

XXXII. OTDK Biológia Szekció

Ezüst nanorészecskék citotoxikus hatásának vizsgálata
tumoros sejtvonalakon

Keskeny Csilla

Biológus MSc II. szamos hallgató

Igaz Nóra

Biológia BSc III. szamos hallgató

Szegedi Tudományegyetem

Témavezető: Dr. Kiricsi Mónika, Kovács Dávid

Bevezető

Ezüst nanorészecskék a biológiában

Nanorészecskének szűkebb értelemben az 1-100 nm tartományba eső részecskéket nevezzük. A nanorészecskék jellemző tulajdonsága, hogy magas a felszín/térfogat arányuk. Míg a nem nanoméretű anyagrészecskéknek állandóak a tulajdonságaik, a nanorészecskék tulajdonságai a méretüktől függenek, mivel ebben az esetben már jelentőséget nyer az anyag felszínén levő atomok százalékos aránya. A részecskék alakja és egyéb fizikai-kémiai tulajdonságai is befolyásolják kölcsönhatásaikat az élő szervezetekkel (1).

Az utóbbi évtizedekben intenzív kutatás folyt a nanorészecskék fizikai és kémiai tulajdonságainak megismerésére. A nanorészecskéket gyakorta alkalmazzák a biológiában és az orvostudományban például bioszenzorokban, vagy mint antibakteriális anyagok, illetve gyógyszerek vivőanyagaként (2).

Az ezüst nanorészecskék a legszélesebb körben felhasznált nanoméretű anyagok, mely elsősorban antibakteriális és gombaellenes hatásuknak köszönhető (3). Az ezüst nanopartikulumok citotoxikus stresszválaszt indukálnak emlős sejtekben is, mely tulajdonságukat ki lehetne használni tumorterápia során. Bár a pontos hatásmechanizmusuk még nem teljesen tisztázott, valószínűleg a sejtekbe jutott ezüst nanorészecskékből nagy mennyiségű ezüst ion szabadul fel, mely végül a sejt pusztulását okozza. A nanorészecskék jelentős irodalma ellenére, nem tisztázott még, hogy milyen hatása van a partikulum méretének, alakjának, a felületi stabilizátornak, illetve esetlegesen a felszínre kötött funkcionizáló csoportoknak az ezüst nanorészecskék tumorsejtek elleni citotoxikus hatására. A jelen kutatásunk célja kiterjeszteni és pontosítani ismereteinket az ezüst nanorészecskék humán tumoros sejtekre kifejtett biológiai, főként sejtbiológiai, biokémiai és molekuláris biológiai hatásairól.

A nanorészecskék kémiája

Számos módszer áll rendelkezésre fém nanorészecskék előállítására, ám gyakori probléma mindegyik esetben, hogy nem lehet megfelelően kontrollálni a keletkező részecskék méretét és alakját. A Lee-Meisel módszer során a pH és a hőmérséklet megfelelő beállításával azonban befolyásolható a részecskék nukleációjának és növekedésének egyensúlya a reakció során, így kisebb méretű és megközelítőleg gömb alakú partikulumok szintetizálhatók

ezüst-nitrát nátrium-borohidrides redukciójával, citrát jelenlétében (4). A kisméretű részecskék felhasználásával több lépéses nukleációval nagyobb méretű, gömb alakú nanorészecskék is létrehozhatók (4). A szintézis másik kulcskérdése a felületi stabilizátor anyag megválasztása. Számos sejtbárát és sejttidegen polimert alkalmaztak már korábbi szintézisek során erre a célra. A Na-citrát használata több szempontból is előnyös, mivel stabilizáló szerepet is betölt: megakadályozza az aggregációt és a redukált ezüst oxidációját, továbbá biokompatibilis, és könnyen kicserélhető más funkcionális ligandra (4). A nanorészecskék funkcionálizálhatók például elektrosztatikus adszorpcióval, mely során a nanorészecskén különböző típusú és funkciójú molekulákat lehet megkötni; ezt fehérjék, különösen antitestek esetében már régóta alkalmazzák (5). A nanorészecskék felületén megkötött anyagok hatással lehetnek a partikulumok sejtbe történő bejutására és sejtbeli eloszlásukra (3).

Az ezüst nanorészecskék sejtbiológiai hatásai

Az ezüst nanorészecskék a legszélesebb körben felhasznált nanoméretű anyagok, ezért egyre több irodalmi adat áll rendelkezésre ezeknek a partikulumoknak a sejtbiológiai hatásairól, elsősorban különféle jelenlegi és jövőbeli orvosi alkalmazásáról.

A nanopartikulumok bejutása a sejtekbe méretfüggő folyamat. Kimutatták, hogy 2 nm-nél kisebb nanorészecskék passzív transzporttal átjuthatnak a vörösvértestek membránján (6). Ezzel szemben a nagyobb nanorészecskék, a makromolekulákhoz hasonlóan, többnyire csak aktív transzportfolyamat révén képesek átjutni a sejtmembránon.

Tanulmányok szerint a sejtek különböző endocitotikus útvonalakon képesek felvenni a nanorészecskéket, ezek közé tartozik a fagocitózis, a makropinocitózis, a receptor mediált endocitózis (klatrin burkolt vezikulumban, vagy kaveola-függő módon), az adszorptív endocitózis (klatrin-burkolt vezikulumban), valamint a klatrin- és kaveolin-független alternatív útvonal (7).

Arora és mtsai (2008) leírták a 7-20 nm-es ezüst nanorészecskével történő kezelés *in vitro* sejttenyészetben megfigyelt celluláris hatásait. Ezek között szerepelt a koncentrációfüggő citotoxicitás, megváltozott sejtmorfológia, DNS-fragmentáció, valamint oxidatív stressz indikátorok megjelenése. Alacsonyabb nanorészecske-koncentráció mellett a sejtek apoptotizáltak, nagyobb dózis mellett azonban a kaspáz-3 aktivitás hiányából arra következtettek, hogy a sejtek nekrozissal pusztulnak el.(8)

Egy másik kísérletben Jiang és mtsai (2013) CHO-K1 sejteken vizsgálták ezüst nanorészecskék hatását. Kimutatták, hogy a BSA-val bevont ezüst nanorészecskék DNS- és

kromoszomális károsodást okoztak, csökkentették a mitokondriális funkciót, és növelték a ROS intracelluláris mennyiségét. A sejtek pusztulásának oka apoptózis és nekrozis volt. Megfigyelték továbbá, hogy a nanorészecske formában és ionos formában a sejtekhez adott ezüst sejtbiológiai hatásai eltérnek, az ionos forma a vártan megfelelően toxikusabbnak bizonyult a sejtekre. Mindezek alapján feltételezik, hogy a nano-kezelés során megfigyelt celluláris hatásokat a nanorészecskékből felszabaduló ezüst ionok okozzák (9).

Hussain és mtsai (2005) szintén kimutatták többféle, eltérő méretű fém nanorészecske toxikus hatását *in vitro*, BRL 3A sejteken. Ebben a kísérletben az ezüst nanorészecskék hatása erősen toxikusnak bizonyult, aminek hátterében szintén oxidatív stresszfolyamatokat feltételeztek (10).

Az apoptózisban kulcsszerepet játszó fehérjék

A p53 tumorsuppresszor

A p53 tumorsuppresszor egy transzkripciós faktor, amely a DNS sérülését érzékeli, és képes a sejtciklust leállítani G1 és G2 fázisban, a sejtciklus ellenőrző pontjain, így időt adva a DNS javítására. A p53 indukálja a DNS repair folyamatokat, de túl nagymértékű károsodás esetén apoptózist indíthat a sejtben, mind extrinsic (külső faktorok által beindított), mind intrinsic (mitokondriális út) módon. Stresszhatás hiányában a p53 fehérje szintje alacsony, mivel az mdm2 fehérje kötődése révén proteasómális degradációra van kijelölve. Sérülés vagy stressz esetén a p53 foszforilálódik, leválik az mdm2-ről és aktiválódik (11). Transzkripciós faktorként a p21 gén regulátor régiójához kapcsolódik, annak átírását indukálja. A p21 fehérje egy ciklin-dependens kináz inhibitor, kötődik az aktív G1/S-Cdk és S-Cdk-hoz, így inaktiválva a komplexeket, melynek eredményeképpen a sejtciklus leáll (12).

Sok tumoros sejtben a p53 gén mutációt szenvedett, melynek eredménye, hogy a károsodott DNS-sel rendelkező sejtek sejtciklusa nem szabályozódik, sérülés esetén is osztódnak a sejtek, melynek számos mutáció felhalmozódása lehet az eredménye. A humán tumorok több mint 50%-ánál kimutatható volt p53 mutáció vagy delécio (11).

Az irodalmi adatokból ismert, hogy a p53 érzékenyen reagál a sejtet érő külső, illetve belső stresszhatásokra, mint például UV fény sugárzásra vagy reaktív oxigén szabadgyökök keletkezésére (13). Mivel a fém-nanorészecskék oxidatív stresszt indukálnak, ezért vizsgálataink során arra is kerestük a választ, hogy ezüst-nanorészecskék hatására hogyan változik a p53 expressziója.

A kísérleteinkhez két olyan sejtvonalat választottunk, melyek p53 státuszukban eltértek, így a nanorészecskék által kiváltott hatást/hatásokat különböző p53 rendszerekben figyelhettük meg.

Kaspáz-3

A kaspázok specifikus proteázok, melyek az apoptózis mechanizmusának kulcsfontosságú szereplői. Az apoptózis két útvonala (extrinsic és intrinsic út) között a kapcsolatot a kaspáz-3 is biztosítja (14).

Az extrinsic útvonalon egy külső jel hatására indul be az apoptózis. A külső jelet a Fas receptor (halál receptor) fogja fel, a ligandját Fas ligandnak nevezik. A Fas ligand bekötődésekor a receptor aktiválódik, a receptor-ligand komplexhez adaptor fehérjék (pl. FADD) kötnek, amelyek a prokaspáz 8-at aktiválják limitált proteolízissel. A kaspáz 8 elindítja a kaspáz kaszkádot, melynek végeredménye a sejt apoptózisa lesz.

Az intrinsic útvonal kiváltója valamilyen celluláris stressz. Az intrinsic utat aktiválhatja a p53 fehérje az apoptózisban részt vevő fehérjék vagy gének aktivációján keresztül, de a sérült mitokondriumból felszabaduló citokróm c is apoptózist indukál. A citokróm c az Apaf 1 fehérjéhez köt a citoplazmában, amivel az Apaf 1-hez kötődő prokaspáz-9-et aktiválva kaspáz kaszkádot indít el. A kétféle úton elinduló kaspáz kaszkád végeredményeként az effektor kaspáz (kaspáz-3) aktiválódik, mely citoskeletális fehérjéket, a nukleáris laminát, és egyéb szubsztátokat hasít, ennek eredménye pedig az apoptózis során megfigyelhető sejtmag kondenzáció és fragmentáció, a citoplazma zsugorodása, majd az elpusztuló sejt fragmentálódása(15).

Mivel különböző stresszhatások, mint oxidatív stressz apoptózist indukálhatnak, ezért vizsgálataink arra voltunk kíváncsiak, hogy ezüst-nanorészecskék hatására beindul-e a programozott sejthalál folyamata a két sejtvonalban.

Célkitűzések

Kísérleteink során célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk két különböző méretű ezüst nanorészecske celluláris hatását tumoros sejtvonalakban.

Ennek érdekében:

1. elő kellett állítanunk két különböző méretben olyan ezüst nanorészecskéket, melyeknek felületi stabilizáló anyaga biokompatibilis;
2. a kiválasztott tumoros sejteket az előállított nanorészecskékkel különböző koncentrációban, változó hatásidő mellett kellett kezelni;
3. megvizsgáltuk, változik-e a sejtek életképessége a nanorészecskék hatására;
4. különböző mikroszkópos technikákkal vizsgáltuk a nanorészecskék hatására bekövetkező morfológiai változásokat;
5. megvizsgáltuk, milyen celluláris folyamatok állhatnak a csökkenő viabilitás hátterében;
6. nyomon követtük egyes, az apoptózisban szerepet játszó fehérjék RNS- és protein-szintű kifejeződésének változásait.

Anyagok és módszerek

Ezüst nanopartikulumok előállítása

A kísérleteinkhez felhasznált, átlagosan 4 nm és 35 nm méretű ezüst nanorészecskéket az SZTE Alkalmazott és Környezeti Kémia Tanszékkal együttműködve állítottuk elő, a Wan és munkatársai által leírt technikával, amely a Lee-Meisel módszeren alapul, és lehetővé teszi az ezüst nanorészecskék kontrollált szintézisét különböző méretekben (4). A 4 nm méretű partikulumokat ezüst-nitrát 70 °C-on, citrát jelenlétében lezajló nátrium-borohidrides redukciójával nyertük, a 35 nm-es részecskéket 100 °C-on szintetizáltuk, melyhez a 4 nm partikulumokat szintetikus gócként használtuk, és a partikulumok növesztését több lépésben hajtottuk végre, szintén citrát jelenlétében.

A 4 nm-es nanorészecskék szintézise

20 ml 1%(w/v) citrát oldatot és 75 ml desztillált vizet egy háromnyakú lombikba öntöttünk, majd 70 °C-on inkubáltuk 15 percig. Ezután hozzáadtunk 1,7 ml 1% (w/v) ezüst-nitrát oldatot, illetve 2 ml 0,1% (w/v) nátrium-borohidrid oldatot. Az egész rendszert 1 órán át kevertettük 70 °C-on, majd lehűlés után desztillált vízzel 100 ml-ig feltöltöttük.

A 35 nm-es nanorészecskék készítése

2 ml 1%(w/v) citrát oldatot és 75 ml desztillált vizet elegyítettük, 100 °C-on inkubáltuk 15 percig. Ezután 10 millilitert a korábban készített 4 nm-es mintából hozzáöntöttük ehhez az elegyhez 1,7 ml 1% (w/v) ezüst-nitrát oldat kíséretében, majd 1 órán át kevertettük, és hozzáadtunk 2 ml 1% citrát oldatot és 1,7 ml 1% ezüst-nitrát oldatot.

Ezután újabb egy óra kevertetés következett, majd ismét 2 ml 1% citrát oldatot és 1,7 ml ezüst-nitrát oldatot öntöttünk a rendszerhez. Még egy órán át forrásponton kevertettük, végül hagytuk kihűlni, és felöntöttük desztillált vízzel 100 ml-re.

Az előállított ezüst nanopartikulumok méretének ellenőrzése transzmissziós elektronmikroszkópiával

Az elektronmikroszkóp a képalkotáshoz elektronsugarat használ, ezért ezzel a technikával akár 0,1 - 0,2 nm-es feloldást is el lehet érni. A transzmissziós elektronmikroszkóp a tárgyon áthaladó elektronsugár segítségével alkot képet, ezért ennél a módszernél lényeges, hogy a minta vékony legyen. A transzmissziós elektronmikroszkópban az elektronok az elektronforrás (volfrám izzószál vagy lantánhexaborid kristály katód) és az anód között létrehozott 80-120 kV gyorsító feszültség segítségével mozognak, az anód

irányába. Annak érdekében, hogy az elektronok ne szóródjanak a levegő molekuláin, vákuumot kell teremteni. Az elektronágyúban létrehozott elektronsugarat az elektromágneses kondenzorlencsék fókuszálják a tárgyra, azon a sugár áthalad, majd objektív és projektív lencséken keresztülhaladva végül fluoreszkáló ernyőre vetül. A felnagyított kép így az emberi szem számára láthatóvá válik. A keletkezett képet nem csak közvetlenül lehet vizsgálni, képeket lehet készíteni a TEM-hez kapcsolt CCD kamera segítségével (16).

A szintetizált nanorészecskék méretét transzmissziós elektronmikroszkóppal ellenőriztük Tecnai G2 elektronmikroszkóp segítségével, Tóth Tímea (Alkalmazott és Környezeti Kémiai Tanszék) közreműködésével. A TEM vizsgálathoz ultravékony mintákat egy 3,05 mm átmérőjű, 58 μm -es lyukakkal ellátott, rézből készült, folytonos szénhártyával borított hordozóra, ún. gridre cseppentettünk fel. Ezután infralámpa segítségével fixáltuk a szolt (17).

A képek alapján számítható a minta átlagos méreteloszlása, és így megadható a partikulumok átlagos mérete.

Az előállított ezüst nanopartikulum minták fizikai- kémiai jellemzése

Zeta potenciál (ζ -potenciál) mérése

Az alkalmazott ezüst nanorészecskék hidrodinamikai méretét és zéta-potenciálját ZetasizerNano készülékkel mértük a Dél-Alföldi Neurobiológiai Tudásközpontban, Dr. Fülöp Livia segítségével. A ZetasizerNano készülék DLS (dynamic light scattering) technikával méri a részecskék hidrodinamikai sugarát, a zéta-potenciál mérése pedig információt ad a kolloid rendszer stabilitásáról, vagyis a részecskék aggregációjáról.

Sejtkultúra

Kísérleteinket adherens, monolayert alkotó U2Os oszteoszarkóma és HeLa méhnyak adenokarcinóma eredetű humán sejtvonalakon végeztük el. A HeLa sejteket 5%, U2Os sejteket 10% magzati borjú szérummal, 2% (4 mM) glutaminnal és 1% antibiotikummal (sztreptomycin és ampicillin) kiegészített DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) tápoldatban tartottuk fenn, 37 °C hőmérsékleten, 5% CO₂-ot tartalmazó légkörben. A sejtek passzálásához 0,05%-os tripszin-EDTA oldatot használtunk.

A sejteket 0, 5, 20, 50, 100, 150 és 200 ppm koncentrációban ezüst nanorészecskét tartalmazó médiummal kezeltük 2, 4, 6, 24, illetve 48 órán át.

Viabilitás vizsgálata

Tripánkék módszer

A tripánkék egy diazo-festék, amelyet negatív töltése miatt az élő, ép membránnal rendelkező sejtek kizárnak, a halott sejtek membránján azonban átjut, és kék színűre festi azokat. A sejtek ezután mikroszkóp segítségével megszámolhatók, a viabilitás százalékos értéke kiszámolható. A módszer hátránya, hogy így nem lehet elkülöníteni a nekrotizáló sejteket az apoptotizálóktól (18).

A kísérletekhez 3 cm átmérőjű csészében növesztett kontroll és nanopartikulumokkal kezelt sejteket 1xPBS-es mosást követően 50 µl 0,05% tripszinnel az aljatról felszedtük, majd 50 µl 0,4%-os tripánkék oldattal (Sigma, T6146) szuszpendáltuk. A sejtekről mikroszkóppal fényképeket készítettünk, majd ImageJ program segítségével megszámoltuk az élő és a kékre festett halott sejteket. A viabilitást százalékosan fejezzük ki az alábbi képlet alapján:

$$\text{Viabilitás (\%)} = (\text{élő sejtek száma/teljes sejtszám}) * 100$$

MTT assay

Az MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromid) tetrazolium redukciós módszer lehetővé teszi nagyszámú anyag hatásának vizsgálatát a sejtek viabilitására. Az élő sejtek aktív metabolizmusuk révén képesek az MTT vegyületet lila színű formazán kristályokká alakítani, melyek elnyelési maximuma 570 nm körül van. A halott sejtekben az MTT nem alakul át, így a színes termék képződése kizárólag az élő sejtek jellemzője.

Kísérleteink során 10 000 db sejtet helyeztünk a 96-lyukú plate mintatartóiba, majd 24 vagy 48 órán át kezeltünk különböző koncentrációban ezüst nanorészecskével. Az MTT szubsztrátot (Sigma-Aldrich, M5655) 0,5 mg/ml végkoncentrációban adtuk a sejt kultúrához (a megfelelő tápoldatban hígítva), 200 µl végtérfogatban, mellyel 3 órán keresztül 37 °C-inkubáltuk a sejteket. PBS-es mosást követően a kialakult formazán kristályokat 100 µl DMSO-ban oldottuk fel. A formazán mennyiségét, amely egyenesen arányos az élő sejtek számával 570 nm-en, Asys Jupiter microplate readerrel mértük. Negatív kontrollként sejtmentes wellekben is lemértük az MTT abszorbanciáját, és mint háttérrel figyelembe vettük a számításoknál.

A kapott jel erőssége sok paramétertől függ: az MTT koncentrációjától, az inkubáció időtartamától, valamint az élő sejtek számától és metabolikus aktivitásától (18).

Elektronmikroszkópos technikák

A nanorészecskék sejtekbe történő bejutását és sejten belüli lokalizációját elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

Transzmissziós elektronmikroszkóp (TEM)

A sejteket egy 12-lyukú plate-be helyezhető speciális poliészter membránra (Corning) tenyésztettük, letapadás után a sejteket 100 ppm koncentrációjú ezüst nanorészecskével kezeltük 24 órán át, majd 4%-os, PBS-sel készített glutáraldehiddel 2 óráig fixáltuk. Ezután az SZTE Patológiai Intézetében 2%-os, szintén PBS-sel készített zselatinba ágyazták a mintát, majd 1-2 mm-es kockákra vágták és Epon 812 (EMS, USA, Hatfield, PA 19440) epoxy gyantába ágyazták. Félvékony metszeteken (1 μm) monolayert azonosítottak, a blokkokat ennek megfelelően trimmelték, majd vékony metszeteket (70 nm) készítettek. Ezeket a metszeteket uránium és ólom oldatokkal festették, majd CM10 (FEI, Hollandia, Eindhoven) elektronmikroszkóppal 100 kV gyorsító feszültséggel vizsgálták. Megaview G2 digitális kamerával TEM mikrográfokat készítettek (ITEM, OlympusSoftImagingSolution GmbH, Münster).

Szkenning elektronmikroszkóp (SEM)

A szkenning vagy pásztázó elektronmikroszkóp térbeli képet alkot a minta felszínéről. Ehhez a mikroszkóp a felszínből kilépő (másodlagos) elektronokat és a minta felszínéről visszaszórt elektronokat használja fel. A sejteket műanyag fedőlemezre (Sarstedt) tenyésztettük, és 6 órás, 100 ppm-es ezüst nanorészecske kezelés után steril 1xPBS-sel mostuk. Ez után 2 ml 2,5%-os glutáraldehiddel (amely módosított, K_2HPO_4 -et tartalmazó 0,133 M-os Sörensen-pufferrel készült, pH=7,6) egy éjszakán át 4 °C-on fixáltuk. Másnap abszolút etanolból desztillált vízzel készített felszálló alkoholsorral (50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 100% EtOH), szobahőmérsékleten dehidráltuk a mintát, az egyes lépések 2x15 percig tartottak. Ezután a mintát 1-1 órán keresztül terc-butil-alkohol : 100% etanol 1 : 2 arányú elegyével, majd 1 : 1, végül 2 : 1 arányú elegyével szobahőmérsékleten szárítottuk. Ezt követően a mintát egy éjszakán át 4 °C-on terc-butil-alkoholban tartottuk, ami ezen a hőmérsékleten megfagy, majd liofilizáltuk 4 órán keresztül. A kezelt sejteket a felületén tartalmazó fedőlemezt zsírtalanított kerek fémkorongra ragasztottuk. A fixált, víztelenített mintát vékony rétegben nehézfémmeel vonjuk be a vizsgálat előtt (19). Amennyiben a másodlagos elektronokat érzékelő SE (secunder electron) detektor mellett a visszaszórt elektronokat érzékelő BSE (backscattered electron) detektort is alkalmazunk,

rendszerkontrasztos képet kapunk. Ez azt jelenti, hogy minél nagyobb rendszámú egy elem, annál inkább szórja az elektronokat, így a 47-es rendszámú ezüst nagy intenzitással jelenik meg a képeken. Így nem csak a sejtek felszínén található ezüst nanorészecskéket láthatjuk, hanem a sejtekbe bejutott, a felszínhez közel elhelyezkedő nanorészecskéket is detektálhatjuk. Az EDS (energiadiszperzív röntgen analízátor) detektor röntgensugárzást érzékel, ami elemvizsgálatra ad lehetőséget, így ellenőrizhetjük, hogy valóban az ezüst nanorészecskéket látjuk-e a képeken

Az SZTE Alkalmazott és Környezeti Kémia Tanszékén Madarász Dániel segítségével a mintát 45 másodperc alatt néhány nanométeres aranyréteggel vontuk be, és Hitachi S4700 típusú pásztázó elektronmikroszkóppal, 10 kV gyorsítófeszültséggel vizsgáltuk.

Reaktív oxigén szabadgyökök kimutatása DCFDA-festéssel

A DCFDA (2',7'-diklorofluoreszcein-diacetát) a reaktív oxigénradikálok intracelluláris mérésére alkalmazott fluoreszcens festék. A nem fluoreszkáló DCFDA diffúzióval jut be a sejtekbe, ahol az intracelluláris észterázok deacetilálják, majd a reaktív oxigénradikálok oxidálják, így létrejön a fluoreszkáló 2',7'-diklorofluoreszcein (DCF).(20)

A DCFDA-t 10 μ M végkoncentrációban, 1xPBS-ben hígítva adtuk a fedőlemezre növesztett, előzőleg 24 órán át 100 ppm ezüst nanorészecskével kezelt sejtekhez. A sejteket a reagenssel 37 °C-on 30-40 percig sötétben inkubáltuk, majd eltávolítottuk a DCFDA-t és 1xPBS-ben mostuk a sejteket. A sejteket ezután Nikon Eclipse80i típusú fluoreszcens mikroszkóppal és az ahhoz csatlakoztatott kamerával fényképeztük. A képeken ImageJ programmal mértük a fluoreszcencia intenzitását.

Immuncitokémia

Mintáinkban immunfestéssel vizsgáltuk a nanorészecske-kezelés hatására az apoptózisban kulcsszerepet játszó aktív kaszpáz-3 fehérje kifejeződését, valamint a tubulinhálózat esetleges változásait.

Az immuncitokémiai vizsgálatokhoz a sejteket 3 cm-es csészében fedőlemezre növesztettük (3×10^5), és 24 órán át kezeltük az eltérő méretű ezüst nanorészecskék 100 ppm-es koncentrációjával. A kezelés után a PBS-sel mosott sejteket 4%-os paraformaldehiddel (4% paraformaldehid-PBS, 2 mM NaOH) 20-30 percen keresztül fixáltuk, majd PBS-es mosást követően 0,3%-os Triton-X-100-PBS detergenssel 20 percig inkubálva permeabilizáltuk. Ezt követően 5%-os BSA-PBS oldattal 20 percen keresztül blokkoltuk a

mintákat. Az egyes lépések között a sejteket 1xPBS-ben mostuk. Ezután 1,5 órán át inkubáltuk a mintákat 1%-os BSA-PBS-ben hígított, a kimutatandó fehérjére specifikus elsődleges antitesttel. A szintén 1%-os BSA-PBS-ben hígított, fluoreszcens festékekkel jelölt másodlagos antitesttel 1 órán át sötétben inkubáltuk a mintákat. Ezt 4 mosási lépés követte PBS-Tweenben (sötétben), a 3. mosóoldat 1 : 1000 hígításban a sejtmag megfestésére szolgáló DAPI fluoreszcens DNS-festéket tartalmazott. A mintákra 20-20 µl Fluoromountot (Sigma) mértünk, majd fedőlemezzel lefedtük.

Kísérleteink során 1:300 arányú hígításban nyúlban termeltetett anti-kaspáz-3 elsődleges ellenanyagot (Cell Signaling, #9661), majd 1 : 600 arányban hígított, nyúl ellen termeltetett, Alexa Fluor® 555 (narancssárga színű, Invitrogen) konjugált másodlagos antitestet használtunk. A tubulin detektálására egérben termeltetett anti- α -tubulin (Sigma, T9026) elsődleges ellenanyagot 1 : 600 hígításban, és kecskében termeltetett anti-egér, Alexa Fluor 488 (zöld színű, Invitrogen) konjugált másodlagos antitestet használtunk 1 : 1000 hígításban.

A fibrilláris aktinhálózat detektálására fluoreszcens festékekkel konjugált falloidint (Life Technologies Texas Red-X phalloidin – piros szín, Invitrogen Alexa Fluor 488 phalloidin – zöld szín) alkalmaztunk. A megfestett sejteket Nikon Eclipse80i típusú fluoreszcens mikroszkóppal és az ahhoz csatlakoztatott kamerával, vagy Olympus Fluoview FV10i-LIV konfokális lézer szkennings mikroszkóppal vizsgáltuk.

Fehérjevizsgálati módszerek

A sejtek feltárása, fehérjekoncentrációjuk meghatározása

Fehérjék vizsgálatához a sejteket 6 vagy 10 cm átmérőjű csészében tenyésztettük. A sejteket 60-70%-os konfluencia elérésekor kezeltük ezüst nanorészecskék vizes oldatával, amelyet a megfelelő tápoldattal hígítottunk. A kezelési idő letelte után, 1xPBS-es mosást követően a sejteket 1 ml 1xPBS-ben felkapartuk. A sejtpelletet 30 µl szonikációs pufferben felfuszpendáltuk (50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0,5 mM DTT és 1x PIC (Calbiochem)), majd a sejtek feltárását 5 egymást követő folyékony nitrogénben történő fagyasztás és 37 °C-on történő olvasztás váltakozásával segítettük elő. A sejtlizátumot 10 percig 15 000 G-n centrifugáltuk. A minták fehérjekoncentrációját Bradford-módszerrel mértük, melyet ismert koncentrációjú BSA-t tartalmazó kalibráló oldatokhoz viszonyítottuk.

SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) és Western blot analízis

A p53, tubulin és aktin elválasztásához és detektálásához 10 vagy 12 %-os, 0,75 mm vastagságú szeparáló gélét öntöttünk. Az SDS-t tartalmazó poliakrilamid gélre minden mintából 15 µg fehérjét vittünk fel, 5x loading pufferrel és desztillált vízzel hígítva. Az elválasztott fehérjék méretének meghatározásához ismert molekulásúlyú fehérjéket tartalmazó markert (3 µl) használtunk (Fermentas ProSieve QuadColor 00193837). A gyűjtőgélben 60 V feszültséggel, a szeparálógélben 120 V-on futtattuk a mintákat, amíg el nem érte a front (a loading pufferben lévő brómfenolkék) a gél alját. A méret szerinti elválasztást követően a keresett fehérjét immunológiai detektálással mutatjuk ki. Ehhez a fehérjét a gélről nitrocellulóz membránra blottoljuk transzfer puffert (25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,01% SDS, 10% metanol) használva. Az alkalmazott feszültség és a transzfer időtartama a fehérje méretétől függ. A p53 fehérje kimutatásához 200 mA áramerősséget alkalmaztunk 1,5 órán keresztül.

A membránt Ponceau festékkel (Reanal) festettük, amivel ellenőriztük a transzfer sikerességét. A festést vízzel kontrasztosítottuk, majd TBS-Tween oldattal (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20) kimostuk a membránból.

Ezután a membránt sovány tejpor 5%-os TBS-Tween oldatában blokkoltuk egy éjszakán át.

Másnap 1%-os sovány tejporban hígított elsődleges antitesttel inkubáltuk a membránt 1-1,5 órán át, szobahőmérsékleten. Háromszor 5 percig TBS-Tween oldattal történő mosás után a szintén 1%-os sovány tejporban hígított, torma peroxidázzal konjugált megfelelő másodlagos antitesttel ismét 1-1,5 órán át inkubáltuk a membránt. A torma peroxidáz (HRP) katalizálja a luminol oxidációját 3-aminoftaláttá, ami fénykibocsátással jár. Az ECL-reagens (enhanced chemiluminescence) (Millipore) két komponensű, peroxidot és luminolt tartalmaz, amelyek szubsztrátként szolgálnak a másodlagos antitesttel konjugált torma peroxidáznak. Az ECL reagens 2 db összetevőjét 1 : 1 arányban összekevertük, és a membránra mértük. 5 perc után a reagenst leitattuk a membránról, amit üveglapra helyeztünk és folpackba csomagoltunk. Sötét szobában röntgen filmre (Agfa) hívtuk elő, a jel erősségétől függő expozíciós időt alkalmazva. A kapott sávokat denzitometriával kvantifikáltuk.

A p53 fehérje detektálásához egérben termeltetett anti-hp53 (Dako) I. antitestet használtunk, 1 : 1500 hígításban. A II. antitest peroxidáz-konjugált RAM-HRP (rabbit anti-mouse horseradish peroxidase, P0260, Dako) volt, 1 : 3000 hígításban. A felvitt fehérjemennyiség kontrolljaként nyúlban termeltetett anti- α -aktin elsődleges antitestet

(Sigma) 1 : 5000 hígításban, rá a peroxidáz-konjugált GAR-HRP-t (goat anti-rabbit horseradish peroxidase, P0448, Dako) antitestet 1 : 10 000 hígításban alkalmaztuk.

Génexpresszió vizsgálata

RNS-izolálás

RNS-izolálás Quiagen RNeasy Plus kittel

A sejteket 6 cm átmérőjű csészékben tenyésztettük, és 24 órán át kezeltük ezüst nanorészecskékkel. A sejtekről eltávolítottuk a médiumot, steril, jégen hűtött 1xPBS-es mosás után a gyártó utasításainak megfelelően össz-RNS-t izoláltunk. Az RNS-koncentrációt Nanodrop ND-1000 Spectrophotometerrel mértük le.

RNS-izolálás TRIzolal

A TRIzol fenol és guanidinium-izotiocianát oldata, amely szolubilizálja a mintát és denaturálja az oldatban található fehérjéket.(21) A sejteket 6 cm átmérőjű csészékben növesztettük, és 24 órán át kezeltük 100 ppm koncentrációjú nanorészecskékkel. 1xPBS-es mosást követően 1 ml 1xPBS-ben felkapartuk a sejteket, a szuszpenziót 4 °C –on, 1000 G-n 5 percig centrifugáltuk. A sejtpelletről eltávolítottuk a felülúszót, majd 500 µl TRIzolban (TriPure Isolation Reagent, Roche) szuszpendáltuk és vortexeltük. A szuszpenziót 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd hozzámértünk 50 µl kloroformot. 15 másodpercig vortexeltük, majd 10 percig szobahőmérsékleten, 12 000 G-n centrifugáltuk. A felső vizes fázist, amely az RNS-t tartalmazza, átmértük egy új Eppendorf-csőbe, és 125 µl izopropanolt adtunk hozzá (RNS kicsapása). 10 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd 10 percig centrifugáltuk 12 000 G-n, szintén szobahőmérsékleten. A felülúszó eltávolítása után levegőn szárítottuk a mintát. A pelletre 250 µl 70 %-os etanolt mértünk, és 13 000 G-n 10 percig centrifugáltuk. Ismét eltávolítottuk a felülúszót, és levegőn szárítottuk a pelletet. Végül a pelletet 10 µl RNáz-mentes vízben szuszpendáltuk.

Ezt követően Nanodrop ND-1000 Spectrophotometerrel megmértük a minták RNS-koncentrációját. A szennyező DNS eltávolításához a mintáinkat Fermentas DNáz I enzimmel kezeltük. A gyártó ajánlása alapján 2,3 µg RNS-t tartalmazó szuszpenzióhoz 1 µl DNáz enzimet és 1 µl MgCl₂-ot tartalmazó 10xDNáz puffert adtunk, ezt az oldatot 10 µl végtérfogatra egészítettük ki vízzel, és 37 °C-on 45 percig inkubáltuk. Ez után az enzimátikus

folyamatok leállítására 2 µl 25 mM EDTA-t adtunk a reakcióelegyhez, amit aztán 10 percig 65 °C-on inkubáltunk.

Reverz transzkripció

Az izolált RNS-ek cDNS-re történő átírásához reverz transzkripciót végeztünk. Mintánként 1-1 µg RNS-t írtunk át ABI TaqMan Reverse Transcription Kit segítségével, a gyártó utasítása szerint, 25 µl reakció térfogatban (5,5 µl MgCl₂, 5 µl dNTP mix, 1,25 µl random hexamer primer, 2,5 µl reverz transzkriptáz puffer, 0,5 µl Rnáz inhibitor, 0,65 µl reverz transzkriptáz enzim, 1 µg DNáz I-kezelt RNS-t tartalmazó térfogat, RNáz-mentes vízzel hígítva). A PCR készülék a reakcióelegyeket 10 percig 25 °C-on, 60 percig 37 °C-on és 5 percig 95 °C-on tartja.

Real-time PCR

A vizsgált génekről átíródó transzkriptumok kvantitatív analízisét RT-qPCR-ral végeztük. A kísérletekhez Thermo Scientific PikoReal 96 készüléket használtunk, a reakció térfogata 10 µl volt: 1,6 µl cDNS, 0,2-0,2 µl forward és reverz primer 100 nM esetén (vagy 0,4-0,4 µl 200 nM esetén, a vízzel kompenzálva), 5 µl SYBR Green, 3 µl víz. Az egyes gének cDNS-ét a Függelék 1. táblázatában látható primerekkel amplifikáltuk. A reakció során az egyes ciklusokban keletkező termék mennyiségét a kétszálú DNS-hez kötődő SYBR Green (Thermo Scientific Maxima SYBR Green qPCR Master Mix) fluoreszcens festékkel kvantifikáltuk.

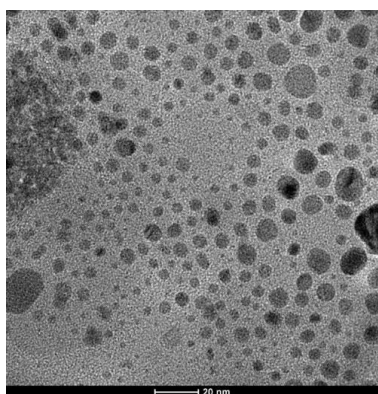
A következő reakciókörülményeket alkalmaztuk: 95 °C 7 percig, majd 95 °C 5 másodpercig és 60 °C 45 másodpercig 40 cikluson keresztül, ez után 60 °C 15 másodpercig. A reakciók végén DNS olvadási görbét vettünk fel, melynek analízisével kiszűrhetjük a melléktermékeket, ellenőrizhetjük a termék minőségét. Az eredmények kiértékelésénél 18S rRNS-re normalizáltunk, a vizsgált gének expressziójának változását $\Delta\Delta C_t$ -módszerrel számoltuk ki.

Eredmények és értékelésük

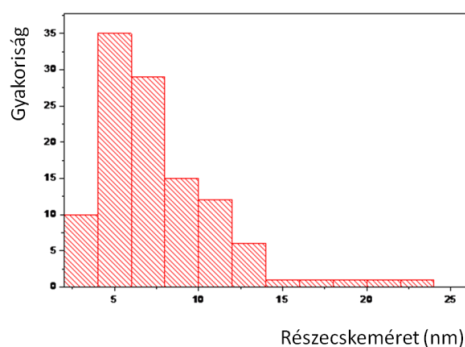
Az ezüst nanorészecskék szintézise és jellemzése

Az Anyagok és módszerek részben leírt módon kémiai redukciós eljárással citráttal stabilizált ezüst nanorészecskéket állítottunk elő két eltérő méretben. Az előállított nanorészecskék méreteloszlását transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM), felületi töltését és stabilitását hidrodinamikai sugár és zéta-potenciál méréssel ellenőriztük.

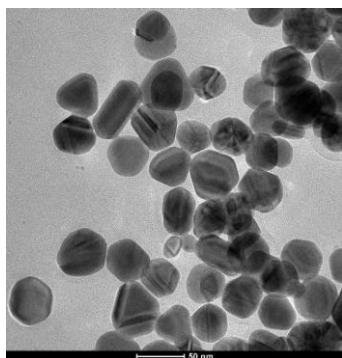
A kapott 4 nm (1. és 2. ábra) és 35 nm (3. és 4. ábra) részecskék transzmissziós elektronmikroszkóppal készített képe az alábbi ábrákon látható.



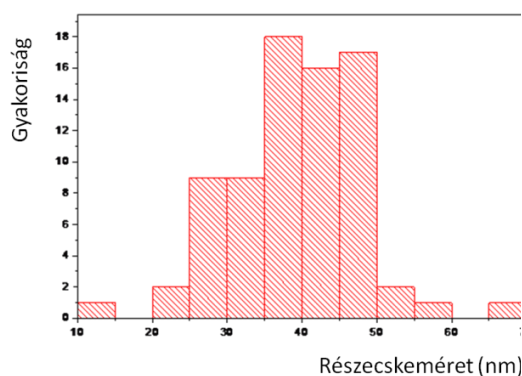
1. ábra. 4 nm-es ezüst nanorészecskék elektronmikroszkóppal készített képe.



2. ábra. 4 nm-es ezüst nanorészecskék TEM felvételek alapján számolt méretbeli eloszlása.



3. ábra. Az elkészített 35 nm-es ezüst nanorészecskék képe (TEM).



4. ábra. 35 nm-es ezüst nanorészecskék méretbeli eloszlása.

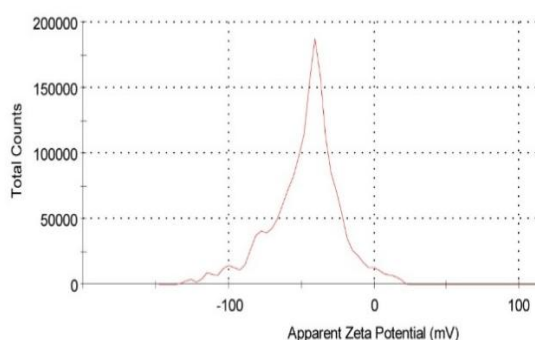
A ZetasizerNano készülék dinamikus fényszórással (DLS – dynamic light scattering) méri a részecskék Brown-mozgását, majd ebből az értékből számítja ki azok átlagos

átmérőjét. A készülék lézerrel világítja meg a részecskéket, és az azokon szóródó fény intenzitásának fluktuációját mériük.

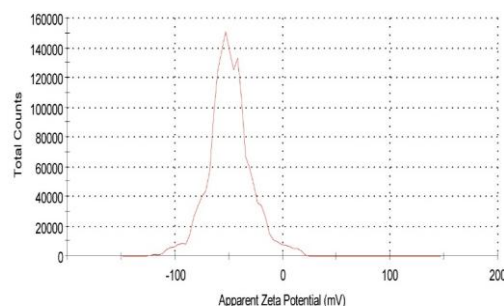
A kolloid rendszerekben a részecske elektrokinetikai potenciálját zéta-potenciálnak nevezzük. Egy ilyen rendszerben a töltéssel bíró részecskéhez ellentétes töltésű ionok tapadnak. A részecskétől kissé távolabb elhelyezkedő, ahhoz gyengébben kötődő ellentétes töltésű ionok egy diffúz ionréteget alkotnak. Amikor a részecske elmozdul, a hozzá kapcsolódó, vele együtt mozgó és az elmozduló folyadékréteg közötti nyírási sík szétválasztja a diffúz ionréteget. A nyírási síkban mérhető potenciál a zéta-potenciál, amit a készülék elektroforézissel és lézer doppler áramlásméréssel határoz meg. A zéta-potenciál alapján következtethetünk a nanorészecskék stabilitására, azaz hogy mennyire ellenálló a rendszer az aggregálódással szemben. Minél nagyobb negatív, illetve pozitív értékű a zéta-potenciál, annál stabilabbnak tekinthetők a részecskék. (ZetasizerNano Usermanual Man0317-1.1)

A méréshez speciális küvetát használtunk, amelyben található kapillárist feltöltöttünk a nanorészecskék vizes oldatával.

A transzmissziós elektronmikroszkóppal készített képek alapján átlagosan 4 nanométeresnek illetve átlagosan 35 nm-esnek tekintett partikulumok hidrodinamikai méreteloszlását is megvizsgáltuk, melynek eredményei (nem publikált adatok) megerősítik a TEM képek alapján becsült átlagméretet. Ugyanakkor azt tapasztaltuk, hogy a nagyobb partikulumokat tartalmazó minta heterogénebb, jelentősebb mennyiségű kisméretű részecskét is tartalmaz, ami azzal is magyarázható, hogy a nagyobb részecskék szintézisében a kisebb, átlagosan 4 nm-es partikulumokat szintetikus góccokként használtuk.



5. ábra. A 4 nm ezüst nanorészecskék zéta-potenciálja.



6. ábra. A 35 nm ezüst nanorészecskék zéta-potenciálja.

A vártnak megfelelően, a zéta-potenciál mérés mindkét szuszpenzió esetében nagy negatív értéket adott, a 4 nm-es részecskék esetében -46,9 mV, a nagyobb méretű, átlagosan 35 nm-esnek tekintett részecskéknél -49,1 mV a zéta-potenciál átlagos értéke. (Lásd 5. ábra, 6. ábra.)

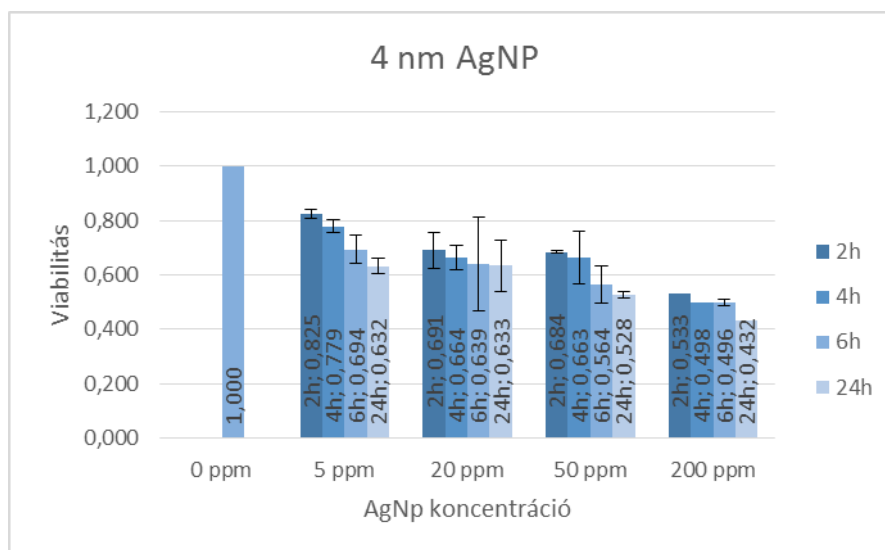
A mért zéta-potenciál értékek tehát jóval a -30 mV érték alá esnek, azaz a szintetizált nanopartikulum szuszpenziók nagyon stabilnak tekinthetők. A stabilitást az okozza, hogy az erősen negatív vagy erősen pozitív zéta-potenciállal rendelkező részecskék nagyobb erővel taszítják egymást, ami csökkenti az aggregáció esélyét.

Mindezek alapján kijelenthetjük, hogy sikerült stabil, megközelítőleg gömb alakú ezüst nanorészecskéket létrehozunk, és a nanorészecskék átlagos mérete megközelítőleg 4 nm és 35 nm. Fontos kiemelni, hogy a nanorészecskék mérete az oldatban heterogén, viszonylag széles skálán mozog, ezért csak átlagos méretről beszélhetünk a kétféle oldat esetében.

Ezüst nanorészecskék hatása a sejtek viabilitására

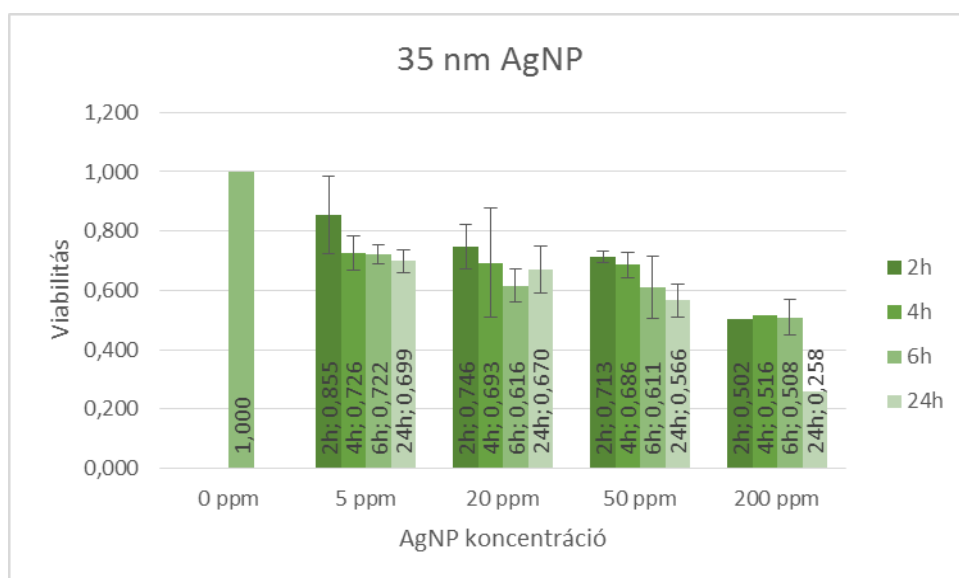
A kísérleteink kezdőpontjaként megvizsgáltuk a szintetizált ezüst nanorészecskék sejtek életképességére kifejtett hatását. A viabilitást kétféle módszerrel: tripánkék- és MTT-assay-el mértük a U2Os sejtvonal esetében, a HeLa sejtek esetében pedig kizárólag MTT-vel. Az eredményeket a kezeletlen kontroll sejtek értékeire normalizáltuk.

Megvizsgáltuk U2Os sejtek viabilitását különböző időtartamú és koncentrációjú, átlagosan 4 nm és 35 nm méretű ezüst nanorészecskékkel (AgNP) való kezelés után tripánkék módszerrel. A U2Os sejteket 5, 20, 50 és 200 ppm koncentrációjú nanorészecskével kezeltük 2, 4, 6 és 24 órán keresztül. A kontroll sejtek életképessége nem mutatott szignifikáns változást a kísérlet időtartamának növelésével, így ennek értékét 1-nek (100%-nak) vettük, és a kezelt sejtek viabilitását ehhez viszonyítottuk. Azt tapasztaltuk, hogy a sejtek életképessége idő- és koncentrációfüggő módon változik a kezelés során.



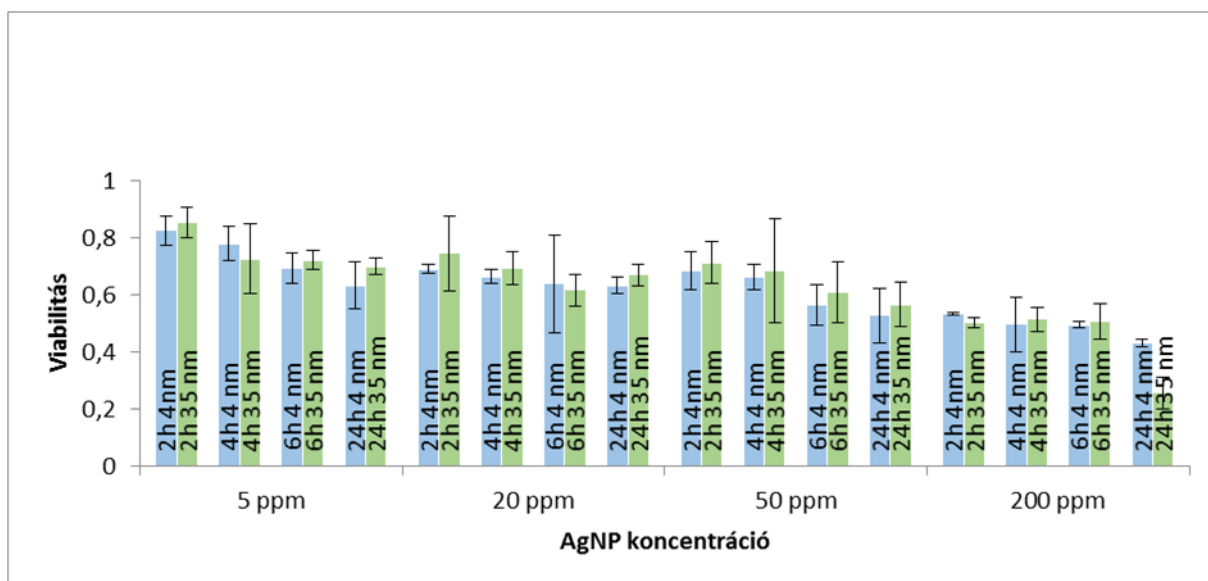
7. ábra. U2Os sejtek viabilitása 4 nm AgNP kezelés hatására a kezeletlen sejtekhez viszonyítva.

Az 5 ppm koncentrációban alkalmazott 4 nm méretű ezüst nanorészecske kezelés esetén a viabilitás egyenletes csökkenését tapasztaltuk a kezelési idő növelésével (7. ábra). A 20 ppm-es kezelés kissé nagyobb mértékben csökkentette a viabilitást, de emellett a koncentráció mellett nem volt jelentős a folyamat időfüggése. Az 50 ppm-es kezelés nem csökkentette jelentősen a viabilitást a 20 ppm-hez képest, azonban ebben a koncentrációban a viabilitás időfüggését figyelhettük meg. A 200 ppm-es kezelés csökkentette a legnagyobb mértékben a sejtek életképességét, és ennél a koncentrációnál is csekély volt a folyamat időfüggése.



8. ábra. U2Os sejtek viabilitása 35 nm AgNP kezelés hatására, a kontroll sejtekhez viszonyítva.

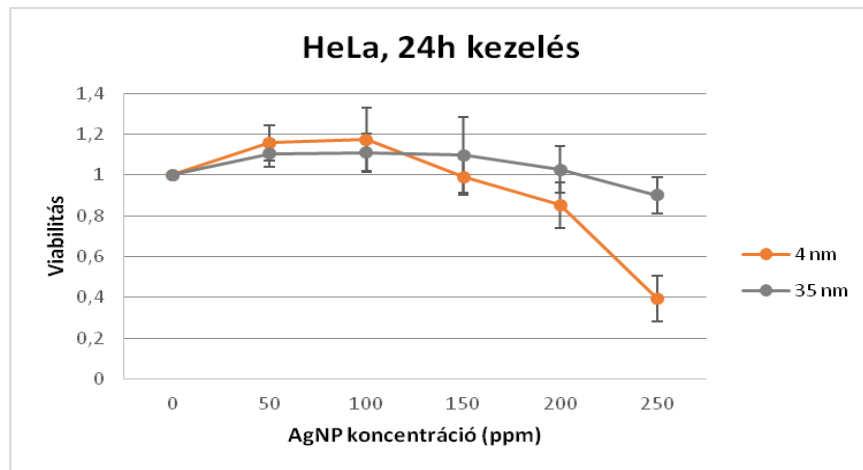
Az átlagosan 35 nm AgNP-t a legkisebb, 5 ppm koncentrációban alkalmaztuk, és azt tapasztaltuk, hogy 4 óra kezelés után már nem csökkent tovább jelentős mértékben a viabilitás. A többi koncentrációban (20, 50, 200 ppm) viszont megfigyelhető volt a U2OS sejtek életképesség csökkenésének időfüggése. A 20 és 50 ppm-es kezelés hatása között ebben az esetben sem volt nagy különbség, és itt is a 200 ppm-es kezelés eredményezte a legdrasztikusabb sejtpusztulást (8. ábra).



9. ábra. Az átlagosan 4 nm és 35 nm AgNP hatásának összehasonlítása U2Os sejtek viabilitására. (Kék színnel jelölve: 4 nm, zöld színnel megjelenítve: 35 nm).

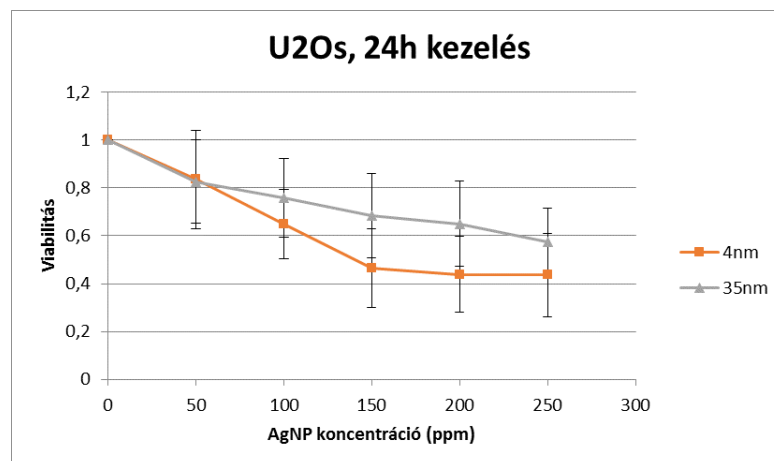
A 4 és 35 nm-es partikulumok hatását összehasonlítva (azonos koncentráció és kezelési idő mellett) látható, hogy tripánkékes módszerrel vizsgálva nem mutatható ki számottevő különbség a kétféle méretű részecske viabilitásra gyakorolt hatása között U2OS sejteken. A 200 ppm-es koncentrációjú, 24 órás kezelés volt az egyetlen kísérlet, ahol a 35 nm-es nanorészecske egyértelműen nagyobb mértékben csökkentette a viabilitást, mint a 4 nm-es (9. ábra).

MTT-módszerrel vizsgáltuk az ezüst nanorészecskék koncentrációfüggő hatását egy másik sejtvonal, a méhnyakrák HeLa sejtek viabilitására, 24 illetve 48 órás kezelési idő után. Továbbá ellenőriztük a U2Os sejtek esetében tripánkék módszerrel kapott eredményeket MTT módszerrel is. A koncentrációkat ezeknél a kísérleteknél – a tripánkéssel végzett viabilitási tesztek tapasztalatai alapján – 50, 100, 150, 200 és 250 ppm-re emeltük, és U2Os sejteken a nanorészecskék kezelési idejét is megnöveltük, a 24 h mellett 48 h időtartamú nanokezelést is alkalmaztunk.



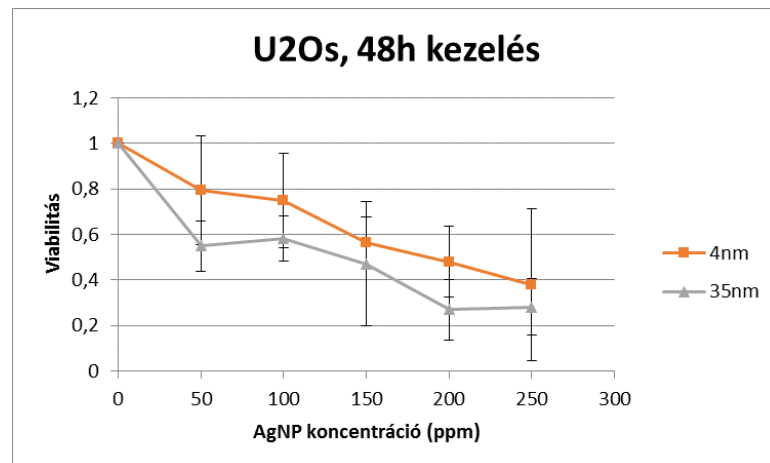
10. ábra. 4 nm és 35 nm AgNP koncentrációfüggő hatása HeLa sejtekre, 24 órás kezelés után.

Megállapítható, hogy csak a 4 nm-es ezüst nanorészecskék és csak nagy dózis esetén csökkentette számottevő mértékben a HeLa sejtek életképességét. 250 ppm koncentrációban alkalmazott nanopartikulumok a kontroll 40%-ára csökkentik a HeLa sejtek metabolikus aktivitását és viabilitását 24 óra alatt. A 35 nm-es partikulumok a viabilitásra nincsenek lényeges hatással (10. ábra).



11. ábra. 4 nm és 35 nm AgNP koncentrációfüggő hatása U2Os sejtekre, 24 órás kezelés után.

A U2Os sejtek sokkal kevésbé ellenállónak mutatkoztak mind a 4 nm-es, mind a 35 nm-es részecskékkel szemben, mint a HeLa sejtek, már alacsonyabb nanopartikulum koncentrációk jelentős sejtpusztulást eredményeztek. Továbbá megfigyelhető, hogy a 4 nm-es részecskék ennek a sejtvonalnak az életképességét is erőteljesebben csökkentette, mint a nagyobb, 35 nm-es partikulumok (11. ábra.)

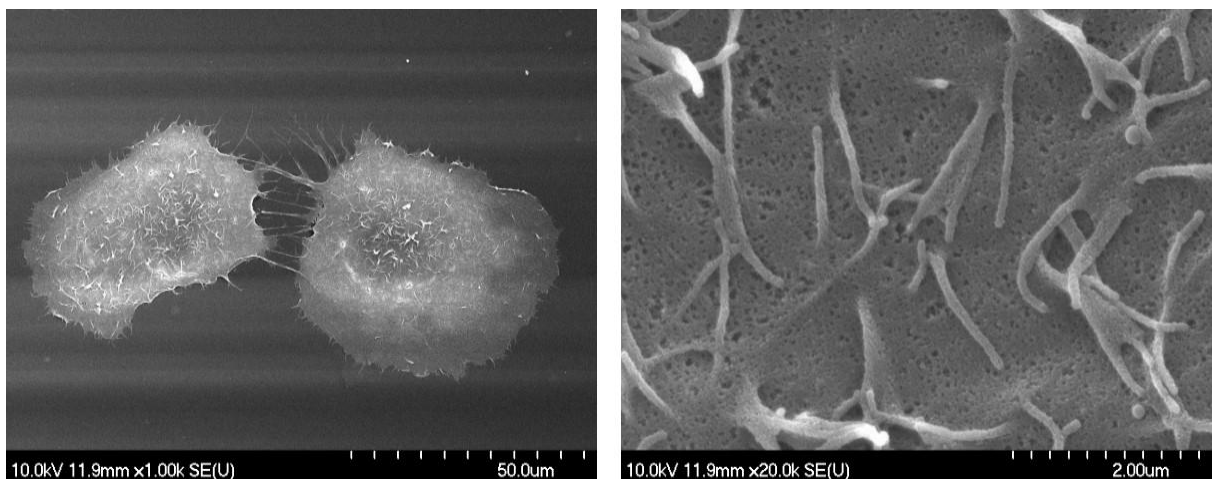


12. ábra. 4 nm és 35 nm AgNP koncentrációfüggő hatása U2Os sejtekre, 48 órás kezelés után.

Kíváncsiak voltunk, hogy a nano-kezelés idejét tovább növelve jelentősebben romlanak-e a U2Os sejtek vitalitási paraméterei. Így U2Os sejtekben 48 órás kezelés után is megmértük a viabilitást, és érdekes módon hosszabb kezelés után a 35 nm-es partikulumok hatása volt erősebb a sejtek életképességére. A viabilitás koncentrációfüggő csökkenése lineáris mindkét méretű nanorészecske esetében. (12. ábra.)

Ezüst nanorészecskék bejutása tumoros sejtekbe

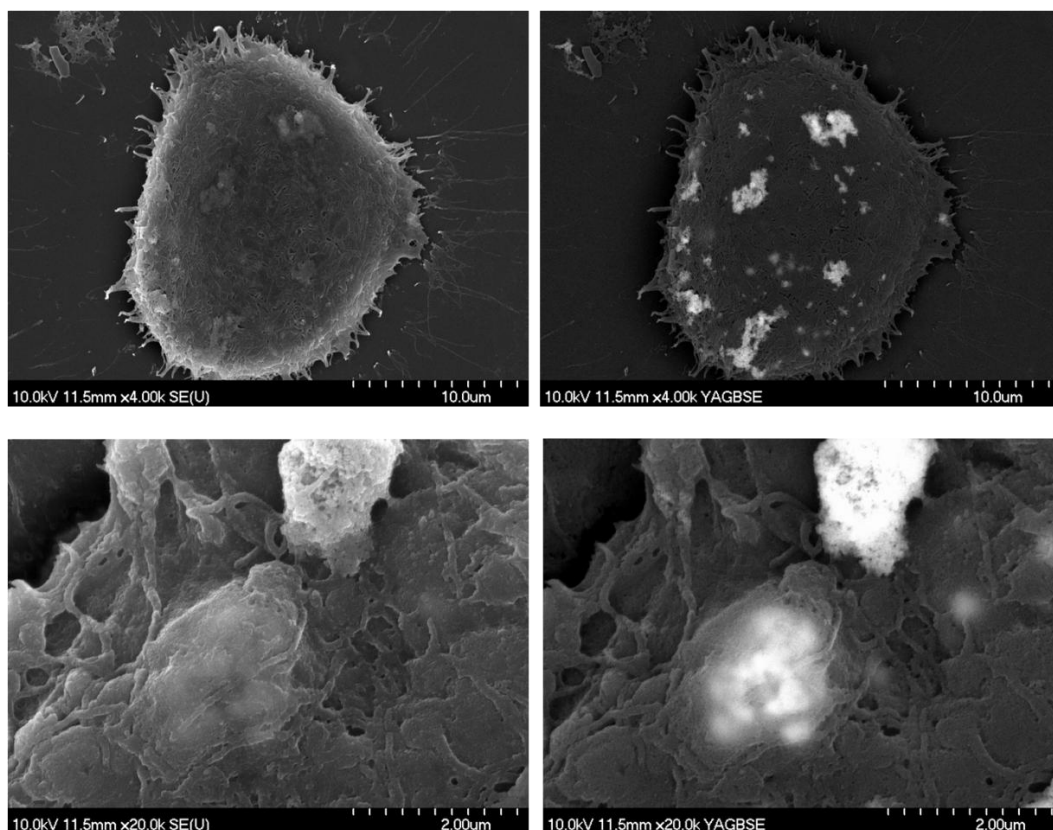
Annak bizonyítására, hogy a kétféle mérettartományú ezüst nanorészecskék a sejtekbe kerülnek, illetve a bejutás előtt a sejtek felszínére tapadnak transzmissziós és szkennning elektronmikroszkópiás felvételeket készítettünk a kezeletlen (13. ábra) és nanorészecskével kezelt U2Os sejtekről.



13. ábra. Kezeletlen U2Os sejtek szkennning elektronmikroszkópos képe.

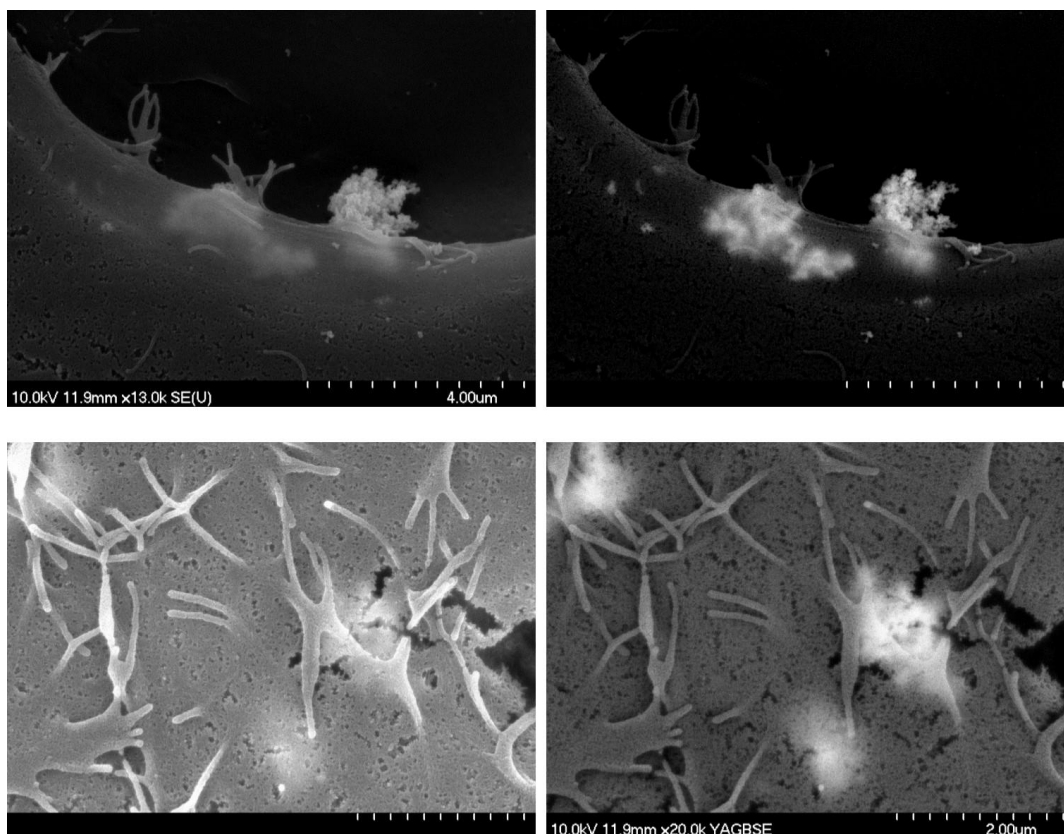
A 4 nm ezüst nanorészecskékkel kezelt sejtek felszínén és a sejt felszíne alatt is nanorészecske aggregátumokat láthatunk (14. ábra). A szkennning elektronmikroszkóp BSE (back scattered electron) detektorával láthatóvá válnak a rendszámukkal arányos módon

világos részekként a sejt belsejébe jutott, a membrán alatt elhelyezkedő, tehát a felszínen már nem detektálható ezüst nanorészecskék. A sejt egy bizonyos részletének felszínéről hagyományos szkennelési képet (SE) és a visszaszórt elektronokat érzékelő BSE detektorral is képet készítettünk, így láthatóvá váltak a sejtbbe jutott ezüst részecskék. (a 14. ábra jobb oldali oszlopa a BSE módban felvett képet mutatja).



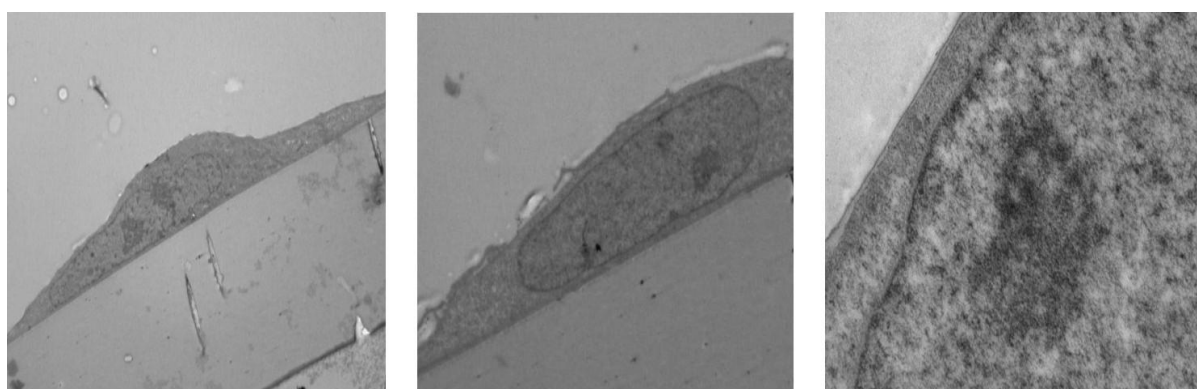
14. ábra. 4 nm AgNP-vel kezelt U2Os sejtek szkennelési elektronmikroszkópos képei. (Bal oldali képek: SE detektorral, jobb oldali képek: BSE detektorral készített felvételek).

A 35 nm ezüst nanorészecskékkel kezelt U2Os sejtek esetében szintén megfigyelhető aggregáció a sejtek felszínén és a sejtekben (15. ábra). Az ábrákon ismételt megfigyelhetjük a sejtekbe bekerült, a membrán alatt található nanorészecskéket a visszaszórt elektronok detektálásával (BSE) készített felvételeken (jobb oldali oszlop).



15. ábra. 35 nm-es AgNP-vel kezelt U2Os sejtek. (Bal oldali oszlop: SE detektorral, jobb oldali oszlop: BSE detektorral készült képek).

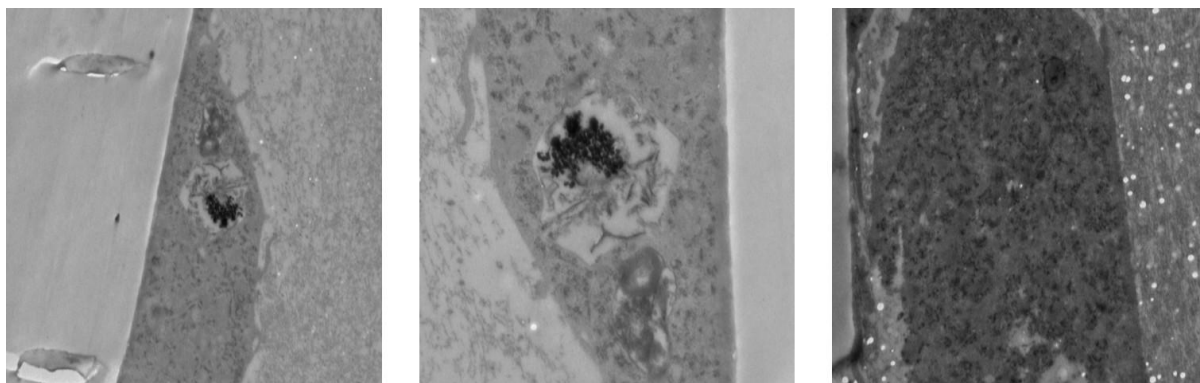
A nanorészecskék sejtekbe való bejutását és sejten belüli lokalizációját transzmissziós elektronmikroszkópiával vizsgáltuk. A kezletlen U2Os sejtről készült felvételeken látható a sejt típusra jellemző morfológia: a U2Os sejtek szétterülnek a tenyésztő membránon, jól kivehető a nagyon nagyméretű sejtmag, mely a sejt nagy részét kitölti, és megfigyelhetők a sejtmagvacskák is (16. ábra).



16. ábra. Kezletlen U2Os sejtek transzmissziós elektronmikroszkópos képe.

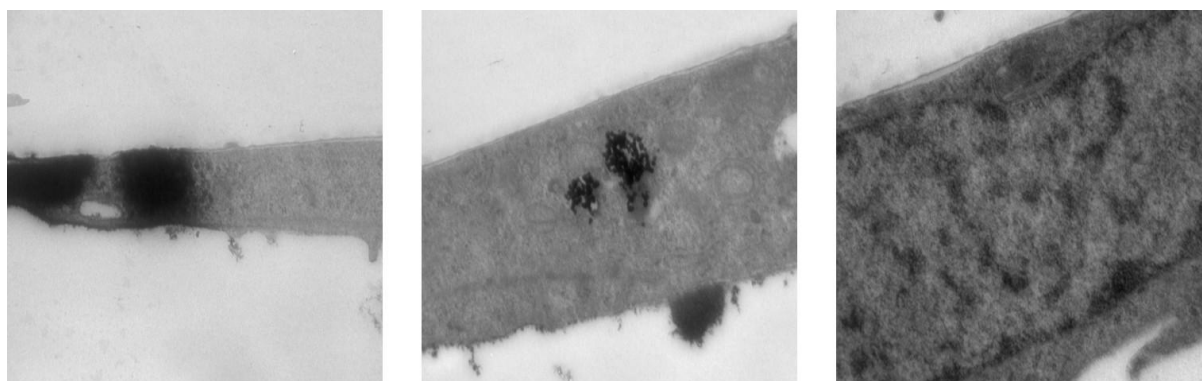
A 4 nm partikulumokkal kezelt sejtekben egyértelműen kimutathatók a nanorészecske-aggregátumok, melyek gyakran vezikulum belsejében találhatók (17. ábra). Ez

alátámaszthatja a feltételezést, miszerint a sejtek endocitózissal veszik fel a nanorészecskéket, de ennek pontos bizonyítására specifikus vizsgálatokra lenne szükség.



17. ábra. 4 nm-es részecskékkel kezelt U2Os sejtek transzmissziós elektronmikroszkópos képe.

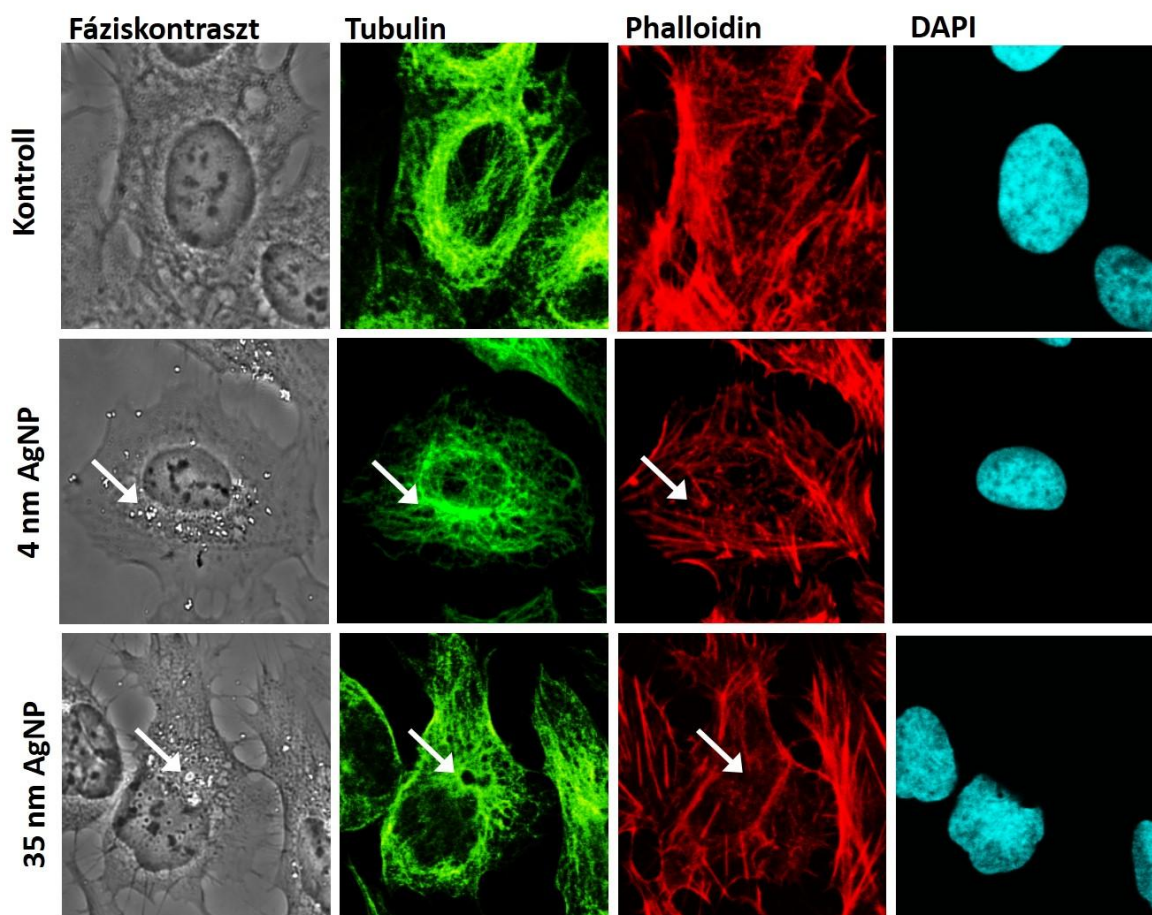
A 35 nm részecskékkel kezelt sejtekben is megfigyelhetünk hasonló elektrondenz aggregátumokat a sejtekben és a sejtek felszínén, melyek gyakran vezikulumokban, máskor diffúzan a sejtből, a mag környezetében találhatók (18. ábra).



18. ábra. 35 nm-es részecskékkel kezelt U2Os sejtek transzmissziós elektronmikroszkópos képe.

U2Os sejtek morfológiai változásai ezüst nanorészecskék hatására

Kontroll és 24 órán át nanorészecskével kezelt U2Os sejtekben immunfestéssel tettük láthatóvá a citoszkeletális rendszert, tubulin-festéssel a mikrotubulusokat és falloidinnel az aktin mikrofilamentumokat, hogy megfigyelhessük, az ezüst nanorészecskék befolyásolták-e a citoszkeleton valamely komponensét, illetve annak morfológiáját (19. ábra).



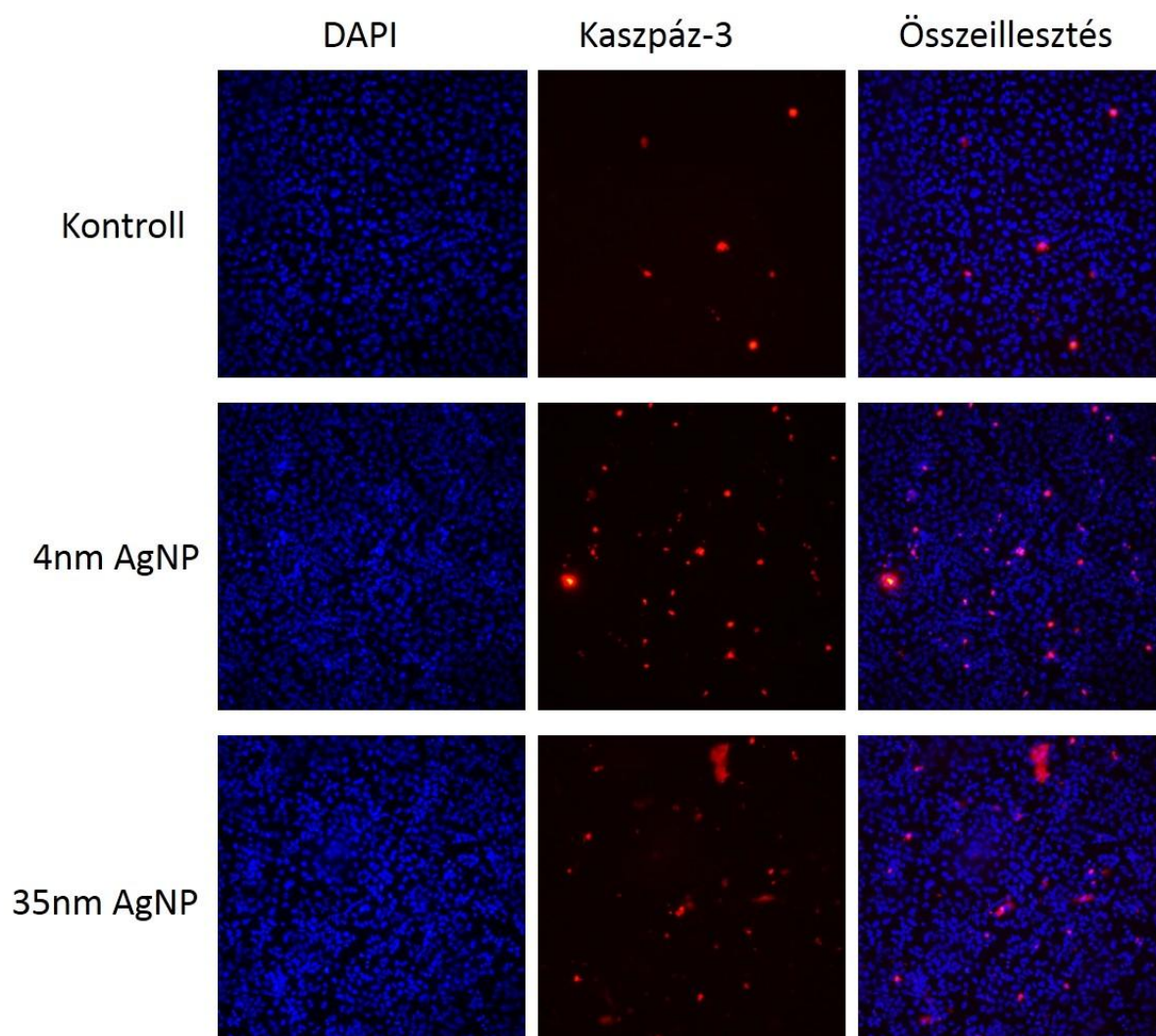
19. ábra. Kontroll és AgNP-kezelt U2Os sejtek, citoszeletális fehérjefilamentumok konfokális mikroszkópos felvételei.

A nanorészecskékkel kezelt sejtek fáziskontraszt képein látható, hogy mind a 4 nm-es, mind a 35 nm-es partikulumok a sejtmag körül halmozódnak fel, ami összhangban van a transzmissziós elektronmikroszkópos felvételek eredményeivel. A nanorészecskék aggregációja is megfigyelhető, a 35 nm-es részecskék esetén nagyobb mértékben. Az aggregátumok a mikrotubulusok szerkezetében is változásokat okoznak a képek tovább erősítik azon megfigyeléseinket, hogy a nanorészecske aggregátumok vezikulumokban, membránnal határolt multivezikuláris testekben találhatóak. A mikrofilamentum-hálózatban ún. stresszfilamentumok megjelenését feltételezzük a képek alapján (22). DAPI-festéssel a sejtmagokat tettük láthatóvá.

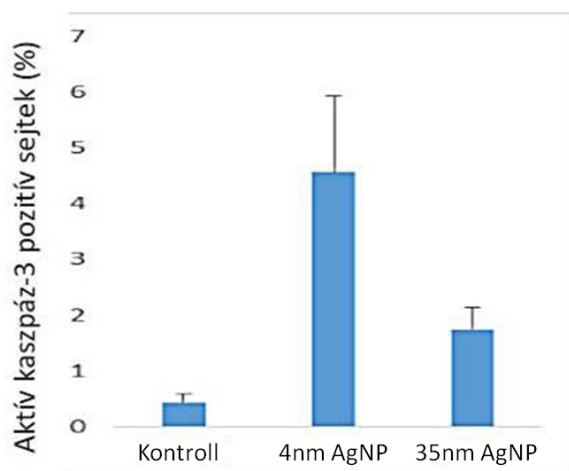
A kaszpáz-3 expresszió változása

Annak érdekében, hogy kiderítsük, a kezelés hatására bekövetkezett sejtpusztulás hátterében apoptotikus folyamatok aktiválódása áll, immunfestéssel vizsgáltuk a U2Os sejtekben az aktív effektor kaszpáz-3 mennyiségét (20. ábra). Kontroll, valamint 100 ppm

koncentrációjú, 4 nm-es és 35 nm-es ezüst nanorészecskékkel 24 órán át kezelt sejteket festettünk aktív kaszpáz-3-ra specifikus antitesttel.



20. ábra. Aktív kaszpáz-3 fehérje kimutatása kezeletlen és 4nm valamint átlagosan 35 nm méretű ezüst nanopartikulumokkal kezelt U2Os sejtekben.



21. ábra Aktív kaszpáz-3 pozitív sejtek mennyisége

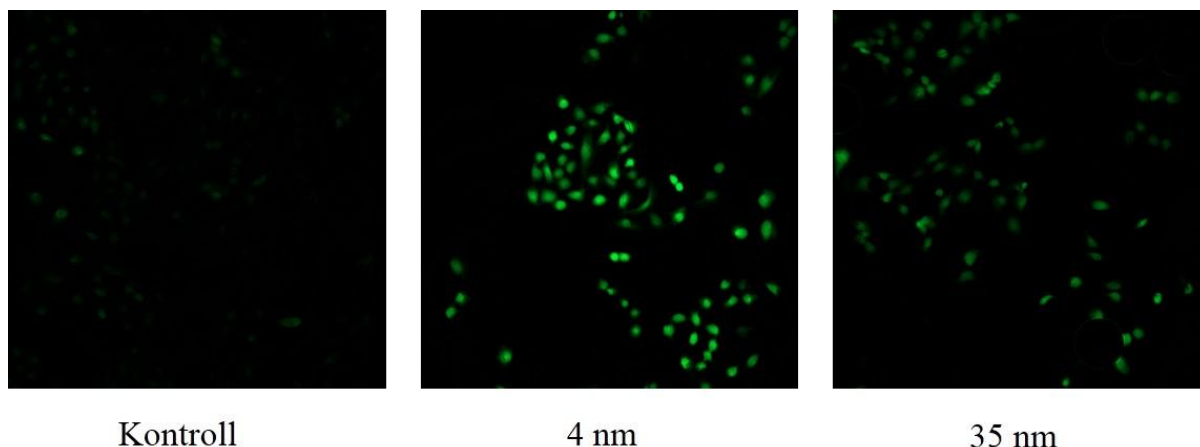
Az immunfestett mintákon látható, hogy a kezeletlen kontroll sejtekben kevés a pirossal festődő, aktív kaszpáz-3-pozitív sejt. Az ezüst nanorészecskékkel való kezelés hatására azonban jelentős számban detektáltunk aktív kaszpáz-3 pozitív sejteket. A 4 nm-es partikulumokkal kezelt sejteknél az apoptotikus sejtek aránya valamelyest nagyobb, mint a 35 nm részecskével kezelt sejtpopuláció esetében (21. ábra).

A kezeletlen sejtekben a DAPI-festés nyomán megfigyelhető sejtmagok épek, normális morfológiát mutatnak. A nanorészecskével kezelt mintákban a sejtmagok morfológiája abnormális, fragmentáció jeleit mutatják.

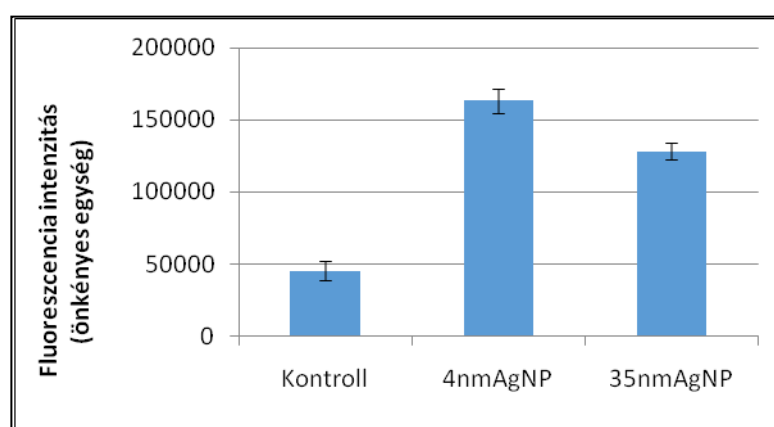
Szabadgyökök felhalmozódása

Mivel a sejteket fém nanopartikulumokkal kezeltük melynek hatására nagyszámú sejt pusztult el feltételezhetően apoptózis eredményeképpen, felmerült a kérdés, hogy a megfigyelt sejthalál kiváltásában szerepet játszhatnak-e oxidatív stressz során keletkező szabadgyökök. A reaktív oxigéngyökök intracelluláris mennyiségét DCFDA fluoreszcens festékekkel mértük U2Os sejtekben (22. ábra). A felvételeken ImageJ programmal meghatároztuk a fluoreszcencia intenzitását, és mivel a DCFDA intracelluláris átalakítása sztöchiometrikus folyamat, az intenzitásértékek változásából tudunk következtetni a ROS mennyiségének változására a 100 ppm koncentrációjú Ag nanopartikulummal kezelt sejtekben, a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva.

A fluoreszcens felvételek alapján jól látható, hogy a nanorészecske kezelés hatására számos U2Os sejt mutatott erős fluoreszcens festődést, amely az oxigén szabadgyökök jelentős termelődésére utal (22. ábra). 100 ppm koncentrációban a 4 nm-es részecskével kezelt sejtekben a kontrollhoz képest háromszorosára, a 35 nm-es nanopartikulumokkal kezelt sejtekben pedig kétszeresére nőtt a reaktív oxigéngyökök mennyisége (23. ábra). Az ezüst nanorészecskék tehát oxidatív stresszt váltanak ki a sejtekben, ami szerepet játszhat a viabilitás csökkenésében és az apoptotikus folyamatok elindításában.



22. ábra. 100 ppm AgNP kezelés hatása a reaktív oxigéngyökök képződésére U2Os sejtekben DCFDA fluoreszcens festéssel.

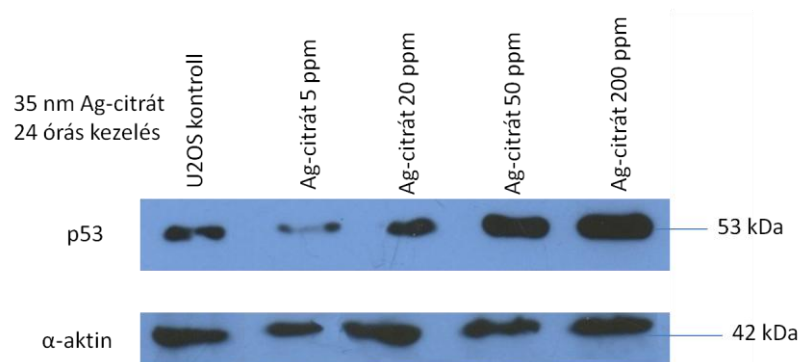


23. ábra. Reaktív oxigéngyökök mennyiségének változása AgNP-kezelés hatására, a DFCDA festés kvantitálása, a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva.

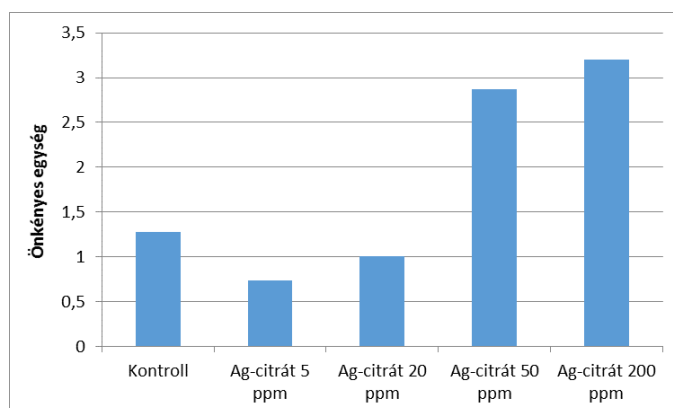
A p53 fehérje expressziójának változása 35 nm AgNP kezelés hatására

Az apoptotikus kaszpáz kaszkád aktiválásban jelentős szerepe van a p53 fehérjének, mely például oxidatív stressz során aktiválódik. Western blot technikával vizsgáltuk, hogy a különböző koncentrációban alkalmazott ezüst nanorészecskékkel történő kezelés hatására, megváltozik-e a p53 fehérje kifejeződése. Az immunoblottokat denzitometrálassal kvantitáltuk, a fehérjemennyiségeket aktinra vagy tubulinra normalizáltuk.

A 35 nm méretű ezüst nanorészecskékkel végzett 24 órás kezelés hatására a p53 fehérje mennyisége U2Os és HeLa sejtvonalban is a nanorészecskék koncentrációjának emelésével nőtt (24. 25. ábra).

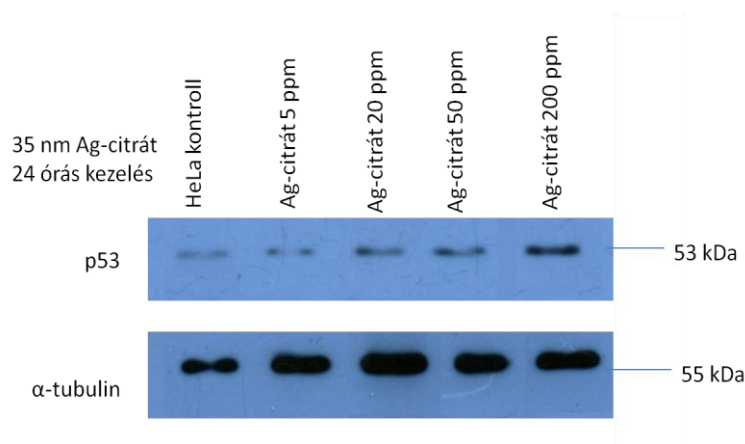


24. ábra. A p53 fehérje mennyisége kezeletlen és különböző koncentrációban ezüst nanorészecskével kezelt U2Os sejtekben.

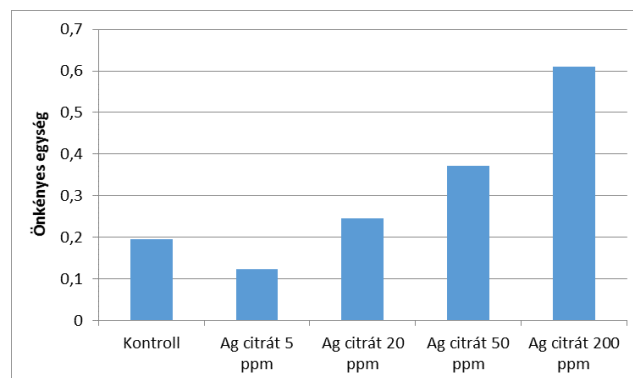


25. ábra. A p53 fehérje mennyiségének változása U2Os sejtekben (aktinra normalizált, denzitometriával nyert értékek).

U2Os sejtekben az 5 és 20 ppm koncentrációjú ezüst-citrát nanopartikulum kezelésnek nem volt jelentős pozitív hatása a p53 fehérje expressziójára (5 ppm-es kezelésnél kismértékű csökkenést is tapasztaltunk), az 50 és 200 ppm-es kezelés viszont több mint kétszeresére emelte a p53 mennyiségét (25. ábra).



26. ábra. A p53 fehérje mennyisége kezeletlen és különböző koncentrációban ezüst nanorészecskével kezelt HeLa sejtekben.



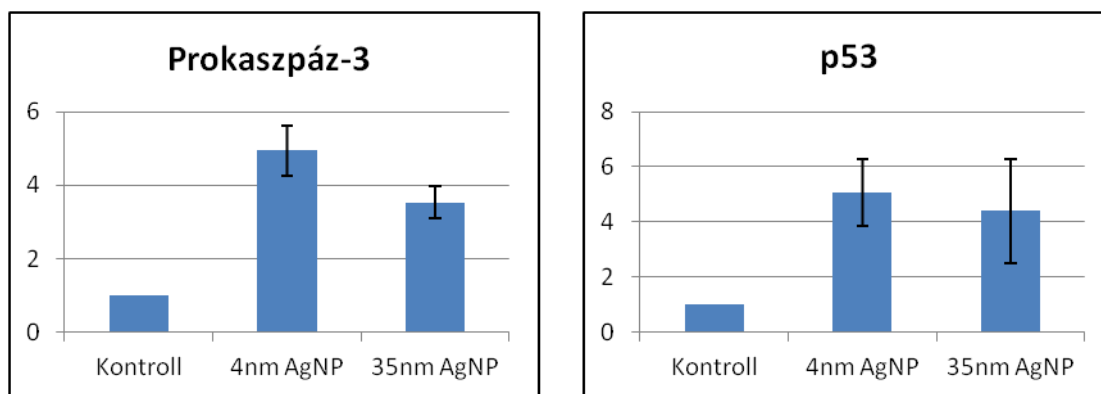
27. ábra. A p53 fehérje mennyiségének változása HeLa sejtekben (tubulinra normalizált, denzitometriával kapott értékek).

A HeLa sejtek esetében 5 ppm-es koncentrációban alkalmazott ezüst nanopartikulum kezelésnél a U2Os sejtekhez hasonlóan csökkenést tapasztaltunk a p53 mennyiségében. 20 ppm-es kezelés kismértékben növelte, 50 ppm koncentrációjú ezüst-citrát nanopartikulumok már egyértelműen növelték a p53 mennyiségét, 200 ppm-es kezelésnél pedig háromszorosára emelkedett a p53 fehérje expressziója a kontrollhoz képest (26. ábra, 27. ábra). Ugyan a HeLa sejtekben alapvetően alacsonyabb a p53 fehérje mennyisége, az ezüst nanorészecskék hatására bekövetkező koncentrációfüggő p53 fehérjeszint-emelkedés ezekben a sejtekben is megfigyelhető. Az ezüst nanorészecskék jelenlétében a p53 fehérje szintjében tapasztalt növekedést okozhatja a fehérje expressziójának növelése vagy a fehérje proteasomális degradáció alóli felszabadulása is.

Figyelembe véve az ezüst nanorészecskék koncentrációjának növelésével párhuzamosan fellépő viabilitáscsökkenést, a reaktív szabadgyökök emelkedett szintjét és a p53 fehérjeszintjének emelkedését, feltételezhető, hogy a magasabb p53-expresszió hozzájárulhat az apoptózis indukálásához a sejtekben. Az ezüst nanorészecskék hatására bekövetkező celluláris stresszhatásokat a p53 felismerheti, ami a transzkripciós faktor stabilizációjához és aktivációjához vezet, majd a p53 elindíthatja az apoptózis intrinsic (mitokondriális) útját.(11)

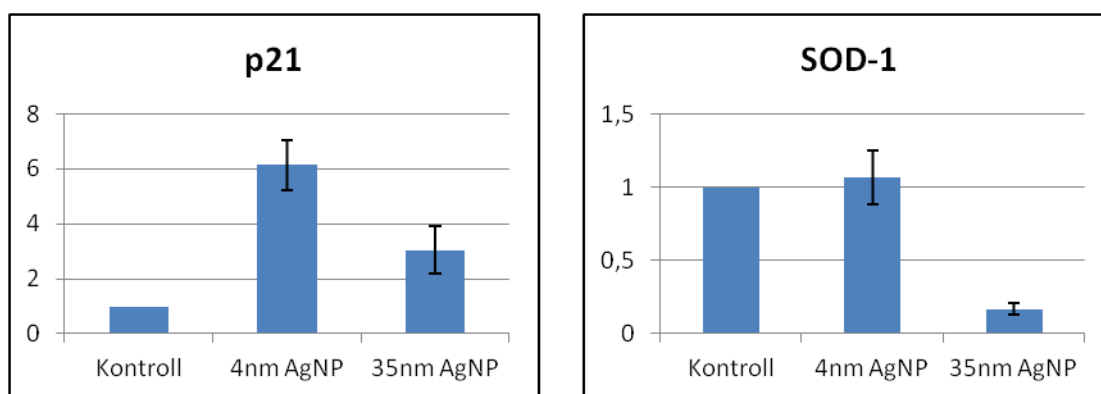
Génexpressziós változások

Az apoptózisban szerepet játszó egyes gének expresszióját RT-qPCR-al vizsgáltuk U2Os sejtekben.



28. ábra. Prokaspáz-3 és p53 expressziója.

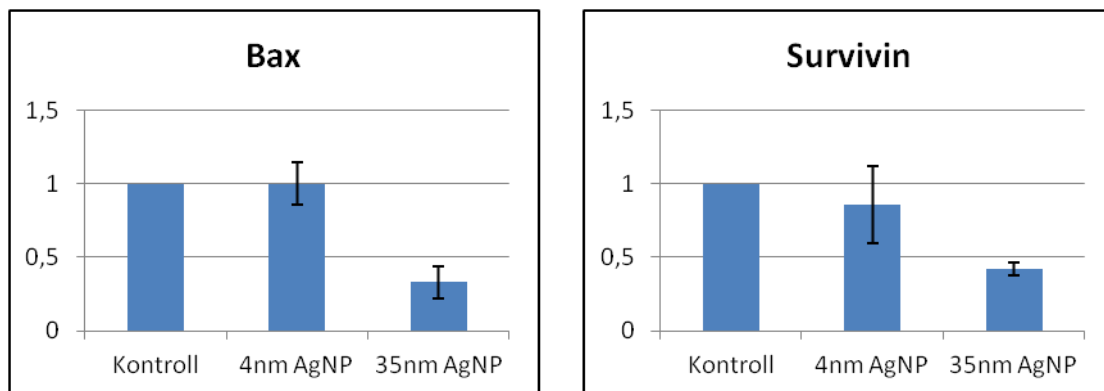
Immunfestéssel és immunoblot technikával kimutattuk, hogy az aktív kaszpáz-3 fehérje és a p53 fehérje mennyisége megnő U2Os sejtekben az ezüst nanorészecske kezelés hatására. Az aktív kaszpáz-3 immunfestés során megfigyelhető volt, hogy a 4 nm részecskék nagyobb mértékben növelték az aktív kaszpáz-3 mennyiségét a sejtekben. Ezt a változást, illetve azt, hogy a két méretű nanorészecske a prokaspáz-3 szintjét eltérő mértékben növeli mRNS szinten is kimutattuk (28. ábra). A p53 expressziója az előzetes kísérleti eredményekkel összehasonlítható módon nagy mértékben megnőtt U2Os sejtekben. (28. ábra)



29. ábra. p21 és sod-1 expressziója.

A p53 által szorosan szabályozott p21 mRNS expressziója mindkét méretű ezüst-nanorészecske hatására megemelkedett, ez a változás nagyobb mértékű volt a 4 nm-es partikulumok esetén, mint a 35 nm részecskék hatására. A reaktív oxigéngyökök által befolyásolt sod-1 mennyisége mRNS-szinten nem mutat eltérést a 4 nm-es

nanopartikulummal történő kezelés hatására, a 35 nm-es részecskékkel történő kezelés során viszont az mRNA mennyisége lecsökkent. (29. ábra)



30. ábra. Bax és survivin expressziója.

Az apoptózisban szerepet játszó bax és az antiapoptotikus survivin expressziója lényegesen nem változott a 4 nm-es nanorészecskék hatására, viszont a 35 nm nagyságú ezüst nanorészecskével történő kezelés után mindkét gén expressziója nagy mértékben lecsökkent. (30. ábra)

Összefoglalás

Kutatásaink kezdőpontjaként sikerült stabil nanorészecskéket szintetizálnunk két mérettartományban. Ezeket többféle koncentrációban és változó kezelési idő mellett alkalmaztuk U2Os és HeLa tumoros sejtvonalakon. A választott koncentrációkban és időpontokban megmértük a sejtek viabilitását, és azt tapasztaltuk, hogy mind a nagyobb, mind a kisebb méretű ezüst-citrát nanorészecske szuszpenzió jelentős mértékben pusztította a U2Os sejteket idő- és koncentrációfüggő módon, HeLa sejtek esetén ezt a változást csak a 4nm-es ezüst-nanorészecskék hatására láttuk..

Mikroszkópos felvételekkel bizonyítottuk, hogy a sejtek valóban felveszik az ezüst nanorészecskéket, melyek a sejtben, gyakran a sejtmag közelében akkumulálódnak és aggregálódnak, főként multivezikuláris testekben. A sejtek felszínén is nagy mennyiségben figyeltünk meg aggregálódott nanopartikulumokat.

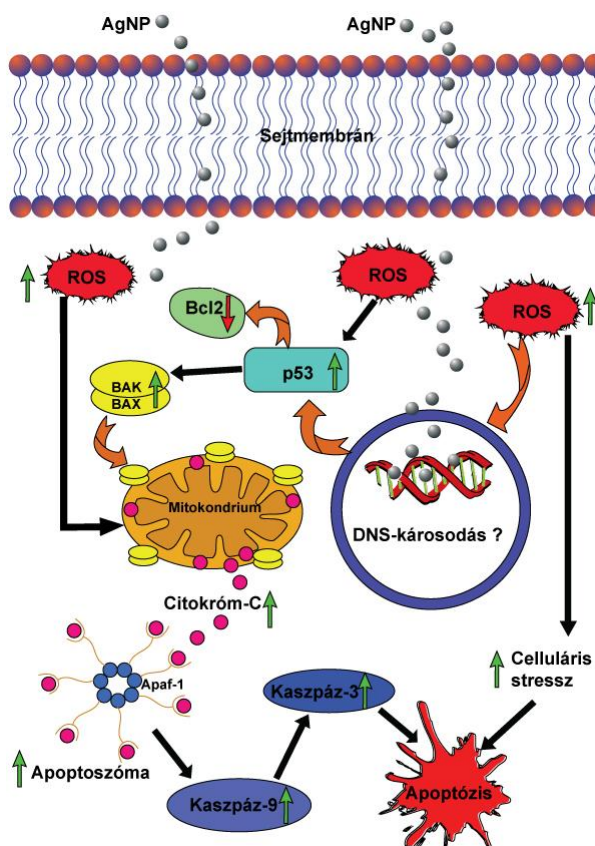
Mivel a fémek sejtekbe juttatásakor nagymértékben indukálódik oxidatív stressz, ezért megvizsgáltuk a reaktív oxigéngyökök mennyiségét a kezelt sejtekben. Mindkét mérettartományú ezüst partikulum kezelés a szabadgyökök szintjének emelkedését váltotta ki a kezeletlen kontroll sejtekben tapasztalhatóhoz képest. Az oxigén szabadgyökök keletkezése a 4 nm-es részecskék alkalmazásakor sokkal erőteljesebb volt, ebből arra lehet következtetni, hogy az oxidatív stressz kiváltásának mértékében jelentőséget kap a részecskeméret. Tehát az ezüst nanorészecskék oxidatív stresszt váltanak ki a sejtekben, ami valószínűleg összefügg a megfigyelt sejtpusztulással.

Mivel kísérleteinkben gyakran tapasztaltunk apoptózisra utaló jeleket (DNS fragmentálódás, szabadgyök termelődés, mikrofilamentumok átrendeződése), ezért megvizsgáltuk néhány kiválasztott, az apoptózisban szerepet játszó fehérje, mint p53 és kaszpáz-3 expressziójának szintjét ezüst nanorészecske kezelést követően. Különböző koncentrációjú ezüst-citrát nanopartikulum kezelés után mind a U2Os sejtekben, mind a HeLa sejtekben megnövekedett a p53 fehérje mennyisége a kezeletlen kontroll sejtekéhez képest. A western blot eredmények arra utalnak, hogy a kezelés után a p53 tumorsuppresszor fehérje mennyisége nagyobb a kezeletlen sejtekhez képest, ezzel hozzájárulhat az apoptózis indukálásához mindkét sejtvonalban. A qPCR-eredmények alátámasztották a p53 expressziójának növekedését mRNS szinten is a nanopartikulum kezelt sejtekben.

A p53 fehérje a kaszpáz kaszkád elindítása útján indukál apoptózist. U2Os sejtekben, 100 ppm koncentrációjú ezüst partikulumokkal kezelt sejtek esetén, ahol a p53 expressziója viszonylag magas, kaszpáz-3 immunfestést végeztünk. A kezeletlen mintában nagyon

alacsony volt az apoptotizáló, kaszpáz-3 pozitív sejtek száma, viszont 100 ppm koncentrációjú ezüst-citrát nanorészecske kezelés hatására jelentős számú kaszpáz-3-ra festődő sejtet detektáltunk mindkét méretű ezüst nanorészecske alkalmazása esetén. Legvégül mRNS szinten vizsgáltuk a prokaspáz-3 mennyiségének változását, melynek eredménye az volt, hogy a vizsgált gén mRNS szintje a nanopartikulumokkal történő kezelés hatására nagymértékben megemelkedett. Végeredményben elmondhatjuk, hogy eredményeink arra utalnak, hogy az ezüst-nanorészecskék hatására U2Os sejtekben indukálódik az apoptózis folyamata.

Kísérleteink alapján feltételezhetjük, hogy mind a kis, mind a nagyobb méretű ezüst nanorészecskéket a sejtek felveszik, azok a sejtekben aggregálódnak, akumulálódnak és a sejtekbe került nagy mennyiségű ezüst hatására szabadgyökök termelődése iniciálódik. Az oxidatív stressz hatására a p53 és kaszpáz-3 fehérjék aktiválódnak, apoptózis indukálódik, mely a tumoros sejtek halálához vezet.



31. ábra Az AgNP által kiváltott feltételezett molekuláris mechanizmus

További kísérletekben szeretnénk feltérképezni az ezüst nanorészecskék hatására bekövetkező p53 aktiválódásának folyamatát eltérő p53 státuszú tumoros sejtekben.