek intracelluláris állapotát. A tumorsejtekből származó EV-k hozzájárulnak a rákos áttétképződéshez azáltal, hogy befolyásolják a tumor mikrokörnyezetét, elnyomják az immunrendszert, elősegítik a premetasztatikus niche kialakulását. A célzott terápiás gyógyszerek fejlődése ellenére a tumorok kezelésének jelenlegi klinikai értékelése elsősorban a tumor volumetrikus képalkotására támaszkodik, amely késleltetett és érzéketlen a gyógyszerek molekuláris kölcsönhatásaival szemben. Szükség lenne egy olyan véralapú megközelítés kifejlesztésére, amely a személyre szabott kezelés nyomon követése érdekében jellemzi a gyógyszer-célpont kölcsönhatásokat. Az EV-k az utóbbi időben ígéretes keringő biomarkerré váltak. Ezek a

nanoméretű membránhólyagok számos emlőssejt által, különösen a gyorsan osztódó rákos sejtek által aktívan kiválasztódnak. Az EV-k bőségesen megtalálhatóak a vérben, és fontos szerepet játszanak a sejtek közötti kommunikáció közvetítésében. Az EV-ekhez kötött célpontok lebomlási útjaival kapcsolatos legújabb eredmények alapján arra következtetnek, hogy az EV-k tartalmazhatnak gyógyszerekhez kötött fehérjéket és tükrözhetik a sejtekben lévő gyógyszerhatásokat is.

Az EV-k gyógyászati jelentőségét emeli ki az is, hogy tumoros megbetegedésekben az EV-k részt vesznek a bioaktív molekulák szállításában a stroma és a tumoros transzformáción átesett sejtek között. Továbbá segítenek megfelelő környezetet teremteni a tumor növekedéséhez, progressziójához és metasztázis kialakulásához. Az EV-k kulcsfontosságát akkor értjük meg igazán, ha figyelembe vesszük, hogy az áttétes tumoros betegek 79,2%-a, a diagnosztizált daganatos betegség miatt hal meg és a daganatos betegek medián túlélési ideje mindössze 10 hónap, valamint tudatosítjuk, hogy a tumoros megbetegedésekhez köthető elhalálozások során a fő halálok nem az elsődleges daganat, hanem az az általa okozott terjedés következménye [7]. Hanna Dillekas és társai adatai alátámasztják azt az elképzelést, hogy a szolid tumorok okozta halálozások többségét, legalább 2/3-át áttétek okozzák. Ezért az áttétek biológiájának jobb megértése és az áttétes növekedésben szerepet játszó gyógyszeres célpontok azonosítása ígéretes stratégia a rákos halálozás csökkentésére. A rákos betegeknél az agresszív kezelésből eredő kardiotoxicitásából magas kockázat várható más halálozási tényezőkre is. National Comprehensive Cancer Network nemrégiben elismerte a rákkezelésnek a szív- és érrendszeri egészségre gyakorolt negatív hatását, különös tekintettel a kardiokardiológiára, és hangsúlyozta a rák túlélőinek szóló multimodális kardiológiai rehabilitációs programok szükségességét. Az áttétes daganatos betegek a diagnózist követő első évben több mint tízszer nagyobb valószínűséggel halnak meg szív- (a nem rákos halálozások 32,4%-a) vagy agyi érrendszeri betegségben (a nem rákos halálozások 6,1%-a), mint az átlagnépesség [7].

1.4. A lipidek szerepe a rák progressziójában és metasztázisában

A lipidek alapvető biológiai funkciókat látnak el a szervezetben, például energiatárolást biztosítanak, jelzőmolekulaként működnek, és a membránok szerkezeti alkotóelemei. Ugyanakkor a túlzott feleslegben elérhető lipidek elősegíthetik a tumorok kialakulását, kolonizációját és a tumorsejtek áttétképzését. Az áttétképzéshez a tumorsejt különböző szakaszokon megy keresztül, amelyekhez lipidekkel kapcsolatos metabolikus és strukturális alkalmazkodásra van szükség. A rákos sejtek a lipidanyagcserét arra is felhasználják, hogy a saját előnyükre módosítsák a stroma- és immunsejtek aktivitását, és hogy ellenálljanak a terápiának.

Nem meglepő módon a rákos sejtek, valamint a tumor mikrokörnyezetében lévő más sejttípusok különböző módokat alkalmaznak a lipidek felvételére és anyagcseréjük átfogó átprogramozására. A sejtek lipidháztartásában és összetételében bekövetkező változások segíthetik

a rákos sejteket abban, hogy a változó mikrokörnyezetben boldoguljanak.

A rákos sejtek tenyésztése során gyakran támaszkodnak a magzati szarvasmarha szérumra, mint a sejtek túlélését és proliferációját támogató fehérje- és lipidfaktorok forrására; a szérumtartalmú közegek azonban nem tökéletesen utánozzák az *in vivo* tumoros környezetet. Újabb tanulmányok azt sugallják, hogy a tipikus szérumtartalmú sejttenyésztési körülmények elfedhetik a rákos sejtek függőségét, például a koleszterin bioszintézis enzimektől, amely függőség *in vivo* létezik, és akkor válik modellezhetővé, ha a sejteket olyan közegben tenyésztik, amely reálisabb lipidszintet biztosít [8].

A lipidek maguk is felhasználhatók membránbontó ágensekként vagy különböző terápiák nanohordozóinak kulcsfontosságú összetevőiként [9]. Így a rákos sejtek membránjaik lipid koncentráció csökkenésére irányuló beavatkozások ígéretes terápiás lehetőségeket kínálnak a rák progressziójának gátlására és az áttétképződés kezelésére [10]. A koleszterinben gazdag membrándomének (pl. lipidraftok) gyakran részt vesznek az exoszómák képződésében és kibocsátásában. A koleszterin az EV-k membránjában lévő lipidkompozíció egyik meghatározó eleme, amely befolyásolja az EV-k célsejtekhez való kötődését és felvételét. A koleszterin befolyásolja az EV-k membránjának fluiditását és stabilitását [11]. Ez a háttér a CD-k egyik potenciális tumor-ellenes hatásának, mely azon alapul, hogy a CD-k a membránlipideket zárványkomplexbe vihetik. Ezen felül a CD-k zárványkomplexeket képezhetnek a hatóanyagokkal, ezáltal fokozva hatékonyságukat [12].

2. Módszerek

2.1. Vizsgált sejtvonalak bemutatása

A kísérleteink során a tumor környezet modellezésére három rákos sejtvonalat alkalmaztunk. Az A2058 (ATCC CRL-11147) sejtvonal metasztatikus nyirokcsomóból származik, és jelentős invazivitással rendelkezik [13]. A BRAF V600E mutáns WM983A (RRID: CVCL-6808) és WM983B (RRID: CVCL-6809) [14] sejtvonalakat ugyanazon beteg primer, illetve áttéti tumorából izolálták és indították.

A migrációs vizsgálatokhoz a Mel Pt 4 pre sejtvonalat használtuk, egy kezelés előtt eltávolított humán melanoma sejtvonalat, amelyet Peter Hersey professzor hozott létre. Azért választottuk ezt a sejtvonalat, mert az általa termelt EV-k nagyobb elmozdulást mutatnak, mint a WM983A és WM983B sejtvonalak EV-jei.[15]

A CD-K hatását nem tumoros környezetben is vizsgáltuk, két humán sejtvonalon: HaCaT és HEK293 [16]. A HaCaT sejtvonal egy 62 éves felnőtt bőréből származó, in vitro spontán transzformálódott keratinocitákból áll. A HEK293 (ATCC CRL-1573) egy humán embriónális vese sejtvonal, amely immortalizált sejtekből származik. Ez a sejtvonal az 1970-es években egy női magzatból izolált HEK sejtekből lett létrehozva.

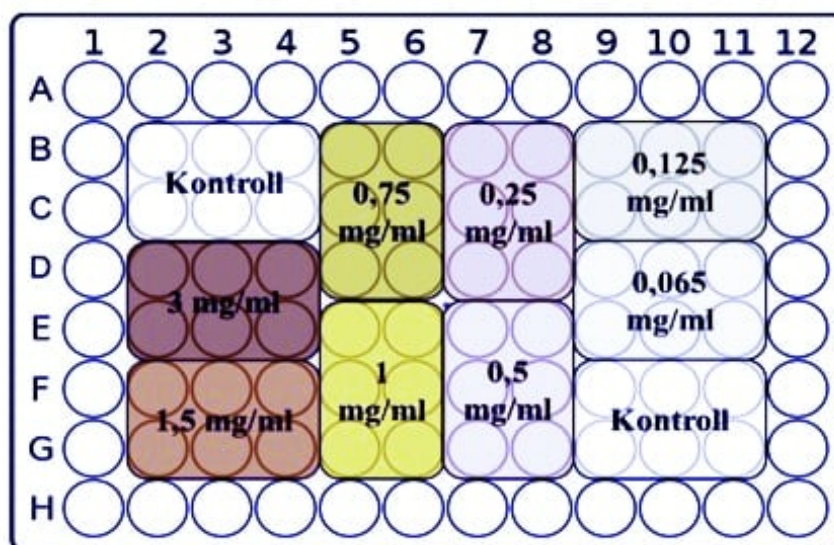
2.2. Sejtek fenntartása és életképességi vizsgálatok

A kutatásban felhasznált sejteket az eredeti helyükről eltávolítva in vitro, úgynevezett sejtkultúrákban tartjuk. Ez lehetőséget ad egy genetikailag homogén sejtpopuláció vizsgálatára, jelentősen megkönnyítve a kísérletek kontrollálását, megismételhetőségét.

Így egy leredukált modellben figyelhetjük meg a potenciális hatóanyagok sejt-migrációra, életképességre gyakorolt hatását valamint molekuláris szinten vett hatásmechanizmusát az egyes onkogén kaszkádokban.

Az életképességi kísérleteket az 2.1. szakaszban említett HEK293, HaCaT, A2058, WM983A és WM983B sejtvonalakon végeztük. Kontrolcsoportként két humán nem tumoros sejtvonalat, illetve két szingenetikus sejtvonalat, melyeket ugyan azon beteg primer tumorjából és nyirokcsomó áttétjéből indítottak. A sejteket a protokollnak megfelelő tápoldatban T25-ös

tenyésztő flask-ban tároltuk. A tápoldat (médium) összetétele: Dulbecco Modified Eagle Medium [DMEM] (4,5 g/l glükóz, L-glutamin és nátrium-piruvát, Capricorn-Scientic), 1% P/S/A-t (penicillin, streptomycin és amfotericin keverék), 10% magzati borjúsérummal [FBS]. A sejtkultúrákat 37 °C-on, 5%-os CO₂ koncentráción, telített páratartalom mellett inkubáltuk. A sejtkultúra, megfelelő körülmények között, 3-4 napon belül konfluens lesz. A ciklodextrinek sejt-életképességre gyakorolt hatását SRB-assayk során vizsgáltuk. Ehhez első lépésben a kiszámolt térfogatot pipettázunk a sejtszuspenzióból a 96 well-es plate belső 60 well-jébe, well-enként 150 μ l tápot és benne 3000 sejtet. A külső well-ekbe nagy feleslegben PBS-t pipettázunk. Az elkészült platet 24 órán keresztül 37 °C-on inkubáljuk. Ez az előkészítés biztosítja, hogy a sejtek megfelelően letapadjanak a lemezhez, mielőtt a kezelést elkezdenénk. A 96-os plateken 8 különböző hígítással (2.1 ábra) kezeltük a sejteket, a CD_4 és CD_{10} kivételével, ahol 10 $\times$ hígabb oldatokat használtunk a sejtek jelentős érzékenysége miatt [17]. Minden platen egyszerre csak egy CD-vel kezeltünk egy sejtkulturából származó sejteket. A vizsgálatokat CD-énként kétféle FBS-t tartalmazó táppal végeztük azonos koncentrációban három-három ismételéssel[18][8]; (DMEM+PSA) 10% FBS, illetve (DMEM+PSA) 1% EV mentes FBS. Majd az eredményeket külön-külön átlagoltuk és elemeztük. Meghatároztuk a CD-k GI₅₀ értékeit, melyek fontos információt nyújtanak a kezelés hatékonyságának értékeléséhez. Ez az érték jelzi azt a koncentrációt, amely mellett a kezelt sejtpopulációban 50%-kal kevesebb sejtek vagy az SRB-assay esetében a letapadt sejtek fehérjei mérhetők a kontrollhoz képest az adott időintervallum alatt. A kezelésekhez a por alakban kapott CD-eket először feloldottuk 300 mg/ml töménységben. A hipotónia elkerülése érdekében a CD_6 kivételével minden CD-t PBS-ben oldottuk be. A CD_6 ciklodextint az rosszul oldódott PBS-ben, ezért csökkentettük a koncentrációját és 150 μ g/ml-es törzsoldatot készítettünk vele. Az első mérésekhez 4 °C-os hűtőben tároljuk a törzsoldatokat. Mivel a tárolás során több ciklodextrin kicsapódott hűtés hatására az oldatból, ezért új törzsoldatokat készítettünk, majd szobahőmérsékleten tároltuk őket.



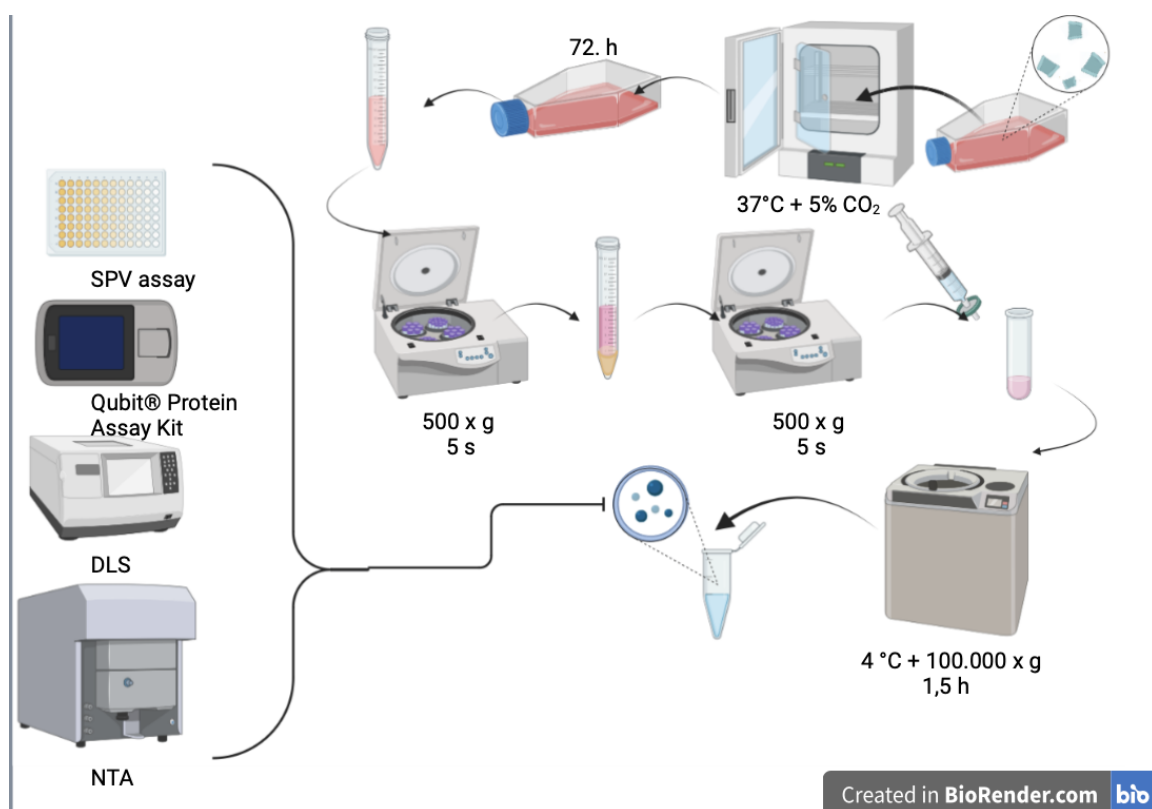
2.1. ábra. A CD minták SRB analíziséhez használt plate elrendezése.

2.3. Extracelluláris vezikulák termeltetése

Az EV-k vizsgálata során szükségszerűen először az EV termelés és izolálás lépéseit kellett beállítani, kidolgozni. A CD-k jelenlétében és kontroll körülmények között történő EV termeltetéshez elsőre lépésként két paraméter beállításra volt szükség: a CD-k koncentrációja, és az FBS tartalmára/koncentrációjára.

A natív FBS használata EV-vizsgálatokban exogén EV-k és nanorészecskék (pl. fehérje/-növekedési faktor aggregátumok) bevitelét eredményezi, amelyek szennyezik az izolált EV-frakciókat. Ez a kevert EV-populáció zavarhatja az in vitro és in vivo elemzéseket, mivel az izolált EV-k a tenyésztett sejtekből és az FBS-ből származó EV-k keverékét tartalmazzák. Továbbá, az FBS-ben lévő sejtmentes DNS-fragmentumok szorosan kapcsolódhatnak az FBS EV-inek a felszínéhez, ami további szennyeződést okoz. Így a natív FBS használata jelentős következményekkel jár és torzíthatja az EV-elemzések eredményeit [18]. Ennek elkerülése érdekében szükséges volt EV-mentes FBS használnunk az EV karakterizálás során. Amíg az EV-mentes FBS egyértelműen előnyös, mivel az exogén EV-kból származó szennyeződések elkerülhetőek, használata számos potenciális hátrányt rejt magában, beleértve a kisebb mennyiségű növekedési faktort, a magasabb költségeket, a tételek/batch-ek közötti változékonyságot, a sejtek adott esetben eltérő válasz-reakcióit [8].

Ezzel összhangban az EV-k termeltetése során a sejteket EV-mentes FBS tartalmú tápban tartottuk. Azért, hogy konzisztensek legyenek a kísérleteink az életképességi vizsgálatokkal, az EV termeltetés során a kezelőoldat térfogatát és a sejtek számát úgy állítottuk be, hogy az egy sejtre jutó CD molekulák száma ne különbözzön. A kezelés előtt a sejteket lepasszáltuk, majd a kezeléshez 1,6 millió konfluens sejtet, 7 ml-es (DMEM+PSA) 10% FBS tartalmú tápban 24 óráig inkubáltunk. Az inkubációs idő letelte után a T75-ös flaska eredeti tápját elöntve, kétszeri PBS-es mosás után a kezeléshez használt táppal töltöttük fel. A kezeléshez használt táp 7 ml 1% EV-mentes FBS tartalmú DMEM volt, ami 1 mg/ml koncentrációjú CD-t tartalmazott, kivéve a CD_4 és CD_{10} esetében, ahol 0,1mg/ml CD koncentrációt alkalmaztunk. A 72 órás inkubációt követően, EV-termeltetés, az EV-k izolálását és karakterizálást a következők szerint végeztük (2.2 ábra.): A sejtenyésztő edényből átöntöttük a felülúszót egy 15 ml-es Falcon-csőbe. A csövet 500 g-vel 5 percig centrifugáltuk szobahőmérsékleten, hogy eltávolítsuk a sejtörmeléket. A centrifugálás után átpipettáztuk a felülúszót egy steril 15 ml-es Falcon-csőbe, amit - 80 °C-on tároltunk további felhasználásig. Közben egy 'cell counter' (Luna II) segítségével megszámoltuk a sejtenyésztő lombikban maradt, tripszinnel felúsztatott sejteket és kiszámoltuk a sejtek teljes számát.



2.2. ábra. Az EV frakció gyűjtése, és EV karakterizálásának sematikus ábrája.

Az extracelluláris vezikulák izolálása során, először lassan kiolvasztottuk a sejt-felülűszo oldatot, majd 3000 g-vel centrifugáltuk 15 percig. A centrifugálás után a folyadékot 0,2 μm fecskendőszűrő segítségével átszűrtük. Az átszűrt folyadékot ultracentrifugáltuk (BECKMAN. L7-55 Ultracentrifuge) 100.000 x g 1,5 órán keresztül, 4 °C-on 70.1 Ti rotort használva. A kapott pelletet 100 μl PBS-be felfuszpendáltuk.

Az EV gyűjtésének és jellemzésének folyamatát az 2.2 ábra mutatja, sematikus formában. Az extracelluláris vezikulák termelését az életképességi assayk során meghatározott GI50 érték figyelembevételével határoztuk meg.

2.4. A termelt extracelluláris vezikulák karakterizálása

Lipid koncentráció meghatározása

A lipid koncentráció meghatározására SPV (sulfo-phospho-vanillin) assay-t alkalmaztunk. Az SPV teszt egy kvantitatív módszer a lipidtartalom meghatározására. A módszer alkalmazásával meghatározható a vizsgált mintában a nagyobb lipid-csoportok mennyisége, mint például a viaszok, a koleszteril-észterek, valamint a koleszterin mennyisége. A mérés során a mintában található lipidek szulfátokká alakulnak az előre meghatározott reakciós körülmények között. Ezután a szulfátok reagálnak a foszfo-vanillin reagenssel. A reakció után a spektrofotometriás adatok alapján kiszámítható a minta lipid-tartalma [19].

Az SPV assay elvégzése során a minták előkészítése a következő lépésekből áll. Először a mintákat készítjük elő 40 μl minta és 40 μl PBS összekeverésével. Majd elkészítjük a 16 elemű standard sort, melynek során a 16-os számú standardhoz 96 μl PBS-t keverünk 64 μl DOPC oldattal (1 mg/ml). Az egyre hígabb standardokat az előzőleg elkészített oldat további hígításával állítjuk elő; a 8-as standardhoz 80 μl PBS-t keverünk 80 μl 16-os standarddal, majd ugyanígy folytatjuk a 4-es, 2-es, 1-es, 0.5-ös, 0.25-ös és végül a 0-s standard elkészítéséig, amelyhez 80 μl PBS-t használunk. A mintákhoz és a standardokhoz 400 μl kénsavat adunk, majd alaposan összevortexeljük őket. Ezt követően az oldatokat 20 percig 90°C-on inkubáljuk nyitott tetővel. Az inkubáció után az oldatokat 5 percig 4°C-on hűtjük. Ezután hozzáadunk 240 μl foszfo-vanillin oldatot (50 mg vanillin és 50 ml 17% foszforsav keveréke), majd ismét alaposan elkeverjük (vortex). Minden mintából 280 μl -t pipetázunk egy 96-well plate két párhuzamos well-jébe, tehát összesen 560 μl -t két well-be. Az így előkészített plate-et 1 órán át 37°C-on inkubáljuk. Végül 540 nm-es hullámhosszon mérve az abszorbanciát, a lipid tartalommal arányos jelet kapunk.

Dinamikus fényszórás [DLS; dynamic light scattering]

A dinamikus fényszórás (DLS) lehetővé teszi az oldatokban lévő részecskék méretének meghatározását. Ez a módszer az oldatban lebegő részecskék Brown-mozgásán alapul. Az oldószer-molekulák folyamatosan ütköznek a részecskékkel, ami olyan energiaátadást eredményez, amely mozgást indukál a részecskékben. Ennek következtében a kisebb részecskék

gyorsabb mozgást mutatnak, míg a nagyobb részecskék lassabban mozognak. A DLS során a mintáinkat fénysugárral világítjuk meg, így mérhetjük az oldatban diffundáló makromolekulák által szórt fény intenzitásának ingadozásait. Ezáltal megkapjuk a részecskék diffúziós együtthatóját, amelyből következtethetünk a méretükre [20].

Nanoparticle Tracking Analysis [NTA]

A Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) egy optikai részecske-követési módszer, amely hasonló elven működik, mint a DLS. Ezt a technikát részecskék koncentrációjának és méreteloszlásának meghatározására fejlesztették ki. A mintában lévő részecskéket megvilágítják, majd egy kamera rögzíti az egyes részecskék útját és mozgását, ami alapján meghatározzák az átlagsebességet és a diffúziós képességet. Az NTA különbözik a DLS-től abban, hogy nem tömegszórásos, hanem egyes részecskék sodródását követi. Ez a módszer ideális a polidiszperz rendszerben lévő extracelluláris vezikulák méreteloszlásának és koncentrációjának meghatározására [20].

Az NTA mérés nulladik lépéseként desztillált vizet és PBS-t szűrünk 0,2 μm -es fecskendő-szűrő segítségével. Ezután bekapcsoljuk a készüléket és csatlakoztatjuk az átfolyó folyadék tárolót. A kalibráláshoz szükséges gyöngyök hígítását két lépésben végezzük. Először 10 μl kalibráló gyöngyöt hígítunk 10 ml vízben, ezt az oldatot 2-3 napig hűtőben tárolhatjuk 4 °C-on. Ezt követően 80 μl -t veszünk az előző lépésben ezerszeresére hígított gyöngyökből, és 20 ml vízben újra hígítjuk, amit új kalibrálás esetén pár órán belül el kell készítenünk. Az oldatok elkészítése után a rendszert desztillált vízzel mossuk át egy 20 ml-es fecskendő segítségével, majd a kalibráló gyöngyöket 1 ml-es fecskendővel töltjük be, és a gép automatikusan elvégzi a kalibrálást. A sikeres kalibrálás után ismét desztillált vizes mosást végzünk, egészen addig amíg részecskék jelenlétét tudjuk detektálni (a kijelzőről eltűnik az összes részecske).

A következő lépésben a PBS tisztaságát ellenőrizzük, ami akkor sikeres, ha a képernyőn maximum néhány részecske látható. Ebben a tiszta PBS-ben hígítjuk a mintákat a készüléknek megfelelő koncentráció tartományba, aminek az elérését a készülék jelezi. A mintákat százszorosára (10 μl minta + 990 μl PBS) vagy ezerszeresére (100 μl százszorosan hígított minta + 900 μl PBS) hígítjuk a méréshez.

A mérés kezdetén beírjuk a minta hígítását a szoftverbe, amely automatikusan számolja a koncentrációt. A kísérlet során 11 pozíciót vizsgálunk 3 cikluson keresztül. Ha a részecskék túl gyorsan mozognak vagy aggregátumot érzékel a műszer, újra kell mérnünk a mintákat. Minden minta között alaposan átmoszuk a cellát desztillált vízzel, amíg nem látunk részecskéket. A gép .txt fájlban adja ki a mért koncentráció és méreteloszlás eredményeit. A vizsgálat végeztével alapos mosást végzünk, és 10 ml levegőt nyomunk át a cellán, hogy minden folyadékot és sót eltávolítsunk a műszerből. Végül kiürítjük az átfolyó folyadékot tartalmazó edényt.

Fehérje koncentráció meghatározása - Qubit® Protein Assay Kit

A fehérje koncentrációjának meghatározása a Qubit Protein Assay Kit segítségével a következő lépések szerint történt: Elkészítettük a munkaoldatot a puffer és a reagens 200:1 arányban való keverékével. Majd eppendorfonkba 190 μ l munkaoldatot és 10 μ l standardot vagy mintát adtunk.

Alaposan elkevertük a mintát vagy standardot a munkaoldattal. Ez után a mintákat illetve a 3 kalibráló oldatot egyenként lemértük a Qubit fluorométerrel a készülék utasításainak megfelelően, és az eredményt a készülék kijelzőjén olvastuk le. A kalibráló oldatot kalibráló egyenest készítettünk a DeNovix QFX Fluorometer [21] segítségével, majd a mintákat a egyesével lemérve ráillesztük a kalibráló egyenesre, a kapott eredményeket a 3.3-as és a 3.4-es fejezethez használtuk fel. A fenti négy vizsgálati módszer segítségével karakterizáltuk a termelt EV-ket.

2.5. A ciklodextrinek felhalmozódása a CD kezelés során

Megvizsgáltuk, hogy a CD-ek a sejtes modellünkben a sejteken az EV környezetében vagy ezektől távol helyezkednek el a kezelést követően. Ennek megfelelően az EV izolálás során a két melanoma sejtvonalról (WM983A, WM983B) három-három frakciót gyűjtöttünk: a sejtes, a felülúszó tartományt és az EV frakciót. A folyamat egyes lépéseit a 2.3 ábra szemlélteti. Az egyes frakciókban tömegspektrometriával vizsgáltuk a ciklodextrinek mennyiségét.

Nagynyomású folyadékkromatográfia - tömegspektrometria [HPLC-MS]

A HPLC-MS (nagynyomású folyadékkromatográfia - tömegspektrometria) egy analitikai módszer, amely a kémiai vegyületek azonosítására és mennyiségi meghatározására szolgál. A HPLC az összetevők elválasztására használható, míg az MS a molekulák tömeg/töltés arányát méri. A módszert a minták ciklodextrin-tartalmának mérésére alkalmaztuk, mivel a tömegspektrometriai mérések során a lipidek nem azonosíthatóak, így csak a kezelés során alkalmazott anyagot, a ciklodextrint mértük. A mintát először egy folyadékkromatográfiai oszlopon vezetik át, ahol az elválasztás az összetevők fizikai-kémiai tulajdonságai alapján történik, majd az elválasztott vegyületeket ionizálva, tömegspektrum formájában jelenítik meg az MS-ben. Az MS méréseket a Cyclolab Kft laborjában végeztük.

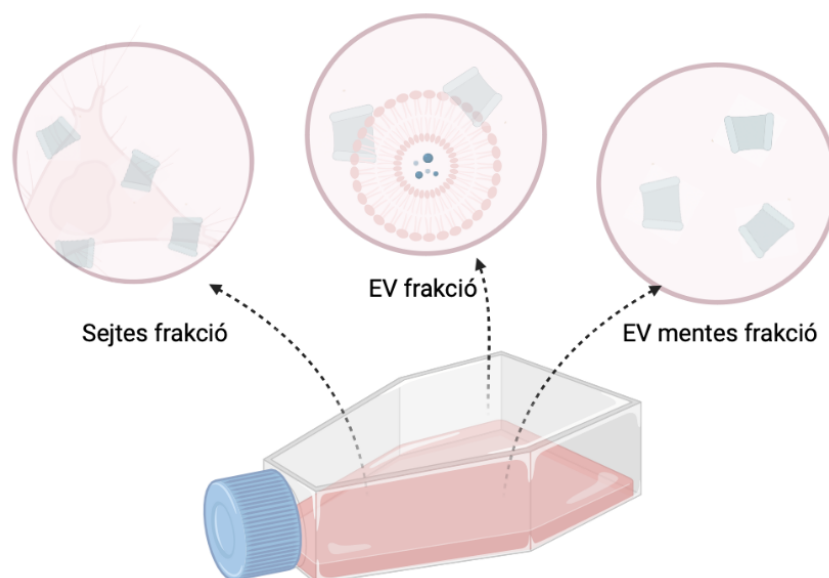
A HPLC-MS vizsgálatokhoz a sejtek 1% EV-mentes magzati borjúsérum [FBS], és az 2.1 táblázatban feltüntetett koncentrációjú ciklodextrin jelenlétében tartottuk 72 óráig. Ezt követően a felülúszót elöntöttük és a sejteket egy un. cell scraper-rel felkapartuk.

Az EV-k izolálásáig mind két frakciót (használt táplodát + lekapart sejtek) lefagyaszttva tároltuk -80 °C-on (2.3 ábra)

Az EV izolálás során a felülúszókat kiolvasztottuk, majd 3000 g erővel centrifugáltuk 15 percig 4°C-on. Ezután az oldatot 0.2 μ m-es szűrőn szűrtük meg. A szűrés után ultracentrifugálást (BECKMAN. L7-55 Ultracentrifuge) végeztünk 100.000 g (40.000 rpm) erővel (sebességgel), 1,5 órán keresztül, 4°C-on, 50.2 Ti rotort használva. Az így nyert pelletet 100

Ciklodextrin	$\frac{mg}{ml}$
CD_6	1
CD_9	0,25
$CD_{10}WM983A$	0,1
$CD_{10}WM983B$	0,025

2.1. táblázat. Kezelési koncentrációk



2.3. ábra. Az egyes ciklodextrin kezelések és a három összegyűjtött frakció (a sejtes frakció ('cells'), az EV-frakció ('EV'), végül az EV-mentes felülúszó ('felülúszó')) sematikus ábrája

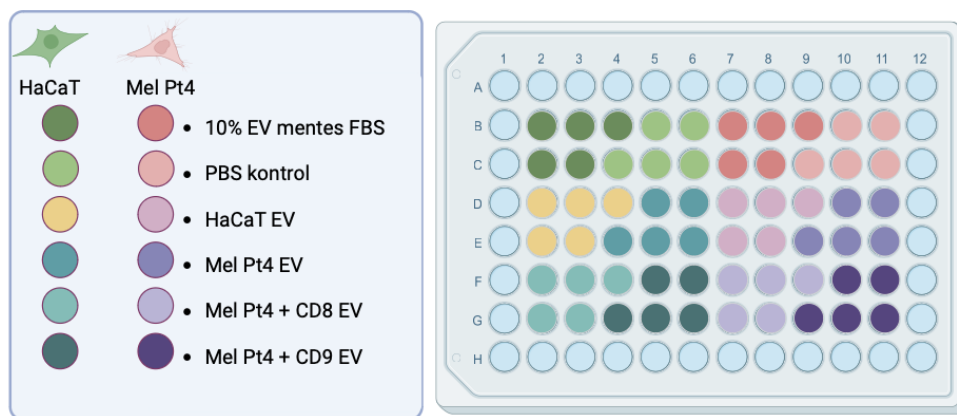
μl PBS-ben szuszpendáltuk.

2.6. Videómikroszkópos mérések

Az extracelluláris vezikulák sejtek viselkedésére gyakorolt hatásának feltárása érdekében a sejtek mozgását videómikroszkópos mérések során vizsgáltuk. Ehhez a sejteket 96 well-es plateben tenyésztettük, és ezt követően 72 órán át 10% EV-mentes FBS-sel kiegészített DMEM-ben EV-kkel ($10 \mu g/ml$ fehérjekoncentráció) kezeltük. Well-enként 1000 sejtet kezeltünk $200 \mu l$ térfogatú kezelő oldattal. A vizsgálatot párhuzamosan mértük két sejtvonalon tumoros Mel Pt4 pre és nem-tumoros HaCaT, megosztva közöttük a plate-et (2.4 ábra).

A mérést a Nikon ECLIPSE Ti2 videómikroszkóppal végeztük. A vizsgálat során az inkubátorral megegyező környezeti paramétereket állítottunk be az eszközön: 5%-os CO_2 koncentráció és $37^\circ C$ hőmérséklet. A mérés során a platen 120 látóteret vizsgálunk úgy, hogy a 60 well mindegyikében 2 látóteret állítottunk be. A videómikroszkóp 10 percenként készít felvételt a kezelt sejtekről. A látótereknek két paraméterét határoztuk meg manuálisan: a well-en belüli pozícióját (x és y tengely) és fókuszát (z tengely).

A kezelést követően a sejteket 10%-os triklórecetsavval fixáltuk, majd a plate mosása és



2.4. ábra. Videó mikroszkópos plate elrendezése: nem-tumoros HaCaT és tumoros Mel Pt4 pre sejtvonalak termelt EV-k jelenlétében.

szárítása után szulforodamin B-vel (SRB) festettük. Festés után a sejteket 1%-os ecetsav oldattal megmostuk és megszáritottuk. A festéket 10 mM Tris-HCl, pH 8-ban oldottuk fel, és az abszorbanciát 570 nm-en határoztuk meg [15].

A sejtek követésére a CellTracker szoftvert használtuk [22]. A mérés során minden EV kezeléshez sejtvonalanként 10 - 10 látótér tartozott, a migrációhoz minden látótérben 10 sejtet követtünk végig. A szoftvert szemiautomata módon használtuk. A sejt követést három tartományra bontottuk: külön vizsgáltuk a 24, 48 és 72 órán belüli elmozdulást. A mérések látóterenként 10 sejt elhelyezkedését adják meg x y koordináta rendszerben. Az adatok kiértékelését Matlabban végeztük. A párhuzamos méréseket átlagolva kiszámoltunk a sejtek maximális elmozdulását, a megtett utat, az átlagsebességet, a direkcionalitást, és az MSD-t (Mean Squared Displacement).

3. Eredmények

3.1. A ciklodextrinek tumorsejtek életképességére és proliferációjára gyakorolt hatásának vizsgálata

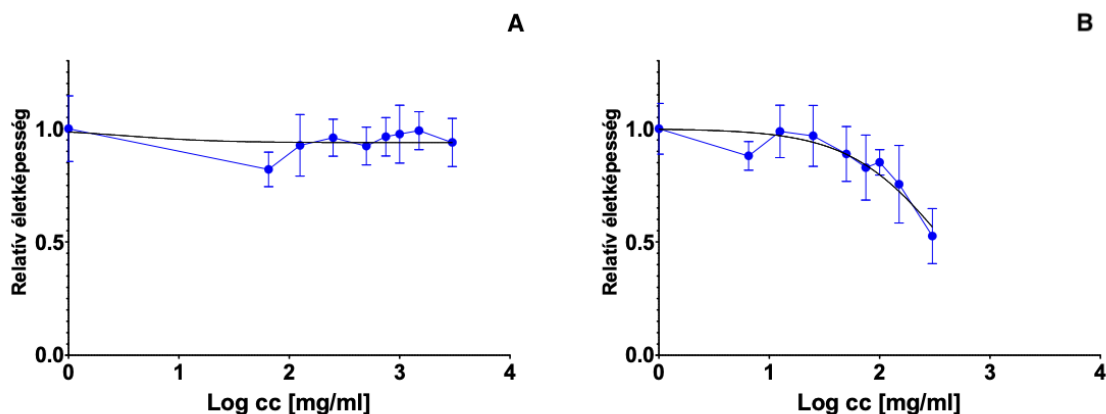
A CD-k hatását a sejtek életképességére 72 órás kezelések és SRB-festések során vizsgáltuk két humán melanoma sejtvonalon mind EV-keket is tartalmazó, mind EV-mentes FBS jelenlétében. Az életképességi vizsgálatok eredményeit, a kalkulált GI50 értékeket a 3.1 táblázat tartalmazza, melyben külön jelöltem azon mérések eredményeit, amelyeket Magyar Rebeka (BSc 2023/24 őszi félév) végzett (CD_1 , CD_2 , CD_4 és CD_5 kezelések EV-keket is tartalmazó FBS jelenlétében). Az WM983A és WM983B sejtvonalakon vizsgált 10 CD kezelésből kiválasztottunk négy molekulát. A DIMEB95, RAMEB, HAACD és α CD ciklodextrinek megvizsgáltuk HaCaT, HEK293, és A2058 sejtvonalakra gyakorolt életképesség hatását is. Ezeket az eredményeket a 3.2 szakaszban tárgyalom.

	WM983A		WM983B		A2058		HEK293		HaCaT	
	sima FBS	EV mentes FBS	sima FBS	EV mentes FBS	sima FBS	EV mentes FBS	sima FBS	EV mentes FBS	sima FBS	EV mentes FBS
CD_1	#*	#	#*	#						
CD_2	#*	#	#*	#						
CD_3	#	#	#	#						
CD_4	0,02*	0,19	0,3*	0,059						
CD_5	#*	#	#*	2,08						
CD_6	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#
CD_7	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#
CD_8	#	#	#	3,40						
CD_9	#	1,16	#	0,52	#	#	#	#	#	#
CD_{10}	0,38	0,79	0,67	0,80	#	3,456	#	3,814	#	#

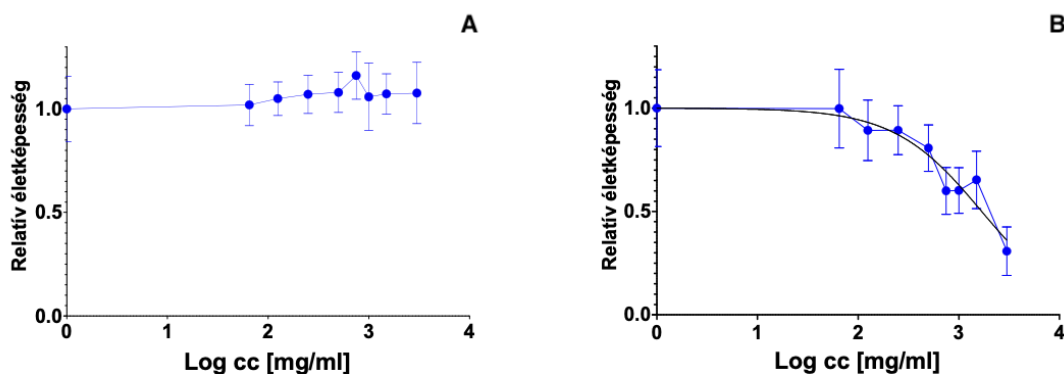
3.1. táblázat. A különféle CD-khez tartozó kalkulált GI50 értékek [mg/ml] az egyes sejtvonalakra, EV-mentes vagy EV-keket is tartalmazó FBS mellett, # » 3 [mg/ml] extrapolált adatok. (* Magyar Rebeka méréseiből származó eredmények)

A vizsgált különféle CD-k eltérő mértékben hatottak a sejtek életképességére. Adott sejtvonalon voltak CD-k melyek csak elhanyagolható mértékben gátolták a sejtek életképességét és voltak olyanok, melyek már viszonylag kis koncentráció mellett is jól mérhető

csökkenést eredményeztek a sejtek életképességében (3.1 ábra). Ilyen eltérést mutatott a CD_7 és a CD_{10} CD-k a WM983A sejtvonalon, ahol a metilált CD származék CD_{10} fokozott citotoxicitást mutatott. Míg az amino-csoportokat tartalmazó CD_7 nem befolyásolta a WM983A sejtek életképességét.



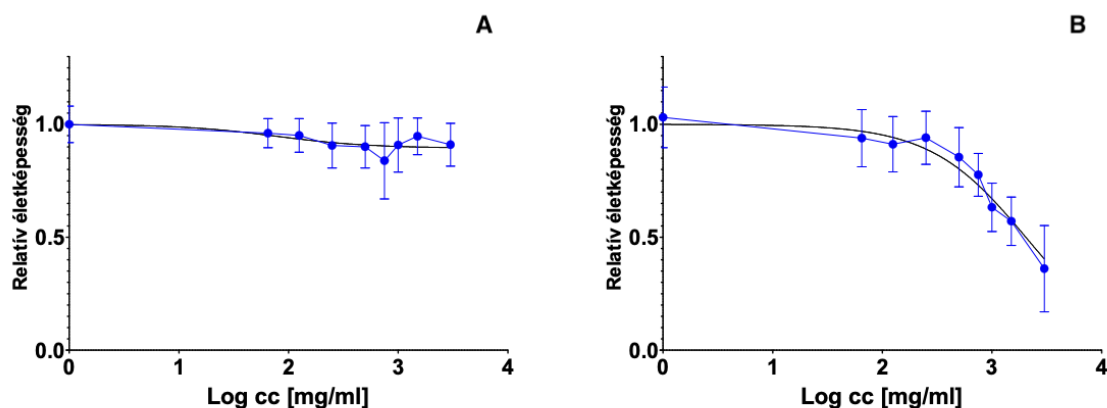
3.1. ábra. A CD_7 (A) és CD_{10} (B) kezelés hatása a WM983A sejtek életképességére. Relatív életképesség a kezeléshez használt koncentráció függvényében, EV-eket is tartalmazó FBS-es tápban. (Két független kísérlet, összesen 12 párhuzamos mérés átlaga $\pm$ SD.)



3.2. ábra. A CD_1 kezelés hatása a WM983A (A) illetve a WM983B (B) sejtek életképességére. Relatív életképesség a kezeléshez használt koncentráció függvényében, EV-mentes FBS-es tápban. (Két független kísérlet, összesen 12 párhuzamos mérés átlaga $\pm$ SD.)

A WM983A és WM983B sejtvonalak különféle CD-kkel történő kezelése során megállapítottuk, hogy vannak olyan CD-k, melyeknek hatása eltérő a különféle tumoros sejtvonalakon (3.2 ábra).

Ezeket az eltéréseket EV-mentes FBS-es tápban figyeltük meg, a két szingeneikus sejtvonal között. Míg a CD_1 nem befolyásolta a WM983A életképességét, addig a WM983B sejtvonalon gátolta a sejtek életképességét.



3.3. ábra. A CD_8 kezelés hatása a WM983B sejtek életképességére. Relatív életképesség a kezeléshez használt koncentráció függvényében, EV-mentes FBS-es (B), illetve EV-ket is tartalmazó FBS-es (A) tápban. (Két független kísérlet, összesen 12 párhuzamos mérés átlaga $\pm$ SD.)

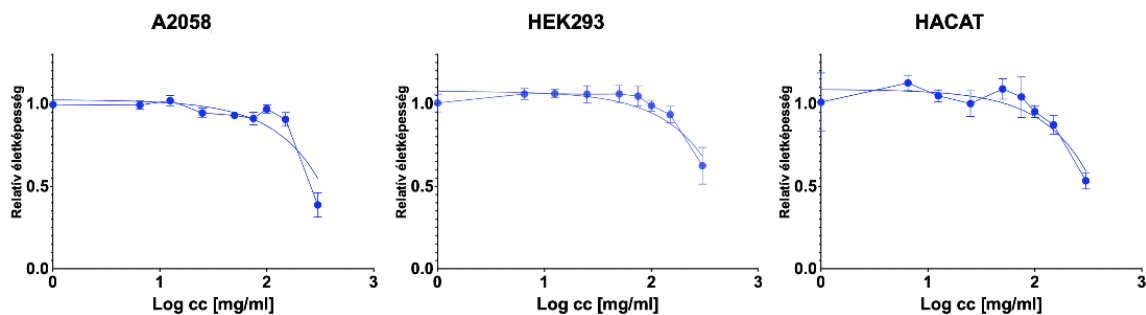
Mind EV-mentes mind EV-ket is tartalmazó FBS jelenlétében megvizsgáltuk a CD-k hatását a sejtek életképességére. Bizonyos CD-k fokozott mértékben gyakoroltak gátló hatást a sejtek életképességére EV-mentes tápban (3.3 ábra).

3.2. A vizsgált ciklodextrinek életképességi vizsgálata nem-tumoros sejteken

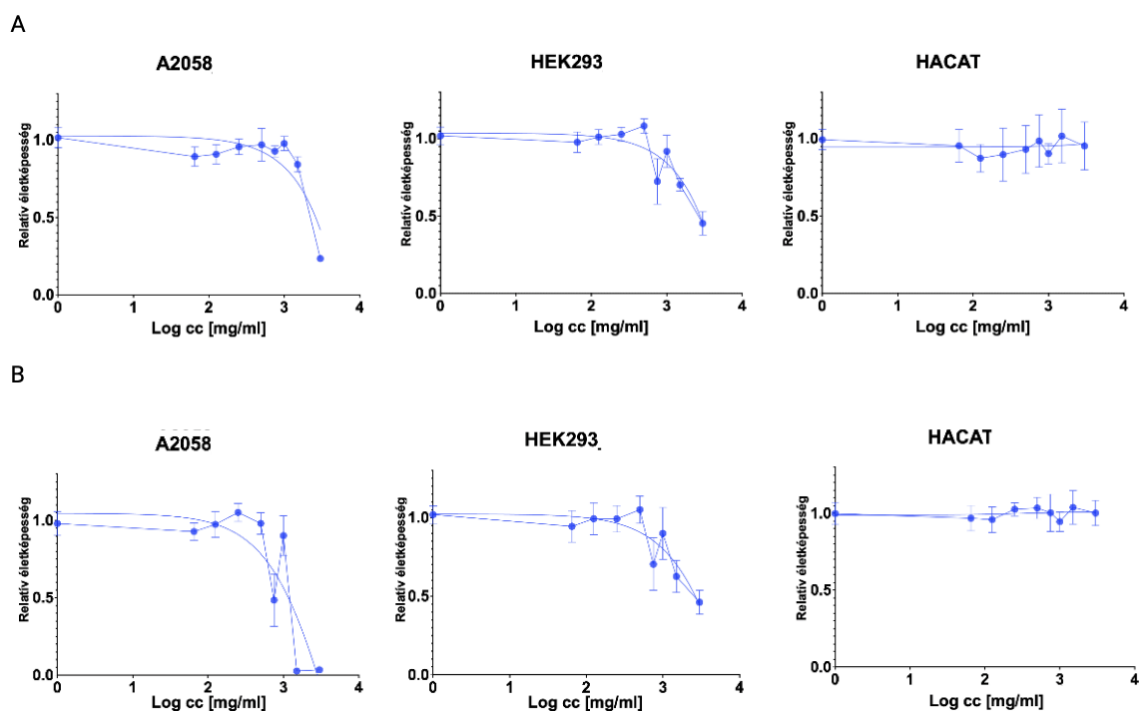
A CD kezelés hatásának átfogóbb tanulmányozása érdekében kiterjesztettük az életképességi vizsgálatokat a HaCaT és HEK293 humán nem-tumoros és az A2058 melanoma sejtvonalra. A konzisztencia érdekében a plateket a korábbi vizsgálatoknak megfelelő koncentrációkkal kezeltük. Ezeken a sejtvonalakon négy CD kezelés hatását vizsgáltuk: a semleges CD_6 , a savas CD_7 , és a metilszármazék CD_9 és CD_{10} ciklodextrineket.

A méréseket EV-ket is tartalmazó és EV mentes táp közegben is vizsgáltuk három-három független kísérlettel, összesen 18 párhuzamos mérést átlagolva (3.1 táblázat). A HEK293 sejtvonal hajlamos szferoidok képzésére, ezért az SRB assay során – ahol a letapadt sejtek össz-fehérje mennyiségét mérjük – viszonylag nagyobb szórása, bizonytalansága lesz az eredményeinknek. Ezzel szemben a másik nem-tumoros sejtvonal (HaCaT) vizsgálata során ilyen nehézségekkel nem szembesültünk. Ezért is lett a HaCaT sejtvonal a további kísérleteink alanya.

Az SRB assay-k alátámasztották a WM983A és a WM983B mérések alapján vártakat. Míg a CD_6 nem befolyásolja a sejtek életképességét. A metilált CD származékok fokozott citotoxikus hatást váltanak ki a tumoros A2058 sejtekből. A CD_{10} minden sejtvonalon citotoxikusnak bizonyult 0,3 mg/ml koncentráció fölött (3.4 ábra). A nem tumoros sejtvonalak kevésbé bizonyultak érzékenynek a kezelés FBS tartalmára. Míg az A2058 sejtvonalon



3.4. ábra. CD_{10} kezelés hatása EV-eket is tartalmazó FBS-es tápban az A2058 melanoma valamint a HaCaT és HEK293 nem-tumoros sejteken. (Három független kísérlet, összesen 18 párhuzamos mérés átlaga $\pm$ SD.)



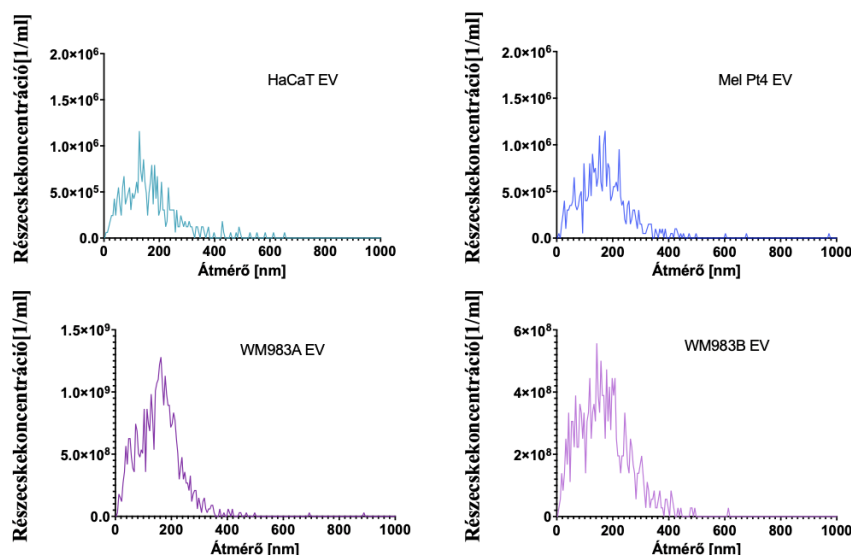
3.5. ábra. CD_9 kezelés hatása (A) EV mentes FBS-es és (B) EV-eket is tartalmazó FBS-es tápban az A2058 melanoma valamint a HaCaT és HEK293 nem-tumoros sejteken. (Három független kísérlet, összesen 18 párhuzamos mérés átlaga $\pm$ SD.)

megfigyeltük a WM983A és WM983B sejtvonalakhoz hasonló szenzitivitást, egyes CD jelenlétében pl CD_9 (3.5. ábra). Az életképességi vizsgálatok alapján a további kísérletekhez a HaCaT sejtvonalat és a CD_9 ciklodextrint választottuk, mivel a CD_9 különösen toxikusnak bizonyult a rákos sejtekre, míg a nem tumoros sejtekben mérsékelt hatást mutatott (3.1. táblázat). Ez a különbség lehetőséget kínál a CD-k alkalmazására célzott rákterápiában, mivel szelektíven lehet elérni a rákos sejteket, miközben a normális sejtek kevésbé károsodnak.

3.3. A ciklodextrinek hatásának vizsgálata a sejtek által termelt extracelluláris vezikulák mennyiségére és összetételére

Szinte minden sejt termel EV-ket, mivel ezek kulcsszerepet töltenek be a sejtek közötti kommunikációban és számos biológiai folyamat irányításában. Az EV-k által közvetített információk lehetővé teszik a sejtek számára, hogy alkalmazkodjanak a környezeti változásokhoz, és hozzájárulnak az immunválaszhoz, a szöveti regenerációhoz, valamint a sejtnövekedés szabályozásához. A rákos sejtek sokszor különösen aktívan termelnek EV-ket, mivel ezeken keresztül képesek a környezetüket úgy módosítani, hogy az kedvezzen a tumor növekedésének és terjedésének. A különböző sejtek eltérő átmérőjű és mennyiségű EV-t termelnek. Az általunk vizsgált sejtvonalak CD-kezelés nélküli EV-jeinek részecskekoncentrációja az átmérő függvényében a 3.6. ábrán látható. A WM983A és a WM983B sejtvonalak fokozott mennyiségben termelnek EV-ket a nem-tumoros HaCaT sejtvonalhoz képest.

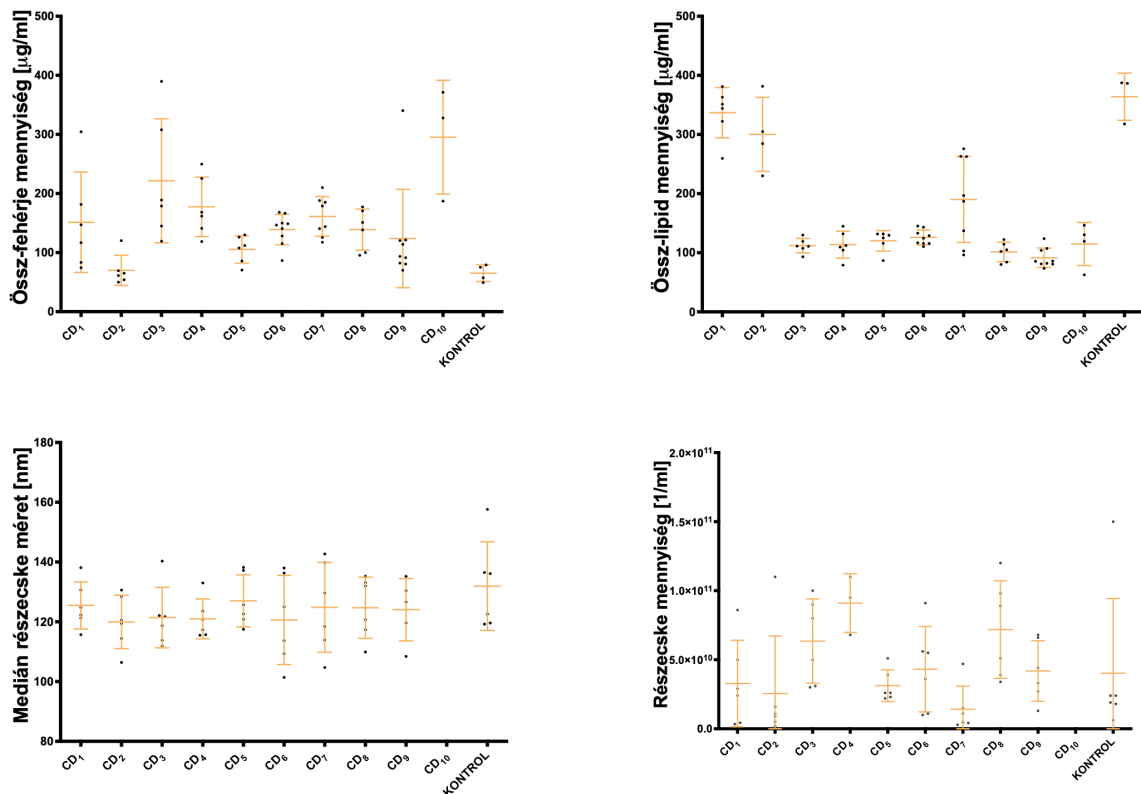
A sejtek által termelt EV-k karakterizálásához a várhatóan legtöbb EV-t termelő a



3.6. ábra. A vizsgált sejtvonalak (HaCaT, Mel Pt 4 pre, WM983A és WM983B) CD kezelés nélküli (kontrol) felülszóból izolált EV-k méreteloszlása, NTA mérések eredménye.

WM983A és a WM983B sejtvonalakat használtuk. Az EV-termeltetés során a sejteket

1%-os EV-mentes FBS-es tápban tartottuk, hogy az FBS-ben található EV-k ne zavarják mérésünket. Az EV-k izolálása után összfehérje mennyiséget, összlipid mennyiséget, medián részecske méretet és részecske mennyiség értéket határoztunk meg (3.7 ábra).



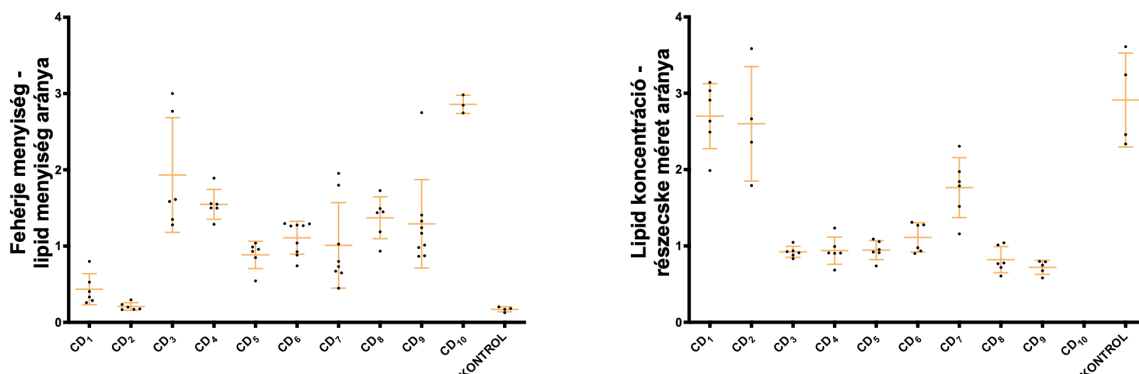
3.7. ábra. Izolált EV-k összfehérje mennyisége, összlipid mennyisége, medián részecske mérete és részecske mennyisége. (Két független kísérlet, összesen 6 párhuzamos mérés átlaga $\pm$ SD.)

A kísérletek során a sejtkultúrák kezeléséhez 7 ml 1% EV-mentes FBS-t tartalmazó DMEM tápot használtunk 1 mg/ml CD koncentrációval, kivéve a CD_4 és CD_{10} esetében, ahol 0,1 mg/ml CD-t alkalmaztunk. A 72 órás inkubáció után az EV-ket izoláltuk és karakterizáltuk. Az így izolált EV frakció mutatja a sejek CD kezelésre adott választ.

A különféle CD-vel történő kezelés hatására az izolált EV-k mérete és mennyisége nem változott számottevően. Ugyanakkor az EV frakció fehérje mennyisége megváltozott, és a változás mértéke az egyes CD-ek esetén nagyon eltérőnek mutatkozott. Ezzel szemben megfigyelhetjük, hogy a CD_1 és CD_2 kivételével a többi CD hatására az EV frakció lipid tartalma következetesen lecsökkent a kontrollhoz képest. Fontos megjegyezni, hogy itt a két sejtvonalból izolált EV-k eredményeit együtt elemezzük, mivel a sejtvonalak genetikailag szinte azonosnak tekinthetők (szingeneikusak) és az előzetes elemzések során nem lehetett markáns különbséget kimutatni az EV-ik között. Továbbá szem előtt kell tartani azt is, hogy a 3.7 ábrán bemutatott eredmények számszerű értéke nagyban függ az EV-k termeltetésére bevetett, sejtek számától, ami egy nehezen beállítható kísérleti paraméter.

Utóbbi hatást próbáltuk azzal kompenzálni, hogy elemzéseink során a fenti 4 mutató hányadosait is vizsgáltuk (3.9 ábra). A CD_1 és CD_2 viszonylagos hatástalansága az EV-k

módosítására még egyértelműbben kirajzolódik a fehérje-lipid és lipid-részecske méretarányok vizsgálatakor. Mindkét esetben a kontroll sejtekről izolált EV-khez hasonló értéket kaptunk.



3.8. ábra. Az izolált EV-frakciók fehérje-lipid és lipid-részecske méret arányai a kezeléshez használt CD-k függvényében. (Két független kísérlet, összesen 6 párhuzamos mérés átlaga $\pm$ SD.)

3.4. A ciklodextrinek eloszlásának vizsgálata tumor sejtek tenyészteteiben

A CD kezelések átfogobb megértése érdekében az egyes CD-ként vizsgáltuk milyen arányban vannak jelen a sejtben, a felülúszóban és az EV-kben. A vizsgálathoz a WM983A és WM983B sejtvonalakkal termeltettünk EV-eket CD jelenlétében. A tömegspektrometriai (MS) méréseket három CD-én végeztük a Cyclolab Kft laboratóriumában. Az MS mérések során megvizsgáltuk a DIMEB95, a RAMEB és az α CD molekulák jelenlétét az egyes frakciókban. A metilált CD származékok (DIMEB95 és RAMEB) előzetes életképességi vizsgálatok során fokozott hatást mutattak a vizsgált melanoma sejtvonalakra. Míg a natív α CD-kel kezelt sejtvonalakon nem figyeltünk meg életképességre gyakorolt hatást.

Tekintettel arra, hogy a három frakció közül a felülúszó frakció feleltethető meg az eredeti rendszer meghatározó részének, a kezeléskor adott és a felülúszóban mért CD koncentráció arányát a módszer detekciós hatékonyságának tekintettük, és ezzel az aránnyal számolva normalizáltuk a kapott koncentráció értékeket.

A kezelések a vizsgált sejtvonalakban hasonló, a különböző ciklodextrinekre eltérő eloszlást mutattak a mintákon. A CD kezelés sejtvonal független választ adott a két vizsgált melanoma sejtvonalra, ami fakadhat a WM983A és WM983B sejtvonalak szingeneitásából is. Az α CD koncentrációja a felülúszó frakcióban (78,06%) több mint kétszerese volt az EV és sejtves frakciókban (35,89% és 31,03%) mért koncentrációknak. Ami alapján következtethetünk arra, hogy a CD_6 csak kismértékben jut be a sejtekbe és az EV-be, és magas koncentrációban marad a felülúszó frakcióban.

Az előzetes életképességi vizsgálatok során a nagyobb életképességi hatást kiváltó metilált β

CD-k sejtes frakciójában átlagosan magasabb (68,18%) koncentrációban voltak jelen CD molekulák az α CD esetében mért koncentrációjához (31,03%) képest. A DIMEB95 és RAMEB kezelések hasonlóan magas arányban voltak kimutathatóak a vizsgált sejtes frakcióban a melanomasejtes frakciójában (RAMEB 73,41%-a, DIMEB95 75,56%-a a kezelési koncentrációnak). A vizsgált metilált CD származékok az EV frakcióban mért koncentrációkban tértek el egymástól. Míg a DIMEB95 mennyisége az EV-ben 82,91% (a sejtes frakcióban mért koncentrációhoz viszonyítva), a RAMEB kevésbé volt kimutatható az EV frakcióból; 27,26%-a volt a sejtes frakcióban mért CD koncentrációjának.

Az eredmények átfogóbb megértése érdekében a vizsgált mintákon SPV és Qubit® Protein

CD	Átlag fehérje mennyiség az EV-ben $\pm$ SD	Átlag lipid mennyiség az EV-ben $\pm$ SD	Átlag fehérje mennyiség a felülúszóban $\pm$ SD
α CD	145.73 $\pm$ 0.047 [μ g/ml]	113.90 $\pm$ 0.031 [μ g/ml]	316.67 $\pm$ 0.251 [μ g/ml]
RAMEB	117.10 $\pm$ 0.045 [μ g/ml]	85.69 $\pm$ 0.024 [μ g/ml]	377.37 $\pm$ 0.181 [μ g/ml]
DIMEB95	384.20 $\pm$ 0.640 [μ g/ml]	132.10 $\pm$ 0.136 [μ g/ml]	402.63 $\pm$ 0.246 [μ g/ml]

3.2. táblázat. A WM983A és WM983B sejtvonalak által termelt EV-k átlag fehérje és lipid mennyisége, valamint a felülúszó átlag fehérje mennyisége a vizsgált három CD (α CD, RAMEB, DIMEB95) jelenlétében. Hat független ismétlés átlaga $\pm$ SD.

Assay Kit méréseket is végeztünk. Az SPV assay reagált táp DMEM tartalmával, így nem tudtuk megmérni a felülúszók lipid tartalmát. A RAMEB EV izolátum kevesebb lipidet és fehérjét tartalmazott a többi kezeléshez képes (3.2 táblázat). Ezt eredményezheti a kevesebb EV termelés is, ami kevesebb ezen a csatornán zajló információ-forgalmat jelenthet a sejtek között. A DIMEB95 mintákban EV és felülúszó frakcióban is fokozott termelést mutattak a sejtek. Ezek az eredmények megfeleltek az EV karakterizációs eredményeink alapján vártaknak.

3.5. Tumoros környezetből származó EV-k életképesség és migrációra gyakorolt hatása

A keratinociták a melanoma mikrokörnyezetének jelentős részét alkotják, figyelembe véve a melanociták irányába betöltött védő szerepüket fiziológiás körülmények között. Kísérleteink során a HaCaT sejteket kezeltük Mel Pt 4 pre tumoros EV-vel.

A kísérlet során a megtermelt EV-eket izoláltuk majd 100 μ l PBS-ben oldottuk. A törzsoldatot Qubit® Protein Assay Kit-tel megmértük (3.3 táblázat) és a kapott fehérjekoncentrációból kiszámoltuk a kezeléshez választott 10 μ g/ml fehérjekoncentrációhoz szükséges mennyiségeket. A kísérlethez két kontrolkezelést választottunk: az 10%-os EV mentes FBS-es tápot és a legtöbb (5,85%-os) PBS-t tartalmazó EV kezeléssel megegyező PBS tartalmú EV mentes FBS-es tápot.

Minta	Összfehérje koncentráció
HaCaT EV	171.0 [$\mu\text{g/ml}$]
Mel Pt4 pre EV	172.7 [$\mu\text{g/ml}$]
CD_8 jelenlétében termelt Mel Pt4 pre EV	187.2 [$\mu\text{g/ml}$]
CD_9 jelenlétében termelt Mel Pt4 pre EV	209.2 [$\mu\text{g/ml}$]

3.3. táblázat. Az izolált EV minták mért összfehérje koncentrációjai.

Megvizsgáltuk a CD kezelt és kontrol melanoma sejtek által termelt EV-k hatása a sejtek életképességére. Az SRB assay során a PBS tartalmú kontrolhoz viszonyítottuk az eredményeinket. Az EV kezelés egyik sejtvonalon se befolyásolta nagymértékben a sejtek életképességét (3.4 táblázat).

Vizsgált sejtvonalak	HaCaT		Mel Pt4	
	Átlag	Szórás	Átlag	Szórás
PBS kontrol	1	0.0592	1	0.1091
EV mentes	1.0576	0.1497	1.0072	0.0533
HaCaT EV	1.0887	0.1601	0.9528	0.0870
Mel Pt4 EV	0.8411	0.0706	0.9833	0.0935
CD_8 kezelt Mel Pt4 EV	1.0784	0.1289	1.0263	0.0298
CD_9 kezelt Mel Pt4 EV	0.8809	0.0457	0.9947	0.0401

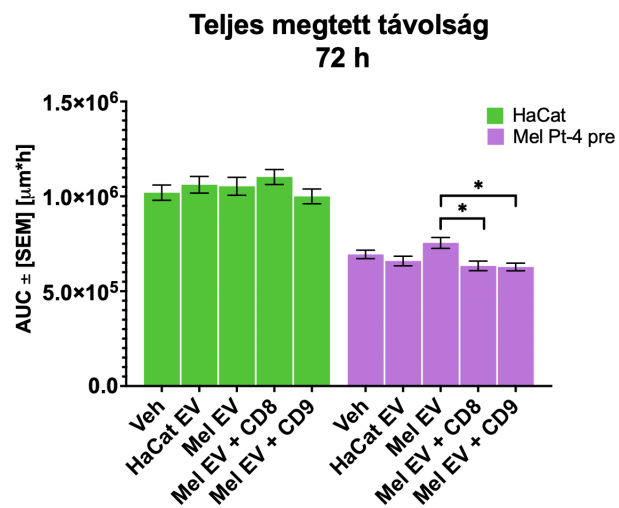
3.4. táblázat. HaCaT és Mel Pt4 sejtvonalakon EV kezelések hatására életképességi vizsgálatok átlaga és szórás adatai a PBS kontrolhoz viszonyítva (5 párhuzamos mérés átlaga).

Az életképességi vizsgálatok után elemeztük a CD kezelt EV-k hatása a sejtek migrációjára is.

Az EV kezelés lehetséges hatását a sejtek mozgékonyására egysejtes követéssel vizsgáltuk. A kísérlethez videómikroszkóppal vizsgáltuk az EV kezelt HaCaT és Mel Pt4 pre sejtvonalakhoz tartozó sejtenyészeteket. A CellTracker szoftver segítségével kiszámoltuk a sejtek maximális elmozdulását, átlag sebeségét, megtett távolságát, direkcionálisát és átlagos négyzetes elmozdulását(MSD).

A kezelés hatásának jellemzésére összevetettük a CD kezelt eredményeket a PBS kontroll mérésekkel. Meghatároztuk az AUC (Area Under Curve), a görbe alatti területet értékeket.

Az általunk használt EV-k a kontrolhoz viszonyítva csak csekély mértékben változtatták meg a vizsgált sejtek migrációs paramétereit. A Mel Pt4 pre sejtek által termelt EV-k nem befolyásolták a HaCaT sejtek mozgékonyását. Míg a melanoma sejtek teljes megtett távolságára hatottak saját EV-i. Itt megfigyeltük, hogy a CD-kezelés mellett termelt EV-k nem fokozzák a sejtek által megtett távolságot (3.9 ábra).



3.9. ábra. EV kezelt közegben a sejtek által megtett távolság, HaCaT és Mel Pt4 pre sejtvonalakon PBS kontrolhoz viszonyítva (5 párhuzamos mérés örbe alatti területének átlaga $\pm$ SD.)

4. Diszkusszió

4.1. A ciklodextrinek nem-tumoros és tumoros sejtek életképességére gyakorolt hatása

A sejtek életképességére gyakorolt hatást az anyagok a GI50 értékével kvantifikálhatjuk, ami az a CD koncentráció, amely feleakkora mérhető sejtpopulációt eredményez, mint amit kontroll körülmények között mérhetünk. A méréseinket 5 humán sejtvonalon, három tumoros (WM983A, WM983B és A2058) és két nem-tumoros (HEK293 és HaCaT) végeztük. A méréseink alapján (3.1 táblázat) a nagy dózisban vizsgált CD-k sem fejtettek ki citotoxikus hatást, általában inkább jól tolerálhatóak. Ez alól kivételt képez a CD_4 és a CD_{10} (3.4 ábra), melyek csak tisztaságukban különböznek egymástól. A vizsgált sejtvonalak közül a WM983B mutatott érzékenységet a legtöbb különböző ciklodextrinre (lásd 3.1 táblázat).

Kutatásaink során megfigyelt szerkezet-aktivitás összefüggéseket hasonlóan rögzítette Kiss és munkatársai in vitro, a Caco-2 humán vastagbélrák sejteken és humán eritrocitákon is [17]. A metilcsoportok számának növelése a molekulán fokozza a toxikus hatást: míg a három-négy metilcsoportot tartalmazó CRYSMEB/CD vegyületek gyakorlatilag nem toxikusak, addig a RAMEB és a DIMEB erősen mérgező a Caco-2 sejtekre. Érdekes módon a TRIMEB citotoxicitása valamivel alacsonyabb, mint a RAMEB és DIMEB származékoknak a citotoxikus hatása. Zhang és munkatársai (2013) kutatásában vizsgálta, hogy a tumornak és mikrokörnyezetének a pH-ja savasabb az ép szövetekhez képest, ezért a lugos pH-jú kezelőanyagok alkalmassabbak lehetnek a rákellenes gyógyszerek bejuttatására. Ilyen anyag a 2-(dimetilamino)etil-metakrilát (DMAEMA)-t, amely savas körülmények között protonálódik [23]. Ez a mechanizmus magyarázhatja a metilált CD származékoknál megfigyelt fokozott citotoxicitást. Hasonló tendencia figyelhető meg ezek hemolitikus hatásánál is. Ezenkívül kimutattunk némi különbséget a különböző izomeri tisztaságú DIMEB-ek citotoxicitásában, ami arra utal, hogy a metilált CD vegyületek esetében a toxikus hatás nagymértékben függ a metilcsoportok számától, és kisebb mértékben a metilcsoportok helyzetétől.

Az eltérő toxikológiai eredmények, az eltérő sejtvonalakon mért vizsgálatokon kívül az alkalmazott életképességi tesztek különbségeiből is adódhatnak. Az SRB assay a sejtek összfehérje-tartalmát méri, azzal a feltételezéssel, hogy a kezelt és kontroll mintákban az egyes sejtekben található fehérjemennyiség hasonló. Ezzel szemben az MTT assay a sejtek mitokondriális aktivitását értékeli: az MTT vegyület (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium bromid) a sejtek mitokondriális dehidrogenázai által formazánná alakul, ami alapján az assay során azt feltételezzük, hogy a sejtek mitokondriális aktivitása a kontroll és a kezelt

minták között egyenlő [24].

Mind EV-mentes mind EV-ket is tartalmazó FBS jelenlétében megvizsgáltuk a CD-k hatását a sejtek életképességére. Vizsgálataink során megfigyelhettük, hogy vannak olyan esetek (adott sejtvonal kezelése, adott CD-vel), ahol meghatározó különbség mutatkozik a mért életképességben annak függvényében, hogy van-e EV az FBS-ben vagy nincs (3.3 ábra). Méréseink alátámasztják a szakirodalomból is megismerhető tapasztalatot, miszerint meghatározó lehet, hogy a sejtek médiuma tartalmaz-e exogén eredetű EV-ket vagy sem [8][9]. Négy CD életképességre gyakorolt hatását nem-tumoros sejtvonalakon is megvizsgáltuk. Ezen SRB vizsgálatok során a CD_9 különösen toxikus hatást mutatott a rákos sejtekre, míg a nem tumoros sejtek esetében enyhébb hatást fejtett ki (lásd 3.4 ábra). Ez a különbség lehetőséget kínálhat a ciklodextrinek rákterápiás alkalmazására, mivel segítségükkel a rákos sejtek szelektíven elérhetők, miközben a normál sejtek kevésbé sérülnek.

4.2. A ciklodextrinek hatásának vizsgálata a sejtek által termelt extracelluláris vezikulák mennyiségére és összetételére

Az EV-k izolálása után meghatároztuk az összfehérje- és összlipid-mennyiséget, a medián részecskeméretet, valamint a részecskekoncentrációt (3.4 ábra). A WM983A és a WM983B sejtvonalból izolált EV-k eredményeit együtt elemeztük, mivel szingeneikusak, és az előzetes vizsgálatokban nem mutatkozott jelentős különbség EV-jeik között.

A különböző CD-kezelések nem okoztak jelentős változást az EV-k méretében és koncentrációjában, viszont az EV frakció fehérjetartalma CD-enként eltérően módosult. Ezzel szemben, az EV-k lipid koncentrációja következetesen csökkent a kontrollhoz képest, kivéve a CD_1 és CD_2 [$HP\beta CD$] esetében. Nasr és munkatársai 24 órás kezelések során megfigyelték, hogy az α -CD és a RAMEB a leghatékonyabb CD-k közé sorolhatók,. Az α -CD-k mind a koleszterinban gazdag, mind a koleszterinben szegény membránokra hatnak a RAMEB pedig magas membrán koleszterin-tartalom esetén fejt ki fokozott hatást. Ezért a RAMEB magas membrán koleszterintartalom esetén kivonhatja a membrán-koleszterint a raftdoménokból. A többi β -CD-származék ($HP\beta CD$, $CRYSMEB$ és $SBE\beta CD$) kisebb hatást mutatott, amely főként alacsony membrán koleszterin-tartalomnál azonnal megfigyelhető volt, és a membrán koleszterintartalom növekedésével csökkent [25].

Az előzetes várakozásunkkal szemben a $CRYSMEB$ is csökkentette az EV-k lipid tartalmát ami adódhat abból, hogy a koleszterinen kívül más lipid exocitózist is képes fokozni. Összefüggésben állhat ez azzal, hogy a CD_1 és CD_2 ionosság tekintetében semleges molekulák és ők tartalmaznak csak hidroxipropil oldalláncokat. Megfigyelésünk összecseng azon irodalmi adatokkal, melyek szerint a $HPBCD$ vegyületek csekély hatással bírnak a sejtek életképességére [5] (3.1 táblázat).

Ezen felül Geda (2022) tanulmányában hangsúlyozza a ciklodextrin (CD) kezelések fontosságát a különböző lipidosztályok specifikus szerepének további vizsgálatához, különösen a koleszterinre és gangliozidokra gyakorolt hatásuk kapcsán [11]. A kutatás kimutatta,

hogy a HPBCD hatékonyabb a szelektív koleszterin-deplécióban, mint a DIMEB, mivel a koleszterin- és gangliozid kivonó koncentrációk között jelentős különbségek figyelhetők meg, és alacsonyabb toxicitása is kedvező tényező. A gangliozidok stimulálják a glutamát felszabadulását az agyi szinaptoszómákból [11]. Az általunk vizsgált daganatos sejtek EV-i magas koleszterin koncentrációt mutatnak, ami miatt a HPBCD lipidcsökkentő hatása nem érvényesül. Ahogyan a CD-k hatását vizsgálták a liposzómákon, a koleszterin hasonlóan befolyásolhatja az EV-k membránjainak permeabilitását.

4.3. A ciklodextrinek eloszlásának vizsgálata tumor sejt tenyészetben

Vizsgáltuk, hogy a CD-k a sejtes rendszernek a felülúszó, a sejtes vagy az EV frakciójában leszenek nagyobb arányban megtalálhatók a kezelések során. Az MS mérések eredményét arányosítottuk a különböző CD kezelések kezdeti koncentrációjával. A mért koncentrációk eltértek a várt, kezdeti koncentrációtól, az MS módszer az általunk használt protokollal csak a CD-k mintegy 60%-át mutatta ki. Ez a koncentrációA bevitt és kimutatott ('visszamért') CD mennyiség közötti különbség fakadhat metodikai hibából, vagy akár a sejtek metabolizmusából is. Mu és munkatársai a β -ciklodextrin farmakokinetikáját, szöveti eloszlását, kiválasztását és metabolizmusát patkányokon orális úton történő beadást követően tanulmányozták[3]. Kutatásukban hasonlóan a mi eredményeinkhez arról számoltak be hogy, az intakt β -ciklodextrin kiválasztása a vizeletbe és a székletbe alacsonyabb volt, mint a beadott dózis. Ezt azzal magyarázzák, hogy a ciklodextrin maltodextrinné metabolizálódott, amely tovább metabolizálódott, felszívódott és végül széndioxid és víz formájában távozott [3]. Fontos megjegyezni, hogy a két modellnek eltérő az absztrakciós szintje, mi in vitro egy sejt kultúra metabolizmusát vizsgáljuk, míg Mu in vivo egy teljes élő szervezetet. Figyelembe véve az in vitro - in vivo modellek korlátozott összehasonlíthatóságát, azt feltételezhetjük az alacsonyabb mért koncentráció adódhat abból is hogy a sejtek a kezelés során lebontották a CD-k mindegy 40%-át.

Az MS mérésekhez használt mintákon SPV és Qubit® Protein Assay Kit méréseket is végeztünk. Az eredményeket átfogóan elemeztük. A DIMEB95 mintákban mind az EV, mind a felülúszó fokozott mennyiségben lehetett CD-ket kimutatni, ami összhangban áll az EV karakterizációs eredményeink alapján vártakkal, vagyis, hogy a kezelés hatására csökkent az EV-k össz lipid tartalma. A RAMEB-kezelés eredményeként az EV izolátumokban alacsonyabb lipid- és fehérjetartalmat mértünk a többi kezeléshez képest (3.2. táblázat). Ez magyarázható a kisebb EV-termeléssel, ami alacsonyabb sejtek közötti információátvitelt jelenthet ezen a csatornán. Ezt az elgondolást támasztja alá, hogy az MS mérések alapján a RAMEB kevésbé volt kimutatható az EV frakcióból: az EV frakcióban mért CD koncentráció a sejtes frakció CD koncentrációjának mindössze 27,26%-át tette ki. Ez arra utalhat, hogy a RAMEB a sejtekben található lipidekhez kevésbé kötődik, vagy a lipideket az EV-kból a felülúszó folyadékba oldhatja ki.

Mindemellett a DIMEB95 és a RAMEB kezelések során magas arányban képeztek zárványkomplexet a sejtes frakciókban, mind a melanoma sejtek belsejében, mind azok felszínén (RAMEB 73,41%-a, DIMEB95 75,56%-a a kezelési koncentrációnak). Ennek oka lehet a metilált CD-származékok fokozott koleszterin-affinitása és citotoxikus hatása (3.1 táblázat) [11] [17]. Az életképességi vizsgálatok alapján (3.1 táblázat) a kisebb hatást kiáltó CD_6 döntően a kezdeti felülúszó frakcióban maradt, és csak csekély százalékban jutott be a sejtes és az EV frakciókba, ráadásul egyenlő arányban.

4.4. Tumoros környezetből származó EV-k életképességre és migrációra gyakorolt hatása

Az EV-k kulcsszerepet játszanak a tumormikrokörnyezet kommunikációjában, mivel a tumorsejt proteázok az EV-ken keresztül befolyásolhatják a tumorsejtek és a tumor-asszociált keratinociták interakcióit beleértve a sejtmigrációt, a proliferációt és a tumornövekedést befolyásoló útvonalakat is. A tumormikrokörnyezetből származó EV-k befolyásolhatják a sejtek életképességét és migrációját. A tumor-asszociált keratinociták fokozott proteolitikus aktivitása és galektin-3 kibocsátása szintén hozzájárulhat a tumor progressziójához. A metalloproteinázok (ADAM és ADAMTS) képesek lebontani az extracelluláris mátrix komponenseit, megkönnyítve a tumorsejtek mozgását és terjedését[26]. A videómikroszkopos vizsgálatainkhoz a tumoros sejtek életképességét a nem tumoros sejtekéhez képest fokozottan gátló RAMEB (2.5.ábra) és a CRYSMEB CD-ket használtuk. A CRYSMEB a migrációra gyakorolt hatásával képes módosítani az immunrendszert in vitro, és potenciálisan kezelni a vascularis problémákat azáltal, hogy serkenti azoknak a molekuláknak a kifejeződését, amelyek szerepet játszanak az immunsejtek és más sejttypusok közötti kölcsönhatásokban [27].

Bár a Mel Pt4 pre sejtek által megtett távolságban 72 óra után megfigyeltünk szignifikáns csökkenést a CD-kezelés mellett termelt tumoros EV-k jelenlétében (3.9.ábra). A kísérletünk nem mutatott szignifikáns eltérést a többi vizsgált paraméterre. Ez adódhat abból, hogy az általunk használt $10\ \mu\text{g/ml}$ fehérjekoncentráció túl alacsony volt a sejtvonalak migrációjának megváltoztatására.

A spontán immortalizált HaCaT sejtvonal felnőtt emberi epidermális sejtekből ered, megőrizve a proliferáció és differenciálódás képességét, hasonlóan az élő szervezetek bazális keratinocitáihoz [16]. A keratinociták által kibocsátott EV-k olyan jelátviteli molekulákat (például endothelin-1) hordozhatnak, amelyek a melanoma sejtek invázióját, növekedését vagy kezelésre adott válaszukat befolyásolhatja. A melanoma jelenléte serkentheti a HaCaT keratinociták galektin-3 termelését, amely kulcsszerepet játszik a sejtvándorlásban és a tumor előrehaladásában [26].

Az általunk vizsgált HaCaT sejteket nem befolyásolták a Mel Pt4 pre sejtek által termelt EV-k. Ez fakadhat abból, hogy a két sejtvonal genetikailag nagyban különbözik egymástól és az EV-ken lévő jelölő fehérjék kevésbé kompatibilisek a sejtek membránján található receptorokkal. Ezért érdemes lehet szingeneikus sejtvonalakon vizsgálni a CD-kezelés EV-

háztartásra gyakorolt hatását.

5. Összefoglalás

Kísérleteink során arra akartunk választ adni hogy a CD-k alkalmasak lehetnek önmagukban is onkológiai terápiás szerként. A ciklodextrineket (CD-ket) széles körben vizsgálják az onkológiában, mint hordozókat, amelyek egyedi szerkezetüknek köszönhetően javítják a rákellenes gyógyszerek oldhatóságát, stabilitását és adagolását. Bizonyos ciklodextrinek, mint például a DIMEB, önmagukban is terápiás hatással bírhatnak, például csökkentik a koleszterin felhalmozódását a sejtekben, ami közvetve támogathatja a sejtek egészségét. Ez a hatás különösen a koleszterinnel kapcsolatos betegségek esetében figyelhető meg, ahol a CD-knek ismert biológiai hatásuk van a pusztán gyógyszeradagoláson túl. Kutatásunkban a CD-k főleg az EV-kre gyakorolt hatását vizsgáltuk, mivel ezek nagy arányban tartalmaznak lipideket. Így kedvező célpontok lehetnek az apoláris ligandok kötésére alkalmazott CD molekulák számára. A CD kezelés egy kedvező alternatívát nyújthat, a tumoros betegek metasztázis kialakulásának gátlására. Bár jelenleg nincsenek olyan széles körben elismert tanulmányok, amelyek kifejezetten dokumentálták volna a tumor visszafejlődését a kizárólag CD-kkel (azaz további rákellenes gyógyszerek nélkül) kezelt csoportokban, a kutatók megfigyelték, hogy a CD-k néha a rájuk lévő gyógyszerektől függetlenül is kifejthetik biológiai hatásukat.

Kutatásaink során megfigyeltünk a különböző ciklodextrinekben szerkezet-aktivitás összefüggéseket. A metilcsoportok számának növelése a molekulán fokozza a toxikus hatást: míg a három-négy metilcsoportot tartalmazó CRYSMEB/CD vegyületek gyakorlatilag nem toxikusak, addig a RAMEB és a DIMEB erősen mérgező a sejtekre. Az EV termelésre gyakorolt hatás tekintetében összefoglalóan elmondhatjuk, hogy a HPBCD csoportba tartozó CD-ket leszámítva (CD_1 és CD_2) minden CD hatott az EV-k termelésére, legmarkánsabban a lipid koncentrációra. Összevágunk ezen eredmények azzal az elképzeléssel, hogy a CD-k képesek zárványkomplext alkotni a membrán-lipidekkel. Tömegspektrometriával megvizsgáltuk a CD-k eloszlását a WM983A és WM983B sejtjeiben, a sejtvonalak által termelt EV-kben és az EV-mentes felülrészben. A molekulák jelenléte hasonló eloszlást mutatott a sejtvonalakban, de eltérő mintázatot adott a különböző ciklodextrinekkel (DIMEB95, RAMEB és α CD) történő kezelés esetében. Videomikroszkópos kísérlettel elemeztük a tumoros környezetből származó, kontroll körülmények között és CD (RAMEB és CRYSMEB) jelenlétében termelt EV-k migrációra gyakorolt hatását Mel Pt4 pre és HaCaT sejtvonalakon. Az EV-k nem befolyásolták a sejtek életképességét, és csak csekély hatással voltak a sejtek migrációjára. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a CD-k jótékony szerepet játszhatnak az EV-közvetített sejtközi kommunikációt célzó onkológiai terápiákban.

Irodalom

- [1] S. Zimmer, A. Grebe, S. S. Bakke és tsai., „Cyclodextrin promotes atherosclerosis regression via macrophage reprogramming“, *Science Translational Medicine*, 8. évf., 333. sz., 2016. ápr. DOI: [10.1126/scitranslmed.aad6100](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad6100). cím: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad6100>.
- [2] Z. Hammoud, N. Khreich, L. Auezova, S. Fourmentin, A. Elaissari és H. Greige-Gerges, „Cyclodextrin-membrane interaction in drug delivery and membrane structure maintenance“, *International Journal of Pharmaceutics*, 564. évf., 59–76. old., 2019. jún., ISSN: 0378-5173. DOI: [10.1016/j.ijpharm.2019.03.063](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.03.063). cím: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.03.063>.
- [3] K. Mu, K. Jiang, Y. Wang és tsai., „The biological fate of pharmaceutical excipient β -cyclodextrin: Pharmacokinetics, tissue distribution, excretion, and metabolism of β -cyclodextrin in rats“, en, *Molecules*, 27. évf., 3. sz., 1138. old., 2022. febr.
- [4] D. h. T. K. Dr. Varga Erzsébet Dr. Kiss Éva, „Ciklodextrinek alkalmazása elektroforetikus elválasztásokra. Szerkezet-hatás összefüggések vizsgálata“, *Eötvös Lóránd Tudományegyetem Természettudományi Kar*, 2018. cím: https://edit.elte.hu/xmlui/bitstream/handle/10831/42974/tezisfuzet_Varga%20Erzsebet.pdf.
- [5] A. K. Nehr-Majoros, J. Erostyák, É. Fenyvesi és tsai., „Cyclodextrin derivatives decrease Transient Receptor Potential vanilloid 1 and Ankyrin 1 ion channel activation via altering the surrounding membrane microenvironment by cholesterol depletion“, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 12. évf., 2024. febr., ISSN: 2296-634X. DOI: [10.3389/fcell.2024.1334130](https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1334130). cím: <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2024.1334130>.
- [6] H. Kaddour, M. Tranquille és C. M. Okeoma, „The Past, the Present, and the Future of the Size Exclusion Chromatography in Extracellular Vesicles Separation“, *Viruses*, 13. évf., 11. sz., 2272. old., 2021. nov., ISSN: 1999-4915. DOI: [10.3390/v13112272](https://doi.org/10.3390/v13112272). cím: <http://dx.doi.org/10.3390/v13112272>.
- [7] K. Mani, D. Deng, C. Lin, M. Wang, M. L. Hsu és N. G. Zaorsky, „Causes of death among people living with metastatic cancer“, *Nature Communications*, 15. évf., 1. sz., 2024. febr., ISSN: 2041-1723. DOI: [10.1038/s41467-024-45307-x](https://doi.org/10.1038/s41467-024-45307-x). cím: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-024-45307-x>.

- [8] R. B. Goldfarb, M. J. Atala Pleshinger, D. F. Yan és D. J. Adams, „Lipid-Restricted Culture Media Reveal Unexpected Cancer Cell Sensitivities“, *ACS Chemical Biology*, 19. évf., 4. sz., 896–907. old., 2024. márc., ISSN: 1554-8937. DOI: 10.1021/acscchembio.3c00699. cím: <http://dx.doi.org/10.1021/acscchembio.3c00699>.
- [9] L. M. Butler, Y. Perone, J. Dehairs és tsai., „Lipids and cancer: Emerging roles in pathogenesis, diagnosis and therapeutic intervention“, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 159. évf., 245–293. old., 2020, ISSN: 0169-409X. DOI: 10.1016/j.addr.2020.07.013. cím: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2020.07.013>.
- [10] M. Martin-Perez, U. Urdiroz-Urricelqui, C. Bigas és S. A. Benitah, „The role of lipids in cancer progression and metastasis“, *Cell Metabolism*, 34. évf., 11. sz., 1675–1699. old., 2022. nov., ISSN: 1550-4131. DOI: 10.1016/j.cmet.2022.09.023. cím: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2022.09.023>.
- [11] O. Geda, T. Tábi, P. P. Lakatos és É. Szökő, „Differential Ganglioside and Cholesterol Depletion by Various Cyclodextrin Derivatives and Their Effect on Synaptosomal Glutamate Release“, *International Journal of Molecular Sciences*, 23. évf., 16. sz., 9460. old., 2022. aug., ISSN: 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms23169460. cím: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23169460>.
- [12] X. Wei, C.-Y. Yu és H. Wei, „Application of Cyclodextrin for Cancer Immunotherapy“, *Molecules*, 28. évf., 14. sz., 5610. old., 2023. júl., ISSN: 1420-3049. DOI: 10.3390/molecules28145610. cím: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules28145610>.
- [13] A. Ladányi, J. Timár, S. Paku, G. Molnár és K. Lapis, „Selection and characterization of human melanoma lines with different liver-colonizing capacity“, *International Journal of Cancer*, 46. évf., 3. sz., 456–461. old., 1990. szept., ISSN: 1097-0215. DOI: 10.1002/ijc.2910460322. cím: <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.2910460322>.
- [14] K. S. Smalley, R. Contractor, T. K. Nguyen és tsai., „Identification of a Novel Subgroup of Melanomas with KIT/Cyclin-Dependent Kinase-4 Overexpression“, *Cancer Research*, 68. évf., 14. sz., 5743–5752. old., 2008. júl., ISSN: 1538-7445. DOI: 10.1158/0008-5472.can-08-0235. cím: <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0235>.
- [15] A. Németh, G. L. Bányai, N. K. Dobos és tsai., „Extracellular vesicles promote migration despite BRAF inhibitor treatment in malignant melanoma cells“, *Cell Communication and Signaling*, 22. évf., 1. sz., 2024. máj., ISSN: 1478-811X. DOI: 10.1186/s12964-024-01660-4. cím: <http://dx.doi.org/10.1186/s12964-024-01660-4>.
- [16] *British Journal of Pharmacology*, 180. évf., 4. sz., 479–570. old., 2022. dec., ISSN: 1476-5381. DOI: 10.1111/bph.15944. cím: <http://dx.doi.org/10.1111/bph.15944>.

- [17] T. Kiss, F. Fenyvesi, I. Bácskay és tsai., „Evaluation of the cytotoxicity of -cyclodextrin derivatives: Evidence for the role of cholesterol extraction“, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40. évf., 4. sz., 376–380. old., 2010. júl., ISSN: 0928-0987. DOI: 10.1016/j.ejps.2010.04.014. cím: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2010.04.014>.
- [18] B. M. Lehrich, Y. Liang és M. S. Fiandaca, „Foetal bovine serum influence on in vitro extracellular vesicle analyses“, *Journal of Extracellular Vesicles*, 10. évf., 3. sz., 2021. jan., ISSN: 2001-3078. DOI: 10.1002/jev2.12061. cím: <http://dx.doi.org/10.1002/jev2.12061>.
- [19] A. McMahon, H. Lu és I. A. Butovich, „The Spectrophotometric Sulfo-Phospho-Vanillin Assessment of Total Lipids in Human Meibomian Gland Secretions“, *Lipids*, 48. évf., 5. sz., 513–525. old., 2013. jan., ISSN: 1558-9307. DOI: 10.1007/s11745-013-3755-9. cím: <http://dx.doi.org/10.1007/s11745-013-3755-9>.
- [20] T. Arab, E. R. Mallick, Y. Huang és tsai., „Characterization of extracellular vesicles and synthetic nanoparticles with four orthogonal single-particle analysis platforms“, *Journal of Extracellular Vesicles*, 10. évf., 6. sz., 2021. ápr., ISSN: 2001-3078. DOI: 10.1002/jev2.12079. cím: <http://dx.doi.org/10.1002/jev2.12079>.
- [21] „A fehérje koncentráció meghatározáshoz használt DeNovix QFX Fluoromter adatlapja.“, Letöltés: 2024.11.03. cím: <https://doi.org/10.3390/ijms23169460>.
- [22] F. Piccinini, A. Kiss és P. Horvath, „CellTracker (not only) for dummies“, *Bioinformatics*, 32. évf., 6. sz., 955–957. old., 2015. nov., ISSN: 1367-4803. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv686. cím: <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btv686>.
- [23] M. Zhang, Q. Xiong, J. Chen, Y. Wang és Q. Zhang, „A novel cyclodextrin-containing pH-responsive star polymer for nanostructure fabrication and drug delivery“, *Polymer Chemistry*, 4. évf., 19. sz., 5086. old., 2013, ISSN: 1759-9962. DOI: 10.1039/c3py00656e. cím: <http://dx.doi.org/10.1039/c3py00656e>.
- [24] V. Patravale, P. Dandekar és R. Jain, „Nanotoxicology: evaluating toxicity potential of drug-nanoparticles“, *Nanoparticulate Drug Delivery*. Elsevier, 2012, 123–155. old., ISBN: 9781907568985. DOI: 10.1533/9781908818195.123. cím: <http://dx.doi.org/10.1533/9781908818195.123>.
- [25] G. Nasr, H. Greige-Gerges, S. Fourmentin, A. Elaissari és N. Khreich, „Cyclodextrins permeabilize DPPC liposome membranes: a focus on cholesterol content, cyclodextrin type, and concentration“, *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 19. évf., 1570–1579. old., 2023. okt., ISSN: 1860-5397. DOI: 10.3762/bjoc.19.115. cím: <http://dx.doi.org/10.3762/bjoc.19.115>.

- [26] J. Mazurkiewicz, A. Simiczyjew, E. Dratkiewicz és tsai., „Melanoma stimulates the proteolytic activity of HaCaT keratinocytes“, *Cell Communication and Signaling*, 20. évf., 1. sz., 2022. szept., ISSN: 1478-811X. DOI: [10.1186/s12964-022-00961-w](https://doi.org/10.1186/s12964-022-00961-w). cím: <http://dx.doi.org/10.1186/s12964-022-00961-w>.
- [27] D. Truffin, F. Marchand, M. Chatelais és tsai., „Impact of Methylated Cyclodextrin KLEPTOSE® CRYSMEB on Inflammatory Responses in Human In Vitro Models“, *International Journal of Molecular Sciences*, 25. évf., 17. sz., 9748. old., 2024. szept., ISSN: 1422-0067. DOI: [10.3390/ijms25179748](https://doi.org/10.3390/ijms25179748). cím: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms25179748>.