

A mikronizált titán-dioxid bőrön történő átjutásának és sejtekre gyakorolt hatásainak vizsgálata

értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében

Írta: Dr. KISS BORBÁLA KATALIN

Témavezető: Dr. Hunyadi János
egyetemi tanár

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok doktori iskolájában

Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum
Bőrgyógyászati Klinika

Debrecen, 2009

I. Tartalomjegyzék

I. TARTALOMJEGYZÉK	2
II. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
III. BEVEZETÉS.....	5
1. A BŐR SZERKEZETE	5
1.1. A hám (epidermis)	5
1. 2. Az irha (dermis)	6
1. 3. A bőralfja (subcutis)	7
1. 4. A bőrfüggelékek	7
2. A BŐR FUNKCIÓI	7
3. A BŐR, MINT BARRIER	8
3. 1. A lipid barrier	8
3. 2. A keratinocita barrier	9
4. FÉNYVÉDELEM	14
4. 1. Mechanikus fényvédelem	14
4. 2. Szisztémás fényvédelem	15
4. 3. Lokális fényvédelem	15
5. A TITÁN ÉS A TITÁN-DIOXID	17
5.1. A titán-dioxid patogenetikai szerepe, a fotokatalitikus hatás	18
6. A BŐR BARRIER ÉS AZ EPIDERMÁLIS PENETRÁCIÓ VIZSGÁLATA	21
6. 1. 1. A nukleáris mikroszkopos (mikroszkópia)	21
6. 1. 1. Elméleti háttér	21
6.1.2. Kísérleti megvalósítás	23
6. 2. Az ionnyaláb-analitikai módszerek alkalmazása a bőr vizsgálatára	25
7. A TITÁN-DIOXID HATÁSAINAK VIZSGÁLATA A BŐRBEN	26
IV. CÉLKITŰZÉSEINK.....	28
V. ANYAG ÉS MÓDSZER	29
1. Titán dioxid formulák	29
2. Kísérleti állatok	29
3. Mintapreparálás nukleáris mikroszkópiához	29
4. Nukleáris mikroanalitikai vizsgálatok	29
5. Transzmissziós Elektron Mikroszkópiás vizsgálatok (TEM)	30
6. Sejtenyésztés	31
7. Sejtproliferáció meghatározása	32
8. Apoptózis meghatározása	32
9. Western blot analízis	32
10. Sejten belüli kalcium koncentráció meghatározása	33
11. Statisztikai analízis	33
VI. EREDMÉNYEK	34
1. A TiO ₂ partikulumok nem jutnak át a humán bőr transzplantátumok stratum corneum rétegén.....	34
2. A fibroblasztok és a melanociták internalizálják a TiO ₂ nanopartikulumokat, a keratinociták és szebociták	

<i>nem veszik fel azokat</i>	39
3. A TiO_2 nanopartikulumok fibroblasztokban és melanocytákban emelik, a keratinocitákban és a szebocitákban nem befolyásolják a sejtek intracelluláris kalcium ion koncentrációját	41
4. A TiO_2 expozíció különbözőképpen befolyásolja a különféle humán bőrsejt vonalak proliferációját és apoptózisát	42
5. A titán-dioxid hatására csökken a keratinocita differenciációs markerek és sejtdhéziós molekulák expressziója	43
VII. MEGBESZÉLÉS.....	45
1. Az ionnyaláb analitikai módszerek alkalmazhatóak nyomelem penetrációs vizsgálatokra	45
2. A SCID-egér humán xenograft modell alkalmas a bőr barrier funkciójának vizsgálatára	46
3. A titán-dioxid nanopartikulumok intakt epidermális barrieren nem penetrálnak	46
3. A titán-dioxid nanopartikulumokat egyes sejtvonalak internalizálják, a részecskék befolyásolják a sejtek működését.....	47
4. A mikronizált titán-dioxid által termelt szabad gyökök oxidatív stressz választ indíthatnak be a sejtekben..	47
5. A TiO_2 expozíció minden vizsgált sejttypusban proliferáció gátlását okozta a nanopartikulumok internalizációjától és az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ választól függetlenül	48
6. A titán-dioxid expozíció apoptózist indukál fibroblasztokban.....	49
7. A nanorészecskék hozzáadása után csökkent a differenciációs markerek expressziója HaCat keratinocitákban.....	49
8. Lehetséges penetráció csökkent barrier funkciójú bőr esetén.....	50
9. Krónikus expozíció	51
10. Gyermekkori expozíció	51
11. Bőrgyógyászati, népegészségügyi, tudományos jelentőség	52
VIII. ÖSSZEFOGLALÁS.....	54
IX. SUMMARY	55
X. ÚJ EREDMÉNYEK	56
X. IRODALOM	57
XI. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS.....	62
X. PUBLIKÁCIÓS LISTA	63
XI. FÜGGELÉK (KÖZLEMÉNYEK MÁSOLATAI)	64

II. Rövidítések jegyzéke

Cyt C: citokró-m-C
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO: dimetil-szulfoxid
Dsg-1: desmoglein-1
EPMA: Electron Probe Microanalysis, elektronszonda mikroanalízis
FCS: fetal calf serum, főtális borjú szérúm
FITC: fluoreszcein izotiocianát
fura-2 AM: a kalciumérzékeny, fluoreszcens Fura-2 festék acetoximetilészter formája
HDF: humán dermális fibroblasztok
HE: hematoxillin-eozin
IBA: ion beam analysis, ionnyaláb analízis
INV: involucrin
LEKTI: lympho-epithelial Kazal-type related inhibitor
MARCO: macrophage receptor with collagenous structure
MED: minimális erythema dózis
MTT: (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólium -bromid)
NRA: magreakció analízis
PAR2: proteináz aktivált receptor 2
PBS: phosphate-buffered saline, fiziológiás só-t tartalmazó foszfát puffer
P-Cad: P-Cadherin
PIXE: Particle Induced X-ray Emission, részecskeindukált röntgenemisszió
RBS: Rutherford backscattering spectrometry, Rutherford-visszaszórási spektrometria
SB: stratum basale
SC: stratum corneum
SCCE: stratum corneum chymotryptic enzyme, stratum corneum kimotriptikus enzim
SCTE: stratum corneum tryptic enzyme, stratum corneum triptikus enzim
SDS-PAGE: Na-dodecil-szulfát poliakrilamid gél elektroforézis
SG: stratum granulosum
SPF: sun protection factor, fényvédő faktor
SPR: kis prolingazdag proteinek
SPINK5: Kazal-típusú szerin proteáz inhibitor 5
SPT: szerin palmitoil-CoA transzferáz
SS: stratum spinosum
STIM :Scanning Transmission Ion Microscopy, pásztázó transzmissziós ionmikroszkópia
TG: transzglutamináz

III. Bevezetés

1. A bőr szerkezete

Az emberi bőr, amely a szervezetünk és a külvilág közti határvonalat képezi, három részből áll. A legkülső réteg a hám (epidermis), a középső az írha (dermis), míg a legbelső része a bőralja (subcutis).

1.1. A hám (epidermis)

A hám a bőr legkülső, külvilággal határos rétege, mely a környezettel szembeni védelmet látja el. Sejtjei 95%-ban **keratinociták**. (Braun-Falco és mtsai., 2000; Dobozy és mtsai., 1998)

A bőr hámsejtek differenciálódása, az elszarusodási folyamat eredménye a védelmet nyújtó szaruréteg. A keratinociták differenciálódási stádiumainak megfelelően a hám 5 szövettani rétegét különböztethetjük meg. A legalsó sejtsor, a *stratum basale* oszló sejteket tartalmaz, melyek az érés során a felső rétegek felé vándorolnak. A sejteket erős intercelluláris junkciók kötik össze egymással, amely a szövettani metszeten a *stratum spinosum* sejtjeinek tüskés kinézetéért felelős, e sejtekben már megtalálható a tonofilamentumok rendszere. A *stratum granulosum* (SG) rétegében már fellelhetők a szaruképzésben szerepet játszó keratohyalin granulumok. A *stratum lucidum* mindössze egy sejtsor vastagságú, a tenyéren és a talpon vastagabb. A lapos sejtekben még találunk organelumokat a kénben gazdag mátrixba ágyazott citoskeleton elemek között. A kutatásaink számára legfontosabb *stratum corneum* (SC) rétegében mag és sejtalkotók nélküli, elszarusodott sejteket, **korneocitákat** találunk, melyeket dezmoszómák láncolnak egymáshoz. A *szaruboríték*ot alkotó sejtek hidrofilek, víz hatására megduzzadnak. A szaruboríték (cornified envelope) a differenciálódó keratinociták sejtmembránjának mentén alakul ki, és transzglutaminázok által keresztkötött (Candi és mtsai., 2005) inszolubilis fehérjemasszába ágyazott keratinokból áll. Alattuk található a lipidekben gazdag hidrofób zóna, a *lipid boríték*. A korneociták hámlás révén válnak le a bőr felszínéről.

A stratum corneum szerkezetének leírására számos modellt dolgoztak ki, melyek lényege, hogy a korneociták, mint „téglák” vannak beágyazva a lipidben dús sejtközi állomány

habarcsába. A modellek sokat finomodtak, de a SC barrier összetett szerkezetét és funkcióit nem tükrözik tökéletesen (Jungersted és mtsai., 2008).

Az utóbbi évtized kutatásai rávilágítottak a keratinociták immunológiai szerepére is. A hámsejtek toll-like receptorokat, major hisztokompatibilitási komplex antigéneket expresszálnak, illetve citokineket, kemokineket, antimikrobiális peptideket termelnek. A keratinociták tehát fontos szereplői a bőr természetes immunvédekező rendszerének (Pivarcsi és mtsai., 2005).

A keratinociták állandó megújulása, a bazális sejtsorból a stratum corneumig tartó vándorlása és pusztulása – az epidermopoiesis - tartja fenn a hám szerkezetét, ennek ideje átlagosan 28 nap. Az epidermális differenciáció az elszarusodással, a keratinizációval párhuzamosan zajlik, a folyamat lényegében a hámsejtek programozott sejthalála (Candi és mtsai., 2005).

A keratinociták mellett a hámban a fényvédelemben szerepet játszó, melanint termelő **melanocitákat**, immunfeladatokat ellátó **Langerhans sejteket**, és idegi eredetű **Merkel-sejteket** találunk.

A melanint termelő melanociták a bazális sejtrétegben lévő nyúlványos, világos plazmájú sejtek, citoplazmájukban a melanin tartalmú melanoszómákkal. Egy melanocita kb. 36 hámsejttel létesít kapcsolatot, ezt melanoszómális, vagy melanocita-keratinocita egységnek nevezzük. A sejtekben a melanin többlépcsős, enzimatis úton képződik tirozinból. Az érett melanint tartalmazó melanoszómákat nyúlványaikon keresztül a keratinocitáknak adják át, ami szabadgyökfogó tulajdonsága révén megvédi utóbbiak magját az UV-okozta DNS károsodástól. A melanin adja az emberi bőr barnás árnyalatú pigmentációját. A pigmentáció mértéke a hámban lévő melanin mennyiségétől függ (Braun-Falco és mtsai., 2000).

1. 2. Az írha (dermis)

Az írha sejteinek döntő részét a **fibroblasztokból** kialakuló **fibrociták** képezik. Ezen kívül a retikuloendoteliális rendszer részét képező **hisztiociták**, valamint az érpályából kivándorolt, immunológiai funkciókat betöltő alakos elemek: a **limfociták**, **granulociták**, **plazmasejtek**, találhatóak. A **hízósejtek** is az írhában helyezkednek el. A fibroblasztok az írha sejtközi állományát és rostrendszerét képezik.

Az írha rostrendszere kollagénrostokból, elasztikus rostokból és rácsrostokból áll, a bőr rugalmasságát és ellenálló képességét biztosítja. Az írha alapállománya amorf massa, amelybe az írha rostjai be vannak ágyazva. Az alapállományt glükózaminoglikánok (hyaluronsav,

dermatán-szulfát, kondroitin-szulfát), valamint azok proteinekkel alkotott vegyületei, a proteoglikánok alkotják. A felsoroltakon kívül az írha alapállomány felépítésében a víz, különböző sók, valamint glikoproteinek is részt vesznek (Braun-Falco és mtsai., 2000). A dermis sejtközi mátrixa a bőr öregedésével veszít mennyiségéből, mellyel párhuzamosan a rostok is feltöredeznek.

Az írha feladata a mechanikai védelem a bőr rugalmasságának biztosítása révén, az elektrolit és vízvesztés megakadályozása. A dermisben futnak a bőrt tápláló vérerek és itt találhatóak a bőrfüggelékek is.

1. 3. A bőralja (subcutis)

A bőralja főként zsírszövetből áll, melyet a fejtetőn, tenyéren és a talpon kötőszövetes sötétyek választanak el egymástól. A subcutan zsírszövet feladata a hőszigetelés, az energiatermelés és a tompa behatások elleni mechanikai védelem.

1. 4. A bőrfüggelékek

A bőrfüggelékek közül kiemelendő az írhában található szőrtüsző, melyet a bele szájadzó faggyúmiriggyel együtt pilosebaceus egységnek nevezünk. A holokrin faggyúmirigy mellett megtalálhatóak az eccrin verejtékmirigyek és az apokrin illatmirigyek.

A bőrfüggelékeknek jelentősége lehet a penetráció szempontjából, mivel a külvilág felé nyitottak, a kivezetőcsöveikkel a hám felső rétegét átfúrják.

2. A bőr funkciói

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, azaz antimikrobiális aktivitása. Kutatásaink szempontjából a legjelentősebb feladat **a bőr barrierfunkciója**.

3. A bőr, mint barrier

A barrierfunkció a vegyi és mechanikai ártalmakkal szembeni védelem, az idegen anyagok, mikroorganizmusok 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.

Bár a bőr egészséges védőfunkciójához mind a keratinocita, mind a lipid védőréteg jelenléte fontos, a kutatások során időről időre vagy a lipidek, vagy a keratinociták szerepe kerül előtérbe. Mind a keratinocita differenciáció, mind a hámsejt megújulás zavara a barrier gyengülését illetve megszűnését idézheti elő. Amennyiben a védőgát meggyengül, az akadályozó hatás megszűnik és a noxák a bőr mélyebb rétegeibe juthatnak.

Az anyagok háromféle módon penetrálhatnak a bőrbe. A szőrtüszőn és a faggyúmirigyeken keresztül, transzfollikuláris, transzglanduláris úton a zsírban oldódó anyagok juthatnak be. A verejtékmirigyeken át a vízdékony anyagok penetrálhatnak. A szaruréteg sejtjeinek eltávolításával („stripping”) a vízdékony, a bőrfelszín zsírtalanításával a lipiddékony molekulák átjutása fokozódik.

A barrier funkciózavara számos betegség, állapot (pl. atófiás bőr) illetve bőrsérülés hatására előállhat, illetve bőrbetegségek (pl. fertőzések, impetiginizáció) oka lehet. Az újabb ismeretek alapján az epidermalis védővonal kulcsjelentőségű az atopiás dermatitis patogenezisének vonatkozásában is.

3. 1. 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

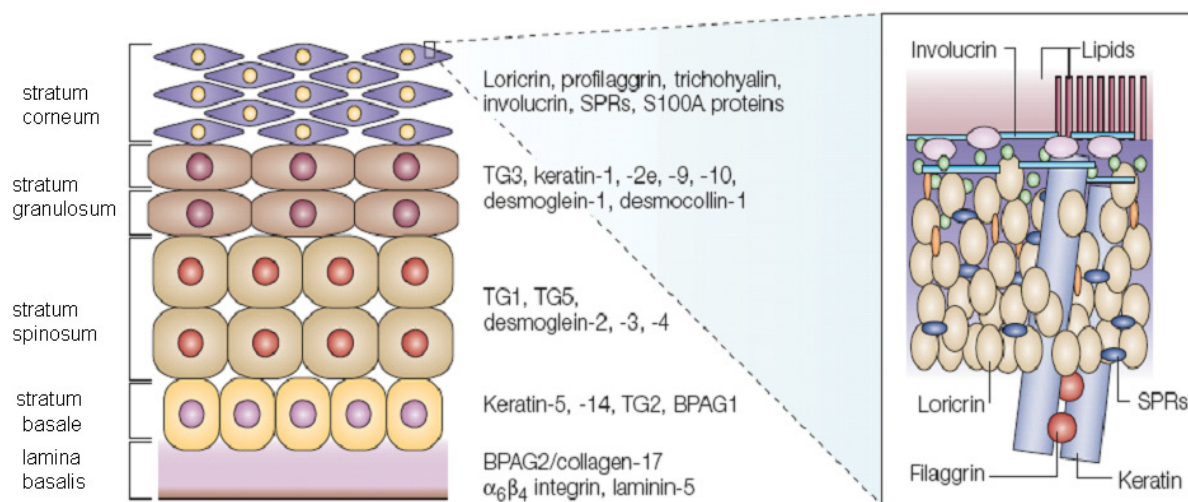
hatások elleni védelemben. Az egyes lipidek tulajdonságait részletesen az **1. számú táblázat** tartalmazza (Jungersted és mtsai., 2008).

Lipid	Tulajdonságok	Keletkezés
Ceramidok	• szfingozinból és ahhoz amidkötéssel kapcsolódó zsírsavból állnak • emberben ceramid 1-9 típus • ceramid-1: SC lipidek felépítésében fontos szerepet játszik • SG keratinocitáiban szintetizálódik, majd a lamelláris (Odland)-testek belsejében szállítódik a SCba • másodlagos messenger szerep jelátviteli folyamatokban (Hannun és Obeid, 1995)	• szintézis: szerin-palmitoil-CoA transzferáz (SPT) katalizálja • SPT expresszió barrierkárosodásra és UVB-hatásra indukálódik • hidrolízis: cerebrozidokból és szingomyelinból, savas szfingomyelináz hatására keletkezhet
Koleszterol	• barrier funkcióban játszik szerepet • hőmérsékletváltozások után stabilizálja a SC szerkezetét	• szintézise összetett folyamat • a sebességhatározó folyamatot a HMG-CoA reduktáz katalizálja • egerekben a helyileg alkalmazott HMG-CoA reduktáz inhibitorok lassították a barrier sérülés utáni visszaállítást (Mao-Qiang és mtsai., 1993) • barrier sérülése után megfigyelték a HMG-CoA reduktáz, HMG-CoA szintáz, farnesol difoszfónát szintáz, és a szkvalén szintáz upregulációját (Harris és mtsai., 1998)
Szabad zsírsavak	• poláros feji véggel, apoláros farokkal rendelkeznek • lipid kettősréteget és a bőr felszínének 4–5.5-ös savas pH értékét alakítják ki	• szintézis: acetil-CoA karboxiláz és zsírsav szintáz katalizálja • az enzimek mRNS szintje megemelkedik barrier károsítás után

1. táblázat: Lipidek a bőrben (Jungersted és mtsai nyomán)

3. 2. A keratinocita barrier

A keratinocita barrier a sejtheadhéziós molekulák révén összekapcsolódott elszarusodó hámsejtek alkotják. A hámsejtek differenciációja - az elszarusodás – a sejtek apoptózisát eredményezi. A hámsejt védőréteget ezen szarusejtek alkotják. A lehámló korneocitákat helyére folyamatosan belépő újabb elszarusodó hámsejtek pótolják. Az elszarusodás folyamata térben és időben is rendkívül szabályozott. A keratinociták a bazális sejtsor proliferatív sejttypusából a granuláris rétegen át (ahol a szaruboríték képződik) az epidermis felszíne felé haladnak, végül a legfelső, stratum corneumot alkotó ellapult, elhalt sejtekké alakulnak (Candi és mtsai., 2005) (**1. ábra**).



1. ábra Terminális differenciáció és apoptózis az epidermisben.

Candi és mtsai cikkéből átvéve (Candi és mtsai., 2005).

Sejtszinten az elszarusodás folyamata a plazmamembrán alatti éretlen boríték kialakulásával kezdődik. Az elszarusodó sejtburók „érése” során egyes molekulák kovalensen kötődnek egymáshoz, melynek eredményeként egy olyan szilárd szerkezet alakul ki, amely képes betölteni a fizikai és folyadék barrier feladatát. A sejtproliferáció, differenciáció és a sejthalál egymás után zajlik, és mindhármát specifikus proteinek expressziója jellemzi.

Az egészséges emberi bőrben a bőrfelszín korneocitáinak hámlása szabályozza a bazális sejtek proliferációjának mértékét: ez az epidermális homeostasis, amely a hámréteg folyamatos megújulását szabályozza. A stratum corneum fehérjéinek össz tömege az egész epidermis tömegének 7–10 százalékát adja. A szaruboríték proteinjeivel egy időben a lipidek is megszentetizálódnak. Egyes lipidek a szaruboríték fehérjeihez kapcsolódva létrehozzák a sejtek közötti lamellákat, mely a barrier fontos része (Jungersted és mtsai., 2008).

A korneocitákat az oldhatatlan lipidekkel körülvett, fillagrin mátrixba ágyazott keratinocita intermediér filamentumok alkotják. A szarusejtek korneodezmoszómákkal kapcsolódnak egymáshoz, amelyek a desquamatio során proteolitikusan lebomlanak a legfelső, elszarusodott sejtrétegekben.

A szaruréteg ellenálló képessége és oldhatatlansága egyrészt a transzzglutaminázok (TG) által létrehozott nagyon stabil izopeptid kötéseknek alapszik. A szaruboríték kialakításában a TG1, TG3 és a TG5 játszik szerepet. A transzzglutaminázok szubsztrátjai közé tartozik az **involucrin**, a **loricrin**, a **profillagrin** és a **kis prolingazdag proteinek (SPR)** (Candi és mtsai., 2005).

A transzglutaminázok által keresztkötött **fillagrin** barrier funkcióban játszott fontos szerepére az utóbbi években derült fény. A keratinocita intermedier filamentumokat a fillagrin molekulák kötik össze, ezért a „keratin ragasztóanyagának” is nevezik őket („keratin glue”). Kimutatták, hogy a fillagrin funkcióvesztő mutációja kulcsjelentőségű az ichthyosis és az atópiás dermatitis patogenezisében. Feltételezik, hogy a szaruvérvonal defektusa révén bőrszárazság, hámlás alakul ki, a defektív szarurétegen az antigének könnyen bejutnak a bőr mélyebb rétegeibe, így kialakítva a gyulladásos tüneteket (Hanifin, 2009) .

A különböző testtájakon található hámszövet fajták mechanikai szakítószilárdsága különböző. Ennek egyik oka az, hogy az egyes hámterületekben található szilárdságért felelős fehérjék (pl. loricrin, SPR-ek) relatív aminosav összetétele eltérő. Ezek az eltérő összetételű fehérjék adják a különféle hámszövetek (pl. tenyér, hát bőre, száj epithelium) egymástól különböző tulajdonságait (elaszticitás, mechanikai ellenállás, vízzel szembeni impermeabilitás) (Candi és mtsai., 2005).

A hám mechanikai szilárdságának másik elengedhetetlen tényezője az egyes hámsejtek erős egymáshoz kapcsolódása, sejtadhéziója. Az epidermisben lévő adhézis sejtorganellumok a következők:

- A **hemidezmoszómák** a bazális sejtsor és a bazálmembrán között, a dermoepidermális junkcióban létesítenek kapcsolatot. Fontos alkotói az integrinek.
- Az **adherens junkciók** a szomszédos sejtek aktin citoskeletonját kapcsolják össze.
- A **dezmoszómák** a szomszédos sejtek keratin-filamentum vázához kapcsolódnak.

Az epidermisben a sejtek egymáshoz rögzítésért az övszerű adherens junkciók (zonula adherens) és a dezmoszómák a felelősek. Néhány adhézis 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 **corneodesmosin**.

A stratum granulosum és a SC határán a dezmoszóma citoplazmatikus plakkja beintegrálódik az elszarusodó borítékba, és az extracelluláris magban egy elektrondenz plakk keletkezik. A korneociták az így létrejött **korneodezmoszómán** keresztül kapcsolódnak össze a stratum corneumban. A korneodezmoszómák két fő alkotórésze a desmoglein-1 és a desmocollin-1, melyek a Ca^{2+} -függő sejtadhéziós molekulák, a **cadherine**k (részletesen ld. **2. táblázat**) csoportjába tartozó két glikoprotein.

Cadherineek:	
• transzmembrán proteinek • kalciumion-dependens homofil kötéssel kapcsolják össze a sejteket • morfogenetikai regulátor szerep	
<i>Dezmoszomális cadherineek</i>	<i>Klasszikus cadherineek</i>
• desmoglein 1-3 és desmocollin 1-3 • dezmoszómákban találhatóak, a szomszédos sejtek tapadását biztosítják • differenciáció-, és szövetspecifikusan expresszálódnak • desmoglein-1 a stratum spinosum felső részén és a stratum granulosumban, desmoglein-2 a stratum basaleban, a desmoglein-3 a basalis és az alsó suprabasalis rétegekben mutatható ki	• E-cadherin és P-cadherin • adherens junctionokban

2. táblázat Cadherineek csoportosítása (Hakuno és mtsai., 2001)

A korneodezmoszómák egy másik fontos alkotója a corneodesmosin, amely az extracelluláris kompartmentek magjában helyezkedik el és a stratum spinosum felső részében, valamint a granuláris rétegben expresszálódik.

A dezmoszóma képződés és funkció zavara számos bőrbetegség kóroki tényezője.

Az intakt és funkcionálisan aktív desmoglein-1 biztosítja a dezmoszóma integritását. A fehérje diszfunkció számos humán bőrbetegség kialakulása során játszik patogenetikai szerepet. Az extracelluláris domént kódoló génekben létrejövő *mutációk* autoszomális domináns striált palmoplantaris keratodermát eredményeznek. Az extracelluláris domén elleni *autoantitestek* autoimmun bullózus bőrbetegséget (pemphigus foliaceus), míg egyes Staphylococcus aureus törzsekkel történő fertőzés ez extracelluláris domén *károsítása* útján staphylococcus forrázott bőr szindrómát eredményez (Whitlock és Bower, 2003). Az autoimmun hólyagos kórképek patogenezisében a dezmoszóma alkotók ellen termelődött autoantitestek játszanak kulcsszerepet: pl. pemphigus vulgaris esetén a desmoglein-3, a már említett pemphigus foliaceusban a desmoglein-1 elleni autoantitest kimutatása a diagnózis egyik alapfeltétele. Az ectodermális dysplasiában a plakophilin-1 mutációját, míg palmoplantaris keratodermában a desmoplakin mutációját igazolták. A dezmoszóma integritásához a Ca^{2+} jelenléte is szükséges. A Ca^{2+}/Mn^{2+} ATPáz (hSPCA1) enzimet kódoló ATP2C1 gén mutációja következtében kialakuló morbus Hailey–Hailey és az ATP2A2 gén által kódolt SERCA2 Ca^{2+} -függő pumpa mutáció által okozott Darier kór esetén dezmoszomális diszfunkciót is megfigyeltek, ám ezen betegségek kialakulásának pontos mechanizmusa máig tisztázatlan (Candi és mtsai., 2005; Dhitavat és

mtsai., 2003; Hakuno és mtsai., 2001; Hu és mtsai., 2000).

A hámlás, a *desquamation* folyamatának fontos része a korneodezmoszóma lebomlása. A korneodezmoszóma proteolízisében feltételezhetően **szerin proteázok**, mint pl. a stratum corneum kimotriptikus enzim (stratum corneum chymotryptic enzyme, SCCE) és a stratum corneum triptikus enzim (stratum corneum tryptic enzyme SCTE) vesznek részt. Több dermatológiai kórkép, tünet vizsgálata során (pl. psoriasis, xerosis, ichthyosis) a SC legfelső részében, a bőrfelszínhez közel, nagyszámú, perzisztáló, retineálódott korneodezmoszómát figyeltek meg (Candi és mtsai., 2005).

A korneodezmoszómát proteolitikusan lebontó szerin proteázokat specifikus inhibitorok regulálják, amelyek megakadályozzák az adhézis struktúrák idő előtti lebontását. Ilyen szerin-proteáz inhibitor a SPINK5 (Kazal-típusú szerin proteáz inhibitor 5) gén által kódolt LEKTI (lympho-epithelial Kazal-type related inhibitor) fehérje. A SPINK5 gén defektusát Netherton-szindróma nevű, súlyos keratinizációs zavarral járó betegségben írták le. A LEKTI hiányában a SCCE és az SCTE a PAR2 (proteináz aktivált receptor 2) receptoron keresztül fejti ki kontrolálatlan aktivitását, mely a desmoglein-1 és a desmocollin korai degradációjával jár (Descargues és mtsai., 2006).

A fentieket egybevetve látható, hogy a hám mechanikai ellenállóképességét, az elszarusodó boríték szerkezetét a transzglutaminázok által keresztbekötött proteinek és a sejtadhézis struktúrákat alkotó fehérjék együttes stabilizáló hatása adja. Jelen munkában terjedelmi okokból az igen nagyszámú fehérje közül csak az általunk vizsgált proteineket ismertetem részletesen a **3. táblázatban**.

Protein név	Funkció	Jellemzők
Involucrin (Inv)	• obligát része a szaruborítéknak • a kornifikáció korai fázisában scaffold, más strukturproteinekhez kötődhet • később a szaruboríték struktúrában a sejtmembrán szomszédságában található • az externalizált lipidek, ceramidok hozzá kovalensen kötődve hozzák létre a szaruboríték külső felszínét	• Gly, Asp gyökökben gazdag, α-helikális protein • TG1 köti keresztbe a Gln495 és a Gln496 között (transzglutamináz szubsztát)
Desmoglein-1 (Dsg-1)	• extracelluláris doménje a desmocollinnal való kalcium-dependens kötődésben vesz részt • intracelluláris doménje a plakoglobinhoz kapcsolódik	• dezmoszomális cadherin • extracelluláris domainje alkotja a dezmoszóma core doménjét • epidermis, nyelv, tonsilla és az oesophagus nem elszarusodó epitheljében expresszálódik

3. táblázat Az involucrin és a desmoglein-1

4. Fényvédelem

Az utóbbi évtizedekben a napfény okozta akut és krónikus bőrelváltozások, bőrbetegségek, valamint a bőr tumorainak incidenciája rohamosan emelkedett. Ugyanezen évtizedek alatt az emberi bőrt sokkal nagyobb mennyiségű ultraibolya sugárzás éri, mint a XX. század elején. A fokozott UV-expozíciónak több oka is van. A fizetett szabadság intézményének bevezetése után már nem csak a tehetősek kiváltsága volt a távoli országokban töltött nyaralás, a vakáció szélesebb néprétegekben is általánossá vált. A trópusi országokban, vízparton illetve a hegyek között töltött nyaralás, a vízi sportok, napozás elterjedése miatt bőrünket több napsugárzás éri. A múlt században a fehér bőr kultuszát felváltotta a barnaság divatja: a bronzos bőrszín gazdagságot, jólétet jelképez. Mindehhez hozzájárul az is, hogy a légköri ózonréteg elvékonyodása miatt bőrünket ugyanannyi idő alatt nagyobb sugárdózis éri el, mint a korábbi évtizedekben. (Braun-Falco és mtsai., 2000; Horkay, 2008) A fényvédelem feladata tehát az egészséges bőr védelme az élet során összegyűjtött, valamint a túlzott expozíció okozta DNS-károsodás ellen, a következményes napfény okozta bőrkárosodás, malignomák megelőzése. A fotoprotekció fontosságát jelzi, hogy napjainkra a kozmetikai ipar jelentős szegmensét képezi a fényvédő termékek előállítása. A nem kívánt UV-sugarak elleni védelmet mechanikus, szisztémás, lokális úton, valamint fotokondicionálás révén valósíthatjuk meg (Horkay, 2008).

4. 1. Mechanikus fényvédelem

Az emberiség évszázadok óta alkalmazza fényvédelemre a ruházatkodást. A zárt, sűrű szövésű anyagból készült öltözet, lehetőleg sötét színű textilből maximálisan 30 SPF (fényvédő faktor, sun protection factor) védelmet jelent. A széles karimájú kalap, sapka a fejtető, arc, orr védelmét látja el, míg a fényvédő anyagból készült napszemüveg a szemkörnyéki régió bőrét és látószervünket védi. Ismert a fényérzékeny egyének számára kifejlesztett speciális SPF 30-50 védelmet nyújtó ruházat is (Horkay, 2008). Mechanikailag szűrik ki az ultraibolya sugarakat az autóüvegre és az ablakokra helyezhető fényvédő fóliák (Braun-Falco és mtsai., 2000).

A napfény kerülése az erős sugárzással járó órák (11-15 óra) idején szintén redukálja a bőrt érő terhelést, ám ez az ózonréteg elvékonyodása miatt csak más eljárásokkal kombináltan nyújt megfelelő védelmet.

4. 2. Szisztémás fényvédelem

Egyes vegyületek szisztémásan alkalmazva fotoprotektív hatásúak lehetnek, némelyeket gyógyszerként is alkalmaznak különböző fotodermatológiai kórképek kezelésében. Effektivitásuk azonban evidenciákkal nem alátámasztott, általában érdemes lokális fényvédőkkel kombinálni őket.

4. 3. Lokális fényvédelem

A fényvédelem legelterjedtebb módja a fotoprotektív helyi készítmények alkalmazása. A fotoprotektív vegyületeket kémiai és fizikai fényvédő filterek csoportjaira oszthatjuk.

A kémiai fényvédő molekulák (organikus filterek) konjugált kettős kötéseiknek köszönhetően elnyelik a beeső fénysugarakat. A fényabszorpció után gerjesztett állapotba kerülnek és az energiatöbbletet magasabb hullámhosszú sugárzás (hő, fluoreszcencia, foszforeszcencia) formájában emittálják. A kémiai filterek többsége az UVB tartományban gerjesztődik, kisebb részük az UVA, vagy mindkét hullámhosszú foton abszorpciójára képes. Természetesen minden vegyületnek saját abszorpciós spektruma van, mely meghatározza a felhasználásával előállított fényvédő karakterisztikáját is. Kíváncos, hogy a fotoprotektív készítmények lehetőleg egyenlő mértékben védjenek az UVB és az UVA sugarak ellen. A kémiai fényvédők hátránya az allergizáló, fotoallergizáló hatás mellett az, hogy a vegyületek a hosszú besugárzás során kimerülhetnek, nem stabilak (Gaspar és Maia Campos, 2006), ami a fényvédő hatás csökkenését eredményezi. Állatkísérletek során a bőrre kent externák felszívódását tapasztalták (Janjua és mtsai., 2004), ami pl. gyerekek esetén szisztémás toxikus hatást fejthet ki. A fotokarcinogén hatásra vonatkozó feltételezéseket eddig még nem sikerült bizonyítani (Lautenschlager és mtsai., 2007).

A fizikai fényvédők (szervetlen, anorganikus filterek) olyan szervetlen vegyületek, amelyek részecskéi visszaverik a beeső fotonokat. A bőrre kenve az UV-sugarakat is reflektálják a bőrfelszínről, így megakadályozzák azok mélybe hatolását (blokkolók). A csoport főbb képviselői a cink-oxid, a titán-dioxid, az alumínium-hidroxid, a vas-oxid, a magnézium-szilikát (talkum) és a kaolin. Ezeket a filtereket már a régebbi időkben is használták, ám, mivel fehérre festették a védendő bőrt, a szerves fényvédők megjelenésekor háttérbe szorultak. A részecskeméret csökkentésével (mikronizációval) nemcsak a kozmetikailag zavaró hatást küszöbölték ki, de a fényvédő spektrumuk is kiszélesedett. A szervetlen blokkolók jelenleg

reneszánszukat élik a fényvédelemben, hiszen hatékony, széles spektrumú védelmet nyújtanak, nem szenzibilizálnak, fotostabilak, a szisztémás keringésbe nem kerülnek be, a szerves fényvédők hatását nem zavarják, velük kombinálhatók (Braun-Falco és mtsai., 2000; Horkay, 2008; Lautenschlager és mtsai., 2007).

A béta-karotin, E-vitamin, flavonoidok, glicin-szója, polifenolok lokális formában fényvédő hatásúak, fényvédő krémek alkotói. Szabadgyökfogó vegyületek révén megelőzik az UV-okozta DNS-károsodást (Horkay, 2008).

A legutóbbi fejlesztések arra irányulnak, hogy a bekövetkezett DNS-károsodást kijavító enzimeket juttassanak a fénykárosodás helyére. Többféle enzim vonatkozásában léteznek próbálkozások (pl. fotoliáz, T4 endonukleáz), a kereskedelmi forgalomban Ultrasome[®] és Photosome[®] néven elérhetőek (Horkay, 2008; Stege, 2001).

A fotoprotektív externák védőképességét a **fényvédő faktorral** (SPF, sun protection factor) jellemezzük, amely a fényvédővel, illetve a nélkül meghatározott minimális erythema dózis (MED) hányadosa. A klinikai illetve biológiai hatékonyság meghatározására amerikai, európai (COLIPA) és ausztrál standardok léteznek. A SPF meghatározás UVB vonatkozásában egyértelmű, hiszen a hullámhossz tartományra jellemző eritémakeltés mértéke egyszerűen mérhető. Az UVA SPF mérése azonban máig nem egységes. Utóbbi mérésére többféle in vitro és in vivo eljárást dolgoztak ki, jellemző azonban, hogy a gyártók gyakran irreálisan magas UVA védelmet tüntetnek fel termékeiken. (Braun-Falco és mtsai., 2000; Horkay, 2008)

Az UVA protektív index ismerete, az UVA filterek használata azért is fontos, mert egyes szerzők szerint a fényvédők használata hamis biztonságérzetet kelt használóikban. Míg a fényvédők a leégéshez vezető UVB sugárzást kiszűrnek, (a régebbi fényvédők) átengedik az UVA sugarakat, melyek mind a fotokarcinogenezishez, mind az aginghez hozzájárulnak. (Dobak és Liu, 1992) Svéd szerzők annak a hatásnak tulajdonították az általuk a fényvédőt használók körében tapasztalt magasabb melanoma előfordulást. (Westerdahl és mtsai., 2000)

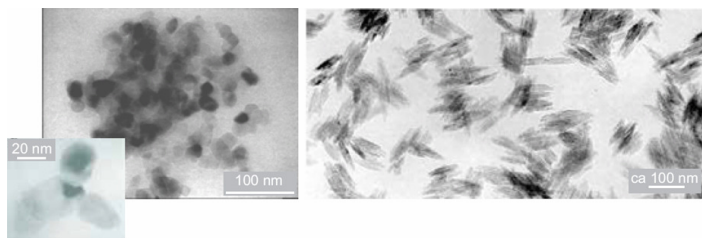
A széles spektrumú UV-szűrőképesség a fényvédő készítmények esetén alapvető fontosságú. A fényvédőknek ezen kívül számos egyéb követelménynek kell megfelelniük, mielőtt emberi felhasználásra kerülnek. Az externákban a fotostabilitás és a szélesebb spektrum elérése érdekében általában a fent említett szerves (UVA és UVB), a szervetlen filtereket, valamint az antioxidánsokat kombináltan alkalmazzák. A fényvédő krémek használata a jelenlegi álláspont szerint elfogadott, használatuk ajánlott. (Braun-Falco és mtsai., 2000; Horkay, 2008)

5. A titán és a titán-dioxid

A titán a kilencedik leggyakoribb elem, a Földkéreg 0,63 százalékát adó átmenetifém. Gyakorisága ellenére mégis csak a 18. század végén fedezték fel (Gregor 1791, Klaproth 1795), mivel a tiszta fém előállítása igen nehézkes. Az elnevezés a német Klaprothtól származik, aki, a mitológiai Titánokról - nevezte el az elemet. A Titánok az Ég és a Föld gyermekei voltak, arra kárhóztatva, hogy a Föld mélyének rejtett tüzei közt éljenek. Az elem a természetben oxidok formájában, homokszerű anyagokban fordul elő. A titán két legfontosabb ásványa az ilmenit (FeTiO_3) és a rutil (TiO_2). Az ilmenit fekete, homokszerű anyag, melyet Kanadában, az USA-ban, Ausztráliában, a skandináv országokban, Malajziában bányásszák, míg a rutilt Ausztráliában termelik ki.

A titán-dioxid a legfontosabb titánvegyület. Szobahőmérsékleten három módosulata ismert: a rutil, az anatáz és a brookit, melyek mindegyike hatos koordinációjú titánt tartalmaz. A természetben, és a kereskedelmi termékek között a leggyakoribb forma a rutil. Melegítés hatására a többi forma is rutillá alakul. Jelentőségét az adja, hogy bár nagy kristályai átlátszóak, a finom szemcsék erősen szórják a fényt, törésmutatójuk magas. Előnyös optikai tulajdonságaik mellett kémiaiilag inerteek, ezért a toxikus „ólomfehér” ($2\text{PbCO}_3 \cdot \text{Pb(OH)}_2$) helyett kezdték alkalmazni fehér festékként. Mivel a természetben előforduló titán-dioxidok általában a bennük lévő szennyezők miatt színesek, csak az igen költséges tisztítási eljárás után használhatóak (Earnshaw, 1999).

A mikronizált (100 nm-nél kisebb részecskenagyságú) titán-dioxid a háztartási, kozmetikai termékek általánosan használt alkotórésze. A TiO_2 -nanorészecskékkel fehér festékekben, fogkrémekben, bőrápoló termékekben, a színezett nanopartikulumokkal dekorkozmetikai cikkekben nap mint nap találkozunk. Ezen mikronizált részecskék (2. ábra) fényvédő krémekben ún. **fizikai fényvédőként** is régóta használatosak.



2. ábra A TiO_2 nanopartikulumok transzmissziós elektronmikroszkópos képe.

Eucerin© (bal) és Eusolex © T-2000 (jobb). Nanoderm Final Reportból átvéve

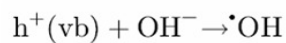
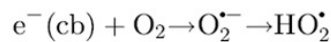
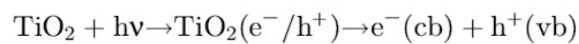
5.1. A titán-dioxid patogenetikai szerepe, a fotokatalitikus hatás

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 partikulumok esetében kimutatták, hogy rágcsőlobkban tüdőrákot okoznak (Borm és mtsai., 2004). A rágcsőlobk hörgőjébe való beadás után a tüdőszövet minden sejtjének citoplazmájában nem membrán-kötött módon megtalálhatóak voltak az ultrafinom részecskék. A TiO_2 internalizációt sejtenyészetben is kimutatták (Geiser és mtsai., 2005). Más szerzők eredményei szerint a titán-dioxidot a tüdő makrofágjai az ún. macrophage receptor with collagenous structure (MARCO) segítségével, opszonizáció nélkül felveszik (Arredouani és mtsai., 2005).

A nanopartikulumok bőrgyógyászati jelentőségét az adja, hogy a TiO_2 fizikai fényvédő filterként és pigmentként a kozmetikai termékek szinte nélkülözhetetlen alkotórésze. A fizikai fényvédő filterek hatásának lényege az, hogy a beérkező fényt szétszórják, visszatükrözik a bőr felszínéről, míg a kémiai filterek esetén a beeső fotonok energiája molekuláik konformációs változásával nyelődik el. Alkalmazásuk kezdeti időszakában a fizikai fényvédők kozmetikai tulajdonságai elmaradtak a kémiai filterekétől. Az utóbbiakkal ellentétben allergizáló képessége csekély, emiatt mégis kiterjedten használták a titán-dioxidot (Aro és Dahms, 2006; Dussert és mtsai., 1997). A rosszabb kozmetikai tulajdonságot a fejlesztések a TiO_2 részecskeméretének ultrafinom, nanométeres tartományba való csökkentésével, mikronizációjával oldották meg. A mikronizáció jobb kozmetikai megjelenést és hatásosabb fényvédelmet eredményezett, így a titán-dioxid a fogyasztók körében is népszerűbbé vált (Bennat és Muller, 2000; Pflucker és mtsai., 1999).

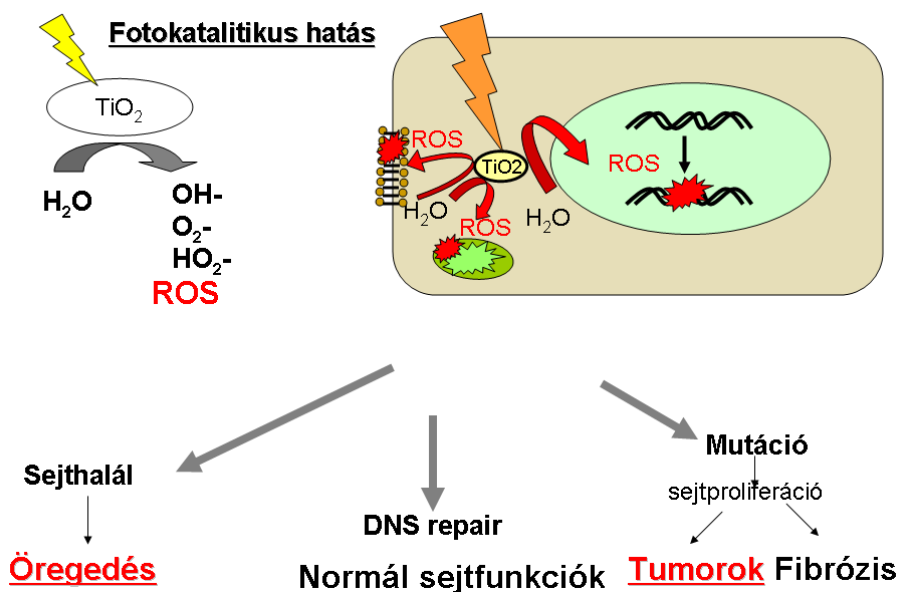
A titán-dioxid azonban nemcsak visszaveri, hanem el is nyeli a fotonokat. Ilyenkor a titán-dioxid katalizátorként viselkedik: a részecskék felszínén UV besugárzás hatására a vizes közegben a vízből szuperoxid és hidroxil ionok, illetve más szabadgyökök képződnek. Ez az ún. **fotokatalitikus hatás** (3. ábra) tehető felelőssé a vegyület lehetséges káros hatásaiért is. Széles körben ismert, hogy a szabadgyökök oxidatív DNS-károsodást (Dunford és mtsai., 1997)

okozhatnak a sejtekben, és negatívan befolyásolhatják azok működését (Kim és mtsai., 2006) 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 (Borm és mtsai., 2004), így több szabadgyök képződését katalizálják.



3.ábra A titán-dioxid fotokatalitikus hatására kialakuló szabad gyökök képződésének reakcióegyenletei.

Eddigi ismereteink szerint a TiO_2 alkalmazása egyetlen bőrbetegség kialakulásában sem játszik szerepet. Feltételezhető, hogy a bőr epidermisének stratum corneum rétegét alkotó érett, elszarusodott keratinociták barrierje hatásos védelmet nyújt ezen részecskék ellen (Candi és mtsai., 2005; Madison, 2003), 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 (extracellularis 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 (**4.ábra**).



4. ábra A titán-dioxid sejtkárosító hatásának patomechanizmusa

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 (Aro és Dahms, 2006) látják el az újonnan kifejlesztett részecskéket. A bevonat az fényvédők 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.

Annak ellenére, hogy a tüdőkárosító hatást már elegendő eredmény támasztja alá, eleddig kevés kutatást végeztek - a fényvédők és egyéb externák alkotórészeként - a bőrön alkalmazott TiO_2 nanopartikulumok toxicitásával kapcsolatban. A fent részletezett okok miatt azonban egyre sürgetőbb az igény az epidermis barrierfunkciójának vizsgálata a helyileg alkalmazott TiO_2 nanopartikulumokkal szemben.

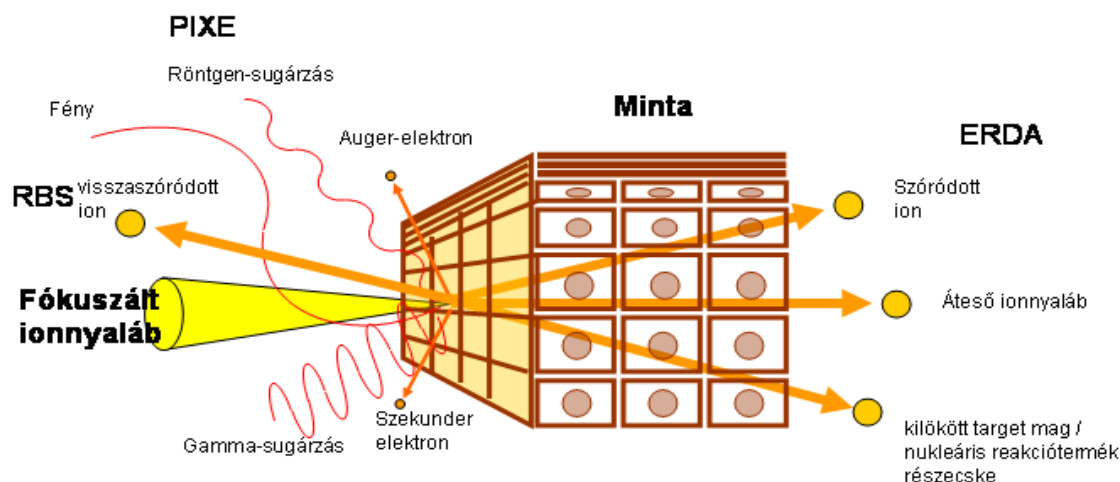
6. A bőr barrier és az epidermális penetráció vizsgálata

A bőr barrierfunkciójának vizsgálata már a titán-dioxid problematikája előtt is a bőrgyógyászati kutatások sarkalatos kérdése volt. A korábban kifejlesztett eljárások segítségével azonban csak igen kisszámú vizsgálatot végeztek a kis partikulumméretű, ultrafinom, mikronizált titán-dioxid transepidermális 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 – úgymint a TEWL (transepidermal water loss, transepidermális vízvesztés) mérése (Jarrett, 1980; Madison, 2003), a „tape stripping” (ragasztóval történő sorozatos deepidermizálás) és elektron mikroszkópia (EM) vagy az energiadiszperzív röntgen analízis kombinációja (Bennat és Muller, 2000; Demerjian és mtsai., 2006; Pflucker és mtsai., 1999) – nehézkesen tudták penetrációs vizsgálatokra alkalmazni.

6 . 1. A nukleáris mikroszonda (mikroszkópia)

6. 1. 1. Elméleti háttér

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-visszaszórás spektrometria (Rutherford backscattering spectrometry - RBS) és a magreakció analízis (Nuclear Reaction Analysis – NRA) módszere (Tapper és Malmqvist, 1991) (**5. ábra**).



5. ábra. Az ionnyaláb analitikai módszerek vázlatos áttekintése

A **nukleáris mikroszkop** mikrométer nagyságrendűre fókuszált MeV energiájú ionnyalábot állít elő, amellyel a vizsgált mintát néhány mm² felületen pásztázni lehet, így a berendezés az elemeloszlás felületi térképezésére is alkalmas. A nukleáris mikroszkopnál a fenti módszerek a „mikro-” jelzővel használatosak. Ide sorolható még a vékony minták sűrűségeloszlásának meghatározására kifejlesztett pásztázó transzmissziós ionmikroszkópia (Scanning Transmission Ion Microscopy – STIM). Az egyes módszereket egymással kombináltan is lehet alkalmazni, ami több információt szolgáltat egy adott mintáról. E munkában játszott szerepük miatt a mikro-PIXE és a STIM módszerekre részletesebben is kitérünk:

A PIXE (jelen esetben a mikro-PIXE) elve és megvalósítása nagyon hasonló az elektronmikroszkópiában ismert elektronszkop mikroanalízis (Electron Probe Microanalysis – EPMA) működési elvéhez és megvalósításához. A mintát (elektronnyaláb helyett) protonnyalábbal bombázzuk. A MeV energiájú protonok a mintában található atomok belső héjaiból elektronokat löknek ki, melyek helye a magasabb energiájú héjakról töltődik be. A többletenergia az adott rendszámú atomra jellemző „karakterisztikus” röntgensugárzás (vagy Auger-elektronok formájában) távozik a vizsgált anyagból. A Si(Li) ún. energiadiszperzív detektorok létrejöttével lehetővé vált, hogy az adott mintán felvett *egyetlen* röntgenspektrumban megjelenő karakterisztikus röntgen vonalak alapján következtetni lehessen az adott anyag elemösszetételére (multieleemes analízis, detektortól függően a C-től az U-ig terjedő elemtartományban). A Si(Li) detektorokkal detektált röntgensugárzás energiaspektruma az ún.

fékezési sugárzás által alkotott folyamatos háttérből és az erre rakódó, a mintából származó karakterisztikus röntgensugárzásból tevődik össze. A mintát elektronok helyett protonokkal gerjesztve, a folytonos háttér nagyságrendekkel lecsökkenthető, így a karakterisztikus röntgensugárzás intenzitása még igen kis koncentrációk esetén is nagy pontossággal meghatározható. A mikro-PIXE módszerrel a kis anyagtömegű minták (0.1-10 ug/g) vizsgálata is megvalósítható. A PIXE lehetővé teszi ismeretlen minta rutin analízisét 95% feletti pontossággal.

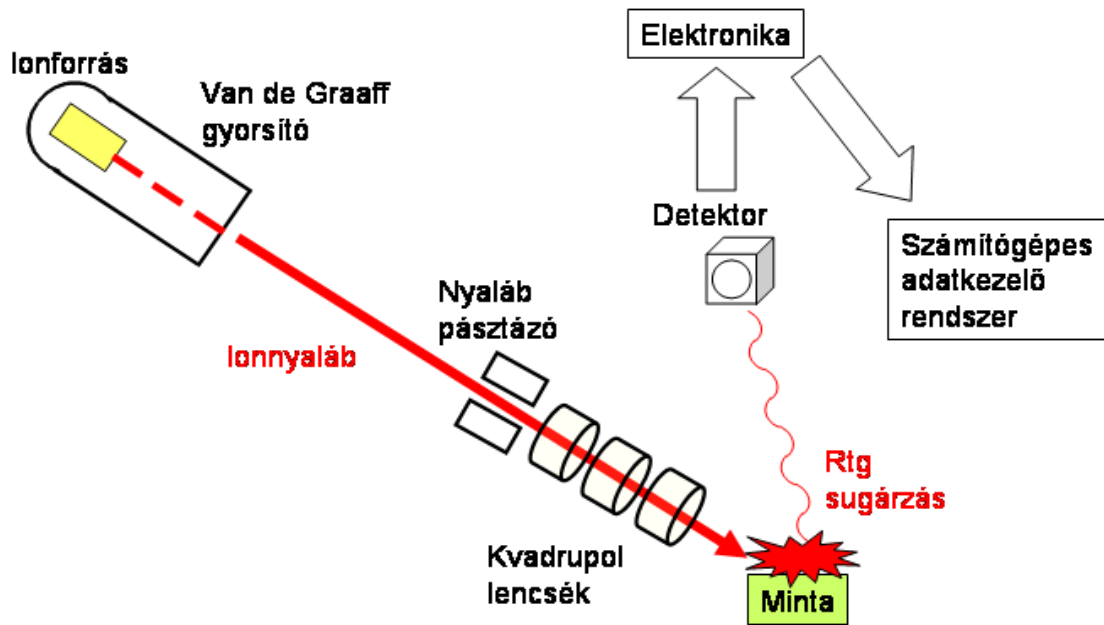
A STIM-et mint nukleáris mikroszonda technikát a vékony minták sűrűségeloszlásának a leképezésére fejlesztették ki, szemben az elemösszetétel meghatározására alkalmas egyéb IBA módszerekkel. A néhány MeV energiával rendelkező könnyű ionok (proton, ^4He) képesek áthatolni az 50 μm -nél vékonyabb mintákon. Az ionok energiavesztése az általuk pásztázott minta minden egyes felületi pontján függ az elemi összetételtől és a vastagságtól, azaz a felületi sűrűségtől. A STIM módszernél a minta mögé helyezett részecskedetektorral a minta minden egyes pontjában (pixelében) méri a mintán áthatolt ion energiáját és az ionok számát. Ezek felhasználásával, számítógépes módszerrel létrehozzák a minta felületi sűrűségeloszlását mutató képet. A módszer előnye, hogy az egyéb IBA technikákhoz képest nagyságrendekkel kisebb intenzitású ionáramot igényel, így gyors képkészítő kapacitással rendelkezik, nagyon jó térbeli felbontás érhető el vele, ezért a PIXE és RBS vizsgálatokat megelőzően a minta részletei meghatározhatók, és segítségével az analitika számára érdekes részletek kiválaszthatók (Breese és mtsai., 1992; Breese és mtsai., 1996).

A STIM képek felhasználhatók a PIXE képeknek a minta sűrűségváltozásainak megfelelő korrigálására (Breese és mtsai., 1996). A mérés általában a korábban ismertetett módszerekkel kombináltan zajlik.

6.1.2. Kísérleti megvalósítás

A nukleáris mikroszonda berendezés részei a következők: **ionforrás** (a hidrogén- vagy egyéb ionok előállítására), **részecskegyorsító** (az ionok MeV energiára gyorsítására), **nyalábfókuszáló lencsék** (az elektronmikroszkópiában használatos hengerlencsék helyett itt az elektronoknál jóval nehezebb ionok fókuszálására alkalmas ún. kvadrupól lencsét alkalmaznak), **pásztázó berendezés**, **mintakamra** (amely a berendezés többi részéhez hasonlóan vákuumban van, és mikrométer pontossággal állítható x-y-z irányokba mozgatható mintatartóval

van ellátva, tartalmazza továbbá az RBS és STIM-hez szükséges részecskedetektorokat, valamint ablakán keresztül kapcsolatban van(nak) vele a Si(Li) röntgendetektor(ok), **adatgyűjtő rendszer** (6.ábra).



6. ábra Az ionnyaláb-analitikai berendezés részei

A pásztázás alatt nagy adatmennyiség képződik, amely egy nagy kapacitású adatkezelő rendszer alkalmazását teszi szükségessé. Amennyiben a vizsgáló személy a vizsgálat közben nyomon szeretné követni az adatokat, azokat „online” kell megjeleníteni. Nagy terület vizsgálata órákig tartó besugárzást igényel. A minta x,y koordinátáinak függvényében eltárolt spektrumadatokról a későbbiekben a minta egészére, vagy egyes részeire vonatkozó elemtérképek állíthatók össze.

A mérés során kapott spektrumból számolható az elemek koncentrációja, a görbe alatti területek lineáris és nem lineáris illesztésével. A koncentrációk megadása 90-95%-os pontossággal történik (amely azonban függ a begyűjtött spektrumok statisztikájától). Amennyiben abszolút skálán kell megadni az elemkoncentrációkat, abban az esetben nem megengedhető a minta térfogatváltozása. A nagy energiájú protonokkal való bombázás jelentős hőhatással jár a biológiai mintában. A nagy besugárzó dózis felszakítja a mintában található kötéseket. Ennek következménye az alacsony rendszámú elemek elvesztése, amely a minta zsugorodását eredményezi. Főleg a hidrogén, és az oxigén elvesztése figyelhető meg. Ez az

elemkilöködés arányos a besugárzás dóziséval. A pontos elemkoncentrációk meghatározása érdekében tehát ezt korrigálnunk kell, mivel a korrigálás nélkül felülbecsülnénk a nyomelemek koncentrációit. Az RBS-sel kiegészített mérés során az utóbbi módszer detektálja az esetleges elemkilöködést, így alkalmas a mátrixelemek monitorozására.

Az optimális érzékenység elérése érdekében a minta besugárzása, majd analízise órákig tart, emiatt a biológiai minták vizsgálata nehézkes lehet. Az apró szerkezetű minta (pl. sejtorganellumok, sejtek) esetén pásztázó ionnyalábot alkalmazunk, mellyel online térképek készíthetők. A minta kímélése érdekében elérhető, hogy az elemkoncentráció részletes vizsgálata csak a vezérlő számítógéppel kijelölt vizsgálandó részeken (térképeken) történjen.

A fenti okok miatt kiemelt fontosságú lehet a szövetminták megfelelő orientációja, ami a szövetminták vizsgálata esetén elengedhetetlen az informatív térkép elkészítéséhez. A minta azon résznek kell a besugárzandó területen lennie, amelyről információt szeretnénk nyerni. Emiatt fontos az előzetes képalkotó eljárások alkalmazása. Mivel a szokásos szövettani festések radikálisan megváltoztatják az eredeti elemkoncentrációkat, ezeket a nukleáris mikroszondával vizsgálandó mintákon nem alkalmazhatjuk. A parallel, a szomszédos területből származó metszetek rutin hisztológiai vizsgálatával javíthatjuk a mikroszondával vizsgált minta orientációját.

A vizsgálat során a MeV energiájú protonok becsapódása fluorszcens fényfelvillanást okoz. A mintakamrához fénymikroszkópot csatlakoztatva a felvillanások hatására kirajzolódó „hot-spot”-ok részletes vizsgálatát tehát mikroszkóp-vezérelten is megkezdhetjük. A módszer hátránya, hogy nagy nagyításra nem képes. Emiatt magát a nyalábot célszerűbb képalkotásra használni, pl. a STIM módszer szerint.

A nukleáris mikroanalitikai módszereket az utóbbi évtizedekben rendkívül sokrétű feladatokra használták a geológia, archeológia, művészettörténet, a biológia és az orvostudomány terén. Korábban például Menkes syndromás betegek fibroblasztjait, Alzheimer kóros szenilis plakkokat, stb. vizsgáltak (Tapper és Malmqvist, 1991).

6. 2. Az ionnyaláb-analitikai módszerek alkalmazása a bőr vizsgálatára

A közelmúltban a PIXE, STIM és RBS nukleáris mikroanalitikai technikákat magfizikai laboratóriumok sikerrel használták a bőr elemösszetételének vizsgálatára. A kezdeti

módszerekkel egészséges humán bőrt analizáltak (Forslind, 1999). A módszer továbbfejlesztésének későbbi szakaszában sertésből, egérből, egészséges humán epidermist (Aguer és mtsai., 2005; Gontier és mtsai., 2006; Moretto és mtsai., 1999) és psoriasisos humán bőrből (Werner-Linde és mtsai., 1998) származó mintákat vizsgáltak. Ezen vizsgálatok segítségével meghatározták a bőr elemösszetételét (**4. táblázat**).

A bőr rétegei	Elemkoncentráció (µg/g szárazsúly)
stratum corneum	tömeg/ szén maximum S maximum Na maximum magas Ca alacsony Cl nincs Fe, Zn
stratum granulosum	magas P
stratum spinosum	alacsony Cl magas K
stratum basale	alacsony Cl magas K
dermoepidermalis junkció	C, P csökkenés Ca, Cl, K változatlan

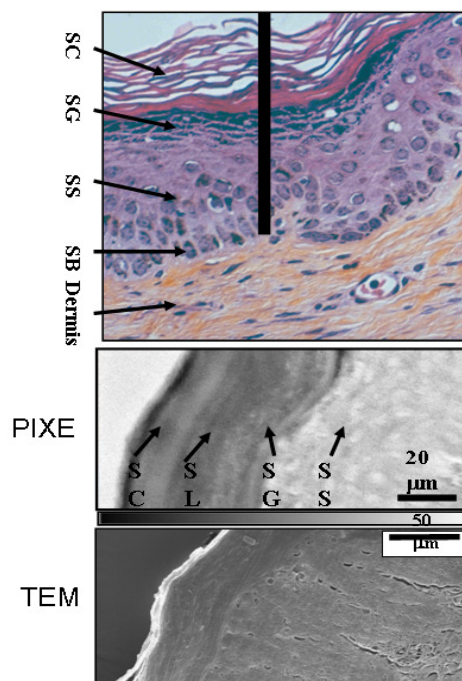
4. táblázat A bőr ionnyaláb analízissel meghatározott elemösszetétele

7. A titán-dioxid hatásainak vizsgálata a bőrben

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 szervesetlen 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 sejttypusok viselkedését. Korábban sertésbőrön, és egészséges humán önkénteseken is végeztek penetrációs méréseket többféle titán-dioxid tartalmú formuláció alkalmazása után (Butz, 2007). A mintákat PIXE és TEM módszerekkel párhuzamosan vizsgáltuk (7. ábra).



7. ábra A bőr szerkezete különböző képalkotó eljárásokkal vizsgálva

Az ábra felső részén a bőr hagyományos szövettani eljárással készült képe látható HE festéssel, a középső részen a PIXE térkép, míg az alsó inzerten a TEM felvétel. A vastag fekete vonal a SC-től a dermoepidermális junctionig terjedő részt jelzi. (SB: stratum basale, SS: stratum spinosum, SG: stratum granulosum, SC: stratum corneum)

IV. Célkitűzéseink

A mikronizált titán-dioxid bőrpenetrációjának vizsgálatát az alábbi kérdések megválaszolása mentén végeztük:

- 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 bőrből 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 tenyészeiben. A TiO_2 direkt sejtkontaktusban kifejtett hatását a sejtek életképességi, apoptotikus, proliferációs és differenciálódási funkcióinak változásával mutattuk ki.

V. Anyag és módszer

1. Titán-dioxid-formulák

A penetrációs vizsgálatokhoz titán-dioxidot tartalmazó hidrofób emulziót használtunk egy kereskedelmi forgalomban kapható termék formájában („TiO₂-emulzió”) (Anthelios XL SPF 60, La Roche Posay, La Roche Posay, Franciaország). A sejttenyészeteken végzett kísérletekhez a titán-dioxid 9 nm-es részecskenagyságú anatáz formáját alkalmaztuk, amely Prof. Z. Stachura (Krakkó, Lengyelország) laboratóriumából származott.

2. 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 (Janossy és mtsai., 1994) SCID egerek hátbőrére transzplantáltuk. A graftok területét 2 mg/cm² koncentrációjú TiO₂-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.

3. Mintapreparálás nukleáris mikroszkópiához

A biopsziás anyagokat folyékony nitrogénben hűtött folyékony izopentánban gyorsfagyasztottuk. A mintákból –25 °C hőmérsékleten 14 µm vastagságú metszeteket készítettünk, melyeket liofilizálás után szobahőmérsékletre melegítettünk. Egymást követő metszésekből származó metszeteket vizsgáltunk nukleáris mikroanalízissel és festettünk meg hematoxin-eozinnal (HE) rutin szövettani vizsgálat céljából. A nukleáris mikroanalízishez a vizsgált metszeteket speciális ragasztócsíkkal erősítettük a mintatartókra.

4. Nukleáris mikroanalitikai vizsgálatok

A nukleáris mikroanalitikai vizsgálatokat a Magyar Tudományos Akadémia Debreceni

Atommagkutató Intézetében (ATOMKI), az 5 MeV energiájú Van de Graaf gyorsító 0°-os nyalábsatornájára telepített pásztázó ion mikroszondán végeztük (Rajta és mtsai., 1996). A minták vizsgálatára a korábban közölt „bio-PIXE” beállítást használtuk, a pásztázó transzmissziós ionmikroszkópiával (STIM) kombinált részecskeindukált röntgen emissziós (PIXE) módszerrel (Kertesz és mtsai., 2005). Ezen mérési és kiértékelési rendszer segítségével meghatározhatjuk a bórnál 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. két-detektoros 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 csomag felhasználásával határoztuk meg (Szabó és Borbely-Kiss, 1993; Uzonyi és Szabó, 2005). Annak ellenére, hogy a két-detektoros módszer a C-től az U-ig mutathatja ki az elemeket, ennek érzékenysége nem azonos az adott elemtartományban. Ennek figyelembevételével a következő elemek eloszlásával foglalkoztunk: kalcium (Ca), klór (Cl), kén (S), kálium (K), foszfor (P), nátrium (Na), titán (Ti). 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 (Pelicon és mtsai., 2005; Simcic és mtsai., 2002). A nukleáris mikroszkópos vizsgálatokat Prof. Dr. Kiss Árpád Zoltán fizikus munkacsoportja végezte, az elemtérképek kiértékelése közösen történt.

5. Transzmissziós Elektron Mikroszkópiás vizsgálatok (TEM)

Az elektronmikroszkópos 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 (Euromedex, Mundolsheim, Franciaország) 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 (Euromedex, Mundolsheim, Franciaország) 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 (TAAB, Berks, Anglia) egy-egy arányú keverékében 2 óráig majd tiszta Eponban 6 órán át inkubáltuk a mintákat, majd 60°C-on egy éjszakán át polimerizáltuk. A beágyazott szövetmintából 35° gyémántkéssel (Diatome, Biel, Switzerland) felszerelt ultramikrotómmal (Reichert-Jung, Vienna, Austria) 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 (Euromedex, Mundolsheim, Franciaország) applikáltuk, ólom-citrátos és uranil-acetátos festés után 80 kV gyorsító feszültséggel transzmissziós elektron mikroszkóppal (CM 10, Philips, Hollandia) vizsgáltuk.

6. Sejttenyésztés

A humán immortalizált HaCaT keratinocita sejtvonal (Boukamp és mtsai., 1988) Prof. N. E. Fusenig (Division of Differentiation and Carcinogenesis, German Cancer Research Center, Heidelberg, Németország) laboratóriumából származott. A sejteket –amennyiben másként nem jelezzük - 25-cm² vagy 75-cm² nagyságú sejttenyésztő flasksokban tenyésztettük 37°C-on 5%-os CO₂ tartalmú atmoszférában. A keratinociták tenyésztéséhez Dulbecco's modified Eagle's médiumot (DMEM; Sigma) 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 (valamennyi Biogal, Debrecen, Magyarország).

A humán dermális fibroblasztokat (HDF) enzimatisz emésztéssel hámfosztott irhából nyertük a korábban közölt módon (Bodo és mtsai., 2005). A fibroblasztokat a fent leírt összetételű DMEM médiumban tenyésztettük.

Az SZ95 humán immortalizált sebecita sejtvonalat (Zouboulis és mtsai., 1999) Sebomed (Biochrom, Berlin, Németország) 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.

7. 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 (5000 sejt/lyuk sűrűségben) 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 (mint az élő sejtek számával arányos) koncentrációját kolorimetriásan határoztuk meg a gyártó előírása szerint. Az adatokat az átlag +/- SEM formában tüntettük fel.

8. Apoptózis meghatározása

A sejteket tripszinezéssel összegyűjtöttük majd 1 ml fluoreszcein izotiocianáttal (FITC)-konjugált annexin V-vel (Coulter-Immunotech, Hialeah, FL, USA) inkubáltuk sötétben 10 percig. Ezután áramlási citométer (Coulter EPICS XL-4) segítségével meghatároztuk az apoptotikus sejtek teljes sejtszámhoz viszonyított százalékát (Papp és mtsai., 2003).

9. Western blot analízis

A sejteket jéghideg foszfát-puffert tartalmazó sóoldatban (PBS) mostuk, majd homogenizáló pufferbe gyűjtöttük, és jégen történő szonikálással feltártuk (Lazar és mtsai., 2003). A minták fehérjetartalmát módosított BCA protein esszével határoztuk meg (Pierce, Rockford, Ill., USA). A fehérjéket SDS-PAGE (8% gél, 20–30 mg protein vályúnként) eljárással történő elválasztás után nitrocellulóz membránra transzferáltuk (BioRad, Vienna, Austria). A membránokat 5% tejport tartalmazó PBS-ben blokkoltuk majd a differenciációs marker involucrin, desmoglein-1 (Progen, Heidelberg, Németország) és P-Cadherin (BD Transduction Laboratories, Berlin, Németország) sejtadhéziós molekulák elleni primer egér antitesttel jelöltük. Ezt követően peroxidázzal konjugált kecske anti-egér második antitestet (BioRad) alkalmaztunk és az immunreaktív sávokat kemolumineszcenciás előhívási technika (ECL Western blotting

detection kit, Amersham, Little Chalfont, Egyesült Királyság) segítségével fényérzékeny filmre hívtuk elő (AGFA, Brussels, Belgium). 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 -merkaptoetanolt tartalmazó Tris-HCl pufferben (65°C-on 1 óra) eltávolítottuk, ezt követően egér anti-cytokróm-c antitesttel jelöltük (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA).

10. Sejten belüli kalcium koncentráció meghatározása

Az intracelluláris kalcium koncentráció ($[Ca^{2+}]_i$) változását a korábbiakban leírtak alapján határoztuk meg (Papp és mtsai., 2004). Röviden, a fedőlemezre szélesztett keratinocitákat 5 μ M fura-2 AM festékkel (a kalcium érzékeny, fluoreszcens Fura-2 festék acetoximetilészter formája) 37°C-on egy óráig inkubálva feltöltöttük. Minden mérés előtt a sejteket szobahőmérsékleten (22–24°C) Tyrode-oldatban (mM-okban kifejezve: 137 NaCl, 5.4 KCl, 0.5 $MgCl_2$, 1.8 $CaCl_2$, 11.8 HEPES-NaOH, 1 g/l glükóz, pH 7.4, 30 perc) inkubáltuk, annak érdekében, hogy a festék egyenletesen eloszoljon. Ezt követően a sejteket 15 μ g/cm² TiO_2 -vel indukáltuk egy állandó perfúziót biztosító pumparendszer segítségével, majd a fura-2-vel feltöltött sejteket tartalmazó fedőlemezeket egy invert fluoreszcens mikroszkóp tárgylemeztartójára helyeztük (Diaphot, Nikon, Tokió, Japán). Az excitációs hullámhosszt 340 és 380 nm között változtattuk egy kettős monokromátor, valamint egy on-line kapcsolt számítógép segítségével (Deltascan, Photon Technology International, New Brunswick, NJ, USA), míg a fluoreszcens emissziót 510 nm-en detektáltuk 10 Hz/hányados adatvételi gyakorisággal egy fotoelektron-sokszorozó segítségével, majd meghatároztuk a fluoreszcencia hányadosokat (F_{340}/F_{380}).

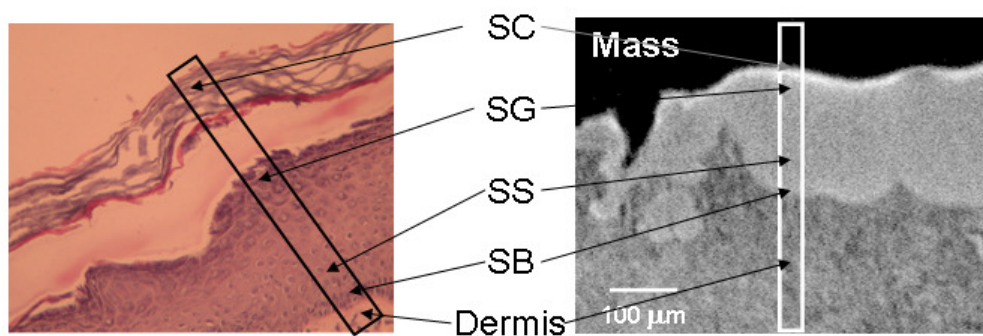
11. Statisztikai analízis

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

VI. Eredmények

1. A TiO_2 partikulumok nem jutnak át a humán bőr transzplantátumok stratum corneum rétegén

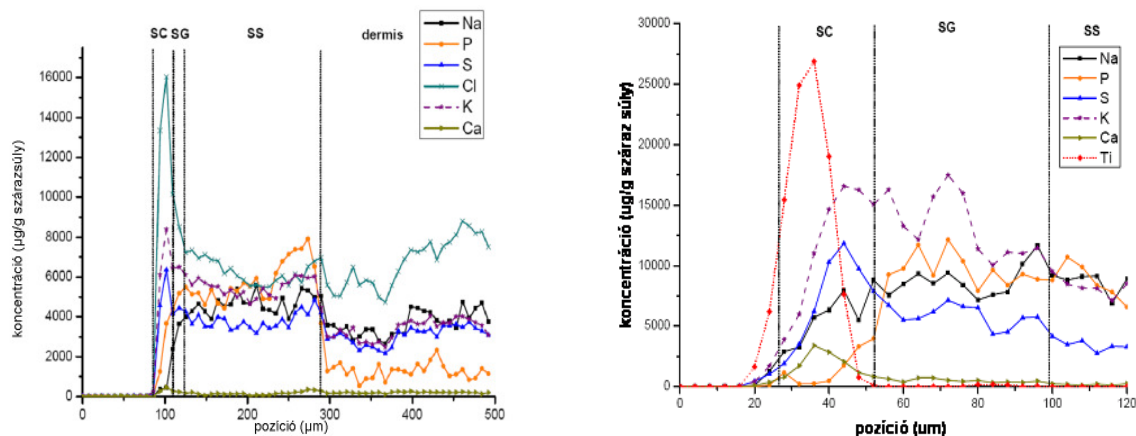
Az első lépésben a kezeletlen minták elemösszetételét vizsgáltuk, majd második lépésben a humán bőr transzplantátumok felületét TiO_2 -tartalmú emulzióval kentük be abból a célból, hogy megvizsgáljuk, hogy a nanopartikulumok eljutnak-e az élő sejtekig (stratum granulosum, spinosum, és basale rétegek). A készítményt 1, 24, és 48 órán keresztül alkalmaztuk a lehetséges penetráció megkönnyítésére okklúziós kötésben. A TiO_2 penetrációs mélység megállapítására a kezelt régiókból biopsziát vettünk, melyeket ionnyaláb analízissel és transzmissziós elektron mikroszkópiával vizsgáltunk.



8. ábra. A bőr rétegeinek képe HE festéssel készült hagyományos szövettani metszeten és tömegeloszlási térképen. A téglalappal jelölt terület jelzi azt a részt, amelyből a 9. ábrán bemutatott grafikon adatai származnak. A HE festett szövettani metszeten a humán xenograft epidermise normális felépítésű, a stratum corneum és a keratinociták az okklúzió nedvesítő hatása miatt duzzadtak.

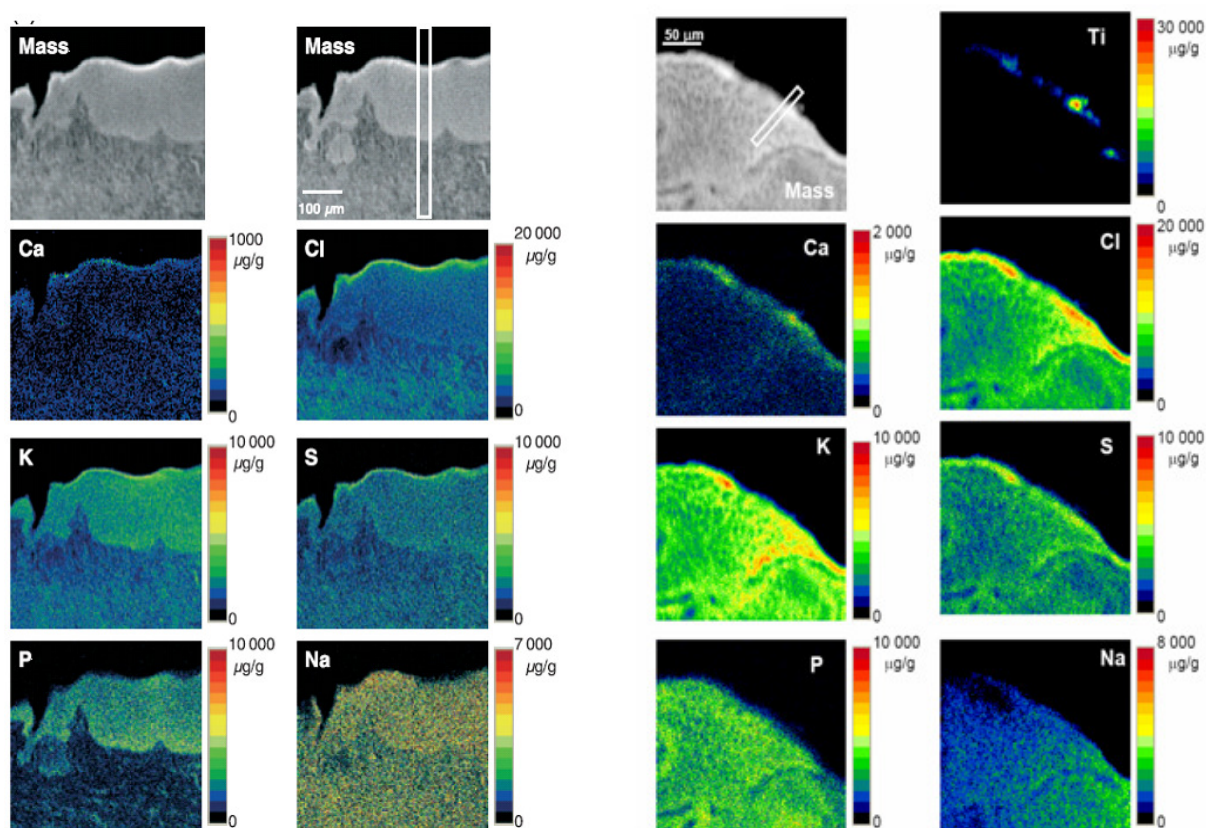
Elsőként igazoltuk, hogy a xenograft minták elemösszetétele megegyezik a korábban leírt, egészséges humán önkéntesekből nyert minták (Aguer és mtsai., 2005; Forslind, 1999; Gontier és mtsai., 2006; Moretto és mtsai., 1999) elemösszetételével. Általánosan elfogadott, hogy a nukleáris mikroszondával kapott 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 (**8. ábra**). A megnövekedett szerves tömeg érték, kén, nátrium maximum érték és a magas kalcium szint a stratum corneumra jellemző (Aguer és mtsai., 2005; Moretto és mtsai., 1999). A magas foszfor értékek a stratum

granulosumot jelzik (Aguer és mtsai., 2005; Moretto és mtsai., 1999), a további rétegeknek is jellemző az elemeloszlási mintázata. Ionnyaláb analízissel a kontroll, nem kezelt bőrbopsziás 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 bőrmockeleken korábban leírtakkal (Aguer és mtsai., 2005; Gontier és mtsai., 2006; Moretto és mtsai., 1999). A nem kezelt mintákban TiO_2 -jelet nem detektáltunk (9., 10 ábra bal oldali panelek).



9. ábra. A bőr elemösszetétele nukleáris mikroszondával meghatározva (kontroll bőrön és 24 óra titán-dioxid expozíció után)

A bőrbopsziás mintákból az Anyag és módszer fejezetben leírt módszer szerint nukleáris mikroszonda segítségével elemeloszlási görbéket, tömeg-, és elemeloszlási térképeket hoztunk létre (ld. 8. ábra). A bőr különböző rétegeinek a bőrfelszíntől mért távolság függvényében detektált elemösszetételét ábrázolja az elemeloszlási görbe. **Bal oldali** grafikon: A spektrumok alapján a nem kezelt „punch biopsziás” mintákban stratum corneum (SC) és a stratum granulosum (SG) az eltérő elemösszetétel alapján világosan megkülönböztethető egymástól. Jelesül a tömegeloszlási csúcs, S, K, Cl maximumok és magas kalciumszintek valamint a Fe, Zn hiánya a stratum corneumra jellemző. A magas P szint a stratum granulosum rétegére jellegzetes. A további rétegek (stratum spinosum-SS, stratum basale-SB, dermis-D) is karakterisztikus elemeloszlási mintázatokat mutattak. A nem kezelt mintában titán jelet nem detektáltunk. **Jobb oldali** grafikon: a titán jel a stratum corneumra jellemző elemekkel (K, S, Ca) azonos mélységben detektálható.

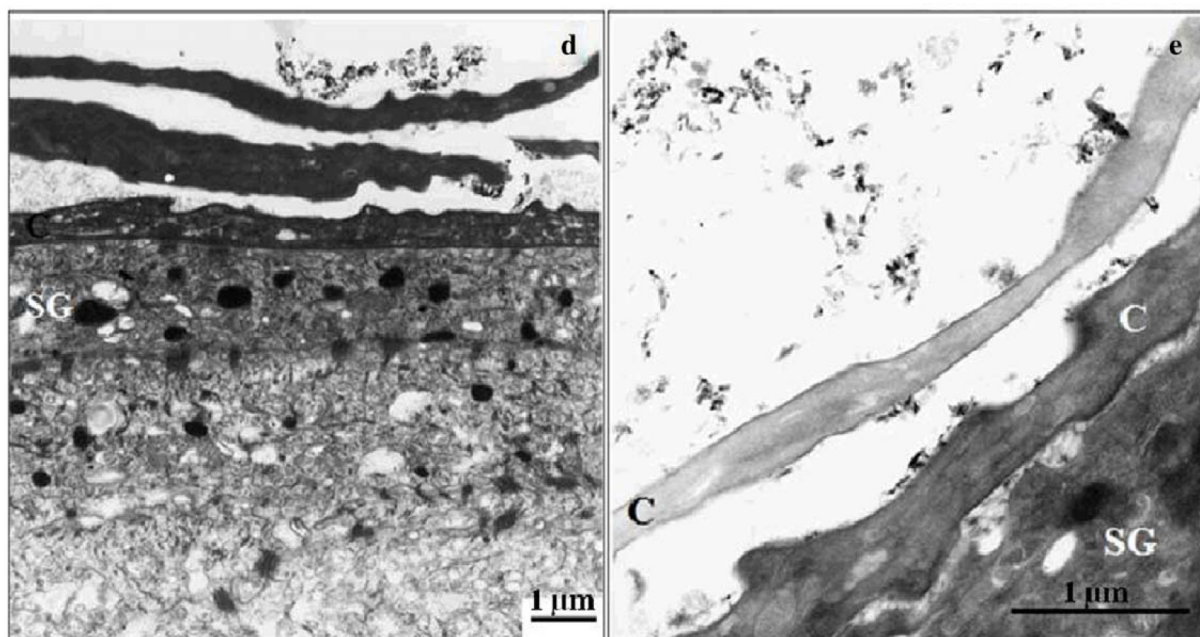


10. ábra A vizsgált bőrminták (kontroll és 24 óráig kezelt) valós elem térképe.

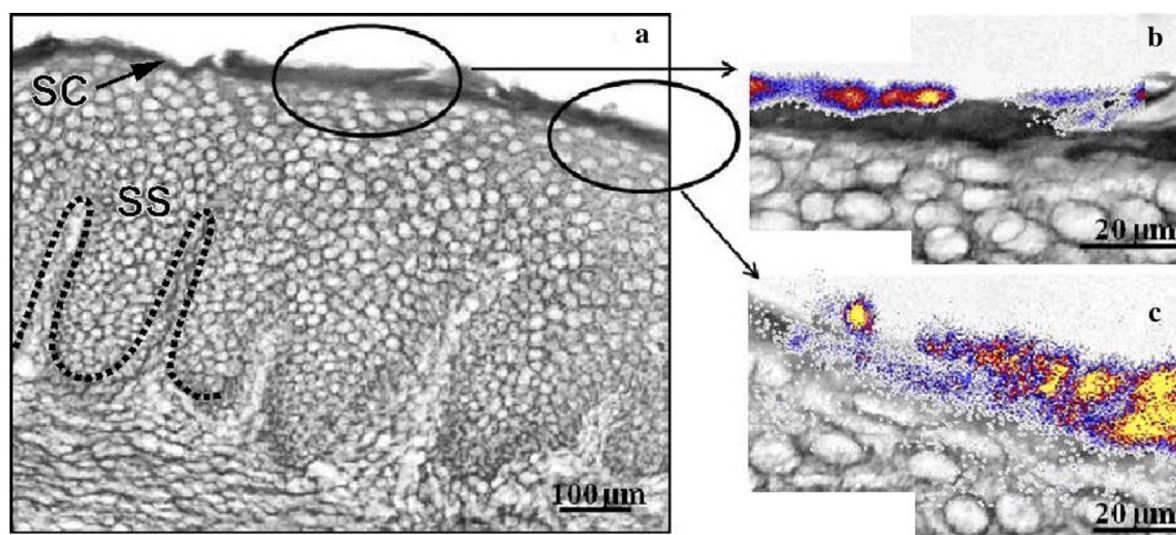
Kalcium (Ca), klór (Cl), kén (S), kálium (K), foszfor (P), nátrium (Na) és tömegeloszlási térképek. A bal oldali panel a kontroll (500 x 500 μm-es skálán meghatározva), a jobb oldali a 24 órás titán-dioxid expozíció után detektált elem térkép. A STIM képeken lévő téglalapok a 9. ábrán lévő grafikonok adatforrásait jelzik.

Ezek után a mikronizált titán-dioxidot tartalmazó készítménnyel 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 (9., 10. ábra jobb oldali panelek). A bőr mélyebb rétegeiben nem kaptunk Ti-jelét. Ezen eredményünket megerősítette egy párhuzamos minta TEM vizsgálata (11. ábra), illetve PIXE analízis a bordeaux-i laboratóriumban (12. ábra). (NB. A hivatkozott cikkben a szerző 24 óra helyett tévesen 2 óra expozíciós időt jelöl meg, mely hibára a figyelmét felhívtam, erratum eddig az időpontig nem jelent meg.)

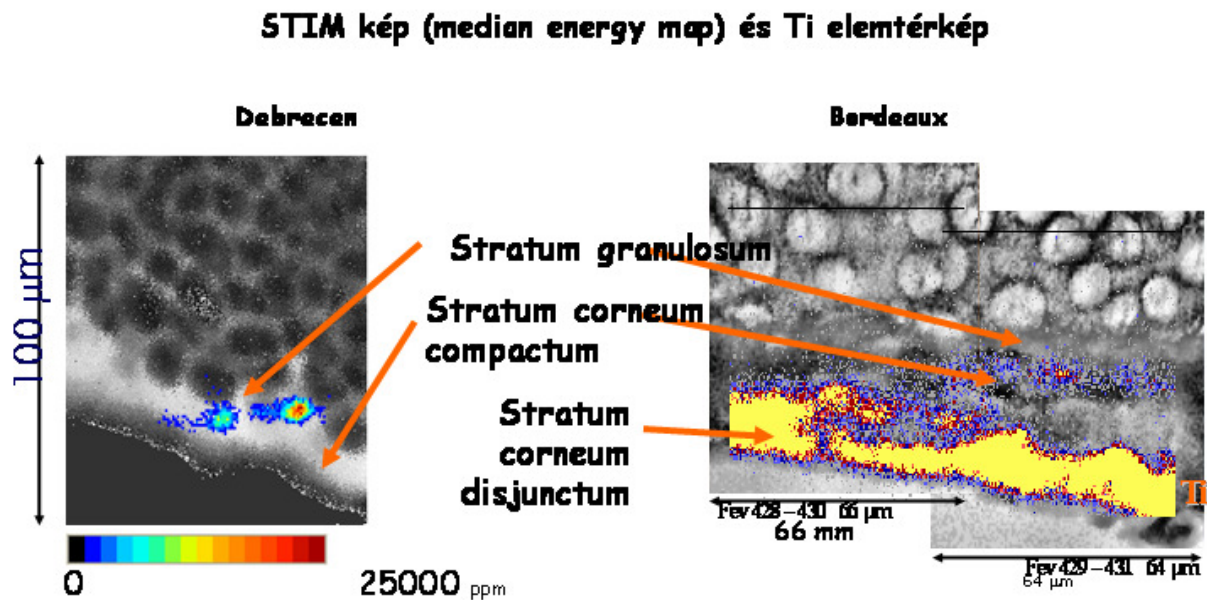


11. ábra. A humán bőr xenograftok elektronmikroszkópos képe 24 óra TiO_2 expozíció után.
A nanopartikulumok a stratum corneum felső részében láthatóak. C- korneocita; SG – stratum granulosum



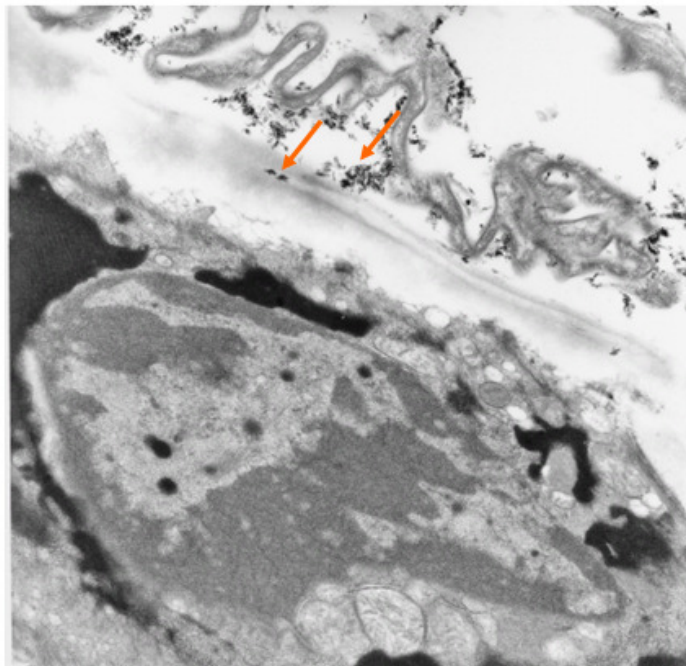
12. ábra. A humán bőr xenograftok tömegeloszlási térképének és a titán elemeloszlási térképének szuperpozíciója a boredaux-i laboratórium eredményei szerint (24 óra expozíció).
A TiO_2 a stratum corneum felső rétegében látható.

A nanopartikulumok egy óra expozíció után is a stratum corneum felszínén maradtak (ábrán nem mutatva). 48 óra expozíció után a TiO_2 nanorészecskék némileg nagyobb mélységben voltak detektálhatóak nukleáris mikroanalízissel a debreceni és a bordeaux-i laboratóriumban vizsgálva (13. ábra). A TEM-vizsgálat a partikulumokat a statum corneum compactum területén, a stratum granulosum határán mutatta, utóbbi réteget el nem érve (14. ábra) (Butz, 2004).



13. ábra. TiO_2 48 óra expozíció után a stratum corneum és a stratum granulosum határán található meg.

A méréseket a bordeaux-i és a debreceni laboratórium párhuzamosan végezte el.



14. ábra. A HRTEM felvételen a TiO_2 nanopartikulumok 48 óra expozíció után a stratum corneum alsóbb rétegeiben helyezkednek el, az élő sejtek rétegét még el nem érve.

A nyilak a TiO_2 nanopartikulumokat mutatják.

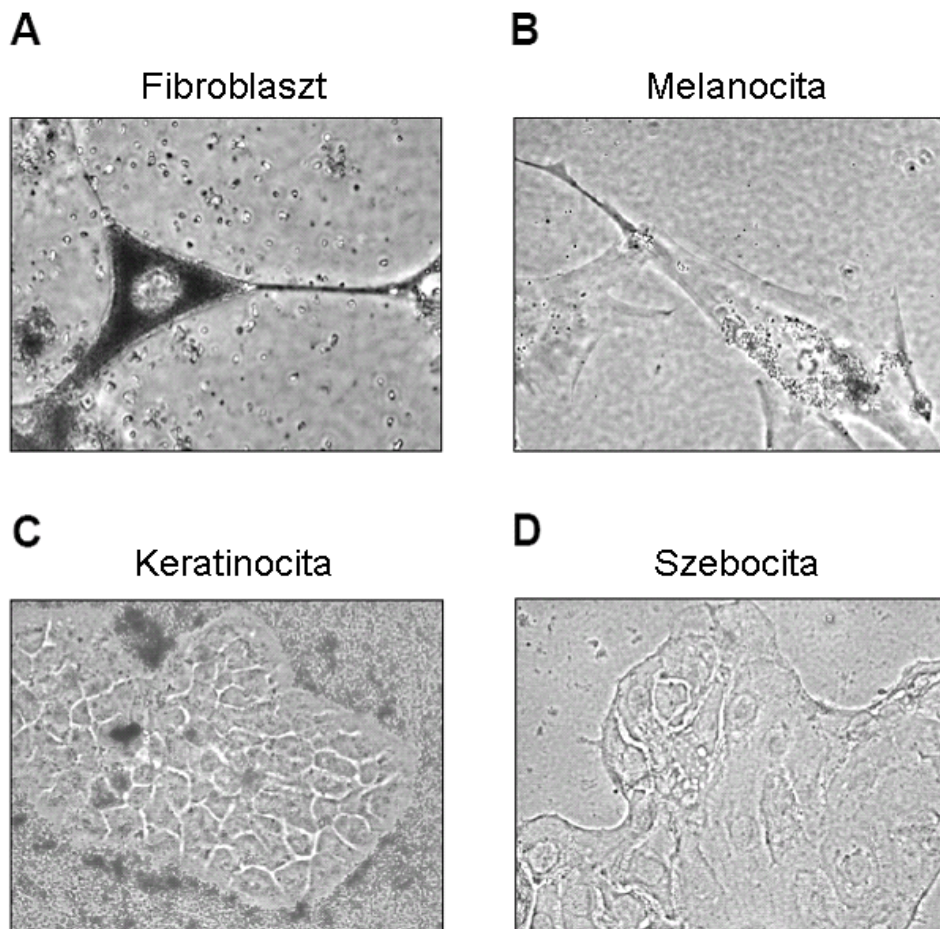
Ezen eredmények megegyeznek a más kutatócsoportok más penetrációs modelleken elért eredményeivel (Butz, 2007; Menzel és mtsai., 2006; Silva és Filipe, 2004; Verissimo és mtsai., 2007). A fentiek alapján megállapíthatjuk, hogy a humán bőr xenograft modellen vizsgálva a TiO_2 nanorészecskék a hámba nem jutnak be, nem érik el az „élő” sejtrétegeket.

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

A fenti eredmények megmutatták, hogy az ép bőrben a stratum corneum hatékony védelmet nyújt a mikronizált TiO_2 -dal szemben. Azonban a bevezetésből is kitűnik, hogy a TiO_2 expozíciója igen gyakran történik meg olyan esetekben, amikor a bőr barrierfunkciója károsodott (pl. napégés, mikrosérülések, felázott bőr), és ezáltal a TiO_2 közvetlen érintkezésbe kerülhet a bőr sejteivel. 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 sejtei felveszik-e a sejtplazmájukba a TiO_2

nanopartikulumokat. Szubkonfluens keratinocita, szebocita, melanocita, és fibroblaszt tenyészetekhez TiO_2 -t adtunk (15 ug/cm^2). 24 órás inkubáció után fáziskontraszt mikroszkópiával vizsgáltuk az internalizációt. Ahogyan a **15. ábrán** látható, a fibroblasztok és a melanocyták citoplazmájában észleltük a részecskéket, perinukleáris dúsulást mutatva. A magban nanopartikulumok nem voltak megfigyelhetők. A keratinociták és a szebociták nem vették fel a titán-dioxidot.



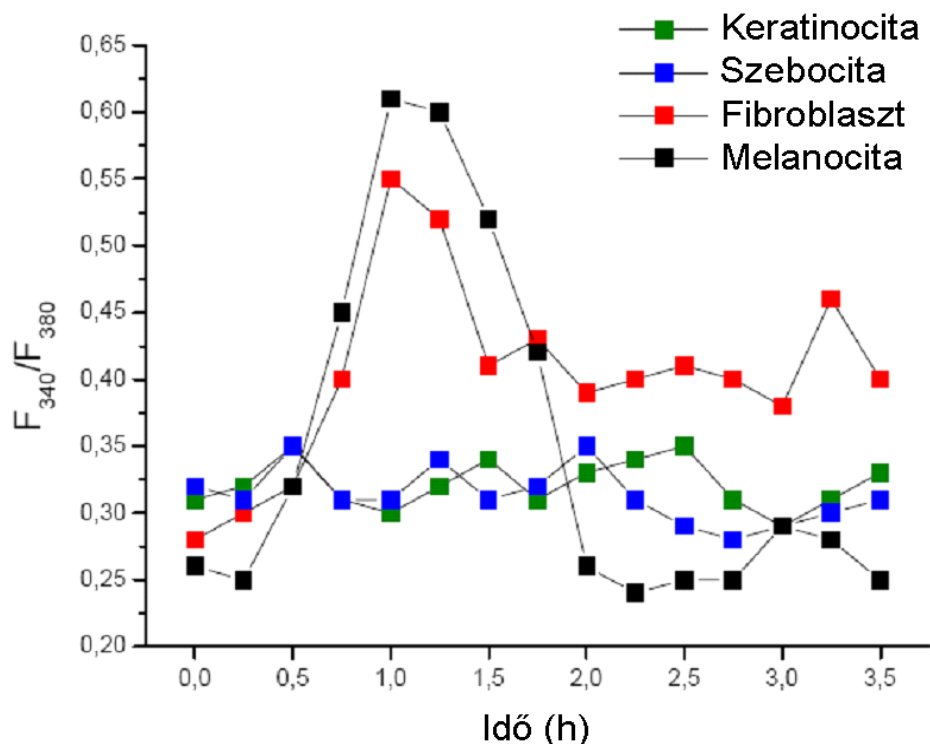
15. ábra A TiO_2 nanopartikulumok internalizációja humán sejt kultúrákban.

A sejteket fedőlemezekre szélesztettük, majd 24 órán át 15 ug/cm^2 TiO_2 -dal kezeltük. A nanopartikulumok internalizációját fáziskontraszt mikroszkópiával vizsgáltuk (400X nagyítás).

3. 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 internalizációjától függetlenül) jelátviteli folyamatok indulnak-e meg, megvizsgáltuk, hogy a nanopartikulum expozíció $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedést okoz-e a fenti sejt típusokban.

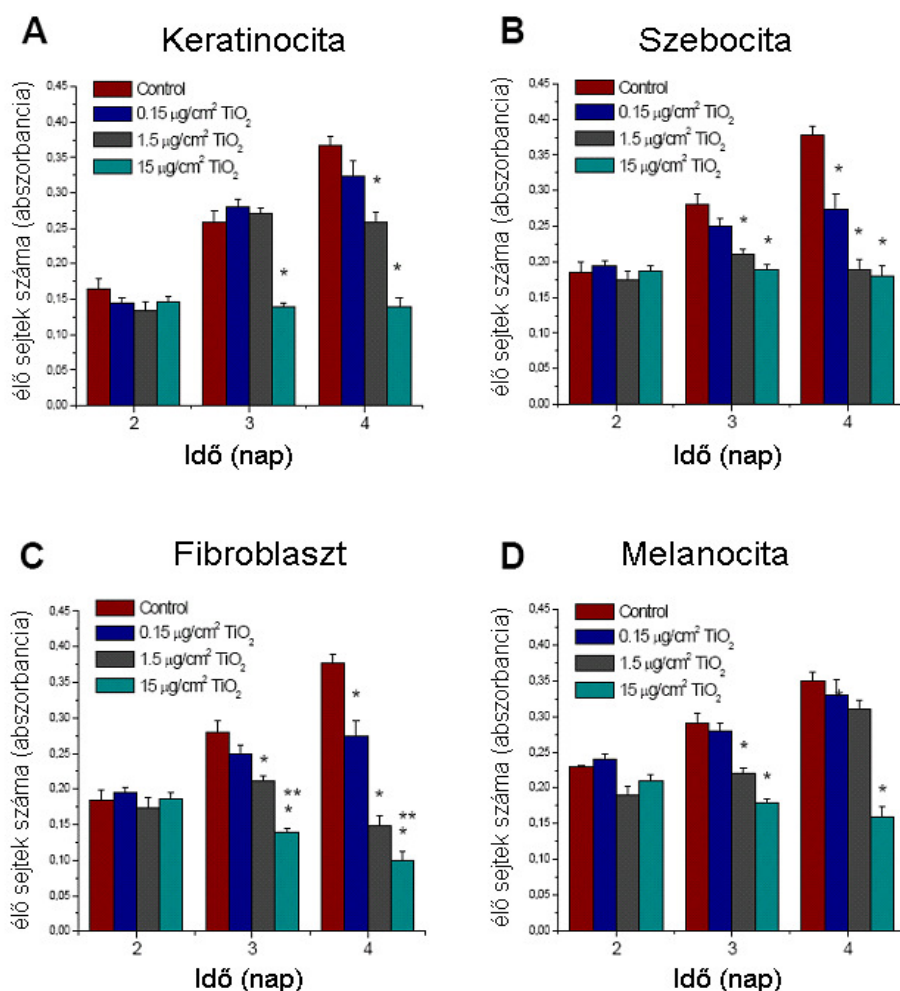
Az intracelluláris ion szintet kalcium-szenzitív festékekkel vizsgálva 15 ug/cm^2 TiO_2 hozzáadása relatíve lassú, az expozíció után 45 perccel kezdődő, ugyanakkor részben vagy teljesen reverzibilis $[\text{Ca}^{2+}]_i$ emelkedést indukált a fibroblasztokban és a melanocytákban (16. ábra.). Nem észleltünk azonban kalcium-választ azokban a sejtekben, amelyek nem vették fel TiO_2 -t, azaz a keratinociták és a szebociták esetében. Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy a titán-dioxid internalizációja megváltoztatja a sejtek kalcium homeosztázisát.



16. ábra A TiO_2 nanopartikulumok hatása a humán bőrsejt vonalak intracelluláris Ca^{2+} koncentrációjának változására.

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

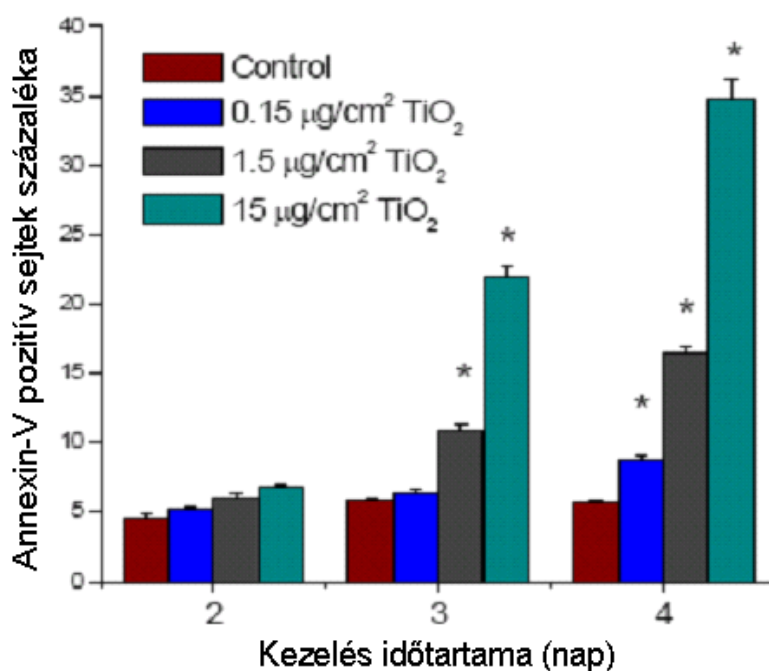
A következő lépésben meghatároztuk a TiO_2 sejtproliferációra gyakorolt hatását. A kolorimetriás MTT életképességi teszttel vizsgálva a titán-dioxid minden vizsgált sejttypusban dózis-, és időfüggő módon csökkentette a sejtproliferáció mértékét (N.B. a keratinocitákban és a szebocitákban is, amelyek nem internalizálták a nanopartikulumokat) (**17. ábra**). Fontos megfigyelésünk volt továbbá, hogy 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.



17. ábra. A TiO_2 nanopartikulumok hatása a tenyésztett bőrsejt vonalak proliferációjára.

* $p < 0,05$ az adott napi kontrollhoz viszonyítva; ** $p < 0,05$ a második nap kontroll csoportjához viszonyítva.

Ezzel szöges ellentétben áll a fibroblasztokon észlelt hatás. $15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ TiO_2 jelenléte nemcsak, hogy teljesen meggátolta a fibroblasztok proliferációját a 3. és a 4. napra, de az élő sejtek számát is csökkentette a 2. napi kontroll értékhez képest. Ez utóbbi megfigyelés miatt feltételeztük, hogy a titán-dioxid sejthalált indukált a humán dermalis fibroblasztokban. Annak vizsgálatára, hogy programozott sejthalál zajlik-e a fibroblasztokban, megvizsgáltuk a foszfatidil-szerin apoptózis marker megjelenését a sejtmembrán külső oldalán (Bodo és mtsai., 2005). A TiO_2 , korábbi eredményeinkkel összhangban, dózis-, és időfüggő módon indukálta a fibroblasztok apoptózist, a **18. ábrán** látható mértékben.



18. ábra. A TiO_2 nanopartikulumok fibroblasztokban apoptózist indukálnak.

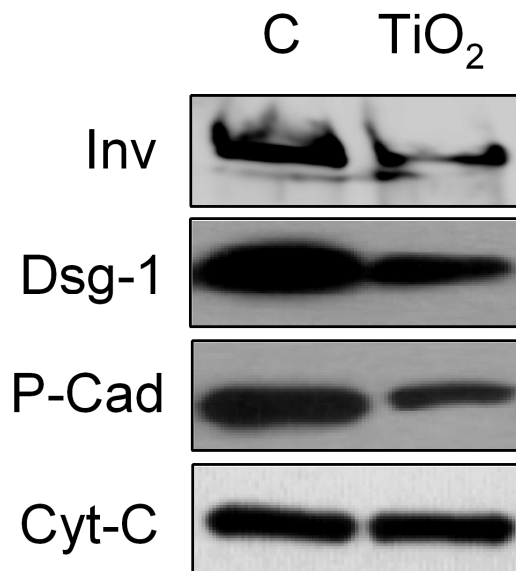
A keratinociták, melanocyták, és szebociták esetében viszont az Annexin-V pozitív apoptótikus sejtek aránya nem emelkedett szignifikánsan (ábrán nem mutatva). Úgy tűnik tehát, hogy a TiO_2 proapoptotikus hatása csak a dermalis fibroblasztokra korlátozódik.

5. 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 $15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ TiO_2 -dal inkubáltunk, majd Western blot analízist végeztünk. Amint a **19. ábrán** is látható, 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 (Candi és mtsai., 2005; Whittock és Bower, 2003). Összefoglalva, ezen adatok arra utalnak, hogy a titán-dioxid nemcsak a keratinociták proliferációját csökkenti, hanem gátolja azok differenciációját is.



19. ábra. A TiO_2 nanopartikulumok hatása különböző keratinocita markerek expressziójára.

HaCaT keratinocitákat 48 órán át $15 \text{ mg}/\text{ml}$ TiO_2 -dal kezeltük, a nem kezelt kontroll csoportot C-vel jelöltük. A sejteket ezután összegyűjtöttük és feltártuk, majd az Anyag és Módszer fejezetben leírtak szerint Western blot technikával vizsgáltuk az involucrin (INV) nevű differenciációs- valamint a desmoglein-1 (Dsg-1) és P-cadherin (P-Cad) adhéziós markerek expresszióját. A citkróm c (cyt c) segítségével igazoltuk, hogy azonos mennyiségű fehérjét vittünk fel a kísérlet során.

VII. 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.

1. 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 egyes anyagok bőrpenetrációjának detektálása szempontjából. A TEWL mérése indirekt információt ad a bőr védőfunkciójáról anélkül, hogy a nanopartikulumok helyzetét megmutatná (Jarrett, 1980; Madison, 2003). A „tape stripping” penetráció vizsgálati technikák a nanopartikulumokat kimutatják ugyan, de nem adnak egzakt információt azok anatómiai fellelési helyéről (Bennat és Muller, 2000; Dussert és mtsai., 1997; Pflucker és mtsai., 1999). Éppen ezek miatt a korábbi technikákkal nem vizsgálható egyidejűleg a nanorészecskék penetrációja és a bőr barrier funkciója.

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 előnyei mellett hátrányai is megemlíthetők. 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.

2. A SCID-egér humán xenograft modell alkalmas a bőr barrier funkciójának 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 szükségtelessé teszi az egészséges önkéntesek – sokszor nehézkes – toborzását bőrbioopszia céljából (Kiss és mtsai., 2004). A preputium graftra azért esett a választásunk, mert a circumcisio során eltávolított és transzplantálandó fitymabőr bőrgyógyászatilag 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 műtéti 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.

3. 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 bőrbioopsiás anyagon 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 vizsgálatokor 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.

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

Kimutattuk, hogy a tüdő modellekhez (Arredouani és mtsai., 2005; Borm és mtsai., 2004; Geiser és mtsai., 2005) 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.

4. A mikronizált titán-dioxid által termelt szabad gyökök oxidatív stressz választ indíthatnak be a sejtekben

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 pontokba szedve 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 (Gutteridge, 1995).
- 2, Redox szenzitív kinázok aktiválásán keresztül (Pantano és mtsai., 2006).
- 3, Redox szenzitív transzkripció faktorok (pl. NFkB) aktiválásán keresztül (Genestra, 2007).
- 4, A DNS károsításán keresztül, így aktiválva a DNS repairt, illetve a kapcsolt folyamatokat (pl. a PARP aktiváció-NAD⁺ deplécio-nekrózis/apoptózis útvonalat) (Virag és Szabo, 2002).

5. A TiO₂ expozíció minden vizsgált sejttípusban a proliferáció gátlását okozta a nanopartikulumok internalizációjától és az [Ca²⁺]_i választól függetlenül

A sejtek proliferációs képességét első lépésben MTT teszttel vizsgáltuk, majd Annexin-V-propidium-jodid kettős jelölésű áramlási citometriával detektáltuk a sejthalál paramétereit.

Az MTT teszt az élő sejteket mutatja meg, hiszen az életképes mitokondriumok tudják a tetrazóliumsót kékes-lilás színű formazánná redukálni. A módszer így a működő mitokondriumokkal rendelkező sejtek arányát detektálja a kontrollhoz képest.

Amennyiben a kapott abszorbancia mértéke magasabb a kontroll értékénél, a sejtek proliferálnak, osztódnak. Amennyiben az abszorbancia csökken a kontrollhoz képest, az élő sejtszám csökkenéséről van szó, melynek hátterében sejthalál folyamatok állhatnak. A fibroblasztokban az élő sejtszám is csökkent a kontroll értékhez képest. Ha a kapott abszorbancia érték nem változik szignifikánsan, az élő sejtszám nem csökken, de osztódásról sem beszélhetünk. Kísérleteink során három vizsgált sejttípusban az élő sejtszám stagnálását tapasztaltuk.

Annak kizárására, hogy tapasztalható-e sejthalál ezekben az esetekben. propidium-jodid-Annexin-V kettős jelölésű áramlási citometriás vizsgálatot végeztünk. A vizsgálatok során a propidium-jodid festődés eredménye megkérdőjelezhető volt. A kontroll csoportban is jelentősen fluktuált a pozitív sejtek százalékos aránya. Tapasztalataink szerint az általunk használt tapadó sejtvonalak esetén a kettős jelöléssel végezhető áramlási citometria, nehezen kivitelezhető, valószínűleg a sejtek felületéről való leválasztása –tripszinezés, felkaparás- miatt jelentkező műtermék, álpozitivitás miatt. A propidium-jodid-festéssel vizsgált sejtek esetén az eredmények ellentmondóak voltak, ezért azokat további munkánk során nem használtuk. (A jelenlegi munka folytatásaként elnyert OTKA-pályázat keretében végzett kutatómunka során kifejlesztésre kerültek a kitapadt sejtekre alkalmazható, 96-lyukú lemezekben működő esszék is, melyekkel a

sejthalál paraméterek mérése elvégezhető. Ezzel a módszerrel más mikronizált anyagok esetén egyértelmű apoptózist és nekrozist detektáltunk. Ezen további vizsgálatokat megelőzően elvégzett MTT teszt az élő sejtszám szignifikáns csökkenését mutatta.)

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.

6. 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. Mivel konkrétabb hivatkozást nem találtam a fibroblasztokban lévő egyéb specifikus titán-dioxid hatásról, a csak e sejtekben észlelt programozott sejthalál jelenségre egyértelmű magyarázat nem adható.

7. A nanorészecskék hozzáadása után csökkent a differenciációs markerek expressziója

HaCat keratinocitákban

Kimutattuk, hogy a keratinocitákban a proliferáció gátlását több differenciációs marker és adhézións molekula csökkent expressziója kísérte. Ezen molekulák csökkent expressziója differenciációs zavart, kóros citoszkeleton és dezmoszómaszerkezetet hozhat létre. A gyenge citoszkeletonból és dezmoszómákból a gyenge sejtközüti adhézións miatt kialakuló defektív szaruboríték a barrierfunkcións további romlását idézheti elő (Candi és mtsai., 2005).

Az a megfigyelésünk, hogy a keratinociták nem internalizálták a mikronizált részecskéket, más aspektusból is fontos lehet. Úgy tünik, a hámsejtek feladata nem egyszerűen

csak a bőr szilárdítása, védelme. A keratinociták természetes (innate) immunitásban játszott szerepe az utóbbi években a kutatások középpontjába került. Egyes szerzők a bőrről, mint immunszervről (SIS, skin immune system) beszélnek (Bos, 1997). A keratinociták immunfunkciói közül elsőként azok fagocitózisra való képességét vetették fel a 70-es években, melyet újabb megfigyelések is megerősítettek (Cardinali és mtsai., 2005; Csato és mtsai., 1986; Pivarsci és mtsai., 2005; Sharlow és mtsai., 2000). A keratinociták a káros anyagokat fagocitálják, majd a bekebelezett noxákkal együtt lehámlanak. 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 nyúlványait 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.

8. 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 TiO₂ nanopartikulumokat, amelyek az epidermalis differenciáció zavarát okozhatják, és toxikus hatást is kifejthetnek a környező sejtekre. A sejtes funkciók ezen változásai tovább gyengíthetik az epidermális barrieret. A dermisben lévő fibroblasztok apoptózisa miatt a részecskék a dermis elasztózist 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. Az

atópiás dermatitis egyik fő patogenetikai tényezője a sérült barrierefunkció. Azok az erosiók, amelyek pl. egyes fotodermatózisok, különböző porfíria fajták (pl. porphyria cutanea tarda), különböző eredetű hólyagos bőrbetegségek rész tünetei is, behatolási kaput jelentenek a nanopartikulumok számára. A műtéti sebek, adóterületek, égési sérülések esetén szintén csökkent a barrier működése, mivel a szaruréteg, a hám gyenge, illetve hiányzik. Ezen állapotok 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.

Az egyes testtájak, pl. a szemkörnyék, a hajlatok, ruhával nem takarható területeken lévő sérülések esetén szintén szerepet játszhat a titán-dioxid toxikus hatása, melyet a mindennapi gyakorlatban figyelembe lehet venni.

9. 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 a 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.

10. Gyermekkor expozíció

Tekintve, hogy a csecsemők, kisgyerekek bőrfelülete igen érzékeny, barrierefunkciójuk 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.

Kimutatták, hogy egy gyermeket évente háromszor annyi UV-sugárzás ér, mint egy felnőttet. Irodalmi adatok szerint egy gyermek, 18 éves kora eléréséig akár az egész élete során elszenvedett UV-sugárdózis 80%-át is megkaphatja. Az is ismert, hogy a melanoma malignumban szenvedő betegek kórelőzményében súlyos gyerekkori napégések fordulnak elő, melyek patogenetikai szerepét az utóbbi évtizedekben hangsúlyozzák a daganatos kórkép vonatkozásában. Egyes szerzők véleménye szerint a basalioma és egyéb nonmelanoma bőrrákok incidenciája is jelentősen csökkenthető lenne, ha a kisdedeket védenék a túlzott UV-expozíciótól, egészen a felnőttkor eléréséig (Stern és mtsai., 1986; Taylor és Sober, 1996). Utóbbi kiemelten fontos tinédzserek esetén, mivel ők életvitelük és rizikómagatartásuk miatt fokozott ultraibolya sugárterhetésnek vannak kitéve (Thieden és mtsai., 2004).

A fentiek miatt nagyon 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.

11. Bőrgyógyászati, népegészségügyi, tudományos jelentőség

Ma, az emelkedő incidenciájú melanoma és rosszindulatú nem melanociter bőrtumorok korában a fényvédelem a bőrgyógyászati terápia és prevenció kiemelkedően fontos területe. Az átlagos klinikus viszont, bár ajánlja a fényvédőket betegeinek, nem minden esetben tájékozott azok effektivitása és mellékhatásai tekintetében. Természetesen minden gyártó és fogyasztó hatékony, nem allergizáló, erős fotoprotektív hatású és az UV hatására nem karcinogén fényvédőt szeretne. Eredményeink azonban rávilágítanak arra, hogy bizonyos esetekben az externákat elővigyázatosan, fokozott óvatossággal érdemes használni, sérült bőrön történő alkalmazásuk kerülendő. Utóbbi esetben betegeinknek más fotoprotektív módszerekkel kombinált fényvédelmet is ajánlhatunk.

A kozmetikai iparban és az alapkutatóban ígéretes próbálkozások történnek az újabb hatásmechanizmusú fényvédők kifejlesztésére. A repair enzimeket tartalmazó fényvédő

készítményekről a bevezetőben már szót ejtettünk. Az antioxidánsok alkalmazása nem csak a napsugárzás, hanem a titán-dioxid által esetlegesen termelt szabadgyököket is képes befogni. Számos anitoxidáns molekula a ma használt fényvédő krémek jelentékeny részének alkotórésze.

Az oxidatív stressz biokémiájában szerepet játszó enzimek működésének befolyásolása egyes szerzők szerint védene a DNS-károsodás következményeitől. Amerikai szerzők elmélete szerint a stressz-válasz enzimeinek (például poly(ADP-ribóz) polimerázok és sirtuinok) központi szubsztrátja, a NAD⁺ intracelluláris szintje meghatározó a sejtek oxidatív stresszre tűrő képessége szempontjából. Kimutatták, hogy a NAD⁺ prekursor niacin hiánya több szabadgyök termelődését segíti elő, amely a sejthalál fokozódásával jár (Benavente és Jacobson, 2008; Benavente és mtsai., 2009). A niacin hozzáadása a fényvédő készítményekhez jelentősen javíthatja a sejtek túlélőképességét, így egy ígéretes út lehet a jövő kutatásai számára.

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 készítmények létrejöttéhez.

Az eredményeink szorosabb értelemben vett interpretálásán túl fontosnak tartom azt, hogy az eljárás, amely alapján az előbbi megállapítások születtek, egy interdiszciplináris kutatócsoport szoros együttműködésben végzett munkájának terméke. A fenti eredmények eléréséhez önmagában egyik tudományterület ismeretanyaga sem lenne elegendő. A fizikusok, biológusok és klinikusok közti kommunikáció, tudás átadása mindhárom tudományterület gyorsabb fejlődésének záloga. Ezen együttműködések új megvilágításba helyezik eddigi klinikai ismereteinket és hozzásegítenek ahhoz, hogy a betegségek hátterét más aspektusból vizsgálhassuk, valamint más diszciplínák szakembereivel együtt új diagnosztikus és terápiás eszközöket fejlesszünk ki.

VIII. Összefoglalás

A titán-dioxid (TiO_2) nanopartikulumokkal a mindennapi életben gyakran találkozunk (pl. festékekben, háztartási eszközökben, műanyag termékekben). Széleskörű elterjedtségük ellenére a nanopartikulumok patogenetikai szerepe néhány betegség vonatkozásában már felmerült (pl. pulmonaris neoplasiák, tüdőfibrózis). A vegyület bőrgyógyászati jelentőségét az adja, hogy a TiO_2 fizikai fotoprotektív tulajdonsága miatt fényvédőkben használatos, emellett különféle egyéb kozmetikumok alkotórésze, jóllehet a TiO_2 bőrfunkciókra kifejtett hatása egyelőre ismeretlen. Jelen munkánkban megvizsgáltuk a TiO_2 *in vivo* penetrációját immundeficiens egérbe transzplantált humán bőr xenograftokon, továbbá megnéztük a nanopartikulumok *in vitro* hatását tenyésztett epidermális és dermális sejtek funkcióira. A tanulmányban az ionnyaláb analízis technikákat felhasználva elsőként bizonyítjuk, hogy a TiO_2 nanopartikulumok *in vivo* az ép epidermalis barrieren át nem penetrálnak. Eredményeinkben azt is megmutatjuk, hogy *in vitro*, sejttenyészetben a TiO_2 jelentős, sejttípus-függő hatást fejt ki a különböző sejtfunkciókra, így az életképességre, a proliferációra, apoptózisra, és a differenciációra. Eredményeink rávilágítanak arra, hogy a sérült barrier funkciójú bőrön a mikronizált TiO_2 -tartalmú készítmények óvatosan alkalmazandók, amíg azok veszélytelenségét klinikai vizsgálatok keretében be nem bizonyítják.

IX. Summary

Titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles are ubiquitously used materials in everyday life (e.g. paints, household products, plastic goods). However, despite the wide array of common applications, their pathogenetic role was also suggested under certain conditions (e.g. pulmonary neoplasies, lung fibrosis). From a dermatological point-of-view, it is also of great importance that TiO₂ also serves as a physical photoprotective agent in sunscreens and is widely used in various cosmetic products. However, the effect of TiO₂ on human cutaneous functions is still unknown. Therefore, in the current study, we investigated the *in vivo* penetration of TiO₂ via human skin transplanted to immunodeficient mice and, furthermore, we measured the *in vitro* effects of nanoparticles on various functional properties of numerous epidermal and dermal cells in culture. Hereby, using various nuclear microscopy methods, we provide the first evidence that TiO₂ nanoparticles *in vivo* do not penetrate through the intact epidermal barrier. However, we also report that TiO₂, when exposed directly to cell cultures *in vitro*, exerts significant and cell-type dependent effects on such cellular functions as viability, proliferation, apoptosis, and differentiation. Our novel findings point out, that micronized TiO₂-containing products should be used with precaution on skin with an impaired stratum corneum barrier function until the potential risk is evaluated in future, clinically-oriented trials.

X. Új 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.

X. Irodalom

- Aguer, P., Alves, L.C., Barberet, P., Gontier, E., Incerti, S., Michelet-Habchi, C., Kertesz, Z., Kiss, A.Z., Moretto, P. and Pallon, J. (2005) Skin morphology and layer identification using different STIM geometries. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, **231**, 292-299.
- Aro, H. and Dahms, G. (2006) Compatibility of micro-fine titanium dioxide with organic UV filters. *Cosmetics and toiletries manufacture worldwide*, 115-118.
- Arredouani, M.S., Palecanda, A., Koziel, H., Huang, Y.C., Imrich, A., Sulahian, T.H., Ning, Y.Y., Yang, Z., Pikkarainen, T., Sankala, M., Vargas, S.O., Takeya, M., Tryggvason, K. and Kobzik, L. (2005) MARCO is the major binding receptor for unopsonized particles and bacteria on human alveolar macrophages. *J.Immunol.*, **175**, 6058-6064.
- Benavente, C.A. and Jacobson, E.L. (2008) Niacin restriction upregulates NADPH oxidase and reactive oxygen species (ROS) in human keratinocytes. *Free Radic Biol Med.*, **44**, 527-537. Epub 2007 Oct 2017.
- Benavente, C.A., Jacobson, M.K. and Jacobson, E.L. (2009) NAD in skin: therapeutic approaches for niacin. *Curr Pharm Des.*, **15**, 29-38.
- Bennat, C. and Muller, G. (2000) Skin penetration and stabilization of formulations containing microfine titanium dioxide as physical UV filter. *International Journal of Cosmetic Science*, **22**, 271-283.
- Bodo, E., Biro, T., Telek, A., Czifra, G., Griger, Z., Toth, B.I., Mescalchin, A., Ito, T., Bettermann, A., Kovacs, L. and Paus, R. (2005) A hot new twist to hair biology: involvement of vanilloid receptor-1 (VR1/TRPV1) signaling in human hair growth control. *Am.J.Pathol.*, **166**, 985-998.
- Borm, P.J., Schins, R.P. and Albrecht, C. (2004) Inhaled particles and lung cancer, part B: paradigms and risk assessment. *Int.J.Cancer.*, **110**, 3-14.
- Bos, J.D. (1997) The skin as an organ of immunity. *Clin Exp Immunol*, **107 Suppl 1**, 3-5.
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. and Fusenig, N.E. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol.*, **106**, 761-771.
- Braun-Falco, O., Plewig, G., Wolff, H.H. and Burgdorf, W.H.C. (2000) *Dermatology* Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- Breese, M.B.H., Grime, G.W. and Watt, F. (1992) The Nuclear Microprobe. *Annual Review of Nuclear and Particle Science*, Vol. 42, pp. 1-38.
- Breese, M.B.H., Jamieson, D.N. and King, P.J.C. (1996) Materials analysis using a nuclear microprobe. John Willey & Sons, INC., New York, p. 173.
- Butz, T. (2004) NANODERM Quality of skin as a barrier to ultrafine particles. QLK4-CT-2002-02678.
- Butz, T. (2007) NANODERM Quality of Skin as a Barrier to ultra-fine Particles QLK4-CT-2002-02678 Final Report.
- Candi, E., Schmidt, R. and Melino, G. (2005) The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, **6**, 328-340.
- Cardinali, G., Ceccarelli, S., Kovacs, D., Aspite, N., Lotti, L.V., Torrisi, M.R. and Picardo, M. (2005) Keratinocyte growth factor promotes melanosome transfer to keratinocytes. *J*

- Invest Dermatol*, **125**, 1190-1199.
- Csato, M., Bozoky, B., Hunyadi, J. and Dobozy, A. (1986) Candida albicans phagocytosis by separated human epidermal cells. *Arch Dermatol Res*, **279**, 136-139.
- Demerjian, M., Man, M.Q., Choi, E.H., Brown, B.E., Crumrine, D., Chang, S., Mauro, T., Elias, P.M. and Feingold, K.R. (2006) Topical treatment with thiazolidinediones, activators of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, normalizes epidermal homeostasis in a murine hyperproliferative disease model. *Exp Dermatol.*, **15**, 154-160.
- Descargues, P., Deraison, C., Prost, C., Fraitag, S., Mazereeuw-Hautier, J., D'Alessio, M., Ishida-Yamamoto, A., Bodemer, C., Zambruno, G. and Hovnanian, A. (2006) Corneodesmosomal cadherins are preferential targets of stratum corneum trypsin- and chymotrypsin-like hyperactivity in Netherton syndrome. *J Invest Dermatol.*, **126**, 1622-1632. Epub 2006 Apr 1620.
- Dhitavat, J., Dode, L., Leslie, N., Sakuntabhai, A., Lorette, G. and Hovnanian, A. (2003) Mutations in the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase isoform cause Darier's disease. *J Invest Dermatol.*, **121**, 486-489.
- Dobak, J. and Liu, F.T. (1992) Sunscreens, UVA, and cutaneous malignancy: adding fuel to the fire. *Int J Dermatol.*, **31**, 544-548.
- Dobozy, A., Horváth, A., Hunyadi, J. and Schneider, I. (1998) *Bőrgyógyászat*. Eklektikon Kiadó és Nyomdai Szolgáltató Kft, Budapest.
- Dunford, R., Salinaro, A., Cai, L., Serpone, N., Horikoshi, S., Hidaka, H. and Knowland, J. (1997) Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients. *FEBS Lett.*, **418**, 87-90.
- Dussert, A.S., Gooris, E. and Hemmerle, J. (1997) Characterization of the mineral content of a physical sunscreen emulsion and its distribution onto human stratum corneum. *International Journal of Cosmetic Science*, **19**, 119-129.
- Earnshaw, A. (1999) Az elemek kémiája. Vol. III., pp. 1307-1317.
- Forslind, B. (1999) Biomedical applications of particle probes and X-ray analysis. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B*, **150**, 150-157.
- Gaspar, L.R. and Maia Campos, P.M. (2006) Evaluation of the photostability of different UV filter combinations in a sunscreen. *Int J Pharm.*, **307**, 123-128. Epub 2005 Nov 2011.
- Geiser, M., Rothen-Rutishauser, B., Kapp, N., Schurch, S., Kreyling, W., Schulz, H., Semmler, M., Im, H.V., Heyder, J. and Gehr, P. (2005) Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ.Health Perspect.*, **113**, 1555-1560.
- Genestra, M. (2007) Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal*, **19**, 1807-1819.
- Gontier, E., Barberet, P., Barbotteau, Y., Gáspár, K., Habchi, C., Hunyadi, J., Incerti, S., Kiss, B., Mavon, A., Moretto, P., Pouthier, T., Rosdy, M., Surlève-Bazeille, J.E. and Ynsa, M.D. (2006) Micro-PIXE characterization of different skin models. *X-Ray Spectrometry*, **34**, 381-388.
- Gutteridge, J.M. (1995) Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*, **41**, 1819-1828.
- Hakuno, M., Akiyama, M., Shimizu, H., Wheelock, M.J. and Nishikawa, T. (2001) Upregulation of P-cadherin expression in the lesional skin of pemphigus, Hailey-Hailey disease and Darier's disease. *J.Cutan.Pathol.*, **28**, 277-281.
- Hanifin, J.M. (2009) Evolving concepts of pathogenesis in atopic dermatitis and other eczemas. *J Invest Dermatol.*, **129**, 320-322. Epub 2008 Aug 2021.

- Hannun, Y.A. and Obeid, L.M. (1995) Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. *Trends Biochem Sci.*, **20**, 73-77.
- Harris, I.R., Farrell, A.M., Holleran, W.M., Jackson, S., Grunfeld, C., Elias, P.M. and Feingold, K.R. (1998) Parallel regulation of sterol regulatory element binding protein-2 and the enzymes of cholesterol and fatty acid synthesis but not ceramide synthesis in cultured human keratinocytes and murine epidermis. *J Lipid Res*, **39**, 412-422.
- Horkay, I. (2008) *Klinikai photodermatologia*. Medicina, Budapest.
- Hu, Z., Bonifas, J.M., Beech, J., Bench, G., Shigihara, T., Ogawa, H., Ikeda, S., Mauro, T. and Epstein, E.H., Jr. (2000) Mutations in ATP2C1, encoding a calcium pump, cause Hailey-Hailey disease. *Nat Genet.*, **24**, 61-65.
- Janjua, N.R., Mogensen, B., Andersson, A.M., Petersen, J.H., Henriksen, M., Skakkebaek, N.E. and Wulf, H.C. (2004) Systemic absorption of the sunscreens benzophenone-3, octyl-methoxycinnamate, and 3-(4-methyl-benzylidene) camphor after whole-body topical application and reproductive hormone levels in humans. *J Invest Dermatol.*, **123**, 57-61.
- Janossy, T., Vizler, C., Krizsa, J., Hunyadi, J., Kiss, M., Nyirati, I., Dobozy, A. and Vegh, P. (1994) Long-term survival and use of human skin xenografts in immunosuppressed mice. *Transplant.Proc.*, **26**, 1268-1270.
- Jarrett, A. (1980) *The Physiology and Pathophysiology of the Skin*. Academic Press Inc, London.
- Jungersted, J.M., Hellgren, L.I., Jemec, G.B. and Agner, T. (2008) Lipids and skin barrier function--a clinical perspective. *Contact Dermatitis.*, **58**, 255-262.
- Kertesz, Z., Szikszai, Z., Uzonyi, I., Simon, A. and Kiss, A.Z. (2005) Development of a bio-PIXE setup at the Debrecen scanning proton microprobe. *Nuclear Inst.and Methods in Physics Research, B*, **231**, 106-111.
- Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., Murakami, S., Uchida, Y. and Arihiro, K. (2006) Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death. *J.Pathol.*, **208**, 319-326.
- Kiss, B., Kertesz, Z., Szikszai, Z., Gontier, E., Moretto, P., Surlève-Bazeille, J.E., Kiss, A.Z. and Hunyadi, J. (2004) 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.
- Lautenschlager, S., Wulf, H.C. and Pittelkow, M.R. (2007) Photoprotection. *Lancet.*, **370**, 528-537.
- Lazar, J., Szabo, T., Kovacs, L., Blumberg, P.M. and Biro, T. (2003) Distinct features of recombinant rat vanilloid receptor-1 expressed in various expression systems. *Cell Mol.Life Sci.*, **60**, 2228-2240.
- Madison, K.C. (2003) Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *J.Invest Dermatol.*, **121**, 231-241.
- Mao-Qiang, M., Feingold, K.R. and Elias, P.M. (1993) Inhibition of cholesterol and sphingolipid synthesis causes paradoxical effects on permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol*, **101**, 185-190.
- Menzel, F., Reinert, T., Vogt, J. and Butz, T. (2006) Investigations of percutaneous uptake of ultrafine TiO₂ particles at the high energy ion nanoprobe LIPSION 2004. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, **219**, 82-86.
- Moretto, P., Surlève-Bazeille, J.E., Licu, D., Michelet, C. and Stoedzel, P. (1999) Microanalysis of the human skin structure: preliminary result. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, **158**, 386-392.
- Pantano, C., Reynaert, N.L., van der Vliet, A. and Janssen-Heininger, Y.M. (2006) Redox-

- sensitive kinases of the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Antioxid Redox Signal*, **8**, 1791-1806.
- Papp, H., Czifra, G., Bodo, E., Lazar, J., Kovacs, I., Aleksza, M., Juhasz, I., Acs, P., Sipka, S., Kovacs, L., Blumberg, P.M. and Biro, T. (2004) Opposite roles of protein kinase C isoforms in proliferation, differentiation, apoptosis, and tumorigenicity of human HaCaT keratinocytes. *Cell Mol.Life Sci.*, **61**, 1095-1105.
- Papp, H., Czifra, G., Lazar, J., Gonczi, M., Csernoch, L., Kovacs, L. and Biro, T. (2003) Protein kinase C isozymes regulate proliferation and high cell density-mediated differentiation in HaCaT keratinocytes. *Exp.Dermatol.*, **12**, 811-824.
- Pelicon, P., Simcic, J., Jaksic, M., Medunic, Z., Naab, F. and McDaniel, F.D. (2005) Spherical chamber - effective solution for multipurpose nuclear microprobe. *Nuclear Inst.and Methods in Physics Research, B*, **231**, 53-59.
- Pflucker, F., Hohenberg, H., Holzle, E., Will, T., Pfeiffer, S., Wepf, R., Diembeck, W., Wenck, H. and Gers-Barlag, H. (1999) The Outermost Stratum Corneum Layer is an Effective Barrier Against Dermal Uptake of Topically Applied Micronized Titanium Dioxide. *International Journal of Cosmetic Science*, **21**, 399-411.
- Pivarsci, A., Nagy, I. and Kemény, L. (2005) Innate immunity in the skin: how keratinocytes fight against pathogens. *Current Immunology Reviews*, **1**, 29-42.
- Rajta, I., Borbely-Kiss, I., Morik, G., Barthá, L., Koltay, E. and Kiss, A.Z. (1996) The new ATOMKI scanning proton microprobe. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, **109**, 148-153.
- Sharlow, E.R., Paine, C.S., Babiarz, L., Eisinger, M., Shapiro, S. and Seiberg, M. (2000) The protease-activated receptor-2 upregulates keratinocyte phagocytosis. *J Cell Sci*, **113** (Pt 17), 3093-3101.
- Silva, J. and Filipe, P. (2004) Localisation of titanium dioxide nanoparticles in human skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, Vol. 18, pp. 170-171.
- Simcic, J., Pelicon, P., Budnar, M. and Smit, Z. (2002) The performance of the Ljubljana ion microprobe. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, **190**, 283-286.
- Stege, H. (2001) Effect of xenogenic repair enzymes on photoimmunology and photocarcinogenesis. *J Photochem Photobiol B.*, **65**, 105-108.
- Stern, R.S., Weinstein, M.C. and Baker, S.G. (1986) Risk reduction for nonmelanoma skin cancer with childhood sunscreen use. *Arch Dermatol.*, **122**, 537-545.
- Szabó, G. and Borbely-Kiss, I. (1993) PIXYKLM computer package for PIXE analyses. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, **75**, 123-126.
- Tapper, U.A.S. and Malmqvist, K.G. (1991) Analysis, imaging, and modification of microscopic specimens with accelerator beams. *Analytical Chemistry*, Vol. 63, pp. 715-725.
- Taylor, C.R. and Sober, A.J. (1996) Sun exposure and skin disease. *Annu Rev Med.*, **47**, 181-191.
- Thieden, E., Philipsen, P.A., Sandby-Moller, J., Heydenreich, J. and Wulf, H.C. (2004) Proportion of lifetime UV dose received by children, teenagers and adults based on time-stamped personal dosimetry. *J Invest Dermatol.*, **123**, 1147-1150.
- Uzonyi, I. and Szabó, G. (2005) PIXEKLM-TPI - a software package for quantitative elemental imaging with nuclear microprobe. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, **231**, 156-161.
- Verissimo, A., Alves, L.C., Filipe, P., Silva, J.N., Silva, R., Ynsa, M.D., Gontier, E., Moretto, P.,

- Pallon, J. and Pinheiro, T. (2007) Nuclear microscopy: a tool for imaging elemental distribution and percutaneous absorption in vivo. *Microsc Res Tech.*, **70**, 302-309.
- Virag, L. and Szabo, C. (2002) The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev*, **54**, 375-429.
- Werner-Linde, Y., Pallon, J. and Forslind, B. (1998) Physiologically important trace elements of parapsoriasis skin. *Scanning Microscopy International*, **12**, 599-608.
- Westerdahl, J., Ingvar, C., Masback, A. and Olsson, H. (2000) Sunscreen use and malignant melanoma. *Int J Cancer.*, **87**, 145-150.
- Whitlock, N.V. and Bower, C. (2003) Targeting of desmoglein 1 in inherited and acquired skin diseases. *Clin.Exp.Dermatol.*, **28**, 410-415.
- Zouboulis, C.C., Seltmann, H., Neitzel, H. and Orfanos, C.E. (1999) Establishment and characterization of an immortalized human sebaceous gland cell line (SZ95). *J Invest Dermatol.*, **113**, 1011-1020.

XI. Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönetem szeretném kifejezni témavezetőmnek, Prof. Dr. Hunyadi Jánosnak segítségért, amit kutatómunkám ideje alatt és a disszertációm írásához nyújtott, illetve a lehetőséget arra, hogy a DE OEC Bőrgyógyászati Klinikán dolgozhassam. Köszönöm, hogy lehetővé tette, hogy a NANODERM projektben részt vegyek, valamint, hogy eredményeimet hazai és külföldi kongresszusokon is bemutathassam. Köszönöm értékes segítségét és támogatását pályázataimhoz.

Hasonlóan szeretném megköszönni, intézetvezetőmnek és korábbi témavezetőmnek, Dr. Remenyik Éva professzornőnek, hogy ötödéves hallgatóként megismertette és megszerette velem a bőrgyógyászatot és a laboratóriumi kutatómunkát. Horkay Irén professzornőnek köszönöm, hogy bevezetett a fotodermatológia szépségeibe.

Köszönettel tartozom Dr. Bíró Tamásnak a NANODERM projekt koordinálásáért és munkámhoz nyújtott önzetlen segítségéért, ötleteiért. Köszönet illeti kutatócsoportját, közülük is Dr. Czifra Gabriellát és Tóth I. Balázst a sejtes vizsgálatokban nyújtott segítségéért.

Édesapámnak, Prof. Dr. Kiss Árpádnak, az ATOMKI csoport vezetőjének köszönöm pótolhatatlan és értékes segítségét, tanácsait úgy a NANODERM munkacsoportban, mind az élet egyéb területein. Fizikus munkatársaimnak, Dr. Kertész Zsófiának, Dr. Szikszai Zitának szintén köszönettel tartozom az ionnyaláb analitikai mérésekért.

Dr. Gáspár Krisztiánnak, Dr. Juhász Istvánnak köszönöm az állatkísérletekhez nyújtott segítségét.

Köszönöm az összes NANODERM partnernek a közös munkát, főleg Tilman Butz, Tilo Reinert, Philippe Moretto, Jean-Etienne Surlève-Bazeille és Etienne Gontier együttműködéséért vagyok hálás.

A Bőrklinikáról köszönet illeti még Bostyán Ferencet és Herbályné Erzsikét a kísérletek technikai kivitelezésében nyújtott támogatásáért, Dr. Törőcsik Dánielnek a liofilizálóért. A Klinika összes dolgozójának köszönöm a türelmét.

Közvetlen barátaimnak, családomnak, édesanyámnak, férjemnek, Dr. Bai Péternek és kisfiamnak Lehelnek is szeretném megköszönni támogatásukat, tûrésüket munkámmal, építő kritikájukat disszertációmmal kapcsolatban és segítségüket a szöveg gondozása során.

X. Publikációs lista

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

B. Kiss, T. Biro, G. Czifra, B. I. Toth, Zs. Kertész, 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) polimerase (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. Kertész, 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

XI. Függelék (közlemények másolatai)