

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar
Biokémia és Molekuláris Biológia Tanszék

DIPLOMAMUNKA

Ezüst nanorészecskék biológiai hatásainak vizsgálata
tumoros sejtvonalakon

Molecular Events in Tumor Cells Treated With Silver
Nanoparticles

Keskeny Csilla
Biológus MSc szakos hallgató

Témavezetők: Csontné dr. Kiricsi Mónika
Kovács Dávid

2014.

Tartalmi összefoglaló

Az ezüst nanorészecskék különleges fizikai-kémiai jellemzőik, valamint antibakteriális, antifungális és antivirális hatásuk miatt a legelterjedtebben alkalmazott nanoanyagok.

Kimutatták, hogy az ezüst nanorészecskék emlős sejtekre is citotoxikusak, mely jelenséget ki lehetne használni a tumorellenes terápiában. Ehhez azonban fel kell deríteni az ezüst nanorészecskék pontos hatásmechanizmusát, valamint azt, hogy a részecskék különböző fizikai-kémiai tulajdonságai (mint a méret, az alak, a szintéziskor alkalmazott redukáló és stabilizáló szerek, valamint a lehetséges felületi funkcionizáló csoportok) hogyan járulnak hozzá a sejtválasz kialakításához.

Munkánk során biokompatibilis nátrium-citráttal redukált és stabilizált ezüst partikulumokat állítottunk elő két különböző méretben (4 nm, 35 nm). Humán U2Os oszteosarkóma és HeLa méhnyak adenokarcinóma sejteken kimutattuk, hogy mindkét méretű részecske hatására koncentráció- és időfüggő módon pusztulnak el a tumoros sejtek. A reaktív oxigén szabadgyökök emelkedett szintjét mutattuk ki ROS-festéssel, valamint nagy mennyiségű aktív kaszpáz-3 fehérjét detektáltunk nanorészecskével kezelt tumorsejtekben immuncitokémiai festéssel, és a 4 nm-es részecskék hatása mindkét esetben jelentősebbnek bizonyult. Western blot módszerrel vizsgáltuk a nanorészecskékkel kezelt sejtekben a tumorsuppresszor p53 kifejeződését fehérje szinten. Vizsgáltuk apoptotikus útvonalak további tagjainak expresszióját is RT-qPCR módszerrel. Transzmissziós és pásztázó elektronmikroszkópiával aggregálódott nanopartikulumokat detektáltunk a sejtekben főként vezikulumokban, illetve a sejtek felszínén, mindkét méretű részecskével végzett kezelést követően. Mindezen eredmények alapján arra következtethetünk, hogy az ezüst nanorészecskével kezelt sejtek a p53-mediált apoptotikus útvonal aktiválásának hatására pusztulnak el, aminek kiváltó oka lehet szabadgyökök felhalmozódása.

Kulcsszavak: ezüst nanorészecske, citotoxicitás, hatásvizsgálat, apoptózis, tumorsejtek

Tartalomjegyzék

Tartalmi összefoglaló	2
Irodalmi áttekintés.....	5
Ezüst nanorészecskék a biológiában	5
A nanorészecskék kémiája	5
Az ezüst nanorészecskék sejtbiológiai hatásai	6
Apoptózisban és celluláris stresszválaszban szerepet játszó fehérjék.....	7
p53.....	7
Kaspáz-3.....	8
p21.....	8
Survivin.....	9
BAX	9
SOD1.....	9
Célkitűzések	10
Anyagok és módszerek	11
Ezüst nanopartikulumok előállítása	11
Az előállított ezüst nanopartikulumok méretének ellenőrzése transzmissziós elektronmikroszkópiával	11
Az előállított ezüst nanopartikulum minták fizikai- kémiai jellemzése.....	12
Sejtkultúra	12
Viabilitás vizsgálata	13
Tripánkék módszer.....	13
MTT assay.....	13
Elektronmikroszkópos technikák	14
Transzmissziós elektronmikroszkóp (TEM).....	14
Pásztázó elektronmikroszkóp (SEM).....	14
Reaktív oxigén szabadgyökök kimutatása DCFDA-festéssel.....	15
Immuncitokémia	16
Fehérjevizsgálati módszerek	17

A sejtek feltárása, fehérjekoncentrációjuk meghatározása	17
SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) és Western blot analízis....	17
Génexpresszió vizsgálata	18
RNS-izolálás	18
RNS-izolálás Quiagen RNeasy Plus kittel	18
RNS-izolálás TRIzolal	18
Reverz transzkripció.....	19
Real-time PCR	19
Eredmények és megvitatásuk.....	21
Az ezüst nanorészecskék szintézise és jellemzése	21
Ezüst nanorészecskék hatása a sejtek viabilitására	24
U2Os sejtek morfológiai változásai ezüst nanorészecskék hatására.....	28
Ezüst nanorészecskék penetrációja tumoros sejtekbe	30
A kaszpáz-3 expresszió változása	33
Szabadgyökök felhalmozódása	34
A p53 fehérje expressziójának változása 35 nm AgNP kezelés hatására	36
Apoptotikus és a stresszválaszban szerepet játszó gének expressziójának változása	38
Összefoglalás.....	41
Irodalomjegyzék.....	44
Nyilatkozat	47
Köszönetnyilvánítás	48
Mellékletek.....	49

Rövidítések

AgNP – ezüst nanorészecske

ROS – reaktív oxigéngyökök

SE – másodlagos elektronok (secunder electrons)

BSE – visszaszórt elektronok (backscattered electrons)

TEM – transzmissziós elektronmikroszkóp

SEM – pásztázó elektronmikroszkóp

Irodalmi áttekintés

Ezüst nanorészecskék a biológiában

Nanorészecskének szűkebb értelemben az 1-100 nm tartományba eső részecskéket nevezzük. Míg a nem nanoméretű anyag részecskéknél állandóak a tulajdonságaik, a nanorészecskék tulajdonságai a méretüktől függenek, hiszen ebben az esetben a nagy felszín/térfogat arány miatt jelentőséget nyer az anyag felszínén levő atomok százalékos mennyisége. A részecskék alakja és egyéb fizikai-kémiai tulajdonságai is befolyásolják kölcsönhatásaikat az élő szervezetekkel. Ezért az utóbbi évtizedekben intenzív kutatás folyt a nanorészecskék fizikai és kémiai tulajdonságainak megismerésére.

Az ezüst nanorészecskék a legszélesebb körben felhasznált nanoméretű anyagok, mely elsősorban antibakteriális és gombaellenes hatásuknak köszönhető. Gyakorta alkalmazzák őket a biológiában és az orvostudományban, mint antibakteriális anyagok, gyógyszerek vivőanyaga; emellett bioszenzorokban is számottevő a felhasználásuk.

Az ezüst nanopartikulumok citotoxikus stresszválaszt indukálnak emlős sejtekben is, mely tulajdonságukat azonban ki lehetne használni tumorterápia során. Bár a pontos hatásmechanizmus még nem teljesen tisztázott, a sejtekbe jutott ezüst nanorészecskékből nagy mennyiségű ezüst ion szabadul fel, mely végül a sejt pusztulását okozza. A nanorészecskék jelentős irodalma ellenére egyelőre nem tisztázott, hogy milyen hatása van a partikulum méretének, alakjának, a felületi stabilizátornak, illetve esetlegesen a felszínre kötött funkcionálizáló csoportoknak az ezüst nanorészecskék tumorsejtek elleni citotoxikus hatására.

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 (Wan és mtsai, 2013). A kisméretű részecskék felhasználásával több lépéses nukleációval nagyobb méretű, gömb alakú nanorészecskék is létrehozhatók (Wan és mtsai, 2013). A szintézis másik kulcskérdése a felületi stabilizátor anyag megválasztása. Számos

sejtbarát és sejtidegen 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 (Wan és mtsai, 2013). A nanorészecskék funkcionálizálhatók például elektrosztatikus adszorpcióval is, mely során a nanorészecskén különböző típusú és funkciójú molekulákat lehet megkötni; ezt fehérjék, különösen antitestek esetében már régóta alkalmazzák (Tauran és mtsai, 2013). A nanorészecskék felületén megkötött anyagok hatással lehetnek a partikulumok sejtbe történő bejutására és sejtbeli eloszlásukra (Wang és mtsai, 2012).

Az ezüst nanorészecskék sejtbiológiai hatásai

Mivel az ezüst nanorészecskék a legszélesebb körben felhasznált nanoméretű anyagok, ezért egyre több irodalmi adat áll rendelkezésre ezeknek a partikulumoknak a sejtbiológiai hatásairól, ám pontos hatásmechanizmusuk, és az intracelluláris hatásoknak a részecskék kémiai, fizikai tulajdonságaitól való függése még nem tisztázott.

A nanopartikulumok bejutása a sejtekbe méretfüggő folyamat. Kimutatták, hogy 2 nm-nél kisebb nanorészecskék passzív transzporttal átjuthatnak az endocitózisra képtelen vörösvértestek membránján (Wang és mtsai, 2012). Ezzel szemben a nagyobb nanorészecskék, a makromolekulákhoz hasonlóan, többnyire csak aktív transzportfolyamat révén képesek átjutni a sejtmembránon.

Tanulmányok szerint a sejtek különböző endocitikus útvonalakon képesek felvenni a nanorészecskéket, ezek közé tartozik a fagocitózis, a makropinocitózis, a receptormediált endocitózis (klatrinburkolt vezikulumban, vagy kaveola-függő módon), az adszorptív endocitózis (klatrin-burkolt vezikulumban), valamint a klatrin- és kaveolin-független alternatív útvonal (Hillaireau és Couvreur, 2009).

Számos esetben leírták különböző fém nanorészecskék, köztük az ezüst nanorészecskék citotoxikus hatását, főleg toxikológiai vizsgálatok kapcsán.

Arora és mtsai (2008) leírták a 7-20 nm-es ezüst nanorészecskével történő kezelés *in vitro* sejtenyészetben 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 kaszpáz-3 aktivitás hiányából arra következtettek, hogy a sejtek nekrozissal pusztulnak el. (Arora és mtsai, 2008)

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 reaktív oxigéngyökök (ROS) intracelluláris mennyiségét. A sejtek pusztulásának oka apoptózis és nekrozis volt. Megfigyelték továbbá, hogy a nanorészecske formában és ionos formában a sejtekhez adott ezüst sejtbioológiai hatásai eltérnek, az ionos forma a vártak megfelelően toxikusabbnak bizonyult a sejtekre. Mindezek alapján feltételezik, hogy a nano-kezelés során megfigyelt celluláris hatásokat a nanorészecskékből felszabaduló ezüst ionok okozzák. (Jiang és mtsai, 2013.)

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. (Hussain és mtsai, 2005.)

Az ezüst nanorészecskék által kiváltott citotoxikus hatást ki lehetne aknázni új, potenciális tumorellenes készítmények fejlesztése során. Ehhez szükséges feltérképeznünk az ezüst nanorészecskék által kiváltott pontos molekuláris mechanizmusokat, valamint a nanorészecskék jellemzőinek hatását ezekre a folyamatokra.

Apoptózisban és celluláris stresszválaszban szerepet játszó fehérjék

p53

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; nagymértékű károsodás esetén pedig apoptózist indukál. Ezáltal ez a fehérje kulcsszerepet tölt be a genom stabilitásának megőrzésében (Agarwal és mtsai, 1998). A humán daganatok több mint 50%-ára jellemző, hogy a p53 mutációt szenved, sok egyéb esetben pedig valamely más mechanizmus gátolja a funkcióját (Agarwal és mtsai, 1998). Ilyen például az MDM2, a p53 legfontosabb negatív regulátorának túltermelése, amely a p53 nukleáris exportját és ubiquitinációját végzi, ezáltal proteoszomális lebontásra jelöli ki a tumorsuppresszor fehérjét (Maki és mtsai, 1996). DNS-károsodás vagy egyéb stressz hatására az egyébként alacsony mennyiségben jelenlevő p53 stabilizálódik, felhalmozódik és aktiválódik (Lavin és Gueven, 2006). Az oxidatív stressz is egy ilyen faktor, amelynek p53-indukáló hatását mind *in vitro*, mind *in vivo* kimutatták (Han és mtsai, 2008).

Kaspáz-3

A kaspázok specifikus proteázok, melyek az apoptózis mechanizmusának kulcsfontosságú szereplői (Porter és Jänicke, 1999).

A kaspázok elnevezése onnan ered, hogy aktív centrumukban ciszteint tartalmaznak, és bizonyos aszparaginsavak mellett hasítanak. Ők maguk is inaktív prokaspáz prekursorok proteolitikus hasításával nyerik el aktív formájukat, amely reakciót más, már aktivált kaspázok katalizálnak egy proteolitikus kaszkádfolyamatban. (Alberts és mtsai, 2008, 1118. o.)

Az apoptózisban részt vevő kaspázokat két csoportba soroljuk: iniciátor és effektor kaspázok. Az iniciátor kaspázok a kaszkád downstream tagjainak aktivációjáért felelnek, az effektor kaspázok pedig más effektor prokaspázok, valamint egyéb fehérjék hasítását végzik. Ilyen célfehérjék például a nukleáris laminok, endonukleázok, valamint citoskeletális és sejtadhéziós fehérjék. A kaspáz-3 az effektor kaspázok csoportjába tartozik. (Alberts és mtsai, 2008, 1119.o.)

Az apoptotikus folyamatokat külső és belső jelek egyaránt elindíthatják. A külső jel hatására aktiválódó extrinsic útvonal esetén a jelet (Fas ligandot) a Fas receptor érzékeli, és FADD adaptor fehérjéken keresztül aktiválja a prokaspáz-8-at vagy a prokaspáz-10-et, amelyek elindítják a kaspáz kaszkádot. A belső jel (celluláris stressz, pl. DNS-károsodás, oxidatív stressz, tápanyagok hiánya) által kiváltott intrinsic útvonalon a Bcl-2 fehérjecsalád tagjai citokróm-C-t és egyéb fehérjéket szabadítanak fel a mitokondriumok membránközi teréből. A citokróm-C az Apaf-1-hez kötődik, kialakul az apoptoszóma, és az iniciátor prokaspáz-9 aktivációja révén elindul a kaspáz kaszkád. (Alberts és mtsai, 2008, 1120-1121. o.). Mind az extrinsic, mind az intrinsic útvonal az effektor kaspázok aktivációját eredményezi, a kaspáz-3 aktivációja pedig az apoptózis során megfigyelhető sejtmag kondenzációhoz és fragmentációhoz, a citoplazma zsugorodásához, majd az elpusztuló sejt fragmentálódásához vezet (Jänicke és mtsai, 1998).

p21

A p21 (ciklin-függő kináz inhibitor 1) a sejtciklus szabályozásában játszik szerepet. Számos ciklin-függő kináz komplex gátlása révén képes a G1/S átmenetnél leállítani a sejtciklust (Gartel és Radhakrishnan, 2005). A p21 expresszióját a p53 transzkripciós faktor szabályozhatja, amely celluláris stressz hatására a p21 fehérjén keresztül állítja le a sejtciklust (Wulf és mtsai, 2002).

Survivin

A survivin (más néven BIRC5) az IAP (inhibitor of apoptosis) apoptózisgátló fehérjecsalád tagja. Overexpressziója több ráktípusra is jellemző, ezért ez a fehérje az antitumor terápia fontos célpontja lehet (Cheung és mtsai, 2013). A fehérje számos kaspáz aktivációjának gátlásával fejt ki anti-apoptotikus hatását (Sah és mtsai, 2006). Azt is kimutatták, hogy a p53 tumorsuppresszor gátolja a survivin mRNS-szintű expresszióját (Mirza és mtsai, 2015).

BAX

A BAX (Bcl-2-associated X protein) a Bcl-2 fehérjecsalád tagjaként az apoptotikus folyamatokban játszik szerepet (Oltvai és mtsai, 1993). A BAX proapoptotikus fehérje, amely a citoszolban helyezkedik el, és a megfelelő szignálok hatására a mitokondrium membránjához kötődve részt vesz a citokróm-C felszabadításában a mitokondriumból (Wolter és mtsai, 1997).

SOD1

A SOD1 (réz-cink szuperoxid dizmutáz) a szabadgyökök molekuláris oxigénné és hidrogén-peroxiddá történő átalakításáért felel (Milani és mtsai, 2011). A reaktív oxigéngyökök képződése a SOD1 mRNS expresszióját indukálja (Tsang és mtsai, 2014).

Célkitűzések

Hosszú távú célunk annak felderítése, hogy alkalmasak lehetnek-e ezüst nanorészecskék a tumorterápiában történő felhasználásra. Ezért kísérleteink során célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk és összehasonlítsuk 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 és a celluláris stresszválaszban 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 előállítását különböző méretekben (Wan és mtsai, 2013). A 4 nm méretű partikulumok szintézisét ezüst-nitrát nátrium-borohidrides redukciójával, citrát jelenlétében, 70 °C-on valósítottuk meg; a 35 nm-es részecskéket 100 °C-on szintetizáltuk, melyhez a 4 nm partikulumokat szintetikus góccokként használtuk, és a partikulumok növesztését több lépésben hajtottuk végre, 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. 1 órán át kevertettük, majd 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 hagytuk keveredni forrásponton, majd 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 feloldóképességet 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

lantán-hexaborid 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. (Hayat, 2000.)

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.

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

Az előállított ezüst nanopartikulum minták fizikai- kémiai jellemzése

Zéta 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 intenzitását, amiből megkaphatjuk a hidrodinamikai sugarat. 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. („Assay Guidance Manual”, 2004.)

A kísérletekhez 3 cm átmérőjű csészében növesztett kontroll és nanopartikulumokkal kezelt sejteket 1xPBS-es mosást követően 50 µl 0,05% tripszinnel az aljzatról 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:

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

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 formazánkristályokká 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. Az MTT redukciójának pontos sejtbiológiai mechanizmusa egyelőre nem teljesen ismert, de valószínűleg mitokondriálisan aktív enzimek NADH koenzim oxidációja mellett alakítják át.

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-in kubáltuk 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 sejmentes 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 („Assay Guidance Manual”, 2004).

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 órán át fixáltuk. Ezután az SZTE Pathológiai 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) monolayeret 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, Olympus Soft Imaging Solution GmbH, Münster).

Pásztázó elektronmikroszkóp (SEM)

A scanning 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, Na_2HPO_4 helyett 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. Ez után 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 fedőlemezt, felületén a kezelt sejtekkel, zsírtalanított kerek fémkorongra ragasztottuk. A fixált, víztelenített mintát vékony rétegben nehézfémmele vontuk be a vizsgálat előtt. Amennyiben a másodlagos elektronokat érzékelő SE (secunder electron) detektor mellett a visszaszórt elektronokat érzékelő BSE (backscattered electron) detektort is alkalmazunk, rendszámkontrasztos 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 analizátor) detektor röntgensugárzást érzékel, ami elemanalízisre 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 gyorsító feszültséggel vizsgáltuk.

Reaktív oxigén szabadgyökök kimutatása DCFDA-festéssel

A DCFDA (2',7'-diklorofluoreszcein-diacetát) a reaktív oxigéngyökök intracelluláris mérésére alkalmazott fluoreszcens festék. A nem fluoreszkáló DCFDA diffúzióval jut be a sejtekbe, ahol az intracelluláris észterázok deacetilálják, majd a reaktív oxigéngyökök oxidálják, így létrejön a fluoreszkáló 2',7'-diklorofluoreszcein (DCF). (Shen és mtsai, 2013)

A DCFDA-t 10 µM 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 darab sejtet), 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 festékkel 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 μ l 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. Az α -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 festékkel 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 pásztázó 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 szonikáló 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 poliakrilamid gél koncentrációja az elválasztandó fehérje méretétől függ. Esetünkben a p53, tubulin és aktin elválasztásához 10 vagy 12 %-os, 0,75 mm vastagságú szeparáló gélre 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 gyűjtő gélben 60 V feszültséggel, a szeparáló gélben 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 festékekkel (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 leittattuk 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 (Rio és mtsai, 2010). 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 enzimatis 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-al 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.

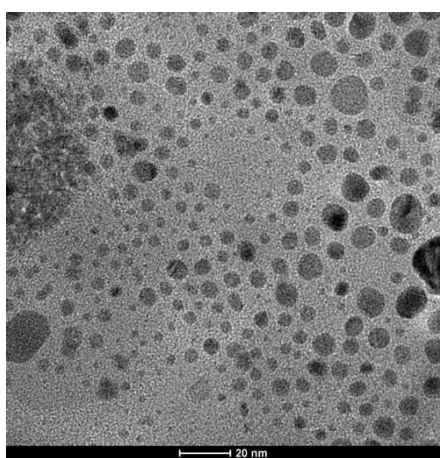
A következő reakciókörülményeket alkalmaztuk: 95 °C 7 percig, majd 95 °C 5 másodpercig és 60 °C 45 másodpercig 40 cikluson keresztül, ez után 60 °C 15 másodpercig. A reakciók végén DNS olvadási görbét vettünk fel, melynek analízisével kiszűrhetjük a melléktermékeket, ellenőrizhetjük a termék minőségét.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

Eredmények és megvitatásuk

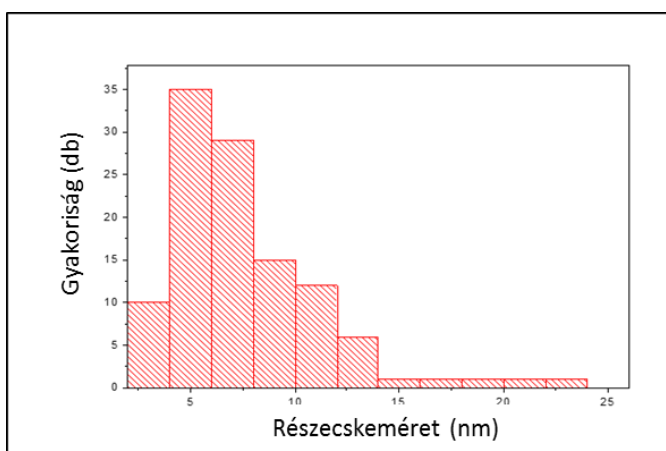
Az ezüst nanorészecskék szintézise és jellemzése

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, felületi töltését és stabilitását hidrodinamikai sugár és zéta-potenciál méréssel ellenőriztük.

A kapott 4 nm részecskék transzmissziós elektronmikroszkóppal készített képe az 1. ábrán, a részecskék méretbeli eloszlása a 2. ábrán látható.

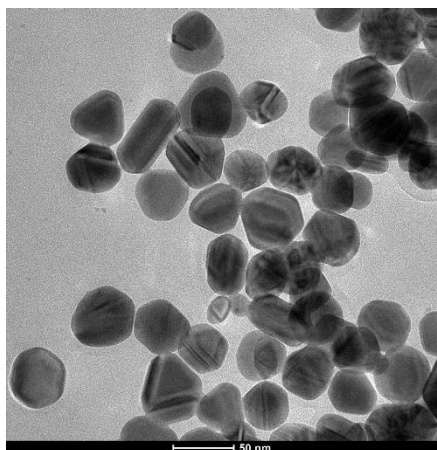


1. ábra. 4 nm-es ezüst nanorészecskék (TEM). SZTE Alkalmazott és Környezeti Kémia Tanszék

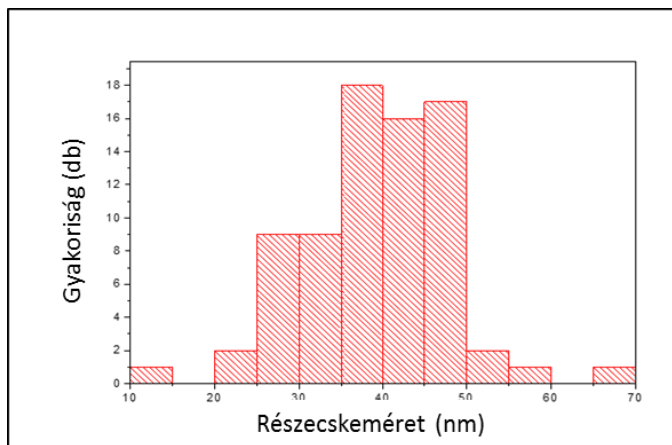


2. ábra. 4 nm-es ezüst nanorészecskék méretbeli eloszlása. SZTE Alkalmazott és Környezeti Kémia Tanszék

A kapott 35 nm részecskék transzmissziós elektronmikroszkóppal készített képe a 3. ábrán, a részecskék méretbeli eloszlása a 4. ábrán látható.



3. ábra. 35 nm-es ezüst nanorészecskék (TEM). SZTE Alkalmazott és Környezeti Kémia Tanszék



4. ábra. 35 nm-es ezüst nanorészecskék méretbeli eloszlása. SZTE Alkalmazott és Környezeti Kémia Tanszék

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 mérjük.

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 tapadó, 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 User manual Man0317-1.1)

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

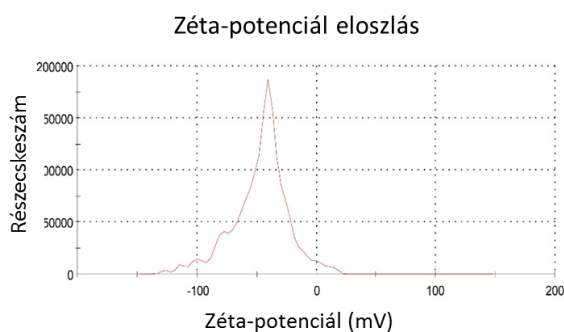
Először a transzmissziós elektronmikroszkóppal készített képek alapján átlagosan 4 nanométeresnek tekintett partikulumok hidrodinamikai méreteloszlását vizsgáltuk.

A kisebb méretű részecskéket tartalmazó szuszpenzió esetében a hidrodinamikai sugár mérési eredmények megerősítik a transzmissziós elektronmikroszkóppal készített képek alapján becsült 4-5 nm körüli átlagméretet. Mivel a nagyobb méretű részecskéken a

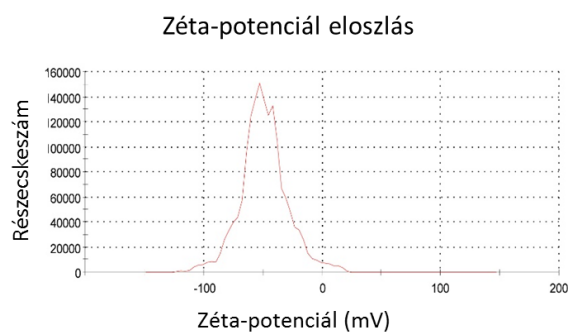
fény sokkal inkább szóródik, ezeknek a mért intenzitása jelentősen magasabb a kisebb méretű partikulumokénál, tehát a nagyobb mérettartományban megjelenő magasabb intenzitáscsúcsok nem azt jelentik, hogy a nagyobb méretű részecskék nagyobb mennyiségben vannak jelen az oldatban. Tehát ez a kolloid oldat lényegében 4-5 nm méretű részecskéket, és nagyon kis mennyiségben nagyobb partikulumokat tartalmaz.

A nagyobb méretű, a transzmissziós elektronmikroszkópos felvételek alapján átlagosan 35 nanométeresnek becsült részecskék hidrodinamikai méreteloszlását is megmértük.

A nagyobb méretű részecskéket tartalmazó szuszpenzió esetében a hidrodinamikai sugár mérési eredmények arra utalnak, hogy ez a minta jóval heterogénebb, mert 2-11 nm közötti tartományban viszonylag jelentős mennyiségű részecske található, ami azzal is magyarázható, hogy a nagyobb részecskék szintézisében a kisebb, átlagosan 4 nm-es partikulumokat szintetikus góccokként használtuk. Ugyanakkor azt is megállapíthattuk, hogy a legnagyobb százalékban a nagyobb, 30-60 nm közötti nanorészecskék alkotják a mintát, bár a megállapított átlagos méretek meghaladják a transzmissziós elektronmikroszkópos technikával becsült átlagos méretet.



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



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

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

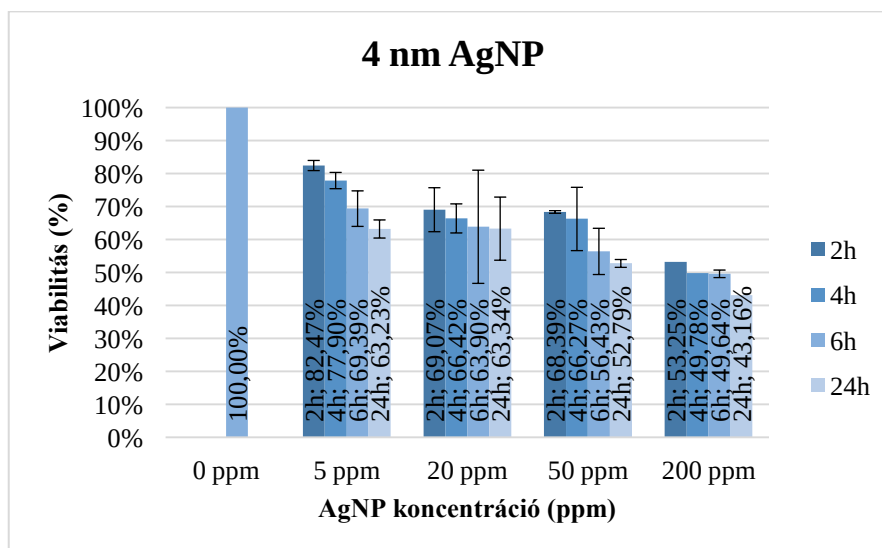
A mért zéta-potenciál értékek tehát jóval a -30 mV érték alá esnek, azaz a szintetizált nanopartikulum szuszpenziók igen stabilnak tekinthetők. A stabilitást az okozza, hogy az erősen negatív vagy erősen pozitív zéta-potenciállal rendelkező részecskék nagyobb erővel taszítják egymást, ami csökkenti az 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 kísérleteinket kezdőpontjaként megvizsgáltuk a szintetizált ezüst nanorészecskék (AgNP) sejtek életképességére kifejtett hatását. A viabilitást kétféle módszerrel: tripánkék- és MTT-assay-vel mértük a U2Os sejtvonal esetében, a HeLa sejtek esetében pedig kizárólag MTT-vel. Az eredményeket a kezeletlen kontroll sejtek értékeire normalizáltuk.

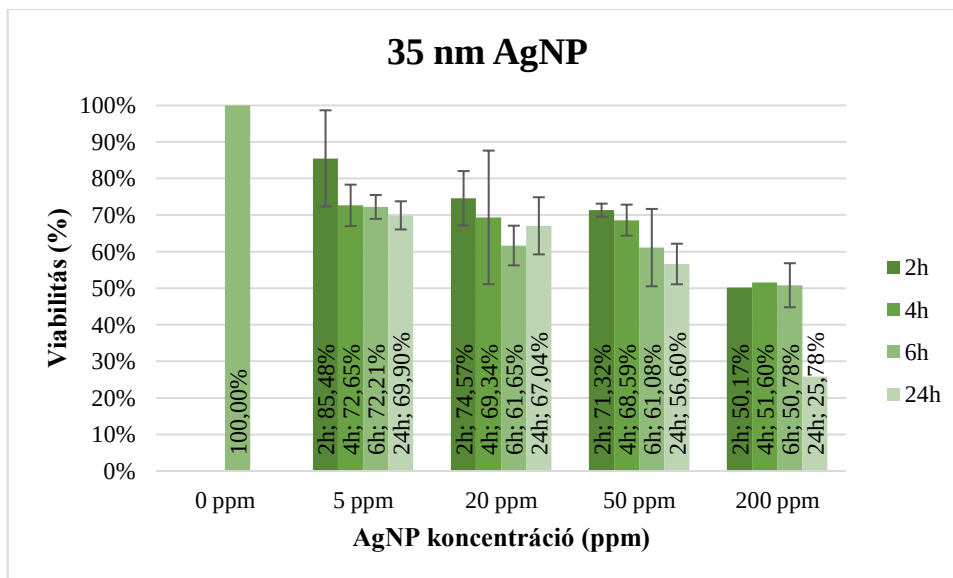
Megvizsgáltuk U2Os sejtek viabilitását tripánkék módszerrel, különböző időtartamú és koncentrációjú, átlagosan 4 nm és 35 nm méretű ezüst nanorészecskékkel való kezelés után. A U2Os sejteket 5, 20, 50 és 200 ppm koncentrációjú nanorészecskével kezeltük 2, 4, 6 és 24 órán keresztül. A kontroll sejtek viabilitása 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.

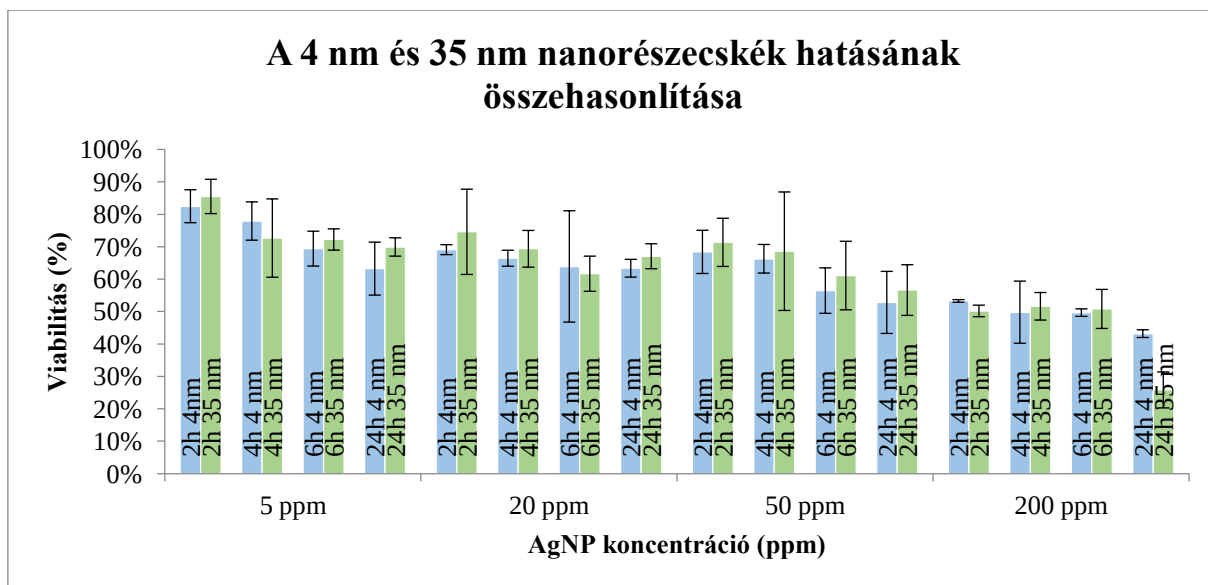
Az 5 ppm koncentrációban alkalmazott 4 nm méretű ezüst nanorészecske kezelés esetén a viabilitás egyenletes csökkenését tapasztaltuk a kezelési idő növelésével (7. ábra). A 20 ppm-es kezelés kissé nagyobb mértékben csökkentette a viabilitást, de emellett a koncentráció mellett nem volt jelentős a folyamat 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.

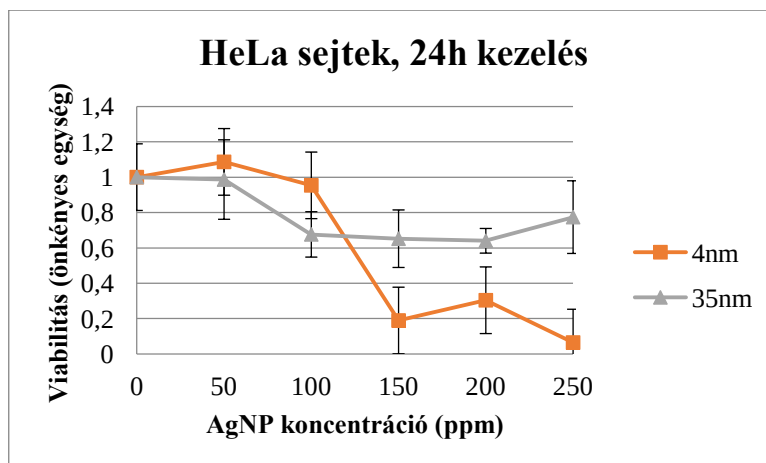
Az átlagosan 35 nm AgNP-t a legkisebb, 5 ppm koncentrációban alkalmaztuk, és azt tapasztaltuk, hogy 4 óra kezelés után már nem csökkent tovább jelentős mértékben a viabilitás. A többi koncentrációban (20, 50, 200 ppm) viszont megfigyelhető volt az életképesség csökkenésének időfüggése. A 20 és 50 ppm-es 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. A 4 nm és 35 nm AgNP hatása U2Os sejtek viabilitására. (Kék színnel jelölve: 4 nm, zöld színnel megjelenítve: 35 nm).

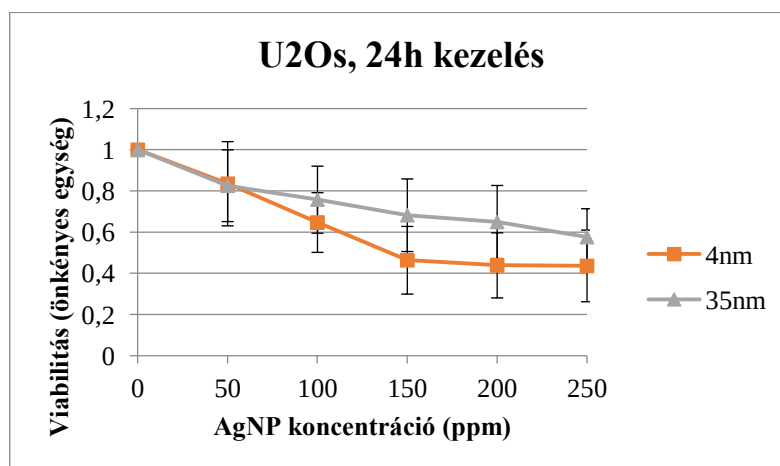
A 4 és 35 nm-es partikulumok hatását összehasonlítva (azonos koncentráció és kezelési idő mellett) látható, hogy tripánkékes módszerrel vizsgálva nem mutatható ki számottevő különbség a kétféle méretű részecske viabilitásra gyakorolt hatása között (9. ábra). A 200 ppm-es koncentrációjú, 24 órás kezelés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

MTT-módszerrel vizsgáltuk az ezüst nanorészecskék koncentrációfüggő hatását egy másik sejtvonal, a méhnyakrák HeLa sejtek viabilitására, 24 vagy 48 órás kezelési idő után. Továbbá ellenőriztük a U2Os sejtek esetében tripánkék módszerrel kapott eredményeket MTT módszerrel is. A koncentrációkat ezeknél a kísérleteknél – a tripánkékes 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.



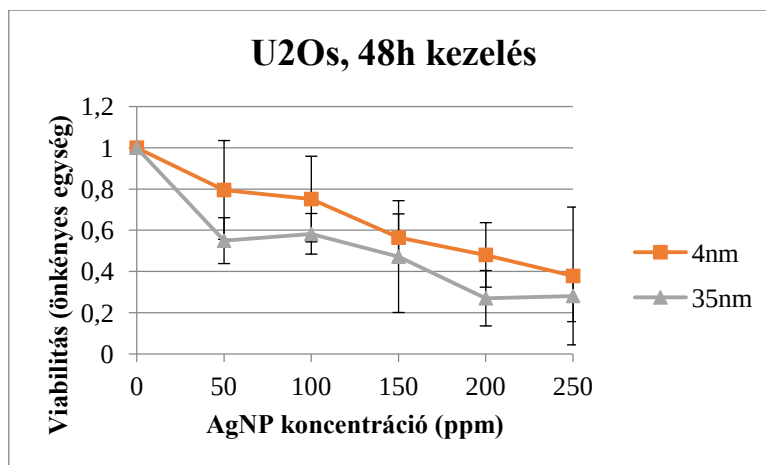
10. ábra. 4 nm és 35 nm AgNP koncentrációfüggő hatása HeLa sejtekre, 24 órás kezelés után.

Alacsonyabb koncentrációban (50 és 100 ppm) a 35 nm-es ezüst nanorészecskék erősebben csökkentették a HeLa sejtek életképességét, viszont nagyobb dózisban a 4 nm-es partikulumok hatása volt sokkal jelentősebb, ezek számottevő mértékben megölték a HeLa sejteket (10. ábra). A 250 ppm-es koncentrációban a 4 nm-es részecskével alkalmazott kezelés már a kontroll 10%-ára csökkenti a HeLa sejtek metabolikus aktivitását és viabilitását 24 óra alatt.



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

A U2Os sejtek sokkal ellenállóbbnak mutatkoztak a 4 nm-es részecskékkel szemben, mint a HeLa sejtek. Ugyanolyan feltételek mellett a 35 nm-es ezüst nanorészecskék hasonló mértékű változást eredményeztek az életképességben, mint a HeLa sejtekben. A 4 nm-es részecske ebben az esetben is erőteljesebben hatott az életképességre, mint a 35 nm-es, azonban olyan nagymértékű sejtpusztulást nem okozott, mint a HeLa sejteknél. (11. ábra.)

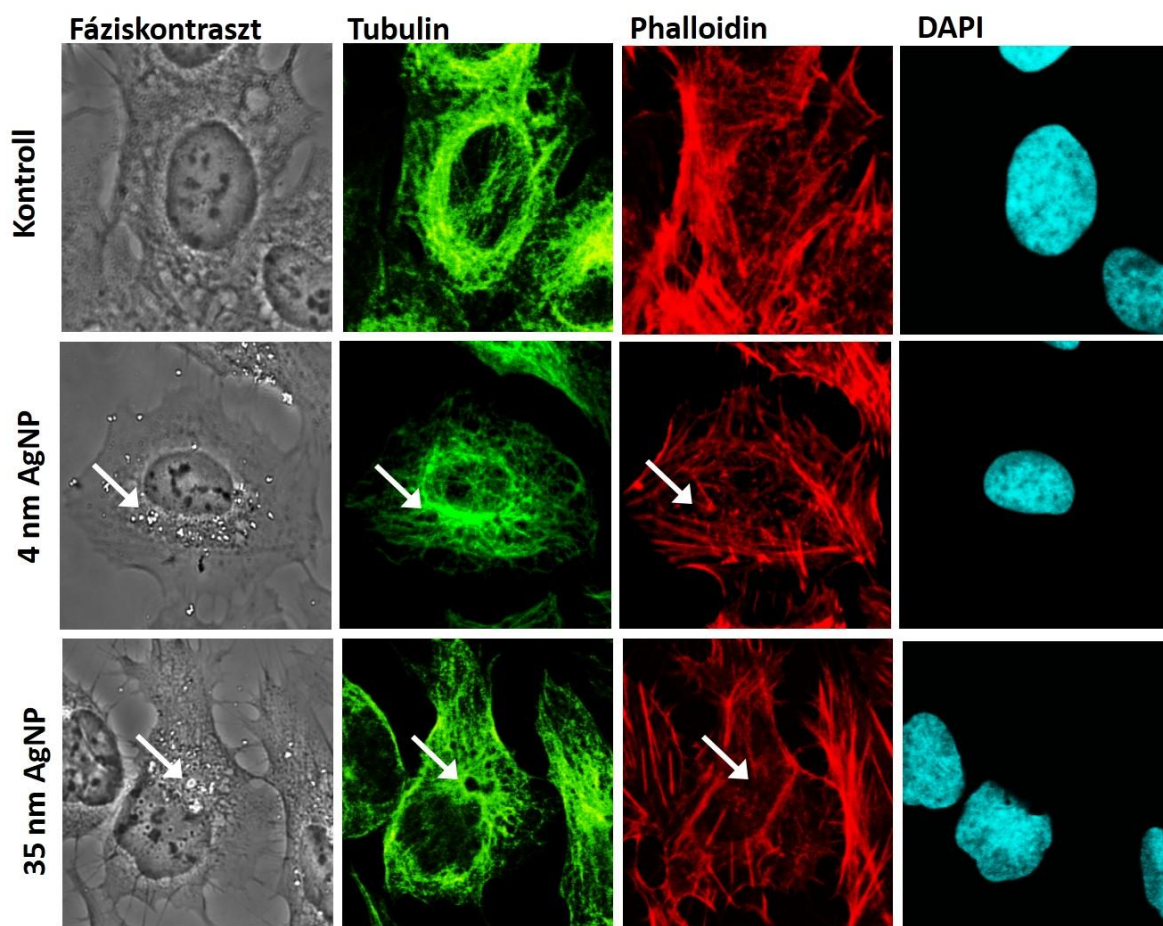


12. ábra. 4 nm és 35 nm AgNP koncentrációfüggő hatása U2Os sejtekre, 48 órás kezelés után.

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.)

U2Os sejtek morfológiai változásai ezüst nanorészecskék hatására

Szerettük volna megvizsgálni, hogy történnek-e sejtmorfológiai változások ezüst nanorészecske-kezelés hatására. Ezért kezeletlen kontroll és 24 órán át 100 ppm koncentrációban nanorészecskével kezelt U2Os sejtekben immunfestéssel tettük láthatóvá a citoszkeletális rendszert, α -tubulin-festéssel a mikrotubulusokat és falloidinnel az aktin mikrofilamentumokat, hogy megfigyelhessük, az ezüst nanorészecskék befolyásolták-e a citoszkeleton valamely komponensét, illetve annak morfológiáját (13. ábra).



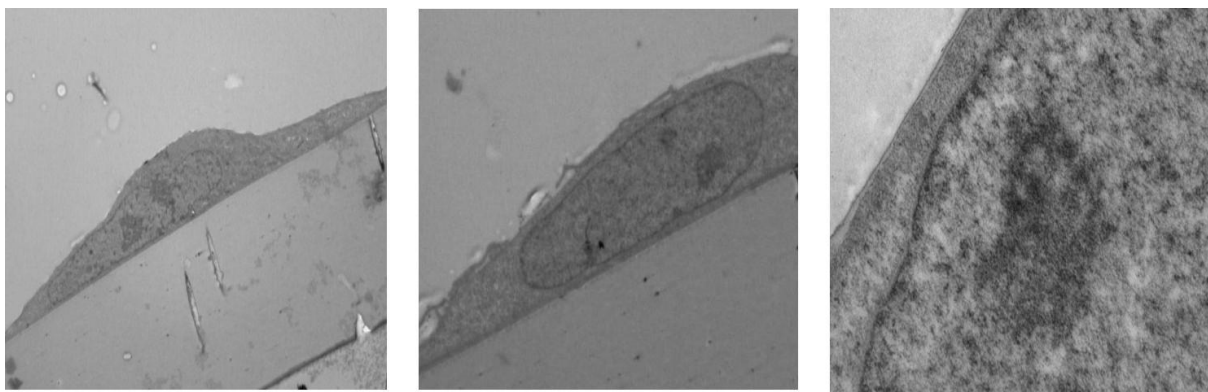
13. ábra. Kontroll és AgNP-kezelt U2Os sejtek, citoszeletális fehérjefilamentumok konfokális mikroszkópos felvételei.

A nanorészecskékkel kezelt sejtek fáziskontraszt képein látható, hogy mind a 4 nm-es, mind a 35 nm-es partikulumok a sejtmag körül halmozódnak fel. A sejtmagban nem látható ezüst nanorészecske. A nanorészecskék aggregációja is megfigyelhető, a 35 nm részecskék esetén nagyobb mértékben. Az aggregátumok a mikrotubulusok szerkezetében is változásokat okoznak. A mikrotubulus-hálózat körülveszi ezeket az aggregátumokat, míg az aktin mikrofilamentumok átrendeződése az aggregátumok közelében nem jellemző. Mindez arra utalhat, hogy a nanorészecskék membránnal határolt struktúrákban, vezikulumok belsejében helyezkednek el. A mikrofilamentum-hálózatban ún. stresszfilamentumok megjelenését feltételezzük a képek alapján, amelyeknek a sejtdhézióban, a morfogenezisben és a mechanotranszdukcióban van szerepük (Tojkander és mtsai, 2012).

Ezüst nanorészecskék penetrációja tumoros sejtekbe

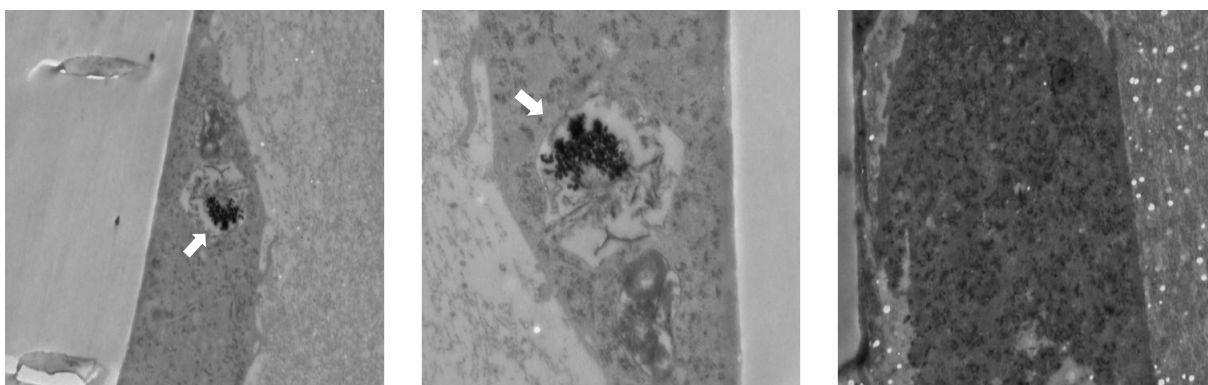
Annak bizonyítására, hogy a kétféle mérettartományú ezüst nanorészecskék a sejtekbe penetrálódtak, illetve a bejutás előtt a sejtek felszínére tapadnak, transzmissziós és pásztázó elektromikroszkópiás felvételeket készítettünk kontroll, és ezüst nanorészecskével kezelt U2Os sejtekről.

A nanorészecskék sejtekbe való bejutását és sejten belüli lokalizációját először transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk. A kezeletlen U2Os sejtről készült felvételeken látható a sejtípusra jellemző morfológia: a U2Os sejtek szétterülnek a tenyésztő membránon, jól kivehető a nagyon nagy méretű sejtmag, mely a sejt nagy részét kitölti, és megfigyelhetők a sejtmagvacskák is (14. ábra).



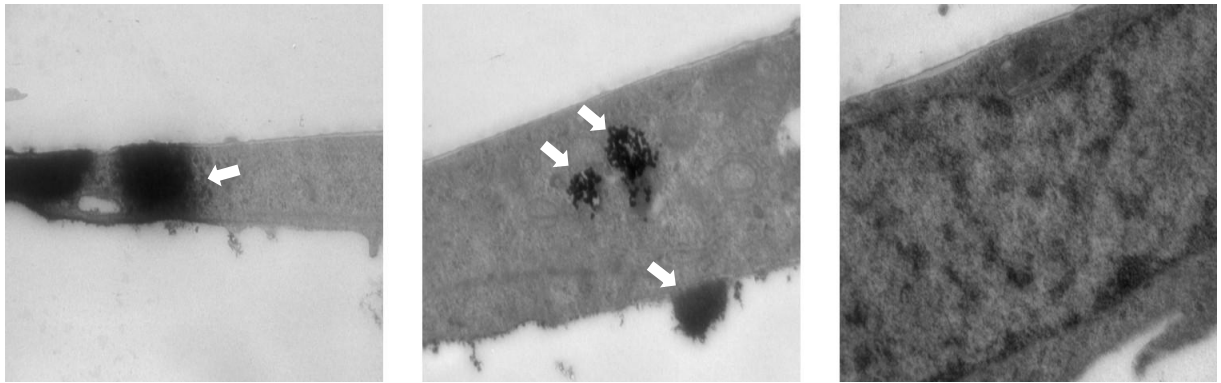
14. ábra. Kezeletlen U2Os sejtek transzmissziós elektronmikroszkópos képe.

A 4 nm partikulumokkal 100 ppm koncentrációban 24 órán keresztül kezelt sejtekben egyértelműen kimutathatók a nanorészecske-aggregátumok, melyek gyakran vezikulumok belsejében találhatók (15. ábra).



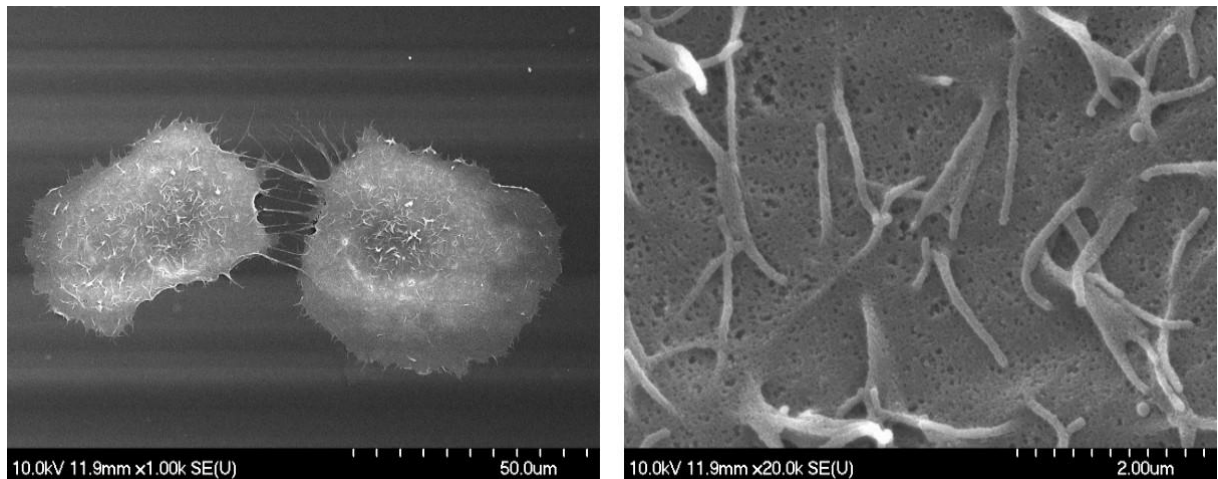
15. ábra. 4 nm-es részecskékkel kezelt U2Os sejtek transzmissziós elektronmikroszkópos képe.

A 35 nm részecskékkel 100 ppm koncentrációban 24 órán keresztül kezelt sejtekben is megfigyelhetünk hasonló elektrondenz aggregátumokat a sejtekben és a sejtek felszínén, melyek gyakran vezikulumokban, máskor diffúzan a sejtben, a mag környezetében, illetve az endoplazmás retikulumhoz tapadva találhatók (16. ábra).



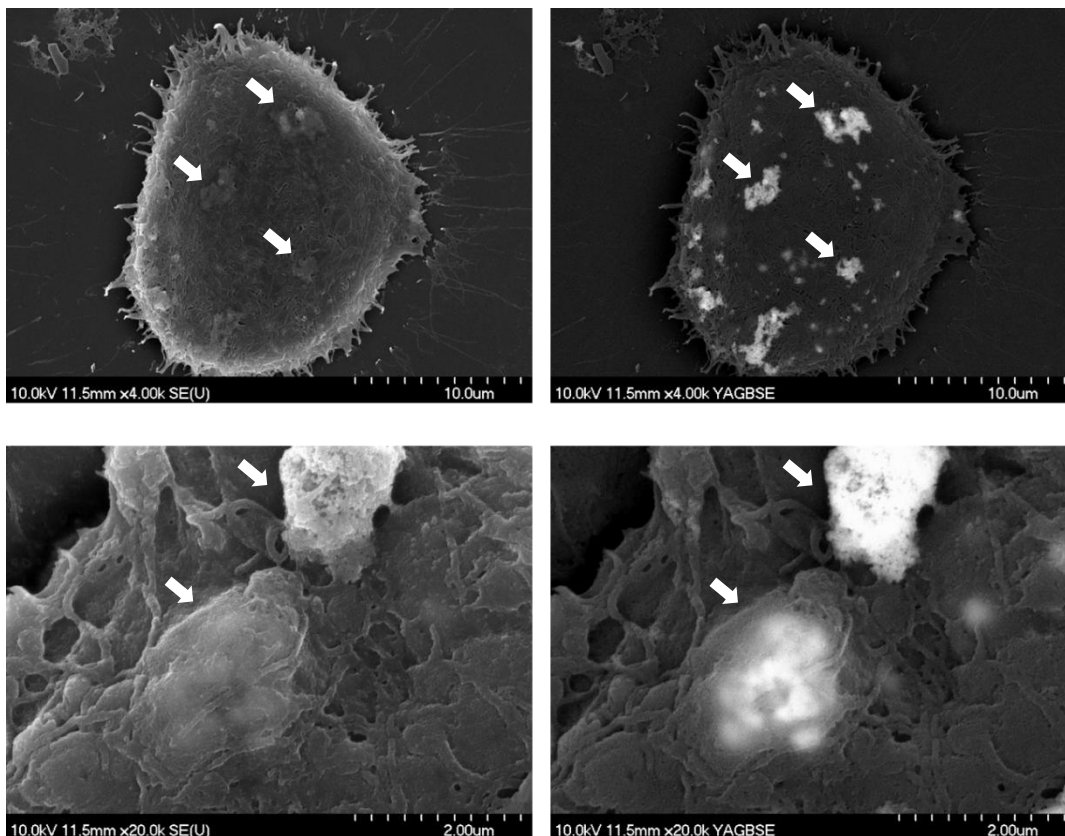
16. ábra. 35 nm-es részecskékkel kezelt U2O₅ sejtek transzmissziós elektronmikroszkópos képe.

Mivel a transzmissziós elektronmikroszkópos felvételeken a sejtek felszínén is láthatók voltak ezüst nanorészecske aggregátumok, a felszínt pásztázó elektronmikroszkóppal is vizsgáltuk. A kezeletlen kontroll sejtekről készült felvételek a 17. ábrán láthatók.



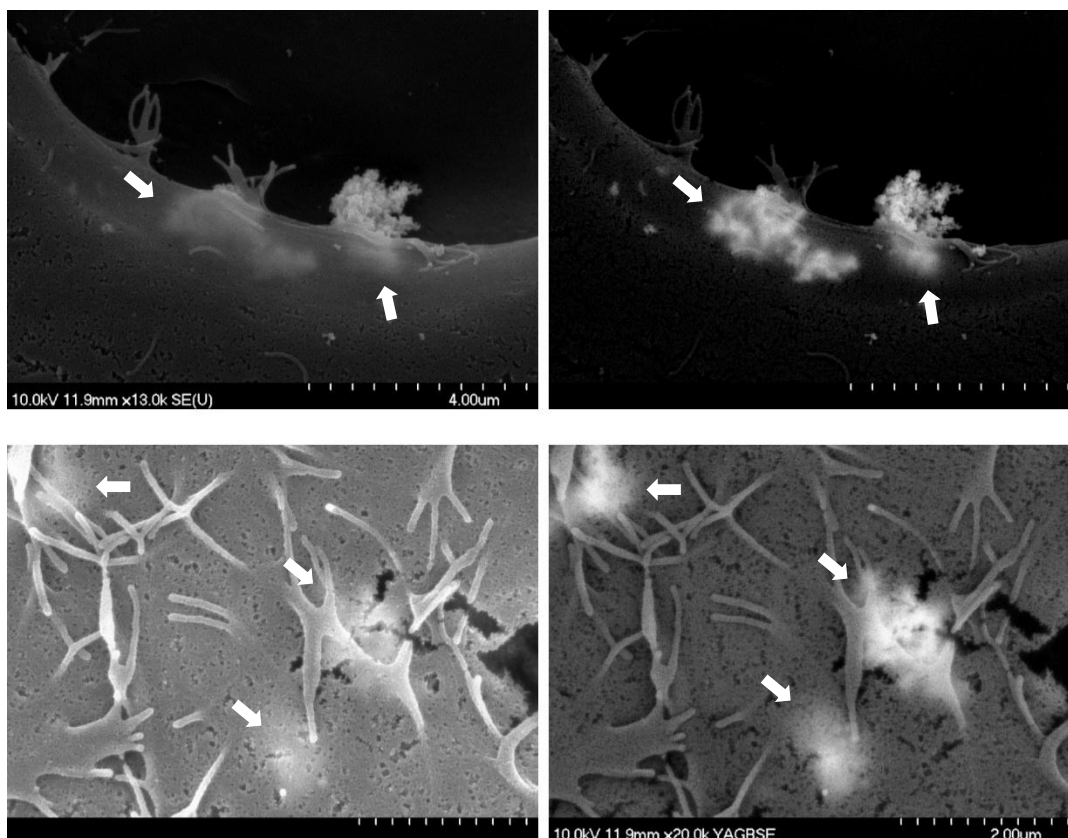
17. ábra. Kezeletlen U2O₅ sejtek pásztázó elektronmikroszkópos képe.

A 4 nm ezüst nanorészecskékkel 100 ppm koncentrációban 24 órán keresztül kezelt sejtek felszínén és a sejt felszíne alatt is nanorészecske aggregátumokat láthatunk (18. ábra). A pásztázó 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 pásztázó elektronmikroszkópos képeket (SE) és a visszaszórt elektronokat érzékelő BSE detektorral is felvételeket készítettünk, így láthatóvá váltak a sejtbe jutott ezüst részecskék (a 18. ábra jobb oldali oszlopa a BSE módban felvett képet mutatja).



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

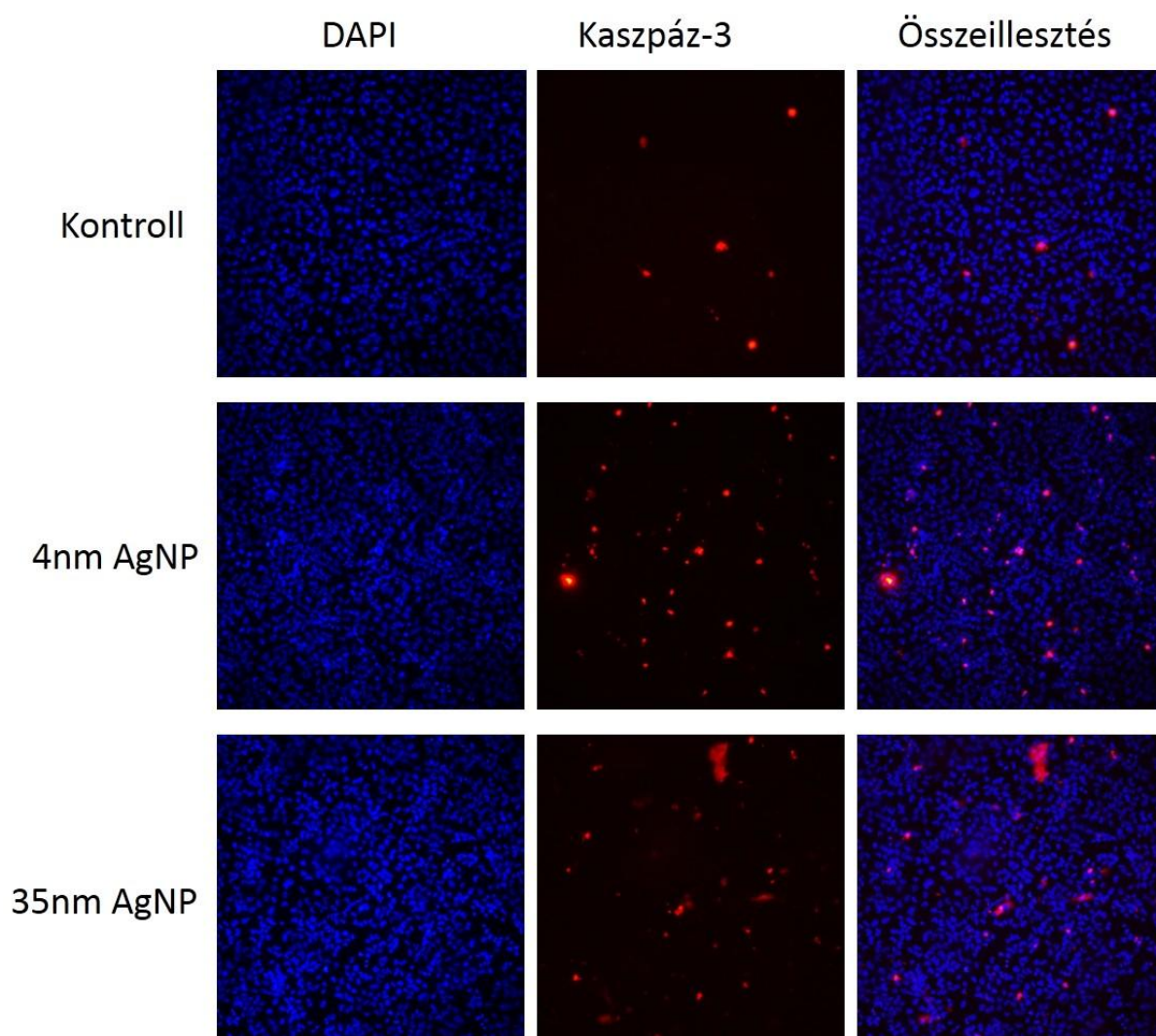
A 35 nm ezüst nanorészecskékkel 100 ppm koncentrációban 24 órán keresztül kezelt U2Os sejtek esetében szintén megfigyelhető aggregáció a sejtek felszínén és a sejtekben, de a 4 nm-es részecskékhez képest kisebb mértékben (19. ábra). Az ábrákon ismételten megfigyelhetjük a sejtekbe bekerült, a membránjuk alatt található nanorészecskéket a visszaszórt elektronok detektálásával (BSE) készített felvételeken (19. ábra, jobb oldali oszlop).



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

A kaszpáz-3 expresszió változása

Annak érdekében, hogy kiderítsük, az ezüst nanorészecske kezelés hatására bekövetkezett sejtpusztulás az apoptotikus folyamatok aktiválódását jelzi-e, immunfestéssel vizsgáltuk a U2Os sejtekben az aktív kaszpáz-3 fehérje mennyiségét a kezelt mintákban (20. ábra). Ennek során kontroll, valamint 100 ppm koncentrációjú, 4 nm-es és 35 nm-es ezüst nanorészecskékkal 24 órán át kezelt sejteket festettünk aktív kaszpáz-3-ra specifikus antitesttel.



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

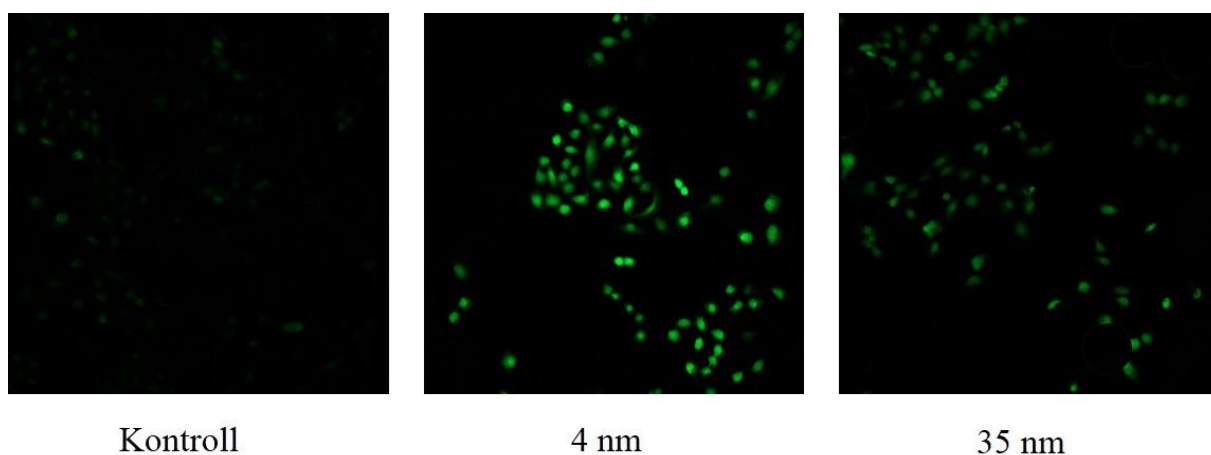
Az immunfestett mintákon látható, hogy a kezeletlen kontroll sejtekben kevés a pirossal festődő, aktív kaspáz-3-pozitív sejt. Az ezüst nanorészecskékkel való kezelés hatására azonban jelentős számban detektáltunk aktív kaspáz-3 pozitív sejteket. A 4 nm-es partikulumokkal kezelt sejteknél az apoptotikus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

Szabadgyökök felhalmozódása

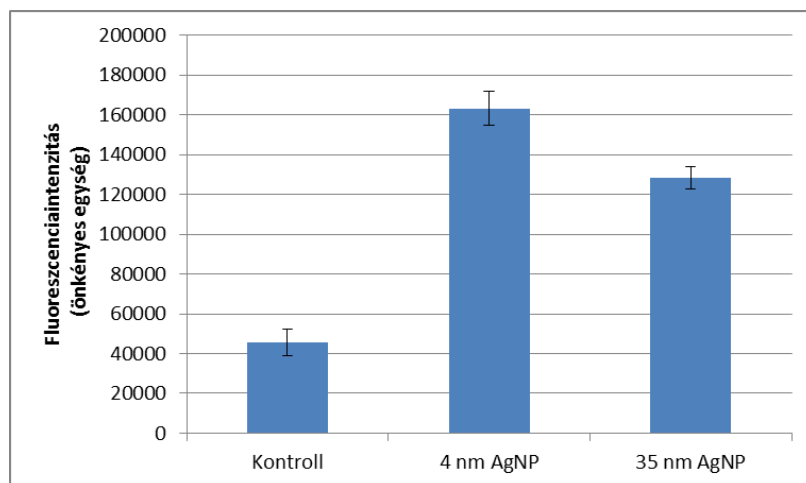
Az irodalomban sok esetben mutatták ki szabadgyökök képződését fém nanorészecske-kezelés hatására, és gyakran feltételeznek oxidatív stresszt a fém nanorészecskék citotoxicitásának hátterében, ezért megvizsgáltuk az ezüst nanorészecske-kezelés hatását ezekre a folyamatokra. A reaktív oxigéngyökök intracelluláris mennyiségét DCFDA fluoreszcens festékkel mértük U2Os sejtekben (21.

ábra). A felvételeken ImageJ programmal meghatároztuk a fluoreszcencia intenzitását, és mivel a DCFDA intracelluláris átalakítása sztöchiometrikus folyamat, az intenzitásértékek változásából tudunk következtetni a ROS mennyiségére a 100 ppm koncentrációjú Ag nanopartikulummal kezelt sejtekben, és a kezeletlen kontroll mintákban.

A fluoreszcens felvételeken jól látható, hogy a nanorészecske-kezelés hatására számos U2Os sejt mutatott erős fluoreszcens festődést, amely az oxigén szabadgyökök jelentős termelődésére utal (21. ábra). 100 ppm koncentrációban 24 órán át a 4 nm-es részecskével kezelt sejtekben a kontrollhoz képest körülbelül háromszorosára, a 35 nm-es nano-kezelt sejtekben pedig nagyjából kétszeresére nőtt a reaktív oxigéngyökök mennyisége (22. ábra). Az ezüst nanorészecskék tehát oxidatív stresszt váltanak ki a sejtekben, ami szerepet játszhat a viabilitás megfigyelt csökkenésében és az apoptotikus folyamatok elindításában.



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

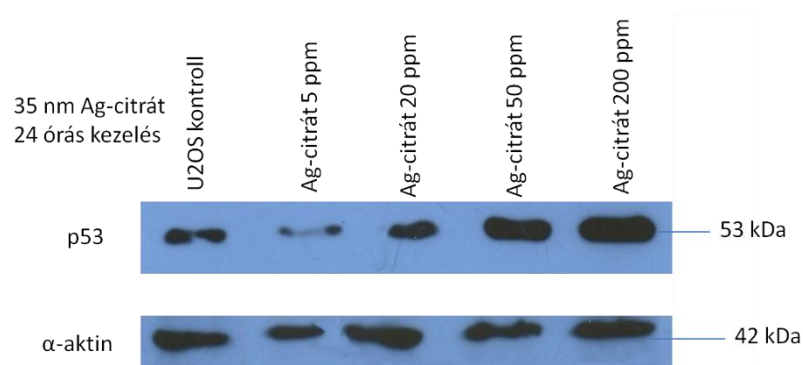


22. ábra. AgNP-kezelés hatására bekövetkező változás a reaktív oxigéngyökök mennyiségében, DCFDA-festés alapján kvantitálva.

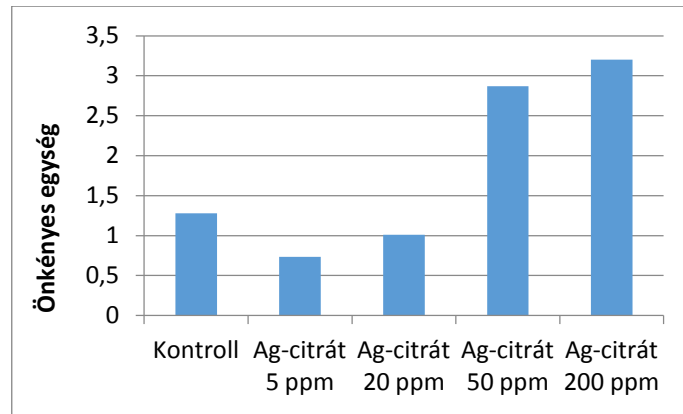
A p53 fehérje expressziójának változása 35 nm AgNP kezelés hatására

Az ezüst nanorészecskékkel történő kezelés hatására számos fehérje kifejeződése megváltozhat. Mivel a p53 kulcsszerepet játszik az apoptózis kiváltásában, a mennyiségét Western blottal detektáltuk kezeletlen, valamint különböző koncentrációjú 35 nm-es partikulumokkal 24 órán át kezelt U2Os és HeLa sejtekben. Az immunoblottokat denzitometrálassal kvantitáltuk, a fehérjemennyiségeket aktinra vagy tubulinra normalizáltuk.

A kezelés hatására a p53 fehérje mennyisége mindkét sejtvonalban a nanorészecskék koncentrációjának emelésével nőtt (23. ábra, 25. ábra).

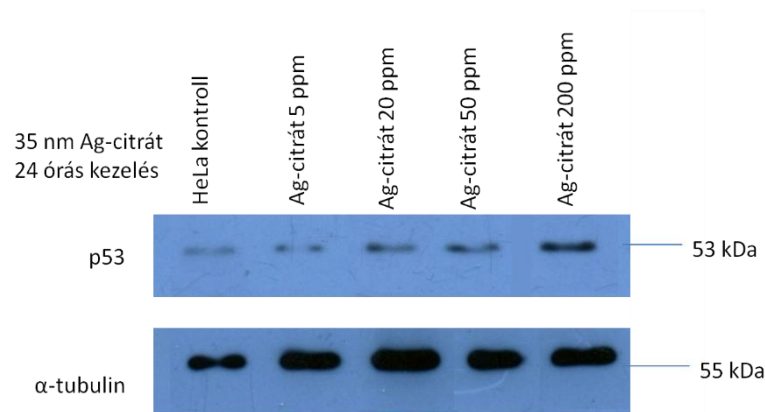


23. ábra. A p53 fehérje mennyisége kezeletlen és különböző koncentrációban ezüst nanorészecskével kezelt U2Os sejtekben.

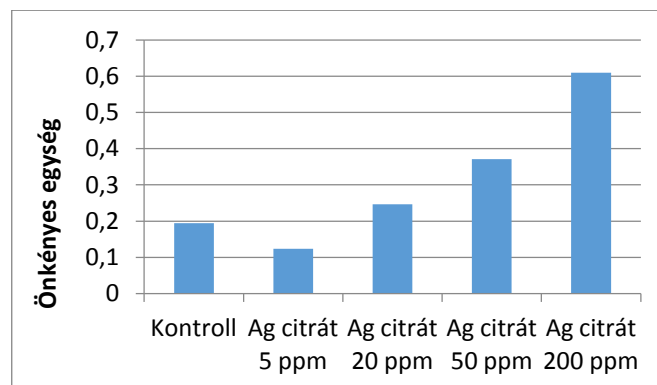


24. ábra. A p53 fehérje mennyiségének változása U2Os sejtekben (aktinra normalizált, denzitometriával nyert értékek).

U2Os sejtekben az 5 és 20 ppm koncentrációjú ezüst-citrát kezelésnek nem volt jelentős 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 (24. ábra).



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



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

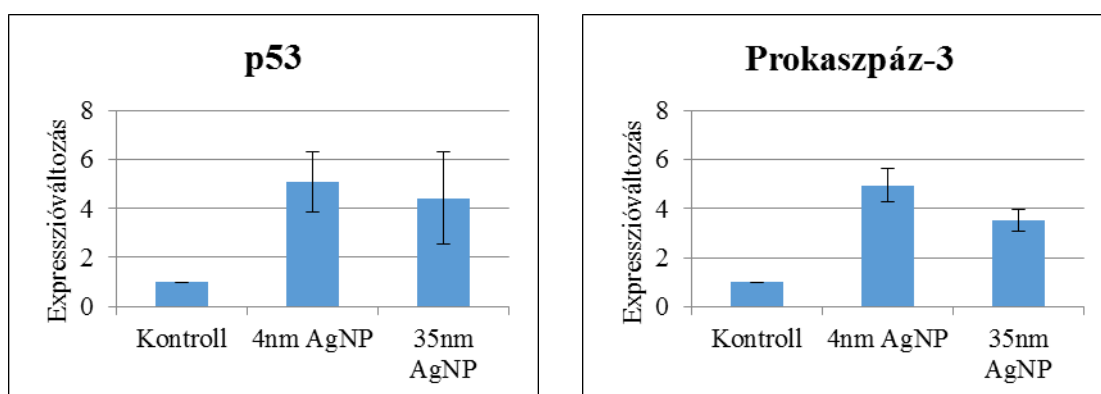
A HeLa sejtek esetében 5 ppm-es koncentrációban alkalmazott ezüst nanopartikulum kezelésnél a U2Os sejtekhez hasonlóan csökkenést tapasztaltunk a p53 mennyiségében.

20 ppm-es kezelés kismértékben növelte, 50 ppm koncentrációjú ezüst-citrát már egyértelműen növelte a p53 mennyiségét, 200 ppm-es kezelésnél pedig háromszorosára emelkedett a p53 fehérje expressziója a kontrollhoz képest (25. ábra, 26. ábra). Mind a U2Os sejtek, mind az általunk használt HeLa sejtvonal vad típusú p53-at expresszál, de a HeLa sejtek jóval alacsonyabb expressziós szinttel jellemezhetők, és ezekben a sejtekben a p53 funkcionálisan mutáns. Ezért lehet érdekes a két sejtvonal p53 kifejeződésének és az apoptózis indukciójának összehasonlítása ezüst nanorészecske kezelés után. 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 proteosomális 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. Amennyiben az ezüst nanorészecskék hatására DNS-károsodás lép fel, azt a p53 felismerheti, ami a transzkripciós faktor stabilizációjához és aktivációjához vezet. Jelentős DNS-károsodás esetén a p53 elindíthatja az apoptózis intrinsic (mitokondriális) útját.

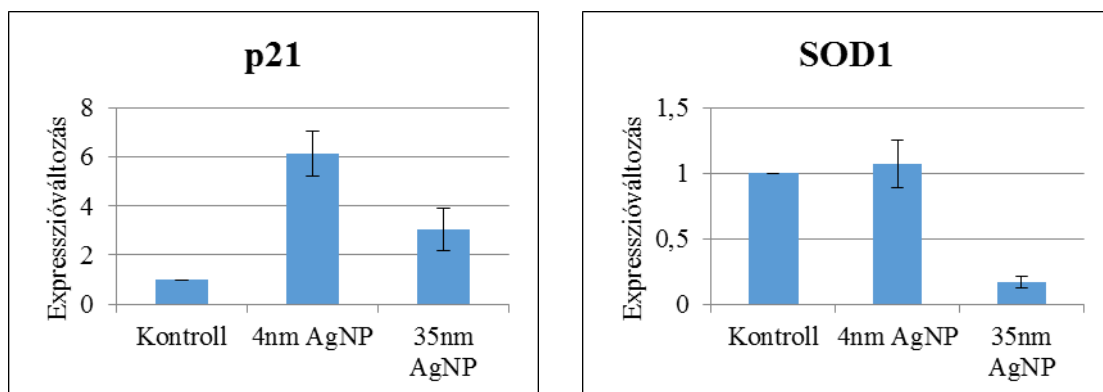
Apoptotikus és a stresszválaszban szerepet játszó gének expressziójának változása

Szerettük volna mRNS-szinten is megvizsgálni, hogy néhány, az apoptózisban és a stresszválaszban részt vevő gén expressziója megváltozik-e a kezelés hatására U2Os sejtekben. Ehhez reverz transzkripciós real-time PCR technikát alkalmaztunk.



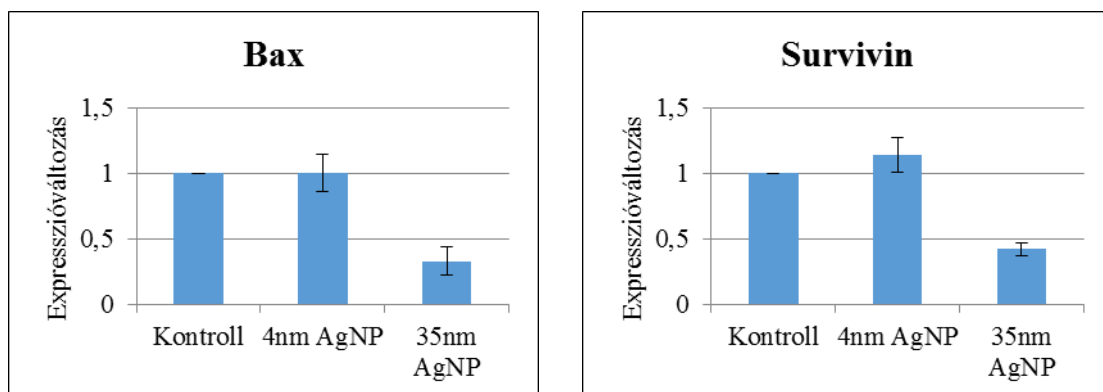
27. ábra. A p53 és a prokaspáz-3 expresszió változása AgNP kezelés hatására.

Az eredmények azt mutatják, hogy nem csak fehérje, hanem mRNA-szinten is megnő a p53 és prokaspáz-3 expressziója (27. ábra).



28. ábra. A p21 és a sod1 expresszió változása AgNP kezelés hatására.

A p53 által szorosan szabályozott p21 mennyisége mRNA-szinten igen jelentős növekedést mutat a 4 nm-es részecskék hatására, és 35 nm-es részecskék hatására is emelkedik, de csekélyebb mértékben (28. ábra). A SOD1 expressziójára a 4 nm-es részecskéknek nincs hatása, azonban 35 nm-es ezüst nanorészecske kezelés jelentősen csökkentette a kifejeződését (28. ábra).



29. ábra. A bax és a survivin expresszió változása AgNP kezelés hatására.

A bax és a survivin expressziója nem változott a 4 nm-es nanorészecskék hatására, viszont a 35 nm-es nanorészecskék hatására kifejeződésük nagymértékben csökkent (29. ábra).

Korábban, 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 nagymértékben növelték az aktív kaszpáz-3 mennyiségét a sejtekben, és ez az mRNA szintjén is megmutatkozott. A p53 fehérje nagyon erőteljes mértékben megnőtt U2Os sejtekben a Western blot eredmények alapján, és mRNA-szintű

expressziójában is tükröződött ez a jelenség. Tehát a p53 fehérje proteosomális degradáció alóli felszabadulása (stabilizálódása) mellett mRNS-szinten is nő a mennyisége. A p21 expresszióváltozása követi a p53-szint változását, ami a p53 szabályozó szerepét támaszthatja alá U2Os sejtekben.

A kísérleti eredmények nagy szórása miatt a qPCR vizsgálatok ismétlése szükséges a jövőben.

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 és HeLa sejteket idő- és koncentrációfüggő módon. A hatás mértékét nem befolyásolta a nanopartikulumok mérete, általában azonos vagy hasonló mértékű sejtpusztulást okoztak az átlagosan 4 nm és az átlagosan 35 nm-es ezüst részecskék.

Mikroszkópos felvételekkel bizonyítottuk, hogy a sejtek valóban felveszik az ezüst nanorészecskéket, melyek a sejtben, gyakran a sejtmag közelében akkumulálódnak és aggregálódnak. Az aggregátumok gyakran vezikulumok belsejében helyezkednek el, ami alátámaszthatja a feltételezést, miszerint a sejtek endocitózissal veszik fel a nanorészecskéket, de ennek pontos bizonyítására specifikus vizsgálatokra lenne szükség.

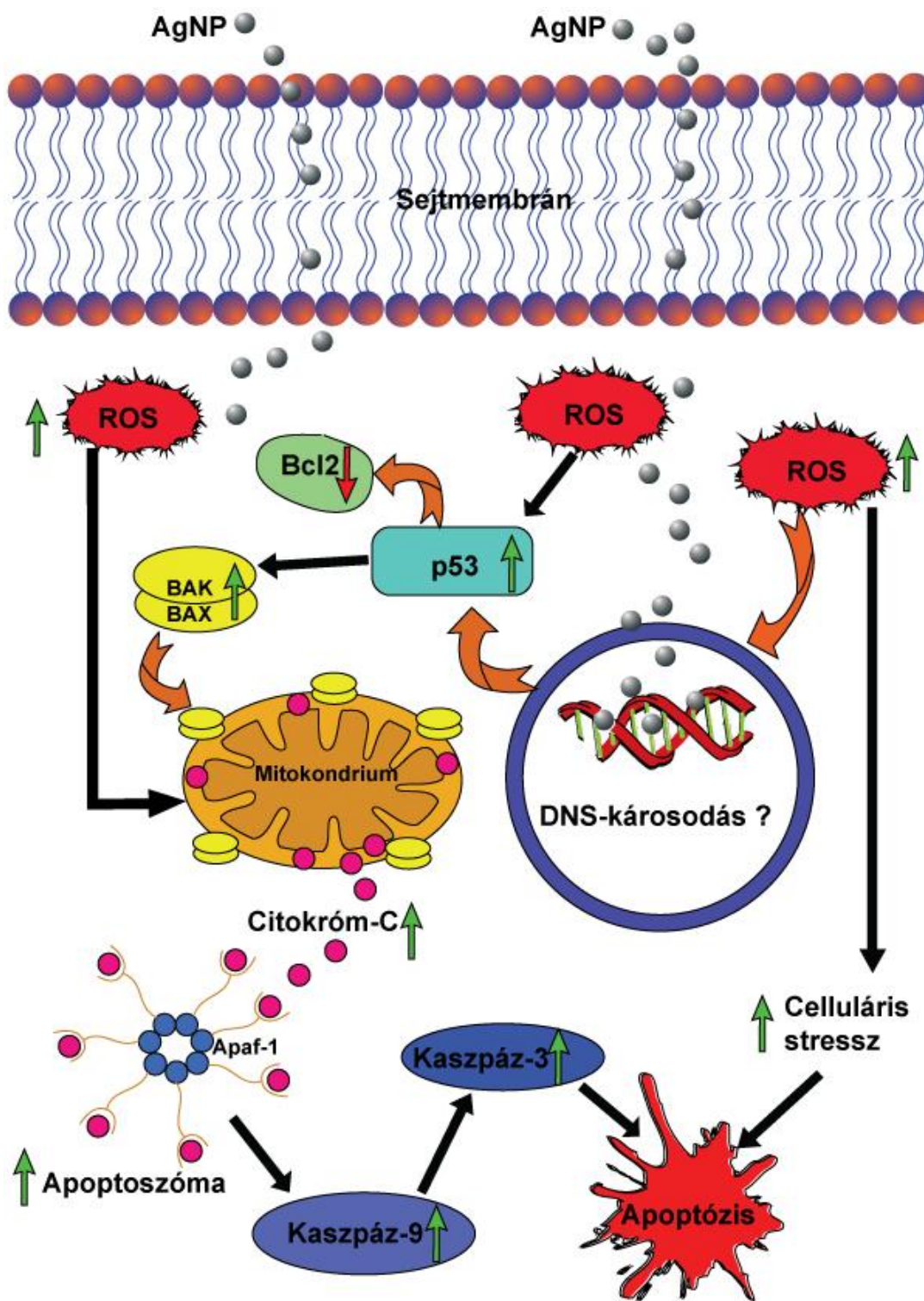
A sejtek felszínén is nagy mennyiségben figyeltünk meg aggregálódott nanopartikulumokat.

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, úgy tűnik, 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 (sejtpusztulás mértéke, szabadgyök termelődés), ezért megvizsgáltunk néhány kiválasztott, az apoptózisban szerepet játszó fehérje, mint p53 és kaszpáz-3 expressziós 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 a mindkét sejtvonalban növeli a p53 tumorsuppresszor fehérje mennyiségét, ezzel hozzájárulhat az apoptózis indukálásához. A qPCR-eredmények is azt mutatják, hogy mRNS-szinten is tapasztalható a p53 expressziójának növekedése a

nanopartikulum-kezelt U2Os sejtekben. Tehát feltehetőleg a p53 expressziója megnő, a fehérje aktiválódik, illetve a proteasomális degradáció alól felszabadul az ezüst partikulum kezelés eredményeképpen, és feltételezhetően ezért nő meg a fehérje szintje a sejtekben.

A p53 fehérje a kaspáz kaskád elindítása útján indukál apoptózist. U2Os sejtekben, 100 ppm koncentrációjú ezüst partikulumokkal kezelt sejtek esetén, ahol a p53 expressziója viszonylag magas, kaspáz-3 immunfestést végeztünk. A kezeletlen mintában nagyon alacsony volt az apoptotizáló, kaspáz-3 pozitív sejtek száma. Viszont 100 ppm koncentrációjú ezüst-citrát hatására jelentős számú kaspáz-3-ra festődő sejtet detektáltunk mindkét méretű ezüst nanorészecske alkalmazása esetén. mRNS szinten is megemelkedett a prokaspáz-3 expressziója, viszont az apoptózisban érintett Bax mRNS szintje nem változott (4 nm-es részecskével történt kezelés), vagy csökkent (35 nm AgNP kezelés hatására). Az antiapoptotikus survivin expressziós szintjét a 35 nm-es AgNP kezelés csökkentette. Végeredményben elmondhatjuk, hogy a legtöbb eredmény arra utal, 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, ezek a sejtekben aggregálódnak, akkumulálódnak, és a sejtekbe került nagy mennyiségű ezüst nanorészecskéből ezüst ionok szabadulnak fel, melyek hatására szabadgyökök termelődése iniciálódik. Az oxidatív stressz hatására a p53 és kaspáz-3 fehérjék aktiválódnak, apoptózis indukálódik, mely a tumoros sejtek halálához vezet (30. ábra).



30. ábra. AgNP által feltételezhetően kiváltott molekuláris folyamatok.

További vizsgálataink során arra próbálunk majd választ kapni, hogy a vad típusú, ám funkcionálisan mutáns p53-at expresszáló HeLa sejtekben, valamint a p53 null mutáns SaOs sejtekben milyen mértékben lehet apoptózist és DNS károsodást kiváltani ezüst nanorészecskék alkalmazásával.

Irodalomjegyzék

- Agarwal, M. L., Taylor, W. R., Chernov, M. V., Chernova, O. B., & Stark, G. R. (1998). The p53 Network. *Journal of Biological Chemistry*, 273(1), 1–4. doi:10.1074/jbc.273.1.1
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, W. P. (n.d.). *Molecular biology of the cell*.
- Arora, S., Jain, J., Rajwade, J. M., & Paknikar, K. M. (2008). Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicology Letters*, 179(2), 93–100. doi:10.1016/j.toxlet.2008.04.009
- Assay Guidance Manual. (2004). Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- Cheung, C. H. A., Huang, C.-C., Tsai, F.-Y., Lee, J. Y.-C., Cheng, S. M., Chang, Y.-C., ... Chang, J.-Y. (2013). Survivin - biology and potential as a therapeutic target in oncology. *OncoTargets and Therapy*, 6, 1453–1462. doi:10.2147/OTT.S33374
- Gartel, A. L., & Radhakrishnan, S. K. (2005). Lost in Transcription : p21 Repression , Mechanisms , and Consequences and Consequences, 3980–3985.
- Han, E.-S., Muller, F. L., Pérez, V. I., Qi, W., Liang, H., Xi, L., ... Richardson, A. (2008). The in vivo gene expression signature of oxidative stress. *Physiological Genomics*, 34(1), 112–26. doi:10.1152/physiolgenomics.00239.2007
- Hayat, M. A. (2000). *Principles and techniques of electron microscopy: biological applications*.
- Hillaireau, H., & Couvreur, P. (2009). Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 66(17), 2873–2896. doi:10.1007/s00018-009-0053-z
- Hussain, S. M., Hess, K. L., Gearhart, J. M., Geiss, K. T., & Schlager, J. J. (2005). In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in Vitro : An International Journal Published in Association with BIBRA*, 19(7), 975–83. doi:10.1016/j.tiv.2005.06.034
- Jänicke, R. U., Sprengart, M. L., Wati, M. R., & Porter, A. G. (1998). Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(16), 9357–60.
- Jiang, X., Foldbjerg, R., Miclaus, T., Wang, L., Singh, R., Hayashi, Y., ... Beer, C. (2013). Multi-platform genotoxicity analysis of silver nanoparticles in the model cell line CHO-K1. *Toxicology Letters*, 222(1), 55–63. doi:10.1016/j.toxlet.2013.07.011
- Lavin, M. F., & Gueven, N. (2006). The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death and Differentiation*, 13(6), 941–50. doi:10.1038/sj.cdd.4401925

- Maki, C. G., Huibregtse, J. M., & Howley, P. M. (1996). In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53(1). *Cancer Research*, 56(11), 2649–54.
- Milani, P., Gagliardi, S., Cova, E., & Cereda, C. (2011). SOD1 Transcriptional and Posttranscriptional Regulation and Its Potential Implications in ALS. *Neurology Research International*, 2011(Figure 1), 458427. doi:10.1155/2011/458427
- Mirza, A., Mcguirk, M., Hockenberry, T. N., Wu, Q., Ashar, H., Black, S., ... Liu, S. (2015). Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway, (2002). doi:10.1038/sj/onc/1205353
- Oltvai, Z. N., Milliman, C. L., & Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 74(4), 609–19.
- Porter, A. G., & Jänicke, R. U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 6(2), 99–104. doi:10.1038/sj.cdd.4400476
- Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J., & Nilsen, T. W. (2010). Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(6), pdb.prot5439. doi:10.1101/pdb.prot5439
- Sah, N. K., Khan, Z., Khan, G. J., & Bisen, P. S. (2006). Structural, functional and therapeutic biology of survivin. *Cancer Letters*, 244(2), 164–71. doi:10.1016/j.canlet.2006.03.007
- Scoumanne, A., Cho, S. J., Zhang, J., & Chen, X. (2011). The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 is regulated by RNA-binding protein PCBP4 via mRNA stability. *Nucleic Acids Research*, 39(1), 213–24. doi:10.1093/nar/gkq778
- Shen, W.-J., Hsieh, C.-Y., Chen, C.-L., Yang, K.-C., Ma, C.-T., Choi, P.-C., & Lin, C.-F. (2013). A modified fixed staining method for the simultaneous measurement of reactive oxygen species and oxidative responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 430(1), 442–7. doi:10.1016/j.bbrc.2012.11.037
- Tauran, Y., Brioude, A., Coleman, A. W., Rhimi, M., & Kim, B. (2013). Molecular recognition by gold, silver and copper nanoparticles. *World Journal of Biological Chemistry*, 4(3), 35–63. doi:10.4331/wjbc.v4.i3.35
- Tojkander, S., Gateva, G., & Lappalainen, P. (2012). Actin stress fibers--assembly, dynamics and biological roles. *Journal of Cell Science*, 125(Pt 8), 1855–64. doi:10.1242/jcs.098087
- Tsang, C. K., Liu, Y., Thomas, J., Zhang, Y., & Zheng, X. F. S. (2014). Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. *Nature Communications*, 5, 3446. doi:10.1038/ncomms4446
- Wan, Y., Guo, Z., Jiang, X., Fang, K., Lu, X., Zhang, Y., & Gu, N. (2013). Quasi-spherical silver nanoparticles: aqueous synthesis and size control by the seed-mediated Lee-

Meisel method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 394, 263–8. doi:10.1016/j.jcis.2012.12.037

Wang, T., Bai, J., Jiang, X., & Nienhaus, G. U. (2012). Cellular uptake of nanoparticles by membrane penetration: a study combining confocal microscopy with FTIR spectroelectrochemistry. *ACS Nano*, 6(2), 1251–9. doi:10.1021/nn203892h

Wolter, K. G., Hsu, Y. T., Smith, C. L., Nechushtan, a, Xi, X. G., & Youle, R. J. (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 139(5), 1281–92.

Wulf, G. M., Liou, Y.-C., Ryo, A., Lee, S. W., & Lu, K. P. (2002). Role of Pin1 in the regulation of p53 stability and p21 transactivation, and cell cycle checkpoints in response to DNA damage. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(50), 47976–9. doi:10.1074/jbc.C200538200

ZetasizerNano User manual Man0317-1.1

Nyilatkozat

Alulírott, *Biológus MSc* szakos hallgató, kijelentem, hogy a szakdolgozatban foglaltak saját munkám eredményei, és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, eszközök stb.) használtam fel.

Tudomásul veszem azt, hogy szakdolgozatomat/diplomamunkámat a Szegedi Tudományegyetem könyvtárában, a kölcsönözhető könyvek között helyezik el.

.....
Aláírás

.....
Dátum

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, dr. Kiricsi Mónikának, aki útmutatásával, magyarázataival, odafigyelésével hatalmas segítséget nyújtott szakdolgozatom elkészítéséhez, valamint Kovács Dávidnak, hogy ötleteivel, a laboratóriumi munka során nyújtott segítségével és tanácsaival hozzájárult a munkámhoz.

Köszönöm Igaz Nórának a rengeteg munkáját, türelmét és kitartását, amivel szakdolgozatom elkészítését segítette.

Köszönöm Dr. Boros Imrének, hogy lehetőséget biztosított szakdolgozatom elkészítéséhez a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszéken.

Szeretném megköszönni a SZTE TTIK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék dolgozóinak segítségüket és hasznos tanácsaikat.

Köszönöm továbbá Kónya Zoltánnak, Tóth Tímeának és Bélteky Péternek az ezüst nanorészecskék szintézisében, valamint Rázga Zsoltnak, Németh Tibornak és Madarász Dánielnek az elektronmikroszkópos felvételek elkészítésében nyújtott segítségüket.

Mellékletek

1. táblázat. A qPCR reakciókban alkalmazott primerek szekvenciái.

Gén	Primerszekvencia	Alkalmazott koncentráció
SOD1	FWD: 5'-GTGCAGGTCCTCACTTTAAT-3' REV: 5'-CTTTGTCAGCAGTCACATTG-3'	200 nM
Survivin	FWD: 5'-AGAAGTGGCCCTTCTTGGAGG-3' REV: 5'-CTTTTTATGTTCTCTATGGGGTC-3'	200 nM
Kaspáz-3	FWD: 5'-ACATGGCGTGTCAATAAATACC-3' REV: 5'-CACAAAGCGACTGGATGAAC-3'	100 nM
BAX	FWD: 5'-TGCTTCAGGGTTTCATCCAG-3' REV: 5'-GGCGGCAATCATCCTCTG-3'	200 nM
p53	FWD: 5'-CCCTTCCCAGAAAACCTACC-3' REV: 5'-CTCCGTCATGTGCTGTGACT-3'	200 nM
p21	FWD: 5'-TGAGCCGCGACTGTGATG-3' REV: 5'-GTC TCG GTG ACA AAG TCG AAG TT-3' (Scoumanne és mtsai, 2011)	200 nM
18S rRNS	FWD: 5'-AAACGGCTACCACATCCAAG-3' REV: 5'-GTAGTTGGATCTTGGGAGCG-3'	100 nM