

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**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**

Tartalomjegyzék

| | |
|--|----|
| Rövidítések jegyzéke | 5 |
| 1. Bevezetés | 6 |
| 2. Irodalmi áttekintés | 7 |
| 2.1. Biopolimerek | 7 |
| 2.1.1. Kitozán | 7 |
| 2.1.2. Poli-gamma-glutaminsav | 8 |
| 2.2. Biopolimer alapú nanorendszerek | 10 |
| 2.2.1. Kitozán/poli-gamma-glutaminsav nanorendszerek..... | 13 |
| 2.3. Targetált nanorendszerek | 15 |
| 2.3.1. Folsavval targetált biopolimer alapú nanorendszerek..... | 16 |
| 2.4. Kontrasztanyagok | 19 |
| 2.4.1. Kontrasztanyagok, radiofarmakonok. Általános ismertető..... | 19 |
| 2.4.2. Nanorendszer alapú kontrasztanyagok..... | 20 |
| 2.4.2.1. MR-kontrasztanyagok | 21 |
| 2.4.2.2. MR-kontrasztanyagok biopolimer alapú nanorendszerekből.... | 23 |
| 2.4.2.3. Targetált MR-kontrasztanyagok..... | 25 |
| 2.5. Célkitűzések..... | 27 |
| 3. Anyagok és módszerek | 28 |
| 3.1. Felhasznált anyagok..... | 28 |
| 3.2. Kísérleti módszerek | 29 |
| 3.2.1. A PGA reakciója folsavval..... | 29 |
| 3.2.2. A kitozán festése Alexa Fluor 546-szukcinimidil-észter festékekkel... | 29 |
| 3.2.3. A kitozán festése fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) | 30 |
| 3.2.4. Szuperparamágneses vas-oxid nanorészecskék (SPION) szintézise. 30 | |
| 3.2.5. Kitozán és a poli- γ -glutaminsav önrendeződése különböző pH-n.... | 31 |
| 3.2.6. Részecske Gd-komplexének képzése..... | 31 |
| 3.2.7. PFS és kitozán önrendeződése | 32 |
| 3.3. Anyagtudományi vizsgáló módszerek | 32 |
| 3.3.1. Nanorészecskék karakterizálása..... | 32 |
| 3.3.2. Mágneses rezonancia képalkotás (MRI) | 33 |
| 3.3.2.1. Nanorészecskék MR-vizsgálata | 34 |

| | |
|--|-----------|
| 3.4. <i>In vitro</i> vizsgáló módszerek | 34 |
| 3.4.1. Kísérletekhez alkalmazott sejtvonalak | 34 |
| 3.4.2. Folát receptorok meghatározása | 34 |
| 3.4.3. MTT toxicitás vizsgálat | 35 |
| 3.4.4. Sejtszámlálás | 35 |
| 3.4.5. Konfokális mikroszkópos vizsgálatok | 36 |
| 3.4.6. Áramlási citometriás vizsgálatok | 37 |
| 3.4.7. Sejtek előkészítése MR-vizsgálatokhoz | 37 |
| 3.5. <i>In vivo</i> vizsgáló módszerek | 37 |
| 3.5.1. Kísérleti állatok | 37 |
| 3.5.2. <i>In vivo</i> toxicitás | 38 |
| 3.5.3. Mágneses rezonancia képalkotás <i>in vivo</i> | 38 |
| 3.5.3.1. Patkány műtét | 38 |
| 3.5.3.2. Egér tumor injektálás | 38 |
| 3.6. Statisztikai elemzés | 39 |
| 4. Eredmények | 40 |
| 4.1. Biopolimer alapú nanohordozó | 40 |
| 4.1.1. Nanorészecskék, a kitozán és a poli- γ -glutaminsav önrendeződésével pH 3 értéken | 40 |
| 4.1.2. Nanorészecskék, a kitozán és a poli- γ -glutaminsav önrendeződésével különböző pH-kon | 42 |
| 4.1.3. Targetált nanorészecskék létrehozása a kitozán és a poli- γ -glutaminsav önrendeződésével | 43 |
| 4.2. Az önrendeződő nanorészecskék Gd-komplexei | 47 |
| 4.2.1. A megfelelő rendszer kiválasztása | 47 |
| 4.3. Paramágneses MR-kontrasztanyag előállítás és vizsgálata | 49 |
| 4.3.1. Paramágneses MR-kontrasztanyag fizikai-kémiai vizsgálata | 49 |
| 4.3.2. Paramágneses kontrasztanyag <i>in vitro</i> vizsgálata | 52 |
| 4.3.2.1. Alapanyagok és a kontrasztanyag citotoxicitás vizsgálata | 52 |
| 4.3.2.2. Paramágneses kontrasztanyag tumorspecifikus internalizációja | 53 |
| 4.3.2.3. Paramágneses kontrasztanyag <i>in vitro</i> MR-vizsgálata | 56 |
| 4.3.3. Paramágneses kontrasztanyag <i>in vivo</i> vizsgálata | 57 |
| 4.3.3.1. <i>In vivo</i> patkány MR-vizsgálatok | 57 |

| | |
|---|-----------|
| 4.3.3.2. <i>In vivo</i> egér MR-vizsgálatok | 59 |
| 4.4. Szuperparamágneses MR-kontrasztanyag vizsgálata | 60 |
| 4.4.1. Szuperparamágneses MR-kontrasztanyag előállítás és fizikai-kémiai vizsgálata..... | 61 |
| 4.4.2. Szuperparamágneses kontrasztanyag tumorspecifikus internalizációjának <i>in vitro</i> vizsgálata | 61 |
| 4.4.3. Szuperparamágneses kontrasztanyag MR-vizsgálata | 62 |
| 4.4.4. Szuperparamágneses kontrasztanyag <i>in vivo</i> vizsgálata | 64 |
| 5. Megbeszélés..... | 66 |
| 5.1. Nanohordozó..... | 66 |
| 5.2. Paramágneses MR-kontrasztanyag | 69 |
| 5.3. Szuperparamágneses MR-kontrasztanyag | 71 |
| 5.4. Új tudományos eredmények | 73 |
| 6. Összefoglalás..... | 74 |
| 7. Summary..... | 75 |
| 8. Irodalomjegyzék..... | 77 |
| 8.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke | 77 |
| 8.2. Saját közlemények jegyzéke | 89 |
| 8.3. Előadások, poszterek jegyzéke | 91 |
| 9. Tárgyszavak..... | 96 |
| 10. Köszönetnyilvánítás..... | 97 |
| 11. Függelék..... | 98 |

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai

Rövidítések jegyzéke

| | |
|---------|--|
| AFM: | atomi erő mikroszkóp (atomic force microscope) |
| BSA: | borjú szérum albumin (bovine serum albumin) |
| CH: | kitozán |
| CT: | komputertomográfia |
| DD: | a kitozán dezacilezettségének mértéke (degree of deacylation) |
| DMSO: | dimetil-szulfoxid |
| DNS: | dezoxiribonukleinsav |
| DOTA: | 1,4,7,10-tetraazaciklododekán-1,4,7,10-tetraecetsav (1,4,7,10-tetraazacyclo dodecane-1,4,7,10-tetraacetic acid) |
| DTPA: | dietilén-triamin-pentaecetsav (diethylenetriaminepentaacetic acid) |
| EDTA: | etilén-diamin-tetraecetsav |
| FA: | folsav |
| FACS: | fluoreszcencia-aktivált sejtszeparálás (fluorescence-activated cell sorting) |
| FITC: | fluoreszcein-izotiocianát |
| FR: | folát receptor |
| HSA: | humán szérum albumin |
| ICP-MS: | induktív csatolású plazma tömegspektrometria (inductively coupled plasma mass spectrometry) |
| MR/MRI: | mágneses magrezonancia képalkotás (magnetic resonance imaging) |
| MTT: | 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid |
| PAMAM: | poliamidoamin (poly(amidoamine)) |
| PAsp: | poli-aszparaginsav |
| PBS: | foszfát puffer-oldat (phosphate-buffered saline) |
| PET: | pozitron emissziós tomográfia |
| PFS: | szuperparamágneses vas-oxid nanorészecskét tartalmazó folsavval módosított poli-gamma-glutaminsav |
| PGA: | poli-gamma-glutaminsav |
| PLGA: | poli(tejsav-glikolsav) (poly(lactic-co-glycolic) acid) |
| RGD: | arginin-glicin-aszpartát szekvencia (arginine-glycine-aspartate sequence) |
| RNS: | ribonukleinsav |
| SEM: | pásztázó elektronmikroszkópia |
| SPECT: | egyfoton-emissziós komputer tomográfia (single-photon emission computed tomography) |
| SPION: | szuperparamágneses vas-oxid nanorészecske (superparamagnetic iron oxid nanoparticle) |
| TEM: | transzmissziós elektronmikroszkópia |
| UV-VIS: | ultraibolya-látható (ultraviolet-visible) spektrofotometria |

1. 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 képalkotó diagnosztika eljárásait, és a biopolimerek orvosbiológiai alkalmazásának, az MR-kontrasztanyagok fejlesztésének, valamint a nanotechnológiai kutatásoknak a metszetében áll.

Napjainkban növekvő érdeklődés övezi a biokompatibilis, biodegradábilis makromolekulák egyre szélesebb körű orvosbiológiai alkalmazási lehetőségeit. [1,2] 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. [3,4] Ezen kiemelt orvosbiológiai felhasználási területek egyike a kontrasztanyagok, ezen belül az MR-kontrasztanyagok fejlesztése. [5,6]

Az utóbbi évtizedekben, a tudomány és a technika fejlődésével növekvő igény jelentkezik a diagnosztikai eljárások iránt. Kiemelt fontosságúvá vált a betegségek korai felismerése, a minél hatékonyabb kezelések megalapozásaként. 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 érzékenységet, erős kontrasztot biztosítanak a megfigyelt anatómiai rendellenességeknél, szervi elváltozásoknál, ezáltal jobb detektálhatóságot téve lehetővé. [7,8]

A kontrasztanyagok fejlesztése során is alkalmazhatók a nanotechnológiai vívmányok. A nano-méretű anyagok méretükből adódóan speciális tulajdonságokkal rendelkeznek, melyek előnyösen kiaknázzhatók bizonyos felhasználási területeken. Kiváló hordozók lehetnek, térfogatukhoz képest nagy a felületük, és alkalmasak számos hatóanyag megkötésére, szállítására, kibocsátására. [3,4]

Az elvárások és lehetőségek szem előtt tartásával kutatómunkám során olyan biopolimer alapú nanorendszerek előállítását tűztük 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.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Biopolimerek

A tudomány különböző területein a biopolimer szó jelentése más és más lehet. A Tudományos és Köznyelvi Szavak Értelmező Szótára szerint a biopolimer „Hosszú, láncszerű képződmény, mely lehet helikális elrendezésű, ill. rendezetlen.” Ez a megfogalmazás túl általános.

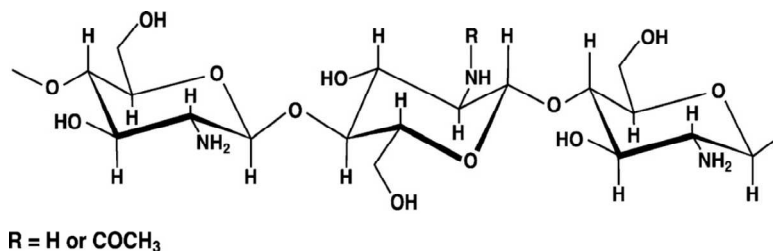
Tág értelemben véve biopolimernek nevezzük azokat az ismétlődő egységekből kovalens kötéssel felépülő makromolekulákat, amelyeket élő szervezetek állítanak elő. Ilyen például a cellulóz, a keményítő, a kitin, a proteinek, a DNS vagy az RNS. Ezen makromolekulákat általában cukor, aminosav vagy nukleotid monomeregységek építenek fel, sok esetben meghatározott struktúrákban.

Más értelmezés szerint a biopolimerek biokompatibilis és biodegradábilis makromolekulák. Ezen követelményeknek számos, szintetikus úton is előállítható polimer felel meg, s ezáltal az értelmezés bonyolódik. [1,2] Mindemellett jelentős kutatói potenciál is dolgozik azon világszerte, hogy különböző felhasználási céloknak megfelelő, enzimatis úton lebomló szintetikus polimert állítson elő.

A jelen dolgozat kutatási témája által leginkább érintett tudományterületek szűk értelmezését alapul véve biopolimerek azok a makromolekulák, amelyeket élő szervezetek állítanak elő, és biodegradábilis tulajdonságúak.

2.1.1. Kitozán

Az utóbbi évtizedekben egyre növekvő figyelem övezi a kitozánt, és számos kutatás számol be annak lehetséges módosításairól és felhasználási lehetőségeiről. [9]



1. ábra: A kitozán szerkezetének sematikus ábrája

(Progress in Polymer Science 37 (2012) 1457-1475)

A kitozán (CH) egy lineáris poliszacharid, a természetben nagy mennyiségben előforduló kitin dezacilezett származéka. A dezacilezési folyamat következtében a kitozán

tulajdonképpen a β -(1-4)-2-acetamido-D-glükóz és a β -(1-4)-2-amino-D-glükóz egységek kopolimerje, amelyben az egységek random módon vagy blokk eloszlásban fordulnak elő (1. ábra). A kitozán láncon belül ezen két monomeregység molaránya adja meg a kitozán dezacilezettségének mértékét (DD), amely legalább 60%. [10]

A DD a molekulatömeg mellett a legfontosabb paraméter, amely szignifikánsan befolyásolja a kitozán fizikai, kémiai és biológiai tulajdonságait és ezáltal felhasználási lehetőségeit is. [11]

A kitozán könnyebb kezelhetőségét teszi lehetővé, hogy savas közegben oldódik (pl. sósavban, ecetsavban) és az aminocsoportok protonálódása révén nagy töltéssűrűségű, pozitívan töltött poliszachariddá alakul. Minden dezacilezett monomeregységen egy aminocsoport és két hidroxilcsoport érhető el, melyek révén a kitozán könnyen módosítható, funkcionálizálható.

Biológiai szempontból a kitozának számos előnyös tulajdonsága van: biokompatibilis, biodegradábilis, nem toxikus, megújuló biopolimer, gombaölő és antibakteriális tulajdonsággal.

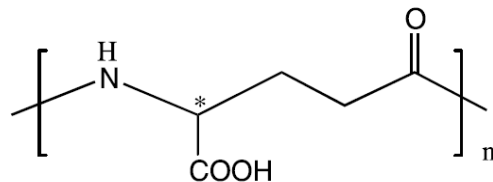
A kitozánt és származékait széleskörű tudományos és ipari érdeklődés övezi, pl. a fémmegkötés, víztisztítás, élelmiszeripar, gyógyászat, stb. területén. [12]

Napjainkban intenzív kutatások folynak a könnyen hozzáférhető kitozán felhasználási lehetőségeinek kiszélesítésére. Jó adszorpciós tulajdonságai miatt fémmegkötésre [13,14], víztisztításra [15], valamint jó filmképző tulajdonsága miatt különböző tulajdonságú membránok, hártyák, filmek [16] fejlesztésére is jelentős kutatási erőfeszítések irányulnak. A legnagyobb figyelem és érdeklődés a kitozán gyógyászatban betölthető szerepét övezi, ezen belül a hatóanyagok becsomagolása, szállítása és a szövetregenerálás került előtérbe. [17] A kitozánból kialakított rendszerek, részecskék, filmek és hidrogélek alkalmasak hatóanyagok (pl. kontrasztanyagok, gyógyszerhatóanyagok, DNS, RNS szekvenciák, stb.) szállítására [18,19], valamint hatékony szövetregenerálásra [20,21].

2.1.2. Poli-gamma-glutaminsav

A poli-gamma-glutaminsav (PGA) egy különleges anionos polipeptid, amelyet γ -amid kötéssel kapcsolódó D- és L-glutaminsav egységek építenek fel (2. ábra). A polipeptid sztereokémiai struktúráját illetően 3 típust különböztetünk meg: a D-glutaminsav egységekből felépülő homopolimert, az L-glutaminsav egységekből felépülő homopolimert és a D- és L-glutaminsav egységekből random módon felépülő kopolimert. [22]

A PGA-ban a polimer láncot a glutaminsav egységek α -amino és γ -karboxilcsoportjai közötti kovalens kötés tartja össze, amely monomeregységenként egy szabad karboxilcsoport jelenlétét eredményezi. A szabad karboxilcsoportok polikarbonsav jelleget kölcsönöznek a polipeptidnek, kialakítva annak polianionos tulajdonságát, és számos más előnyös sajátossággal is bírnak. [22] A karboxil funkciós csoportok reaktívak, könnyen módosíthatók, mely által a PGA széles körben alkalmazhatóvá vált. [23]

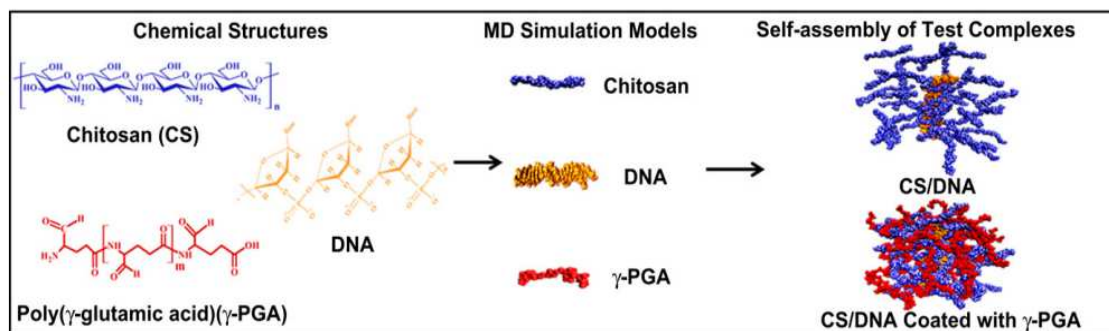


2. ábra: A poli-gamma-glutaminsav monomeregységének sematikus ábrája

(Bioresource Technology 79 (2001) 207-225)

A PGA vízben jól oldódó, biokompatibilis, biodegradábilis, nem toxikus biopolimer. [24] A PGA-t mikroorganizmusok termelik, bakteriális fermentációval lehet előállítani. A PGA-t elsőként két magyar tudós (Ivánovics és Bruckner) izolálta a *Bacillus anthracis* tokanyagából, de napjainkban szélesebb körben alkalmazzák a *Bacillus subtilis*-t és a *Bacillus licheniformis*-t a γ -polipeptid előállítására. [23,25]

A PGA-t széles körű ipari felhasználás és egyre növekvő kutatási érdeklődés övezi, a kedvező fizikai, kémiai és biológiai tulajdonságainak köszönhetően. A polipeptidből és származékaiból könnyen képezhetők részecskék [26], kompozitok [27], hidrogéljei [28] jó vízmegkötő tulajdonsággal rendelkeznek, jó fémmegkötő [29] és flokkulálószer [30]. Ezen tulajdonságait felhasználva a PGA-t nagy mennyiségben alkalmazza és dolgozza fel a kozmetikai és élelmiszeripar, az agrárgazdaság, valamint a gyógyszeripar és az orvostudomány. [23,24,29]



3. ábra: Kitozán/DNS/PGA önrendeződő polielektrolit komplex sematikus ábrája

(Biomaterials 33 (2012) 3306-3315)

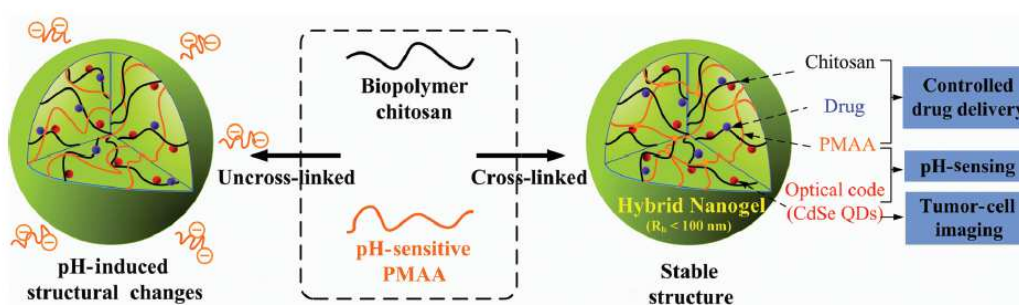
Az utóbbi években jelentős kutatói érdeklődés mutatkozik olyan PGA-ból kialakítható részecskék, hidrogélek előállítására, amelyek alkalmasak lehetnek gyógyszerhatóanyagok szállítására, kibocsátására, valamint alkalmazhatók szövetregenerálásra. [27,28] Számos közlemény számol be PGA alapú nanorészecskék [31], polielektrolit komplexek (3. ábra) [32], illetve hidrogélek fejlesztéséről [27,28], valamint ezek orvosbiológiai felhasználásáról [23,24].

2.2. 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 nanorészecskét állítunk elő (elsősorban fém, fém-oxid, vagy szén) és ezen nanorészecskék burkolása történik a biopolimerrel. Mindkét típusú nanorendszer fejlesztését nagy kutatói érdeklődés övezi.

A biopolimer alapú nanorendszereket is több szempontból csoportosíthatjuk: a rendszert alkotó biopolimerek minősége és mennyisége, az esetleges „adalékanyagok”, a nanorendszert összetartó kémiai kötések minősége szerint, stb.

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. [1,2,17]



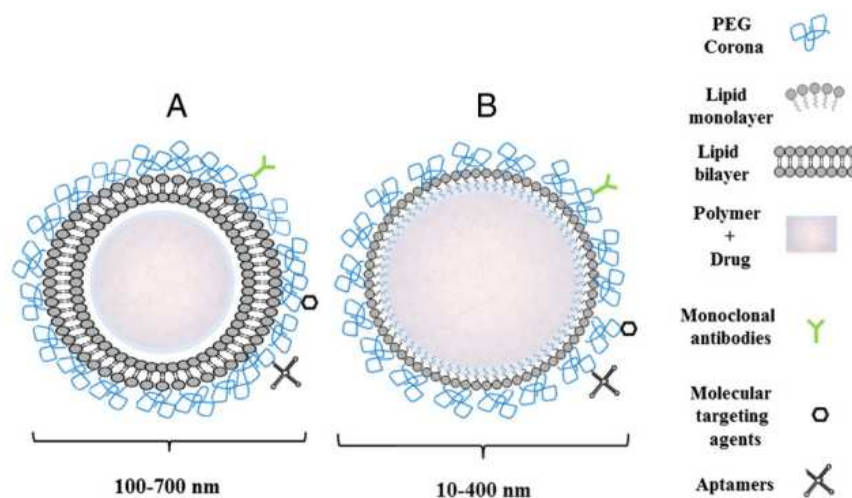
4. ábra: Fizikailag és kémiailag térhálósított kitozán-polimetakrilsav hibrid nanogélek szerkezetének és felhasználásának sematikus ábrája

(Nano Reviews 1 (2010) DOI: 10.3402/nano.v1i0.5730)

A biopolimer alapú nanorendszerek előállítása általában kovalens és/vagy ionos kötések létrehozásával érhető el (4. ábra). Számos kutatás irányul olyan biopolimer alapú

nanorendszerek fejlesztésére, amelyekben kovalens kötések kialakításával térhálós részecskéket hoznak létre, makroszkópikus gélképződés nélkül. A szakirodalomban egyaránt megtalálható a kitozán [33], hialuronsav [34], poli-glutaminsav [31], keményítő [35], guar-gumi [36], és számos egyéb biopolimer [37,38] nanorészecskék keletkezését eredményező kovalens térhálósítás leírása. A kutatások beszámolnak ezen nanorészecskék hatóanyag-szállító és -kibocsátó tulajdonságairól is. [39]

A biopolimerekből kialakítható speciális nanorészecskéket, ún. mag-héj rendszereket jelentős mértékben kutatják a kedvező szerkezeti struktúra hatékony kiaknázása végett (5. ábra). [40,41]



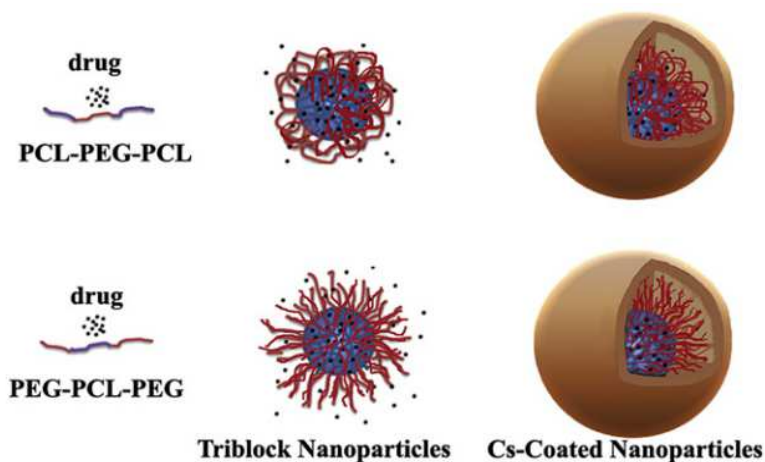
5. ábra: Lipid-polimer hibrid nanorészecske mag-héj szerkezetének sematikus ábrája lipid kettősréteggel (A) és lipid monoréteggel (B) burkolva

(Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine 9 (2013) 474-491)

A mag-héj szerkezet kiválóan alkalmas hatóanyagok becsomagolására és szállítására azáltal, hogy a legalább kétrétegű struktúra megvédi a magba becsomagolt hatóanyagot a környezetétől, így hatékonyan szállítható. Általában hidrofób gyógyszer-hatóanyagok szállítását valósítják meg ilyen módon, elkerülve annak vizes közegben történő kicsapódását. [42]

A mag-héj rendszerek kialakítása során a kovalens kötés és az ionos kölcsönhatás egyaránt fontos szerepet játszhat. [43] Mag-héj szerkezet alakítható ki biopolimerekből úgy, hogy hidrofób oldalláncot kapcsolnak hozzá kovalensen, majd az így létrejövő graftolt amfifil polimer önrendeződik, kialakítva a számára termodinamikailag stabil struktúrát. [44]

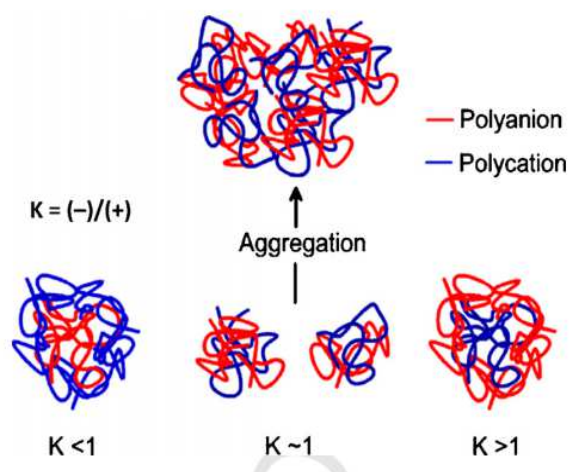
Hasonló szerkezetű részecskék formálódnak (amfifil) blokk kopolimerekből is. [45] A diszperziós közeg hidrofilitásától függően rendeződik a szerkezet mag-héj struktúrája (6. ábra).



6. ábra: Kitozánnal burkolt triblokk kopolimererek mag-héj szerkezetének sematikus ábrája
(Polymer 53 (2012) 5723-5736)

Két- vagy többlépéses reakcióban biopolimerekből olyan mag-héj szerkezet is kialakítható, amelynek magját térhálós biopolimer rendszer [46] vagy pl. dendrimer [47] adja, és erre burokként kerül a biopolimer héj. Ezen szerkezetekben a mag kialakítása során a kovalens kötés játszik fontos szerepet, míg a héj formálásában a mag és a héj biopolimerjei közötti ionos kölcsönhatás a meghatározó.

A részecskék formálása, a részecskékkel történő hatóanyag-szállítás területén új távlatokat nyithatnak meg a polielektrolit komplexek.[12] A reaktív funkciók csoportokkal rendelkező hidrophil biopolimerek vizes közegben polianionként vagy polikationként viselkedhetnek. Az ellentétes töltésű funkciók közötti ion-ion kölcsönhatás következtében ezen polielektrolitok kolloid rendszereket formálhatnak, melyeket polielektrolit komplexeknek nevezünk.



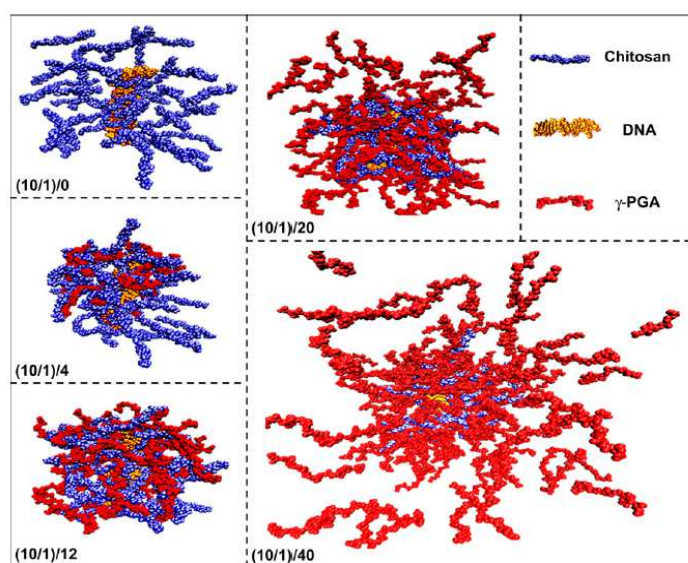
7. ábra: Kitozán-alginát polielektrolit komplex szerkezetének sematikus ábrája a részecskék felületi töltésének függvényében

A reakcióköörülmények függvényében ezen rendszerek lehetnek hidrogélek [48], filmek [49], membránok [50], vagy részecskék [51]. A létrejövő polielektrolit komplexek előnye és hátránya egyaránt a kovalens kötés hiányából ered: a módosítatlan biopolimerek megőrzik eredeti, kedvező biológiai tulajdonságaikat, így egyszerűen kialakíthatók a biokompatibilis, biodegradábilis rendszerek; mindazonáltal az önrendeződés rendkívül érzékeny, egyaránt befolyásolja a biopolimerek fizikai-kémiai paramétereit (pl. molekulatömeg, töltéssűrűség) és a reakció körülmények (pl. a közeg sókoncentrációja, pH-ja, a biopolimerek aránya, koncentrációja) (7. ábra). [12]

2.2.1. Kitozán/poli-gamma-glutaminsav nanorendszerek

A kitozán és a PGA vizes közegben oldható, reaktív funkció 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 kitozán és a PGA önrendeződésével kialakítható részecskék, elsősorban nanorészecskék fejlesztését övezi kitüntetett figyelem. A szakirodalomban számos önrendeződő CH/PGA nanorészecske előállítását és vizsgálatát írták le, melyeket elsődlegesen hatóanyagok szállítására fejlesztettek ki. Számos közlemény számol be ezen nanorendszerekkel történő génszállításról [52,53], kontrasztanyag-szállításról [54], valamint egyéb hatóanyagok [55,56] szállításáról.



8. ábra: A (CH/DNS)/PGA komplexek szerkezetének sematikus ábrája, a biopolimerek arányainak függvényében

(Molekuláris dinamikus szimulációval, vizes közegben.)

(Biomaterials 33 (2012) 3306-3315)

Kitozánból és PGA-ból olyan nanorészecskéket állítottak elő, amelyekkel a DNS [52,53] (8. ábra), illetve siRNS [57] hatékonyan szállítható. A nanorendszer létrehozásának alapja az ellentétes töltésű makromolekulák között kialakuló ion-ion kölcsönhatás. A kitozán képes megkötni a DNS, illetve siRNS láncokat, és – ezt a kötést nem befolyásolva – a kitozán a PGA-val is erős kölcsönhatásba lép. A DNS-t szállító nanorendszer részecskemérete 130-140 nm volt, míg az siRNS-t szállító részecskéké 200-210 nm. Mindkét kutatócsoport kimutatta, hogy ezen három komponensű komplexek sejtek általi felvételét a komplexek PGA tartalma befolyásolja: a PGA tartalom növelésével a sejtek általi felvétel növelhető.

DNS szállítására alkalmas, kitozán és PGA alapú, mag-héj szerkezetű nanorészecskékről is beszámol a szakirodalom. [52] A nanorendszer magját a kitozán és DNS komplexe adja, melyet a PGA héjként borít be. A nanorendszer mérete ~120 nm, melyet a kitozán és a PGA közötti ion-ion kölcsönhatás tart össze. Ezen nanorendszerek vizsgálata során is igazolást nyert, hogy a nanorészecskék sejtek általi felvétele a PGA biopolimer részarányával fokozható.

Az önrendeződő nanorendszerek radiológiában használható kontrasztanyagot, képalkotást elősegítő más anyagokat, ionokat, molekulákat is képesek szállítani. [5] Saját kutatómunka keretében állítottunk elő és vizsgáltunk kitozán és a PGA önrendeződésével kialakított olyan nanorészecskéket, amelyek ^{99m}Tc radionuklidot szállítottak, és ezáltal SPECT radiofarmakonként alkalmazhatók. [54]

Széleskörű kutatások folynak a kitozán és a PGA önrendeződésével kialakítható nanorészecskék hatóanyag-szállító tulajdonságainak kiaknázására is. A szakirodalomban találunk példát inzulin [55], lizozim [58], vagy doxorubicin [56] szállítására.

CH-PGA önrendeződő nanorendszerrel alakították ki a szájon át szedhető inzulint. [55,59,60] Olyan nanorendszereket állítottak elő, amelyek orális bevitel mellett is csökkentik a vér glükóztartalmát. Más kutatásokban a vizsgálatok során azt tapasztalták, hogy a tripolifoszfáttal módosított önrendező nanorendszerek stabilabbak, mint a tripolifoszfát nélküliek, és ezáltal alkalmasabbak az inzulin orális szállítására.

Tripolifoszfáttal módosított és anélküli önrendező nanorészecskéket előállítottak lizozim szállítására is. [58] A lizozim molekulákat PGA-val és kitozánnal burkolták, és némely esetben a nanorendszert tripolifoszfáttal is reagáltatták. Az antibakteriális hatás vizsgálata során azt tapasztalták, hogy az antibakteriális spektrum szélessége, valamint az

antibakteriális aktivitás mértéke a lizozim csomagolásával, a biopolimerek sorrendjével van összefüggésben.

Az önrendeződő nanorészecskék alkalmasak kemoterápiás szerek szállítására is. Doxorubicin szállítását valósították meg a kitozán és a PGA biopolimerek önrendeződésével létrejövő nanohordozóval. [56] Kimutatták, hogy a pozitív töltésű doxorubicin és a negatív töltésű PGA közötti ion-ion kölcsönhatás eredményeként még nem jön létre részecske, ehhez a kitozán biopolimer hozzáadása is szükséges. Ily módon ion-ion kölcsönhatáson alapuló, 150-630 nm közötti részecskéket hoztak létre. Tanulmányozták a sejttúlélést a biopolimerek koncentrációja és a részecskeméret függvényében. Azt tapasztalták, hogy a legkisebb méretű és legnagyobb doxorubicin tartalmú részecskék rendelkeztek a legjelentősebb citotoxicitással.

A szakirodalomban számos közlemény számol be a kitozán és a PGA önrendeződésével létrejövő olyan hidrogélekről és porózus mátrixokról is, amelyek alkalmasak lehetnek szövetregenerálás vagy csontpótlás céljára történő felhasználásra. [48,61,62] Ezen szerkezeteket is a két biopolimer funkciós csoportjai közötti ion-ion kölcsönhatás tartja össze.

A két biopolimer kölcsönhatásán alapulva olyan mátrixot hoztak létre, melynek pórusmérete 30-100 μm között változik. [27] Megállapítást nyert, hogy a mátrix fizikai tulajdonságai, mint pl. a felületi hidrofilitása, duzzadási tulajdonsága, mechanikai szilárdsága, hatékonyan befolyásolhatók a mátrixot alkotó biopolimerek arányával, így megvalósítva a konkrét felhasználási célnak megfelelő tulajdonságú mátrixot.

A két biopolimer mellett karboximetil-cellulózt is felhasználva harmadik komponensként olyan antibakteriális mátrixot hoztak létre, amely alkalmas lehet fogászati csonthiány, illetve csontelégeltelenség kezelésére. [62] A biopolimerek ion-ion kölcsönhatásával kialakított hidrogélt liofilizálták, majd az így nyert 100-500 μm pórusméretű mátrixot tanulmányozták az adott felhasználási céllal. Azt tapasztalták, hogy a rendszer a fizikai, antibakteriális és biokompatibilis tulajdonságai alapján potenciális jelölt lehet fogászati felhasználási célokra.

2.3. 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, érzékenységét, kombináljuk a különböző

képalkotó módszereket, és ezáltal elősegítjük 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 célbajuttatást. Számos célzóligandum ismert, pl. monoklonális antitestek [63], peptidek [64], transferrin [65], szomasztatin [66], aptamerek [67], folsav [68,69], melyek megfelelő célzó tulajdonságát preklinikai és klinikai vizsgálatok bizonyítják.

Számos közlemény eredménye is igazolja a folsavval targetált nanorendszerek hatékonyságát. Micellákat [70], dendrimereket [71], liposzómákat [72], fém alapú nanorendszereket [73] és polimer alapú nanorendszereket [74] mutat be a szakirodalom, mint folsavval targetált nanohordozókat.

A legújabb tanulmányok eredményei igazolják, hogy számos tumorsejt-típus overexpresszál folát receptorokat (pl. emlő, petefészek, méhnyak, kolorektális, vese, orrgarat), szemben a legtöbb egészséges sejttel, melyek felszínén ezen receptorok nem, vagy csak kis mértékben detektálhatók. A kis molekulatömegű folsav nagy folát receptor affinitással rendelkezik [75], receptor-mediált endocitózis révén internalizálódik [76], s ezáltal hatékony célzóliganduma lehet a hatóanyagot, kontrasztanyagot szállító nanorendszereknek.

2.3.1. Folsavval targetált biopolimer alapú nanorendszerek

Az elmúlt évtizedekben jelentős kutatói érdeklődés irányult a sejtek felületén található folát receptorok és az ezeket hatékonyan célzó folsav felé. A szakirodalomban fellelhető eredmények között olvashatunk a folát receptorok izoformáiról [77], a sejtek felszínén való elhelyezkedésükről és eloszlásukról [75], kölcsönhatásukról a folsavval, valamint a folsavval történő hatékony célzásukról.

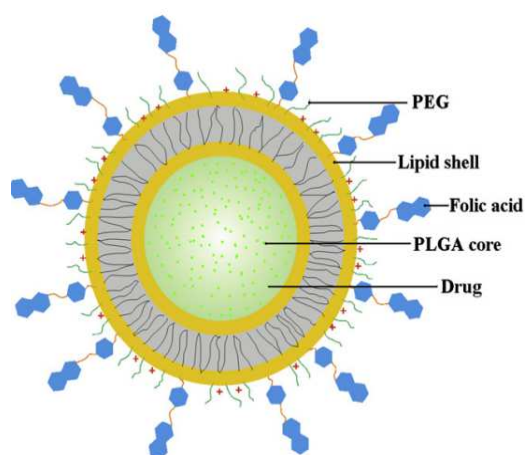
A folát receptorokra irányuló kutatási eredmények alapján napjainkban tényként számol a szakirodalom a folát receptorok folsavval történő hatékony célzásával.

A folsav egy vízben oldódó vitamin, hétköznapi nevén M- vagy B₉-vitamin, kémiai elnevezése (2S)-2-[(4-[(2-amino-4-hydroxipterin-6-yl)metil]amino}fenil)formamido]

pentándisav, más néven *N*-(4-[[[(2-amino-4-oxo-1,4-dihidropteridin-6-il)metil]amino}benzoil)-L-glutaminsav.

Jelentős kutatási potenciál foglalkozik a folsavval targetált nanorendszerek fejlesztésével. A targetált dendrimerek [71], micellák [70], liposzómák [72], fém vagy fém-oxid nanorendszerek [73] fejlesztése mellett egyre növekvő figyelem övezi a biopolimer alapú, targetált nanorendszerek [74,78] fejlesztését. A folsav kapcsolásával megvalósított hatékony célzó tulajdonság mellett ezen rendszerek biokompatibilisek, biodegradábilisak, funkciós csoportjaik révén egyszerűen módosíthatók, alkalmasak számos különböző molekula szállítására, valamint nano mérettartományba eső méretük miatt hosszabb ideig keringenek a véráramban.

A folsavval targetált biopolimer alapú nanorendszerek között találhatunk pl. albumin [79], hialuronsav [80], kitozán alapú rendszereket [81], valamint biodegradábilis szintetikus polimer [82] alapú részecskéket egyaránt (9. ábra).



9. ábra: Folsavval targetált nanorendszer sematikus rajza

(European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 81 (2012) 248–256)

BSA módosításával olyan 90 nm méretű mag-héj részecskéket állítottak elő, amelyek alkalmasak doxorubicin célzott szállítására. [83] A folsavat előbb dextránhoz kapcsolták, majd ezt a molekulát kötötték a BSA-hoz. A létrejövő szerkezet magját a BSA és a doxorubicin alkották, míg a dextrán képezte a védő héjat, felületén a célzó folsav molekulákkal. A nanorendszerről igazolták, hogy kisebb toxicitású a szabad doxorubicinnél, és emellett szignifikánsan nagyobb a tumorelles hatása – köszönhetően a gyógyszer becsomagolásának és a folát-targetálásnak.

Hialuronsavból – szintén mag-héj szerkezet kialakításával – olyan 200 nm méretű nanorészecskéket állítottak elő, amelyek alkalmasak a hidrofób tulajdonságú paclitaxel

becsomagolására és célzott szállítására. [80] A hialuronsavat hidrofób oktadecil oldalláncokkal látták el. Az így keletkező graftolt molekula önrendeződik egy termodinamikailag kedvezőbb mag-héj szerkezet, polimer micella kialakításával, melynek hidrofób magja alkalmas a paclitaxel biztonságos szállítására. A nanorészecskéket utólag folsavval reagáltatták (karbodiimid technikával), megvalósítva ezáltal a hialuronsav alapú nanorendszer kettős célzó tulajdonságát: a folsav révén a folát receptorok célozhatók, míg a hialuronsavval a CD44 receptorok.

A biopolimer alapú, folsav célzó molekulát tartalmazó biopolimerek között a kitozánnak van az egyik legjelentősebb irodalmi háttere. [84-87]

Előállítottak és tanulmányoztak olyan kitozán alapú rendszereket, amelyekben a kitozánhoz linkerrel (EDBE) keresztül kapcsolják a folsavat. A kutatók beszámoltak ezen 200-250 nm-es rendszerek antioxidatív hatásáról [84], illetve vankomicin szállító tulajdonságáról [85].

Folsavval módosított kitozánnal DNS is szállítható. [86] A 120 nm méretű nanorészecskéket komplex koacervációval állították elő: a kitozánhoz közvetlenül kapcsolják a folsav célzó molekulát (karbodiimid technikával), majd a módosított biopolimert DNS-sel elegyítették. Ion-ion kölcsönhatás révén nano-méretű, pozitív felületi töltésű folát-targetált nanorendszer jött létre.

A kitozánból olyan önrendező mag-héj micellákat is létrehoztak, amelyek szintén alkalmasak hidrofób gyógyszerhatóanyagok célzott szállítására. [70] A kitozánt hidrofil és hidrofób oldalláncokkal látták el, s az így létrejött amfifil szerkezet önrendeződött. A 135 nm méretű részecskéket utólag folsavval reagáltatták, így garantálva a célzó molekulák felszínen történő elhelyezkedését.

Saját kutatás keretében kitozánból önrendeződéssel olyan folsavval targetált nanorendszert hoztunk létre, amely alkalmas radioaktív ligandum célzott szállítására. [54] A kitozán és a folsavval módosított PGA biopolimerek önrendeződésével stabil nanorészecskéket hoztunk létre és sikerrel jelöltük ^{99m}Tc radioizotóppal. A tanulmányunkban igazoltuk, hogy a folsavval célzott nanorészecskék jelentős mértékben halmozódtak a célzott tumorsejtekben és biztonságosan szállították a SPECT-aktív ^{99m}Tc -t. Az eredmények alapján elmondhattuk, hogy a kialakított célzott nanorendszer potenciális SPECT radiofarmakon lehet.

A szakirodalomban olvashatunk olyan kitozán alapú hibrid rendszerről is, amelyben karbodiimiddel a kitozánhoz közvetlenül kapcsolják a folsavval alakított ki nanorészecskéket, melyekkel szén nanocsöveket funkcionálisítottak génszállítás megvalósítása céljából. [87]

A természetes biopolimerek mellett egyre nagyobb figyelmet kapnak a kutatás és az alkalmazás terén is a biodegradábilis, szintetikus polimerek. [82] Ezen polimerek egyik jelentős képviselője a PLGA, amely egy biodegradábilis kopolimer. Ezen polimer célzott szállítása is kutatás tárgyát képezi. Olyan 100 nm-nél kisebb PLGA-PEG részecskéket állítottak elő és hasonlítottak össze, amelyek egyik származéka RGD-vel targetált, a másika pedig folsavval. [88] A nanorészecskék felületének vizsgálata során a kutatók azt tapasztalták, hogy a hasonló módon előállított két rendszer közül a jobb vízoldható tulajdonságú PLGA-PEG-RGD célzó molekuláinak közel 100%-a a felszínen található, míg ez az arány a PLGA-PEG-FA esetén a folsavra nézve csupán 20%. Ezen arányok közötti különbségek is hozzájárulhattak ahhoz, hogy a célzó tulajdonságok összehasonlítása során is jelentős eltérés mutatkozott a kétféle rendszer között: az RGD-t tartalmazó nanorészecskék koncentrációjának növelésével növekedett a célzott sejtek általi felvétel, míg a folsavval targetált részecskék esetében átlagosan 50%-os érték volt mérhető.

2.4. Kontrasztanyagok

2.4.1. Kontrasztanyagok, radiofarmakonok. Általános ismertető

A radiológiában a kontraszt a kép legvilágosabb és legsötétebb pontja közötti világosság-különbség. A kontraszt teszi lehetővé a vizsgáló számára az elváltozások felismerését. [89] 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.” [90]

A kontrasztanyagok olyan vegyületek, amelyek alkalmazásával a keletkező kép kontrasztosabb lesz, melynek következtében a tanulmányozott területeken az anatómiai rendellenességek, a szöveti struktúrák, szervi elváltozások jobban detektálhatóvá válnak.

A speciális tulajdonságú kontrasztanyagok különböző mértékben lépnek kölcsönhatásba a vizsgált szervek szöveteivel, különböző mértékben halmozódnak, ezáltal változtatják a vizsgált területek kontrasztját és könnyebb detektálhatóságot tesznek lehetővé.

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

A röntgen-, ultrahang- és MR-képkeltő eljárások során a kontrasztanyagok használatának indikációi vannak, esetenként az anatómiai elváltozások a kontrasztanyag alkalmazása nélkül is kimutathatók.

A nukleáris medicinában elterjedt pozitron emissziós tomográfia (PET), egyfonotos emissziós komputer tomográfia (SPECT) diagnosztikai eljárások hatékonyan egészítik ki az említett anatómiai vizsgálatokat. „A nukleáris medicina nyílt radioaktív izotópokat (radiofarmakonokat) diagnosztikus vagy terápiás célra felhasználó önálló orvosi szakterület.” [91]

A nukleáris medicinában használt PET és SPECT funkcionális képkeltő eljárások a szervek, szövetek működését jelenítik meg, hatékonyan kiegészítve a morfológiai elváltozásokat megjelenítő eljárásokat. Ezen funkcionális képkeltő eljárásokhoz szükségesek a radiofarmakonok, melyek a PET esetében pozitront sugárzó izotópokkal jelölt vegyületek, míg a SPECT esetében gamma sugarakat kibocsátó izotópokkal jelölt anyagok.

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

2.4.2. Nanorendszer alapú kontrasztanyagok

A diagnosztikai képkeltő 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 kontrasztfeloldásának növelése céljából.

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

A szakirodalomban számos újszerű kontrasztanyag előállítását leíró közlemény olvasható, melyek között a CT- és az ultrahang- mellett az MR-kontrasztanyagok fejlesztése kap nagy hangsúlyt.

A nanorészecskékre épülő CT-kontrasztanyagok fejlesztésében legjelentősebbek a jódozott származékokra [92-94] és az arany nanorészecskékre irányuló kutatások [95-97]. A jódtartalmú röntgen-kontrasztanyagokat ma is elterjedten alkalmazza az orvostudomány, de a

mellékhatások csökkentése és az érzékenység növelése érdekében számos újszerű, jódtartalmú CT-kontrasztanyag fejlesztése folyik. A szakirodalom beszámol jódozott lipidről, amely 50-150 nm liposzóma részecskékké önrendeződik [92], jódozott monomerek emulziós kopolimerizációjával előállított nanorészecskékről [93], hidrofób jódozott olajok ~100 nm méretű emulziócseppekbe történő becsomagolásáról [94].

A CT-kontrasztanyagok között egyre növekvő érdeklődés kíséri az arany nanorészecskék fejlesztését. Számos közlemény számol be néhány nm méretű arany részecskék előállításáról, felületi stabilizálásáról, valamint ezek CT-kontrasztanyagként való alkalmazásáról. [95-97] Az arany nanorészecskék előállítása egyszerűen kivitelezhető, a kutatási terület kihívása ezen nanorészecskék stabilizálása, a biztonságos alkalmazás elérése céljából.

A nano mérettartományba eső ultrahang-kontrasztanyagok fejlesztése terén nagy hangsúlyt kap az ún. üreges (hollow) részecskék [98], mikrobuborékok előállítása és stabilizálása [99], valamint ezen rendszerek továbbfejlesztésével duális kontrasztanyagok [95,100], illetve multifunkcionális kontraszt- és terápiás anyagok [101,102] fejlesztése.

2.4.2.1. MR-kontrasztanyagok

Napjainkban a mágneses rezonancia képalkotás (MRI) az egyik legfontosabb diagnosztikai képalkotó módszer. Előnyös tulajdonságai közé tartozik, hogy nem invazív módszer, és jó kontraszt és térbeli felbontású képet ad a lágyrészekről.

A mágneses rezonancia jelensége az atommag impulzusmomentumának nevezett tulajdonságán alapszik. A szervezetben nagy számban jelenlévő páratlan nukleonszámú hidrogénatomok erős mágneses térbe helyezve nagyfrekvenciájú rádióhullámokkal gerjeszthetők, majd gerjesztés után az energiát kisugározzák, relaxálódnak. A kisugárzott rádióhullámokat a berendezés felfogja, képpontként méri és elemzi, majd képpé alakítja.

Az utóbbi évtizedekben az MRI rendkívül gyorsan fejlődő képalkotó módszer, mely különös jelentőséggel bír többek között a neurológia, kardiovaszkuláris és onkológiai területeken.

Az MRI nagy felbontású, nagy érzékenységű, anatómiai képet ad a vizsgált területről. Az MRI alkalmazásával a szöveti elváltozások, anatómiai rendellenességek jól detektálhatók a vizsgált területek proton denzitásának kimutatása alapján, amely a szürke skálán jelentős kontrasztot eredményez. A megjelenő kontraszt alatt azon szignálintenzitás-különbségeket értjük, amelyek lehetővé teszik a diagnózist.

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. [103,104]

Az MR-képpalkotásban kétféle relaxációt különböztetünk meg: az egyik a T1, a másik a T2 relaxáció. A T1 (spin-rács) relaxáció az elemi mágnes (proton) és környezete közötti kölcsönhatásra, míg a T2 (spin-spin) relaxáció az elemi mágnesek (protonok) közötti kölcsönhatásra utal.

Számos kutatás eredménye számol be a gadolínium, mint paramágneses fémion komplexeinek előállításáról, vizsgálatáról, és MR-kontrasztanyagként történő alkalmazásáról. [6,105] 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. [106,107] Mindazonáltal a kis molekulatömegű Gd-kelátok komoly hiányosságai – mint pl. rövid tartózkodásuk és gyors kiürülésük a vérből (gyors kiválasztódásuk a vesén keresztül) – nem hagyhatók figyelmen kívül.

A hiányosságok elkerülése és javítása érdekében számos makromolekulás hordozót állítottak elő a paramágneses Gd(III)-szállítás céljából. Ezen fejlesztések között fellelhetők proteinek [108], poliszacharidok [5], vízdoldható fullerének [109], szén nanocsövek [110], dendrimerek [111], liposzómák [112], polimer micellák [113], és számos egyéb természetes és szintetikus biokompatibilis polimer [114] vagy polielektrolit komplex [115].

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-ok fejlesztése intenzíven kutatott terület azok MR-kontraszt hatása és fém-oxid jellege miatt egyaránt. A SPION tartalmú rendszerek alkalmasak számos orvostudományi felhasználási célra, mint pl. MR-kontrasztanyagok [116], mágneses hőkezelés (hipertermia) [117], illetve célzott gyógyszerhatóanyag-szállítás [118].

Intenzív kutatás irányul SPION-ok előállítására, vizsgálatára, felületi módosítására és stabilizálására, felhasználási lehetőségeire. [119] Számos makromolekuláról bizonyosodott be, hogy alkalmas SPION-ok burkolására és ezáltal stabilizálására. Ilyen polimer pl. a kitozán [120], dextrans [121], alginát [122], illetve több más szintetikus [123,124] vagy természetes polimer [125]. A stabilizálást eredményező burkolás mellett nagy figyelmet kap a

szakirodalomban a SPION szállítása is, amelyre liposzómákat [126], mikrobuborékokat [100], nano- [127] és mikrorészecskéket [128] fejlesztettek ki.

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. [129]

2.4.2.2. MR-kontrasztanyagok biopolimer alapú nanorendszerekből

A paramágneses Gd(III)-iont szállító makromolekulás nanorendszerek között különböző szerkezetű nanohordozók előállításáról és vizsgálatáról számol be a szakirodalom. Előállításra kerültek nano mérettartományba eső, nanorészecskékké formálódó polimer micellák [113,130], polielektrolit komplexek [115], térhálós nanorészecskék [131,132].

A polimer micellák és a polielektrolit komplexek keletkezésének is az önrendeződés az alapja. A polimer micellák formálódásának fő hajtóereje a kedvezőbb termodinamikai állapot elérése. A polielektrolit komplexek önrendeződését az ellentétes töltésű polielektrolitok közötti ion-ion kölcsönhatás irányítja.

PEG-*b*-poli(L-lizin) blokk kopolimerek önrendeződése révén polimer micellák előállításáról számoltak be japán kutatók. [130] A polimerhez kovalensen kapcsolták a Gd(III)-iont komplexáló DTPA-t, és ezáltal 40 nm méretű részecskék, valamint 225 nm-es aggregátumok keletkeztek. Kimutatták, hogy a polimer micellák hatékony MR-kontrasztanyagok, melyek elsősorban a májban, lépben, vesében, és a tanulmányozott colon26 típusú tumorban halmozódnak *in vivo*.

Kitozán és dextrán-szulfát önrendeződésével polielektrolit komplexek jönnek létre. [115] Ezen nanorészecskék paramágneses MR-kontrasztanyaggá alakítását többféle módon valósították meg. Készítettek olyan részecskéket, amelyekben a polielektrolitokhoz ion-ion kölcsönhatással kapcsolták a paramágneses Gd(III)-iont, illetve előállítottak olyan kontrasztanyagot is, amelyben a Gd(III)-iont komplexáló DTPA-t a kitozánhoz kapcsolták kovalensen, karbodiimiddel, majd ezt a polimer hordozót reagáltatták az ellentétes töltésű dextrán-szulfáttal, jó kolloid stabilitású nanorészecskékké történő önrendeződés során. Kimutatták a keletkező polielektrolit komplexek megfelelő MR-aktivitását, igazolták nem toxikus jellegét, valamint tanulmányozták biodisztribúcióját.

A kitozán részvételével olyan polielektrolit komplexet is létrehoztak, amelyben a negatív töltésű biopolimer DNS volt. [133] Ezen nanorendszer esetében is kovalensen kapcsolták a kitozánhoz a Gd(III)-iont komplexáló DTPA-t, és ez a biopolimer hordozó önrendeződött a DNS makromolekulával, 30-150 nm részecskéket hozva létre.

Biopolimer alapú, térhálós paramágneses kontrasztanyagra is található példa a szakirodalomban. A térhálósítással kialakítható a nanorészecske, de a biopolimerek kovalens módosítása révén azok veszíthetnek kedvező biológiai tulajdonságaikból.

Glutáraldehiddel térhálósított, DTPA-val komplexált Gd(III)-iont szállító kitozán és HSA nanorészecskék előállításáról és vizsgálatáról is beszámol a szakirodalom. [132] Az emulzióban előállított térhálós kitozán alapú paramágneses kontrasztanyag esetében

tanulmányozták a reakció körülmények hatását a keletkező kontrasztanyag tulajdonságaira. A térhálós HSA esetében a választott technikával 240 nm méretű részecskéket állítottak elő, és tanulmányozták a toxicitását, tumorbeli felvételét.

A paramágneses Gd(III)-ion szállítására alkalmas nanorendszerek fejlesztésével szemben a SPION esetében elsősorban annak felületi stabilizálására, felületi burkolására helyeződött a fő szakmai hangsúly.

A SPION erős MR-aktivitású, előállításuk egyszerűen és pontosan kivitelezhető, viszont aggregációra hajlamos. A stabilitás elérése érdekében a felületét módosítani, burkolni szükséges, illetve a SPION-t eloszlatni valamely erre alkalmas nanorendszerben. [119,134]

A biopolimerekkel stabilizált SPION rendszerek esetében több olyan tanulmány is olvasható, amelyben az előállítás és fizikai-kémiai karakterizálás mellett megtörténik a képződött rendszer *in vitro*, illetve *in vivo* tesztelése is, szuperparamágneses MR-kontrasztanyagként történő felhasználás céljából. [121, 135,136]

A SPION, mint néhány nm-es részecske biopolimerekkel történő stabilizálását általában egy- [121,136] vagy kétlépéses [135,137] reakciókban hajtják végre. Egylépéses *in situ* előállítás során a SPION részecskéket a biopolimer jelenlétében állítják elő Fe(II)- és Fe(III)-ionokból különböző módon. Megtalálható a szakirodalomban a SPION *in situ* előállítása és burkolása pl. kitozán [136], dextrán [121,135] vagy alginát [138] jelenlétében. Egy adott szintézissel kitozán jelenlétében gamma-sugárzással állítják elő a SPION-t, és a keletkező stabil 90 nm-es részecskéket *in vitro* és *in vivo* is tesztelik. [136] Dextrán, valamint alginát jelenlétében történő *in situ* előállítás során tanulmányozták a keletkező stabil szuperparamágneses rendszerek tulajdonságait (pl. méretét, aggregációs hajlamát, stb) az adott biopolimer koncentrációjának, illetve arányának változásával. Dextrán esetében azt tapasztalták, hogy adott biopolimer koncentráció esetén létezik egy olyan kritikus biopolimer-SPION arány, amely alatt nem keletkeznek szeparált részecskék, aggregáció figyelhető meg. [121] Az alginát esetében a biopolimer koncentrációjának hatását tanulmányozták. [138] Azt tapasztalták, hogy az alginát koncentrációjának növelésével nagyobb méretű részecskék keletkeznek.

Számos tudományos közlemény számol be biopolimerrel stabilizált SPION kétlépéses szintéziséről. [135,137] Ezen esetekben külön reakcióban történik a SPION előállítása, majd utólag történik annak beburkolása, eloszlatása. PLGA biopolimerrel emulzióban burkolták be az előzőekben előállított SPION-t. [124] PEG-PAsp blokk-kopolimerrel vizes közegben keverték össze a SPION-t, hosszúkás alakú, stabilizált nanorészecskéket eredményezve [123].

Kétlépéses reakciókban előállított szuperparamágneses térhálós nanorészecskékről is beszámol a szakirodalom. Térhálós hialuronsav esetében a már meglévő keresztkötött biopolimerhez utólag keverték a SPION-t, miközben 85 nm méretű részecskék keletkeztek. [125]

Tripolifoszfáttal térhálósított kitozánban elosztatott SPION-t úgy állították elő, hogy a kitozán és a SPION elegyéhez utólag adták a térhálósítót. [137] Azt tapasztalták, hogy a SPION nélküli térhálós kitozán 150 nm méretű részecskéinek mérete 120 nm-re csökken a SPION jelenlétének köszönhetően, mely méret kis mértékben változhat a SPION koncentrációjának változtatásával. A keletkező rendszerek vizsgálata során kimutatták, hogy azok kiváló MR-aktivitással rendelkeznek és CR-2522 bőr fibroblast sejtvonalon tanulmányozva nem toxikusak.

2.4.2.3. *Targetált MR-kontrasztanyagok*

A szakirodalomban számos paramágneses és szuperparamágneses MR-kontrasztanyag előállítását és vizsgálatát publikálták. Ezen fejlesztések célul tűzték ki a hatékony, speciális tulajdonságokkal rendelkező rendszerek létrehozását. Továbbfejlesztésük több vonalon folyik: duális kontrasztanyagok előállítása [100,139,140], gyógyszerhatóanyagot is szállító kontrasztanyagok fejlesztése ún. „teragnosztika” céljára [102,141,142], illetve targetált kontrasztanyagok [143-146] előállítása.

Az MR-képzéskészítésre 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 tesznek egy időben elhúzódó MR-vizsgálatot is.

A tumorspecifikusság elérése érdekében a kontrasztanyagokhoz célzóligandum kapcsolható, amely irányítja a kontrasztanyagot a célzott tumorsejtek adott receptoraihoz. A célzó molekulák között találhatóak kis molekulák (pl. folsav) [73], peptidek [143], monoklonális antitestek (pl. herceptin) [144], illetve egyéb ligandumok [145].

A tumorterápiában a folsav széles körben alkalmazott célzó molekulák. [146,147] Korábban ugyanis több kutatás számolt be arról, hogy számos humán tumorsejt overexpresszál folát receptorokat a felszínén és ennek megfelelően nagy affinitást mutat a folsav molekulára nézve. [75,77] Mindazonáltal az egészséges sejtek többsége csak korlátozott számban expresszál folát receptorokat a felszínén.

A folsavval targetált MR-kontrasztanyagok irodalmában találhatunk gadolinium tartalmú paramágneses [148-150], valamint SPION tartalmú szuperparamágneses kontrasztanyagra [140,151] is példát.

Amerikai kutatók olyan ötödik generációs (G5) PAMAM dendrimerről számoltak be, amely DOTA komplexképzővel megkötött Gd(III)-ionokat szállít, folsavval targetált, és ezáltal tumorspecifikus MR-kontrasztanyagként alkalmazható. [148] A targetált paramágneses dendrimer hatását folát receptorokat overexpresszáló KB sejtvonalon tesztelték *in vitro* és *in vivo*. Megállapították, hogy a folsav targetálás hatékonyan működött: a folátos nanorendszer specifikus és szignifikáns tumor-halmozódást mutatott.

Szintén DOTA komplexképzővel megkötött gadoliniumot szállító folát-targetált liposzómákról is ír a szakirodalom. [149] A 100 nm-es részecskéket tartalmazó nanorendszert IGROV-1 sejtvonalon tesztelték, és azt tapasztalták, hogy a folsavval történő targetálás következtében négyszer jobb tumor-halmozás volt elérhető.

DOTA-val komplexált gadolínium iont szállít az a folsavval targetált csillag kopolimer is, amely speciális amfifil struktúrájának köszönhetően micellává záródik, és ezáltal paclitaxel becsomagolására is alkalmas. [150] A multifunkcionális nanorendszert folát receptorokat overexpresszáló HeLa sejtvonalon tesztelték *in vitro*, valamint egészséges állatmodellen vizsgálták annak biodisztribúcióját. A gyógyszerhatóanyagot is szállító paramágneses targetált nanorendszer alkalmazásával ugyanis nem invazív módon nyomon követhető annak halmozódása és eloszlása a szervezetben.

Folsavval targetált lipofil SPION előállításáról és vizsgálatáról számoltak be koreai kutatók. [151] Az előállított 5,5 és 11 nm méretű folsavazott rendszerek tanulmányozása során azt tapasztalták, hogy a KB sejtekben jól halmozódnak a részecskék, és az általuk kiváltott relaxációs időváltozás arányos a vas-tartalommal.

Poliakrilsavval stabilizált SPION-hoz PEG linkerrel keresztül kapcsolták a folsavat, és az így létrejövő nanorendszer hatékonyságát tesztelték FR(+) és FR(-) KB sejteken. [140] Azt tapasztalták, hogy a folsavval targetált rendszer szignifikánsan nagyobb mértékben halmozódott az FR(+) sejtekben, mint a folsav nélküli, míg az FR(-) sejtek esetén a nanorészecskék halmozódása nem függött a folsav jelenlététől; mely különbség az *in vitro* MR-felvételeken is megmutatkozott.

2.5. Célküztüzések

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 előállításának és preklinikai tesztelése volt, amelyek képesek a hozzájuk kapcsolt célzó molekula 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 előállításának 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 szerveleszlás tanulmányozását;
- a T1 és T2 kontrasztanyagok relaxációs időkre gyakorolt hatásának tanulmányozását mind *in vitro*, mind *in vivo* körülmények között.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Felhasznált anyagok

A kitozánt a Sigma-Aldrich Kft.-től vásároltuk. Felhasználás előtt nagy tisztaságú 0,01 M-os sósavban oldottuk, 5 μm -es szűrőn (Ultra Cruz, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Németország) szűrtük, nagy tisztaságú MILLIQ vízzel szemben dializáltuk, majd a szilárd anyagot liofilizálással nyertük ki. A kitozán határviszkózitását Ostwald-féle viszkoziméterrel határoztuk meg. A határviszkózitás érték felhasználásával a viszkozitás szerinti átlagos molekulatömeget a Mark-Houwink egyenlet alapján számítottuk. [152] A kitozán viszkozitás szerinti átlagos molekulatömege $M_v = 320$ kDa volt.

A poli- γ -glutaminsavat (PGA) a Vedan (Taichung, Taiwan) cégtől vásároltuk. Felhasználás előtt nagy tisztaságú MILLIQ vízben oldottuk, 5 μm -es szűrőn szűrtük, nagy tisztaságú MILLIQ vízzel szemben dializáltuk, majd a szilárd anyagot liofilizálással nyertük ki. Az átlagos molekulatömegének meghatározása vizes közegű méretkizárásos kromatográfiával (SEC), Waters Ultrahydrogel 2000 oszlopon történt, PBS-ben, 7,4-es pH-n, poli-akrilsav sztenderdek felhasználásával. A poli- γ -glutaminsav tömeg szerinti átlagos molekulatömege $M_w = 282$ kDa volt. Tisztítás után a biopolimerek toxicitását MTT teszttel vizsgáltuk.

Az anyagtudományi szintézisekhez használt 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilkarbodiimid metiljodidot, folsavat, gadolinium(III)-klorid hexahidrátot, vas(III)-klorid hexahidrátot, vas(II)-klorid tetrahidrátot, fluoreszcein-izotiocianátot és dimetil-szulfoxidot a Sigma-Aldrich Kft.-től (Budapest, Magyarország) rendeltük, analitikai tisztaságban. A reakciók során használt sósavat, nátrium-hidroxidot, nátrium-kloridot, glükózt, ammóniaoldatot, valamint a N_2 gázt a VWR International Kft.-től (Debrecen, Magyarország) rendeltük.

Az *in vitro* vizsgálatok elvégzése során használt tripszint, etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA), RPMI 1640-t, magzati borjúsérumot (FBS), nátrium-azidot, MTT reagenst, formaldehidet, valamint a PBS és citrát puffer elkészítéséhez szükséges anyagokat a Sigma-Aldrich Kft.-től rendeltük, analitikai tisztaságban.

A folát receptor meghatározáshoz szükséges LK26 folát receptor ellenes elsődleges antitestet az Abcam-től (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.

Az *in vivo* vizsgálatok során használt Nembutal, Ketamin, Xylazin, nátrium-barbiturát és dietil-éter anyagokat a Sigma-Aldrich Kft.-től rendeltük analitikai tisztaságban.

3.2. Kísérleti módszerek

3.2.1. A PGA reakciója folsavval

A PGA-t ($m = 60$ mg, $n = 0,465$ mmol) egy 150 ml-es főzőpohárba mértük, és 100 ml desztillált vizet adtunk hozzá. A feloldódás után az oldatot jeges hűtéssel $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra hűtöttük.

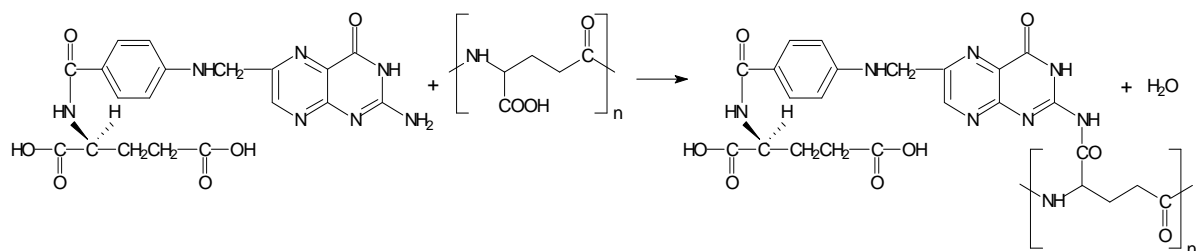
Az ekvivalensnyi 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilkarbodiimid metiljodidot ($m = 13$ mg) bemértük egy penicillines üvegbe és 5 ml desztillált vízben oldottuk. A feloldódás után jégen hűtöttük.

Az oldatokat hidegen összeöntöttük, majd egy óráig jégen, egy óra hosszat szobahőmérsékleten kevertettük.

A folsavat ($m = 21,3$ mg, $n = 0,0446$ mmol) feloldottuk $V = 4$ ml DMSO-ban. A két óra kevertetés után a folsav oldatot hozzácsepegtettük a PGA-karbodiimid reakcióelegyhez. A reakció ideje 24 óra volt, szobahőmérsékleten (10. ábra).

A folsavval módosított PGA-t (PGA-FA) tartalmazó oldatot dialízissel tisztítottuk, regenerált cellulóz dialízis zsákban (Dialysis Tubing Cellulose Membrane 43 mm x 27 mm, Sigma-Aldrich) desztillált vízzel szemben 7 napig.

A PGA molekulához kötődő FA molekulák számát UV-VIS spektrofotometriával becsültük meg a $\lambda_{\text{max}1} = 368$ nm és a $\lambda_{\text{max}2} = 283$ nm hullámhosszakhoz eső maximális adszorpciós értékek alapján.



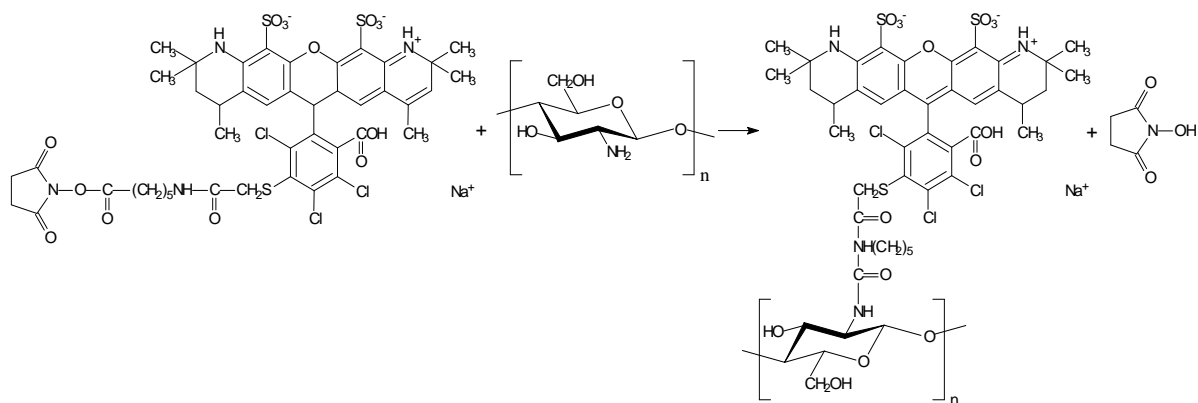
10. ábra: A PGA folsavval történő jelölésének sematikus ábrája

3.2.2. A kitozán festése Alexa Fluor 546-szukcinimidil-észter festékkel

Mágneses keverővel ellátott 10 ml-es főzőpohárba bemértünk $m = 2$ mg ($0,0124$ mmol) kitozánt és 2 ml desztillált vizet adtunk hozzá. A poliszacharid oldódását $0,1$ M sósav adagolásával segítettük. A feloldódott kitozán savas oldatának pH-ját $6,5$ -re állítottuk be $0,1$ M NaOH oldattal.

A kitozán oldathoz ($V = 2$ ml, $c = 1$ mg/ml) kevertetés közben hozzáadtunk $V = 5$ μ l Alexa-546-szukcinimidil-észter festéket. A festés reakcióideje 24 óra volt, szobahőmérsékleten (11. ábra).

A megfestett kitozánt (CH-AF) tartalmazó oldatot dialízissel tisztítottuk regenerált cellulóz dialízis zsákban desztillált vízzel szemben 7 napig.



11. ábra: A kitozán reakciója Alexa Fluor 546 festékekkel

3.2.3. A kitozán festése fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC)

A kitozánt ($m = 10$ mg, $n = 0,0620$ mmol) desztillált vízben ($V = 10$ ml) szolubilizáltuk, az oldódását 0,1 M sósavval segítettük, végül az oldat pH-ját 6,5-re állítottuk 0,1 M NaOH oldattal.

A FITC-t DMSO-ban oldottuk, $c = 1$ mg/ml koncentrációjú oldat keletkezése mellett. A kitozán oldathoz intenzív kevertetés mellett $V = 250$ μ l FITC oldatot csepegtettünk. A festés reakció ideje 24 óra volt, szobahőmérsékleten. [60]

A FITC-vel jelölt kitozán oldatot dialízissel tisztítottuk regenerált cellulóz dialízis zsákban desztillált vízzel szemben 3 napig, a tisztaságát UV–VIS spektrofotométerrel ellenőriztük.

3.2.4. Szuperparamágneses vas-oxid nanorészecskék (SPION) szintézise

A SPION-t in situ állítottuk elő folsavval módosított PGA jelenlétében. A PGA-FA-t ($m = 13$ mg) desztillált vízben ($V = 30$ ml) oldottuk. Az oldódás után az oldat pH-ját 0,1 M-os sósavval 2,6-ra állítottuk.

A FeCl_3 -ot desztillált vízben oldottuk fel, $c = 0,22$ mg/ml koncentrációjú oldat keletkezése mellett. A feloldódás után a vas-klorid oldatot ($V = 18$ ml) kevertetés közben hozzácsepegtettük a PGA-FA oldathoz, és a reakcióelegy pH-ját ezután 7,0-ra emeltük

0,1 M-os NaOH-val. Ezután a reakcióelegyet 15 percig nitrogéngáz átbuborékolatásával, inert atmoszféra alatt kevertettük.

Következő lépésben $m = 1,5$ mg $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -ot mértünk ki és adtunk a reakcióelegyhez szilárdan, 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. A reakcióelegyet hagytuk lehűlni, majd a SPION tartalmú, folsavval módosított PGA-t (PFS) regenerált cellulóz dialízis zsákban, desztillált vízzel szemben, 7 napig dializáltuk.

3.2.5. Kitozán és a poli- γ -glutaminsav önrendeződése különböző pH-n

A poli- γ -glutaminsavat (PGA) és a kitozánt (CH) desztillált vízben, szobahőmérsékleten oldottuk fel. A PGA oldat pH-ját 0,01 M-os NaOH-oldattal állítottuk be 9,5 értékre, a CH oldat pH-ját 0,05 M-os HCl-oldattal állítottuk be 4,0 értékre. A nanorészecskék előállítását az azonos koncentrációjú oldatok összeöntésével történt, szobahőmérsékleten, intenzív kevertetés mellett, a megjelölt arányok mellett.

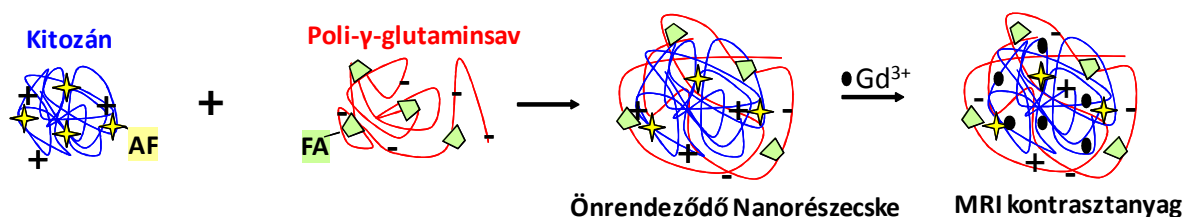
PGA-CH 2:1 jelölés jelentése: 2 térfogatrész PGA-hoz adagoltunk 1 térfogatrész CH-t.

3.2.6. Részecske Gd-komplexének képzése

A GdCl_3 -ot desztillált vízben, szobahőmérsékleten oldottuk fel, $c = 0,4$ mg/ml koncentrációban.

Az elkészített PGA vagy PGA-FA oldatot ($c = 0,3$ mg/ml, $\text{pH} = 9,5$) és a CH oldatot ($0,3$ mg/ml, $\text{pH} = 4,0$) intenzív kevertetés mellett, szobahőmérsékleten öntöttük össze, a megjelölt térfogatarányokban. 5 perc reakcióidő után, intenzív kevertetés mellett csepegtettük hozzá a megadott térfogatrésznyi gadolínium oldatot (12. ábra), majd a reakcióelegyet további 5 percig intenzíven kevertettük.

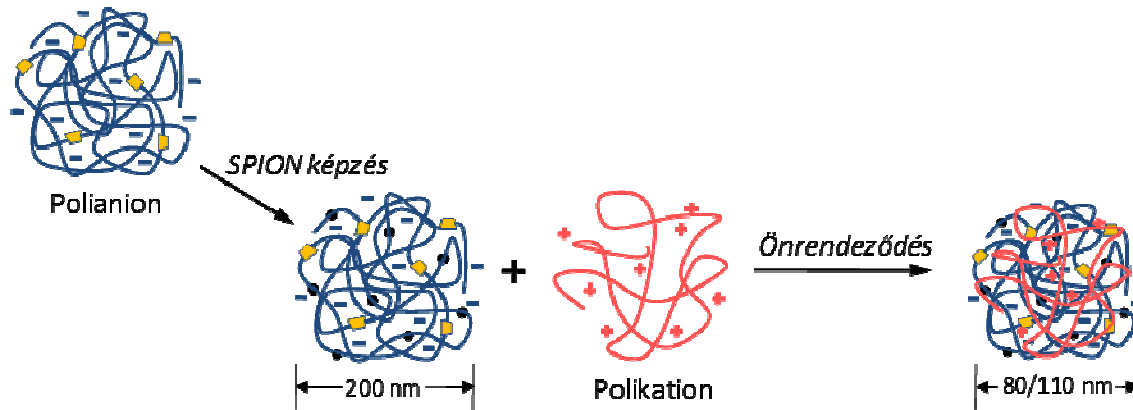
PGA-CH 2:1+0,4Gd jelölés jelentése: 2 térfogatrész PGA-hoz adagoltunk 1 térfogatrész CH-t, majd 0,4 térfogatrész Gd(III) -ion oldatot.



12. ábra: Paramágneses MR-kontrasztanyag előállításának sematikus ábrája

3.2.7. PFS és kitozán önrendeződése

A SPION tartalmú T2 MR-kontrasztanyag nanorészecske előállításához a dialízissel megtisztított PFS koncentrációját 0,3 mg/ml-re, pH-ját 0,01 M-os NaOH-oldattal 9,5-re állítottuk. A kitozán oldat koncentrációját szintén 0,3 mg/ml-re, pH-ját viszont 0,05 M-os HCl-oldattal 4,0 értékre állítottuk be. A nanorészecske előállításához a PFS és a kitozán oldatot intenzív kevertetés mellett öntöttük össze 2:1, illetve 3:1 térfogatarányban úgy, hogy a PFS oldathoz öntöttük a kitozán oldatot (13. ábra).



13. ábra: Szuperparamágneses MR-kontrasztanyag előállításának sematikus ábrája

3.3. Anyagtudományi vizsgálómódszerek

3.3.1. 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. A méréseket 4 mW-os hélium/neon lézerrel felszerelt Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Grovewood, Worcestershire, UK) készülékkel végeztük. A lézer hullámhossza 633 nm. A részecskék méretének mérése $T = 25\text{ °C}$ - on, a részecskékről visszaszórt fény intenzitásából, 173° -os detektorszögénél, automata módban történt, a műszer saját programjával.

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

A száradt, szilárd állapotú részecskék vizuális megjelenítéséhez, valamint azok méretének meghatározásához transzmissziós (TEM) és szkenneléses (SEM)

elektronmikroszkópiát használtunk. A felvételeket JEOL2000 FX-II transzmissziós elektronmikroszkóppal, illetve Hitachi 3000N szkennings elektronmikroszkóppal készítettük. A mintákat szénréteggel bevont G2400C típusú rézhálóra cseppentettük. A felvételek alatt készített elemanalízist elektronsugaras röntgenanalízissel végeztük, egy Si-Li (Lítiummal driftelt szilícium) detektorral felszerelt Oxford Link-Isis típusú energiadiszipatív 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.

3.3.2. Mágneses rezonancia képalkotás (MRI)

Az MR-méréseket egy SIGNA LX 1,5 T típusú, alagút rendszerű 1,5 Teslás humán MRI berendezéssel készítettük. Az eredmények kiértékelését 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. [108, 153] 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 mérésnél az inverziós idők (TI) 50, 100, 200, 400, 800, 1400, 2200, és 3600 ms voltak, a repetíciós idő TR=4000 ms, az echó idő TE=9 ms volt. A szeletvastagság 1,5 mm, a szeletek közötti távolság 0 mm volt. A T2 relaxációs idő meghatározását az LX

ScanTools 2000 programmal végeztük. A méréseknél a repetíciós idő (TR) 4000,0 ms volt, az echó idők (TE) 12,8, 25,7, 38,5, 51,4, 64,2, 77,0, 89,9, 102,7, 115,6, 128,4, 141,2, 154,1, 166,9, és 179,8 ms voltak. A szeletvastagság 2 mm és a szeletek közötti távolság 0 mm volt. [138,150]

3.3.2.1. Nanorészecskék MR-vizsgálata

A $c = 0,3$ mg/ml koncentrációban elkészített 2PGA-FA:1CH-Gd, illetve 2PFS:1CH és 3PFS:1CH nanorészecskéket MRI készülékben vizsgáltuk meg. A nanorészecskékből hígítási sort készítettünk, a paramágneses nanorészecske esetében 300 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációtól 9 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációig, a SPION tartalmú részecskék esetében 75 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációtól 4,7 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációig. A koncentrációsorozatokat MRI készülékben mértük le úgy, hogy a sorozat végére desztillált vizet tettünk.

3.4. In vitro vizsgáló módszerek

3.4.1. 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 Rösltől (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Németország), míg a HeDe sejteket a Debreceni Egyetem Nukleáris Medicina Intézetéből, Dr. Trencsényi Györgytől kaptuk. A sejtek 5% CO_2 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.

3.4.2. Folát receptorok meghatározása

A HeLa és A2780 humán tumorsejtek felszínén lévő folát receptorok számát Cellquant calibrator kit segítségével határoztuk meg. A vizsgálatához 4×10^5 HeLa és A2780 sejtet vettünk fel 30 μl , 1% FBS-t és 0,1% azidot tartalmazó PBS-ben, majd a sejtekhez 10 μl LK26 folát receptor ellenes elsődleges antitestet adtunk 20 $\mu\text{g/ml}$ töménységben. Ezután a sejteket 30 percig inkubáltuk 4°C-on. Az inkubáció után a sejtuszpenziót mostuk, majd a sejtekhez FITC-vel jelzett anti-egér IgG poliklonális antitestet adtunk, és újabb 30 percig, 4°C-on inkubáltuk. Az inkubáció után a sejteket lecentrifugáltuk, 1% szérumot és 0,1% azidot tartalmazó PBS-sel mostuk és FACS csövekbe helyeztük. Ezzel párhuzamosan a kitben lévő

gyöngyökhöz szintén FITC-vel jelzett anti-egér IgG poliklonális antitestet adtunk, majd 30 percig, 4°C-on inkubáltuk. A gyöngyök felületén növekvő mennyiségű, pontosan meghatározott számú egér IgG van, így ezek segítségével a kalibrációs egyenes felvehető.

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. [154]

3.4.3. 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 elvégezni, ezért a módszer alkalmas vegyületek toxikus hatásának megállapítására.

MTT vizsgálat A2780 sejteken: a sejtek egy 96 lyukú sejtenyésző lemezre (Cellstar, Greiner Bio-One, Mosonmagyaróvár, Magyarország) helyeztük, 10.000 sejt/lyuk töménységben. 24 óra múlva a médiumot eltávolítottuk, majd friss médiummal a nanorészecskéket 12 különböző koncentrációban (147 ng/ml-től 0,3 mg/ml-ig) a sejtekre helyeztünk. A kontroll sejtek azonos térfogatú friss médiummal lettek kezelve. [155]

MTT vizsgálat HeLa sejteken: a kísérlet első napján a sejteket egy 96 lyukú sejtenyésző lemezre (Cellstar, Greiner Bio-One) osztottuk, 3.000 sejt/lyuk töménységben, 100 µl fenolvörös nélküli RPMI-ben. A mintát 24 óráig 5% CO₂ tartalmú nedves atmoszférában, 37 °C-on inkubáltuk. A következő napon a sejtekre 10 µl nanorészecske alapanyagot, vagy nanorészecskét tettünk, majd 24 óráig inkubáltuk. A kezelést követően a sejtekről eltávolítottuk a felülúszót, majd 10 µl MTT oldatot (c = 5 mg/ml) adtunk a sejtekhez lyukanként. Három óra elteltével a sejtek lyukanként 100 µl DMSO-t kaptak, majd lemértük az optikai denzitást 492 nm hullámhosszon Microplate Reader segítségével. A citosztázis mértékét %-ban ábrázoltuk a kontroll sejtekhez viszonyítva. [80, 156]

3.4.4. Sejtszámlálás

A kísérlet első napján a HeLa sejteket két darab nyolc lyukú Lab-Tek II CC2 fedőlemez aljú mikroszkóp kamrába tettük ki, 20.000 sejt/lyuk töménységben, 300 µl fenolvörös nélküli

RPMI-ben. A mintát 5% CO₂ tartalmú nedves atmoszférában, 37 °C-on inkubáltuk. 24 óra múlva mind a két nyolc lyukú fedőlemez aljú kamrából két-két lyukban az élő sejteket Bürker-kamrában megszámoltuk. A maradék 6 lyuknál az egyik kamra friss médiumot, a másik pedig friss médiumot és nanorészecskét kapott. A következő napon mind a két kamrából a két-két lyukban lévő élő sejteket újra megszámoltuk, a maradék lyukak pedig friss médiumot, vagy friss médiumot és nanorészecskét kaptak. A sejszámlálást négy napig folytattuk, az eredményeket grafikonon ábrázoltuk.

3.4.5. Konfokális mikroszkópos vizsgálatok

A jelzett nanorészecskék sejtbe jutását konfokális mikroszkóppal és áramlási citometriával is vizsgáltuk. A konfokális mikroszkóppal történt vizsgálatok esetében a kísérlet első napján a HeLa sejteket Lab-Tek II CC2 fedőlemez aljú mikroszkóp kamrákba tettük ki, 20000 sejt/lyuk töménységben, 300 µl fenolvörös nélküli RPMI-ben. A mintát 5% CO₂ tartalmú nedves atmoszférában, 37 °C-on inkubáltuk. Másnapra kitapadtak, és szubkonfluens réteget alkottak a fedőlemezen.

A második napon a jelölt részecskék hozzáadása előtt a sejtek egy részét folsavval telítettük. A telítés menete: 10,8 mg folsavat feloldottunk 1 ml DMSO-ban. Ebből az oldatból kivettünk 4 µl-t, és hozzáadtuk a sejtekhez. Egy órát inkubáltuk, majd az inkubáció után adtuk a sejtekhez a jelölt részecskéket.

A részecskék hozzáadása után a sejteket újabb egy napig inkubáltuk. [88,140]

A harmadik napon a sejteket közvetlenül a mikroszkópos vizsgálat előtt mostuk, így eltávolítottuk azokat a részecskéket, amelyek nem jutottak be a sejtekbe, (nem internalizálódtak). A membránt az első osztályú fő hisztokompatibilitási komplex (MHC I) glikoproteinekre specifikus W6/32 monoklonális antitesthez kapcsolt Alexa Fluor 488 festékkel festettük [157]. A jelölés úgy történt, hogy a kamrákban lévő sejteket először 400 µl PBS-sel, majd 400 µl citrát pufferrel, majd újra 400 µl PBS-sel mostuk. Ezután 100 µl PBS-hez 3,3 µl antitest oldatot (c = 50 µg/ml) adtunk. A jelölést jégben, 40 percig, sötétben végeztük. A mintákat ezután kétszer PBS-sel mostuk, majd 1%-os formaldehid-PBS-sel fixáltuk.

A sejtekről egy OLYMPUS Fluoview FV1000 fluorescens mikroszkóp UPLSAPO 60-szoros nagyítású (numerikus apertúra: 1,35) olajimmerziós objektívvel készítettünk felvételeket. Az Alexa488 fluorescens 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.

3.4.6. Áramlási citometriás vizsgálatok

Az áramlási citometriás internalizációs vizsgálatokhoz a HeLa sejteket 24 lyukú sejttenyésztő edénybe (Cellstar, Greiner Bio-One) helyeztük, a sejtszám lyukanként 50000 sejt volt, a médium 1000 µl fenolvörös nélküli RPMI. Ezután a mintát 24 órán keresztül 5% CO₂ tartalmú nedves atmoszférában, 37 °C-on inkubáltuk. A következő napon a sejteket 0,3 mg/ml koncentrációjú, Alexa Fluor 546 festékkel jelölt nanorészecskével kezeltük, és 24 óráig inkubáltuk. A kezelést követően a sejtekről eltávolítottuk a felülúszót, a sejteket PBS-sel mostuk, majd tripszin-EDTA (0,05% tripszin-0,025% EDTA) oldattal kezeltük. A tripszinezést 10 perc elteltével 10% magzati borjúsérumot tartalmazó RPMI-1640-nel állítottuk le. A sejteket ezután lecentrifugáltuk, PBS-sel mostuk és FACS csövekbe helyeztük. [73,140] A sejtek fluoreszcencia intenzitását áramlási citométerrel (BD FACSAarray 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.

3.4.7. Sejtek előkészítése MR-vizsgálatokhoz

Az első napon 75 cm² alapterületű sejttenyésztő edénybe kitettünk 2×10⁶ HeLa sejtet fenolvörös nélküli RPMI-ben. A sejteket 24 óráig inkubáltuk 37 °C-on, 5% CO₂ tartalmú nedves atmoszférában. A sejtek másnapra kitapadtak, és szubkonfluens réteget alkottak.

MR-vizsgálatra 3 különböző mintát vittünk:

Az első flaskában lévő sejtekhez folsavval targetált 2PGA-FA:1CH-Gd nanorészecskét adtunk, a második flaskában lévő sejtekhez folátmentes 2PGA:1CH-Gd nanorészecskét adtunk. A harmadik flaskában lévő sejteket kontrollként használtuk.

A részecskék hozzáadása után a sejteket újabb egy napig inkubáltuk, majd a harmadik napon a sejtekből tripszin kezeléssel sejtszuspenziót készítettünk. A szuszpenziót lecentrifugáltuk (7 min 1100 RPM), majd citrát pufferrel mostuk, és újra lecentrifugáltuk. A centrifugálás után a sejteket 200 µl steril FA-PBS-ben, egy 5 mm átmérőjű, és 2 cm magas üveghengerbe vettük föl.

A felvételek értékelésénél a ROI-nak (region of interest) az üvegcső belsejében egy 4,5 mm átmérőjű, 63,6 mm² területű kört választottunk.

3.5. In vivo vizsgáló módszerek

3.5.1. Kísérleti állatok

A kísérleteket 18-22 g-os 5-6 hetes nőtény 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. [158]

3.5.2. *In vivo* toxicitás

A nanorészecskék élő szervezetre gyakorolt esetleges toxikus hatását is ki szeretnénk volna deríteni. Ennek érdekében nude egereken *in vivo* toxicitás tesztet végeztünk. A vizsgálatot úgy végeztük, hogy 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. Majd a fiziológiás sóoldat és a nanorészecskék injektálása után mértük az egerek testtömegét. [159]

3.5.3. *Mágneses rezonancia képalkotás in vivo*

3.5.3.1. *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.

Első lépésben 4 mm átmérőjű Gelaspon^R korongokat sterilizáltunk, majd a korongra 10 µl fiziológiás sóoldatban 10⁶ HeDe sejtet helyeztünk. Az állatokat 60 mg/kg Nembutal i.p. adásával elaltattuk, a bal oldali lumbális tájéket szőrtelenítettük, fertőtlenítettük, a retroperitoneumot lumbális metszéssel megnyitottuk, és az előhúzott vese tokja alá a tumorsejteket tartalmazó Gelaspon^R korongot helyeztük. A sebeket sebészi öltéssel zártuk. [160] Az MR-vizsgálatokat a tumorsejtek beültetése után 10 nappal végeztük. A vizsgálat során a tumoros patkány 200 µl specifikus kontrasztanyag nanorészecskét kapott intravénásan 24 órával az MR-vizsgálat előtt. A 24 órás inkubáció után az állatokat 60 mg/kg Nembutal i.p. adásával elaltattuk, az MR-vizsgálatot altatásban végeztük.

3.5.3.2. *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 (0,1 ml/10 g egér testtömeg).

A tumoros állatok specifikus kontrasztanyag nanorészecskét kaptak intravénásan 2 órával a vizsgálat előtt. Az inkubációs idő letelte után az állatokat 60 mg/kg Nembutal i.p. adásával elaltattuk, az MR-vizsgálatot altatásban végeztük.

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

3.6. 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.

4. Eredmények

4.1. Biopolimer alapú nanohordozó

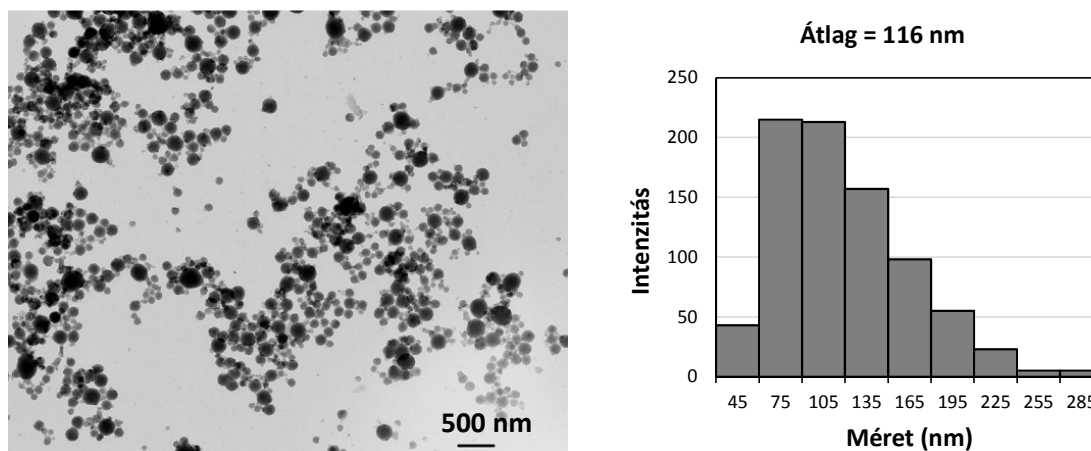
4.1.1. Nanorészecskék, a kitozán és a poli- γ -glutaminsav önrendeződésével pH 3 értéken

A biopolimerek között számos olyan makromolekula található, amelyek szabad, reaktív funkciós csoportja van. Ezen funkciós csoportok révén a vízoldható biopolimerek vizes közegben polielektrolitként viselkednek. A polielektrolit biopolimerek, töltöttségüknek köszönhetően ion-ion kölcsönhatás révén számos stabil, biokompatibilis, biodegradábilis kolloid rendszer kialakítására alkalmasak. Ily módon lehetőség van nanorendszerek, filmek, polielektrolit komplexek, illetve hidrogélek előállítására.

Előtanulmányaink során vizsgáltuk a kitozán és poli- γ -glutaminsav (PGA) biopolimerek önrendeződési folyamatait. Az aminocsoportjainak köszönhetően a kitozán polikationként, míg a karboxilcsoportjai révén a PGA polianionként viselkedhet, megfelelő körülmények között. Az ellentétes töltésű funkciós csoportoknak köszönhetően ezen két biopolimer polielektrolit komplexek kialakulása révén olyan (nano)rendszerek formálására alkalmas, amelyekben a rendszert a funkciós csoportok közötti ion-ion kölcsönhatás tartja össze. Az ion-ion kölcsönhatás nagy előnye, hogy a biopolimerek a kolloid rendszer kialakítása után is megtartják eredeti, kedvező biológiai tulajdonságaikat.

Kutatómunkánk során arra törekedtünk, hogy a kitozán és poli- γ -glutaminsav önrendeződésével hidrofil részecskéket, lehetőleg nanorészecskéket állítsunk elő.

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. (14. ábra).

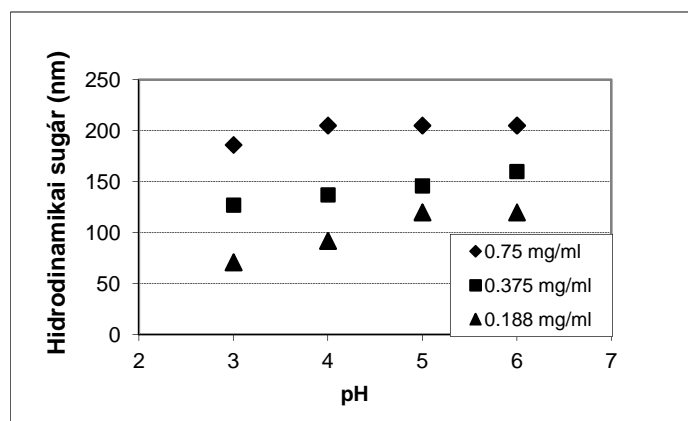


14. ábra: A PGA-CH 1:1 önrendeződő nanorészecské TEM felvétele és méreteloszlása.

A biopolimerek koncentrációjának csökkentésével egyre kisebb és stabilabb részecskék keletkeztek, mely megállapítást részecskeméret és transzmittancia adatok is alátámasztották. Mindamellet megállapítottuk, hogy a kialakuló rendszerek stabilitásában pH = 3-on a rosszabb oldhatóságú kitozán játszik döntő szerepet. Amennyiben az önrendeződéssel létrejövő rendszerekben a kitozán részaránya meghaladta a PGA részarányát, stabilabb részecskék keletkeztek. A jelenséget azzal magyaráztuk, hogy a kitozán oldatban maradásához szükséges a szabad aminocsoportok jelenléte, melyek a nanorészecskeformálódás után stabilizálják a kitozánt és ezáltal a rendszert.

Az erősen savas közegben formált önrendeződő nanorendszerek felhasználása szempontjából tanulmányoztuk a részecskék stabilitását a vizes közeg pH-jának függvényében. Megállapítottuk, hogy mind a létrejött részecskék mérete, felületi töltöttsége, mind a vizes közeg opálossága jelentősen változott a közeg pH-jának növelésével.

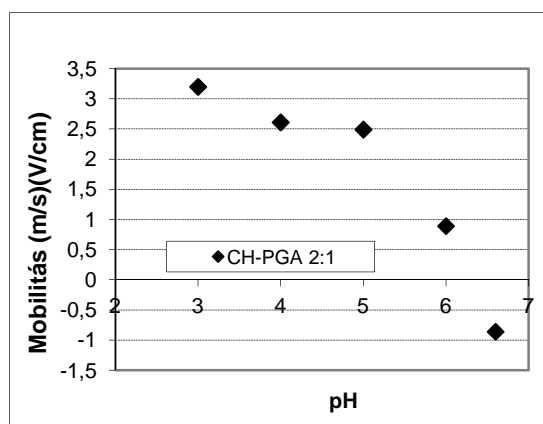
A közeg pH-jának és a kiindulási biopolimer koncentrációnak a növelésével a részecskék hidrodinamikai mérete növekedett, több száz nanométeres részecskék keletkeztek (15. ábra).



15. ábra: A CH-PGA 2:1 részecskék hidrodinamikai mérete a közeg pH-jának és biopolimerek koncentrációjának függvényében.

A közeg pH-jának növelésével az önrendeződő részecskék mérete mellett azok felületi töltöttsége is változott. A pH növelésével a deprotonálódási folyamatok kerültek előtérbe. Mind a PGA karboxilcsoportjai, mind a kitozán aminocsoportjai deprotonálódtak, melynek következtében az önrendeződő rendszerek felületi töltöttsége drasztikusan lecsökkent, és negatívvá vált (16. ábra).

A rossz oldhatóságú kitozán oldatban maradását a protonált aminocsoportjai biztosítják. A deprotonálódási folyamat azt vonja maga után, hogy a kitozán oldhatósága lecsökkent, majd az önrendeződő részecskékkel együtt a kitozán 6-os pH felett kicsapódott.



16. ábra: A CH-PGA 2:1 önrendeződő nanorészecske elektroforetikus mobilitása a pH függvényében. (Mérési körülmények: $c = 0,375$ mg/ml.)

Ezen kísérleti tapasztalatok alapján megállapítottuk, hogy a kitozán és a poli- γ -glutaminsav biopolimerek képesek részecskéket formálni ion-ion kölcsönhatáson alapuló önrendeződéssel, kovalens kötés kialakítása nélkül. Feltártunk számos összefüggést a létrejövő önrendeződő rendszerek tulajdonságai és a reakció körülmények között. Nyilvánvalóvá vált, hogy a 3-as pH-n kialakított önrendeződő rendszerek érzékenyek a közeg pH-jának változtatására: alkalmasak lehetnek savas vizes közegű felhasználásra, de jelen előállítási paraméterek mellett, közel semleges pH mellett kicsapódnak.

4.1.2. Nanorészecskék, a kitozán és a poli- γ -glutaminsav önrendeződésével különböző pH-kon

Kutatómunkánk következő lépéseként olyan önrendeződő nanorendszer előállítását terveztük megvalósítani, ami $\text{pH} \approx 7,4$ -en stabil, s ezáltal *in vitro* kísérletekben, valamint *in vivo* intravénás alkalmazásra is megfelelő.

Előzetes eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a savas körülmények között előállított, önrendeződött nanorendszer pH-ja csak bizonyos határok között változtatható a nanorendszer stabilitásának megtartása mellett, és ezzel a módszerrel $\text{pH} \approx 7,4$ -en nem tudtunk megfelelő méretű és stabilitású részecskéket létrehozni.

A probléma megoldására a polimerek pH-ját különböző értékekre állítottuk, és az összeöntés után ezt már nem változtattuk. Ilyen módon sikerült semlegeshez közeli végső pH érték mellett 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 polimerarányok mellett tanulmányoztuk (1. táblázat).

1. táblázat: Az önrendeződő PGA (c = 0,3 mg/ml, pH = 9,5) – CH (c = 0,3 mg/ml, pH = 4,0) nanorészecskék transzmittancia, méret és pH értéke

| Minta (a biopolimerek aránya) | PGA-CH 1:2 | PGA-CH 1:1 | PGA-CH 2:1 | CH-PGA 2:1 | CH-PGA 1:1 | CH-PGA 1:2 |
|------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Transzmittancia (500 nm) | 82 | 87 | 96 | 87 | 81 | 92 |
| Méret (nm) | 192 | 147 | 285 | 175 | 162 | 360 |
| pH | 6,3 | 7,4 | 8,1 | 6,3 | 7,4 | 8,1 |

A PGA és a kitozán különböző pH-kon történő összeöntése során megállapítottuk, hogy a keletkező részecskék stabilak, a nanorendszerek pH-ja 6,3 és 8,1 között változott az összeöntési arányoktól függően.

Az 1. táblázat eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy a PGA és a kitozán 1:1 arányú összeöntése esetén keletkeztek a legkisebb részecskék. Ez a biopolimerek molekulatömegének arányával, a biopolimerek nanorészecskén belüli orientációjával, valamint a kitozán poliszacharid voltával egyaránt összefüggésben lehet.

Mindazonáltal a transzmittancia és hidrodinamikai méretek között egyértelműen megállapítható tendencia nem figyelhető meg. Megállapíthatjuk viszont, hogy a PGA:CH 1:1 arányú nanorészecskéhez viszonyítva, a PGA részarányának növekedésével nagyobb méretű részecskék keletkeztek, mely részecskék vizes oldata kevésbé opálos volt. Viszont azon esetekben, amikor a PGA részaránya nem haladta meg a kitozánét, hasonló méretű kisebb részecskéket tartalmazó, kissé opálosabb rendszerek keletkeztek. Az opálosság növekedése a rosszabb oldhatóságú kitozán arányának növekedésével is magyarázható, de egyértelmű összefüggés nem tárható fel. Szintén nem állítható fel egyértelmű összefüggés a biopolimerek összeöntésének sorrendje, valamint a részecskeméret és transzmittancia értékek között sem.

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

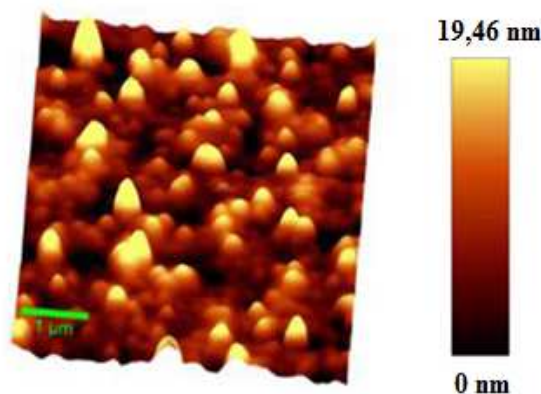
4.1.3. Targetált nanorészecskék létrehozása a kitozán és a poli- γ -glutaminsav önrendeződésével

Olyan, 0,3 mg/ml koncentrációjú, pH \approx 7,4-en stabil, célzó molekulával ellátott önrendeződő nanorendszert kívántunk előállítani és vizsgálni, amely célzottan a

tumorsejtekben halmozódik fel, s ezáltal nanohordozóvá válhat kontraszthatást kiváltó ligandumok, illetve gyógyszerhatóanyagok tumorspecifikus szállítására.

A PGA biopolimerhez annak karboxilcsoportjain keresztül folsav molekulákat kapcsoltunk, melyek célzóligandumként szolgálnak folát receptorokat overexpresszáló tumorsejtekhez. A folsav molekulákat savamid kötéssel, karbodiimid mechanizmust alkalmazva kapcsoltuk a polianionhoz. 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 (17. ábra), míg a hidrodinamikai méret 80 nm és 180 nm között változott, köszönhetően a nanorészecskék vizes közegben kialakult duzzadt állapotának.

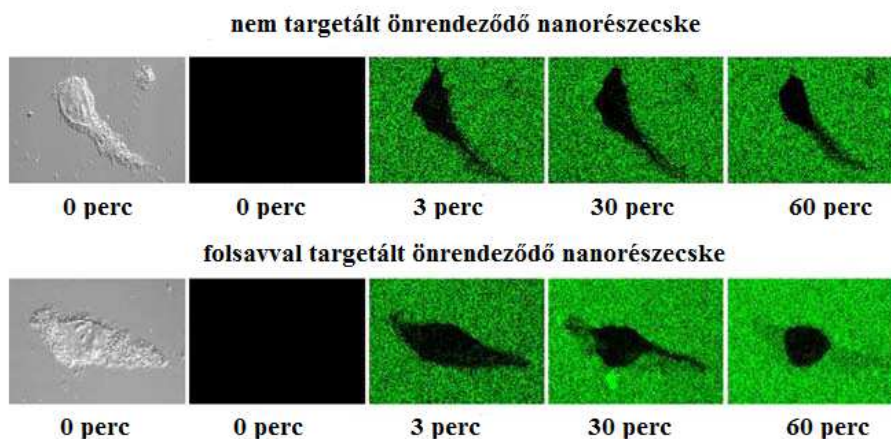


17. ábra: CH-PGA-FA 1:1 önrendeződő nanorészecskék AFM felvétele, a harmadik dimenziót szemléltető színsávval. (Mérési körülmények: $c = 0,3 \text{ mg/ml}$)

A biopolimerek különböző pH-jú oldatainak összeöntésekor keletkező nanorészecskék elektroforetikus mobilitása $u = -2,09 \pm 0,07 \text{ (m/s)(V/cm)}$ volt, amely az alkalmazott pH értékeken teljesen deprotonálódott COO^- és teljes mértékben protonálódott NH_4^+ funkciócsoportok $-1:+0,67$ arányának volt tulajdonítható.

A folát-targetált önrendeződő nanorészecskék hatékonyságát, a nanorészecskéhez kapcsolt folsav célzó hatását, a nanorészecskék *in vitro* internalizációjának vizsgálatával teszteltük A2780/AD, igazoltan folát receptorokat overexpresszáló, petefészek tumorsejtvonalon, konfokális mikroszkóppal. (A konfokális mikroszkóppal történő vizsgálatokhoz a nanorészecskéket fluorescensen, FITC-vel jelöltük.)

Megállapítottuk, hogy a folsavval targetált nanorészecskék átjutottak 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 (18. ábra).

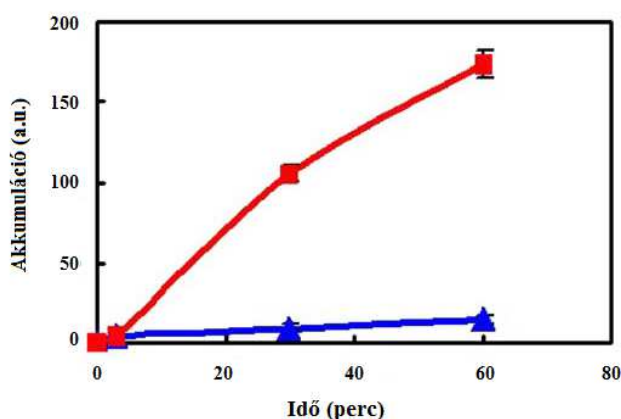


18. ábra: A2780 tumorsejtek konfokális mikroszkópos felvételei nem targetált -, valamint targetált önrendeződő nanorészecskékkel történő kezelés után, az idő függvényében.

Elvégeztük a FITC-vel jelölt nanorészecskék akkumulációjának kvantitatív meghatározását, a vizsgált sejten belüli teljes fluoreszcencia intenzitás kiszámításával.

Azt tapasztaltuk, hogy a folsavval rendelkező, targetált nanorészecskék gyorsabban és jelentős mértékben halmozódnak fel a célzott tumorsejtekben. Ezzel szemben a nem targetált nanorészecskék tumorsejten belüli akkumulációja még 60 perc elteltével is elhanyagolható (19. ábra).

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

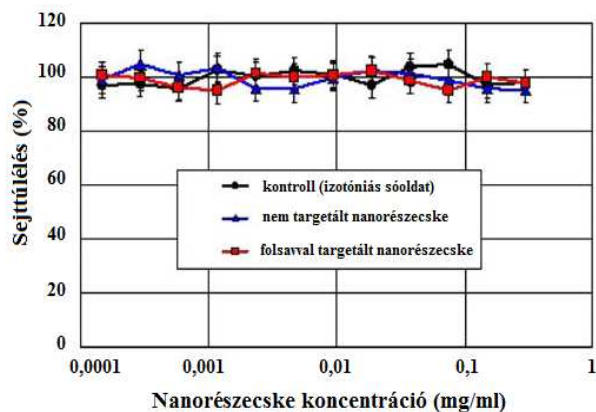


19. ábra: FITC-vel jelölt folsavval targetált (■) és nem targetált (▲) önrendeződő nanorészecskék akkumulációja A2780 sejteken.

Az előállított, targetált nanorészecske hatékony internalizációja mellett fontos annak toxicitása is. A nanorészecske biokompatibilis, biodegradábilis biopolimerek ion-ion

kölcsönhatásán alapuló önrendeződésével jön létre, mégis szükséges kísérleti eredményekkel is alátámasztani a nanorendszer nem toxikus voltát.

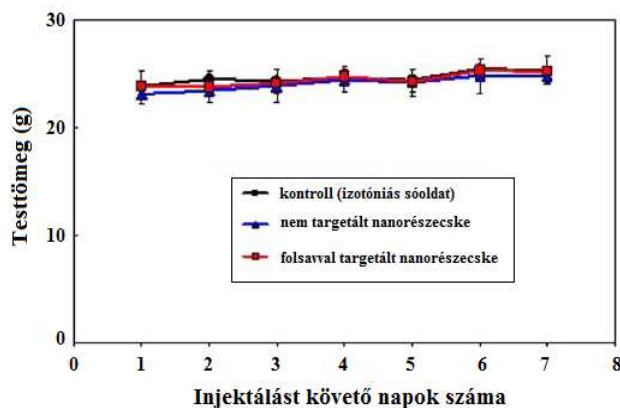
In vitro citotoxicitás és *in vivo* toxicitás vizsgálatokat végeztünk a nanorendszer nem toxikus voltának igazolására. Az *in vitro* citotoxicitás tesztet A2780 sejtvonalon MTT teszttel, míg az *in vivo* toxicitás vizsgálatokat egészséges, immunhiányos nude egereken végeztük. Azt tapasztaltuk, hogy sem a folsavval targetált nanorészecske, sem a folsav nélküli, nem targetált nanorészecske nem volt kimutatható mértékben toxikus. A citotoxicitás teszten, a sejt túlélés során nem mutatkozott különbség a nanorészecskékkel kezelt és a kontroll sejtek között 24 óra alatt (20. ábra).



20. ábra: Folsavval targetált és nem targetált önrendeződő nanorészecskék citotoxicitása A2780 sejtvonalon 24 órás inkubálás után.

(Mérési körülmények: Az adott nanorészecske koncentrációk mellett ábrázolt kontroll sejtek azonos mennyiségű izotóniás sóoldatot kaptak.)

Az *in vivo* toxicitás vizsgálat során, a nanorészecskék injektálását követően mértük az állatok testtömegét (21. ábra).



21. ábra: Folsavval targetált és nem targetált önrendeződő nanorészecskék toxicitása immunhiányos nude egereken.

A vizsgálat alatt testtömegükben nem tapasztaltunk csökkenést, valamint nem tapasztaltunk különbséget a targetált és nem targetált nanorészecskével injektált, valamint kontroll állatok értékei között sem.

Az általunk végzett vizsgálati módszerek eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy a biopolimerek önrendeződésével létrejövő nanorészecskék az általunk használt vizsgálati módszerek alapján nem voltak kimutatható mértékben toxikusak.

4.2. Az önrendeződő nanorészecskék Gd-komplexei

4.2.1. A megfelelő rendszer kiválasztása

A biopolimerekből felépülő, nem toxikus, folsavval targetált nanorészecske mint nanohordozó alkalmas lehet különböző ionok, molekulák célzott szállítására. Ennek megvalósítására tett törekvésünk az volt, hogy a nanohordozót MR-kontrasztanyaggá fejlesszük.

A PGA karboxilcsoportjai révén képes pozitív ionok megkötésére, és ezáltal szállítására.

Koncepciónk szerint az önrendeződő nanorészecskéhez Gd(III)-ionokat komplexáltunk, kialakítva ezáltal egy MRI T1 paramágneses, tumorspecifikus, nanoméretű kontrasztanyagot.

Az önrendeződő nanorészecskéhez utólag GdCl₃ oldatot adtunk, így a gadolínium-ion a kész részecskében lévő szabad karboxilcsoportokhoz tudott kapcsolódni.

A nanohordozóhoz komplexált Gd(III)-ionok megváltoztatták annak tulajdonágait és viselkedését, így szükségessé vált a kívánt paramétereknek megfelelő, paramágneses T1 kontrasztanyag kiválasztása.

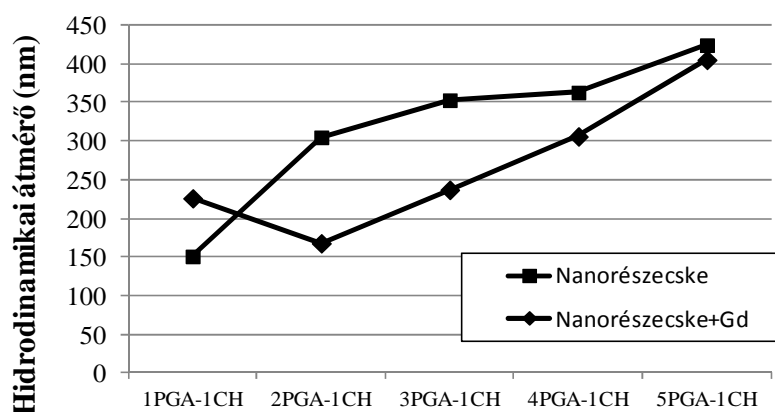
2. táblázat: Az önrendeződő PGA és CH nanorészecskék Gd-komplexeinek transzmittancia, méret és pH értéke (Mérési körülmények: PGA: c = 0,3 mg/ml, pH = 9,5; CH: c = 0,3 mg/ml, pH = 4,0; Gd³⁺: c = 0,4 mg/ml)

| Minta+0,5 Gd(III) | PGA-CH | PGA-CH | PGA-CH | CH-PGA | CH-PGA | CH-PGA |
|------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 1:2 | 1:1 | 2:1 | 2:1 | 1:1 | 1:2 |
| Transzmittancia (500 nm) | 85 | 80 | 85 | 89 | 74 | 75 |
| Méret (nm) | 220 | 167 | 162 | 208 | 176 | 222 |
| pH | 4,93 | 6,11 | 7,49 | 4,93 | 6,27 | 7,38 |

A 2. táblázatban látható, hogy a Gd(III)-ionok hozzáadása után is minden esetben stabil rendszerek keletkeztek. A PGA-CH 1:2, és CH-PGA 2:1 minták kivételével a gadolínium

hozzáadása után opálosabb rendszer keletkezik, mely bizonyítja, hogy a részecskék és a gadolínium között megtörténik az ion-ion kölcsönhatás. A PGA-CH 1:2, és CH-PGA 2:1 minták esetében azért nem tapasztalhatjuk, hogy a rendszer opálosabb lesz, mivel ezekben az esetekben a PGA összes karboxilcsoportját lefoglalja a kétszeres mennyiségű kitozán, így a teljesen víztiszta $GdCl_3$ oldat hozzáadása után nem történik kémiai kölcsönhatás, csak egy egyszerű hígítás, mely a transzmittancia értékek kismértékű növekedését eredményezi.

Ezen tulajdonságok figyelembe vételével olyan önrendeződő nanorendszereket teszteltünk tovább, amelyekben a PGA részarány nagyobb, mint a CH-é.

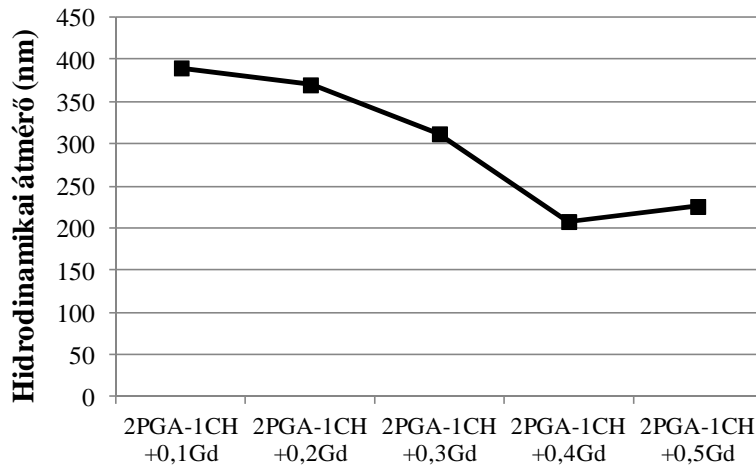


22. ábra: Önrendeződő nanorészecskék és Gd-komplexeik hidrodinamikai méretének változása a PGA részarányának függvényében

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 ebben az esetben volt a legjelentősebb (22. ábra).

A paramágneses kontrasztanyag nanorészecskék formálása során a nanohordozóhoz utólag adott Gd(III)-ionok hatására lecsökkent méretet a nanorészecskék több hétig megtartották, melyből azok stabilitására következtettünk. Ez alapján feltételeztük, hogy a Gd(III)-ionok komplexált formában maradnak a nanorészecskében.

A megfelelő paramágneses kontrasztanyag eléréséhez 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 (23. ábra).



23. ábra: PGA-CH 2:1 önrendeződő nanorészecskék hidrodinamikai mérete a hozzáadott Gd(III)-ionok függvényében

(Mérési körülmények: PGA: $c = 0,3$ mg/ml, pH = 9,5; CH: $c = 0,3$ mg/ml, pH = 4,0;
Gd(III): $c = 0,4$ mg/ml)

A mérési eredményeket összegezve arra a megállapításra jutottunk, hogy a további biológiai vizsgálatokhoz a PGA-CH 2:1+0,4Gd rendszert használjuk. Az így kialakult rendszer fizikai-kémiai paramétereit alkalmassá teszik a paramágneses nanorészecskéket arra, hogy mint potenciális MRI T1 kontrasztanyagot fejlesszük és teszteljük tovább.

4.3. Paramágneses MR-kontrasztanyag előállítása és vizsgálata

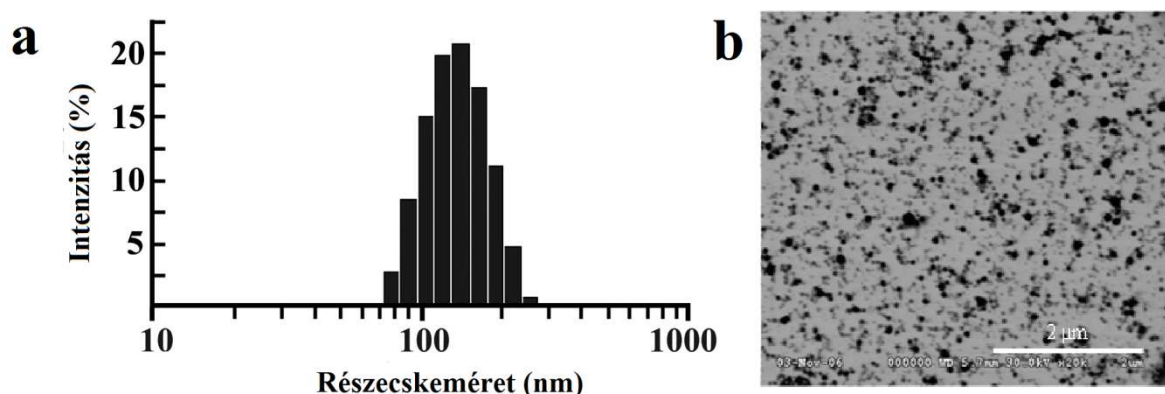
4.3.1. Paramágneses MR-kontrasztanyag fizikai-kémiai vizsgálata

Tumorspecifikus, paramágneses MR-kontrasztanyagot állítottunk elő a PGA és a kitozán önrendeződésével: a PGA-hoz folsavat, mint célzómolekulát kapcsoltunk kovalens kötéssel, majd az önrendeződés után Gd(III)-iont komplexáltunk a nanorészecskéhez. A konfokális mikroszkópos felvételek sikeres elkészítése érdekében a kitozánhoz fluoreszcens festéket, Alexa Fluor 546 szukcinimidil észtert kapcsoltunk.

A nanorészecskéhez kapcsolt FA révén a tumorspecifikus célbajuttatást kívántuk megvalósítani, míg a Gd(III)-ion, mint paramágneses, MRI T1 ligandum az MR szignálintenzitást befolyásolja.

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. A száraz nanorészecskék

méretének és morfológiájának vizuális megjelenítése során kapott SEM felvétel alapján azt tapasztaltuk, hogy ezen részecskék mérete 50 és 150 nm között változott (24. ábra).



24. ábra: A PGA-FA-CH 2:1+0,4Gd paramágneses kontrasztanyag hidrodinamikai méreteloszlása (a) és SEM felvétele (b).

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.





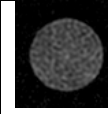
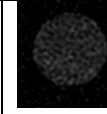


A kiindulási biopolimer oldatok termodinamikailag stabilak, valódi oldatok, transzmittanciájuk ($\lambda=500 \text{ nm}$) $\sim 100\%$. Vizsgáltuk ezen makromolekulák önrendeződésével létrejövő nanorészecskéket tartalmazó kolloid rendszer transzmittanciáját. A kialakult nanorendszer stabil, enyhén opálos, a transzmittancia értéke 85%.

Az önrendeződő nanorészecske Gd(III)-ion tartalmát a TEM és SEM felvételek elkészítése során elemanalízissel mutattuk ki. Emellett szükséges volt igazolni a nanorendszer által szállított paramágneses ionnak az MR szignálintenzitás értékeire gyakorolt hatását is.

A paramágneses kontrasztanyag nanorészecske MR-vizsgálatát úgynevezett fantom vizsgálattal kezdtük. A nanorészecskéből koncentrációsorozatot készítettünk, melynek első eleme az eredeti hígítatlan nanorészecske ($300 \mu\text{g}/\text{ml}$), az utolsó eleme pedig desztillált víz volt. A nanorészecskéket tartalmazó koncentrációsorozat pontos Gd(III)-ion tartalmát ICP-MS módszerrel meghatároztuk meg (3. táblázat).

A T1-súlyozott MR-felvételek azt mutatták, hogy a szürkeárnyalatos skálán a desztillált víz fekete tónusával összehasonlítva az eredeti, hígítatlan nanorészecske fehéren világít, és a nanorészecske koncentrációjának függvényében változik az MR-felvételen az intenzitás. Az MR-felvételeken megjelenő intenzitásokat számszerűen is kifejeztük ún. szignálintenzitás és T1 relaxációs idő értékekkel.

3. táblázat: A paramágneses kontrasztanyag nanorészecske T1-súlyozott MR-felvételei, szignálintenzitás és T1 relaxációs időértékei különböző nanorészecske koncentráció mellett.

| | | | | | | | | |
|--|---|---|---|---|--|---|---|---|
| Nanorész. konc. ($\mu\text{g/ml}$) | 300 | 225 | 150 | 75 | 38 | 19 | 9 | 0 (d.v.) |
| Gd(III)-konc ($\mu\text{g/ml}$) | 18,20 | 14,12 | 9,88 | 4,98 | 2,53 | 1,29 | 0,64 | <0,005 |
| MR-kép |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Szignál-intenzitás (a.u.) | 1783 | 1767 | 1665 | 1366 | 771 | 436 | 372 | 287 |
| T₁ relaxációs idő (ms) | 244 | 265 | 504 | 1047 | 1566 | 2161 | 2784 | 2980 |

A mért értékek azt mutatják, hogy a nanorészecske, és a benne lévő gadolínium koncentrációjának csökkenésével a szignálintenzitás értékek monoton módon csökkennek: a hígítatlan nanorészecske MR-képének szignálintenzitása 1783, a desztillált víz MR-képének szignálintenzitása 287. A T₁ relaxációs időértékek a vártnak megfelelően a gadolínium tartalmú nanorészecskék koncentrációjának növekedésével csökkennek. A desztillált víz relaxációs ideje T₁-súlyozott módban 2980 ms, míg a T₁ kontrasztanyag nanorészecske relaxációs ideje 244 ms.

A táblázatban foglalt eredmények alapján a vizsgált paramágneses kontrasztanyag nanorészecske relaxivitása $r_1 = 34,6 \text{ l}/(\text{mM s})$.

A táblázat alapján elmondható, hogy a gadolínium tartalmú T₁ kontrasztanyag nanorészecske jelentősen növeli a szignálintenzitást, és nagymértékben csökkenti a T₁ relaxációs időt, mely tulajdonságai révén fehér tónussal jelenik meg az MR-képeken, és ezáltal alkalmas lehet paramágneses kontrasztanyagként történő alkalmazásra.

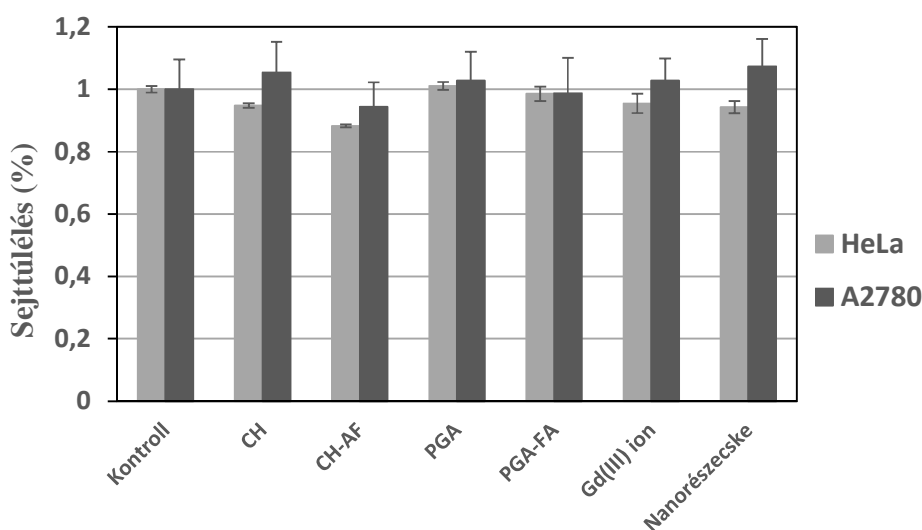
A Gd(III)-ionok stabil komplexáltságának igazolására is végeztünk fantom MR-vizsgálatot: a paramágneses nanorészecskéket több napig dializáltuk, majd azok Gd(III)-ion tartalmát T₁ MR méréssel ellenőriztük. Azt tapasztaltuk, hogy a minták szignálintenzitása nem változott jelentősen, azaz a nanohordozó Gd(III)-ion tartalma nem csökkent kimutatható mértékben. A vizsgálattal sikerült alátámasztanunk a Gd(III)-ionok stabil komplexált formáját.

4.3.2. Paramágneses kontrasztanyag *in vitro* vizsgálata

4.3.2.1. Alapanyagok és a kontrasztanyag citotoxicitás vizsgálata

Az előállított paramágneses kontrasztanyag *in vitro* és *in vivo* hatékonyságának vizsgálata előtt tanulmányoztuk a tumorspecifikus kontrasztanyag, valamint alkotórészeinek citotoxicitását. Az önrendező nanorészecskét felépítő biopolimerek – az irodalom szerint – biokompatibilisek, biodegradábilisek és nem váltanak ki immunreakciót a szervezetben. Ennek igazolására a kontrasztanyag és az azt felépítő alkotórészek hatását a sejtek életképességére MTT teszttel vizsgáltuk, valamint sejtszámlálással teszteltük a kontrasztanyag nanorészecske citotoxicitását az idő függvényében. Az alapanyag biopolimerek koncentrációja 0,3 mg/ml volt, a Gd(III)-ion koncentráció 0,4 mg/ml, a kontrasztanyag nanorészecske koncentrációja 0,3 mg/ml volt (25. ábra).

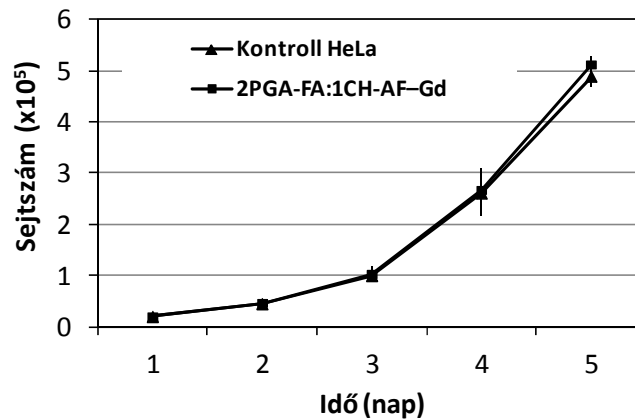
A folsavval targetált nanorészecskék citotoxicitását folát receptorokat overexpresszáló tumorsejt vonalakon vizsgáltuk, amihez előzőleg meghatároztuk az adott sejtek folát receptorainak számát. A fluoreszcencia intenzitás és a receptorszám közötti kalibrációt Cellquant calibrator segítségével végeztük. Az áramlási citometriai eredmények azt mutatták, hogy a HeLa sejtek felszínén átlagosan 1876 ± 13 folát receptor van, az A2780 sejteken 790 ± 9 .



25. ábra: A paramágneses kontrasztanyag nanorészecske és alkotórészeinek citotoxicitás vizsgálata különböző sejt vonalakon. (MTT teszt; inkubációs idő: 24 h)

A vizsgálat kimutatta, hogy a HeLa sejtek érzékenyebben reagáltak mind az alapanyagok, mind a nanorészecske jelenlétére. A sejttúlélés értékei a kontroll sejtek 100%-os értékéhez viszonyítva 95% fölött voltak, a CH-AF kivételével, amely HeLa sejten szintén viszonylag magas, 88%-os értéket adott. Mindazonáltal az általunk elvégzett MTT teszt

alapján sem az alapanyagok, sem a nanorészecske nem voltak kimutatható mértékben toxikusak a vizsgált sejtvonalakon.



26. ábra: A paramágneses nanorészecskével kezelt HeLa sejtek proliferációja a kontroll sejtekkel összehasonlítva, az idő függvényében.

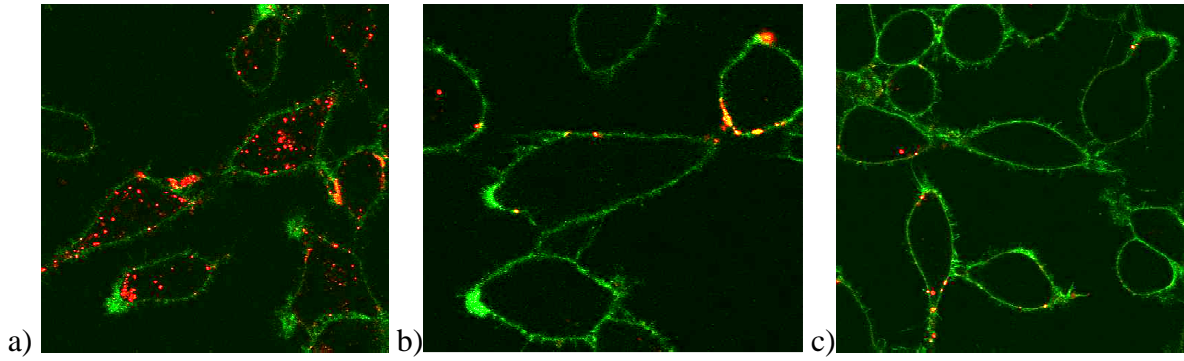
A citotoxicitás vizsgálatot sejtszámlálással egészítettük ki (26. ábra). Vizsgáltuk a paramágneses kontrasztanyag nanorészecskével kezelt HeLa sejtek túlélését és összehasonlítottuk a kontroll sejtek túlélésével. Azt tapasztaltuk, hogy nem volt jelentős különbség a kezelt és a kontroll sejtek között. A vizsgálat megerősítette, hogy az előállított paramágneses nanorészecske nem rendelkezik kimutatható mértékű toxicitással, s ezen tulajdonsága figyelembe vételével alkalmas *in vitro* és *in vivo* kísérletek elvégzésére.

4.3.2.2. Paramágneses kontrasztanyag tumorspecifikus internalizációja

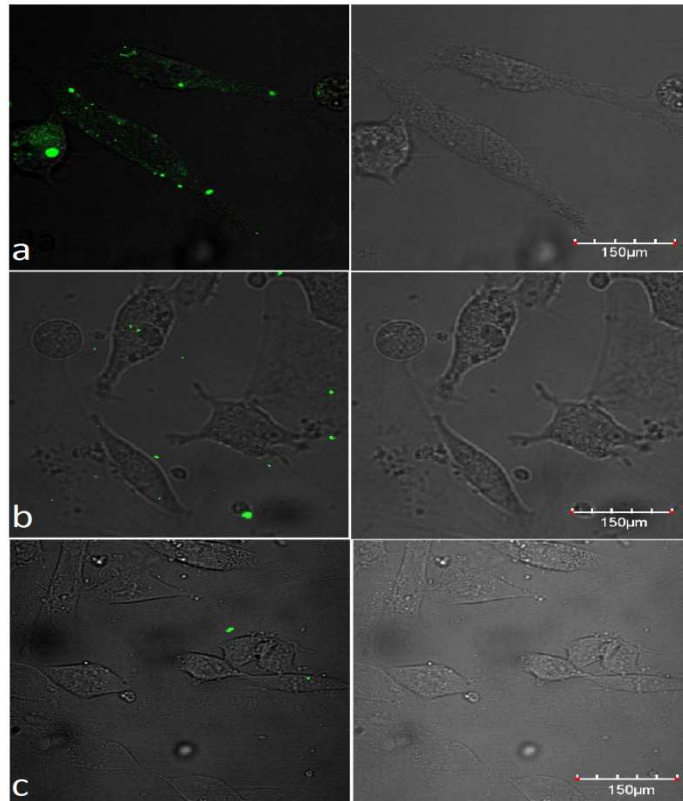
Az előállított paramágneses nanorészecske célzó molekulaként folsavat is tartalmazott. Mindazonáltal ezen nanorészecskék tumorspecifikus internalizációját szükséges volt bizonyítani. A specifikus internalizációt konfokális mikroszkópos, valamint áramlási citometriás vizsgálatokkal igazoltuk folát receptorokat overexpresszáló sejtvonalakon.

A részecskék nyomonkövethetősége érdekében azokat fluoreszcensen festettük; a képek készítésekor minden esetben azonos beállításokat, azonos erősítést használtunk.

A konfokális mikroszkópos felvételek igazolták, hogy a folsav célzó molekulával ellátott nanorészecskék kötődtek a sejtmembránhoz és internalizálódtak a tanulmányozott tumorsejtekben (27. és 28. ábra).



27. ábra: HeLa sejtek konfokális mikroszkópos felvétele folsav célzó molekulát tartalmazó 2PGA-FA:1CH-AF-Gd nanorészecskével (a), célzó molekulát nem tartalmazó 2PGA:1CH-AF-Gd nanorészecskével (b), valamint a sejtek folsavval történő előtelítését követően folsav célzó molekulát tartalmazó 2PGA-FA:1CH-AF-Gd nanorészecskével (c) történt kezelése után.



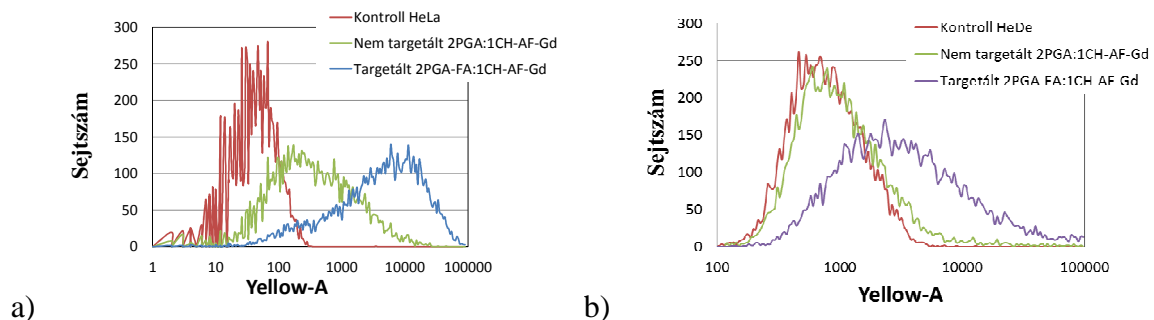
28. ábra: HeDe sejtek konfokális mikroszkópos felvétele folsav célzó molekulát tartalmazó 2PGA-FA:1CH-AF-Gd nanorészecskével (a), célzó molekulát nem tartalmazó 2PGA:1CH-AF-Gd nanorészecskével (b), valamint a sejtek folsavval történő előtelítését követően folsav célzó molekulát tartalmazó 2PGA-FA:1CH-AF-Gd nanorészecskével (c) történt kezelése után.

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 a receptorokat szabad folsavval előtelítettük. A folsavas telítésre azért volt szükség, hogy a nanorészecskék specifikus, folát receptorhoz kapcsolódó felvételét igazoljuk. Ha a daganatos sejteken lévő folát receptorokat folsavval telítjük még a folsavat tartalmazó részecskék hozzáadása előtt, akkor a nanorészecske nem képes a receptorokhoz kötődni. Ez a kísérlet azt is modellezi, hogyan viselkedik a nanorészecske a folát receptorokat nem overexpresszáló sejtekkel szemben.

Mindkét kiegészítő vizsgálat során azt tapasztaltuk, hogy a nanorészecskék tumorsejtekben történő internalizációja minimális volt, sőt a sejtmembránon történő adszorpció is elhanyagolható.

A kapott eredmény megfelelt az elvárásainknak és bizonyította, hogy ha a részecskék nem tartalmaznak folsavat, ami kapcsolódni tud a folát receptorokat overexpresszáló tumorsejteken lévő folát receptorokhoz, akkor a részecske nem vagy alig kötődik a sejtmembránhoz, így az internalizáció nem vagy jóval kisebb mértékben történik meg.

A konfokális mikroszkópos vizsgálatok a nanorészecskék internalizációjának vizuális megjelenítését is szolgálta. Ezen internalizációs vizsgálatot áramlási citometriás eredményekkel is alátámasztottuk, mely vizsgálat során kizárólag az élő sejteket számoljuk, a mért fluoreszcencia intenzitás függvényében (29. ábra).



29. ábra: HeLa (a) és HeDe (b) sejtek áramlási citometriás analízise, targetált 2PGA-FA:1CH-AF-Gd nanorészecskével való kezelés hatására, összehasonlítva a nem targetált 2PGA:1CH-AF-Gd nanorészecskével történő kezeléssel és a kontroll sejtekkel.

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

mikroszkópos eredményeket, mely szerint sikerült folát receptor-specifikus nanorészecskéket előállítani.

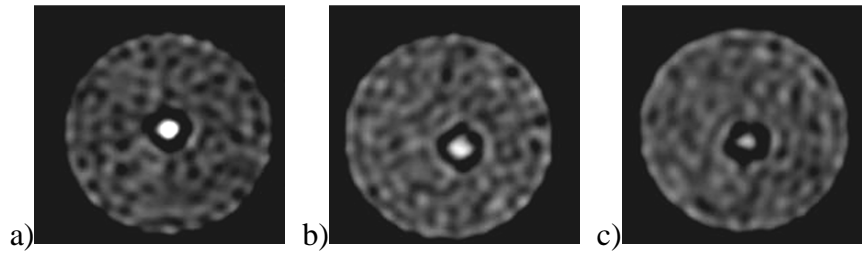
A konfokális mikroszkóppal készített felvételek és az áramlási citometriás vizsgálatok egyértelműen bizonyították, hogy az általunk elkészített részecskék specifikusan a daganatos sejtekben internalizálódnak. A TEM felvételnél készült elemanalízis, az ICP-MS módszerrel készült elemanalízis, illetve a nanorészecskék fantom MR-vizsgálata egyértelműen bizonyította, hogy a nanorészecskék tartalmaznak Gd(III)-iont. A vizsgálatok következő lépéseként igazolni volt szükséges, hogy a részecske által szállított Gd(III)-ion is specifikusan a tumorsejtekben halmozódik. Ennek igazolására a HeLa és HeDe sejteket gadolínium tartalmú nanorészecskével kezeltük, majd a kezelt sejtsuszpenziókat MR készülékben vizsgáltuk.

4.3.2.3. Paramágneses kontrasztanyag *in vitro* MR-vizsgálata

A gadolínium tartalmú nanorészecskékkel kezelt, illetve a kontroll HeLa és HeDe sejtsuszpenziókról készült T1 súlyozott MR-felvételek vizuálisan igazolják az előállított nanorészecskék tumorspecifikus paramágneses kontrasztanyagként történő hatékony alkalmazhatóságát.

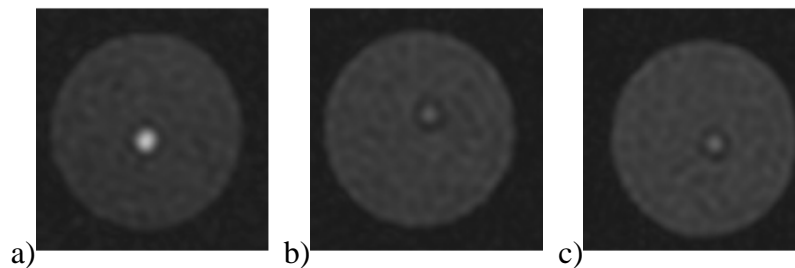
A sejteket folsavval targetált 2PGA-FA:1CH-Gd nanorészecskével, illetve folátmentes ún. nem specifikus 2PGA:1CH-Gd nanorészecskével kezeltük és összehasonlítottuk a kontroll sejtekkel. Az MR-felvételeken látható színbeli megjelenés, valamint a képek alapján mért szignálintenzitás értékek is azt bizonyították, 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 sejtsuszpenzió nem mutatott jelentős különbséget a kontroll sejtekkel való összehasonlításban; ezzel alátámasztva a folsav, mint célzó molekula által megvalósuló folát receptor-specifikus internalizációt.

HeDe sejtek esetén a gadolínium iont tartalmazó, targetált 2PGA-FA:1CH-Gd nanorészecskék emelik a sejtsuszpenzió szignálintenzitását 869-re, és fehéren világítanak az MR-felvételen. A folsavmentes nanorészecskék hatása a szignálintenzitásra nem jelentős, hasonló a kontroll sejtekéhez: rendre 511 és 441 a denzitométer skálán. Ezen szignálintenzitásbeli különbség szintén egyértelmű színbeli eltérést mutat a T1 súlyozott MR-felvételeken (30. ábra).



30. ábra: HeDe sejtszuszpenziók T1 súlyozott MR-felvételei folsavval targetált 2PGA-FA:1CH-Gd nanorészecskével - (a), és folátmentes 2PGA:1CH-Gd nanorészecskével (b) történő kezelés után, valamint kontroll sejtek (c).

Az MR-képeken a célbajuttató folsav molekulát tartalmazó nanorészecskékkel kezelt HeLa sejtek szignálintenzitása 1351. Amennyiben a sejteket nem targetált nanorészecskével kezeltük, az MR-képen a sejtszuszpenzió nem fehér, szürkés árnyalatú, a szignálintenzitása csupán 523, hasonlóan a nanorészecskével nem kezelt kontroll HeLa sejtszuszpenzió 480 szignálintenzitás értékével (31. ábra).



31. ábra: HeLa sejtszuszpenziók T1 súlyozott MR-felvételei folsavval targetált 2PGA-FA:1CH-Gd nanorészecskével - (a), és folátmentes 2PGA:1CH-Gd nanorészecskével (b) történő kezelés után, valamint kontroll sejtek (c).

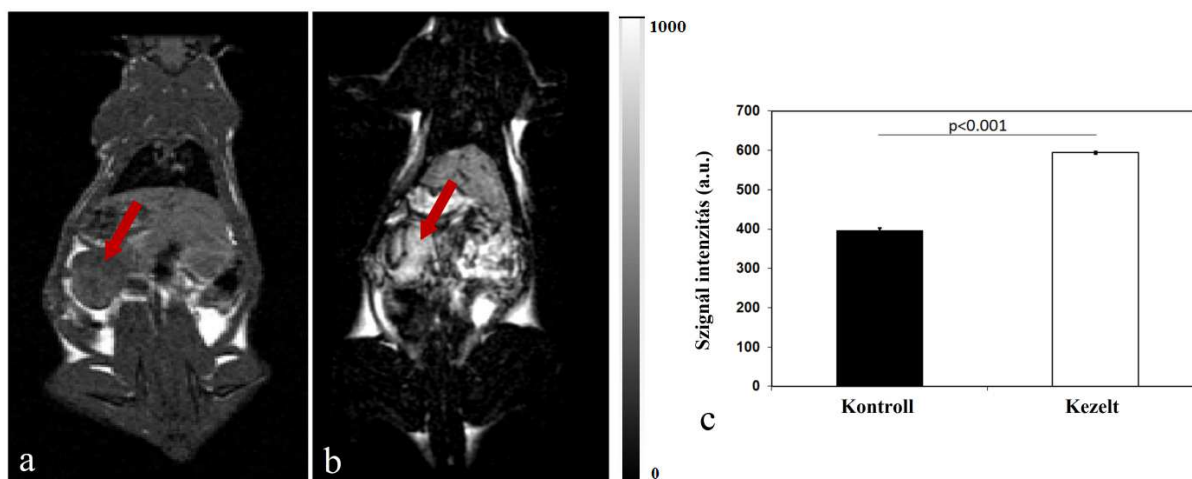
4.3.3. Paramágneses kontrasztanyag *in vivo* vizsgálata

4.3.3.1. *In vivo* patkány MR-vizsgálatok

Az *in vivo* kísérletekhez 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, 24 h inkubációs idő letelte után (32. ábra). (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: rendre 397 ± 7 és 595 ± 3 volt, mely értékek közötti különbség szignifikánsnak adódott ($p < 0,001$).

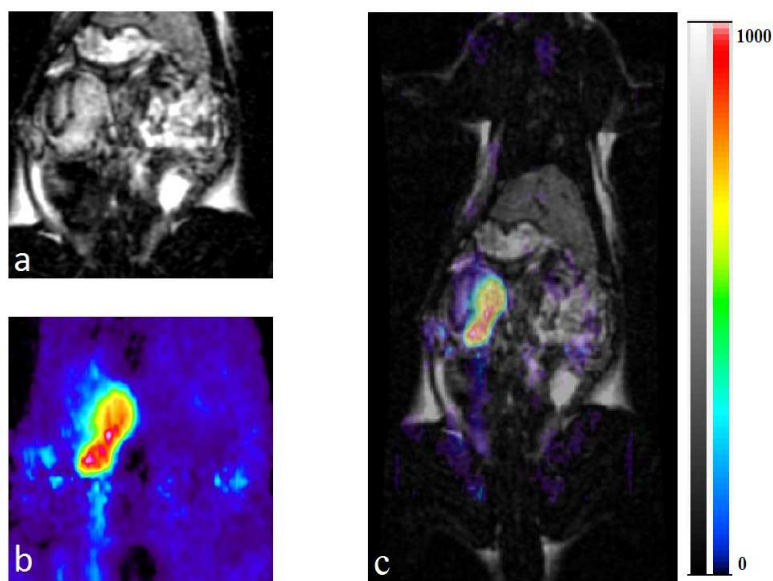


32. ábra: HeDe tumoros Fischer 344 patkány T1 súlyozott MR-felvétele 5% glükóz oldat i.v. injektálását követően, kontroll (a), és targetált paramágneses kontrasztanyag nanorészecskék i.v. injektálást követően (b); valamint a kontroll és a kezelt HeDe tumorok számszerűsített szignálintenzitás értékeit bemutató diagram (c).

Az eredmény igazolta a paramágneses kontrasztanyag *in vivo* hatékonyságát. A folsavval targetált 2PGA-FA:1CH-Gd nanorészecskék internalizálódtak a tanulmányozott folát receptorokat overexpresszáló célzott tumorsejtekben. A szállított paramágneses ligandum révén a kontrasztanyag nanorészecskék megváltoztatták a tumor szignálintenzitását, amely jól elkülönülővé vált a környező szövetektől. Az így kapott MR-felvételek pontos információt adnak a vizsgált állat anatómiájáról, megkönnyítve a tumor lokalizációját.

Vizsgálataink során az MR-felvételeket PET-vizsgálatokkal egészítettük ki, ^{18}F -FDG radiofarmakon i.v. alkalmazását követően. A metabolizmusra épülő PET nem ad pontos információt a tumor helyzetéről, de megerősíti annak meglétét: színekódolású képrészletek megjelenésével mutatja az esetlegesen előforduló tumor fokozott metabolizmusát.

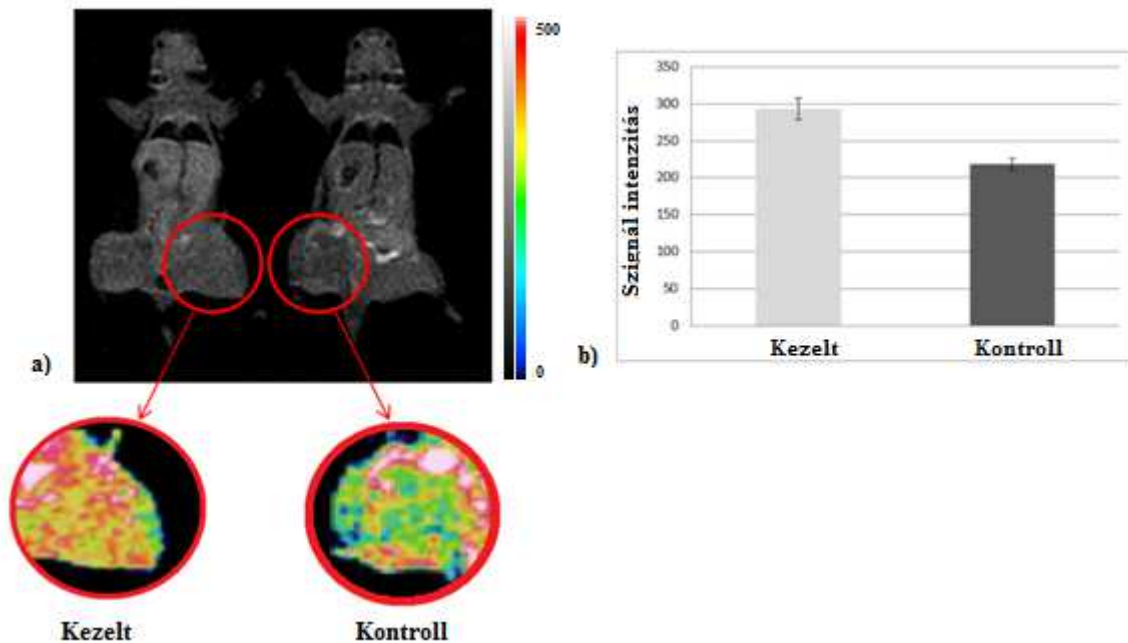
Munkánk során MRI és PET képek fuzionálásával kombináltuk az anatómiát és a funkciót, és fúziós kép létrehozásával segítettük elő a korai tumordiagnosztikát és a pontos lokalizációt (33. ábra).



33. ábra: Targetált paramágneses kontrasztanyaggal kezelt HeDe tumoros patkány modell T1 súlyozott MRI-felvétele (a), PET-felvétele (b), valamint fúziós MRI-PET-képe (c).

4.3.3.2. *In vivo* egér MR-vizsgálatok

Az *in vivo* vizsgálatok második szakaszában humán eredetű tumoron kívántuk tesztelni a paramágneses kontrasztanyag nanorészecskét. Ennek megvalósítása HeLa tumoros 5-6 hetes nőstény thymus nélküli nude egereken történt. Kontrollként HeLa tumoros, nanorészecskével nem kezelt nude egereket használtunk. Az MR-vizsgálat eredménye megfelelt az *in vitro* vizsgálatok alapján elvártaknak, miszerint a folsavval targetált kontrasztanyag nanorészecske internalizálódott a folát receptorokat overexpresszáló HeLa tumorsejtekben. Az internalizálódott és akumulálódott nanorészecskék az általuk szállított gadolinium ionok révén jelentős relaxációs idő, és ezáltal szignálintenzitás-változást okoztak a célzott tumorszövetben. Ez a szignálintenzitás-változás egyértelműen ábrázolódik az állatokról készült T1 súlyozott MR-képen. A kontroll állathoz képest jelentős szignálintenzitás-emelkedés figyelhető meg a nanorészecskével kezelt egér tumorszövetében 2 órával a kontrasztanyag intravénás injektálása után. A kontroll állatban lévő tumor szignálintenzitása: 218 ± 8 a.u., míg a kezelt állat tumorának szignálintenzitása 293 ± 14 a.u. volt (34. ábra).



34. ábra: Subkután HeLa tumoros nőstény nude egér T1 súlyozott MR-felvétele 2PGA-FA:1CH-Gd kontrasztanyaggal történt kezelés után, a kontroll állattal összehasonlítva (a), és a tumorok szignálintenzitás értékeit bemutató diagram (b).

A színes tumorkép a kezelt tumor szignálintenzitásbeli változását reprezentálja, a megjelenő piros szín dominanciájával.

4.4. Szuperparamágneses MR-kontrasztanyag vizsgálata

A szuperparamágneses vas-oxid nanorészecskék (SPION) az MR-képkalkotásban képesek megváltoztatni a homogén mágneses teret, szignálintenzitás és T2 relaxációs időváltozást okoznak, T2 kontrasztanyagként alkalmazhatók.

Kutatómunkánk során kontrasztanyagok előállítására és fejlesztésére fókuszáltunk. Előállítottuk és részletesen tanulmányoztuk az önrendeződő nanorészecske alapú paramágneses T1 MR-kontrasztanyagokat. Mindamellettt kutatásokat folytattunk önrendeződő, szuperparamágneses nanorészecskék, mint T2 MR-kontrasztanyagok előállítása és vizsgálata témakörében is.

A szuperparamágneses MR-kontrasztanyag előállítása és vizsgálata során elért eredményeket hazai és nemzetközi konferenciákon mutattuk be, de publikálásuk még nem történt meg.

4.4.1. Szuperparamágneses MR-kontrasztanyag előállítás és fizikai-kémiai vizsgálata

(A 4.4.1. fejezet eredményei Csikós Zsuzsanna munkája)

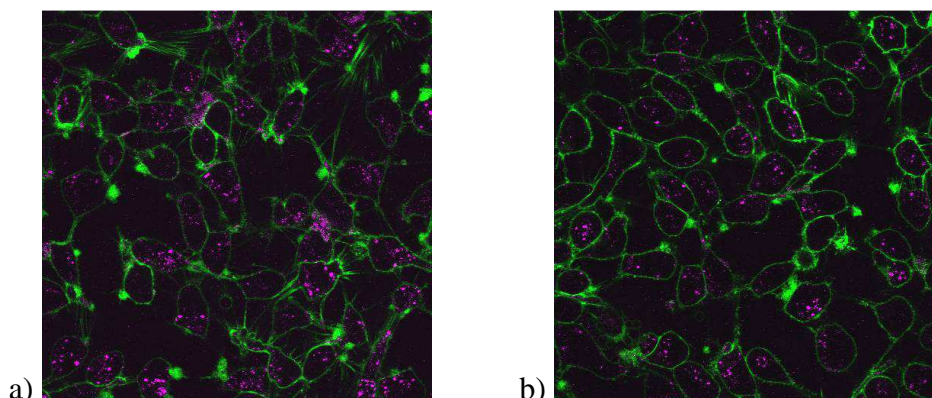
SPION-t állítottunk elő in situ folsavas PGA jelenlétében (PFS), és ezen módosított biopolimer kitozánnal történő önrendeződésével állítottuk elő a szuperparamágneses T2 MR-kontrasztanyag nanorészecskéket.

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 elektroforetikus mobilitásuk 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.

4.4.2. Szuperparamágneses kontrasztanyag tumorspecifikus internalizációjának in vitro vizsgálata

A folsavval targetált szuperparamágneses nanorészecskék internalizációját HeLa sejteken teszteltük konfokális mikroszkóppal és áramlási citométerrel.

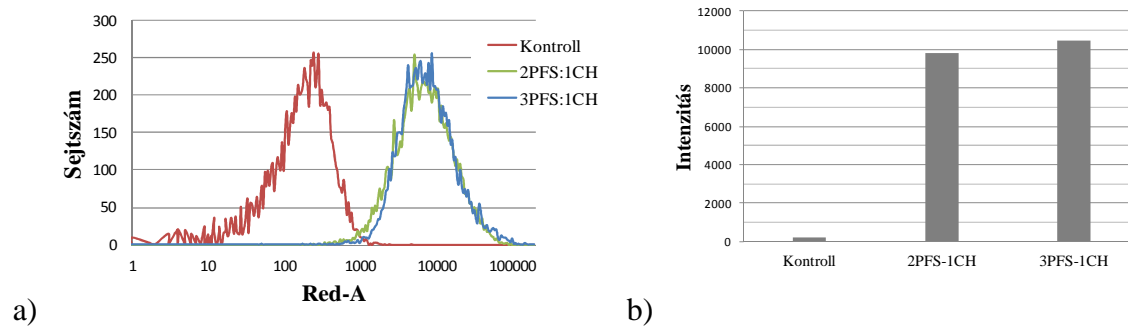
A konfokális mikroszkópos felvételek egyértelműen igazolták, hogy a folsavval targetált önrendeződő szuperparamágneses nanorészecskék akkumulálódtak a célzott HeLa tumorsejtekben (35. ábra).



35. ábra: 2PFS:1CH (a), és 3PFS:1CH (b) nanorészecskékkel kezelt HeLa sejtek konfokális mikroszkópos felvétele.

(Mérési körülmények: a sejtmembránban kifejezett MHC I glikoproteineket Alexa 488-W6/32 monoklonális antitesttel (zöld), a nanorészecskéket Alexa 647 fluoreszcens festékkel (lila) festettük.)

A halmozódás vizuális megjelenítése mellett annak mértékét és a szelektivitást áramlási citométerrel tanulmányoztuk. A célzott HeLa sejteket folsavval targetált szuperparamágneses nanorészecskékkel inkubáltuk, majd vizsgáltuk a fluoreszcencia intenzitás (FI) mérése során jelentkező jeletolódást és azt összehasonlítottuk a kontroll sejtekkel (36. ábra).



36. ábra: Folsavval targetált szuperparamágneses nanorészecskékkel kezelt HeLa sejtek áramlási citometriai analízise (a), és az analízis alapján mért fluoreszcencia intenzitás értékek diagramja (b).

A vizsgálat eredménye alátámasztotta a konfokális mikroszkópos eredményeket. Jelentős fluoreszcencia intenzitás növekedést tapasztaltunk a folsavval targetált nanorészecskékkel kezelt sejtek esetében, a kontroll sejtekkel történő összehasonlítás során. 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.

Eredményeink bizonyították a folsavval targetált nanorészecskék internalizációját a célzott tumorsejtekbe. A kutatás következő lépésében azt kívántuk igazolni, hogy az önrendeződő nanorészecskék által szállított mágneses vas-oxid kifejti-e szuperparamágneses tulajdonságát, és ezáltal alkalmazható-e mint T2 MR-kontrasztanyag.

4.4.3. Szuperparamágneses kontrasztanyag MR-vizsgálata

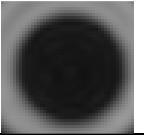
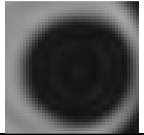
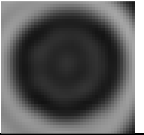
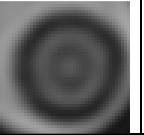
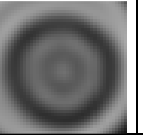
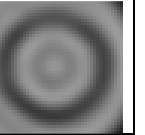
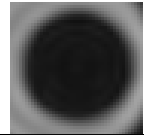
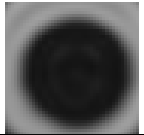
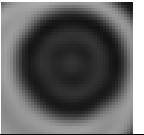
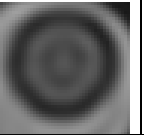
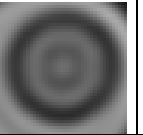
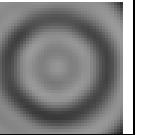
A SPION-t szállító önrendeződő nanorészecskék MR-kontrasztanyagként történő alkalmazhatóságának alapfeltétele a nanorészecskék T2 relaxációs időt csökkentő tulajdonsága. Ennek bizonyítására fantom MR-vizsgálatot végeztünk (4. táblázat).

A 2PFS:1CH és a 3PFS:1CH nanorészecskéből koncentráció sorozatot készítettünk, és tanulmányoztuk a T2 MR-képi megjelenésre és a T2 relaxációs időre gyakorolt hatását. Azt tapasztaltuk, hogy mindkét nanorészecske – már igen kis koncentrációban is – jelentős

mértékben csökkentette a T2 relaxációs időt, 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 két nanorészecske T2 relaxációs időt csökkentő hatásában egyedül a mért legnagyobb nanorészecske koncentráció mellett volt jelentős különbség.

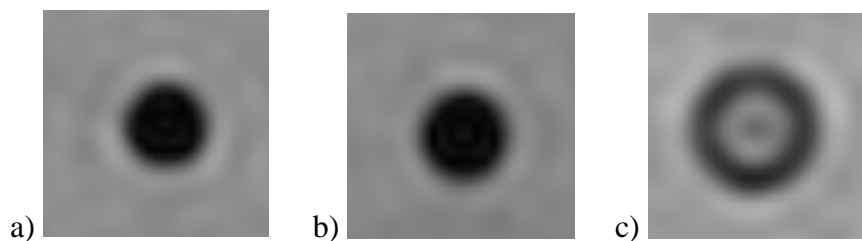
A fantom MR-vizsgálat alapján megállapítottuk, hogy mindkét szuperparamágneses nanorészecske jelentős mértékben csökkenti a T2 relaxációs időt, T2 MR-kontraszthatást vált ki.

4. táblázat: A szuperparamágneses kontrasztanyag nanorészecske T2-súlyozott MR-felvételei és T2 relaxációs időértékei különböző nanorészecske koncentráció mellett.

| Nanorész. konc. ($\mu\text{g/ml}$) | 75 | 37,5 | 18,8 | 9,4 | 4,7 | 0 (d.v.) |
|---|---|---|---|--|---|---|
| 2PFS:1CH |  |  |  |  |  |  |
| T ₂ relaxációs idő (ms) | 10 | 13 | 62 | 109 | 172 | 2410 |
| 3PFS:1CH |  |  |  |  |  |  |
| T ₂ relaxációs idő (ms) | 4 | 12 | 59 | 112 | 172 | 2410 |

Az *in vitro* internalizációs vizsgálatok igazolták a SPION-t szállító targetált nanorészecskék célzott tumorsejtekben történő akkumulációját; a fantom MR-vizsgálatok igazolták ezen nanorészecskék szuperparamágneses, T2 relaxációs időt csökkentő tulajdonságát. A kutatómunkánk következő lépéseként bizonyítani kívántuk, hogy a targetált nanorészecskék által szállított SPION is akkumulálódik a célzott sejtekben és ott is kifejti hatását. Ennek igazolására a HeLa sejteket SPION-t tartalmazó nanorészecskékkel kezeltük, majd a kezelt sejtszuspenziókat MR készülékben vizsgáltuk.

A HeLa sejtszuspenziókról készült T2 súlyozott MR-felvételek vizuálisan igazolták az előállított nanorészecskék tumorspecifikus szuperparamágneses kontrasztanyagként történő hatékony alkalmazhatóságát (37. ábra).



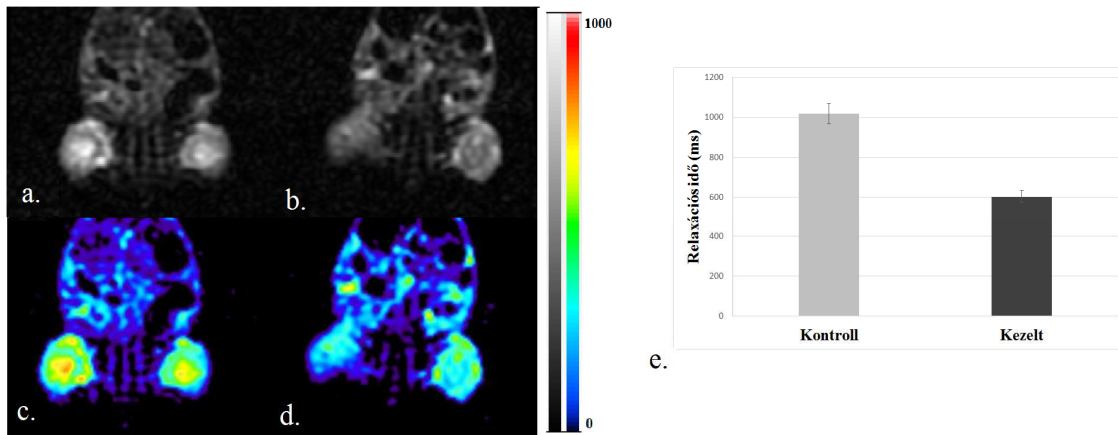
37. ábra: HeLa sejtszuspenziók T2 súlyozott MR-felvételei folsavval targetált szuperparamágneses 2PFS:1CH (a), és 3PFS:1CH (b) nanorészecskékkel történő inkubáció után, valamint a nem kezelt kontroll sejtek (c).

Az MR-felvételeken látható, hogy a szuperparamágneses nanorészecskékkel kezelt sejtszuspenziók fekete tónussal jelennek meg a T2 súlyozott MR-felvételeken, szemben a kezeletlen kontroll sejtek világosszürke színével. Az MR-felvételeken látható színbeli megjelenés igazolja, hogy a targetált nanorészecskékkel együtt az általuk szállított SPION is internalizálódik a célzott tumorsejtekben, és kifejti szuperparamágneses tulajdonságát. A vizuális megjelenéshez párosuló T2 relaxációs időkben is jelentős változás történik, ami alátámasztja a SPION tartalmú szuperparamágneses nanorészecskék tumorspecifikus internalizációját. A 2PFS:1CH és a 3PFS:1CH nanorészecskékkel kezelt sejtszuspenziók T2 relaxációs ideje 424 ms és 388 ms, míg a kezeletlen kontroll sejteké 923 ms.

4.4.4. Szuperparamágneses kontrasztanyag *in vivo* vizsgálata

Az *in vitro* vizsgálatok után *in vivo* is bizonyítani szeretnénk volna, hogy az előállított szuperparamágneses nanorészecskék a tumorban halmozódnak, ott kifejtik relaxációs idő - és szignálintenzitás-csökkentő hatásukat, mellyel nagyban megkönnyítik azok egyértelmű azonosítását. Ennek érdekében a vizsgálatokat HeLa tumoros 5-6 hetes nőstény athymicus nude egereken végeztük és kontrollként HeLa tumoros, nanorészecskével nem kezelt egereket használtunk.

A vizsgálat eredménye egyértelműen alátámasztotta azt, hogy a folsavval mint célzó molekulával ellátott kontrasztanyag nanorészecskék felhalmozódtak a folát receptorokat overexpresszáló HeLa tumorsejtekben. 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 a kontroll állat tumorához képest. Míg a kontroll állat tumorának szignálintenzitás értéke 793 ± 19 (a.u.) és relaxációs ideje 1018 ± 23 ms volt, addig a kezelt állat tumorának szignálintenzitása 582 ± 13 és relaxációs ideje 602 ± 15 ms (38. ábra).



38. ábra: Subkután HeLa tumoros nőstény athymicus nude egér T2 súlyozott MR-felvétele 2PFS:1CH kontrasztanyaggal történt kezelés után (b), a kontroll állattal összehasonlítva (a).

A színes kép a kezelt tumor szignálintenzitásbeli változását reprezentálja, a megjelenő sötétebb kék színek dominanciájával (c, d). A diagram a tumorok relaxációs idejének értékeit mutatja a kontroll és kezelt állatok esetében (e).

5. Megbeszélés

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

5.1. A nanohordozó

Napjainkban növekvő érdeklődés övezi a biokompatibilis, biodegradábilis makromolekulákból felépülő nanorendszerek egyre szélesebb körű alkalmazási lehetőségeit. [1,2] 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 [1,2,17]. Ezen biopolimerek között megtalálható pl. a kitozán [33], a hialuronsav [34], poli-glutaminsav [31], dextrin [37], guar-gumi [36], stb.

Kutatómunkánk során a választásunk a kitozán és a poli-gamma-glutaminsav biopolimerekre esett, melyek biológiai szempontból számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek: biokompatibilisek, biodegradábilisek, nem toxikusak. A kitozánt a kitinből állítják elő, megújuló biopolimernek tekinthető [17], míg a poli-gamma-glutaminsavat bakteriális fermentációval lehet előállítani [25].

A kitozán és a poli- γ -glutaminsav biopolimerek funkciós csoportjaik révén vizes közegben polielektrolitként viselkednek és kovalens kötés kialakítása nélkül, önálló részecskéket, ún. polielektrolit komplexeket képesek formálni ion-ion kölcsönhatáson alapuló önrendeződéssel. [46-48] A kovalens kötés hiányából adódóan a polielektrolit komplexek új távlatokat nyitottak meg a részecskék formálása, illetve ezen részecskékkel történő hatóanyagok szállítása területén. [45]

A szakirodalomban számos önrendeződő CH/PGA nanorészecske előállítását és vizsgálatát írták le, melyeket elsődlegesen hatóanyagok megkötésére és szállítására fejlesztettek ki [52-56], targetálás megvalósítása nélkül.

Kutatómunkánk megalapozásaként mi a CH és a PGA önrendeződésével kialakítható polielektrolit nanohordozó, mint alaprendszer 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. [46]

Megállapítottuk, hogy ilyen savas körülmények között is stabil, önrendező nanorészecskék állíthatók elő. A nanorészecskék méretét befolyásolni tudtuk elsősorban a biopolimerek koncentrációjával és arányával. Mindazonáltal kimutattuk, hogy a 3-as pH-n kialakított önrendező 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 génszakaszt szállító PGA/CH polielektrolit komplex nanorészecskék pH-stabilitásáról pH = 6,0-7,4 között számol be a szakirodalom [52,53], de hatóanyagok orális bevitele esetén a savas közegű stabilitás az elvárt [55,59]. 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, stabil nanorészecskék keletkezésével eredményezve közel semleges pH-n. Ennek megfelelően a PGA oldat pH-ját 9-9,5-re, a kitozán oldat pH-ját 4,0-ra állítottuk. Tanulmányoztuk a nanorészecskék formálását az összeöntési sorrendek, és biopolimer-arányok változtatása mellett.

A PGA és a kitozán különböző pH-n történő összeöntése során megállapítottuk, hogy stabil nanorészecskék keletkeztek, melyek pH-ja 6,3 és 8,1 között változott az összeöntési arányoknak megfelelően. Az összeöntések során stabil 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.

Mindemellett megállapítottuk, hogy a PGA és a CH 1:1 arányú összeöntése esetén keletkeztek a legkisebb méretű részecskék, ezért a további vizsgálatainkhoz a CH és PGA 1:1 arányú összeöntésével formálódó nanorészecskék tanulmányozását helyeztük előtérbe.

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 kontraszthatást kiváltó ligandumok, illetve gyógyszerhatóanyagok tumorspecifikus szállítására.

A szakirodalomban elérhető számos célzó molekula [58-64] közül a mi választásunk a folsav volt, amely reaktív funkció csoportokkal rendelkező kis molekula; elismert

célzóligandum, amely képes a nanorészecskét a folát receptorokat overexpresszáló tumorsejtekhez irányítani, lehetővé téve ezáltal a tumorspecifikus célba juttatást. [70,71]

Jelentős kutatói potenciál foglalkozik a folsavval targetált nanorendszerek fejlesztésével, melyek között megtalálhatók a biopolimer alapú nanorendszerek [74,78], de a folsavval targetált polielektrolit komplexek irodalma még nem jelentős. Mansouri és mtsai folsavval módosított kitozánnal ion-ion kölcsönhatás révén szállítottak DNS-t, 120 nm-es, pozitív felületi töltéssel rendelkező nanorészecskék keletkezésével. [86] A CH és a PGA önrendeződésével létrejövő, folsavval targetált polielektrolit komplex nanorészecskék újdonságot jelentenek a szakirodalomban.

Ezen kutatói vonalon haladva, kutatómunkánk során mi a célzó folsav molekulát a poligamma-glutaminsav biopolimerhez kovalens kötéssel kapcsoltunk, 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. Megállapítottuk, hogy az A2780 sejtvonalon a sejttúlélés során nem mutatkozott különbség a kontroll, a folsavval targetált nanorészecskével kezelt, illetve a folsav nélküli, nem targetált nanorészecskével kezelt sejtek között; mely eredmény alapján megállapítható a vizsgált részecskék nem (kimutatható mértékű) toxikus tulajdonsága. Az *in vivo* toxicitás teszt során a nanorészecskékkel kezelt állatok testtömegét mértük. Azt tapasztaltuk, hogy a kezelés hatására az állatok testtömege nem csökkent, és elhullás sem volt.

Ezen vizsgálatokkal 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.

5.2. 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. [101,102] Konceptiónk szerint ugyanis a PGA karboxilcsoportjai révén képes pozitív ionok megkötésére és ezáltal szállítására. [21] A paramágneses MR-kontrasztanyag kialakításához az önrendeződött nanorészecskéhez utólag adtuk a GdCl₃ oldatot, így a Gd(III)-ion a kész részecskében lévő szabad karboxilcsoportokhoz tudott kapcsolódni.

A paramágneses, Gd(III)-ionokat tartalmazó nanorészecskék között azok vizsgálatát helyeztük előtérbe, amelyekben a PGA részaránya nagyobb volt a kitozán részarányánál, a Gd(III)-ionok stabil szállításához ugyanis szükség volt olyan szabad karboxilcsoportok jelenlétére, amelyek képesek voltak megkötni és szállítani a paramágneses ionokat.

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 [54,161] kijelenthető volt, hogy fémion a glutamát-peptid karboxilcsoportjain keresztül kötődik a nanorészecskéhez.

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. Mindazonáltal ezen kis molekulatömegű Gd-kelátok komoly hiányosságai – mint pl. rövid tartózkodásuk és gyors kiürülésük a vérből (gyors kiválasztódásuk a vesén keresztül) – 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. [106,107]

A makromolekulás MR-kontrasztanyagok fejlesztésén belül beszámol a szakirodalom polielektrolit komplexeken alapuló paramágneses MR-kontrasztanyagokról [115,133], de

előállított kontrasztanyagok targetálása, tumorspecifikus halmozódásának elősegítése még nem elterjedt. Előállításra került folsavval targetált dendrimerrel [148], - liposzómával [149], vagy - csillag kopolimerrel [150] szállított Gd(III)-ion, de biopolimer alapú, önrendező polielektrolit komplexekkel történő targetált Gd(III)-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 kapcsolunk 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.

A paramágneses kontrasztanyag nanorészecske optimális összetétele 2PGA-FA:1CH+0,4Gd-nak adódott. A nanorészecske 130±4 nm átlagos hidrodinamikai mérettel, negatív felületi töltéssel, és $c = 0,3$ mg/ml biopolimer koncentráció mellett 85% transzmittanciával rendelkezett.

Igazoltuk az előállított paramágneses kontrasztanyag nanorészecske paramágneses és nem toxikus tulajdonságát, valamint tumorspecifikus halmozódását a célzott sejtekben.

MR-felvételekkel igazoltuk a nanorészecskék Gd(III)-ion tartalmát: a nanorészecske koncentrációjának és ezáltal a szállított Gd(III)-ion tartalomnak a növekedésével a szignálintenzitás nő és a T1 relaxációs idő csökken, ami fehéren világító kontrasztot eredményezett az MR-felvételen. Ezen eredmények alapján elmondható volt, hogy a gadolínium tartalmú T1 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.

Az *in vitro* hatékonysági vizsgálatokat folát receptorokat overexpresszáló HeLa és HeDe tumorsejt vonalakon végeztük el. [147] 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 tumorspecifikus célbajuttatására és a folát-targetált nanorészecske szelektíven a folát receptorokat overexpresszáló tumorsejtekben halmozódik fel.

A vizsgálatok következő lépéseként igazolni volt szükséges, 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)-t, a PGA karboxilcsoportjaihoz komplexálva, külön komplexképző alkalmazása nélkül. A szakirodalomban fellelhető makromolekulás paramágneses MR-kontrasztanyagok többsége DOTA [148,149] vagy DTPA [115132] 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 targetált kontrasztanyaggal kezelt állatok tumorsejtjei halmozták a paramágneses nanorészecskéket, és jelentős szignálintenzitás-változást mutattak az MR-felvételeken. A vizsgálatokat a jelen gyakorlattól eltérő, hosszabb inkubációs időkkel (2 h, 24 h) végeztük annak igazolására, hogy a nanorendszer alapú MR-kontrasztanyag hosszabb ideig fellelhető a szervezetben, tumorhalmozása időben elnyújtott. Ezen vizsgálatok alapját szolgálta azon korábbi saját munkánk is [54], amelyben igazoltuk az önrendeződő nanorészecskék elnyújtott tumorhalmozódását.

A paramágneses targetált kontrasztanyag nanorészecske tanulmányozása során kapott eredményeket összegezve megállapítható, 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.

5.3. 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 fejleszhető ezen polielektrolit komplex nanohordozóból

tumorspecifikus MR T2 kontrasztanyag. Ennek megvalósításához tanulmányoztuk a SPION tartalmú, PGA és kitozán 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, mint pl. kitozánnal [136], dextránnal [121], algináttal [138]. Kutatásaink során a SPION-t *in situ* állítottuk elő folsavazott PGA jelenlétében, és az így létrejött rendszer kitozánnal történő reakciójának következtében alakítottuk ki a nanorészecskét, mint T2 MR-kontrasztanyagot. A SPION folsavval történő targetálásáról, és annak KB sejteken történő vizsgálatáról már beszámol a szakirodalom [140,151], 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 akumulálódtak a célzott folát receptorokat overexpresszáló HeLa tumorsejtekben. [147] A vizsgálatok során azt is megállapítottuk, hogy a kétféle összetételű (2PFS:1CH, 3PFS:1CH) szuperparamágneses részecske fluoreszcencia intenzitást növelő hatásában nem mutatkozott jelentős különbség, ami a kétféle nanorészecske hasonló mértékű internalizációjára utalt.

A szuperparamágneses hatás igazolására fantom és *in vitro* MR-felvételeket készítettünk. A fantom MR-vizsgálat alapján megállapítottuk, hogy mindkét szuperparamágneses nanorészecske jelentős mértékben csökkenti a T2 relaxációs időt, T2 MR-kontraszthatást vált ki. Mindazonáltal a relaxációs idők azt mutatták, hogy a több SPION hatása nem szignifikánsabb erősebb, azaz a 2PFS:1CH és a 3PFS:1CH összetételű részecskék

hasonló mértékben befolyásolták a mágneses teret. Ezen megállapítást erősíti az *in vitro* T2 MR-vizsgálat is, amelyben 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. A kétfajta összetételű SPION tartalmú nanorészecske hatásának különbsége nem volt jelentős. Ez arra utalt, hogy már a 2PFS:1CH részecske is annyi szuperparamágneses ligandumot szállít, ami elegendő az általa maximálisan kiváltható relaxációs idő változáshoz.

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.

5.4. Új tudományos eredmények

- Poli-gamma-glutaminsav és kitozán önrendeződésével olyan targetált nanohordozót állítottunk elő, amely 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.

6. Összefoglalás

Kutatómunkám során a kitozán és a poli-gamma-glutaminsav önrendeződésével olyan stabilis nanohordozót állítottunk elő, amely 100-120 nm hidrodinamikai méretű és 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 T1 méréssel igazoltuk a nanorészecskék paramágneses, szignálintenzitást növelő, valamint T1 relaxációs időt csökkentő tulajdonságát.

A SPION tartalmú targetált nanohordozó esetén fantom MR-vizsgálatokkal igazoltuk a szuperparamágneses, T2 relaxációs időt csökkentő hatást.

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 *in vivo*, 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.

7. Summary

Stable nanocarriers were successfully prepared by self-assembly of chitosan and poly-gamma-glutamic acid biopolymers. These nanoparticles have 100-120 nm hydrodynamic size, negative surface charge, and are able to transport paramagnetic Gd(III) ions or superparamagnetic SPIONs. Folic acid as targeting molecule was successfully coupled to the biopolymers via their functional groups to realize the preparation of targeted contrast agent nanoparticles.

Full physico-chemical characterization of paramagnetic MR contrast agent nanoparticles was performed, and factors that influence the parameters of nanoparticles were defined. It was established that concentration and ratio of biopolymers, the order of addition and the pH of the environment effect the properties of nanocarriers. The transported Gd(III) ions changed the size of nanocarrier particles, MR T1 measurements confirmed that the nanoparticles are paramagnetic and can increase the signal intensity and reduce T1 relaxation time.

In case of SPION-containing targeted nanocarriers phantom MR measurements were performed to confirm the superparamagnetic effect of nanoparticles, which can reduce the T2 relaxation time. SPION content of nanoparticles was measured and their effect on T2 relaxation time was determined.

Confocal microscopic, flow cytometric and *in vitro* MR investigations were carried out to confirm that folate targeted paramagnetic and superparamagnetic nanoparticles specifically accumulate in the studied tumor cells overexpressing folate receptors, transport the MR active ligands (Gd(III) ions, SPIONs) and therefore they can cause significant contrast in MR images.

HeDe tumor bearing Fischer 344 rat models and HeLa tumor bearing nude mice were used to test the accumulation of paramagnetic folate targeted nanoparticles *in vivo*. Based on the MR images it was confirmed that the developed nanoparticles behaved as effective paramagnetic contrast agent for both studied animal and tumor models. The nanoparticles specifically accumulated in studied tumors and caused significant contrast compared to control animals.

In vivo investigation of SPION-loaded folate targeted nanoparticles as T2 MR contrast agents was performed using HeLa tumor bearing female athymic nude mice. Based on the T2-weighted MR images it was established that folate targeted contrast agent nanoparticles accumulate in tumor and significantly reduce the relaxation time of tumor tissue.

Summarizing, biopolymer-based, tumorspecific paramagnetic or superparamagnetic nanoparticulate MR contrast agents were successfully prepared, which can facilitate the early tumor diagnosis.

8. Irodalomjegyzék

8.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke

- [1] L. S. Nair, C. T. Laurencin: Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 762-798.
- [2] D. Chow, M. L. Nunalee, D. W. Lim, A. J. Simnick, A. Chilkoti: Peptide-based biopolymers in biomedicine and biotechnology. *Mat. Sci. Engin. R* 62 (2008) 125-155.
- [3] V. Torchilin: Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 71 (2009) 431-444.
- [4] O. Veiseh, J. W. Gunn, M. Zhang: Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Adv. Drug Delivery Rev.* 62 (2010) 284-304.
- [5] P. Agrawal, G. J. Strijkers, K. Nicolay: Chitosan-based systems for molecular imaging. *Adv. Drug Delivery Rev.* 62 (2010) 42-58.
- [6] M.-F. Bellin: MR contrast agents, the old and the new. *Eur. J. Radiol.* 60 (2006) 314-323.
- [7] H.-J. Weinmann, W. Ebert, B. Misselwitz, H. Schmitt-Willich: Tissue-specific MR contrast agents. *Eur. J. Radiol.* 46 (2003) 33-44.
- [8] G.-P. Yan, L. Robinson, P. Hogg: Magnetic resonance imaging contrast agents: Overview and perspectives. *Radiography* 13 (2007) 5-19.
- [9] S. K. Shukla, A. K. Mishra, O. A. Arotiba, B. B. Mamba: Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. *Int. J. Biol. Macromol.* 59 (2013) 46-58.
- [10] M. Z. Elsabee, E. S. Abdou: Chitosan based edible films and coatings: A review. *Mat. Sci. Engin. C* 33 (2013) 1819-1841.
- [11] T. Jiang, M. Deng, R. James, L. S. Nair, C. T. Laurencin: Micro- and nanofabrication of chitosan structures for regenerative engineering. *Acta Biomaterialia* 10 (2014) 1632-1645.
- [12] Y. Luo, Q. Wang: Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* 64 (2014) 353-367.
- [13] L. Pontoni, M. Fabbri: Use of chitosan and chitosan-derivatives to remove arsenic from aqueous solutions—a mini review. *Carbohydr. Res.* 356 (2012) 86-92.
- [14] P. Miretzky, A. F. Cirelli: Hg(II) removal from water by chitosan and chitosan derivatives: A review. *J. Hazard. Mater.* 167 (2009) 10-23.
- [15] W. S. W. Ngah, L.C. Teong, M. A. K. M. Hanafiah: Adsorption of dyes and heavy metal ions by chitosan composites: A review. *Carbohydr. Polym.* 83 (2011) 1446-1456.
- [16] M. Aider: Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT - Food Sci. Techn.* 43 (2010) 837-842.
- [17] R. Jayakumar, D. Menon, K. Manzoor, S. V. Nair, H. Tamura: Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials—A short review. *Carbohydr. Polym.* 82 (2010) 227-232.

- [18] P. Mukhopadhyay, R. Mishra, D. Rana, P. P. Kundu: Strategies for effective oral insulin delivery with modified chitosan nanoparticles: A review. *Progr. Polym. Sci.* 37 (2012) 1457-1475.
- [19] H. Ragelle, G. Vandermeulen, V. Pr at: Chitosan-based siRNA delivery systems. *J. Control. Rel.* 172 (2013) 207-218.
- [20] J.-K. F. Suh, H. W. T. Matthew: Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials* 21 (2000) 2589-2598.
- [21] I.-Y. Kim, S.-J. Seo, H.-S. Moon, M.-K. Yoo, I.-Y. Park, B.-C. Kim, C.-S. Cho: Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechn. Adv.* 26 (2008) 1-21.
- [22] M. Cao, W. Geng, L. Liu, C. Song, H. Xie, W. Guo, Y. Jin, S. Wang: Glutamic acid independent production of poly- γ -glutamic acid by *Bacillus amyloliquefaciens* LL3 and cloning of *pgsBCA* genes. *Biores. Techn.* 102 (2011) 4251-4257.
- [23] I.-L. Shih, Y.-T. Van: The production of poly-(γ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications. *Biores. Techn.* 79 (2001) 207-225.
- [24] I. Bajaj, R. Singhal: Poly (glutamic acid) – An emerging biopolymer of commercial interest. *Biores. Techn.* 102 (2011) 5551-5561.
- [25] Z. Xu, X. Feng, D. Zhang, B. Tang, P. Lei, J. Liang, H. Xu: Enhanced poly(γ -glutamic acid) fermentation by *Bacillus subtilis* NX-2 immobilized in an aerobic plant fibrous-bed bioreactor. *Biores. Techn.* 155 (2014) 8-14.
- [26] T. Uto, M. Toyama, Y. Nishi, T. Akagi, F. Shima, M. Akashi, M. Baba: Uptake of biodegradable poly(γ -glutamic acid) nanoparticles and antigen presentation by dendritic cells in vivo. *Results Immun.* 3 (2013) 1-9.
- [27] C.-Y. Hsieh, S.-P. Tsai, D.-M. Wang, Y.-N. Chang, H.-J. Hsieh: Preparation of γ -PGA/chitosan composite tissue engineering matrices. *Biomaterials* 26 (2005) 5617-5623.
- [28] H. J. Choi, M. Kunioka: Preparation conditions and swelling equilibria of hydrogel prepared by γ -irradiation from microbial poly(γ -glutamic acid). *Radiat. Phys. Chem.* 46 (1995) 175-179.
- [29] M. Bodnár, I. Hajdu, E. R thi, N. Harmati, Z. Csikós, J. F. Hartmann, C. Balogh, B. Kelemen, J. Tamás, J. Borbély: Biopolymer-based nanosystem for ferric ion removal from water. *Sep. Purif. Techn.* 112 (2013) 26-33.
- [30] M. Taniguchi, K. Kato, A. Shimauchi, X. Ping, K.-I. Fujita, T. Tanaka, Y. Tarui, E. Hirasawa: Physicochemical properties of cross-linked poly- γ -glutamic acid and its flocculating activity against kaolin suspension. *J. Biosci. Bioeng.* 99 (2005) 130-135.
- [31] J.  . F. Radu, L. Novak, J. F. Hartmann, N. Beheshti, A.-L. Kj niksen, B. Nyström, J. Borbély: Structural and dynamical characterization of poly-gamma-glutamic acid-based cross-linked nanoparticles. *Colloid Polym. Sci.* 286 (2008) 365-376.

- [32] J. Fang, Y. Zhang, S. Yan, Z. Liu, S. He, L. Cui, J. Yin: Poly(L-glutamic acid)/chitosan polyelectrolyte complex porous microspheres as cell microcarriers for cartilage regeneration. *Acta Biomaterialia* 10 (2014) 276-288.
- [33] M. Bodnar, J. F. Hartmann, J. Borbely: Preparation and characterization of chitosan-based nanoparticles. *Biomacromolecules* 6 (2005) 2521-2527.
- [34] M. Maroda, M. Bodnár, S. Berkó, J. Bakó, G. Erős, E. Csányi, P. Szabó-Révész, J. F. Hartmann, L. Kemény, J. Borbély: Preparation and investigation of a cross-linked hyaluronan nanoparticles system. *Carbohydr. Polym.* 83 (2011) 1322-1329.
- [35] A.-m. Shi, D. Li, L.-j. Wang, B. Adhikari: Rheological properties of suspensions containing cross-linked starch nanoparticles prepared by spray and vacuum freeze drying methods. *Carbohydr. Polym.* 90 (2012) 1732-1738.
- [36] J. K. Sarmah, R. Mahanta, S. K. Bhattacharjee, R. Mahanta, A. Biswas: Controlled release of tamoxifen citrate encapsulated in cross-linked guar gum nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.* 49 (2011) 390-396.
- [37] S. Manchun, C. R. Dass, P. Sriamornsak: Designing nanoemulsion templates for fabrication of dextrin nanoparticles via emulsion cross-linking technique. *Carbohydr. Polym.* 101 (2014) 650-655.
- [38] Y.-H. Lin, S.-C. Tsai, C.-H. Lai, C.-H. Lee, Z. S. He, G.-C. Tseng: Genipin-cross-linked fucosechitosan/heparin nanoparticles for the eradication of *Helicobacter pylori*. *Biomaterials* 34 (2013) 4466-4479.
- [39] X. Zhen, X. Wang, C. Xie, W. Wu, X. Jiang: Cellular uptake, antitumor response and tumor penetration of cisplatin-loaded milk protein nanoparticles. *Biomaterials* 34 (2013) 1372-1382.
- [40] B. Mandal, H. Bhattacharjee, N. Mittal, H. Sah, P. Balabathula, L. A. Thoma, G. C. Wood: Core-shell-type lipid-polymer hybrid nanoparticles as a drug delivery platform. *Nanomed.: Nanotechn. Biol. Med.* 9 (2013) 474-491.
- [41] K. Hadinoto, A. Sundaresan, W. S. Cheow: Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: A review. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85 (2013) 427-443.
- [42] P. Zhao, H. Wang, M. Yu, Z. Liao, X. Wang, F. Zhang, W. Ji, B. Wu, J. Han, H. Zhang, H. Wang, J. Chang, R. Niu: Paclitaxel loaded folic acid targeted nanoparticles of mixed lipid-shell and polymer-core: In vitro and in vivo evaluation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 81 (2012) 248-256.
- [43] A. P. Bagre, K. Jain, N. K. Jain: Alginate coated chitosan core shell nanoparticles for oral delivery of enoxaparin: *In vitro* and *in vivo* assessment. *Int. J. Pharm.* 456 (2013) 31-40.
- [44] D. Zeng, J. Fan, Z. Deng, J. Tan, Z. Deng, L.-M. Zhang, L. Yang: One-step synthesis of amphiphilic hyperbranched amylopectin derivatives, characterization and use as functional nanovehicles. *Carbohydr. Polym.* 98 (2013) 905-913.

- [45] S. Zamani, S. Khoee: Preparation of core-shell chitosan/PCL-PEG triblock copolymer nanoparticles with ABA and BAB morphologies: Effect of intraparticle interactions on physicochemical properties. *Polymer* 53 (2012) 5723-5736.
- [46] A. Almalik, R. Donno, C. J. Cadman, F. Cellesi, P. J. Day, N. Tirelli: Hyaluronic acid-coated chitosan nanoparticles: Molecular weight-dependent effects on morphology and hyaluronic acid presentation. *J. Control. Rel.* 172 (2013) 1142-1150.
- [47] Y. Wen, Z. Tan, F. Sun, L. Sheng, X. Zhang, F. Yao: Synthesis and characterization of quaternized carboxymethyl chitosan/poly(amidoamine) dendrimer core-shell nanoparticles. *Mat. Sci. Engin C* 32 (2012) 2026-2036.
- [48] C. T. Tsao, C. H. Chang, Y. Y. Lin, M. F. Wu, J.-L. Wang, J. L. Han, K. H. Hsieh: Antibacterial activity and biocompatibility of a chitosan- γ -poly(glutamic acid) polyelectrolyte complex hydrogel. *Carbohydr. Res.* 345 (2010) 1774-1780.
- [49] Q. Feng, G. Zeng, P. Yang, C. Wang, J. Cai: Self-assembly and characterization of polyelectrolyte complex films of hyaluronic acid/chitosan. *Colloid. Surf. A.* 257-258 (2005) 85-88.
- [50] Q. Zhao, Q. F. An, Y. Ji, J. Qian, C. Gao: Polyelectrolyte complex membranes for pervaporation, nanofiltration and fuel cell applications. *J. Membr. Sci.* 379 (2011) 19-45.
- [51] A. Kumar, M. Ahuja: Carboxymethyl gum kondagogu-chitosan polyelectrolyte complex nanoparticles: Preparation and characterization. *Int. J. Biol. Macrom.* 62 (2013) 80-84.
- [52] Z.-X. Liao, S.-F. Peng, Y.-C. Ho, F.-L. Mi, B. Maiti, H.-W. Sung: Mechanistic study of transfection of chitosan/DNA complexes coated by anionic poly(γ -glutamic acid). *Biomaterials* 33 (2012) 3306-3315.
- [53] S.-F. Peng, M.-J. Yang, C.-J. Su, H.-L. Chen, P.-W. Lee, M.-C. Wei, H.-W. Sung: Effects of incorporation of poly(γ -glutamic acid) in chitosan/DNA complex nanoparticles on cellular uptake and transfection efficiency. *Biomaterials* 30 (2009) 1797-1808.
- [54] A. Polyák, I. Hajdu, M. Bodnár, G. Trencsényi, Z. Pöstényi, V. Haász, G. Jánoki, G. A. Jánoki, L. Balogh, J. Borbély: ^{99m}Tc -labelled nanosystem as tumour imaging agent for SPECT and SPECT/CT modalities. *Int. J. Pharm.* 449 (2013) 10-17.
- [55] Y.-H. Lin, K. Sonaje, K. M. Lin, J.-H. Juang, F.-L. Mi, H.-W. Yang, H.-W. Sung: Multi-ion-crosslinked nanoparticles with pH-responsive characteristics for oral delivery of protein drugs. *J. Control. Rel.* 132 (2008) 141-149.
- [56] F. Hellmers, P. Ferguson, J. Koropatnick, R. Krull, A. Margaritis: Characterization and *in vitro* cytotoxicity of doxorubicin-loaded γ -polyglutamic acid-chitosan composite nanoparticles. *Biochem. Engin. J.* 75 (2013) 72-78.
- [57] Z.-X. Liao, Y.-C. Ho, H.-L. Chen, S.-F. Peng, C.-W. Hsiao, H.-W. Sung: Enhancement of efficiencies of the cellular uptake and gene silencing of chitosan/siRNA complexes via the inclusion of a negatively charged poly(γ -glutamic acid). *Biomaterials* 31 (2010) 8780-8788.

- [58] Y. Liu, Y. Sun, Y. Xu, H. Feng, S. Fu, J. Tang, W. Liu, D. Sun, H. Jiang, S. Xu: Preparation and evaluation of lysozyme-loaded nanoparticles coated with poly- γ -glutamic acid and chitosan. *Int. J. Biol. Macrom.* 59 (2013) 201-207.
- [59] K. Sonaje, Y.-J. Chen, H.-L. Chen, S.-P. Wey, J.-H. Juang, H.-N. Nguyen, C.-W. Hsu, K.-J. Lin, H.-W. Sung: Enteric-coated capsules filled with freeze-dried chitosan/poly(γ -glutamic acid) nanoparticles for oral insulin delivery. *Biomaterials* 31 (2010) 3384-3394.
- [60] Y.-H. Lin, F.-L. Mi, C.-T. Chen, W.-C. Chang, S.-F. Peng, H.-F. Liang, H.-W. Sung: Preparation and Characterization of Nanoparticles Shelled with Chitosan for Oral Insulin Delivery. *Biomacromolecules* 8 (2007) 146-152.
- [61] H.-D. Wu, J.-C. Yang, T. Tsai, D.-Y. Ji, W.-J. Chang, C.-C. Chen, S.-Y. Lee: Development of a chitosan–polyglutamate based injectable polyelectrolyte complex scaffold. *Carbohydr. Polym.* 85 (2011) 318-324.
- [62] H.-D. Wu, D.-Y. Ji, W.-J. Chang, J.-C. Yang, S.-Y. Lee: Chitosan-based polyelectrolyte complex scaffolds with antibacterial properties for treating dental bone defects. *Mat. Sci. Engin. C* 32 (2012) 207-214.
- [63] N. Dinauer, S. Balthasar, C. Weber, J. Kreuter, K. Langer, H. von Briesen: Selective targeting of antibody-conjugated nanoparticles to leukemic cells and primary T-lymphocytes. *Biomaterials* 26 (2005) 5898-5906.
- [64] T. P. Herrington, J. G. Altin: Effective tumor targeting and enhanced anti-tumor effect of liposomes engrafted with peptides specific for tumor lymphatics and vasculature. *Int. J. Pharm.* 411 (2011) 206-214.
- [65] T. R. Daniels, E. Bernabeu, J. A. Rodríguez, S. Patel, M. Kozman, D. A. Chiappetta, E. Holler, J. Y. Ljubimova, G. Helguera, M. L. Penichet: The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1820 (2012) 291-317.
- [66] A. Bunschoten, T. Buckle, J. Kuil, G. D. Luker, K. E. Luker, O. E. Nieweg, F. W. van Leeuwen: Targeted non-covalent self-assembled nanoparticles based on human serum albumin. *Biomaterials* 33 (2012) 867-875.
- [67] E. K. Lim, B. Kim, Y. Choi, Y. Ro, E. J. Cho, J. H. Lee, S. H. Ryu, J. S. Suh, S. Haam Y. M. Huh: Aptamer-conjugated magnetic nanoparticles enable efficient targeted detection of integrin $\alpha\beta 3$ via magnetic resonance imaging. *J. Biomed. Mater. Res. A* 102 (2014) 49-59.
- [68] H. M. Yang, C. W. Park, P. K. Bae, T. Ahn, B. K. Seo, B. H. Chung, J. D. Kim: Folate-conjugated cross-linked magnetic nanoparticles as potential magnetic resonance probes for *in vivo* cancer imaging. *J. Mater. Chem. B* 1 (2013) 3035-3043.
- [69] M. Licciardi, G. Giammona, J. Du, S. P. Armes, Y. Tang, A. L. Lewis: New folate-functionalized biocompatible block copolymer micelles as potential anti-cancer drug delivery systems. *Polymer* 47 (2006) 2946-2955.

- [70] H. Zhu, F. Liu, J. Guo, J. Xue, Z. Qian, Y. Gu: Folate-modified chitosan micelles with enhanced tumor targeting evaluated by near infrared imaging system. *Carbohydr. Polym.* 86 (2011) 1118-1129.
- [71] D. Chandrasekar, R. Sistla, F. J. Ahmad, R. K. Khar, P. V. Diwan: The development of folate-PAMAM dendrimer conjugates for targeted delivery of anti-arthritic drugs and their pharmacokinetics and biodistribution in arthritic rats. *Biomaterials* 28 (2007) 504-512.
- [72] A. Gabizon, A. T. Horowitz, D. Goren, D. Tzemach, H. Shmeeda, S. Zalipsky: *In vivo* fate of folate-targeted polyethylene-glycol liposomes in tumor-bearing mice. *Clin. Cancer Res.* 9 (2003) 6551-6559.
- [73] J. J. Lin, J. S. Chen, S. J. Huang, J. H. Ko, Y. M. Wang, T. L. Chen, L. F. Wang: Folic acid-Pluronic F127 magnetic nanoparticle clusters for combined targeting, diagnosis, and therapy applications. *Biomaterials* 30 (2009) 5114-5124.
- [74] M. E. Werner, S. Karve, R. Sukumar, N. D. Cummings, J. A. Copp, R. C. Chen, T. Zhang, A. Z. Wang: Folate-targeted nanoparticle delivery of chemo- and radiotherapeutics for the treatment of ovarian cancer peritoneal metastasis. *Biomaterials* 32 (2011) 8548-8554.
- [75] S. D. Weitman, R. H. Lark, L. R. Coney, D. W. Fort, V. Frasca, V. R. Zurawski Jr, B. A. Kamen: Distribution of the folate receptor GP38 in normal and malignant cell lines and tissues. *Cancer Res.* 52 (1992) 3396-3401.
- [76] N. Tyagi, P. C. Ghosh: Folate receptor mediated targeted delivery of ricin entrapped into sterically stabilized liposomes to human epidermoid carcinoma (KB) cells: effect of monensin intercalated into folate-tagged liposomes. *Eur. J. Pharm. Sci.* 43 (2011) 343-353.
- [77] J. F. Ross, P. K. Chaudhuri, M. Ratnam: Differential regulation of folate receptor isoforms in normal and malignant tissues in vivo and in established cell lines. *Cancer* 73 (1994) 2432-2443.
- [78] R. Singh, J. W. Lillard Jr.: Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp. Mol. Pathol.* 86 (2009) 215-223.
- [79] A. O. Elzoghby, W. M. Samy, N. A. Elgindy: Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *J. Control. Rel.* 157 (2012) 168-182.
- [80] Y. Liu, J. Sun, W. Cao, J. Yang, H. Lian, X. Li, Y. Sun, Y. Wang, S. Wang, Z. He: Dual targeting folate-conjugated hyaluronic acid polymeric micelles for paclitaxel delivery. *Int. J. Pharm.* 421 (2011) 160-169.
- [81] J. H. Park, G. Saravanakumar, K. Kim, I. C. Kwon: Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Adv. Drug Delivery Rev.* 62 (2010) 28-41.
- [82] H. Tian, Z. Tang, X. Zhuang, X. Chen, X. Jing: Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. *Prog. Polym. Sci.* 37 (2012) 237-280.
- [83] H. Hao, Q. Ma, C. Huang, F. He, P. Yao: Preparation, characterization, and *in vivo* evaluation of doxorubicin loaded BSA nanoparticles with folic acid modified dextran surface. *Int. J. Pharm.* 444 (2013) 77-84.

- [84] S. P. Chakraborty, S. K. Mahapatra, S. K. Sahu, P. Pramanik, S. Roy: Antioxidative effect of folate-modified chitosan nanoparticles. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* (2011) 29-38.
- [85] S. P. Chakraborty, S. K. Sahu, P. Pramanik, S. Roy: *In vitro* antimicrobial activity of nanoconjugated vancomycin against drug resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Pharm.* 436 (2012) 659-676.
- [86] S. Mansouri, Y. Cuie, F. Winnik, Q. Shi, P. Lavigne, M. Benderdour, E. Beaumont, J. C. Fernandes: Characterization of folate-chitosan-DNA nanoparticles for gene therapy. *Biomaterials* 27 (2006) 2060-2065.
- [87] X. Liu, Y. Zhang, D. Ma, H. Tang, L. Tan, Q. Xie, S. Yao: Biocompatible multi-walled carbon nanotube-chitosan-folic acid nanoparticle hybrids as GFP gene delivery materials. *Colloid. Surf. B* 111 (2013) 224-231.
- [88] P. M. Valencia, M. H. Hanewich-Hollatz, W. Gao, F. Karim, R. Langer, R. Karnik, O. C. Farokhzad: Effects of ligands with different water solubilities on self-assembly and properties of targeted nanoparticles. *Biomaterials* 32 (2011) 6226-6233.
- [89] R. Morava: Kontrasztanyagok. *Magyar Radiológia* 82 (2008) 300-304.
- [90] B. K. Kovács: A kontrasztanyagok. http://oftankonyv.reak.bme.hu/tiki-index.php?page=A+kontrasztanyagok_ptg
- [91] T. Györke: Nukleáris medicina. <http://oftankonyv.reak.bme.hu/tiki->
- [92] D. B. Elrod, R. Partha, D. Danila, S. W. Casscells, J. L. Conyers: An iodinated liposomal computed tomographic contrast agent prepared from a diiodophosphatidylcholine lipid. *Nanomed.: Nanotechn. Biol. Med.* 5 (2009) 42-45.
- [93] H. Aviv, S. Bartling, F. Kiesling, S. Margel: Radiopaque iodinated copolymeric nanoparticles for X-ray imaging applications. *Biomaterials* 30 (2009) 5610-5616.
- [94] A. de Vries, E. Custers, J. Lub, S. van den Bosch, K. Nicolay, H. Grull: Block-copolymer-stabilized iodinated emulsions for use as CT contrast agents. *Biomaterials* 31 (2010) 6537-6544.
- [95] Y. Jin, J. Wang, H. Ke, S. Wang, Z. Dai: Graphene oxide modified PLA microcapsules containing gold nanoparticles for ultrasonic/CT bimodal imaging guided photothermal tumor therapy. *Biomaterials* 34 (2013) 4794-4802.
- [96] S. Wen, K. Li, H. Cai, Q. Chen, M. Shen, Y. Huang, C. Peng, W. Hou, M. Zhu, G. Zhang, X. Shi: Multifunctional dendrimer-entrapped gold nanoparticles for dual mode CT/MR imaging applications. *Biomaterials* 34 (2013) 1570-1580.
- [97] L. E. Cole, T. Vargo-Gogola, R. K. Roeder: Bisphosphonate-functionalized gold nanoparticles for contrast-enhanced X-ray detection of breast microcalcifications. *Biomaterials* 35 (2014) 2312-2321.
- [98] K. Hadinoto: Mechanical stability of hollow spherical nano-aggregates as ultrasound contrast agent. *Int. J. Pharm.* 374 (2009) 153-161.

- [99] M. Azmin, G. Mohamedi, M. Edirisinghe, E. P. Stride: Dissolution of coated microbubbles: The effect of nanoparticles and surfactant concentration. *Mat. Sci. Engin. C* 32 (2012) 2654-2658.
- [100] Z. Liu, T. Lammers, J. Ehling, S. Fokong, J. Bornemann, F. Kiessling, J. Gätjens: Iron oxide nanoparticle-containing microbubble composites as contrast agents for MR and ultrasound dual-modality imaging. *Biomaterials* 32 (2011) 6155-6163.
- [101] M. C. Cochran, J. Eisenbrey, R. O. Ouma, M. Soulen, M. A. Wheatley: Doxorubicin and paclitaxel loaded microbubbles for ultrasound triggered drug delivery. *Int. J. Pharm.* 414 (2011) 161-170.
- [102] C.-H. Fan, C.-Y. Ting, H.-J. Lin, C.-H. Wang, H.-L. Liu, T.-C. Yen, C.-K. Yeh: SPIO-conjugated, doxorubicin-loaded microbubbles for concurrent MRI and focused-ultrasound enhanced brain-tumor drug delivery. *Biomaterials* 34 (2013) 3706-3715.
- [103] K. M. Donahue, D. Burstein, W. J. Manning, M. L. Gray: Studies of Gd-DTPA relaxivity and proton exchange rates in tissue. *Magn. Reson. Med.* 32 (1994) 66-76.
- [104] J. Morkenborg, M. Pedersen, F. T. Jensen, H. Stodkilde-Jorgensen, J. C. Djurhuus, J. Frokiær: Quantitative assessment of Gd-DTPA contrast agent from signal enhancement: an in-vitro study. *Magn. Reson. Imaging* 21 (2003) 637-643.
- [105] Y. Okuhata: Delivery of diagnostic agents for magnetic resonance imaging. *Adv. Drug Delivery Rev.* 37 (1999) 121-137.
- [106] K. W.-Y. Chan, W.-T. Wong: Small molecular gadolinium(III) complexes as MRI contrast agents for diagnostic imaging. *Coordin. Chem. Rev.* 251 (2007) 2428-2451.
- [107] J.-H. Kim, K. Park, H. Y. Nam, S. Lee, K. Kim, I. C. Kwon: Polymers for bioimaging. *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 1031-1053.
- [108] X. Wen, E. F. Jackson, R. E. Price, E. Kim, Q. Wu, S. Wallace, C. Charnsangavej, J. G. Gelovani, C. Li: Synthesis and characterization of poly(L-glutamic acid) gadolinium chelate: A new biodegradable MRI contrast agent. *Bioconjugate Chem.* 15 (2004) 1408-1415.
- [109] J. Liu, S.-i. Ohta, A. Sonoda, M. Yamada, M. Yamamoto, N. Nitta, K. Murata, Y. Tabata: Preparation of PEG-conjugated fullerene containing Gd³⁺ ions for photodynamic therapy. *J. Control. Rel.* 117 (2007) 104-110.
- [110] C. Richard, B.-T. Doan, J.-C. Beloeil, M. Bessodes, E. Toth, D. Scherman: Noncovalent functionalization of carbon nanotubes with amphiphilic Gd³⁺ chelates: toward powerful T₁ and T₂ MRI contrast agents. *Nano Lett.* 8 (2008) 232-236.
- [111] C. Kojima, B. Turkbey, M. Ogawa, M. Bernardo, C. A. S. Regino, L. H. Bryant, P. L. Choyke, K. Kono, H. Kobayashi: Dendrimer-based MRI contrast agents: the effects of PEGylation on relaxivity and pharmacokinetics. *Nanomed.: Nanotechn. Biol. Med.* 7 (2011) 1001-1008.
- [112] D. D. Castelli, W. Dastrù, E. Terreno, E. Cittadino, F. Mainini, E. Torres, M. Spadaro, S. Aime: *In vivo* MRI multicontrast kinetic analysis of the uptake and intracellular trafficking of paramagnetically labeled liposomes. *J. Control. Rel.* 144 (2010) 271-279.

- [113] K. Shiraishi, K. Kawano, Y. Maitani, M. Yokoyama: Polyion complex micelle MRI contrast agents from poly(ethylene glycol)-b-poly(L-lysine) block copolymers having Gd-DOTA; preparations and their control of T₁-relaxivities and blood circulation characteristics. *J. Control. Rel.* 148 (2010) 160-167.
- [114] Y. Zong, J. Guo, T. Ke, A. M. Mohs, D. L. Parker, Z.-R. Lu: Effect of size and charge on pharmacokinetics and in vivo MRI contrast enhancement of biodegradable polydisulfide Gd(III) complexes. *J. Control. Rel.* 112 (2006) 350-356.
- [115] M. Huang, Z. L. Huang, M. Bilgen, C. Berkland: Magnetic resonance imaging of contrast-enhanced polyelectrolyte complexes. *Nanomedicine* 4 (2008) 30-40.
- [116] J. K. Oh, J. M. Park: Iron oxide-based superparamagnetic polymeric nanomaterials: Design, preparation, and biomedical application. *Prog. Polym. Sci.* 36 (2011) 168-189.
- [117] P. Pradhan, J. Giri, F. Rieken, C. Koch, O. Mykhaylyk, M. Döblinger, R. Banerjee, D. Bahadur, C. Plank: Targeted temperature sensitive magnetic liposomes for thermo-chemotherapy. *J. Control. Rel.* 142 (2010) 108-121.
- [118] O. Veiseh, J. W. Gunn, M. Zhang: Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Adv. Drug Delivery Rev.* 62 (2010) 284-304.
- [119] A. K. Gupta, M Gupta: Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* 26 (2005) 3995-4021.
- [120] Z. T. Tsai, J. F. Wang, H. Y. Kuo, C.R. Shen, J. J. Wang, T. C. Yen: *In situ* preparation of high relaxivity iron oxide nanoparticles by coating with chitosan: A potential MRI contrast agent useful for cell tracking. *J. Magn. Magn. Mater.* 322 (2010) 208-213.
- [121] R. Y. Hong, B. Feng, L.L. Chen, G. H. Liu, H. Z. Li, Y. Zheng, D. G. Wei: Synthesis, characterization and MRI application of dextran-coated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. *Biochem. Eng. J.* 42 (2008) 290-300.
- [122] H. L. Ma, Y. F. Xu, X. R. Qi, Y. Maitani, T. Nagai: Superparamagnetic iron oxide nanoparticles stabilized by alginate: Pharmacokinetics, tissue distribution, and applications in detecting liver cancers. *Int. J. Pharm.* 354 (2008) 217-226.
- [123] M. Kumagai, Y. Imai, T. Nakamura, Y. Yamasaki, M. Sekino, S. Ueno, K. Hanaoka, K. Kikuchi, T Nagano, E. Kaneko, K. Shimokado, K. Kataoka: Iron hydroxide nanoparticles coated with poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer as novel magnetic resonance contrast agents for *in vivo* cancer imaging. *Colloid. Surf. B.* 56 (2007) 174-181.
- [124] D. Patel, J. Y. Moon, Y. Chang, T. J. Kim, G. H. Lee: Poly(D,L-lactide-co-glycolide) coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, characterization and in vivo study as MRI contrast agent. *Colloid. Surf. A.* 313-314 (2008) 91-94.
- [125] A. Kumar, B. Sahoo, A. Montpetit, S. Behera, R. F. Lockey, S. S. Mohapatra: Development of hyaluronic acid-Fe₂O₃ hybrid magnetic nanoparticles for targeted delivery of peptides. *Nanomedicine* 3 (2007) 132-137.

- [126] J. W. M. Bulte, M. de Cuyper, D. Despres, J. A. Frank: Preparation, relaxometry, and biokinetics of PEGylated magnetoliposomes as MR contrast agent. *J. Magn. Magn. Mater.* 194 (1999) 204-209.
- [127] P. W. Lee, S. H. Hsu, J. J. Wang, J. S. Tsai, K. J. Lin, S. P. Wey, F. R. Chen, C. H. Lai, T. C. Yen, H. W. Sung: The characteristics, biodistribution, magnetic resonance imaging and biodegradability of superparamagnetic core-shell nanoparticles. *Biomaterials* 31 (2010) 1316-1324.
- [128] M. Hamoudeh, F. Hatem: Preparation, characterization and surface study of poly-epsilon caprolactone magnetic microparticles. *J. Colloid Interf. Sci.* 300 (2006) 584-590.
- [129] V. Weissig, J. Babich, V. Torchilin: Long-circulating gadolinium-loaded liposomes: potential use for magnetic resonance imaging of the blood pool. *Colloid. Surf. B.* 18 (2000) 293-299.
- [130] K. Shiraishi, K. Kawano, T. Minowa, Y. Maitani, M. Yokoyama: Preparation and in vivo imaging of PEG-poly(L-lysine)-based polymeric micelle MRI contrast agents. *J. Control. Rel.* 136 (2009) 14-20.
- [131] T. K. Saha, H. Ichikawa, Y. Fukumori: Gadolinium diethylenetriaminopentaacetic acid-loaded chitosan microspheres for gadolinium neutron-capture therapy. *Carbohydr. Res.* 341 (2006) 2835-2841.
- [132] W. Watcharin, C. Schmithals, T. Pleli, V. Köberle, H. Korkusuz, F. Huebner, S. Zeuzem, H. W. Korf, T. J. Vogl, C. Rittmeyer, A. Terfort, A. Piiper, S. Gelperina, J. Kreuter: Biodegradable human serum albumin nanoparticles as contrast agents for the detection of hepatocellular carcinoma by magnetic resonance imaging. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (2014) <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.12.010>
- [133] V. Darras, M. Nelea, F. M. Winnik, M. D. Buschmann: Chitosan modified with gadolinium diethylenetriaminepentaacetic acid for magnetic resonance imaging of DNA/chitosan nanoparticles. *Carbohydr. Polym.* 80 (2010) 1137-1146.
- [134] M. Muthiah, I.-K. Park, C.-S. Cho: Surface modification of iron oxide nanoparticles by biocompatible polymers for tissue imaging and targeting. *Biotechn. Adv.* 31 (2013) 1224-1236.
- [135] A. Saraswathy, S. S. Nazeer, Ni. Nimi, S. Arumugam, S. J. Shenoy, R. S. Jayasree: Synthesis and characterization of dextran stabilized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for in vivo MR imaging of liver fibrosis. *Carbohydr. Polym.* 101 (2014) 760-768.
- [136] Z.-T. Tsai, J.-F. Wang, H.-Y. Kuo, C.-R. Shen, J.-J. Wang, T.-C. Yen: *In situ* preparation of high relaxivity iron oxide nanoparticles by coating with chitosan: A potential MRI contrast agent useful for cell tracking. *J. Magn. Magn. Mater.* 322 (2010) 208-213.
- [137] C. Sanjai, S. Kothan, P. Gonil, S. Saesoo, W. Sajomsang: Chitosan-triphosphate nanoparticles for encapsulation of super-paramagnetic iron oxide as an MRI contrast agent. *Carbohydr. Polym.* 104 (2014) 231-237.

- [138] H.-l. Ma, X.-r. Qi, Y. Maitani, T. Nagai: Preparation and characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles stabilized by alginate. *Int. J. Pharm.* 333 (2007) 177-186.
- [139] Y. Onuki, I. Jacobs, D. Artemov, Y. Kato: Noninvasive visualization of *in vivo* release and intratumoral distribution of surrogate MR contrast agent using the dual MR contrast technique. *Biomaterials* 31 (2010) 7132-7138.
- [140] J. H. Ke, J. J. Lin, J. R. Carey, J. S. Chen, C. Y. Chen, L. F. Wang: A specific tumor-targeting magnetofluorescent nanoprobe for dual-modality molecular imaging. *Biomaterials* 31 (2010) 1707-1715.
- [141] M. Mahmoudi, S. Sant, B. Wang, S. Laurent, T. Sen: Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. *Adv. Drug Delivery Rev.* 63 (2011) 24-46.
- [142] N. Butoescu, O. Jordan, P. Burdet, P. Stadelmann, A. Petri-Fink, H. Hofmann, E. Doelker: Dexamethasone-containing biodegradable superparamagnetic microparticles for intra-articular administration: Physicochemical and magnetic properties, *in vitro* and *in vivo* drug release. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72 (2009) 529-538.
- [143] J. Meng, J. Fan, G. Galiana, R. T. Branca, P. L. Clasen, S. Ma, J. Zhou, C. Leuschner, C. S. S. R. Kumar, J. Hormes, T. Otit, A. C. Beye, M. P. Harmer, C. J. Kiely, W. Warren, M. P. Haataja, W. O. Soboyejo: LHRH-functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for breast cancer targeting and contrast enhancement in MRI. *Mat. Sci. Engin. C.* 29 (2009) 1467-1479.
- [144] S. C. Wuang, K. G. Neoh, E. T. Kang, D. W. Pack, D. E. Leckband: HER-2-mediated endocytosis of magnetic nanospheres and the implications in cell targeting and particle magnetization. *Biomaterials* 29 (2008) 2270-2279.
- [145] G. Huang, J. Diakur, Z. Xu, L. I. Wiebe: Asialoglycoprotein receptor-targeted superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 360 (2008) 197-203.
- [146] D. Goren, A. T. Horowitz, D. Tzemach, M. Tarshish, S. Zalipsky, A. Gabizon: Nuclear delivery of doxorubicin via folate-targeted liposomes with bypass of multidrug-resistance efflux pump. *Clin. Cancer Res.* 6 (2000) 1949-1957.
- [147] I. J. Majoros, T. P. Thomas, C. B. Mehta, J. R. Baker, Jr.: Poly(amidoamine) dendrimer-based multifunctional engineered nanodevice for cancer therapy. *J. Med. Chem.* 48 (2005) 5892-5899.
- [148] S. D. Swanson, J. F. Kukowska-Latallo, A. K. Patri, C. Chen, S. Ge, Z. Cao, A. Kotlyar, A. T. East, J. R. Baker: Targeted gadolinium-loaded dendrimer nanoparticles for tumor-specific magnetic resonance contrast enhancement. *Int. J. Nanomed.* 3 (2008) 201-210.
- [149] N. Kamaly, T. Kalber, M. Thanou, J. D. Bell, A. D. Miller: Folate receptor targeted bimodal liposomes for tumor magnetic resonance imaging. *Bioconjugate Chem.* 20 (2009) 648-655.

- [150] X. Li, Y. Qian, T. Liu, X. Hu, G. Zhang, Y. You, S. Liu: Amphiphilic multiarm star block copolymer-based multifunctional unimolecular micelles for cancer targeted drug delivery and MR imaging. *Biomaterials* 32 (2011) 6595-6605.
- [151] K. Woo, J. Moon, K.-S. Choi, T.-Y. Seong, K.-H. Yoon: Cellular uptake of olate-conjugated lipophilic superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* 321 (2009) 1610-1612.
- [152] G. A. F. Roberts, J. G. Domszy: Determination of the viscometric constants for chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* 4(6) (1982) 374-377.
- [153] G. Sun, J. Feng, F. Jing, F. Pei, M. Liu: Synthesis and evaluation of novel polysaccharide-Gd-DTPA compounds as contrast agent for MRI. *J. Magn. Magn. Mater.* 265 (2003) 123-129.
- [154] M. D. Forster, M. G. Ormerod, R. Agarwal, S. B. Kaye, A. L. Jackman: Flow cytometric method for determining folate receptor expression on ovarian carcinoma cells. *Cytometry A* 71A (2007) 945-950.
- [155] T. Minko, P. Kopeckova, J. Kopecek: Chronic exposure to HPMA copolymer-bound adriamycin does not induce multidrug resistance in a human ovarian carcinoma cell line. *J. Control. Rel.* 59 (1999) 133-148.
- [156] L. Dai, Y. Liu, Z. Wang, F. Guo, D. Shi, B. Zhang: One-pot facile synthesis of PEGylated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MRI contrast enhancement. *Mat. Sci. Engin. C* 41 (2014) 161-167.
- [157] J. Szöllösi, V. Horejci, L. Bene, P. Angelisova, S. Damjanovich: Supramolecular complexes of MHC class I, MHC class II, CD20, and tetraspan molecules (CD53, CD81, and CD82) at the surface of a B cell line JY. *J. Immunol.* 157 (1996) 2939-2946.
- [158] P. Workman, P. Twentyman, F. Balkwill, A. Balmain, D. Chaplin, J. Double, J. Embleton, D. Newell, R. Raymond, J. Stables, T. Stephens, J. Wallace: United Kingdom Co-ordinated Committee on Cancer Research (UKCCCR) Guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia (second edition). *Br J Cancer* 77(1) (1998) 1-10.
- [159] S. S. Dharap, Y. Wang, P. Chandna, J. J. Khandare, B. Qiu, S. Gunaseelan, P. J. Sinko, S. Stein, A. Farmanfarmanian, T. Minko: Tumorspecific targeting of an anticancer drug delivery system by LHRH peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (2005) 12962-12967.
- [160] G. Trencsenyi, P. Kertai, F. Bako, J. Hunyadi, T. Marian, Z. Hargitai, I. Pocsi, E. Muranyi, L. Hornyak, G. Banfalvi: Renal capsuleparathyroid lymph node complex: a new in vivo metastatic model in rats. *Anticancer Res.* 29(6) (2009) 2121-2126.
- [161] I. C. Wei, N. Tsao, Y. H. Huang, Y. S. Ho, C. C. Wu, D. F. Yu, D. J. Yang: ^{99m}Tc -glycopeptide: Synthesis, biodistribution and imaging in breast tumor-bearing rodents. *Appl. Radiat. Isotopes* 66 (2008) 320-331.

8.2. Saját közlemények jegyzéke



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

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

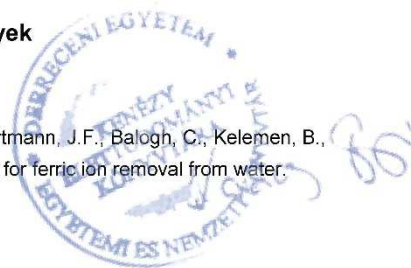
Jelölt: Hajdu István
Neptun kód: FWTI7S
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
Mtm azonosító: 10035948

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.**, Röthi, 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., Györi, 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 Képek. 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 tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.02.18

8.3. Előadások, poszterek jegyzéke

Egyéb tudományos közlemények:

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

Nanoparticles Prepared by Self-assembly of Chitosan and Poly-gamma-glutamic acid
Nanotech Conference Publications 2007, (2), 143-146.

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

Nanorendszerek, mint tumorspecifikus MR kontrasztanyagok (experimentális
vizsgálatok)

IME Az egészségügyi vezetők szaklapja 2011, X. évf. Képkötő különszám 19-21.

Szabadalmi bejelentések:

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

János Borbély, István Hajdu, Magdolna Bodnár, Ildikó Schiffertné Denyicska

Novel Targeted Paramagnetic Contrast Agent

U. S. Patent Application, Application Number:US 13/888,675 (Filed: May. 9. 2012)

János Borbély, István Hajdu, Jozsef Kollar, Magdolna Bodnár, Zsuzsanna Csikós

Magnetic Fluid Nanosystem

U. S. Patent Application, Application Number: US 61/711,543 (Filed: 10/9/2012)

János Borbély, István Hajdu, Zsuzsa Berényi

Self-assembled Nanoparticles for Targeted Drug Delivery of Epirubicin

U. S. Patent Application, Application Number: US 61/805,956 (Filed: 03/28/2013)

János Borbély, István Hajdu, Zsuzsanna Csikós, Magdolna Bodnár

Tumorspecific PET/MR(T1), PET/MR(T2) and PET/CT contrast agent

U. S. Patent Application, Application Number: US 61/840,482 (Field: 06/28/2013)
János Borbély, Magdolna Bodnár, István Hajdu, Zsuzsanna Csikós
Tumorspecific SPECT/MR(T1), SPECT /MR(T2) and SPECT /CT contrast agents
U. S. Patent Application, Application Number: US 61/840,483 (Field: 06/28/2013)

Konferencia előadások és poszterek:

Hajdu István

Nanorendszerek előállítása a kitozán és a poli- γ -glutaminsav önrendeződésével
Országos tudományos diákköri konferencia, Szeged, Apr 2-4 2007.

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.

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.

István Hajdu, Magdolna Bodnár, Genovéva Filipcsei, Dezső Kazup, Zsolt Keresztessy, John
F. Hartmann, János Borbély

Self-Assembled Nanoparticles for intracellular DNA delivery
9th Conference on Colloid Chemistry, Siófok, Hungary, October 3-5 2007.

Zsolt Keresztessy, Magdolna Bodnár, Elizabeth Ber, István Hajdu, Min Zhang, John F.
Hartmann, Tamara Minko, Janos Borbely

Self-Assembling Nanoparticles for targeted drug Delivery
9th Conference on Colloid Chemistry, Siófok Hungary, October 3-5 2007.

Hajdu István, Borbély János

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

István Hajdu, János Borbély

Self-assembled nanoparticles from biopolymers for DNA delivery

235th ACS National Meeting, New Orleans, April 6-10, 2008.

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.

Magdolna Bodnár, István Hajdu, John F. Hartmann and János Borbély

Toxic Heavy Metal Ions Removal from Waste Water by Membrane Filtration of PGA-based Nanoparticles

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

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, Bodnár Magdolna, Csikós Zsuzsa, Kovács Elza, Pregun Csaba, Kovács Béla, Györi Zoltán, Tamás János, Borbély János

Toxikus nehézfémek eltávolítása kombinált nano-membrán technológiával

XVII. Konferencia a felszíni vizekről, Siófok, március 24-25, 2010.

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.Kongresszusa Budapest Aug. 25-27 2011.

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.Kongresszusa Budapest Aug. 25-27 2011.

Hajdu István, Harmati Nóra, Róthi Eszter, Csikós Zsuzsanna, Bodnár Magdolna, Tamás János, Borbély János

Vas ionok eltávolítása mikroöntözésre alkalmas víz előállítása céljából

Környezetvédelmi Analitikai és Technológiai konferencia. Sümeg Okt. 5-7 2011.

Hajdu István, Bodnár Magdolna, Csikós Zsuzsanna, Kovács Béla, Tamás János, Borbély János

Ólomionok eltávolítása kombinált nano-membrán technológiával

Környezetvédelmi Analitikai és Technológiai konferencia. Sümeg Okt. 5-7 2011.

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

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.Kongresszusa Pécs 2013 június 30.- július 2.

9. Tárgyszavak

poli-gamma-glutaminsav
kitozán
biokompatibilis
folát-targetált
önrendeződő nanorészecske
MR-kontrasztanyag
paramágneses
szuperparamágneses
in vivo tumor halmozás

Keywords

poly-gamma-glutamic acid
chitosan
biocompatible
folate-targeted
self-assembled nanoparticle
MR contrast agent
paramagnetic
superparamagnetic
in vivo tumor accumulation

10. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak, akik segítségemre voltak az egyetemi doktori értekezést megalapozó kísérletek elvégzésében, és a mögötte rejlő elméleti tudásom megszerzésében.

Szeretném megköszönni Dr. Vámosi György és Prof. Dr. Kollár József témavezetői munkáját, szellemi irányítását, mellyel hozzájárultak szakmai fejlődésemhez és ezen munka létrejöttéhez.

Köszönet illeti Dr. Borbély Jánost, aki lehetővé tette és útmutatásával segítette a munkámat.

Köszönettel tartozom Dr. Trencsényi Gyögynek, Nagy Tamásnak és Gyuró Ágnesnek, akikkel sok éjszakát töltöttünk együtt a sikeres MR-vizsgálatok elvégzéséért.

Köszönöm a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetben dolgozó munkatársaimnak a munkám kezdeti szakaszában nyújtott önzetlen segítséget, amellyel bevezettek az in vitro vizsgálatok világába.

Köszönet illeti minden volt és jelenlegi kollegámat, a kísérletek során nyújtott tanácsaikért, segítségükért, valamint a magyar és a külföldi kollaborációs partnereket az eredményes közös munkáért.

Ezen felül köszönettel tartozom családomnak a támogatásért, bátorításért, valamint páromnak, Dr. Bodnár Magdolnának, aki a nyugodt családi háttér biztosításán kívül a disszertációm alapjául szolgáló kísérletekben is tevékenyen részt vett.

11. Függelék

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai