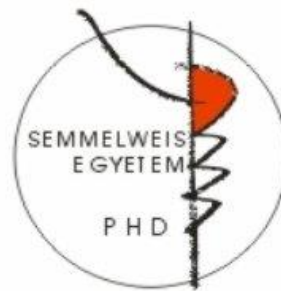


Nanopartikulumok szövet- és sejt-specifikus felhalmozódása: vizsgálatok spektrális képalkotású fluoreszcens mikroszkópiával

Doktori tézisek

Kenesei Kata

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Madarász Emília, DSc., kutatóprofesszor

Hivatalos bírálók: Dr. Bíró László Péter, DSc., kutatóprofesszor
Dr. Tóth Sára, PhD., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Röhlich Pál, DSc., professzor emeritus
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kőhidai László, PhD., egyetemi docens
Dr. Krizbai István, DSc., tud. tanácsadó

Budapest
2016

BEVEZETÉS

Az elemek és vegyületek új, különleges tulajdonságokat mutatnak, ha kiterjedésük legalább 1 dimenzióban a nanométer tartományba kerül. A nanopartikulumok (NP) – melyeknek mindhárom dimenziója a „nano” (tipikusan 1-100nm közötti) mérettartományba tartozik – fizikokémiai átmenetet képeznek az állandó sajátságokkal jellemezhető hétköznapi értelemben vett anyagok és a molekuláris/atómi részecskék fizikokémiai tulajdonságai között.

A nanopartikulumokban az atomok jelentős hányada a struktúra felszínén helyezkedik el. A felszíni atomok kevesebb atomhoz kapcsolódnak, kisebb a kohéziós energiával rendelkeznek és ezzel magasabb a kémiai reaktivitásuk. A nagy felületi energia kivételes mechanikai, kémiai, elektromos és termodinamikusan tulajdonságokkal ruházza fel a NP-okat. A felszín-effektusokkal párhuzamosan a kvantummechanikai tulajdonságok is megváltoznak. Az elektronok energia állapota viszonylag könnyen módosul NP-okban, melynek következtében jellemző félvezető, magnetikus és optikai tulajdonságokat vesz fel az anyag (például felszíni plazmon rezonancia, vagy részecskeméret függvényében változó szín és emittált fény).

A nano-anyagokat széles körben használja az ipar különféle fogyasztási cikkekben az elektronikai műszerektől a kozmetikai termékekig. A nano-adalékok speciális (pl. baktériumölő, színfokozó) sajátságokat adhatnak, növelhetik a termék stabilitását és javíthatják a gyártási hatékonyságot.

A nanomedicina a NP-ok vagy az azokhoz kötött gyógyszer és/vagy jelölő molekulák jellegzetes szerkezeti eloszlását használják ki a diagnosztikában és terápiában. Hatásigilag engedélyezett „nanogyógyszerek” – példaként a nanoliposzómális doxorubicin (Doxil®), mely passzív módon, megnövekedett penetrációs és retenciós tulajdonságával feldúsítja a doxorubicin szintjét a tumoros szövetekben – egyre nagyobb szerepet kapnak a terápiában. Nanorészecskék kontraszt- és jelölőanyagként való használata jobb felbontást és detekciót eredményez sok képalkotó eljárásban, így a mágnesesrezonancia-képalkotásban (MRI), pozitronemissziós tomográfiában (PET), egyfotonos emissziós komputertomográfiában (SPECT) és közeli infravörös fluoreszcens eljárásokban.

A nanopartikulumok alkalmazása a humán gyógyászatban tulajdonságaiknak köszönhetően igen vonzó. Azonban a különleges fizikokémiai tulajdonságok, amelyek

előnyössé teszik a nanopartikulumok felhasználását, egyúttal potenciális egészségkárosító kockázatot is jelentenek mind a felhasználás, mind a partikulumok előállítása és kezelése során. A nanomedicina számára gyártott hordozók, melyeknek célja a specifikus sejtfelvétel és szöveti penetráció növelése, nagyban növelik a gyógyszeradagolás vagy képalkotás hatékonyságát. A nem szándékosan kitett környezetet, például az ipari előállítókat és korházi dolgozókat, azonban meg kell védeni a NP-ok hatásaitól. A NP-ok egyre növekvő termelése, a széleskörű felhasználása fogyasztási cikkekben, ipari és orvosi alkalmazásokban, azaz az egyre növekvő jelenlétük a mindennapi életünkben, fontos kérdéseket vetnek fel a NP-ok biológiai rendszerekre gyakorolt hatásaival kapcsolatban.

Annak ellenére, hogy a nanopartikulumok biológiai interakcióit, toxicitását nagy erővel kutatják és ellenőrzik, a nanotechnológia rohamos fejlődése állandó kihívást jelent a biztonságosság szempontjából. A kutatóknak, szabályozó és ellenőrző szerveknek gyors és megbízható mérési módszerekre, valamint megbízható standardokra van szükségük az ellenőrzéshez. A NP-ok fizikokémiai tulajdonságaik és biológiai hatásaik hasonlósága szerint csoportosíthatók, mely csoportosítási rendszer könnyíti az ellenőrző mérések tervezését. Szemben a fibrilláris nanorészecskékkel, a gömb alakú nanopartikulumok esetén az alak nem jelent veszélyforrást. A nanogömbök veszélyességét a kémiai toxicitás okozhatja, amely magába foglalja (1) a toxikus anyagok kibocsátását/leválását a NP-ről (2) a felszíni funkciós csoportok reakcióit a környezettel (3) a NP-ok és/vagy a NP-felület katalitikus hatásait.

Biológiailag inert vagy biohasonlatos tulajdonságaik miatt, a biológiai kutatásokban – többnyire nem képalkotó-alkalmazásokban – gyakran alkalmazott a nemfémes nanopartikulumok használata. A nem toxikus alapanyagú NP-ok közül doktori munkám során két széles körben előállított és használt NP tulajdonságait és biológiai hatásait vizsgáltam.

A *polisztirol nanopartikulumok* (PS-NP) nem toxikus, nem karcinogén polimerből készülnek. A polisztirol elterjedt anyag a mindennapi életben, de orvosi eszközökben, laboratóriumi műszerekben is széles körűen alkalmazzák. Az EU normatíváknak megfelelően gyakran használt csomagoló anyag, amely nem okoz rövidtávú toxikus hatásokat, azonban nem bomlik el a szervezetbe jutva. A polisztirol nagyfokú inertsége

lehetővé tette számunkra, hogy PS-NP-at használjunk annak vizsgálatára, miképp befolyásolják a különböző felszíni funkciós csoportok a NP-ok biológiai interakcióit.

Az *amorf szilika nanopartikulumok* (SiO₂-NP) orális adminisztrációja, használata fogyasztási cikkekben évtizedek óta engedélyezett. Adalékanyagként a gyártási folyamatokban meggátolja az anyagok összetapadását, segíti az áramlást, de használják habzsgátlóként, derítőként vagy ízanyagok hordozójaként is. Orvosi alkalmazásokban jelentős szerepet töltenek be, mint ígéretes gyógyszer- és jelölőanyag hordozók. A kedvező tulajdonságok és a potenciális klinikai alkalmazások ellenére a SiO₂-NP alkalmazásával kapcsolatos kockázati tényezők nincsenek teljes körben feltérképezve, valamint a biztonságosságot alátámasztó bizonyítékok hiányosak.

A NP-ok biológiai anyagokkal való kölcsönhatásai, a felépítő anyagokon kívül, alapvetően függ a részecskék felszíni tulajdonságaitól. Magas reakcióképességű felszínüknek köszönhetően nagy mennyiségű és különböző eredetű anyagot adszorbeálnak a felszínükön. Biológiai oldatokban a NP-ok egy úgynevezett „protein koronát” alakítanak ki, mely elfedi a NP valódi felszínét. A protein korona dinamikusan változik, összetétele egyensúlyi reakciókkal alakul ki és befolyásolja mind a NP, mind a környezet összetétele.

A NP felszínét legvégül a protein korona „funkcionalizálja”. A korona kialakulása és összetétele azonban befolyásolható a NP-ok felszínének és reakcióképességének megváltoztatásával. Felszíni funkciós csoportokkal a NP-ok aktivált vagy passzívált felületre tehetnek szert, mely vonzza vagy taszítja a szerves és szervetlen anyagokat. Doktori munkám során azonos méretű, szilika- vagy polisztirol alapanyagú, de különböző kémiai összetételű felszínnel rendelkező nanorészecskék sejt- és szöveti penetrációját vizsgáltam.

CÉLKITŰZÉSEK

A doktori értekezés tárgyát képező munkában fluoreszcens nanopartikulumok fizikokémiai tulajdonságait és biológiai anyaggal való interakcióit tanulmányoztam, a NP-ok sejtes internalizációjának *in vitro*, valamint szervek, szövetek közötti megoszlásának *in vivo* vizsgálatával. Munkám során tanulmányoztam, miképpen befolyásolják a szilika (SiO₂) és polisztirol (PS) nanopartikulumok biológiai viselkedését a különböző funkciós csoportok; az erősen negatív töltésű (PS-COOH, SiO₂, SiO₂-SH) felszíni csoportoktól a pozitív (SiO₂-NH₂) vagy passzíváló (PS-PEG, SiO₂-PVP) csoportokig. A kísérletek során a következő kérdésekre kerestem a választ:

- Megfelelő modellek lehetnek a vizsgálatokban használt polisztirol (PS-COOH, PS-PEG) és szilika (SiO₂, SiO₂-NH₂, SiO₂-SH and SiO₂-PVP) nanopartikulumok a felszíni funkciós csoportok hatásainak tanulmányozására? A felszíni funkciós csoportok mellett van-e más, biológiailag releváns különbség a NP-ok között?
- Hogyan befolyásolják a funkciós csoportok a NP-ok viselkedését szerves és szervetlen oldatokban?
- Milyen sejtípusok veszik fel az egyes NP-okat szérumentes *in vitro* körülmények között?
- Milyen mértékben penetrálnak illetve ürülnek a különböző funkciós csoporttal rendelkező NP-ok az egér szervekben, szövetekben, különös tekintettel, az élettani gáttal védett agyszövetre és embrióra?
- Növelhető-e a fluoreszcens NP-ok mikroszkópos detekciójának hatékonysága? Alkalmas-e a spektrum analízissel kombinált spektrális képalkotású fluoreszcens mikroszkópia a NP-ok detektálására magas szöveti autofluoreszcencia mellett?

MÓDSZEREK

Nanopartikulumok

Fluoreszcens polisztirol nanopartikulumokat (10 mg/ml vizes szuszpenzió) a Spherotech Inc. (Lake Forest, IL, USA) gyártotta. Az 50-70nm névleges átmérőjű NP-ok felszíne karboxil- (PS-COOH) vagy polietilén glikol (PS-PEG; $M_{\text{PEG}} = 300\text{g/mol}$) csoportokkal volt funkcionálizálva. A NP-ok „Yellow” vagy „NileRed” fluoreszcens festékekkel jelölt polisztirolból készültek.

A „mag-héj” struktúrával rendelkező fluoreszcens szilika nanopartikulumokat (50nm, fluorescein izotiocianát (FITC) jelölőanyag a belső tokban) Emilia Izak-Nau (Bayer Technology Services) készítette módosított Stöber szintézis alapján. A szilika NP-ok felszíne polivinil pirrolidonnal (PVP K-15, Sigma-Aldrich) volt bevonva; vagy 3-aminopropil trietoxiszilán (APTES, 98%, Alfa Aesar) és 3-merkaptopropil trimetoxiszilán (MPTMS, Sigma-Aldrich) hozzáadásával amino- és merkaptocsoportokat képzett rajtuk.

Fizikokémiai karakterizálás

A NP-ok méretét dinamikus fényszórás (DLS) méréssel határoztuk meg 633 nm-es He-Ne lézerrel felszerelt ZetasizerNano ZS90 (Horiba Instruments Inc., Irvine, CA) műszerrel, 25°C-on mérve. A nanopartikulumok időbeli méretváltozását 37°C-on követtük nyomon szerves és szervetlen oldatokban. A NP-ok méretét és alakját transzmissziós elektron mikroszkóp (TEM, JEOL JEM 1010, JEOL Ltd., Tokyo, Japan) segítségével is meghatároztuk. A NP-ok zeta-potenciálját elektroforetikus mobilitásuk alapján határoztuk meg, 25°C-on, egy U-kapilláriscsővel felszerelt (DTS1070, Malvern Instruments) ZetasizerNano ZS90 készülékkel.

Protein adszorpció mérése

A NP-ok fehérje adszorpcióját SDS (sodium dodecyl sulfate) -poliakrilamid gélelektroforézissel határoztuk meg, 1h vagy 24h inkubáció után 10%-os hőinaktivált főtális borjúsavó (fetal calf serum, FCS) tartalmú minimum essential mediumban (MEM, Sigma-Aldrich). A géleket ezüst festékekkel hívtuk elő (silver staining 33 kit, Cosmobio Ltd., Tokyo, Japan) a gyártó utasításai szerint.

Idegszöveti sejtenyészetek

Primer idegsejt tenyészetek: embrionális (E14-19) vagy korai posztnatális (P0-P3) egér előagyból állítottuk elő az idegszövet mechanikai vagy kombinált enzimátikus disszociációjával (Neural Tissue Dissociation Kit, Miltenyi Biotec). A primer sejtenyészeteket 4 mM glutamint, 2,5 µg/ml amphotericin-B-t (Sigma-Aldrich) és 40 µg/ml gentamicint (Sanofi-Aventis/Chinoin) tartalmazó 10% FCS-MEM-ben tartottuk fent, 37 °C-on, 5% CO₂-t tartalmazó gázkörnyezetben. Neuron-dús tenyészetekhez a kirakást követő 4.-5. napon anti-mitotikus CAR-al (cytozin-arabino-furanozid, 10µM) kezeltük és 10% ló szérum tartalmú MEM-ben tartottuk fent.

A *primer mikroglia tenyészeteket* Saura et al. (2003) módszere szerint készítettük újszülött egér előagyból. A GFP-jelölt mikroglia sejteket CX3CR1 gén promóter alatt zöld fluoreszcens fehérjét (green fluorescent protein, GFP) expresszáló egerekből izoláltuk. Újszülött egér előagyból származó egysejt-szuszpenziót 10% FCS tartalmú DMEM-F12 1:1 arányú keverékében tenyésztőedényekben, 37°C-on, 5% CO₂-t tartalmazó gázkörnyezetben tartottuk fent. Az asztrocitákat enyhe tripszines kezeléssel eltávolítottuk a konfluens vegyes glia kultúrákból, és az aljzathoz taapódó mikroglia sejteket DMEM-F12-FCS tápoldatban tartottuk fent.

NE-4C embrionális őssejtek (ATTC CRL-2925): p53 deficiens egérembriók elülső és középső agyhólyagjából származó neurális őssejtek. Az NE-4C sejteket PLL-el kikent tenyésztőedényekben tartottuk fent 5% FCS és 4 mM glutamin tartalmú MEM tápoldatban, 37°C-on, 5% CO₂-t tartalmazó gázkörnyezetben.

Radiális glia sejtek: A 21 napos CD1 egerek hippokampuszából és szubventrikuláris zónájából izolált és klónozott radiális glia-szerű sejteket AK-cyclo[RGDfC]-vel bevont tenyésztőfelszínen, 1% B27 és 20 ng/ml epidermális növekedési faktort (EGF, Peprotech) tartalmazó MEM-F12 (1:1) tápoldatban tartottuk fent.

***In vitro* NP-felvétel kísérletek**

Az *in vitro* NP-felvétel vizsgálatára a NP-okat különböző koncentrációkban diszpergáltuk szérum-mentes tápoldatban, majd a sejtenyészeteket 60 percig inkubáltuk a nanopartikulumok szuszpenzióival 37°C vagy 4°C hőmérsékleten. Kontrol tenyészetek ugyanezen körülmények között tartottuk, NP-ok hozzáadása nélkül. Az inkubáció után a mintákat PBS-el mostuk, majd paraformaldehiddel (PFA, 4% w/v, 20min) fixáltuk szobahőmérsékleten.

***In vivo* NP-adminisztráció**

Hím (P25-30) és vemhes nőtény egereket (a terhesség 10-15. napján) testtömeg grammonként 100 µg ketamine (CP-Pharma mbH) és 10 µg xylazine (CEVA-PHYLAXIA) keverékével altattuk. Karboxilált és PEGilált polisztirol NP-okat szonikálással oszlattuk el PBS-ben (hígítás 1:30) és testtömeg grammonként 7 µl NP szuszpenziót injektáltunk az állatok farki vénájába. 5-perces vagy 4 napos expozíció után az állatokat ketamine-xylazine injekcióval túlaltattuk és szerveiket (agy, máj, vese, lép, placenta és embriók) 8%-os PFA-val fixáltuk 4 °C-on 24 órán át. Nanopartikulummal nem kezelt, de ugyanazon eljárásan átesett egerek szerveit kontroll mintákként fixáltuk. Az állatkísérletek a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Állatetikai Bizottságának előírásai szerint, a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatalának engedélyével (No.: 22.1/353/3/2011) (www.NEBIH.gov.hu) végeztük.

Immunistokémiai festés

A fixált preparátumokat Triton-X-100 oldattal feltártuk (10 perc, 0.1% v/v PBS-ben), majd a 2 órán át 10% FCS-t tartalmazó PBS-be helyezve a nem specifikus kötőhelyeket blokkoltuk. Az elsődleges ellenanyaggal (1:1000, PBS-FCS-ben) egy éjszakán át inkubáltuk +4°C-on. A fluoreszcens detektálás érdekében alexa-594-el konjugáltatott második réteg ellenanyagot (1:1000) használtunk (szoba hőn, 1 h). A minták elemzéséhez fluoreszcens Zeiss Axiovert 200 M mikroszkópot (Carl Zeiss Microimaging, Jena, Germany) és spektrál detektorral rendelkező Nikon A1R konfokális mikroszkópot (Nikon, Shinjuku, Tokyo, Japan) használtunk.

NP-ok detekciója spektális képalkotású fluoreszcens mikroszópiával

A fixált sejtenyészetekről és metszetekről spektrál detektorral felszerelt mikroszkóppal készítettünk konfokális képeket. A „Yellow” fluoreszcens festékekkel jelölt NP-ok detekciója esetén 457 nm hullámhosszú argon ion lézerrel gerjesztjük a mintákat. Az emittált fény intenzitását 468-548nm tartományban, 2.5nm-es spektrum felbontással regisztráltuk. A spektrum analízis célmezőit (regions of interest, ROIs) NP-kezelt és nem kezelt mintákban hasonlítottuk össze egy spektrum arány (spectral ratio, SR) segítségével, melyet a relatív fluoreszcencia intenzitásokból számítottunk a NP-fluoreszcencia és a szöveti autofluoreszcencia intenzitásmaximumait egymáshoz viszonyítva. A ROIk NP-ot tartalmaztak, ha az SR érték 1 feletti volt ($SR > 1$).

EREDMÉNYEK

A nanopartikulumok fizikokémiai karakterizálása

Az egyes NP-típusok tulajdonságainak átfogó karakterizálása szükséges volt annak megértése érdekében, hogy a felszíni funkciós csoportok hogyan befolyásolják a NP-ok biológiai viselkedését. A biológiai kísérleteket megelőzően meghatároztuk a NP-ok hidrodinamikai és fizikai átmérőit, aggregációs tulajdonságait és protein adszorpcióját. Nyomon követtük hogyan változnak meg ezek a tulajdonságok szerves és biológiai környezetben, beleértve a NP-ok kezelésekor használt oldatokat és a szervezet biológiai folyadékainak összetételét imitáló oldatokat.

Dinamikus fényszórás mérések megmutatták, hogy a polisztirol és szilika NP-ok stabil, monodiszperz szuszpenziókat képeznek szerves oldatokban (desztillált víz, PBS), valamint a felszín kémiai funkcionálizálása ezen körülmények között nem befolyásolta a NP-diszperziók stabilitását. Megmutattuk, hogy az eltérő csoportokkal funkcionálizált NP-ok mérete nem különbözik egymástól. A felszíni funkciós csoportok jelenléte azonban, jelentősen eltérő felszíni töltést (azaz zeta-potenciált) eredményezett. Transzmissziós elektron mikroszkópos mérések megerősítették a DLS-el mért NP-méretet és a NP-ok gömbszerű alakját.

Szérummentes, de jelentős aminosav és cukor tartalmú (DMEM) tápoldatban a NP-ok nagymértékű aggregációját figyeltük meg, a szerves oldatokban stabil diszperziókkal ellentétben. A méretnövekedés kinetikájából arra következtethetünk, hogy az oldatból rövid idő alatt a NP-ok felszínére rakódnak olyan anyagok, amelyek egymással való kölcsönhatásai fokozzák az aggregátum képződést. A kiterjedt aggregációt a pasziváló, PEG vagy PVP polimerekkel való felszín bevonás csökkentette. A NP-ok szérum-tartalmú tápoldatban (10% FCS-DMEM) való inkubációja során azonnali méretnövekedést találtunk, azonban kiterjedt aggregációt nem. A felszínre rakódott szérum komponensek meggátolták a NP-ok egymáshoz tapadását, a kialakuló protein korona stabilizálta a NP-ok szuszpenzióját. Szérum-fehérjékkel inkubált NP-okon végzett SDS-poliakrilamid gélelektroforézis eredményei megerősítették, hogy (1) a NP-ok felszínén gyors fehérje-lerakódás játszódik le, valamint (2) a PEG és PVP funkciós csoportok csökkentik a NP-ok felszínére adszorbeálódó fehérjék mennyiségét.

In vitro sejtek NP-felvétele

In vitro körülmények között az idegsejtek, asztrociták és idegi progenitor sejtek nem internalizálták a polisztirol vagy szilika NP-okat, annak ellenére, hogy a nagy zeta-potenciállal rendelkező szilika NP-ok lerakódtak a sejt felszínre.

Az idegszövet fagocitái, a mikroglia sejtek, jelentős mennyiségű NP-ot vettek fel a NP anyagára való tekintet nélkül. A passzíváló PVP-bevonat vagy PEGilálás azonban nagymértékben csökkentette a NP-ok akkumulálódását a sejtekben. A kísérleteket 4°C-on megismételve, nem találtunk NP-okat intracellulárisan, jelezve, hogy a részecskék felvétele energiaigényes sejt-folyamat, mely alacsony hőmérsékleten nem játszódik le.

Konfokális fluoreszcens mikroszkópiával értékes adatokat nyertünk a NP felvétel sejt-típus és partikulum-felszín szerinti különbségeiről, a NP-ok által emittált fény alacsony intenzitása és az erős sejtes autofluoreszcencia miatt, érzékenyebb detekciós módszer kialakítására volt szükség.

NP-ok detekciójának optimalizálása spektrális fluoreszcens mikroszkópiával

A NP-ok kimutatása nagyfelbontású konfokális mikroszkópiával sem lehetséges sok esetben, mivel méretük (mely tipikusan 1-100nm közötti), a fénymikroszkópos rendszerek feloldóképessége alatti (Abbé féle diffrakciólimitált felbontási határ: ~250nm). Emellett a NP-ok detekcióját nehezíti a biológiai minták magas autofluoreszcenciája, mely az alacsony jel-zaj arány miatt nem teszi lehetővé az egyedi NP-ok és sok esetben a kisebb aggregátumok kimutatását sem.

A NP-ok vizualizációs nehézségeinek leküzdésére fluoreszcens mikroszopíát spektrál detekcióval és spektrum analízissel kombináltuk, mely segítette az alacsony NP-fluoreszcencia azonosítását még magas szöveti autofluoreszcencia esetén is. A módszer alapja, hogy a mintából érkező, emittált fény egy spektrál detektorra érkezik, mely a beállított spektrumtartományon belül több hullámhosszon egyszerre regisztrálja a fényintenzitást. Ilyen módon a kép minden egyes pixeléről egy spektrum görbét kaphatunk. Előkísérletek során megmutattuk, hogy a NP-ok spektruma a különböző körülmények között (szérummentes és szérum tartalmú oldatokban, mowiol fedőanyaggal vagy szövet szeletekkel kontaktusban) állandó, valamint a felszín funkcionálizálása nem okoz változást a NP-ok fluoreszcencia spektrumában.

A NP-fluoreszcencia sejttenyészetekben és szövetmintákban való azonosítására spektrum analízist dolgoztunk ki. A NP-ok által emittált fény és az autofluoreszcencia

intenzitás-maximumainak megfelelő hullámhosszakon (referencia hullámhosszak) mért fényintenzitásának hányadosa (spektrális arány; spectral ratio; SR) jelezte, hogy az adott mikroszkópos mező tartalmaz-e NP-t.

A spektrum analízissel és konfokális technikával kombinált fluoreszcens mikroszkópia bizonyította a NP-ok intracelluláris jelenlétét mikroglia sejtekben. A technika segítségével megmutattuk, hogy a mikroglia sejtek internalizálják a funkcionálatlan szilika, valamint az amin- és merkapto-csoporttal funkcionálizált szilika NP-okat, de a PVP-vel bevont SiO₂-NP-okat nem. A megfigyelések alátámasztják, hogy a spektrális képkalkotású fluoreszcens mikroszkópia ideális módszer a fluoreszcens NP-ok vizsgálatára, még olyan környezetben is, ahol a magas szöveti autofloreszcencia más technikáknál problémát jelent.

A nanopartikulumok *in vivo* eloszlása

Fluoreszcensen jelölt polisztirol nanopartikulumok *in vivo* anatómiai eloszlását egyszeri intravénás injekciót követően vizsgáltuk hím és vemhes nőstény egerekben. A karboxilált vagy PEGilált felszínnel rendelkező polisztirol NP-okat a fark vénába adott injekcióval juttattuk a véráramba, majd jelenlétüket a különböző szövetekben spektrum analízissel kombinált spektrális fluoreszcens mikroszkópiával vizsgáltuk.

Öt perccel a beadás után a PS-COOH és PS-PEG nanopartikulumokat nagy mennyiségben detektáltuk a vesében, a májban és a lépben, azaz a szervezetbe kerülő idegen anyagok eliminációjáért felelős szervekben. A fiziológiás barrierek által védett agyban és az embrióban azonban, csakis PS-COOH partikulumok megtapadását figyeltük meg; PS-PEG partikulumok csak ritkán fordultak elő.

Az agyban a PS-COOH nanopartikulumok a nagy erekben és kisebb kapillárisokban koncentráálódtak, míg a parenchymába nem jutottak be. Az agyi erekben megfigyelt kitapadás rövid idejű volt: 4 nappal az adminisztrációt követően a PS-COOH NP-ok kiürültek az agyból. A passzíváló PEG csoporttal történő felszíni funkcionálizálás csökkentette az erekhez való tapadást.

A placentában a PS-COOH partikulumokat a lakúnákban mutattuk ki, míg a PS-PEG partikulumok nem tapadtak meg. Fontos megjegyezni, hogy embrionális szövetekben nem detektáltunk sem PEG-, sem COOH-felszínű PS-NP-t, jelezve a placenta hatékony barrier működését. Négy nap után mindkét partikulum kiürült a szövetből.

Ellentétben a placentával és az aggyal, mindkét partikulum megjelent a vesében 5 perccel a beadás után, mind a glomerulusokban, mind a tubulusok körüli intersticiumban. Négy nappal később a PS-COOH NP-ok kiürültek a veséből, míg a PS-PEG partikulumok továbbra is detektálhatóak voltak a glomerulusok mesangium zónájában.

A májban a PS-NP nagy mennyiségben akkumulálódtak a felszíni funkciós csoportokra való tekintet nélkül. Mennyiségük 4 nap után sem csökkent.

A lépben jelentős mennyiségű PS-COOH és PS-PEG nanopartikulumot detektáltunk. Öt perccel az intravénás injekciót követően jelenlétük a marginális zónára korlátozódott, mely a lép egy monocitákban/makrofágokban gazdag régiója. Kolokalizációs kísérletekkel megmutattuk a polisztirol nanopartikulumok intracelluláris akkumulációját Iba-1-pozitív fagocita sejtekben. Négy nappal az adminisztrációt követően a NP-ok karakterisztikus eloszlásváltozását figyeltük meg: a PS nanopartikulumok megjelentek a fehér pulpában, felszíni funkciós csoporttól függetlenül.

KÖVETKEZTETÉSEK

- A vizsgált NP-ok sejtek általi felvételének és élő testben való eloszlásának különbségeit alapvetően meghatározza a felszín kémiai összetétele.
- Passzíváló PEG és PVP funkciós csoportok csökkentik a NP-ok felszínére adszorbeálódó fehérjék mennyiségét, befolyásolják a protein korona összetételét, megakadályozzák a sejtes tápoldatokban végbemenő aggregálódást és csökkentik a sejtekkel való *in vitro* kölcsönhatásokat.
- A nanopartikulumokkal való kölcsönhatás alapvetően függ a kölcsönható sejt típusától és a NP-ok felszíni tulajdonságaitól:
 - Idegsejtek és idegi őssejtek nem vettek fel sem polisztirol sem szilika NP-okat szérumentes *in vitro* körülmények között.
 - GFAP-pozitív asztroglia sejtek nem internalizáltak NP-okat, annak ellenére, hogy a sejtek felszínére lerakódtak részecskék és részecske-aggregátumok.
 - Mikroglia sejtek nagy mennyiségű szilika és polisztirol nanopartikulumot vettek fel és akkumuláltak intracelluláris vezikulákban. Az energia-függő endocitotikus mechanizmus a NP-ok

felszínének passzíváló PVP vagy PEG bevonásával jelentősen csökkenthető volt.

- A nanopartikulumok felszínét jellemző funkciós csoportok befolyásolják a partikulumok *in vivo* szöveti penetrációját és akkumulációját:
 - A PEGiláció jelentősen csökkentette az érfalhoz való kitapadást.
 - A vér-agy gát és a placenta barrier funkciója meggátolta a polisztirol NP-ok bejutását az agyi parenchimába és az embrionális szövetekbe.
 - Mind a töltéssel rendelkező, mind a passzívált felszínű NP-ok felhalmozódtak a retikuloendoteliális szövetekben: a PS-COOH és a PS-PEG NP-ok akkumulálódtak a májban, a lépben található makrofágokban és kis mennyiségben a vese intraglomeruláris mesangiumjában.
- A spektrális képalkotású fluoreszcens mikroszkópia spektál analízissel kombinálva nagy mértékben javította a fluoreszcens NP-ok detekcióját, olyan natív mintákban, ahol a magas autofluoreszcencia nem tette lehetővé a nanopartikulumok detekcióját konvencionális fluoreszcens mikroszkópos technikával. A kidolgozott módszernek jelentős szerepe volt a NP-ok szövet és sejtszintű eloszlásának vizsgálatában, olyan időintervallum alatt, mely elektrónmikroszkópiával megvalósíthatatlan.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönöm témavezetőm, Prof. Madarász Emília szakmai támogatását és útmutatását doktori munkám és tudományos fejlődésem során. Köszönöm, hogy hallgatójaként megismerhettem és részese lehettem a NanoTOES inspiráló és nagyszerű légkörű nemzetközi programjának.

Köszönöm a közös munkát Murali Kumarasamynak, Emília Izak-Naunak, Yang Linek, Demeter Kornélnak és Környei Zsuzsának, akikkel együtt dolgoztunk a nano-interakciók megismerésén.

Hálás vagyok az Idegi Sejt- és Fejlődésbiológiai Laboratórium minden régi és jelenlegi tagjának szakmai támogatásért és a nagyszerű légkörű laborban eltöltött időért:

Barabás Kornélia	Jády Attila	Murali Kumarasamy
Demeter Kornél	Jelitai Márta	Nyámádi Piroksa
Fekete Rebeka	Kőhidi Tímea	Orsolits Barbara
Gaál Katalin	Környei Zsuzsa	Székács Inna
Hádinger Nóra	Markó Károly	Szelényi Judit
Herberth Balázs	Mészáros Zsófia	Van-Weert Szuzan

Köszönöm kollaborációs partnereinknek a doktori munkám során nyújtott nélkülözhetetlen segítségüket és támogatásukat:

Dr. Lustyik György és Dr. Czéh Árpád (Soft Flow Hungary Kft.);

Dr. Victor Puentes és Jordi Piella (Catalan Institute of Nanoscience and Nanotechnology) a QualityNano FP7 projektnek, hogy ösztöndíjával támogatta kísérleteimet az ICNnél.

Köszönettel tartozom az MTA-KOKI munkatársainak segítségükért és a stimuláló tudományos környezetért, a KOKI Nikon Mikroszkóp Központjának, a Nikon Austriának és az Auro-Science Kft.-nek, hogy lehetővé tették a Nikon mikroszkópok használatát. Köszönöm Dr. Katona Istvánnak az elsőszerzős publikációmnál és a disszertáció készítésénél nyújtott segítségét, valamint Barna Lászlónak az értékes tanácsait a spektrál detekcióval kapcsolatban.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm családomnak és barátaimnak kíváncsi érdeklődésüket és biztatásukat tanulmányaim során, valamint támogatásukat és türelmüket a publikációk és a PhD disszertáció írásakor.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Disszertációhoz kapcsolódó közlemények

- Kenesei K, Murali K, Czéh Á, Piella J, Punes VF, Madarász E. Enhanced detection with spectral imaging fluorescence microscopy reveals tissue- and cell-type-specific compartmentalization of surface-modified polystyrene nanoparticles. *Journal of Nanobiotechnology*, 2016 Jul 7;14(1):55. Impact factor: 4.239
- Murali K, Kenesei K, Li Y, Demeter K, Környei Zs, Madarász E. Uptake and bio-reactivity of polystyrene nanoparticles is affected by surface modifications, ageing and LPS adsorption: in vitro studies on neural tissue cells. *Nanoscale*, 2015 Mar 7;7(9):4199-210. Impact factor: 7.760
- Izak-Nau E, Kenesei K, Murali K, Voetz M, Eiden S, Punes VF, Duschl A, Madarász E. Interaction of differently functionalized fluorescent silica nanoparticles with neural stem- and tissue-type cells. *Nanotoxicology*, 2014 Aug;8 Suppl 1:138-48. Impact factor: 6.411
- Demeter K, Kenesei K, Czéh Á, Török L, Orsolits B, Lustyik G, Madarász E. Cell labelling with functionalised nano-beads. Published abstract: *European Cells and Materials*, 2010, 20(3), 55. Impact factor: 9.650

Disszertációtól független közlemények

- Lee SH, Ledri M, Toth B, Marchionni I, Henstridge CM, Dudok D, Kenesei K, Barna L, Szabó SzI, Renkecz T, Oberoi M, Watanabe M, Limoli CL, Horvai G, Soltesz I, Katona I. Multiple Forms of Endocannabinoid and Endovanilloid Signaling Regulate the Tonic Control of GABA Release. *J. Neurosci.* 2015 Jul 8;35(27):10039-57. Impact factor: 5.924