

OTDK dolgozat
36. Országos Tudományos Diákköri Konferencia
Biológia Szekció

**Titán-dioxid különböző kristályszerkezeti formáinak
hatása idegi sejtenyészetek életképességére**

Készítette:
Geiszelhardt Eszter
Biológus mesterszak 3. félév

ELTE TTK Biológiai Intézet, Élettani és Neurobiológiai Tanszék

Témavezetők:
Dr. Tárnok Krisztián
Dr. Schlett Katalin



ELTE
EÖTVÖS LORÁND
TUDOMÁNYEGYETEM

2023

Tartalomjegyzék

1	ÖSSZEFOGLALÁS	4
2	BEVEZETÉS.....	5
3	IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	7
3.1	A TITÁN-DIOXID KRISTÁLYSZERKEZETI FORMÁI	7
3.2	A TITÁN-DIOXID NANORÉSZECSKÉK KÖRNYEZETI KOCKÁZATAI	8
3.3	A TITÁN-DIOXID NANORÉSZECSKÉK SEJTBiolÓgiai KOCKÁZATAI	9
3.4	A NANOPARTIKULUMOK HATÁSA AZ IDEGRENDSZERRE	9
3.5	A TITÁN-DIOXID IDEGRENDSZERI HATÁSAINAK ELEMZÉSE <i>IN VIVO</i> ÉS <i>IN VITRO</i>	10
4	CÉLKITŰZÉS.....	12
5	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	13
5.1	LABORATÓRIUMI ÁLLATOK TARTÁSA ÉS FELHASZNÁLÁSA	13
5.2	SEJTKULTÚRÁK KÉSZÍTÉSE	13
5.2.1	<i>Kevert neuron és glia tenyészetek készítése</i>	<i>13</i>
5.2.2	<i>Tiszta neuron tenyészetek készítése</i>	<i>14</i>
5.2.3	<i>Tiszta glia tenyészetek kialakítása</i>	<i>14</i>
5.2.4	<i>Embrionális glia tenyészetek kialakítása.....</i>	<i>15</i>
5.2.5	<i>Mikroglia tenyészetek kialakítása</i>	<i>15</i>
5.3	TITÁN-DIOXID TÖRZSOLDAT KÉSZÍTÉSE ÉS ALKALMAZÁSA	15
5.4	ÉLETKÉPESSÉG MÉRÉS MTT MÓDSZERREL.....	16
5.5	ÉLETKÉPESSÉG MÉRÉS LDH MÓDSZERREL	16
5.6	IMMUNCITOKÉMIA ÉS MIKROSKÓPOS FELVÉTELEK KÉSZÍTÉSE	17
5.7	STATISZTIKA ÉS AZ ADATOK ÁBRÁZOLÁSA.....	18
6	EREDMÉNYEK.....	20
6.1	TiO ₂ NANORÉSZECSKÉK HATÁSA GLIA ÉS IDEGSEJTEK (KEVERT) PRIMER TENYÉSZETEIRE	20
6.2	TiO ₂ NANORÉSZECSKÉK HATÁSA EMBRIONÁLIS GLIA TENYÉSZETEKEN.....	22
6.3	TiO ₂ NANORÉSZECSKÉK HATÁSA POSZTNATÁLIS GLIA TENYÉSZETEKEN	23
6.3.1	<i>A nanorészecskék hatása az asztroglia sejtek sejtíváz szerkezetére</i>	<i>26</i>
6.4	TiO ₂ NANORÉSZECSKÉK HATÁSA MIKROGLIA SEJTEKEN.....	27
6.5	TISZTA NEURON TENYÉSZETEK	28
7	EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	30
8	DISZKUSSZIÓ.....	31
8.1	AZ ANATÁZ HATÁSA A KÜLÖNBÖZŐ SEJTTÍPUSOKRA	32
8.2	A RUTIL KRISTÁLYSZERKEZETŰ TiO ₂ A KÜLÖNBÖZŐ SEJTTÍPUSOKRA ELTÉRŐEN HAT	34
9	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	36
10	IRODALOMJEGYZÉK.....	36
11	SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS	39

Rövidítésjegyzék

BBB	vér-agy gát (blood brain barrier)
BSA	marha szérum albumin (bovine serum albumin)
DIV	<i>in vitro</i> tenyésztési napok száma (days <i>in vitro</i>)
ER	endoplazmatikus retikulum
FCS	fötális borjú szérum (foetal calf serum)
HDMEM	magas cukortartalmú Dulbecco's Modified Eagle tápfolyadék (high glucose)
LDH	laktát dehidrogenáz
MEM	Minimum Essential Medium tápfolyadék
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromid
NP	nanopartikulum
PBS	foszfát pufferelt sóoldat (phosphate buffered saline)
PLL	poli-L-lizin
ROS	reaktív oxidatív szabadgyökök (reactive oxidative species)
TiO ₂	titán-dioxid

1 Összefoglalás

A titán-dioxid széles körben alkalmazott kristályos anyag. Optikai tulajdonságai miatt pigmentként használatos, de nanorészecskéinek UV tartományban megfigyelhető fényszóró képességét kozmetikai készítményekben, például naptejekben is kihasználják. Mivel gyakran alkalmazott vegyületről van szó, környezeti terhelését, biológiai hatásait korábban már elemezték, különös tekintettel a TiO_2 nanorészecskék (6-100 nm) élettani hatásaira. Kristályszerkezeti formáinak egyedi hatásait ezzel szemben kevesen vizsgálták.

Kísérleteimben TiO_2 ásványok *anatáz* (gömb alak, szemcseméret: 6-8 nm) és *rutil* (pálcika alak, hosszúság: 80-100 nm, átmérő: 10-20 nm) nanorészecskéinek életképességre gyakorolt hatását négyféle sejt-összetételű primer idegi sejt kultúrán vizsgáltam. A csak idegsejteket, csak gliasejteket, ideg- és gliasejteket, valamint a csak mikroglia sejteket tartalmazó sejtenyészeteket a kétféle nanorészecskével különböző koncentrációkban (1-1000 $\mu\text{g/ml}$) 24 vagy 48 óráig kezeltem. Az életképességre gyakorolt hatást MTT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) redukción és LDH (laktát dehidrogenáz) aktivitás mérésen alapuló módszerek segítségével határoztam meg.

Eredményeim alapján az alkalmazott koncentrációtól és a kezelés idejétől függetlenül a csak idegsejteket, valamint a neuront és gliát vegyesen tartalmazó sejt kultúrák esetében sem az *anatáz*, sem pedig a *rutil* nanorészecskék nem csökkentették a sejtek életképességét. Az asztroglia tenyészeteken a *rutil* forma már 24 órás kezelésben, 10 $\mu\text{g/ml}$ koncentráció felett sejtpusztulást okozott, és hatása a koncentráció, illetve a kezelési idő emelésével potencírozható volt. Az *anatáz* forma esetén ugyanakkor az életképességre gyakorolt hatást nem tapasztaltam. A *rutil* forma a mikroglia sejtekre is sejtkárosító volt.

Vizsgálataim felhívják a figyelmet, hogy a nano-titán szemcséket *rutil* formában tartalmazó készítmények célzott kockázatot jelenthetnek a központi idegrendszer asztroglia és mikroglia sejtjeire.

2 Bevezetés

A titán-dioxid (TiO_2) a titán természetben is előforduló oxidja. Ásványként magmás kőzetekben és hidrotermális erekben fordul elő. Sokféle ipari célú felhasználása ismeretes, ezért az éves TiO_2 forgalom kb. 5-6 Mt közé tehető. Kinyerése, előállítása leginkább kloridos és szulfátos módszerrel történik. Előbbi esetben az ércet klórral és szénnel kezelik, így titán-tetrakloridot állítanak elő, melyet oxidálnak. A szulfátos módszernél az ilmenitet (vas tartalmú titánérc ásvány) kénsavval kezelik, hogy a vasat vas(II)-szulfát-pentahidrát formájában extrahálják. Mind a szulfát-, mind a klorideljárás során a titán-dioxid pigmentet természetben is előforduló, rutil kristályformájában állítják elő, de a szulfáteljárás beállítható az anatáz forma előállítására is ¹.

A világ titán-dioxid termelésének mintegy 80%-át a festékekben, lakkokban, műanyagokban és papírokból található pigmentek (pl. titán-fehér) előállítására használják. További 8%-ot más pigment alkalmazások (pl. nyomdafesték, gumi) tesznek ki. A TiO_2 emellett megtalálható élelmiszerekben is, valamint fényszóró képességének köszönhetően naptejekben, kozmetikumokban is alkalmazzák (Racovita, 2022). A felhasználási területtől függetlenül a polimorf titán-dioxid ásványok nanopartikulumok formájában is előfordulhatnak, amelyeket méretük alapján kategorizálhatunk. Az ultrafinom részecskék mérete kisebb, mint 100 nm, míg a finom részecskék a 0,1-3 μm -es tartományba esnek (Baranowska-wójcik és mtsai., 2020).

Bár 2006-ig a TiO_2 *egészségre ártalmatlan* anyagként volt nyilvántartva (Kischkewitz, 2006), egyre több vizsgálat irányult a nanopartikulumainak emberi egészségre gyakorolt hatására. Tanulmányok bizonyították², hogy a testbe jutott TiO_2 számos problémát okozhat, köztük gyulladást vagy sejthalált, valamint az immunrendszerre és az idegrendszerre is hatással lehet (Rashid és mtsai., 2021). A TiO_2 nanorészecskék a szervezetbe főleg belélegzés útján kerülhetnek be, majd a tüdőből a vérkeringéssel a test különböző területeire eljuthatnak. Mivel a TiO_2 -t korábban széles körben alkalmazták élelmiszerekben, mint táplálék kiegészítőt, szájon keresztül is bejuthatott az emberi szervezetbe. Potenciális egészségkárosító hatásai miatt mára az Egyesült Államokban betiltották azokat az élelmiszereket, amelyek a termék súlyához viszonyítva több, mint 1%-ban tartalmazznak TiO_2 -t (Baranowska-wójcik és mtsai., 2020), az Európai Unió pedig 2022. januárjától tiltotta be a TiO_2 (E 171) használatát az élelmiszerekben³.

¹ <https://www.essentialchemicalindustry.org/chemicals/titanium-dioxide.html>

² [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/869#section=Human-Toxicity-Excerpts-\(Complete\)](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/869#section=Human-Toxicity-Excerpts-(Complete))

³ COMMISSION REGULATION (EU) 2022/63, 14 January 2022

A nanopartikulumok azonban nemcsak közvetlenül lehetnek ártalmasak az emberi egészségre, hanem ökotoxikológiai⁴ kockázati tényezőt is jelentenek. A TiO_2 ugyanis megtalálható a talajban, ahol a talajban élő mikroorganizmusokat vagy közvetlenül a növényeket károsíthatja. A talajból a növények felvehetik a TiO_2 -t, ami felhalmozódhat később a növények különböző részeiben. A TiO_2 a vizek élővilágára is hatással lehet, mivel a tengerekbe kerülve veszélyeztetheti pl. a fitoplanktont, amely a táplálékláncok alapját adja ezen vízi életközösségekben (Rashid és mtsai., 2021).

A kockázatok feltárása szempontjából a TiO_2 nanopartikulumok hatásainak széleskörű környezettudományi elemzésére ezért mindenképpen szükség van. Dolgozatomban ennek egy szeletével, a titán-dioxid nanopartikulumok emlős központi idegrendszer sejtjeire *in vitro* kifejtett, akut toxicitásával foglalkozom.

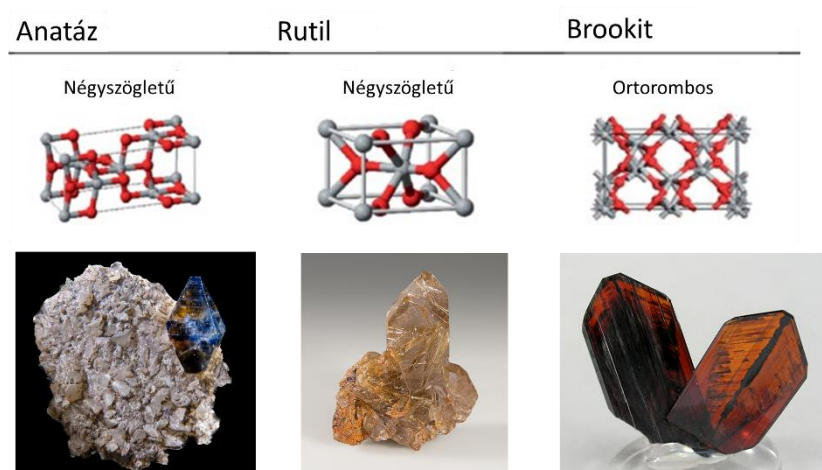
⁴ ökotoxikológiának nevezzük, amikor egy anyag az élő organizmusokra hat azáltal, hogy megváltoztatja anyagcseréjüket, fiziológiai változásokat idéz elő.

3 Irodalmi áttekintés

3.1 A titán-dioxid kristályszerkezeti formái

A titán-dioxid különböző kristályszerkezeti formákban fordul elő. Ezek közül a leggyakoribb az anatóz, a brookit és a rutil. A szerkezetek kristályrácsa oktaéder konformációjú, amelyben hat oxigén anion kapcsolódik három darab titán-ionhoz (kation), így az anyag képlete $\text{TiO}_{6/3}$, amely egyszerűsítve kiadja a TiO_2 képletet (Racovita, 2022). A rutil a legstabilabb forma, míg az anatóz és brookit metastabilak, bizonyos körülmények között átalakulnak a stabilabb rutil formává. A brookit állapot a leginstabilabb mindhárom állapot közül, ezt a formát a legnehezebb mesterségesen előállítani (Racovita, 2022).

A kristályformák különböző tulajdonságainak hátterében a kristályrácsok eltérő szerkezete áll (1. ábra). A rutil oktaéder szerkezetében az oktaéderek TiO_6 láncokat alkotnak. Ezek a láncok úgy alakulnak ki, hogy az oktaéderek egymással szemben lévő éle közös. A láncok között ún. sarokkapcsolatok alakulnak ki, a kristályszerkezet négyszögletű. A rutillal ellentétben az anatózban nem alakulnak ki sarokkapcsolatok, oktaéderenként négy sarka van. Kristályszerkezete bár négyszögletű, úgy alakul ki, hogy az oktaéder cikkcakkos láncai kapcsolódnak egymáshoz. A brookitnak ortorombos szerkezete van, amely úgy jön létre, hogy az oktaédereknek közös az éle és a sarka, ez adja ki a rombold struktúrát (Allen és mtsai., 2018).



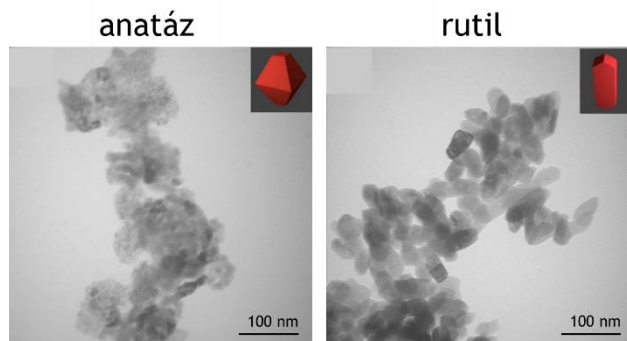
1. ábra. A titán-dioxid különböző izoformái. Felül a szerkezet látható, alul pedig a természetben előforduló kristály (képek forrása^{5 6})

A titán-dioxid kristályok nanorészecskék formájában is előfordulhatnak, az iparban elsődlegesen ilyen méretben használják fel. A nanorészecskék mérettartománya általában 100 nm-től 500 nm-ig terjed, az ultrafinom részecskék átlagos mérettartománya 10-50 nm közötti.

⁵ Képek forrása: <https://en.wikipedia.org/wiki/Anatase>; <https://en.wikipedia.org/wiki/Brookite>; https://hu.m.wikipedia.org/wiki/F%C3%A1jl:Quartz_a_rutile.jpg

⁶https://www.researchgate.net/figure/Properties-of-anatase-rutile-and-brookite_tbl1_310382540

Ilyen kis méretben a TiO_2 részecskéket speciális anyagokként, például fotokatalizátorokként is hasznosítják (Peters és mtsai., 2014). Nanorészecskék formájában az anatáz gömbölyded alakú, míg a rutil pálcika alakra emlékeztet (2. ábra) (Natarajan és mtsai., 2015).



2. ábra. Anatáz és rutil nanorészecskék szerkezete. A képek transzmissziós elektron-mikroszkóppal készültek. Az anatáz forma gömbölyded alakú (bal kép), a jobb oldali képen a rutil forma inkább pálcikára emlékeztet (Natarajan és mtsai., 2015 nyomán) mércé: 100 nm

3.2 A titán-dioxid nanorészecskék környezeti kockázatai

A titán-dioxid nanorészecskék felülete nagy, ezért igen reaktívak. A környezetbe jutva különböző módon hathatnak az élőlényekre: megváltoztathatnak biokémiai reakciókat, fiziológiai változásokat idézhetnek elő vagy a sejtek közötti kapcsolatokra is hatással lehetnek (Rashid és mtsai., 2021).

A titán-dioxid nanorészecskék talajba jutva megváltoztathatják például a pH-t, ezen keresztül pedig hatással lehetnek a talajban található mikroorganizmusokra, befolyásolva osztódásukat, anyagcseréjüket. A magas TiO_2 koncentrációról (1 mg/ml) ismert, hogy befolyásolja a baktériumok nitrogén-anyagcseréjét, csökkenti az anyagcserében fontos enzimek aktivitását és megváltoztatja a génexpressziót. Ennek következtében csökken a nitrogén megkötés és a metán oxidációja, mely megváltoztathatja a fehérjék lebontását is (Rashid és mtsai., 2021). A növényekre szintén negatívan hat a TiO_2 . A kisebb, 30 nm alatti nanorészecskéket ugyanis felvehetik a növények, ezek viszont eltömhetik az anyagszállításhoz szükséges struktúrákat. A nanorészecskék kis méretükből kifolyólag, a gyökértől egészen a levelekig szállíthatódnak, ahol felhalmozódhatnak. A titán-dioxid részecskék fotoaktívak, így befolyásolhatják a növények fotoszintézisét, de a génátírásba is beleavatkozhatnak. Mivel hatással vannak a baktériumokra is, bizonyos növényeket azzal is befolyásolhatnak, hogy a növény számára fontos baktériumokra hatnak (Rashid és mtsai., 2021).

A TiO_2 nanorészecskék az élővizekbe is bejuthatnak, és pl. a fitoplanktonra, a tengervízi életközösségek alappilléreire is hatással lehetnek. Kötődhetnek a sejtek felszínéhez (így felhalmozódhatnak a táplálékláncban), de reaktív oxigén gyökök (ROS) keletkezéséhez is vezetve növelhetik az oxidatív stressz kockázatát (Rashid és mtsai., 2021). Toxicitásuk nagyban függ a részecskemérettől, koncentrációtól és a kitettség idejétől is (Rashid és mtsai., 2021).

A titán-dioxid nanoszemcsék az emberi szervezetbe főleg belélegzés útján jutnak be, de mivel élelmiszerekben is előfordultak, a bejutás a szájon keresztül is előfordulhat, vagy a bélcsatornából is felszívódhatnak. Innen a vérkeringés segítségével tovább juthatnak a szervezetbe, például a szívbe, a vesékbe, a lépbe (Baranowska-wójcik és mtsai., 2020). Egyes tanulmányok azt találták, hogy a vérben a titán-dioxid hatására gyulladásos faktorok, mint például a TNF- α (tumor nekrosis faktor- α) vagy az IL-8 (interleukin-8) jelennek meg, ezek pedig a keringési rendszer rendellenességeihez vezethetnek (Baranowska-wójcik és mtsai., 2020), de a Crohn-betegséggel is összefüggésbe hozták a TiO₂-t (Weir és mtsai., 2012).

3.3 A titán-dioxid nanorészecskék sejtbioológiai kockázatai

Számos *in vitro* vizsgálat támasztja alá a titán-dioxid sejtbioológiai kockázatait. Ilyen megfigyelt káros hatás például a túlzott ROS (reaktív oxigén gyök) képzés. Normál esetben a reaktív gyököket az antioxidánsok megkötik. Stressz hatására azonban, mint például a TiO₂-nak való kitettség, a ROS mennyisége nem lesz egyensúlyban az antioxidánsok mennyiségével, ez pedig ún. oxidatív stresszhez vezet, valamint a lipidek peroxidációját is okozhatja. Ilyen hatások következtében a sejtmembrán integritása romlik, átjárhatóvá válik, ez pedig lehetőséget ad arra, hogy a nanorészecskék bejuthassanak a sejt belsejébe. Ugyanakkor a sejt a nanorészecskéket endocitózissal is felveheti (Rashid és mtsai., 2021).

A sejtorganellumokban is változások következhetnek be a TiO₂ hatására. Az endoplazmatikus retikulum (ER) a nanorészecskék okozta stressz következtében megnagyobbodhat. További hatás lehet az intracelluláris Ca⁺⁺-szint növekedése, de a mitokondriumok is érintetté válhatnak, belső membránpotenciáljuk csökkenthet, mely kihathat az ATP képződésére is. Az is lehetséges, hogy a mitokondrium és az ER által irányított szignalizációs útvonalak aktiválódásának hatására apoptikus folyamatok indulnak el (Czajka és mtsai., 2015).

3.4 A nanopartikulumok hatása az idegrendszerre

A TiO₂ nanorészecskék az agyat elsősorban a keringésen keresztül, a vér-agy gáton átlépve érik el. A keringésbe belégzéssel, illetve a bőrön átdiffundálva vagy a bélrendszerből felszívódva léphetnek be, de elérhetik az agyat a szaglóhámon keresztül is. A fejlődő magzatra is hatással lehetnek, valószínűleg a placentán is képesek átjutni (D'Errico és mtsai., 2022).

A vér-agy gát feladata, hogy specifikus és szigorúan szabályozott anyagforgalmat biztosítson a vér és a központi idegrendszer között, megvédve annak homeosztázisát. A nanopartikulumok azonban, kis méretükből adódóan, képesek átdiffundálni ezen a

határfelületen, ezzel meg tudják változtatni a vér-agy gát áteresztőképességét is. Ennek oka, hogy a vér-agy gát integritásának kialakításáért felelős molekulák szintjét, mint például a P-glikoprotein vagy a claudin, lecsökkentik. Különböző gyulladásos faktorok (pl. TNF- β) megnövekedett expresszióját is észrevették jelenlétükben, ami szintén a permeabilitás növekedéséhez vezethet. Következésképpen gyulladás, ödéma és sejthalál is kialakulhat (Song és mtsai., 2015).

A nanorészecskék az agyban súlyos károsodásokat okozhatnak. A más sejtípusokban is megfigyelt hatásokhoz hasonlóan megnövekedett ROS szinthez vezethetnek, ami a mitokondriumok, valamint az endoplazmatikus retikulum károsodását okozhatja. Neurotranszmitter szintekre is hathatnak: csökkenthetik a glutamát mennyiségét, de ugyanakkor az acetyl-kolin mennyiségét növelhetik, mivel csökkentik az azt lebontó acetyl-kolin-észteráz aktivitását (Ma és mtsai., 2010). Egyes kutatások kimutatták, hogy a nanorészecskék a dopaminerg neuronokat is károsíthatják, a noradrenalin, valamint a szerotonin rendszerre azonban nincsenek hatással. A TiO₂ hatására a mikroglia aktivitás is megnőhet az agyban, ami gyulladást és neurodegenerációt is okozhat (Zeman és mtsai., 2018).

A részecskék az agyban fel is halmozódhatnak, például a hippocampusban, mely elsősorban a memória kialakulásáért, a tanulási folyamatokért felelős. Memóriára gyakorolt hatása miatt a titán-dioxid nanorészecskéket neurodegeneratív betegségekkel, például az Alzheimer-kórral is összefüggésbe hozták (Song és mtsai., 2015).

A felnőtt agy mellett a fejlődő embrionális idegszövet is érintett lehet, mivel a titán-dioxid képes lehet átmenni a placentán. Egérben és patkányban végzett kísérletek kimutatták, hogy az anya testében megtalálható titán-dioxid nanorészecskék szintén megtalálhatóak voltak a fejlődő embriók agyában, ahol sejtpusztulást okoztak. Ezek alapján elképzelhető, hogy a fejlődő magzatban kialakult és a fejlődéssel összefüggő neurológiai kórképek kialakulásában, mint például a depresszió, az autizmus vagy a skizofrénia, szintén szerepet játszhat a nano TiO₂ részecskék hatása (Song és mtsai., 2015).

3.5 A titán-dioxid idegrendszeri hatásainak elemzése *in vivo* és *in vitro*

A titán-dioxid nanorészecskék idegrendszeri hatásait több szinten is, *in vitro* és *in vivo* is tanulmányozhatjuk. Az *in vivo* kísérletekben az állatokba különböző módokon juttatták be a TiO₂ részecskéket. Ez történhetett inhalálás útján vagy direkt injekciókkal (Hong és mtsai., 2017).

Több, állatmodelleket alkalmazó kutatás is igazolta, hogy a TiO₂ nanorészecskék hatnak a különböző szervrendszerekre. A tüdőben például módosíthatják a sejtciklust, sejthalálhoz

vezethetnek, gyulladásos faktorokat aktiválnak, ezek pedig a tüdőszövet károsodását okozzák. Kimutatták azt is, hogy képesek felhalmozódni például a lépben, a vesében, a májban, de még a szívben, az érrendszerben és az agyban is (Hong és mtsai., 2017).

A titán-dioxid nanorészecskék a fejlődő magzatokra is hatással lehetnek. Egy kísérletben vemhes patkányokat minden nap 100 mg/kg mennyiségű anatáz formával etettek. Kiderült, hogy a TiO_2 részecskék megtalálhatók voltak az újszülött patkányok agyában, a hippocampális régióban is. A későbbi memória tesztek elvégzésekor pedig azok az egyedek, amelyek titán-dioxiddal etetett anyától származtak, szignifikánsan rosszabbul teljesítettek, mint azok, amelyeknek az anyja nem kapott TiO_2 -t (Mohammadipour és mtsai., 2014).

Az *in vitro* kísérletek során az idegrendszer különböző sejtípusainak túlélését vizsgálták titán-dioxid kezelésekre hatására. Az *in vitro* modellrendszerekben ellenőrzött körülmények között, a felszívódást és a határfelületeken történő átjutást kiküszöbölve, célzottan lehet vizsgálni a toxinok különböző sejtípusokra kifejtett hatását. A legtöbb titán-dioxiddal kapcsolatos *in vitro* kísérletet humán vagy patkány sejtvonalakon végezték. A kísérletekben általában életképességi tesztekkel vizsgálták a titán-dioxiddal történt kezelés hatását. Ezek a kezelések legtöbbször 24 órán és 48 órán át tartottak (Papp és mtsai., 2020), (Hong és mtsai., 2015), de előfordultak 6, 12, illetve 72 órás vizsgálatok is (Mu és mtsai., 2020), (Liu és mtsai., 2013).

A sejtvonalak mellett embrionális vagy újszülött rágcsáló idegrendszerből izolált, ún. primer sejtenyészetekben is vizsgálták már a TiO_2 nanorészecskék hatását. Ezekben a sejtmódellekben a vizsgált sejtféleséget közvetlenül a szövetből nyerik, így tulajdonságaiban közel áll eredeti forrásához. Sheng és munkatársai például arra az eredményre jutottak, hogy az anatáz és rutil elegyének életképesség csökkentő hatása van patkány primer hippocampális sejteken, 24 és 48 órás kezeléseket után (Sheng és mtsai., 2015).

Mások patkány primer asztrocita sejteken végzett kísérletekben az anatáz hatását elemezték. Bár a nanorészecske jelenléte az életképesség csökkenését 24 óra után kiváltotta, érdekes módon a glia sejtkultúrákban az életképesség csökkenése ellenére apoptózis és nekrosis sem volt megfigyelhető (Papp és mtsai., 2020).

A titán-dioxid hatását nemcsak patkány, de humán sejteken is elemezték (Coccini és mtsai., 2015). Humán glia és neuron sejtvonalakon az anatáz forma hatását vizsgálták. Ezekben a kísérletekben a sejteket 4, 24 és 48 órás, illetve 7-10 napos, hosszútávú kezeléseket tették ki. Eredményeik arra mutatnak, hogy az idegrendszer egyes sejtípusait eltérő mértékben érintheti a titán-dioxid nanorészecskék jelenléte: a neurális sejtvonalak (SH-SY5Y) a glia

sejteknel (D384) érzékenyebbnek bizonyultak, és a hatás a kezelés időtartamával összhangban növelhető volt.

4 Célkitűzés

Az irodalomban talált adatok szerint a korábbi kutatások a TiO_2 nanorészecskék hatásait általában az anatáz és a rutil formák elegyeivel vizsgálták, kevés kísérletben elemezték a kristályformák hatásait külön-külön. Kísérleteimben arra a kérdésre kerestem választ, hogy a különböző kristályszerkezetű nanopartikulumok az idegrendszer főbb sejttypusainak *in vitro* túlélését hogyan befolyásolják.

TDK munkám során célul tűztem ki:

- a vegyesen neuronokat és glia sejteket tartalmazó tenyészeteken (kevert tenyészetek) a különböző kristályszerkezeti formák koncentráció-függő hatásának vizsgálatát a sejtek életképességre. Ez a tenyészet típus modellezi legjobban az idegszövetet, ugyanis tartalmazza az idegszövetet alkotó főbb sejttypusokat.
- tisztán (i) asztroglia, (ii) mikroglia, és (iii) idegsejt tenyészetek felhasználásával az adott sejttypusok érzékenységeinek vizsgálatát a különböző kristályszerkezeti formákra. Az adatok alapján célom volt annak kiderítése, hogy melyik sejttypus a legérzékenyebb ezekre a részecskékre.
- annak vizsgálatát, hogy a kezelési idő hossza (24 vagy 48 óra) a nanorészecskék életképességre gyakorolt hatását befolyásolja-e.

5 Anyagok és módszerek

5.1 Laboratóriumi állatok tartása és felhasználása

A kísérletekhez CD1-es, vad típusú egereket használtam fel sejtdonorként. Az állatokat 22 °C-on, 12 órás sötét / világos megvilágítás mellett tartottuk. Vizet és élelmet korlátlan mennyiségben biztosítottunk számukra. Minden elvégzett állatkísérletnél betartottuk a vonatkozó helyi és EU-s jogszabályokat, irányelveket és előírásokat.

5.2 Sejtkultúrák készítése

Vizsgálataimat különböző típusú primer idegi sejtenyészeteken végeztem. Készítettem (i) kevert tenyészeteket, melyek neuronokat és glia sejteket egyaránt tartalmaztak, valamint tisztán (ii) neuronokat, (iii) posztnatális glia sejteket, (iv) embrionális glia sejteket és (v) mikroglia sejteket tartalmazó tenyészeteket is (lásd a továbbiakban).

5.2.1 Kevert neuron és glia tenyészetek készítése

A kevert tenyészeteket 14-14,5 napos egér embriókból nyertem, a laboratóriumunk által korábban közölt protokoll szerint (Tárnok és mtsai., 2008). Steril körülmények között kiemelttem az állatok agyát, az agyhártyák eltávolítása után leválasztottam és feldaraboltam a kortexeket, majd a kéregdarabokat 0,5 mg/ml koncentrációjú tripszin-EDTA (Thermo Scientific) oldatban 37 °C-on, 15 percig emésztettem. Az emésztést főtális borjú szérummal (FCS, PAN-BioTech) állítottam le. A szövetdarabokból az egyedi sejteket triturálással szabadítottam ki, ehhez 5% FCS tartalmú Neurobasal plus tápfolyadékot (Neurobasal, 2% B27, 0,5 mM Glutamax, 5% FCS, 40 µg/ml gentamycin, 2,5 µg/ml amphotericinB, Thermo Scientific) használtam fel, és a folyamatot a homogén sejtuszpenzió kialakításáig folytattam. A sejteket poli-L-lizinnel (Sigma) felszínkezelte 96 lukú szövettenyésztő tálcákba (Greiner) ültettem ki, $8 \cdot 10^4$ db sejt/lyuk mennyiségben.

A kortikális, kevert tenyészeteken a kiültetést követő első nap (days in vitro, DIV1) teljes tápcserét végeztem 5% FCS tartalmú Neurobasal plus tápfolyadékkal (Neurobasal, 2% B27, 0,5 mM Glutamax, 5% FCS, 40 µg/ml gentamycin, 2,5 µg/ml amphotericinB, Thermo Scientific). A tenyésztés 4. napján (DIV4) a tenyészetek tápfolyadékának felét friss, de FCS-t már nem tartalmazó tápfolyadékkal cseréltem (Neurobasal, 2% B27, 0,5 mM Glutamax, 40 µg/ml gentamycin, 2,5 µg/ml amphotericinB, Thermo Scientific). A kortikális, kevert tenyészeteken titán-dioxid kezelést a tenyésztés 7. napján (DIV7) végeztem el (részletek a szövegben).

5.2.2 Tiszta neuron tenyészetek készítése

A tisztán idegsejteket tartalmazó tenyészeteket a kevert tenyészetekhez hasonló módon állítottam elő (Liliom és mtsai., 2017), ugyanakkor a sejteket már DIV1 kortól FCS-mentes tápfolyadékban (Neurobasal, 2% B27, 0,5 mM Glutamax, 40 µg/ml gentamycin, 2,5 µg/ml amphotericinB, Thermo Scientific) neveltem. A glia sejtek osztódásának megakadályozására 10 µM CAR (citozin-arabino-furanozid) kezelést is alkalmaztam. Mivel a glia sejtek által termelt faktorok alapvetően szükségesek az idegsejtek megfelelő fejlődéséhez, a kiültetés 4. napján (DIV4) a tápfolyadék felét FCS mentes Neurobasal plus (lásd fent) és tiszta glia tenyészetéről kinyert, kondicionált tápfolyadék 1:1 arányú keverékével végeztem el. (A kondicionált tápfolyadék elkészítéséhez a glia sejteket tartalmazó Petri-csészére 2 nappal a felhasználás előtt FCS mentes Neurobasal plus tápfolyadékot raktam). A tiszta neuron tenyészeteket is a tenyésztés 7. napján (DIV7) kezeltem titán-dioxid nanorészecskékkel.

5.2.3 Tiszta glia tenyészetek kialakítása

A primer glia sejtenyészeteket 1-3 napos (P1-P3) újszülött CD1 egerekből, a laboratóriumunkban alkalmazott protokoll szerint készítettem (Tárnok és mtsai., 2010). Az állatok agyát kisedtem, eltávolítottam az agyhártyákat, valamint a kisagyat és a szaglógumókat, majd a féltekéket feldaraboltam és 0,05% DNáz (Sigma) tartalmú tripszin-EDTA oldatban (0,5 mg/ml, Thermo Scientific) 15 percig 37 °C hőmérsékleten inkubáltam. Az emésztést FCS-sel (PAN-BioTech) állítottam le, majd triturálással 10% FCS tartalmú HDMEM (high glucose essential media, Sigma) tápfolyadékban egysejt-szuszpenziót készítettem. A sejteket másfél agy / Petri-csésze mennyiségben poli-L-lizinnel (Sigma) felszínkezelte, 10 cm átmérőjű Petri-csészékbe raktam ki.

A tenyészeteket 10% FCS tartalmú HDMEM tápoldatban (high glucose DMEM, 10% FCS, 40 µg/ml gentamycin, 2,5 µg/ml amphotericinB, Sigma) 37 °C-on, 5% CO₂ atmoszféra mellett szövettenyésztő inkubátorban neveltem. A primer tenyészeteken 4 naponta 10% FCS-HDMEM tápoldattal teljes tápcserét végeztem. Amikor az aljzatra letapadt sejtek teljesen konfluenssé váltak, akkor a sejteket PBS-es mosás után PBS-ben oldott tripszin enzimmel learattam, majd a sejtmennyiséget négyfele osztva új, poli-L-lizinnel kezelt Petri-csészékbe ültettem át. A kezelések előtt a tenyészetek maximum kétszer lettek átültetve. A titán-dioxid kezelésekhez a sejteket poli-L-lizinnel bevont 96 lyukú szövettenyésztő tálcába ültettem, $2,5 \cdot 10^4$ darab sejt/lyuk sejtsűrűségben. A kezeléseket a kiültetést követő 2. napon végeztem el.

5.2.4 Embrionális glia tenyészetek kialakítása

A 16 napos (E16) egér embriókból nyert embrionális glia tenyészeteket laboratóriumunk munkatársa, Dr. Bencsik Norbert állította elő. Az agyhártyáktól megtisztított kéregből kimetszettük a hippocampus területét, melyből a sejteket 0,05% DNáz (Sigma) tartalmú tripszin-EDTA oldattal (0,5 mg/ml, Thermo Scientific) történt emésztést (15 perc, 37°C) követően triturálással izoláltuk, majd poli-L-lizinnel felszínkezelt, 10 cm-es Petri-csészékbe raktuk ki. A tenyészetek fenntartása a posztnatális glia tenyészetekkel azonos módon történt. A kezelésekhöz a sejteket poli-L-lizinnel (Sigma) bevont 96 lyukú szövettenyésztő tálcába ültettem, $2,5 \cdot 10^4$ darab sejt/lyuk sejtsűrűségben. A kezeléseket a kiültetést követő 2. napon végeztem el.

5.2.5 Mikroglia tenyészetek kialakítása

A mikroglia tenyészeteket ugyanazzal a módszerrel állítottam elő, mint a primer glia tenyészeteket. A különbség annyi volt, hogy miután a glia sejtek teljesen benőtték a Petri-csésze felszínét, nem ültettem át a tenyészeteket, így 1-2 hét elteltével az asztroglia sejtek felszínén mikroglia sejtek is megjelentek. Miután a mikroglia sejtek száma elérte a megfelelő mennyiséget, a mikroglia sejteket HDMEM-mel (high glucose DMEM, 10% FCS, 40 µg/ml gentamycin, 2,5 µg/ml amphotericinB, Sigma) lemostam az asztroglia sejtek felszínéről. A lemosott sejteket 96-os, poli-L-lizinnel (Sigma) felszínkezelt plate-re, $2,5 \cdot 10^4$ sejt/lyuk sejtszámmal ültettem ki. A mikroglia sejteket egy nappal szövettenyésztő tálcára ültetésük után kezeltem.

5.3 Titán-dioxid törzsoldat készítése és alkalmazása

Kísérleteim során kétfajta nano titán-dioxid vizes diszperziót használtam. Az anatóz kristályforma diszperziójában 5,5 tömeg%-os, gömb alakú TiO_2 részecskék (szemcseméret 6-8 nm), míg a rutil kristályformát tartalmazó diszperzióban pálcika alakú részecskék (hosszúság: 80-100 nm, átmérő: 10-20 nm) találhatóak, 13,17 tömeg% TiO_2 tartalom mellett. A diszperziókat Dr. Tóth Erika (ELTE Mikrobiológiai Tanszék) bocsátotta rendelkezésünkre.

A diszperziókból először 10 mg/ml-es törzsoldatot készítettem, oldószerként desztillált vizet, foszfát pufferelt sóoldatot (PBS), valamint Neurobasal plus (Thermo Scientific) tápfolyadékot is használtam. A törzsoldatok készítése során a vizes diszperziót legalább fél órán keresztül szonikáltam (50W). Az oldószerek között nem tapasztaltam eltérést, a titán-dioxid ugyanolyan mértékben keveredett el mindegyik diszpergáló közegben. Kísérleteim során a

neuront is tartalmazó tenyészeteken a Neurobasal plus (Thermo scientific) tápfolyadékba beoldott anatózt és rutilt használtam, míg a glia / mikroglia tenyészeteknél a PBS-be beoldott formát alkalmaztam. Kezelések előtt a törzsoldatokat 30 percig szonikáltam (50W). Mind az anatóz, mind a rutil hatását 1-1000 µg/ml koncentráció tartományban, 24 és 48 órás kezelések mellett vizsgáltam. Neuronális tenyészetek esetén a hígításokat a sejtkultúrák saját tápfolyadékában, egyéb tenyészetek esetén (a tenyésztés leírásánál megadott) friss tápfolyadékban végeztem el. Kontrollként a diszpergáló közeget (tápfolyadék, illetve PBS) alkalmaztam.

5.4 Életképesség mérés MTT módszerrel

A titán-dioxid citotoxikus hatását MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid, Sigma) életképesség mérésekkel elemeztem. Az eljárás során a sejtek által felvett MTT-t a NAD(P)H enzim kék formazán kristállyá redukálja, mely feloldás után fotometrálnak. A keletkezett formazán mennyisége a sejtek redukáló állapotával, valamint az életképes sejtek számával arányos.

A mérés során a 96 lukú szövettenyésztő tálca lukjaihoz 200 µg/ml végkoncentrációban MTT-t adtam, majd a lemezeket 20-35 percig, 37 °C-on szövettenyésztő inkubátorban tartottam. A kristálynövekedés mértékét mikroszkóppal ellenőriztem, majd a formazán kristályokat savas izopropil alkohol hozzáadásával feloldottam. A kapott oldatok optikai denzitását (OD) Multiscan EX spektrofotométerrel (Thermo) 570 nm-es hullámhosszon, 620 nm-es referencia hullámhossz mellett detektáltam. Mivel a titán-dioxid részecskék interferálhatnak a spektrofotometriás mérésekkel, minden alkalmazott titán-dioxid koncentráció esetén a kezelést elvégeztem sejtmentes lukakon is. Ezek OD háttér értékeit a sejteket tartalmazó tenyésztő lemez lukaiban mért értékekből levontam. A kapott adatokat a kontroll, nanorészecskéket nem, csak az oldószert kapott lyukak adatainak százalékában adtam meg (életképesség %)⁷.

5.5 Életképesség mérés LDH módszerrel

A kezelések citotoxicitásának meghatározására egy másik módszert, az LDH (laktát dehidrogenáz) enzimaktivitás mérést is felhasználtam (CyQuant LDH Cytotoxicity Assay, C20300). Ez az enzim szerepet játszik a sejt normál anyagcseréjében, a laktát átalakulását segíti piruváttá. Amennyiben a kezelések hatására a sejt elpusztul, az enzim kiszabadul belőle. A

⁷ Dolgozatomban az MTT mérés eredményeire „életképesség”-változásként hivatkozom

tenyészetek tápfolyadékából fotometriás módszerrel mérhető LDH enzimaktivitás alapján pedig a felszabadult enzim mennyiségére, így az elpusztult sejtek arányának változására következtethetünk⁸.

Az LDH mérések során a kezelések mellett több kontrollt is alkalmaznom kellett. Az egyik kontroll a maximális LDH szint meghatározására szolgált. Ehhez a sejteket a gyártó leírása alapján lizáltam, majd a lizált tenyészetek tápfolyadékából adott mennyiséget összegyűjtöttem. Sejtek nélküli kontrollokat is alkalmaztam, amelyeken megmértem a szérumot tartalmazó táp (HDMEM+ 10% FCS), valamint a szérummentes táp LDH aktivitását (HDMEM). A kontroll, csak oldószerrel kezelt tenyészetekből a sejtek spontán LDH felszabadítását mértem meg. A reakció ellenőrzéséhez sejtmmentes, de LDH-t tartalmazó pozitív kontrollt is alkalmaztam.

Az összegyűjtött felülúszók azonos mennyiségét (50 µL) egy új mikrotiter lemezbe pipettáztam, majd a gyártó útmutatója alapján kezeltem (reagens hozzáadása, 30 perc inkubáció, majd a reakció leállítása). A mikroplateken az optikai denzitásértékeket Multiscan EX (Thermo) spektrofotométer segítségével 492 és 620 nm-es hullámhosszon határoztam meg. Az adatok bemutatásának módját lásd a *Statisztika* szakaszban.

Ezt a mérést azokon a mikroglia, valamint tiszta glia sejtenyészeteken alkalmaztam, amelyeken pozitív eredményt tapasztaltam az MTT mérések során, vagyis ahol érvényesült a titán-dioxid életképesség-csökkentő hatása.

5.6 Immuncitokémia és mikroszkópos felvételek készítése

Az immunfestés elvégzéséhez a glia sejteket 12 mm átmérőjű, poli-L-lizinnel (Sigma) kétszeresen felszínkezelte üveglemezre raktam ki. Miután a tenyészetek konfluenssé váltak, a sejteket 48 órán keresztül, 100 µg/ml-es koncentrációban anatóz és rutil diszperziókkal kezeltem. A kezelést követően a sejteket 20 percen keresztül 4%-os paraformaldehid oldattal (PFA, EMS) fixáltam szobahőmérsékleten. PBS-es mosást követően a sejtmembránt 5 perces 0,1%-os TritonX100-PBS kezeléssel permeabilizáltam. A nem-specifikus fehérje kötőhelyek blokkolásához 2% BSA és 0,1% NaNO₃ tartalmú PBS oldatot alkalmaztam 1 órán keresztül.

Elsődleges ellenanyagként a gliális fibrilláris savas fehérjét felismerő, anti-GFAP-t (nyúl poliklonális ellenanyag, 1:1000, SynapticSystem #173002, 2% BSA és 0,1% NaNO₃ tartalmú PBS oldatban), glia sejtekre specifikus ellenanyagot alkalmaztam, melyet 4 °C-on, egész éjszakán át rajta hagytam a mintákon. PBS mosást követően az elsődleges ellenanyag

⁸ Dolgozatomban az LDH mérés eredményeire „citotoxicitás”-változásként hivatkozom.

jelenlétét fluoreszcensen jelölt, anti-nyúl IgG - AlexaFluor555 (kecskében termelt, Thermo Scientific, 1:500, 2% BSA és 0,1% NaNO₃ tartalmú PBS oldatban) ellenanyag alkalmazásával (1 óra, szobahőmérsékleten) tettem láthatóvá. Az inkubációt követően a mintákat PBS-sel mostam, majd a fedőlemezeket Mowiol 4.88 fedőanyaggal mikroszkópos tárgylemezre rögzítettem. A mikroszkópos felvételeket Zeiss AxioObserver Z1 mikroszkópon, 63x-os nagyítású objektívvel (α -Plan-Apochromat 63x/1.46 NA Oil), AxioCam R3 monokróm kamera alkalmazásával Zen programmal (Zeiss) készítettem. Az azonos időpontban elvégzett immunfestésből származó minták fényképezése során azonos megvilágítási fényerősséget és expozíciós időket alkalmaztam. A sejtekről több síkban készítettem felvételeket (Z-stack) 0,1 μ m-es lépésnagysággal, melyeket a Zen program Extended Depth of Focus algoritmusával egyesítettem, így a sejt minden pontján „éles” felvételt állítottam elő.

A fáziskontraszt felvételeket Zeiss AxioObserver Z1 mikroszkópon 20x-os nagyítású objektívvel (20x/0,4 NA, LD Plan Neofluar) készítettem el.

5.7 Statisztika és az adatok ábrázolása

Az MTT mérések során a neuront és gliát vegyesen tartalmazó, valamint a posztnatális glia tenyészetek esetében 5 független mérést végeztem anatóz és rutil nanorészecskékkel, 24 és 48 órás kezelési időkkkel, kezelésenként 6-8 párhuzamossal. Az embrionális glia tenyészeteken mért eredményeket 2 független mérésből nyertem, kezelésenként 6-8 párhuzamos méréssel. A tiszta neuron tenyészeteken 1 mérést végeztem, kezelésenként 7-8 párhuzamossal. A mikroglia tenyészetek adatait 1 mérésből nyertem, kezelésenként 6-8 párhuzamossal.

Az LDH méréseket posztnatális glia és mikroglia tenyészeteken végeztem el. A posztnatális glia tenyészeteken 2 független mérést végeztem, kezelésenként 4-6 párhuzamossal. A mikroglia tenyészeteken egy mérést végeztem, kezelésenként 3-6 párhuzamossal.

Az MTT eredményeket a kontroll, csak oldószerrel kezelt, azonos kiültetésből származó eredményekhez normalizáltam, százalékos értékben adtam meg (*életképesség%*). A párhuzamos méréseket egységes adatbázisként kezeltem. Az LDH adatokat a következő képlettel számoltam ki: $\text{citotoxicitás \%} = \frac{[(\text{kezelt lukon mért LDH felszabadulás} - \text{spontán LDH felszabadulás})]}{(\text{maximum LDH felszabadulás} - \text{spontán LDH felszabadulás})} \cdot 100$. Az eredmények ábrázolásakor a SEM-et (standard error of mean) ábrázoltam.

A statisztikai elemzést Jamovi 2.3.18 programmal⁹ végeztem. Az adatok normál eloszlását Shapiro-Wilk próbával teszteltem, $p < 0,05$ szignifikancia szint mellett. Amennyiben

⁹ <https://www.jamovi.org/>

az adatok normál eloszlást mutattak, egyszempontos variancia elemzést (ANOVA) végeztem, post-hoc tesztként Tukey-próbát használtam. Ha az adatok nem normál eloszlásúak voltak, akkor nem-paraméteres Kruskal-Wallis próbát alkalmaztam, Dwass-Steel-Critchlow-Fligner páros összehasonlítással. A szignifikáns különbségeket a kontroll értékekhez viszonyítva jeleztem, jelölésére a * jelet használtam, ($p < 0.05$: *; $p < 0.01$: **; $p < 0.001$: ***).

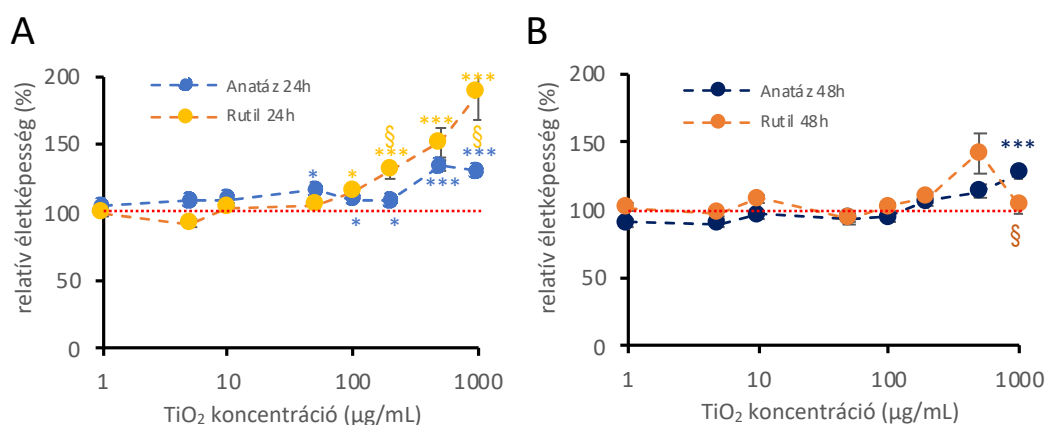
Az anatáz és a rutil 24 és 48 órás kezelések adatainak összehasonlítását Student-t próbával végeztem. Az adatok normál eloszlását Shapiro-Wilk próbával teszteltem, $p < 0.05$ szignifikanciaszint mellett. Amennyiben az adatok normál eloszlása sérült, Mann-Whitney U próbát alkalmaztam. Amennyiben a kezelések hatásait egymással vetettem össze, a szignifikancia jelölésére a \$ jelet használtam ($p < 0.05$: \$; $p < 0.01$: \$\$; $p < 0.001$: \$\$\$).

Az adatokat Microsoft Excel programmal ábrázoltam és átlag $\pm$ SEM formában jelenítettem meg. A könnyebb összehasonlíthatóság kedvéért az adatsorokat kétféle elrendezésben is bemutatom: egyrészt az azonos idejű kezelések, másrészt az azonos kristályszerkezetű nanorészecskék adatai szerint csoportosítva.

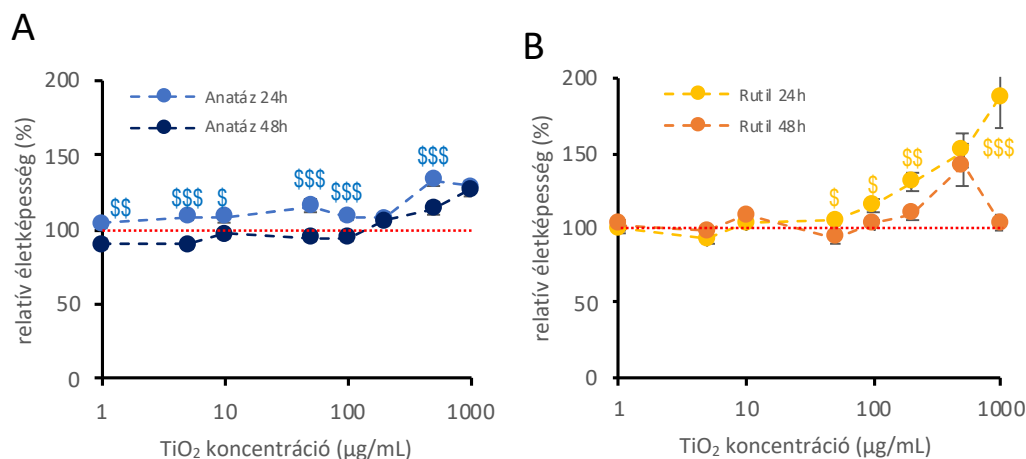
6 Eredmények

6.1 TiO₂ nanorészecskék hatása glia és idegsejtek (kevert) primer tenyészeire

A titán-dioxid nanorészecskék tisztán anatóz vagy rutil kristályformáinak idegszöveti sejtekre kifejtett sejtélettani hatását ún. kevert tenyészeteken tanulmányoztam. A 96 lyukú szövettenyésztő tálcán fenntartott primer tenyészetekben, melyeket 14-14,5 napos egérembriók agykérgéből állítottam elő, mind az ideg-, mind az asztroglia sejtek megtalálhatóak (Lesuisse & Martin, 2002). A tenyészeteket a kiültetést követő 7. napon (DIV7) anatóz vagy rutil nanorészecskék 1, 5, 10, 50, 100, 200, 500 vagy 1000 µg/ml koncentrációjú diszperziójával 24 vagy 48 óráig kezeltem, majd életképességüket MTT módszerrel határoztam meg. Annak érdekében, hogy a TiO₂ nanorészecskék és az MTT fotometriás módszer esetleges összeférhetetlenségét kizárhassam, a TiO₂ kezelést és az életképesség mérést a sejteket nem tartalmazó lyukakban is elvégeztem, majd a kapott eredményeket háttér (vak) értéként figyelembe vettem (részletek az *Anyag és módszer* fejezetben). A többi tenyészet típusnál is ezt az eljárást alkalmaztam.



3. ábra Anatáz és rutil hatása a kevert tenyészetek életképességére 24 órás (A) és 48 órás (B) kezelést követően (MTT mérés). A primer kevert tenyészeteket DIV7 időpontban, 1-1000 µg/ml [1, 5, 10, 50, 100, 200, 500, 1000 µg/ml] tartományban kezeltem. A kék színek az anatózt, sárga színek a rutilt jelölik. Az eredményeket a kezeltlen kontrollhoz viszonyított százalékos értékben átlag±SEM formában adtam meg. Az adatok 5 független mérésből származnak, minden koncentráció tartományban kristályszerkezetenként 6-8 párhuzamos mérést végeztem. A piros pontozott vonal a 100%-ot jelzi. (Kruskal-Wallis teszt: $p < 0,05$: §, *; $p < 0,01$: **; $p < 0,001$: ***) § az anatóz és rutil adatok összehasonlítását mutatja, a * a kontrolltól való különbséget jelzi.



4. ábra. Anatáz (A) és rutil (B) nanodiszperzió hatása vegyesen neuront és gliát tartalmazó sejtek életképességére 24, illetve 48 órás kezelés után. A kék színek az anatázt, sárga színek a rutilt jelölik. Az eredményeket a kezeletlen kontrollhoz viszonyított százalékos értékben átlag±SEM formában adtam meg. Az adatokat ez esetben a 24 és 48 órás kezelés szempontjából mutatom be és hasonlítom össze. A piros pontozott vonal a 100%-ot jelzi. A \$ a 24-48 órás adatok szignifikáns különbségét jelzi. (Student-t teszt: $p < 0,05$; \$; $p < 0,01$; \$\$; $p < 0,001$: \$\$\$)

Az anatáz-kezelést 50 µg/ml koncentráció alatt alkalmazva, függetlenül a kezelés idejétől, a kontroll tenyészetek értékeitől jelentősen eltérő változást nem okozott. 24 órás kezelésben 50-1000 µg/ml között, 48 órás kezelésben azonban csak 1000 µg/ml koncentrációban emelte szignifikánsan az MTT mérés OD értékeit, a számított relatív életképességet (3., 4.A ábra). A rutil nanodiszperzió 24 órás kezelésben már 100 µg/ml koncentráció felett szignifikáns relatív életképesség növekedést okozott (3., 4.B ábra), hatása az anatázét meghaladta. Érdekes megfigyelés, hogy az életképesség növelő hatás a 48 órás kezelés során nem jelentkezett (4.B ábra). Fontos megjegyezni, hogy a 100 µg/ml-es koncentráció felett az alkalmazott nanodiszperzió már kiülepszik a sejtenyészetek felszínére, ott bevonatot („nanohó¹⁰”) képez (11. ábra). Így bár a legtöbb mérésbe a 200-1000 µg/ml koncentrációjú kezeléseket is bevontam, azért, hogy a toxicitási koncentráció tartományról teljes képet kaphassak, biológiaiilag releváns hatást csak 100 µg/ml-es koncentráció alatt képezek el.

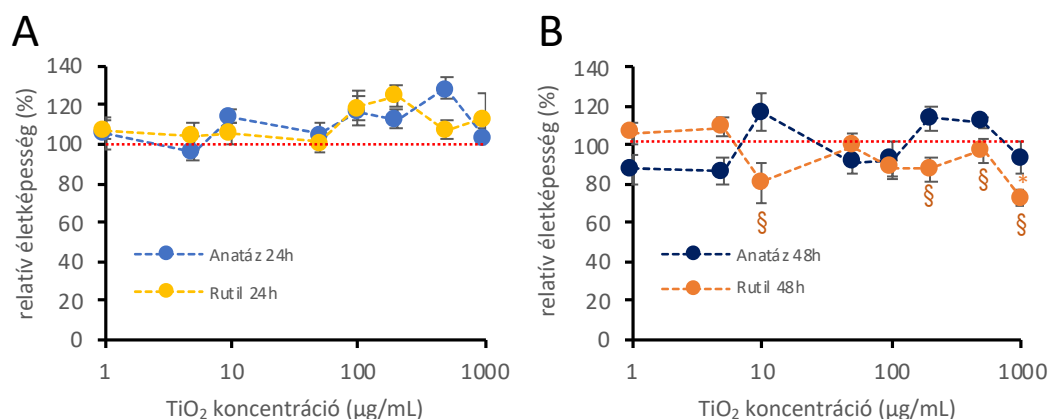
Eredményeim azt mutatják, hogy egyik TiO₂ nanoformának sem volt életképességet csökkentő hatása a vegyesen neuront és gliát tartalmazó tenyészeteken sem 24 órás, sem pedig 48 órás kezelést követően, még nagyon magas koncentrációk alkalmazásakor sem.

¹⁰ A titán-dioxid részecskék által kialakított hó-szerű réteg, amely a kívül a sejtek felszínére, ezzel teljesen ellepve a sejteket. Mikroszkópban nézve a sejteket a „nanohó” miatt a sejtek alig vagy egyáltalán nem láthatóak.

6.2 TiO₂ nanorészecskék hatása embrionális glia tenyészeteken

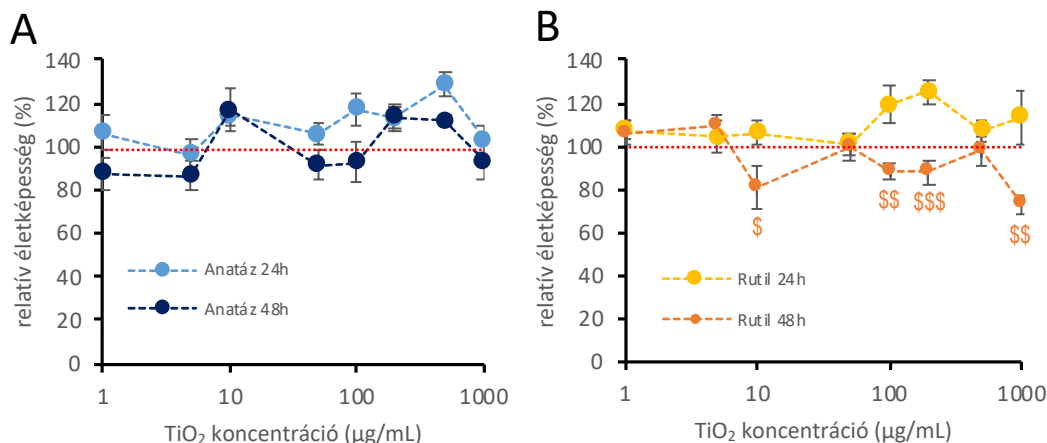
A kevert tenyészeteken mért MTT mérés adatai a teljes tenyészet tulajdonságait jellemzik, ugyanakkor nem szolgáltatnak információt arról, hogy a tenyészetben található különböző sejtípusok (idegsejtek, asztroglia-sejtek) milyen mértékben érintettek a titán-dioxid nanorészecskék hatásaiban. Ennek megválaszolására a kezeléseket tiszta, csak glia sejteket tartalmazó tenyészeteken is elvégeztem. Ilyen glia tenyészetekből kétfélét is készítettem: vizsgálataimat 16 napos egér embriókból (embrionális glia) és 1-3 napos újszülött egerekből származó (posztнатális glia) primer glia tenyészeteken is elvégeztem. Az embrionális gliasejt tenyészeteket¹¹ a kevert tenyészeteknél leírt módon kezeltem anatáz vagy rutil nanodiszperzióval. A sejt kultúrák életképességét 24, illetve 48 órás kezelést követően itt is MTT módszerrel határoztam meg.

Az embrionális glia sejtek esetén 24 órás kezelés esetén sem az anatáz, sem a rutil nanodiszperzió nem volt hatással a sejtek életképességére (**5. ábra**). 48 órás kezelés a hatást döntően nem változtatta meg (**6. ábra**), bár a hosszabb idejű rutil kezelés 10 µg/ml koncentráció felett a 24 órás kezeléshez viszonyítva, 1000 µg/ml-es koncentrációban pedig a kontrollhoz képest is szignifikánsan kisebb OD értékeket eredményezett (**5., 6.B ábra**).



5. ábra Anatáz és rutil hatása embrionális glia tenyészetek életképességére 24 órás (**A**) és 48 órás (**B**) kezelést követően (**MTT mérés**). A primer embrionális glia tenyészeteket 1-1000 µg/ml [1, 5, 10, 50, 100, 200, 500, 1000 µg/ml] tartományban kezeltem. A kék színek az anatázt, sárga színek a rutilt jelölik. Az eredményeket a kezeltetlen kontrollhoz viszonyított százalékos értékben átlag±SEM formában adtam meg. Az adatok 2 független mérésből származnak, minden koncentráció tartományban kristályszerkezetenként 6-8 párhuzamos mérést végeztem. A piros pontozott vonal a 100%-ot jelzi. (Kruskal-Wallis; $p < 0,05$; *, §) § az anatáz és rutil adatok összehasonlítását mutatja, a * a kontrolltól való különbséget jelzi.

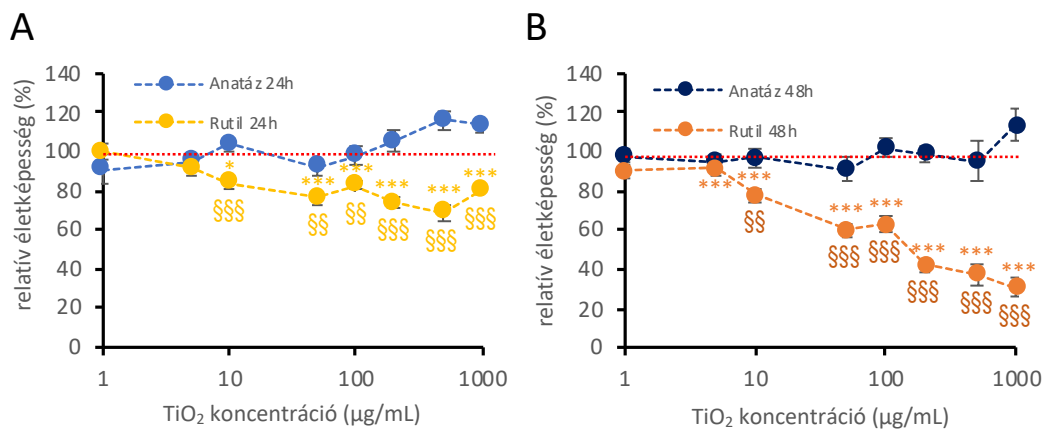
¹¹ Az embrionális gliasejt tenyészeteket laboratóriumunkból Dr. Bencsik Norbert alakította ki. A többi tenyészetet én készítettem.



6. ábra. Anatáz (A) és rutil (B) nanodiszperzió hatása embrionális glia sejtek életképességére 24, illetve 48 órás kezelés után. A kék színek az anatázt, sárga színek a rutilt jelölik. Az eredményeket a kezeletlen kontrollhoz viszonyított százalékos értékben átlag±SEM formában adtam meg. Az adatokat ez esetben a 24 és 48 órás kezelés szempontjából mutatom be és hasonlítom össze. A piros pontozott vonal a 100%-ot jelzi. A \$ a 24-48 órás adatok szignifikáns különbségét jelzi. (Student-t teszt: $p < 0,05$: \$; $p < 0,01$: \$\$; $p < 0,001$: \$\$\$)

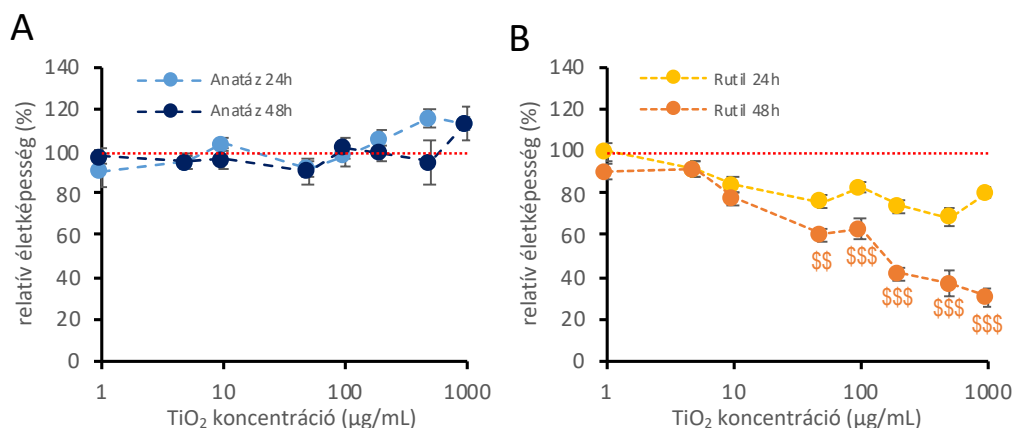
6.3 TiO₂ nanorészecskék hatása posztnatális glia tenyészeteken

A primer posztnatális asztroglia tenyészeteket újszülött, 1-3 napos egerek előagyából alakítottam ki. A gliasejt tenyészeteket itt is anatáz vagy rutil nanorészecskék 1, 5, 10, 50, 100, 200, 500 vagy 1000 µg/ml koncentrációjú diszperziójával 24 vagy 48 óráig kezeltem, majd életképességüket MTT módszerrel határoztam meg (7., 8. ábra).



7. ábra Anatáz és rutil hatása a posztnatális glia tenyészetek életképességére 24 órás (A) és 48 órás (B) kezelést követően (MTT mérés). A primer posztnatális glia tenyészeteket 1-1000 µg/ml [1, 5, 10, 50, 100, 200, 500, 1000 µg/ml] tartományban kezeltem. A kék színek az anatázt, sárga színek a rutilt jelölik. Az eredményeket a kezeletlen kontrollhoz viszonyított százalékos értékben átlag±SEM formában adtam meg. Az adatok 5 független mérésből származnak, minden koncentráció tartományban kristályszerkezetként 6-8 párhuzamos mérést végeztem. A piros pontozott vonal a 100%-ot jelzi. A * a kontrolltól való különbséget jelzi. (Kruskal-Wallis teszt: $p < 0,05$: *; $p < 0,01$: **; $p < 0,001$: ***) A \$ az anatáz és rutil adatok összehasonlítását mutatja (Student-t: $p < 0,05$: \$; $p < 0,01$: \$\$; $p < 0,001$: \$\$\$)

A posztnatális glia tenyészetek esetében mind a kevert, mind az embrionális glia tenyészetekétől eltérő hatást figyeltem meg. Az anatóznak ennél a tenyésztípusnál sem a 24, sem pedig a 48 órás kezelést követően nem volt megfigyelhető hatása (7., 8.A ábra). A rutil nanodiszperzió ugyanakkor már 10 µg/ml-es koncentrációtól szignifikánsan csökkentette a sejtek életképességét (7. ábra), hatása pedig a kezelési idő növelésével potencírozható volt (8.B ábra). 48 órás alkalmazása már 5 µg/ml-es koncentráció felett csökkentette az életképességet.

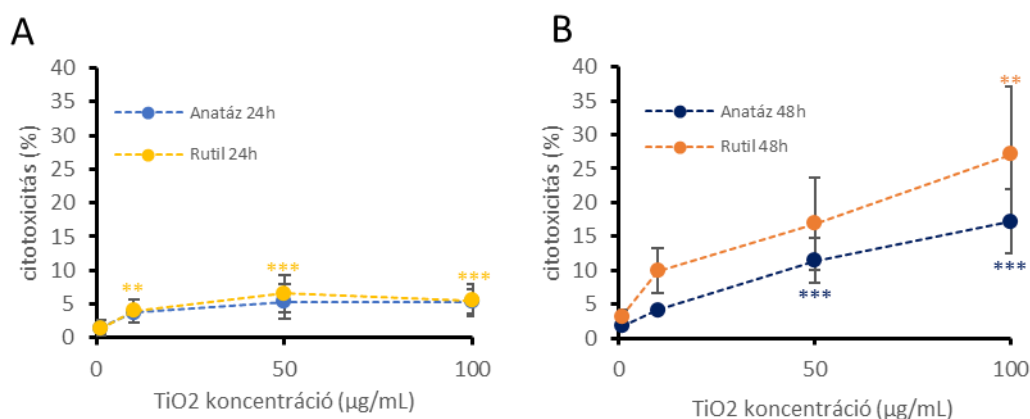


8. ábra: Anatáz (A) és rutil (B) nanodiszperzió hatása posztnatális glia sejtek életképességére 24, illetve 48 órás kezelés után. A kék színek az anatózt, sárga színek a rutilt jelölik. Az eredményeket a kezeltlen kontrollhoz viszonyított százalékos értékben átlag±SEM formában adtam meg. Az adatokat ez esetben a 24 és 48 órás kezelés szempontjából mutatom be és hasonlítom össze. A piros pontozott vonal a 100%-ot jelzi. A \$ a 24-48 órás adatok szignifikáns különbségét mutatja. (Student-t teszt: $p < 0,05$; \$, $p < 0,01$; \$\$, $p < 0,001$; \$\$\$)

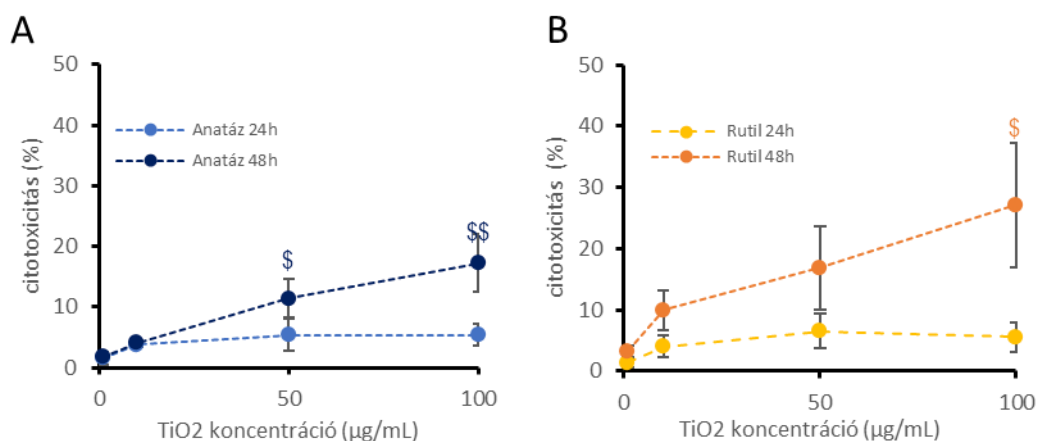
Az MTT módszer az egészséges (életképes) sejtek NAD(H) dehidrogenáz aktivitásán alapul, így a kiolvasott értékét befolyásolja a tenyészetek sejt száma, a sejtekben elérhető enzim mennyisége, a reakcióban redukálószerként szereplő NAD(H) mennyisége (vagyis a sejt redukáló kapacitása, ezeken keresztül aktuális metabolizmusa) és a mitokondriumok száma is. Annak ellenőrzésére, hogy az MTT-mérés során kapott OD-érték csökkenés valóban a kiváltott citotoxicitásnak köszönhető, egy másik eljárást, az extracelluláris környezetben mért laktát dehidrogenáz aktivitást (LDH módszer) is alkalmaztam. A módszer alapja, hogy a sérült sejtekből az LDH enzim kiszabadul, így aktivitása a tenyészetek tápfolyadékából fotometriásan mérhető. Az előző fejezetben ismertetett „nanohó”-jelenség miatt ebbe a vizsgálatba csak a 1-100 µg/ml koncentráció tartományt vontam be, a kezelést ebben az esetben is 24, illetve 48 óráig végeztem (9., 10. ábra).

Az elvégzett LDH méréseink részben az MTT méréssel megegyező eredményeket mutattak. 24 óra elteltével az anatáz esetében nem tapasztaltam citotoxicitás növekedést, a rutil esetében viszont már 10 µg/ml-től szignifikáns emelkedést figyeltem meg (9.A ábra). Ez megerősíti az MTT mérésben tapasztalt életképesség-csökkenést. A 48 órás kezeléseknél

azonban – ellentétben az MTT méréssel - az anatóz nanodiszperzió esetén is szignifikáns citotoxicitás emelkedést figyeltem meg 50 µg/ml koncentráció felett. A rutil nanodiszperziójánál a citotoxicitás növekedése hasonló volt, szignifikáns különbséget azonban csak 100 µg/ml-es koncentrációnál detektáltam (9.B ábra). Mindkét kezelés esetén a hatás potencírozható volt (10. ábra).



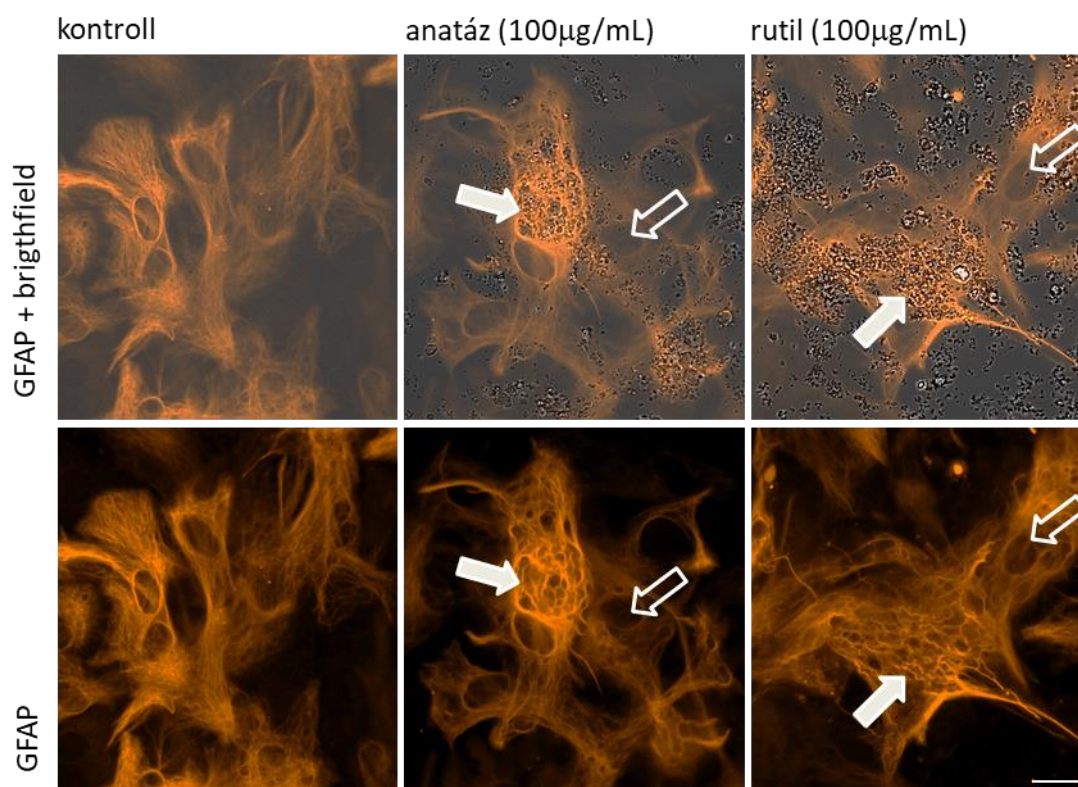
9. ábra 24 órás (A) és 48 órás (B) anatóz és rutil nanodiszperzió-kezelés citotoxikus hatása posztnatális glia sejtekre (LDH mérés). A primer posztnatális gliasejt tenyészeteket 1-100 µg/ml [1, 10, 50, 100 µg/ml] tartományban kezeltem. A kék színek az anatózt, sárga színek a rutilt jelölik. Az eredményeket a kezeletlen kontrollhoz viszonyított százalékos értékben átlag±SEM formában adtam meg. Az adatok 2 független mérésből származnak, minden koncentráció tartományban kristályszerkezetenként 3 párhuzamos mérést végeztem. A piros pontozott vonal a 100%-ot jelzi. (egyutas ANOVA: $p < 0,05$: *; $p < 0,01$: **; $p < 0,001$: ***, a kezeletlen értékekhez viszonyítva)



10. ábra: 24, illetve 48 órás anatóz (A) és rutil (B) nanodiszperzió-kezelés citotoxikus hatása posztnatális glia sejtekre (LDH mérés). A kék színek az anatózt, sárga színek a rutilt jelölik. Az eredményeket a kezeletlen kontrollhoz viszonyított százalékos értékben átlag±SEM formában adtam meg. Az adatokat ez esetben a 24 és 48 órás kezelés szempontjából mutatom be és hasonlítom össze. A piros pontozott vonal a 100%-ot jelzi. (Student-t teszt: $p < 0,05$: \$, $p < 0,01$: \$\$, $p < 0,001$: \$\$\$)

6.3.1 A nanorészecskék hatása az asztroglia sejtek sejtíváz szerkezetére

Az anatáz, illetve rutil diszperzióból a sejtek felszínére kiült „nanohó” hatását a sejtíváz szerkezetet megjelenítésével is elemeztük. Ehhez a glia sejteket 48 óráig 100 µg/ml koncentrációjú anatáz és rutil diszperziókkal kezeltük, a tenyészeteket lefixáltuk, majd az asztroglia sejteket egy intermedier filamentum, a gliális fibrilláris savas fehérje (GFAP) immunpozitivitásuk alapján azonosítottuk (**11. ábra**).



11. ábra TiO_2 nanorészecskék hatása a posztnatális glia sejtek GFAP^+ intermedier filamentumaira kontroll, illetve 48 órás anatáz és rutil kezelés esetén.

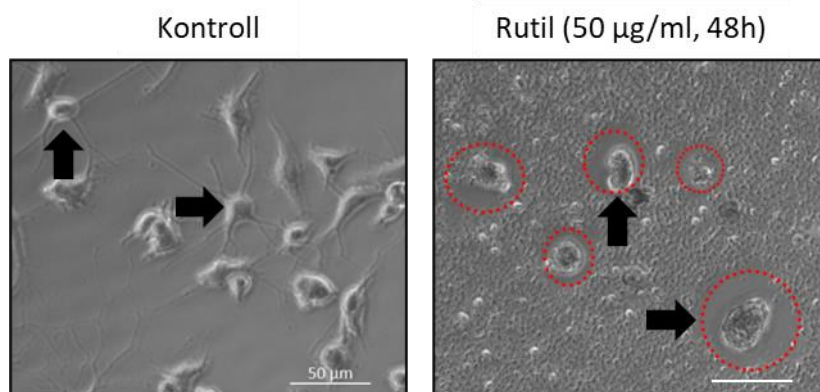
A felső képek a GFAP fluoreszcens jel és az ún. brighthfield technika kombinációjával készültek. A teli nyilak a nanorészecskékből kialakult aggregátumokat és a megváltozott sejtíváz szerkezetet mutatják, az üres nyilak azokra a területekre mutatnak, amelyeken nem vagy alig láthatók nanorészecskék, és a sejtíváz szerkezete a kontroll állapothoz hasonló. Az alsó képsor a GFAP jelet önmagában mutatja. A mérce 20 µm-t jelöl.

A kezeletlen, kontroll tenyészetekben az aljzatra kiterült, lapos asztroglia sejtekben a citoplazmában hosszabb lefutású, általában sugárirányban rendezett GFAP filamentumok voltak jellemzőek. Az anatázzal és rutillal kezelt lemezekben sokkal több „furcsa szerkezetű” sejtet találtunk: a „nanohó” által sűrűbben fedett területeken (**11. ábra**, teli nyilak) a GFAP filamentumok elrendeződése megváltozott, míg ott, ahol nem alakult ki számottevő nano TiO_2 réteg a sejtek felett (**11. ábra**, üres nyilak), a GFAP rostok elrendezése a TiO_2 -dal nem kezelt, kontroll sejtekhez hasonló volt. A hatást anatázzal és rutillal is kezelt sejteken is tapasztaltuk.

A mikroszkópos elemzések alapján ugyanakkor csak feltételezhető, hogy a nanorészecskék hatással vannak a sejt szerkezet megváltozására. Ennek oka, hogy az általunk használt felbontás, valamint a vizsgálati limitációk nem tették lehetővé annak megállapítását, hogy a sejtek felvették-e a nanorészecskéket, vagy csak „körülölelték” a részecskéket, ezért látunk megváltozott sejt váz szerkezetet.

6.4 TiO₂ nanorészecskék hatása mikroglia sejteken

A mikroglia az agy „immunsejtjeként” igen erős fagocitotikus aktivitással rendelkezik. Aktivációja számos idegi gyulladásos kórképben és neurodegeneratív betegségben játszik fontos szerepet (Hickman és mtsai., 2018). A sejtek fagocitotikus aktivitását kísérleteimben is megfigyeltem. A 48 órás, 50 µg/ml-es TiO₂ kezelés esetén a tenyészetben kialakuló titán-dioxid „nanohó” a mikroglia sejtek környezetében (12. ábra, piros körök) eltűnt, valamint a sejtek alakja is megváltozott¹².

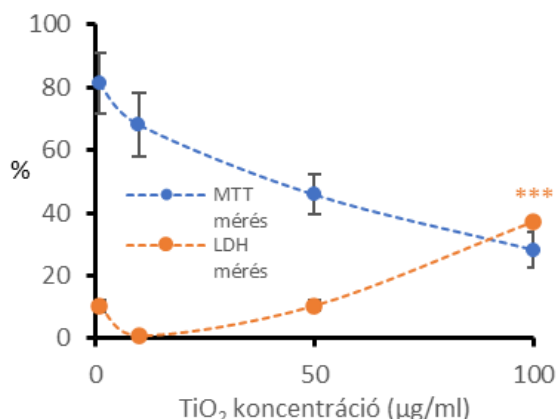


12. ábra Mikroglia sejtek fagocitálják a TiO₂ nanorészecskéket. A rutillal kezelt sejtek (48h, 50 µg/ml) alakja (nyíl) láthatóan megváltozott a kontroll sejtekhez (nyíl) képest, valamint a sejtek körül (piros körök) nem látható a „nanohó”, mivel a mikroglia sejtek valószínűleg fagocitálták a részecskéket. A mérce 50 µm-nek felel meg.

Mivel ezek alapján az agyba kerülő nanorészecskék fagocitózisában a mikroglia sejteknek elsődleges szerepe lehet, ezért az anatóz és rutil nanorészecskék hatását e sejt típuson is megvizsgáltam. Ehhez újszülöttekből posztnatális glia tenyészeteket alakítottam ki, melyek felszínén 1-2 hét tenyésztést követően megjelentek a mikroglia sejtek foltjai. A lapos, felszínre kitapadt asztroglia sejtek felszínéről a gömbölyded, kis nyúlványokkal rendelkező és gyengén letapadó mikroglia sejteket tápfolyadékkal történő lemosással izoláltam, majd szövettenyésztő tálcába ültettem. Mivel a glia sejtek tenyészeiben a rutil forma 48 órás kezelése tűnt a

¹² A fagocitózisra a megfigyelések alapján csak következtetek. Bizonyítására további vizsgálatok, pl. elektronmikroszkópia szükségesek.

leghatásosabbnak, ebben a kísérletben csak a 48 órás rutil-kezelés (1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$) hatását elemeztem MTT, illetve LDH módszerrel.



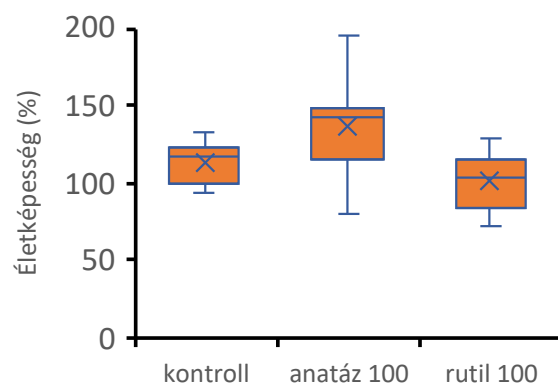
13. ábra: 48 órás rutil kezelés mikroglia tenyészetek életképességére (MTT) és citotoxicitására (LDH). Az MTT mérés esetében a relatív életképességet, az LDH mérés esetében a citotoxicitást adtam meg százalékos értékben. Az adatok 1 mérésből származnak, minden koncentráció tartományban 2-6 párhuzamos mérést végeztem. A hibasávok a SEM-et ábrázolják. Kruskal-Wallis: $p < 0,001$: ***

A rutil nanoszuszpenzió 48 órás expozícióban a mikroglia sejtek esetén is csökkentette az életképességet, illetve növelte a citotoxicitást (**13. ábra**). Az adatok az alacsony elemszámok egyelőre inkább csak a tendenciát mutatják, a citotoxicitásban szignifikáns változást csak 100 $\mu\text{g/ml}$ -es koncentrációnál kaptam.

6.5 Tiszta neuron tenyészetek

Utolsó kísérletsorozatként a nanopartikulumok hatását tiszta, csak idegsejteket tartalmazó tenyészeteken is elemeztem. A tiszta neuron tenyészeteket, hasonlóan a vegyesen neuront és glia sejteket is tartalmazó tenyészetekhez, 14-14,5 napos egér embriókból nyertem, ezekben a tenyészetekben azonban a glia sejtek osztódását gátoltam (lásd *Anyag és módszer*). A tiszta neuron tenyészeteket csak az általam biológiailag még relevánsnak ítélt és a „nanohó” kialakulását csak részlegesen mutató¹³, 100 $\mu\text{g/ml}$ -es koncentrációval kezeltem, mind az anatóz, mind a rutil esetében. A dolgozat készítéséig rendelkezésre álló idő alatt csak egy tenyészet 24 órás kezelésének elvégzésére jutott időm, a tenyészetek életképességét MTT módszerrel mértem meg. Előzetes eredményeim azt mutatják, hogy a vizsgált koncentrációban sem az anatóz, sem a rutil nem volt hatással az idegsejtek életképességére (**14. ábra**).

¹³ A sejteket nem fedte összefüggő TiO₂ bevonat.



14. ábra: 100 µg/ml-es anatáz és rutil nanodiszperzió hatása tiszta neuron tenyészet életképességére, 24 órás kezelés után (MTT mérés). Az adatok 1 mérésből származnak, kristályszerkezetenként 6-8 párhuzamos mérést végeztem.

7 Eredmények összefoglalása

A különböző idegi sejtípusokon megfigyelt anatóz és rutil nanodiszperziók okozta életképesség változásokat az 1. táblázat foglalja össze, míg a citotoxicitás változásokat a 2. táblázat tartalmazza.

1. táblázat Anatóz és rutil nanodiszperziók hatása az idegi sejtek életképességére MTT módszerrel mérve, in vitro

tenyésztetítípus	kezelés			
	anatóz 24h	anatóz 48h	rutil 24h	rutil 48h
kevert (neuron és glia)	nőtt (50 µg/ml felett szignifikáns)	nőtt (1000 µg/ml felett szignifikáns)	nőtt (100 µg/ml felett szignifikáns)	nem változott
embrionális glia	nem változott	nem változott	nem változott	csökkent (1000 µg/ml felett szignifikáns)
posztnatális glia	nem változott	nem változott	csökkent (10 µg/ml felett szignifikáns)	csökkent (5 µg/ml felett szignifikáns)
mikroglia	N/A	N/A	N/A	csökkent, de nem szignifikáns (50 µg/ml)
neuron	nem változott (100 µg/ml)	N/A	nem változott (100 µg/ml)	N/A

2. táblázat Anatóz és rutil nanodiszperziók hatása a citotoxicitásra LDH módszerrel mérve, in vitro

tenyésztetítípus	kezelés			
	anatóz 24h	anatóz 48h	rutil 24h	rutil 48h
posztnatális glia	nem változott	nőtt (50 µg/ml felett szign.)	nőtt (10 µg/ml felett szign.)	nőtt (100 µg/ml felett szign.)
mikroglia	N/A	N/A	N/A	nőtt (100 µg/ml felett szign.)

8 Diszkusszió

A titán-dioxidot kedvező tulajdonságai miatt széles körben, főleg 1-100 nm-es nanorészecske méretben alkalmazzák az iparban. Fehérítő tulajdonságai miatt titán-fehérnek (titanium-white) is nevezik, a festékiparban, kozmetikumokban is alkalmazzák. Nanopigmentjei mérettartományukban alkalmasak a bőrt károsító UV sugárzás visszaverésére, ezért naptejekben is használatos, de nagy felülete miatt fotokatalizátorként is alkalmazzák. Baktériumölő képességét fertőtlenítőszerekben használják ki (Haider és mtsai., 2019).

Élelmiszerekben is használatos volt, azonban kísérletekkel igazolták, hogy a nanorészecskék károsak is lehetnek az egészségre, főleg, ha ezeknek hosszú időn keresztül ki van téve a szervezet (Chen és mtsai., 2020). Számos *in vivo* kísérlet igazolta, hogy a titán-dioxid képes a bélrendszeren keresztül is felszívódni, a vérkeringésen keresztül létfontosságú szervekbe eljutni, ahol felhalmozódhat és károsíthatja a szöveteket (Hong és mtsai., 2017). Ez a felhalmozódás az idegrendszerben is megfigyelhető, így igazolták pl. a memóriáért és a tanulásért felelős agyterület, a hippokampusz érintettségét is (Mohammadipour és mtsai., 2014). Részben ezek a megfigyelések vezettek oda, hogy az Európai Unió 2022 januárjától betiltotta a TiO₂ (E 171) használatát az élelmiszerekben¹⁴.

A nanopartikulumok idegrendszerre gyakorolt hatását *in vitro* kísérletekben is vizsgálták. Az ilyen kísérleti rendszerek előnye, hogy a vizsgált anyag hatása közvetlenül a kívánt összetételű sejtpopuláción tesztelhető, miközben a többi paramétert változatlanul tartjuk. Ezek a kísérletek általában humán vagy patkány sejtvonalakon történtek, bár kisebb részben használtak a szervezetből közvetlenül származó ún. primer tenyészeteket is (Sheng és mtsai., 2015). Az elemzésekben elsősorban sejtélettani paramétereket, így a sejtek életképesség-változását követték nyomon különböző módszerekkel. A legtöbb esetben a kutatók koncentráció és kitettség függő citotoxikus, vagyis életképesség csökkentő hatásokat azonosítottak (Papp és mtsai., 2020) (Hong és mtsai., 2015).

Sok olyan közleményt publikáltak, mely a TiO₂ nanorészecskék idegsejtekre gyakorolt *in vitro* hatását vizsgálja, azonban a legtöbb vizsgálat egy sejt típusra koncentrál (Mu és mtsai., 2020), így nem veszi figyelembe, hogy a titán-dioxid hatásában szerepet játszhatnak a különböző típusú sejtek között kialakuló kölcsönhatások is. Munkámban ezért összehasonlító elemzésbe vontam be az idegrendszer számos sejt típusát, illetve ezek elegyét.

¹⁴ COMMISSION REGULATION (EU) 2022/63, 14 January 2022

Az ipari előállítás során a titán-dioxid nanorészecskék leginkább rutil (pálcika alak) és anatáz (gömb alak) kristályformában fordulnak elő (Allen és mtsai., 2018). Az előállítás a rutil formának kedvez, ugyanakkor a legtöbb vizsgálatban vagy anatázból és rutilből álló keveréket, vagy csak anatázt használtak a kezelések során (Sheng és mtsai., 2015). Olyan vizsgálatot, ahol az anatáz és a rutil hatását idegi sejteken és sejtípus-specifikus módon hasonlították volna össze, nem találtam a szakirodalomban.

8.1 Az anatáz hatása a különböző sejtípusokra

Vizsgálataim során az anatáz formát különböző koncentrációkban, 24 és 48 órás kezelésekben alkalmaztam eltérő összetételű primer tenyészeteken. Bár bizonyos tanulmányok szerint az anatáz forma a legtoxikusabb (Baranowska-wójcik és mtsai., 2020), eredményeim ezt nem támasztják alá.

Az anatáz egyik tenyésztípus esetében (embrionális és posztnatális asztroglia tenyészetek, tiszta neuron tenyészet, neuron és glia vegyes tenyészet) sem okozott jelentős életképesség-csökkenést 24 órás kezelést követően sem az MTT, sem pedig az LDH mérések során. Egyedüli hatást posztnatális glia sejteken 48 órán keresztül alkalmazva láttam, de ezt is csak az LDH méréssel tudtam kimutatni.

Ezek az eredmények ellentmondanak azoknak a vizsgálatoknak, ahol anatáz formával kezelték a sejteket és szignifikáns életképesség csökkenést tapasztaltak. Sheng és munkatársai pl. primer patkány hippokampális sejteken végzett kísérleteikben szignifikáns életképesség csökkentő hatást figyeltek meg már 6 óra kezelési idő után, 50 µg/ml-es koncentráció felett. LDH mérésnél pedig 24 óra után, 5 µg/ml-től tapasztaltak hatást (Sheng és mtsai., 2015). Papp és munkatársai szintén primer asztroglia sejteken alkalmaztak anatáz kezelést 0,05-2 mg/mL-es koncentrációban, 24 és 48 órán keresztül. Az életképességet MTT módszerrel vizsgálták. 24 órás kezelés után 1 mg/ml-es koncentrációnál, míg 48 órás kezelés során 0,5 mg/ml felett tapasztaltak szignifikáns hatást (Papp és mtsai., 2020). Hasonló, az életképességet csökkentő hatást én azonban nem tudtam kimutatni, mivel csak 48 óra után volt megfigyelhető némi életképesség-csökkenés. További érdekes megfigyelés, hogy az anatáz a kevert tenyészeteken növelte a relatív életképességet. Ennek egyik oka lehet, hogy a titán-dioxid oxidatív stresszt okoz a sejtekben. Egy lehetséges mechanizmus erre a “ROS-indukálta ROS felszabadulás” (ROS induced ROS release). Ennek során a reaktív oxigén gyökök (ROS) a mitokondrium belső membránjára hatnak, módosítják az anion csatornák működését, ez pedig további ROS felszabaduláshoz vezet. A felszaporodott ROS mennyiség pedig mitokondrium és

sejtkárosodáshoz vezet (Gutiérrez Iglesias és mtsai., 2014). Lehetséges, hogy az oxidatív stressz hatására megnő a glia sejtek redukciós kapacitása, ezt pedig az MTT módszerrel életképesség növekedésként detektálhatjuk. Hasonló, bár nem szignifikáns hatás volt megfigyelhető a tisztán idegsejteket tartalmazó tenyészetekben is, így elképzelhető, hogy a neuronok ennek a hatásnak (energetikai folyamataik miatt) jobban kitettek. A pontos ok azonban csak további, pl. a mitokondriumok szerepét ellenőrző vizsgálattal deríthető fel. Mivel a rutil formánál is hasonló hatást tapasztaltam, a jelenség kristályszerkezet függetlennek tűnik. Fontos azt is megjegyezni, hogy a sejteken 100 µg/ml felett kialakuló „nanohó” réteg miatt a magasabb koncentrációknál mért életképesség-növekedés műtermékeknek tekinthető.

Sejttípus-specifikus hatást Coccini és munkatársai is leírtak, igaz, ellentétes előjellel. A kutatók humán neuronokon és asztroglia sejtvonalakon végeztek kezeléseket az anatáz formával. Eredményeik szerint a neuron tenyészetekben kisebb koncentráció alkalmazásakor (15 µg/ml) csökkent az életképesség, míg a glia tenyészetekben ez csak magasabb koncentrációnál következett be (31 µg/ml). Az életképességi vizsgálatokat ebben az esetben is MTT módszerrel végezték, a cikkben található mikroszkópos képek alapján azonban a 125 µg/ml-es koncentrációnál és a 250 µg/ml-es koncentrációnál is megjelent a „nanohó” réteg, így ennek is szerepe lehet a mért életképesség változásokban (Coccini és mtsai., 2015).

Az anatáz és a rutil formára adott különböző típusú sejtválaszok háttérében állhat a nanorészecskék eltérő szerkezete is. Jin és munkatársai arra az eredményre jutottak, hogy a két forma eltérően hat a ROS keletkezésre. Diszperzió után mindkét nanorészecske szerkezete megváltozik, a felszínükön több reaktív hidroxil csoport lesz. Ezek képesek elektront elvonni, ezzel pedig szuperoxid és hidroxil gyökök alakulnak ki. A tanulmány szerint az anatáz forma hajlamosabb a gyökök kialakítására, mert nagyobb felülettel rendelkezik, mint a rutil forma. Azt is kimutatták, hogy mindkét forma megtalálható volt a citoplazmában, ahova fagocitózissal jutottak be, az anatáz forma azonban megtalálható volt a sejtmagban is, ezért genotoxicitást is kiváltott. A mitokondriumban is megtalálható volt az anatáz, ahol valószínűleg beleavatkozott az elektrontranszportlánc működésébe, ami reaktív oxigén gyökök túltermeléséhez vezetett. Az anatázzal ellentétben a rutil nem volt megtalálható sem a sejtmagban, sem pedig a mitokondriumban. Ennek ellenére a szerzők nem zárják ki annak a lehetőségét, hogy a rutil is képes lehet bejutni ezekbe a struktúrákba, és károsítani azokat (Jin és mtsai., 2011). Mindezek alapján azt is feltételezhetjük, hogy az eltérő eredményekért a nanorészecskék eltérő beszerzési forrása, tisztasága, állapota (ld. kristályszerkezet, kristálméret) is felelős lehet.

Felmerülhet, hogy a megfigyelt hatás mennyiben a nanorészecskék jelenlététől, és mennyiben a kémiai összetevők (pl. ionok) egyedi hatásától függ. A titán-dioxid vízben

gyakorlatilag oldhatatlan, ezért a titán ionos hatását vizsgálatainkban tulajdonképpen kizárhatjuk¹⁵.

8.2 A rutil kristályszerkezetű TiO_2 a különböző sejtípusokra eltérően hat

Az irodalomban főleg arról találtam adatot, hogy a rutil anatázzal együtt alkalmazva hogyan hat a sejtekre. Kifejezetten a rutil forma idegsejtekre gyakorolt hatásáról nem találtam eredményeket, bár az ipari előállítás során elsősorban ilyen forma képződik¹⁶.

A rutil formát is több koncentrációban alkalmaztam a sejteken, a kezelési idő ebben az esetben is 24 és 48 óra volt. Hasonlóan az anatázhoz, ennél a formánál sem tapasztaltam életképesség-csökkenést a neuront és gliát vegyesen tartalmazó tenyészetek esetében. A kezelési időnek sem volt befolyása a hatás kialakulására. Abban az esetben azonban, amikor a rutilt posztnatális asztroglia tenyészeteken alkalmaztam, jelentős relatív életképesség-csökkenést (MTT) és citotoxicitás növekedést (LDH) figyeltem meg, mely a kezelési idő növelésével potencírozható volt. Az embrionális glia sejteknél hatást csak 1000 $\mu\text{g/ml}$ -es koncentrációnál figyeltem meg. Ezekből az eredményekből az látszik, hogy a glia sejtek, ellentétben a neuronokkal, érzékenyebbek a rutil formára.

Egy lehetséges magyarázat lehet arra, hogy a glia sejteken tapasztalt életképesség-csökkentő hatás nem jelentkezett a vegyesen neuront és gliát is tartalmazó, kevert tenyészeteken, hogy ebben a tenyészetípusban a neuronok mennyisége jóval magasabb volt, mint a glia sejteké. Mivel a neuronok nem voltak érzékenyek a titán-dioxid kezelésre, elképzelhető, hogy a glia sejtek életképessége ezekben a tenyészetekben is csökkent, de a neuronok „jele” elnyomta a glia sejteken tapasztalt hatást.

Mivel az asztroglia tenyészetek esetében a rutil életképesség csökkentő hatását tapasztaltam, ezért a rutilt csak mikroglia tartalmazó tenyészeteken is alkalmaztam 48 órán keresztül, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban. A mikroglia sejtek esetében az MTT módszer használatával életképesség-csökkenést tapasztaltam, de az eddig összegyűjtött adatok nem mutattak szignifikáns változást. Az LDH módszernél is csak 100 $\mu\text{g/ml}$ koncentráció esetén kaptam szignifikáns citotoxicitás-növekedést. Fontos megjegyezni, hogy ezeknél a méréseknél még csak kevés adatra támaszkodhatunk, így további vizsgálatok szükségesek a hatás megerősítésére.

¹⁵ [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/869#section=Human-Toxicity-Excerpts-\(Complete\)](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/869#section=Human-Toxicity-Excerpts-(Complete))

¹⁶ <https://www.essentialchemicalindustry.org/chemicals/titanium-dioxide.html>

Eredményeimből látható, hogy bár kifejezetten a rutil formára irányuló eredményt nem találtam az irodalomban, a nano-titán szemcséket rutil formában tartalmazó készítmények célzott kockázatot jelenthetnek a központi idegrendszer főbb sejtípusaira, főleg az asztroglia sejtekre.

9 Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőimnek, Dr. Tárnok Krisztiánnak és Dr. Schlett Katalinnak, hogy segítettek a kísérletek megtervezésében, kivitelezésében, az adatok elemzésében. Köszönöm türelmüket, és hogy mindig szakították rám időt.

Köszönetet mondanék a kutatócsoport minden tagjának segítségükért, különösen Bauer Krisztinának, hogy segített a kísérletek kivitelezésében, a sejtek fenntartásában. Köszönöm Dr. Bencsik Norbertnek is, hogy mindig segítségemre sietett.

Kutatásunkat az ELTE TTK Biológiai Intézet Diagnosztika és Terápia programjának „Alkalmazott mikrobiológia” alprogramja támogatta.

10 Irodalomjegyzék

- Allen, N. S., Mahdjoub, N., Vishnyakov, V., Kelly, P. J., & Kriek, R. J. (2018). The effect of crystalline phase (anatase, brookite and rutile) and size on the photocatalytic activity of calcined polymorphic titanium dioxide (TiO₂). *Polymer Degradation and Stability*, 150(January), 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2018.02.008>
- Baranowska-wójcik, E., Szwajgier, D., Oleszczuk, P., & Winiarska-mieczan, A. (2020). Baranowska-Wójcik2020_Article_EffectsOfTitaniumDioxideNanopa.pdf. *Biological Trace Element Research*, 193(1), 118–129.
- Coccini, T., Grandi, S., Lonati, D., Locatelli, C., & De Simone, U. (2015). Comparative cellular toxicity of titanium dioxide nanoparticles on human astrocyte and neuronal cells after acute and prolonged exposure. *NeuroToxicology*, 48, 77–89. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.03.006>
- Czajka, M., Sawicki, K., Sikorska, K., Popek, S., Kruszewski, M., & Kapka-Skrzypczak, L. (2015). Toxicity of titanium dioxide nanoparticles in central nervous system. *Toxicology in Vitro*, 29(5), 1042–1052. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.04.004>
- D’Errico, J. N., Doherty, C., Reyes George, J. J., Buckley, B., & Stapleton, P. A. (2022). Maternal, placental, and fetal distribution of titanium after repeated titanium dioxide nanoparticle inhalation through pregnancy. *Placenta*, 121(November 2021), 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2022.03.008>
- Gutiérrez Iglesias, E., Pérez-Arizti, J. A., Márquez-Ramírez, S. G., Delgado-Buenrostro, N. L., Chirino, Y. I., Iglesias, G. G., & López-Marure, R. (2014). Titanium dioxide nanoparticles induce strong oxidative stress and mitochondrial damage in glial cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 73, 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.026>
- Hickman, S., Izzy, S., Sen, P., Morsett, L., & El Khoury, J. (2018). Microglia in neurodegeneration. *Nature Neuroscience*, 21(10), 1359–1369. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0242-x>
- Hong, F., Sheng, L., Ze, Y., Hong, J., Zhou, Y., Wang, L., Liu, D., Yu, X., Xu, B., Zhao, X., & Ze, X. (2015). Suppression of neurite outgrowth of primary cultured hippocampal neurons is involved in impairment of glutamate metabolism and NMDA receptor function caused by nanoparticulate TiO₂. *Biomaterials*, 53, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.02.067>

- Hong, F., Yu, X., Wu, N., & Zhang, Y. Q. (2017). Progress of: In vivo studies on the systemic toxicities induced by titanium dioxide nanoparticles. *Toxicology Research*, 6(2), 115–133. <https://doi.org/10.1039/c6tx00338a>
- Jin, C., Tang, Y., Yang, F. G., Li, X. L., Xu, S., Fan, X. Y., Huang, Y. Y., & Yang, Y. J. (2011). Cellular toxicity of TiO₂ nanoparticles in anatase and rutile crystal phase. *Biological Trace Element Research*, 141(1–3), 3–15. <https://doi.org/10.1007/s12011-010-8707-0>
- Lesuisse, C., & Martin, L. J. (2002). Long-term culture of mouse cortical neurons as a model for neuronal development, aging, and death. *Journal of Neurobiology*, 51(1), 9–23. <https://doi.org/10.1002/neu.10037>
- Liliom, H., Tárnok, K., Ábrahám, Z., Rácz, B., Hausser, A., & Schlett, K. (2017). Protein kinase D exerts neuroprotective functions during oxidative stress via nuclear factor kappa B-independent signaling pathways. *Journal of Neurochemistry*, 142(6), 948–961. <https://doi.org/10.1111/jnc.14131>
- Liu, Y., Xu, Z., & Li, X. (2013). Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in rat neuroglia cells. *Brain Injury*, 27(7–8), 934–939. <https://doi.org/10.3109/02699052.2013.793401>
- Ma, L., Liu, J., Li, N., Wang, J., Duan, Y., Yan, J., Liu, H., Wang, H., & Hong, F. (2010). Oxidative stress in the brain of mice caused by translocated nanoparticulate TiO₂ delivered to the abdominal cavity. *Biomaterials*, 31(1), 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.028>
- Mohammadipour, A., Fazel, A., Haghir, H., Motejaded, F., Rafatpanah, H., Zabihi, H., Hosseini, M., & Bideskan, A. E. (2014). Maternal exposure to titanium dioxide nanoparticles during pregnancy; impaired memory and decreased hippocampal cell proliferation in rat offspring. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37(2), 617–625. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.01.014>
- Mu, X., Li, W., Ze, X., Li, L., Wang, G., Hong, F., & Ze, Y. (2020). Molecular mechanism of nanoparticulate TiO₂ induction of axonal development inhibition in rat primary cultured hippocampal neurons. *Environmental Toxicology*, 35(8), 895–905. <https://doi.org/10.1002/tox.22926>
- Natarajan, V., Wilson, C. L., Hayward, S. L., & Kidambi, S. (2015). Titanium dioxide nanoparticles trigger loss of function and perturbation of mitochondrial dynamics in primary hepatocytes. *PLoS ONE*, 10(8), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134541>
- Papp, A., Horváth, T., Igaz, N., Gopisetty, M. K., Kiricsi, M., Berkesi, D. S., Kozma, G., Kónya, Z., Wilhelm, I., Patai, R., Polgár, T. F., Bellák, T., Tiszlavicz, L., Razga, Z., & Vezér, T. (2020). Presence of titanium and toxic effects observed in rat lungs, kidneys, and central nervous system in vivo and in cultured astrocytes in vitro on exposure by titanium dioxide nanorods. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 9939–9960. <https://doi.org/10.2147/IJN.S275937>
- Peters, R. J. B., Van Bommel, G., Herrera-Rivera, Z., Helsper, H. P. F. G., Marvin, H. J. P., Weigel, S., Tromp, P. C., Oomen, A. G., Rietveld, A. G., & Bouwmeester, H. (2014). Characterization of titanium dioxide nanoparticles in food products: Analytical methods to define nanoparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(27), 6285–6293. <https://doi.org/10.1021/jf5011885>

- Racovita, A. D. (2022). Titanium Dioxide: Structure, Impact, and Toxicity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(9).
<https://doi.org/10.3390/ijerph19095681>
- Rashid, M. M., Tavčer, P. F., & Tomšič, B. (2021). Influence of titanium dioxide nanoparticles on human health and the environment. *Nanomaterials*, 11(9).
<https://doi.org/10.3390/nano11092354>
- Sheng, L., Ze, Y., Wang, L., Yu, X., Hong, J., Zhao, X., Ze, X., Liu, D., Xu, B., Zhu, Y., Long, Y., Lin, A., Zhang, C., Zhao, Y., & Hong, F. (2015). Mechanisms of TiO₂ nanoparticle-induced neuronal apoptosis in rat primary cultured hippocampal neurons. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 103(3), 1141–1149.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.35263>
- Song, B., Liu, J., Feng, X., Wei, L., & Shao, L. (2015). A review on potential neurotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*, 10(1).
<https://doi.org/10.1186/s11671-015-1042-9>
- Tárnok, K., Kiss, E., Luiten, P. G. M., Nyakas, C., Tihanyi, K., Schlett, K., & Eisel, U. L. M. (2008). Effects of Vinpocetine on mitochondrial function and neuroprotection in primary cortical neurons. *Neurochemistry International*, 53(6–8), 289–295.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2008.08.003>
- Tárnok, Krisztián, Szilágyi, L., Berki, T., Németh, P., Gráf, L., & Schlett, K. (2010). Anoxia leads to a rapid translocation of human trypsinogen 4 to the plasma membrane of cultured astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 115(2), 314–324.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06685.x>
- Weir, A., Westerhoff, P., Fabricius, L., Hristovski, K., & Von Goetz, N. (2012). Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environmental Science and Technology*, 46(4), 2242–2250. <https://doi.org/10.1021/es204168d>
- Zeman, T., Loh, E. W., Čierný, D., & Šerý, O. (2018). Penetration, distribution and brain toxicity of titanium nanoparticles in rodents' body: A review. *IET Nanobiotechnology*, 12(6), 695–700. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2017.0109>

11 Szerzői hozzájárulás

- A dolgozatban szereplő adatok forrásául szolgáló primer tenyészetek előállításában és fenntartásában aktívan részt vettem.
- A sejttenyészetek anatóz és rutil nanopartikulum kezelésében és azok hatását vizsgáló MTT és LDH életképesség mérésekben, illetve azok kiértékelésében aktívan részt vettem.
- Az immunfestést és a mikroszkópos felvételeket Tárnok Krisztiánnal közösen készítettük.
- Az adatok kiértékelésében és a grafikonok elkészítésében Dr. Tárnok Krisztián és Dr. Schlett Katalin segítettek.