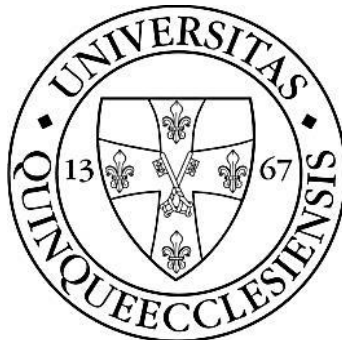


A szöveti plazminogén aktivátorra vonatkozó vizsgálatok: a thrombolysis hatékonysága jódozott kontrasztanyag jelenlétében és t-PA immobilizáció vas oxid alapú nanopartikulumokon

Tézisfüzet



Szerző: Vörös Eszter

Doktori iskola vezetője: Dr. Kovács L. Gábor M.D. D.Sc.

Program vezető: Dr. Tóth Kálmán M.D., Ph.D., Sc.D.

Témavezetők: Dr. Battyáni István M.D., Ph.D., és

Dr. Tóth Kálmán M.D., Ph.D., Sc.D.

Pécsi Tudományegyetem

Klinikai Idegtudományi Doktori Iskola

Radiológiai Klinika

I. számú Belgyógyászati Klinika

Pécs, 2017

Bevezetés

Világszerte a szív- és agyér-betegségek jelentik a legjelentősebb népegészségügyi problémákat. A WHO (Egészségügyi Világszervezet) legfrissebb adatai szerint a kardiovaszkuláris elváltozásokkal kapcsolatos halálozás felelős az összes haláleset 22,3 %-áért a világon megelőzve a fertőző (19,1 %) és daganatos betegségeket (12,5 %). A fejlett országokban a halálozási statisztikák kismértékű javulást mutatnak az utóbbi egy évtizedben, ez javarészt a szívinfarktus és iszkémiás stroke trombolitikus kezelésének tulajdonítható. A terápiás eljárás plazminogén aktivátorok (urokináz, streptokináz, szöveti plazminogén aktivátor (tPA) és rekombináns változatai) alkalmazásán alapszik. Ezek a hatóanyagok a trombusok felszínén vagy belsejében a vérplazma eredetű plazminogént plazminná alakítják, és az utóbbi proteolitikus hasítással feloldja a trombusok fibrinhálós szerkezetét. Trombózis után azonban az elzárt erek tartós rekanalizációja gyakran (az esetek 15 – 40 %-ában) elmarad, a trombolitikumok hatásos dózisa mellett pedig jelentős vérzéses szövődményekkel kell számolni.

Thrombolízis a klinikai gyakorlatban

A koaguláció vagy a véralvadás fontos biológiai folyamat. Alapvetően a vérrög abban az esetben képződik, ha valamilyen sérülés érni a vérereket. A vérrög megállítja a vérzést, illetve megvédi bennünket a baktériumok és vírusok bejutásától a szervezetbe. Vérrögök kialakulhatnak felületi sérülés nélkül, amennyiben egy véredény sérült, majd a szervezet lebontja őket, ha már nincs szükségük rájuk.

Egészséges felnőtt esetében egyensúly van a két tevékenység között. Azonban bizonyos esetekben kóros vérrögek képződés lép fel: egyes esetekben a vérrögök nem oldódnak fel, másrészt, ha túlméretes vérrög a véredényben rendkívül veszélyes, mert teljesen blokkolhatja a véráramlást. Az áramlás hiánya miatt a létfontosságú szervek nem kapnak elég oxigént, amely azonnali diagnózist és kezelést igényelnek.

Számítógépes tomográfia és mágneses rezonancia képalkotás szerepe a trombózisban

Az 1990-es években számos új, non-invazív diagnosztikus eljárás terjedt el a technológiai fejlődésének köszönhetően: a komputertomográfia (CT) és a mágneses rezonancia (MR).

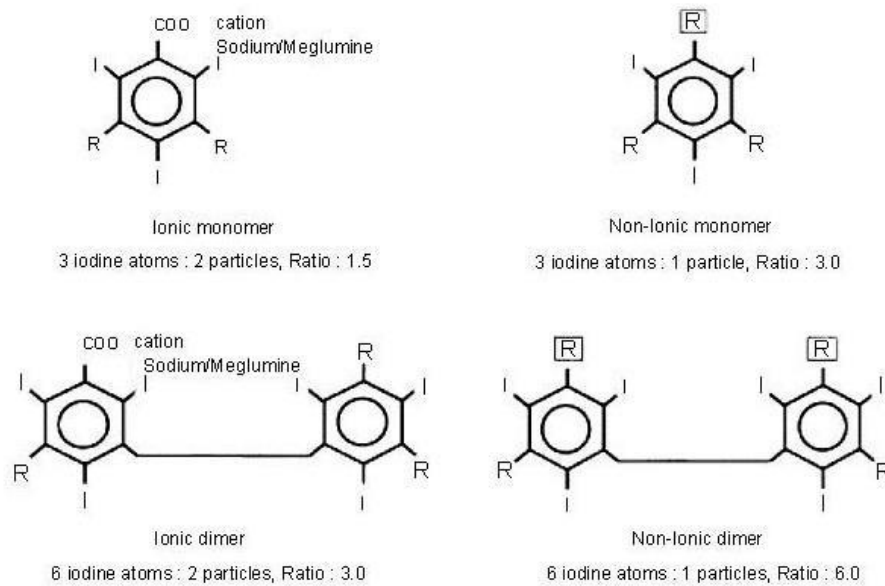
A komputertomográfia a klasszikus röntgeneljárás továbbfejlesztése. Lényege, hogy a röntgensugárral történő számítógépes rétegvizsgálat során a CT-kép, a hagyományos röntgen felvételektől eltérően, az emberi testet hossz tengelyével merőlegesen, haránt metszeteiben mutatja, átfedések nélkül. A vizsgálati módszer a képalkotó diagnosztika legértékesebb diagnosztikai eljárásai közé tartozik, bevezetésük óta a készülékek gyors technikai fejlődésen mentek keresztül, főleg, ami a képminőséget és a felvételi időt illeti.

A jódozott kontrasztanyag negatív mellékhatása a trombolitikus terápia során

A jódozott kontrasztanyagokat széles körben használják akár vérerek vizualizálására (angiográfia), akár a különböző szervek és szövetek sűrűségének növelésére és ezáltal a kontraszt növelésére. Elméletileg nincs kölcsönhatás a médiumok és a többi gyógyszer között, azonban aggodalomra ad okot a röntgen-kontrasztanyagok és a trombolitikus terápia közötti lehetséges kölcsönhatás. Gyakran a thrombus lokalizálása végett, az rt-PA beadás előtt kontrasztosított számítógépes tomográfiás értékelést végeznek (a kontrasztos CT felvétel több információt szolgáltat, mint a nem-kontrasztos CT önmagában). Azonban kardiológiai és radiológiai szakirodalmi adatok indikálják, hogy az ionos és nem ionos jódozott kontrasztanyagok jelenlétében rt-PA indukálta trombolízis jelentősen lassul.

A jódozott kontrasztanyagok nem-ionosok vagy ionosok lehetnek, valamennyi jelenleg használt ionos kontrasztanyag a 2,4,6-tri-jódozott benzolgyűrű kémiai módosítása (**1. ábra**).

Fizikai és kémiai tulajdonságaik alapján osztályozzák, beleértve kémiai szerkezetüket, ozmolaritásukat, jódtartalmukat és az oldat ionizációját.



1. ábra: 2,4,6-tri-jódozott benzolgyűrű kémiai módosításai

Számos *in vitro* rágcsáló-lítikus modellt dolgoztak az ionos és nemionos jódozott kontrasztanyagok rt-PA-re gyakorolt hatásának értékelésére; a mai napig az rt-PA véralvadásgátló aktivitásának legmegbízhatóbb módja ellenére a *in vitro* rágó lízis modell. Más kutató csoportok pedig ultrahangos módszereket alkalmaztak a sztreptokináz trombolitikus aktivitásának mérésére *ex vivo* létrehozott vérrögökön. Számos olyan eset is megjelent, amely vagy klinikai statisztikai adatokat, vagy esettanulmányokat mutat be, ahol az ionos, jódtartalmú kontraszt anyag negatívan befolyásolta a tPA aktivitását. Azonban ezek a megközelítések tartalmazhatják a betegek, pl. életkori, nemi, vagy életmódbeli különbségeket. A jelen tanulmány célja annak vizsgálata, hogy milyen hatást fejt ki a jódtartalom bemutatására thrombolitikus terápiára *in vitro* rögök lízis modellen keresztül.

Nanomedicina – avagy nanotechnológia az orvostudományban

A nanotechnológia mára széles körben ismert tudományág, azonban a gondolat régebbi, mint azt legtöbben képelnénk. Az elnevezés Richard P. Feynman-től származik, 1959-ből. Az

ő első ismert felhasználási ötlete a szívsebészethez köthető: a véráramba juttatott apró nanorobotok, amelyek a szívhez eljutva kijavítanák a hibát, így nem lenne szükség a veszélyes szívműtétekre. Míg Feynman úgy gondolta, hogy a létező, nagyméretű eszközökből kiindulva, egyre kisebb eszközöket célszerű gyártanunk, addig a nanotechnológia fejlődésével egyértelművé vált, hogy célszerűbb az atomokból építkezni. Ma már az anyagokat nanométeres mérettartományban, molekuláris szinten tudjuk befolyásolni. Bár szem előtt tartjuk Feynman álmát, a nanotechnológia még nem az apró robotokról szól.

Jelenleg a legjelentősebb és leghasznosabb nanotechnológiával kapcsolatos kutatások az orvostudományban folynak, ahogy azt már Feynman is megálmodta. Kutatócsoportok már sok fontos eredményt értek már el, azonban az igazi áttörések 5-10 éven belül következnek be. A nanotechnológia eredménye pontosabb, jobban irányítható, sokoldalúbb, megbízhatóbb és költséghatékonyabb gyógyászat, amely mind az orvosok, mind a betegek számára fontos, mivel ez életminőség javulását eredményezi. A nanogyógyászatot 79 kisebb kategóriára osztják és ezeken belül rengeteg kísérleti munka és fejlesztés folyik.

Mágneses nanopartikulumok

Számos tudományos terület használja a mágneses nanopartikulumokat különböző biokémiai és biomedikai alkalmazásokban, beleértve a bakteriális detektálást, a fehérje tisztítást, az enzim immobilizációt, a sejtek szétválasztását, a gyógyszeradagolást, a hipertermiát és az MRI képalkotást. A mágneses nanostruktúrák jól definiált méretűek, külső mágneses mezővel manipulálhatók, illetve képesek a kontraszt erősítése a mágneses rezonancia képalkotásban. A szintetikus mágneses nanopartikulumok fő komponense a kolloid állapotú magnetit vagy hematit .

A vas és vegyületei széles körben elterjedtek és a laboratóriumban körülmények között könnyen, gyorsan előállíthatóak. A vas biogén elem, amely minden élő szervezetben jelen van,

de egyes vas vegyületek káros hatással lehetnek az emberekre, az állatokra és a környezetre: a vas-oxidok szerepet játszhatnak tumor kialakulásában.

A vas-oxid nanorészecskék monodiszpergált szintézisének meghatározása döntő fontosságú a nanotechnológia számára, mivel tulajdonságaik nagymértékben függenek a nanorészecskék méretétől és alakjától. A vas-oxid nanorészecskék biológiai alkalmazását lehetővé tevő kolloid jellemzőket a **felületük**, nem pedig az ömlesztett térfogatuk határozza meg. A kolloidális stabilitás a termikus mozgásból vagy a Brownian mozgásból származik: a véletlenszerű ütközések más részecskékkel, a szuszpendáló folyadékkal vagy a tartályfallyal a partikulumok mozgási pályájának folyamatos változását okozza. Azonban a van-der Waals és a mágneses dipólus-dipólus vonzó erők miatt a mágneses nanorészecskék hajlamosak koagulálódni, ami kolloid stabilitásuk csökkenését eredményezi. A biológiai környezetben (pH, ozmolalitás) fennálló kolloid stabilitás elérése érdekében egyensúlyt kell tartani a van der Waals vonzó erők és a felületi töltésen alapuló 3 elektrosztatikus repulzió között. Ezt az elektromos kettős réteg kialakításával lehet elérni.

A két leggyakrabban vizsgált vasoxid a magnetit (Fe_3O_4) és a magemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Az vas-oxid nanorészecskék a környezetben is megtalálhatók a levegőszennyezés és a vulkánkitörések során keletkezhetnek. A magnetit és magemit kémiai is szintetizálhatók. Különböző módszereket alkalmazhatunk a gyártás során, például a víz-az-olaj mikroemulziós rendszerben való szintézis, a csapadék kicsapódása, a korlátozott környezetben lejátszódó reakciók, a poliol módszer, az áramlás-befecskendezési szintézis és a szonolízis. A mágneses viselkedés fontos paraméter a szuperparamágneses vasoxid nanopartikulumok tervezésében és szintézisében, hogy maximalizáljuk képalkotó és terápiás hatékonyságukat, mivel ezek az alkalmazások nagy mágneses értékeket igényelnek. A reakciókörülmények a szintézis folyamatok befolyásolhatók, ami lehetővé teszi ezeknek a részecskéknek a magas mágneses érzékenységet.

Célkitűzések

1. Mérési módszer kidolgozása *ex vivo* vérrögök előállítására, frissen vett egér vagy patkány teljes vér használatával. Ismert koncentrációjú t-PA-t hozzáadásával fibrinolízis indukálása, és a felszabadult hemoglobin mennyiségének mérésén keresztül spektrofotometriával nyomon követi a vérrög lízis előrehaladását.

2. Öt különböző kontrasztanyagok (Xenetix® (iobitridol), Ultravist® (iopromid), Omnipaque® (iohexol), Visipaque® (iodoxanol) és Iomeron® (iomeprol)) a t-PA indukált trombolízisre gyakorolt hatásának vizsgálata a kifejlesztett *ex vivo* vérrög lízis modell segítségével.

3. Nanopartikulum platform kifejlesztése és optimalizálása, amely alkalmas a t-PA és más potenciális trombolitikus gyógyszerek vas-oxid-mag alkalmazásával való célzott szállítására.

4. Megfelelő fizikai-kémiai jellemzők végrehajtása, mint pl. Mérete, alakja, zéta-potenciálja, stabilitása, kiszámítva a feltöltött hatóanyag-mennyiséget a részecskébe

5. A nanopartikulumok trombolízis képességének vizsgálata *in vitro* körülmények között áramlás jelenlétében és anélkül.

6. A nanopartikulumok trombolízis képességének vizsgálata alternatív mágneses mezőben, a lízis hatékonyság változásának mérése hipertermia mellett.

7. Egér vas(III)-klorid artériás sérülés modellt kidolgozása és a partikulumok tesztelésére *in vivo* körülmények között intravitális mikroszkópos technikával.

Eredmények

A jódozott kontrasztanyag és a szöveti plazminogén aktivátor közötti kölcsönhatások: *in vitro* összehasonlító vizsgálat

Vérrögök készítése, vizsgált csoportok

A vizsgálatokhoz a vért 8-10 hónapos WKY Wistar Kyoto patkányokból (Charles River Laboratories, Budapest, Magyarország) farki vénájából vettük le 100 µl-ként kísérleti csövekbe helyeztük, majd 50U thrombint adtunk a 100 µl vérhez és 3 órán át 37 ° C-on tartottuk a vérrögeképződéshez, majd 3 napig 4 ° C-on állni hagytuk.

A trombolízis vizsgálatához az előkészített rögöket egyenként 15 ml-es Falcon-csövekben helyeztük el. A csövekhez 5.0 ml normál fiziológiás sóoldatot adtunk, amely 100 µg rt-PA-t és az alábbiak közül egy kontrasztanyagot adtunk: Xenetix® (iobitridol), Ultravist® (iopromid), Omnipaque® (iohexol), Visipaque® (iodoxanol) és Iomeron® (iomeprol) 30 mg vagy 60 mg jód koncentrációban. A dózisokat az átlagos felnőtt beteg intravaszkuláris beadása esetén a gyártó által megadott tartományok alapján számítottuk ki (1. táblázat). Referenciaként 5.0 ml

1. táblázat: A vizsgálatban használt jód tartalmú kontrasztanyagok fizikai paramétereit. * Az alábbi adatok javaslatként szolgálnak, egy átlagos 70 kg súlyú normál felnőtt esetében.

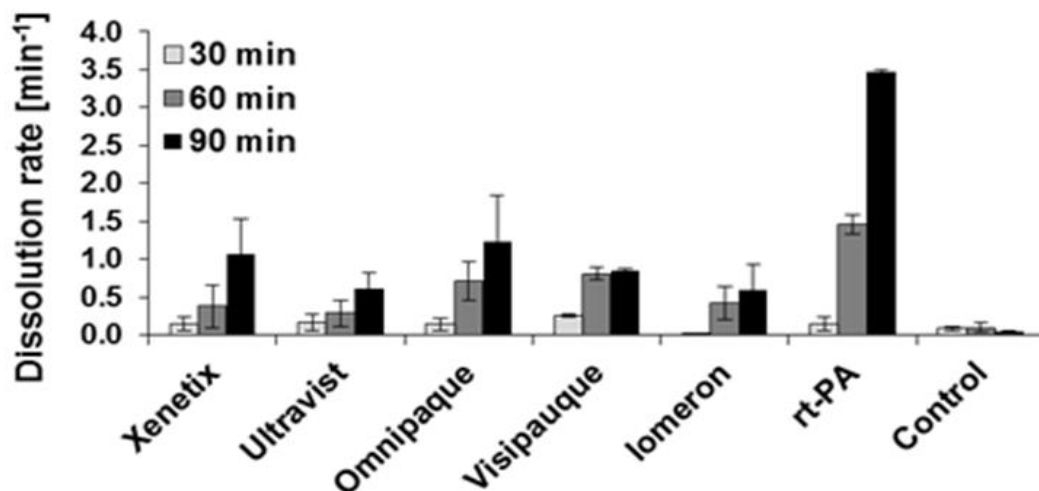
	Concentration of Iodine [mg /mL]	Brand	Dosage*	Osmolality [mOsm / kg H ₂ O]	Viscosity [mPa s] 37°C	Active Substance
ULTRAVIST	300	Bayer AG	3 – 5 mL per kg body weight	607	4.7	iopromide
IOMERON	300	Bracco S.p.A.	3 – 5 mL per kg body weight	521	4.5	iomeprol
OMNIPAQUE	350	GE Healthcare	2.5 – 4 mL per kg body weight	844	10.6	iohexol
VISIPAQUE	320	GE Healthcare	3 – 4.5 mL per kg body weight	290	11.4	iodixanol
XENETIX	300	Guerbet Corporate	3 – 5 mL per kg body weight	915	10.0	iobitridol

fiziológiás sóoldatot és 100 µg rt-PA oldatot (pozitív kontroll), vagy csak 5.0 ml fiziológiás sóoldatot (kontroll) alkalmaztunk. Minden csoport esetében 5 vérrögöt vizsgáltunk állatokként.

Eredmények

A kontrasztanyagokat 2 koncentrációba vizsgáltuk, mertük a lízis sebességét és a szabad hemoglobin mennyiségét. (2. és 3. ábra).

A várakozásoknak megfelelően, a negatív kontroll esetében kisebb mennyiségű hemoglobin szabadult fel az első percekben a negatív kontroll esetében, ami a fibrin háló spontán lebomlásával magyarázható. Összehasonlítva a csoportokat, az első 30 percben nem volt szignifikáns különbség a kontrasztanyag csoportok és pozitív kontroll között, azonban 30. perc után jelentős különbséget találtunk mutatkozott: a lízis $56.2 \pm 15.6\%$ -os növekedést volt mutatott a pozitív kontroll esetében, míg a kontrasztanyag csoportok esetében ez a növekedés szignifikánsan kisebb volt. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy minden esetben

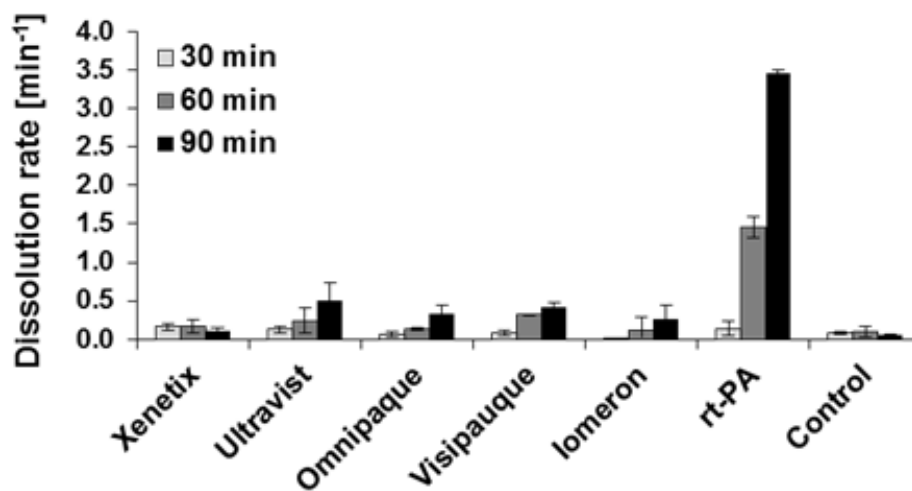


2. ábra: Vérrög oldás 30 mg jódot tartalmazó kontrasztanyag jelenlétében. 100 µg rt-PA vérrög oldásának hatékonysága az öt leggyakrabban használt kontrasztanyag (Xenetix® (iobitridol), Ultravist® (iopromide), Omnipaque® (iohexol), Visipaque® (iodixanol) és Iomeron® (iomeprol)) jelenlétében illetve hiányában. 30 perc után van $56.2 \pm 15.6\%$ csökken a t-PA effektivitása 30 mg kontrasztanyag jelenlétében.

az rt-PA önmagában képes a leghatékonyabban oldani a vérrögöket. (2. ábra) - rt-PA három nagyságrenddel effektívebben bontja le a vérrögöket önmagában, mint jódos kontrasztanyag jelenlétében.

Ezt követően a 60 mg jódot tartalmazó kontrasztanyagot tartalmazó csoportokat összehasonlítottuk össze egymással és a pozitív kontrollcsoporttal. Ugyanazt a tendenciát figyeltük meg, mint a 30 mg-os csoportban: nem találtunk szignifikáns különbség a kontrasztanyagot tartalmazó csoportok között, azonban a pozitív kontroll az első 30 perc után 100-szor nagyobb oldódási sebességet mutatott, mint a kontrasztanyagokkal rendelkező csoportoké (3. ábra).

Összegzés



3. ábra: Vérrög oldás 60 mg jódot tartalmazó kontrasztanyag jelenlétében. 100 µg rt-PA vérrög oldásának hatékonysága az öt leggyakrabban használt kontrasztanyag (Xenetix® (iobitridol), Ultravist® (iopromide), Omnipaque® (iohexol), Visipaque® (iodixanol) és Iomeron® (iomeprol)) jelenlétében illetve hiányában. 30 perc után van $82.3 \pm 23.9\%$. csökken a t-PA effektivitása 60 mg kontrasztanyag jelenlétében.

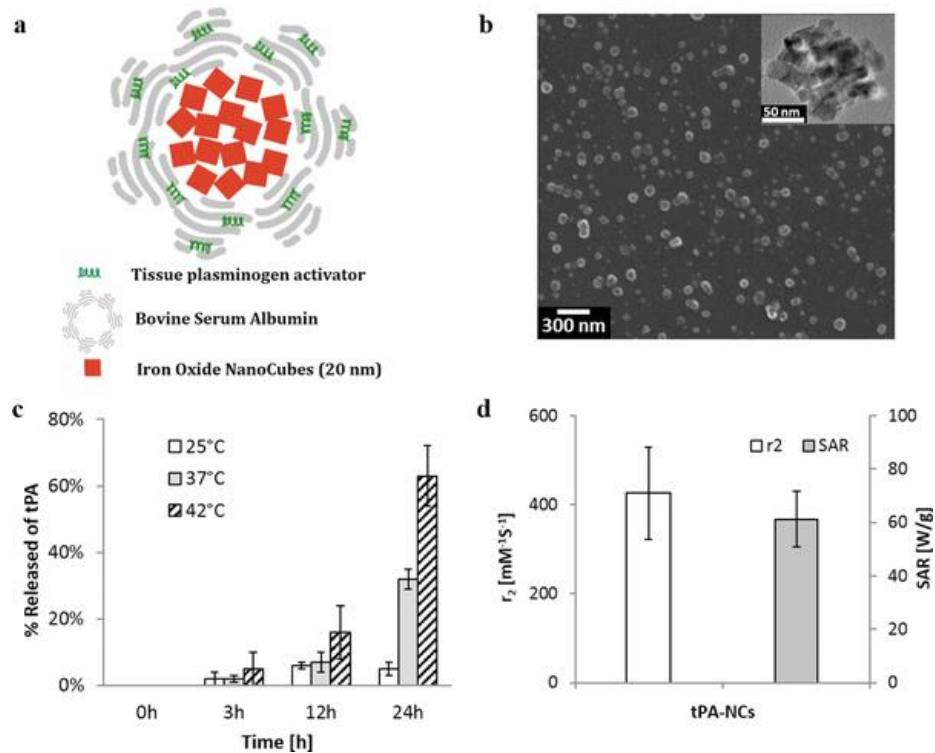
Ebben a dózis tanulmányban egy az *in vitro* patkány vérrög modellt használtunk az rt-PA által indukált thrombus lízis hatékonyságának összehasonlítása a leggyakrabban használt jódtartalmú kontrasztanyagok jelenlétében: Xenetix® (iobitridol), Ultravist® (iopromide),

Omnipaque® (iohexol), Visipaque® (iodixanol) és Iomeron® (iomeprol). A kísérleti eredmények bizonyították, hogy a kontrasztanyag jelenléte negatívan befolyásolja a fibrinolízis hatékonyságát, ami egy dózis függő hatást mutatott: nagyobb dózisú jód tartalmú kontrasztanyag potenciálisan jobban csökkentheti a thrombus lízis. Továbbá, ezek az adatok megerősítik, hogy a jód tartalmú röntgen-kontrasztanyagok lelassítják, illetve gátolják a thrombolízist. Ezen megállapításnak fontos klinikai relevanciája van, ugyanis a mai klinikai gyakorlatban a thrombolitikus gyógyszerek beadás előtt komputertomográfias vizsgálatot végeznek a thrombus lokalizálása végett.

t-PA immobilizáció vas oxid alapú nanopartikulumokon és a lokalizált mágneses hipertermia

A nanopartikulumok fizikai megjelenése, kémiai tulajdonságok

A t-PA-NC-ek vázlatos ábrázolása a **4. ábrán** látható. A nanopartikulumoknak két fő része van: vas-oxid alapú mag, amelyet több 20 nm-es vas-oxid nanokockákból áll; míg a felület réteget a t-PA molekulák és a marhaszérum-albumin (BSA) bevonat alkotja.



4. ábra: t-PA vas-oxid nanocubes (t-PA-NCs). a) sematikus ábrázolása a) a nanopartikulumok egy superparamágneses vas-oxid (Fe_3O_4) magból és egy bevonati rétegből állnak, amelyek olyan funkcionális csoportokat hoznak létre, melyek elősegítik a gyógyszer kötődését a terápia során célzott sejtcsoportokhoz, illetve gátolják a partikulumok aggregációját és növelik a kolloidstabilitást. b) a SEM és TEM felvételek, a t-PA-NCs jellemző mérete ≈ 150 nm; c) t-PA kioldása a nanopartikulumokból különböző hőmérsékleteken (25, 37 és 42 ° C) és időpontokban (0, 3, 12 és 24 h); d) keresztirányú mágneses rezonancia relaxációs idő (r_2) (1.41T) és a fajlagos abszorpciós ráta ($f = 512$ kHz-et; $H = 10$ kA m⁻¹).

A t-PA-NC-ek elektronmikroszkópiás analízise nanoméretű szerkezeteket és körülbelül 100 nm átlagos vasmagátmérőt mutat (**4. ábra**), míg vizes oldatban a nanokomponensek átlagos ≈ 150 nm-es hidrodinamikai átmérőjét mutatnak. A t-PA-NC stabilitását normál

sóoldatban (0,90% w / v NaCl) mérjük hét egymást követő napon. Az első napon belül mérsékelt méretcsökkenést figyeltük meg, majd a következő 6 napban a hidrodinamikai átmérő általános változása az átlagérték 10% -án belül maradt. A t-PA-NCs-k felületi bevonata kissé negatív, körülbelül -18 mV elektrosztatikus feltöltéssel rendelkezik, amely állandó marad az egész megfigyelési periódusban. A hidrodinamikai méret, és a felszíni töltés egy hét alatt megfigyelt apró, de nem szignifikáns változásai megerősítenék a t-PA-NC-k fiziológiai körülmények között fennálló stabilitását.

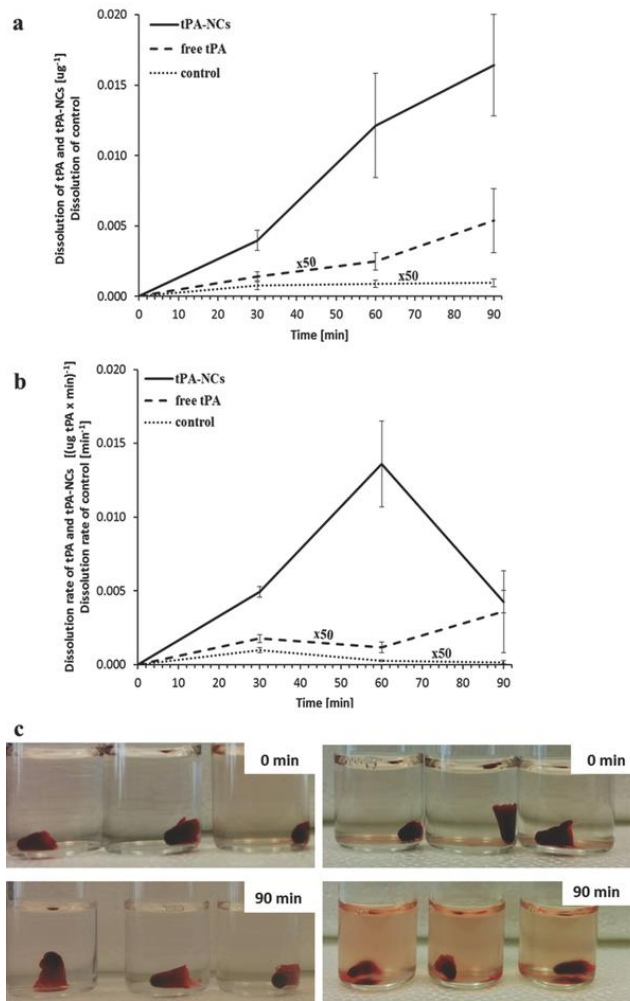
Ahhoz, hogy megállapítsuk a felületen kötött t-PA mennyiségét, zöld fluoreszcens jelöléssel ellátott t-PA (FITC-t-PA) állítpttunk elő. Így a t-PA-NC-kkel társított fluoreszcens jel mérésével kvantáltuk a nano-konstrukció felszínén adszorbeált t-PA mennyiségét. A FITC-t-PA molekulák számához viszonyított optikai abszorbancia kalibrációs görbéjének felvétele után a kötött t-PA mennyiségét $9,6 \pm 1.014$ nano-konstrukcióra vonatkoztatva. Hasonló protokollt követve a t-PA molekulák felszabadulását különböző időpontokban és hőmérsékleteken végeztük. Ezeket a kísérleteket 10% szérum oldatban, enyhe keverés mellett végeztük. Amint az várható volt, megfigyelhető, hogy a felszabadult t-PA mennyisége idővel és hőmérsékleten növekszik. 3 órás incubálás után 25°C -on nem észleltük felszabadulást, míg a $\approx 2\%$ -os felszabadulást 37°C és 42°C -on mértük. 12 órás inkubáció után 25°C -on $\approx 2\%$ -os felszabadulást észlelünk, ami 37°C és 42°C -on $\approx 7\%$, illetve 15% . 24 órás inkubálás után a felszabadult t-PA százalékos aránya 6% , 32% , illetve 63% , 25°C , 37°C és 42°C -on.

Trombus oldás hatékonyságának mérése in vitro környezetben

Két különböző vizsgálati eljárásban hasonlítottuk össze a tPA NCs (nanopartikulum csoport) és a szabad tPA vérrög feloldásának képességét: egy statikus és egy dinamikus vizsgálatban. Három teszt csoportot hasonlítottunk össze: a) kontrol csoport, ahol a vérrögök nem voltak kezelve; b) szabad tPA, amely csoportot $100\ \mu\text{mg}$ szabad hatóanyaggal kezeltünk; és c) tPA-NCs csoport, amelyhez a fent leírt tPA-NCs nanopartikulumokat adtuk. A kísérlethez

szükséges vérrögöket ex vivo módon képeztük. Röviden, 100 μ L friss, teljes vért vegyítettünk 50 U trombinnal 2 ml-es Eppendorf centrifuga csövekben, majd a csöveket 3 napig 4°C-n tartottuk, hogy a trombusok szerkezete megfelelően kialakuljon, és stabilak legyenek.

A **5. ábra** a statikus kísérlet 0. és 90. percét mutatja be: 3 ml fiziológiás sóoldatba helyeztünk minden vérrögöt, és a csoportnak megfelelően kezeltük a trombusokat (a szabad tPA csoport nem látható a képen). A vérrög-oldódás nyomon követéséhez a 0., 30., 60., és 90. percben mintát vettünk minden üvegcséből, és 96 lyukú plate-re helyeztük; majd spektrofotométer segítségével mértük az oldott hemoglobin mennyiségét (OD_{415}). A kapott eredményeket a **5. ábra** ábrán kerülnek bemutatásra. Amint várható volt, a kontroll csoport esetében idővel kismértékű oldódás figyelhető meg, ez a fibrin hálózat spontán degradációjával magyarázható. Ezzel szemben a szabad hatóanyag és a tPA-NCs által kezelt vérrögök nagymértékben szétestek. Összehasonlítva a két csoportot, jól látszik, hogy a nanopartikulumok két nagyságrenddel hatékonyabban bontják fel a fibrin hálót, mint a hagyományos gyógyszer molekulák. Fontos kiemelni azt a tényt, hogy a nanopartikulumok az első 30 percben jelentősen gyorsabban képesek elbontani a vérrögöt, amely sok esetben a beteg életét mentheti meg, ugyanis ha az elzárt érszakasz előbb válik szabaddá, akkor a szöveti károsodás mértéke is csökkenhet.

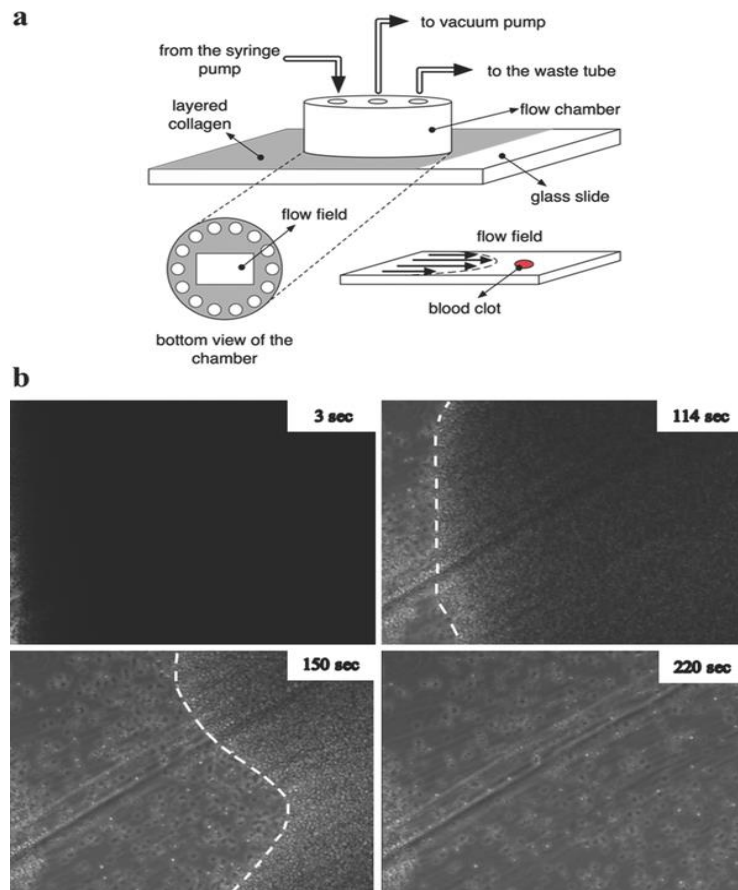


5. ábra: Trombus oldás hatékonyságának mérése statikus körülmények között. a) reprezentatív képek a kontroll és a tPA-NCs nanopartikulumokkal kezelt csoportokról, a kísérlet 0. és 90. percében. b) Az oldódás és az oldódás sebességének változása az idő függvényében

A dinamikus kísérlet vázlatosan a **6. ábrán** látható. A képen jól látható, hogy a vérrög a kamra közepén helyezkedik el, az áramlásra merőlegesen. A kísérlet ideje alatt egy pumpa biztosította az egyenletes áramlást $64.516 \mu\text{l} \times \text{min}^{-1}$ sebességgel. A kísérlet ideje alatt 1 ml oldatot tartalmazó tPA-NCs vagy azzal egyenértékű térfogatú szabad tPA-t injektáltunk a vérrög bal oldaláról, a jobb oldalon pedig elvezettük a folyadékot. A vérrögök lízisét fénymikroszkóppal követtük nyomon.

A **6.b ábrán** reprezentatív felvételeket láthatunk egy tPA-NCs-t tartalmazó oldattal elvégzett kísérletből. A kezdő időpillanatban egy sűrű, fekete tömeg figyelhető meg, ez az ép,

kezeletlen vérrög. A következő képen a kísérlet 114. másodpercénél a fehér, szaggatott vonal jelöli a vérrög határát. Az előző képhez hasonlítva a vérrög frontvonala beljebb került mintegy 1 mm-rel. Továbbá a 150. másodpercénél a trombus jól észrevehetően veszített tömörségéből, az intakt vörösvérsejtek is megfigyelhetők már. A 220. másodpercben pedig megtörtént a teljes lízis, a vérrög teljesen eltűnt a látómezőből. A kísérletet elvégeztük szabad hatóanyaggal is (az ábrák nem kerülnek bemutatásra), ahol azt tapasztaltuk, hogy 300 másodperc elteltével a vérrög szerkezete fellazult, azonban a vérrögök degradációja nem kezdődött meg.



6. ábra: Trombus oldás hatékonyságának mérése dinamikus körülmények között: a) sematikus ábrázolása a flow chambernek. A vérrög a kamra közepén kollagénnel van rögzítve, a folyadékáram állandó sebességgel balról érkezik. A trombus oldódását egy mikroszkóp segítségével lehet nyomon követni b) Reprezentatív felvételek egy tPA-NCs-t tartalmazó oldattal elvégzett kísérletből. A fehér szaggatott vonal jelöli a vérrög határát.

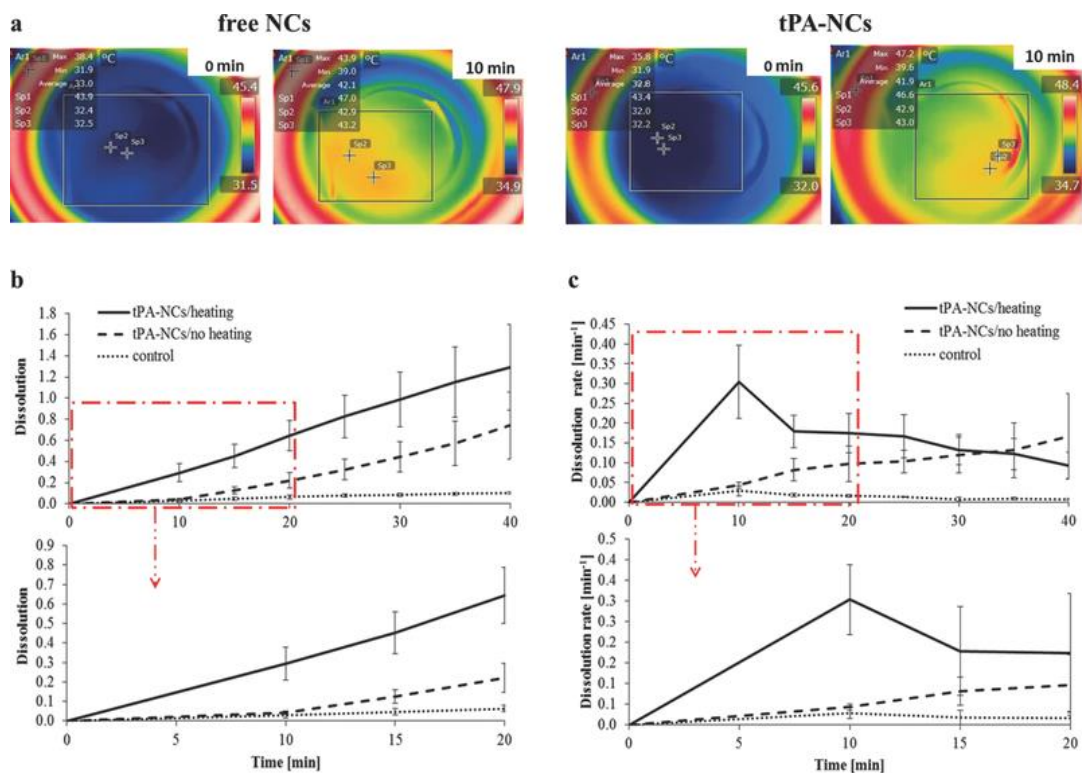
Vérrög oldás hipertermia segítségével

Régóta ismeretes, hogy bizonyos mágneses részecskék (pl. vas-oxidok) a különféle szövetek hő terápia kezelésére, hipertermiára alkalmasak. A nanomágneseket tartalmazó mágneses folyadékot a célszövetbe juttatnak, majd külső mágneses teret alkalmaznak. A tér hatására az eredetileg random elhelyezkedésű mágneses momentumok az erővonalaknak megfelelően orientálódnak. A szuper-paramágneses nanorészecskék a külső mágneses tér kikapcsolását követően kétféle mechanizmus szerint térhetnek vissza a nyugalmi állapotukba: a) hőmozgással (Brown-mozgás), méretüknél fogva egy mágneses egységként (doménként) illetve b) Néel-rotáció útján, ahol csak a momentum fordul vissza az eredeti állapotába. Ha váltakozó mágneses teret használunk, akkor az orientálódás és a relaxáció a tér frekvenciájának megfelelő gyorsasággal váltakozik.

A késleltetett mágneses relaxáció eredményeként bekövetkező, a mágneses energia hőenergiává alakulása során tapasztalható hő effektus nagymértékben függ a részecske mágneses tulajdonságaitól, amely főként a méretük és a mikroszerkezetük függvénye. Az enyhébb hipertermia kezelés (42-45 °C) a kemoterápiával együtt alkalmazva várhatóan növeli annak hatékonyságát, míg magasabb hőmérsékleten (> 50 °C) a sejtek pusztulása (nekrózis, nem programozott sejthalál) következik be.

Jól ismert tény, hogy a szöveti plazminogén aktivátor (tPA) optimális működési hőmérséklete 42-45°C. Ennek ismeretében a szuper-paramágneses nanopartikulumokat és a tPA-t hordozó nanopartikulumokat is változó mágneses térnek tettük ki, és egy hő-kamera segítségével hő-térképet készítettünk. Mindkettő esetben 10 perc elteltével jelentős hőmérséklet-emelkedést mértünk; a vas-oxid partikulumok esetében 46.9 ± 1.7 °C maximum hőmérsékletet értünk el, míg a szabad tPA-t hordozó partikulumok esetében 49.6 ± 1.3 °C lett a maximum hőmérséklet (**7. ábra**).

Ezután vizsgáltuk, hogy a magasabb hőmérséklet hogyan befolyásolja a vérrög oldódást. Három csoportot hasonlítottunk össze: a) kontroll csoport, amely vérrögök semmilyen kezelést nem kaptak, b) hőkezelés nélküli csoport, ahol a vérrögökhöz tPA-NCs nanopartikulumokat adagoltunk, de nem alkalmaztunk változó mágneses teret, és végül c) ahol a vérrögökhöz tPA-NCs nanorészecskéket adtunk, és 10 percig változó mágneses térbe helyeztük. Mindhárom esetben a lízist 40 percen át mértük, a fent említett spektrofotometriás módszer segítségével. A várakozásoknak megfelelően a melegített csoportban a degradáció sokkal jelentősebb, mint a melegítés nélküli csoportban. Fontos kiemelni, hogy ez a különbség az első 10 percben a legmarkánsabb, amikor a melegítés folyamatos (7. ábra; piros szaggatott téglalapok az első 10 perc kinagyítása). Ez is mutatja, hogy egy kombinált terápia mennyivel hatékonyabb trombus oldást eredményez, a vérrögök degradációja gyorsabbá és hatékonyabbá tehető.

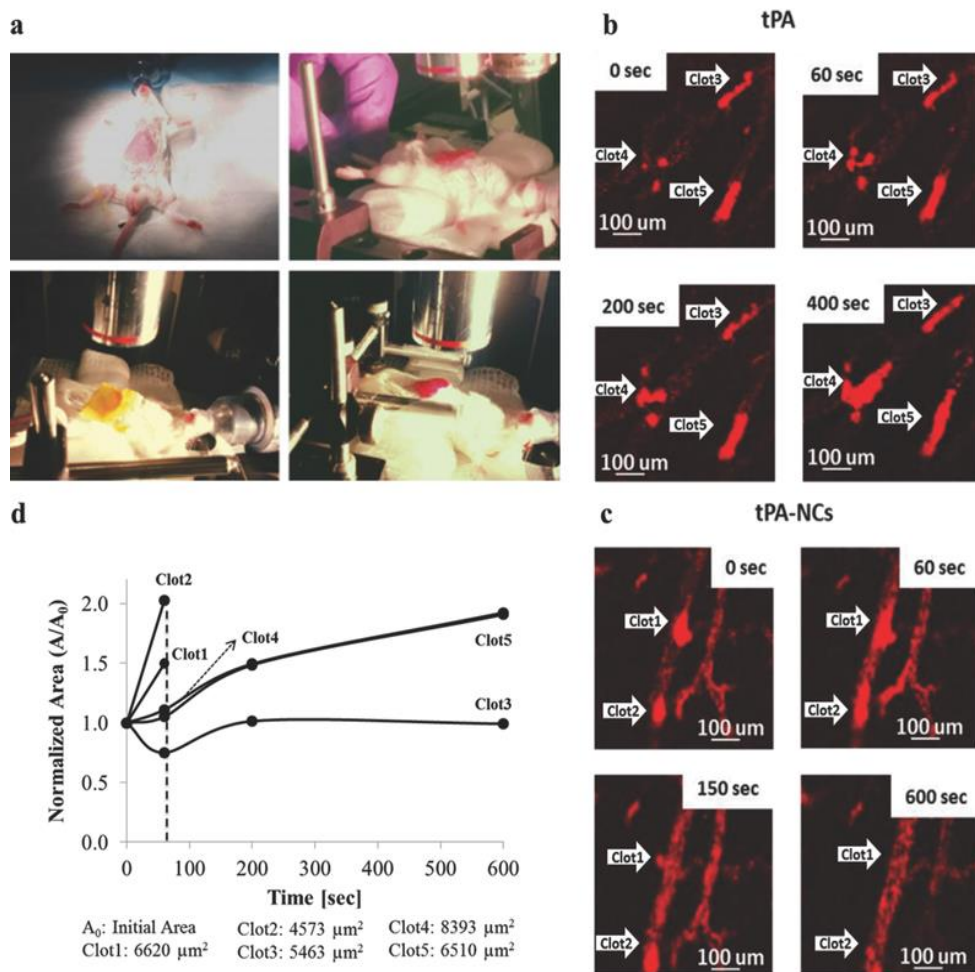


7.ábra: Vérrög oldás hipertermia segítségével. a) szuper-paramágneses vas-oxid nanopartikulumok (NCs) és tPA-NCs nanopartikulumok hőterképe 0. és 10. percben változó mágneses térrel való kezelés esetében b) trombus Az oldódás és az oldódás sebességének változása az idő függvényében, változó mágneses térrel való stimulálással, illetve annak hiányában

tPA-NCs nanorészecskék trombolitikus aktivitásának jellemzése in vivo környezetben

Egér vas(III)-klorid artériás sérülés modellt dolgoztunk ki a partikulumok tesztelésére in vivo körülmények között. A trombusok degradációját pedig intravital mikroszkóp technika segítségével követtük nyomon. Röviden összefoglalva, az egereket 2,5-3% isoflurán adagolás segítségével altattuk, majd a vörösvérsejteket és trombocitákat fluoreszcensen megjelöltük (az **8. ábrán** piros színnel látszanak a trombociták). Ezután egy bemetszést ejtettünk az egér hasfalán, és egy vas(III)-kloriddal átitatott szűrőpapírral roncsolást hoztunk létre a mesenterialis érrendszerben. A roncsolás hatására a hajszálerekben trombusok alakultak ki, amit a intravital fluoreszcens mikroszkóp segítségével nyomon tudtunk követni. Amint kialakultak a trombusok a farki vénán át intravénásan adagoltuk a) a kontroll csoport esetében 200 µL fiziológias sóoldatot; b) 100 µg tPA-t, 200 µL fiziológias sóoldatban feloldva; c) 100 µg tPA-NCs partikulumot 200 µL fiziológias sóoldatban. A vérrögök degradációját 10 percen át monitoroztuk.

Jelentős eltéréseket tapasztaltunk a két kísérleti csoport között. A szabad hatóanyag esetében (**8b. ábra**) a 3., 4., és 5. számmal jelölt vérrög teljesen elzárja az érszakaszt, áramlást egyáltalán nem tudtunk detektálni. A tPA beadása után a vérrögök nem kezdtek el oldódni, sőt, a 10 perc után még nagyobb méretűek lettek (egy kísérlet eredménye kerül bemutatásra, azonban minden csoport esetében 3 állattal végeztük el a tesztet). Ezzel szemben a tPA-NCs csoport esetében a partikulumok szinte azonnal, a beadásuk után képesek voltak a vérrögök degradációját megkezdeni. Az **8.c ábrán** 1. és 2. számmal jelöltük a megfigyelt vérrögöket. Szembetűnő, hogy 150 másodperc után az érszakaszban már részben helyreállt a keringés, a 10. perc végén pedig a vérrögök teljesen feloldódtak, a keringés teljesen helyreállt.



8. ábra: tPA-NCs nanorészecskék trombolitikus aktivitásának jellemzése in vivo környezetben. Reprezentatív képek a mesenterialis érrendszerben létrehozott trombus oldásról különböző időpillanatokban, szabad hatóanyagot, vagy tPA-NCs oldatot adagolva.

Összegzés

Eredményeink azt mutatják, hogy egy erős, klinikailag alkalmazott trombolitikus gyógyszerhatóanyagot - szöveti plazminogén aktivátor, tPA - hatékonyan lehet immobilizálni vas-oxid alapú nanopartikulumok felületén, és célzott vérrög oldást végezni. Ezek a gyógyszer szállító partikulumok (tPA-NCs) bebizonyították, hogy több nagyságrenddel hatékonyabban képesek a vérrögöket degradálni a szabad tPA-hoz képest; illetve képesek rekanalizációt megvalósítani az elzáródott érszakaszokban. Az effektív hatóanyag célbejuttatás csökkenti a vérrög lízisének idejét, illetve csökkenti a szükséges tPA mennyiséget, ami

mérsékeli a mellékhatások kialakulásának kockázatát. A nanopartikulumok potenciálisan lehetőséget adnak a trombusok magas hőmérsékletű helyi kezelésére, akár magas intenzitású fókuszált ultrahang segítségével.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom az PTE-AOK Radiológia Intézet és I.sz. Belgyógyászati Klinika minden munkatársának, akik doktori tanulmányaim során segítségemre voltak. Külön köszönet illeti témavezetőimet Dr. Battyáni Istvánt és Dr. Tóth Kálmánt, akik segítették doktori munkám elvégzését, valamint segítséget nyújtottak az eredményeim értelmezésében, megfogalmazásában és publikálásában. Hálásan köszönöm Dr. Deres László önzetlen és kitartó segítségét, akinek az évek során megszerzett állatházás gyakorlati tudásom legnagyobb részét köszönhetem, és akinek szigorúan lényegretörő, de mindig egyenes, emberséges, biztató szavai és tettei nélkül a dolgozatom nem jöhetett volna létre. Köszönettel tartozom Dózsa Tímeának a mérések elvégzésében nyújtott segítségéért. Köszönetemet fejezem ki Dr. Halmosi Róbertnek és Dr. Riba Ádámnak a hasznos diszkusszióért.

Megköszönöm Édesanyámnak és Édesapámnak, és testvéreimnek és barátaimnak az önzetlen támogatást, biztatást, hogy anyagi és erkölcsi alapot teremtettek tanulmányaim elvégzéséhez.

Végül, de nem utolsósorban, szeretném kifejezni hálámat Dr. Giacomo Brunonak, kifogyhatatlan támogatását és folyamatos ösztönzését az évek során

Köszönöm.

Vörös Eszter

A DOLGOZATHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

2017

1. Eszter Vörös, László Deres, Róbert Halmosi, Edit Váradi, Kálmán Tóth, István Battyáni
Interactions between iodinated contrast media and tissue plasminogen activator: In vitro comparison study
CLINICAL HEMORHEOLOGY AND MICROCIRCULATION: 66(2): p. 167-174. (2017.)
Impact factor: 1.69

2016

2. Eszter Vörös., Cho M., Garami Z., Battyáni I., Decuzzi P., Tóth K.
T-PA immobilization on iron oxide nanocubes and localized magnetic hyperthermia accelerate blood clot lysis
ECR 2016 Book of Abstracts - E - Authors' Index. Insights into Imaging, 2016. 7(1): p. 475-525

2015

3. Eszter Vörös, Cho Minjung, Ramirez Maricela, Palange Anna Lisa, De Rosa Enrica, Key Jaehong, Garami Zsolt, Lumsden Alan B, Decuzzi Paolo
T-PA Immobilization on Iron Oxide Nanocubes and Localized Magnetic Hyperthermia Accelerate Blood Clot Lysis
ADVANCED FUNCTIONAL MATERIALS: (11) pp. 1709-1718. (2015)
Impact factor: 12.12
4. Eszter Vörös, Minjung Cho, Garami Zsolt, Paulo Decuzzi, Tóth Kálmán, Battyáni István
Vas oxid alapú nanoparticulomokhoz kötött t-PA és hypertermia kombinációjával végzett célzott thrombus oldás
In: X. IME Jubileumi Képalakotó Diagnosztikai Továbbképzés és Konferencia. Konferencia helye, ideje: Budapest, Magyarország, 2015.03.26 Budapest: LARIX Kiadó Kft., pp. 72-77.
6. Eszter Vörös, Minjung Cho, Garami Zsolt, Decuzzi Paolo, Tóth Kálmán, Battyáni István
Vas oxid alapú nanoparticulomokhoz kötött t-PA és hypertermia kombinációjával végzett célzott trombus oldás
IME: INTERDISZCIPLINÁRIS MAGYAR EGÉSZSÉGÜGY / INFORMATIKA ÉS MENEDZSMENT AZ EGÉSZSÉGÜGYBEN 14:(8) pp. 62-66. (2015)

A DOLGOZATHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

2017

1. Grishma Khanal, Rose-Ann Huynh, Kian Torabian, Hui Xia, Eszter Vörös, Sergey S Shevkoplyas
Towards bedside washing of stored red blood cells: a prototype of a simple apparatus based on microscale sedimentation in normal gravity
VOX SANGUINIS 5: pp. 167-175. (2017)
Impact factor:2.85
2. Hui Xia, Grishma Khanal, Briony C Strachan, Eszter Vörös, Nathaniel Z Piety, Sean C Gifford, Sergey S Shevkoplyas
Washing in hypotonic saline reduces the fraction of irreversibly-damaged cells in stored blood: a proof-of-concept study: Hypotonic washing of stored RBCs
BLOOD TRANSFUSION (2017)
Impact factor:1.61

2016

3. Eszter Vörös, Nathaniel Z Piety, Sergey S Shevkoplyas
A Simple Disposable Device for Bedside Washing of Stored Red Blood Cells.
Konferencia helye, ideje: Orlando, Amerikai Egyesült Államok, 2016.10.22-2016.10.25.
Wiley-Blackwell Publishing Ltd., 2016. 1 p. (56.) (ISBN:07030-5774)
4. Eszter Vörös, Nathaniel Z Piety, Sergey S Shevkoplyas
A Simple Disposable Device for Bedside Washing of Stored Red Blood Cells
Konferencia helye, ideje: Minneapolis, Amerikai Egyesült Államok, 2016.10.05-2016.10.08.
2016.

2013

4. Eszter Vörös, Horváth A, Sveiczzer A
Length growth patterns in the mitotic cycle of large fission yeast cells
ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA 60: pp. 107-108. (2013)

2012

5. Horváth A, Rácz-Mónus A, Eszter Vörös, Sveiczzer Á
Sejtnövekedési mintázatok vizsgálata a hasadó élesztőben. Cell growth pattern analysis in fission yeast
MIKOLÓGIAI KÖZLEMÉNYEK-CLUSIANA 51: pp. 44-45. (2012)

2011

6. Horváth A, Rácz-Mónus A, Eszter Vörös, Sveiczzer Á
Cell length growth patterns and size control in fission yeast mutants
ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA 58:(Suppl.) p. 157. (2011)

**Studies on tissue plasminogen activator: efficiency of
thrombolysis in the presence of iodinated contrast media and
development of a novel targeted tPA delivery system**

PhD thesis booklet



Author: Eszter Voros

Head of the Doctoral School: Prof. Dr. Kovacs L. Gabor M.D. D.Sc.

Head of the Doctoral Program: Prof. Kalman Toth M.D., Ph.D., Sc.D.

Supervisors: Prof. Istvan Battyani M.D., Ph.D., and
Prof. Kalman Toth M.D., Ph.D., Sc.D.

University of Pécs, Medical School, Hungary

Radiology Department, Pécs, Hungary

First Department of Medicine, Pécs, Hungary

Pécs, 2017

Introduction

In Western world the obstruction of critical blood vessels due to thrombosis is the leading cause of death: acute ischemic stroke, deep vein thrombosis (DVT), pulmonary embolism (PE), and acute ischemic stroke (AIS) are the major causes of cardiovascular mortality, which results in over 1 million deaths each year in the US. Thrombosis is responsible for most of the pathophysiology of these diseases. Thrombolytic drug therapy can reduce mortality, and this therapeutic approach has been widely used in thrombosis treatment. Although a number of thrombolytic drugs are currently available, tissue plasminogen activator (t-PA) is currently the only US Food and Drug Administration-approved therapy for lysis of fibrin clot in treating ischemic stroke.

t-PA is a serine protease that converts the zymogen plasminogen to plasmin, which initiates the process of lysis of the fibrin clot (fibrinolysis). As t-PA has a very short life in plasma (half-life \approx 5 minutes), it needs to be administered at a high dose for a prolonged period of time in order to maintain an effective drug level during thrombolytic drug therapy, which leads to degradation of clotting factors and hemorrhage. It will therefore be highly desirable to deliver t-PA under guidance for targeted thrombolysis, which will allow t-PA to be localized to the target site and reduce its hemorrhagic side effects.

The major treatment strategy for DVT, PE, heart attack, and AIS is pharmacological reperfusion using intravenous t-PA. In some cases, multimodal computed tomography (CT) is performed prior to t-PA administration. While this multimodal approach provides greater information than non-contrast CT alone, radiographic contrast agents may interfere with thrombolytic therapy. The relationship between the dosage of iodinated contrast media and the efficiency of the fibrinolysis via rt-PA is poorly understood in patients receiving intravenous tissue-type plasminogen activator. Thus, in this study, we compare the effect of five different

contrast media such as Xenetix® (iobitridol), Ultravist® (iopromide), Omnipaque® (iohexol), Visipaque® (iodixanol) and Iomeron® (iomeprol) on fibrinolysis via t-PA.

Thrombolysis in clinical practice

Coagulation or blood clotting is a very important biological process which transfers the liquid blood to solidify. It is fundamental to form blood clots when we have an injury that reaches the blood vessels. Clotting can prevent us from bleeding to death and protect us from the entry of bacteria and viruses. However, clots can also form inside our body, without surface injury, when a blood vessel is injured. The human body can make clots and breaks them down once there is no need for them anymore.

Mostly there is a healthy balance between these two activities. In some cases, abnormal blood clotting occurs; some people's body may not be able to break the clots down. On the other hand, an oversized clot inside a blood vessel is extremely dangerous because it can easily block the blood flow in the vessel. Thus, because of the lack of flow, indispensable organs will not obtain enough oxygen. These situations can be dangerous and require an immediate diagnosis and treatment.

Computed Tomography vs. Magnetic Resonance Imaging for Thrombosis

During the 1990s, computed tomography (CT) and magnetic resonance (MR) imaging changed significantly due to the technological advancement and expanded clinical use in patients with thromboembolic disease, particularly with regard to the pulmonary vasculature, acute ischemic stroke, deep vein thrombosis, pulmonary embolism or heart attack. In countless institutions, helical CT pulmonary angiography has become the basic imaging study choice to evaluate patients with suspected thrombolysis. In addition, CT venography of the pelvis and lower extremities is often incorporated into the CT angiography protocol to identify or exclude concurrent deep venous thrombosis.

Although MR imaging produces high tissue contrast without ionizing radiation, currently, this technique is less popular than CT for evaluation of acute venous thromboembolism (VTE) because of technical limitations, higher costs, limited availability, and other logistical considerations. As technology improves, however, MR pulmonary angiography (MRPA) and MR venography (MRV) may play a greater role in the evaluation of patients with venous thromboembolic disease.

Negative side effect of iodinated contrast media for thrombolysis

Iodinated contrast media are widely used either to visualize blood vessels (angiography) or to increase the density between different organs and tissues. In both cases, they are infused intravascularly and theoretically, there is no interaction between media and other presenting drugs. However there is a concern for a possible interaction between x-ray contrast agents and thrombolytic therapy; since contrast enhanced computed tomography (CT) evaluation is performed prior to rt-PA administration for localizing a thrombus [40] and this multi-phase approach provides greater information than non-contrast CT alone. Clinical data from the cardiology literature propose that rt-PA induced thrombolysis in the presence of both ionic and nonionic iodinated contrast agents notably slows down. However, in current clinical practice, the interaction between contrast agents and fibrinolysis is marginal due to the importance of the mechanical recanalization techniques.

Radiographic iodinated contrast media

Since their introduction in the 1950s, organic radiographic iodinated contrast media (ICM) have been among the most commonly prescribed drugs in the history of modern medicine. The phenomenon of present-day radiologic imaging would be lacking without these agents. ICM generally have a good safety record. Adverse effects from the intravascular administration of ICM are generally mild and self-limited; reactions that occur from the

extravascular use of ICM are rare. Nonetheless, severe or life-threatening reactions can occur with either route of administration.

All currently used ICM are chemical modifications of a 2,4,6-tri-iodinated benzene ring (**Figure 1**). They are classified based on their physical and chemical characteristics, including their chemical structure, osmolality, iodine content, and ionization in solution. In clinical practice, categorization based on osmolality is widely used. Osmotic effects of contrast media that are specific for the kidney include transient decreases in blood flow, filtration fraction, and glomerular filtration rate. Secondary effects include osmotically induced diuresis with a dehydrating effect.

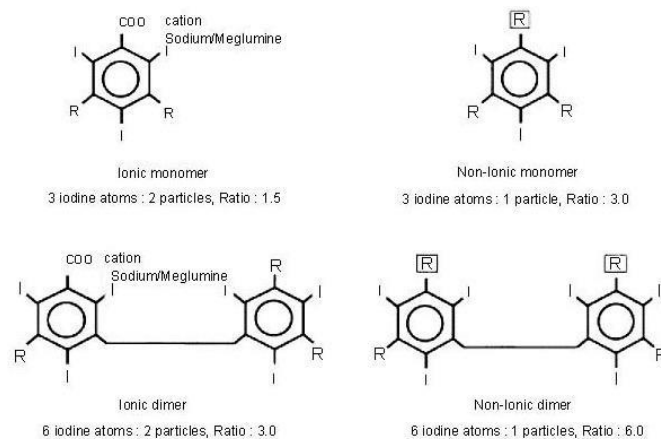


Figure 1: Chemical modifications of a 2,4,6-tri-iodinated benzene ring

Numerous methods were established to develop an in-vitro clot lytic model for understating the effect of ionic and nonionic iodinated contrast agents on rt-PA; notwithstanding the most reliable way to investigate clot lysis activity of rt-PA is through vitro clot lysis model. However, these approaches might contain the differences of patients such as age, gender, medical history or lifestyle. The present paper is aimed to study the effect the quantity of presenting iodine on thrombolytic therapy through in vitro clot lysis model.

Nanomedicine – nanoparticles in a clinical practice

The history of the nanotechnology started in 1959 when Richard Feynman introduced the idea of nanotechnology in his famous talk “*There’s plenty of room at the bottom*” at the annual meeting of the American Physic Society. Feynman proposed employing machine tools to make smaller machine tools, and those machine tools would be used to make more smaller machine tools; all the way down to the atomic level. Feynman was clearly aware of the potential medical applications of this new technology.

He imaged a new technology which might allow the scientists to manipulate the materials at its basic elements: the single atoms. A few years later, in 1974, Norio Taniguchi named this field to nanotechnology. Despite of the fact that scientists applied this design for years, nanotechnology became an individual scientific field just in 1981. Since then, 35 years of research and development, nanotechnology infiltrates in almost every field of science and industry, from biology to construction science, including electronic and environment control [49-52]; bringing new promises into each field. Nanotechnology is a revolutionary way of understanding technology and manufacturing in different sectors of industries such as transportation, nuclear weapons, detection systems, and telecommunications.

Introduction to Magnetic Nanoparticles

Several fields utilize the properties of magnetic nanoparticles (MNPs) in various biochemical and biomedical applications including bacterial detection, protein purification, enzyme immobilization, cell separation, drug delivery, hyperthermia, and MRI imaging. Magnetic nanostructures are well-established nanomaterial with controlled size, ability to be manipulated by an external magnetic field, and enhancement of contrast in magnetic resonance imaging. The core component for synthesizing MNPs is colloidal magnetite or hematite (Fe_3O_4).

Iron and its compounds are widespread in nature and successfully synthesized in the laboratory. Iron compounds present in the hydrosphere, the lithosphere and (as pollutants) in the atmosphere. Iron is a biogenic element, present in all biota, but some iron compounds can cause harmful effects to humans, animals, and environment. In occupational exposure of humans, iron and iron oxides are known to produce benign siderosis – but iron oxides have been implicated also as a vehicle for transporting high concentrations of carcinogens and sulfur dioxide deep into the lungs, thereby enhancing the activity of these pollutants. In most of these compounds, iron is in the trivalent state, but FeO and Fe₃O₄ contain Fe(II) .

The two most commonly studied iron oxides have been magnetite (Fe₃O₄) and maghemite (γ -Fe₂O₃). IONPs are found naturally in the environment as particulate matter in air pollution and in volcanic eruptions. Either Fe₃O₄ (magnetite) or γ -Fe₂O₃ (maghemite), particles can be generated as emissions from traffic, industry and power stations but can also be specifically synthesized chemically for a wide variety of applications. Various methods can be employed in their fabrication such as synthesis by water-in-oil micro-emulsion system, co-precipitation, reactions in constrained environments, polyol method, flow-injection synthesis and sonolysis. Magnetic behavior is an important parameter in design and synthesizing of superparamagnetic iron oxide NPs (SPIONs) to maximally facilitate their imaging and therapeutic efficacy as these applications require high magnetization values. Although this can be accomplished by applying a maximum magnetic field acceptable under the clinical settings, the reaction conditions during the synthesis processes can be modulated to generate particle size with a large surface area, which in turn allows these particles to exhibit high magnetic susceptibility.

Aims of the thesis

1. Developing a reliable method to make ex vivo blot clots freshly drawn mouse or rat whole blood. Inducing thrombolysis using t-PA in known concentration and follow the progress of clot lysis over time via spectrometry by measuring the amount of released hemoglobin.
2. Testing the effect on thrombolysis therapy induced by t-PA of five different contrast media such as Xenetix® (iobitridol), Ultravist® (iopromide), Omnipaque® (iohexol), Visipaque® (iodixanol) and Iomeron® (iomeprol) using the developed ex vivo blood clot lysis model.
3. Developing and optimizing a nanocarrier platform which is suitable for targeted delivery of t-PA and other potential thrombolytic drugs using iron oxide core. Developing an alternative protocol for synthesizing labeled nanoparticles to follow up the thrombus lysis at in vitro and in vivo environment
4. Performing the sufficient physical-chemical characterizations such as measuring size, shape, Zeta-potential, stability, calculating the loaded amount of drug into the particles
5. Testing the NPs in in vitro environment with and without flow. Developing a method for making identical thrombus (mouse, pig, human) in ex vivo environment
6. Introducing the NPs into an alternative magnetic field for testing their behavior, measuring the lysis efficiency and time with heating effect
7. Developing a mouse and pig ferric chloride arterial injury model and testing the NPs in in vivo environment using intravital microscopy technique. Performing the remote guidance of NPs via external magnetic fields.

Results

Interactions between iodinated contrast media and tissue plasminogen activator: in vitro comparison study

Blood collection and clotting & in vitro thrombolysis

Forming the rat blood clots, the blood was drawn from 8-10-month-old male WKY-strain Wistar Kyoto rats (Charles River Laboratories, Budapest, Hungary). Blood was obtained from the tail using a 25-gauge needle and 1mL syringe. 100 µl of blood was then aliquoted into several tubes which were containing 50U thrombin solution. The tubes were placed for 3 hours at 37°C to form the blood clots than the clots were aged for 3 days at 4°C.

The rt-PA was obtained from the manufacturer (Activase, Genentech, San Francisco, CA) as a lyophilized powder. The powder was mixed with sterile water to a concentration of 1 mg/mL as per the manufacturer's instructions. Thrombolysis was performed by placing individually the prepared clots in a 15 mL Falcon tubes. The tubes were containing 5.0 mL saline buffer, 100 µg rt-PA and different contrast media Xenetix® (iobitridol), Ultravist® (iopromide), Omnipaque® (iohexol), Visipaque® (iodixanol) and Iomeron® (iomeprol) (see **Table 1**). The quantity of each contrast media was chosen to study the effect of 30 mg or 60 mg iodine, the active substance, for the clot lysis. The dosages were calculated based on the manufactures' given ranges for an average adult patient for intravascular administration. As a reference, there were vials containing 5.0 mL saline buffer and 100 µg rt-PA solutions (positive control) or just 5 mL saline solution (control). For each group, there were 5 clots. The vials were placed into the incubator at 37°C and continuous shaking at 100 rpm for 90 minutes. The OD₄₁₅ (optical absorbance) of the supernatant was measured (plate reader) at time point 0 min, 30 min, 60 min and 90 min to estimate the amount of released hemoglobin at 415 nm.

Table 1.: The physical parameters of the iodine containing contrast media which were used in the current study.

*The dosages given below are recommendations only and represent common doses for an average normal adult weighing 70 kg. Doses are given for single injections or per kilogram (kg) body weight (BW) as indicated below, based on the manufactures' instructions for Intravascular Administration

	Concentration of Iodine [mg /mL]	Brand	Dosage*	Osmolality [mOsm / kg H ₂ O]	Viscosity [mPa s] 37°C	Active Substance
ULTRAVIST	300	Bayer AG	3 – 5 mL per kg body weight	607	4.7	iopromide
IOMERON	300	Bracco S.p.A.	3 – 5 mL per kg body weight	521	4.5	iomeprol
OMNIPAQUE	350	GE Healthcare	2.5 – 4 mL per kg body weight	844	10.6	iohexol
VISIPAQUE	320	GE Healthcare	3 – 4.5 mL per kg body weight	290	11.4	iodixanol
XENETIX	300	Guerbet Corporate	3 – 5 mL per kg body weight	915	10.0	iobitridol

In Vitro thrombolytic efficacy

Two different amounts of the contrast media were used for quantifying the rt-PA efficacy in dissolving blood clots over time: 30 mg or 60 mg of iodine. Dissolution rate, which measures the dissolution velocity, are plotted in **Fig. 2** and **Fig. 3**, as a function of time for the different experimental groups. For the assay, the thrombolytic efficacy was quantified by measuring the optical density (OD₄₁₅) of the supernatant at different time points, namely 0, 30, 60, and 90 minutes while the clots were treated different contrast media such as Xenetix® (iobitridol), Ultravist® (iopromide), Omnipaque® (iohexol), Visipaque® (iodixanol) and Iomeron® (iomeprol).

As expected, only a minor dissolution of the untreated clot (negative control) is observed over time, related to a spontaneous break down of the fibrin network. We found a statistically significant difference in each time point at each group ($p < 0.05$) – except for the negative control. These results suggest that in all cases the rt-PA could dissolve the clots on some level, and as expected, the negative control didn't conduct a considerable thrombus lysis. Next, we analyzed the performance of each contrast media containing group comparing to each other and the positive control group. For the first 30 minutes, there was no significant difference between the groups with contrast media and positive control.

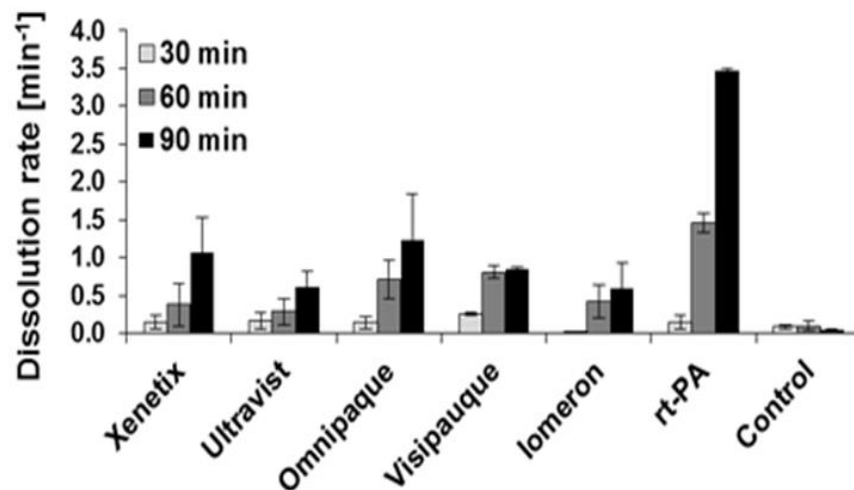


Fig. 2. Dissolution rate of blood clots over time exposed to 100 μg rt-PA in presence the five most commonly used contrast media (Xenetix® (iobitridol), Ultravist® (iopromide), Omnipaque® (iohexol), Visipaque® (iodixanol) and Iomeron® (iomeprol)); each in a concentration of 30 mg of active substance. After 30 minutes, there is a significant ($56.2 \pm 15.6\%$) drop in dissolution rate for the iodine containing groups comparing to the only rt-PA treated group.

In the following time period, significant difference was found between all the contrast media groups and the positive control: a $56.2 \pm 15.6\%$ increase of dissolution rate was noticed for the positive control group compared to all the other samples (**Fig. 2**). With other words, rt-PA itself provides three orders of magnitude higher dissolution rate than clots treated with

Xenetix® (iobitridol), Ultravist® (iopromide), Omnipaque® (iohexol), Visipaque® (iodixanol) and Iomeron® (iomeprol).

The following step was to analyze the 60-mg group. The same analyses were performed. First we confirmed that in the rt-PA treated groups the clot dissolution was successful, some hemoglobin was released. Next, we evaluated each contrast media containing group comparing to each other and the positive control group, and we noticed that same trend as at 30 mg group. Namely, there were no significant differences between the contrast media containing groups, and all the rt-PA containing groups acted similarly in the first 30 minutes. In comparison, the positive control could provide ~100 times higher dissolution rate after the first 30 minutes compared to groups with contrast media (Fig.3).

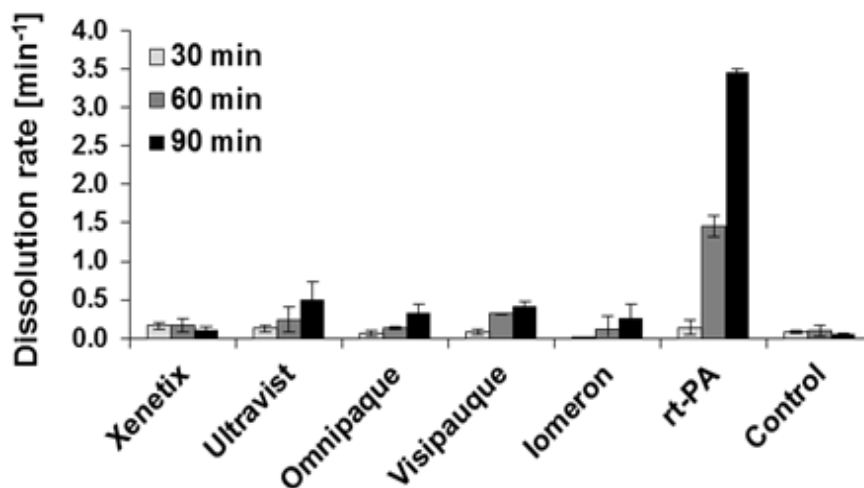


Fig. 3. Dissolution rate of blood clots over time exposed to 100 µg rt-PA in presence the five most commonly used contrast media (Xenetix® (iobitridol), Ultravist® (iopromide), Omnipaque® (iohexol), Visipaque® (iodixanol) and Iomeron® (iomeprol)); each in a concentration of 60 mg of active substance (iodine). After 30 minutes, there is a major ($82.3 \pm 23.9\%$) drop in dissolution rate for iodine containing groups comparing to the only rt-PA treated group.

T-PA Immobilization on Iron Oxide Nanocubes and Localized Magnetic Hyperthermia Accelerate Blood Clot

Physico-Chemical Characterizations of t-PA–NCs

A schematic representation of t-PA–NCs is shown in **Figure 4a** which depicts two main compartments: a metal core, constituted by multiple 20 nm iron oxide NCs clustered together; a surface layer, obtained by mixing t-PA molecules and bovine serum albumin (BSA). The clustered iron oxide nanocubes are synthesized via high temperature thermal decomposition

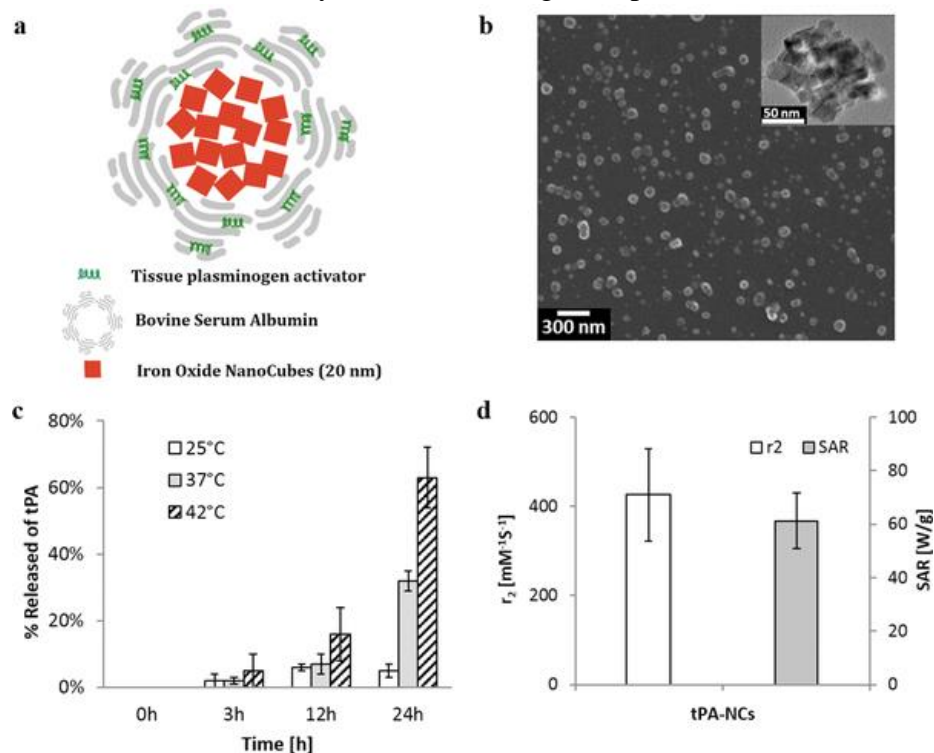


Figure 4: t-PA iron oxide nanocubes (t-PA–NCs). a) Schematic representation of t-PA–NCs showing two main compartments: a cluster of iron oxide nanocubes (NCs) forming the nanoconstruct core; a surface coating of t-PA and serum albumin, forming the external nanoconstruct layer; b) SEM and TEM (inset) images of t-PA–NCs demonstrating a characteristic size of ≈ 150 nm; c) Release of t-PA from t-PA–NCs at different temperatures (25, 37, and 42 °C) and time points (0, 3, 12, and 24 h); d) Transverse magnetic resonance relaxivity (r_2) (1.41T) and specific absorption rate of t-PA–NCs ($f = 512$ KHz; $H = 10$ kA m^{-1}).

method, using iron acetylacetonate as an iron source [129]. The resulting NCs are coated by the t-PA/BSA mixture using an emulsion technique. An electron microscopy analysis of t-PA–NCs reveals nanoconstructs with a quasispherical shape and an average iron core diameter of

about 100 nm (**Figure 4b**). The transmission electron microscopy image in the inset of **Figure 4b** shows multiple 20 nm iron oxide nanocubes clustered together to form the t-PA-NC core. In aqueous solution, the nanoconstructs show an average hydrodynamic diameter of ≈ 150 nm. The stability of t-PA-NCs is measured in normal saline solution (0.90% w/v of NaCl) for seven consecutive days. It is observed a moderate reduction in size within the first day followed by a slight increase toward the end of the characterization period. However, the overall variation in hydrodynamic diameter is limited within 10% of the average value. Also, the polydispersity index (PDI) of t-PA-NCs is quite constant over the 7 days characterization returning an average value of 0.20. The surface coating of t-PA-NCs has a slightly negative surface electrostatic charge of about -18 mV which stays constant for the whole observation period. The minor variations in hydrodynamic size, PDI, and surface charge observed over a week would confirm the high stability of t-PA-NCs under physiological conditions. Furthermore, preliminary toxicity analysis performed on murine macrophages has shown negligible effect on cell viability upon incubation with t-PA-NCs.

To gain insights into the loading and release of tissue plasminogen activator from t-PA-NCs, nanoconstructs were synthesized using a green fluorescent labeled t-PA (FITC-t-PA). Thus, by measuring the fluorescent signal associated with t-PA-NCs, the amount of t-PA adsorbed over the nanoconstruct surface was quantified. After generating a calibration curve relating optical absorbance to the number of FITC-t-PA molecules, the total amount of loaded t-PA was estimated to be 0.749 ± 0.08 μg per 9.6×10^{14} nanoconstructs. Following a similar protocol, the release of t-PA molecules was derived at different times points and temperatures. These experiments were performed in 10% serum solution, under mild agitation, and the resulting data are presented in **Figure 4c**. As expected, it is observed that the amount of released t-PA grows with time and temperature. At 3 h post incubation (p.i.), no release is observed at 25 $^{\circ}\text{C}$, while a $\approx 2\%$ release is measured at 37 and 42 $^{\circ}\text{C}$. At 12 h post incubation, a $\approx 2\%$ release is

detected at 25 °C, which becomes $\approx 7\%$ and 15% at 37 and 42 °C, respectively. After 24 h of incubation, the percentages of released t-PA are 6%, 32%, and 63%, respectively at 25, 37, and 42 °C. Importantly, within the first few hours, most of the t-PA is still associated with the iron oxide core confirming again the stability of the nanoconstruct surface. Moreover, the release of t-PA at 42 °C tend to be larger than at the physiological temperature suggesting that NC heating could efficiently trigger the local release of t-PA molecules. It is here important to note that t-PA molecules can still activate the fibrinolytic pathway while being immobilized on the nanoconstruct surface. In other words, t-PA does not need to be released in order to form plasmin. The magnetic properties of t-PA-NCs were characterized by quantifying the longitudinal r_1 and transverse r_2 MR relaxivities, and the specific absorption rate (SAR) for magnetic hyperthermia. The nanoconstructs showed a r_2 of $\approx 450 \times 10^{-3} \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and a SAR of $\approx 60 \text{ W g}^{-1}$ (**Figure 4d**), which are among the highest values so far reported in the literature for iron oxide nanoconstructs.[18] The iron encapsulation efficiency, defined as the percentage of iron in the t-PA-NCs over the initial input, was of $66\% \pm 5.6\%$ as measured via ICP-OES.

In Vitro Thrombolytic Efficacy of t-PA-NCs

Two different assays were used for quantifying the t-PA-NC efficacy in dissolving blood clots over time: a static assay, where blood clots were exposed to the thrombolytic agents (free t-PA and t-PA-NCs) in a quiescent fluid; a dynamic assay, where blood clots entrapped within a parallel plate flow chamber were exposed to a flowing solution of thrombolytic agents.

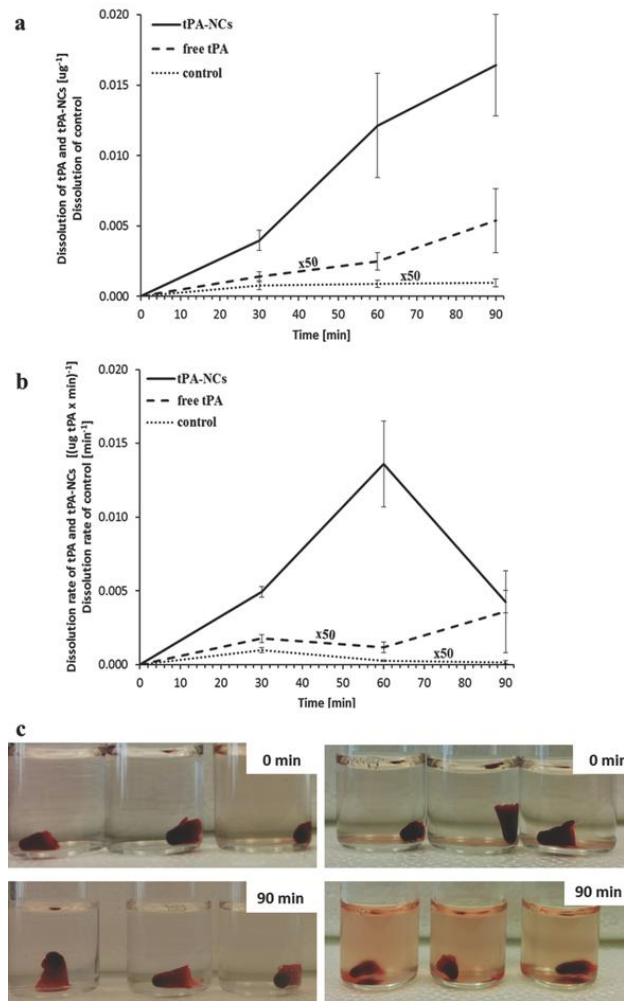


Figure 5: Blood clot dissolution under static conditions. a,b) Dissolution and dissolution rate of blood clots over time exposed to t-PA-NCs, free t-PA, and saline solution (control). Data are normalized by the amounts of t-PA. c) Representative images of blood clots at 0 and 90 min post incubation with saline solution (left) and t-PA-NCs (right).

For the static assay, **Figure 5** show representative images of blood clots at 0 and 90 min, post incubation with thrombolytic agents. Three experimental groups are considered, specifically free t-PA; t-PA-NCs; and control whit clots in a saline solution. The thrombolytic efficacy was quantified by measuring the optical density (OD415) of the supernatant at different time points, namely 0, 30, 60, and 90 min post incubation. The dissolution, which is related to the amount of lysed clot, and the dissolution rate, which measures the dissolution velocity, are plotted in **Figure 5**, respectively, as a function of time and for the three different experimental groups. As expected, only a minor dissolution of the untreated clot (control) is observed over time, related to a spontaneous break down of the fibrin network. On the other

hand, the free drug and t-PA-NCs dissolved the blood clots efficiently (**Figure 5b**). In particular, the t-PA nanoconstructs provide two orders of magnitude higher dissolution and dissolution rate as compared to the conventional drug. **Figure 5c** presents representative images of blood clots at different time points, treated with t-PA-NCs or untreated (control). These images clearly show the progressive lysis of the clots treated with t-PA-NCs, where t-PA breaks down the fibrin mesh releasing the red blood cells and inducing a progressive red coloration of the solution.

Next, the thrombolytic efficacy of the t-PA-NCs was assessed in a dynamic assay. In this case, a blood clot was deposited over a microscope glass slide. This slide was assembled in a parallel plate flow chamber apparatus, as schematically shown in **Figure 6**, eventually mounted on the stage of a microscope. The blood clot was placed in the middle of the chamber deck, partially occluding the flow section. Using a syringe pump, a solution of t-PA-NCs was infused within the parallel plate flow chamber, reaching the blood clot on the left hand side. The blood clot was continuously monitored by light microscopy over a period of 10 min and images of the clot boundaries were taken at different time points (**Figure 6**). At time 0, the region of interest appeared black for the dense clot. Then, clot lysis started to occur with the infusion of the t-PA-NC solution. At 114 s, the left border of the clot (dashed white line) regressed by ≈ 1 mm, and even more at 150 s when the remaining mass of the clot appeared far

less dense. The t-PA-NCs solution induced a complete lysis of the clot within the field of view already at 220 s (**Figure 6**).

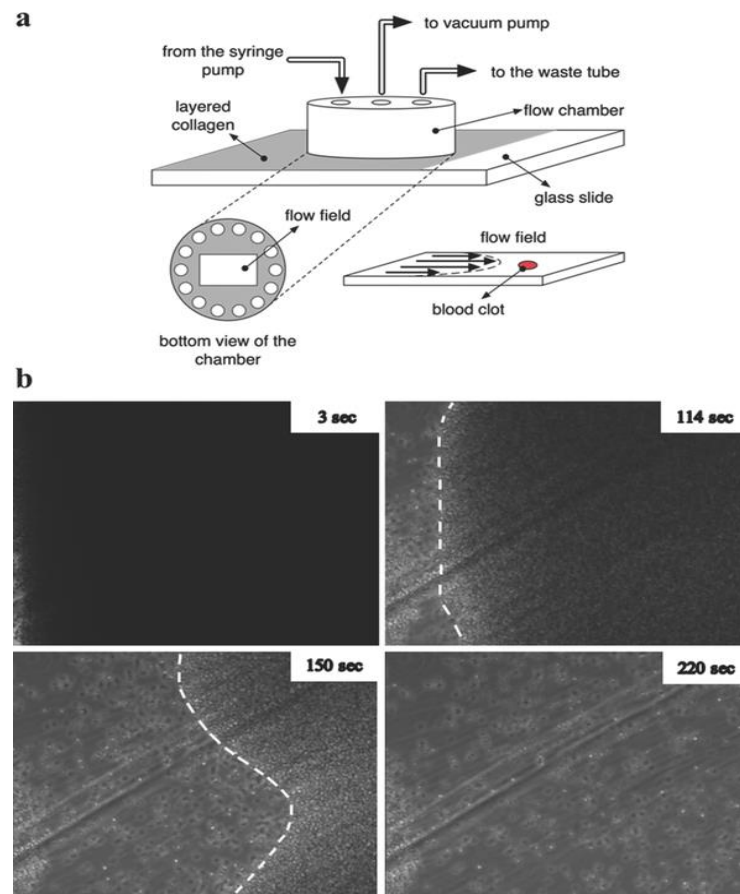


Figure 6: Blood clot dissolution under dynamic conditions. a) Schematic representation of a parallel plate flow chamber system used for reproducing vascular flow. A partially occluding blood clot is deposited in the middle of the chamber over a microscopy glass slide coated with collagen; b) Images of the upstream boundary of a blood clot exposed to a continuous flow of t-PA-NCs. The white dashed line identifies the blood clot upstream boundary while it recedes over time due to progressive dissolution.

Mechano-Chemical Thrombolysis via t-PA-NCs

Upon stimulation with alternating magnetic fields (AMFs), NCs heat up inducing a significantly high local increase in temperature (**Figure 7**). t-PA-NCs have demonstrated a remarkable SAR of $\approx 60 \text{ W g}^{-1}$, at 512 KHz and 10 kA m^{-1} . Also, the clot busting efficacy of t-PA is known to depend on the temperature and shows a maximum around $45 \text{ }^\circ\text{C}$. Following this, NCs and t-PA-NCs were exposed to alternating magnetic fields and temperature maps were captured over time using an infrared camera (**Figure 7**). In both cases, significant heating is observed within 10 min of exposure to AMF with maximum temperatures of 46.9 ± 1.7 and

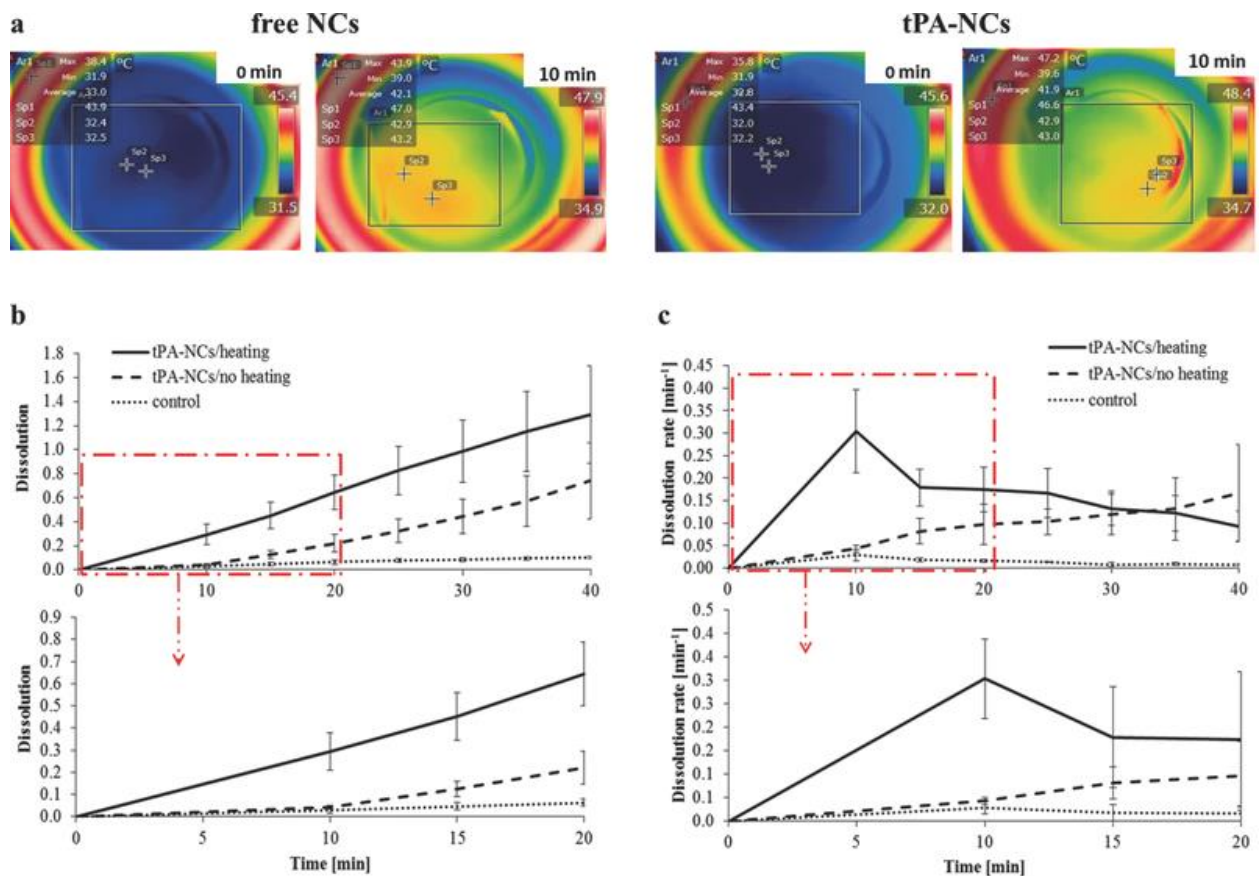


Figure 7: Mechano-chemical lysis of blood clots via magnetic hyperthermia. a) Representative temperature maps of saline solutions in which free NCs and t-PA-NCs are dispersed and exposed to alternating magnetic fields. b,c) Dissolution and dissolution rate of blood clots in the presence of t-PA-NCs either stimulated or not stimulated with alternating magnetic fields. In the control experiments, blood clots were exposed to a saline solution.

$49.6 \pm 1.3 \text{ }^\circ\text{C}$, respectively, for NCs and t-PA-NCs. Note that the temperature distribution is

quite uniform for a saline solution, in the absence of any NCs, and returns a maximum value of about 30 °C. This confirms that the heating is solely specific and is associated with the presence of NCs in solution. Next, the blood clot dissolution and dissolution rates were quantified upon incubation with t-PA–NCs in the presence and absence of AMFs (**Figure 7**). The thrombolytic activity of t-PA–NCs is assessed for a period of 40 min, while exposure to AMF and consequent heating is limited to the first 10 min of incubation. The clot dissolution in the presence of heating was significantly larger than without heating with a time averaged 2-fold increase over the 40 min period (**Figure 7**). However, a much larger increase can be observed within the first 10 min of incubation (dashed lines in the insets of **Figure 7**), during which NCs are continuously exposed to AMF. These results emphasize the synergy between the chemical and thermo-mechanical effects in clot lysis.

In Vivo Characterization of the Thrombolytic Activity of t-PA–NCs

For determining the *in vivo* efficacy of the proposed nanoconstructs, intravital microscopy (IVM) was used to follow the formation and dissolution of clots over time. Mice were anesthetized with 2.5%–3% isoflurane and injected with 30 μ L of rat anti-mouse CD41 Clone MW Reg30 to fluorescently label autologous platelets for the visualization of clot formation and blood flow dynamics. Then, an incision was made through the abdominal wall to expose the mesentery arterioles (\approx 100 μ m in diameter), a Whatman filter paper saturated with 10% ferric chloride (FeCl₃) solution was applied topically for 5 min. This caused denudation of the endothelium and clot formation. These steps are documented in **Figure 8**. After removal of the ferric chloride filter paper; 200 μ L of saline solution with either NPs loaded with t-PA (100 μ g initial input of t-PA) or soluble t-PA (100 μ g) were administered through tail vein. Following the bolus injection, the vessels were monitored over time (**Figure 8**). Significant differences were observed between the two experimental groups: t-PA–NC injected animals (**Figure 8**) and free t-PA injected animals (**Figure 8**). Note that 100 μ g of

initial t-PA input during the t-PA-NC synthesis corresponds to $\approx 20 \mu\text{g}$ of actual t-PA immobilized on the NC surface.

In the first case, two clots (Clot 1 and Clot 2) were almost fully occluding a vessel at time 0. The platelets concentration (red signal) between the two clots was minimal documenting the absence of continuous blood flow. Already at 10 s p.i., the structure of the two clots started changing and, at 60 s p.i., the region between Clot 1 and Clot 2 appeared more populated in platelets demonstrating that the vessel was already partially reopened. At 150 s p.i., Clot 1 was almost completely dissolved and the vessel was fully recanalized at 600 s p.i.. Also, the graph of **Figure 8** shows the actual clot area (A), normalized by the initial value (A_0), as a function of time. For the free t-PA case, three clots are identified in the field of view whose areas tend to moderately grow with time rather than decreasing (**Figure 8**). Therefore, at 400 s p.i., the normalized areas of Clot 3, 4, and 5 are larger than the initial values (**Figure 8**). It should be here recalled that free t-PA has a very short half-life in blood (< 5 min in humans, and even shorter in mice), therefore its efficacy can only be seen within the first few minutes post injection.

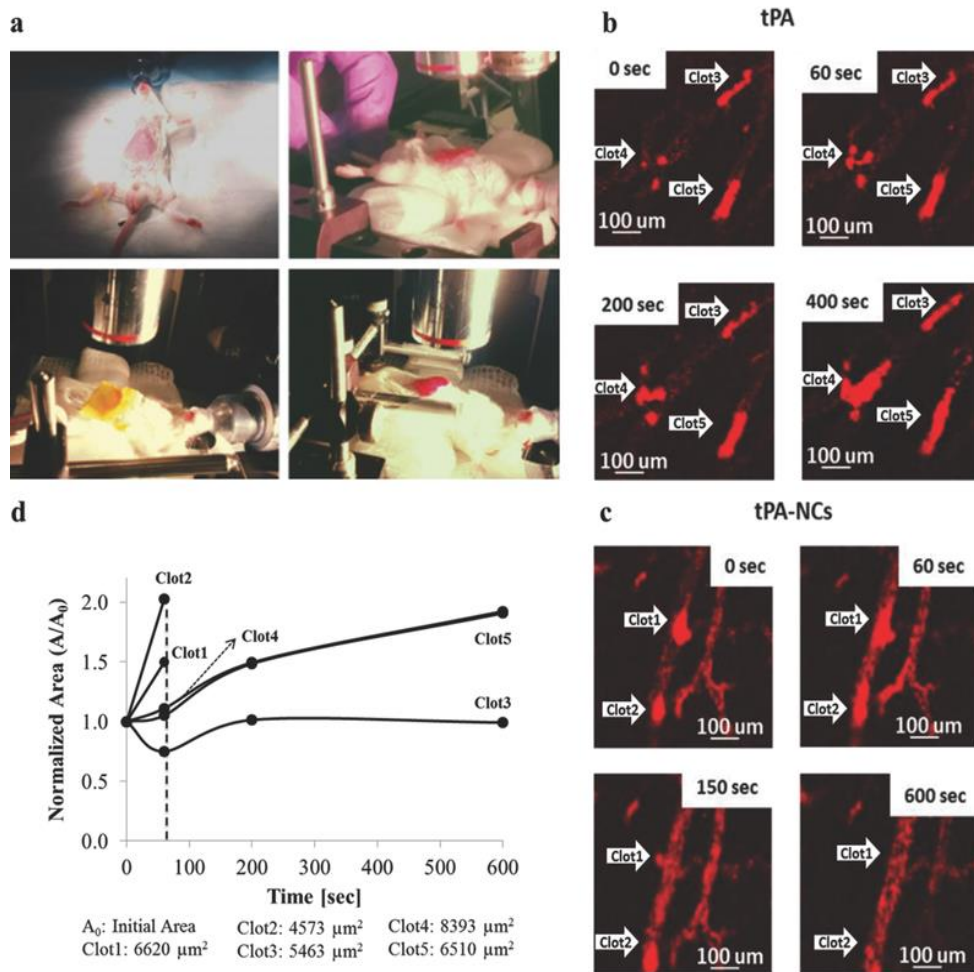


Figure 8. Blood clots in the murine mesentery vasculature monitored in real time via intravital microscopy. a) The endothelium in the mesentery vasculature of a mouse is damaged by a topical treatment with a ferric chloride (FeCl_3) solution inducing extensive damage and formation of large, stable blood clots deriving from the intimate mixing of platelets (red dots) and fibrin. b,c) Representative intravital microscopy images of the mesentery vasculature taken at different time points during treatments with free t-PA b) and t-PA-NCs c). Blood clots are identified preinjection and monitored over time up to 10 min post injection of thrombolytic agents. d) Variation with time of the normalized clot area for the five clots identified in the images (b – free t-PA treated mice) and (c – t-PA-NC treated mice). (Injected free t-PA: 5 mg of t-PA/kg of animal; injected t-PA-NCs: ≈ 1 mg of t-PA/kg

Conclusion

In our study, first we examined the effect of iodinated contrast media on the efficiency of thrombolysis therapy via recombinant tissue plasminogen activator. We found, that a higher dose of iodinated contrast media might impede fibrinolysis, since the experimental results demonstrated that presence of these contrast media negatively affects the efficiency of the fibrinolysis induced by rt-PA.

Secondly, we examine the preparation of magnetic nanoparticles to use them as a magnetic nanocarrier for delivery of t-PA. MNP consisting of a superparamagnetic core and an bovine serum albumin (BSA) shell was synthesized and characterized. After covalent binding to the MNPs, t-PA showed high activity retention and enhanced storage and operation stability. Effective thrombolysis with MNP-t-PA under magnetic guidance substantially reduced blood clot lysis time compared with runs without magnetic targeting and with free t-PA using the same drug dosage. The results demonstrate that SiO₂-MNP is a useful magnetic targeting drug carrier for t-PA delivery, and SiO₂-MNP-t-PA may provide a new form of thrombolytic drug that is potentially useful for treatment of thrombus.

In conclusion, t-PA-NCs can be a promising therapeutic agent to improve fibrinolysis, even in those patients who have other injures, thus systematic injection of tissue plasminogen activator could induce life-threatening situations, since rt-PA could prevent clog forming at critical locations. Our results can introduce a new concept into the treatment of thrombus, and revolutionize the current medical procedures.

However, the side-effects of the t-PA-NCs requires further investigations, since the reactions of the human immune-system to these nanocarriers is currently unknown.

Acknowledgment

Foremost, I would like to express my sincere gratitude to my advisors Prof. Istvan Battyani and Kalman Toth for their continuous support of my Ph.D. study and research, for their patience, motivation, enthusiasm, and immense knowledge. Their guidance helped me in all the time of research and writing of this thesis. I could not have imagined having a better advisors and mentors for my Ph.D study.

My sincere thanks also go to Dr. Laszlo Deres for leading me working on diverse exciting projects.

I thank my fellow lab mates at the Szentagothai Research Center: Krisztian Eros, Adam Riba and Timea Dozsa.

None of these could have happened without my family, they were there for me with their own brand of humor and support over the last several years. Every time when I was ready to quit, you did not let me and I am forever grateful.

Last but not the least, I must express my very profound gratitude to my parents and to Dr. Giacomo Bruno for providing me with unfailing support and continuous encouragement throughout my years of study and through the process of researching and writing this thesis. This accomplishment would not have been possible without you. Thank you.

Eszter Voros

PUBLICATIONS SUPPORTING THE DISSERTATION

2017

1. Eszter Vörös, László Deres, Róbert Halmosi, Edit Váradi, Kálmán Tóth, István Battyáni
Interactions between iodinated contrast media and tissue plasminogen activator: In vitro comparison study
CLINICAL HEMORHEOLOGY AND MICROCIRCULATION: 66(2): p. 167-174. (2017.)
Impact factor: 1.69

2016

2. Eszter Vörös., Cho M., Garami Z., Battyáni I., Decuzzi P., Tóth K.
T-PA immobilization on iron oxide nanocubes and localized magnetic hyperthermia accelerate blood clot lysis
ECR 2016 Book of Abstracts - E - Authors' Index. Insights into Imaging, 2016. 7(1): p. 475-525

2015

3. Eszter Vörös, Cho Minjung, Ramirez Maricela, Palange Anna Lisa, De Rosa Enrica, Key Jaehong, Garami Zsolt, Lumsden Alan B, Decuzzi Paolo
T-PA Immobilization on Iron Oxide Nanocubes and Localized Magnetic Hyperthermia Accelerate Blood Clot Lysis
ADVANCED FUNCTIONAL MATERIALS: (11) pp. 1709-1718. (2015)
Impact factor: 12.12
4. Eszter Vörös, Minjung Cho, Garami Zsolt, Paulo Decuzzi, Tóth Kálmán, Battyáni István
Vas oxid alapú nanoparticulomokhoz kötött t-PA és hypertermia kombinációjával végzett célzott thrombus oldás
In: X. IME Jubileumi Képalakotó Diagnosztikai Továbbképzés és Konferencia. Konferencia helye, ideje: Budapest, Magyarország, 2015.03.26 Budapest: LARIX Kiadó Kft., pp. 72-77.
6. Eszter Vörös, Minjung Cho, Garami Zsolt, Decuzzi Paolo, Tóth Kálmán, Battyáni István
Vas oxid alapú nanoparticulomokhoz kötött t-PA és hypertermia kombinációjával végzett célzott trombus oldás
IME: INTERDISZCIPLINÁRIS MAGYAR EGÉSZSÉGÜGY / INFORMATIKA ÉS MENEDZSMENT AZ EGÉSZSÉGÜGYBEN 14:(8) pp. 62-66. (2015)

PUBLICATIONS NOT RELATED TO THE DISSERTATION

2017

1. Grishma Khanal, Rose-Ann Huynh, Kian Torabian, Hui Xia, Eszter Vörös, Sergey S Shevkoplyas
Towards bedside washing of stored red blood cells: a prototype of a simple apparatus based on microscale sedimentation in normal gravity
VOX SANGUINIS 5: pp. 167-175. (2017)
Impact factor:2.85
2. Hui Xia, Grishma Khanal, Briony C Strachan, Eszter Vörös, Nathaniel Z Piety, Sean C Gifford, Sergey S Shevkoplyas
Washing in hypotonic saline reduces the fraction of irreversibly-damaged cells in stored blood: a proof-of-concept study: Hypotonic washing of stored RBCs
BLOOD TRANSFUSION (2017)
Impact factor:1.61

2016

3. Eszter Vörös, Nathaniel Z Piety, Sergey S Shevkoplyas
A Simple Disposable Device for Bedside Washing of Stored Red Blood Cells.
Konferencia helye, ideje: Orlando, Amerikai Egyesült Államok, 2016.10.22-2016.10.25.
Wiley-Blackwell Publishing Ltd., 2016. 1 p. (56.) (ISBN:07030-5774)
4. Eszter Vörös, Nathaniel Z Piety, Sergey S Shevkoplyas
A Simple Disposable Device for Bedside Washing of Stored Red Blood Cells
Konferencia helye, ideje: Minneapolis, Amerikai Egyesült Államok, 2016.10.05-2016.10.08.
2016.

2013

4. Eszter Vörös, Horváth A, Sveiczzer A
Length growth patterns in the mitotic cycle of large fission yeast cells
ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA 60: pp. 107-108. (2013)

2012

5. Horváth A, Rácz-Mónus A, Eszter Vörös, Sveiczzer Á
Sejtnövekedési mintázatok vizsgálata a hasadó élesztőben. Cell growth pattern analysis in fission yeast
MIKOLÓGIAI KÖZLEMÉNYEK-CLUSIANA 51: pp. 44-45. (2012)

2011

6. Horváth A, Rácz-Mónus A, Eszter Vörös, Sveiczzer Á
Cell length growth patterns and size control in fission yeast mutants
ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA 58:(Suppl.) p. 157. (2011)