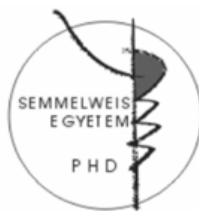


Mesterséges nanorészecskék protrombotikus hatása

Doktori tézisek

Dr. Bihari Péter

Semmelweis Egyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Merkely Béla egyetemi tanár, D.Sc.

Dr. Krombach Fritz egyetemi tanár, D.Sc.

Opponensek: Dr. Bereczky Zsuzsanna egyetemi docens, Ph.D.

Dr. Szebeni János egyetemi tanár, D.Sc.

Szigorlati Bizottság

Elnök: Dr. Ferdinandy Péter egyetemi tanár, D.Sc.

Tagok: Dr. Komorowicz Erzsébet egyetemi adjunktus, Ph.D.

Dr. Kaszaki József egyetemi docens, Ph.D.

Budapest
2015

Bevezetés

Nanorészecskének a 100 nm-nél kisebb partikulumokat nevezzük. Környezetünkben mindig jelen voltak ilyen méretű részecskék, de csak az utóbbi 50 évben kerültek a figyelem középpontjába, amikor a nanotechnológia robbanásszerű fejlődése révén lehetővé vált a nanorészecskék tervezése és gyártása. Azóta a nanotechnológia jelentős iparággá növekedett és mára több száz olyan termék van a piacon, ami nanoanyagot tartalmaz.

A nanorészecskék önálló entitásként való kezelését különleges fiziko-kémiai sajátosságai indokolják, melyek különböznek az adott anyag tömeges formájának illetve az anyagot felépítő atomoknak, molekuláknak a tulajdonságaitól is. Ezek a sajátosságok lehetővé teszik új alkalmazások kifejlesztését, másrészt eddig ismeretlen biológiai hatásokat is magukban rejthetnek.

A nanorészecskék különböző utakon, így belégzéssel, a tápcsatornán keresztül, a bőrön lerakódva illetve orvosi alkalmazásoknál injekció útján kerülnek kapcsolatba az emberi szervezettel. A behatolási helyekről a keringésbe, majd onnan a szervezet bármely szövetébe eljuthatnak és módosíthatják a szervek működését.

A hemosztázis alapvető fontosságú, az erek integritásának fenntartását célzó élettani funkció. Érsérülés során a vér érintkezése az erek belsejétől eltérő bármely más felszínnel trombusképződéshez vezet, ami megállítja a vérzést. Ennek a mechanizmusnak egy ismert és nem kívánt következménye, hogy az érpályába beültetett orvosi eszközök idegen felszínén is kialakulnak trombusok. A nanorészecskék rendkívül kis méretük ellenére, nagy összesített felszínük révén szintén befolyással lehetnek a hemosztázisra.

Ezt a feltevést támasztják alá azok az epidemiológiai vizsgálatok is, melyek a légszennyezés szív- és érrendszert károsító hatásaiban a környezetben előforduló nanorészecskék alapvető szerepét bizonyítják. Ezen kóros

folyamatok háttérben a környezeti nanorészecskék trombusképződést fokozó hatását számos vizsgálat igazolja.

A nanorészecskék potenciálisan trombogén felszíne és a környezeti nanorészecskék esetében már ismert protrombotikus folyamatok felvetik a mesterséges nanorészecskék hemosztázist befolyásoló hatásának lehetőségét, erről azonban kevés adat áll rendelkezésre. Míg a keringésbe bekerülő nanorészecskék a mikrocirkuláció területeire is eljutnak, az itt kifejtett protrombotikus hatásokat még nem vizsgálták.

Célkitűzések

Disszertációm célja a mesterséges nanorészecskék vérlemezkeaktivációra, valamint makro- és a mikrocirkulációs trombusképződésre kifejtett hatásainak vizsgálata volt. E célok eléréséhez először két módszertani problémára kellett megoldást találni: stabil nanorészecske diszperzió előállítás a fiziológiás oldatokban, és a vérlemezke-granulocita komplexek mérésének optimalizálása.

1. Nanorészecske diszperzió előállítása fiziológiás oldatokban

A nanorészecskék biológiai hatásainak vizsgálatához azokat fiziológiás oldatokban kell diszpergálni. A diszpergálás egyik lehetséges módja az ultrahangos kezelés. A nanorészecskék azonban fiziológiás só és pH értékek mellett az ultrahangkezelés ellenére is durva agglomerátumokat képeznek. Célunk az agglomerátumok képződésének megakadályozása volt. Az általunk alkalmazott sztérikus stabilizálási módszer optimalizálása során a következő tényezők szerepét vizsgáltuk:

- i)* az ultrahang behatás specifikus energiája
- ii)* a sztérikus stabilizátorok típusa: humán, marha vagy egér albumin, Tween 80 vagy egér szérum

- iii) a sztérikus stabilizátorok koncentrációja
- iv) a nanorészecskék koncentrációja
- v) a diszperzió előállítás lépéseinek sorrendje
- vi) az előállított diszperzió időbeli stabilitása.
- vii) A kifejlesztett módszert a nanorészecskék széles skáláján teszteltük.

2. Vérlemezke-granulocita komplexek mérésének optimalizálása

A vérlemezkek aktivációjukkor nem csak vérlemezkekkel, de granulocitákkal is kapcsolódhatnak. Az így kialakuló vérlemezke-granulocita komplexek vizsgálatát azért tartottam fontosnak, mivel ismert, hogy a szervezetbe beültetett idegen anyagok jelenlétében mennyiségük a keringésben emelkedik. A vérlemezke-granulocita komplexek áramlási citometriás mérése a két sejttípus eltérő fluoreszcenciájú jelöléseinek egyidejű detektálásán alapul. Az ilyen kettős pozitivitást mutató események azonban nemcsak vérlemezke-granulocita komplextől, hanem olyan, egymáshoz nem kapcsolódó vérlemezketől és granulocitától is származhatnak, melyek egymástól függetlenül, véletlenül egy időben kerülnek a műszer detekciós térfogatába. Célunk egy olyan módszer kidolgozása volt, amely a két sejttípus véletlen egyidejű detektálásából származó mérési hibát képes kiküszöbölni.

3. Nanorészecskék protrombotikus hatása

Bár bizonyított a környezetünkben előforduló nanorészecskék protrombotikus hatása, a mesterségesen előállított nanorészecskéket ilyen szempontból még kevésbé vizsgálták. Ezért célunk volt a dízelpor, a titán-dioxid nanorészecskék és az egyfalú szén nanocsövek hatásának vizsgálata

- i) a vérlemezkek aktivitására és
- ii) a vérlemezke-granulocita komplexek kialakulására *in vitro*, valamint

- iii) a trombusképződésre a makro- és
- iv) a mikrocirkulációban *in vivo*
- v) továbbá ezeknek a hatásoknak az összevetése a referenciaként használt felszín módosított polisztirol nanogyöngyök hatásaival.

Módszerek

1. Nanorészecskék

Kísérleteinkben titán-dioxid (rutil), titán-dioxid (anatáz), cink-oxid, módosítatlan polisztirol nanogyöngy, karboxil-módosított polisztirol nanogyöngy, amin-módosított polisztirol nanogyöngy, egyfalú szén nanocső, többfalú szén nanocső, szilícium-oxid, ezüst, és dízelpor (dízelüzemű motorok által kibocsátott) nanorészecskéket vizsgáltunk.

2. Nanorészecske diszperzió előállítása fiziológiás oldatokban

Titán-dioxid (rutil) diszperziókat állítottunk elő desztillált vízben, PBS-ben és RPMI 1640 sejt kultúra médiumban. Vizsgáltuk a változó erősségű ultrahang energiák ($0 - 1,65 \times 10^6$ kJ/m³), a többféle sztérikus stabilizáló (humán, marha, egér albumin, Tween 80, és egér szérum), a különböző nanorészecske (2 µg/ml – 2 mg/ml) és stabilizáló (1,5 µg/ml – 15 mg/ml) koncentrációk, valamint az eltérő preparációs sorrend hatásait. Az így elkészített diszperziók nanorészecskéinek méretbeli eloszlását dinamikus fényszórással, a nanorészecskék zeta-potenciálját pedig elektroforetikus mobilitás módszerekkel határoztuk meg. A nanorészecskék méretét transzmissziós elektronmikroszkóppal is ellenőriztük.

3. Vérlemezke-granulocita komplexek mérésének optimalizálása

A véletlen egyidejű detektálás jelenségét fluoreszkáló gyöngyök keverékének illetve EDTA-val és citráttal antikoagulált vérminták különböző hígításainak áramlási citometriás mérésével vizsgáltuk. A véletlen egyidejű detektálás jelenségének matematikai törvényszerűségeit Poisson eloszlás segítségével írtuk le.

4. Nanorészecskék hatása a vérlemezkék aktivitására *in vitro*

Vérlemezke P-selectin expresszióját és vérlemezke-granulocita komplexek mennyiségét mértük áramlási citometriával, miután teljes vért, amin- vagy, karboxil-módosított polisztirol nanogyöngyökkel, dízelporral, titán-dioxid rutil (0,1 mg/ml) nanorészecskékkel vagy egyfalú nanocsövekkel (0,001-0,1 mg/ml) inkubáltunk. A vérlemezkék aggregációs képességét trombocita dús plazmában aggregometriával vizsgáltuk.

5. A nanorészecskék trombusképződésre gyakorolt *in vivo* hatása

Mesenterialis kis erek vas-kloriddal indukált trombusképződésének idejét intravitális mikroszkópiával egér modellben mértük, nanogyöngyök (0,5 mg/kg) és nanorészecskék (1 mg/kg) intravaszkuláris beadását követően. További kísérletekben polisztirol nanogyöngy (0,5 mg/kg), titán-dioxid (rutil, 1 mg/kg), dízelpor (1 mg/kg) illetve egyfalú szén nanocső (0,01–1 mg/kg) injekciója után a cremaster izom mikrocirkulációjában vizsgáltuk a fotodinamias (light/dye) módszerrel indukált trombusképződést.

6. Statisztika

Az adatok statisztikai feldolgozásához a megfelelő post-hoc tesztekkel kiegészített ANOVA-t, t-tesztet, a legkisebb négyzetek módszerét és regresszió analízist használtunk, a $p < 0,05$ értékeket tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények

1. Nanorészecske diszperzió előállítása fiziológias oldatokban

Vizsgálataink alapján az aggregátum nélküli nanorészecske diszperziók fiziológias oldatokban történő előállításához a következő tényezőket kell figyelembe venni:

- i)* A diszperzióba leadott ultrahang energiának legalább olyan magasnak kell lennie, ami elegendő a nanorészecske aggregátumok szétválasztásához ($> 4,2 \times 10^5$ kJ/m³).
- ii)* Az albumint vagy a szérumot, mint sztérikus stabilizátorokat olyan koncentrációban kell a diszperzióhoz adni, ami elegendő a nanorészecskék felszínének lefedéséhez (ez 0,2 mg/ml-nél alacsonyabb nanorészecske koncentrációk esetén 1,5 mg/ml humán albumint vagy hasonló mennyiségű albumint tartalmazó szérumot jelent).
- iii)* A diszperzió előállítás lépéseinek sorrendje akkor optimális, ha először desztillált vízben történik az ultrahangkezelés, majd ezt követi a sztérikus stabilizátor és végül pufferezett sóoldat hozzáadása a diszperzióhoz.

2. Vérlemezke-granulocita komplexek mérésének optimalizálása

Vizsgálataink alapján három olyan módszert ajánlunk vérlemezke-granulocita komplexek áramlási citometriás meghatározására, amelyek kiküszöbölik a véletlen egyidejű detektálásból származó mérési hibát:

- i)* A kettős pozitív események korrekciója a detektálási térfogat és a trombocitaszám ismeretében kiszámított véletlen egyidejű detektálások számával.
- ii)* A mért kettős pozitív események korrekciója a fluoreszcens gyöngyök segítségével megmért véletlen egyidejű detektálások számával.

- iii) Vérlemezke-granulocita komplexek mérése olyan nagyfokú hígításoknál, ahol a véletlen egyidejű detektálás előfordulása elhanyagolható.

3. Nanorészecskék protrombotikus hatása

A környezeti és a mesterségesen előállított nanorészecskék *in vitro* vérlemezke aktivációra és *in vivo* makro- és mikrocirkulációs trombusképződésére kifejtett hatásainak vizsgálata alapján megállapíthatjuk, hogy:

- i) Az általunk használt polisztirol nanogyöngyök amin-módosítása fokozza, de a karboxil-módosítása nem változtatja meg a vérlemezkék P-selectin expreszsióját és a vérlemezke-granulocita komplexek mennyiségét. A trombociták aggregációjára egyik módosításnak sincs hatása.
- ii) Az amin-módosított polisztirol nanogyöngyök csökkentik, míg a karboxil-módosított nanogyöngyök növelik a trombusképződés idejét a mesenterialis kiserekben, de egyik módosításnak sincs hatása a mikrocirkulációs trombusképződésre.
- iii) Dízelpor és titán-dioxid (rutil) nanorészecskéknek nincs hatása a vérlemezkék aktivitására.
- iv) A dízelpor és a titán-dioxid (rutil) nanorészecskék sem a mesenterialis erekben, sem a mikrocirkulációban nem befolyásolják a trombusképződés idejét.
- v) Az egyfalú szén nanocsövek fokozzák a vérlemezkék P-selectin expreszsióját, a vérlemezke-granulocita komplexek mennyiségét, és a vérlemezkék aggregációját.
- vi) Az egyfalú szén nanocsövek mind a mesenterialis arteriákban, mind a mikrocirkulációban csökkentik a trombusképződéshez szükséges időt.

Következtetések

A nanorészecskék biológiai hatásainak vizsgálatához sikerült egy olyan diszpergálási technikát beállítani, amelynek alkalmazásakor fiziológias oldatokban nem jönnek létre agglomerátumok. Továbbá a kísérleteink során használt vérelemezke-granulocita komplexek áramlási citometriás méréséhez kidolgoztunk egy olyan módszert, ami kiküszöböli a két sejttípus véletlen egyidejű detektálásából származó mérési hibát.

Disszertációm fő vizsgálatai a nanorészecskék trombusképződésre kifejtett hatásaira irányultak. Eredményeink azt mutatják, hogy míg a polisztirol nanogyöngyök amin módosítása fokozza a trombociták aktivitását és a mesenterialis trombusképződést, ugyanezen nanogyöngyök karboxil módosítása nem aktiválja a trombocitákat és csökkenti a trombusképződést a mesenterialis arteriákban. Egyik módosítás sem hoz létre trombocita aggregációt és nem befolyásolja a trombusképződést a mikrocirkulációban. Vizsgálatainkban a dízelpornak és a titán-dioxid (rutil) nanorészecskéknek nem voltak sem *in vitro* sem *in vivo* protrombotikus hatásai. Ezzel szemben az egyfalú szén nanocső *in vitro* aktiválja és aggregálja a vérelemezket, és *in vivo* fokozza a trombusképződést mind a makro-, mind a mikrocirkulációban.

A mesterséges nanorészecskék növekvő technológiai és orvosi felhasználása szükségessé teszi egészségügyi rizikójuk felmérését. Legfontosabb eredményünk, hogy vizsgálataink felhívják a figyelmet egyes nanorészecskék protrombotikus hatására. Mivel ezek a hatások a nanorészecskék fiziko-kémiai paramétereiből nem kikövetkeztethetők, ezért szükség van e hatások szűrésére.

Publikációk jegyzéke

A disszertáció tárgyát képező, nemzetközi folyóiratban megjelent publikációk:

1. **Bihari P**, Holzer M, Praetner M, Fent J, Lerchenberger M, Reichel CA, Rehberg M, Lakatos S, Krombach F. (2010) Single-walled carbon nanotubes activate platelets and accelerate thrombus formation in the microcirculation. *Toxicology*, 269(2-3):148-54. (IF: 3.641)
2. **Bihari P**, Vippola M, Schultes S, Praetner M, Khandoga AG, Reichel CA, Coester C, Tuomi T, Rehberg M, Krombach F. (2008) Optimized dispersion of nanoparticles for biological in vitro and in vivo studies. *Part Fibre Toxicol*, 6;5:14. (IF: a folyóiratnak 2008-ban még nincs impaktfaktora)
3. **Bihari P**, Fent J, Hamar J, Furész J, Lakatos S. (2008) An easy-to-use practical method to measure coincidence in the flow cytometer – the case of platelet-granulocyte complex determination. *J Biochem Biophys Methods*, 24;70(6):1080-5. (IF: 1.994; osztott elsőszerezőség Dr. Fent Jánossal.)

Egyéb, nemzetközi folyóiratban megjelent publikációk:

4. Holzer M, **Bihari P**, Praetner M, Uhl B, Reichel C, Fent J, Vippola M, Lakatos S, Krombach F. (2014) Carbon-based nanomaterials accelerate arteriolar thrombus formation in the murine microcirculation independently of their shape. *J Appl Toxicol*, 34(11):1167-76. (IF: 3.174)

5. Karatolios K, Wittek A, Nwe TH, **Bihari P**, Shelke A, Josef D, Schmitz-Rixen T, Geks J, Maisch B, Blase C, Moosdorf R, Vogt S. (2013) Method for aortic wall strain measurement with three-dimensional ultrasound speckle tracking and fitted finite element analysis. *Ann Thorac Surg*, 96(5):1664-71. (IF: 3.631)
6. Wittek A, Karatolios K, **Bihari P**, Schmitz-Rixen T, Moosdorf R, Vogt S, Blase C. (2013) In vivo determination of elastic properties of the human aorta based on 4D ultrasound data. *J Mech Behav Biomed Mater*, 27:167-83. (IF: 3.048)
7. **Bihari P**, Shelke A, Nwe TH, Mularczyk M, Nelson K, Schmandra T, Knez P, Schmitz-Rixen T. (2013) Strain measurement of abdominal aortic aneurysm with real-time 3D ultrasound speckle tracking. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 45(4):315-23. (IF: 3.070)
8. Bubik MF, Willer EA, **Bihari P**, Jürgenliemk G, Ammer H, Krombach F, Zahler S, Vollmar AM, Fürst R. (2012) A novel approach to prevent endothelial hyperpermeability: the Crataegus extract WS® 1442 targets the cAMP/Rap1 pathway. *J Mol Cell Cardiol*, 52(1):196-205. (IF: 5.148)
9. Bihari I, Tornoci L, **Bihari P**. (2012) Epidemiological study on varicose veins in Budapest. *Phlebology*, 27(2):77-81. (IF: 1.458)
10. Rehberg M, Praetner M, Leite CF, Reichel CA, **Bihari P**, Mildner K, Duhr S, Zeuschner D, Krombach F. (2010) Quantum dots modulate leukocyte adhesion and transmigration depending on their surface modification. *Nano Lett*, 10(9):3656-64. (IF: 12.186)
11. Praetner M, Rehberg M, **Bihari P**, Lerchenberger M, Uhl B, Holzer M, Eichhorn ME, Fürst R, Perisic T, Reichel CA, Welsch U, Krombach F. (2010) The contribution of the capillary endothelium to blood clearance and tissue deposition of anionic quantum dots in vivo. *Biomaterials*, 31(26):6692-700. (IF: 7.882)

12. Khandoga A, Stoeger T, Khandoga AG, **Bihari P**, Karg E, Ettehadieh D, Lakatos S, Fent J, Schulz H, Krombach F. (2010) Platelet adhesion and fibrinogen deposition in murine microvessels upon inhalation of nanosized carbon particles. *J Thromb Haemost*, 8(7):1632-40. (IF: 5.439)
13. Tasnádi G, Bihari I, **Bihari P**. (2010) Peritoneo-venous shunt implantation as a therapy for chylous ascites. *Phlebologie*, 39: 24-27. (IF: 0.733)
14. Reichel CA, Rehberg M, Lerchenberger M, Berberich N, **Bihari P**, Khandoga AG, Zahler S, Krombach F. (2009) Ccl2 and Ccl3 mediate neutrophil recruitment via induction of protein synthesis and generation of lipid mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29(11):1787-93. (IF: 7.235)
15. Khandoga AG, Khandoga A, Reichel CA, **Bihari P**, Rehberg M, Krombach F. (2009) In vivo imaging and quantitative analysis of leukocyte directional migration and polarization in inflamed tissue. *PLoS One*, 4(3):e4693. (IF: 4.351)
16. Fürst R, Bubik MF, **Bihari P**, Mayer BA, Khandoga AG, Hoffmann F, Rehberg M, Krombach F, Zahler S, Vollmar AM. (2008) Atrial natriuretic peptide protects against histamine-induced endothelial barrier dysfunction in vivo. *Mol Pharmacol*, 74(1):1-8. (IF: 4.711)
17. Reichel CA, Rehberg M, **Bihari P**, Moser CM, Linder S, Khandoga A, Krombach F. (2008) Gelatinases mediate neutrophil recruitment in vivo: evidence for stimulus specificity and a critical role in collagen IV remodeling. *J Leukoc Biol*, 83(4):864-74. (IF: 4.605)

18. Fent J, **Bihari P**, Furész J, Hamar J, Lakatos S. (2008) Impact of coincidence on granulocyte-platelet complex determination by flow cytometry is evaluated by a novel computer simulation model of coincidence. *J Biochem Biophys Methods*, 70(6):1086-90. (IF: 1.994)
19. Bihari I, Muranyi A, **Bihari P**. (2005) Laser-doppler examination shows high flow in some common telangiectasias of the lower limb. *Dermatol Surg*, 31(4):388-90. (IF: 2.254)
20. Bihari I, Tasnádi G, **Bihari P**. (2003) Importance of subfascial collaterals in deep-vein malformations. *Dermatol Surg*, 29(2):146-9. (IF: 1.806)

Magyar nyelvű folyóiratban megjelent publikációk:

21. Bihari I, Tornóczi L, **Bihari P**. (2002) Alsó végtagi varicositas hazai epidemiológiai felmérése. *Érbetegségek*, 2:57-62. (IF: a folyóiratnak nincs impaktfaktora)