

Antitumor ezüst-lipid nanopartikulumok targetált tumor terápiához

Darwish Ammar

Biokémiai és Orvosi Kémiai Tanszék
Pécsi Tudományegyetem Orvostudományi Kar

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskolája

Doktori Iskola vezetője és programigazgató: **Prof. Dr. Gallyas Ferenc**

Témavezető
Dr. Balogi Zsolt

Társtémavezető
Prof. Dr. Kónya Zoltán



Pécs, 2026

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés.....	2
1.1	Daganatok	2
1.2	Nanotudomány	2
2	Célkitűzések	4
2.1	Liposzómába zárt AgNP-k (LAg-k) előállítása és jellemzése (LAgs).....	4
2.2	Cél: célzott, lipidbevonatú AgNP-k előállítása és jellemzése.....	4
3	Anyagok és Módszerek	5
3.1	Liposzómába zárt AgNPs.....	5
3.2	Hibrid lipidbevonatú, háromszög alakú AgNP-k.....	6
4	Eredmények.....	6
4.1	LAgs.....	6
4.2	Lipidbevonatú AgNP-k	7
5	Megbeszélés	9
6	Következtetés	13
7	Közlemények.....	14
8	Konferencia részvétel.....	14

1 Bevezetés

1.1 Daganatok

A daganatok olyan betegségek, amelyben a sejtek képesek kontrollálatlanul szaporodni és növekedni. Úgy vélik, hogy ezt a viselkedést genetikai mutációk okozzák, epigenetikai módosulások mellett. A hagyományos kezelési módok közé tartozik a műtét, a sugárkezelés és a kemoterápia. Sajnos a kemoterápiás szerek generalizált szisztémás toxicitást okoznak, a sugárzás hatással van a környező egészséges szövetekre, a műtét pedig invazív, és nem mindig képes teljesen eltávolítani a tumorszövetet. Ebben az összefüggésben a nanotechnológiai és nanotudományos megközelítések egyre inkább hozzájárulnak a küzdelemhez azáltal, hogy új stratégiákat dolgoznak ki a tumorok kezelésére, miközben minimalizálják az egészséges szövetek károsodását.

1.2 Nanotudomány

A nanotudomány napjainkban a nanométeres mérettartományba eső struktúrák és molekulák vizsgálatával foglalkozik, jellemzően 1 és 100 nm között. A nanorészecskék (NP-k) kivételes tulajdonságokkal rendelkeznek, ami ígéretes jelöltekké teszi őket a daganatok kezelésében. Ilyen például a nanorészecskék azon képessége, hogy passzívan felhalmozódjanak a tumorokban. Emellett a felszínükhöz célpont specifikus ligandumok kapcsolhatók. A nanorészecskék közül az ezüst nanorészecskék (AgNP-k) különös figyelmet kaptak biomedicinális alkalmazásaik miatt.

1.2.1 Ezüst nanorészecskék (AgNP-k)

Az AgNP-k szervetlen, fémes nanorészecskék (MNP-k), amelyek nanométeres tartományban lévő elemi ezüsből állnak. Különösen jól ismertek optikai és biocid tulajdonságaikról. Érdeemes megemlíteni, hogy fokozhatják a hagyományos kemoterápiás szerek hatékonyságát.

Bizonyították, hogy az AgNP-k citolitikus hatásukat az Ag^+ ionok intracelluláris felszabadításán keresztül fejthetik ki az úgynevezett „trójai faló” mechanizmus révén, amely során az Ag^+ ionok reaktív oxigén gyökök (ROS) generálnak, ami oxidatív stresszhez (OS) vezet. Továbbá fontos megjegyezni, hogy az AgNP-k Ag^+ -ionoktól független mechanizmuson keresztül is kiválthatnak toxicitást.

1.2.1.1 Az AgNPs fototermikus tulajdonságai

Az AgNPs jól ismertek felszíni plazmonrezonanciájukról (SPR) is, amely lehetővé teszi a fény hatékony átalakítását lokális hővé, amikor az AgNP-eket fényforrással besugározzák. Ez a fototermikus hatás kiterjeszti az AgNP-k alkalmazását a dagantok kezelésében fototermikus terápiára (PTT) azáltal, hogy hipertermiát idéz elő és sejthalált vált ki.

1.2.1.2 Az AgNPs korlátai

A mononukleáris fagocita rendszer (MPS) az AgNP-eket idegen testként ismeri fel, ami immunválaszt vált ki, és "off-target" hatásokat okoz az egészséges szövetekben. Ezzel együtt a tumorhelyen rendelkezésre álló AgNP-k mennyiségének csökkenésével is jár. Továbbá, az emlős sejtek AgNP-kkal történő kezelése oxidatív stresszt (OS), DNS-károsodást és apoptotikus útvonal aktivációt idézhet elő. Emellett az AgNP-k reakcióba léphetnek a biológiai folyadékok összetevőivel, például elektrolitokkal, ami befolyásolja saját fizikai-kémiai tulajdonságaikat, ezáltal csökkentve stabilitásukat. Ennek következtében az AgNP-k toxicitása ingadozóvá és kiszámíthatatlanná válik. Egy lehetséges mód ezen korlátok leküzdésére az AgNP-k lipidhordozók segítségével történő célzott szállítása.

1.2.2 Lipid alapú gyógyszershállító rendszerek

A lipid alapú gyógyszershállító rendszerek nanorészecske-méretűek (NP), sejtyszerű rétegekből állnak, és széles körben alkalmazzák őket aktív hatóanyagok célzott szállítására. Ezek a rendszerek magukban foglalják a liposzómákat és a lipidbevonatokat. Jellemzően foszfolipidekből (PL-ekből) épülnek fel.

A liposzómák gömb alakú, mesterséges nanorendszerek, amelyek foszfolipidekből és/vagy más amfipatikus lipidekből állnak. Általában egy vagy több kettősrétegből álló membránt tartalmaznak, amelyek a liposzóma típusától függően egy vagy több vizes magot (core-t) hoznak létre. A foszfolipid-kettősrétegek nagyon hasonlítanak a természetes sejthártyákhoz, lehetővé téve a hatékony sejtkölcsönhatást, miközben minimalizálják a kedvezőtlen reakciókat és javítják a biokompatibilitást.

1.2.3 Lipid–fém nanorészecske formulációk

A lipidhordozók és fém nanorészecskék (MNP-k) kombinációja ígéretes stratégiát jelent mindkét rendszer egyedi tulajdonságainak integrálására. A liposzómába zárt AgNP-k tekintetében

csupán korlátozott számú tanulmány vizsgálta a liposzómák alkalmazását az AgNP-k szállítójaként, hogy értékeljék antineoplasztikus aktivitásukat, és ezek a vizsgálatok hagyományos, két-dimenziós (2D) modellekre korlátozódtak. Ezekben a tanulmányokban a liposzóma-formulációkat nem tisztították meg az szabad, kapszulán kívüli AgNP-któl, ami megnehezíti annak megkülönböztetését, hogy a terápiás hatást a bezárt vagy a szabad nanorészecskék hozzák-e létre. Ennek következtében a tisztított liposzómák valódi terápiás potenciálja és mechanisztikus hatásai továbbra sem tisztázottak.

Továbbá az AgNP-k hibrid lipid-tiol réteggel történő bevonása jelentősen csökkentette a toxicitást embrionális zebradánió modellekben, és javította az AgNP-k stabilitását, valamint szabályozta az aggregációt. A biztató eredmények ellenére ezt a bevonati stratégiát még nem tesztelték emlős tumorsejtekben vagy ex vivo modellekben, amelyek a jelen tanulmány egyik fő fókuszát képezik.

2 Célkitűzések

2.1 Liposzómába zárt AgNP-k (LAg-k) előállítása és jellemzése (LAg-s)

- A lipidösszetétel hatásának fizikai-kémiai vizsgálata.
- A LAg-k biológiai alkalmazhatóságának értékelése.
- A legstabilabb LAg-k passzív, akut és hosszú távú toxicitásának vizsgálata, valamint annak felderítése, hogy az AgNP-k liposzómákba zárása hogyan befolyásolja az AgNP-k toxicitását egészséges és tumorsejtekre 2D modellekben.
- A LAg-formulációk antiinvazív potenciáljának értékelése fiziológiailag releváns 3D környezetben.

2.2 Cél: célzott, lipidbevonatú AgNP-k előállítása és jellemzése

- Oxidációálló, stabil és biokompatibilis nanorészecskék előállítása.
- A hibrid lipidbevonat védelmi képességének értékelése agresszív környezetben.
- A bevonat terápiás hatásának vizsgálata az AgNP-k toxicitására egészséges kontrollsejtekre és GBM sejtvonalra 2D modellekben.
- Annak ellenőrzése, hogy az AgNP-k fototermikus ágensekként (PTA) történő alkalmazása javítja-e a hatékonyságukat tumorsejtekkel szemben.
- A sejtspecifikus aktív célzás fokozása.

3 Anyagok és Módszerek

3.1 Liposzómába zárt AgNPs

AgNP-k szintézise és jellemzése: A szabad AgNP-eket (AgNP-k-u) és a citráttal bevont AgNP-eket (AgNP-k-c) kémiai redukcióval állítottuk elő, majd ultraibolya-látható (UV-Vis) spektroszkópiával, dinamikus fénykiterjedéses szórással (DLS) és transzmissziós elektronmikroszkópiával (TEM) jellemeztük.

Liposzómák előállítása: Különböző lipidösszetételű liposzómákat (**1. táblázat**) a hagyományos vékonyfilm-hidratációs módszerrel készítettük. A szárított lipidfilmeket szobahőmérsékleten hidratáltuk AgNP-ekkel, hogy többrétegű liposzómákat (MLV-eket) képezzenek. A keletkező szuszpenziókat 100 nm-es polikarbonát membránon történő extrudálásnak vetettük alá.

1. táblázat. Különböző liposzóma-formulációk

Lipid típusa	Móláris arány
1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC)	
DOPC / 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-rac-(1-glycerol) (DOPG)	1/1
DOPC/DOPG /Sphingomyelin (SM)	1/1/1
DOPC/DOPG /Cholesterol (Cho)/(SM)	1/1/1/1
DOPC/DOPG /(Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate) PIP₂	40/55/5
DOPC/DOPG / 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine (DOPS)/ PIP₂	20/20/55/5

Liposzóma tisztítása és jellemzése: A liposzómák szabad AgNPs-ektől történő tisztítását méretszelektív kromatográfia (SEC) segítségével végeztük, Sephadex G-200 oszlop alkalmazásával. A LAg-k tulajdonságait DLS, TEM és röntgendiffrakció (XRD) módszerekkel értékeltük. Az enkapszulációs hatékonyságot (EE) tömegspektrometriával mértük. Ezen felül sűrűséggradiens-centrifugálást alkalmaztunk az üres liposzómák szétválasztására, majd elemeztük az egyes frakciókat.

LAg-k szivárgásvizsgálata: A liposzómák stabilitását biológiai közegben úgy értékeltük, hogy karboxifluoresceint (CF) lipiddel bevontuk, majd a LAg-eket DMEM-ben és DMEM + FBS mellett 37 °C-on inkubáltuk.

LAg 2D toxicitás: Az AgNP-k és LAg-k citotoxikus hatását 48 órán keresztül A375, RPMI7951 és HEK293 sejtvonalakban vizsgáltuk az MTT-analízis segítségével. A kezelést követően az A375 és RPMI7951 melanoma sejtek kolónia formáló potenciálját kolónia képző teszttel értékeltük.

3D Sferoid inváziós vizsgálat: A melanoma sejtek invazív viselkedését 3D környezetben szferoid inváziós teszt segítségével értékeltük. Az A375 és RPMI7951 szferoidokat Matrigel mátrixba ágyasztuk, majd szabad AgNP-kkel és LAg-kel kezeltük, és az inváziót folyamatosan nyomon követtük.

3.2 Hibrid lipidbevonatú, háromszög alakú AgNP-k

Lipidbevonatú, háromszög alakú AgNP-k: A citráttal stabilizált háromszög alakú AgNP-eket kémiai redukcióval, H₂O₂ jelenlétében állítottuk elő. Ezután az AgNP-eket nátrium-oleáttal (SOA), dipalmitoil-foszfátidil-kolin (DPPC) és hexán-tiollal (HT) vontuk be, így létrehozva a végső AgNP–SOA–DPPC–HT formulációt. Az AgNP-eket UV–Vis spektroszkópiával és TEM-mel jellemeztük, majd stabilitásukat KCN maratási próbával értékeltük.

A lipidbevonatú háromszög alakú AgNP-k fototermikus potenciálja: Az AgNP-szuspenziókat DMEM-ben 808 és 850 nm hullámhosszú lézerekkel, 2 W teljesítménnyel 6 percig kezeltük. A hőmérsékletet az besugárzás alatt folyamatosan mértük.

A háromszög alakú AgNP-k citotoxicitása: A háromszög alakú AgNP-k toxicitását U87, U251 és HEK sejtvonalakra az MTT-analízis segítségével értékeltük. A sejteket AgNP-kkel kezelték, majd lézerbesugárzásnak vetettük alá.

A háromszög alakú AgNP-k célzása: A klorotoxin (CTX) és az epidermális növekedési faktor (EGF) rekombináns DNS-technológiával készült, majd a DSPE-PEG2000-COOH beépítésével a LUV-okhoz konjugálták a bilayer formulációban. A hidrofób fluoreszcens festék, Dil beépítésre került az AgNP-felvétel nyomon követésére. A 3D szferoidokat nem célzott vagy célzott AgNP-kkel kezeltük, majd fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

Ex vivo célzás emberi glioma-szeleteken: Az emberi glioma szövetmintákat célzott, lipidbevonatú AgNP-kkel inkubáltuk, majd fluoreszcens mikroszkópiás megfigyelést végeztünk.

4 Eredmények

4.1 LAgs

AgNPs-k jellemzése

Az AgNP-k-u és AgNP-k-c UV–Vis spektrumában SPR-csúcsok jelentek meg. A TEM képek közvetlenül igazolták a gömbölyű, egyenletes morfológiát, míg a DLS-mérések továbbá feltárták a hidrodinamikai átmérőket: 45,0 nm az AgNP-k-u és 32,4 nm az AgNP-k-c esetében, a Zeta-potenciál értékek pedig rendre -27,0 mV és -41,3 mV voltak.

AgNP-k liposzómába zárása: A LAg-k tisztítását SEC-módszerrel végeztük, ami korábban még nem történt LAg-k esetében. A nagyobb LAg-k eluálódtak, míg a szabad AgNP-k a kolonna tetején maradtak. Ezt DLS-mérésekkel is megerősítettük: a nem tisztított LAg-minták két csúcsot mutattak, míg a tisztított LAg-minták csak egyet. A tisztított preparátumok TEM-képei csak a lipiddel bevont nanorészecskéket mutatták, szabad AgNP-k nem voltak láthatók egyik vizsgált formulációban sem. Továbbá, az XRD-spektrumok igazolták az AgNP-k jelenlétét.

LAg-k tulajdonságai és biostabilitása: Az enkapszuláció általában negatívabb Zeta-potenciál értékeket eredményezett, ami fokozott kolloid stabilitást jelez a LAg-k esetében. A sűrűséggradiens-centrifugálás (DGC) alapján a vezikulák sűrűsége növekedett a NP kapszulázás során, és a LAg-k jelentős része a gradiens sűrűbb rétegeibe ülepedett. A szabad AgNP-k és a liposzómába zárt AgNP-k ülepedési viselkedése DGC-vel jól elkülöníthető volt.

LAg-k biostabilitása: Izotóniás közegben szivárgás figyelhető meg a semleges és erősen negatív töltésű LAg-k esetében. FBS hozzáadása további különbségeket tárt fel. Mindazonáltal a PC/PG-, PC/PG/SM- és PC/PG/SM/Chol-LAg-k konzisztensen a legmagasabb stabilitást mutatták szérum mellett.

A tisztított LAg-k gátolják a tumorsejtek életképességét: Mind a LAg-k, mind a szabad AgNP-k csökkentették az A375 és RPMI7951 sejtek életképességét, a bevonóanyag függvényében. Az AgNP-k lipiddel történő bevonása megőrizte vagy javította a hatékonyságot. Érdemes megjegyezni, hogy a LAg-formulációk kevésbé voltak toxikusak a nem daganatos HEK293 sejtekre, mint a szabad AgNP-k. Emellett a kezelés drámaian gátolta mindkét sejt vonal kolónia formáló potenciálját, megerősítve, hogy a LAg-k erősen károsítják a melanoma sejtek hosszú távú túlélését és proliferációs képességét.

A tisztított LAg-k gátolják a 3D tumorszferoid inváziót: Mind a szabad AgNP-k, mind a LAg-k csökkentették az A375 sejtek invazív növekedését. Az RPMI7951 sejtek esetében a szabad AgNP-k-u nem okozott jelentős hatást, míg csak az AgNP-k-c és LAg-c bizonyultak hatásosnak

4.2 Lipidbevonatú AgNP-k

Háromszög alakú AgNP-k jellemzése: A szabad AgNP-k az NIR-tartományban jelentős SPR-csúcsot mutattak. A lipid-funkcionalizációt követően a bevont AgNP-k megőrizték az SPR-csúcsot, míg a TEM-képek a háromszög alakú morfológiát igazolták.

A hibrid lipidbevonatú AgNP-k stabilitása KCN maratás ellen: Az AgNP–SOA–DPPC–HT formuláció volt az egyetlen, amely stabil maradt a maratási körülmények között.

AgNP-k fototermikus potenciálja: Az AgNP-szuszpenziók sejtenyésző közegben történő besugárzása mérhető hőmérséklet-emelkedést eredményezett, amely lineárisan követte az AgNP-arányt.

A hibrid lipidbevonatú AgNP-k citotoxikus hatásai: Az AgNP-k lipiddel történő bevonása jelentősen csökkentette toxicitásukat a HEK293 egészséges sejtekre. Ugyanakkor a bevont AgNP-k megőrizték vagy javították a citotoxikus aktivitást az U87 és U251 sejtek ellen. Ezzel szemben a fototermikus terápia (PTT) alkalmazása jelentősen fokozta a toxikus hatást mindkét sejtvonalra.

A lipidbevonatú AgNP-k célzása 3D GBM-szferoidokra: A jelölt és célzott AgNP-k mindkét típusú tumorszferoid esetében jelentősen erősebb fluoreszcens jelet mutattak a nem célzott kontrollokhöz képest. A fluoreszcens intenzitás kvantitatív elemzése tovább bizonyította, hogy a célzott AgNP-kkel történő kezelés jelentős növekedést eredményezett a jelzésben.

AgNP-k célzott szállítása emberi glioma-szövetekhez: Az emberi glioma szövetminták világos fluoreszcens jeleket mutattak, igazolva az AgNP-k tumorszöveten belüli kötődését. A jel heterogén módon oszlott el a szeleten, egyes területek erősebb fluoreszcenciát mutattak.

5 Megbeszélés

Az AgNP-k jelentős figyelmet kaptak a daganatok kezelésében. Klinikai alkalmazásuk azonban több okból korlátozott, elsősorban az egészséges sejtekre gyakorolt toxikus hatásuk miatt. Az AgNP-khez kapcsolódó korlátok leküzdésének egyik lehetséges módja, ha azokat lipid alapú gyógyszerszállító rendszeren keresztül juttatjuk be.

Kutatásunk két részből állt. Az elsőben tisztán liposzómába zárt AgNP-eket (LAg-eket) fejlesztettünk, elválasztva a szabad AgNP-ktől, és ezek tulajdonságait vizsgáltuk. Érdemes kiemelni, hogy ez a munka az első, amely tisztított, a liposzómákban szállított AgNP-at, jellemezte.

Az eredmény azt mutatta, hogy az AgNP-k-c kisebbek, ami a citrát stabilizáló szerepének köszönhető, amely megakadályozza az AgNP-k aggregációját, szemben az AgNP-k-u-val. Ezt tovább támogatták a Zeta-potenciál adatok, amelyek szerint az AgNP-k-c erősen negatív Zeta-potenciált mutattak, ami a részecskék közötti taszító hatást eredményezett.

Az AgNP-k-u beépülése egy 3–4 nm vastag, hidrofób kettősrétegű magba rendkívül valószínűtlen viszonylag nagy mérete miatt. Ezzel párhuzamosan a citráttal stabilizált AgNP-k erősen negatív töltéssel rendelkeznek, ami elektrosztatikus taszítást eredményez a negatív töltésű lipidekkel szemben. Mindazonáltal mindkét típusú nanorészecske elhelyezkedését a LUV-ok belső magjában vártuk.

Az LAg-k közvetlen hatásának vizsgálatához szükséges volt a liposzómákban nem található szabad AgNP részecskéket elkülöníteni, ehhez SEC-módszert alkalmaztunk. A LAg-k gyorsabban haladtak át a SEC-oszlopon, míg a kisebb szabad AgNP-k a kolonna tetején maradtak, valószínűleg a stacionárius fázissal kialakuló erős, nem specifikus kölcsönhatások miatt.

A Zeta-potenciál mérések kimutatták, hogy a lipiddel bevonat megváltoztatta a LAg-formulációk felszíni töltését. Ezt a töltésváltozást okozhatja az AgNP-k részleges beépülése a kettősréteg belső felületébe, valamint a liposzóma-membrán morfológiai torzulásai.

A DGC-eredmények azt mutatták, hogy a LAg-k mindig sűrűbbek voltak, mint a szabad AgNP-k vagy az üres liposzómák; azonban a teljes fizikai szétválasztás DGC-vel nem volt kivitelezhető, ami azt sugallja, hogy a DGC csak kvalitatív és szemikvantitatív módszerként szolgálhat a liposzómák bevonási hatékonyságának értékelésére. A lipid-tartalom eredményei szerint a PC-LAg-k, és különösen a PC/PG/SM-LAg-k, nagyobb mértékben dúsultak a sűrűbb frakciókban, mint az üres liposzómák, jelezve, hogy a PC, PG és SM fokozza az AgNP-k bevonását.

A stabilitási vizsgálatok kiemelik a közeg összetételének kritikus szerepét a LAg-k integritásának fenntartásában. Ebben a kontextusban a csak PC-ből álló LAg-k és a PIP₂-t tartalmazó LAg-k voltak a legkevésbé stabilak. Ennek háttérében feltehetően a PC ikerionos töltése áll. Ugyanakkor a PIP₂ erősen negatív töltése elektrosztatikus taszítást idézhet elő az egymás melletti PIP₂ fejrészek között, ami a CF felszabadulásához vezethet. Ezzel szemben a PG-, PG/SM- és PG/SM/Chol-LAg-k voltak a legstabilabbak ezekben a körülményekben. A magyarázatok között szerepelhet a SM és a Chol merevítő hatása is.

A FBS alkalmazása tovább fokozta a megfigyelt különbségeket. Például a csak PC-ből álló LAg-k, valamint a PS-t és PIP₂-t tartalmazó formulációk ebben a közegben instabilnak bizonyultak, valószínűleg a szérumfehérjék és ezek a PL-ek közötti kölcsönhatás miatt. Ez a destabilizáló hatás a szérumfehérjékből adódhat. A többi formuláció (PC/PG-, PC/PG/SM- és PC/PG/SM/Chol-LAg-k) eredményei összhangban voltak a korábbi vizsgálatokkal, és ezen három formuláció bizonyult a legalkalmasabbnak bioassay-ekhez.

Az enkapszulációs hatékonyságot (EE) kevesebb, mint 30%-ra becsülték, ami a nagy AgNP-méretnek, valamint az AgNP negatív töltése és a liposzóma kettősrétegben lévő negatív töltésű PL-ek közötti taszításnak tudható be. Mind a szabad AgNP-k, mind a LAg-k toxikusak voltak az A375 és RPMI7951 sejtekre, ahol az A375 sejtek voltak érzékenyebbek. Az adatok továbbá azt is mutatják, hogy az AgNP-k liposzómába zárása javíthatja azok toxikus hatását tumorsejtekre, míg az egészséges HEK293 sejtekre alkalmazva a LAg-k kevésbé voltak toxikusak, mint az AgNP kontroll esetén. Ez valószínűleg a daganatos sejtek normál sejtekhez képest jól ismert fokozott internalizációjának (anyagok sejtbe jutásának) és turnoverének (anyagcseréjének) köszönhető.

A hosszú távú expozíciós vizsgálatokban mind az AgNP-k, mind a LAg-k gátolták az A375 és RPMI-7951 sejtek kolónia képző potenciálját hasonló módon, néhány formuláció esetében pedig az AgNP kontrollhoz képest fokozott aktivitást mutattak.

A 3D modellek felé haladva, az A375 szferoidok invázióját mindkét típusú AgNP, valamint LAg jelentősen gátolta, ami azt jelzi, hogy a lipiddel bevont AgNP-k megőrizték az antiinvazív hatást. Az RPMI7951 eredmények esetében azonban csak az AgNP-k-c és LAg-k-c voltak effektívek hasonló hatékonysággal. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a hatékonyságukat erősen befolyásolja a nanorészecskék felületi kémiája, valamint a tumorsejtek invazív fenotípusa. Az A375 sejtek ameboid típusú inváziójával ellentétben az RPMI7951 szferoidok eltérő érzékenysége valószínűleg azok mezenchimális jellegű inváziós jellegéből adódik.

Miután optimalizáltuk az lipiddel történő bevonást, a következő lépésként egy alternatív lipid-AgNP szállítási megközelítésre koncentráltunk. Az AgNP-k lipiddel történő bevonása magasabb fokú AgNP-védelem elérését teszi lehetővé. A magasabb AgNP-terhelés előnye ellenére technikai kihívást jelent a lipidbevonatú AgNP-k degradációjának megakadályozása, ezért ezen technikai akadályok leküzdése érdekében, és hogy a háromszög alakú lipidbevonatú AgNP-k valós alternatívát jelentsenek, stabil és célzott nanorészecskéket állítottunk össze, és fototermikus terápiát (PTT) szándékoztunk alkalmazni.

A PTT egy minimálisan invazív orvosi eljárás tumorok kezelésére, amely kihasználja a fototermikus ágensek (PTA-k) képességét lokalizált hipertermia előidézésére. A lipidbevonatú háromszög alakú AgNP-k az NIR-tartományban (650–950 nm) SPR-csúcsot mutattak, ami igazolja azok alkalmasságát PTA-ként. Ezt úgy értük el, hogy a H₂O₂-t oxidatív maratóanyagként alkalmaztuk, így kontrolláltuk az AgNP-k alakját, és elősegítettük a háromszög alakú részecskék kialakulását. A TEM-analízis kimutatta, hogy a lipidbevonatú AgNP-k háromszög morfológiájúak, ahol a morfológia éles szélei és csúcsai plazmonikus „hot spot”-ként működnek, a nanorészecskék SPR-jét biokompatibilis NIR-tartományba hangolva.

Az AgNP-k érzékenysége az oxidatív oldódásra és a felszíni korrózióra vízben és biológiai környezetben instabilitáshoz és fokozott Ag⁺-felszabaduláshoz vezet, ami jelentős korlátot jelent az alkalmazásukban. Annak közvetlen értékelésére, hogy a felszíni bevonatok mennyire védik az AgNP-eket az ilyen kémiai degradációtól, cianidot (KCN) alkalmaztunk, amely lehetővé tette a nanorészecskék felszíni fedettségének alapos vizsgálatát. A KCN-nel történő kitétség azt mutatta, hogy a szabad AgNP-k, valamint a részlegesen funkcionált formulációk erősen érzékenyek voltak a maratásra, jelezve, hogy a ezüstmag védelme nem volt kielégítő. Ezzel szemben csak az AgNP–SOA–DPPC–HT formuláció mutatott jelentős ellenállást, bizonyítva, hogy a SOA hidrofób kötőpartnerként, a DPPC lipidmembránként, valamint a HT rögzítőként való kombinált hatása sűrű és folyamatos védőréteget eredményezett.

A LAg-eredményekkel összhangban, a hibrid bevonat jelentősen csökkentette a HEK293 sejtekre gyakorolt toxikus hatást a szabad AgNP-k-hez képest. Ez a védőréteg jelentős maszkírozó hatásának tudható be, amely megakadályozza az ezüst nanorészecskék (AgNP) idő előtti oxidációját a sejteken történő alkalmazás során. A GBM tumorsejtek esetében azonban az életképességi vizsgálatok azt mutatták, hogy a bevonat nem befolyásolta a citotoxikus tulajdonságokat. Továbbá, a sejtek külső lézertérrel történő besugárzása a háromszög alakú

AgNP-k kezelését követően fokozta a terápiás hatékonyságot mind az U87, mind az U251 sejtvonalakban, ami a PTT hatásoknak köszönhető: a hipertermia a sejttűrési szint fölé emelkedik, ami visszafordíthatatlan sejthalálhoz vezet. Röviden, a lipidbevonatú AgNP-k kettős hatást értek el: tumorsejt-specifikus toxikus ágensekként és fototermikus ágensként (PTA) működtek.

A részecskék hatékonyságának növelése érdekében aktív célzást alkalmaztunk, a bevonatréteget különböző célzó molekulákkal funkcionáltattuk, beleértve a CTX-et, EGF-et és folátot. A CTX egy skorpióméregben található peptid, amely magas affinitással kötődik a GBM sejtekhez. Továbbá, a GBM betegek körülbelül 40%-ánál figyelhető meg az EGFR túlexpresszió, ami indokolja az EGF alkalmazását. Emellett a folátot is kiválasztottuk, tekintettel a GBM-ben előforduló magas folátreceptor-szintekre. A szferoid célzás eredményei azt mutatták, hogy a célzott és bevont AgNP-k jelentősen javították a nanorészecskék dokkolását és felvételét, ami a fluoreszcencia-jelzés növekedésében nyilvánult meg.

A 3D GBM szferoidokon történt megfigyelések alapján a következő lépésként az emberi glioma szövetmintákban történő célzott AgNP-felhalmozódást vizsgáltuk, hogy értékeljük az AgNP-k szállítását egy komplex, ex vivo tumorkörnyezetben. Minden mintában heterogén jelzést figyeltünk meg. A receptor-sűrűség, a sejttartalom és a tumor abnormális extracelluláris mátrixa valószínűleg befolyásolja, hogy a CTX-, folát- és EGF-funkcionált AgNP-k hol és hogyan halmozódnak fel, kiemelve a célzó ligandumok szerepét a specifikus tumorrégiókhöz történő irányításban.

Összefoglalva: a lipidbevonatú, háromszög alakú ezüst nanorészecskék (AgNP-k) stabilitást, NIR-érzékeny fototermikus aktivitást és GBM-sejtek elleni toxicitást mutatnak, miközben mérsékelik az egészséges sejtekre gyakorolt toxikus hatást. A célzó ligandumok tovább fokozzák a tumorsejt-specifikus felhalmozódást, míg a PTT erősíti az antitumor hatást. További vizsgálatokra van szükség a hosszú távú terápiás hatékonyság, biodisztribúció és a potenciális antiinvazív tulajdonságok értékeléséhez.

6 Következtetés

Az AgNP-k nagy jelentőséggel bírnak az orvostudományban egyedi biocid tulajdonságaik miatt, azonban klinikai alkalmazásuk továbbra is stabilitási problémákba és szabályozatlan toxicitásba ütközik. A hátrányok leküzdésére ígéretes megoldást kínál a lipid alapú hordozók alkalmazása, legyen szó liposzómákról vagy lipid kettősréteggel történő bevonásról.

A LAg-eredmények azt mutatták, hogy a SEC-módszerrel történő tisztítás lehetővé tette a nettó hatás vizsgálatát anélkül, hogy a szabad AgNP-k befolyásolták volna az eredményeket. Egyes LAg-formulációk magas stabilitást mutattak bioközegekben, ami alkalmassá tette őket sejtes vizsgálatokra. Az AgNP-k lipiddel történő bevonása mérsékelte az egészséges sejteket érintő nem kívánatos (off-target) citotoxicitást, miközben megőrizte vagy fokozta a rövid- és hosszú távú passzív hatékonyságot a melanoma sejtek ellen. A 3D tumormodellekben az antiinvazív aktivitás szintén megmaradt.

A lipidbevonatú háromszög alakú AgNP-k megfelelő NIR-optikai tulajdonságokat és magas stabilitást mutattak erős oxidálószerrel szemben, továbbá kiváló fototermikus tulajdonságokkal rendelkeztek, így alkalmasak voltak a PTA-ként való alkalmazásra. Az AgNP-k bevonása csökkentette az AgNP-k szabályozatlan toxicitását, miközben megőrizte azok aktivitását a GBM sejtvonalak ellen. A lézeralkalmazás fokozta a bevont AgNP-k hatékonyságát hipertermia indukálásával. A felszín célzóágensekkel történő módosítása felerősítette a fluoreszcens jelet, ami a sejtes felvétel hatékonyságának javulását jelzi. A célzott AgNP-k képesek voltak kötődni az emberi szövetmintákhoz, amelyekben heterogén jeleloszlás volt megfigyelhető

Ezek az eredmények bizakodással tekintenek a lipid-AgNP formulációk jövőjére, mivel ezek a lipid alapú szállítási módszerek lehetőséget kínálnak az AgNP-kkel kapcsolatos korlátok leküzdésére és a hatékonyság növelésére. A jövőbeni vizsgálatok során összetett *in vivo* modellekre lesz szükség a biztonságosság, a biodisztribúció és a daganatspecifikus célzás hatékonyságának igazolásához.

7 Közlemények

A dolgozat a következő közleményen alapul:

Darwish, Ammar, Nikolett Sándor, Imre Szent, Tamás Marosvölgyi, Kata Juhász, Andrea Rónavári, Edi Kachal, Bence Kutus, Zoltán Kónya, and Zsolt Balogi. "Highly Stable Antitumor Silver-Lipid Nanoparticles Optimized for Targeted Therapy." **International Journal of Nanomedicine** (2025): 1351-1366. **IF: 6.5; D1**

Darwish, Ammar, Milán Pammer, Ferenc Gallyas Jr, László Vígh, Zsolt Balogi, and Kata Juhász. "Emerging lipid targets in glioblastoma." **Cancers** 16, no. 2 (2024): 397. **IF: 4.4; Q1**

8 Konferencia részvétel

Ammar Darwish, Nikolett Sándor, Imre Szent, Tamás Marosvölgyi, Kata Juhász, Andrea Rónavári, Edi Kachal, Bence Kutus, Zoltán Kónya, Zsolt Balogi
Silver-lipid nanoparticles shaped for targeted tumor therapy
ÖPhG MEETING: Pharmaceutical Sciences in the Heart of Europe, Vienna 2025
Részvétel típusa: **Szóbeli előadás (kiválasztott)**.

Ammar Darwish, Nikolett Sándor, Imre Szent, Tamás Marosvölgyi, Kata Juhász, Andrea Rónavári, Edi Kachal, Bence Kutus, Zoltán Kónya, Zsolt Balogi
Silver-lipid nanoparticles shaped for targeted tumor therapy
Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society, Budapest 2024
Részvétel típusa: **Poszter (díjazott)**