

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A MIKRONIZÁLT TITÁN-DIOXID BŐRÖN TÖRTÉNŐ ÁTJUTÁSÁNAK ÉS SEJTEKRE
GYAKOROLT HATÁSAINAK VIZSGÁLATA**

Dr. Kiss Borbála
Témavezető: **Dr. Hunyadi János**



DEBRECENI EGYETEM
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2009

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr. Berta András, az MTA doktora

tagok:

Dr. Bata-Csörgő Zsuzsanna, az MTA doktora

Dr. Virág László, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: 2009 . október 14. 11 óra

A védési bizottság

elnöke: Dr. Berta András, az MTA doktora

opponensek:

Dr. Matesz Klára, az MTA doktora

Dr. Széll Márta, Ph. D.

a védési bizottság tagjai:

Dr. Bata-Csörgő Zsuzsanna, az MTA doktora

Dr. Matesz Klára, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja és helye:

2009. október 14-én 13 órakor az I. sz. Belgyógyászati Klinika

Bevezetés és célkitűzések

A bőr, mint barrier

Az emberi bőr egy olyan védőréteg, amely a szervezetet a környezetétől elválasztani képes. A bőr feladatai közé tartozik a szervezet mechanikai védelme, az ingerek észlelése, a fényvédelem, a hőreguláció, és a kórokozók, idegen anyagok távoltartása. Kutatásaink szempontjából a legjelentősebb feladat a bőr barrier funkciója. A barrier funkció a vegyi és mechanikai ártalmakkal szembeni védelem, az idegen anyagok, organizmusok távoltartása, a víz és elektrolitok elvesztésének megakadályozása, az anyagok bőrön keresztüli felszívódásának gátlását jelenti. A bőr a hámrétege révén akadályt képez az idegen anyagok számára.

Az epidermális barriert a szaruréteg (a szaru-, vagy keratinocita barrier) és a lipid barrier együttesen alkotják. A szarubARRIER a szaruboríték korneocitáinak összessége, melyek erős mechanikai kapcsolat, sejtadhéziós struktúrák révén kapcsolódnak egymáshoz.

A barrier funkciózavara számos betegség, állapot illetve bőrsérülés hatására előállhat, illetve bőrbetegségek (pl. fertőzések, impetiginizáció) oka lehet.

A lipid barrier

A bőr barrierjének mind a lipid-, mind a keratinocita réteg egyformán fontos alkotórésze. Az előbbiről fontossága ellenére mégis relatíve keveset tudunk. Az egészséges stratum corneum lipid barrierjét ceramidok, szabad zsírsavak és koleszterol alkotják. A lipid szintézis a stratum granulosumban megy végbe, ahol kis intracitoplazmatikus zárványok (lamellar bodies) szintetizálódnak, melyek lipid tartalma exocitózissal a sejtek közötti térbe kerül a SG-SC határon, megalkotva ezzel a lipid védőréteget. Mindhárom lipid egyformán fontos szerepet játszik a külső hatások elleni védelemben.

A keratinocita barrier

A keratinocita barriert a sejtadhéziós molekulák révén összekapcsolódott hámsejtek terminális differenciációja, apoptózisa, azaz elszarusodása, és a lehámló korneociták helyére folyamatosan belépő újabb elszarusodó hámsejtek összessége alkotja. Az elszarusodás folyamata térben és időben is rendkívül szabályozott. A keratinociták a bazális sejtsor proliferatív sejtípusából a granuláris rétegen át (ahol a szaruboríték képződik) az epidermis felszíne felé haladnak, végül a legfelső, stratum corneumot alkotó ellapult, elhalt sejtekké alakulnak. Sejtszinten az elszarusodás folyamata a plazmamembrán alatti éretlen boríték kialakulásával kezdődik. Az elszarusodó sejtburrok „érése” során egyes preformált molekulák kovalensen

kötődnek egymáshoz, melynek eredményeként egy olyan rigid struktúra alakul ki, amely képes betölteni a fizikai és folyadék barrier feladatát. A korneocitákat az inszolubilis lipidekkel körülvett, fillagrin mátrixba ágyazott keratinocita intermedier filamentumok alkotják. A korneociták korneodezmoszómmal kapcsolódnak egymáshoz, amelyek a desquamatio során proteolitikusan lebomlanak a legfelső, elszarusodott sejtrétegekben.

A szaruréteg ellenálló képessége és oldhatatlansága egyrészt a transzglutaminázok (TG) által létrehozott nagyon stabil izopeptid kötéseknek alapszik. A transzglutaminázok szubsztátjai közé tartozik az involucrin, a loricrin, a profillagrin és a kis prolingazdag proteinek (SPR).

Az epidermis mechanikai szilárdságának másik elengedhetetlen tényezője az egyes keratinociták erős egymáshoz kapcsolódása, sejtdhéziója. Az epidermisben az intercelluláris rögzítésért az övszerű adherens junctionok (zonula adherens) és a dezmoszómmak a felelősek. Néhány adhéziós komplexet alkotó protein az elszarusodás folyamata során jellegzetes expressziós mintázattal jelentkezik. Ezen fehérjék közé tartoznak a desmogleinek, desmocollin-1, envoplakin, periplakin, plakophilin-1 és a korneodezmozin. A stratum granulosum és a SC határán a dezmoszóma citoplazmatikus plakkja beintegrálódik az elszarusodó borítékba, és az extracelluláris magban egy elektron-denz plakk keletkezik. A korneociták az így létrejött korneodezmoszómon keresztül kapcsolódnak össze a stratum corneumban. A korneodezmoszómmak két fő alkotórésze a desmoglein-1 és a desmocollin-1. A korneodezmoszómmak egy másik fontos alkotója a korneodezmozin.

A hám mechanikai ellenállóképességét, az elszarusodó boríték szerkezetét a transzglutaminázok által keresztbekötött proteinek és a sejtdhéziós struktúrákat alkotó fehérjék együttes stabilizáló hatása adja.

A titán-dioxid

A titán-dioxid a legfontosabb titánvegyület. A mikronizált (100 nm-nél kisebb részecskeméretű) titán-dioxid a háztartási, kozmetikai termékek általánosan használt alkotórésze. A TiO₂-nanorészecskékkel fehér festékekben, fogkrémekben, bőrápoló termékekben, a színezett nanopartikulumokkal dekorkozmetikai cikkekben nap mint nap találkozunk. Ezen mikronizált részecskék fényvédő krémekben ún. fizikai fényvédőként is régóta használatosak.

A mindennapi életünkben olyan sokoldalúan használt titán-dioxidnak felvetették a patogenetikai szerepét néhány tüdőbetegség kapcsán. Bizonyították, hogy e szervesetlen vegyületek

belégzése alveoláris gyulladást okozhat, következményes fibrosissal, így szerepet játszva a pneumoconiosis és rokon entitások kialakulásában. A TiO_2 részecskék, főként az ultrafinom, nanométeres tartományú részecskék esetében kimutatták, hogy rágszálókban tüdőrákot okoznak.

A nanopartikulumok bőrgyógyászati jelentőségét az adja, hogy a TiO_2 fizikai fényvédő filterként és pigmentként a kozmetikai termékek szinte nélkülözhetetlen alkotórésze. A titán-dioxid azonban nemcsak visszaveri, hanem el is nyeli a fotonokat. Ilyenkor a vegyület katalizátorként viselkedik: a részecskék felszínén UV besugárzás hatására a vizes közegben a vízből szuperoxid és hidroxil ionok, illetve más szabadgyökök képződnek. Ez az ún. fotokatalitikus hatás tehető felelőssé a vegyület lehetséges káros hatásaiért is. Széles körben ismert, hogy a szabadgyökök oxidatív DNS-károsodást okozhatnak a sejtekben, és negatívan befolyásolhatják azok működését a sejtciklus regulációjának elvesztése révén sejthalált, vagy proliferatív elváltozásokat okozva. Egy másik kutatócsoport kimutatta, hogy a mikronizált részecskék nagyobb valószínűséggel okoznak gyulladást, mint a nagyobb partikulumok, mivel előbbiek könnyebben diffundálnak a szövetekbe és a nagyobb fajlagos felületük miatt a nanopartikulumok nagyobb számú molekulával reagálnak, mint a nagyobb méretű részecskék, így több szabadgyök képződését katalizálják.

Eddigi ismereteink szerint a TiO_2 alkalmazása egyetlen bőrbetegség kialakulásában sem játszik szerepet. Feltételezhető, hogy a bőr epidermisének stratum corneum rétegét alkotó érett, elszarusodott hámsejtek barrierje hatásos védelmet nyújt ezen részecskék ellen, ellentétben a tüdő sérülékeny alveoláris felszínével. Amennyiben stratum corneum megakadályozza a TiO_2 nanopartikulumok *in vivo* penetrációját, úgy a bőr mélyebb rétegeiben található élő sejteken nem fejthetnek ki fotokatalitikus hatást. Hatásos védelem hiányában viszont az epidermist védő szaruréteg barrieren átjutott titán-dioxid nanopartikulumok a szövetek (extracelluláris mátrix, és sejten belüli kompartmentek) vizes közegébe kerülnek. Itt fotokatalitikus képességük birtokában szabadgyököket termelhetnek, melyek oxidatív hatása felgyorsíthatja a bőr öregedését, illetve kedvezhet a bőrtumorok kialakulásának.

A fényvédő készítményekben újabban a kis részecskeméretű, mikronizált titán-dioxidot alkalmazzák, amely jobb fényvédő hatásúnak bizonyult, mint a korábbi, nem mikronizált forma. A gyártók különféle felületi bevonattal látják el az újonnan kifejlesztett részecskéket. A bevonat az externák felvitele után jobb eloszlást eredményez a bőr felszínén, továbbá a káros hatások esetleges kivédését szolgálja. A részecskék kisebb mérete miatt a nanopartikulumok a bőr stratum

corneum barrierjén is könnyebben átjuthatnak.

Tekintve, hogy a titán-dioxidot igen sok fényvédőben és kozmetikumban megtalálhatjuk, a fogyasztók gyakran sérült integritású hámmal rendelkező (pl. felázott, napégett) bőrön alkalmazzák azokat. Ilyenkor a fent részletezett fotokatalitikus hatás az „élő sejtek” környezetében jeletkezik, és a bőrben található különböző sejteket károsíthatja. Az is feltételezhető, hogy a pulmonáris modellhez hasonlóan a dermális és epidermális sejtípusok is internalizálják a nanopartikulumokat. Ily módon a TiO_2 direkt toxikus hatást fejthet ki a sejtekre és emellett az epidermális hámképződés komplex mechanizmusának zavarát okozhatja.

Az ionnyaláb-analitikai módszerek alkalmazása a bőr vizsgálatára

A bőr barrier funkciójának vizsgálata már a titán-dioxid problematikája előtt is a bőrgyógyászati kutatások sarkallatos kérdése volt. A korábban kifejlesztett eljárások segítségével azonban csak igen kis számú vizsgálatot végeztek a kis partikulumméretű, ultrafinom, mikronizált titán-dioxid transzepidermális penetrációjával kapcsolatban. Tekintve, hogy ezek a nanopartikulumok a szokásos rutin hisztológiai módszerekkel nem tehetők láthatóvá, speciális képalkotó vizsgálatok szükségesek az epidermális penetráció mértékének meghatározására. A korábbi technikákat nehézkesen tudták penetrációs vizsgálatokra alkalmazni.

Nagy – megaelektronvolt (MeV) – energiájú ionnyalábbal anyagmintát bombázva, a minta nyaláb által érintett felületén (illetve annak bizonyos mélységéig) az összetevőkre (atomokra, esetleg izotópokra) jellemző különféle sugárzásokkal járó atomi és magfolyamatok jönnek létre. A sugárzás fajtáját, energiáját és intenzitását detektálva a minta összetevői meghatározhatók. A kifejlesztett analitikai módszerek a detektált sugárzás fajtájának, illetve a végbemenő folyamatoknak megfelelően különböznek egymástól. Összefoglaló elnevezésük: ionnyaláb analízis (ion beam analysis - IBA). Ezek közé tartozik többek között a részecskeindukált röntgenemisszió (Particle Induced X-ray Emission - PIXE), a Rutherford-visszaszórási spektrometria (Rutherford backscattering spectrometry - RBS) és a magreakció analízis (Nuclear Reaction Analysis – NRA) módszere.

A közelmúltban a PIXE, STIM (pásztázó transzmissziós ion mikroszkóp) és RBS nukleáris mikroanalitikai technikákat magfizikai laboratóriumok sikerrel használták a bőr elemösszetételének vizsgálatára. A kezdeti módszerekkel egészséges humán bőrt analizáltak. A módszer továbbfejlesztésének későbbi szakaszában sertésből, egérből, egészséges humán epidermist és psoriasisos humán bőrből származó mintákat vizsgáltak. Ezen vizsgálatok

segítségével meghatározták a bőr elemösszetételét.

A korábban leírtak alapján látható, hogy a kutatásaink tárgyát képező titán-dioxid a bőrben is feltehetően sejttoxikus hatású, ennek ellenére a mindennapi életben gyakran érintkezik kültakarónkkal. Fontos tehát megtudnunk, hogy a titán-dioxid bejut-e a bőrbe, és ha igen, eléri-e az élő sejtek rétegét. A nanopartikulumokat tartalmazó készítményeket ugyan a korábbi években is vizsgálták a bőrpenetráció szempontjából, de a régebbi módszerek korlátozottan alkalmasak ezen anyagok bőrbe jutásának tesztelésére. Az ionnyaláb analitikai technikák megfelelőnek ígérkeztek a bőr e szervetlen anyagokkal szembeni védekezőképességének vizsgálatára. Ezeket a módszereket alkalmaztuk tehát, hogy megtudjuk: láthatóvá tehető-e a titán-dioxid az emberi bőrben, penetrálnak-e a nanopartikulumok a bőrbarrieren, és ha igen, ott milyen sejtes hatást fejtenek ki?

A fenti nyitott kérdésekből kiindulva fizikusokból, biológusokból és bőrgyógyászokból álló interdiszciplináris kutatócsoportot állítottunk fel a NANODERM EU5 Konzorcium keretében. A „Quality of skin as a barrier for ultrafine particles” projekt célkitűzése az volt, hogy megvizsgálja: a bőrön alkalmazott titán-dioxid nanorészecskék eljutnak-e az epidermis élő sejtjeihez, illetve az expozíció hogyan befolyásolja a bőrben lévő sejt típusok viselkedését. A mintákat PIXE és TEM módszerekkel párhuzamosan vizsgáltuk.

Célkitűzéseink

- 1, Alkalmazható-e a súlyos kombinált immundeficienciás (severe combined immunodeficiency (SCID)) egérre transzplantált humán epidermis modell ionnyaláb analitikai vizsgálatokra? Egyezik-e a humán xenograft epidermis elemösszetétele a korábban vizsgált bőrmodellek elemösszetételével? Kísérleteink első részében tehát a SCID-egérre transzplantált humán bőr xenograft modell struktúráját TEM, és ionnyaláb analitikai módszerrel, valamint rutin hisztológiai módszerrel vizsgáltuk, az eredményeket az egészséges önkéntesek bőréből kapott korábbi adatokkal hasonlítottuk össze.
- 2, Kísérleteink következő fázisában választ kerestünk arra a kérdésre, vajon átjut-e a mikronizált titán-dioxid az ép epidermális barrieren? E célból a beállított módszerek segítségével, a *in vivo* penetrációs vizsgálatokat végeztünk SCID egér humán xenograft modellen, több laboratórium párhuzamos részvételével.
- 3, Végül kíváncsiak voltunk arra, hogy a sejtekkel közvetlenül kapcsolatba került titán-dioxid nanopartikulumok a tüdőben tapasztaltakhoz hasonlóan toxikusak-e a bőr sejtjeire? Annak

megállapítására, hogy a szarurétegen átjutott és az élő sejtekkel kapcsolatba lépett nanopartikulumok milyen sejtes hatást fejtenek ki, megvizsgáltuk a részecskék viselkedését különböző hám és írha eredetű sejtek tenyésztéseiben. A TiO_2 direkt sejtkontaktusban kifejtett hatását a sejtek életképességi, apoptotikus, proliferációs és differenciálódási funkcióinak változásával mutattuk ki.

Anyag és módszer

Titán dioxid formulák

A penetrációs vizsgálatokhoz titán-dioxidot tartalmazó hidrofób emulziót használtunk egy kereskedelmi forgalomban kapható termék formájában. A sejtenyészeteken végzett kísérletekhez a titán-dioxid 9 nm-es részecskenagyságú anatáz formáját alkalmaztuk, amely Prof. Z. Stachura (Krakkó, Lengyelország) laboratóriumából származott.

Kísérleti állatok

Az állatkísérletek kezelési protokolljait a DE OEC Állatkísérletes Bizottsága, és Kutatás Etikai Bizottsága jóváhagyta. A SCID egereken végzett kísérletek specifikus patogénektől mentes körülmények között a Debreceni Egyetem Orvos-, és Egészségtudományi Centrumának Bőr-, és Nemikórtani Klinikáján történtek. Circumcisióból származó humán preputium graftokat a korábban közölt módszer szerint SCID egerek hátbőrére transzplantáltuk. A graftok területét 2 mg/cm^2 koncentrációjú TiO_2 -emulzióval okklúzióban a megadott ideig kezeltük. A kezeléseket halotán inhalációs narkózisban végeztük. A nem kezelt állatokat kontrollként használtuk. Az expozíció után az állatokat az altatószer túladagolásával elpusztítottuk. A transzplantátumok területéről 6 mm átmérőjű „punch biopsziákat” vettünk.

Mintapreparálás nukleáris mikroszkópiához

A biopsziás anyagokat folyékony nitrogénben hűtött folyékony izopentánban gyorsfagyasztottuk. A mintákból $-25\text{ }^\circ\text{C}$ hőmérsékleten 14 μm vastagságú metszeteket készítettünk, melyeket liofilizálás után szobahőmérsékletűre melegítettünk. Egymást követő metszésekből származó metszeteket vizsgáltunk nukleáris mikroanalízissel és festettünk meg hematoxillin-eozinnal (HE) rutin szövettani vizsgálat céljából. A nukleáris mikroanalízishez a vizsgált metszeteket speciális ragasztócsíkkal erősítettük a mintatartókra

Nukleáris mikroanalízis az ATOMKI Ionnyaláb Alkalmazások Laboratóriumában

A nukleáris mikroanalitikai vizsgálatokat a Magyar Tudományos Akadémia debreceni Atommagkutató Intézetében, az 5 MeV energiájú Van de Graaf gyorsító 0°-os nyalábsatornájára

telepített pásztázó ion mikroszondán végeztük. A minták vizsgálatára a korábban közölt bio-PIXE beállítást használtuk, a pásztázó transzmissziós ionmikroszkópiával (STIM) kombinált részecskeindukált röntgenemissziós (PIXE) módszerrel. Ezen mérési és kiértékelési rendszer segítségével meghatározhatjuk a bőrnél nehezebb elemek kvantitatív elemkoncentrációját és eloszlását, néhány mikrométeres laterális felbontással 1-10 µg/g szenzitivitással. Összefoglalva: a mintákat egy 2 µm x 2 µm területre fókuszált protonnyalábbal sugároztuk be, amellyel szisztematikusan pásztáztuk a vizsgált területet.

A minták morfológiáját és felületi sűrűségeloszlását a pásztázó transzmissziós ionmikroszkópiával (STIM) határoztuk meg. Az egyes elemek koncentrációit és azok felületi eloszlását a PIXE módszerrel vizsgáltuk. Az ún. kétdetektoros módszert használtuk. Az egyik (igen vékony ablakú) detektorral a C-Fe (könnyű és közepes), míg a másik (normál Be ablakú) Si(Li) detektorral az S-U (közepes és nehéz) elemrégiókban vettük fel, ill. készítettük el a PIXE spektrumokat és térképeket. A kvantitatív elemkoncentrációkat és eloszlási térképeket a PIXEKLK szoftver felhasználásával határoztuk meg. A NANODERM projekt keretében néhány minta párhuzamos vizsgálatára P. Moretto bordeaux-i laboratóriumában került sor. Néhány további mérést a ljubjanai Jožef Stefan Institute (Ljubljana, Slovenia) ion mikroszondáján végeztünk.

Transzmissziós elektron mikroszkópia (TEM)

Az elektron mikroszkópos vizsgálatok a Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux-Gradignan, IN2P3-CNRS, (Gradignan, Franciaország) laboratóriumában készültek. A 6 mm átmérőjű bőrbiopsziákat 1 órán át 4°C-on 2.5% koncentrációjú glutáraldehid oldatban fixáltuk. A minták 0.1 M Na-cacodylate pufferben való kétszeri mosását (pH 7.4, 5 perces öblítés) követően 2 órán át szobahőmérsékleten 1% ozmium-tetroxid tartalmú 0.1 M nátrium-cacodylate pufferben (pH 7.4) öblítettük. Még két 5 perces cacodylate pufferes öblítési lépés után a mintákat szobahőmérsékleten felszálló etanol sorban dehidráltuk. Propilén-oxidos (2x 30 perc) áztatást követően propilén-oxid és Epon 812 egy-egy arányú keverékében 2 óráig majd tiszta Eponban 6 órán át. Ezek után 60°C-on egy éjszakán át polimerizáltuk. A beágyazott szövetmintából 35° gyémántkéssel felszerelt ultramikrotómmal félvékony (500 nm) és az ultravékony (50–100 nm) metszeteket készítettünk. Annak érdekében, hogy a vizsgált formulával való mesterséges kontaminációt elkerüljük, a metszés iránya a bőr belső rétegei felől a stratum corneum felé mutatott. A félvékony metszeteket mikroszkópos tárgylemezre gyűjtöttük, majd

fénymikroszkópos vizsgálat céljából toluidin-kékkel megfestettük. Az ultravékony metszeteket formvar/carbon bevonatú rézhálóra applikáltuk, ólom-citrátos és uranil-acetátos festés után 80 kV gyorsító feszültséggel transzmissziós elektron mikroszkóppal vizsgáltuk.

Sejtenyésztés

A humán immortalizált HaCaT keratinocita sejtvonal Prof. N. E. Fusenig laboratóriumából származott. A sejteket 25-cm² vagy 75-cm² nagyságú sejtenyésztő flaskákban tenyésztettük 37°C-on 5%-os CO₂ tartalmú atmoszférában. A keratinociták tenyésztéséhez Dulbecco's modified Eagle's médiumot használtunk 10% főtális borjú szérum (FCS), 2 mM/L-glutamin, 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, 1.25 µg/ml fungizone kiegészítés mellett.

A humán dermális fibroblasztokat (HDF) enzimátikus emésztéssel hámfosztott irhából nyertük a korábban közölt módon. A fibroblasztokat a fent leírt összetételű DMEM médiumban tenyésztettük.

Az SZ95 humán immortalizált sebecita sejtvonalat Sebomed médiumban tenyésztettünk, 10% FCS, 1 mM CaCl₂, 5 ng/ml humán rekombináns epidermális növekedési faktor, 50 U/ml penicillin, 50 µg /ml streptomycin hozzáadásával.

A primer humán melanocita sejtvonalat 10% FCS, 2 mM/L-glutamin, 50 U/ml penicillin, 50 µg /ml streptomycin, 1.25 µg /ml fungizone-nal kiegészített DMEM-ben tenyésztettük.

Sejtproliferáció meghatározása

Az életképes sejtszámot MTT teszttel határoztuk meg. Ennek lényege, hogy az életképes sejtek mitokondriumában az MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólium-bromid) tetrazóliumsó formazánná alakul, melynek koncentrációja mérhető. A sejtenyészetekből származó sejteket 96-lyukú multititer lemezekre szélesztettük négy párhuzamos mintán, melyeket a megadott ideig kezeltünk különböző koncentrációjú TiO₂ szuszpenzióval. Ezután a sejteket 2 órán át 0.5 mg/ml MTT-vel inkubáltuk, és a DMSO-ban feloldott formazán kristály koncentrációját kolorimetriásan határoztuk meg a gyártó előírása szerint. Az adatokat az átlag +/- SEM formában tüntettük fel.

Apoptózis meghatározása

A sejteket tripszinezéssel összegyűjtöttük majd 1 ml fluoreszcein izotiocianáttal (FITC)-konjugált annexin V-vel inkubáltuk sötétben 10 percig. Ezután áramlási citométer (segítségével meghatároztuk az apoptotikus sejtek teljes sejtszámhoz viszonyított százalékát.

Western blot analízis

A sejteket jéghideg foszfát-puffert tartalmazó sóoldatban (PBS) mostuk, majd homogenizáló pufferbe gyűjtöttük, és jégen történő szonikálással feltártuk. A minták fehérjetartalmát módosított BCA protein esszével határoztuk meg. A fehérjéket SDS-PAGE (8% gél, 20–30 mg protein vályúként) eljárással történő elválasztás után nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránokat 5% tejport tartalmazó PBS-ben blokkoltuk majd a differenciációs marker involucrin, desmoglein-1 és P-Cadherin sejtadhéziós molekulák elleni primer egér antitesttel jelöltük. Ezt követően peroxidázzal konjugált kecske anti-egér második antitestet alkalmaztunk és az immunreaktív sávokat kemilumineszcenciás reakció segítségével fényérzékeny filmre hívtuk elő. A felvitt fehérje mennyiségének ellenőrzésére az előbbi nitrocellulóz membránokról az antitesteket 200 ml 50 mM-os (pH 7.5) 2% SDS-t és 0.1% β -merkaptóetanolt tartalmazó Tris-HCl pufferben (65°C-on 1 óra) eltávolítottuk, ezt követően egér anti-cytokróm-c antitesttel jelöltük.

Sejten belüli kalcium koncentráció mérése

Az intracelluláris kalcium koncentráció ($[Ca^{2+}]_i$) változását a korábbiakban leírtak alapján határoztuk meg. A fedőlemezre szélesztett keratinocitákat 5 μ M fura-2 AM festékkel 37°C-on egy óráig inkubálva feltöltöttük. Minden mérés előtt a sejteket szobahőmérsékleten (22–24°C) Tyrode-oldatban inkubáltuk. Ezt követően a sejteket 15 μ g/cm² TiO₂-vel indukáltuk egy állandó perfúziót biztosító pumparendszer segítségével, majd a fura-2-vel feltöltött sejteket tartalmazó fedőlemezeket egy invert fluoreszcens mikroszkóp tárgylemeztartójára helyeztük. Az excitációs hullámhosszt 340 és 380 nm között változtattuk, míg a fluoreszcens emissziót 510 nm-en detektáltuk egy fotoelektron-sokszorozó segítségével, majd meghatároztuk a fluoreszcenciahányadosokat (F_{340}/F_{380}).

Statisztikai analízis

Minden kísérletet három alkalommal végeztünk el, különböző napokon. A szignifikancia meghatározására a Student *t* tesztet alkalmaztuk, és a $p < 0,05$ értékeket tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények

A TiO₂ partikulumok nem jutnak át a humán bőr transzplantátumok stratum corneum rétegén

Első lépésként igazoltuk, hogy a xenograft minták elemösszetétele megegyezik a korábban

leírt, egészséges humán önkéntesekből nyert minták elemösszetételével. Általánosan elfogadott, hogy a nukleáris mikroszondával kapott tömegeloszlási térképek és spektrumok a bőr organikus tömegét reprezentálják (HE metszetekkel összevethetően), továbbá, hogy a szerves tömeg és az egyes elemek megoszlása a bőr egyes rétegeire jellemző változást mutat. A megnövekedett szerves tömeg érték, kén, nátrium maximum érték és a magas kalcium szint a stratum corneumra jellemző. A magas foszfor értékek a stratum granulosumot jelzik, a további rétegeknek is jellemző az elemeloszlási mintázata. Ionnyaláb analízissel a kontroll, nem kezelt bőrbioptizás mintákban a jellemző elemeloszlási spektrum alapján a stratum corneum és a stratum granulosum azonosítható és egymástól egyértelműen megkülönböztethető. Az általunk alkalmazott SCID egérre transzplantált humán bőr modell esetén a vizsgált elemek eloszlása és az elemtérképek megegyeztek a más bőrmodelleken korábban leírtakkal. A nem kezelt mintákban TiO_2 -jelet nem detektáltunk.

Ezek után a mikronizált titán-dioxidot tartalmazó externával kezelt bőrminták elemösszetételét vizsgáltuk. A mintákat 1, 24 és 48 órán át kezeltük a titán-dioxid emulzióval, majd a penetrációt ionnyaláb analízissel és transzmissziós elektron mikroszkópiával követtük.

24 óra expozíció után TiO_2 jel maximumot ugyanazokon a területeken észleltük, ahol a stratum corneum elemösszetételére jellemző kén, nátrium és kalcium elemek magas koncentrációját. A bőr mélyebb rétegeiben nem kaptunk Ti-jelet. Ezen eredményünket megerősítette egy párhuzamos minta TEM vizsgálata, illetve PIXE analízis a bordeaux-i laboratóriumban. A nanopartikulumok egy óra expozíció után is a stratum corneum felszínén maradtak. 48 óra expozíció után a TiO_2 nanorészecskék némileg nagyobb mélységben voltak detektálhatóak nukleáris mikroanalízissel a debreceni és a bordeaux-i laboratóriumban vizsgálva. A TEM-vizsgálat a partikulumokat a stratum corneum compactum területén, a stratum granulosum határán mutatta, utóbbi réteget el nem érve.

A fentiek alapján megállapíthatjuk, hogy a humán bőr xenograft modellen vizsgálva a TiO_2 nanorészecskék az epidermisbe nem penetrálnak, nem érik el az „élő” sejtrétegeket.

A fibroblasztok és a melanociták internalizálják a TiO_2 nanopartikulumokat, a keratinociták és szebociták nem veszik fel azokat

A fenti eredmények megmutatták, hogy az intakt bőrben a stratum corneum hatásos végőgátként működik a mikronizált TiO_2 -dal szemben. Azonban a TiO_2 expozíciója igen

gyakran történik meg olyan esetekben, amikor a bőr barrierfunkciója károsodott (pl. napégés, mikrosérülések, felázott bőr), és a TiO_2 közvetlen érintkezésbe kerülhet a bőr sejtjeivel. Kísérleteink következő fázisában tehát be kívántuk mutatni a TiO_2 direkt hatását egyes epidermisből és dermisből származó tenyésztett sejttypusok celluláris funkcióira.

Elsőként megvizsgáltuk, hogy a bőr sejtjei felveszik-e plazmájukba a TiO_2 nanopartikulumokat. Szubkonfluens keratinocita, szebocita, melanocita, és fibroblaszt tenyészetekhez TiO_2 -t adtunk. 24 órás inkubáció után fáziskontraszt mikroszkópiával vizsgáltuk az internalizációt. A fibroblasztok és a melanocyták citoplazmájában észleltük a részecskéket, perinukleáris dúsulást mutatva. A magban nanopartikulumok nem voltak megfigyelhetőek. A keratinociták és a szebociták nem vették fel a titán-dioxidot.

A TiO_2 nanopartikulumok fibroblasztokban és melanocytákban emelik, a keratinocitákban és a szebocitákban nem befolyásolják a sejtek intracelluláris kalcium ion koncentrációját

Annak érdekében, hogy meghatározzuk, hogy a TiO_2 hatására (annak sejtbe való felvételétől függetlenül) jelátviteli folyamatok indulnak-e meg, megvizsgáltuk, hogy a nanopartikulum expozíció $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedést okoz-e a fenti sejttypusokban.

Az intracelluláris ion szintet kalcium-szenzitív festékkel vizsgálva 15 ug/cm^2 TiO_2 hozzáadása relatíve lassú, ugyanakkor részben vagy teljesen visszafordítható $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedést indukált a fibroblasztokban és a melanocitákban. Nem észleltünk azonban kalcium-választ azokban a sejtekben, amelyek nem vették fel TiO_2 -t, azaz a keratinociták és a szebociták esetében. A titán-dioxid internalizációja változást indukál a sejtek kalcium homeosztázisában.

A TiO_2 expozíció különbözőképpen befolyásolja a különféle humán bőrsejt vonalak proliferációját és apoptózist

A következő lépésben meghatároztuk a TiO_2 sejtproliferációra gyakorolt hatását. MTT életképességi teszttel vizsgálva a titán-dioxid minden vizsgált sejttypusban dózis-, és időfüggő módon csökkentette a sejtproliferáció mértékét (N.B. a keratinocitákban és a szebocitákban is, amelyek nem internalizálták a nanopartikulumokat). A keratinociták, szebociták, és melanocyták esetében a sejtproliferáció lassulását nem kísérte sejthalál. Más szóval, egyik TiO_2 expozíciós protokoll (koncentráció, expozíciós idő) esetében sem csökkent a második napon mért kontroll érték alá az életképes sejtek száma.

Ezzel szöges ellentétben áll a fibroblasztokon észlelt hatás. 15 ug/cm^2 TiO_2 jelenléte nemcsak, hogy teljesen meggátolta a fibroblasztok proliferációját, de az élő sejtek számát is csökkentette a kontroll értékhez képest. Annak vizsgálatára, hogy programozott sejthalál zajlik-e a fibroblasztokban, megvizsgáltuk a foszfatidil-szerin apoptózis marker megjelenését a sejtmembrán külső oldalán. A TiO_2 , korábbi eredményeinkkel összhangban, dózis-, és időfüggő módon indukálta a fibroblasztok apoptózisát. A keratinociták, melanocyták, és szebociták esetében viszont az Annexin-V pozitív apoptotikus sejtek aránya nem emelkedett szignifikánsan. A TiO_2 programozott sejthalált kiváltó hatása csak a dermalis fibroblasztokra korlátozódik.

A titán-dioxid hatására csökken a keratinocita differenciációs markerek és sejtadhéziós molekulák expressziója

Az *in vitro* kísérleteink utolsó fázisában azt vizsgáltuk, hogy a TiO_2 expozíció, a keratinociták proliferációgátlásán kívül befolyásolta-e néhány, a keratinocita differenciációban fontos fehérje expresszióját. 80-90 % konfluenciájú keratinocita tenyészeteket 48 órán át 15 ug/cm^2 TiO_2 -dal inkubáltunk, majd Western blot analízist végeztünk. A TiO_2 szignifikánsan csökkentette a késői keratinocita differenciációs marker involucrin valamint a desmoglein-1 és P-cadherin sejtadhéziós molekulák expresszióját.

A desmoglein-1 és az involucrin az intercelluláris adhézió kulcsmolekulái az epidermisben. E markerek a humán keratinociták differenciációja során azokban egyre erősödő expressziót mutatnak. Összefoglalva, ezen adatok arra utalnak, hogy a titán-dioxid nemcsak a keratinociták proliferációját csökkenti, hanem gátolja azok differenciációját is.

Megbeszélés

Kísérleteink eredményeként bebizonyítottuk, hogy az emberi epidermis stratum corneuma hatásos barrierként védi a bőr élő sejtjeit a mikronizált titán-dioxiddal való káros „találkozástól”. Mindemellett megmutattuk, hogy a bőr különböző sejtpopulációival történő közvetlen érintkezés (pl. sérült barrierfunkció) esetén a nanopartikulumok számos sejtfunkcióban jelentős zavart okozhatnak.

Az ionnyaláb analitikai módszerek alkalmazhatóak nyomelem penetrációs vizsgálatokra

A bőr barrierfunkciójának vizsgálata kiemelt fontosságú az emberi egészség szempontjából. A barrier értékelésére használt korábbi technikáknak számos hátránya van az

egyres anyagok bőrpentrációjának detektálása szempontjából. A TEWL mérése indirekt információt ad a bőr védőfunktációjáról anélkül, hogy a nanopartikulumok helyzetét megmutatná. A „tape stripping” penetráció vizsgálati technikák a nanopartikulumokat kimutatják ugyan, de nem adnak egzakt információt azok anatómiai fellelési helyéről. Éppen ezek miatt a korábbi technikákkal nem vizsgálható egyidejűleg a nanorészecskék penetrációja és a bőr barrier funktációja.

Munkánk során megmutattuk, hogy a nukleáris mikroanalitikai eljárások a régebbi módszereknél jobban alkalmazhatóak nyomelem penetrációs vizsgálatokra. Bebizonyítottuk, hogy a nukleáris mikroszondás módszerek nagy szenzitivitása és specifitása miatt ezen korábbi vizsgálómódszereknél nagyobb topográfiai relevanciával képes a vizsgált minta anatómiai struktúráinak reprodukciójára. Az eljárás a korábban kimutatott jellegzetes mutatók alapján (tömeg, ionösszetétel) a bőr rétegeinek egyértelmű azonosítására is alkalmas.

A módszer fenti előnye mellett hátrányai is megemlítendőek. Az ionnyaláb analízishez felhasználandó minták speciális fixálást igényelnek, a formalinban fixált anyagok utólag nem használhatóak a technikához. A mintának egyszerre csak kis része vizsgálható, a besugárzás, az eredmények kiértékelése időigényes, emiatt a nehézkes a nagy számú minta részletes képalkotó vizsgálata.

A SCID-egér humán xenograft modell alkalmas a bőr barrier funktációjának vizsgálatára

A SCID egérbe transzplantált humán preputium bőr xenograft modellen elért eredmények arra utalnak, hogy az kiválóan használható transzepidermális penetrációs vizsgálatokra. A modell előnye, hogy szükségtelemmé teszi az egészséges önkéntesek – sokszor nehézkes – toborzását bőrbipszia céljából. A preputium graftra azért esett a választásunk, mert a circumcisio során eltávolított és transzplantálandó fitymabőr bőrgyógyászatiilag egészséges, emellett a betegeknek nem jelent kozmetikai hátrányt és további kellemetlenséget a műtét elvégzése, hiszen arra más okokból sor kerül. Ezen graftok könnyebben beszerezhetőek, ezzel ellentétben a bőrgyógyászati tumorok műteti anyagait a szövettani feldolgozás (éppen történő eltávolítás megítélése) miatt teljes egészében fixáljuk. Az állatokra természetesen más területekről is átültethetőek egészséges illetve tumoros xenograftok.

Amellett, hogy a keratinocita barrier vizsgálatára tökéletesen alkalmas, a preputium xenograft – anatómiai tulajdonságaiból adódóan – nem teszi lehetővé a transzfollikuláris penetráció vizsgálatát.

A titán-dioxid nanopartikulumok intakt epidermális barrieren nem penetrálnak

Az állatmodell segítségével bebizonyítottuk, hogy az epidermis stratum corneuma elengedhetetlenül fontos szerepet játszik a mikronizált titán-dioxid elleni védelemben. Nukleáris mikroanalízissel ugyan kimutattuk az igen kis mennyiségű TiO_2 jelenlétét a mintában, ám annak elhelyezkedése főként a stratum corneum felső rétegére korlátozódott. Megfigyeltük azt is, hogy – megerősítve az általunk és más kutatócsoportok által disznóbőrön és humán bőrbíopsiás anyagokon már korábban leírtakat – még a 48 óra expozíciós idő és a penetrációt segítő okklúziós kötés alkalmazása sem eredményezte a nanopartikulumok mélyebb rétegekbe történő bejutását.

A bőr védőbarrierje azonban gyakran károsodhat (pl. sérülés, napégés, felázás, bizonyos bőrbetegségek esetén). Ezen kívül feltételezhető, hogy néhány helyileg alkalmazott anyag a stratum corneum megkerülésével transzfollikuláris vagy transzglanduláris úton elérheti a mélyebb epidermális rétegeket illetve a dermist. Korábbi kísérleteink során, sertésbőr modell vizsgálatokkor egy ízben egy follikulus mélyén titán jelet észleltünk. Ez megerősíti azt a feltevést, miszerint a mikronizált titán-dioxidot tartalmazó emulzió a szőrtüszőkön keresztül a bőr mélyebb rétegébe penetrálhat. Emiatt különös jelentőségű annak kiderítése, milyen következményei vannak a TiO_2 nanopartikulumok direkt expozíciójának az emberi bőrben megtalálható sejtek életképességére és sejtfunkcióira.

A titán-dioxid nanopartikulumokat egyes sejtvonalak internalizálják, a részecskék befolyásolják a sejtek működését

Kimutattuk, hogy a tüdő modellekhez hasonlóan, a TiO_2 az epidermalis és dermális sejtekhez adása jelentősen megváltoztatja azok működését. A partikulumokat internalizálták a fibroblasztok és a melanocyták, az epidermalis keratinociták és szebociták viszont nem vették fel őket. Ehhez kapcsolódott az a megfigyelésünk, hogy a TiO_2 nanopartikulumok internalizációját a fibroblasztokban és a melanocytákban az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedése kísérte, mely utóbbi jelenséget a másik két sejtvonal esetén nem tapasztaltuk. Ezen eredményünk arra utal, hogy a legtöbb sejtes mechanizmust szabályzó celluláris kalciumion-háztartás zavart szenvedett.

Érdekes megfigyelésünk volt azonban, hogy a nanorészecskék sejtes hatásainak kifejtéséhez sem a partikulumok felvétele, sem a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ szintjének változása nem obligát feltétel. Ez felvetheti más jelátviteli utak, illetve más sejtfelszíni receptorok szerepét.

A mikronizált titán-dioxid által termelt szabad gyökök oxidatív stressz választ indíthatnak be

A mikronizált titán-dioxid által sejtszinten kiváltott jelátviteli folyamatra az irodalomban nem találhatók korábbi eredmények (eltekintve a nagy részecskeméretű titán-dioxid makrofágokban észlelt MARCO-mediált fagocitózistól). Feltételezhető a részecskék fotokatalitikus tulajdonsága miatt, hogy a titán-dioxid nanopartikulumok sejtes hatása a részecskék szabadgyök termelő képességével lehet összefüggésben. A sejtekben főként a titán-dioxid felszínén létrejött szabadgyökök károsító hatása miatt oxidatív stressz keletkezhet. A oxidatív károsodásra adott reakciók létrejöttéhez sem a titán-dioxid felvétele, sem előzetes kalcium-szint emelkedés nem szükséges.

A TiO_2 szemcsék többféle módon befolyásolhatják a sejtek működését az általuk termelt szabadgyökökön keresztül. Mivel csak feltételezésekre hagyatkozhatunk, nehéz súlyozni, hogy az alábbiakban felsorolt lehetőségek közül melyek valóban aktívak és melyek módosítják érdemben a sejthalál paramétereit.

- 1, A sejtmembrán alkotóinak oxidációján keresztül, mely a membránfluiditás csökkenéséhez és a jelátviteli útvonalak aktivitásának megváltozásához vezethet
- 2, Redox szenzitív kinázok aktiválásán keresztül
- 3, Redox szenzitív transzkripciós faktorok (pl. NF κ B) aktiválásán keresztül.
- 4, A DNS károsításán keresztül, így aktiválva a DNS repairt, illetve a kapcsolt folyamatokat (pl. a PARP aktiváció-NAD⁺ deplécio-nekrózis/apoptózis útvonalat).

A TiO_2 expozíció minden vizsgált sejttípusban a proliferáció gátlását okozta a nanopartikulumok internalizációjától és az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ választól függetlenül

A TiO_2 expozíció minden vizsgált sejttípusban a növekedés dózis-dependens leállítását okozta, még a keratinociták és szebociták esetében is, amelyekben sem internalizációt, sem a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedését nem tapasztaltuk. A proliferációban gátolt, ám nem apoptotikus sejtvonalak esetén sokféle mechanizmus vezethet az osztódás leállításához. Erre utal az is, hogy a keratinocitákban, szebocitákban és a melanocitákban az MTT-vel stagnáló élő és apoptotikus sejtszámot detektáltunk, de míg melanociták esetén a nanopartikulumok internalizációját, és intracelluláris kalciumion-koncentráció emelkedést mutattunk ki, ugyanez hiányzott a keratinocitákban és szebocitákban. A keratinociták ugyan nem adtak kalcium-választ, és nem internalizálták a nanorészecskéket, mégis csökkent a specifikus differenciációs markerek

expressziója.

A titán-dioxid expozíció apoptózist indukál fibroblasztokban

A fibroblasztokban MTT vizsgálattal az élő sejtszám csökkenését tapasztaltuk, az Annexin-V áramlási citometriával apoptózist detektáltunk.

Az irodalomban nem lelhetők fel adatok a titán-dioxid apoptózist kiváltó hatásáról fibroblasztokban. Kísérleteink során azonban megfigyeltük a nanopartikulumok internalizációját, így azok kifejthették szabadgyök termelő képességüket a fibroblasztok citoplazmájában. Ennek következtében fent említett szabadgyökök által kiváltott folyamatok mehetnek végbe, melyek végül a fibroblasztok programozott sejthalálát okozzák.

A nanorészecskék hozzáadása után csökkent a differenciációs markerek expressziója HaCat keratinocitákban

Kimutattuk, hogy a keratinocitákban a proliferáció gátlását több differenciációs marker és adhézios molekula csökkent expressziója kísérte. Ezen molekulák csökkent expressziója differenciációs zavart, kóros citoszkeleton és dezmoszómaszerkezetet hozhat létre. A gyenge citoszkeletonból és dezmoszó mákból a gyenge sejtközötti adhézio miatt kialakuló defektív szaruboríték a barrierfunkció további romlását idézheti elő.

Az a megfigyelésünk, hogy a keratinociták nem internalizálták a mikronizált részecskéket, más aspektusból is fontos lehet. A kísérleteink során tapasztalt elmaradt internalizáció azt is jelentheti, hogy a piciny részecskénagyságú partikulumokat nem „észlelik” a sejtek, így azt nem tudják fagocitózissal eliminálni az élő sejtek közeléből.

A négy sejtvonal vizsgálata során kapott eredményeink arra utalnak, hogy a nanorészecskék a sejtes funkciók zavarát okozhatják mindegyik vizsgált sejttípusban, mely a fibroblasztok esetén bizonyítottan apoptózis. Az adatokból az is kitűnik, hogy titán-dioxid expozícióra mind a négyféle sejttípus más-más módon reagált.

Érdekes megfigyelésünk volt, hogy a nanorészecskék hozzáadása után morfológiai változások mennek végbe a sejtekben, melyek nyúlványaikat behúzták, „összehúzták magukat”. Ennek ismeretében feltételezhető, hogy a sejtes hatások háttérében kontakt gátlás állhat, melyet az oldhatatlan részecskék váltanak ki a sejtekre ülepedve és azokat körülvéve.

Lehetséges penetráció csökkent barrier funkciójú bőr esetén

Eredményeink bizonyítják, hogy humán bőrben intakt epidermális barrieren keresztül a mikronizált TiO₂ nanopartikulumok *in vivo* nem penetrálnak a stratum corneumon és nem érik el

a mélyben lévő élő sejtek rétegeit. Mindezek ellenére sérült barrier funkció, károsodott stratum corneum, illetve a bőrfüggelékeken át történő esetleges penetráció esetén feltételezhető, hogy egyes sejtek internalizálják a TiO_2 nanopartikulumokat, amelyek az epidermalis differenciáció zavarát okozhatják, és toxikus hatást is kifejthetnek a környező sejtekre. A sejt funkciók ezen változásai tovább gyengíthetik az epidermális barriert. A dermisben lévő fibroblasztok apoptózisa miatt a részecskék a dermis elasztózisát okozhatják, mely klinikailag a bőr öregedésében nyilvánul meg.

Különösen fontos lehet a sérült epidermális barrier szerepe egyes bőrbetegségek, állapotok esetén, amikor a sejtek megóvása érdekében a bőrgyógyász fényvédelmet rendel el. Ezek adekvát terápiája során javasoljuk a hatásos UV-sugárzás elleni védelmet, amely kiemelt fontosságú a szövetek funkcionálisan és esztétikailag is megfelelő regenerációja szempontjából. A fényvédelemre használt nanopartikulumok ekkor szinte biztosan bejuthatnak az élő sejtek környezetébe, és ott szabadgyököket termelhetnek.

Krónikus expozíció

A fent részletezett hatások feltehetően halmozottan jelentkezhetnek a hosszú távú expozíció alkalmával. A rendszeresen fényvédő krémeket használni kényszerülő betegek éppúgy ki vannak téve ezen hatásoknak, mint az egészséges személyek a vízparti nyaraláskor alkalmazott fényvédelem, a mindennapi bőrápolás során, smink használatakor.

Muitán a bőröregítő, és a karcinogén hatások jelentős részéért az UVA-hatás a felelős, a fényvédő krémek gyártói igyekeznek az UVB és UVA-spektrumban is egyformán hatékony externákat fejleszteni. A titán-dioxid és a szervesetlen filterek kulcsfontosságúak e készítményekben, hiszen ezek a molekulák azok, amelyek legnagyobb hatásfokkal szűrik ki az UVA sugarakat. A titán-dioxid nanopartikulumok más, a bevezetőben részletezett tulajdonságaik miatt is megkerülhetetlenek a kozmetikai ipar számára. A gyakran, hosszú távon fényvédő krémeket, kozmetikumokat használók tehát a pozitív és a negatív hatásoknak is ki vannak téve.

Gyermekekkori expozíció

Tekintve, hogy a csecsemők, kisgyerekek bőrfelülete igen érzékeny, barrierfunkciójuk gyengébb. Esetükben nagyobb a penetráció lehetősége, mint a felnőtteknél, így nagyobb az esélye a toxikus, és a DNS-károsító hatások bekövetkezésének is. Ismert, hogy a fiatal korban elszenvedett DNS-károsodás az öregedés során fokozottan hajlamosít bőrtumorok kialakulására. Kiemelt feladat a 20 év alatti fiatalok, gyermekek fotoprotekciója, amelynek segítségével a

melanoma és nonmelanoma bőrneopláziák megelőzhetők. A gyermekek fényvédelmére ajánlott általánosan elfogadott fényvédők fő hatóanyaga a titán-dioxid és egyéb fizikai filterek, mivel stabilak és nem allergizálnak. Számos külsőleg alkalmazott gyógyszerrel, organikus filterrel ellentétben a nanopartikulumok szisztémás felszívódásától, nem kívánt (pl. hormonális) mellékhatásaitól sem kell tartanunk. Fontos, hogy a gyermekek esetén se érvényesüljön a titán-dioxid fotokatalitikus hatása, amellyel az UV sugárzás szabadgyöktermelő hatását potencírozhatná.

Látható tehát, hogy kutatómunkánk nem csak a betegek egy kisebb csoportját érinti, hanem eredményei mindenki – egészségesek és betegek - számára egyaránt fontosak. Tekintve, hogy a titán-dioxid használata igen széles körben, szinte a teljes lakosság körében elterjedt, munkánknak ez különleges népegészségügyi, termékbiztonsági jelentőséget is ad: felhívhatjuk a szakemberek, a gyártók és a fogyasztók figyelmét egy lehetséges környezeti kockázatra. Különlegesen figyelemreméltó ez például a gyermekeknek kifejlesztett, illetve a sérült, beteg bőr ápolására ajánlott termékek esetében. Munkánkkal, eredményeinkkel reményeink szerint hozzájárulunk az újabb, biztonságosabb externák létrejöttéhez.

Új tudományos eredmények

1. A SCID egérmodell alkalmas a penetrációs vizsgálatok elvégzésére.
2. A SCID egérre transzplantált humán bőr xenograftok elemösszetétele nem különbözött az egészséges emberi bőrtől a tömegeloszlás, a Ca, K, P, S, Na, Cl vonatkozásában
3. Az ép stratum corneum rétegén a nanopartikulumok nem jutnak át. Elképzelhető azonban, hogy a titán-dioxid nanorészecskék a szaruréteg megkerülésével, transzfollikuláris vagy transzglanduláris úton jutnak a bőr mélyebb rétegeibe.
4. A fibroblasztok és a melanociták felveszik sejtplazmájukba a mikronizált titán-dioxidot, ahol azok hatására emelkedik az intracelluláris Ca^{2+} -szint.
5. A titán-dioxid nanopartikulumok proliferáció csökkenést okoznak a szebocitákban, melanocitákban, keratinocitákban.
6. A nanorészecskék apoptózist indukálnak fibroblasztokban.
7. A titán-dioxid hozzáadása csökkenti a HaCat keratinocita differenciációs markerek expresszióját.

Publikációs lista

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

- B. Kiss**, T. Biro, G. Czifra, B. I. Toth, Zs. Kertesz, Z. Szikszai, A.Z. Kiss, I. Juhasz, C. C. Zouboulis and J. Hunyadi. Investigation of micronized titanium dioxide penetration in human skin xenografts and its effect on cellular functions of human skin-derived cells *Exp. Dermatol.*, 2008 Aug;17(8):659-67 IF 2.449
- Zs. Kertész, Z. Szikszai, E. Gontier, P. Moretto, J.-E. Surlève-Bazeille, **B. Kiss**, J. Hunyadi, Á.Z. Kiss. Nuclear microprobe study of TiO₂-penetration in the epidermis of human skin xenografts. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 231 (2005) 280–285 IF 1.181
- E. Gontier, P. Barberet, Y. Barbotteau, K. Gáspár, C. Habchi, J. Hunyadi, S. Incerti, **B. Kiss**, A. Mavon, P. Moretto, T. Pouthier, M. Rosdy, J.-E. Surlève-Bazeille and M. D. Ynsa Micro-PIXE characterization of different skin models *X-Ray Spectrom.* 2005; 34: 381–388 IF 1.372
- E. Gontier; M-D Ynsa; T. Bíró; J. Hunyadi; **B. Kiss**; K. Gáspár; T. Pinheiro; J.-N. Silva; P. Filipe; J. Stachura; W. Dabros; T. Reinert; T. Butz; P. Moretto; J.-E. Surlève-Bazeille Is there penetration of titania nanoparticles in sunscreens through skin? A comparative electron and ion microscopy study *Nanotoxicology*, Vol. 2, Issue 4 December 2008 , 218 – 231, 12 November 2008

Egyéb közlemények

- P. Bai, S. M. Houten, A. Huber, V. Schreiber, M. Watanabe, **B. Kiss**, G. de Murcia, J. Auwerx, and J. Ménissier-de Murcia. Poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP)-2 controls adipocyte differentiation and adipose tissue function through the regulation of the activity of the retinoid X receptor/PPAR gamma heterodimer *J. Biol. Chem.*, Vol. 282, Issue 52, 37738-37746, December 28, 2007 IF 5.808

Idézhető absztraktok

- B. Kiss, Zs. Kertesz, Z. Szikszai, E. Gontier, P. Moretto, J. E. Surlève-Bazeille, A.Z. Kiss, and J. Hunyadi Investigation of TiO₂-penetration in the epidermis of human skin xenografts. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, Florence, Italy, Vol. 18, pp. 288-289. 2004

Összesített impakt faktor: 10.81