

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**MR-kontrasztanyagok tumorspecifikus célbajuttatására alkalmas
nanorészecskék előállítása és *in vitro*, *in vivo* tesztelése**

Hajdu István

Témavezetők:

Dr. Vámosi György

Prof. Dr. Kollár József



DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen

2014

**MR-kontrasztanyagok tumorspecifikus célbajuttatására alkalmas nanorészecskék előállítása
és *in vitro*, *in vivo* tesztelése**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Hajdu István okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Membránbiofizikai kérdések és vizsgálómódszerek programja) keretében

Témavezetők: Dr. Vámosi György, PhD
Prof. Dr. Kollár József, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Gergely Pál, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Kéki Sándor, az MTA doktora
Prof. Dr. Matkó János, az MTA doktora

A doktori szigorlat helye és időpontja: Debreceni Egyetem, Élettudományi Központ 3.016
terem, 2014. szeptember 8. 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Kellermayer Miklós, az MTA doktora
Dr. Varga József, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Gergely Pál, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Kellermayer Miklós, az MTA doktora
Prof. Dr. Kéki Sándor, az MTA doktora
Prof. Dr. Matkó János, az MTA doktora
Dr. Varga József, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem, ÁOK, Belgyógyászati Intézet "A"
épület tanterme, 2014. szeptember 8. 13:00 óra

Bevezetés

Kutatómunkámat olyan interdiszciplináris tudományterületen kívántam végezni, ahol a kémiai elméleti tudásomat és gyakorlati tapasztalatomat olyan rendszerek előállításához használhatom, amelyek nagy érdeklődésre számot tartó orvosbiológiai felhasználást céloznak meg. Ezen alapelvek figyelembe vételével a kutatómunkám témája ötvözi a napjainkban intenzíven fejlődő nanotechnológia és képződiagnosztika eljárásait, és a biopolimerek orvosbiológiai alkalmazásának, az MR-kontrasztanyagok fejlesztésének, valamint a nanotechnológiai kutatásoknak a metszetében áll.

Napjainkban növekvő érdeklődés övezi a biokompatibilis, biodegradálható makromolekulák egyre szélesebb körű orvosbiológiai alkalmazási lehetőségeit. Ezen makromolekulák speciális tulajdonságait alapul véve, a biopolimer alapú fejlesztések megcélazzák a szövetregeneráció, implantáció, hatóanyag-hordozók és más rendszerek újszerű megvilágítását és biológiai felhasználási lehetőségeit. Ezen kiemelt orvosbiológiai felhasználási területek egyike a kontrasztanyagok, ezen belül az MR-kontrasztanyagok fejlesztése.

Az utóbbi évtizedekben, a tudomány és a technika fejlődésével növekvő igény jelentkezik a diagnosztikai eljárások iránt. Kiemelt fontosságúvá vált a betegségek korai felismerése. Ezt segítő hatékony, esetenként tumorspecifikus kontrasztanyagok alkalmazása válik szükségessé a pontos diagnózis felállításához. Ezen igények olyan T1, illetve T2 MR-kontrasztanyagok fejlesztését teszik szükségessé, amelyek növelik az MRI érzékenységét, erős kontrasztot biztosítanak a megfigyelt anatómiai rendellenességeknél, szervi elváltozásoknál, ezáltal jobb detektálhatóságot téve lehetővé.

A kontrasztanyagok fejlesztése során is alkalmazhatók a nanotechnológiai vívmányok. A nano-méretű anyagok méretükből adódóan speciális tulajdonságokkal rendelkeznek, melyek előnyösen kihasználhatók bizonyos felhasználási területeken. Kiváló hordozók lehetnek, térfogatukhoz képest nagy a felületük, és alkalmasak számos hatóanyag megkötésére, szállítására, kibocsátására.

Az elvárások és lehetőségek szem előtt tartásával kutatómunkám során olyan biopolimer alapú nanorendszerek előállítását tűztem ki célul, amelyek tumorspecifikus MR-kontrasztanyagként alkalmazhatók. A felhasznált biopolimerek kedvező biológiai tulajdonságokat kölcsönöznek az előállított nanorendszereknek, melyek mint nanohordozók alkalmasak paramágneses, illetve szuperparamágneses ligandumok tumorspecifikus szállítására.

Irodalmi áttekintés

Biopolimerek

Jelen dolgozat kutatási témája által leginkább érintett tudományterületek szűk értelmezését alapul véve, biopolimernek tekinthetők azok a makromolekulák, amelyeket élő szervezetek állítanak elő, és biodegradábilis tulajdonsággal rendelkeznek.

Ezen követelményeknek megfelel a kitozán (CH), amely lineáris poliszacharid, a természetben nagy mennyiségben előforduló kitin dezacilezett származéka.

Biológiai szempontból a CH számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik: biokompatibilis, biodegradábilis, nem toxikus, megújuló biopolimer, gombaölő és antibakteriális tulajdonságú.

A biopolimer szűk értelmű definíciójának szintén megfelel a poli-gamma-glutaminsav (PGA), amely egy különleges anionos polipeptid, amelyet γ -amid kötéssel kapcsolódó D- és L-glutaminsav egységek építenek fel. A PGA vízben jól oldódó, biokompatibilis, biodegradábilis, nem toxikus biopolimer. A PGA-t mikroorganizmusok termelik, bakteriális fermentációval lehet előállítani.

Biopolimer alapú nanorendszerek

A biopolimert (is) tartalmazó nanorendszerek, nanorészecskék fejlesztésének és kutatásának számos ága különböztethető meg. A biopolimer szerepe szerint ezen rendszereket két nagy csoportba sorolhatjuk: (i) a biopolimerből alakítjuk ki magát a nanorészecskét és mellette más polimerek/biopolimerek/egyéb anyagok is részt vehetnek a rendszer kialakításában, illetve (ii) szervesetlen nanorészecske kerül előállításra (elsősorban fém, fém-oxid, vagy szén) és ezen nanorészecskék burkolása történik a biopolimerrel. Mindkét típusú nanorendszer fejlesztését nagy kutatói érdeklődés övezi.

A szakirodalomban egyre növekvő számban jelennek meg az orvosbiológiai és gyógyszer tudományi felhasználás céljára fejlesztett olyan biopolimer alapú nanorendszerek, amelyek biokompatibilisek, biodegradábilisek és alkalmasak valamely speciális felhasználásra, mint pl. hatóanyagok szállítására.

A CH és a PGA vizes közegben oldható, reaktív funkciós csoportokkal rendelkező biopolimerek. Megfelelő körülmények között polielektrolitként viselkedhetnek, melynek következtében a két makromolekulából, ion-ion kölcsönhatással kolloid rendszerek, pl. részecskék, filmek, gélek, kompozitok keletkezhetnek.

A tudomány fő irányvonalainak fejlődésével és változásával a CH és a PGA önrendeződésével kialakítható részecskék, elsősorban nanorészecskék fejlesztését övezi

kitüntetett figyelem. A szakirodalomban számos önrendező CH/PGA nanorészecske előállításáról és vizsgálatáról publikálnak, melyek elsődlegesen hatóanyagok szállítására kerültek kifejlesztésre. Számos közlemény számol be ezen nanorendszerekkel történő génszállításról, kontrasztanyag-szállításról, valamint egyéb hatóanyagok szállításáról.

Targetált nanorendszerek

Az utóbbi években egyre növekvő tudományos érdeklődés és kutatói aktivitás övezi a nanorendszerek kontrasztanyagként történő alkalmazásának lehetőségeit az orvosi képalkotásban.

A nanorendszerek orvosi képalkotásban történő alkalmazása lehetőséget teremt arra, hogy javítsuk a felvételek diagnosztikus biztonságát, érzékenységet, kombináljuk a különböző képalkotó módszereket, és ezáltal elősegítsük a korai tumordiagnosztikát és a hatékony tumorterápiát.

A nanorendszerek alkalmazása mellett egyre nagyobb figyelem irányul a különböző hatóanyagok, kontrasztanyagok célzott szállítására. Számos kutatás irányul hatékony, célzottan szállító rendszerek fejlesztésére, valamint azok alkalmazására az orvostudományban.

A hatékony tumortargetálás megvalósítása terén elért eredmények azt bizonyítják, hogy a hordozó alaprendszerhez irányító, célzóligandum kapcsolásával megvalósítható a megfelelő tumortargetálás. A célzó, specifikus ligandum révén a hordozó rendszer hozzákötődik a tumorsejtek felszínén található megfelelő receptorokhoz, megvalósítva ezáltal a hivatott célbajuttatást.

Kontrasztanyagok

A radiológiában a kontraszt a kép legvilágosabb és legsötétebb pontja közötti világosság különbség. A kontraszt teszi lehetővé a vizsgáló számára az elváltozások felismerését. A különböző képalkotó eljárások során gyakran szükségessé válik ezen kontraszt erősítése, amelyet ún. kontrasztanyagokkal érhetjük el.

„A kontrasztanyagok az egyes képalkotó eljárások során használt, jogi értelemben gyógyszernek minősülő készítmények, melyek a detektálható jeleket módosítják, a diagnosztikai hatékonyságot javítják.”

A kontrasztanyagokat három nagy csoportba sorolhatjuk: röntgen-, ultrahang-, MR-kontrasztanyagok. Ezek a fizikai és kémiai tulajdonságaikban különböző anyagok, az alkalmazott képalkotó eljárás kívánalmainak felelnek meg, és elősegítik, fokozzák annak érzékenységét.

A nukleáris medicinában elterjedt pozitron emissziós tomográfia (PET), egyfoton-emissziós komputer tomográfia (SPECT) diagnosztikai eljárások hatékonyan egészítik ki az említett anatómiai vizsgálatokat. Ezen képalkotó eljárások a szervek, szövetek működését jelenítik meg, hatékonyan kiegészítve a morfológiai elváltozásokat megjelenítő eljárásokat, radiofarmakonok alkalmazásával.

A szöveti, szervi elváltozások hatékony és minél korábbi diagnosztizálása érdekében egyre elterjedtebbek a hibrid, más néven fúziós képalkotó módszerek is, pl. SPECT/CT, PET/CT, PET/MR, stb. Ezen hibrid képalkotó eljárások során, az anatómiai és funkcionális elváltozások kombinált diagnózisa elősegíti az esetleges elváltozások és rendellenességek minél korábbi és minél pontosabb felismerését.

MR-kontrasztanyagok

A diagnosztikai, képalkotó módszerek szerepének erősödésével egyre növekvő figyelem fordul az eljárások érzékenységének növelése felé, a minél hatékonyabb diagnosztika elérésére. A kontrasztanyagok fejlesztésének motiváló oka egyrészt azok mellékhatásainak csökkentése, másrészt azok finomítása, fejlesztése az elkészült kép érzékenységének növelése céljából.

A kontrasztanyagok fejlesztésének egyik fő irányvonalát alkotják a nanorendszerek, amelyek a méretükből adódó speciális tulajdonságaik révén hatékony kontrasztanyagok lehetnek.

Napjainkban a mágneses rezonancia képalkotás (MRI) az egyik legfontosabb diagnosztikai képalkotó módszer. Számos előnyös tulajdonsága közé tartozik, hogy egy nem invazív módszer, jó kontraszt és térbeli felbontású képet ad a lágyrészekről. Különös jelentőséggel bír többek között a neurológia, kardiovaszkuláris és onkológiai területeken.

Az MRI nagy felbontású, nagy érzékenységű anatómiai képet ad a vizsgált területről. Alkalmazásával a szöveti elváltozások, anatómiai rendellenességek jól detektálhatók a vizsgált területek proton denzitásának kimutatása alapján, amely a szürke skálán jelentős kontrasztot eredményez.

Az MRI felbontása és érzékenysége intravaszkuláris kontrasztanyagokkal növelhető. A legelterjedtebb MR-kontrasztanyagok a paramágneses és szuperparamágneses anyagok, melyek képesek megváltoztatni a homogén mágneses teret. Halmazódnak a különböző szövetekben, megváltoztatják azok relaxációs idejét és ezáltal szignálintenzitás-különbséget hoznak létre a vizsgált területen.

Bár a Gd(III)-ion szabad ionként erősen toxikus, komplexálva nem mérgező, éppen ezért mind a kis molekulatömegű, mind a makromolekulás hordozók fejlesztését intenzív kutatói érdeklődés övezi, elsősorban az MRI jelintenzitásának javítása céljából. Mindazonáltal a kis molekulatömegű Gd-kelátok komoly hiányosságai (mint pl. rövid tartózkodásuk a vérben, gyors kiürülésük a vérből) nem hagyhatók figyelmen kívül.

A hiányosságok elkerülése és javítása érdekében számos makromolekulás hordozó került előállításra a paramágneses Gd(III)-ionok szállítása céljából. Ideális esetben a polimer alapú MR-kontrasztanyagok hosszú ideig keringenek a véráramban, célzottan a vizsgált szövetekben halmozódnak fel, és erős kontrasztot eredményeznek az MR-képeken. Később ezen anyagok degradálódnak és a vesén keresztül kiürülnek a szervezetből.

Míg a Gd(III) tartalmú MR-kontrasztanyagok a T1 relaxációs időt csökkentik, addig a szuperparamágneses vas-oxid nanorészecskék (SPION) a T2 relaxációs időt rövidítik, és így T2 MR-kontrasztanyagként alkalmazhatók.

A SPION intenzíven kutatott terület az MR-kontraszt hatása és a fém-oxid jellege miatt egyaránt. A SPION tartalmú rendszerek alkalmasak számos orvostudományi felhasználási célra, mint pl. MR-kontrasztanyagok, mágneses hőkezelés (hipertermia), illetve célzott gyógyszerhatóanyag-szállítás.

Targetált MR-kontrasztanyagok

Az MR-kontrasztanyagra irányuló fejlesztések célul tűzték ki a hatékony, speciális tulajdonságokkal rendelkező rendszerek létrehozását. Továbbfejlesztésük több vonalon folyik: duális kontrasztanyagok előállítása, gyógyszerhatóanyagot is szállító kontrasztanyagok fejlesztése ún. „teragnosztika” céljára, illetve targetált kontrasztanyagok előállítása.

Az MR-képalkotásra fókuszálva ideális esetben a kontrasztanyagok specifikusak, a célzott tumorsejtekben halmozódnak fel, és MR-aktivitásuknak köszönhetően jól kivehető kontrasztot eredményeznek a vizsgált tumor és egészséges környezete között, lehetővé téve egy időben elhúzódó MR-vizsgálatot is.

A tumorspecifikusság elérése érdekében a kontrasztanyagokhoz célzóligandum kapcsolható, amely irányítja a kontrasztanyagot a célzott tumorsejtek adott receptoraihoz.

A tumorterápiában a folsav széles körben alkalmazott célzó molekula. Ezt alapul véve intenzív érdeklődés övezi a folsavval targetált MR-kontrasztanyagok fejlesztését. Irodalmában egyaránt találhatunk gadolinium tartalmú paramágneses, valamint SPION tartalmú szuperparamágneses kontrasztanyag fejlesztésére is példát.

Célkitűzések

A daganatos betegségek számának növekedésével egyre fontosabb szerep jut a korai diagnosztizálásnak, amely maga után vonja a képalkotó módszerek, ezen belül az MRI érzékenységének intenzív fejlesztését. Ennek egyik eszköze a tumorszövetre specifikus kontrasztanyagok alkalmazása.

Az értekezésben bemutatott kutatómunka fő célja olyan önrendeződésre képes, biodegradábilis, biopolimer alapú nanoeszközök előállítása és preklinikai tesztelése volt, amelyek képesek a hozzájuk kapcsolt célzómolekula révén a kiválasztott sejteket felismerni, és az általuk szállított kontrasztanyagot szelektíven ezen sejtekbe juttatni.

A kutatómunka során az alábbi konkrét célokat tűztük ki:

- paramágneses, illetve szuperparamágneses ligandumok biopolimerek önrendeződése révén létrejött targetált nanorészecskékhez történő kapcsolását, T1 és T2 MR-kontrasztanyagok előállítása céljából;
- az MR-kontrasztanyagok teljes körű fizikai-kémiai karakterizálásának elvégzését, a tulajdonságokat befolyásoló tényezők meghatározását, az összefüggések feltárását;
- az MR-kontrasztanyagok citotoxicitásának vizsgálatát és sejtspecifikusságának igazolását különböző, folát receptorokat overexpresszáló sejtvonalakon (MTT teszttel, konfokális mikroszkóppal, áramlási citométerrel, MR-méréssel);
- a kontrasztanyagok MR-hatékonyságának igazolását *in vivo* tumoros állatmodelleken: a vizsgálatokhoz optimális körülmények és MR-paraméterek, pulzusszekvenciák meghatározását, a tumorhalmozás körülményeinek feltárását, a szervezetszlás tanulmányozását;
- a T1 és T2 kontrasztanyagok relaxációs időkre gyakorolt hatásának tanulmányozását mind *in vitro*, mind *in vivo* körülmények között.

Anyagok és módszerek

Felhasznált anyagok

A kitozánt (CH) a Sigma-Aldrich Kft.-től (Budapest, Magyarország), a poli- γ -glutaminsavat (PGA) a Vedan (Taichung, Taiwan) cégtől vásároltuk. Felhasználás előtt mindkét biopolimert tisztítottuk és meghatároztuk a molekulatömegüket. A kitozán viszkozitás szerinti átlagos molekulatömege $M_v = 320$ kDa, a poli- γ -glutaminsav tömeg szerinti átlagos molekulatömege $M_w = 282$ kDa volt. Tisztítás után a biopolimerek toxicitását MTT teszttel vizsgáltuk.

Az anyagtudományi szintézisekhez, *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokhoz használt anyagokat a Sigma-Aldrich Kft.-től rendeltük, analitikai tisztaságban.

A folát receptor meghatározáshoz szükséges LK26 folát receptor ellenes elsődleges antitestet az Abcam-tól (Cambridge, UK), a Cellquant calibrator kiteket a Biocytex-től (Marseille, Franciaország) rendeltük.

A nanorendszerek *in vitro* vizuális megjelenítéséhez szükséges AlexaFluor fluoreszcens festékeket a Life Technologies Magyarország Kft.-től rendeltük.

Kísérleti módszerek

A *folsavas PGA (PGA-FA)* előállításához a PGA-t folsavval reagáltattuk vizes közegben, karbodiimides mechanizmussal. A PGA molekulákhoz kötődő FA molekulák számát UV-VIS spektrofotometriával becsültük meg a $\lambda_{\max 1} = 368$ nm és a $\lambda_{\max 2} = 283$ nm hullámhosszakhoz eső maximális adszorpciós értékek alapján.

A nanorészecskék vizuális megjelenítését lehetővé téve a *kitozánt Alexa Fluor 546-szukcinimidil-észter*, illetve *fluoreszcein-izotiocianát festékkel* reagáltattuk vizes közegben. A festett kitozán oldatot dialízissel tisztítottuk regenerált cellulóz dialízis zsákban desztillált vízzel szemben, a tisztaságát UV-VIS spektrofotométerrel ellenőriztük.

A *szuperparamágneses vas-oxid nanorészecskék (SPION) szintézisét* in situ végeztük folsavval módosított PGA jelenlétében: FeCl_3 oldatot kevertetés közben hozzácsepegtettük a PGA-FA oldathoz, és a reakcióelegy pH-ját ezután 7,0-ra emeltük inert atmoszféra mellett. Majd szilárd $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -ot adtunk a reakcióelegyhez, intenzív kevertetés mellett, nitrogén atmoszféra alatt. A szilárd vas-klorid bemérése után a reakcióelegy hőmérsékletét 80°C -ra emeltük, majd 5 perc múlva a reakcióelegy pH-ját ammóniaoldattal 10-re emeltük. A reakcióidő 1 óra volt.

Kitozán és a poli- γ -glutaminsav önrendeződését a PGA/PGA-FA és a CH oldatok összeöntésével valósítottuk meg. A biopolimerekből adott koncentrációjú vizes oldatokat

készítettünk, melyek pH-ját a kívánt értékre állítottuk be. A nanorészecskék előállítása az azonos koncentrációjú oldatok összeöntésével történt, szobahőmérsékleten, intenzív kevertetés mellett, a megjelölt arányok mellett.

A *részecske Gd-komplexének képzése* során önrendeződéssel előállítottuk a nanorészecskét, majd 5 perc reakcióidő után, intenzív kevertetés mellett csepegtettük hozzá a megadott térfogat résznyi $GdCl_3$ oldatot.

A *SPION tartalmú nanorészecske előállítása* során a SPION tartalmú PGA-FA és a CH biopolimerből adott koncentrációjú vizes oldatokat készítettünk, melyek pH-ját a kívánt értékre állítottuk be. A nanorészecskék előállítása az azonos koncentrációjú oldatok összeöntésével történt, szobahőmérsékleten, intenzív kevertetés mellett, a megjelölt arányok mellett.

Anyagtudományi vizsgáló módszerek

Nanorészecskék karakterizálása

A nanorészecskék fizikai-kémiai karakterizálása során vizsgáltuk azok hidrodinamikai méretét és méreteloszlását, valamint felületi töltöttségét duzzadt állapotban, tanulmányoztuk morfológiáját száraz állapotban, illetve meghatároztuk a nanorészecskéket tartalmazó oldatok transzmittanciáját.

A részecskék hidrodinamikai átmérőjét dinamikus fényszórással (DLS) határoztuk meg, egy 4mW-os hélium/neon lézerrel felszerelt Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Grovewood, Worcestershire, UK) készülékkel, 633 nm hullámhosszon, $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$ -on, 173° -os detektorszögénél.

A felületi töltöttséget, az elektroforetikus mozgékonytságot szintén Zetasizer Nano ZS készülékkel, automata módban mértük. A rendszerek előállításához nagy tisztaságú MILLIQ vizet használtunk.

A száradt, szilárd állapotú részecskék vizuális megjelenítéséhez, valamint azok méretének meghatározásához JEOL2000 FX-II transzmissziós elektronmikroszkópot, illetve Hitachi 3000N szkennig elektronmikroszkópot használtunk. A mintákat szénréteggel bevont G2400C típusú rézhálóra csepegtettük. A felvételek alatt készített elemanalízist elektronsugaras röntgenanalízissel végeztük, egy Si-Li (Lítiummal driftelt szilícium) detektorral felszerelt Oxford Link-Isis típusú energiadisperzív röntgenspektrométerrel. A felvételek alapján készült részecskeméret-eloszlásokat SPSS 11.0 programmal értékeltük ki. A nanorészecskék atomi erő mikroszkópos vizsgálatát (AFM) WITec alpha300 A/R

készüléken végeztük. A nanorészecskéket tartalmazó mintát 0,1 mg/ml-es koncentrációban üveglapra cseppentettük, majd vákuum alatt szárítottuk és a mintákat aranyréteggel vontuk be.

A részecskéket tartalmazó vizes kolloid rendszerek transzmittancia értékeit Hitachi U 1900 fotométerrel határoztuk meg $\lambda = 500$ nm hullámhosszon, optikailag homogén kvarcküvetében, szobahőmérsékleten.

A minták gadolínium koncentrációját Thermo Scientific XSeries I típusú induktív csatolású plazma tömegspektrométerrel (ICP-MS) határoztuk meg. A mintabeviteli rendszer Peltier hűtött (2 °C) ütközőgömbös kúp alakú ködkamrához csatolt Meinhard-típusú koncentrikus porlasztóból állt. Az elemzés az előkészített minták ötszörös hígításaiból, 0,5 M HNO₃-val történt roncsolás mellett, belső standard (100 ng/ml Rh) és ¹⁵⁷Gd izotóp alkalmazásával történt.

Mágneses rezonancia képalkotás (MRI)

Az MRI méréseket egy SIGNA LX 1,5 T típusú, alagút rendszerű 1,5 Teslás humán MRI berendezéssel készítettük. Az eredmények értékelését, LX ScanTools 2000 programmal végeztük. (DE, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Radiológiai Klinika)

A T1 súlyozott méréseknél a repetíciós idő (TR) 420,0 ms, az echó idő (TE) 20,0 ms, a szeletvastagság 1,5 mm és a szeletek közötti távolság 0 mm volt. A T2 súlyozott méréseknél a repetíciós idő (TR) 5520,0 ms, az echó idő (TE) 90,7 ms, a szeletvastagság 1,5 mm és a szeletek közötti távolság 0 mm volt.

Az MR-vizsgálatokat minden esetben úgy végeztük, hogy a képi megjelenítés során az alacsony szignálintenzitású részek sötét tónussal, a magas szignálintenzitásúak világos tónussal ábrázolódtak.

A T1 relaxációs idő meghatározásához inversion recovery spin echo módszert használtunk. A T2 relaxációs idő meghatározását az LX ScanTools 2000 programmal végeztük.

In vitro vizsgáló módszerek

Kísérletekhez alkalmazott sejtvonalak

Kísérleteinket A2780/AD2780 (humán petefészek karcinóma), HeLa (humán méhnyak karcinóma) és HeDe (epitheliális eredetű májkarcinóma) sejtvonalakon végeztük. Az A2780/AD sejteket Dr. T. C. Hamiltontól (Fox Chase Cancer Center), a HeLa sejteket Frank Röseltől (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Németország), míg a HeDe sejteket a Debreceni Egyetem Nukleáris Medicina Intézetéből, Dr. Trencsényi Györgytől kaptuk. A sejtek 5% CO₂ tartalmú nedves atmoszférában, 37 °C-on inkubálva, fenol vörös nélküli, 10%

magzati borjú szérumot tartalmazó RPMI 1640 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) tápoldatban növekedtek. A passzáláshoz a monolayerben növekvő sejteket standard PBS oldattal (Lonza) mostuk és tripszin-EDTA (0,05% tripszin-0,025% EDTA) oldattal kezeltük.

Folát receptorok meghatározása

A HeLa és A2780 humán tumorsejtek felszínén lévő folát receptorok számát Cellquant calibrator kit segítségével határoztuk meg, LK26 folát receptor ellenes elsődleges antitest és FITC-vel jelzett anti-egér IgG poliklonális antitest segítségével.

Kontrollként olyan HeLa és A2780 sejteket használtunk, melyek az elsődleges LK26 antitestet nem, csak a másodlagos FITC-vel jelzett anti-egér IgG poliklonális antitestet kapták. A vizsgálandó sejtek és a kalibrációként szolgáló gyöngyök fluoreszcencia intenzitását áramlási citométerrel (BD FACScan Bioanalyzer System, BD Bioscience, San Jose, CA, USA) vizsgáltuk.

MTT toxicitás vizsgálat

A nanorészecskék és kontrasztanyagok esetleges toxikus hatását a sejtek életképességének vizsgálatával MTT módszer segítségével határoztuk meg. A 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) sárga színű só, melyet az élő sejtek mitokondriális dehidrogenáz enzim segítségével formazán származékká alakítanak át. Mivel ezt az átalakítást csak az élő sejtek képesek megvalósítani, ezért a módszer alkalmas vegyületek toxikus hatásának megállapítására. A citosztázis mértékét %-ban ábrázoltuk a kontroll sejtekhez viszonyítva.

Konfokális mikroszkópos és áramlási citometriás vizsgálatok

A jelzett nanorészecskék sejtbe jutását konfokális mikroszkóppal és áramlási citometriával is vizsgáltuk. A sejtekről egy OLYMPUS Fluoview FV1000 fluoreszcens mikroszkóp UPLSAPO 60-szoros nagyítású (numerikus apertúra: 1,35) olajimmerziós objektívvel készítettünk felvételeket. Az Alexa488 fluoreszcens festéket az argon-ion lézer 488 nm-es vonalával gerjesztettük, az emisszióját pedig egy 506-530 nm-es sávszűrőn keresztül detektáltuk. Az Alexa546 festéket a He-Ne lézer 543 nm-es vonalával gerjesztettük, az emisszióját pedig egy 567-618 nm-es sávszűrőn keresztül detektáltuk.

A nanorészecskékkel kezelt, lecentrifugált sejtek fluoreszcencia intenzitását áramlási citométerrel (BD FACSArray BD Bioscience, San Jose, CA, USA) vizsgáltuk. Az Alexa 546 festéket a műszer 532 nm-es lézerével gerjesztettük, a kiértékelést a ReFlex nevű programmal végeztük.

In vivo vizsgáló módszerek

Kísérleti állatok

A kísérleteket 18-22 g-os 5-6 hetes nőstény athymicus nude egereken (Balb/c, Charles River), és 150-200 g-os beltenyésztett hím Fisher 344 patkányokon végeztük. A nude egereket az Országos "Frédéric Joliot-Curie" Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutató Intézetből, a Fisher 344 patkányokat a Debreceni Egyetem Nukleáris Medicina Intézetéből kaptuk. Az állatokat konvencionális laboratóriumi körülmények között 21-25 °C állandó hőmérséklet mellett olyan helyiségben tartották, ahol a 12 óránkénti sötét-világos ciklusok váltakozása biztosított volt. Az állatokat szisztematikus diétával (Charles River Kft., Gödöllő, Magyarország) etették és sterilizált vízzel ad libitum itatták. A kísérleteket a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottságának engedélyével végeztük.

In vivo toxicitás

A vizsgálat elvégzése során az egereket három csoportra osztottuk, úgy, hogy minden csoportban 4-4 egér volt. Az első csoport fiziológiás sóoldatot, a második csoport nem targetált nanorészecskét, a harmadik csoport pedig targetált nanorészecskét kapott egy héten keresztül mindennap. A fiziológiás sóoldat és a nanorészecskék injektálása után mértük az egerek testtömegét.

Mágneses rezonancia képalkotás in vivo

Patkány műtét

A műtéttel Fischer 344 patkányok baloldali vesetokja alá Gelaspon^R (Germed, Rudolstadt, Németország) korongon HeDe sejteket helyeztünk el, melyből a vizsgálathoz szükséges tumor fejlődött ki. Az MR-vizsgálatokat a tumorsejtek beültetése után 10 nappal végeztük, altatásban.

Egér tumor injektálás

Az *in vivo* tumor xenograft kísérleteinkben 0,1 ml térfogatban 4×10^6 db HeLa sejtet tartalmazó szuszpenziót injektáltunk szubkután a nude egerek mindkét combjába. Az injektáláshoz az egereket felületesen elaltattuk Ketamin-Xylazin keverékkel.

Az MR-vizsgálatot altatásban végeztük, a kontrasztanyag adagolását követő inkubációs idő leteltével.

Az állatokat csak egy vizsgálathoz használtuk fel, melynek végétével az állatok eutanáziája 150 mg/ttkg (test tömeg kilogramm) Na-barbiturát felhasználásával, vagy dietil-éter belélegeztetésével történt.

Statisztikai elemzés

A kísérleti adatok minimum három mérés átlag és szórás értékeit tartalmazzák. Az adatokat Student t próbával értékeltük. A szignifikancia szintnek a $p \leq 0,05$ értéket állítottuk be. Az eredményeket középérték \pm standard deviációban fejeztük ki.

Eredmények

Biopolimer alapú nanohordozó

Előtanulmányaink során vizsgáltuk a kitozán és poli- γ -glutamisav biopolimerek önrendeződési folyamatait. Az ellentétes töltésű funkciós csoportoknak köszönhetően ezen két biopolimer polielektrolit komplexek kialakulása révén olyan hidrofil (nano)rendszerek formálására alkalmasak, amelyeket a funkciós csoportok közötti ion-ion kölcsönhatás tart össze. Az ion-ion kölcsönhatás nagy előnye, hogy biopolimerek a kolloid rendszer kialakítása után is megtartják eredeti, kedvező biológiai tulajdonságaikat.

Tanulmányoztuk a két biopolimer önrendeződési folyamatait vizes közegben, pH = 3 mellett. Megállapítottuk, hogy az önrendeződés során keletkező individuális részecskék, illetve aggregátumok képződését pH = 3-on nagymértékben befolyásolja a biopolimerek koncentrációja és aránya, valamint az összeöntés sorrendje.

A biopolimerek koncentrációjának csökkentésével egyre kisebb és stabilabb részecskék keletkeztek, mely megállapítást részecskeméret és transzmittancia adatok is alátámasztották. Mindamellett megállapítottuk, hogy a kialakuló rendszerek stabilitásában pH = 3 -on a rosszabb oldhatóságú kitozán játszik döntő szerepet.

Az erősen savas közegben formált önrendeződő nanorendszerek felhasználása szempontjából tanulmányoztuk a részecskék stabilitását a vizes közeg pH-jának függvényében. Megállapítottuk, hogy a létrejött részecskék mérete növekedett, felületi töltöttsége csökkent, valamint a vizes közeg opálossága erősödött a közeg pH-jának növelésével, és a rossz oldhatóságú kitozának köszönhetően az önrendeződő részecskék 6-os pH felett kicsapódtak.

Az eredmények alapján nyilvánvalóvá vált, hogy a 3-as pH-n kialakított önrendeződő rendszerek érzékenyek a közeg pH-jának változtatására. Ennek megfelelően alkalmasak lehetnek számos savas vizes közegű felhasználásra, de közel semleges pH mellett kicsapódnak.

Kutatómunkánk következő lépéseként olyan önrendeződő nanorendszer előállítását valósítottuk meg, ami pH \approx 7,4-en stabil, s ezáltal *in vitro* kísérletekben, valamint *in vivo* intravénás alkalmazásra is megfelelő.

A polimerek pH-ját különböző értékekre állítottuk, és az összeöntés után ezt már nem változtattuk, ilyen módon sikerült izotóniás körülmények között stabil rendszert előállítanunk. A PGA oldat pH-ját 9-9,5-re, a kitozán oldat pH-ját 4,0-ra állítottuk. A nanorészecskék

formálását az eddig is használt összeöntési sorrendek, és polimer-arányok mellett tanulmányoztuk.

Megállapítottuk, hogy a keletkező részecskék stabilak, a nanorendszerek pH-ja 6,3 és 8,1 között változott az összeöntési arányoknak megfelelően.

A transzmittancia és hidrodinamikai méretek között egyértelműen megállapítható tendencia nem volt megfigyelhető. Szintén nem volt felállítható egyértelmű összefüggés a biopolimerek összeöntésének sorrendje, valamint a részecskeméret és transzmittancia értékek között sem.

Mindazonáltal megállapíthattuk, hogy a PGA és a CH 1:1 arányú összeöntése esetén keletkeztek a kisebb részecskék. Ez a biopolimerek molekulatömegének arányával, a biopolimerek nanorészecskén belüli orientációjával, valamint a kitozán poliszacharid voltával egyaránt összefüggésben lehet.

Az eredmények alapján a további vizsgálatainkhoz a kitozán és PGA 1:1 arányú összeöntésével formálódó nanorészecskék tanulmányozását helyeztük előtérbe.

Targetált nanorészecskék

Olyan, pH \approx 7,4-en stabil, célzó molekulával ellátott önrendeződő nanorendszert állítottunk elő, amely célzottan a tumorsejtekben halmozódik fel, s ezáltal potenciális tumorspecifikus nanohordozó.

A PGA biopolimerhez, annak karboxilcsoportjain keresztül folsav molekulákat kapcsoltunk, melyek célzó ligandumként szolgálnak folát receptorokat overexpresszáló tumorsejtekhez. Spektrofotometriásan meghatároztuk, hogy átlagosan 7 folsav molekula kapcsolódik egy PGA makromolekula-lánchoz.

A vizsgált önrendeződő részecskék átlagos mérete száraz állapotban 30 nm és 160 nm között volt, míg a hidrodinamikai méret 80 nm és 180 nm között változott, köszönhetően a nanorészecskék duzzadt állapotának vizes közegben. A nanorészecskék felületi töltése, ún. mobilitása $u = -2,09 \pm 0,07$ (m/s)/(V/cm) volt, amely az alkalmazott pH értékeken teljesen deprotonálódott COO⁻ és teljes mértékben protonálódott NH₄⁺ funkciós csoportok: -1:+0,67 arányának volt tulajdonítható.

A folát-targetált önrendeződő nanorészecskék hatékonyságát a nanorészecskék *in vitro* internalizációjának vizsgálatával teszteltük A2780/AD folát receptorokat overexpresszáló, petefészek tumorsejt-vonalon, konfokális mikroszkóppal.

Megállapítottuk, hogy a folsavval targetált nanorészecskék penetrálódtak a sejtmembránon 60 percen belül, és kitöltötték a citoplazma teljes térfogatát. Ezzel szemben

azon nanorészecskék, amelyek nem tartalmaztak célzó folsav molekulát, nem, illetve elhanyagolható mértékben voltak fellelhetők a citoplazmában.

Elvégeztük ezen FITC-vel jelölt nanorészecskék akkumulációjának kvantitatív meghatározását is, a vizsgált sejten belüli teljes fluoreszcencia intenzitás kiszámításával. Azt tapasztaltuk, hogy a folsavval rendelkező, targetált nanorészecskék gyorsabban és jelentős mértékben halmozódtak fel a célzott tumorsejtekben. Ezzel szemben a nem targetált nanorészecskék tumorsejten belüli akkumulációja elhanyagolható volt.

Ezek alapján megállapítottuk, hogy a folsav nanorészecskéhez történő hozzákapcsolásával elérhető, hogy a nanorendszer, mint nanohordozó hatékonyan akkumulálódjon folát receptorokat overexpresszáló tumorsejtekben.

A nanorendszer nem toxikus tulajdonságának alátámasztására *in vitro* citotoxicitás és *in vivo* toxicitás vizsgálatokat végeztünk. Az *in vitro* citotoxicitás tesztet A2780 sejtvonalon MTT teszttel, míg az *in vivo* toxicitás vizsgálatokat egészséges, immunhiányos nude egereken végeztük. Azt tapasztaltuk, hogy mind a folsavval targetált nanorészecske, mind a folsav nélküli, nem targetált nanorészecske nem volt kimutatható mértékben toxikus. A citotoxicitás teszten, a sejttúlélés során nem mutatkozott különbség a nanorészecskékkel kezelt és a kontroll sejtek között. Az *in vivo* toxicitás vizsgálat során, a nanorészecskék injektálását követően az állatok mért testtömegében sem tapasztaltunk csökkenést, valamint nem tapasztaltunk különbséget a targetált és nem targetált, valamint kontroll állatok értékei között sem. Ennek figyelembe vételével megállapíthattuk, hogy a biopolimerek önrendeződésével létrejövő nanorészecskék az általunk használt vizsgálati módszerek szerint nem voltak kimutatható mértékben toxikusak.

Az önrendeződő nanorészecskék Gd-komplexei

A nanohordozó, mint MR-kontrasztanyag továbbfejlesztése érdekében az önrendeződő nanorészecskéhez Gd(III)-ionokat komplexálunk, kialakítva ezáltal egy MRI T1 paramágneses, tumorspecifikus, nanoméretű kontrasztanyagot.

A Gd(III)-ionok hozzáadása után is minden esetben stabil rendszerek keletkeztek. Azt tapasztaltuk, hogy azok az önrendeződő nanorészecskék, amelyek PGA-CH 2:1 arányú összeöntésével formálódtak, a legkisebb hidrodinamikai méretű rendszert alkották, és a Gd(III)-ionok hozzáadásának méretet csökkentő hatása is ebben az esetben volt a legjelentősebb.

Tanulmányoztuk a PGA-CH 2:1 arányú nanorészecske hidrodinamikai méretének változását a hozzáadott Gd(III)-ionok mennyiségének függvényében. Azt tapasztaltuk, hogy a

részecskeméret a hozzáadott $GdCl_3$ mennyiségének növelésével csökkent, és 0,4 térfogatarányú hozzáadása esetén minimumot mutatott.

A mérési eredményeket összegezve arra a megállapításra jutottunk, hogy a további biológiai vizsgálatokhoz a PGA-CH 2:1+0,4Gd rendszert használjuk.

Paramágneses MR-kontrasztanyag

Tumorspecifikus, paramágneses MR-kontrasztanyagot állítottunk elő a PGA és a CH önrendeződésével: a PGA-hoz folsavat, mint célzó molekulát kapcsolunk kovalens kötéssel, majd az önrendeződés után Gd(III)-iont komplexáltunk a nanorészecskéhez. A nanorészecskéhez kapcsolt FA révén a tumorspecifikus célba juttatást kívántuk megvalósítani, míg a Gd(III)-ion, mint paramágneses, MRI T1 ligandum az MR-szignálintenzitást befolyásolta.

Tanulmányoztuk a PGA-FA-CH 2:1+0,4Gd önrendeződő nanorészecske méretét duzzadt és száraz állapotban. A nanorészecskék átlagos hidrodinamikai átmérője $d = 130 \pm 4$ nm volt, viszonylag szűk, 70 és 280 nm közötti méreteloszlással. SEM felvétel alapján a száraz nanorészecskék mérete 50 és 150 nm között változott. A nanorészecskék mobilitása $\mu = -3,8 \pm 0,3 \mu\text{m cm}/(\text{V s})$ volt, azaz a felületi töltés $\text{pH} \approx 7,4$ -en negatív. A kialakult nanorendszer stabil, enyhén opálos, a transzmittancia értéke 85%. A nanorészecskék, mint paramágneses MR-kontrasztanyag vizsgálatát fantom MR-vizsgálattal kezdtük. A T1-súlyozott MR-felvételek azt mutatták, hogy a desztillált víz fekete tónusával összehasonlítva, az eredeti, hígítatlan nanorészecske világos, és a szürke szín intenzitása a nanorészecske koncentrációjának függvényében változik a MR-felvételen. A vizuális megjelenítést alátámasztó mért értékek is azt mutatták, hogy a nanorészecske, és a benne lévő gadolínium koncentrációjának csökkenésével a szignálintenzitás értékek arányosan monoton csökkentek: a hígítatlan nanorészecske MR-képének szignálintenzitása 1783, a desztillált víz MR-képének szignálintenzitása 287 volt. A T1 relaxációs időértékek a vártnak megfelelően a gadolínium tartalmú nanorészecskék koncentrációjának növekedésével csökkentek. A desztillált víz relaxációs ideje T1-súlyozott módban 2980 ms, míg a T1 kontrasztanyag nanorészecske relaxációs ideje 244 ms volt.

A tumorspecifikus kontrasztanyag, valamint alkotórészeinek citotoxicitását MTT teszttel vizsgáltuk. A vizsgált sejtek esetén az áramlási citometriai eredmények azt mutatták, hogy a vizsgált HeLa sejtek felszínén átlagosan 1876 ± 13 folát receptor van, az A2780 sejteken 790 ± 9 .

A vizsgálat kimutatta, hogy a HeLa sejtek érzékenyebben reagáltak mind az alapanyagok, mind a nanorészecske jelenlétére. A sejttúlélés értékei a kontroll sejtek 100%-hoz viszonyítva 95% fölött voltak, a CH-AF kivételével, amely HeLa sejten szintén viszonylag magas, 88% sejttúlélési értéket adott. Mindazonáltal az általunk elvégzett MTT teszt alapján sem az alapanyagok, sem a nanorészecske nem voltak kimutatható mértékben toxikusak a vizsgált sejtvonalakon.

A citotoxicitás vizsgálatot sejtszámlálással egészítettük ki, amely megerősítette az MTT eredményeket.

A kutatómunka következő lépéseként bizonyítottuk az előállított paramágneses nanorészecskék tumorspecifikus internalizációját, konfokális mikroszkópos-, valamint áramlási citometriás vizsgálatokkal, folát receptorokat overexpresszáló sejtvonalakon.

A konfokális mikroszkópos felvételek igazolták, hogy a folsav célzó molekulával ellátott nanorészecskék kötődtek a sejtmembránhoz és internalizálódtak a tanulmányozott tumorsejtekben.

A hatékonyság tumorspecificitásának igazolására két kiegészítő vizsgálatot is végeztünk: (i) kezeltük a sejteket folsavat nem tartalmazó, azaz nem targetált nanorészecskével, valamint (ii) a sejtek targetált nanorészecskével való kezelése előtt azokat szabad folsavval előtelítettük. Mindkét kiegészítő vizsgálat során azt tapasztaltuk, hogy a nanorészecskék tumorsejtekben történő internalizációja minimális volt, sőt a sejtmembránon történő adszorpció is elhanyagolható.

Ezen internalizációs vizsgálatot áramlási citometriás eredményekkel is alátámasztottuk, mely vizsgálat során kizárólag az élő sejteket számoltuk, a mért fluoreszcencia intenzitás függvényében.

Mindkét tanulmányozott HeLa és HeDe sejt esetében magasabb fluoreszcencia intenzitást mértünk, a fluoreszcens skálán jelentős jeleltolódást tapasztalva a folsavat tartalmazó targetált nanorészecskével való kezelés után, mind a kontroll, mind a nem targetált részecskével való összehasonlításban.

A vizsgálatok következő lépéseként igazoltuk, hogy a részecske által szállított Gd(III)-ion is specifikusan a tumorsejtekben halmozódik. A HeLa és HeDe sejteket gadolínium tartalmú nanorészecskével kezeltük, majd a kezelt sejtszuspenziókat MR készülékben vizsgáltuk.

Az MR-felvételeken látható színbeli megjelenés, valamint a képek alapján mért szignálintenzitás értékek is azt bizonyították, hogy a folsav célzó molekulával ellátott nanorészecskék internalizálódtak és akkumulálódtak a célzott tumorsejtekben, szállítva a

paramágneses Gd(III)-ionokat, s ezáltal jelentős szignálintenzitás-változást okoztak és intenzíven fehér képi megjelenítést biztosítottak a T1 súlyozott MR-felvételeken. Mindazonáltal a folátmentes nanorészecskével kezelt sejtszuszpenzió nem mutatott jelentős különbséget a kontroll sejtekkel való összehasonlításban; ezzel alátámasztva a folsav, mint célzó molekula által megvalósuló tumorspecifikus internalizációt.

Az MR-képeken a célbajuttató folsav molekulát tartalmazó nanorészecskékkel kezelt HeLa sejtek szignálintenzitása 1351, HeDe sejtek esetén 869 volt. Amennyiben a sejteket nem targetált nanorészecskével kezeltük, az MR-képen a sejtszuszpenzió nem fehér, szürkés árnyalatú, a szignálintenzitása csupán rendre 523 és 511, hasonlóan a nanorészecskével nem kezelt kontroll sejtszuszpenziók 480 és 441 szignálintenzitás értékével.

A nanorészecskék *in vivo* teszteléséhez subcutan HeLa tumoros 5-6 hetes nőstény athymicus nude egereket, illetve Fischer patkány modelleket használtunk, melyek bal vesetokja alá HeDe sejteket ültettünk. A vizsgálatokat 10 nap tumornövekedés után végeztük el.

A folsavval targetált 2PGA-FA:1CH-Gd paramágneses kontrasztanyag nanorészecskék *in vivo* halmozódását i.v. adminisztrációt követő T1 súlyozott MR-felvételek készítésével tanulmányoztuk, az inkubációs idő letelte után. (A kontroll állatok 5% glükóz oldatot kaptak i.v.)

Az MR-felvételek alapján megállapítottuk, hogy jelentős tumor szignálintenzitás érték-növekedést tapasztaltunk a targetált nanorészecskével kezelt állatok esetében, összehasonlítva a kontroll állatokkal. A kontroll és a kezelt tumor szignálintenzitás értéke HeDe tumor esetén rendre $396,8 \pm 7,3$ és $595,2 \pm 3,4$ volt, HeLa tumor esetén pedig 218 ± 8 és 293 ± 14 a.u. volt.

Vizsgálataink során az MR-felvételeket PET-vizsgálatokkal egészítettük ki, ^{18}F -FDG radiofarmakon i.v. alkalmazását követően. Munkánk során MRI és PET képek fuzionálásával kombináltuk az anatómiát és a funkciót, és fúziós kép létrehozásával segítettük elő a korai tumordiagnosztikát és a pontos lokalizációt.

Szuperparamágneses MR-kontrasztanyag

SPION-t állítottunk elő *in situ* folsavas PGA jelenlétében (PFS), és ezen módosított biopolimer kitozánnal történő önrendeződésével állítottuk elő a szuperparamágneses T2 MR-kontrasztanyag nanorészecskéket.

Tanulmányoztuk a 2PFS:1CH és a 3PFS:1CH nanorészecskék hidrodinamikai méretét, méreteloszlását, felületi töltését és stabilitását. Azt tapasztaltuk, hogy a 2PFS:1CH nanorészecskék intenzitás szerinti átlag mérete $d = 110$ nm volt, szűk méreteloszlással, a

felületi töltésük pedig $u = -1,99$ (m/s)(V/cm); a 3PFS:1CH nanorészecskék intenzitás szerinti átlag mérete $d = 90$ nm, szűk méreteloszlással, a részecskék mobilitása $u = -2,07$ (m/s)(V/cm) volt. Megállapítottuk továbbá, hogy a részecskék stabilak, a méretüket több hétig megtartják.

A folsavval targetált szuperparamágneses nanorészecskék internalizációját HeLa sejteken teszteltük konfokális mikroszkóppal és áramlási citométerrel. A konfokális mikroszkópos felvételek egyértelműen igazolták, hogy a folsavval targetált önrendeződő szuperparamágneses nanorészecskék akkumulálódtak a célzott HeLa tumorsejtekben. Ezen eredményeket az áramlási citometriás vizsgálat eredménye is alátámasztotta. Jelentős fluoreszcencia intenzitás-növekedést tapasztaltunk a folsavval targetált nanorészecskékkel kezelt sejtek esetében, a kontroll sejtekkel történő összehasonlítás során. Viszont a kétféle szuperparamágneses részecske fluoreszcencia intenzitást növelő hatásában nem volt jelentős különbség, ami a kétféle nanorészecske hasonló mértékű internalizációjára utalt. A 2PFS:1CH-AF részecskékkel kezelt HeLa sejtek FI értéke 47-szer, a 3PFS:1CH-AF részecskékkel kezelték FI értéke 44-szer nagyobb volt a kontroll HeLa sejtekhez viszonyítva.

A SPION-t szállító önrendeződő nanorészecskék T2 relaxációs időt csökkentő tulajdonságának bizonyítására fantom MR-vizsgálatot végeztünk. Megállapítottuk, hogy mindkét szuperparamágneses nanorészecske jelentős mértékben csökkentette a T2 relaxációs időt, T2 MR-kontraszthatást váltott ki, amely a képi megjelenés során egyre sötétebb tónussal ábrázolódott. A két nanorészecske relaxációs időt csökkentő, szuperparamágneses hatása közötti különbség nem volt jelentős: a 3PFS:1CH nanorészecskében lévő több SPION hatása nem volt szignifikánsan erősebb.

A nanorészecskék szuperparamágneses, T2 relaxációs időt csökkentő tulajdonságát *in vitro* internalizációt követő MR-vizsgálatokkal is bizonyítottuk. A HeLa sejtszuszpenziókról készült T2 súlyozott MR-felvételeken a kezelt sejtszuszpenziók sötét tónussal jelentek meg, szemben a kontroll sejtek világosszürke színével, s ezáltal vizuálisan igazolták az előállított nanorészecskék tumorspecifikus szuperparamágneses kontrasztanyagként történő hatékony alkalmazhatóságát. A 2PFS:1CH és a 3PFS:1CH nanorészecskékkel kezelt sejtszuszpenziók T2 relaxációs ideje 424 ms és 388 ms, míg a kezeletlen kontroll sejteké 923 ms volt.

A szuperparamágneses nanorészecskék *in vivo* tesztelését HeLa tumoros 5-6 hetes nőstény athymicus nude egereken végeztük és kontrollként HeLa tumoros, nanorészecskével nem kezelt egereket használtunk.

Az akkumulálódott kontrasztanyag nanorészecskék jelentősen csökkentették a tumorszövet relaxációs idejét és ezáltal szignálintenzitását, mely a T2 súlyozott MR-képen egyértelműen látható: a kezelt állat tumora jelentősen sötétebb tónussal ábrázolódott a

kontroll állat tumorához képest. A kontroll állat tumorának szignálintenzitás értéke 793 ± 19 au. és relaxációs ideje 1018 ± 23 ms volt, a kezelt állat tumorának szignálintenzitása 582 ± 13 au. és relaxációs ideje 602 ± 15 ms volt.

Megbeszélés

Kutatómunkámat olyan interdiszciplináris tudományterületen végeztem, ahol ötvöződnek a napjainkban intenzíven fejlődő nanotechnológia és képalkotó diagnosztika eljárásai, a biopolimerek orvosi biológiai alkalmazásának, az MR-kontrasztanyagok fejlesztésének, valamint a nanotechnológiai kutatásoknak az előterében áll.

A nanohordozó

Napjainkban növekvő érdeklődés övezi a biokompatibilis, biodegradálható makromolekulákból felépülő nanorendszerek egyre szélesebb körű alkalmazási lehetőségeit. A szakirodalomban egyre növekvő számban jelennek meg az orvosi biológiai és gyógyszer-tudományi felhasználás céljára fejlesztett olyan biopolimer alapú nanorendszerek, amelyek biokompatibilisek, biodegradálhatóak és alkalmasak valamely speciális felhasználásra.

A kutatómunka során a választásunk a kitozán és a poli-gamma-glutaminsav biopolimerekre esett, melyek biológiai szempontból számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek: biokompatibilisek, biodegradálhatóak, nem toxikusak.

A CH és a PGA biopolimerek funkcionális csoportjaik révén vizes közegben polielektrolitként viselkednek és kovalens kötés kialakítása nélkül, önálló részecskéket, ún. polielektrolit komplexeket képesek formálni ion-ion kölcsönhatáson alapuló önrendeződéssel. A kovalens kötés hiányából adódóan a polielektrolit komplexek új távlatokat nyitottak meg a részecskék formálása, illetve ezen részecskékkel történő hatóanyagok szállítása területén.

A szakirodalomban számos önrendeződő CH/PGA nanorészecske előállítását és vizsgálatát írták le, melyeket elsődlegesen hatóanyagok megkötésére és szállítására fejlesztettek ki, targetálás megvalósítása nélkül.

Kutatómunkánk megalapozásaként mi a CH és a PGA önrendeződésével kialakítható polielektrolit nanohordozó, mint alrendszer tulajdonságait tanulmányoztuk, hatóanyag hozzáadás nélkül, valamint igyekeztünk feltárni a nanorendszer kialakulását befolyásoló tényezőket. Azt tapasztaltuk, hogy a CH és a PGA biopolimerek vizes oldatainak összeöntése során, pH = 3-on, nanorészecskéket tartalmazó opálos rendszerek keletkeznek. Megállapítottuk, hogy ilyen savas körülmények között is stabil, önrendeződő nanorészecskék állíthatók elő. A nanorészecskék méretét befolyásolni tudtuk elsősorban a biopolimerek koncentrációjával és arányával. Mindazonáltal kimutattuk, hogy a 3-as pH-n kialakított önrendeződő rendszerek érzékenyek a közeg pH-jának változtatására, annak növelésével a részecskék mérete növekedett, majd a rendszer 6-os pH felett kicsapódott.

A nanorészecskék stabilitása a pH függvényében, illetve a felhasználási célnak megfelelő pH-n elvárt stabilitás fontos tényezők a nanorendszerek tervezése során. Az i.v. injektálással alkalmazható polielektrolit komplex nanorészecskék pH-stabilitásáról pH = 6,0-7,4 között számol be a szakirodalom, de hatóanyagok orális bevitele esetén a savas közegű stabilitás az elvárt. Ennek megfelelően kutatómunkánk következő lépéseként olyan nanorendszert kívántunk előállítani a CH és a PGA önrendeződésével, amely pH \approx 7,4-en stabil, mert a továbbiakban azokat *in vitro* kísérletekben, valamint *in vivo* intravénás alkalmazás során kívántuk tesztelni.

A probléma megoldására a kiindulási paramétereket úgy kellett megváltoztatni, hogy a biopolimerek önrendeződése megtörténjen, közel semleges pH-n stabil nanorészecskék keletkezését eredményezve. Ennek megfelelően a PGA oldat pH-ját 9-9,5-re, a CH oldat pH-ját 4,0-ra állítottuk. Tanulmányoztuk a nanorészecskék formálását az összeöntési sorrendek, és biopolimer-arányok változtatása mellett.

A PGA és a CH különböző pH-n történő összeöntése során megállapítottuk, hogy nanorészecskéket tartalmazó, opálos vizes rendszerek keletkeztek, de a transzmittancia értékek és a hidrodinamikai méretek tanulmányozása során nem tudtunk egyértelmű összefüggéseket feltárni a kiindulási paraméterek és a keletkező nanorészecskék tulajdonságai között.

Az előállított nanorészecskéket úgy kívántuk tovább fejleszteni, hogy azok *in vitro* és *in vivo* körülmények között a célzottan a tumorsejtekben halmozódjanak fel, s ezáltal potenciális nanohordozóvá válhatnak hatóanyagok tumorspecifikus szállítására.

A szakirodalomban elérhető számos célzó molekula közül a mi választásunk a folsav volt, amely reaktív funkciós csoportokkal rendelkező kis molekula; elismert targetáló ligandum, amely képes a nanorészecskét a folát receptorokat overexpresszáló tumorsejtekhez irányítani, lehetővé téve ezáltal a tumorspecifikus célba juttatást.

Jelentős kutatói potenciál foglalkozik a folsavval targetált nanorendszerek fejlesztésével, melyek között megtalálhatók a biopolimer alapú nanorendszerek, de a folsavval targetált polielektrolit komplexek irodalma még nem jelentős. A CH és a PGA önrendeződésével létrejövő, folsavval targetált polielektrolit komplex nanorészecskék újdonságot jelentenek a szakirodalomban.

Ezen kutatói vonalon haladva, kutatómunkánk során a célzó folsav molekulát a PGA biopolimerhez kovalens kötéssel kapcsolunk, majd ezen folsavazott PGA és a CH önrendeződésével állítottuk elő a targetált nanorészecskéket.

Sikerült folsavval targetált, negatív felületi töltésű, 80-180 nm méretű részecskéket előállítani a két biopolimer önrendeződésével. A folsavval történő targetálás hatékonyságát A2780 folát receptorokat overexpresszáló tumorsejteken teszteltük. Konfokális mikroszkópos felvételekkel igazoltuk, hogy a folát-targetált nanorészecskék már 60 perc eltelte után kitöltötték a citoplazma teljes térfogatát; szemben a folsavat nem tartalmazó kontroll részecskékkel, amelyek internalizációja elhanyagolható volt.

A biztonságos alkalmazhatósághoz elengedhetetlenül szükséges *in vitro* citotoxicitás és *in vivo* toxicitás vizsgálatokkal támasztottuk alá a nanorendszer nem toxikus tulajdonságát.

Igazolást nyert, hogy sikerült folsavval targetált, negatív felületi töltésű, önrendeződő nanorészecskéket előállítani, és bizonyítani, hogy ezen nanorészecskék nem rendelkeznek kimutatható mértékű toxicitással, és képesek a tumorspecifikus internalizációra, ezáltal alkalmasak lehet, mint targetált nanohordozó számos hatóanyag szállítására.

Paramágneses MR-kontrasztanyag

Kutatómunkám célja az volt, hogy az önrendeződő, targetált nanorészecskékből MR-kontrasztanyagokat állítsak elő. Ennek megvalósításához az előállított és tanulmányozott nanohordozóhoz Gd(III)-ionokat komplexáltunk, kialakítva ezáltal egy MRI T1 paramágneses, tumorspecifikus, nanoméretű kontrasztanyagot. Koncepciónk szerint a PGA karboxilcsoportjai révén képes pozitív ionok megkötésére és ezáltal szállítására. A paramágneses MR-kontrasztanyag kialakításához az önrendeződött nanorészecskéhez utólag adtuk a $GdCl_3$ oldatot, így a Gd(III)-ion a kész részecskében lévő szabad karboxilcsoportokhoz tudott kapcsolódni.

A paramágneses fémion pontos kötődési helyét a nanorészecskéken nem vizsgáltuk külön. A nanorészecskék előállítása, anyagösszetétele alapján tudható volt, hogy azok nagyszámú amino- és karboxilcsoportokat tartalmaznak, így korábbi leírások alapján kijelenthető volt, hogy fémion a glutamát-peptid karboxilcsoportjain keresztül kötődik a nanorészecskéhez. Ennek megfelelően a paramágneses, Gd(III)-ionokat tartalmazó nanorészecskék között azok vizsgálatát helyeztük előtérbe, amelyekben a PGA részaránya nagyobb volt a CH részarányánál. Ezen részecskék esetén a PGA szabad karboxilcsoportjai képesek voltak stabilan megkötni és szállítani a paramágneses ionokat.

Tanulmányoztuk a PGA részarány növelésének és a Gd(III)-ionok mennyiségének hatását a keletkező kontrasztanyag nanorészecskék méretére. Mindkét esetben minimumot adó összefüggésgörbét tapasztaltuk, melyek összevetéséből a 2PGA:1CH+0,4Gd összetételű részecske mutatta az optimális tulajdonságokat.

A Gd(III)-ion paramágneses tulajdonságú, csökkenti a T1 relaxációs időt, ezáltal MR-kontrasztanyagként alkalmazható. Mindazonáltal a Gd(III)-ion szabad ionként erősen toxikus, ezért szükséges komplexált formában történő használata. Jelenleg a gyakorlatban számos kismolekulás Gd(III)-komplexet alkalmaznak, melyekben a Gd(III)-ionokat komplexképzőkkel kötik meg. Ezen kis molekulatömegű Gd-kelátok komoly hiányosságai nem hagyhatók figyelmen kívül. A hiányosságok elkerülése és javítása érdekében számos kis molekulatömegű, és makromolekulás hordozó fejlesztését övezi intenzív kutatói érdeklődés, elsősorban az MRI jelintenzitásának javítása céljából.

A makromolekulás MR-kontrasztanyagok fejlesztésén belül beszámol a szakirodalom polielektrolit komplexeken alapuló paramágneses MR-kontrasztanyagokról, de előállított kontrasztanyagok targetálása, tumorspecifikus halmozódásának elősegítése még nem elterjedt. Biopolimer alapú, önrendeződő polielektrolit komplexekkel történő targetált Gd(III)-ion szállításról nem számol be a szakirodalom. Ezen kutatási irányvonal előmozdítására tumorspecifikus, paramágneses MR-kontrasztanyagot állítottunk elő a PGA és a CH önrendeződésével. A megvalósításhoz a PGA-hoz folsavat, mint célzó molekulát kapcsoltunk kovalens kötéssel, majd az önrendeződés után Gd(III)-iont komplexáltunk a nanorészecskéhez. A folsav révén a tumorspecifikus célbajuttatást kívántuk megvalósítani, míg a Gd(III)-ion mint paramágneses MRI T1 ligandum az MR-szignált befolyásolja.

Sikerült 130 ± 4 nm átlagos hidrodinamikai mérettel, negatív felületi töltéssel, és $c = 0,3$ mg/ml biopolimer koncentráció mellett 85% transzmittanciával rendelkező, Gd(III)-ionokat tartalmazó nanorészecskéket előállítani.

Igazoltuk az előállított kontrasztanyag nanorészecske paramágneses tulajdonságát, Gd(III)-ion tartalmát, nem toxikus tulajdonságát, valamint tumorspecifikus halmozódását a célzott sejtekben. Az eredmények alapján elmondható volt, hogy a T1 MR-kontrasztanyag nanorészecske alkalmas lehet paramágneses kontrasztanyagként történő alkalmazásra.

A paramágneses nanorészecskéről, valamint annak alkotó elemeiről MTT teszttel igazoltuk, hogy nem rendelkeznek kimutatható mértékű toxicitással, így alkalmasak további *in vitro* és *in vivo* hatékonysági vizsgálatok elvégzésére.

A specifikus internalizációt konfokális mikroszkópos, valamint áramlási citometriás vizsgálatokkal támasztottuk alá. Az eredmények megfeleltek elvárásainknak: a folsav, mint célzó molekula alkalmas és képes a nanorészecskék célbajuttatására és a folát-targetált nanorészecske szelektíven a folát receptorokat overexpresszáló tumorsejtekben halmozódik fel.

A vizsgálatok következő lépéseként igazoltuk, hogy a részecske alkalmas a Gd(III)-ionok szállítására, és specifikusan eljuttatja azokat is a tumorsejtekbe. Ezen vizsgálat szükségességét az is indokolta, hogy az általunk előállított nanorészecskékhez direkt módon adtuk

a Gd(III)-ionokat, a PGA karboxilcsoportjaihoz komplexálva, külön komplexképző alkalmazása nélkül. A szakirodalomban fellelhető makromolekulás paramágneses MR-kontrasztanyagok többsége DOTA vagy DTPA komplexképzőt használ a Gd(III)-ionok megkötésére.

A Gd(III)-ionok stabil, komplexált szállításának *in vitro* igazolására a HeLa és HeDe sejteket gadolínium tartalmú nanorészecskével kezeltük, majd a kezelt sejtszuszpenziókat MR készülékben vizsgáltuk. A T1 súlyozott felvételek bizonyították, hogy a folsavval targetált, paramágneses ligandumot szállító nanorészecskék specifikusan a célzott tumorsejtekben halmozódtak, és a szállított Gd(III)-ionoknak köszönhetően jelentősen megváltoztatták azok szignálintenzitását, és ennek megfelelően paramágneses kontrasztanyagként alkalmazhatók.

Ennek igazolására a paramágneses kontrasztanyag nanorészecskét *in vivo* teszteltük HeDe tumoros patkány, és humán HeLa tumoros egér modelleken. Mindkét esetben megállapítottuk, hogy a T1 súlyozott MR-felvételek jelentős tumorhalmozást mutattak. A vizsgálatokat a jelen gyakorlattól eltérő, hosszabb inkubációs idővel (2 h, 24 h) végeztük annak igazolására, hogy a nanorendszer alapú MR-kontrasztanyag hosszabb ideig fellelhető a szervezetben, tumorhalmozása időben elnyújtott.

A paramágneses targetált kontrasztanyag nanorészecske tanulmányozása során kapott eredményeket összegezve megállapítottuk, hogy sikerült olyan tumorspecifikus, stabil önrendeződő nanorendszert előállítani a CH és a PGA biopolimerekből, amely optimális fizikai-kémiai paraméterekkel rendelkezik, nem kimutathatóan toxikus, és specifikusan internalizálódik a célzott tumorsejtekben *in vitro* és *in vivo*, és az általa szállított paramágneses ligandum révén jelentős szignálintenzitás változást eredményez a T1 súlyozott MR-felvételeken, megkönnyítve a tumordiagnosztikát.

Szuperparamágneses MR-kontrasztanyag

Kutatómunkánk során a PGA és a CH önrendeződésével olyan nanorészecskét állítottunk elő, amely potenciális nanohordozó, és továbbfejlesztésével tumorspecifikus paramágneses MR T1 kontrasztanyaggá alakítható. Kutatásaink során vizsgálni kívántuk annak lehetőségeit is, hogyan fejleszthető ezen polielektrolit komplex nanohordozóból tumorspecifikus MR T2 kontrasztanyag. Ennek megvalósításához tanulmányoztuk a SPION

tartalmú, PGA és CH önrendeződésével létrejövő, folsavval targetált nanorészecskék szuperparamágneses kontrasztanyagként történő alkalmazásának lehetőségeit.

A SPION a gyakorlatban is elismert, T2 relaxációs időt befolyásoló MR-kontrasztanyag. Az alkalmazásához viszont szükséges a néhány nm-es vas-oxid részecskék stabilizálása, melyet gyakran végeznek biopolimerekkel. Kutatásaink során a SPION-t *in situ* állítottuk elő folsavazott PGA jelenlétében, és az így létrejött rendszer CH-nal történő reakciójával alakítottuk ki a nanorészecskét, mint T2 MR-kontrasztanyagot. A SPION folsavval történő targetálásáról, és annak KB sejteken történő vizsgálatáról már beszámol a szakirodalom, de ezen rendszerekben folsavval targetált lipofil SPION-ról, illetve poliakrilsavval stabilizált SPION-hoz PEG-linkeren keresztül kapcsolt folsavval targetált SPION-ról olvashatunk. A SPION polielektrolit komplexekkel történő burkolására, illetve abban történő elosztatására, valamint azok folsavval történő targetálására nem találtunk példát a szakirodalomban.

Kutatómunkánk ezen fejezetében olyan folsavval targetált nanorészecskéket állítottunk elő a folsavazott PGA-val burkolt SPION és a CH önrendeződésével, amelyet T2 MR-kontrasztanyagként kívántuk tanulmányozni és alkalmazni.

Az általunk előállított paramágneses kontrasztanyag vizsgálata során korábban bizonyítást nyert, hogy a folsav képes targetálni az önrendeződő nanorészecskét, de a szuperparamágneses nanorészecskék esetében ennek igazolása újból szükségessé vált, mivel a SPION szintetizálása PGA-FA jelenlétében, magas hőmérsékleten történt.

A konfokális mikroszkópos felvételek és az áramlási citometriás eredmények egyértelműen igazolták, hogy a folsavval targetált önrendeződő szuperparamágneses nanorészecskék akkumulálódtak a célzott folát receptorokat overexpresszáló HeLa tumorsejtekben.

A szuperparamágneses hatás igazolására fantom és *in vitro* MR-felvételeket készítettünk. A fantom MR-vizsgálat alapján megállapítottuk, hogy a szuperparamágneses nanorészecskék jelentős mértékben csökkentették a T2 relaxációs időt, T2 MR-kontraszthatást váltottak ki. Az *in vitro* T2 MR-vizsgálat során targetált szuperparamágneses nanorészecskékkel kezelt HeLa sejteket vizsgáltunk és hasonlítottunk össze kezeletlen sejtekkel. A sejtszuspenziók T2 relaxációs idői azt mutatták, hogy a nanorészecskék internalizálódtak a sejtekbe, odaszállították a SPION-t, és ezáltal jelentős relaxációs idő csökkenést idéztek elő a kontroll sejtekhez viszonyítva.

Az *in vitro* vizsgálatok után *in vivo* is bizonyítottuk az előállított szuperparamágneses nanorészecskék tumorspecifitását. HeLa tumoros nude egereken teszteltük a kontrasztanyag

relaxációs idő és szignálintenzitás-csökkentő hatását. A vizsgálat eredménye egyértelműen alátámasztotta, hogy a folsavval mint célzó molekulával ellátott kontrasztanyag nanorészecskék halmozódtak a folát receptorokat overexpresszáló HeLa tumorsejtekben, a SPION tartalomnak köszönhetően jelentősen csökkentették a tumorszövet relaxációs idejét és ezáltal szignálintenzitását, mely a T2 súlyozott MR-képen egyértelműen látható.

Új tudományos eredmények

- Poli-gamma-glutaminsav és kitozán önrendeződésével olyan targetált nanohordozót állítottunk elő, amely $\text{pH} \approx 7,4$ –en stabil.
- Kimutattuk, hogy a biopolimer alapú önrendeződő nanorészecskék alkalmasak paramágneses, illetve szuperparamágneses ligandumok célzott szállítására.
- Megállapítottuk, hogy a paramágneses kontrasztanyag nanorészecskék fizikai-kémiai tulajdonságai nagymértékben befolyásolhatók a biopolimerek arányával, az összeöntés sorrendjével, a szállított paramágneses ligandum mennyiségével, valamint a közeg pH-jával.
- MR-vizsgálatokkal támasztottuk alá, hogy a paramágneses, illetve szuperparamágneses kontrasztanyag nanorészecskék hatékonyan csökkentik a relaxációs időt, és ezáltal MR-kontrasztanyagként alkalmazhatók.
- Megállapítottuk, hogy a targetált paramágneses, illetve szuperparamágneses kontrasztanyag nanorészecskék hatékonyan internalizálódnak a célzott tumorsejtekbe *in vitro* körülmények között.
- Állati és humán tumoros állatmodelleken igazoltuk a targetált kontrasztanyag nanorészecskék hatékony tumorbeli halmozódását *in vivo*.
- Megállapítottuk, hogy a paramágneses, illetve szuperparamágneses nanorészecskék alkalmasak lehetnek targetált MR-kontrasztanyagként történő felhasználásra.

Összefoglalás

Kutatómunkám során a kitozán és a poli-gamma-glutaminsav önrendeződésével olyan stabilis nanohordozót állítottunk elő, amely 100-120 nm hidrodinamikai méretű, felületi töltése negatív, valamint képes paramágneses Gd(III)-ionok, illetve szuperparamágneses SPION részecskék szállítására. A nanohordozót alkotó biopolimerek funkciós csoportjai révén sikerült folsavat, mint célbajuttató molekulát kapcsolni a nanohordozóhoz, megvalósítva ezáltal a targetált kontrasztanyag nanorészecskék előállítását.

Elvégeztük a paramágneses MR-kontrasztanyag nanorészecskék teljes körű fizikai-kémiai vizsgálatát, és feltártuk a nanorészecskék tulajdonságait befolyásoló tényezőket. Kimutattuk, hogy a biopolimerek koncentrációja, összeöntésének sorrendje és aránya, valamint a közeg pH-ja hogyan befolyásolja a nanohordozó tulajdonságait. Összefüggést állítottunk fel a szállított Gd(III)-ionok mennyisége és a nanohordozó részecskék mérete között. MR-mérésekkel igazoltuk a paramágneses-, illetve szuperparamágneses nanorészecskék szignálintenzitást és relaxációs időt befolyásoló hatását.

Konfokális mikroszkópos, áramlási citometriás, valamint *in vitro* MR-vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a folsavval targetált paramágneses, illetve szuperparamágneses nanorészecskék specifikusan halmozódnak a tanulmányozott folát receptorokat overexpresszáló tumorsejtekben, szállítják az MR-aktív ligandumokat (Gd(III)-ionokat, ill. SPION-t), és ezáltal jelentős kontrasztot idéznek elő az MR-felvételeken.

HeDe tumoros Fischer 344 patkány, valamint HeLa tumoros nude egér modelleken teszteltük a paramágneses folát-targetált nanorészecskék halmozódását *in vivo*. MR-felvételekkel igazoltuk, hogy az előállított nanorészecskék hatékony paramágneses kontrasztanyagként viselkedtek, mindkét tanulmányozott állat- és tumormodell esetén. A nanorészecskék specifikusan halmozódtak a vizsgált tumorban, és jelentős kontrasztot hoztak létre a kontroll állatokkal történt összehasonlítás során.

A SPION tartalmú folát-targetált nanorészecske mint T2 MR-kontrasztanyag hatását *in vivo* HeLa tumoros nőstény athymicus nude egereken teszteltük. A T2 súlyozott MR-felvételek alapján megállapítottuk, hogy a folát-targetált kontrasztanyag nanorészecskék akkumulálódtak a tumorban, és jelentősen csökkentették a tumorszövet relaxációs idejét.

Összegezve, sikerült olyan biopolimer alapú, tumorspecifikus paramágneses, illetve szuperparamágneses nanorészecske MR-kontrasztanyagokat előállítani, amelyek alkalmazásával nagyban elősegíthető a korai tumordiagnosztika.

Közlemények



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK/33/2014.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

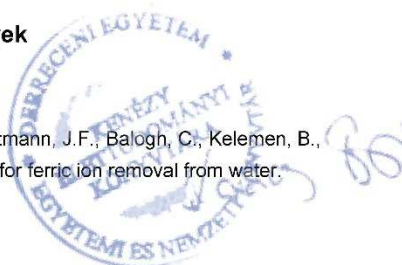
Jelölt: Hajdu István
Neptun kód: FWTI7S
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
Mtmazonosító: 10035948

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Hajdu, I.**, Trencsényi, G., Bodnár, M., Emri, M., Bánfalvi, G., Sikula, J., Márián, T., Kollár, J., Vámosi, G., Borbély, J.: Tumor-specific localization of self-assembled nanoparticle PET/MR modalities. *Anticancer Res.* 34 (1), 49-59, 2014.
IF:1.713 (2012)
2. **Hajdu, I.**, Bodnár, M., Trencsényi, G., Márián, T., Vámosi, G., Kollár, J., Borbély, J.: Cancer cell targeting and imaging with biopolymer-based nanodevices. *Int. J. Pharm.* 441 (1-2), 234-241, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.11.038>
IF:3.458 (2012)
3. Keresztessy, Z., Bodnár, M., Ber, E., **Hajdu, I.**, Zhang, M., Hartmann, J.F., Minkó, T., Borbély, J.: Self-assembling chitosan/poly- γ -glutamic acid nanoparticles for targeted drug delivery. *Colloid Polym. Sci.* 287 (7), 759-765, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00396-009-2022-3>
IF:2.057

További Közlemények

4. Bodnár, M., **Hajdu, I.**, Róthi, E., Harmati, N., Csikós, Z., Hartmann, J.F., Balogh, C., Kelemen, B., Tamás, J., Borbély, J.: Biopolymer-based nanosystem for ferric ion removal from water. *Sep. Purif. Technol.* 112, 26-33, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2013.03.043>
IF:2.894 (2012)



5. Polyák, A., **Hajdu, I.**, Bodnár, M., Trencsényi, G., Pöstényi, Z., Haász, V., Jánoki, G., Jánoki, G.A., Balogh, L., Borbély, J.: (99m)Tc-labelled nanosystem as tumour imaging agent for SPECT and SPECT/CT modalities.
Int. J. Pharm. 449 (1-2), 10-17, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.03.049>
IF:3.458 (2012)
6. **Hajdu, I.**, Bodnár, M., Csikós, Z., Wei, S., Daróczy, L., Kovács, B., Győri, Z., Tamás, J., Borbély, J.: Combined nano-membrane technology for removal of lead ions.
J. Membr. Sci. 409-410, 44-53, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2012.03.011>
IF:4.093
7. Kollár J., **Hajdu I.**, Sikula J., Vámosi G., Trencsényi G., Márián T., Emri M., Bodnár M., Borbély J.: Nanorendszerek, mint tumorspecifikus MR kontrasztanyagok (experimentális vizsgálatok).
IME Képz. Diagn. Különsz. 10 (Különsz. 6), 19-21, 2011.
8. Bodnár, M., **Hajdu, I.**, Filipcsei, G., Daróczy, L., Hartmann, J.F., Borbély, J.: Nanoparticles Prepared by Self-assembly of Chitosan and Poly- γ -glutamic Acid.
In: NSTI Nanotech : Technical Proceedings Vol. 2. Ed.: NanoScience & Technology Inst, CRC Press, [S. l.], 143-146, 2007.
9. **Hajdu, I.**, Bodnár, M., Filipcsei, G., Hartmann, J.F., Daróczy, L., Zrínyi, M., Borbély, J.: Nanoparticles prepared by self-assembly of Chitosan and poly- γ -glutamic acid.
Colloid Polym. Sci. 286 (3), 343-350, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00396-007-1785-7>
IF:1.62

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 19.293

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 7.228

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.02.18



Az értekezés témájához kapcsolódó szabadalmak listája:

János Borbély, Magdolna Bodnár, John F. Hartmann, István Hajdu, József Kollár, György Vámosi
Cancer Cell Diagnosis by Targeting Delivery of Nanodevices
U. S. Patent, Patent No.: US 7,976,825 B2 Date of Patent: Jul. 12, 2011

Az értekezés témájához kapcsolódó előadások listája:

Magdolna Bodnár, István Hajdu, Genovéva Filipcsei, John F. Hartmann, Tamara Minko, János Borbély
Formation and characterization of polyelectrolyte complexes based on self-assembly of chitosan and poly- γ -glutamic acid
EPF, Portoroz, Slovenia, July 2-6 2007.

Hajdu István, Borbély János
Nanoanyagok alkalmazása in vitro kísérletekben
VIII. Téli Iskola, Balatonfüred, Február 6-8, 2008.

István Hajdu, Éva Nagy, Magdolna Bodnár, John F. Hartmann, Sándor Damjanovich, József Kollár, György Vámosi, László Nagy, Tamara Minko and János Borbély
Cancer Cell Diagnosis and Drug Delivery by Targeted Delivery of Biopolymer-Based Nanodevices
Polymer Networks Group Conference 2008, 22-26 June, Larnaca, Cyprus, 2008.

Bodnár Magdolna, Csikós Zsuzsanna, Hajdu István, Emri Miklós, Trencsényi György, Sikula Judit, Vámosi György, Márián Teréz, Borbély János, Kollár József
Kontrasztanyagok fejlesztése multimodális képalkotás céljára
A Magyar Radiológusok Társasága XXVI. Kongresszusa Debrecen, 2012. Jún. 21-23

István Hajdu, Magdolna Bodnár, Zsuzsanna Csikós, György Trencsényi, Miklós Emri, Imre Lajos, András Polyák, Judit Sikula, György Vámosi, Terez Marian, Lajos Balogh, János Borbély, József Kollár
Preparation and investigation of multimodal contrast agents
World Molecular Imaging Congress September 5-8, 2012 Dublin Ireland

Az értekezés témájához kapcsolódó poszterek listája:

Magdolna Bodnár, István Hajdu, Genovéva Filipcsei, Lajos Daróczi, John F. Hartmann,
János Borbély

Nanoparticles Prepared by Self-assembly of Chitosan and Poly- γ -glutamic Acid

NSTI Nanotechnology Conference, Nanotech, Santa Clara, CA, USA, May 20-24 2007.

István Hajdu, Éva Nagy, Magdolna Bodnár, John F. Hartmann, Sándor Damjanovich, József
Kollár, György Vámosi, and János Borbély

Cancer Cell Diagnosis by Targeted Delivery of Nanodevices

NSTI Nanotech 2008, Boston, USA, June 1-5, 2008.

István Hajdu, Éva Nagy, Magdolna Bodnár, John F. Hartmann, Sándor Damjanovich,
György Vámosi, József Kollár, János Borbély

Targeted Delivery of Gadolinium Complexes of Chitosan/Poly- γ -glutamic Acid Self-
assembled Nanoparticles as Potential MRI Contrast Agents

Polymer Networks Group Conference 2008, 22-26 June, Larnaca, Cyprus, 2008.

Hajdu István, Trencsényi György, Csikós Zsuzsanna, Emri Miklós, Vámosi György, Márián
Teréz, Bodnár Magdolna, Borbély János, Kollár József

Új szuperparamágneses nanorendszer kontrasztanyag PET és MR vizsgálata

Magyar Orvostudományi Nukleáris Társaság XVII.Kongr. Budapest Aug. 25-27. 2011.

Polyák András, Hajdu István, Bodnár Magdolna, Pöstényi Zita, Haász Veronika, Jánoki
Gergely, Török Roland, Jánoki Győző A., Balogh Lajos, Borbély János

Tc-99m-mel jelzett önrendező biopolimer-bázisú nanorészecskék receptormediált
felvétele, alkalmazása tumorok diagnosztizálásához

Magyar Orvostudományi Nukleáris Társaság XVII.Kongr. Budapest Aug. 25-27. 2011.

Polyák András, Hajdu István, Bodnár Magdolna, Pöstényi Zita, Haász Veronika, Balogh
Lajos, Borbély János

Első klinikai tapasztalatok spontán beteg állatok folát-receptort kifejező tumorainak
SPECT/CT vizsgálataiban, Tc-99m-mel jelzett nanorészecskék használatával

Magyar Orvostudományi Nukleáris Társaság XVIII.Kongr. Pécs Jún. 30.-Júl. 2. 2013.