

Stacjonarne Studia Doktoranckie
Biochemiczno-Biofizyczne

Patrycja Paciorek

**Rola miRNA w toksyczności
nanocząstek srebra**

The role of miRNA in the toxicity of silver nanoparticles

Praca doktorska

wykonana w Katedrze Biologii
Nowotworów i Epigenetyki
Instytutu Biofizyki

Promotor:

- Dr hab. Agnieszka Grzelak

Praca doktorska finansowana ze środków budżetowych na naukę w latach 2017-2019, jako projekt badawczy w ramach programu „Diamentowy Grant” finansowany przez Ministerstwo Edukacji i Nauki nr DI2016009546 pt.: „Rola miRNA w toksyczności nanocząstek srebra”; Kierownik: mgr Patrycja Paciorek; Opiekun: dr hab. Agnieszka Grzelak.



Diamentowy
Grant

Praca doktorska została wykonana z pomocą dotacji celowej przyznawanej na działalność związaną z prowadzeniem badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych, służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich w roku 2019.



WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY ŚRODOWISKA
Uniwersytet Łódzki

Jesteśmy częścią sieci
European University of
Post-Industrial Cities (UNIC)



UNIwersytet
ŁÓDZKI

Spis treści

1. Wstęp	7
1.1. Odkrycie miRNA	7
1.2. Powstawanie i dojrzewanie miRNA	9
1.3. Rola miRNA w regulacji procesów fizjologicznych na poziomie komórkowym	12
1.4. Funkcja miRNA w procesie nowotworzenia i rozwoju guzów	16
1.5. Epigenetyczne mechanizmy zaangażowane w progresję nowotworu	17
1.6. Sposoby modulacji poziomu miRNA	22
1.7. MiRNA markerami prognostycznymi, diagnostycznymi i celem terapeutycznym	26
1.8. Nanomateriały: ksenobiotyki mogące wpływać na homeostazę komórkową i organizmalną	29
1.9. Stres oksydacyjny jako czynnik sygnałowy	33
2. Cel pracy	37
3. Materiały wykorzystywane w pracy	38
3.1. Linie komórkowe	38
3.2. Materiały laboratoryjne, odczynniki chemiczne, zestawy komercyjne oraz samodzielnie przygotowywane roztwory	38
3.3. Odczynniki i materiały wykorzystywane do przygotowanie lizatów białkowych do metody Western Blot	40
3.4. Materiały z wykorzystaniem których przeprowadzono izolacje i analizę ilościową kwasów nukleinowych oraz modulowano poziom wybranych miRNA	40
3.5. Urządzenia za pomocą których przeprowadzono pozostałe eksperymenty	41
4. Metody	42
4.1. Hodowla linii komórkowych	42
4.2. Przygotowanie nanocząstek srebra	42
4.3. Transfekcja syntetycznymi analogami miRNA	42
4.4. Ocena toksycznego działania nanocząstek srebra	43
4.4.1. Metoda z wykorzystaniem czerwieni obojętnej	43
4.4.2. Ocena żywotności komórek z wykorzystaniem błękitu trypanu	45
4.5. Ocena potencjału proliferacyjnego komórek Hep G2 poddanych działaniu nanocząstek srebra	45
4.6. Ocena potencjału komórek Hep G2 do tworzenia kolonii	46
4.6.1. Ocena potencjału transfekowanych analogami miRNA komórek Hep G2 hodowanych w pożywce różniącej się stężeniem glukozy, do tworzenia kolonii ..	46

4.6.2. Absorbjometryczna ocena wpływu nanocząstek srebra na potencjał komórek Hep G2 hodowanych w pożywkach o różnym stężeniu glukozy do tworzenia kolonii	47
4.7. Badanie potencjału inwazyjnego komórek Hep G2	48
4.7.1. Ocena wpływu nanocząstek srebra na potencjał inwazyjny komórek Hep G2 hodowanych w pożywkach o różnym stężeniu glukozy.....	48
4.7.2. Ocena wpływu syntetycznych analogów miRNA na potencjał inwazyjny komórek Hep G2 poddanych działaniu nanocząstek srebra	49
4.8. Badanie potencjału migracyjnego komórek Hep G2	49
4.8.1. Test zarastania rasy przez komórki Hep G2 hodowanych w dwóch wariantach dostępności glukozy i poddanych działaniu nanocząstek srebra.....	49
4.8.2. Test zarastania rasy przez komórki Hep G2 transfekowane syntetycznymi analogami miRNA i poddane działaniu nanocząstek srebra	50
4.9. Analiza cyklu komórkowego	50
4.9.1. Analiza cyklu komórkowego komórek Hep G2 hodowanych w pożywkach o różnym stężeniu glukozy i poddanych działaniu nanocząstek srebra.....	50
4.9.2. Analiza cyklu komórkowego komórek Hep G2 transfekowanych syntetycznymi analogami miRNA i poddanych działaniu nanocząstek srebra.....	51
4.10. Apoptoza.....	51
4.11. Metody wykorzystane w celu analizy ilościowej białek z wykorzystaniem techniki Western Blot	52
4.11.1. Przygotowanie lizatów białkowych z hodowli komórkowych.....	52
4.11.2. Oznaczenie białka w lizatach komórkowych.....	52
4.11.3. Wykrywanie białek zaangażowanych w EMT oraz białek kontrolowanych przez wybrane miRNA metodą Western Blot	53
4.12. Ocena generacji reaktywnych form tlenu w komórkach Hep G2.....	55
4.12.1. Ocena ilości generowanych reaktywnych form tlenu z wykorzystaniem H ₂ DCFDA w komórkach Hep G2 hodowanych w pożywkach o różnym stężeniu glukozy, poddanych działaniu nanocząstek srebra	55
4.12.2. Ocena ilości generowanych reaktywnych form tlenu z wykorzystaniem H ₂ DCFDA w komórkach Hep G2 transfekowanych syntetycznymi analogami miRNA i poddanych działaniu nanocząstek srebra	56
4.12.3. Pomiar reaktywnych form tlenu z użyciem sondy DHR123 w komórkach Hep G2 poddanych działaniu syntetycznych analogów miRNA i nanocząstek srebra.....	56
4.12.4. Oznaczenie rodnikowych produktów peroksydacji lipidów za pomocą sondy BODIPY C11 w komórkach transfekowanych syntetycznymi analogami miRNA i poddanych działaniu nanocząstek srebra	56
4.13. Ocena zawartości NADP i NADPH w komórkach Hep G2.....	57
4.13.1. Ocena zawartości NADP i NADPH w komórkach hodowanych w dwóch wariantach stężenia glukozy i poddanych działaniu nanocząstek srebra	57

4.13.2. Ocena zawartości NADP i NADPH w komórkach transfekowanych syntetycznymi analogami miRNA i poddanych działaniu nanocząstek srebra	58
4.14. Metody wykorzystane w celu analizy poziomów ekspresji paneli miRNA związanych z procesem nowotworzenia w wątrobie	58
4.14.1. Izolacja miRNA	58
4.14.2. Reakcja odwrotnej transkrypcji	59
4.14.3. Oznaczanie ilości miRNA w materiale biologicznym metodą real-time PCR	59
4.15. Pomiar potencjału błony mitochondrialnej w komórkach Hep G2 po transfekcji wybranymi syntetycznymi analogami miRNA oraz po inkubacji z nanocząstkami srebra	60
4.16. Pomiar poziomu ATP w komórkach linii Hep G2 po transfekcji wybranymi syntetycznymi analogami miRNA oraz po inkubacji z nanocząstkami srebra	60
4.17. Ocena modulacji miRNA związanych z procesem nowotworzenia <i>in vivo</i>	60
5. Wyniki	62
5.1. Badanie toksyczności nanocząstek srebra	62
5.1.1. Analiza cytotoksyczności nanocząstek srebra wobec komórek linii Hep G2 hodowanych w pożywkach o różnym stężeniu glukozy	62
5.1.2. Szybkość proliferacji komórek Hep G2 hodowanych w pożywkach o różnym stężeniu glukozy, poddanych działaniu nanocząstek srebra	64
5.2. Badanie poziomu miRNA ulegających ekspresji w komórkach linii Hep G2 hodowanych w pożywkach o różnym stężeniu glukozy	66
5.3. Transfekcja i ocena efektywności transfekcji	68
5.3.1. Analiza wpływu wybranych syntetycznych analogów miRNA na toksyczność wywołaną nanocząstkami srebra	69
5.3.2. Badanie poziomu białek kontrolowanych na poziomie mRNA przez wybrane miRNA	71
5.3.3. Ocena złożoności/granularności komórek na podstawie parametru SSC	74
5.4. Modulacja toksyczności nanocząstek srebra poprzez zmianę poziomu wybranych miRNA w komórkach Hep G2	76
5.4.1. Przeżywalności komórek Hep G2 transfekowanych syntetycznymi analogami miRNA poddanych działaniu nanocząstek srebra	76
5.4.2. Badanie zdolności do tworzenia kolonii transfekowanych analogami miRNA komórek Hep G2, hodowanych na medium o różnym stężeniu glukozy i poddanych działaniu nanocząstek srebra	78
5.4.3. Badanie zdolności migracyjnych komórek Hep G2 poddanych działaniu nanocząstek srebra	82
5.4.4. Analiza potencjału migracyjnego wykonana na podstawie zdolności komórek Hep G2 poddanych działaniu nanocząstek srebra do zarastania rasy	86
5.4.5. Pomiar poziomu wybranych białek, kluczowych dla procesu EMT w komórkach Hep G2 poddanych działaniu nanocząstek srebra	91
5.4.6. Analiza cyklu komórkowego w komórkach Hep G2	96

5.4.7. Badanie apoptozy w komórkach linii Hep G2 poddanych działaniu nanocząstek srebra	100
5.4.8. Ilościowe badanie reaktywnych form tlenu powstających w komórkach wobec nanocząstek srebra i transfekcji wybranymi, syntetycznymi analogami miRNA.....	101
5.4.9. Badanie całkowitego poziomu NADP i NADPH w komórkach Hep G2 poddanych działaniu nanocząstek srebra	106
5.4.10. Pomiar potencjału błony mitochondrialnej w komórkach Hep G2 po wprowadzeniu inhibitorów łańcucha oddechowego.....	108
5.4.11. Pomiar ATP w komórkach Hep G2 transfekowanych syntetycznymi analogami miRNA i poddanych działaniu nanocząstek srebra	110
5.5. Ocena modulacji profilu miRNA w tkankach <i>in vivo</i>	110
6. Dyskusja.....	112
7. Podsumowanie	135
8. Wnioski.....	139
9. Streszczenie	140
10. Abstract.....	145
11. Suplement	150
12. Bibliografia	152

Wykaz skrótów

AgNP	nanoszczałtki srebra, <i>ang. silver nanoparticles</i>
AGO2	<i>ang. argonaute-2</i>
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	adenozynotrifosforan
BMI1	<i>ang. B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog</i>
BSA	surowicza albumina wołowa <i>ang. Bovine Serum Albumin</i>
CCCP	<i>ang. carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone</i>
CCNE1	gen kodujący białko cyklinę E1 <i>ang. cyclin E1</i>
CDKN1B	gen kodujący białko <i>ang. cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>
CHS	syntaza chalkonu, <i>ang. chalcone synthase</i>
CLDN1	gen kodujący klaudynę 1, <i>ang. claudin 1</i>
DGCR8	<i>ang. DiGeorge Syndrome Critical Region 8</i>
DHR123	dihydorrodamina 123
DMEM	<i>ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	kwas deoksurybonukleinowy, <i>ang. deoxyribonucleic acid</i>
dsRBD	domena wiążąca dsRNA, <i>ang. Double stranded RNA-binding protein domain</i>
dsRNA	RNA, dwuniciowy RNA , <i>ang. Double stranded</i>
E2F1	czynnik transkrypcyjny E2F1, <i>ang. Transcription factor E2F1</i>
EMA	<i>ang. European Medicines Agency</i>
EMT	przejście epithelialno-mezenchymalne , <i>ang. Epithelial Mesenchymal Transition</i>
ERCC1	<i>ang. Excision repair cross-complementing 1</i>
EZH2	katalityczna podjednostka kompleksu PRC2, <i>ang. Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit</i>
FBS	Płodowa surowica bydłęca , <i>ang. Fetal Bovine Serum</i>
FDA	<i>ang. Food and Drug Administration</i>
geny HOX	<i>ang. homeobox genes</i>
H ₂ DCFDA	<i>ang. 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate</i>
HDAC	deacetylazy histonowe , <i>ang. histone deacetylase</i>
HIF1-alpha	<i>ang. Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
HIF2-alpha	<i>ang. Hypoxia-inducible factor 2-alpha</i>
JNK	<i>ang. Jun N-terminal kinase</i>
lncRNA	długie niekodujące RNA , <i>ang. long non-coding RNA</i>
LPS	lipopolisacharyd
miRNA	mikro RNA
mRNA	matrycowy RNA
mTOR	<i>ang. mammalian target of rapamycin</i>
NBL	nerwiak zarodkowy
ncRNA	<i>ang. non-coding RNA</i> , niekodujący RNA
NER	<i>ang. Nucleotide excision repair</i>
NF1	neurofibromina 1, <i>ang. neurofibromin 1</i>
NFKB	<i>ang. Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
PBS	zbuforowany roztwór soli fizjologicznej

PRC2	ang. <i>polycomb repressive complex 2</i>
pre-miRNA	prekursorowy miRNA, ang. <i>precursor-miRNA</i>
pri-miRNA	pierwotne miRNA , ang. <i>primary miRNA</i>
RBP	białko wiążące RNA, ang. <i>RNA-binding protein</i>
RFT	reaktywne formy tlenu
RIIID	ang. <i>Ribonuclease-III domain</i>
RNA	kwasy rybonukleinowe , ang. <i>Ribonucleic acid</i>
RNAi	interferencja RNA, ang. <i>RNA interference</i>
shRNA	ang. <i>short hairpin RNA</i>
siRNA	małe interferujące RNA, ang. <i>small interfering RNA</i>
SMER	małocząsteczkowe wzmacniacze dojrzewania mikroRNA, ang. <i>small-molecule enhancer of microRNA</i>
SMIR	małocząsteczkowe inhibitory specyficznych miRNA, ang. <i>small molecule inhibitor</i>
TBST	bufor do przeprowadzenia elektroforezy
TLR	ang. <i>Toll-like receptors</i>
ZO	geny kodujące białka ang. <i>zonula occludens</i>

1. Wstęp

1.1. Odkrycie miRNA

Historia odkrycia mikroRNA (miRNA) sięga roku 1990, kiedy to Carolyn Napoli wraz z zespołem skupili się na badaniu genu *CHS*, który koduje syntazę chalkonu, enzymu kluczowego w syntezie flawonoidów odpowiedzialnych za m. in. barwę rośliny. Naukowcy wprowadzili chimeryczny gen *CHS* do *Petunia hybryda* chcąc wywołać nadekspresję tego genu. Nieoczekiwanie, zamiast ciemniejszych kwiatów, potomne rośliny charakteryzowały się całkowicie białymi kwiatami o zróżnicowanej wielkości. Obserwacja ta skłoniła badaczy do sprawdzenia poziomu mRNA genu *CHS*. Rośliny potomne z wprowadzonym genem, wykazywały 50-krotny spadek ilości mRNA *CHS* w porównaniu do mRNA *CHS* roślin kontrolnych. Zauważono zahamowanie ekspresji genu *CHS* odpowiedzialnego za syntezę fioletowego barwnika. Wyciszenia genu wprowadzoną kopią nie potrafiono na tamten czas wytłumaczyć a zjawisko nazwano kosupresją [1].

Trzy lata później w 1993 roku, na łamach *Cell*, zespół Victora Ambrosa przedstawił hipotezę na temat interakcji RNA-RNA w regulacji powstawania produktu białkowego. V. Ambros i B. Wightman pracowali równolegle nad znaczeniem genu *lin-4* w *Caenorhabditis elegans*. Potwierdzili oni, że w stadium rozwoju larwalnego nicienia, mutacja genu *lin-4* hamuje powstawanie struktur charakterystycznych dla dorosłego osobnika. Na podstawie informacji, że do wyciszenia białka *lin-14*, dochodzi potranskrypcyjnie, a sekwencja RNA *lin-4* jest komplementarna do powtarzalnej sekwencji w rejonie 3'UTR genu *lin-14* wykazali, że wyciszenie genu *lin-4* przekładało się na wysoką ekspresję produktów genu *lin-14*. Prowadziło to do zaburzenia rozwoju *C. elegans*, przez hamowanie powstawania białka *lin-14*. Badania wykazały, że gen *lin-4* nie koduje żadnego produktu białkowego, ale posiada zdolność do inhibicji translacji *lin-14* na poziomie RNA-mRNA, co okazało się być kluczowe dla prawidłowego rozwoju nicienia [2].

Kilka lat później, Andrew Fire i John Mello razem z zespołem wyjaśnili mechanizm, który zaobserwowano w pracy Victora Ambrosa. Naukowcy pierwszy raz wyjaśnili zjawisko interferencji RNA (RNAi). Badano jak komplementarne RNA wpływa na powstawanie produktu białkowego genu *unc-22*. Gen ten koduje u *C. elegans* białko

znajdujące się w mięśniach poprzecznie prążkowanych. Wstrzyknięcie nici sensownej bądź antysensownej RNA nie dawało oczekiwanych wyników, jednak wstrzyknięcie obu nici nawet w małych dawkach spowodowało, że u nicieni potomnych zaobserwowano fenotyp związany z utraconą funkcją genu *unc-22*. Przypuszczając, że w trakcie transfekcji obiema nićmi RNA, pojawiły się dwuniciowe transkrypty, naukowcy postanowili celowo wprowadzić dwuniciowe cząsteczki. Wykazano, że nasilenie interferencji odbywało się tylko wtedy, gdy sekwencje sensowne i antysensowne tworzyły wspólnie dsRNA, i były odcinkami homologicznymi do genu docelowego. Osobno, szybko ulegały degradacji i były niezdolne do połączenia z docelowym mRNA. Dwuniciowe RNA interferowało w regionach homologicznych do docelowego mRNA powodując zahamowanie mobilności nicieni a nawet fenotyp charakterystyczny dla braku genu *unc-22* w kolejnym pokoleniu [3]. Wyjaśnienie oddziaływania komplementarnych odcinków dsRNA na mRNA i rola interferencji w powstawanie docelowego białka zaowocowało Nagrodą Nobla w 2006 roku. Odkrycie mechanizmu interferencji RNA rzuciło nowe światło na odcinki genomu, które nie kodują białek a możliwości regulacyjne mikroRNA dały nadzieję na innowacyjne zastosowania kliniczne, przez co w kolejnych latach rośnie zainteresowanie niekodującymi RNA.

W 2002 roku, dziewięć lat od odkrycia pierwszego miRNA (*lin-4*) pojawiła się jedna z najbardziej popularnych do dnia dzisiejszego baz danych na temat miRNA: miRBASE, która gromadzi znane sekwencje miRNA dla wielu gatunków. W momencie powstania, baza miRBASE liczyła sobie zaledwie 218 loci miRNA wykrytych u pięciu gatunków. Obecnie, najnowsza wersja miRBASE-v22 zawiera 38589 prekursorów miRNA zawierającą strukturę spinki do włosów i 48860 dojrzałych miRNA z 217 organizmów, przy czym jest stale aktualizowana. Naukowcy wciąż opisują i przesyłają do bazy informacje o mikroRNA, również takich, które ulegają ekspresji na bardzo niskim poziomie lub w specyficznych typach komórek tkanek a nawet w odpowiednich stadiach rozwojowych organizmów. Baza do dzisiaj jest uaktualniana i wykorzystywana przez wielu badaczy [4-6]. Równolegle rozwijają się kolejne bazy danych np. niezwykle przydatna przy poszukiwaniu przewidywanych celów dla danego miRNA baza danych miRDB, baza Rfam skupiająca informacje o rodzinach i funkcjach miRNA czy baza RNAstructure skupiona na budowie miRNA [7].

Niekodujące RNA czyli ncRNA (ang. *non-coding RNA*) to RNA, które nie podlegają procesowi translacji. Wśród ncRNA można wyróżnić te odpowiedzialne za utrzymanie prawidłowego pod względem fizjologicznym stanu komórki (ang. *housekeeping RNAs*), w skład których wchodzi rybosomalne RNA (rRNA), transferowe RNA (tRNA), małe jądrowe RNA (snRNA), małe jąderkowe RNA (snoRNA), komponenty RNA telomerazy (TERC), fragmenty RNA pochodzące z tRNA (tRF) i krótkie RNA indukowane stresem (tiRNA) oraz drugą grupę ncRNA, czyli RNA regulatorowe, wśród których znajdują się mikroRNA (miRNA, z ang. *microRNA*), małe interferujące RNA (siRNA), RNA oddziaływujące z PIWI (piRNA), RNA wzmacniające ekspresję (eRNA), długie niekodujące RNA (lncRNA), koliste RNA (circRNA) i Y RNA [8]. NcRNA regulatorowe dzielą się dodatkowo na krótkie niekodujące RNA (sncRNA), których rozmiar nie przekracza 200 nukleotydów oraz długie niekodujące RNA (lncRNA), których rozmiar przekracza 200 nukleotydów, natomiast krótkie miRNA i siRNA należą do regulatorowych miRNA [9].

Regulacja ekspresji genów przez małe RNA występuje u bakterii, archeonów i eukariontów i ewoluowała w celu obrony przed egozennymi kwasami nukleinowymi [10]. Systemy regulacji ekspresji oparte na interferencji RNA składają się z kwasu nukleinowego umożliwiającego rozpoznanie celu specyficznego dla sekwencji oraz z białka efektorowego, które pośredniczy na dalszych etapach interferencji [11].

MikroRNA należy do klasy krótkich niekodujących RNA długości od 19 do 24 nukleotydów. Nie podlega ono translacji, a więc nie bierze udziału w powstawaniu białek. Odpowiada natomiast za regulację ich ilości w komórkach na poziomie potranskrypcyjnym a regulacja syntezy białek odbywa się na zasadzie łączenia się miRNA z komplementarną nicią mRNA [12]. MiRNA są niezbędne do utrzymania homeostazy w komórkach. Jak już wspomniano, według jednej z największych baz danych dotyczących miRNA – miRBASE, stwierdzono obecność dziesiątek tysięcy miRNA w organizmach zwierzęcych i roślinnych. Zgodnie z danymi z roku 2018 w przypadku samego genomu człowieka rozpoznano 1917 prekursorów miRNA i 2654 dojrzałych miRNA [4].

1.2. Powstawanie i dojrzewanie miRNA

Synteza miRNA rozpoczyna się na drodze transkrypcji genów miRNA przez polimerazę RNA II (Pol II), w której powstaje dwuniciowe pri-miRNA o wielkości ponad

1000 nt. Posiadają strukturę spinki do włosów w której zapisany jest transkrypt dojrzałego miRNA [13]. Na dalszych etapach dojrzewania, pri-miRNA wchodzi na szlak biogenezy kanonicznej lub niekanonicznej [14]. Kanoniczna ścieżka dojrzewania jest częstszą formą powstawania miRNA. W obrębie jądra komórkowego, kompleks mikroprocesora (ang. *Microprocessor complex*) przeprowadza dojrzewające miRNA przez kolejne etapy. Kompleks mikroprocesora tworzą białko Drosha wraz z białkiem z domeną wiążącą RNA (DGCR8) (ang. *DiGeorge Syndrome Critical Region 8*). DGCR8 rozpoznaje m. in. N-6-metyloadenyłowany motyw GGAC na dwuniciowym pri-miRNA oraz stabilizuje i wzmacnia wiązanie między pri-miRNA a kompleksem, natomiast endonukleaza III Drosha posiada domenę wiążącą dsRNA (dsRBD, z ang. Double stranded RNA-binding domain), oraz tandemowo ułożone domeny RIIID. W przetwarzanie niedojrzałego miRNA angażowana jest domena wiążąca dsRNA (dsRBD), która wspomaga przyłączenie do pri-miRNA u podstawy spinki do włosów oraz domeny katalityczne: RIIIDa i RIIIDb, których działanie polega na przecinaniu nici kolejno 3' i 5' i w rezultacie stworzeniu pre-miRNA posiadającego dwa niesparowane nukleotydy na końcu 3' [9, 15, 16]. W ten sposób powstaje pre-miRNA o strukturze spinki do włosów i długości ok. 65 pz, [17], który jest eksportowany do cytoplazmy. Za transport pre-miRNA odpowiedzialny jest kompleks XPO5-RanGTP, który tworzą eksportyna 5 (XPO5) przyłączona do RanGTP (ang. *RAs-related Nuclear protein*). XPO5 przyłącza się do rdzenia oraz dwóch niesparowanych nukleotydów końca 3' pre-miRNA tworzących unikalne motywy dla rozpoznania odpowiedniej cząsteczki. Budowa kompleksu pozwala na ochronę pre-miRNA przed atakiem nukleaz w obrębie jądra komórkowego. Po przemieszczeniu do cytoplazmy, RanGTP jest hydrolizowane do RanGDP, co powoduje rozpad kompleksu i uwolnienie pre-miRNA [18, 19]. W kolejnym kroku bierze udział Dicer – enzym grupy endonukleaz III, którego domena N-końcowa ułatwia rozpoznawanie pre-miRNA. Dicer ma dwa miejsca na łączenie z pre-miRNA, zarówno dla końca 3' jak i 5'. Przyłącza się on do pre-miRNA trawiąc nici najczęściej w obszarze około 22 nt od dwóch wolnych nukleotydów 3'. W komórkach ludzkich, Dicer może łączyć zarówno fosforylowany koniec 5' pre-miRNA nacinając nić 22 nukleotydy od końca 5' jak i koniec 3', choć badania wskazują na większą preferencję ufosforylowanego końca 5' [20]. Odcięta zostaje końcowa (terminalna) pętla pre-miRNA tworząc dojrzały dupleks miRNA ok 22 nt [21]. Tak przygotowany dojrzały miRNA jest zdolny do wyciszania mRNA. Sama

interferencja mRNA jest przeprowadzana z udziałem RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*), który składa się z białka AGO (ang. *Argonaute*) i przyłączonego do niego dupleksu RNA. Wśród klasy ludzkich białek AGO o zdolności regulacyjnej tylko AGO2 ma charakter katalityczny i jest zdolne do całkowitego wyciszenia komplementarnych celów mRNA. Mimo, że wszystkie te białka są zdolne do inkorporacji miRNA jak i siRNA, białko AGO2 spełnia kluczową rolę w tworzeniu kompleksu RISC a usunięcie jego genu jest letalne. Przez katalityczne właściwości AGO2 jest zdolne do przeprowadzenia degradacji przyłączonego mRNA, co ma miejsce przy wysokim stopniu komplementarności miRNA do mRNA [22-24]. W kompleksie RISC, białko AGO degradowuje jedną z nici. Wybór nici degradowanej nie jest oczywisty. W zależności od zapotrzebowania komórki za nią wiodącą może być wybrana nić 5' lub 3'. Nić o relatywnie niestabilnym końcu 5' zwykle zostaje wybrana na nią wiodącą jednak nie jest to regułą, zdarza się, że w zależności od typu komórki preferowaną izoformą będzie 3' i tak może powstać miR-3p lub miR-5p. Termodynamiczna stabilność nici może być zależna od działania Drosha [25].

Niekanoniczna droga dojrzewania miRNA dzieli się na niezależną od kompleksu mikroprocesora i niezależną od Dicer. Pre-miRNA wytwarzane przez ścieżkę niezależną od Drosha/DGCR8 przypominają substraty Dicer, np. mirtrony to pre-miRNA, które powstają z intronów mRNA w procesie składania (ang. *splicing*) i nie są przetwarzane przez nukleazę Drosha i białko AGO. Tak powstające RNA są bezpośrednio eksportowane do cytoplazmy poprzez eksportynę 1 bez potrzeby cięcia przeprowadzanego przez Drosha. Krótkie transkrypty RNA o strukturze spinki do włosów (shRNA) są przetwarzane przez Drosha niezależne od endonukleazy Dicer. Te pre-miRNA do zakończenia ich biosyntezy, z uwagi na swoją długość, wymagają interakcji z białkiem AGO [16]. Chociaż większość alternatywnych szlaków dojrzewania miRNA zależy od działania Dicer biogeneza miR-451 nie wymaga Dicer a zamiast tego obejmuje katalityczną aktywność AGO2. Cięcie za pośrednictwem Drosha pri-miR-451 generuje krótką strukturę spinki do włosów z gałęzią 18 nt, zbyt krótką aby była przetwarzana przez Dicer, dlatego jest bezpośrednio inkorporowany do AGO2 i cięty w środku pasma 3', co prowadzi do powstania 30-nukleotydowych form pośrednich z ac-pre-mir-451. Rybonukleaza swoista dla poli(A) PARN przycina koniec 3' ac-pre-mir-451 i powoduje powstanie miR-451. Brak aktywności tej rybonukleazy również powoduje powstanie funkcjonalnego miRNA ale dłuższego o 7 nt. [26].

1.3. Rola miRNA w regulacji procesów fizjologicznych na poziomie komórkowym

Po odkryciu ludzkich miRNA rozpoczęto intensywne badania nad ich regulacyjną rolą, w szczególności w kontekście występowania chorób. Zakłada się, że mikroRNA stanowi 3-4 % ludzkiego genomu i odpowiadają za regulację 30 do 60 % ludzkich genów. Powiązanie między patogenezą chorób a miRNA stało się oczywiste z uwagi na specyfikę tkankową ekspresji miRNA i ich rolę w różnicowaniu komórek [27-29]. Nieprawidłowości w biogenezie miRNA zmieniają poziom efektorowych białek i powodują zaburzenia embriogenezy u każdego badanego organizmu modelowego [11]. Działanie mikroRNA opiera się na regulacji ekspresji genów poprzez komplementarne łączenie par zasad z docelową cząsteczką mRNA, jednak dopasowanie nici dla prawidłowego funkcjonowania mechanizmu regulacyjnego nie musi być stuprocentowe [30].

MiRNA są niezbędne dla funkcjonowania organizmów, jednak odkrycie funkcji poszczególnych z nich stanowi wyzwanie między innymi dlatego, że ekspresja odpowiednich miRNA ma charakter tkankowo specyficzny i bierze udział w określeniu specyficznej roli danej komórki a więc roli wielu mRNA w ściśle wyspecjalizowanych komórkach (takich jak neurony albo hepatocyty). Do tej pory, pomimo badań i baz danych, które ułatwiają prowadzenie eksperymentów przez przewidywanie dopasowań miRNA – mRNA, nie potrafimy określić pełnych paneli miRNA charakterystycznych dla danych typów komórek [31]. Przez swój mechanizm wyciszania, miRNA są trudnymi do badania cząsteczkami. Jest to między innymi spowodowane zaangażowaniem miRNA w wielość ścieżek sygnalizacyjnych i możliwość modulacji poziomu ekspresji ich samych na wielu etapach. Dotychczasowe badania dowiodły, że regulacja przez niektóre miRNA ma miejsce dopiero przy silnie zmienionych warunkach środowiskowych czyli przykładowo w odpowiedzi na ekstremalne temperatury czy ekspozycję na patogeny, co utrudnia obserwacje i wnioskowanie na temat konsekwencji ekspresji miRNA [11, 32].

Przykładem miRNA ulegających zmianom ekspresji w odpowiedzi na czynniki zewnętrzne mogą być miRNA zaangażowane w ścieżki naprawy DNA. Wpływ czynników zewnętrznych może być pośredni (na drodze uszkodzeń, zmian stanu redoks oraz modyfikacji szlaków) i prowadzić do zmian w poziomie miRNA [33]. Egzogenne czynniki, jak promieniowanie UV, prowadzą do powstawania reaktywnych form tlenu oraz peroksydacji lipidów, co niesie ze sobą ryzyko pojawienia się uszkodzeń DNA [34].

W takich przypadkach w komórkach włączany jest szlak naprawy NER (ang. *Nucleotide excision repair*), w wyniku czego usuwane są większe odcinki nukleotydowe. Brak sprawnego NER, prowadzi do zatrzymania replikacji i inicjacji apoptozy. Celem wielu chemioterapeutyków jest niszczenie DNA komórek nowotworowych. Niestety, niejednokrotnie mechanizmy naprawy DNA wzmagają swoje działanie w komórkach nowotworowych i w trakcie stosowania leczenia wywołują lekooporność. Lekooporność w komórkach nowotworowych wywołana jest między innymi zwiększeniem wydajności naprawy NER [35]. Jednym z głównych białek tego systemu naprawy jest białko ERCC1 (ang. *Excision repair cross-complementing 1*), którego wzrost poziomu jest charakterystyczny dla komórek nowotworowych poddanych działaniu cis-platyny, czy doksorubicyny [36]. Oporność na cis-platynę w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc o podwyższonej ekspresji ERCC1 może być znoszona przez inhibitory deacetylazy histonów (HDAC) i uwrażliwiać komórki na działanie chemioterapeutyku. Rolę w tym procesie odgrywa również miRNA. Zauważono, że wzmożone działanie inhibitorów HDAC skutkuje podwyższeniem ekspresji miR-149. Wzrost ekspresji miR-149 nie jest bezpośredni. Wynika on z aktywacji przez inhibitory HDAC czynnika E2F1 (z ang. *Transcription factor E2F1*) białka działającego supresorowo m. in. przez promowanie apoptozy. Wykazano, że acetylacja przez inhibitory HDAC czynnika E2F1 skutkuje przyłączeniem się E2F1 do promotora miR-149 a zarazem promowania wzrostu ekspresji tego miRNA. Wzrost poziomu miR-149 powodował spadek białka ERCC1, które okazało się być biologicznym celem dla tego miRNA [37]. W ten sposób hamowana jest pośrednio ekspresja ERCC1 przez inhibitory ERCC1. MiRNA jest więc kluczowe przy odpowiedzi komórek na czynniki stresowe. Cząsteczki te są zdolne do hamowania systemów naprawczych DNA takich jak NER przez inhibicję powstawania kluczowych dla tego systemu białek.

MiRNA mogą brać istotny udział w zwalczaniu lekooporności komórek. Wykryto, że zmiana w poziomach miRNA jest ściśle powiązana ze zjawiskiem lekooporności w komórkach. Przykładem może być miR-182, będący znanym onkogennym miRNA, którego podwyższony poziom zauważono u pacjentów cierpiących na raka wątrobowokomórkowego i poddanych chemoterapii opartej na cis-platynie. Negatywny wpływ miR-182 wynika z inhibowania powstawania białka TP53INP1 (ang. *tumor protein 53-induced nuclear protein 1*), wykazującego działanie supresorowe w stosunku do

komórek nowotworowych. Białko to bierze udział w regulacji i aktywacji apoptozy. Jego niedobory w komórkach nowotworowych skutkują zwiększeniem ich przeżywalności [38].

Odkryto, że regulacja powstawania białek przez miRNA zachodzi na bardzo wielu poziomach. Może wpływać na podziały komórkowe [39], szlaki śmierci komórkowej [40], odpowiadać za procesy metaboliczne [41], przekazywanie sygnałów między komórkami [42], odporność komórkową [43], odpowiedź na stres oksydacyjny [44] czy zdolność motoryczną komórek [45].

Ze względu na taki potencjał pojawiły się pomysły modulacji poziomu miRNA komórek nieprawidłowych, które miały prowadzić do korekcji fenotypu w kierunku komórek prawidłowych dla danej tkanki. Ta obiecująca idea doprowadziła do wielu prób stworzenia strategii terapeutycznych. Spadek lub wzrost poziomu miRNA regulatorowych może być związany z typowymi mutacjami w DNA w komórce. Delecje, insercje czy inwersje mogą prowadzić do spadku poziomu ekspresji miRNA natomiast duplikacje powodować jego wzrost [11]. Regulacja ekspresji miRNA może odbywać się na wielu etapach. Przykładem może być zmiana pojedynczego nukleotydu w pętli wierzchołkowej pri-mir-30c-1 obecna u chorych z rakiem piersi i żołądka, która skutkuje większym powinowactwem do mikroprocesora, a tym samym wyższym poziomem miR-30c-1 [46].

Skoro poziom miRNA różni się w zależności od czynników środowiskowych i ich wpływu na komórkę, musi istnieć sposób jego komórkowej regulacji. W trakcie obróbki miRNA, jego poziom może być regulowany na dwóch etapach. W jądrze, w momencie łączenia się z mikroprocesorem Drosha/DGCR, oraz w cytoplazmie podczas rozpoznawania przez Dicer. Od budowy niedojrzałego miRNA przed obróbką zależy, czy będzie ono włączane w kolejne fazy przetwarzania, a więc różnice w budowie pri- oraz pre-miRNA mogą stanowić czynnik ograniczający poziom miRNA na kolejnych etapach jego biogenezy [47]. 70 % genów kodujących miRNA jest w genomie związanych z genami kodującymi białka i podlega jednoczesnej transkrypcji, natomiast 30 % miRNA jest transkrybowanych z ich własnych otwartych ramek odczytu zlokalizowanych w obszarach międzygenowych [9, 48]. Wykazano, że za inicjację powstawania konkretnych miRNA są odpowiedzialne białka wiążące RNA (RBP, ang. *RNA-binding protein*). Kontrola powstawania miRNA odbywa się na różnych etapach. RBP rozpoznają

unikalne miejsca w cząsteczkach takie jak pętle prekursorowych miRNA. RBP przetwarzają prekursory miRNA a swoistość ich wiązania może być determinowana przez pętlę końcową pre- i pri-miRNA, w której odcinek RNA jest jednoniciowy i zazwyczaj wystawiony na kontakt z innymi białkami. Przykładowo MSI1/2 (ang. *RNA-binding protein Musashi homolog 1/2*) wykazuje silne wiązanie z pre-miR18a i pre-miR-20a. Również modyfikacje potranskrypcyjne wpływają na dojrzewanie miRNA w zależności od jego specyfiki tkankowej. RBP są zdolne do kontrolowania aktywności dojrzałych miRNA przez co pośrednio regulują poziom mRNA białek będących bezpośrednim celem tych miRNA a spadek poziomu odpowiednich RBP może pozytywnie lub negatywnie wpływać na ekspresję miRNA [49]. Mutacje w genach białek odpowiedzialnych za biogenezę miRNA mogą również prowadzić do wielu chorób i nieprawidłowości w organizmie człowieka. Przykładem może być delecja regionu w którym znajduje się gen kodujący DGCR8. Zanik ekspresji DGCR8 prowadzi do autosomalnego recesywnego zaburzenia genetycznego zwanego zespołem DiGeorge'a. Chorobie tej często towarzyszą wady serca, słaba odporność, rozszczep podniebienia i zaburzenia zachowania [50]. Na podstawie analizy bazy danych The Cancer Genome Atlas (TCGA) przewidywanych jest 7110 mutacji miRNA w 33 nowotworach [51], jednak zmiany w ekspresji miRNA można zauważyć nie tylko w przypadku nowotworów ale w całym spektrum chorób psychicznych, immunologicznych czy sercowo-naczyniowych [29].

Czynności układu naczyniowego zależą od funkcjonalności komórek śródbłonna i ich skoordynowanej regulacji. Cząsteczki RNA pełnią ważną funkcję w regulacji czynności serca i układu sercowo-naczyniowego a także angiogenezy i waskulogenezy ssaków [52, 53]. W próbkach pobranych z lewej komory serca osób u których wystąpiły przypadki kardiomiopatii niedokrwiennej, kardiomiopatii rozstrzeniowej i zwężenia aorty sprawdzono poziom ekspresji 428 miRNA. Stwierdzono obecność 87 miRNA z czego 43 miRNA wykazywały zmiany ekspresji między grupami badanymi. Wzór zmienionej ekspresji miRNA był charakterystyczny dla poszczególnych grup badanych co pokazało, że profile ekspresji miRNA znacząco różnią się między jednostkami chorób nawet w obrębie jednej klasy chorób [52].

Zaburzenia w ekspresji miRNA mogą nieść ryzyko pojawienia się chorób w kolejnych pokoleniach. Również choroby o podłożu psychicznym są powiązane z zaburzeniem regulacji kluczowych miRNA. Przykładem jest choroba dwubiegunowa,

która jest zaburzeniem psychicznym i często dziedzicznym. Ekspresja miR-15b, miR-132 i miR-652 w krwi nieleczonych krewnych osób z chorobą dwubiegunową była podwyższona w porównaniu do poziomu miRNA we krwi pacjentów z grupy kontrolnej, co może świadczyć o roli tych miRNA w podatności na chorobę dwubiegunową [54].

Odpowiedź immunologiczna jest także ściśle kontrolowana przez całe rodziny miRNA, które towarzyszą procesom eliminacji infekcji bakteryjnych i ochrony organizmu. Geny kodujące miR-146 i miR-155 określono mianem genów odpowiedzi na endotoksyny (ang. *endotoxin-responsive genes*), ponieważ działają przeciwzapalnie w odpowiedzi na infekcję wywołaną przez patogeny. Wzrost poziomu miR-146 i miR-155 jest obserwowany przy ekspozycji komórek na lipopolisacharyd (LPS). Zauważono, że poziom miR-146a wzrasta już po ośmiu godzinach od wystawienia komórek na działanie LPS. Ponadto, poziom miR-164a jest zależny od szlaku NFκB (z ang. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) podczas stanu zapalnego i może być zaangażowany w regulację TLR (z ang. *Toll-like receptors*) i przekaznictwo receptorów cytokin przez przyłączanie się do mRNA IRAK1 (z ang. *Interleukin-1 receptor-associated kinase 1*) i TRAF6 (z ang. *TNF receptor-associated factor 6*), białek kluczowych dla aktywacji NFκB [55, 56].

1.4. Funkcja miRNA w procesie nowotworzenia i rozwoju guzów

Szacuje się, że jeden na osiem zgonów jest spowodowany chorobą nowotworową co plasuje nowotwory na drugim miejscu najczęstszych przyczyn śmierci na świecie. Proces nowotworzenia jest złożony, jednak we wszystkich przypadkach sprowadza się do zmian w strukturze DNA i mutacji, które mogą być zarówno dziedziczone jak i nabyte. Nowotwory charakteryzują się relatywnie wysoką szybkością proliferacji, co prowadzi do nabywania kolejnych mutacji a w konsekwencji zdolności do migracji i kolonizacji kolejnych tkanek, czyli ułośliwiania nowotworu [57]. Ponadto, dojrzałe nowotwory charakteryzują się brakiem zróżnicowania, szybszym wzrostem i zmianami w systemach odpowiedzialnych za śmierć komórkową [58]. Komórki pozostające w masie guza wykazują brak zdolności do metastazy i zasiedlania kolejnych niszy komórkowych, tworzą nowotwór łagodny. Zdolność do kolonizacji kolejnych siedlisk komórek prawidłowych i inicjowania następnych guzów nadaje nowotworowi miano złośliwego. Guzy można podzielić ze względu na typy komórek z jakich się wywodzą, dlatego wyróżniamy

nowotwory epitelialne, mezenchymalne, hematopoetyczne i neuroektodermalne. Szybkość wzrostu guza zależy od jego unaczynienia. Dodatkowo, guzy muszą być odporne na działanie komórek układu odpornościowego. Ze względu na efekt Warburga, i związaną z nim kwasicę, wraz ze wzrostem guzów stają się one bardziej niejednorodne, co utrudnia ich eliminację [59, 60].

Przejście epitelialno-mezenchymalne (EMT, z ang. *Epithelial Mesenchymal Transition*) polega na zmianie fenotypu komórki z epitelialnego na mezenchymalny i odgrywa kluczową rolę w embriogenezie i morfogenezie narządów, regeneracji tkanek, oraz metastazie. Metastaza, czyli nieprawidłowa aktywacja EMT, jest złożonym procesem polegającym na utracie typowych cech nabłonka (ściśłego połączenia komórka-komórka, połączeń komórka- macierz pozakomórkowa, polarności komórek wierzchołkowo-podstawnych i prawidłowo przeprowadzanej apoptozy) co prowadzi do pozyskania zdolności migracji, inwazyjności i zwiększonej produkcji składników macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) [61-63]. Mechanizm metastazy polega na przedostawaniu się komórek do naczyń limfatycznych lub bezpośrednio do krwioobiegu, gdzie przemieszczając się wraz z krwią przedostają się do odległych miejsc w organizmie. Pojedyncze komórki mogą tworzyć mikroprzerzuty i stopniowo rosnące przerzuty angiogeniczne dzięki plastyczności fenotypu nabłonka, która umożliwia odwrotne przejście mezenchymalno-epitelialne (MET) [61]. Zmiana komórek guza z nowotworowych na rakowe może się wiązać z utratą funkcji genów, które utrzymują prawidłowy zróżnicowany stan komórek. Zidentyfikowano geny supresorowe dla metastazy tworzące KAI1 (z ang. *Metastasis Suppressor Kagai-1*), NM23 (z ang. *Metastasis Inhibition Factor Nm23*), białka rodziny kinaz aktywowanych mitogenami [61] i zauważono, że miRNA mogą odgrywać rolę również w nowotworowym przejściu epitelialno-mezenchymalnym [64].

1.5. Epigenetyczne mechanizmy zaangażowane w progresję nowotworu

Z uwagi na zmiany w DNA związane z nowotworzeniem i progresją nowotworu etiologia nowotworu ma podstawy zarówno w genetyce jak i epigenetyce. Procesy epigenetyczne nie wprowadzają zmian w sekwencji genomu. Dziedziczne zmiany w strukturze DNA zależą również od nadekspresji lub zmniejszonej ekspresji cząsteczek niezbędnych do zachowania homeostazy. Istnieje wiele epigenetycznych mechanizmów,

jednak najlepiej poznane i zrozumiane, silnie związane z równowagą komórki i regulacją powstawania nowotworów to: metylacja cytozyny, potranslacyjne modyfikacje histonów oraz wyciszanie genów związane z interferencją RNA. Wszystkie wspomniane procesy ulegają zaburzeniu w komórkach nowotworowych [65].

Metylacja DNA polega na przyłączaniu grup metylowych do DNA w obszarach wysp CpG. Wyspy CpG to odcinki DNA bogate w cytozynę i guaninę, które zlokalizowane są często w sekwencjach promotorowych genów tkankowo specyficznych, czyli decydujących o fenotypie komórki. Metylacja jest podstawowym mechanizmem podtrzymującym homeostazę komórki. Pozwala na regulację procesów, które decydują czy gen ma podlegać transkrypcji, czy nie, ponieważ proces ten prowadzi do zmniejszenia ekspresji genu na drodze blokowania miejsca promotorowego. Prawidłowe komórki utrzymują stałą równowagę w procesach metylacji i demetylacji. W przypadku wystąpienia nowotworu, następuje spadek metylacji czyli hipometylacja z jednoczesnym wzrostem metylacji (hipermetylacja) w różnych regionach DNA. Hipometylacja prowadzi do zwiększenia liczby oraz dostępności aktywnych onkogenów, natomiast hipermetylacja ma zwykle miejsce w genach supresorowych nowotworów, to prowadzi do nadmiernej zdolności do proliferacji komórek, zmniejszenia możliwości przeprowadzenia procesu apoptozy czy wzrostu potencjału migracyjnego [66].

Nadekspresja metylotransferaz DNA: DNMT1, DNMT3A i DNMT3B (z ang. kolejno *DNA methyltransferase 1; 3 alpha; 3 beta*) jest obserwowana m. in. w nowotworach jajnika. Powyższe enzymy przeprowadzają metylację i ich podwyższona ilość prowadzi do hipermetylacji w genach supresorowych [67]. Spadek ekspresji niektórych genów w tym demetylaz takich jak *TET1* (z ang. *Tet Methylcytosine Dioxygenase 1*) czy *TET3* (z ang. *Tet Methylcytosine Dioxygenase 3*) jest skorelowany z powstawaniem nowotworów piersi, jelita grubego oraz wątroby, natomiast mutacje *TET2* (z ang. *Tet Methylcytosine Dioxygenase 2*) są wykrywane w przypadku wystąpienia białaczki. Hipermetylacja może skutkować wyciszaniem supresorów nowotworów, natomiast hipometylacja, nadekspresją onkogenów [68]. Hipermetylacja w komórkach nowotworowych często wpływa na zmiany w regulacji cyklu komórkowego (hipermetylacja CDKN2a-p16INK4a, CDKN2b-p15INK4b RB1) lub na systemy naprawy DNA (hipermetylacja hMLH1, MGMT, BRCA1). Skutkiem zaburzonej w ten sposób homeostazy może być niekontrolowana proliferacja. Jednocześnie hipometylacja takich

genów jak *IGF2* (ang. *Insulin-like growth factor II*) może prowadzić do metastazy i przerzutowania nowotworów piersi a hipometylacja w elementach ruchomych DNA takich jak *LINE-1* (ang. *long interspersed nuclear element*) wpływa na zmniejszenie stabilności genomowej [69-72].

DNA jest upakowany w strukturę chromatyny, której podstawowymi jednostkami są nukleosomy. Nukleosom jest zbudowany z DNA, oktameru histonu (histony H2A, H2B, H3 i H4) oraz histonu H1. DNA może być upakowane silnie w strukturę heterochromatyny, lub luźno jako euchromatyna. Histony rdzeniowe są konserwatywnymi białkami, które mają wspólny motyw strukturalny zwany fałdowaniem histonowym, składającym się z trzech helis α połączonych dwiema pętlami i N-końca, który może być obiektem modyfikacji. Jedną z modyfikacji N-końca jest acetylacja lizyny. Acetylacja lizyny prowadzi do usunięcia dodatnich ładunków i redukcji powinowactwa między histonami a DNA co sprawia, że polimeraza i czynniki transkrypcyjne mają łatwiejszy dostęp do nukleotydów i tym samym ułatwia to przeprowadzenie transkrypcji [73].

Acetylacja histonów zwiększa szybkość transkrypcji i prowadzi do zmiany konformacji heterochromatyny do euchromatyny, podczas gdy deacetylacja histonów hamuje transkrypcję i promuje powstawanie heterochromatyny. Acetylazy histonowe (rodzina HAT, ang. *histone acetyltransferase*) to enzymy, które acetylują konserwatywne aminokwasy lizyny na histonach, natomiast deacetylazy histonowe (HDAC, ang. *histone deacetylase*) to enzymy, które usuwają grupy acetylowe z lizyn histonowych. W prawidłowych warunkach środowiskowych, komórki posiadają równowagę w procesach acetylacja/deacetylacja, jednak w przypadku komórek nowotworowych, nadekspresja HDAC często skutkuje obniżoną ekspresją genów supresorowych jak p21 albo p27. Deacetylacja histonów prowadzona przez deacetylazy HDAC wpływa na ekspresję genów i prowadzi do inicjacji i progresji nowotworów przez zniesienie ekspresji inhibitorów cyklu komórkowego inicjacji apoptozy. Zwiększenie ekspresji HDAC jest skorelowane z rozwojem nowotworów przez aktywację czynników promujących spadek adhezji komórek a więc i zdolność komórek do inwazyjności i migracji [74].

Regulacja transkrypcji jest kontrolowana również przez metylację lizyny i arginyiny na N-końcach. Metylacja lizyn może powodować aktywację lub represję transkrypcji. Zmiany w metylacji lizyn histonowych są obserwowane w różnych typach nowotworów.

Zmiany poziomu metylacji są często powodowane przez mutacje w genach zaangażowanych w przeprowadzanie procesów metylacji/demetylacji, przykładowo mutacje punktowe w genie metylotransferazy - *EZH2* (ang. *Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit*) są związane z powstawaniem chłoniaków rozlanych z dużych komórek B [75, 76].

Kompleksy polycomb to białka, które przeprowadzają zmianę struktury chromatyny tak, aby w trakcie rozwoju embrionalnego mogło dochodzić do epigenetycznego wyciszania genów. Jednymi z najlepiej scharakteryzowanych białek kompleksu polycomb są PRC1 (ang. *polycomb repressive complex 1*) i PRC2 (ang. *polycomb repressive complex 2*). Mogą one wyciszać geny samodzielnie lub synergistycznie. Najważniejszymi genami wyciszonymi przez te białka są geny *HOX* (ang. *homeobox genes*). Geny *HOX* są konserwatywnymi sekwencjami DNA, które odpowiadają za kodowanie czynników transkrypcyjnych determinujących kierunek rozwoju embrionalnego zwierząt. Są one zaangażowane w kontrolę budowy osi przednio-tylnej (głowa-ogon) embrionu [77]. Jednym z komponentów drugiego represyjnego kompleksu, Polycomb 2 (PRC2) jest metylotransferaza *EZH2*, która bierze udział w metylacji histonów a tym samym jej ekspresja prowadzi do represji transkrypcji. Zwiększenie poziomu *EZH2* jest często skorelowane z inicjacją nowotworzenia i stanowi zły prognostyk dla terapii. Nadprodukcja *EZH2* wykrywana jest w nowotworach piersi, prostaty, pęcherza, okrężnicy, płuc, trzustki, różnego rodzaju mięśniakach i chłoniakach. W nowotworach prostaty wzrost poziomu *EZH2* prowadzi do wyciszania genu *CDH1* (ang. *Cadherin 1*), którego białkowy produkt jest zaangażowany w regulację przejścia epithelialno-mezenchymalnego (EMT) [78] co promuje nabywanie przez komórki nowotworowe fenotypu mezenchymalnego i daje im możliwość migrowania do innych organów poprzez naczynia krwionośne. Białka kompleksu Polycomb są zaangażowane w powstawanie komórek prawidłowych macierzystych oraz komórek macierzystych nowotworowych. Komórki macierzyste nowotworów są rzadkimi komórkami w obrębie wszystkich komórek guza. Posiadają zdolność samoodnowy i dają początek zróżnicowanym fenotypowo komórkom nowotworowym wśród populacji komórek guza. Brak sprawnych systemów Polycomb PRC1/PRC2 (ang. *Polycomb repressive complex ½*) prowadzi do powstawania macierzystych komórek nowotworowych z prawidłowych komórek macierzystych. Różnicowanie prawidłowych komórek macierzystych jest ściśle

kontrolowane przez poziomy białek Polycomb, które w zależności od potrzeby blokują lub włączają ścieżki rozwojowe. Zmiana w aktywności tych białek może prowadzić do wzmożonej proliferacji w konsekwencji do powstawania komórek macierzystych nowotworowych [77].

Zmiany w ekspresji protoonkogenu BMI1 (ang. *B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog*), będącego również białkiem kompleksu Polycomb, sprzyjają inicjacji i progresji nowotworowej związanej z powstawaniem macierzystych komórek nowotworowych. Badania wskazują na zwiększającą się ekspresję BMI1 w nowotworach płuc, jajników, piersi, ostrej białacze szpikowej i nerwiakach. BMI1 reguluje na poziomie organizmalnym wiele procesów fizjologicznych w tym rozwój embrionalny, stabilizację i różnicowanie komórek macierzystych jednak wzrost ekspresji tego białka pozwala na zapobieganie wstępowaniu nieprawidłowych komórek na drogę apoptozy co czyni je onkogenem [79].

Istotnym mechanizmem epigenetycznej regulacji jest interferencja miRNA. Podczas powstawania, progresji i metastazy nowotworów, profil miRNA ulega zmianom przez kumulujące się mutacje. Z uwagi na swoje działanie regulacyjne wiele miRNA przy zwiększonym poziomie odgrywa rolę onkogeną lub przy zmniejszonym poziomie supresorową [80]. Jednym z najlepiej poznanych i często występujących w tkankach miRNA jest miR-21 (hsa-miR-21). Podczas progresji nowotworu to miRNA odgrywa rolę onkogeną przez wzrost ekspresji w komórkach nowotworowych. Prowadzi to do promowania wzrostu komórek i zdolności inwazyjnej na inne tkanki przez represję przez to miRNA mRNA supresora nowotworowego *PTEN* (ang. *Phosphatase And Tensin Homolog*) [81]. Z drugiej strony jest miR-101, którego niedobory w komórkach powodują zwiększoną zdolność komórek do EMT. E-kadheryna jest białkiem odpowiedzialnym za połączenia międzykomórkowe a jego spadek jest uznawany za markerowy w komórkach metastazujących. Spadek E-kadheryny zauważono w komórkach raka wątrobowokomórkowego z niedoborami miR-101, a wraz z niedoborami miR-101, podwyższony poziom białka ZEB1, które reguluje poziom E-kadheryny w komórce. Mechanizm ten pokazuje, że spadek supresorowego miR-101 pozwala na powstawanie wysokiego poziomu białka ZEB1 co skutkuje zmniejszeniem ilości E-kadheryny i włączaniem systemów zaangażowanych w zmianę fenotypu komórki na mezenchymalny [82].

MiRNA regulują około 30 % genomu ludzkiego co sprawia, że regulacja miRNA może mieć w przyszłości ogromny potencjał do wytwarzania terapeutycznych celów, markerów i narzędzi diagnostycznych na bazie mechanizmu interferencji RNA. Pierwsze powiązania między miRNA a nowotworami stwierdzono w 2002 roku. Wykryto spadek miR-15 i miR-16 w komórkach przewlekłej białaczki limfatycznej [83]. Terminem „onkomir” określane są te miRNA, które biorą udział w nowotworzeniu podobnie jak mutacje w samych genach supresorowych i onkogenach [84]. Nieprawidłowy poziom tych miRNA wywołuje podobne skutki w kluczowych genach zaangażowanych w nowotworzenie, co same mutacje tych genów. Jednym z najstarszych przykładów onkomiru jest miRNA- let-7 [85].

Wiele badań wykazało rolę let-7 jako supresora nowotworów tkanki płuc ssaków. Wykryto, że ekspresja let-7 jest dwukrotnie mniejsza w guzach płuc niż w prawidłowych tkankach sąsiadujących. Zmniejszona ekspresja let-7 korelowała ze zwiększonym ryzykiem zgonu pacjenta w porównaniu z pacjentami o wysokim poziomie let-7 [85, 86]. Dodatkowo, niska ekspresja let-7 prowadzi do podwyższonego poziomu onkoproteiny RAS – wskaźnika niedrobnokomórkowego raka płuc [87].

Zaburzenia w ekspresji miRNA pojawiają się powszechnie w przypadku rozwoju wielu nowotworów a panel miRNA ulegający zmianom może znacznie się różnić w przypadku odmiennych typów nowotworów oraz innych jednostek chorobowych. Z uwagi na umiejscowienie genów miRNA w miejscach DNA szczególnie wrażliwych na uszkodzenia, w przypadku zmian w homeostazie wywołanych czynnikami zewnętrznymi lub wewnętrznymi organizmu, miRNA mogą ulegać częstszej amplifikacji lub delecji [88].

1.6. Sposoby modulacji poziomu miRNA

Badacze powiązali zmianę poziomu miRNA z występowaniem wielu chorób. Rozsądnym posunięciem wydawała się próba przywrócenia pierwotnej gospodarki miRNA w komórkach nieprawidłowych. Stwierdzono, że modulacja poziomu miRNA w komórkach nowotworowych zsyntetyzowanymi miRNA lub inhibitorami miRNA może przyczynić się do przywrócenia prawidłowej aktywności miRNA i naprawić ścieżki regulatorowe genów oraz szlaki sygnałowe. Taka taktyka mogłaby teoretycznie prowadzić do odwrócenia fenotypu komórek nowotworowych i przyczynić się do przywrócenia homeostazy w zmienionej tkance [89]. Dodatkowo, w wielu chorobach

dochodzi do nadekspresji lub niedoboru czynników transkrypcyjnych, które regulują nie tylko geny kodujące białka ale także geny miRNA.

Warunki hipoksji (obniżonego stężenia tlenu) są charakterystyczne dla guzów litych, co wynika ze słabego unaczynienia, zwiększonego metabolizmu i szybkiej proliferacji komórek. Adaptacja do takich warunków jest silnie związana z syntezą białek indukowanych przez hipoksję: HIF1-alpha (ang. *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*) i HIF2-alpha (ang. *Hypoxia-inducible factor 2-alpha*) [90]. MiRNA, które regulują powstawanie produktów *HIF* oraz białek bezpośrednio związanych z hipoksją mają ogromny wpływ na cały fenotyp komórek znajdujących się w hipoksji. Przykładowo miR-199a charakteryzuje się zmniejszoną ekspresją w komórkach w obszarze hipoksji, a jego funkcją jest regulacja powstawania HIF1-alpha i HIF2-alpha oraz HER2 (ang. *receptor protein-tyrosine kinase*) - którego wysoka ekspresja jest skorelowana z wysoką ekspresją HIF2-alpha [91, 92]. Niedobór miR-15 i miR-16, również wpływa na powstawanie fenotypu związanego z wystąpieniem hipoksji ponieważ te miRNA powinny kontrolować powstawanie białka HIF1-alpha i VEGF (ang. *Vascular endothelial growth factor A*) [93]. MiR-210 jest regulowany przez stan hipoksji za pośrednictwem transkrypcji przez HIF1-alpha. Indukowana hipoksja może modulować poziom tego miRNA, który zwiększa się wraz ze zwiększeniem poziomu HIF1-alpha [94]. Zaburzona gospodarka miRNA wpływa więc na odpowiedź komórki na warunki niedotlenienia.

MiRNA, które kontrolują powstawanie białek przez przyłączanie się do mRNA na zasadzie komplementarności łańcucha, same mogą być w podobny sposób kontrolowane przez lncRNA. lncRNA mogą posiadać na długości swojego łańcucha nawet kilka miejsc wiążących poszczególne miRNA i w ten sposób oddziaływać na nie jak „chłonna gąbka”. Zauważono już, że w wielu chorobach, w tym nowotworowych, ekspresja lncRNA również może ulegać zmianom. Zatrzymując na sobie poszczególne miRNA, lncRNA mogą zmniejszać poziom aktywnych miRNA, podczas gdy sama ekspresja miRNA jest prawidłowa. Dobrym przykładem mechanizmu jest działanie lncRNA H19 na miR-106a z uwagi na kilka miejsc wiążących dla tego miRNA [95, 96]. Zmiany w aktywności lncRNA mogą powodować problemy w regulacji miRNA, a więc pośrednio wpływać na aktywność białek a tym samym na zmiany w homeostazie. Ich działanie może być z jednej strony pozytywne, wychytując miRNA o działaniu promującym powstawanie i proliferację guzów, a z drugiej negatywne, prowadzące do nowotworzenia

i przerzutowania guza przez przyłączenie miRNA o działaniu supresorowym. Przykładem działania lncRNA jest wzrost poziomu miR-21 miRNA przez zmniejszony poziom ekspresji lncRNA MEG3 w tkankach pacjentów cierpiących na raka żołądka. MEG3 jest odpowiedzialny za wychwyt miR-21 a tym samym przyczynia się do zmniejszenia proliferacji i metastazy [97]. Odkrycie roli lncRNA w regulacji miRNA wzmacnia przekonanie dotyczące złożoność procesów związanych z interferencją RNA, a stałe poszerzanie wiedzy związanej z tą tematyką przybliża do nowatorskich rozwiązań farmaceutycznych i terapeutycznych.

Celem terapii miRNA jest przywrócenie prawidłowej gospodarki miRNA w celu odwrócenia patologicznych zmian. Możliwe jest uzupełnienie braków w miRNA działających jako supresory nowotworowe na zasadzie wzmocnienia działania miRNA o słabej ekspresji lub przywrócenie poziomu endogennych miRNA, których ekspresja jest całkowicie wyciszona. Inną drogą przewracania równowagi miRNA jest redukcja ekspresji lub blokowanie tych miRNA, które odgrywają rolę onkogenów. W celu zwiększenia poziomu miRNA można zastosować kwasy nukleinowe, w tym syntetyczne miRNA, rekombinowane lub wektory ekspresyjne niosące sekwencje kodujące miRNA. Takimi syntetycznymi łańcuchami oligonukleotydowymi o strukturze wybranego miRNA mogą być syntetyczne analogi miRNA (ang. *miRNA mimics*) - małe dwuniciowe cząsteczki RNA, których budowa przypomina dane miRNA i jest komplementarna do sekwencji odpowiedniego mRNA [98].

Odwrotną strategią przywracania prawidłowej równowagi miRNA - białko jest zastosowanie chemicznie modyfikowanych jednoniciowych łańcuchów oligonukleotydowych będących inhibitorami miRNA tzw. anty-miRNA inaczej antagomiRów. Strategia taka, stosowana jest w celu obniżenia poziomu odpowiedniego miRNA. Wyciszanie miRNA polega na ukierunkowanym, komplementarnym przyłączeniu się do miRNA przez antysensowny szkielet oligonukleotydowy (ASO, ang. *antisense oligonucleotide*) albo przez modyfikację łańcucha miRNA zablokowanymi kwasami nukleinowymi (LNA, ang. *locked nucleic acid*). Takie konstrukty zaopatrzone są w różne modyfikacje strukturalne w celu zapewnienia stabilności łańcucha i ochrony przed nukleazami [96]. Wśród takich modyfikacji, często spotykane są modyfikacje zwiększające temperaturę topnienia, przykładowo, modyfikacje reszty cukrowej. Do modyfikacji grupy cukrowej mogą być zaliczane te w jego pozycji 2' czyli 2'-O-metylowe

(2'-O-Me), 2'-O-metoksyetylowe (2'-MOE) i 2'-fluorowe (2'-F). Zwiększenie odporności na nukleazy zapewnia natomiast wprowadzenie mostka metylenowego i usztywnienie pierścienia rybozy w konformacji C3'-endo. Modyfikacje łańcucha gwarantują silne wiązanie się z miRNA na zasadzie komplementarności i hamowanie jego aktywności [99-101].

Istnieje wiele zewnątrzkomórkowych modyfikatorów małych cząsteczek, zdolnych do modulacji biogenezy i funkcji miRNA. Pierwszym z nich była enoksacyna. Enoksacyna należy do grupy fluorochinonów, i poza działaniem bakteriobójczym, jest jednym z małocząsteczkowych wzmacniaczy dojrzewania mikroRNA (SMER, ang. *small-molecule enhancer of microRNA*). Wykazano to poprzez eksperyment w którym użyto ludzkich embrionalnych komórek nerki (HEK293). Komórki te, były zakażone lentiwirusem zdolnym do ekspresji shRNA (ang. *short hairpin RNA*) oraz wykazywały ekspresję genu kodującego 293-EGFP (białko zielonej fluorescencji). ShRNA jest przetwarzany w siRNA, który podobnie jak miRNA, przyłącza mRNA, w tej sytuacji mRNA 293-EGFP. Poddanie komórek działaniu enoksacyny powodowało zmniejszenie fluorescencji, natomiast w przypadku próby w której nie powstawało shRNA, enoksacyna nie wpływała na intensywność fluorescencji. Żeby potwierdzić wszechstronną naturę enoksacyny na wzmacnianie interferencji RNA, użyto konstruktów z obecnością różnych shRNA, w których działanie tego SMER dawało podobne rezultaty. Stwierdzono więc, że enoksacyna wzmacnia mechanizm interferencji RNA. Zaangażowanie w promowanie biogenezy miRNA tej niezwyklej cząsteczki wynika z jej unikalnej budowy, która wpływa na wzrost poziomu miRNA na etapie wczesnej biogenezy. Zauważono, że aktywność enoksacyny zależy od TRBP (ang. *transactivation response element RNA-binding protein*) i wiąże się z poprawą powinowactwa TRBP do pre-miRNA [102, 103]. Eksperymenty przeprowadzone na komórkach nowotworu prostaty pokazały, że SMER mogą mieć zastosowanie terapeutyczne, ponieważ w przypadku komórek nowotworu prostaty enoksacyna wykazała hamujące działanie na progresję i potencjał inwazyjny komórek [104].

W opozycji do SMER stoją małocząsteczkowe inhibitory specyficznych miRNA (SMIR, ang. *small molecule inhibitor*). Pierwszym opisanym SMIR była pochodna diaminoheksahidropirymidyny, która mimo pokładanych nadziei obniżała syntezę wyłącznie miR-21 [105].

Kolejnym przykładem jest trypaflawina, która hamuje poziom ekspresji miRNA na poziomie przyłączania jej do AGO2. Zastosowanie tego modyfikatora na modelach nowotworowych zależnych od miRNA prowadziło do zmniejszenia wzrostu nowotworu. Obok trypaflawiny warto wspomnieć o poli-L-lizynie działającej na szlak biogenezy małych ncRNA na poziomie obróbki przez Dicer pre-miRNA/shRNA do miRNA/siRNA. Działanie obu związków może mieć zastosowanie terapeutyczne z uwagi na hamowanie działających onkogenicznie wielu miRNA w tym miR-21, miR-93 oraz miR-130b [106]. Wśród małych modyfikatorów miRNA są też związki łączące się z niedojrzałymi nićmi miRNA w ten sposób zapobiegające ich obróbce przez Drosha lub Dicer. W taki sposób działa streptomycyna, która blokuje powstawanie miR-21 na poziomie pre-miR-21 [107].

1.7. MiRNA markerami prognostycznymi, diagnostycznymi i celem terapeutycznym

Badania na zwierzętach dają nadzieję na zastosowanie miRNA jako alternatywę w klasycznym leczeniu nowotworów. Opracowanie małych molekuł modulujących miRNA w odpowiedni sposób, może stać się odpowiednią strategią terapeutyczną. MiRNA są zdolne do przeprogramowania komórek rakowych w stan pluripotencjalny przypominający embrionalne komórki macierzyste. Taki stan można indukować w dojrzałych typach komórek tkankowo specyficznych [89].

Ponieważ miRNA w komórkach kontrolują poziom onkogenów i genów supresorowych oraz modulują kluczowe procesy komórkowe definiujące fenotyp komórki, zmieniony poziom ekspresji miRNA odgrywa ważną rolę w nowotworzeniu. Niezwykły mechanizm regulacyjny tych cząsteczek sprawia, że są badane na szeroką skalę i dopatruje się w nich złotego środka zarówno w postaci leków jak i metod diagnostycznych dla wielu chorób. Strategie terapeutyczne oparte na miRNA zostały z powodzeniem zastosowane w modelach przedklinicznych, co dowodzi potencjału ukierunkowanych modyfikacji profili miRNA do leczenia chorób nowotworowych. Z drugiej strony występują liczne problemy związane z modulacją funkcji miRNA.

Pierwszy z nich, to identyfikacja cząsteczek, które mogłyby skutecznie hamować, lub naśladować dojrzałe miRNA. Drugim problemem jest skuteczne dostarczenie tych cząsteczek do docelowych miejsc w organizmie. Skuteczne dostarczanie miRNA wielokrotnie okazywało się być nieefektywne ze względu na możliwość degradacji łańcuchów miRNA po wprowadzeniu do organizmu. Ten problem został z czasem

rozwiązany dzięki zastosowaniu modyfikacji chemicznych przy końcach miRNA. Wyzwaniem nadal pozostaje dostarczanie miRNA tak, aby w odpowiednich komórkach znalazło się odpowiednie stężenie miRNA. Precyzyjne dostarczanie każdego leku do odpowiednich komórek danego narządu jest często czynnikiem limitującym podczas badań klinicznych, gdzie na kolejnych żmudnych etapach można natrafić na przeszkodę w postaci barier w obrębie organizmu ograniczających na wielu poziomach skuteczność terapii [108].

Zwiększone zainteresowanie tematyką ncRNA dostarcza coraz większej wiedzy na temat miRnomu i jego znaczenia w komórce. Odkrywanie zależności miRNA-inne cząsteczki uświadomiła, że regulacja przez miRNA poza tym, że charakteryzuje się ogromnym potencjałem jest niezwykle złożonym i delikatnym procesem, który raz zmodyfikowany może wpływając na szereg mechanizmów. Jedna cząsteczka miRNA może kierować całymi szlakami komórkowymi i przyłączać się do wielu mRNA i odwrotnie, jeden gen lub jeden szlak może być regulowany przez więcej niż jeden miRNA [99, 109, 110].

Organizmy wykazują również odpowiedź immunologiczną na ncRNA, regulowaną m. in. przez receptor TRL (ang. *Toll-like receptor*). Nie tylko indukcja odpowiedniego stężenia miRNA cząsteczkami dostarczonymi zewnątrznie prowadzi do włączenia mechanizmów obronnych organizmu, ale nawet endogenna RNAi. Ponieważ egzosomy są związane z komunikacją międzykomórkową, egzosomalne miRNA mogą przedostawać się parakrynowo między komórkami nerwiaka zarodkowego (NBL) i sąsiednimi monocytami. Wzrost poziomu egzosomalnego miR-21 komórek NBL prowadził do wzrostu stężenia miR-155 wynikającego, nie ze wzrostu jego ekspresji w komórkach nowotworowych, a z transferu egzosomalnego pobliskich makrofagów. MiR-155 jest inhibitorem TERF1 (ang. *telomeric repeat binding factor 1*), który wpływając na aktywność telomerazy, prowadzi do wzrostu lekooporności. Mechanizm wykryty w komórkach NBL nie jest odosobniony, ponieważ wzrost stężeń miR-21/miR-155 wykryto również w innych komórkach nowotworowych [111, 112].

Koncerny farmaceutyczne od lat przeznaczają olbrzymie środki na badania metod ingerujących w RNAi wierząc w jego potencjał i opracowując farmaceutyki na bazie miRNA lub siRNA w fazach przedklinicznych lub klinicznych. W 2020 roku zakończono fazę II badań klinicznych potencjalnego leku Remlarsen (MRG-201) naśladującego

aktywność miR-29, który jest zaangażowany w ekspresję kolagenu i białek biorących udział w tworzeniu bliznowców a potencjalnym zastosowaniem leku jest ograniczenie powstawania włóknistej tkanki bliznowatej [99, 108, 113]. Trzy farmaceutyki przeznaczone do leczenia schorzeń wątroby są na etapie fazy III badań klinicznych. Na akceptację fazy III czeka Nedosiran (DCR-PHXC) zaprojektowany głównie do leczenia choroby genetycznej - hiperoksalurii pierwotnej. Nedosiran hamuje wytwarzanie wątrobowego enzymu dehydrogenazy mleczanowej (LDH) zapobiegając kamicy nerkowej i przewlekłym chorobom nerek. W roku w 2019 w trzecią fazę badań wszedł Pelacarsen (TQJ230), który ma hamować powstawanie lipoproteiny(a) w rozwoju chorób sercowo naczyniowych i hiperlipoproteinemii. W 2020 Eplontersen (IONIS-TTR-LRx) rozpoczął fazę III badań klinicznych. Jest to farmaceutyk o przeznaczeniu zwalczania wszystkich rodzajów amyloidozy ogólnoustrojowej. W badaniach brali udział pacjenci z dziedziczną polineuropatią amyloidową, w której pośredniczy transtyretyna (białko przenoszące tyroksynę) [108].

Należy pamiętać, że stworzenie leku drobnocząsteczkowego jest wyzwaniem. Zwykle opracowanie kandydata na lek, który jest gotowy do badań klinicznych, zajmuje od 5 do 7 lat a mniej niż 10 % z testowanych związków kiedykolwiek trafi na rynek [114]. Dodatkowo należy mieć na uwadze sam mechanizm działania miRNA, który może być największą wadą jak i zaletą opracowywanych leków. Jedno miRNA może regulować powstawanie nawet setek białek. Zmiany powstające w ekspresji miRNA podczas nowotworzenia wpływają więc na szereg czynników. Egzogenna modulacja miRNA mogłaby więc prowadzić do przywrócenia równowagi szeregu czynników, które uległy zmianie. Z drugiej strony, mnogość zjawisk kontrolowanych przez interferencję RNA ulega wpływom z wielu stron. Nie tylko za pośrednictwem miRNA ale i innych ncRNA oraz licznych modulatorów epigenetycznych i systemów naprawczych. Należy też zaznaczyć, że sporadycznie bazy danych sugerują potencjalne cele miRNA, które nie były sprawdzone *in vitro*, co przekłada się na braki w usystematyzowanej wiedzy na temat odpowiedniego modulowania profili miRNA i zastosowania oligonukleotydowych terapeutyków w pożądanym sposób [115].

Jedno miRNA może kontrolować powstawanie wielu produktów białkowych ale w drugą stronę sytuacja ma się podobnie, gdyż jedno mRNA może być kontrolowane przez wiele miRNA. Daje to możliwość zastosowania różnych miRNA w celowanej terapii

dla przywracania poziomu odpowiednich białek, jednak taka operacja często niesie za sobą modyfikacje wielu innych czynników, nie zawsze nawet bezpośrednio związanych z obszarem badań [116, 117].

Mimo krótkiego czasu rozwoju wiedzy o RNAi oraz zaangażowanych w nią RNA powstały już leki dostępne na rynku i zatwierdzone przez EMA (ang. *European Medicines Agency*) i/lub (w zależności od terapeutyku) FDA (ang. *Food and Drug Administration*) celujące w regulację mRNA. Przykładami takich leków są zatwierdzone w 2012 przez EMA i 2013 przez FDA Mipomersen leczący homozygotyczną hipercholesterolemię rodzinną, lub zatwierdzone w 2020 przez EMA Inclisiran, którego zastosowaniem jest zalecane przy leczeniu miażdżycowej choroby sercowo-naczyniowej, hipercholesterolemii rodzinnej lub podwyższonego poziomu cholesterolu [108].

Naukowcy nie tylko doszukują się w miRNA środka w zwalczaniu wielu chorób. Z uwagi na specyficzność profili miRNA zależną od choroby, tkanki i typu komórki, zauważono, że miRNA mogą odgrywać istotną rolę w diagnostyce oraz określaniu obciążenia genetycznego wieloma jednostkami chorobowymi. Przewagą miRNA nad wieloma dotychczasowo stosowanymi środkami diagnostycznymi jest możliwość rozróżnienia na ich podstawie stadium rozwoju chorób w tym guzów łagodnych od złośliwych [118]. Izolacji miRNA można dokonać z próbek krwi, moczu czy śliny. Metody takie są bezpieczniejsze i znacznie mniej inwazyjne niż biopsja czy badania endoskopowe. Przykładowo po zbadaniu ponad 500 próbek moczu okazało się, że można z czułością >90 % rozróżnić raka pęcherza moczowego od łagodnej hematurii [119, 120]. Podczas jednego badania zidentyfikowano aż pięć potencjalnych paneli składających się z 27 miRNA do zastosowania w diagnozie raka trzustki [121] opracowywanie paneli biorących pod uwagę zmiany w wielu miRNA może w przyszłości zaowocować powstaniem zaawansowanych narzędzi diagnostycznych.

1.8. Nanomateriały: ksenobiotyki mogące wpływać na homeostazę komórkową i organizmalną

Nanomateriały to struktury, których długość nie przekracza 100 nm przynajmniej w jednym wymiarze. Wśród nanomateriałów wyróżniamy nanomateriały metaliczne i niemetaliczne. Nanomateriały pochodzenia naturalnego istnieją od początków formowania się Ziemi i są nieodłączną częścią środowiska życia organizmów. Nanocząstki

biorą udział w naturalnym obiegu materii w przyrodzie, będąc produktem erupcji wulkanów, burz piaskowych, pożarów lasów, rozkładu biomaterii czy reakcji fotochemicznych. Wiele nanocząstek wchodzi w skład aerozoli i niezależnie od pochodzenia, jest problemem ekologicznym i wpływa nie tylko na organizmy żywe ale i na skład i strukturę atmosfery ziemskiej [122]. Z uwagi na naturalne występowanie nanocząsteczek i ich wykorzystanie przez organizmy w komórkach wykształciły się systemy pobierania nanocząstek uwzględniające ich cechy fizyczne i chemiczne. Nanocząstki mogą wnikać do organizmu drogą pokarmową, przez inhalację, naskórek a po dostaniu się do krwioobiegu są transportowane wraz z krwią [123].

Oprócz nanomateriałów pochodzenia naturalnego mamy w środowisku również nanomateriały pochodzenia antropogenicznego. Mimo swoich małych rozmiarów ich uwalnianie do środowiska jest rzędu tysięcy megaton, przez co konieczne są prace nad ich wpływem na środowisko i żyjące w nim organizmy [124, 125]. Za najczęściej produkowane nanomateriały uważane są TiO_2 , SiO_2 , Fe, ZnO, Al_2O_3 , CeO_2 , Cu, Ag, nanorurki węglowe, grafeny, i kompozyty nanoglinki [125].

Nanocząstki srebra (AgNP) są to indywidua chemiczne intensywnie wykorzystywane w nauce i technologii ze względu na charakterystyczne właściwości fizykochemiczne i biologiczne, takie jak duży stosunek powierzchni do objętości, łatwość sprzęgania z ligandami, toksyczność wobec patogenów, oraz cytotoksyczność wobec komórek nowotworowych [126, 127]. Ich potencjał terapeutyczny zaowocował wykorzystaniem nanosrebra w produktach i urządzeniach medycznych, ale również w przemyśle np. w tkaninach oraz opakowaniach na żywność [128, 129].

Niebezpieczeństwo związane z nanocząstkami srebra wiąże się z ich możliwością wnikania do organizmu. Wnikają one do komórek na drodze pinocytozy lub endocytozy i mogą powodować zaburzenia w syntezie białek, upośledzenie w różnicowaniu komórek oraz uszkodzenia mitochondriów [130]. Badania przeprowadzone na komórkach ośrodkowego układu nerwowego wskazują na destrukcyjne działanie nanocząstek srebra na komórki wynikające ze zdolności do wpływania na białka błony komórkowej i aktywacji szlaków sygnałowych, co ostatecznie może prowadzić do powstawania reaktywnych form tlenu (RFT). Nanocząstki srebra powodują powstawanie w komórkach reaktywnych form tlenu, prowadzą do indukcji oksygenazy hemowej-1 i karbonylacji białek. Ponadto działanie nanocząstek srebra powiązано z zaburzeniem homeostazy

wapnia i tworzeniem reaktywnych form tlenu w pierwotnych komórkach nerwowych [131].

Nanocząstki srebra są jednymi z najpowszechniej występujących nanocząstek. Ich pozytywne aspekty takie jak właściwości przeciwdrobnoustrojowe i dezynfekujące sprawiły, że zaczęto opracowywać coraz więcej materiałów i substancji, zawierających AgNP. Nawet w obecnych czasach, kiedy świadomość dotycząca negatywnego wpływu nanocząstek srebra wzrasta, opracowywane są coraz nowsze sposoby ich wykorzystywania na dużą skalę. Zgromadzona wiedza dotycząca niepożądanych skutków stosowania nanomateriałów zainicjowała zmiany w systemach kontroli produkcji i wprowadzania ich do środowiska. Obecnie toksyczne działanie nanocząstek srebra jest powszechną wiedzą. Badania dowodzą, że nanocząstki srebra mają nawet 50 % silniejsze działanie toksyczne niż cząstki azbestu białego [132] wpływając, nawet w niewielkich stężeniach, na sygnalizację wewnątrz komórek. Przykładowo, w spermatogennych komórkach macierzystych przez interakcję z kinazą Fyn prowadząc do modulacji cyklu komórkowego i zmniejszając zdolność komórek do proliferacji [133]. Mimo takich doniesień i prób łagodzenia niepożądanych skutków wprowadzania nanocząstek do środowiska, nowe produkty bazujące na nanocząstach srebra cały czas powstają i pojawiają się w sklepach np. w postaci skarpetek czy dezodorantów z dodatkiem nanocząstek srebra [134].

Jak wcześniej wspomniano, zagrożeniem jak i zaletą wynikającymi ze stosowania nanocząstek jest ich wnikanie do wnętrza komórek eukariotycznych i wewnątrzkomórkowe działanie. Głównymi drogami wnikania nanocząstek są różne rodzaje endocytozy w tym fagocytoza i pinocytoza zależna od klatryny lub kaweoliny. Wyróżniany jest również transport parakomórkowy, przez przestrzenie międzykomórkowe nabłonka oraz transport za pośrednictwem receptorów. W uproszczeniu, najdrobniejsze nanocząstki mogą dostawać się do wnętrza komórki za pomocą dyfuzji a większe na drodze endocytozy. Nie da się w prosty i jednoznaczny sposób odpowiedzieć na pytanie "jak" ponieważ sposób wnikania jest zależny zarówno od właściwości fizycznych nanocząstki jak i od typu narażonej komórki, a nawet od środowiska zewnętrznego, przykładowo użytego medium [135]. Przykładem są badania wskazujące na znaczenie potencjału zeta, rozmiaru nanocząstek oraz rozmiaru ich powierzchni w sposobie transportowania nanocząstek. Rozwianie wszelkich niejasności

i braków w wiedzy związanych ze skomplikowanym charakterem wnikania nanocząstek jest niezwykle istotne, ponieważ nanocząstki mimo swoich wad mają olbrzymie znaczenie w medycynie a ich celowane dostarczenie do odpowiednich komórek jest kluczowe dla farmacji i medycyny [136].

Nanocząstki wykorzystywane w leczeniu muszą przekraczać bariery biologiczne. Wiele badań obecnie skupia się na uproszczeniu ich wnikania do komórek [137]. Wybór nośnika jest podyktowany wieloma czynnikami ograniczającymi takimi jak np. ładunek nanocząstki. Z uwagi na ujemne naładowanie błony komórkowej, cząsteczki niezaopatrzone w ładunek lub naładowane dodatnio mają dużo większą przenikalność od cząsteczek anionowych [138]. Przykładem mogą być dodatnio naładowane nanocząstki srebra mogące służyć do dostarczania leków przeciwnowotworowych dzięki możliwości pozostawania w krwioobiegu przez dłuższy czas niż ujemnie naładowane cząstki [139]. Innymi czynnikami limitującymi są kształt cząsteczek, ich właściwości powierzchniowe ale również wielkość obszarów dostarczania czy wielkość samej komórki. Najmniejsze naczynia krwionośne mają średnicę zaledwie 4 μm , a cząsteczka wielkości 1 μm może już doprowadzić do zatoru. Ponadto, komórka musi być wystarczająco duża aby pomieścić nośnik z wprowadzaną cząsteczką. Badania w zakresie poprawy właściwości nanocząstek jako wektorów transportujących substancje w organizmie przyczyniają się do opracowania leków o specyficznym i ukierunkowanym uwalnianiu. Dzięki temu można zminimalizować skutki uboczne farmaceutyku a zarazem zwiększyć selektywność jego działania. W idealnej sytuacji nie tylko istotnym wydaje się uwalnianie leku od nanocząsteczki wektorowej ale również eliminacja samego nanonośnika z organizmu [135].

Aby nakreślić drogę detoksykacji nanocząstek ze szczególnym uwzględnieniem nanocząstek srebra, należy zrozumieć przemiany jakim podlegają te nanocząstki w organizmie. W zależności od sposobu dostawiania się nanocząstek srebra do organizmu, mogą one ulegać różnym drogom detoksykacji. Na podstawie modelu zwierzęcego stwierdzono, że docelowymi miejscami biodystrybucji nanocząstek srebra jest układ jelitowy, wątroba i nerki, jednak srebro znaleziono również w płucach i mózgu [140]. Detoksykacja nanocząstek srebra silnie zależy od metody jaką wniknęły do organizmu. Jednocześnie, niezależnie od drogi podania w warunkach *in vivo*, nanocząstki srebra mają tendencje do odkładania się w śledzionie i wątrobie. W laboratoryjnych

modelach przewodzenia pokarmowego nanocząstki podczas przemieszczania się ulegają rozpuszczeniu w żołądku. [141] W soku jelitowym wykrywa się agregaty srebra, ale w badaniach soku jelitowego nie wykrywa się charakterystycznego dla nanocząstek srebra sygnału powierzchniowego rezonansu plazmonowego, wobec czego w soku jelitowym prawdopodobnie znajdują się wytrącone sole srebra, głównie chlorek srebra. Wysoka zawartość białek hamuje rozpuszczanie nanocząstek srebra w żołądku [142]. Forma w jakiej nanocząstki srebra przedostają się przez barierę jelito-krew nie jest dokładnie znana. W warunkach *in vivo* przy podaniu nanocząstek i soli srebra szczerom *per os* większa część srebra jest wykrywana w kale i mniejsza w narządach [143]. Szacuje się, że od 1 do 5 % srebra przyjętego *per os* w postaci nanocząstek srebra dostaje się do krwioobrotu [144], a lokalizacja nanocząstek wielkości 20 - 30 nm została potwierdzona w wątrobie, śledzionie, żołądku, płucach i jelicie. Jednocześnie brak jest informacji na temat dokładnego składu i formy tych cząstek. W odróżnieniu do szybkiego wydalania większości nanocząstek srebra podanych *per os*, bezpośrednie iniekcje z nanocząstkami srebra pozostawiają je w układzie krwionośnym do 5 dni, dopiero po tym czasie ich stężenie powoli spada [145].

1.9. Stres oksydacyjny jako czynnik sygnałowy

Stres oksydacyjny to zaburzenie w homeostazie redoks powodowane dysproporcją między produkcją i dostarczaniem do komórki, lub w szerszym ujęciu, do tkanki/organizmu reaktywnych form tlenu, a ich usuwaniem z użyciem mechanizmów ochrony antyoksydacyjnej. Same RFT są cząsteczkami o stosunkowo krótkim czasie półtrwania, $T_{1/2}$ dla RFT wynosi od nanosekund do maksymalnie kilku godzin.

Tlen cząsteczkowy jest nisko reaktywny mimo dwóch niesparowanych elektronów w swojej strukturze - każdy z nich jest na innym orbitalu, a ich spiny są równoległe. Kolejne, jednoelektronowe redukcje tlenu cząsteczkowego powodują powstawanie reaktywnych form tlenu, czyli związków tlenu o wyższej reaktywności od tlenu cząsteczkowego. Trzema pierwotnymi RFT są anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), nadtlenek wodoru (H_2O_2) i rodnik hydroksylowy (HO^{\cdot}). Rodniki tlenowe takie jak $O_2^{\cdot-}$ i HO^{\cdot} mogą reagować ze związkami organicznymi z wytworzeniem form pośrednich, które mogą powodować powstawanie innych rodników tlenowych. W reakcji oderwania atomu wodoru przez rodnik hydroksylowy w wiązaniu węgiel-wodór prowadzi do

powstania rodnika węglowego, który będzie gwałtownie reagował z tlenem cząsteczkowym skutkując powstaniem rodnika peroksylogo [146]. Sam rodnik peroksylogo może reagować z kolejnym substratem dając kolejny rodnik węglowy i wodoronadtlenek. Wodoronadtlenki mogą ulec rozkładowi do rodników alkoksylogowych w reakcji katalizowanej przez kationy metali takich jak żelazo lub miedź, będące składnikami grup hemowych białek [147]. Powyższe reaktywne formy tlenu można nazwać wtórnymi ponieważ nie pochodzą z bezpośredniej redukcji tlenu cząsteczkowego. Jednocześnie ich reaktywność i właściwości są zbliżone do pierwotnych reaktywnych form tlenu. RFT takie jak nadttlenek wodoru i wodoronadtlenki charakteryzują się dłuższym czasem półtrwania i mniejszą reaktywnością niż RFT rodnikowe. Jednocześnie mogą generować rodniki tlenowe na drodze reakcji Fentona i reakcji Habera Weissa [148].

W związku z opisanym powyżej łańcuchowym charakterem reakcji wolnorodnikowych wywołanych reaktywnymi formami tlenu, ich nagromadzenie i powstanie stresu oksydacyjnego prowadzi to uszkodzeń oksydacyjnych cząsteczek w komórkach, co na poziomie organizmálním prowadzi do szeregu zmian patologicznych, między innymi do miażdżycy, nowotworów i chorób neurodegeneracyjnych [149].

RFT powstają głównie w biochemicznych reakcjach zachodzących w mitochondriach, peroksysomach i chloroplastach. W komórkach ssaków w największej ilości powstają wskutek reakcji enzymatycznych błonowej NADPH oksydazy (oksydaza fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego), enzymów zaangażowanych w oddychanie tlenowe w szlaku mitochondrialnego łańcucha oddechowego i w mniejszym stopniu w innych organellach, w reakcjach katalizowanych przez oksydazę ksantynową, lipooksygenazę, cyklooksygenazę, cytochrom P450 i inne [150].

Oksydaza NADPH katalizuje jednoelektronową redukcję tlenu cząsteczkowego, w wyniku której powstaje anionorodnik ponadtlenkowy [150], który jest uwalniany do przestrzeni międzykomórkowej w przypadku komórek fagocytujących, lub do wewnątrz dla komórek niefagocytujących. W mitochondriach RFT są wytwarzane jako produkt uboczny syntezy ATP (adenozynotryfosforan). W optymalnych warunkach ostatecznym akceptorem elektronów przekazywanych w łańcuchu oddechowym jest tlen cząsteczkowy. Jednak niewielka część elektronów w sposób mniej specyficzny wydostaje

się poza składniki łańcucha oddechowego w kompleksie I i III tworząc anionorodnik ponadtlenkowy. Z uwagi na wysoką aktywność tego szlaku metabolicznego w komórkach pozyskujących energię na drodze oddychania tlenowego wyciek elektronów w łańcuchu oddechowym jest głównym źródłem reaktywnych form tlenu w komórkach ssaków, nie licząc fizjologicznej roli oksydazy NADPH w komórkach fagocytujących [151].

Oprócz endogennych źródeł reaktywnych form tlenu, formowanie RFT jest również wywołane zjawiskami zewnętrznymi. Promieniowanie jonizujące powoduje powstawanie RFT głównie na drodze radiolizy wody i reakcji następczych [152]. Chemioterapia bardzo często opiera się na wytwarzaniu RFT jako głównego czynnika indukującego toksyczność, co uwidacznia się podczas terapii zwiększoną peroksydacją lipidów oraz spadkiem poziomu komórkowych antyoksydantów, takich jak zredukowany glutation.

Organizmy wielokomórkowe polegają na sieci przekaźnictwa sygnałów wewnątrz i zewnątrz komórkowych, aby przeprowadzać procesy fizjologiczne na poziomie organizmalnym. Sygnały zewnątrzkomórkowe są przekazywane przez czynniki wzrostu, cytokiny, neurotransmitery i hormony, które są wiązane przez specyficzne receptory powierzchniowego na błonach komórkowych. Te interakcje indukują z kolei sygnały wewnątrzkomórkowe, których nośnikami są wtórne cząsteczki sygnałowe takie jak jony wapnia i cAMP (cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan). Końcowym etapem wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnałów jest aktywacja czynników transkrypcyjnych prowadząca to zmiany w ekspresji genów.

Reaktywne formy tlenu oprócz tego, że są czynnikiem bezpośrednio toksycznym, jako uboczny produkt metabolizmu komórkowego, są również cząstkami sygnałowymi biorącymi udział w wielu szlakach przekaźnictwa sygnałowego zarówno w komórkach prokariotycznych jak i eukariotycznych [153]. Pochodzenie i lokalizacja oraz stężenie reaktywnej formy tlenu jest determinujące w odniesieniu do jej funkcji. Bezpośrednim wpływem na szlaki sygnałowe aktywowane przez RFT jest ich zdolność do modyfikowania reszt aminokwasowych białek oraz do wchodzenia w interakcję z metalami w białkach. Przykładem tego rodzaju oddziaływania jest utlenianie grup sulfhydrylowych do grup sulfenowych, sulfinowych, sulfonowych lub S-glutationylowych. Taka modyfikacja białka w krytycznych resztach cysteinowych będzie wpływała na aktywność enzymatyczną lub możliwość czynnika transkrypcyjnego

do wiązania z DNA [154]. Proces odwracalnej S-glutationylacji reguluje, dla przykładu, białkową fosfatazę tyrozynową 1B [155], i jest podstawą w regulacji redoks wiązania c-Jun do DNA [156].

Oprócz przekazywania sygnałów w formie modyfikacji białek reaktywne formy tlenu spełniają funkcje przekaźnicze i regulatorowe przez wpływ na wewnątrzkomórkowy status redoks. W warunkach fizjologicznych cytozol jest środowiskiem silnie redukującym, głównie dzięki tiolom, takim jak glutation i tioredoksyna. Relatywnie wysokie stężenia w cytozolu tych związków w formie zredukowanej są utrzymywane enzymatycznie z udziałem reduktaz, glutationowej i tioredoksynowej. Oprócz aktywności antyoksydacyjnej te związki są częścią siatki przekaźnictwa wewnątrzkomórkowego. Zarówno poziom całkowity glutationu [157] jak i stosunek formy utlenionej do zredukowanej są stanami propagującymi sygnał [158]. W jądrze komórkowym stosunek glutationu utlenionego do zredukowanego reguluje wiązanie czynnika transkrypcyjnego Sp-1 do DNA. W cytozolu, glutation promuje proliferację fibroblastów [159] i ogranicza proliferację komórek śródbłonna [160]. Sygnałowa funkcja tioredoksyny wynika z możliwości wiązania bezpośrednio z innymi białkami, dzięki dwóm redoks-aktywnym cysteinom. Sama tioredoksyna może przemieszczać się z cytozolu do jądra komórkowego, gdzie wiąże się z Ref-1 co promuje wiązanie kompleksu Jun-Fos do DNA [161]. Tioredoksyna wykazuje podobny efekt w stosunku do innych czynników transkrypcyjnych, takich jak NFKB i p54, PEBP2/CBF [162].

2. Cel pracy

Doświadczenia zostały przeprowadzone na komórkach drobnokomórkowego raka wątroby o dwóch odmiennych profilach metabolicznych. Sprawdzone wpływ nanocząstek srebra na komórki linii Hep G2, oraz ich wpływ na profil miRNA. Zaplanowane doświadczenia pozwoliły na określenie następujących celów pracy:

1. Ocena wpływu nanocząstek srebra na komórki o różnym fenotypie metabolicznym.
2. Ocena wpływu nanocząstek srebra na profil miRNA istotnych w powstawaniu i progresji nowotworów.
3. Ocena wpływu modulacji miRNA na fenotyp komórek poddanych toksycznemu działaniu nanocząstek srebra.

3. Materiały wykorzystywane w pracy

3.1. Linie komórkowe

Linia komórkowa Hep G2: ludzkie komórki raka wątrobowokomórkowego (ATCC, Manassas, VA, Stany Zjednoczone). Są to komórki adherentne, wykazujące morfologię nabłonka. Jest to linia komórkowa odpowiednia do transfekcji i badań toksykologicznych. Hep G2 posiada 1 poziom bezpieczeństwa biologicznego zgodnie z aktualnymi wskazaniami BMBL (ang. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*).

3.2. Materiały laboratoryjne, odczynniki chemiczne, zestawy komercyjne oraz samodzielnie przygotowywane roztwory

Wszystkie eksperymenty z wykorzystaniem roztworów wodnych, przeprowadzono przy użyciu wody filtrowanej Milli-Q wytwarzanej w układzie odwróconej osmozy (Merc Millipore, Massachusetts, Stany Zjednoczone). Odczynniki (sole, kwasy, alkohole) zakupiono w firmie POCH (Gliwice, Polska). Inne odczynniki, barwniki i sondy takie jak czerwień obojętna, fiolet krystaliczny, błękit trypanu, dihydrorodamina 123, CCCP, oligomycyna, CMXRos zakupiono w Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, Stany Zjednoczone) oraz Sigma Aldrich (Missouri, Stany Zjednoczone). Do oceny ilości fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego użyto zestawu NADP/NADPH-Glo™ (Promega Madison, WI, Stany Zjednoczone). Pomiaru stężenia ATP dokonano przy pomocy zestawu ATP Determination Kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Stany Zjednoczone). Hydrofilowe nanocząstki srebra o średnicy nominalnej 20 nm, zostały przygotowane na indywidualne zamówienie (PlasmaChem, Berlin, Niemcy).

W przypadku pracy z komórkami korzystano z naczyń i przyborów jednorazowych oraz sterylnych lub, w przypadku naczyń szklanych, sterylizowanych. Sterylizację przeprowadzono w autoklawie (Prestige Medical Classic 2100 Automatic Autoclave). W pracy użyto: sterylnych, polistyrenowych butelek o zmodyfikowanej powierzchni wspomagającej adhezję komórek EasY Nunclon 75 cm² i 25 cm² z korkami z filtrem (Thermo Fisher Scientific Massachusetts, Stany Zjednoczone), sterylnych, przezroczystych naczyń hodowlanych: 6-dołkowych, 96-dołkowych, 12-dołkowych oraz sterylnych, czarnych naczyń hodowlanych 96-dołkowych, również o zmodyfikowanej powierzchni adhezyjnej (Nunclon, Thermo Fisher Scientific Massachusetts, Stany

Zjednoczone), sterylnych pipet jednorazowych o pojemności 10 cm³, 25 cm³ i 50 cm³ Greiner Bio-One (Frickenhausen, Niemcy), probówek typu Falcon sterylnych, zakręcanych, o pojemności 15 cm³ i 50 cm³ (Corning, Nowy Jork, Stany Zjednoczone), sterylnych probówek jednorazowych o pojemności 1,5 cm³ i 2 cm³ (Eppendorf, Hamburg, Niemcy), sterylnych końcówek do pipet z filtrem (i bez filtra do doświadczeń, w których praca sterylna nie była konieczna) o pojemnościach 0,01 cm³, 0,02 cm³, 0,05 cm³, 0,2 cm³, 1 cm³ oraz 5 cm³ (Gilson, Ohio, Stany Zjednoczone). Do pomiarów z wykorzystaniem cytofluorometru przepływowego użyto probówek cytometrycznych (Becton Dickinson, New Jersey, Stany Zjednoczone). W celu identyfikacji i ilościowej analizy białek użyto żeli poliakrylamidowych Mini Protean GTX o gradiencie stężeń 4-20 % (Bio-Rad, Kalifornia, Stany Zjednoczone), membran do transferu Western Blot Trans-Turbo mini PVDF (Bio-Rad, Kalifornia Stany Zjednoczone). W celu wizualizacji białek na membranie PVDF użyto SuperSignal™ Western Blot Substrate Bundle (ThermoFisher Scientific Massachusetts, Stany Zjednoczone). W celu oceny potencjału migracyjnego komórek użyto naczyń hodowlanych 24-dołkowych Cellstar przeznaczonych do wkładów membranowych Greiner Bio-One (Frickenhausen, Niemcy), wkładów membranowych ThinCert™ na 24-dołkowe płytki Greiner Bio-One (Frickenhausen, Niemcy) oraz odczynnika Matrigel Recon Basement Membrane (Corning, Nowy Jork, Stany Zjednoczone).

Odczynniki przygotowywane samodzielnie które były wykorzystywane w pracy to: zbuforowany roztwór soli fizjologicznej (PBS) o następującym składzie: 0,137 mol/dm³ NaCl, 2,7 mmol/dm³ KCl, 10 mmol/dm³ Na₂HPO₄, 2 mmol/dm³ KH₂PO₄; TBS: 20 mmol/dm³ Tris, pH=7,5; 150 mmol/dm³, NaCl pH= 8,3; TBST: 99,9 % TBS [o/o]; 0,1 % [o/o] Tween20; bufor blokujący do membran PVDF o następującym składzie: 5 % BSA [w/o] w TBST; bufor do przeprowadzenia elektroforezy: 25·10⁻³ mol/dm³ Tris; 192·10⁻³ mol/dm³ glicyna; 0,1 % [w/o] SDS, pH=8,3; roztwór solubilizujący wykorzystywany w testach przeżywalności z czerwienią obojętną: 50 % [o/o] etanol, 1 % [o/o] kwas octowy i 49 % [o/o] woda destylowana.

3.3. Odczynniki i materiały wykorzystywane do przygotowanie lizatów białkowych do metody Western Blot

Komórki były hodowane w pożywkach firmy Gibco. Pożywki z niską zawartością glukozy ($5,5 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³) i z wysoką zawartością glukozy ($25 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³) (Dulbecco's modified eagle media Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Stany Zjednoczone kolejno nr. kat. 21885025 i 32430027), wzbogaconym 10 % surowicą bydlęcą (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) w inkubatorze Forma™ Steri-Cult™ CO₂ Incubator, 323L (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Stany Zjednoczone) w temperaturze 37°C, stężeniu CO₂: 5 % przy wilgotności względnej: 95 %.

W celu uwolnienia komórek od podłoża używano 0,25 % (o/o) roztworu trypsyny (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) z dodatkiem 1 mmol/dm³ EDTA (Warchem, Warszawa, Polska) w PBS. Do izolacji białek wykorzystano roztwór ekstrakcyjny M-PER (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Stany Zjednoczone). W celu zabezpieczenia białek przed proteolizą wykorzystano zestaw inhibitorów proteaz Halt Protease Inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Stany Zjednoczone). Do oceny stężenia białka użyto Pierce 660 nm Protein Assay Reagent (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Stany Zjednoczone). Jako odniesienia dla mas cząsteczkowych w metodzie Western Blot wykorzystano Precision Protein Dual Color (Bio-Rad, Kalifornia, Stany Zjednoczone). Do wykrycia białek wykorzystano przeciwciała dla CDKN1B, mTOR, NF1, CCNE1 (Biorbyt, Wielka Brytania) i jako kontroli gamma-tubuliny (Sigma Aldrich, Missouri, Stany Zjednoczone). Do detekcji białek związanych z przejściem epitelialno-mezenchymalnym użyto Epitelial-Mesenchymal Transition (EMT) Antibody Sampler Kit (Cell Signaling Technology, Massachusetts, Stany Zjednoczone).

3.4. Materiały z wykorzystaniem których przeprowadzono izolacje i analizę ilościową kwasów nukleinowych oraz modulowano poziom wybranych miRNA

W celu izolacji miRNA wykorzystano zestaw miRNEASY mini kit (Qiagen, Hilden, Niemcy). W celu uzyskania informacji dotyczącej ekspresji miRNA wykorzystano panel opracowany dla miRNA charakterystycznych przy nowotworach i chorobach wątroby (miScript miRNA PCR Arrays 331221/MIHS-116ZD-12, Qiagen, Hilden, Niemcy). Jako modulatory miRNA wykorzystano syntetyczne analogi miRNA (dla hsa-miR-29c-3p,

hsa-miR-100-5p, hsa-miR-107, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-221-3p) oraz dedykowaną dla nich kontrolę (Negative Control miRNA Mimic, Qiagen, Hilden, Niemcy).

3.5. Urządzenia za pomocą których przeprowadzono pozostałe eksperymenty

Wszystkie testy oparte na pomiarach spektrofotometrycznych, luminometrycznych i fluorymetrycznych wykonano przy pomocy czytnika mikroplitek EnVision 2104 Multilabel Reader (PerkinElmer, Stany Zjednoczone). Do pomiarów z wykorzystaniem technik cytometrii przepływowej użyto cytofluorymetru przepływowego FACS LSRII™ BD (Franklin Lakes, New Jersey, Stany Zjednoczone). Do ilościowych i jakościowych oznaczeń kwasów nukleinowych użyto spektrofotometru UV-Vis NanoDrop 2000c/2000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Stany Zjednoczone). Do ilościowych oznaczeń kwasów nukleinowych techniką PCR w czasie rzeczywistym użyto Termocyklera C1000 Touch Thermal Cycler (Biorad, Kalifornia, Stany Zjednoczone). Białka techniką Western Blot identyfikowano z użyciem systemu do elektroforezy i transferu białek Mini Protean II oraz TransBlot Turbo Transfer System (Biorad, Kalifornia, Stany Zjednoczone). Białka wykrywano w oparciu o metodę chemiluminescencyjną z wykorzystaniem Transiluminatora UV mini HD (Cambridge, Wielka Brytania). Obserwacje komórek w świetle białym przechodzącym oraz obserwacje i pomiary fluorymetryczne prowadzono za pomocą mikroskopu Nikon Eclipse Ti z odwróconą optyką.

Ponadto do rutynowych prac wykorzystywano: autoklaw Classic (Prestige Medical, Płock, Polska) w celu sterylizacji aparatury oraz roztworów; automatyczny licznik komórek Countess Automated Cell Counter firmy Thermo Fisher Scientific (Life Technologies™, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone); urządzenie do zliczania kolonii komórek – GELCOUNT Oxford Optronix (Oxford, Wielka Brytania); wagę laboratoryjną Mettler Toledo (Warszawa, Polska) o skali ważenia 0,5g- 820g oraz wyposażoną w osłonę przeciwwiatrową i bramkę o skali ważenia 10- 220 mg; wirówki – Centrifuge 5810 R Eppendorf (Hamburg, Niemcy) oraz 3-30K Sigma (Osterode am Harz, Niemcy), obie z wymiennymi rotorami; homogenizator Omni-Ruptor 4000 (Omni International Inc. Georgia, Stany Zjednoczone) do sonikacji nanocząstek srebra. Inkubacje w kontrolowanej temperaturze przeprowadzono w łaźni wodnej Julabo TW20

(Seelbach, Niemcy) oraz w suchym bloku grzejnym z możliwością mieszania zawartości probówki Thermomikser Comfort z wymiennymi blokami grzejnymi (Eppendorf, Hamburg, Niemcy).

4. Metody

4.1. Hodowla linii komórkowych

Hodowlę komórek linii Hep G2 (ATCC, Manassas, VA, Stany Zjednoczone) prowadzono w pożywkach o różnej zawartości glukozy: wyższej - $25 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³ oraz niższej - $5,5 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³, z suplementacją 10 % FBS w sterylnych, jednorazowych, naczyniach hodowlanych. Hodowla komórek była utrzymywana w inkubatorze w stałych warunkach 5 % zawartości CO₂ przy 37°C i 95 % wilgotności.

4.2. Przygotowanie nanocząstek srebra

Zawiesinę nanocząstek srebra przygotowywano w taki sam sposób w doświadczeniach przeprowadzonych z wykorzystaniem zwierząt oraz na liniach komórkowych. Zawiesinę nanocząstek przygotowywano każdorazowo tuż przed eksperymentem w celu zapewnienia jej homogenności.

W celu utworzenia zawiesiny, nanocząstki przed odważeniem ucierano w moździerzu agatowym i odważano 4 mg. Następnie, do probówki z nanocząstkami dodawano 1,6 cm³ wody MilliQ i zawartość probówki poddawano sonikacji (4.2 kJ/cm³) w ultradźwiękowym homogenizatorze. Po procesie sonikacji, do probówki dodano 20 mm³ stężonego dziesięciokrotnie PBS (Sigma, Darmstadt, Niemcy) oraz 20 mm³ albuminy, z wcześniej przygotowanego roztworu o stężeniu 2 mg/cm³ (Sigma, Darmstadt, Germany) aby końcowo otrzymać zawiesinę nanocząstek srebra o stężeniu 2 mg/cm³ w PBS zawierającą 0,1 mg/cm³ albuminy. W celu uniknięcia agregacji nanocząstek w zawieszynie, wykorzystano ją niezwłocznie po przygotowaniu.

4.3. Transfekcja syntetycznymi analogami miRNA

Do transfekcji komórek syntetycznymi analogami miRNA zastosowano produkt o nazwie HiPerfect Transfection Reagent. W zależności od eksperymentu w celu transfekcji wykorzystywano odpowiednią ilość pożywki bez FBS. Do pożywki dodawano

HiPerfect Transfection Reagent tak aby jego zawartość była równa 3 % (o/o) oraz syntetyczne analogi miRNA tak, aby stężenie każdego z nich wynosiło 30-nmol/dm³. Otrzymany roztwór inkubowano 10 minut, po czym dodawano do komórek po kropli przygotowanego roztworu. Końcowo, roztwór stanowił 16,7 % całkowitego medium w którym inkubowano komórki. We wszystkich eksperymentach z udziałem transfekowanych komórek, roztwór dodawano do komórek 12 godzin przed dodaniem nanocząstek srebra. W przypadku kontrolnych syntetycznych oligonukleotydów miRNA, używano korespondującego stężenia odczynnika transfekującego jak w próbach badanych. Stężenie syntetycznych analogów miRNA, po dodaniu do docelowej pożywki hodowlanej z komórkami wynosiło 5 nmol/dm³ dla każdego z użytych analogów miRNA. Stężenie oligonukleotydów kontrolnych wynosiło końcowo 25 nmol/dm³.

Wyjątek, stanowił pomiar przeżywalności transfekowanych syntetycznymi analogami miRNA komórek Hep G2 poddanych działaniu nanocząstek srebra, w których pomiaru dokonano z użyciem komórek transfekowanych syntetycznymi analogami miRNA użytymi osobno. We wspomnianym przypadku, użyto 180 nmol/dm³ syntetycznych analogów miRNA, otrzymując końcowo w hodowli komórkowej 30 nmol/dm³.

W przypadku pomiarów w których wykorzystywano komórki transfekowane syntetycznymi analogami miRNA, wszystkie próby badane były poddane transfekcji, co oznacza, że w przypadku komórek w których nie wykorzystywano syntetycznych analogów wybranych miRNA, komórki transfekowano syntetycznymi oligonukleotydami kontrolnymi.

4.4. Ocena toksycznego działania nanocząstek srebra

4.4.1. Metoda z wykorzystaniem czerwieni obojętnej

Przeżywalność komórek Hep G2 oceniono na podstawie testu akumulacji czerwieni obojętnej. Zasada działania tej metody oceny toksyczności polega na tym, że czerwień wnika do cytoplazmy komórek żywych, gromadząc się w lizosomach a po ekstrakcji barwi roztwór ekstrakcyjny na czerwony kolor [163].

Czerwień obojętną rozpuszczono w PBS uzyskując roztwór o stężeniu 5 mg/cm³. Następnie mieszano roztwór z medium hodowlanym, które końcowo zawierało czerwień obojętną o stężeniu 50 µg/cm³.

4.4.1.1. Ocena toksycznego działania nanocząstek srebra na komórki Hep G2 hodowane w pożywkach o różnym stężeniu glukozy

Oznaczenie przeżywalności komórek Hep G2 pod wpływem nanocząstek srebra przeprowadzono z wykorzystaniem przezroczystych, 96-dołkowych naczyń hodowlanych. Komórki hodowane w pożywce o zawartości glukozy 5,5 mmol/dm³ oraz 25 mmol/dm³ wysiano w ilości 10⁴ komórek na dołek. Po 24 godzinach, dodano do nich zawiesinę nanocząstek srebra w szeregu rozcieńczeń od 0,4 do 100 µg/cm³ i pozostawiono komórki na kolejną dobę. Po inkubacji usuwano medium kondycjonowane i przepłukiwano monowarstwę komórek roztworem PBS. PBS usuwano, a na jego miejsce dodano medium hodowlane z roztworem czerwieni obojętnej w objętości 0,2 cm³ na cztery godziny, po których ponownie przepłukiwano komórki. Inkubację z barwnikiem prowadzono w standardowych warunkach hodowli. W celu uwolnienia wchłoniętej przez lizosomy czerwieni, do dołków dodano po 0,15 cm³ roztworu solubilizującego (1 % [o/o] kwas octowy, 50 % [o/o] etanol). Po dodaniu roztworu płytkę wytrząsano przez 15 minut w temperaturze pokojowej a następnie wykonywano pomiar absorbancji czerwieni obojętnej przy długości fali 540 nm.

4.4.1.2. Ocena modulacji toksycznego działania nanocząstek srebra na komórki Hep G2 transfekowane syntetycznymi analogami miRNA

Doświadczenie przeprowadzono jak w rozdziale 4.4.1.1 z tym, że komórki poddawano transfekcji syntetycznymi analogami miRNA miR-29c-3p, miR-100-5p, miR-107, miR-195-5p, miR-221-3p. Wpływ każdego z wybranych syntetycznych analogów miRNA zbadano osobno. Transfekcję syntetycznymi analogami miRNA opisano w rozdziale 4.3. Jediną modyfikacją opisaną transfekcji było stężenie końcowe wybranych analogów miRNA, które każdorazowo wynosiło 30 nmol/dm³. Transfekcję przeprowadzono dwanaście godzin, po wysianiu komórek na naczynia hodowlane. Po kolejnych dwunastu godzinach, do naczynia dodawano nanocząstek srebra i komórki poddawano wszystkim zabiegom wymienionym w rozdziale 4.4.1.1.

4.4.1.3. Ocena modulacji toksycznego działania nanocząstek srebra na komórki Hep G2 transfekowane wieloma syntetycznymi analogami miRNA

Doświadczenie przeprowadzono jak w rozdziale 4.4.1.1 z tym, że komórki poddawano transfekcji syntetycznymi analogami miRNA, jak opisano w rozdziale 4.3., dwanaście godzin po wysianiu komórek na naczynia hodowlane. Po kolejnych dwunastu godzinach, do naczynia dodawano nanocząstek srebra i komórki poddawano wszystkim zabiegom wymienionym w rozdziale 4.4.1.1.

4.4.2. Ocena żywotności komórek z wykorzystaniem błękitu trypanu

Zasada metody oceny przeżywalności z wykorzystaniem błękitu trypanu polega na wnikaniu błękitu do cytoplazmy komórek martwych, pozbawionych ujemnego potencjału błonowego, barwiąc je na niebieski kolor [164].

Błękit trypanu w stężeniu 0,4 % (w/o) dodano do sterylnej probówki jednorazowej o pojemności 1,5 cm³ w objętości 0,02 cm³. Następnie, dodawano zawiesinę komórek każdorazowo przed wysianiem komórek do eksperymentu, w objętości w stosunku 1:1. Zawiesinę komórek wraz z błękitem trypanu mieszano pipetą automatyczną a następnie przenoszono do komory do zliczania komórek w automatycznym liczniku komórek. Pomiary przeprowadzono w celu oznaczenia ilości i żywotności komórek, jako rutynową metodę oceny żywotności komórek wykorzystanych do eksperymentów.

4.5. Ocena potencjału proliferacyjnego komórek Hep G2 poddanych działaniu nanocząstek srebra

Potencjał proliferacyjny oceniono za pomocą metody absorpcyjometrycznej z wychwytem czerwieni obojętnej. Komórki wysiano na naczynia hodowlane 96-dołkowe przezroczyste. Komórki wysiano w ilości od $3,125 \cdot 10^3$ do $50 \cdot 10^3$ komórek na dołek. Po 24 godzinach od wysiania komórek dodano nanocząstki srebra w stężeniach: $3,125 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, $6,25 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ oraz $12,5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, z uwzględnieniem właściwej kontroli. Pomiar przygotowanych w ten sposób komórek przeprowadzono na czytniku mikroplątek niezwłocznie po dodaniu srebra oraz po 24, 48 i 72 godzinach od zainicjowania eksperymentu. Warunki, w których uzyskano rozwór końcowy, gotowy do

odczytu w czytniku mikroplitek opisano w rozdziale 3.3.1.1. Komórki barwione metodą wychwytu czerwieni obojętnej analizowano przy długości fali 540 nm.

4.6. Ocena potencjału komórek Hep G2 do tworzenia kolonii

4.6.1. Ocena potencjału transfekowanych analogami miRNA komórek Hep G2 hodowanych w pożywce różniące się stężeniem glukozy, do tworzenia kolonii

Komórki hodowane w pożywkach o różniącym się stężeniu glukozy (5,5 mmol/dm³ oraz 25 mmol/dm³) wysiano na płytki 24-dołkowe w gęstości 2·10⁵ komórek na dołek w objętości 0,5 cm³ medium hodowlanego. Po 72 h od wysiania, do komórek dodano nanocząstki srebra w stężeniach: 12,5 i 25 µg/cm³. Transfekcje syntetycznymi oligonukleotydami miRNA, wykonano dwanaście godzin przed dodaniem nanocząstek srebra. Komórki inkubowano z nanocząstkami srebra przez kolejną dobę, po czym usuwano medium kondycjonowane, a komórki uwalniano od podłoża za pomocą 0,1 cm³ roztworu 0,25 % trypsyny. Inkubację z trypsyną prowadzono pięć minut, po czym naczynia dopełniono medium hodowlanym do 0,5 cm³. Zawiesinę komórek wymieszano i policzono metodą wykorzystującą błękit trypanu w automatycznym liczniku komórek. Następnie komórki przenoszono do probówek i wirowano 3·10² g przez 10 minut, po czym usuwano supernatant, a do komórek ponownie dodano medium. Zawiesinę komórek mieszano i inicjowano hodowlę komórek w ilości 12,5·10³ na dołek w 6-dołkowych przezroczystych naczyniach hodowlanych w medium o objętości 3 cm³.

Hodowlę kontynuowano przez kolejne cztery doby. Przez cały czas trwania eksperymentu medium kondycjonowane wymieniano na świeże co 24 godziny. Po okresie obserwacji wzrostu kolonii, przepłukiwano je dwukrotnie 1 cm³ PBS po czym dodawano po 1 cm³ mieszanki kwas octowy- metanol przygotowanej w stosunku 1:7 (o/o). Proces utrwalania prowadzono przez pięć minut. Po tym czasie roztwór usuwano z dołków a na jego miejsce dodano 1 cm³ przesączonego 0,2 % (w/o) fioletu krystalicznego. Barwienie kolonii prowadzono przez 30 minut, a następnie przepłukano dwukrotnie 1 cm³ PBS. Płytkę pozostawiono do wyschnięcia a następnie kolonie zliczono z użyciem urządzenia do zliczania kolonii.

4.6.2. Absorbcyjometryczna ocena wpływu nanocząstek srebra na potencjał komórek Hep G2 hodowanych w pożywkach o różnym stężeniu glukozy do tworzenia kolonii

Komórki hodowane w pożywkach o różniącym się stężeniu glukozy (5,5 mmol/dm³ oraz 25 mmol/dm³) wysiano na płytki 24- dołkowe w ilości 2·10⁵ komórek na dołek, w objętości 0,5 cm³ medium hodowlanego. Po 72 h od wysiania, do komórek dodano nanocząstek srebra w stężeniach: 12,5 i 25 µg/cm³. Komórki inkubowano z nanocząstkami srebra przez kolejną dobę, po czym usuwano medium kondycjonowane, a komórki uwalniano od podłoża za pomocą 0,1 cm³ 0,25 % trypsyny. Inkubację z trypsyną prowadzono pięć minut, po czym naczynia dopełniono medium hodowlanym do 0,5 cm³. Zawiesinę komórek wymieszano i policzono metodą wykorzystującą błękit trypanu w automatycznym liczniku komórek. Następnie komórki przenoszono do probówek i wirowano 3·10² g przez 10 minut, po czym usuwano supernatant, a do komórek ponownie dodano medium. Zawiesinę komórek mieszano i inicjowano hodowlę komórek w ilości 12,5·10³ na dołek w 6-dołkowych przezroczystych naczyniach hodowlanych w medium o objętości 3 cm³.

Hodowlę kontynuowano przez kolejne cztery doby. Przez cały czas trwania eksperymentu medium kondycjonowane wymieniano na świeże co 24 godziny. Po okresie obserwacji wzrostu kolonii, przepłukiwano je dwukrotnie 1 cm³ PBS po czym dodawano po 1 cm³ mieszaniny kwas octowy- metanol przygotowanej w stosunku 1:7. Proces utrwalaania prowadzono przez pięć minut. Po tym czasie roztwór usuwano z dołków a na jego miejsce dodano 1 cm³ przesączonego 0,2 % (w/o) fioletu krystalicznego. Barwienie kolonii prowadzono przez 30 minut czym przepłukano dwukrotnie 1 cm³ PBS. Płytkę pozostawiono do wyschnięcia a następnie kolonie rozpuszczono w 0,2 cm³ 33 % (o/o) kwasu octowego.

Do przezroczystej płytki 96-dołkowej przeniesiono po 0,15 cm³ rozpuszczonych w kwasie octowym komórek a następnie dokonano pomiaru absorbcji na czytniku mikroplitek przy długości fali 590 nm.

4.7. Badanie potencjału inwazyjnego komórek Hep G2

4.7.1. Ocena wpływu nanocząstek srebra na potencjał inwazyjny komórek Hep G2 hodowanych w pożywkach o różnym stężeniu glukozy

Eksperyment prowadzono według procedury rekomendowanej przez firmę, od której pozyskano model macierzy błony podstawnej Matrigel (Corning), z drobnymi modyfikacjami wprowadzonymi w związku z rekomendacjami firmy od której pozyskano wkłady membranowe (Greiner). Doświadczenie rozpoczęto od wysiania komórek Hep G2, hodowanych w pożywce o różnym stężeniu glukozy (5,5 mmol/dm³ oraz 25 mmol/dm³), na 6-dołkowe płytki w ilości 0,5·10⁶ komórek w 3 cm³ pożywki i inkubowano przez 24 godziny. Następnie do komórek dodano nanocząstki srebra w stężeniach: 6,25, 12,5 i 25 µg/cm³. Transfekcje syntetycznymi analogami miRNA, wykonano dwanaście godzin przed dodaniem nanocząstek srebra.

Po 16 godzinach od dodania nanocząstek przygotowano przezroczystą płytkę hodowlaną 24-dołkową i umieszczono w jej dołkach wkłady membranowe. Zgodnie z zaleceniami producenta, do wkładów membranowych dodano po 0,06 cm³ świeżo przygotowanego odczynnika Matrigel o stężeniu 0,5 mg/cm³ w buforze Tris-HCl z dodatkiem NaCl pH=8,0 (gdzie Tris 0,1mol/dm³ i 0,7 % (w/o) NaCl). Pod wkłady membranowe dodano 0,6 cm³ medium hodowlanego z 20 % (o/o) zawartością surowicy. W tym samym czasie usuwano medium kondycjonowane z płytek 6-dołkowych z komórkami, a komórki umieszczono w świeżym medium pozbawionym surowicy.

Po ośmiu godzinach od przygotowania płytek 24-dołkowych, czyli 24 godzinach od dodania nanocząstek srebra do komórek, usuwano medium kondycjonowane z naczyń hodowlanych, a komórki uwalniano od podłoża za pomocą 0,2 cm³ 0,25 % trypsyny. Inkubację z trypsyną prowadzono pięć minut, po czym naczynia dopełniono medium hodowlanym bez dodatku surowicy do 1 cm³, komórki mieszano i liczono metodą wykorzystującą błękit trypanu za pomocą automatycznego licznika komórek.

Komórki przenoszono do probówek a następnie wirowano 3·10² g przez 10 minut w temperaturze pokojowej i usuwano supernatant. Do osadu komórek dodawano medium bez surowicy a zawiesinę komórek mieszano. Następnie z wkładów membranowych usuwano nadmiar Matrigelu i dodano do nich zawiesinę komórek tak,

aby uzyskać ilość końcową 10^5 komórek w $0,2 \text{ cm}^3$ medium hodowlanego bez dodatku surowicy.

Przygotowaną w ten sposób płytkę inkubowano w warunkach standardowej hodowli przez 24 godziny. Po tym czasie z wkładów membranowych usunięto medium, przepłukano je dwukrotnie PBS i przeniesiono do czystej płytki 24-dołkowej. Zarówno do wkładów membranowych jak i do dołków płytki dodano formaldehydu 4 % (w/o) doprowadzonego do $\text{pH}=7,1$. Płytkę pozostawiono na 24 godziny, po których ponownie przepłukano wkłady membranowe dwukrotnie w PBS i przeniesiono je do kolejnej czystej płytki 24-dołkowej. Zarówno do wkładów membranowych jak i do dołków płytki dodano wcześniej przygotowany i przesączony przez bibułę filtracyjną fiolet krystaliczny o stężeniu 0,2 % (w/o). Barwiące się komórki we wkładach membranowych inkubowano 30 minut w temperaturze pokojowej, po czym przepłukano je dwukrotnie PBS. Wkłady membranowe oczyszczono delikatnie jednorazowymi patyczkami higienicznymi i pozostawiono do wyschnięcia przez 24 godziny. Po tym czasie wybarwione, suche wkłady przeniesiono na szkiełko podstawowe i fotografowano pod mikroskopem. Wyniki w formie zdjęć zostały opracowane w programie ImageJ (<https://imagej.net/>).

4.7.2. Ocena wpływu syntetycznych analogów miRNA na potencjał inwazyjny komórek Hep G2 poddanych działaniu nanocząstek srebra

Do eksperymentu wybrano komórki hodowane w pożywce o stężeniu glukozy równym 25 mmol/dm^3 . Komórki przygotowano w sposób identyczny jak opisany w rozdziale 4.7., z tym że do komórek dodano syntetyczne analogi wybranych miRNA na dwanaście godzin przed dodaniem do komórek nanocząstek srebra.

4.8. Badanie potencjału migracyjnego komórek Hep G2

4.8.1. Test zarastania rasy przez komórki Hep G2 hodowanych w dwóch wariantach dostępności glukozy i poddanych działaniu nanocząstek srebra

Test zarastania rasy wykonano zgodnie z rekomendowaną w literaturze metodą [165]. Komórki Hep G2 hodowane w pożywce o różnym stężeniu glukozy wysiano na 6-dołkowych, przezroczystych naczyniach hodowlanych w ilości $0,5 \cdot 10^6$ komórek w 3 cm^3 odpowiedniej pożywki hodowlanej. Po dwóch dobach od wysiania komórek, do medium dodano zawiesinę nanocząstek srebra w stężeniach: 6,25, 12,5 i $25 \text{ } \mu\text{g/cm}^3$,

uwzględniając właściwą kontrolę. Rysę wykonano po trzech dobach od inicjacji hodowli komórek za pomocą sterylnej końcówki pipety automatycznej, o pojemności 2-20 cm³. W trakcie trwania doświadczenia, co 24 godziny medium kondycjonowane wymieniano na świeże. Proces zarastania rysy dokumentowano za pomocą zdjęć wykonanych pod mikroskopem niezwłocznie po wykonaniu rysy oraz po 24, 48 i 72 godzinach. Zdjęcia wykonano w powiększeniu 20-krotnym. Pola powierzchni rys oceniano za pomocą programu ImageJ.

4.8.2. Test zarastania rysy przez komórki Hep G2 transfekowane syntetycznymi analogami miRNA i poddane działaniu nanocząstek srebra

Do eksperymentu wybrano komórki hodowane w pożywce o stężeniu glukozy równym 25 mmol/dm³. Komórki przygotowano w sposób identyczny jak opisany w rozdziale 4.8b z tym, że do komórek dodano syntetyczne analogi wybranych miRNA na dwanaście godzin przed dodaniem do komórek nanocząstek srebra.

4.9. Analiza cyklu komórkowego

4.9.1. Analiza cyklu komórkowego komórek Hep G2 hodowanych w pożywkach o różnym stężeniu glukozy i poddanych działaniu nanocząstek srebra

W celu przeanalizowania rozkładu faz cyklu komórkowego zmodyfikowano metodę wykorzystującą jodek propidyny [166].

Komórki wysiano na 6-dołkowe naczynia hodowlane w ilości 0,5·10⁶ komórek na dołek. Do doświadczeń użyto komórek hodowanych w pożywkach różniących się stężeniem glukozy (5,5 mmol/dm³ i 25 mmol/dm³). W każdym dołku umieszczono komórki w 3 cm³ odpowiedniej pożywki hodowlanej. Po 24 godzinach do komórek dodano zawiesinę nanocząstek srebra w stężeniach: 6,25 µg/cm³, 12,5 µg/cm³ i 25 µg/cm³ uwzględniając właściwą kontrolę. Inkubacja z nanocząstkami trwała kolejną dobę, po której usunięto medium kondycjonowane i przepłukano monowarstwę komórek PBS.

Komórki uwolniono od podłoża z użyciem 0,15 cm³ 0,25 % trypsyny. Uzyskaną zawiesinę komórkową uzupełniono PBS do objętości 0,5 cm³. Następnie komórki przeniesiono do probówki i wirowano przy 3·10² g przez 10 minut. Po zwirowaniu komórek usunięto supernatant a komórki zawieszano w 0,1 cm³ PBS. Zawiesinę komórek

do dodano do 0,9 cm³ schłodzonego do -20°C alkoholu etylowego 70 % (o/o), szybko wstrzykując ją pod powierzchnię alkoholu na wytrząsarce typu vortex.

Przygotowane w ten sposób komórki przechowywano w -20°C przez jedną dobę. Następnego dnia próbówki wirowano 10⁴ g w temperaturze -4°C przez 10 minut. Po zwirowaniu komórek supernatant usunięto, a do osadu komórek dodano roztwór RNAzy o aktywności 50 ku/cm³ w PBS, w objętości 0,5 cm³. Trawienie enzymem prowadzono przez pół godziny. Na kolejne pół godziny do zawiesiny komórek dodano 0,5 cm³ jodku propidyny o stężeniu 150·10⁻⁶ mol/dm³ osiągając końcowo stężenie 75·10⁻⁶ mol/dm³.

Pomiar cyklu komórkowego wykonano z wykorzystaniem cytofluorymetru przepływowego LSRII BD. Uzyskane dane analizowano za pomocą programu FlowJo.

4.9.2. Analiza cyklu komórkowego komórek Hep G2 transfekowanych syntetycznymi analogami miRNA i poddanym działaniu nanocząstek srebra

Doświadczenie wykonano analogicznie jak w rozdziale 4.9a. Jedyną modyfikację stanowiła transfekcja komórek syntetycznymi analogami miRNA na dwanaście godzin przed dodaniem nanocząstek srebra. Wybrany wariantem komórek do doświadczenia były komórki hodowane w pożywce o stężeniu glukozy równym 25 mmol/dm³.

4.10. Apoptoza

Komórki wysiano na 6-dółkowe naczynia hodowlane w gęstości 0,5·10⁶ komórek w pożywce o objętości 3 cm³. Po 24 godzinach, do komórek dodano nanocząstki srebra i prowadzono inkubację przez kolejną dobę. Następnie usunięto z płytki medium kondycjonowane, a komórki przepłukano 3 cm³ PBS.

Komórki uwolniono od podłoża z użyciem 0,15 cm³ 0,25 % trypsyny. Uzyskaną zawiesinę komórkową uzupełniono PBS do objętości 0,5 cm³. Następnie komórki przeniesiono do próbówki i wirowano przy 3·10² g przez 10 minut. Po zwirowaniu komórek usunięto supernatant a komórki zawieszano w 1 cm³ pożywki hodowlanej. Do uzyskanej zawiesiny dodawano 10 µg/cm³ Hoechst 33342 oraz 50 µg/cm³ PI po czym prowadzono inkubację przez 30 minut w temperaturze 37°C w ciemności. Ilość komórek w odpowiednich fazach zliczano pod mikroskopem fluorescencyjnym.

4.11. Metody wykorzystane w celu analizy ilościowej białek z wykorzystaniem techniki Western Blot

4.11.1. Przygotowanie lizatów białkowych z hodowli komórkowych

Komórki hodowano na przezroczystych 6-dołkowych naczyniach hodowlanych w ilości $0,5 \cdot 10^6$ komórek na dołek. Po 24 godzinach, do komórek dodano zawiesinę nanocząstek srebra w stężeniach: 6,25, 12,5 oraz $25 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ z uwzględnieniem stosownej kontroli. W następnej dobie, usunięto medium kondycjonowane i przepłukano komórki PBS w objętości 2 cm^3 . Do komórek dodano roztworu M-PER w objętości $0,2 \text{ cm}^3$ wzbogaconego inhibitorami proteaz zgodnie z zaleceniami producenta. Zawiesinę białek mieszano przez pięć minut na wytrząsarce termicznej. Przygotowaną zawiesinę przeniesiono do probówek jednorazowych i wirowano przy $14 \cdot 10^3 \text{ g}$ przez 10 minut. Następnie, przeniesiono supernatant do nowych sterylnych probówek jednorazowych.

Zabezpieczone w ten sposób lizaty przechowywano w temperaturze -20°C przez maksymalnie miesiąc.

W przypadku doświadczeń w których wykorzystywano komórki transfekowane syntetycznymi analogami miRNA, przygotowanie lizatów białkowych odbywało się w identyczny sposób jak opisany powyżej, z tym że transfekcję syntetycznymi analogami miRNA wykonano dwanaście godzin przed dodaniem nanocząstek srebra.

4.11.2. Oznaczenie białka w lizatach komórkowych

Przygotowane próby wzorcowe, wraz z próbkami badanymi opisanymi powyżej, przenoszono na 96-dołkowe naczynie reakcyjne w objętości $10 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ w trzech powtórzeniach technicznych. Do próbek oraz szeregu rozcieńczeń dodano 150 cm^3 odczynnika Pierce 660. Płytkę wytrząsano przez pięć minut na wytrząsarce termicznej w temperaturze pokojowej a następnie wykonywano pomiar. Pomiar absorbancji wykonano za pomocą czytnika mikroplatek przy długości fali 660 nm.

Stężenie białka w lizatach było określane na podstawie krzywej kalibracyjnej przygotowanej równoległe z ocenianymi próbkami. Krzywa dla białek została przygotowana przez szereg rozcieńczeń roztworu albuminy bydlęcej (BSA) przygotowanej w roztworze M-PER z inhibitorami proteaz, a maksymalne stężenie

oznaczane z zachowaniem liniowego charakteru zależności stężenia do absorbancji wynosiło 5 mg/cm^3 .

4.11.3. Wykrywanie białek zaangażowanych w EMT oraz białek kontrolowanych przez wybrane miRNA metodą Western Blot

Poziom białek odpowiadających za EMT oraz białek kontrolowanych przez wybrane miRNA oznaczono za pomocą metody Western Blot. Transfer przeprowadzono na membranach PVDF z użyciem zestawu do szybkiego transferu firmy Biorad. Chemiluminescencyjnej detekcji białek dokonano z wykorzystaniem transiluminatora przy pomocy komercyjnego zestawu SuperSignal™ Western Blot Substrate Bundle.

W przypadku białek regulujących EMT użyto zestawu przeciwciał Epitelial-Mesenchymal Transition (EMT) Antibody Sampler Kit, natomiast w przypadku białek kontrolowanych przez odpowiednie miRNA użyto przeciwciał przeciwko: mTOR (kontrolowane przez miR-100-5p), CCNE1 (kontrolowane przez (miR-195-5p), CDKN1B (kontrolowane przez miR-221-3p, NF1 (kontrolowane przez miR-107) oraz CLDN1 (kontrolowane przez miR-21c-3p). Jako białko odniesienia, do eksperymentów wybrano gamma-tubulinę.

Przygotowane wcześniej lizaty białkowe umieszczono w temperaturze 0°C na 30 min. W czasie inkubacji, przygotowane zostały roztwory konieczne do przeprowadzenia oznaczenia Western Blot (TBST i SDS PAGE).

Próbki wirowano $14 \cdot 10^3 \text{ g}$ przez pięć minut i przenoszono do suchego bloku grzejnego rozgrzanego do temperatury 95°C , również na pięć minut celem denaturacji białek. Próbki przygotowano tak, aby końcowo w studzienkach żelu, po dodaniu 10^{-2} cm^3 buforu obciążającego, znajdowało się po 10^{-5} g białka całkowitego. Pozostawiono również studzienkę dla markera mas, którego dodano $3 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3$. Elektroforezę prowadzono przez pierwsze pięć minut przy napięciu 50 V, a przez resztę rozdziału elektroforetycznego przy 100 V. Po zakończonej elektroforezie, żele przeniesiono na membrany i przystąpiono do transferu, prowadzonego przez 7 min (2,5 A).

W następnym kroku, membrany PVDF przenoszono do pojemników zawierających 10 cm^3 TBST i umieszczano na mieszadle. Membrany płukano trzykrotnie 10 cm^3 TBST, każdorazowo po pięć minut. Następnie membrany blokowane były przez

godzinę roztworem TBST z dodatkiem 5 % BSA [w/o]. Po tym czasie, membrany nacinano sterylnym skalpelem, w zgodności z miejscami widocznymi dzięki markerom mas, tak aby zachować fragmenty zawierające pojedyncze białka. Fragmenty ponownie płukano trzykrotnie 10 cm³ TBST i rozdystrybuowano w osobne pojemniki.

W celu detekcji odpowiednich białek, membrany inkubowano z 5 cm³ TBST z 5 % zawartością BSA [w/o] oraz dodatkiem odpowiednich, dla każdego z białek, przeciwciał I-rzędowych dodanych w stosunku 1:1000 (o/o) do roztworu BSA. Inkubację z przeciwciałami I-rzędowymi prowadzono przez noc (dwanaście godzin). Membranę płukano trzykrotnie 10 cm³ TBST a następnie umieszczono na godzinę w 5 cm³ TBST z 5 % zawartością BSA [w/o] oraz dodatkiem przeciwciał II-rzędowych w stosunku 1:2000 (o/o). Nadmiar przeciwciał usunięto przez trzykrotne płukanie w TBST w którym pozostawiono membrany do wizualizacji.

W celu detekcji białek, membrany umieszczono w roztworze chemiluminescencyjnym na minutę, po czym przystąpiono do detekcji sygnału przy pomocy transiluminatora.

W celu detekcji białek, membrany umieszczono w roztworze do detekcji chemiluminescencyjnej na minutę. Sygnał wykrywano za pomocą transiluminatora z użyciem oprogramowania dedykowanego dla urządzenia.

Wybrane białko	Pochodzenie przeciwciała	Dystrybutor
I rządowe przeciwciała		
N-kadheryna	Królicze IgG	Cell Signaling
E-kadheryna	Królicze IgG	Cell Signaling
Beta-katenina	Królicze IgG	Cell Signaling
Klaudyna	Królicze IgG	Cell Signaling
ZO-1	Królicze IgG	Cell Signaling
Snail	Królicze IgG	Cell Signaling
TCF8/Zeb1	Królicze IgG	Cell Signaling

Gamma-tubulina	Królicze IgG	Sigma Aldrich
mTOR	Królicze IgG	Biorbyt
CCNE1	Królicze IgG	Biorbyt
CDKN1B	Królicze IgG	Biorbyt
NF1	Królicze IgG	Biorbyt
II rzędowe przeciwciało		
Przeciwciało przeciwko króliczemu IgG z HRP	Kozie	Cell Signaling

4.12. Ocena generacji reaktywnych form tlenu w komórkach Hep G2

4.12.1. Ocena ilości generowanych reaktywnych form tlenu z wykorzystaniem H₂DCFDA w komórkach Hep G2 hodowanych w pożywkach o różnym stężeniu glukozy, poddanych działaniu nanocząstek srebra

Doświadczenie wykonano na podstawie dostępnej w literaturze metodologii [167]. Komórki Hep G2 hodowane w dwóch wariantach dostępności glukozy (5,5 mmol/dm³ i 25 mmol/dm³) wysiano w butelkach hodowlanych o powierzchni 25 cm² w ilości 1,3·10⁶ komórek i inkubowano przez 24 godziny. Następnie do komórek dodano nanocząstki srebra w stężeniach: 6,25, 12,5 i 25 µg/cm³, z uwzględnieniem właściwej kontroli. Przygotowane w ten sposób komórki inkubowano dwanaście godzin. Medium kondycjonowane usuwano, a komórki uwolniono od podłoża z użyciem 0,5 cm³ 0,25 % trypsyny. Inkubację prowadzono przez pięć minut po czym do naczyń hodowlanych dodano 0,5 cm³ PBS i zawiesinę komórkową wymieszano. Następnie, komórki przenoszono do jałowych probówek jednorazowych. Zawiesinę wirowano przy 3·10² g przez 10 minut. Po wirowaniu usunięto supernatant i do komórek dodano 1 cm³ odpowiedniej pożywki hodowlanej. Komórki delikatnie wymieszano i dodano do nich sondę H₂DCFDA przygotowaną w DMSO. Stężenie końcowe sondy wynosiło 10⁻⁵ mol/dm³.

Pomiaru dokonano za pomocą cytofluorometru przepływowego w kanale FITC.

4.12.2. Ocena ilości generowanych reaktywnych form tlenu z wykorzystaniem H₂DCFDA w komórkach Hep G2 transfekowanych syntetycznymi analogami miRNA i poddanych działaniu nanocząstek srebra

Do eksperymentu wykorzystano komórki Hep G2 hodowane w pożywce zawierającej 25 mmol/dm³ glukozy. Doświadczenie przeprowadzono analogicznie do opisanego w rozdziale 4.12.1a. Zmianę, stanowiła transfekcja komórek przeprowadzona dwanaście godzin przed dodaniem do płytki nanocząstek srebra.

4.12.3. Pomiar reaktywnych form tlenu z użyciem sondy DHR123 w komórkach Hep G2 poddanych działaniu syntetycznych analogów miRNA i nanocząstek srebra

Komórki hodowane w pożywce o stężeniu glukozy równym 25 mmol/dm³ wysiano na 6-dołkowe naczynia hodowlane w ilości 0,5·10⁶ komórek w medium o objętości 3 cm³. Po dwunastu godzinach hodowli, przeprowadzano transfekcję syntetycznymi analogami miRNA, a po kolejnych dwunastu godzinach dodano nanocząstki srebra. Komórki inkubowano w obecności nanocząstek srebra przez 24 godziny, po czym medium kondycjonowane usuwano a komórki uwolniono od podłoża inkubując monowarstwę z 0,15 cm³ 0,25 % trypsyny. Do powstałej zawiesiny dodano medium hodowlane tak, aby uzyskać końcowo objętość 0,5 cm³. Następnie do komórek dodano sondę DHR123, tak aby zawiesina komórek końcowo zawierała 5 μmol/dm³ barwnika. Zawiesinę wymieszano, przeniesiono do probówek cytometrycznych i przeprowadzono 45-minutową inkubację w 37°C. Po tym czasie zmierzono poziom utlenienia sondy za pomocą cytometru przepływowego w kanale FITC.

4.12.4. Oznaczenie rodnikowych produktów peroksydacji lipidów za pomocą sondy BODIPY C11 w komórkach transfekowanych syntetycznymi analogami miRNA i poddanych działaniu nanocząstek srebra

Komórki wysiano na 6-dołkowe naczynia hodowlane w gęstości 0,5·10⁶ komórek w medium o objętości 3 cm³ pożywki hodowlanej o 25 mmol/dm³ zawartości glukozy. Po dwunastu godzinach hodowli, komórki transfekowano syntetycznymi analogami miRNA, a po kolejnych dwunastu godzinach dodano nanocząstki srebra. Komórki inkubowano w obecności nanocząstek srebra przez 24 godziny po czym usuwano medium kondycjonowane, a komórki uwolniono od podłoża inkubując monowarstwę

z 0,15 cm³ 0,25 % trypsyną. Do powstałej zawiesiny dodano medium hodowlane tak, aby uzyskać końcowo objętość 0,5 cm³. Następnie, powstałą zawiesinę komórek przenoszono do probówek cytometrycznych i dodawano sondę BODIPY 581/591 C11 uzyskując stężenie końcowe 1 μmol/dm³. Zawartość probówki wymieszano i inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37°C.

Pomiaru produktów peroksydacji lipidów dokonano za pomocą cytofluorymetru przepływowego w kanałach FITC i PE.

4.13. Ocena zawartości NADP i NADPH w komórkach Hep G2

4.13.1. Ocena zawartości NADP i NADPH w komórkach hodowanych w dwóch wariantach stężenia glukozy i poddanych działaniu nanocząstek srebra

Doświadczenie przeprowadzono zgodnie ze wskazaniami producenta zestawu NADP/NADPH-Glo™. Test oparty jest na zjawisku bioluminescencji i wykrywa utlenione i zredukowane formy fosforanów dinukleotydów nikotynoamidoadeninowych (odpowiednio NADP⁺ i NADPH). Reakcja polega na redukcji substratu reduktazy prolucyferyny w celu wytworzenia lucyferyny, która jest oznaczana ilościowo przy użyciu rekombinowanej lucyferazy Ultra-Glo™. W reakcji wytwarzany jest sygnał, proporcjonalny do ilości NADP⁺ i NADPH.

Komórki hodowane w dwóch stężeniach dostępności glukozy (5,5 mmol/dm³ oraz 25 mmol/dm³) wysiano na naczynie hodowlane 96-dołkowe dedykowane do pomiarów bioluminescencyjnych, w ilości 10⁴ w 0,1 cm³ medium. Po 24 godzinach do komórek dodano nanocząstki srebra zmieszane z pożywką hodowlaną tak aby końcowe stężenie w płytce z komórkami wynosiło: 6,25, 12,5 oraz 25 μg/cm³ a objętość w dołku wynosiła 0,15 cm³. Inkubację z nanocząstkami prowadzono przez jedną dobę. Następnie medium kondycjonowane wymieniono na świeże w objętości 0,1 cm³ i pozostawiono hodowlę na pięć minut w temperaturze pokojowej. Do dołków dodano świeżo przygotowanego NADP/NADPH-Glo™ Detection Reagent w stosunku 1:1 i wytrząsano na wytrząsarce termicznej przez pięć minut.

Pomiaru luminescencji NADP i NADPH dokonano za pomocą czytnika mikroplatek po 30 minutach od dodania odczynnika.

4.13.2. Ocena zawartości NADP i NADPH w komórkach transfekowanych syntetycznymi analogami miRNA i poddanych działaniu nanaocząstek srebra

Do doświadczenia wybrano komórki hodowane w pożywce hodowlanej o stężeniu 25 mmol/dm³. Eksperyment przeprowadzono w sposób wskazany w rozdziale 4.13a. Jediną różnicę stanowi transfekcja komórek, która została przeprowadzona dwanaście godzin przed dodaniem do komórek nanocząstek srebra.

4.14. Metody wykorzystane w celu analizy poziomów ekspresji paneli miRNA związanych z procesem nowotworzenia w wątrobie

4.14.1. Izolacja miRNA

Do izolacji miRNA z komórek Hep G2 użyto zestawu komercyjnego miRNEASY mini kit (Qiagen), procedurę izolacji prowadzono zgodnie z zaleceniami producenta.

Komórki hodowane w medium o różnym stężeniu glukozy (5,5 mmol/dm³ oraz 25 mmol/dm³) wysiano w butelkach hodowlanych o powierzchni 25 cm² w ilości 1,2·10⁶ komórek w 5 cm³ medium. Po 24 godzinach dodawano nanocząstek w stężeniu 25 µg/cm³ w obecności których inkubowano komórki przez kolejną dobę. Po tym czasie komórki uwalniano od podłoża przez dodanie 1 cm³ 0,25 % trypsyny na 5 minut. Aby zatrzymać proces trypsynizacji do komórek dodano 4 cm³ PBS po czym komórki wirowano 3·10² g przez 10 minut. Następnie supernatant usuwano a komórki zawieszano w 5 cm³ PBS. Wirowanie powtórzono w powyższych warunkach, i następnie usuwano supernatant i zawieszano komórki w 0,7 cm³ QIAzol Lysis Reagent. Przygotowany lizat przenoszono do nowej probówki jednorazowej i przechowywano w temperaturze -80°C przez tydzień.

Przygotowany według powyższej procedury materiał biologiczny inkubowano przez pięć minut w temperaturze pokojowej. Następnie dodawano 0,14 cm³ chloroformu i intensywnie mieszano, po czym inkubowano pięć minut w celu rozdzielenia faz. Następnie próbki wirowano przez 15 minut w temperaturze 4°C z prędkością 14·10³ g. Po wirowaniu, przenoszono górną fazę wodną do nowej probówki jednorazowej, do której dodawano również 0,5 cm³ etanolu 100 % (o/o), zawartość probówki intensywnie mieszano i niezwłocznie przenoszono do kolumn (załączonych w zestawie) umieszczonych w probówkach jednorazowych. Próbkę wirowano 8·10³ g w temperaturze 21°C przez 15 sekund. Przelany do probówki jednorazowej supernatant

usuwano. Czynność powtarzano do wykorzystania całości próbek w etanolu. Kolumny z zamkniętym RNA całkowitym wypłukano roztworem RWT w objętości 0,7 cm³ wirując kolumnę z roztworem w takich samych warunkach jak w kroku poprzednim. Następnie kolumnę płukano załączonym roztworem RWE w objętości 0,5 cm³ i postępowano jak w przypadku roztworu RWT. Do kolumny dodano jeszcze raz 0,5 cm³ buforu RWE i przeprowadzono wirowanie 8·10³ g w temperaturze 21°C, jednak tym razem przez dwie minuty aby osuszyć kolumnę z pozostałości etanolu.

Elucję RNA przeprowadzono po przeniesieniu kolumny do nowej próbówki jednorazowej. Na kolumnę dodano 0,03 cm³ wody wolnej od RNaz po czym wirowano kolumnę 8·10³ g w temperaturze 21°C przez 60 sekund. Jakość wyizolowanego RNA była oceniana za pomocą spektrofotometru NanoDrop.

4.14.2. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Synteza DNA została przeprowadzona z użyciem komercyjnie dostępnego zestawu miScript II RT Kit (Qiagen) zgodnie z instrukcjami dołączonymi do produktu. Jako matrycy użyto 20 ng RNA wyizolowanego z komórek linii Hep G2. Reakcję prowadzono w objętości 20 mm³ z użyciem Termocyklera C1000 Touch Thermal Cycler (Biorad). Reakcję przeprowadzono w dwóch etapach: 60 minut w 37 °C a następnie 5 minut w 95 °C. Reakcja syntezy cDNA była przeprowadzono niezwłocznie po izolacji RNA celem uniknięcia degradacji matrycy. cDNA przechowywano w -80 °C.

4.14.3. Oznaczanie ilości miRNA w materiale biologicznym metodą real-time PCR

Reakcja RT-PCR została przeprowadzona z użyciem paneli ze starterami przednimi miScript miRNA PCR Array MIHS-116ZD-12, miScript SYBR Green PCR Kit (zawierającego starter wsteczny) oraz QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix(Qiagen). Wstępne prace przeprowadzono zgodnie z instrukcjami do zestawów. Reakcje przeprowadzono z użyciem Termocyklera C1000 Touch Thermal Cycler (Biorad). Reakcję RT-PCR przeprowadzono w następujących krokach: 19 minut w 95 °C. Następnie 40 cykli w tym każdy: faza denaturacji 15 s w 94 °C, faza hybrydyzacji starterów 30 s w 55 °C, faza elongacji nici 30 s w 70 °C.

Wyniki opracowano za pomocą oprogramowania będącego częścią zestawu firmy Qiagen do przeprowadzenia q-PCR.

4.15. Pomiar potencjału błony mitochondrialnej w komórkach Hep G2 po transfekcji wybranymi syntetycznymi analogami miRNA oraz po inkubacji z nanocząstkami srebra

Komórki Hep G2 wysiano na płytkach 6-dołkowych w gęstości $0,5 \cdot 10^6$ komórek w 3 cm^3 pożywki hodowlanej. Po dwunastu godzinach komórki transfekowano wybranymi syntetycznymi analogami miRNA, po następnych 12 godzinach dodawano nanocząstki srebra na kolejne 24 godziny inkubacji. Komórki uwalniano od podłoża za pomocą $0,2 \text{ cm}^3$ 0,25 % trypsyny podczas pięciominutowej inkubacji. Następnie trypsynę inaktywowano przez dodanie $0,8 \text{ cm}^3$ pożywki hodowlanej i powstałą zawiesinę komórek wymieszano. Pobrano z niej $0,5 \text{ cm}^3$ i przeniesiono do próbki cytometrycznej. Roztwór sondy fluorescencyjnej (CMXRos) o stężeniu $30 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ przygotowano w pożywce hodowlanej i dodano do zawiesiny komórek $0,1 \text{ cm}^3$ w celu uzyskania stężenia końcowego $5 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Odczyty wykonano w kanale PE-Texas Red z użyciem cytometru przepływowego LSR II.

Do walidacji testu potencjału mitochondrialnego zastosowano CCCP w końcowym stężeniu $5 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ oraz oligomycynę w końcowym stężeniu $5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$.

4.16. Pomiar poziomu ATP w komórkach linii Hep G2 po transfekcji wybranymi syntetycznymi analogami miRNA oraz po inkubacji z nanocząstkami srebra

Komórki linii Hep G2 wysiewano na płytce 12-dołkowe ilości $5 \cdot 10^5$. Po dwunastu godzinach przeprowadzono transfekcję wybranymi syntetycznymi analogami miRNA. Po kolejnych 12 godzinach dodano nanocząstki srebra na 24 godziny inkubacji. Po tym czasie komórki uwolniono z powierzchni mechanicznie z użyciem skrobaczek w $0,15 \text{ cm}^3$ wody. Następnie próbki podgrzano do $99 \text{ }^\circ\text{C}$ przez 10 minut oraz zwirowano w $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 10 minut, 10^4 g . Oznaczenie wykonywano z użyciem supernatantu.

Poziom ATP zmierzono za pomocą komercyjnego zestawu ATP Determination Kit (Thermo Fisher Scientific) zgodnie z zaleceniami producenta. Odczyty luminescencji przeprowadzono za pomocą czytnika mikroplatek EnVision.

4.17. Ocena modulacji miRNA związanych z procesem nowotworzenia *in vivo*

Eksperyment został zatwierdzony przez III Lokalną Komisję Etyczną w Warszawie i przeprowadzony zgodnie z obowiązującymi przepisami prawa krajowego; nr. zgody:35/2014.

Doświadczenia przeprowadzono na samcach szczurów w czternastym tygodniu życia Fischer 344 (szczep: Fischer 344/DuCrI: otrzymany od Charles River, Sulzfeld, Niemcy) po dziesięciodniowej aklimatyzacji zwierząt. Podczas doświadczenia zwierzęta przebywały w indywidualnych klatkach z poliuretanu z zapewnieniem stałej temperatury 23°C, wilgotności względnej 60 % i 12-godzinnego cyklu światło - ciemność. Zwierzęta miały swobodny dostęp do świeżej wody i paszy (Sniff® Spezialitäten GmbH R/M-H Niemcy).

Po aklimatyzacji szczury (n=56) podzielono na 4 grupy Ag Iv (n=14), Ag Pos (n=14), kontrolną Iv (n=14) i kontrolną Pos (n=14). Początkowa masa ciała zwierząt wynosiła $205,7 \pm 9,2$ g. Zwierzęta z grupy doświadczalnej otrzymywały 20 nm AgNPs w dawce 5 mg/kg masy ciała dożylnie jako pojedynczą dawkę do żyły ogonowej (grupa Ag Iv) oraz 30 mg/kg masy ciała doustnie po codziennym podaniu dożołądkowym (grupa Ag Pos). Szczury z grupy kontrolnej poddano działaniu 0,9 % roztworu NaCl, stosując tę samą drogę ekspozycji, co w przypadku odpowiedniej grupy poddanej działaniu nanocząstek srebra.

W trakcie doświadczenia monitorowano parametry takie jak objawy chorobowe, stan wzrostu, spożycie paszy oraz aktywność zwierząt. W pierwszym i 28 dniu (Ag Iv, kontrola Iv) oraz siódmym i 28 dniu (Ag Pos, kontrola Pos) doświadczenia zwierzęta uśmiercono (po siedem egzemplarzy z każdej grupy) przez inhalację izofluranem (Baxter Healthcare, Warszawa, Polska). Próbki z tkanek poddanych perfuzji przepłukano buforem PBS i wyizolowano z nich miRNA. MiRNA przepisano na cDNA i zamrożano w ciekłym azocie do momentu przeprowadzenia analiz z użyciem zestawów analogicznych jak w podrozdziale 4.13.3 (Qiagen).

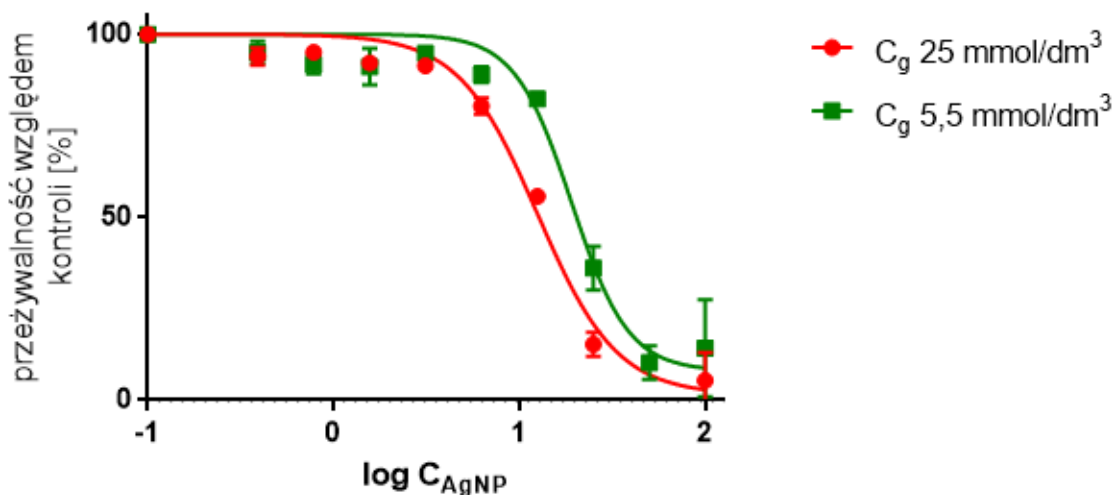
Pobranie materiału i przygotowanie tkanek zrealizowano przez Szkołę Główną Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie w Katedrze Dietetyki.

5. Wyniki

5.1. Badanie toksyczności nanocząstek srebra

5.1.1. Analiza cytotoksyczności nanocząstek srebra wobec komórek linii Hep G2 hodowanych w pożywkach o różnym stężeniu glukozy

W literaturze wykazano toksyczne działanie nanocząstek srebra na wiele linii komórkowych o różnym pochodzeniu tkankowym i organizmalnym. Do weryfikacji postawionych hipotez badawczych wybrano linię komórkową Hep G2 ze względu na wcześniej udokumentowaną aktywność względem niej nanocząstek srebra. Do doświadczeń zostały użyte komórki linii Hep G2 utrzymywane w pożywkach DMEM o różnych stężeniach glukozy: stężenie 5,5 mmol/dm³, które jest stężeniem fizjologicznym w krwi człowieka; stężenie, 25 mmol/dm³, jest stężeniem występującym przy ostrym stanie cukrzycowym. Większość danych literaturowych powstało w oparciu o używanie mediów o wyższym stężeniu glukozy w hodowli komórek linii Hep G2, mimo zaleceń ATCC odnośnie hodowli tych komórek. Wynika to prawdopodobnie z większej szybkości podziałów komórek Hep G2 utrzymywanych w medium o wyższym stężeniu glukozy. Jednocześnie często pomijany jest fakt istnienia znaczących różnic w metabolizmie tych komórek w zależności od stężenia glukozy w pożywce, wraz z którym zmienia się profil odpowiedzi na działanie ksenobiotyków, w tym nanocząstek srebra.



Rysunek 1. Przebieg krzywych przeżywalności komórek linii Hep G2, hodowanych w pożywkach zawierających różne stężenia glukozy (5,5 mmol/dm³ i 25 mmol/dm³), w funkcji stężenia nanocząstek srebra (0,4-100 µg/cm³). Punkty reprezentują średnie wraz ze standardowym błędem średniej, n=6.

Tabela 1. W tabeli zestawiono IC₅₀ dla komórek hodowanych w różnych pożywkach poddanych działaniu nanocząstek srebra, razem z przedziałami ufności ich wyznaczenia, n=6, α=0,05, test T-Studenta.

	C _g =25 mmol/dm ³	C _g =5,5 mmol/dm ³
IC ₅₀ [µg/cm ³]	12,54	19,09
PU 95 % [µg/cm ³]	10,95-14,48	16,4-22,87

W wyniku analizy krzywych przeżywalności komórek linii Hep G2 (Rys. 1) wyznaczono parametry IC₅₀ wobec szeregu stężeń nanocząstek srebra dla komórek hodowanych przy dostępności glukozy 25 mmol/dm³ (IC₅₀=12,6 µg/cm³) oraz dla komórek hodowanych przy dostępności glukozy 5,5 mmol/dm³ (IC₅₀=19,09 µg/cm³). Zgodnie z wcześniejszymi obserwacjami i z danymi literaturowymi, badanie wykazało statystycznie istotną różnicę (Tab. 1) między odpowiedzią na nanocząstki srebra komórek hodowanych w pożywkach hodowlanych o różnym stężeniu glukozy. Komórki hodowane

w medium o niższym stężeniu glukozy są odporniejsze na toksyczne działanie nanocząstek srebra.

5.1.2. Szybkość proliferacji komórek Hep G2 hodowanych w pożywkach o różnym stężeniu glukozy, poddanych działaniu nanocząstek srebra

Na proliferację komórek nowotworowych wpływa wiele czynników. Do mechanizmów komórkowych zwiększających proliferację komórek można zaliczyć te działające bezpośrednio na ekspresję genów np. mutacje takie jak delecje, wyłączające geny supresorowe lub duplikacje w onkogenach. Pośrednie mechanizmy polegają na zmianach w ekspresji genów, zaangażowanych w kontrolę innych genów np. kontrola przez miRNA, genów na poziomie mRNA. Na szybkość proliferacji wpływają również warunki środowiskowe, których zmiany mogą powodować do powstawania stresu oksydacyjnego w komórkach a w rezultacie do modyfikacji DNA, białek i wielu innych składników komórkowych, co wiąże się ze zmianami w metabolizmie komórki.

Zaproponowano doświadczenie oparte na klasycznym teście przeżywalności z akumulacją czerwieni obojętnej, sprawdzające szybkość proliferacji komórek Hep G2, poddanych działaniu nanocząstek srebra, przy różnej dostępności glukozy. W celu weryfikacji hipotezy na temat zdolności komórek do proliferacji w warunkach toksycznego działania srebra, komórki wysiano w różnych gęstościach, po czym dodawano do komórek nanocząstek srebra o różnym stężeniu. Przez następne trzy doby od dodania nanocząstek srebra sprawdzano szybkość podziałów komórkowych.

Tabela 2. Szybkość proliferacji komórek linii Hep G2 hodowanych w medium suplementowanym różnymi stężeniami glukozy: 5,5 mol/dm³ i 25 mmol/dm³. W tabeli zestawiono średnie wartości absorbancji dla odczytów ilości zakumulowanej czerwieni obojętnej po 24, 48 i 72 godzinach. Komórki poddano działaniu nanocząstek srebra w stężeniach 3,125, 6,25 i 12,5 µg/cm³. Kolor zielony oznacza, że za zaobserwowane różnice w wynikach odpowiedzialna jest interakcja pomiędzy stężeniem nanocząstek srebra i stężeniem glukozy w danym punkcie czasowym i w danej wyjściowej ilości komórek w hodowli. Kolor fioletowy oznacza, że ignorując czynnik w postaci stężenia glukozy, za różnice w wynikach odpowiedzialne jest działanie nanocząstek srebra. Kolor żółty oznacza, że ignorując wpływ nanocząstek srebra, za obserwowany efekt odpowiedzialny jest czynnik w postaci stężenia glukozy w pożywce. Kolor niebieski wskazuje na synergistyczne działanie obu czynników. Kolory zielony i czerwony stanowiące tła dla wartości absorbancji oznaczają różnice między odczytami dla obu stężeń glukozy, w danym stężeniu nanocząstek srebra, wyjściowej gęstości hodowli oraz czasie inkubacji, dwuczynnikowa ANOVA, n=9, α=0,05.

99

Początkowa ilość komórek	Czas inkubacji [h]	Stężenie AgNP [µg/cm ³]							
		0		3,125		6,25		12,5	
		Stężenie glukozy [mmol/dm ³]							
		5,5	25	5,5	25	5,5	25	5,5	25
3,125·10 ³	24	0,069	0,038	0,05	0,029	0,046	0,025	0,01	0,024
	48	0,084	0,101	0,062	0,079	0,041	0,039	0,015	0,028
	72	0,278	0,283	0,235	0,254	0,141	0,24	0,022	0,079
6,25·10 ³	24	0,19	0,174	0,166	0,129	0,161	0,129	0,067	0,092
	48	0,229	0,291	0,205	0,299	0,173	0,247	0,071	0,178
	72	0,336	0,361	0,346	0,346	0,318	0,356	0,139	0,287
12,5·10 ³	24	0,26	0,248	0,232	0,258	0,252	0,27	0,208	0,212
	48	0,318	0,394	0,33	0,418	0,315	0,398	0,251	0,339
	72	0,461	0,444	0,439	0,416	0,426	0,436	0,37	0,405
25·10 ³	24	0,334	0,355	0,317	0,36	0,317	0,333	0,313	0,317
	48	0,443	0,52	0,447	0,49	0,432	0,536	0,431	0,454
	72	0,481	0,448	0,49	0,423	0,454	0,438	0,475	0,416
50·10 ³	24	0,416	0,446	0,426	0,471	0,414	0,449	0,425	0,416
	48	0,457	0,516	0,469	0,484	0,462	0,528	0,482	0,403
	72	0,492	0,309	0,473	0,278	0,468	0,407	0,486	0,362

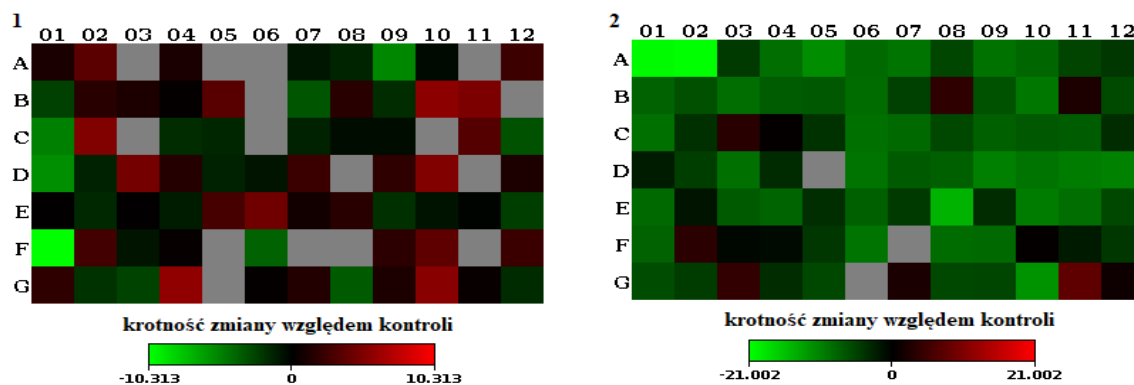
Różnice w odpowiedzi komórek linii Hep G2 na nanocząstki srebra między dwoma wariantami hodowlanymi, są najbardziej widoczne w hodowlach inokulowanych komórkami w ilości $3,125 \cdot 10^3$ i $6,25 \cdot 10^3$. Początkowa szybkość proliferacji, po 24 godzinach jest wyższa dla komórek hodowanych w pożywce o niższym stężeniu glukozy, przy czym różnica ta jest pogłębianą przez nanocząstki srebra. Wynik ten, jest zbieżny z obserwacjami przeprowadzonymi podczas badania przeżywalności (Rys. 1). Po 48 godzinach występuje punkt przelamania, gdzie obserwowane wyniki są efektem działania zarówno nanocząstek srebra i różnic w zawartości glukozy w pożywce, jednocześnie brak jest statystycznie istotnej różnicy w sposobie reagowania na nanocząstki srebra komórek hodowanych w medium o różnym stężeniu glukozy. Po 72 godzinach obserwowany jest wyższy potencjał proliferacyjny komórek hodowanych w pożywce o wyższym stężeniu glukozy, przy większej tolerancji tych komórek na działanie nanocząstek srebra, co stanowi odwrotność obserwacji po 24 godzinach. W hodowlach inokulowanych komórkami w ilości $25 \cdot 10^3$ i $50 \cdot 10^3$ nie zaobserwowano wpływu nanocząstek srebra na potencjał proliferacyjny po 24 h i 72 h od inicjacji hodowli, a powstające różnice są efektem prowadzenia hodowli w mediach suplementowanymi różnymi stężeniami glukozy. Jednocześnie, po 48 godzinach widoczny jest wpływ nanocząstek srebra na szybkość proliferacji komórek w zależności od stężenia glukozy w medium hodowlanym (Tabela 2).

5.2. Badanie poziomu miRNA ulegających ekspresji w komórkach linii Hep G2 hodowanych w pożywkach o różnym stężeniu glukozy

Profil mikroRNA jest specyficzny tkankowo i może ulegać zmianom zarówno pod wpływem czynnikiem endo- jak i egzogennych. W celu selekcji miRNA do dalszych badań zbadano poziom ekspresji w panelu miRNA, których występowanie zostało potwierdzone w wątrobie i których ekspresja może być zaangażowana w kontrolowanie procesów w komórkach tego narządu.

Komórki Hep G2 hodowane w dwóch wariantach hodowlanych: suplementowanych glukozą w stężeniu fizjologicznie prawidłowym ($5,5 \text{ mmol/dm}^3$) i glukozą w stężeniu (25 mmol/dm^3) poddano działaniu nanocząstek srebra w stężeniu korespondującym z wyznaczonym wcześniej stężeniem IC50. Na tej podstawie

wyselekcjonowano miRNA do dalszych badań. Kryterium wyboru miRNA do analiz stanowiła zmiana w ich ekspresji pod wpływem inkubacji komórek z nanocząstkami srebra.



Rysunek 2. Zmiana ekspresji miRNA w komórkach Hep G2 hodowanych w medium DMEM suplementowanym glukozą w stężeniu 5,5 nmol/dm³ [1] i 25 mmol/dm³ [2] pod wpływem działania nanocząstek srebra. Na rycinie odłożono uśrednione wyniki z trzech powtórzeń. Wyniki opracowano za pomocą oprogramowania będącego częścią zestawu miRNA miScript miRNA PCR assay, Qiagen.

Tabela 3. Zestawienie miRNA, których ekspresja została zbadana w komórkach linii Hep G2 hodowanych w pożywkach suplementowanych różnymi stężeniami glukozy (5,5 mmol/dm³ i 25 mmol/dm³).

Pozycja	miRNA	Pozycja	miRNA	Pozycja	miRNA
A01	let-7a-5p	C05	miR-17-5p	E09	miR-29b-3p
A02	let-7b-5p	C06	miR-192-3p	E10	miR-29c-3p
A03	let-7c-5p	C07	miR-192-5p	E11	miR-30a-5p
A04	let-7f-5p	C08	miR-194-5p	E12	miR-30b-5p
A05	let-7g-5p	C09	miR-195-5p	F01	miR-30c-5p
A06	miR-1-3p	C10	miR-199b-3p	F02	miR-30d-5p
A07	miR-100-5p	C11	miR-199a-5p	F03	miR-30e-5p
A08	miR-101-3p	C12	miR-19a-3p	F04	miR-3183
A09	miR-106b-5p	D01	miR-19b-3p	F05	miR-34a-3p
A10	miR-107	D02	miR-200b-3p	F06	miR-34a-5p
A11	miR-122-3p	D03	miR-20a-5p	F07	miR-3607-5p

A12	miR-122-5p	D04	miR-214-3p	F08	miR-3653-3p
B01	miR-125a-5p	D05	miR-21-5p	F09	miR-3663-3p
B02	miR-125b-5p	D06	miR-221-3p	F10	miR-375
B03	miR-1260a	D07	miR-222-3p	F11	miR-3907
B04	miR-126-3p	D08	miR-223-3p	F12	miR-4286
B05	miR-126-5p	D09	miR-22-3p	G01	miR-4291
B06	miR-142-3p	D10	miR-224-5p	G02	miR-4301
B07	miR-142-5p	D11	miR-22-5p	G03	miR-4454
B08	miR-143-3p	D12	miR-23a-3p	G04	miR-4516
B09	miR-145-3p	E01	miR-23b-3p	G05	miR-451a
B10	miR-145-5p	E02	miR-24-3p	G06	miR-5100
B11	miR-146a-5p	E03	miR-26a-5p	G07	miR-5701
B12	miR-148a-3p	E04	miR-26b-5p	G08	miR-664b-3p
C01	miR-148b-3p	E05	miR-27a-3p	G09	miR-92a-3p
C02	miR-155-5p	E06	miR-27b-3p	G10	miR-93-5p
C03	miR-15a-5p	E07	miR-29a-3p	G11	miR-940
C04	miR-16-5p	E08	miR-29a-5p	G12	miR-99a-5p

Ponieważ w przypadku komórek Hep G2 hodowanych w pożywce o niskiej zawartości glukozy, po potraktowaniu nanocząstkami srebra, profile miRNA nie ulegały tak znaczącej zmianie, jak w przypadku tych samych komórek hodowanych w medium o wysokiej zawartości glukozy, wytypowano miRNA, których ekspresja uległa zmniejszeniu w komórkach hodowanych na medium o wysokiej zawartości glukozy, pod wpływem działania nanocząstek srebra (Rys. 2).

5.3. Transfekcja i ocena efektywności transfekcji

W celu modyfikacji poziomu wybranych miRNA w komórkach hodowanych w pożywce o stężeniu glukozy 25 mmol/dm³ poddanych działaniu nanocząstek srebra, użyto wybranych syntetycznych analogów miRNA o zachowanym transkrypcie.

W publikowanych pracach stężenie użytych syntetycznych miRNA waha się w przedziale piko molarnych do nawet mikro molarnych [168, 169]. Niekiedy, aby uzyskać efekt biologiczny, w eksperymentach prowadzonych na tych samych liniach

komórkowych wykorzystywane są różne ilości syntetycznych nukleotydów (nawet przy użyciu tych samych metod transfekcji). Obserwacje te wynikają ze zróżnicowania działania poszczególnych miRNA, które pełnią wiele funkcji w komórce, przez jednoczesne wpływanie na różne rodziny białek, przy jednoczesnej kontroli systemów regulujących poziom miRNA takich jak lncRNA,

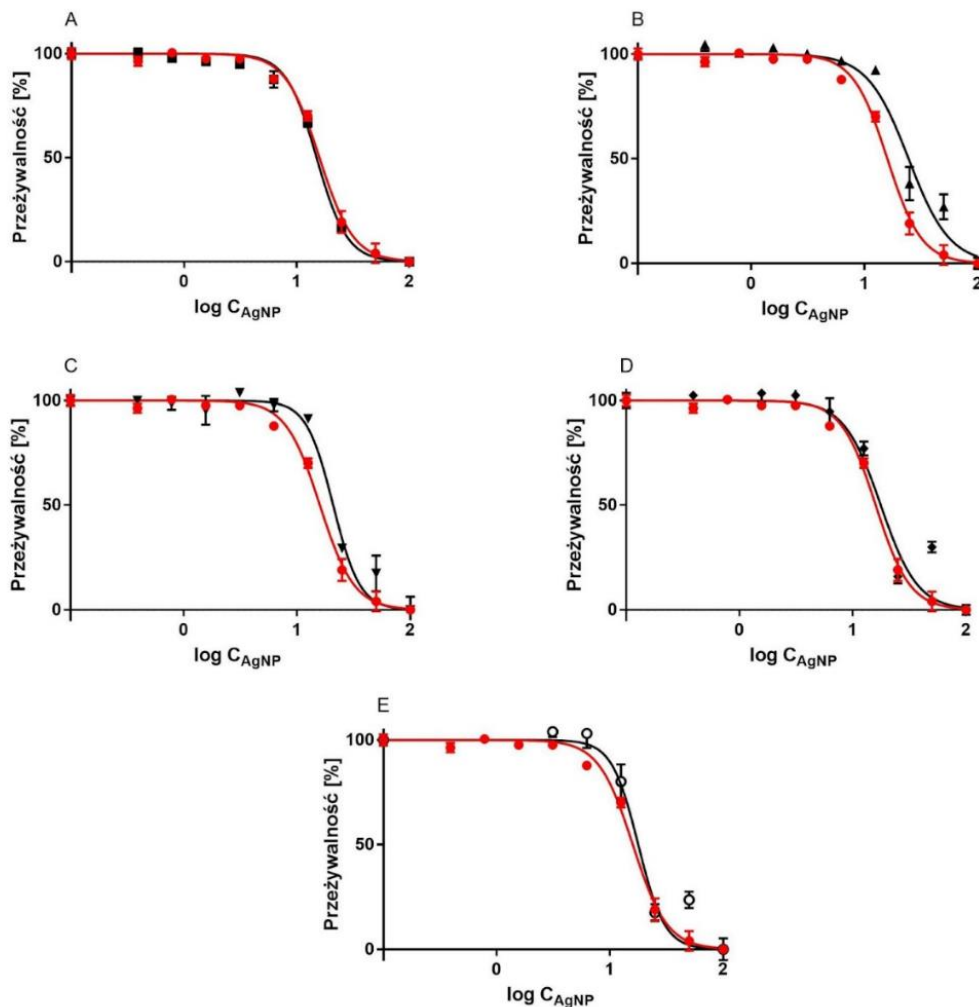
W celu oceny odpowiedzi komórki na transfekcję syntetycznymi analogami miRNA sprawdzono jakie ich stężenia, będą wpływały na przeżywalność komórek Hep G2, poddanych działaniu nanocząstek srebra.

5.3.1. Analiza wpływu wybranych syntetycznych analogów miRNA na toksyczność wywołaną nanocząstkami srebra

Syntetyczne analogi miRNA (z ang. miRNA mimics) to chemicznie zsyntetyzowane dsRNA, z zachowaną sekwencją miRNA kopiowanego. Po transfekcji do komórki badanej, syntetyczny miRNA, ma funkcjonować w taki sam sposób, jak miRNA, którego strukturę kopiuje. Do dalszych doświadczeń wybrano miRNA, których ekspresja spadała w komórkach hodowanych na 25 mmol/dm³ glukozie pod wpływem działania nanocząstek srebra. Na podstawie danych z analizy paneli miRNA oraz kwerendy literaturowej do badań postanowiono wykorzystać syntetyczne analogi miR-29c-3p, miR-100-5p, miR-107, miR-195-5p i miR-221-3p.

W celu oceny odpowiedzi komórki na transfekcję syntetycznymi analogami miRNA sprawdzono ich wpływ na przeżywalność komórek Hep G2 poddanych działaniu nanocząstek srebra. Znaczące zmiany w przeżywalności komórek poddanych działaniu nanocząstek srebra zaczęto zauważać dopiero przy 30 nmol/dm³ stężeniu niektórych z syntetycznych analogów miRNA.

Kontrola	IC50 [$\mu\text{g}/\text{cm}^3$]	PU 95 % [$\mu\text{g}/\text{cm}^3$]
miR-29c-3p	15,02 ^{ab}	13,86-16,25
miR-100-5p	24,51 ^{*acd}	21,53-28,08
miR-107	20,86 ^{*b}	18,79-23,28
miR-195-5p	17,65 ^c	15,09-21,18
miR-221-3p	17,77 ^d	15,21-20,97



Rysunek 3. Przeżywalność komórek linii Hep G2 hodowanych w medium suplementowanych glukozą w stężeniu 25 mmol/dm^3 . Komórki zostały poddane działaniu syntetycznych analogów: miR-29c-3p [A], miR-100-5p [B], miR-107 [C], miR-195-5p [D], miR-221-3p [E] w stężeniu 20 nmol/dm^3 oraz nanocząstek srebra w zakresie stężeń od $0,390625$ do $100 \text{ } \mu\text{g/cm}^3$. Punkty reprezentują średnie wraz ze standardowym błędem średniej, $n=6$. Przebiegi funkcji oznaczone kolorem czerwonym i czarnym obrazują odpowiednio przeżywalność komórek kontrolnych i poddanych działaniu syntetycznych nukleotydów. W tabeli zestawiono IC_{50} dla nanocząstek srebra dla komórek kontrolnych oraz poddanych działaniu syntetycznych miRNA razem z przedziałami ufności ich wyznaczenia. „*” oznacza statystyczną różnicę względem komórek kontrolnych. Różnice między pozostałymi parami wyników oznaczono literami, $n=6$, $\alpha=0,05$, ANOVA, test post hoc Tukeya.

W wyniku analizy krzywych przeżywalności komórek poddanych transfekcji analogami miRNA o następnie poddanych działaniu nanocząstek srebra wyznaczono parametry IC50. Statystycznie istotną zmianę w przeżywalności względem kontroli spowodowały: miR-100-5p oraz miR-107. Najwyższe zwiększenie przeżywalności zaobserwowano dla miR-100-5p, w tym przypadku parametr IC50 był wyższy o 1,54 raza w stosunku do kontroli. Ze wszystkich przetestowanych nukleotydów najmniejszą zmianę wywołał miR-29c-3p, powodując 0,94-krotny spadek przeżywalności (Rys. 3).

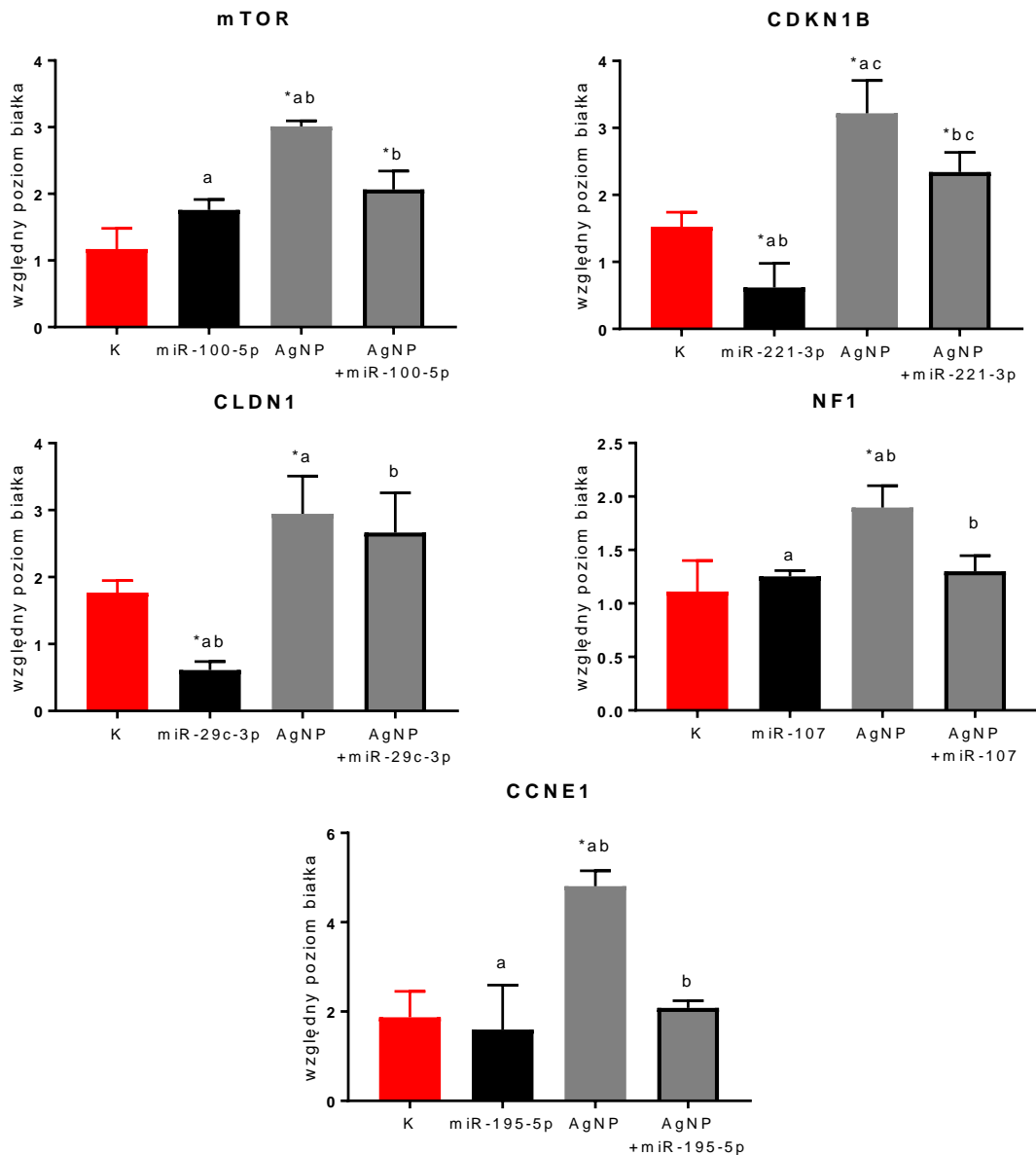
5.3.2. Badanie poziomu białek kontrolowanych na poziomie mRNA przez wybrane miRNA

Białka markerowe dla miRNA są to białka, których poziom jest bezpośrednio regulowany przez dane miRNA. Jasnym jest, że jedno białko może być kontrolowane przez wiele miRNA, jak również to, że wiele miRNA może kontrolować jedno białko. Do tej pory powstało mnóstwo prac, w których podejmowane są starania powiązania docelowego mRNA dla konkretnego białka do danego miRNA. Często korzysta się z programów, stworzonych w celu przyporządkowania białek docelowych do miRNA, jednak istotną pracą badacza, jest weryfikacja *in vitro* zaproponowanych przez program danych. Dodatkową trudnością jest świadomość specyfiki tkankowej i komórkowej zarówno dla ekspresji białek jak i miRNA, oraz fakt, że na ekspresję miRNA oraz poziom białka może wpływać badany związek, reżim czasowy czy nawet w drobny sposób zmienione warunki środowiska takie jak ciśnienie, wilgotność czy pH i skład pożywki w której hodowane są badane komórki. Przez wspomniane trudności, niezwykle ważnym jest sprawdzenie, czy w badanym układzie doświadczalnym, transfekcja syntetycznymi analogami przebiegła w odpowiedni sposób i potwierdzić to na poziomie regulacji białek.

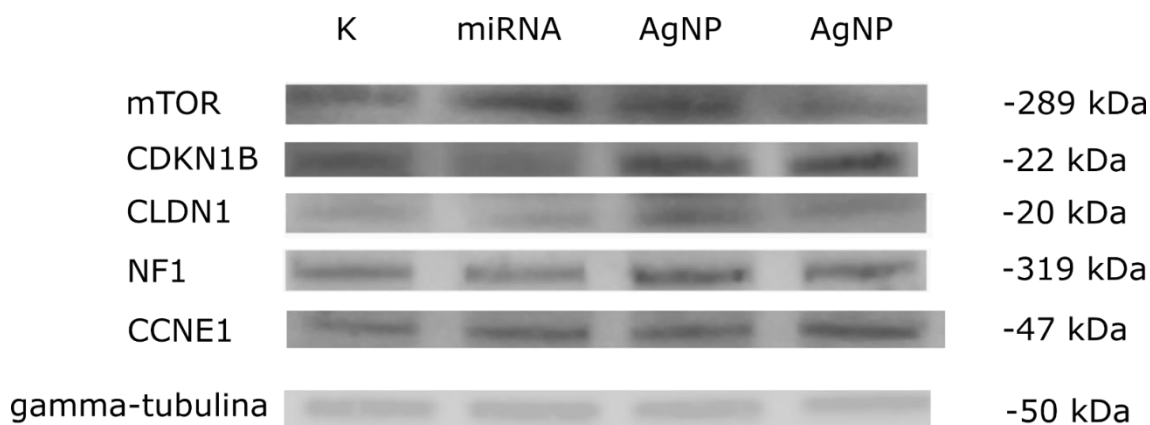
W celu weryfikacji działania miRNA na syntezę produktów białkowych, wybrano pięć białek markerowych, po jednym dla każdego z badanych miRNA. Wybór kierowany był kwerendą literaturową, oraz informacjami dostarczonymi przez bazę danych zbierającą informacje na temat poziomu komplementarności miRNA z mRNA interferowanymi (TargetScanHuman 7.0) (https://www.targetscan.org/vert_70/) oraz miRDB (<https://mirdb.org/mirdb/index.html>). Spadek poziomu wybranych białek po transfekcji syntetycznymi analogami miRNA świadczy więc o działaniu wybranych do doświadczeń miRNA na białka na poziomie mRNA.

Tabela 4. Zestawienie wybranych miRNA oraz białek, które posłużyły jako markerowe dla interferencji badanych miRNA. Informacje dotyczące zgodności na poziomie komplementarności, oraz sekwencji wybranych miRNA przedstawiono przy użyciu baz danych miRBase (<https://www.mirbase.org/>) oraz miRDB (<https://mirdb.org/mirdb/index.html>).

Nazwa miRNA	identyfikator miRBase	sekwencja 5' → 3'	białko regulowane	Przewidywanie regulacji białka (miRDB)
miR-29c-3p	MIMAT0000681	uagcaccauuugaaucgguua	CLDN1	95
miR-100-5p	MIMAT0000098	aaccguagauccgaacuugug	mTOR	93
miR-107	MIMAT0000104	agcagcauuguacagggcuauca	NF1	96
miR-195-5p	MIMAT0000461	uagcagcacagaaaauuggc	CCNE1	99
miR-221-3p	MIMAT0000278	agcuacauugucugcugguuuc	CDKN1B	99



Rysunek 4. Poziom białek markerowych dla wybranych miRNA, które ulegają ekspresji w komórkach linii Hep G2 hodowanych w pożywce DMEM suplementowanym glukozą w stężeniu 25 mmol/dm³. Jako białka markerowe wytypowano CCNE1, CDKN1B, CLDN1, NF1 i mTOR, odpowiednio dla miR-100-5p, miR-221-3p, miR-29c-3p, miR-107 i miR-195-5p. Komórki poddano działaniu nanocząstek srebra w stężeniu 25 µg/cm³ oraz transfekcji syntetycznymi nukleotydami w stężeniu 5 nmol/dm³. Na wykresach zestawiono średnie z pomiarów densytometrycznych w stosunku do ekspresji gamma tubuliny. „*” oznacza statystyczną różnicę względem komórek kontrolnych, oznaczenia literowe oznaczają różnice między danymi parami wyników, n=3, α=0,05, ANOVA, test post hoc Tukeya.



Rysunek 5. Przykładowy obraz immunodetekcji białek zaangażowanych w EMT w komórkach Hep G2 transfekowanych syntetycznymi analogami miRNA. Gamma-tubulina została wybrana jako kontrola odnośnikowa dla doświadczenia.

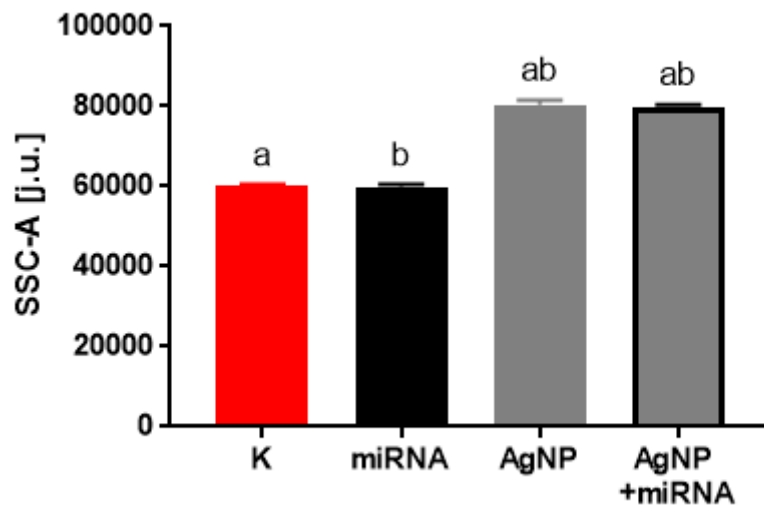
Spośród wybranych białek markerowych dla CDKN1B (inhibitor kinazy cyklinozależnej 1B) i CLDN1 (klaudyna 1) zaobserwowano zmianę w ich poziomie po dodaniu odpowiednich syntetycznych analogów miRNA, miR-221-3p i miR-29c-3p. Zarówno w przypadku miR-221-3p i miR-29c-3p ilość białek CDKN1B i CLDN1 zmalała. Dla białek CCNE1 (cyklina E1), NF1 (neurofibromina 1) i mTOR (saczy cel rapamycyny), nie zauważono bezpośrednich zmian w ekspresji względem kontroli po transfekcji z użyciem miR-100-5p, miR-107 i miR-195-5p, jednocześnie transfekcja wywołała efekt modulujący w stosunku do ekspresji tych białek po inkubacji z nanocząstkami srebra. Inkubacja z nanocząstkami srebra spowodowała wzrost ekspresji wszystkich badanych białek. Transfekcja komórek poddanych działaniu nanocząstek srebra we wszystkich przypadkach, poskutkowała zmniejszeniem ekspresji w stosunku do komórek poddanych działaniu tylko nanocząstek srebra, z wyjątkiem CLDN1.

W odniesieniu do komórek transfekowanych zaobserwowano wzrost poziomu dla wszystkich białek w komórkach poddanych działaniu nanocząstek srebra. Zwiększony poziom białka po transfekcji i inkubacji z nanocząstkami srebra w stosunku do komórek transfekowanych zaobserwowano w przypadku CDKN1B i CLDN1 (Rys 4 i 5).

5.3.3. Ocena złożoności/granularności komórek na podstawie parametru SSC

W cytometrii przepływowej rozproszenie wiązki światła jest mierzone przez dwa detektory - przez detektor boczny (SSC, ang. side scatter channel) i przedni (FSC, ang. forward scatter channel). Promieniowanie odbierane przez detektor boczny jest efektem

światła załamane lub odbite przez struktury wewnątrzkomórkowe, takie jak jądro komórkowe, organelle i inne ziarnistości. Z tego względu, może służyć do opisu złożoności struktur wewnątrzkomórkowych oraz ilości drobin zawieszonych w cytoplazmie, w tym, do opisu ilości nanocząstek metalicznych wnikaających do wnętrza komórek.



Rysunek 6. Wartości parametru SSC-A dla komórek linii Hep G2 hodowanych w medium suplementowanym glukozą w stężeniu 25 mmol/dm³, transfekowanych syntetycznymi analogami (miR-29c-3p, miR-100-5p, miR-107, miR-195-5p, miR-221-3p, w stężeniu 5 nmol/dm³ każdy) oraz poddanych działaniu nanocząstek srebra w stężeniu 25 µg/cm³. Na wykresie zestawiono średnie wraz z odchyleniami standardowymi. Litery a oraz b oznaczają istotną statystycznie różnicę między daną parą wyników, ANOVA, $\alpha=0,05$, $n=3$, test post hoc Tukeya, [j.u.] – jednostka umowna.

Zgodnie z danymi literaturowymi, nanocząstki srebra spowodowały podwyższenie parametru SSC-A w komórkach linii Hep G2. Transfekcja wybranymi syntetycznymi analogami miRNA pozostała bez wpływu na odczyty tego parametru.

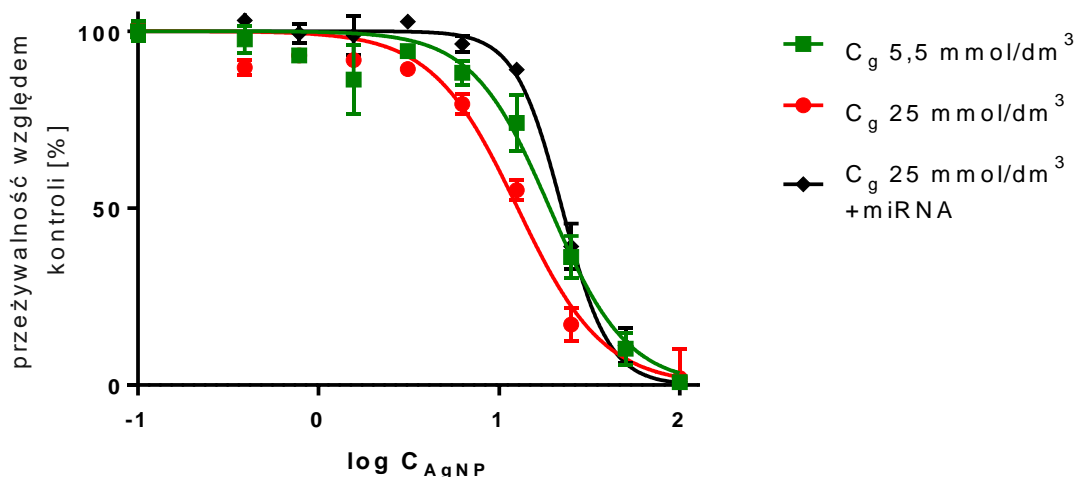
5.4. Modulacja toksyczności nanocząstek srebra poprzez zmianę poziomu wybranych miRNA w komórkach Hep G2

5.4.1. Przeżywalności komórek Hep G2 transfekowanych syntetycznymi analogami miRNA poddanych działaniu nanocząstek srebra

Analiza danych uzyskanych w wyniku doświadczeń przeprowadzonych na komórkach Hep G2, wykazała zwiększoną cytotoksyczność nanocząstek srebra względem komórek hodowanych w medium o wyższej zawartości glukozy. Po przeprowadzeniu badania ekspresji wybranych miRNA wytypowano miRNA, których analogi miały posłużyć do dalszych badań.

Wybrane miRNA, zgodnie z kwerendą literaturową uczestniczą w mechanizmach proliferacji i lekooporności komórek, oraz wykazują zmniejszoną ekspresję w komórkach hodowanych w pożywce o wyższej zawartości glukozy pod wpływem nanocząstek srebra. Dało to podstawę do hipotezy, że mogą one brać udział w mechanizmach, które powodują większą wrażliwość tych komórek na nanocząstki srebra w zależności od glikemii, uwrażliwiając komórki na działanie nanocząstek srebra.

Na podstawie wcześniejszych badań komórek transfekowanych syntetycznymi analogami miRNA wykazano, że pierwsze zmiany w przeżywalności były obserwowane po transfekcji 30 nmol/dm³ analogami miRNA. Ponieważ miRNA działają na mechanizmy komórkowe synergistycznie, postanowiono sprawdzić, czy wybrane syntetyczne analogi miRNA, w niższych stężeniach, ale wspólnie, będą wpływały na przeżywalność komórek poddanych działaniu nanocząstek srebra.



Rysunek 7. Przeżywalność komórek linii Hep G2 hodowanych w pożywce suplementowanej glukozą w stężeniu 5,5 mmol/dm³ i 25 mmol/dm³ względem nanocząstek srebra stosowanych w zakresie stężeń od 0,4 do 100 µg/cm³. Komórki hodowane w medium o zawartości glukozy 25 mmol/dm³ transfekowano syntetycznymi analogami: miR-29c-3p, miR-100-5p, miR-107, miR-195-5p, miR-221-3p w stężeniach 5 nmol/dm³ każdy. Punkty reprezentują wartości średnich wraz ze standardowym błędem średniej, n=6. Przebiegi funkcji oznaczone kolorem zielonym, czerwonym i czarnym obrazują odpowiednio przeżywalność komórek hodowanych w medium o zawartości glukozy 5,5 mmol/dm³ i 25 mmol/dm³ poddanych działaniu nanocząstek srebra oraz komórek hodowanych medium o zawartości glukozy 25 mmol/dm³ transfekowanych syntetycznymi analogami miRNA i poddanych działaniu nanocząstek srebra.

Tabela 5. W tabeli zestawiono IC₅₀ dla wszystkich wariantów badanych razem z przedziałami ufności ich wyznaczenia, n=6, α=0,05, ANOVA, test post hoc Tukeya.

	C _g 5,5 mmol/dm ³	C _g 25 mmol/dm ³	C _g 25 mmol/dm ³ + miRNA
IC ₅₀ [µg/cm ³]	20,69	12,77	22,32
PU 95 % [µg/cm ³]	18,58-23,16	11,54-14,13	20,47-24,4

Zaobserwowano statystycznie istotną różnicę między komórkami kontrolnymi i komórkami poddanymi działaniu syntetycznych analogów miRNA poddanymi działaniu nanocząstek srebra. Parametry IC₅₀ to odpowiednio 12,77 µg/cm³ i 22,32 µg/cm³. Zastosowanie wszystkich wybranych analogów miRNA razem, w indywidualnych stężeniach 5 nmol/dm³ spowodowało 1,75-krotny wzrost odporności komórek linii

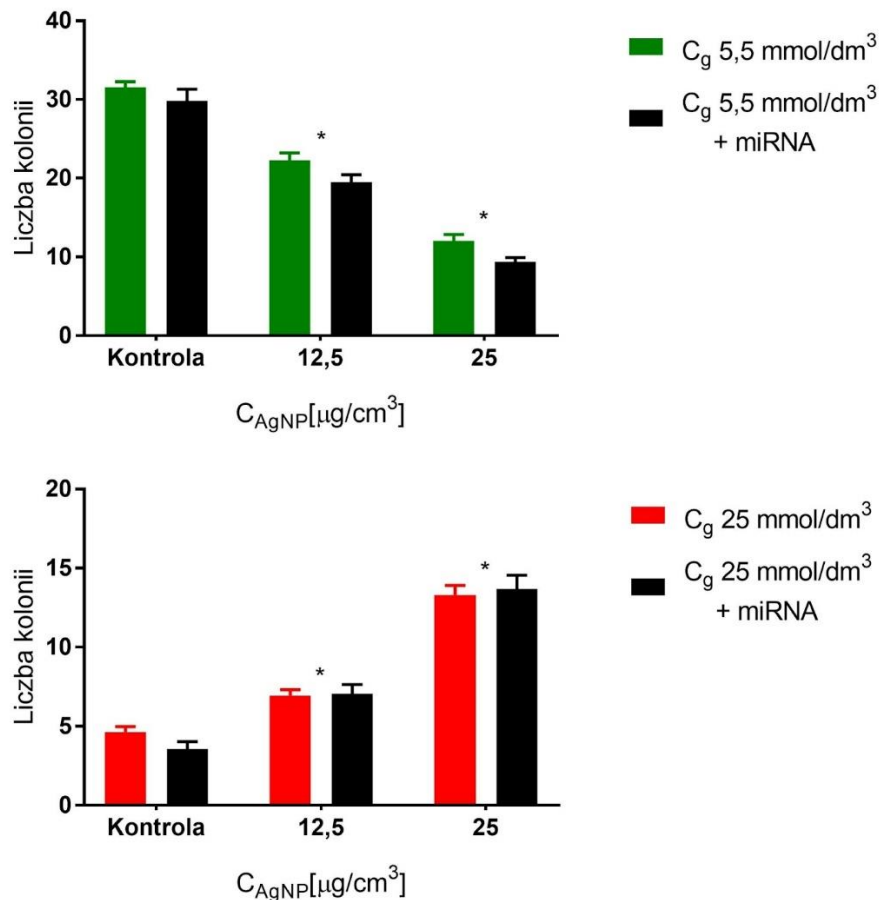
Hep G2 na nanocząstki srebra. Jest to większy wzrost w stosunku do najsilniej działających syntetycznych analogów miRNA, zastosowanych w stężeniu 30 nmol/dm³; miR-100-5p, który spowodował 1,54 krotny wzrost parametru IC50 w stosunku do komórek kontrolnych (Rys 7 i tab. 5).

5.4.2. Badanie zdolności do tworzenia kolonii transfekowanych analogami miRNA komórek Hep G2, hodowanych na medium o różnym stężeniu glukozy i poddanych działaniu nanocząstek srebra

Jako kolonię definiuje się skupisko składające się z co najmniej 50 komórek. Test tworzenia kolonii po raz pierwszy został wykorzystany w 1956 roku w celu wyznaczenia zdolności pojedynczej komórki do stworzenia kolonii w warunkach promieniowania rentgenowskiego [170]. Obecnie test tworzenia kolonii jest często modyfikowany pozwalając sprawdzić skuteczność innych czynników cytotoksycznych.

5.4.2.1. Zdolność komórek Hep G2 do tworzenia kolonii po inkubacji z nanocząstkami srebra

Test tworzenia kolonii wykonano w celu zbadania jak transfekcja komórek Hep G2 wpłynie na zdolność do tworzenia kolonii w komórkach hodowanych w pożywkach o różnej zawartości glukozy, poddanych działaniu nanocząstek srebra.



Rysunek 8. Liczność kolonii komórek linii Hep G2 hodowanych w dwóch wariantach pożywki - o stężeniach glukozy 5,5 i 25 mmol/dm³. Komórki poddano działaniu nanocząstek srebra oraz syntetycznych analogów (miR-29c-3p, miR-100-5p, miR-107, miR-195-5p, miR-221-3p) na czas 24 godzin. Po inkubacji liczono kolonie na podstawie zdjęć mikroskopowych. Na wykresie zestawiono średnie wraz z błędem standardowym średniej. „*” oznacza statystycznie istotną różnicę względem kontroli n=16, α=0,05, ANOVA, test post hoc Bonferroniego.

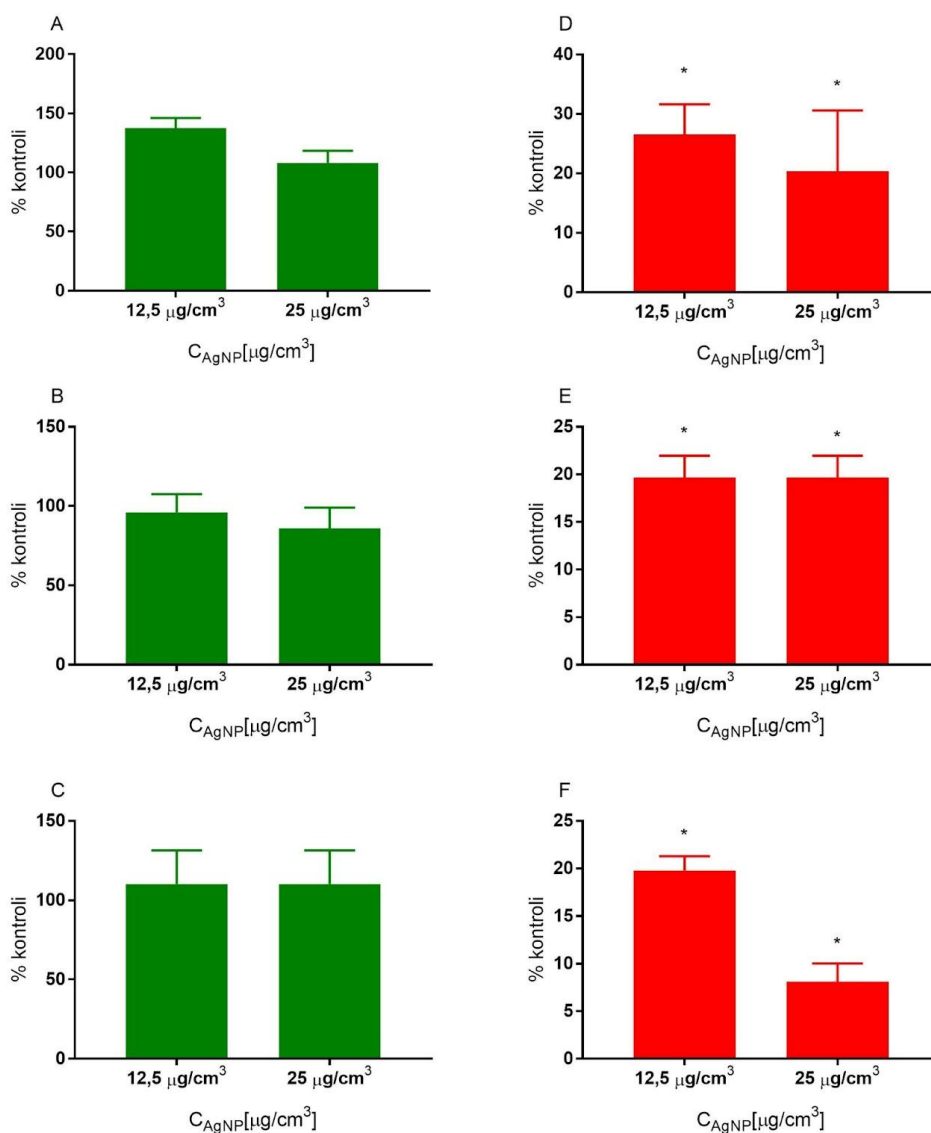
Nanocząstki srebra ograniczały potencjał do tworzenia kolonii w komórkach linii Hep G2 utrzymywanych w pożywce zawierającej 5,5 mmol/dm³. Nanocząstki srebra w stężeniu 12,5 µg/cm³ spowodowały spadek średniej liczby kolonii o 9,31 dla komórek kontrolnych i o 10,31 dla komórek pod wpływem syntetycznych analogów miRNA, natomiast w stężeniu 25 µg/cm³, nanocząstki spowodowały spadek średniej liczby kolonii o odpowiednio o 19,5 i o 20,44. Nanocząstki srebra, w przypadku komórek hodowanych na medium o niższym stężeniu glukozy, powodowały spadek ilości powstających kolonii. Efekt ten, jest silniejszy przy wyższym stężeniu nanocząstek srebra.

Wzrost komórek linii Hep G2 w medium o wyższym stężeniu glukozy (25 mmol/dm³) był nieregularny z większym stopniem migracji pojedynczych komórek tworzących kolonię. Z tego względu licznosc kolonii szacowana z użyciem technik mikroskopowych jest trudna do jednoznacznego określenia. Niemniej, kolonie obserwowane w medium o wyższej zawartości glukozy są mniej liczne oraz znacznie większe w stosunku do komórek utrzymywanych w pożywce o niższym stężeniu glukozy. Można też zaobserwować wzrost ilości kolonii, przy jednoczesnym ograniczeniu ich wielkości po zastosowaniu nanocząstek srebra. Ten efekt nasila się wraz ze zwiększeniem stężenia nanocząstek srebra.

W obu wariantach medium hodowlanego użycie syntetycznych analogów miRNA, nie wpłynęło na ilość kolonii tworzonych przez komórki linii Hep G2.

5.4.2.2. Badanie ilości komórek tworzących kolonie w hodowlach komórek Hep G2 utrzymywanych w medium o różnym stężeniu glukozy

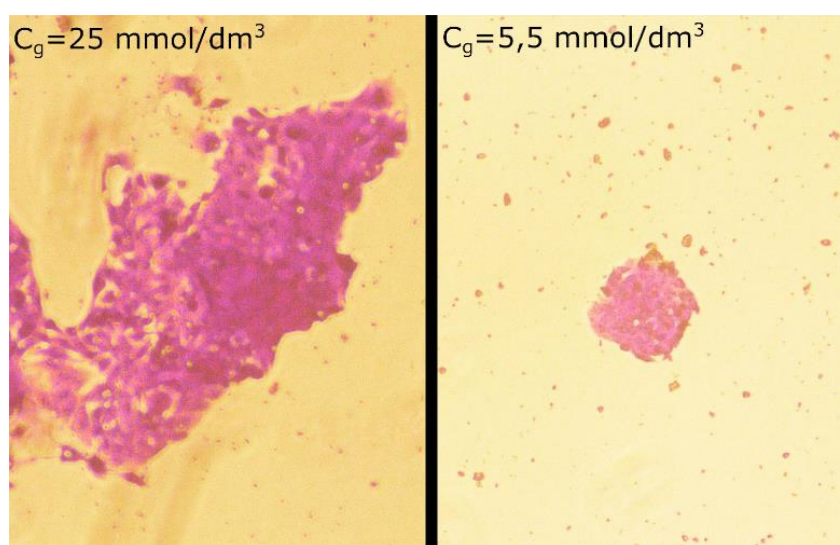
Z uwagi na trudność w jednoznacznym określeniu ilości kolonii w przypadku komórek hodowanych w medium suplementowanym glukozą w stężeniu 25 mmol/dm³ przeprowadzono dodatkowe eksperymenty polegające na barwieniu komórek tworzących kolonie fioletem krystalicznym i określeniu ich ilości metodą absorpcyjometryczną.



Rysunek 9. Absorbancja uwolnionego z komórek fioletu krystalicznego w 33 % kwasie octowym, przeliczona na procent kontroli, którą stanowią komórki nie traktowanych AgNP. Komórki inokulowano na płytkę 6 dołkową w ilości $10 \cdot 10^3$ (A, D), $5 \cdot 10^3$ (B, E) i $2,5 \cdot 10^3$ (C, F). Hodowle prowadzone w medium suplementowanym różnymi stężeniami glukozy; $5,5 \text{ mmol/dm}^3$ (A, B, C) lub 25 mmol/dm^3 (B, E, F). * oznacza statystycznie istotną różnicę względem kontroli w danym medium hodowlanym, ANOVA, $\alpha=0,05$, $n=3$, test post hoc Dunetta.

W komórkach hodowanych w pożywce o $5,5 \text{ mmol/dm}^3$ stężeniu glukozy nie zaobserwowano różnic w ilości komórek, wynikających z aktywności nanocząstek srebra, niezależnie od gęstości hodowli. Jednocześnie, nanocząstki srebra powodowały zmniejszenie ilości tworzonych kolonii (Rys. 8), w sposób odwrotnie proporcjonalny do zastosowanego stężenia. Nanocząstki spowodowały zmiany w dyspersji komórek

podczas wzrostu hodowli, jednocześnie nie spowodowały istotnych statystycznie zmian w samej ilości komórek. W przypadku pożywki o zawartości glukozy (25 mmol/dm^3) ilość komórek spada wraz z wzrostem stężenia nanocząstek srebra (Rys. 9). Jest to efekt odwrotny w stosunku do pomiarów liczby kolonii (Rys. 8), gdzie wraz ze wzrostem stężenia nanocząstek srebra rosła liczba formowanych kolonii. Kolonie, w przypadku tego medium hodowlanego składały się z mniejszej ilości komórek w obecności nanocząstek srebra (Rys. 10).



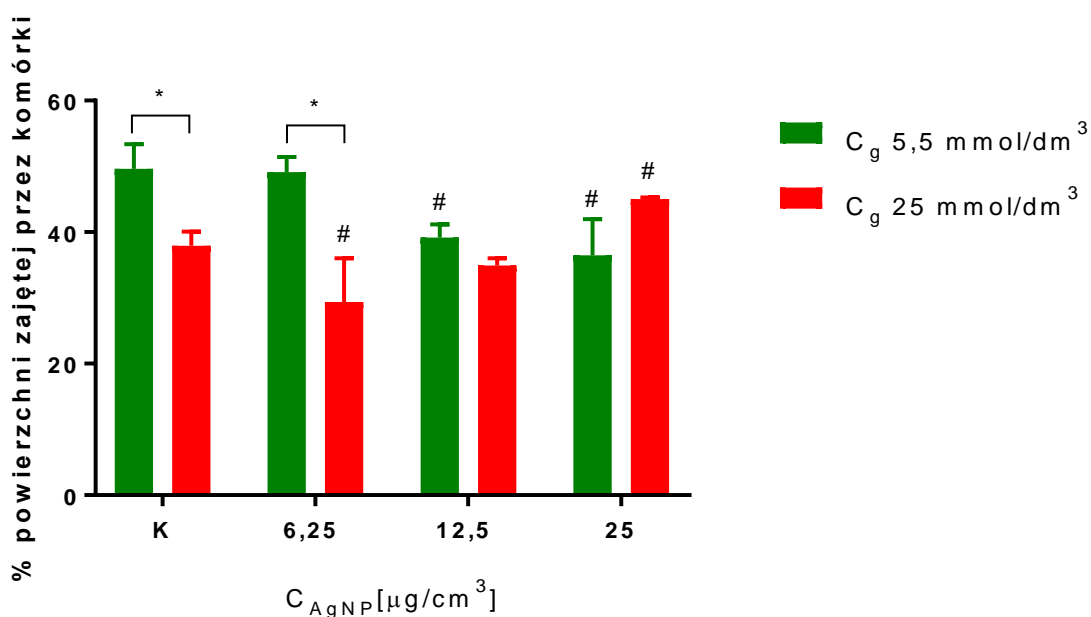
Rysunek 10. Przykładowy obraz morfologii komórek Hep G2 hodowanych w pożywkach o różnej zawartości glukozy.

5.4.3. Badanie zdolności migracyjnych komórek Hep G2 poddanych działaniu nanocząstek srebra

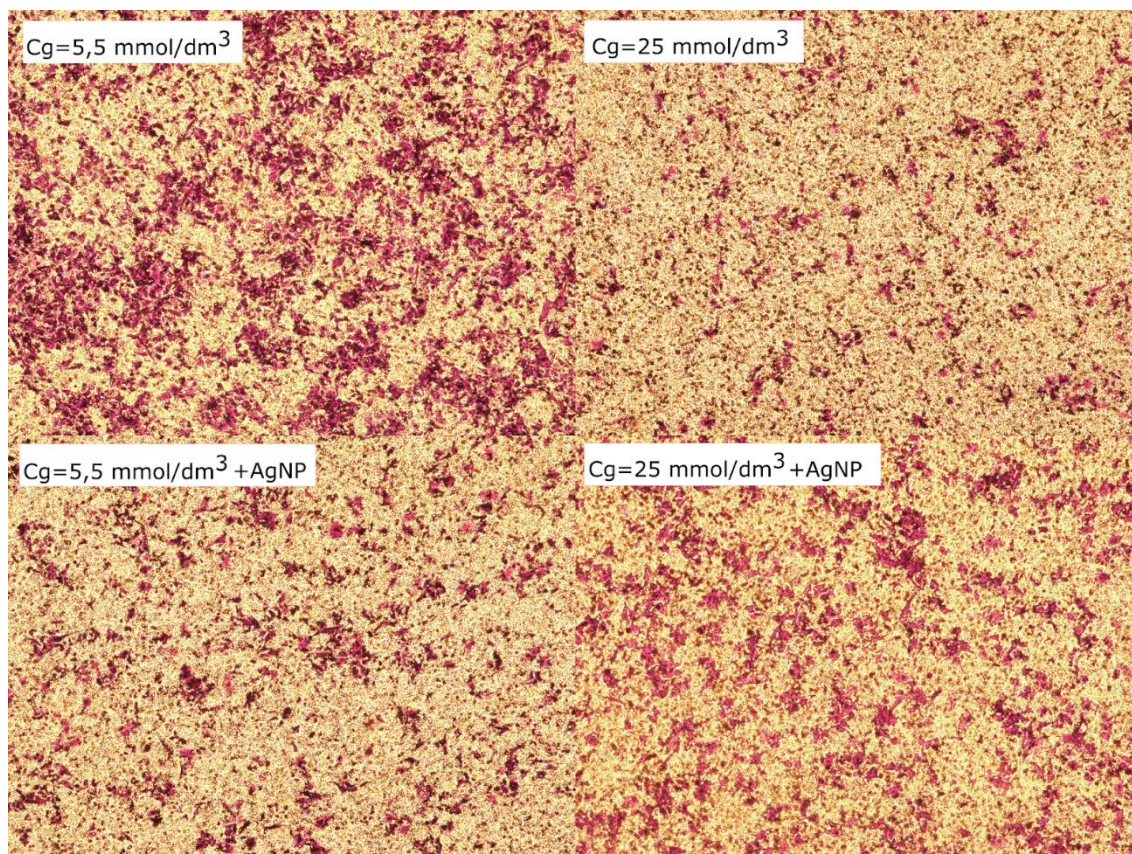
Zdolność do migracji komórek nowotworowych jest charakterystyczna dla przerzutowania. Zdolność do migracji, podobnie jak zwiększona proliferacja wynikają ze zmienionej ruchliwości i metabolizmu komórek [171]. W metastazujących komórkach następuje przebudowanie cytoszkieletu oraz zachodzą zmiany w macierzy zewnątrzkomórkowej, wywołane przez mechanizmy sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, która jest częściowo wrażliwa na stan redoks komórek [172, 173].

W celu określenia zmian w zdolności komórek Hep G2, hodowanych w pożywkach o dwóch wariantach stężeniowych i glukozy, poddanych działaniu nanocząstek srebra, do badania metastazy i migracji, użyto wkładów membranowych z warstwą Matrigelu. Komórki preinkubowano z nanocząstkami srebra, po czym przenoszono do wkładów

membranowych, w celu zminimalizowania oddziaływania nanocząstek srebra pozostających w medium kondycjonowanym na pory wkładów membranowych.



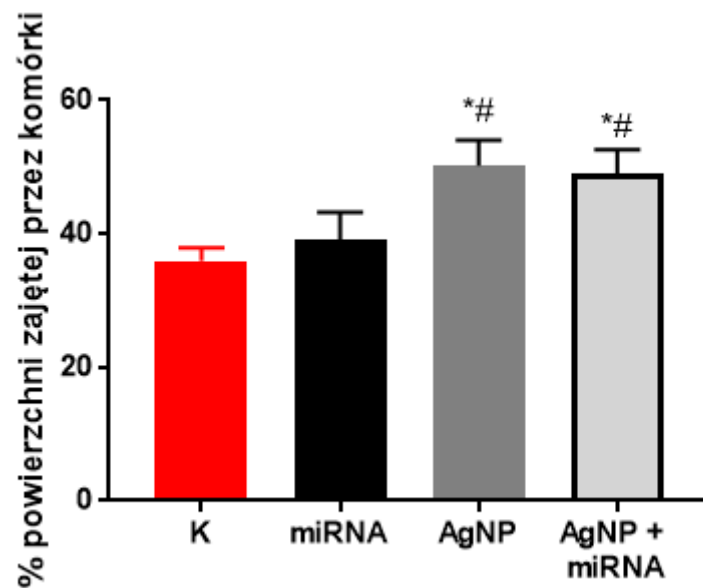
Rysunek 11. Powierzchnia wkładu membranowego zajętego przez komórki względem komórek kontrolnych po przejściu przez Matrigel po inkubacji z nanocząstkami srebra. We wszystkich próbach zastosowano 10^4 komórek. Powierzchnia zajęta przez komórki po przejściu przez Matrigel została wyznaczona z użyciem oprogramowania ImageJ. „*” oznacza statystycznie istotną różnicę w zajętej powierzchni między hodowlami prowadzonymi w medium suplementowanym odmiennym stężeniem glukozy przy danym stężeniu nanocząstek srebra. „#” oznacza statystycznie istotną różnicę między komórkami poddanymi działaniu nanocząstek srebra a próbkami kontrolnymi w danym stężeniu glukozy. ANOVA, $\alpha=0,05$, $n=3$ test post hoc Bonferroniego.



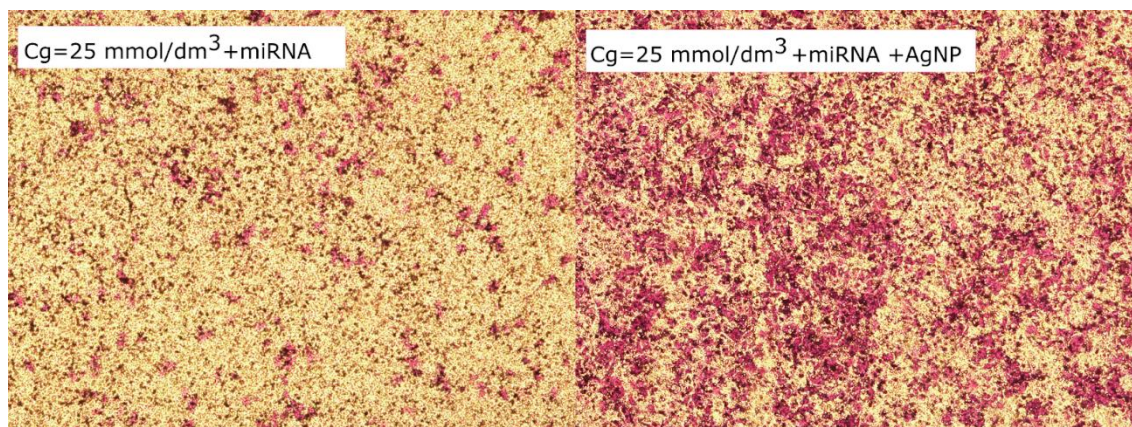
Rysunek 12. Reprezentatywny obraz utrwalonych komórek Hep G2 poddanych działaniu nanocząstek srebra po przejściu przez membranę we wkładach membranowych. Na zdjęciach przedstawiono obrazy wybranych par komórek hodowanych w pożywkach o różnej zawartości glukozy. Na ilustracjach przedstawiono zmianę w ilości komórek migrujących przez Matrigel pod wpływem nanocząstek srebra (w najwyższym użytym stężeniu) $25 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ w porównaniu do komórek kontrolnych.

Komórki linii Hep G2 hodowane w pożywce z zawartością $5,5 \text{ mmol}/\text{dm}^3$ glukozy wykazują wyższy potencjał inwazyjny, niż komórki hodowane w pożywce z zawartością $25 \text{ mmol}/\text{dm}^3$ glukozy. W przypadku komórek poddanych działaniu nanocząstek srebra w stężeniu $6,25 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ zaobserwowano podobną różnicę. Natomiast, przy stężeniach nanocząstek srebra $12,5$ i $25 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic między komórkami utrzymywanymi w pożywce o różnym stężeniu glukozy. W przypadku komórek hodowanych w pożywce o stężeniu glukozy $5,5 \text{ mmol}/\text{dm}^3$ zaobserwowano spadek potencjału migracyjnego po działaniu nanocząstek srebra w stężeniach $12,5$ i $25 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ w stosunku do prób kontrolnych. W przypadku komórek hodowanych w medium o stężeniu glukozy $25 \text{ mmol}/\text{dm}^3$ tendencja była odwrotna - nanocząstki

srebra spowodowały wzrost potencjału inwazyjnego przy stężeniu nanocząstek srebra na poziomie $25 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ (Rys. 11 i 12).



Rysunek 13. Powierzchnia wkładu membranowego zajętego przez komórki transfekowane syntetycznymi analogami (miR-29c-3p, miR-100-5p, miR-107, miR-195-5p, miR-221-3p) po inkubacji z nanocząstkami srebra w stężeniu $25 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. We wszystkich próbach zostało użyte 10^4 komórek. Powierzchnia zajęta przez komórki po przejściu przez Matrigel została wyznaczona z użyciem oprogramowania ImageJ. Znaki „*” oraz „#” oznaczają odpowiednio statystycznie istotną różnicę między danym wynikiem a próbami kontrolnymi i próbami po transfekcji wybranymi syntetycznymi analogami miRNA. ANOVA, $\alpha=0,05$, $n=3$, test post hoc Tukeya.



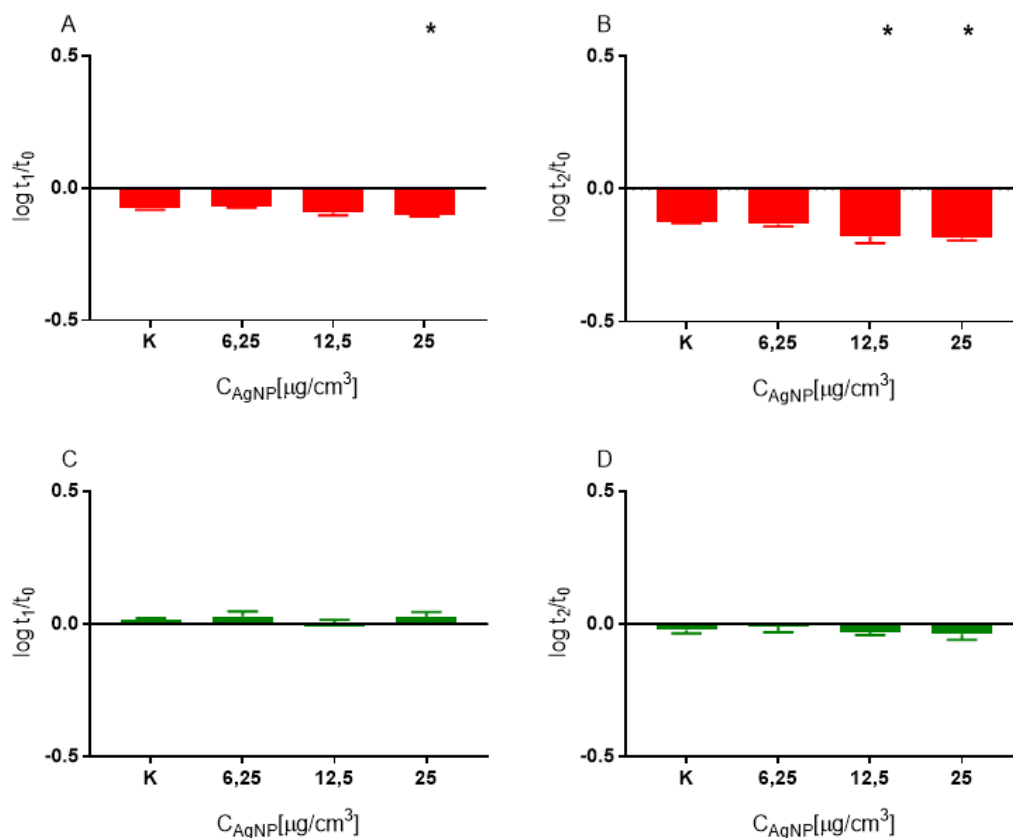
Rysunek 14. Reprezentatywny obraz utrwalonych transfekowanych syntetycznymi analogami miRNA komórek Hep G2 poddanych działaniu nanocząstek srebra po przejściu przez membranę we wkładach membranowych. Na zdjęciach przedstawiono obraz wybranej pary hodowli poddanych działaniu nanocząstek srebra ($25 \mu\text{g}/\text{cm}^3$). Zobrazowano zmianę ilości komórek migrujących przez Matrigel pod wpływem nanocząstek srebra.

Zarówno w przypadku inkubacji komórek linii Hep G2 z samymi nanocząstkami srebra jak i w przypadku połączenia inkubacji z nanocząstkami srebra i transfekcji syntetycznymi analogami miRNA zaobserwowano wzrost potencjału komórek do przejścia przez macierz błony podstawnej. Nie zaobserwowano różnic między komórkami transfekowanymi a próbkami kontrolnymi. Podobnie, nie zaobserwowano zmian między komórkami inkubowanymi z nanocząstkami srebra a komórkami jednocześnie pod działaniem nanocząstek srebra i transfekowanymi wybranymi syntetycznymi miRNA (Rys. 13 i 14).

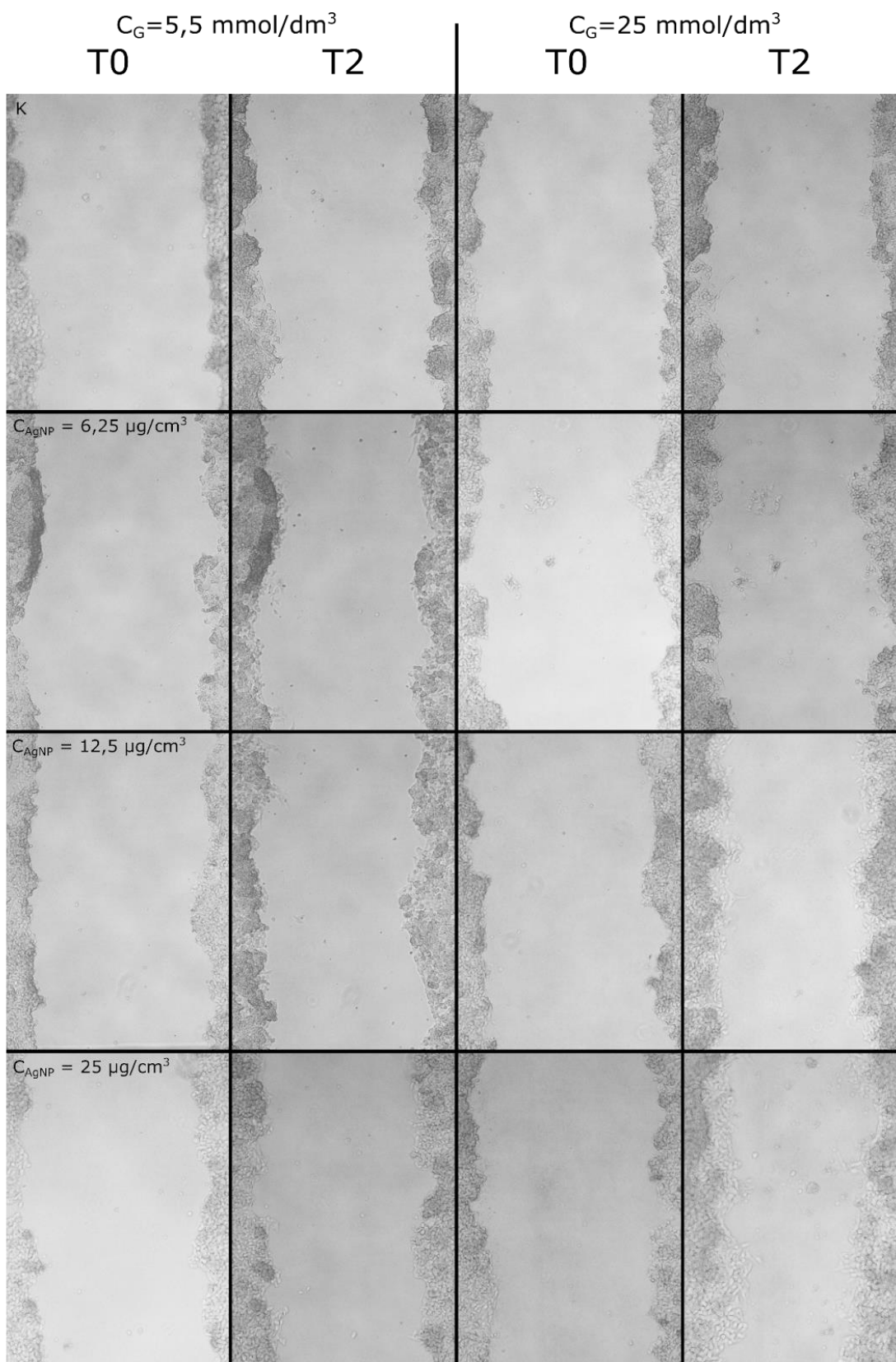
5.4.4. Analiza potencjału migracyjnego wykonana na podstawie zdolności komórek Hep G2 poddanych działaniu nanocząstek srebra do zarastania rysy

Test zarastania rysy (*ang. scratch test*) pozwala na ilościowe określenie zdolności komórek do migracji, pod wpływem działania wybranych czynników, na powierzchni płytki [174].

Test przeprowadzono zgodnie z wytycznymi protokołu [175]. Komórki Hep G2 traktowano nanocząstkami srebra w stężeniu $25 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ w celu weryfikacji hipotezy, czy hodowla na mediach o zróżnicowanej dostępności glukozy wpłynie na potencjał migracyjny komórek modulowany nanocząstkami srebra.

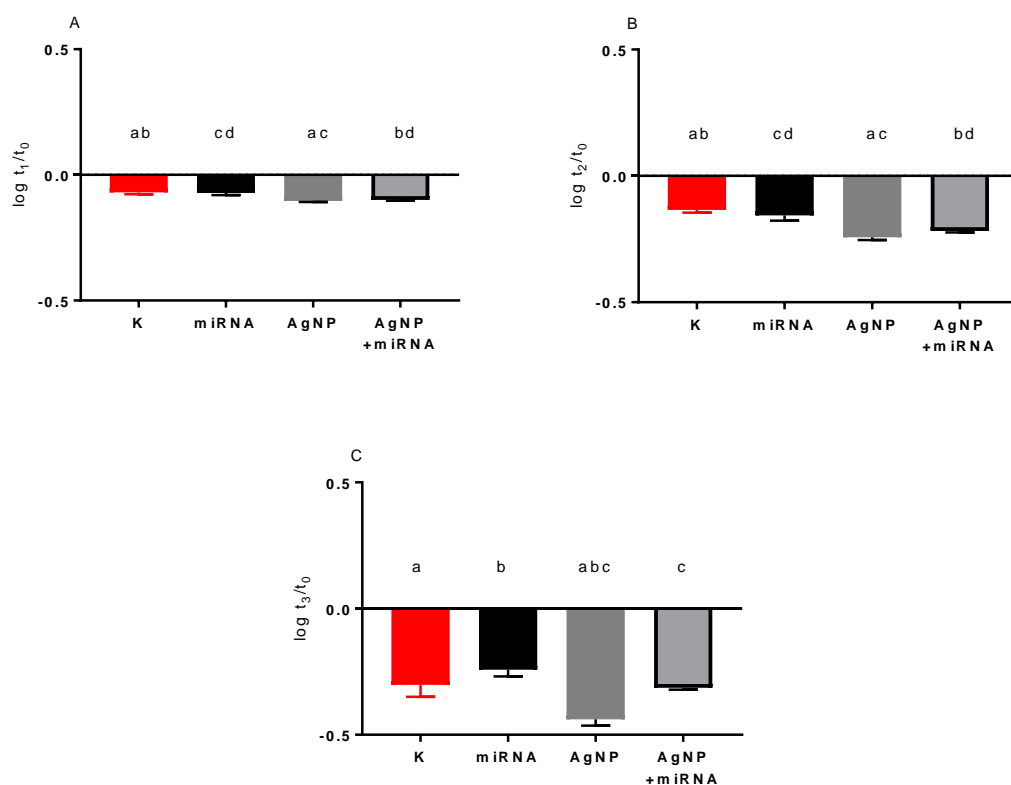


Rysunek 15. Intensywność przejścia epitelialno-mezenchymalnego komórek linii Hep G2 hodowanych w medium suplementowanym glukozą o stężeniu 5,5 mmol/dm³ (C, D) i 25 mmol/dm³ (A, B) poddanych działaniu nanocząstek srebra w stężeniach 6,25, 12,5, 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Wyniki zostały przedstawione jako logarytm z krotności zmiany pola powierzchni rysy po czasie t1: 24 godziny i t2: 48 godzin od wykonania rysy. „*” oznacza statystycznie istotną zmianę względem kontroli, ANOVA, $\alpha=0,05$, $n=16$, test post hoc Dunetta.

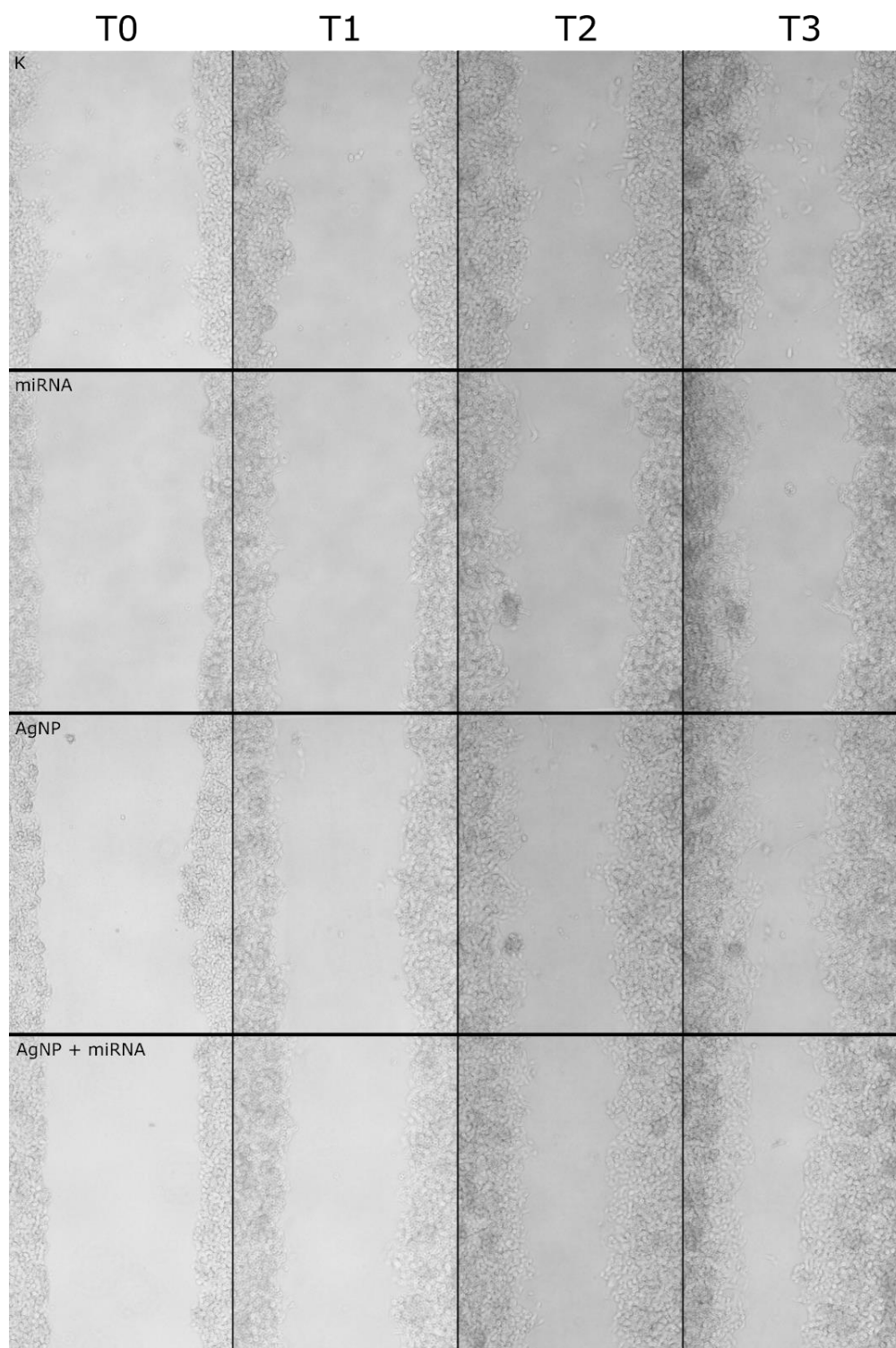


Rysunek 16. Poglądowy obraz zmiany pola powierzchni rysy, wykonanej na monowarstwie, komórek Hep G2 poddanych działaniu nanocząstek srebra. Komórki hodowane w pożywce o zawartości $5,5 \text{ mmol/dm}^3$ i 25 mmol/dm^3 .

Z analizy danych wynika, że nanocząstki srebra intensyfikowały proces przejścia epitelialno-mezenchymalnego w hodowli komórek Hep G2, w przypadku medium suplementowanego glukozą o stężeniu 25 mmol/dm³. Statystycznie istotne różnice zaobserwowano dla nanocząstek srebra w stężeniu 25 µg/cm³ dla 24 godzin od wykonania rysy oraz dla stężeń 12,5 i 25 µg/cm³ po 48 godzinach od wykonania rysy. Nanocząstki srebra nie wpływają na przejście epitelialno-mezenchymalne komórek linii Hep G2 hodowanych w pożywce suplementowanej glukozą w stężeniu 5,5 mmol/dm³ (Rys. 15 i 16).



Rysunek 17. Intensywność przejścia epitelialno-mezenchymalnego komórek Hep G2 transfekowanych syntetycznymi analogami (miR-29c-3p, miR-100-5, miR-107, miR-195-5p, miR-221-3p) w stężeniu 5 nmol/dm³ (każdy), hodowanych w medium suplementowanym glukozą w stężeniu 25 mmol/dm³ i poddanych działaniu nanocząstek srebra w stężeniu 25 µg/cm³. Wyniki zostały przedstawione jako logarytm z krotności zmiany pola powierzchni rysy po czasie t₁-24(A), t₂-48(B) oraz t₃-72(C) godziny od wykonania rysy. Litery „a”, „b”, „c” i „d” oznaczają istotną statystycznie różnicę między daną parą wyników, ANOVA, α=0,05, n=16, test post hoc Tukeya.



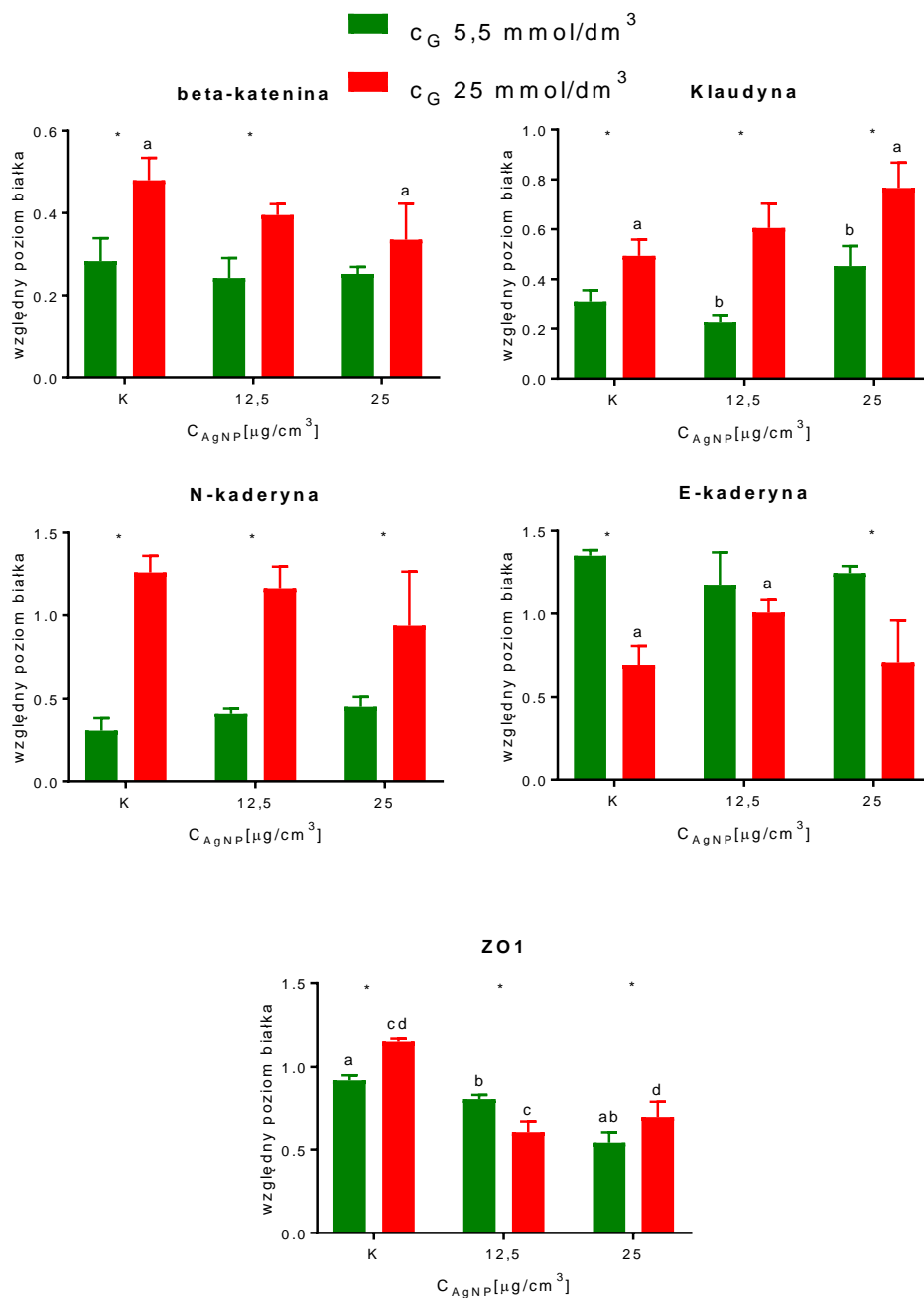
Rysunek 18. Poglądowy obraz zmiany pola powierzchni rysy w czasie, wykonanej na monowarstwie, transfekowanych syntetycznymi analogami wybranych miRNA, komórek Hep G2 poddanych działaniu nanocząstek srebra. Komórki hodowane w pożywce o zawartości 25 mmol/dm^3 .

Dodanie syntetycznych analogów (miR-29c-3p, miR-100-5p, miR-107, miR-195-5p, miR-221-3p) nie spowodowało zmian w stosunku do kontroli w żadnym badanym czasie inkubacji. Dodanie nanocząstek srebra zwiększyło szybkość zarastania rasy w stosunku do komórek kontrolnych i komórek poddanych działaniu analogów miRNA we wszystkich zbadanych czasach inkubacji. Dodanie zarówno nanocząstek srebra i syntetycznych analogów miRNA spowodowało taki sam profil zmian dla 24 i 48 godzin inkubacji, jak w przypadku samych nanocząstek srebra. Po 72 godzinach od wykonania rasy, zaobserwowano, że połączony wpływ nanocząstek srebra i miRNA nie przyspieszył zarastania rasy w stosunku do komórek kontrolnych, w odróżnieniu do zastosowania samych nanocząstek srebra. Transfekcja syntetycznymi analogami miRNA zahamowała zwiększenie szybkości zarastania rasy przez komórki linii Hep G2 wywołane przez nanocząstki srebra, ale efekt był widoczny dopiero po 72 godzinach inkubacji (Rys 17 i 18).

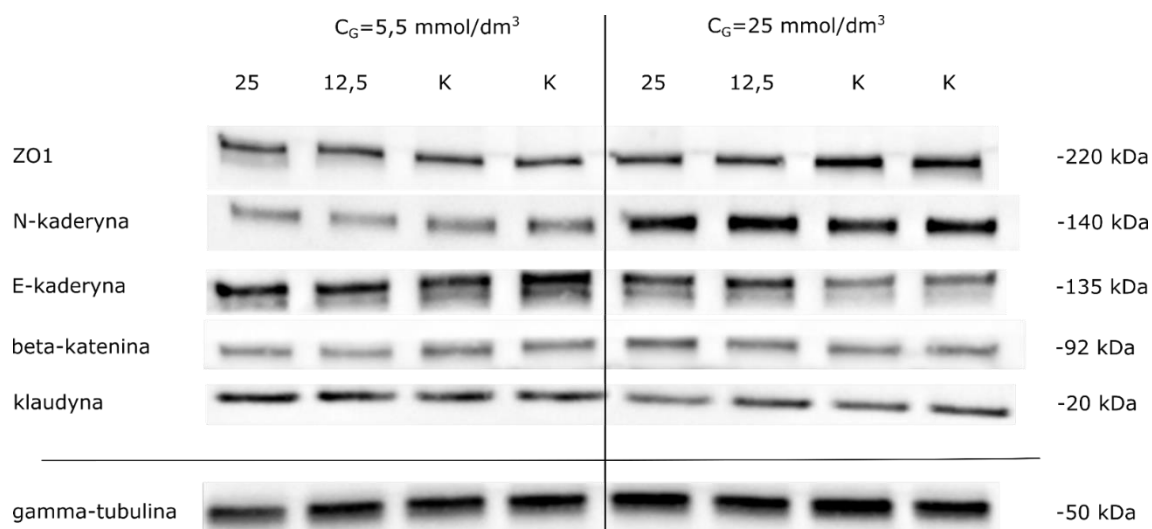
5.4.5. Pomiar poziomu wybranych białek, kluczowych dla procesu EMT w komórkach Hep G2 poddanych działaniu nanocząstek srebra

Proces EMT jest uzależniony na każdym etapie od ekspresji i umiejscowienia białek sygnalizacyjnych i strukturalnych, kierujących zmianami zachodzącymi w komórce. Najlepiej zbadanymi i udokumentowanymi zmianami białkowymi w komórkach dokonujących przejścia epitelialno-mezenchymalnego jest spadek poziomu E-kadheryny na rzecz wzrostu poziomu N-kadheryny. Taka zmiana ekspresji kadheryn nosi w literaturze angielską nazwę "cadherin switch". Poza białkami z rodziny kadheryn, w uzyskanie przez komórkę zdolności do migracji są również kadeniny, okludyny, klaudyny czy białka z rodziny snail.

W celu głębszego zrozumienia mechanizmów stojących za zmianami w zdolności do migracji komórek Hep G2 poddanych działaniu nanocząstek srebra, przeprowadzono ocenę poziomu białek uczestniczących w przejściu nabłonkowo-mezenchymalnym, za pomocą metody Western blot. Zmiany w ilości badanych białek mają wzorzec zmian w komórkach przeprowadzających EMT i są zbieżne z danymi literaturowymi na ten temat.

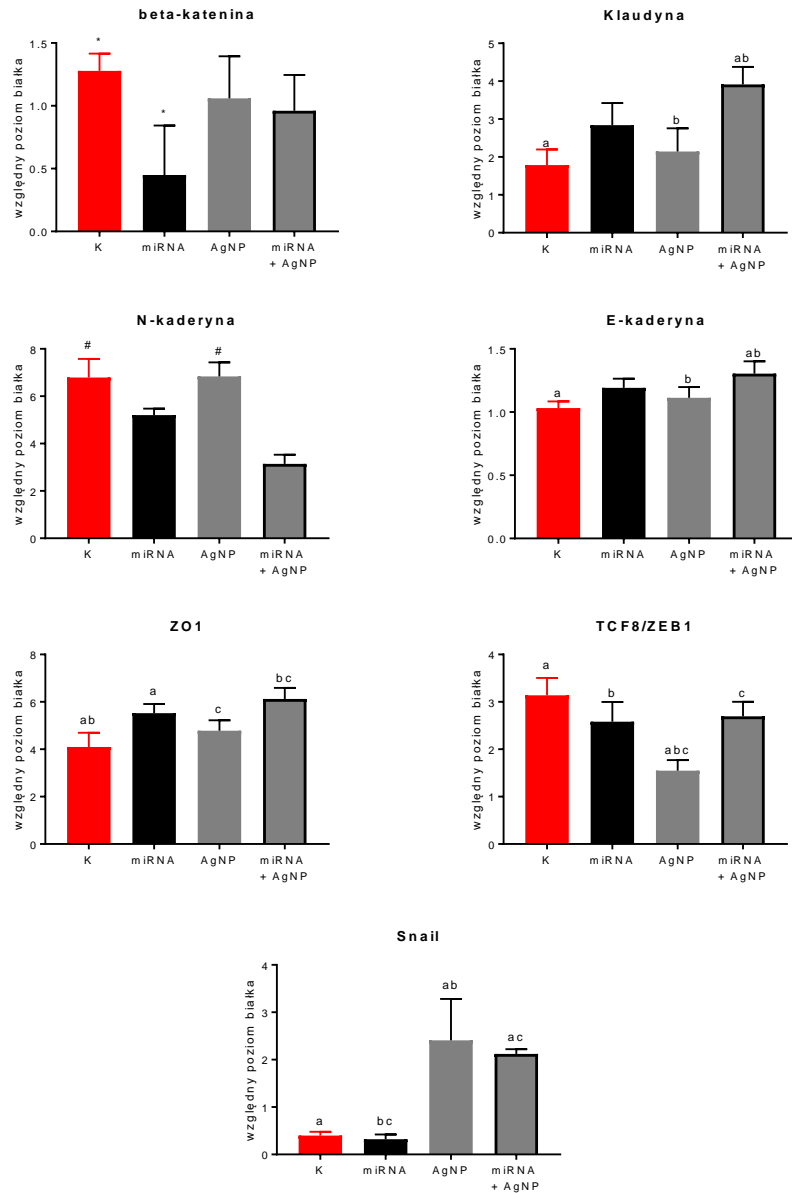


Rysunek 19. Poziom białek związanych z przejściem epitelialno-mezenchymalnym w komórkach linii Hep G2 hodowanych w mediach suplementowanych glukozą w dwóch wariantach stężenia: 5,5 mmol/dm^3 oraz 25 mmol/dm^3 . Komórki poddano działaniu nanocząstek srebra na 24 godziny. „*” oznacza statystycznie istotną różnicę w ekspresji danego białka w komórkach hodowanych w medium o różnym stężeniu glukozy poddanych działaniu tego samego stężenia nanocząstek srebra. Oznaczenia literowe oznaczają statystycznie istotne różnice w ekspresji między daną parą wyników. Względna ekspresja została określona densytometrycznie względem ekspresji gamma-tubuliny, $n=3$, ANOVA, $\alpha=0,05$, test post hoc Bonferroni.

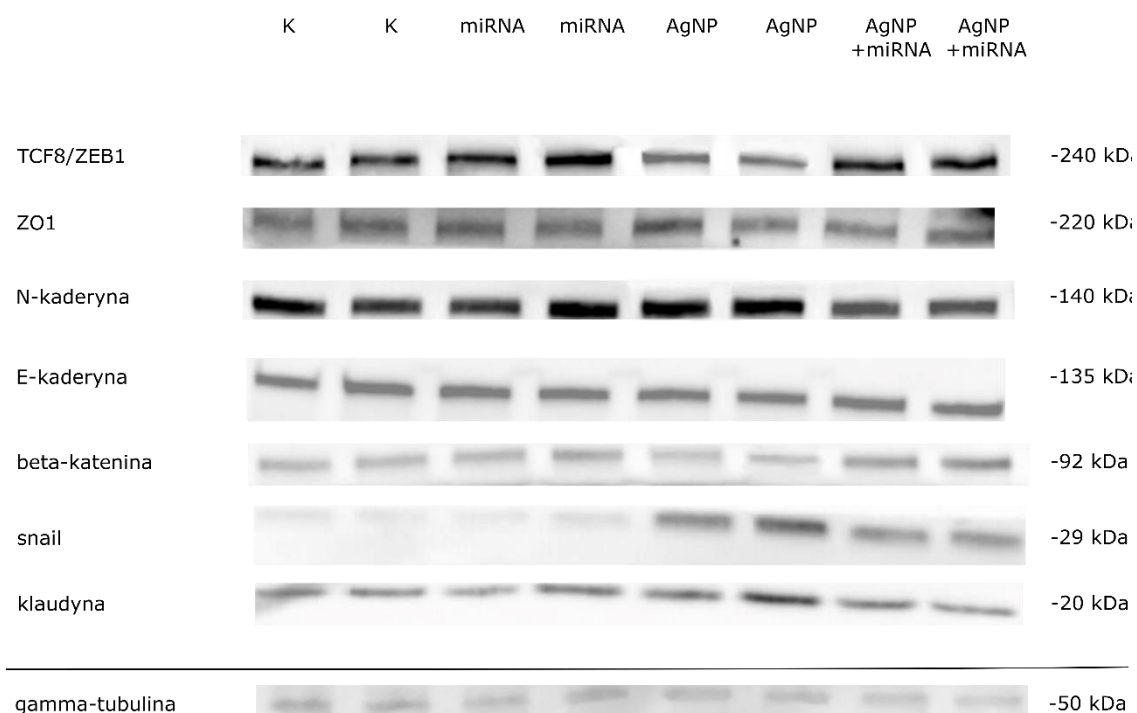


Rysunek 20. Reprezentatywny obraz immunodetekcji białek zaangażowanych w EMT w komórkach Hep G2 hodowanych w dwóch wariantach dostępności glukozy i poddanych działaniu nanocząstek srebra. Gamma-tubulina została wybrana jako kontrola referencyjna dla doświadczenia.

Nanocząstki srebra modulowały poziom badanych białek. W komórkach hodowanych w medium o wyższym stężeniu glukozy (25 mmol/dm^3) zwiększeniu uległy poziomy klaudyny-1 i E-kadheryny a obniżeniu uległ poziom białka ZO1. Natomiast, w komórkach hodowanych w medium o niższym stężeniu glukozy, po ekspozycji na nanocząstki srebra, zwiększeniu ulegał poziom klaudyny-1 a obniżeniu białko ZO1. W przypadku beta-kaeniny, klaudyny-1 i N-kadheryny wyższy poziom zaobserwowano w komórkach hodowanych w medium o wyższym stężeniu glukozy, niezależnie od zastosowanego stężenia nanocząstek srebra. Poziom E-kadheryny był większy w komórkach hodowanych w medium o niższym stężeniu glukozy dla komórek kontrolnych i dla komórek poddanych działaniu nanocząstek srebra w stężeniu 25 µg/cm^3 . W przypadku białka ZO1 zaobserwowano wzrost poziomu białka w medium suplementowanym glukozą w stężeniu 25 mmol/dm^3 w komórkach kontrolnych oraz poddanych działaniu nanocząstek srebra w stężeniu 25 µg/cm^3 . W przypadku komórek inkubowanych z nanocząstkami srebra w stężeniu $12,5 \text{ µg/cm}^3$ większy poziom zaobserwowano w przypadku medium z glukozą o stężeniu $5,5 \text{ mmol/dm}^3$ (Rys. 19 i 20).



Rysunek 21. Poziom białek związanych z przejściem epithelialno-mezenchymalnym w komórkach linii Hep G2 hodowanych w pożywce suplementowanej glukozą w stężeniu 25 mmol/dm³. Komórki poddano działaniu nanocząstek srebra w stężeniu 25 µg/cm³ oraz transfekcji syntetycznymi analogami (miR-29c-3p, miR-100-5, miR-107, miR-195-5p, miR-221-3p) w stężeniu 5 nmol/dm³. Zbadane białka to beta-katenina, klaudyna-1, N-kadheryna, E-kadheryna, ZO-1, TCF8/ZEB1, snail. Na wykresach zestawiono średnie z pomiarów densytometrycznych wraz z odchyleniem standardowym. Oznaczenia literowe określają istotne statystycznie zmiany między danymi parami wyników. „#” oznacza parę wyników w danym zestawieniu w między którą nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy, n=3, ANOVA, α=0,05, test post hoc Tukeya.



Rysunek 22. Przykładowy obraz immunodetekcji białek zaangażowanych w EMT w komórkach Hep G2 transfekowanych syntetycznymi analogami miRNA i poddanych działaniu nanocząstek srebra. Gama-tubulina została wybrana jako kontrola referencyjna dla doświadczenia.

Transfekcja syntetycznymi analogami miRNA w połączeniu z zastosowaniem nanocząstek srebra spowodowała wzrost ilości kładyny-1 i E-kadheryny w porównaniu do prób kontrolnych i prób w których komórki były poddane działaniu nanocząstek srebra. Sama transfekcja syntetycznymi analogami miRNA i sama inkubacja z nanocząstkami srebra nie wywołały zmian w poziomie tych białek w porównaniu do prób kontrolnych. W przypadku N-kadheryny inkubacja z nanocząstkami srebra nie wykazała efektu modulującego ekspresji, w stosunku do prób kontrolnych. Jednocześnie, sama transfekcja syntetycznymi analogami miRNA jak i transfekcja połączona z inkubacją z nanocząstkami srebra wywołały spadek ilości białka zarówno w stosunku do prób kontrolnych jak i w stosunku do komórek poddanych działaniu nanocząstek srebra, przy czym spadek zaobserwowany dla połączonego efektu nanocząstek srebra i transfekcji syntetycznymi analogami miRNA był znacząco większy. Dla białka ZO-1 zaobserwowano znaczący wzrost ekspresji w stosunku do komórek kontrolnych dla prób transfekowanych syntetycznymi analogami miRNA i dla prób transfekowanych syntetycznymi analogami miRNA i inkubowanych z nanocząstkami srebra, przy czym wzrost był większy w drugim

przypadku. Same nanocząstki srebra nie wywołały zmian w ekspresji tego białka w stosunku do prób kontrolnych, jednocześnie ilość białka była niższa niż w komórkach poddanych zarówno transfekcji syntetycznymi oligonukleotydami i inkubacji z nanocząstkami srebra. Poziom białka TCF8/ZEB1 w komórkach linii Hep G2 po inkubacji z nanocząstkami srebra był niższy niż w próbach kontrolnych, transfekowanych syntetycznymi analogami miRNA i w komórkach poddanych zarówno inkubacji z nanocząstkami srebra jak i transfekcji miRNA. Białko snail uległo zwiększonej ekspresji w komórkach poddanych działaniu nanocząstek srebra, a transfekcja syntetycznymi oligonukleotydami pozostała bez wpływu na jego ilość (Rys. 21 i 22).

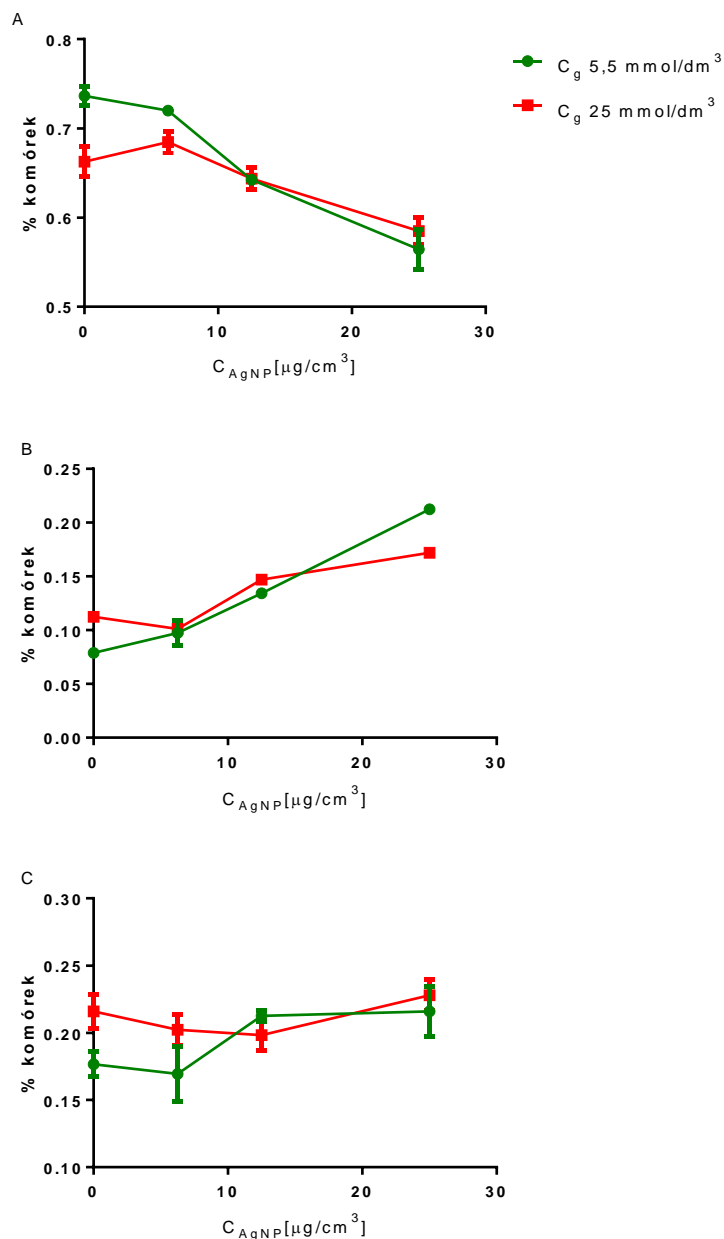
5.4.6. Analiza cyklu komórkowego w komórkach Hep G2

Cykl komórkowy jest procesem umożliwiającym powielanie materiału genetycznego i w rezultacie podział komórek. Na drodze podziału komórka przeprowadza cykl komórkowy, który jest obostrzony punktami kontrolnymi. Dzięki nim, w razie nieprawidłowości w materiale genetycznym, możliwa jest jego naprawa lub kierowanie komórki na drogę apoptozy.

W przypadku komórek nowotworowych, dochodzi do uszkodzeń i mutacji materiału genetycznego, co prowadzi do zaburzeń w działaniu punktów kontrolnych i tym samym prowadzeniu cyklu komórkowego pomimo uszkodzeń materiału. Na cykl komórkowy mogą wpływać warunki środowiskowe, wywołując stres oksydacyjny i przyczyniając się do uszkodzeń DNA, mogą wpływać na białka takie jak kinazy cyklinozależne, co moduluje sygnalizację komórki i prowadzenie cyklu komórkowego.

Jodek propidyny jest barwnikiem fluorescencyjnym, który wiąże się do większego rowka dsDNA. Cytometryczny pomiar utrwalonych komórek barwionych jodkiem propidyny jest najpowszechniejszą metodą wykorzystywaną w badaniu cyklu komórkowego [176].

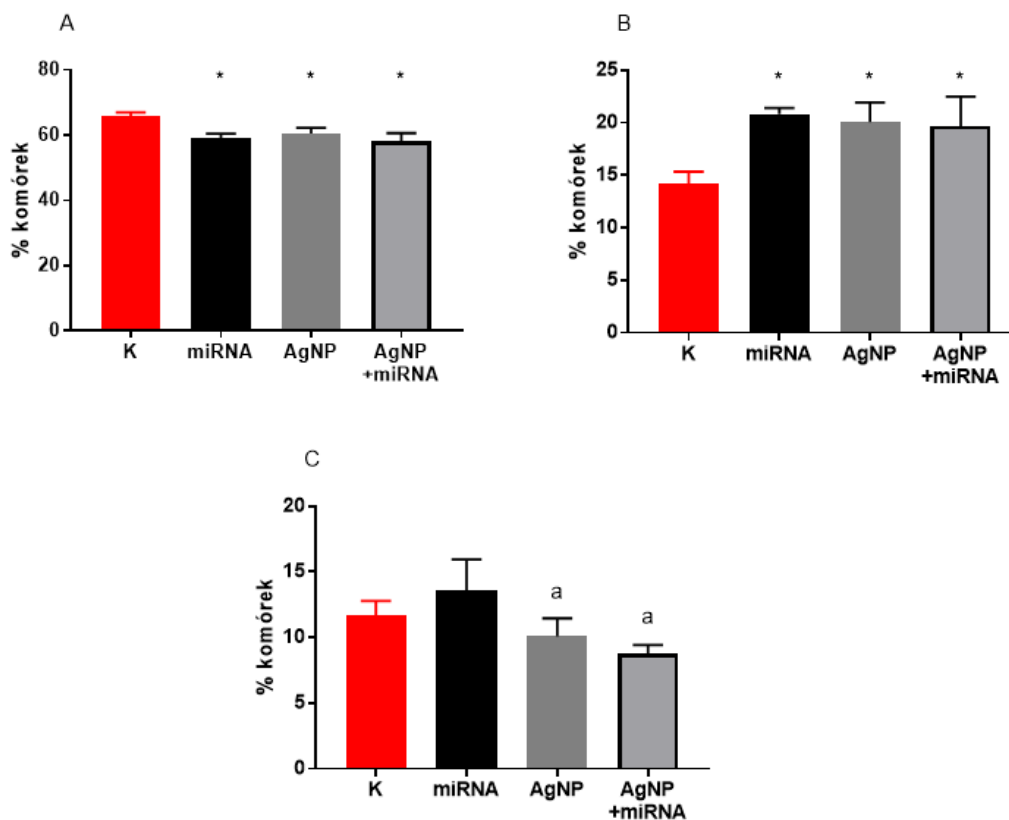
W celu weryfikacji wpływu nanocząstek srebra na cykl komórkowy komórek Hep G2 wykonano pomiar cytometryczny z wykorzystaniem jodku propidyny. Pomiar wykonano z użyciem cytometru przepływowego, intensywność fluorescencji odczytywano w kanale PE.



Rysunek 23. Odsetek komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego (A - faza G1, B - faza G2, C - faza S). Komórki były hodowane w medium DMEM o różnych stężeniach glukozy, $5,5 \text{ mmol}/\text{dm}^3$ i $25 \text{ mmol}/\text{dm}^3$. Komórki poddano działaniu nanocząstek srebra w stężeniach 6,25, 12,5 i $25 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. Punkty reprezentują średnie wraz ze standardowym błędem średniej, $n=3$, ANOVA, $\alpha=0,05$, test post hoc Bonferroniego.

Na podstawie uzyskanych wyników można postawić tezę, że stężenie glukozy w medium hodowlanym różnicuje hodowle komórek Hep G2 pod względem liczności komórek w różnych fazach cyklu komórkowego (Rys. 23). Istotnie statystycznie różnice zaobserwowano między licznością komórek znajdujących się w fazach G1 i G2 cyklu

komórkowego. Odpowiednio, w medium o niższej zawartości glukozy zaobserwowano 7,46 % komórek więcej w fazie G1 i 3,35 % mniej w fazie G2 niż w medium o wyższej zawartości glukozy. Dodanie nanocząstek srebra spowodowało obniżenie odsetka komórek w fazie G1 oraz jego podwyższenie w fazie G2 w obydwu wariantach medium hodowlanego. Jednocześnie dynamika zmian była różna, w zależności od zastosowanego stężenia glukozy w medium hodowlanym. Zmian były mniejsze w hodowli utrzymywanej na pożywce o wyższym stężeniu glukozy, co spowodowało odwrócenie stosunku liczebności komórek w fazie G2 cyklu komórkowego w badanych wariantach. W warunkach kontrolnych, w hodowli utrzymywanej w medium o wyższym stężeniu glukozy, obecnych było więcej komórek w fazie G2, niż w medium o niższym stężeniu glukozy. Dodanie nanocząstek srebra w stężeniu $12,5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ spowodowało wzrost odsetka komórek w fazie G2 w obu wariantach medium hodowlanego i jednocześnie zniwelowało różnice obecne w próbach kontrolnych. Dodanie wyższego stężenia nanocząstek srebra ($25 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) spowodowało w obu wariantach hodowli dalszy wzrost odsetka komórek w fazie G2 cyklu i powstanie odwrotnych różnic między mediami hodowlanymi, w stosunku do różnic, zaobserwowanych w przypadku komórek kontrolnych. W tym wypadku zaobserwowano większą ilość komórek w fazie G2 w medium o niższym stężeniu glukozy (różnica na poziomie 4,03 %).



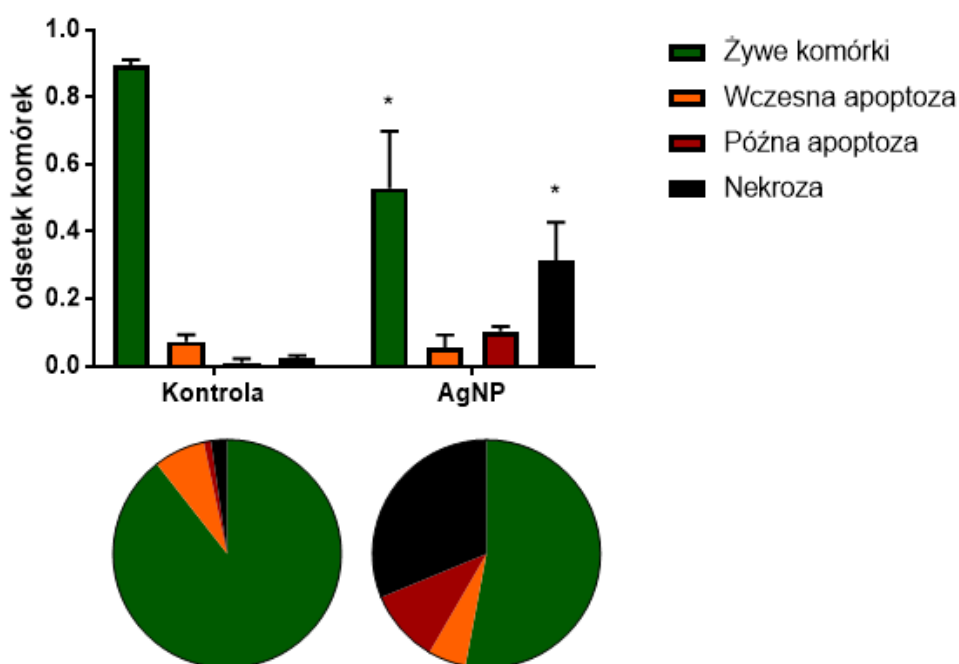
Rysunek 24. Odsetek komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego (A - faza G1, B - faza G2, C - faza S), przedstawiona jako procent komórek. Komórki były hodowane w medium DMEM suplementowanym glukozą w stężeniu 25 mmol/dm³. Komórki poddano działaniu nanocząstek srebra oraz syntetycznych oligonukleotydów (miR-29c-3p, miR-100-5p, miR-107, miR-195-5p, miR-221-3p), w stężeniach, odpowiednio 25 µg/cm³ i 5 nmol/dm³ (dla każdego syntetycznego miRNA). Na wykresie zestawiono średnie z odchyleniem standardowym, „*” oznacza statystycznie istotną różnicę w stosunku do kontroli, a oznacza statystycznie istotną różnicę między daną parą wyników, ANOVA, α=0,05, n=16, test post hoc Tukeya.

W przypadku komórek linii Hep G2 hodowanych w pożywce suplementowanej glukozą w stężeniu 25 mmol/dm³ zarówno transfekcja syntetycznymi analogami miRNA, wpływ nanocząstek srebra i oba czynniki zastosowane jednocześnie spowodowały podobny spadek odsetka komórek w fazie G1 cyklu komórkowego, odpowiednio o 6,77, 5,17 i 7,50 %. Jednocześnie frakcja komórek w fazie G2 cyklu komórkowego zwiększyła się po zastosowaniu wymienionych czynników o odpowiednio 6,63, 6,5 i 5,5 %. Nie zaobserwowano addytywnego efektu dla nanocząstek srebra i nanocząstek srebra w połączeniu z transfekcją syntetycznymi analogami miRNA. W fazie S zaobserwowano

spadek odsetka komórek po transfekcji syntetycznymi analogami miRNA inkubowanych z nanocząstkami srebra w stosunku do komórek transfekowanych oligonukleotydami kontrolnymi i inkubowanych z nanocząstkami srebra (Rys. 24).

5.4.7. Badanie apoptozy w komórkach linii Hep G2 poddanych działaniu nanocząstek srebra

Apoptoza jest autonomicznym procesem zachodzącym w komórce umożliwiającym jej usunięcie bez wywoływania procesu zapalnego w tkance. Bodziec prowadzący do apoptozy może być wynikiem międzykomórkowego przekazywania sygnałów lub efektem uszkodzeń funkcjonalnych komórki. Nekroza z kolei jest procesem nagłym, wynikającym z niekontrolowanych zmian środowiska komórki, prowadzącym do uwolnienia czynników prozapalnych z wnętrza komórki. W obliczu toksyczności nanocząstek srebra, zasadnym było zbadanie w jaki sposób ograniczają one przeżywalność komórek linii Hep G2.



Rysunek 25. Odsetek komórek żywych, apoptotycznych i nekrotycznych. Liczność frakcji określono na podstawie obserwacji mikroskopowych po barwieniu z użyciem jodku propidyny i Hoechst 33342. „*” oznacza istotną statystycznie różnicę w ilości komórek danej frakcji, między próbami po inkubacji z nanocząstkami srebra a komórkami kontrolnymi, ANOVA, $\alpha=0,05$, $n=16$, test post hoc Bonferroniego.

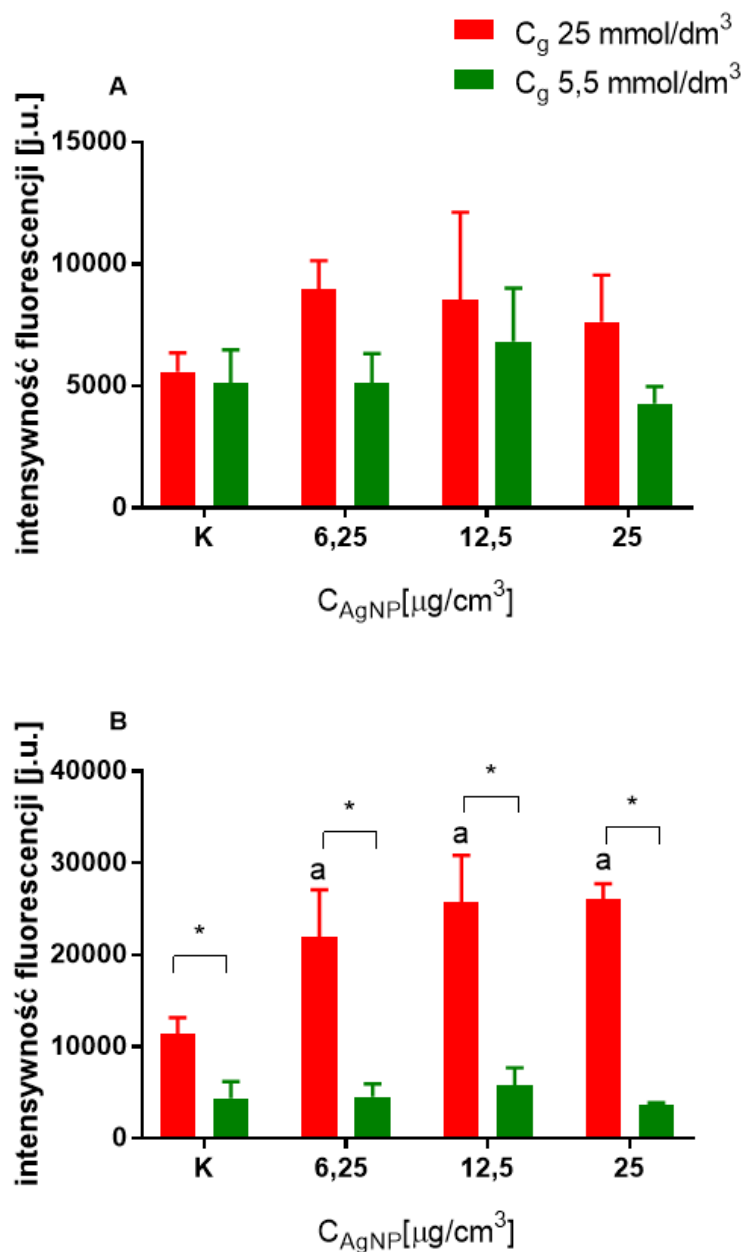
W hodowli komórek Hep G2, w medium o zawartości glukozy 25 mmol/dm³, nanocząstki srebra spowodowały znaczny spadek komórek określanych jako komórki żywe o 36,43 %. Jednocześnie zaobserwowano wzrost odsetka komórek nekrotycznych o 28,94 % w stosunku do komórek z prób kontrolnych. Suma komórek apoptotycznych w próbach kontrolnych wyniosła 8,32 %. Natomiast w komórkach poddanych działaniu nanocząstek srebra 25,8 %.

5.4.8. Ilościowe badanie reaktywnych form tlenu powstających w komórkach wobec nanocząstek srebra i transfekcji wybranymi, syntetycznymi analogami miRNA

Zważywszy na znaczące różnice w aktywności parametrów obrony antyoksydacyjnej w komórkach linii Hep G2 w zależności od stanu metabolicznego wynikającego z zawartości glukozy w medium hodowlanym przeprowadzono eksperymenty pozwalające ocenić ilość powstających reaktywnych form tlenu w komórkach kontrolnych oraz komórkach transfekowanych syntetycznymi analogami miRNA i poddanych działaniu nanocząstek srebra. W literaturze produkcja reaktywnych form tlenu jest wymieniana jako główny efekt toksyczny w działaniu nanocząstek srebra.

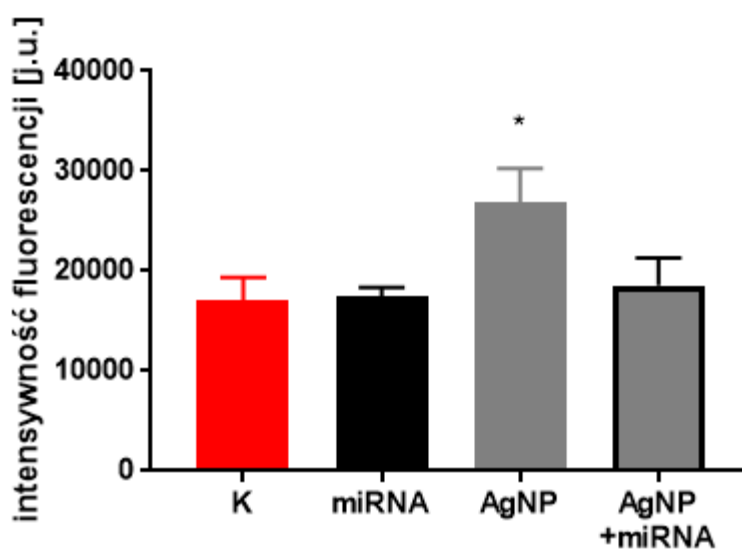
5.4.8.1. Ilościowa analiza produkowanych przez komórkę reaktywnych form tlenu

Diocyan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (H₂DCFDA) jest zredukowaną formą fluoresceiny. W komórkach zostaje przekształcony przez esterazy do 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (H₂DCF) a następnie utleniony przez reaktywne formy tlenu do 2',7'-dichlorodrofluoresceiny (DCF). DCF wykazuje silną fluorescencję o maksimum emisji przy długości fali 530 nm. W poniższych doświadczeniach prowadzonych z użyciem metod cytometrii przepływowej fluorescencja sondy była obserwowana w kanale FITC.



Rysunek 26. Intensywność fluorescencji utlenionej sondy mierzonej wewnątrz komórek w kanale FITC. Komórki linii Hep G2 hodowane w mediach o różnym stężeniu glukozy (5,5 i 25 mmol/dm³) poddano działaniu nanocząstek srebra przez 12 godzin. Inkubacja ze znacznikiem fluorescencyjnym H₂DCFDA trwała 10 min (A) i 60 min (B). Na wykresie zestawiono średnie wraz z odchyleniem standardowym. „*” oznacza istotne statystycznie różnice między parami prób poddanych działaniu tego samego stężenia nanocząstek srebra, ale hodowanych w mediach o różnym stężeniu glukozy. „a” oznacza istotne statystycznie różnice między danym wynikiem a komórkami kontrolnymi hodowanymi z użyciem tego samego stężenia glukozy, ANOVA, $\alpha=0,05$, $n=3$, test post hoc Bonferroniego.

Nanocząstki srebra spowodowały wzrost intensywności fluorescencji pochodzącej z komórek hodowanych w medium suplementowanym glukozą o stężeniu 25 mmol/dm³. w każdym z testowanych stężeń (6,25, 12,5, 25 µg/cm³). W przypadku komórek hodowanych w medium o niższym stężeniu glukozy (5,5 mmol/dm³) nie zaobserwowano wpływu nanocząstek srebra na intensywność fluorescencji. Jednocześnie, poziom intensywności fluorescencji był znacząco wyższy w komórkach kontrolnych hodowanych w medium o wyższym stężeniu glukozy. Inkubacja z nanocząstkami srebra zwiększa różnice w intensywności fluorescencji obserwowanej w komórkach obu hodowli (Rys. 26).



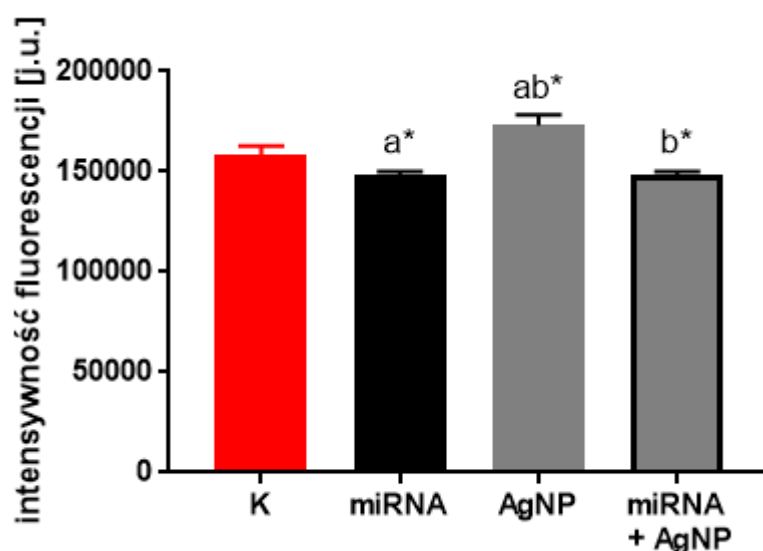
Rysunek 27. Intensywność fluorescencji utlenionej sondy mierzonej wewnątrz komórek w kanale FITC. Komórki linii Hep G2 hodowane w medium suplementowanym glukozą w stężeniu 25 mmol/dm³ poddano działaniu nanocząstek srebra o stężeniu 25 µg/cm³ oraz syntetycznych analogów (miR-29c-3p, miR-100-5p, miR-107, miR-195-5p, miR-221-3p) w stężeniu 5 nmol/dm³ (każdy). Na wykresie zestawiono średnie wraz z odchyleniem standardowym. „*” oznacza statystycznie istotną różnicę w stosunku do każdego innego wyniku. ANOVA, $\alpha=0,05$, $n=3$, test post hoc Tukeya.

Nanocząstki srebra spowodowały zwiększenie fluorescencji DCF zarówno w komórkach linii Hep G2 w stosunku do komórek kontrolnych, komórek poddanych działaniu syntetycznych analogów miRNA jak i komórek poddanych działaniu nanocząstek srebra w połączeniu z syntetycznymi analogami miRNA. Nie

zaobserwowano statystycznie istotnego wpływu nanocząstek srebra i analogów miRNA na poziom intensywności fluorescencji (Rys. 27).

5.4.8.2. Ilościowa analiza reaktywnych form tlenu z użyciem DHR 123

Dihydrorodamina 123 (DHR 123) używana jest do badania poziomu reaktywnych form tlenu w komórce. Przez właściwości lipofilowe, dyfunduje przez błony komórkowe. Wewnątrz komórki jest utleniana do fluorescencyjnego kationu rodaminy i pozostaje wewnątrz mitochondrium [177]. Dihydrorodamina 123 po utlenieniu cechuje się emisją fluorescencji przy długości fali 528 nm. W poniższych doświadczeniach prowadzonych z użyciem cytometru przepływowego fluorescencja była rejestrowana w kanale FITC.



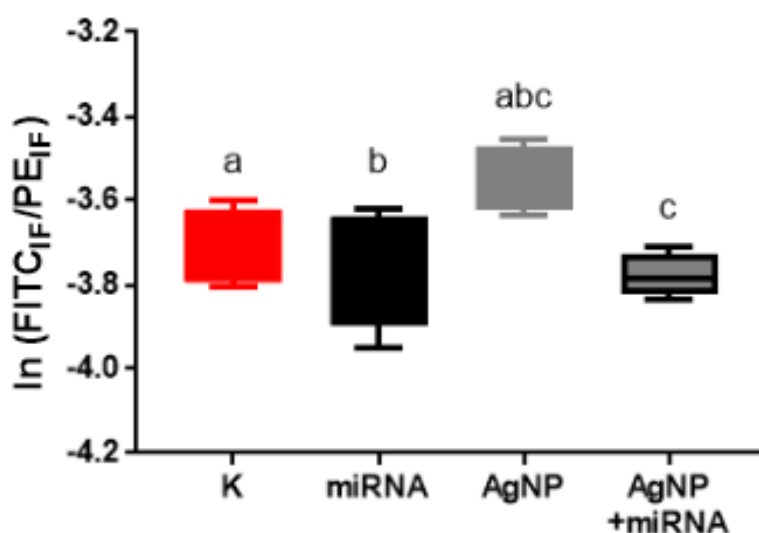
Rysunek 28. Intensywność fluorescencji sondy wewnątrz komórek rejestrowana w kanale FITC, zastosowana sonda to dihydrorodamina 123 w docelowym stężeniu $5 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Komórki linii Hep G2 hodowane w medium suplementowanym glukozą w stężeniu $25 \text{mmol}/\text{dm}^3$ poddano działaniu nanocząstek srebra o stężeniu $25 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ oraz syntetycznych analogów (miR-29c-3p, miR-100-5, miR-107, miR-195-5p, miR-221-3p) w stężeniu $5 \text{nmol}/\text{dm}^3$ (każdy). Na wykresie zestawiono średnie wraz z odchyleniem standardowym. „*” Oznacza statystycznie istotną różnicę w stosunku do kontroli, a litery a oraz b oznaczają różnicę między daną parą wyników. ANOVA, $\alpha=0,05$, $n=3$, test post hoc Tukeya.

Zaobserwowano spadek intensywności fluorescencji w komórkach, w stosunku do kontroli, dla modelu komórek transfekowanych syntetycznymi analogami miRNA oraz w przypadku połączenia transfekcji z inkubacją z nanocząstkami srebra. Inkubacja

z nanocząstkami srebra wywołała wzrost intensywności fluorescencji właściwej dla rodaminy 123 w stosunku do komórek kontrolnych. Jednocześnie zaobserwowano że intensywność fluorescencji była wyższa niż w komórkach transfekowanych syntetycznymi nukleotydami oraz komórkach poddanych zarówno transfekcji jak i inkubacji z nanocząstkami srebra (Rys. 28).

5.4.8.3. Ocena rodnikowych produktów peroksydacji lipidów w komórkach Hep G2 poddanych działaniu nanocząstek srebra

BODIPY (581/591) C11 jest sondą fluorescencyjną, wykorzystywaną do oceny peroksydacji lipidów i skuteczności potencjału antyoksydacyjnego komórek [178].



Rysunek 29. Poziom nadtlenu lipidów oznaczonych z użyciem sondy BODIPY (581/591) C11. Na wykresie zestawiono logarytm naturalny ze stosunku intensywności fluorescencji zaobserwowanej w kanale FITC do tej zaobserwowanej w kanale PE. Komórki poddano transfekcji syntetycznymi analogami miRNA w stężeniu 5 nmol/dm³ (miR-29c-3p, miR-100-5p, miR-107, miR-195-5p, miR-221-3p) oraz działaniu nanocząstek srebra w stężeniu 25 µg/cm³. Na wykresie zobrazowano zakres od 25 do 75 percentyla razem z obserwowanymi wielkościami minimalnymi i maksymalnymi. Litera „a” i „b” oznaczają istotną statystycznie różnicę między danymi parami wyników, ANOVA, α=0,05, n=4, test post hoc Tukeya.

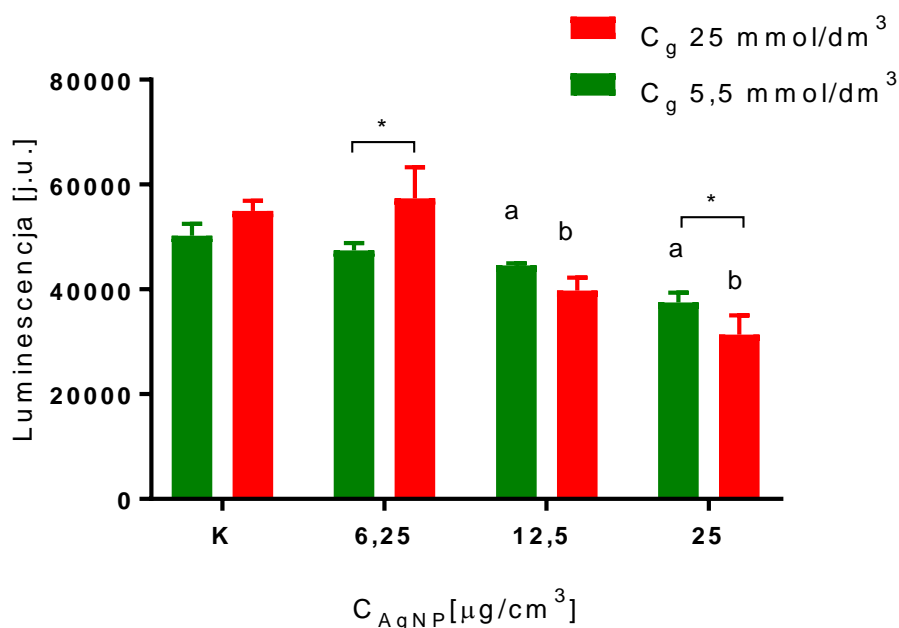
Nanocząstki srebra powodują generację nadtlenu lipidów w komórkach linii Hep G2 hodowanych w pożywce suplementowanej glukozą w stężeniu 25 mmol/dm³ w stosunku do komórek kontrolnych. Podobne różnice zaobserwowano między

komórkami pod działaniem nanocząstek srebra a komórkami po transfekcji syntetycznymi oligonukleotydami oraz komórkami zarówno po transfekcji i po inkubacji z nanocząstkami srebra. Sama transfekcja nie spowodowała zmian w wykrywanej ilości nadtlenków lipidów w stosunku do kontroli (Rys. 29).

5.4.9. Badanie całkowitego poziomu NADP i NADPH w komórkach Hep G2 poddanych działaniu nanocząstek srebra

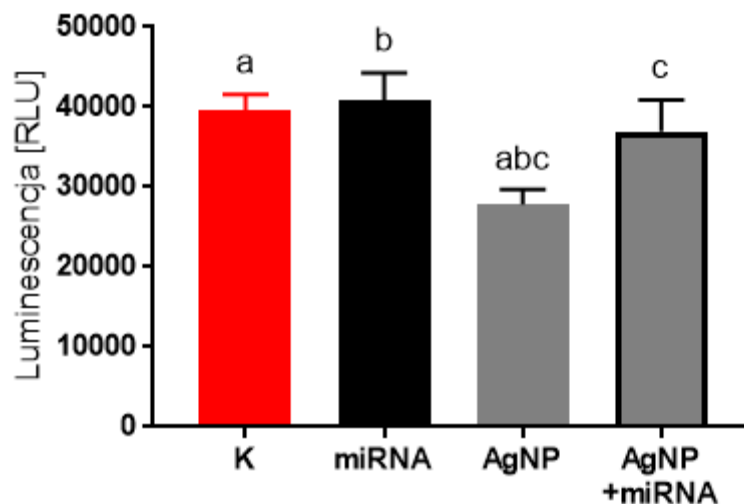
Przekierowanie metabolizmu glukozy na szlak pentozowy umożliwia redukcję i detoksykację reaktywnych form tlenu przez wytwarzanie NADPH. NADPH jest częścią systemu antyoksydacyjnego komórek i zwiększenie jego ilości w komórce zabezpiecza ją przed konsekwencjami stresu oksydacyjnego [179].

W celu określenia, czy zwiększona oporność komórek Hep G2 hodowanych w medium o stężeniu 5,5 mmol/dm³ glukozy względem komórek tej samej linii w pożywce o podwyższonym stężeniu glukozy (25 mmol/dm³) zależy od szlaku metabolicznego komórki, sprawdzono całkowitą ilość NADPH i jego utlenionej formy NADP.



Rysunek 30. Poziom NADP i NADPH zbadano komercyjnie dostępnym zestawem. Komórki linii Hep G2 suplementowane glukozą w stężeniu 5,5 i 25 mmol/dm³ poddano działaniu nanocząstek srebra w stężeniach: 6,25, 12,5, 25 μg/cm³. Na wykresie zestawiono średnie wraz z odchyleniem standardowym. „*” oznacza różnicę między wynikami uzyskanymi dla komórek inkubowanych z danym stężeniem nanocząstek srebra, w różnych stężeniach glukozy. Litery „a” oraz „b” oznaczają statystycznie istotne różnice między danym wynikiem a kontrolą dla danego stężenia glukozy. ANOVA, α=0,05, n=3, test post hoc Bonferroniego, [j.u.] – jednostka umowna.

W komórkach linii Hep G2 poziom NADP/NADPH różnicował media hodowlane w stężeniu nanocząstek srebra na poziomie 25 μg/cm³. Przy stężeniu 6,25 μg/cm³ zaobserwowano wyższe stężenie NADP/NADPH w komórkach hodowanych w medium suplementowanym glukozą w stężeniu 25 mmol/dm³. Natomiast przy stężeniu 25 μg/cm³ zaobserwowano odwrotne zjawisko, stężenie NADP/NADPH było wyższe w medium o stężeniu glukozy na poziomie 5,5 mmol/dm³. Jednocześnie, nanocząstki srebra w stężeniach 12,5 i 25 μg/cm³ spowodowały spadek stężenia NADP/NADPH w stosunku do komórek kontrolnych, w obu pożywkach (Rys. 30).

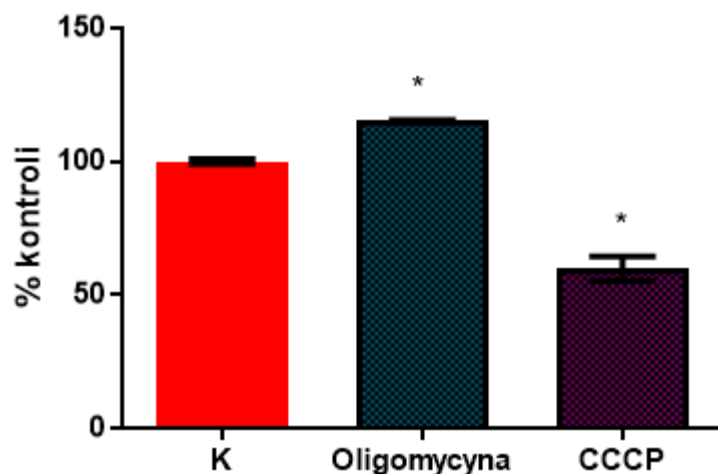


Rysunek 31. Poziom NADP/NADPH w komórkach linii Hep G2. Hodowlę prowadzono w medium DMEM suplementowanym glukozą w stężeniu 25 mmol/dm³. Komórki transfekowano syntetycznymi analogami miRNA w stężeniu 5 nmol/dm³ (miR-29c-3p, miR-100-5p, miR-107, miR-195-5p, miR-221-3p) oraz poddano działaniu nanocząstek srebra w stężeniu 25 µg/cm³. Litery a, b oraz c oznaczają statystycznie istotne różnice między danymi parami wyników, ANOVA, $\alpha=0,05$, n=3, test post hoc Tukeya.

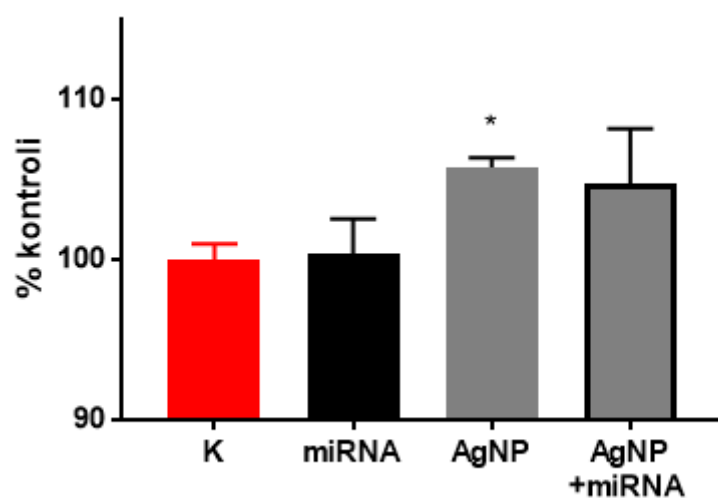
Nanocząstki srebra spowodowały spadek poziomu NADP/NADPH w komórkach linii Hep G2 hodowanych w medium suplementowanym glukozą w stężeniu 25 mmol/dm³. Transfekcja komórek wybranymi syntetycznymi miRNA przywróciła stężenie NADP/NADPH w komórkach poddanych działaniu nanocząstek srebra do poziomu kontrolnego. Sama transfekcja miRNA nie wpłynęła w sposób znaczący na stężenie NADP/NADPH (Rys. 31).

5.4.10. Pomiar potencjału błony mitochondrialnej w komórkach Hep G2 po wprowadzeniu inhibitorów łańcucha oddechowego

Do pomiarów potencjału błony mitochondrialnej użyto CMXRos. Walidację metody przeprowadzono z użyciem CCCP (ang. carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone, m-chlorofebylohydraton cyjanku karbonylu) oraz oligomycyny.



Rysunek 32. Potencjał mitochondrialny komórek Hep G2, hodowanych w medium suplementowanym glukozą w stężeniu 25 mmol/dm³, mierzy za pomocą CMXRos. Komórki poddano działaniu oligomycyny i CCCP. „*” oznacza różnicę istotną statystycznie ANOVA, $\alpha=0,05$, n=3, test post hoc Dunnetta.

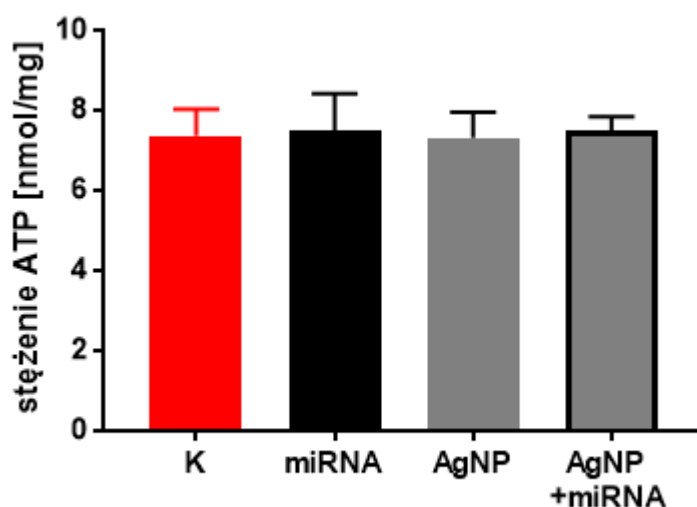


Rysunek 33. Potencjał mitochondrialny komórek Hep G2 hodowanych w medium suplementowanym glukozą w stężeniu 25 mmol/dm³, mierzony za pomocą CMXRos. Komórki poddano transfekcji syntetycznymi analogami miRNA (miR-29c-3p, miR-100-5, miR-107, miR-195-5p, miR-221-3p) oraz inkubowano z nanocząstkami srebra w stężeniu 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. „*” oznacza różnicę istotną statystycznie, ANOVA, $\alpha=0,05$, n=3, test post hoc Tukeya.

Pomiary potencjału mitochondrialnego komórek poddanych działaniu nanocząstek srebra różniły się w stosunku do prób kontrolnych. Oligomycyna

spowodowała wzrost potencjału mitochondrialnego o 15,5 %, natomiast CCCP spowodował spadek o 40,29 % (Rys. 32). Nanocząstki srebra prowadziły do hiperpolaryzacji błony mitochondrialnej, co jest zbieżne z efektem obserwowanym dla oligomycyny, natomiast zastosowane syntetyczne analogi miRNA pozostały bez wpływu na potencjał błony mitochondrialnej (Rys. 33).

5.4.11. Pomiar ATP w komórkach Hep G2 transfekowanych syntetycznymi analogami miRNA i poddanych działaniu nanocząstek srebra

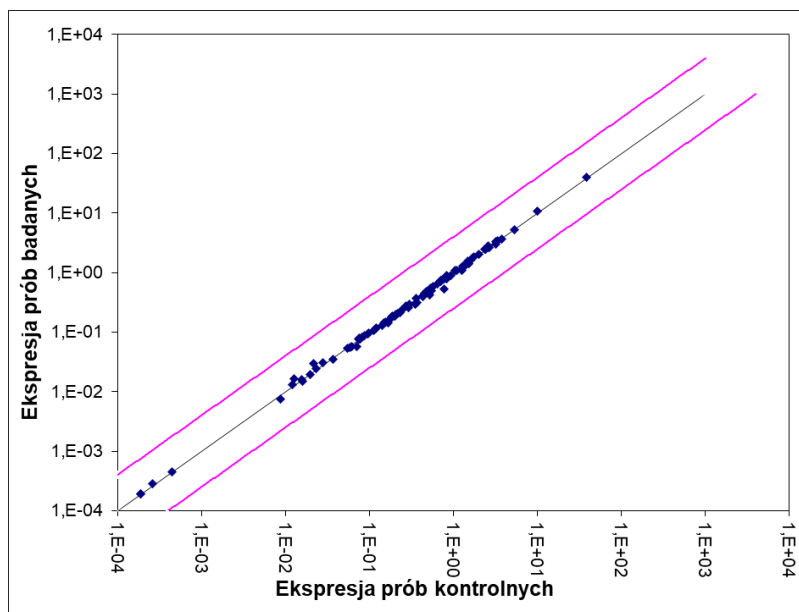


Rysunek 34. Stężenie ATP w komórkach Hep G2 hodowanych w medium suplementowanym glukozą w stężeniu 25 mmol/dm³. Komórki zostały poddane działaniu nanocząstek srebra w stężeniu 25 µg/cm³ oraz transfekcji syntetycznymi analogami miRNA (miR-29c-3p, miR-100-5p, miR-107, miR-195-5p, miR-221-3p). Inkubacja komórek z nanocząstkami srebra, jak i transfekcja wybranymi analogami miRNA pozostały bez wpływu na poziom ATP w komórkach Hep G2 (Rys. 34).

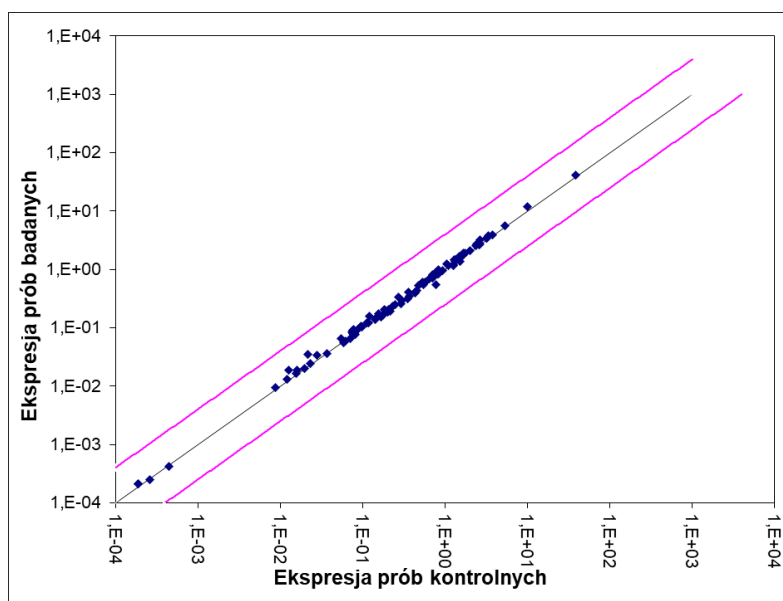
Zastosowanie nanocząstek srebra oraz transfekcja syntetycznymi analogami miRNA pozostały bez wpływu na stężenie ATP w komórkach Hep G2.

5.5. Ocena modulacji profilu miRNA w tkankach *in vivo*

W celu weryfikacji hipotezy na temat zmian w profilu miRNA u zwierząt narażonych intencjonalnie na nanomateriały zbadano zmiany w profilu miRNA w wątrobach szczurów którym podawano nanocząstki srebra dwoma drogami: poprzez podanie jednorazowej iniekcji do żyły doogonowej oraz w dawce podzielonej per os.



Rysunek 35. Ekspresja wybranych miRNA w wątrobach szczurów szczepu Fischer 344/DuCrI. Zwierzęta otrzymały nanocząstki srebra dożylnie, do żyły ogonowej w dawce 5 mg/kg masy ciała. Na wykresie zestawiono ekspresję prób badanych w stosunku do ekspresji prób kontrolnych, n=7.



Rysunek 36. Ekspresja wybranych miRNA w wątrobach szczurów szczepu Fischer 344/DuCrI. Zwierzęta otrzymały nanocząstki srebra doustnie, w dawce 30 mg/kg masy ciała. Na wykresie zestawiono ekspresję prób badanych w stosunku do ekspresji prób kontrolnych, n=7.

Zarówno w przypadku zwierząt, którym nanocząstki były podawane z pokarmem jak i w przypadku tych, którym nanocząstki były podawane dożylnie nie zaobserwowano istotnych różnic w ekspresji badanych miRNA w stosunku do zwierząt kontrolnych (Rys. 35 i 36).

6. Dyskusja

Wielkość globalnego rynku miRNA w 2020 roku oceniono na 854,6 milionów dolarów amerykańskich i zgodnie z prognozami rozwój osiągnie skumulowaną roczną stopę wzrostu na poziomie 19,8 % rocznie do 2028 roku [180]. Na szybkie tempo wzrostu wykorzystania miRNA nakłada się kilka czynników, spośród których najistotniejszym wydaje się szybka identyfikacja celów ekspresyjnych dla kolejnych miRNA, co przyczynia się do ich dalszych zastosowań diagnostycznych i terapeutycznych. Dzięki temu miRNA należą obecnie do najważniejszych potencjalnych kandydatów na biofarmaceutyki. Ze względu na potencjalnie wiele zastosowań konieczne jest badanie interakcji z cząsteczkami obecnymi w środowisku.

Aby określić rolę miRNA w odpowiedzi komórek Hep G2 na toksyczne działanie nanocząstek srebra, zaplanowano realizację badań na trzech płaszczyznach:

- definiując różnice w odpowiedzi komórek tej samej linii, o zmienionym profilu metabolicznym przez dostępność glukozy w pożywce, na działanie nanocząstek srebra.
- określając zmiany w ekspresji miRNA w modelu *in vitro* i *in vivo* pod wpływem działania nanocząstek srebra.
- sprawdzając jak modulacja poziomu miRNA będzie wpływała na parametry komórek poddanych działaniu nanocząstek srebra.

Ekspresja miRNA jest nie tylko specyficzna tkankowo, ale może ulegać zmianom przy zmienionych warunkach środowiska [181]. W przypadku komórek Hep G2, hodowla w różnych wariantach pożywki DMEM, powodowała różnice w profilu miRNA. Wyniki analizy przeprowadzonych doświadczeń qPCR (ang. *quantitative Polymerase Chain Reaction*) (Rys. 2) nasunęły pytania, jak częściowe przywrócenie zmienionego profilu miRNA w hodowli w medium o zwiększonej dostępności glukozy, wpłynie na fenotyp komórek poddanych toksycznemu działaniu nanocząstek srebra.

Toksykologiczne efekty końcowe działania nanocząstek srebra są stosunkowo dobrze poznane, a badania były prowadzone na szeregu linii komórkowych oraz na zwierzętach laboratoryjnych. W przypadku linii Hep G2, istnieją doniesienia

o toksyczności nanocząstek w szerokim zakresie rozmiarów, zarówno dla wielkości 10 nm [182] jak i 100 nm [183].

Mimo badań nad toksycznością nanocząstek srebra, w dalszym ciągu brak jest zgodności co do mechanizmów jej powstawania. Pewien problem w analizie dostępnych danych powodują rozbieżności w warunkach prowadzenia hodowli komórkowej *in vitro*. Nawet w przypadku tej samej linii komórkowej, hodowle są prowadzone w pożywkach często drastycznie różniących się składem. Wobec tego, trudno jest porównywać dane z prac sugerujących odmienne mechanizmy toksyczności na podstawie pomiarów dotyczących różnych szlaków metabolicznych i różnych szlaków wewnątrzkomórkowego przekazywania sygnałów. Dla komórek linii Hep G2 częsta jest rozbieżność między metodyką badań opisaną w literaturze tematu, a zaleceniami ATCC (American Type Culture Collection). W materiałach udostępnionych przez ATCC, pożywka EMEM (ang. *Eagle's Minimum Essential Medium*) jest zalecana do hodowli komórek Hep G2. Jednocześnie duża część doświadczeń wykonywanych na komórkach linii Hep G2 prowadzona jest na hodowlach z użyciem pożywki DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*), z częstym pominięciem informacji, który wariant został zastosowany [184-186] lub pożywki RPMI (ang. *Roswell Park Memorial Institute*) [187-189]. Nie licząc nawet innych różnic w składzie tych pożywek w stosunku do pożywki EMEM, samo stężenie glukozy jest odpowiednio 4,5 raza i 2 razy większe.

Glukoza jest istotnym czynnikiem decydującym o profilu metabolicznym komórki. W linii Hep G2 potwierdzono, że ograniczenie dostępności glukozy prowadzi do biogenezy mitochondriów i intensyfikacji fosforylacji oksydacyjnej [190]. Przy analizie przeżywalności komórek wobec ksenobiotyków istotnym czynnikiem jest profil metaboliczny komórek. Stężenie glukozy będzie miało szczególne znaczenie w przypadku związków o biologicznej aktywności kierowanej w szlaki glikolizy i cyklu kwasu cytrynowego oraz strukturę i inne funkcje mitochondriów. Jak wykazano, substytucja glukozy galaktozą uwrażliwia komórki Hep G2 na czynniki zaburzające pracę mitochondriów [191]. Zbadana przeżywalność komórek linii Hep G2 w odpowiedzi na nanocząstki srebra (Rys. 1) jest zbieżna z wcześniejszymi doniesieniami [192]. Nanocząstki srebra silniej ograniczały przeżywalność w przypadku medium suplementowanym glukozą w wyższym stężeniu (25 mmol/dm³) w stosunku do medium

o niższej zawartości glukozy ($5,5 \text{ mmol/dm}^3$). Jako przyczynę takiego stanu rzeczy wskazywano naturę toksyczności nanocząstek srebra, często definiowaną przez zaburzenia równowagi redoks komórek i silniejsze stymulowanie mechanizmów obrony antyoksydacyjnej w przypadku komórek hodowanych w warunkach obniżonej dostępności glukozy. Co więcej, komórki utrzymywane przez krótki czas w pożywce o niższym poziomie glukozy przedstawiały profil przeżywalności zbliżony do tego uzyskanego dla komórek hodowanych na medium o wyższym stężeniu glukozy. Dopiero długotrwała hodowla w warunkach obniżonej dostępności glukozy skutkowała znaczącymi zmianami w profilu przeżywalności i w różnicach parametrów obrony antyoksydacyjnej [192].

Z uwagi na znaczące różnice w przeżywalności komórek Hep G2 poddanych działaniu nanocząstek srebra w mediach hodowlanych o różnej dostępności glukozy, porównano efekt AgNP na licznosc żywych komórek w różnych czasach inkubacji i w różnej gęstości hodowli komórkowej. Dostępność glukozy jako czynnika przyspieszającego proliferację komórek różnorodnych linii jest zjawiskiem szeroko opisanym w literaturze, między innymi dla komórek raka piersi (MDAMB231, SKBR3, MCF-7) [193], endometrium (ECC-1, Ishikawa) [194], komórek nabłonkowych przewodu trzustkowego [195] i wielu innych. Na każdym etapie badania przeprowadzonego w mojej pracy doktorskiej (Tab. 2) komórki hodowane w medium o stężeniu glukozy 25 mmol/dm^3 wykazywały większą liczebność w stosunku do komórek hodowanych w medium o stężeniu glukozy $5,5 \text{ mmol/dm}^3$. Wyjątkiem był pomiar po 24 godzinach, dla hodowli o wyjściowej ilości $3,125 \cdot 10^3$ komórek, gdzie zaobserwowano więcej komórek w przypadku medium o niższej zawartości glukozy. Wyniki dwuczynnikowej analizy wariancji sugerują, że dla niższych wartości wyjściowego zagęszczenia komórek różnice w odczytach były skutkiem zarówno różnic w warunkach hodowli komórek, jak i zastosowanego stężenia nanocząstek srebra. Przy wyższych gęstościach wyjściowej hodowli i przy dłuższych czasach hodowli, efekt nanocząstek srebra stawał się zaniedbywalny, a rolę kluczową miało stężenie glukozy w medium hodowlanym. Przy wyjściowych licznosciach $25 \cdot 10^3$ i $50 \cdot 10^3$ komórek zauważono spadek liczby komórek hodowanych w pożywce z wyższym stężeniem glukozy w stosunku do komórek hodowanych w medium o niższym stężeniu glukozy. Jest to najprawdopodobniej efektem

przegęszczenia hodowli komórkowej. W warunkach doświadczalnych, hodowle są umieszczane w niewielkich naczyniach hodowlanych, takich jak mikroptytki, w znacznej ilości komórek na jednostkę powierzchni. Medium hodowlane, w tym stężenie glukozy, będzie odgrywało znaczącą rolę w odczytach wielu doświadczeń biochemicznych prowadzonych w takich warunkach. Zaobserwowane różnice w liczebności żywych komórek są efektem końcowym różnic w aktywności szlaków metabolicznych i szlaków przekazywania sygnałów wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych. Zmiany w ilości żywych komórek obserwowane po 24 godzinach inkubacji mają swoje źródło w przemianach zapoczątkowanych wiele godzin wcześniej. Sam proces apoptozy trwa od 12 do 24 godzin [196]. Prawdopodobnie wybór mediów o wyższym stężeniu glukozy w stosunku do zalecanego w wielu pracach badawczych jest związany właśnie z wyższym potencjałem proliferacyjnym komórek hodowanych w takich mediach (Tab. 2), co przyspiesza i ułatwia prace laboratoryjne, aczkolwiek utrudnia interpretację danych.

Z uwagi na narządowe pochodzenie komórek linii Hep G2, po zweryfikowaniu ich profilu przeżywalności względem nanocząstek srebra sprawdzono profil miRNA o potwierdzonej ekspresji w komórkach wątrobowych (Rys. 2). Badanie przeprowadzono z udziałem komórek hodowanych na pożywkach o niskiej i wysokiej zawartości glukozy. Znacząco silniejszym zmianom ekspresji po inkubacji z nanocząstkami srebra uległ profil miRNA w komórkach hodowanych w pożywce suplementowanej glukozą w stężeniu 25 mmol/dm³. Na podstawie profilu zmian miRNA i kwerendy literaturowej wytypowano pięć miRNA do dalszej części badań: miR-29c-3p, miR-100-5p, miR-107, miR-195-5p, miR-221-3p.

Działanie toksyczne nanocząstek srebra opiera się, według paradygmatu w literaturze, na generowaniu przez te indywidualne stresu oksydacyjnego. Wybrane miRNA miały potencjał do modulowania odpowiedzi komórek na stres oksydacyjny oraz na przejście epitelialno-mezenchymalne. W komórkach raka jelita grubego wykazano, że miR-29c-3p może być bezpośrednim regulatorem SPARC (*ang. secreted protein acidic, rich in cysteine*). Ekspresja tego genu jest powiązana z adhezją, proliferacją i różnicowaniem komórek, a jego podwyższony poziom koreluje z powstawaniem stresu oksydacyjnego. Z uwagi na spadek poziomu miR-29c-3p w tych komórkach można przypuszczać o zaangażowaniu regulacji miR-29c-3p w niwelowanie stresu

oksydacyjnego przez kontrolę poziomu SPARC [197]. Regulacja SPARC przez miR-29c-3p wiąże się również ze zmniejszaniem zdolności do ułożliwiania komórek przez hamowanie inwazyjności i metastazy w komórkach raka szyjki macicy [198]. MiR-100-5p jest zaangażowany w obniżanie poziomu stresu oksydacyjnego przez bezpośrednią regulację poziomu NOX4 [199] lub pośrednią regulację czynników pośredniczących w regulacji stresu oksydacyjnego w tym HIF1-a, P53, VEGF, NRF2 co może być związane z rolą miR-100-5p w indukowaniu oporności na terapię stosowaną w leczeniu raku prostaty. Ponadto miR-100-5p bierze udział w regulacji szlaku WNT/beta-*katzenina* [200] oraz regulacji poziomu białka mTOR powodując spadek potencjału migracyjnego i inwazyjnego komórek [201]. MiR-107 również bierze udział w regulacji szlaku WNT/beta-*katzenina* [202] a ponadto wpływa na poziom kładyny-1 [203], co może skutkować zmniejszeniem potencjału komórek do przejścia epitelialno-mezenchymalnego. W przypadku regulacji stresu oksydacyjnego wykazano obronne działanie miR-107 w stosunku do neurotoksycznych właściwości 6-hydroksydopaminy *in vivo* oraz *in vitro* (MiR-107 overexpression attenuates neurotoxicity induced by 6-hydroxydopamine both in vitro and in vivo). Również miR-195-5p obniża poziom stresu oksydacyjnego. Doniesienia sugerują, że dzieje się tak przez bezpośrednią regulację ATF6 (ang. *activating transcription factor 6*) [204] i VEGFA (ang. *endothelial growth factor A*) [205]. MiR-195-5p hamuje również inwazyjność komórek przez inhibicję czynnika E2F3 [206] oraz regulację poziomu kładyny 2 [207]. MiR-221-3p ogranicza powstawanie stresu oksydacyjnego poprzez inhibicję szlaku TLR4/NF- κ B [208] oraz bierze udział w regulacji szlaku WNT/beta-*katzenina* [209].

Do badań obejmujących transfekcje wybranymi syntetycznymi miRNA wytypowano hodowlę komórek linii Hep G2 w medium o podwyższonym, względem fizjologicznego stężeniu glukozy (25 mmol/dm³). Taki wybór był spowodowany znacząco większą wrażliwością komórek linii Hep G2 hodowanych w medium o wyższym stężeniu glukozy, co wykazały wstępne badania przeżywalności wobec nanocząstek srebra oraz badanie zmian w profilu miRNA pod działaniem nanocząstek srebra.

Następnie zbadano zmiany w przeżywalności komórek linii Hep G2 hodowanych w medium suplementowanym glukozą w stężeniu 25 mmol/dm³, po transfekcji wybranymi syntetycznymi analogami miRNA, wobec szeregu stężeń nanocząstek srebra

użytego do wstępnej oceny toksyczności. Wśród sprawdzonych syntetycznych nukleotydów, miR-100-5p i miR-107 najskuteczniej zwiększyły przeżywalność komórek względem nanocząstek srebra (Rys. 3). Stwierdzono rolę miR-107 w kontroli powstawania produktu białkowego genu supresorowego: *PTEN* (ang. *Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*). Wzrost poziomu miR-107 koreluje ze spadkiem potencjału apoptotycznego komórek, stymulacją proliferacji oraz spadkiem poziomu białka PTEN [210]. Podwyższony poziom miR-100-5p, podobnie jak miR-107 może ograniczać potencjał apoptotyczny oraz promować przeżywalność komórek raka nerkowokomórkowego [211].

Rolą miRNA w komórkach eukariotycznych jest kontrola ekspresji genów na poziomie potranskrypcyjnym. MiRNA charakteryzuje się krótką, bo ok. 24 nt. sekwencją, w wysokim stopniu komplementarną z mRNA docelowych białek. Celem weryfikacji transfekcji komórek Hep G2 syntetycznymi miRNA oraz upewnienia się, że wybrane miRNA wykazują interferencję, posłużono się badaniem poziomu powstawania w tych komórkach białek, wybranych jako markerowe regulowane przez wybrane miRNA. W celu wybrania takich białek, których mRNA wykazywały zbieżność sekwencyjną z badanymi miRNA posłużono się danymi wygenerowanymi przez bazę danych miRDB (Tab. 4) oraz kwerendą literaturową. W literaturze tematu można znaleźć prace dokumentujące interferencję między wybranymi parami białko-miRNA *in vitro*. Wykazano, że mTOR może być bezpośrednio regulowane przez miR-100-5p [201], CCNE1 przez miR-195-5p [212, 213], CDKN1B przez miR-221-3p [214], oraz NF1 przez miR-107 [215]. Do tej pory nie wykonano badań, które bezpośrednio wskazywałyby na korelację między ekspresją miR-29c-3p a kładyną-1, jednak wskazano na taką zależność w przypadku członka tej samej rodziny (miR-29) o podobnej sekwencji: miR-29a-3p [216].

W związku z powyższym sprawdzono w jaki sposób nanocząstki srebra będą modulowały ekspresję regulowanych białek w komórkach linii Hep G2 przed i po transfekcji wybranymi syntetycznymi analogami miRNA. Wykonany na panelach miRNA qPCR (Rys. 2) wykazał, że poziom wybranych miRNA uległ obniżeniu w komórkach Hep G2 pod wpływem działania nanocząstek srebra. Pozwoliło to na przyjęcie tezy, że poziom białek, wybranych jako markerowe, jeśli są kontrolowane przez wybrane miRNA, będzie

wzrastał pod wpływem działania nanocząstek srebra, gdyż na poziomie mRNA nie będzie dochodziło do interferencji miRNA tak intensywnie, jak w przypadku komórek kontrolnych. Na weryfikację postawionej tezy pozwoliło badanie Western blot (Rys. 4), które wykazało znaczący wzrost ekspresji wszystkich wybranych białek w komórkach Hep G2 poddanych działaniu nanocząstek srebra w porównaniu do komórek kontrolnych. Istnieją wcześniejsze doniesienia literaturowe pokazujące spadek ilości CDKN1 w komórkach linii Hep G2 pod wpływem nanocząstek srebra [217]. Jednak badania były wykonane na komórkach hodowanych w pożywce Williama, która nie zawiera glukozy w składzie, a której dostępność warunkuje odpowiedź komórki na stres oksydacyjny, w tym ten indukowany przez nanocząstki srebra [192]. Jednocześnie, stres oksydacyjny wywołany przez leki przeciwcukrzycowe powoduje zwiększenie ekspresji CDKN1B [218]. W tym doniesieniu zastosowano do hodowli DMEM o nieznanym stężeniu glukozy. Główną rozpoznaną funkcją CDKN1B jest zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1 [219] jednak w prezentowanym układzie badanym zwiększenie poziomu tego białka było czynnikiem niewystarczającym do wywołania podobnych zmian. W badaniu cyklu komórkowego zaobserwowano odwrotny efekt działania nanocząstek srebra, polegający na zwiększeniu ilości komórek w fazie G2 (Rys. 23). Zastosowanie miR-221-3p skutecznie ograniczyło poziom białka CDKN1B zarówno w stosunku do komórek kontrolnych i w stosunku do komórek poddanych działaniu nanocząstek srebra. CLDN1 jest jednym z białek wchodzących w skład połączeń ścisłych i determinuje właściwości barierowe błon między sąsiadującymi komórkami [220]. Ekspresja *CLDN1* na poziomie miRNA ulega zwiększeniu u szczurów poddanych działaniu nanocząstek srebra [221]. Transfekcja komórek linii Hep G2 syntetycznym miR-29c-3p spowodowała spadek ekspresji CLDN1. CCNE1 jest jednym z białek warunkujących przejście G1/S. Nadekspresja tego białka została zaobserwowana w wielu nowotworach [222], również w komórkach Hep G2, pod działaniem nanocząstek srebra zaobserwowano jego nadekspresję. MiR-195-5p nie spowodował zmiany w poziomie CCNE1 w stosunku do kontroli, ale zredukował obserwowany wzrost poziomu białka wywołany nanocząstkami srebra do poziomu kontrolnego. Podobnie w przypadku białka NF1, którego poziom jest regulowany potranskrypcyjnie przez miR-107, transfekcja nie spowodowała zmian w poziomie białka w stosunku do prób kontrolnych, jednak ograniczyła jego poziom indukowany przez nanocząstki srebra.

Symultaniczna transfekcja wybranymi syntetycznymi analogami miRNA spowodowała znacząco zwiększoną przeżywalność komórek wobec działania nanocząstek srebra (Rys. 7), mimo użycia niższych stężeń poszczególnych oligonukleotydów (5 nmol/dm^3) niż w przypadku badania każdego z nich osobno (30 nmol/dm^3). Parametr IC50 wzrósł 1,75 krotnie w stosunku do prób kontrolnych, osiągając wartość $22,32 \text{ } \mu\text{g/cm}^3$ dla komórek hodowanych w medium suplementowanym glukozą w stężeniu 25 mmol/dm^3 . Jest to wartość wyższa niż ta wynikająca z analizy krzywej przeżywalności dla komórek utrzymywanych w pożywce zawierającej niższe stężenie glukozy ($5,5 \text{ mmol/dm}^3$). Zastosowane syntetyczne analogi miRNA skutecznie zniwelowały różnicę w przeżywalności wobec nanocząstek srebra, indukowaną różnicami w stężeniu glukozy w medium hodowlanym i wykazały charakter protekcyjny wobec toksycznego działania nanocząstek srebra.

Parametr SSC-A, zgodnie z dostępnymi danymi [223] i własnymi obserwacjami może służyć identyfikacji wnikania nanocząstek srebra do komórek. Wielkość tego parametru jest proporcjonalna do stężenia zastosowanych nanocząstek srebra. Transfekcja wybranymi syntetycznymi analogami miRNA nie powodowała zmian w odczytach parametru SSC-A w stosunku do nietransfekowanych prób kontrolnych (Rys. 6), co świadczy o tym, że transfekcja pozostała bez wpływu na intensywność akumulacji nanocząstek srebra. Pośrednio można więc wnioskować, że wybrane miRNA nie regulują procesów związanych z wnikaniem nanocząstek srebra.

Wpływ nanocząstek srebra został zbadany na wielu liniach komórkowych, między innymi, powodował ograniczenie klonogenności w HCT116 [224], CHO-K1 i CHO-XRS5 [225], HeLa i HaCaT [226]. C.A. Ottoni (i wsp.) [227] zbadali wpływ nanocząstek srebra o rozmiarze $35 \pm 10 \text{ nm}$ na klonogenność komórek linii Hep G2. Nie zaobserwowano znaczących różnic w klonogenności komórek hodowanych w medium DMEM o nieznanym stężeniu glukozy. Przy zastosowaniu nanocząstek srebra o nominalnym rozmiarze 20 nm zaobserwowano odpowiedź komórek linii Hep G2 w testach klonogenności. Stężenie glukozy w pożywce hodowlanej jest kluczowe dla formowania kolonii pod działaniem nanocząstek srebra przez komórki linii Hep G2. W przypadku pożywki o zawartości glukozy ($5,5 \text{ mmol/dm}^3$), nanocząstki srebra spowodowały zależny do stężenia spadek liczby obserwowanych kolonii (Rys. 8). Jednocześnie sumaryczna

liczba komórek składająca się na te kolonie pozostała bez zmian (Rys. 9). Jak wcześniej wykazano, spadek liczby kolonii formowanych pod wpływem nanocząstek srebra jest związany z białkiem p53 oraz kaskadą JNK (ang. *c-Jun N-terminal kinases*) aktywowaną reaktywnymi formami tlenu produkowanymi w wyniku aktywności nanocząstek srebra [224]. Badania przeprowadzono z użyciem komórek HCT116, jednak geny *JNK1* i *JNK2* ulegają ekspresji we wszystkich rodzajach tkanek i komórek [228]. Pewien problem interpretacyjny w odniesieniu do wyników w niniejszej pracy stanowi brak pełnego opisu medium hodowlanego; autorzy użyli pożywki DMEM, bez wskazania stężenia glukozy. Zgodnie z zaleceniami ATCC do hodowli tych komórek przewiduje się medium McCoy's 5A o stężeniu glukozy 16,67 mmol/dm³, co stanowi stężenie pośrednie między popularnymi stężeniami glukozy w DMEM (5,5 mmol/dm³ i 25 mmol/dm³). W przypadku komórek linii Hep G2 hodowanych w pożywce suplementowanej wyższym stężeniem glukozy zauważono wzrost liczby formowanych kolonii w sposób proporcjonalny do zastosowanego stężenia nanocząstek srebra (Rys. 8). Jednocześnie sumaryczna liczba komórek stanowiła od 20 do 30 % liczby komórek kontrolnych (Rys. 9). Spadek liczby komórek w połączeniu ze wzrostem liczby kolonii w odpowiedzi na działanie nanocząstek srebra może być związany z promowaniem przez nanocząstki srebra przejścia epitelialno-mezenchymalnego w komórkach linii Hep G2 hodowanych w pożywce o stężeniu glukozy na poziomie 25 mmol/dm³ (Rys. 15). Ilość żywych komórek oceniona podczas testów klonogenności prezentuje odmienny obraz niż wcześniejsze testy przeżywalności z czerwienią obojętną (Rys. 1). Hodowla komórek linii Hep G2 przy wzroście klonalnym wykazuje inną morfologię niż po równomiernym posiewie w naczyniu hodowlanym. Również czas wzrostu hodowli jest inny. Pomiar liczności kolonii wykonywano po 5 dniach wzrostu, natomiast odczyt przeżywalności wykonywany był po 48 godzinach od inicjacji hodowli.

Zawiesina nanocząstek srebra nie jest roztworem rzeczywistym, wobec czego istotny jest fizyczny kontakt nanocząstki z komórką. W przypadku testów przeżywalności, dbałość o poprawny i równomierny posiew i dokładne mieszanie zawiesiny nanocząstek srebra w medium nad komórkami zapewnia równomierną dystrybucję nanocząstek srebra w hodowli. Przy testach klonogenności kontakt nanocząstek srebra z komórkami był nierównomierny, a kolejne komórki potomne pozostawały pod coraz mniejszym

wpływem nanocząstek srebra, ze względu na agregację nanocząstek (dane nie prezentowane). W przypadku komórek hodowanych w pożywce o niższej zawartości glukozy spowodowało to brak zauważalnego spadku liczby komórek, niezależnie od stężenia nanocząstek srebra. Natomiast w przypadku komórek hodowanych w pożywce o podwyższonym poziomie glukozy zaobserwowano jeszcze drastyczniejsze ograniczenie ilości komórek żywych niż w przypadku testów przeżywalności (Rys. 9).

Nanocząstki srebra wykazywały różny efekt w modulacji inwazyjności komórek Hep G2 w zależności od zastosowanego stężenia glukozy w medium hodowlanym. W przypadku niższego stężenia glukozy wykazywały właściwości ograniczające inwazyjność. Natomiast w przypadku medium suplementowanego wyższym stężeniem glukozy promowały inwazyjność (Rys. 11). Sam termin inwazyjność oznacza utratę własności adhezyjnych w interakcjach międzykomórkowych, co umożliwia komórce nowotworowej oddysocjowanie od głównej struktury guza. Natomiast zmiany w profilu biochemicznym komórki umożliwiają sekrecję substancji degradujących błonę podstawną i macierz zewnątrzkomórkową. Badania na linii komórkowej MCF 7 [229] łączą reaktywne formy tlenu z promowaniem inwazyjności tych komórek. Głównym postulowanym mechanizmem działania nanocząstek srebra jest indukcja stresu oksydacyjnego na poziomie komórkowym. Efekt zwiększonego potencjału do przejścia przez model macierzy błony podstawnej komórek Hep G2 utrzymywanych w medium suplementowanym glukozą w stężeniu 25 mmol/dm³ może być powiązany ze stresem oksydacyjnym indukowanym w tych komórkach przez nanocząstki srebra (Rys. 26). Dodatkowo, komórki linii Hep G2 utrzymywane w warunkach podwyższonej dostępności glukozy charakteryzują się niższym poziomem obrony antyoksydacyjnej w stosunku do hodowli o niższej dostępności glukozy [192]. W pracy Gupta S.C (i wsp.) [229] właśnie mechanizmy antyoksydacyjne niwelowały inwazyjność komórek MCF 7. Prace prowadzone na komórkach linii A549, stanowiących model drobnokomórkowego raka płuc, sugerują ochronny charakter biologicznej aktywności nanocząstek srebra w aspekcie inwazyjności komórek [230]. Jednocześnie komórki linii A549 wykazują znacząco wyższą aktywność katalazy niż komórki linii Hep G2 [231], która, będąc jednym z najważniejszych czynników obrony antyoksydacyjnej, może skutecznie ograniczyć modulację inwazyjności w komórkach tej linii. Również w komórkach linii Hep G2,

utrzymywanych w medium o niższym poziomie glukozy zaobserwowano ograniczenie intensywności przejścia przez model błony podstawnej w odpowiedzi na działanie nanocząstek srebra (Rys. 11). Mechanizm może być zbieżny ze wspomnianymi obserwacjami w linii A549. W tym wariantcie hodowli komórek linii Hep G2 obserwuje się znaczącą stymulację mechanizmów obrony antyoksydacyjnej, w tym aktywności katalazy, ale również transferazy S-glutationowej, dysmutazy ponadtlenkowej i reduktazy glutationowej [192]. Wydaje się prawdopodobnym, że nanocząstki srebra mogą indukować przejście epitelialno-mezenchymalne i w następstwie intensyfikować migrację komórek przez model błony podstawnej na drodze mechanizmów związanych z reaktywnymi formami tlenu. Jednocześnie poziom obrony antyoksydacyjnej może niwelować ten skutek.

Obniżenie intensywności migracji komórek przez model błony podstawnej może być również związane z procesem endocytozy. Nanocząstki srebra o wielkości 20 nm wnikają do komórek na drodze endocytozy fazy płynnej i endocytozy klatrynozależnej [232]. Sam proces endocytozy angażuje podobne struktury białkowe jak te biorące udział w migracji komórek nowotworowych, przy zaangażowaniu przeplatających się mechanizmów regulacyjnych. Do supresorów metastazy powiązanych z procesem endocytozy można zaliczyć NME1 (ang. *NM23/NM23-H1, non-metastatic clone 23, isoform H1*), CD82 (ang. *cluster of differentiation 82*), *MTSS1* (ang. *metastasis suppressor protein 1*) i *KISS* (ang. *kisspeptin-1*) [233]. Intensyfikacja endocytozy podczas ekspozycji komórek na nanocząstki srebra może być związana z zależnym od stężenia nanocząstek spadkiem odsetka komórek migrujących w przypadku komórek Hep G2 hodowanych w medium o niższej zawartości glukozy. W odróżnieniu do komórek hodowanych w medium o wyższej zawartości glukozy, wydajniejsze mechanizmy obrony antyoksydacyjnej ograniczają efekt generowanych przez nanocząstki srebra reaktywnych form tlenu. Efekt płynący z intensyfikacji endocytozy wraz ze zwiększaniem stężenia nanocząstek srebra może być silniejszy niż działanie reaktywnych form tlenu (Rys. 11).

Wyniki zaprezentowane dla testu migracji komórek przez model macierzy błony podstawnej obrazują zdolność chemotaktyczną komórek wobec chemoatraktantu oraz inwazję komórek przez macierz zewnątrzkomórkową w procesach spotykanych podczas

przerzutowania nowotworu. W odróżnieniu do powyższego testu, test zarastania rysy bada migrację komórek na powierzchni, bez dodatkowych czynników stymulujących i bez fizykochemicznych barier. Podobnie jak w przypadku wyników uzyskanych z użyciem Matrigel, nanocząstki srebra wywołały istotny statystycznie efekt w przypadku hodowli suplementowanej glukozą w stężeniu 25 mmol/dm³. Szybkość ubytku niezajętej powierzchni była znacząco wyższa w próbach gdzie użyto nanocząstki srebra w stężeniach 12,5 i 25 µg/cm³ niż w przypadku prób kontrolnych (Rys. 15 i Rys. 16).

Zastosowane syntetyczne analogi miRNA wykazują działanie inhibitujące migrację i inwazyjność komórek [234-238]. W wynikach opisywanych w niniejszej pracy zaobserwowano ograniczenie szybkości zarastania rysy przez komórki poddane transfekcji wybranymi syntetycznymi oligonukleotydami (miR-29c-3p, miR-100-5p, miR-107, miR-195-5p, miR-221-3p). Jednocześnie nie zaobserwowano podobnego efektu w przypadku przejścia przez model macierzy błony podstawnej. To sugeruje, że przyczyna zwiększonej migracji komórek po działaniu nanocząstek srebra jest odmienna od przyczyny intensywniejszego przechodzenia przez model macierzy błony podstawnej w kierunku czynnika chemotaktycznego.

Badania zmian fenotypu komórek Hep G2 pod wpływem działania nanocząstek srebra objęły również zdolność komórek do EMT. W celu jej określenia, przeprowadzono eksperymenty określające potencjał inwazyjny (Rys. 15) i migracyjny (Rys. 17). Zarówno w przypadku testu zarastania rysy, jak i testu inwazyjności z Matrigelem, dochodzi do wzrostu potencjału migracyjnego komórek poddanych działaniu nanocząstekek srebra w przypadku komórek hodowanych w medium suplementowanym wyższym stężeniem glukozy. W związku z powyższym w następnym kroku dokonano analizy ekspresji białek, które są związane ze zdolnością komórki do EMT. Pomiarów poziomu białek dokonano za pomocą metody Western Blot (Rys. 19). Zbadano poziom E-kadheryny, N-kadheryny, beta-kateniny, ZO-1 oraz kładyny-1 w komórkach linii Hep G2 hodowanych w pożywce DMEM w dwóch wariantach stężenia glukozy: 5,5 mmol/dm³ i 25 mmol/dm³, komórki inkubowano z nanocząstkami srebra. Poziom kładyny-1 sprawdzano również jako marker walidacji transfekcji analogicznymi miRNA, gdyż na poziomie mRNA okazało się, że białko to może być kontrolowane przez miR-93c-5p (Rys. 4).

Wśród danych literaturowych dotyczących mechanizmów towarzyszących EMT można spotkać się z określeniem “cadherin switch”, co w tłumaczeniu na język polski, można nazwać przełączeniem ekspresji kadheryn. Jest to jedno z najlepiej zbadanych zjawisk, kojarzonych z komórkami przeprowadzającymi proces tranzycji nabłonkowo-mezenchymalnej i polega na spadku poziomu E-kadheryny przy jednoczesnym wzroście N-kadheryny [239]. Spadek poziomu E-kadheryny w komórkach nowotworowych prowadzi do rozprzestrzeniania się przerzutów i aktywacji czynników transkrypcyjnych EMT [240], natomiast wzrost poziomu N-kadheryny jest jednoznacznie skorelowany z nowotworzeniem i świadczy o tym, że zainicjowany został proces EMT [239, 241, 242]. W przypadku badań komórek Hep G2 hodowanych w mediach o różnej zawartości glukozy, poziom N-kadheryny jest wyższy w przypadku komórek Hep G2 hodowanych w medium o wyższym stężeniu glukozy, natomiast w komórkach hodowanych w medium o niższym stężeniu glukozy można zauważyć zwiększony poziom białka E-kadheryny. Może to świadczyć o zwiększonej gotowości komórek Hep G2 hodowanych w medium o wyższej zawartości glukozy do przejścia epitelialno- mezenchymalnego (Rys. 19).

Podobne obserwacje można wyciągnąć z poziomów ekspresji beta-kateniny. Jest obecna w komórkach endotelialnych, przylegając do E-kadheryny, jednak w EMT dochodzi do rozszczepienia tych silnie związanych białek i wolna beta-katenina zaczyna działać jako aktywator transkrypcji promując proliferację komórki [243]. Poziom wolnej beta-kateniny jest wyższy w komórkach hodowanych na wysokiej zawartości glukozy niż w przypadku komórek hodowanych w medium o niższej zawartości glukozy.

Do białek ZO (ang. *Zona occludens*) można zaliczyć białka ZO-1, ZO-2 i ZO-3. Są one przyłączone do białek transmembranowych takich jak np. kładyny. Białka ZO-1 uczestniczą w regulacji ścisłych połączeń (ang. *tight junctions*) między komórkami. Na te połączenia składają się różne typy białek błonowych, które pośredniczą w adhezji komórka-komórka, tworzą bariery dyfuzyjne i utrzymują cytoszkielet aktynowy [244]. W komórkach epitelialnych, ZO-1 towarzyszy innym białkom w utrzymaniu ścisłych połączeń w cytoplazmie, jednak w komórkach proliferujących ZO-1 występuje w jądrze komórkowym, co sugeruje że poziom ZO-1 jest związany z proliferacją komórek [245]. Ponadto zmiana lokalizacji ZO-1 z cytoplazmatycznej na jądrową może działać sygnalizacyjnie podczas EMT [246]. Zauważono, również, że wzrost ZO-1 może

powodować zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G0/G1/S. Poziom ZO-1 w proliferujących komórkach jest niski i rośnie wraz z gęstością hodowli komórkowej. Wzrost ekspresji ZO-1 hamuje akumulację ZONAB (ang. *zonula occludens 1 (ZO-1)-associated nucleic acid binding protein*) w jądrze, regulując w ten sposób proliferację [247]. Spadek poziomu ZO-1 i E-kadheryny może być związany z przerzutami nowotworu do wątroby [248]. Ponadto, ubytek ZO-1 jest związany ze złymi prognozami przeżycia pacjentów z rakiem wątrobowokomórkowym po operacji [249]. W przypadku komórek Hep G2, stężenie glukozy w pożywce hodowlanej wpływało znacząco na poziom białka ZO-1. Co więcej, pomimo większego poziomu N-kadheryny oraz zmniejszonego poziomu E-kadheryny w komórkach hodowanych w medium o wyższej zawartości glukozy, zaobserwowano wyższą ekspresję ZO-1.

Klaudyny, podobnie jak białka ZO, uczestniczą w ścisłych połączeniach międzykomórkowych oraz uczestniczą we wzroście i różnicowaniu komórek. Poziom klaudyn ulega zmianom w wielu typach nowotworów, również w raku wątrobowokomórkowym. W komórkach raka wątrobowokomórkowego, poziom klaudyny-1 jest kluczowy dla EMT, ze względu na zaangażowanie tego białka w regulację ścieżki c-Abl-Ras-Raf-1-ERK1/2. Nadekspresja *CLDN1* indukuje powstawanie białek znaczących dla inicjacji EMT - Slug i Zeb1 oraz prowadzi do zmniejszenia poziomu E-kadheryny i zwiększonego poziomu N-kadheryny, wimentyny i beta-keniny. Konsekwencją zwiększonego poziomu klaudyny-1 jest utrata adhezji oraz zwiększona migracja komórek [250]. W przypadku komórek hodowanych w medium o większej dostępności glukozy, poziom klaudyny-1 był wyższy niż w komórkach hodowanych w medium o mniejszej dostępności glukozy.

Jednoczesna ocena poziomu białek takich jak N-kadheryna, E-kadheryna, beta-kenina oraz klaudyna-1 wskazuje na zwiększoną predyspozycję do EMT komórek hodowanych w pożywce o wyższym stężeniu glukozy. Jedynym białkiem, którego poziom, nie wskazywałby jednoznacznie na taki stan jest białko ZO-1.

W komórkach Hep G2 poddanych działaniu nanocząstek srebra różnice między komórkami hodowanymi w pożywce o zwiększonej zawartości glukozy, a komórkami hodowanymi w pożywce o zmniejszonej zawartości glukozy pozostawały statystycznie istotne. W przypadku klaudyny-1, N-kadheryny i beta-keniny nanocząstki srebra

spowodowały wzrost poziomu tych białek w komórkach hodowanych w medium o zwiększonej dostępności glukozy. Natomiast w medium o zmniejszonej dostępności glukozy ich poziom białek spadał. Odwrotną zależność można było zaobserwować w przypadku E-kadheryny, jednak nie była ona tak intensywna w przypadku komórek hodowanych na medium o zwiększonej dostępności glukozy. W przypadku białka ZO-1 nanocząstki srebra w obu wariantach medium hodowlanego spowodowały obniżenie poziomu w stosunku do prób kontrolnych.

W przypadku raka szyjki macicy dochodzi do spadku ekspresji miR-29c-3p. Zwiększenie ekspresji miR-29c-3p w tych komórkach powodowało inhibicję proliferacji, inwazyjności i migracyjności, zatrzymanie cyklu komórkowego oraz kierowanie komórki na drogę apoptozy. Powodowało inhibicję EMT przez podniesienie poziomu E-kadheryny i spadek poziomów N-kadheryny, wimentyny i snail [198]. Spadek miR-29c-3p jest skorelowany ze spadkiem poziomu E-kadheryny i promowaniem EMT [251]. Na procesy EMT związane z poziomem beta-kateniny mają bezpośredni wpływ miR-29-3p [252], miR-100-5p [200], miR-107 [202], miR-195-5p [253], miR-221-3p [209]. Wszystkie wymienione miRNA pełnią funkcje regulatorowe w szlaku WNT/beta-katenina. Ekspresja tego białka w komórkach Hep G2 hodowanych w medium suplementowanym glukozą w stężeniu 25 mmol/dm³ uległa obniżeniu po transfekcji wybranymi syntetycznymi analogami miRNA, sugerując działanie ograniczające EMT związane ze szlakiem WNT/beta-katenina.

Klaudyny są kolejnymi białkami, których poziom jest silnie związany z przejściem epitelialno-mezenchymalnym. Wraz z okludyną stanowią zrąb połączeń ścisłych i warunkują wytrzymałość mechaniczną grup komórek [254]. Obniżenie poziomu klaudyn w komórkach epitelialnych skutkuje dysfunkcjami połączeń ścisłych i utratą integralności nabłonka [255]. Obniżenie poziomu klaudyn jest również charakterystyczne dla wielu inwazyjnych nowotworów, takich jak rak piersi, przełyku i prostaty [256-258], jednak rola klaudyn jest niejednoznaczna i w przypadku nowotworów jajnika zaobserwowano wzrost ich poziomu [259]. W literaturze nie ma bezpośrednich doniesień o wpływie miR-29c-3p na ekspresję klaudyny 1, jednak podobne miRNA, miR-29a-3p, pochodzące z tej samej rodziny, jest regulatorem klaudyny 1 i wykazuje inhibicję w stosunku do procesu przejścia epitelialno-mezenchymalnego [216]. Zgodnie

z informacjami w dostępnych bazach danych, miR-29c-3p powinno mieć podobne działanie, co potwierdziło badanie Western Blot, gdzie wykazano blokadę translacji kładyny przez zastosowanie miR-29c-3p (Rys. 4). Podobnie, miR-107 wykazuje działanie ograniczające poziom kładyny 1 i ogranicza migrację oraz przejście epitelialno mezenchymalne w komórkach raka wątroby [203]. miR-195-5p działa w sposób pośredni, obniżając poziom kładyny 2, co w konsekwencji prowadzi do spadku poziomu kładyny 1 [207]. Mimo powyższych doniesień transfekcja wybranymi analogami miRNA nie wpłynęła na poziom CLDN1 (Rys. 20). Natomiast inkubacja z nanocząstkami srebra wpłynęła w sposób znaczący na poziom tego białka w przypadku komórek hodowanych w medium o podwyższonym poziomie glukozy. Również sam poziom glukozy okazał się znaczący dla poziomu CLDN1 (Rys. 19). Niezależnie od zastosowanego stężenia nanocząstek srebra poziom białka był wyższy w komórkach hodowanych w pożywce o wyższym stężeniu glukozy. Te różnice mogą być powodem różnic obserwowanych w ilości tworzonych kolonii w zależności od pożywki hodowlanej (Rys. 8 i 10), gdzie zaobserwowano mniejszą ilość kolonii w przypadku pożywki suplementowanej glukozą w stężeniu 25 mmol/dm³ i same kolonie składały się ze znacząco większej ilości komórek. Za ten efekt mogą być odpowiedzialne połączenia ścisłe.

Zastosowane syntetyczne analogi miRNA spowodowały zmiany w profilu białek związanych z EMT sugerujące ich wpływ na obniżenie potencjału komórek Hep G2 do przejścia epitelialno mezenchymalnego. Szczególną uwagę zwracają zmiany w poziomach N-kadheryny i E-kadheryny. Wzrost poziomu N-kadheryny połączony z jednoczesnym spadkiem E-kadheryny są wyznacznikami wcześniej opisanego procesu o nazwie „cadherin switch”, który jest opisywany jako jeden z głównych wyznaczników potencjału do EMT. Transfekcja komórek linii Hep G2 syntetycznymi analogami miRNA przed inkubacją z nanocząstkami srebra spowodowała znaczący spadek poziomu N-kadheryny i zwiększenie poziomu E-kadheryny w stosunku do komórek nie poddanych transfekcji i inkubowanych z AgNP (Rys. 21). Efekt zmian w poziomie tych białek przez syntetyczne analogi wybranych miRNA jest widoczny w ograniczeniu potencjału migracyjnego komórek linii Hep G2 hodowanych w medium o wyższym stężeniu glukozy w testach zarostania rasy (Rys. 17).

Nanocząstki srebra spowodowały zmiany w proporcji komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego w obu wariantach stężenia glukozy w użytych pożywkach. Zaobserwowano zależny od stężenia nanocząstek srebra spadek ilości komórek w fazie G1 cyklu komórkowego, czemu towarzyszył wzrost ilości komórek w fazie G2. Podobnych obserwacji w doświadczeniach na linii komórkowej Hep G2 dokonano już wcześniej [260], dla hodowli prowadzonej w medium RPMI1640, które pod względem zawartości glukozy jest zbieżne z użytym w niniejszej pracy wyższym stężeniem (25 mmol/dm^3).

Zaobserwowany większy odsetek komórek w fazie G2 w medium o stężeniu glukozy 25 mmol/dm^3 jest zbieżny z wcześniejszą obserwacją różnic w potencjale proliferacyjnym komórek (Tab. 2) gdzie uwidacznia się proproliferacyjny wpływ wyższego stężenia glukozy w stosunku do komórek linii Hep G2. Większa ilość komórek linii Hep G2 w fazie G2 cyklu komórkowego koreluje z rozkładem populacji komórek w podobnych doświadczeniach, prowadzonych z użyciem linii ECC-1 oraz Ishikawa, gdzie odsetek komórek w pożywce o stężeniu glukozy na poziomie 1 mmol/dm^3 również był niższy niż w przypadku komórek hodowanych w pożywce o wyższym stężeniu glukozy [194].

Spowolnienie proliferacji komórek w odpowiedzi na nanocząstki srebra (Tab. 2) w połączeniu ze zwiększonym odsetkiem komórek w fazie G2 cyklu komórkowego sugeruje zatrzymanie podziału w tej fazie. Podobne obserwacje przeprowadzono dla komórek A549 i Calu-1. Jednocześnie, wydaje się, że ten efekt jest specyficzny względem określonych linii komórkowych, ponieważ w przypadku linii BEAS-2B zaobserwowano zatrzymanie cyklu w fazie S, a w przypadku linii NCI-H358 nanocząstki srebra nie miały żadnego wpływu na cykl komórkowy [261]. W przypadku komórek linii Hep G2 hodowanych w pożywce RPMI1640 o stężeniu glukozy wynoszącym 25 mmol/dm^3 nanocząstki srebra o nominalnej wielkości 15 nm również spowodowały wzrost ilości komórek w fazie G2 cyklu komórkowego, pozostając bez wpływu na fazę S [260]. Efekt działania nanocząstek srebra w kontekście wpływu na cykl komórkowy nie jest więc uniwersalny dla różnych linii komórkowych. Co więcej, nie wydaje się też zależny od tkankowego pochodzenia komórek. Zastosowane syntetyczne analogi miRNA pozostały bez wpływu na proporcje ilości komórek obserwowanych w poszczególnych fazach cyklu komórkowego (Rys. 24), co świadczy o braku wpływu badanych miRNA na punkty kontrolne cyklu komórkowego.

Stres oksydacyjny wywołany przez nadtlenek wodoru powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2 [262], co jest zbieżne z efektem działania nanocząstek srebra i sugeruje, że właściwości nanocząstek srebra wywołujące stres oksydacyjny w komórkach, powodują zatrzymanie komórek w fazie G2 cyklu komórkowego. Wykazano również, że nanocząstki srebra powodują wzrost obserwowanych nadtlenców w komórkach linii Hep G2 hodowanych w medium o podwyższonym stężeniu glukozy (25 mmol/dm³) (Rys. 28), co wykazano również wcześniej [263]. Różnice w dynamice zmian liczności komórek linii Hep G2 w różnych fazach cyklu w odpowiedzi na nanocząstki srebra, w mediach o różnej zawartości glukozy, mogą wynikać z innego profilu odpowiedzi na stres oksydacyjny.

Apoptoza wywoływana przez stres oksydacyjny, jest zjawiskiem udokumentowanym i opisanym w literaturze przedmiotu. Sam proces może być wywołany przez wiele czynników, w tym chemoterapeutyki, szlaki przekazywania sygnałowego, niedobory czynników wzrostu czy też uszkodzenia DNA. Przez różnorodność inicjatorów apoptozy, wszechobecne w metabolizmie komórkowym reaktywne formy tlenu spełniają różnorodne funkcje w jej przebiegu. W mitochondriach, zbiegają się różne drogi inicjacji apoptozy [264]. Jednocześnie, mitochondria są głównym źródłem reaktywnych form tlenu w komórce, takich jak tlen singletowy, anionorodnik ponadtlenkowy, rodnik hydroksylowy i nadtlenek wodoru, [265]. Nawet niewielkie zaburzenie w homeostazie redoks może prowadzić do zmian w regulacji czynników transkrypcyjnych, takich jak NF-κB, p53 czy AP-1 [266] skutkujących zmianami w poziomie białek prowadząc do apoptozy. Gdy mechanizmy obrony antyoksydacyjnej komórki są niewystarczające, żeby kompensować rosnącą ilość reaktywnych form tlenu, uszkodzeniom oksydacyjnym ulegają składniki komórki. Praktycznie każda część komórki jest podatna na takie uszkodzenia ze względu na łańcuchowy charakter reakcji rodnikowej. Mechanizmy indukujące apoptozę, zależne od reaktywnych form tlenu, są wykorzystywane w działaniu wielu leków przeciwnowotworowych, przykładem których jest adriamycyna [267].

Stres oksydacyjny wywoływany przez nanocząstki srebra często przedstawiany jest jako główny efekt ich działania na poziomie komórkowym. Mimo to, są doniesienia o efektach biologicznych wywołanych samą strukturą nanocząstki niezwiązaną z jonową

warstwą na jej powierzchni. AgNP o wielkości 20 nm i 100 nm zlokalizowano w mitochondriach za pomocą metody SLI (ang. *Scattered Light Imaging*) oraz za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej, co sugeruje indukcję apoptozy na drodze efektów specyficznych dla nanocząstek w mitochondriach [183]. Dla komórek Hep G2 hodowanych w pożywce o podwyższonym stężeniu glukozy (Rys. 25) zaobserwowano istotny wzrost ilości komórek nekrotycznych. Podobne obserwacje przeprowadzono dla komórek iMEC oraz SUM159. Jednocześnie, komórki iMEC wykazywały późną fazę apoptozy/wtórny nekrozę w odróżnieniu do komórek SUM159 gdzie nie odnotowano zwiększenia odsetka komórek we wczesnej nekrozie co sugeruje, że mechanizm śmierci komórki opierał się o szlak apoptozy a nie o oksydacyjne uszkodzenia skutkujące bezpośrednio nekrozą [268]. To może świadczyć o odmiennych mechanizmach śmierci komórki wywołanej nanocząstkami srebra w zależności od linii komórkowej. W przypadku komórek linii SUM159 mechanizm był zbieżny z mechanizmem indukowanym przez Ag^+ , natomiast w przypadku komórek iMEC decydujące mogły być mechanizmy zależne od bezpośredniej interakcji nanocząstek z mitochondriami, podobnie jak w obserwacjach odnośnie otrzymanych wyników (Rys. 25), gdzie odnotowano stosunkowo niewielkie zmiany w odsetku komórek na szlaku apoptozy i jednocześnie wzrost ilości komórek nekrotycznych.

Podobnie do danych opisanych w literaturze, nanocząstki srebra spowodowały wzrost fluorescencji 2',7'-dichlorofluoresceiny (DCF) (Rys. 26). Diocyan dichlorodihydrofluoresceiny (H_2DCFDA) wnika do komórek, gdzie jest deacetylowany przez esterazy do 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (H_2DCF), która z kolei jest utleniana do DCF. Historycznie pierwszą zmierzoną reaktywną formą tlenu za pomocą tej sondy był nadtlenek wodoru [269]. Jednak od tego czasu zaobserwowano również inne drogi utleniania H_2DCF do DCF. Zauważono, że chelatory żelaza inhibują utlenianie H_2DCF przez nadtlenek wodoru. Sam mechanizm utleniania przez żelazo/ H_2O_2 może być mediowany przez rodnik hydroksylowy lub/i przez kompleksy żelaza z tlenem, co sprawia, że wewnątrzkomórkowe hemoproteiny mogą odgrywać rolę w utlenianiu H_2DCF [270]. Niemniej, dichlorodihydrofluoresceina uznawana jest za skuteczne narzędzie do ilościowej, porównawczej oceny ilości reaktywnych form tlenu, głównie nadtlenu wodoru. Zaobserwowane różnice w odpowiedzi na nanocząstki srebra komórek

z hodowli o różnych warunkach dostępności glukozy, są zbieżne z wcześniejszymi obserwacjami, gdzie nanocząstki srebra pozostawały bez efektu w przypadku komórek hodowanych w medium suplementowanym glukozą o stężeniu 5,5 mmol/dm³ [263]. Podobne wyniki uzyskano dla dihydroetydyny, dihydrorodaminy i MitoSOX. Każda z tych sond, włączając dichlorodihydrofluoresceinę charakteryzuje się innym powinowactwem w stosunku do różnych reaktywnych form tlenu, co sugeruje, że efekt oporności komórek na szkodliwe działanie reaktywnych form tlenu pochodzących z oddziaływania nanocząstek jest uniwersalny w aspekcie całego spektrum powstających RFT.

W pomiarach z użyciem dihydrorodaminy 123 (Rys. 28) inkubacja z nanocząstkami srebra spowodowała wzrost obserwowanej intensywności fluorescencji w komórkach linii Hep G2 hodowanych w medium suplementowanym glukozą w stężeniu 25 mmol/dm³. Dihydrorhodamina 123 jest sondą używaną, między innymi, do oznaczania poziomu nadtlenu wodoru i innych nadtlenków w komórkach. Sam sposób detekcji jest pośredni. Szybkość reakcji utleniania dihydrorhodaminy 123 przez nadtlenek wodoru jest stosunkowo niska, jednocześnie przy obecności jonów żelaza (IV) i peroksydaz dihydrorhodamina 123 jest efektywnie utleniana [271]. Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami, nanocząstki srebra w istotny sposób zwiększają poziom nadtlenków mierzonych tą metodą w komórkach linii Hep G2. Transfekcja wybranymi syntetycznymi miRNA nie wpłynęła w sposób znaczący na poziom utleniania sond, jednak w komórkach transfekowanych, nanocząstki srebra nie wywołały znacznego wzrostu fluorescencji jak w przypadku komórek nietransfekowanych. Podobny efekt zaobserwowano w przypadku pomiarów z użyciem H₂DCFDA. Jednym z celów modulacyjnych miR-100-5p jest oksydaza NADPH (NOX4). Funkcją NOX4 jest generacja reaktywnych form tlenu [199], a wzrost poziomu białek z rodziny NOX prowadzi do stresu oksydacyjnego i jest silnie związana z niewydolnością serca [272]. Wykazano, że miR-100-5p skutecznie ogranicza powstawanie miażdżycy na drodze regulacji szlaku związanego z NRF2 i stresem oksydacyjnym [273]. MiR-221-3p ogranicza procesy zapalne oraz powstawanie stresu oksydacyjnego poprzez inhibicję szlaku TLR4/NF-κB w komórkach HUVEC [208]. MiR-29c-3p hamuje autofagię wywołaną przez neurotoksyny, na drodze indukcji stresu oksydacyjnego, MPP⁺ (jon 1-metylo-4-fenylpirydyniowy) poprzez ograniczenie ekspresji TET2 [274]. MiR-195-5p jest kolejnym

miRNA, który ogranicza stres oksydacyjny, działając poprzez hamowanie ekspresji ATF6 [204] oraz VEGFA [205]. Rola miR-107 w powstawaniu stresu oksydacyjnego jest niejednoznaczna. Obecność reaktywnych form tlenu obniża ekspresję miR-107 zarówno w skutek bezpośredniego działania nadtlenu wodoru jak i reaktywnych form tlenu powstających w skutek działania β -amyloidu, przy czym antyoksydanty były w stanie odwrócić ten efekt [275]. Glukoza wpływa dodatnio na ekspresję miR-107 [276], a inhibicja tego miRNA powoduje wzrost ekspresji CAB39, co aktywuje szlak AMPK-NRF2 indukujący mechanizmy antyoksydacyjne w osteoblastach [277]. Jednocześnie, syntetyczne analogi miR-107 spowodowały odwrócenie organizmalnych efektów toksycznego działania złogów β -amyloidu w zwierzętach laboratoryjnych takich jak upośledzenie pamięci przestrzennej, zahamowanie długotrwałego wzmocnienia synaptycznego, utrata neuronów piramidowych, zmniejszenie poziomu czynnika neurotroficznego oraz zmniejszenie poziomu fosforylacji kinaz receptora tyrozynowego B i kinazy białkowej B. [278].

Do oceny stopnia peroksydacji lipidów użyto sondy BODIPY C11, której maksimum emisji fluorescencji przesuwają się po utlenieniu z $\lambda=590$ nm do $\lambda=510$ nm. Sama sonda lokalizuje się preferencyjnie w dwuwarstwie lipidowej. Zgodnie z wcześniejszymi badaniami [279] peroksydacja lipidów w odpowiedzi na nanocząstki srebra jest intensywniejsza w komórkach z hodowli suplementowanej wyższym stężeniem glukozy. Transfekcja syntetycznymi analogami miRNA obniża poziom oksydacyjnych uszkodzeń lipidów wywołanych działaniem nanocząstek srebra (Rys. 29).

Pomiary wykonane przy użyciu dioctanu dichlorodihydrofluoresceiny, dihydrorodaminy oraz BODIPY C11 wykazały prooksydacyjny charakter nanocząstek srebra zarówno w cytoplazmie, mitochondriach oraz w obszarze błony komórkowej. Badania wykazują, że jony srebra i ich sole są toksyczne i często służą jako punkt odniesienia w stosunku do cytotoxyczności nanocząstek srebra [280]. Jony srebra, podobnie jak nanocząstki srebra wykazują silne działanie przeciwbakteryjne, zwłaszcza w środowisku tlenowym. Jest to spowodowane generacją anionorodnika ponadtlenkowego w komórkach, wynikającą z ograniczenia aktywności enzymów łańcucha oddechowego [281]. Główna różnica między jonami srebra a nanocząstkami srebra jest związana z biodostępnością. Jony srebra, z uwagi na dużą dostępność

reagentów w przestrzeni międzykomórkowej, również w hodowli *in vitro* [282], będą obecne w komórce w stosunkowo niskim stężeniu i w konsekwencji możliwość ich reakcji ze składnikami wewnątrzkomórkowymi będzie ograniczona. W przypadku nanocząstek srebra, uwolnienie jonów z powierzchni w przestrzeni zewnątrzkomórkowej ma podobny efekt toksyczny do jonów srebra. W obu przypadkach ten efekt zanika w funkcji czasu, w wyniku tworzenia ligandów srebra. Stopień rozpuszczalności nanocząstek srebra w środowisku wewnątrzkomórkowym jest sporny, jednocześnie hipoteza „Konia Trojańskiego”, jako jedna z głównych funkcjonujących hipotez toksyczności nanocząstek srebra zakłada stopniowe ich rozpuszczanie we wnętrzu komórki, połączone ze stopniowym uwalnianiem jonów srebra [283].

Błona mitochondrialna komórek Hep G2 hodowanych w medium o podwyższonej zawartości glukozy ulega hiperpolaryzacji w obecności nanocząstek srebra (Rys. 33), podobny efekt uzyskano dla oligomycyny (Rys. 32). Mechanizm działania oligomycyny polega na inhibicji syntazy ATP, w skutek czego przestają funkcjonować pompy protonowe łańcucha oddechowego [284], co powinno powodować blokadę syntezy ATP na drodze fosforylacji oksydacyjnej. Wykazano, że oligomycyna powoduje ograniczenie syntezy ATP w komórkach Hep G2. Jednocześnie, efekt jest nieporównywalnie większy w przypadku komórek hodowanych na pożywce z galaktozą niż w przypadku pożywki z glukozą. Dla komórek hodowanych z użyciem galaktozy, oligomycyna powodowała spadek stężenia ATP do poziomów bliskich zera. Natomiast komórki, do hodowli których użyto glukozy, okazały się mniej wrażliwe na deplecję ATP przez oligomycynę i ich poziom ATP uległ ograniczeniu do 40 – 80 % w zależności od stężenia oligomycyny i czasu inkubacji [284]. Stężenie glukozy jest kluczowe dla wtórnych efektów uszkodzeń mitochondriów w komórkach wykazujących elastyczność metaboliczną, takich jak Hep G2. Stres oksydacyjny może powodować potranslacyjne modyfikacje syntazy ATP na drodze karbonylacji, nitracji, lipoksydacji i modyfikacje poprzez kowalencyjne wiązanie z reaktywnymi aldehydami, takimi jak HNE (4-hydroxy-2-nonenal) [285]. Mimo podobnego efektu końcowego działania nanocząstek srebra i oligomycyny wydaje się, że działanie AgNP nie jest bezpośrednio związane z inhibicją syntazy ATP na drodze bezpośrednich interakcji jak ma to miejsce w przypadku oligomycyny, o czym świadczy brak zmian w poziomie ATP po inkubacji z nanocząstkami srebra w zastosowanym

stężeniu (Rys. 34). Stres oksydacyjny w komórkach linii Hep G2 powoduje spadek potencjału błony mitochondrialnej [286]. Mimo zaobserwowanego wzrostu poziomu reaktywnych form tlenu (Rys. 26 i 27), wykazano, że działanie nanocząstek srebra może zarówno podwyższyć [287] jak i obniżyć potencjał błony mitochondrialnej [286]. Niestety, dokładny skład medium hodowlanego nie jest w tych wypadkach znany.

NADPH/NADP⁺ jest jednym z wyznaczników komórkowego potencjału antyoksydacyjnego. Jest kofaktorem reduktazy glutationowej oraz reduktazy tioredoksyny. Jednocześnie nadmiar NADP(H) może wywoływać stres oksydacyjny, ponieważ aktywność oksydaz NADPH skutkuje powstawaniem reaktywnych form tlenu [288]. Obniżenie puli NADP(H) w komórce po niedokrwieniu serca jest związana z indukcją aktywności NAD(P)azowej CD38 [289]. Samo białko CD38 kojarzone głównie z białymi krwinkami jest silnie związane z syntezą NADP, ale pełni również istotną rolę w komórkach wątroby, gdzie jest markerem stanów zapalnych [290]. Również w komórkach linii Hep G2 ekspresja CD38 została potwierdzona [291]. Jak wcześniej wykazano, nanocząstki srebra mogą powodować obniżenie stosunku NADPH do NADP⁺. Nanocząstki srebra wywołały spadek dostępnej puli NADPH i NADP⁺ (Rys. 30), co sugeruje, że nie tylko pula dostępnego NADPH zostaje ograniczona w wyniku aktywności obrony antyoksydacyjnej zależnej od GSH, ale również występuje kolejny efekt, prawdopodobnie związany z CD38, który skutkuje ogólną deplecją NADPH i NADP⁺. Podwyższenie poziomu glukozy powoduje podwyższenie produkcji NADPH bez wpływu na poziom puli NAD, co zostało udokumentowane na przykładzie wielu rodzajów komórek [292]. Podobnie w przypadku cukrzycy, podwyższone stężenie glukozy-6-fosforanu powoduje zwiększenie poziomu dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej, co z kolei powoduje zwiększenie produkcji NADPH [293]. Sumaryczne stężenie NADP(H) pozostaje niezależne od samego stężenia glukozy (Rys. 30), czynnikiem różnicującym są nanocząstki srebra, które powodują, że poziom NADP(H) jest obniżony przy wyższych stężeniach AgNP. Sama transfekcja syntetycznymi analogami miRNA nie spowodowała istotnych zmian w poziomie NADP(H). Natomiast transfekcja w połączeniu z inkubacją z nanocząstkami srebra zniwelowała efekt działania samych AgNP. Prawdopodobnie jest to związane z analogicznymi obserwacjami dotyczącymi generacji reaktywnych form tlenu (Rys. 26 i 27). Główną funkcją NADPH w aspekcie obrony antyoksydacyjnej jest

regeneracja puli zredukowanego glutationu [294]. Przywrócenie puli NADP(H) przez transfekcję wybranymi syntetycznymi analogami miRNA (Rys. 31) może być przyczyną ich wpływu na spadek wykrywanych reaktywnych form tlenu w komórkach linii Hep G2 (Rys. 27 i 28) oraz spadek potencjału utleniającego względem składników błony komórkowej (Rys. 29).

Analiza ekspresji wybranych miRNA w wątrobach szczurów szczepu Fischer 344/DuCrI nie wykazała znaczących różnic między zwierzętami, którym podawano nanocząstki srebra a zwierzętami kontrolnymi, bez względu na drogę podania nanocząstek srebra (Rys. 35 i 36). Jest to zbieżne z wynikami otrzymanymi dla zmian w ekspresji tych samych miRNA w komórkach linii Hep G2 hodowanych w medium o fizjologicznym stężeniu glukozy na poziomie 5,5 mmol/dm³ (Rys. 2). Zwierzęta były hodowane w optymalnych warunkach z prawidłową dietą. Można założyć, że parametry biochemiczne krwi były zbliżone do warunków naturalnych w sensie fizjologicznym. Prawidłowe stężenie glukozy w krwi szczurów jest podobne do tego u ludzi i wynosi od 3,95 do 5,65 mmol/dm³ [295].

7. Podsumowanie

Glukoza jest istotnym czynnikiem metabolicznym w ssaczych liniach komórkowych. Już wcześniej badania prowadzone w Katedrze wykazały różnice w odpowiedzi komórek na stres oksydacyjny wywołany nanocząstkami srebra w zależności od użytego stężenia glukozy w medium hodowlanym. W niniejszej pracy kontynuowano tę myśl, przeprowadzając dodatkowe doświadczenia porównawcze. Doświadczenia z zakresu potencjału proliferacyjnego, klonogenności, migracji i inwazyjności komórek, cyklu komórkowego, poziomu białek związanych z przejściem epitelialno-mezenchymalnym oraz doświadczenia obrazujące poziom stresu oksydacyjnego pokazały głębokie różnice metaboliczne między komórkami tej samej linii, w hodowlach różniących się jedynie dostępnością glukozy w pożywce. Poziom badanych parametrów różnił się znacząco bez udziału ksenobiotyków. Co więcej, w niektórych doświadczeniach różnica w stężeniu glukozy powodowała nie tylko zmianę poziomu obserwowanej cechy, ale skutkowałą obserwacją różnych zjawisk lub zupełnym odwróceniem zależności cechy od stężenia nanocząstek srebra, co miało miejsce przy

pomiarach klonogenności (Rys. 8), przejścia przez model macierzy błony podstawnej (Rys. 11), migracji komórek (Rys. 15) i w pomiarach reaktywnych form tlenu z H₂DCFDA (Rys. 26). Znajdujące się w literaturze opisy wielu komórkowych procesów biochemicznych dotyczą konkretnego stanu metabolicznego, a przy częstym braku informacji na temat warunków hodowlanych, są trudne w interpretacji i mogą być przyczyną pozornych sprzeczności. W niniejszej pracy zobrazowano również jak bardzo odpowiedź komórki na czynnik toksyczny różni się w zależności od jej profilu metabolicznego. Zwłaszcza, gdy czynnik ma charakter modulujący status redoks komórki, jak ma to miejsce w przypadku nanocząstek srebra, gdzie wyjściowy potencjał antyoksydacyjny komórek odgrywa kluczową rolę. W komórkach linii Hep G2 znaczne zwiększenie stężenia glukozy ponad fizjologiczne normy zaowocowało spadkiem oporności komórek na działanie nanocząstek srebra. Jest to istotny czynnik przy rozważaniu cywilizacyjnych następstw stosowania nanomateriałów, zwłaszcza przy stałym wzroście problemów zdrowotnych na tle cukrzycowym. Przy odsetku ludzi cierpiących na cukrzycę w populacji na poziomie 4,1 % w 2020 roku, zasadnym staje się pytanie jak stosowane materiały wpływają na już istniejące choroby cywilizacyjne. Wysokie stężenie glukozy we krwi jest identyfikowane jako istotny czynnik w powstawaniu nowotworów [296]. Cukrzyca, głównie typu drugiego, jest związana z podwyższonym ryzykiem zachorowania na niektóre typy nowotworów, głównie wątroby, pęcherza moczowego, trzustki, endometrium i jelita grubego. Ryzyko powstania nowotworu wątroby w przypadku cukrzycy jest ponad dwukrotnie większe [297]. Na podstawie zaprezentowanych wyników i przytoczonych danych literaturowych można wysnuć wniosek, że wysoki poziom glukozy jest induktorem stresu oksydacyjnego. Sam stres oksydacyjny i jego implikacje są głównym zidentyfikowanym efektem biologicznym oddziaływania nanocząstek srebra na organizmy, zarówno w modelach *in vitro* jak i *in vivo*. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy pokazują istotny wzrost parametrów stresu oksydacyjnego w następstwie działania nanocząstek srebra. Jednocześnie transfekcja wybranymi syntetycznymi analogami miRNA w sposób skuteczny ograniczyła powstawanie stresu oksydacyjnego mierzonego za pomocą szeregu metod: testów z użyciem sond fluorescencyjnych H₂DCFDA i DHR123 oraz doświadczeń określających potencjał oksydacyjny względem elementów błony komórkowej z użyciem BODPIY C11. Nanocząstki srebra spowodowały również ograniczenie dostępnej puli NADP(H)

w komórce. Wybrane syntetyczne analogi miRNA spowodowały odwrócenie tych efektów i wydają się niwelować wpływ nanocząstek srebra w aspekcie produkcji reaktywnych form tlenu i powstawania stresu oksydacyjnego. Transfekcja przywróciła również poziom NADP(H) do poziomu prób kontrolnych.

Nanocząstki srebra wywołały silny spadek ekspresji wybranych miRNA w komórkach linii Hep G2 hodowanych w medium o wyższym stężeniu glukozy, gdzie na podstawie porównania parametrów IC50, zauważono wyższą wrażliwość na toksyczne działanie AgNP niż w komórkach hodowanych w medium o niższym stężeniu glukozy. Transfekcja z użyciem miR-29c-3p, miR-100-5p, miR-107, miR-195-5p oraz miR-221-3p skutecznie ochroniła komórki z hodowli o wyższym poziomie glukozy przed toksycznym działaniem nanocząstek srebra. Co więcej, komórki te stały się po transfekcji mniej wrażliwe niż komórki hodowane z użyciem niższych stężeń glukozy. Spośród wybranych miRNA, na poziomie organizmalnym, miR-29c-3p [298], miR-100-5p [299], miR-107 [300] oraz miR-195-5p [301] są związane z fenotypem cukrzycowym. Na tę chwilę brak jest jasno sprecyzowanych powiązań między ilością wolnego miRNA w osoczu a wewnątrzkomórkowymi procesami regulowanymi przez te miRNA. Same miRNA, wydzielane w egzosomach i mikropęcherzykach stanowią istotną część międzykomórkowych szlaków sygnalizacyjnych [302] i umożliwiają międzykomórkową regulację epigenetyczną. Większość komórek eukariotycznych posiada funkcję wydzielniczą miRNA, jednak największa część obecnych w osoczu miRNA jest wydzielana przez płytki krwi [303]. Wpływ na metabolizm komórki będzie więc wypadkową wewnątrzkomórkowej ekspresji miRNA oraz międzykomórkowej regulacji epigenetycznej.

Można postawić tezę, że to właśnie stymulacja obrony antyoksydacyjnej za pomocą wybranych miRNA zmieniła profil odpowiedzi na ten zbliżony do komórek o obronie antyoksydacyjnej wcześniej wyindukowanej przez długotrwałą hodowlę w medium o fizjologicznym poziomie glukozy.

Na szczególną uwagę zasługują wyniki uzyskane z testów potencjału migracyjnego komórek linii Hep G2 (Rys. 15), gdzie komórki hodowane w medium o niższej zawartości nie wykazywały potencjału do przejścia epitelialno-mezenchymalnego, niezależnie od zastosowanego stężenia nanocząstek srebra.

Jednocześnie, komórki w medium suplementowanym glukozą w stężeniu 25 mmol/dm³ wykazywały tendencję do przejścia epitelialno-mezenchymalnego nawet bez wpływu dodatkowych czynników. Co więcej, inkubacja z nanocząstkami srebra zadziałała stymulująco na intensywność przejścia w tych komórkach. Zważywszy na przytoczony wcześniej związek między chorobą cukrzycową a nowotworzeniem wydaje się to szczególnie istotne w kontekście badania potencjalnych związków i metod terapeutycznych. Te wyniki sugerują również konieczność bliższego przyjrzenia się, w kontekście metabolizmu glukozy, dostępnym terapeutynom, których mechanizm działania lub efekty uboczne opierają się o modulację statusu redoks komórki. Zastosowane miRNA w sposób skuteczny ograniczyły potencjał do przejścia epitelialno-mezenchymalnego komórek linii Hep G2 hodowanych w medium o podwyższonym poziomie glukozy (Rys. 17). Jest to szczególnie istotne ze względu na istniejące kliniczne powiązania między podwyższonym stężeniem glukozy we krwi i śmiertelnością wywołaną wieloma rodzajami nowotworów, w tym nowotworami wątroby, co zostało potwierdzone w badaniach epidemiologicznych [304].

To obrazuje, że manipulacje epigenetyczne za pomocą miRNA nie tylko mogą znaleźć zastosowanie w bezpośredniej terapii, ale są też istotnym narzędziem badawczym mogącym modyfikować tło danego zespołu chorobowego.

8. Wnioski

1. Profil metaboliczny komórek linii Hep G2 jest kluczowy w odpowiedzi na toksyczne działanie nanocząstek srebra.
2. Stężenie glukozy w pożywce hodowlanej jest czynnikiem wpływającym na profil miRNA w komórkach.
3. Wybrane miRNA (miR-29c-3p, miR-100-5p, miR-107, miR-195-5p, miR-221-3p) mają znaczenie w modulacji toksyczności nanocząstek srebra w komórkach linii Hep G2.
4. Zróżnicowanie odpowiedzi komórek na stres oksydacyjny wywołany nanocząstkami srebra można zniwelować przez zastosowanie regulacji epigenetycznej z użyciem syntetycznych analogów miRNA.
5. Zmiana poziomu pojedynczych miRNA wpływała w mniejszym stopniu na toksyczność nanocząstek srebra niż jednoczesna transfekcja wszystkimi wytypowanymi miRNA. Jednoczesna zmiana poziomu: miR-29c-3p, miR-100-5p, miR-107, miR-195-5p, miR-221-3p zmniejsza wrażliwość komórek Hep G2 na toksyczne działanie nanocząstek srebra.
6. Modulacja potencjału do przejścia epithelialno-mezenchymalnego za pomocą mechanizmów epigenetycznych okazała się skuteczna. Jednocześnie użyta manipulacja dotycząca poziomu miRNA (miR-29c-3p, miR-100-5p, miR-107, miR-195-5p, miR-221-3p) zwiększyła odporność komórek nowotworowych na stres oksydacyjny, będący jednym z głównych mechanizmów działania chemoterapeutyków, i przeżywalność, wobec toksycznego ksenobiotyku w postaci nanocząstek srebra.
7. W materiale izolowanym od zwierząt doświadczalnych profil badanych miRNA nie uległ znaczącej zmianie po ekspozycji zwierząt na działanie nanomateriałów, co oznacza brak wpływu nanomateriałów na badane miRNA w warunkach *in vivo* w wybranym układzie badawczym.

9. Streszczenie

Toksyczne działanie nanocząstek srebra zostało potwierdzone na wielu liniach komórkowych w tym na linii komórek Hep G2. Niemniej jednak, wpływ nanocząstek srebra na komórki, może różnić się w zależności od stosowanej do hodowli pożywki. W badaniach prowadzonych na komórkach linii Hep G2 stała jest rozbieżność między metodyką hodowli używaną w literaturze a zaleceniami ATCC dlatego trudno jest porównywać dane literaturowe, dotyczące tego zagadnienia.

Na różnice w odpowiedzi komórki na działanie nanocząstek srebra w różnych mediach hodowlanych może składać się wiele czynników. Jednym z nich jest interferencja mikroRNA (miRNA). MiRNA to małe cząsteczki RNA o budowie ok. 22 nt, które potranskrypcyjnie kontrolują ekspresję genów na zasadzie interferencji, czyli przyłączania się do komplementarnych mRNA. W proces ten zaangażowana jest cała maszyna białkowa, która pozwala na dojrzewanie miRNA, jego transport a w rezultacie blokowanie docelowej nici mRNA.

Regulacja ekspresji genów jest jednym z procesów epigenetycznych, które służą komórkom prawidłowym do przeprowadzania procesów fizjologicznych niezbędnych do utrzymania zdrowej kondycji tkanki i całego organizmu. Nowotworzenie powodowane jest przez mutacje w DNA. Komórki nowotworowe charakteryzują się zmienioną ekspresją genów, również tych odpowiedzialnych za powstawanie miRNA. Zarówno wzrost jak i spadek odpowiednich miRNA niesie za sobą konsekwencje. Zmniejszenie poziomu białek będących produktem genów supresorowych, spowodowany zwiększeniem poziomu kontrolujących je miRNA oraz zwiększenie poziomu białek będących produktem onkogenów spowodowany spadkiem ekspresji kontrolujących je miRNA. Prowadzi to do zaburzeń cyklu komórkowego, blokowania szlaków przekazywania sygnałów prowadzących do apoptozy jak również zwiększenia potencjału do przejścia epitelialno-mezenchymalnego.

Należy nadmienić że zmiany w poziomach miRNA zweryfikowano w wielu chorobach nie tylko nowotworowych. Z uwagi na prostą budowę oraz istotne funkcje w metabolizmie na poziomie komórkowym, tkankowym oraz organizmalnym, miRNA są materiałem licznych badań. Regulacja miRNA przez wykorzystanie syntetycznych

analogów lub inhibitorów może być wykorzystywana zarówno do celów badawczych, diagnostycznych jak i terapeutycznych.

Niniejsza praca zakłada następujące cele:

1. Ocenę wpływu nanocząstek srebra na komórki o różnym fenotypie metabolicznym,
2. Ocenę wpływu nanocząstek srebra na profil miRNA istotnych w powstawaniu i progresji nowotworu,
3. Ocenę wpływu modulacji miRNA na fenotyp komórek poddanych toksycznemu działaniu nanocząstek srebra.

Na model badawczy wybrano komórki raka wątrobowokomórkowego linii Hep G2, hodowane w pożywce zawierającej glukozę w stężeniu odzwierciedlającym stężenie prawidłowe u człowieka ($5,5 \text{ mmol/dm}^3$) oraz w pożywce o podwyższonym stężeniu glukozy (25 mmol/dm^3) występującym przy ostrym stanie cukrzycowym.

W pierwszej kolejności zbadano odpowiedź komórek linii Hep G2 na działanie nanocząstek srebra i sprawdzono różnice w charakterze tej odpowiedzi w zależności od stanu metabolicznego komórek, warunkowanego zmienną zawartością glukozy w pożywce. W drugiej części badań podjęto próbę modulacji odpowiedzi komórek na AgNP za pomocą syntetycznych analogów miRNA.

Zbadano toksyczność nanocząstek srebra względem komórek Hep G2. Komórki do hodowli, których użyto pożywki o wyższym stężeniu glukozy okazały się mniej odporne na działanie AgNP. Co zostało powiązane z wcześniejszymi doniesieniami o wyższym poziomie mechanizmów obrony antyoksydacyjnej w komórkach hodowanych w niższym, prawidłowym fizjologicznie stężeniu glukozy. Zastosowane wybrane syntetyczne analogi miRNA spowodowały nie tylko przywrócenie oporności komórek hodowanych z użyciem pożywki o wyższej zawartości glukozy, a nawet zwiększenie ich oporności w porównaniu do komórek hodowanych w pożywce o niższej zawartości glukozy.

MiRNA mające spełniać funkcje modulacyjne w stosunku do biologicznej aktywności nanocząstek srebra wybrano na podstawie kwerendy literaturowej oraz analizy ekspresji miRNA biorących udział w nowotworzeniu komórek nowotworów wątroby pod działaniem nanocząstek srebra w różnych mediach hodowlanych. Działanie

wyranych miRNA zweryfikowano przez analizę poziomu białek będących celami regulacyjnymi danych miRNA oraz przez analizę przeżywalności każdego miRNA z osobna. W następnym kroku zbadano potencjał proliferacyjny komórek linii Hep G2 hodowanych charakteryzowanych przez różną dostępność glukozy. Komórki hodowane w wyższej dostępności glukozy wykazywały wyższy potencjał proliferacyjny niż komórki hodowane z użyciem niższego stężenia glukozy. Odwrotną zależność zaobserwowano przy pierwszych odczytach, po 24 godzinach, gdzie licznosc komórek w medium hodowlanym zawierającym glukozę w stężeniu 5,5 mmol/dm³ była wyższa. Celem sprawdzenia czy wybrane syntetyczne analogi miRNA wpłynęły na akumulację nanocząstek srebra w komórkach linii Hep G2 przeprowadzono pomiary parametru SSC-A z użyciem technik cytometrii przepływowej. Transfekcja pozostała bez wpływu na zwiększenie granularności komórek po inkubacji z nanocząstkami srebra. W przypadku klonogenności AgNP spowodowały spadek ilości tworzonych kolonii w medium hodowlanym o niższym stężeniu glukozy i odwrotny efekt dla wyższego stężenia. Jednocześnie ilość komórek w hodowlach pod działaniem nanocząstek srebra uległa ograniczeniu tylko w przypadku eksperymentu prowadzonego w pożywce o wyższej zawartości glukozy. Transfekcja wybranymi syntetycznymi analogami miRNA pozostała bez wpływu na klonogenność komórek linii Hep G2.

W celu dokładniejszego zbadania zmian zaobserwowanych w doświadczeniach związanych z cytotoksycznością nanocząstek srebra i modulacyjnego wpływu wybranych syntetycznych analogów miRNA zbadano poziom apoptozy oraz rozkład komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. AgNP spowodowały znaczący wzrost komórek nekrotycznych w hodowli prowadzonej przy użyciu pożywki suplementowanej glukozą w stężeniu 25 mmol/dm³. Pomiary cyklu komórkowego różnicowały hodowle w pożywkach o różnej zawartości glukozy. W próbach kontrolnych zauważono przewagę liczności komórek w fazie G1 cyklu w hodowli o niższym stężeniu glukozy i mniejszą ich ilość w fazie G2. Działanie nanocząstek srebra obniżyło ilość komórek w fazie G1 i podwyższyło w fazie G2 w obu rodzajach hodowli. Jednak dynamika zmian była inna; po działaniu nanocząstek srebra zaobserwowano więcej komórek w fazie G2 w przypadku medium hodowlanego o niższym stężeniu glukozy. Transfekcja wybranymi syntetycznymi analogami miRNA nie wpłynęła w sposób znaczący na rozkład ilości

komórek linii Hep G2 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego w stosunku do komórek poddanych działaniu nanocząstek srebra.

Sprawdzono potencjał komórek do przejścia epitelialno mezenchymalnego za pomocą testów zarastania rysy, intensywności przejścia przez model macierzy błony podstawnej oraz zbadano poziom białek o znaczącej roli w EMT. W przypadku przejścia przez model macierzy błony podstawnej nanocząstki srebra wywołały podobny efekt jak w przypadku oznaczeń klonogenności. Niższa dostępność glukozy promowała spadek intensywności inwazji przez model macierzy w obecności AgNP, natomiast wyższa dostępność wywołała efekt odwrotny. Jednocześnie, nanocząstki srebra nie spowodowały zmian w szybkości zarastania rysy przez komórki linii Hep G2 hodowane w medium hodowlanym suplementowanym glukozą w stężeniu 5,5 mmol/dm³. Suplementacja glukozą w stężeniu 25 mmol/dm³ spowodowała zwiększenie szybkości migracji komórek. Również sam poziom glukozy różnicował próby badane, wyższe stężenie promowało szybsze zarastanie rysy. Transfekcja wybranymi syntetycznymi analogami miRNA ograniczyła intensyfikację migracji wywołaną nanocząstkami srebra, ale jednocześnie nie wpłynęła na przejście komórek przez model macierzy błony podstawnej w kierunku chemoatraktanta. Poziom białek związanych z przejściem epitelialno mezenchymalnym, beta kateniny, kładyny 1, oraz N-kadheryny był wyższy w komórkach hodowanych w medium o wyższym stężeniu glukozy. Natomiast poziom E-kadheryny był niższy, co świadczy o procesie „cadherin switch” zachodzącym w komórkach Hep-G2 z hodowli o wyższym stężeniu glukozy w stosunku do komórek z hodowli o niższym stężeniu glukozy. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów określających potencjał do przejścia EMT komórek linii Hep G2 można postawić tezę, że zwiększenie dostępności glukozy jest czynnikiem promującym przejście epitelialno mezenchymalne, a zastosowane syntetyczne analogi miRNA mogą ograniczyć zmiany wynikające z dostępności glukozy w aspekcie potencjału migracyjnego komórek, ale nie w przypadku intensywności przejścia przez model macierzy błony podstawnej.

W celu określenia wpływu nanocząstek srebra, poziomu glukozy i ewentualnej możliwości modulacji odpowiedzi komórek na stres oksydacyjny przeprowadzono pomiary poziomu reaktywnych form tlenu za pomocą sond fluorescencyjnych; H₂DCFDA i DHR123, pomiary poziomu utleniania składników błony komórkowej z sondą BODIPY

C11, pomiary potencjału błony mitochondrialnej, pomiary puli dostępnego NADP(H) oraz pomiary stężenia ATP. Zgodnie z przewidywaniami nanocząstki srebra pozostały bez wpływu na detekcję reaktywnych form tlenu w komórkach hodowanych w pożywce o niższej zawartości glukozy, natomiast w medium hodowlanym o wyższym stężeniu glukozy spowodowały znaczący wzrost ilości reaktywnych form tlenu zarówno w cytoplazmie jak i w błonie komórkowej. Wywołały również spadek puli dostępnego NADP(H). Transfekcja syntetycznymi analogami miRNA spowodowała ograniczenie stresu oksydacyjnego wywołanego nanocząstkami przywracając kontrolny poziom reaktywnych form tlenu i NADP(H). Jednocześnie, transfekcja nie zniwelowała hiperpolaryzacji błony mitochondrialnej wywołanej przez nanocząstki srebra. AgNP i transfekcja analogami miRNA nie wywołała znaczących zmian w poziomie ATP w komórkach linii Hep G2.

Powyższe eksperymenty wykazały, że w zależności od warunków hodowli, komórek Hep G2 ich odpowiedź na toksyczne działanie wywołane nanocząstkami srebra jest różna. Stwierdzono że, nanocząstki srebra wywołują zmiany w profilach miRNA w komórkach Hep G2. Transfekcja komórek wykazujących zmieniony profil pod wpływem czynnika badanego, syntetycznymi analogami miRNA nawet w niewielkich dawkach, może cofać zmiany wywołane tym czynnikiem.

10. Abstract

The toxic effect of silver nanoparticles has been confirmed on many cell lines, including the Hep G2 cell line. Nevertheless, the effect of silver nanoparticles on cells may vary depending on the culture medium used.

In studies conducted on Hep G2 cells, there is a constant discrepancy between the culture methodology used in the literature and the ATCC recommendations, therefore it is difficult to compare literature data on this issue.

Differences in cell response to silver nanoparticles in different culture media may be due to many factors. One of them is microRNA (miRNA) interference. MiRNAs are small RNA molecules with a structure of approx. 22 nt, which post-transcriptionally control gene expression by interference, i.e. by attaching to complementary mRNAs. This process involves the entire protein machinery that allows for miRNA maturation, its transport and, as a result, blocking the target mRNA strand.

Regulation of gene expression is one of the epigenetic processes that normal cells use to carry out the physiological processes necessary to maintain a healthy condition of the tissue and the whole organism. Cancer is caused by mutations in DNA. Cancer cells are characterized by altered expression of genes, including those responsible for the formation of miRNAs. Both the increase and decrease of the respective miRNAs have consequences. A decrease in the level of proteins that are the product of tumor suppressor genes, due to an increase in the level of miRNAs that control them, and an increase in the level of proteins that are the product of oncogenes, due to a decrease in the expression of miRNAs that control them. This leads to disturbances in the cell cycle, blocking the signaling pathways leading to apoptosis, as well as increasing the potential for epithelial-mesenchymal transition.

It should be noted that changes in miRNA levels have been verified in many diseases, not only cancer. Due to the simple structure and important functions in metabolism at the cellular, tissue and organismal level, miRNAs are the material of numerous studies. Regulation of miRNAs by the use of synthetic analogs or inhibitors can be used for research, diagnostic and therapeutic purposes.

This work has the following goals:

- Evaluation of the effect of silver nanoparticles on cells with different metabolic phenotypes,
- Evaluation of the impact of silver nanoparticles on the profile of miRNAs important in the formation and progression of cancer,
- Evaluation of the impact of miRNA modulation on the phenotype of cells exposed to the toxic effects of silver nanoparticles.

Hepatocellular carcinoma cells (Hep G2) were selected as the research model grown in a medium containing glucose at the physiological concentration (5.5 mmol/dm³) and in medium with increased concentration of glucose (25 mmol/dm³) occurring in acute diabetic state.

The research was conducted in two modules. First, the response of Hep G2 cells to the action of silver nanoparticles was examined and the differences in the nature of this response depending on the metabolic state of the cells, conditioned by the variable content of glucose in the medium, were examined. In the second part of the study, an attempt was made to modulate the cell response to AgNPs using synthetic miRNA analogs.

First, the toxicity of silver nanoparticles to Hep G2 cells was examined. Cells cultured with a medium with a higher concentration of glucose turned out to be more resistant to AgNP. Which has been linked to previous reports of higher levels of antioxidant defense mechanisms in cells cultured at a lower, physiologically normal concentration of glucose. The selected synthetic miRNA analogues used not only restored the resistance of cells cultured with a medium with a higher glucose content, but even increased their resistance compared to cells grown in a medium with a lower glucose content.

MiRNAs intended to perform modulation functions in relation to the biological activity of silver nanoparticles were selected on the basis of a literature search and analysis of the expression of miRNAs involved in the formation of liver cancer cells under the action of silver nanoparticles in varying culture media. The performance of the

expressed miRNAs was verified by analyzing the level of proteins that are regulatory targets of selected miRNAs and by analyzing the survival of Hep G2 cells treated with AgNPs and each miRNA separately. In the next step, the proliferative potential of Hep G2 cells cultured with different glucose availability was examined. Cells cultured with higher glucose availability showed a higher proliferative potential than cells cultured with lower glucose concentration. An inverse relationship was observed at the first readings, after 24 hours, where the number of cells in the culture medium containing glucose at a concentration of 5.5 mmol/dm³ was higher. In order to check whether the selected synthetic miRNA analogues influenced the accumulation of silver nanoparticles in the cells of the Hep G2 line, measurements of the SSC-A parameter using flow cytometry techniques were conducted. The transfection had no effect on the level of cell granularity after incubation with silver nanoparticles. In the case of clonogenicity, AgNPs caused a decrease in the number of colonies formed in the culture medium with a lower concentration of glucose and the opposite effect at a higher concentration. At the same time, the number of cells in colonies under the influence of silver nanoparticles was limited only in the case of the experiment carried out in a medium with a higher glucose content. Transfection with selected synthetic miRNA analogues had no effect on the clonogenicity of Hep G2 cells.

In order to investigate in more detail the changes observed in experiments related to the cytotoxicity of silver nanoparticles and the modulatory effect of selected synthetic miRNA analogues, the level of apoptosis and cell distribution were examined in particular phases of the cell cycle. AgNPs caused a significant increase in necrotic cells in a culture carried out using a medium supplemented with glucose at a concentration of 25 mmol/dm³. Cell cycle measurements differentiated the cultures in media with different glucose content. In the control trials, a higher number of cells in the G1 phase of the cycle in the culture with a lower glucose concentration and a lower number of cells in the G2 phase were noted. The action of silver nanoparticles reduced the number of cells in the G1 phase and increased in the G2 phase in both cultures. However, the dynamics of change were different; after treatment with silver nanoparticles, more cells in the G2 phase were observed in culture medium with a lower concentration of glucose. Transfection with selected synthetic miRNA analogues did not significantly

affect the distribution of Hep G2 cells in particular phases of the cell cycle in relation to cells treated with silver nanoparticles alone.

The potential of cells for epithelial-mesenchymal transition was checked by means of wound healing assays, the intensity of the transition through the basement membrane matrix model, and examination of the level of proteins with a significant role in EMT. In the case of passage through the model of the basement membrane matrix, the silver nanoparticles produced a similar effect as in the clonogenic experiments. Lower glucose availability promoted a decrease in invasion intensity through the matrix model in the presence of AgNPs, while higher availability caused the opposite effect. At the same time, silver nanoparticles did not cause changes in the rate of scratch overgrowth by cultured Hep G2 in a culture medium supplemented with glucose at a concentration of 5.5 mmol/dm³. On the other hand, supplementation with glucose at a concentration of 25 mmol/dm³ increased the rate of cell migration. Also, the level of glucose itself differentiated the tested samples, higher concentration promoted faster overgrowth of the scratch. Transfection with selected synthetic miRNA analogs reduced the intensification of migration induced by silver nanoparticles, but at the same time did not affect the passage of cells through the model of the basement membrane matrix towards the chemoattractant. Level of proteins linked to epithelial-mesenchymal transition, beta-catenin, claudin 1, and E-cadherin was higher in cells cultured in a medium with a higher concentration of glucose. On the other hand, the level of N-cadherin was lower, which indicates the "cadherin switch" process taking place in Hep-G2 cells from cultures with a higher concentration of glucose in relation to cells from low-glucose cultures. On the basis of the conducted experiments determining the EMT potential of Hep G2 cells, it can be argued that the increase in glucose availability is a factor promoting the epithelial-mesenchymal transition, and the synthetic miRNA analogs used may limit changes resulting from glucose availability in terms of cell migration potential, but not in the case of the intensity of the transition through the model of the basement membrane matrix.

In order to determine the effect of silver nanoparticles, glucose levels and the possible modulation of cell responses to oxidative stress, measurements of the level of reactive oxygen species were carried out using fluorescent probes; H₂DCFDA and

DHR123, measurements of the level of oxidation of cell membrane components with the BODIPY C11 probe, measurements of the mitochondrial membrane potential, measurements of the pool of available NADP(H) and measurements of ATP concentration were conducted. As expected, silver nanoparticles had no effect on the detection of reactive oxygen species in cells grown in medium with a lower glucose content, while in the culture medium with a higher concentration of glucose caused a significant increase in the amount of reactive oxygen species both, in the cytoplasm and in the cell membrane. They also caused a decrease in the pool of available NADP(H). Transfection with synthetic miRNA analogues reduced nanoparticle-induced oxidative stress, restoring control levels of reactive oxygen species and NADP(H) levels. At the same time, the transfection did not eliminate the hyperpolarization of the mitochondrial membrane caused by the silver nanoparticles. AgNP and transfection with miRNA analogues did not induce significant changes in ATP levels in Hep G2 cells.

The above experiments showed that depending on the culture conditions, Hep G2 cells react with different sensitivity to the toxic effects caused by silver nanoparticles. In addition, silver nanoparticles induce changes in miRNA profiles in Hep G2 cells. Transfection of cells showing a changed profile under the influence of the test factor with synthetic miRNA analogues, even in small doses, can reverse the changes caused by studied factor.

11. Supplement

Wykaz miRNA badanych w tkankach pobranych od zwierząt którym AgNP były podawane *Per os*.

miRNA	Krotność zmiany	P	miRNA	Krotność zmiany	P	miRNA	Krotność zmiany	P
rno-let-7a-5p	1,01	0,875	rno-miR-16-5p	1,02	0,705	rno-miR-26a-5p	1,03	0,835
rno-let-7b-5p	1,00	0,998	rno-miR-17-5p	-1,04	0,947	rno-miR-26b-5p	1,04	0,784
rno-let-7c-5p	1,00	0,922	rno-miR-181a-5p	-1,01	0,999	rno-miR-27a-3p	1,03	0,880
rno-let-7e-5p	0,96	0,934	rno-miR-181b-5p	1,01	1,000	rno-miR-27b-3p	1,00	0,978
rno-let-7f-5p	1,05	0,207	rno-miR-186-5p	1,02	0,992	rno-miR-28-5p	1,02	0,995
rno-let-7i-5p	1,04	0,970	rno-miR-191a-5p	1,03	0,929	rno-miR-29a-3p	1,02	0,854
rno-miR-100-5p	1,01	0,991	rno-miR-192-5p	1,02	0,866	rno-miR-29a-5p	1,01	0,999
rno-miR-101a-3p	1,00	0,996	rno-miR-194-5p	1,01	0,931	rno-miR-29b-3p	-1,03	0,918
rno-miR-103-3p	1,00	1,000	rno-miR-195-5p	1,03	0,610	rno-miR-29c-3p	1,02	0,885
rno-miR-106b-5p	0,97	0,976	rno-miR-199a-3p	1,02	0,992	rno-miR-30a-5p	1,01	0,914
rno-miR-107-3p	0,98	0,995	rno-miR-199a-5p	-1,02	0,994	rno-miR-30b-5p	1,04	0,684
rno-miR-122-5p	1,02	0,943	rno-miR-19a-3p	-1,02	0,695	rno-miR-30c-5p	1,04	0,660
rno-miR-125a-5p	1,07	0,901	rno-miR-19b-3p	-1,03	0,565	rno-miR-30d-5p	1,04	0,384
rno-miR-125b-5p	1,02	0,846	rno-miR-200c-3p	1,15	0,988	rno-miR-30e-3p	1,04	0,988
rno-miR-126a-3p	1,06	0,713	rno-miR-20a-5p	-1,02	0,944	rno-miR-30e-5p	1,02	0,815
rno-miR-126a-5p	1,05	0,205	rno-miR-20b-5p	-1,03	0,982	rno-miR-322-5p	1,03	0,979
rno-miR-130a-3p	-1,04	0,959	rno-miR-214-3p	1,02	0,999	rno-miR-342-3p	1,05	0,997
rno-miR-139-5p	1,05	0,985	rno-miR-21-5p	1,06	0,781	rno-miR-34a-5p	1,06	0,994
rno-miR-142-3p	1,03	0,873	rno-miR-221-3p	1,13	0,994	rno-miR-365-3p	1,02	0,842
rno-miR-142-5p	-1,03	0,992	rno-miR-222-3p	1,02	0,999	rno-miR-370-3p	-1,02	1,000
rno-miR-143-3p	1,04	0,846	rno-miR-223-3p	1,06	0,981	rno-miR-374-5p	1,05	0,988
rno-miR-145-5p	1,03	0,639	rno-miR-22-3p	1,02	0,930	rno-miR-375-3p	1,02	0,999
rno-miR-146a-5p	1,01	0,996	rno-miR-224-5p	-1,02	1,000	rno-miR-378a-3p	1,02	0,846
rno-miR-148b-3p	1,02	0,991	rno-miR-22-5p	1,02	0,983	rno-miR-451-5p	-1,11	0,410
rno-miR-150-5p	1,08	0,955	rno-miR-23a-3p	1,04	0,592	rno-miR-497-5p	-1,00	1,000
rno-miR-151-5p	1,03	0,989	rno-miR-23b-3p	1,01	0,528	rno-miR-92a-3p	-1,02	0,961
rno-miR-152-3p	-1,01	0,993	rno-miR-24-3p	1,02	0,500	rno-miR-93-5p	-1,02	0,996
rno-miR-15b-5p	-1,03	0,98	rno-miR-25-3p	1,01	0,997	rno-miR-99a-5p	1,02	0,931

Wykaz miRNA badanych w tkankach pobranych od zwierząt którym AgNP były podawane iniekcyjnie.

miRNA	Krotność zmiany	P	miRNA	Krotność zmiany	P	miRNA	Krotność zmiany	P
rno-let-7a-5p	1,01	0,875	rno-miR-16-5p	1,02	0,705	rno-miR-26a-5p	1,03	0,835
rno-let-7b-5p	1,00	0,998	rno-miR-17-5p	-1,04	0,947	rno-miR-26b-5p	1,04	0,784
rno-let-7c-5p	1,00	0,922	rno-miR-181a-5p	-1,01	0,999	rno-miR-27a-3p	1,03	0,880
rno-let-7e-5p	0,96	0,934	rno-miR-181b-5p	1,01	1,000	rno-miR-27b-3p	1,00	0,978
rno-let-7f-5p	1,05	0,207	rno-miR-186-5p	1,02	0,992	rno-miR-28-5p	1,02	0,995
rno-let-7i-5p	1,04	0,970	rno-miR-191a-5p	1,03	0,929	rno-miR-29a-3p	1,02	0,854
rno-miR-100-5p	1,01	0,991	rno-miR-192-5p	1,02	0,866	rno-miR-29a-5p	1,01	0,999
rno-miR-101a-3p	1,00	0,996	rno-miR-194-5p	1,01	0,931	rno-miR-29b-3p	-1,03	0,918
rno-miR-103-3p	1,00	1,000	rno-miR-195-5p	1,03	0,610	rno-miR-29c-3p	1,02	0,885
rno-miR-106b-5p	0,97	0,976	rno-miR-199a-3p	1,02	0,992	rno-miR-30a-5p	1,01	0,914
rno-miR-107-3p	0,98	0,995	rno-miR-199a-5p	-1,02	0,994	rno-miR-30b-5p	1,04	0,684
rno-miR-122-5p	1,02	0,943	rno-miR-19a-3p	-1,02	0,695	rno-miR-30c-5p	1,04	0,660
rno-miR-125a-5p	1,07	0,901	rno-miR-19b-3p	-1,03	0,565	rno-miR-30d-5p	1,04	0,384
rno-miR-125b-5p	1,02	0,846	rno-miR-200c-3p	1,15	0,988	rno-miR-30e-3p	1,04	0,988
rno-miR-126a-3p	1,06	0,713	rno-miR-20a-5p	-1,02	0,944	rno-miR-30e-5p	1,02	0,815
rno-miR-126a-5p	1,05	0,205	rno-miR-20b-5p	-1,03	0,982	rno-miR-322-5p	1,03	0,979
rno-miR-130a-3p	-1,04	0,959	rno-miR-214-3p	1,02	0,999	rno-miR-342-3p	1,05	0,997
rno-miR-139-5p	1,05	0,985	rno-miR-21-5p	1,06	0,781	rno-miR-34a-5p	1,06	0,994
rno-miR-142-3p	1,03	0,873	rno-miR-221-3p	1,13	0,994	rno-miR-365-3p	1,02	0,842
rno-miR-142-5p	-1,03	0,992	rno-miR-222-3p	1,02	0,999	rno-miR-370-3p	-1,02	1,000
rno-miR-143-3p	1,04	0,846	rno-miR-223-3p	1,06	0,981	rno-miR-374-5p	1,05	0,988
rno-miR-145-5p	1,03	0,639	rno-miR-22-3p	1,02	0,930	rno-miR-375-3p	1,02	0,999
rno-miR-146a-5p	1,01	0,996	rno-miR-224-5p	-1,02	1,000	rno-miR-378a-3p	1,02	0,846
rno-miR-148b-3p	1,02	0,991	rno-miR-22-5p	1,02	0,983	rno-miR-451-5p	-1,11	0,410
rno-miR-150-5p	1,08	0,955	rno-miR-23a-3p	1,04	0,592	rno-miR-497-5p	-1,00	1,000
rno-miR-151-5p	1,03	0,989	rno-miR-23b-3p	1,01	0,528	rno-miR-92a-3p	-1,02	0,961
rno-miR-152-3p	-1,01	0,993	rno-miR-24-3p	1,02	0,500	rno-miR-93-5p	-1,02	0,996
rno-miR-15b-5p	-1,03	0,98	rno-miR-25-3p	1,01	0,997	rno-miR-99a-5p	1,02	0,931

12. Bibliografia

1. Napoli, C., C. Lemieux, and R. Jorgensen, *Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans*. *Plant Cell*, 1990. **2**(4): p. 279-289.
2. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. *Cell*, 1993. **75**(5): p. 843-54.
3. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
4. Kozomara, A., M. Birgaoanu, and S. Griffiths-Jones, *miRBase: from microRNA sequences to function*. *Nucleic Acids Res*, 2019. **47**(D1): p. D155-D162.
5. Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones, *miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data*. *Nucleic Acids Res*, 2014. **42**(Database issue): p. D68-73.
6. Nawrocki, E.P., et al., *Rfam 12.0: updates to the RNA families database*. *Nucleic Acids Res*, 2015. **43**(Database issue): p. D130-7.
7. Chen, L., et al., *Trends in the development of miRNA bioinformatics tools*. *Brief Bioinform*, 2019. **20**(5): p. 1836-1852.
8. Zhang, P., et al., *Non-Coding RNAs and their Integrated Networks*. *J Integr Bioinform*, 2019. **16**(3).
9. Ha, M. and V.N. Kim, *Regulation of microRNA biogenesis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014. **15**(8): p. 509-24.
10. Makarova, K.S., et al., *Prokaryotic homologs of Argonaute proteins are predicted to function as key components of a novel system of defense against mobile genetic elements*. *Biol Direct*, 2009. **4**: p. 29.
11. Dexheimer, P.J. and L. Cochella, *MicroRNAs: From Mechanism to Organism*. *Front Cell Dev Biol*, 2020. **8**: p. 409.
12. Bhaskaran, M. and M. Mohan, *MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease*. *Vet Pathol*, 2014. **51**(4): p. 759-74.
13. Lee, Y., et al., *MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization*. *EMBO J*, 2002. **21**(17): p. 4663-70.
14. Stavast, C.J. and S.J. Erkeland, *The Non-Canonical Aspects of MicroRNAs: Many Roads to Gene Regulation*. *Cells*, 2019. **8**(11).
15. Han, J., et al., *The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing*. *Genes Dev*, 2004. **18**(24): p. 3016-27.
16. O'Brien, J., et al., *Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018. **9**: p. 402.
17. Alarcon, C.R., et al., *N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing*. *Nature*, 2015. **519**(7544): p. 482-5.
18. Yi, R., et al., *Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs*. *Genes Dev*, 2003. **17**(24): p. 3011-6.
19. Wang, X., et al., *Dynamic mechanisms for pre-miRNA binding and export by Exportin-5*. *RNA*, 2011. **17**(8): p. 1511-28.
20. Park, J.E., et al., *Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing*. *Nature*, 2011. **475**(7355): p. 201-5.

21. Okada, C., et al., *A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery*. Science, 2009. **326**(5957): p. 1275-9.
22. Huntzinger, E. and E. Izaurralde, *Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(2): p. 99-110.
23. Liu, J., et al., *Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi*. Science, 2004. **305**(5689): p. 1437-41.
24. Ye, Z., H. Jin, and Q. Qian, *Argonaute 2: A Novel Rising Star in Cancer Research*. J Cancer, 2015. **6**(9): p. 877-82.
25. Wu, H., et al., *Alternative processing of primary microRNA transcripts by Drosha generates 5' end variation of mature microRNA*. PLoS One, 2009. **4**(10): p. e7566.
26. Yoda, M., et al., *Poly(A)-specific ribonuclease mediates 3'-end trimming of Argonaute2-cleaved precursor microRNAs*. Cell Rep, 2013. **5**(3): p. 715-26.
27. Sayed, D. and M. Abdellatif, *MicroRNAs in development and disease*. Physiol Rev, 2011. **91**(3): p. 827-87.
28. Valinezhad Orang, A., R. Safaralizadeh, and M. Kazemzadeh-Bavili, *Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation*. Int J Genomics, 2014. **2014**: p. 970607.
29. Ardekani, A.M. and M.M. Naeini, *The Role of MicroRNAs in Human Diseases*. Avicenna J Med Biotechnol, 2010. **2**(4): p. 161-79.
30. Szczepanek, J., C.S. Pareek, and A. Tretyn, *The role of microRNAs in animal physiology and pathology*. Translational Research in Veterinary Science, 2018. **1**(1): p. 13-33.
31. Ng, R., et al., *A microRNA-21 surge facilitates rapid cyclin D1 translation and cell cycle progression in mouse liver regeneration*. J Clin Invest, 2012. **122**(3): p. 1097-108.
32. Ren, Z. and V.R. Ambros, *Caenorhabditis elegans microRNAs of the let-7 family act in innate immune response circuits and confer robust developmental timing against pathogen stress*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(18): p. E2366-75.
33. Wang, Y. and T. Taniguchi, *MicroRNAs and DNA damage response: implications for cancer therapy*. Cell Cycle, 2013. **12**(1): p. 32-42.
34. Reczek, C.R. and N.S. Chandel, *ROS-dependent signal transduction*. Curr Opin Cell Biol, 2015. **33**: p. 8-13.
35. Tessitore, A., et al., *MicroRNAs in the DNA Damage/Repair Network and Cancer*. Int J Genomics, 2014. **2014**: p. 820248.
36. Ning, J., et al., *miR-138-5p modulates the expression of excision repair cross-complementing proteins ERCC1 and ERCC4, and regulates the sensitivity of gastric cancer cells to cisplatin*. Oncol Rep, 2019. **41**(2): p. 1131-1139.
37. He, Y., et al., *Histone Deacetylase Inhibitor Sensitizes ERCC1-High Non-small-Cell Lung Cancer Cells to Cisplatin via Regulating miR-149*. Mol Ther Oncolytics, 2020. **17**: p. 448-459.
38. Qin, J., et al., *Upregulated miR-182 increases drug resistance in cisplatin-treated HCC cell by regulating TP53INP1*. Gene, 2014. **538**(2): p. 342-7.
39. Bueno, M.J. and M. Malumbres, *MicroRNAs and the cell cycle*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1812**(5): p. 592-601.
40. Jang, J.H. and T.J. Lee, *The role of microRNAs in cell death pathways*. Yeungnam Univ J Med, 2021. **38**(2): p. 107-117.

41. Chen, B., et al., *Roles of microRNA on cancer cell metabolism*. J Transl Med, 2012. **10**: p. 228.
42. Inui, M., G. Martello, and S. Piccolo, *MicroRNA control of signal transduction*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(4): p. 252-63.
43. Tsitsiou, E. and M.A. Lindsay, *microRNAs and the immune response*. Curr Opin Pharmacol, 2009. **9**(4): p. 514-20.
44. Konovalova, J., et al., *Interplay between MicroRNAs and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(23).
45. Yue, J., *miRNA and vascular cell movement*. Adv Drug Deliv Rev, 2011. **63**(8): p. 616-22.
46. Fernandez, N., et al., *Genetic variation and RNA structure regulate microRNA biogenesis*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 15114.
47. Michlewski, G. and J.F. Caceres, *Post-transcriptional control of miRNA biogenesis*. RNA, 2019. **25**(1): p. 1-16.
48. Lee, T.J., et al., *Strategies to Modulate MicroRNA Functions for the Treatment of Cancer or Organ Injury*. Pharmacol Rev, 2020. **72**(3): p. 639-667.
49. Treiber, T., et al., *A Compendium of RNA-Binding Proteins that Regulate MicroRNA Biogenesis*. Mol Cell, 2017. **66**(2): p. 270-284 e13.
50. Shiohama, A., et al., *Molecular cloning and expression analysis of a novel gene DGCR8 located in the DiGeorge syndrome chromosomal region*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **304**(1): p. 184-90.
51. Urbanek-Trzeciak, M.O., et al., *Pan-cancer analysis of somatic mutations in miRNA genes*. EBioMedicine, 2020. **61**: p. 103051.
52. Ikeda, S., et al., *Altered microRNA expression in human heart disease*. Physiol Genomics, 2007. **31**(3): p. 367-73.
53. Tufekci, K.U., et al., *The role of microRNAs in human diseases*. Methods Mol Biol, 2014. **1107**: p. 33-50.
54. Walker, R.M., et al., *Preliminary investigation of miRNA expression in individuals at high familial risk of bipolar disorder*. J Psychiatr Res, 2015. **62**: p. 48-55.
55. Jin, W., et al., *Transcriptome microRNA profiling of bovine mammary epithelial cells challenged with Escherichia coli or Staphylococcus aureus bacteria reveals pathogen directed microRNA expression profiles*. BMC Genomics, 2014. **15**: p. 181.
56. Taganov, K.D., et al., *NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(33): p. 12481-6.
57. Stratton, M.R., P.J. Campbell, and P.A. Futreal, *The cancer genome*. Nature, 2009. **458**(7239): p. 719-24.
58. Stahlhut Espinosa, C.E. and F.J. Slack, *The role of microRNAs in cancer*. Yale J Biol Med, 2006. **79**(3-4): p. 131-40.
59. Damaghi, M., et al., *The harsh microenvironment in early breast cancer selects for a Warburg phenotype*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021. **118**(3).
60. Shuvalov, O., et al., *Linking Metabolic Reprogramming, Plasticity and Tumor Progression*. Cancers (Basel), 2021. **13**(4).
61. Steeg, P.S., *Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(1): p. 55-63.
62. Sun, L. and J. Fang, *Epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition*. Cell Mol Life Sci, 2016. **73**(23): p. 4493-4515.

63. Kolečková, M., et al., *Epithelial to mesenchymal transition and microRNA expression are associated with spindle and apocrine cell morphology in triple-negative breast cancer*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 5145.
64. Sadrkhanloo, M., et al., *Non-coding RNAs in EMT regulation: Association with tumor progression and therapy response*. Eur J Pharmacol, 2022. **932**: p. 175212.
65. Chen, Q.W., et al., *Epigenetic regulation and cancer (review)*. Oncol Rep, 2014. **31**(2): p. 523-32.
66. Kim, J., C.L. Bretz, and S. Lee, *Epigenetic instability of imprinted genes in human cancers*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(22): p. 10689-99.
67. Subramaniam, D., et al., *DNA methyltransferases: a novel target for prevention and therapy*. Front Oncol, 2014. **4**: p. 80.
68. Huang, Y. and A. Rao, *Connections between TET proteins and aberrant DNA modification in cancer*. Trends Genet, 2014. **30**(10): p. 464-74.
69. Cheung, H.H., et al., *DNA methylation of cancer genome*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2009. **87**(4): p. 335-50.
70. Yu, J., et al., *Methylation profiling of twenty promoter-CpG islands of genes which may contribute to hepatocellular carcinogenesis*. BMC Cancer, 2002. **2**: p. 29.
71. Crespo, I., et al., *Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme*. Am J Pathol, 2015. **185**(7): p. 1820-33.
72. Nakamura, M., et al., *Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas*. Lab Invest, 2001. **81**(1): p. 77-82.
73. Barnes, C.E., D.M. English, and S.M. Cowley, *Acetylation & Co: an expanding repertoire of histone acylations regulates chromatin and transcription*. Essays Biochem, 2019. **63**(1): p. 97-107.
74. Parbin, S., et al., *Histone deacetylases: a saga of perturbed acetylation homeostasis in cancer*. J Histochem Cytochem, 2014. **62**(1): p. 11-33.
75. Visser, H.P., et al., *The Polycomb group protein EZH2 is upregulated in proliferating, cultured human mantle cell lymphoma*. Br J Haematol, 2001. **112**(4): p. 950-8.
76. Greer, E.L. and Y. Shi, *Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance*. Nat Rev Genet, 2012. **13**(5): p. 343-57.
77. Richly, H., L. Aloia, and L. Di Croce, *Roles of the Polycomb group proteins in stem cells and cancer*. Cell Death Dis, 2011. **2**(9): p. e204.
78. Yang, Y.A. and J. Yu, *EZH2, an epigenetic driver of prostate cancer*. Protein Cell, 2013. **4**(5): p. 331-41.
79. Sahasrabudhe, A.A., *BMII: A Biomarker of Hematologic Malignancies*. Biomark Cancer, 2016. **8**: p. 65-75.
80. Lam, J.K., et al., *siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing*. Mol Ther Nucleic Acids, 2015. **4**(9): p. e252.
81. Meng, F., et al., *MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer*. Gastroenterology, 2007. **133**(2): p. 647-58.
82. Zhao, S., et al., *Loss of MicroRNA-101 Promotes Epithelial to Mesenchymal Transition in Hepatocytes*. J Cell Physiol, 2015. **230**(11): p. 2706-17.
83. Calin, G.A., et al., *Frequent Deletions and Down-Regulation of Micro-RNA Genes miR15 and miR16 at 13q14 in Chronic Lymphocytic Leukemia*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(24): p. 15524-15529.

84. He, L., et al., *A microRNA polycistron as a potential human oncogene*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 828-33.
85. Tong, A.W. and J. Nemunaitis, *Modulation of miRNA activity in human cancer: a new paradigm for cancer gene therapy?* Cancer Gene Ther, 2008. **15**(6): p. 341-55.
86. Takamizawa, J., et al., *Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival*. Cancer Res, 2004. **64**(11): p. 3753-6.
87. Johnson, S.M., et al., *RAS is regulated by the let-7 microRNA family*. Cell, 2005. **120**(5): p. 635-47.
88. Calin, G.A., et al., *Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): p. 2999-3004.
89. Wu, W., *Modulation of microRNAs for potential cancer therapeutics*. Methods Mol Biol, 2011. **676**: p. 59-70.
90. Choudhry, H., A.L. Harris, and A. McIntyre, *The tumour hypoxia induced non-coding transcriptome*. Mol Aspects Med, 2016. **47-48**: p. 35-53.
91. Jarman, E.J., et al., *HER2 regulates HIF-2alpha and drives an increased hypoxic response in breast cancer*. Breast Cancer Res, 2019. **21**(1): p. 10.
92. Ye, P., et al., *Hypoxia-induced deregulation of miR-126 and its regulative effect on VEGF and MMP-9 expression*. Int J Med Sci, 2014. **11**(1): p. 17-23.
93. Madaneci, P., et al., *Regulation of angiogenesis by hypoxia: the role of microRNA*. Cell Mol Biol Lett, 2013. **18**(1): p. 47-57.
94. Camps, C., et al., *hsa-miR-210 Is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(5): p. 1340-8.
95. Imig, J., et al., *miR-CLIP capture of a miRNA targetome uncovers a lincRNA H19-miR-106a interaction*. Nat Chem Biol, 2015. **11**(2): p. 107-14.
96. Rupaimoole, R. and F.J. Slack, *MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases*. Nat Rev Drug Discov, 2017. **16**(3): p. 203-222.
97. Dan, J., et al., *LncRNA-MEG3 inhibits proliferation and metastasis by regulating miRNA-21 in gastric cancer*. Biomed Pharmacother, 2018. **99**: p. 931-938.
98. Wang, Z., *The guideline of the design and validation of MiRNA mimics*. Methods Mol Biol, 2011. **676**: p. 211-23.
99. Diener, C., A. Keller, and E. Meese, *Emerging concepts of miRNA therapeutics: from cells to clinic*. Trends Genet, 2022. **38**(6): p. 613-626.
100. van Rooij, E. and S. Kauppinen, *Development of microRNA therapeutics is coming of age*. EMBO Mol Med, 2014. **6**(7): p. 851-64.
101. Hogan, D.J., et al., *Anti-miRs competitively inhibit microRNAs in Argonaute complexes*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e100951.
102. Melo, S., et al., *Small molecule enoxacin is a cancer-specific growth inhibitor that acts by enhancing TAR RNA-binding protein 2-mediated microRNA processing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(11): p. 4394-9.
103. Felicetti, T., V. Cecchetti, and G. Manfroni, *Modulating microRNA Processing: Enoxacin, the Progenitor of a New Class of Drugs*. J Med Chem, 2020. **63**(21): p. 12275-12289.
104. Sousa, E., et al., *Enoxacin inhibits growth of prostate cancer cells and effectively restores microRNA processing*. Epigenetics, 2013. **8**(5): p. 548-58.

105. Gumireddy, K., et al., *Small-molecule inhibitors of microRNA miR-21 function*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008. **47**(39): p. 7482-4.
106. Wataashi, K., et al., *Identification of small molecules that suppress microRNA function and reverse tumorigenesis*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(32): p. 24707-16.
107. Fan, R., et al., *Small molecules with big roles in microRNA chemical biology and microRNA-targeted therapeutics*. *RNA Biol*, 2019. **16**(6): p. 707-718.
108. Winkle, M., et al., *Noncoding RNA therapeutics - challenges and potential solutions*. *Nat Rev Drug Discov*, 2021. **20**(8): p. 629-651.
109. Gebert, L.F.R. and I.J. MacRae, *Regulation of microRNA function in animals*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019. **20**(1): p. 21-37.
110. He, L. and G.J. Hannon, *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. *Nat Rev Genet*, 2004. **5**(7): p. 522-31.
111. Challagundla, K.B., et al., *Exosome-mediated transfer of microRNAs within the tumor microenvironment and neuroblastoma resistance to chemotherapy*. *J Natl Cancer Inst*, 2015. **107**(7).
112. They, C., L. Zitvogel, and S. Amigorena, *Exosomes: composition, biogenesis and function*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(8): p. 569-79.
113. Gallant-Behm, C.L., et al., *A MicroRNA-29 Mimic (Replarsen) Represses Extracellular Matrix Expression and Fibroplasia in the Skin*. *J Invest Dermatol*, 2019. **139**(5): p. 1073-1081.
114. Conde, J. and N. Artzi, *Are RNAi and miRNA therapeutics truly dead?* *Trends Biotechnol*, 2015. **33**(3): p. 141-4.
115. Liu, B., et al., *Interplay between miRNAs and host genes and their role in cancer*. *Brief Funct Genomics*, 2018. **18**(4): p. 255-266.
116. Ni, W.J. and X.M. Leng, *Dynamic miRNA-mRNA paradigms: New faces of miRNAs*. *Biochem Biophys Res*, 2015. **4**: p. 337-341.
117. Tay, Y., J. Rinn, and P.P. Pandolfi, *The multilayered complexity of ceRNA crosstalk and competition*. *Nature*, 2014. **505**(7483): p. 344-52.
118. Mishra, S., T. Yadav, and V. Rani, *Exploring miRNA based approaches in cancer diagnostics and therapeutics*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2016. **98**: p. 12-23.
119. Piao, X.M., et al., *Urinary cell-free microRNA biomarker could discriminate bladder cancer from benign hematuria*. *Int J Cancer*, 2019. **144**(2): p. 380-388.
120. He, B., et al., *miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in Cancer*. *Int J Biol Sci*, 2020. **16**(14): p. 2628-2647.
121. Shams, R., et al., *Identification of potential microRNA panels for pancreatic cancer diagnosis using microarray datasets and bioinformatics methods*. *Sci Rep*, 2020. **10**(1): p. 7559.
122. Buzea, C., Pacheco, II, and K. Robbie, *Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity*. *Biointerphases*, 2007. **2**(4): p. MR17-71.
123. De Matteis, V., *Exposure to Inorganic Nanoparticles: Routes of Entry, Immune Response, Biodistribution and In Vitro/In Vivo Toxicity Evaluation*. *Toxics*, 2017. **5**(4).
124. Malakar, A., et al., *Nanomaterials in the environment, human exposure pathway, and health effects: A review*. *Sci Total Environ*, 2021. **759**: p. 143470.
125. Hochella, M.F., Jr., et al., *Natural, incidental, and engineered nanomaterials and their impacts on the Earth system*. *Science*, 2019. **363**(6434).
126. Jain, P.K., et al., *Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine*. *Acc Chem Res*, 2008. **41**(12): p. 1578-86.

127. Akter, M., et al., *A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives*. J Adv Res, 2018. **9**: p. 1-16.
128. Abass Sofi, M., et al., *An overview of antimicrobial and anticancer potential of silver nanoparticles*. Journal of King Saud University - Science, 2022. **34**(2): p. 101791.
129. Nie, P., Y. Zhao, and H. Xu, *Synthesis, applications, toxicity and toxicity mechanisms of silver nanoparticles: A review*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2023. **253**: p. 114636.
130. Reidy, B., et al. *Mechanisms of Silver Nanoparticle Release, Transformation and Toxicity: A Critical Review of Current Knowledge and Recommendations for Future Studies and Applications*. Materials, 2013. **6**, 2295-2350 DOI: 10.3390/ma6062295.
131. Haase, A., et al., *Effects of silver nanoparticles on primary mixed neural cell cultures: uptake, oxidative stress and acute calcium responses*. Toxicol Sci, 2012. **126**(2): p. 457-68.
132. Jaswal, T. and J. Gupta, *A review on the toxicity of silver nanoparticles on human health*. Materials Today: Proceedings, 2021.
133. Braydich-Stolle, L.K., et al., *Silver nanoparticles disrupt GDNF/Fyn kinase signaling in spermatogonial stem cells*. Toxicol Sci, 2010. **116**(2): p. 577-89.
134. Reidy, B., et al., *Mechanisms of Silver Nanoparticle Release, Transformation and Toxicity: A Critical Review of Current Knowledge and Recommendations for Future Studies and Applications*. Materials (Basel), 2013. **6**(6): p. 2295-2350.
135. Murugan, K., et al., *Parameters and characteristics governing cellular internalization and trans-barrier trafficking of nanostructures*. Int J Nanomedicine, 2015. **10**: p. 2191-206.
136. Nicolete, R., D.F. dos Santos, and L.H. Faccioli, *The uptake of PLGA micro or nanoparticles by macrophages provokes distinct in vitro inflammatory response*. Int Immunopharmacol, 2011. **11**(10): p. 1557-63.
137. Gratton, S.E.A., et al., *Microfabricated Particles for Engineered Drug Therapies: Elucidation into the Mechanisms of Cellular Internalization of PRINT Particles*. Pharmaceutical Research, 2008. **25**(12): p. 2845-2852.
138. Harush-Frenkel, O., et al., *Surface Charge of Nanoparticles Determines Their Endocytic and Transcytotic Pathway in Polarized MDCK Cells*. Biomacromolecules, 2008. **9**(2): p. 435-443.
139. Schlinkert, P., et al., *The oxidative potential of differently charged silver and gold nanoparticles on three human lung epithelial cell types*. J Nanobiotechnology, 2015. **13**: p. 1.
140. Loeschner, K., et al., *Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate*. Part Fibre Toxicol, 2011. **8**: p. 18.
141. Bove, P., et al., *Dissolution test for risk assessment of nanoparticles: a pilot study*. Nanoscale, 2017. **9**(19): p. 6315-6326.
142. Walczak, A.P., et al., *Behaviour of silver nanoparticles and silver ions in an in vitro human gastrointestinal digestion model*. Nanotoxicology, 2013. **7**(7): p. 1198-210.
143. Loeschner, K., et al., *Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate*. Particle and Fibre Toxicology, 2011. **8**(1): p. 18.

144. Demin, V.A., et al., *Modeling interorgan distribution and bioaccumulation of engineered nanoparticles (using the example of silver nanoparticles)*. Nanotechnologies in Russia, 2015. **10**(3): p. 288-296.
145. Dziendzikowska, K., et al., *Time-dependent biodistribution and excretion of silver nanoparticles in male Wistar rats*. Journal of Applied Toxicology, 2012. **32**(11): p. 920-928.
146. Neta, P., R.E. Huie, and A.B. Ross, *Rate Constants for Reactions of Peroxyl Radicals in Fluid Solutions*. Journal of Physical and Chemical Reference Data, 1990. **19**(2): p. 413-513.
147. Hawkins, C.L. and M.J. Davies, *Generation and propagation of radical reactions on proteins*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1504**(2-3): p. 196-219.
148. Haber, F. and J. Weiss, *The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts*. Proceedings of the Royal Society of London. Series A-Mathematical and Physical Sciences, 1934. **147**(861): p. 332-351.
149. Collin, F., *Chemical Basis of Reactive Oxygen Species Reactivity and Involvement in Neurodegenerative Diseases*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(10).
150. Vignais, P.V., *The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(9): p. 1428-59.
151. Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*. 1999: Oxford University Press.
152. Riley, P.A., *Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation*. Int J Radiat Biol, 1994. **65**(1): p. 27-33.
153. Finkel, T., *Oxygen radicals and signaling*. Curr Opin Cell Biol, 1998. **10**(2): p. 248-53.
154. Abate, C., et al., *Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro*. Science, 1990. **249**(4973): p. 1157-61.
155. Barrett, W.C., et al., *Roles of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B*. J Biol Chem, 1999. **274**(49): p. 34543-6.
156. Klatt, P., et al., *Redox regulation of c-Jun DNA binding by reversible S-glutathiolation*. FASEB J, 1999. **13**(12): p. 1481-90.
157. Esposito, F., et al., *Inhibition of the differentiation of human myeloid cell lines by redox changes induced through glutathione depletion*. Biochem J, 1994. **301** (Pt 3)(Pt 3): p. 649-53.
158. Knoepfel, L., et al., *Role of zinc-coordination and of the glutathione redox couple in the redox susceptibility of human transcription factor Sp1*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **201**(2): p. 871-7.
159. Cantin, A.M., P. Larivee, and R.O. Begin, *Extracellular glutathione suppresses human lung fibroblast proliferation*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1990. **3**(1): p. 79-85.
160. Das, S.K., A.C. White, and B.L. Fanburg, *Modulation of transforming growth factor-beta 1 antiproliferative effects on endothelial cells by cysteine, cystine, and N-acetylcysteine*. J Clin Invest, 1992. **90**(5): p. 1649-56.
161. Hirota, K., et al., *AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(8): p. 3633-8.
162. Pearson, G.D. and G.F. Merrill, *Deletion of the Saccharomyces cerevisiae TRR1 gene encoding thioredoxin reductase inhibits p53-dependent reporter gene expression*. J Biol Chem, 1998. **273**(10): p. 5431-4.

163. Borenfreund, E. and J.A. Puerner, *A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90)*. Journal of tissue culture methods, 1985. **9**(1): p. 7-9.
164. Strober, W., *Trypan blue exclusion test of cell viability*. Curr Protoc Immunol, 2001. **Appendix 3**: p. Appendix 3B.
165. Rodriguez, L.G., X. Wu, and J.L. Guan, *Wound-healing assay*. Methods Mol Biol, 2005. **294**: p. 23-9.
166. Pozarowski, P. and Z. Darzynkiewicz, *Analysis of cell cycle by flow cytometry*. Methods Mol Biol, 2004. **281**: p. 301-11.
167. Alexandre, J., et al., *Accumulation of hydrogen peroxide is an early and crucial step for paclitaxel-induced cancer cell death both in vitro and in vivo*. Int J Cancer, 2006. **119**(1): p. 41-8.
168. Li, J., et al., *Curcumin Inhibits Hepatocellular Carcinoma via Regulating miR-21/TIMP3 Axis*. Evid Based Complement Alternat Med, 2020. **2020**: p. 2892917.
169. He, C., et al., *MiR-21 mediates sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting autophagy via the PTEN/Akt pathway*. Oncotarget, 2015. **6**(30): p. 28867-81.
170. Puck, T.T. and P.I. Marcus, *Action of x-rays on mammalian cells*. J Exp Med, 1956. **103**(5): p. 653-66.
171. Zanutelli, M.R., J. Zhang, and C.A. Reinhart-King, *Mechanoresponsive metabolism in cancer cell migration and metastasis*. Cell Metab, 2021. **33**(7): p. 1307-1321.
172. Toehhawng, L., et al., *Redox regulation of cancer cell migration and invasion*. Mitochondrion, 2013. **13**(3): p. 246-53.
173. Hurd, T.R., M. DeGennaro, and R. Lehmann, *Redox regulation of cell migration and adhesion*. Trends Cell Biol, 2012. **22**(2): p. 107-15.
174. Mahmoudi, N., et al., *Temporary skin grafts based on hybrid graphene oxide-natural biopolymer nanofibers as effective wound healing substitutes: pre-clinical and pathological studies in animal models*. J Mater Sci Mater Med, 2017. **28**(5): p. 73.
175. Martinotti, S. and E. Ranzato, *Scratch Wound Healing Assay*. Methods Mol Biol, 2020. **2109**: p. 225-229.
176. Kim, K.H. and J.M. Sederstrom, *Assaying Cell Cycle Status Using Flow Cytometry*. Curr Protoc Mol Biol, 2015. **111**: p. 28 6 1-28 6 11.
177. Davis Volk, A.P. and J.G. Moreland, *ROS-containing endosomal compartments: implications for signaling*. Methods Enzymol, 2014. **535**: p. 201-24.
178. Drummen, G.P., et al., *C11-BODIPY(581/591), an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (micro)spectroscopic characterization and validation of methodology*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(4): p. 473-90.
179. Luo, W., et al., *Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1*. Cell, 2011. **145**(5): p. 732-44.
180. Markets, R.a. *Global microRNA Market Size, Share & Trends Analysis Report by Products, by Services, by Application (Cancer, Neurological Disease, Infectious Diseases), by End-use, by Region, and Segment Forecasts, 2021-2028*. 2021 15.02.2023]; Available from: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/micrna-market>.
181. Kuosmanen, S.M., et al., *MicroRNA Profiling Reveals Distinct Profiles for Tissue-Derived and Cultured Endothelial Cells*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 10943.

182. Kawata, K., M. Osawa, and S. Okabe, *In Vitro Toxicity of Silver Nanoparticles at Noncytotoxic Doses to HepG2 Human Hepatoma Cells*. Environmental Science & Technology, 2009. **43**(15): p. 6046-6051.
183. Wang, F., et al., *Silver Nanoparticles Induce Apoptosis in HepG2 Cells through Particle-Specific Effects on Mitochondria*. Environ Sci Technol, 2022. **56**(9): p. 5706-5713.
184. Chu, Z., et al., *The V protein in oncolytic Newcastle disease virus promotes HepG2 hepatoma cell proliferation at the single-cell level*. BMC Cancer, 2023. **23**(1): p. 346.
185. Wang, D., et al., *Uncarboxylated Osteocalcin Decreases SCD1 by Activating AMPK to Alleviate Hepatocyte Lipid Accumulation*. Molecules, 2023. **28**(7).
186. Li, Y., et al., *Aristolochic acid I promotes the invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells by activating the C3a/C3aR complement system*. Toxicol Lett, 2023. **378**: p. 51-60.
187. Bakhshi Aliabad, H., et al., *Vanadium complex: an appropriate candidate for killing hepatocellular carcinoma cancerous cells*. Biometals, 2018. **31**(6): p. 981-990.
188. Wang, Z.B., et al., *NO-1886 ameliorates glycogen metabolism in insulin-resistant HepG2 cells by GSK-3beta signalling*. J Pharm Pharmacol, 2012. **64**(2): p. 293-301.
189. Wu, J., et al., *2-[(3-carboxy-1-oxopropyl) amino]-2-deoxy-D-glucose induces apoptosis in Hep G2 cells*. Exp Oncol, 2005. **27**(1): p. 52-5.
190. Weber, K., et al., *Cultivation in glucose-deprived medium stimulates mitochondrial biogenesis and oxidative metabolism in HepG2 hepatoma cells*. Biol Chem, 2002. **383**(2): p. 283-90.
191. Marroquin, L.D., et al., *Circumventing the Crabtree effect: replacing media glucose with galactose increases susceptibility of HepG2 cells to mitochondrial toxicants*. Toxicol Sci, 2007. **97**(2): p. 539-47.
192. Zuberek, M., et al., *Glucose availability determines silver nanoparticles toxicity in HepG2*. J Nanobiotechnology, 2015. **13**: p. 72.
193. Hou, Y., et al., *High glucose levels promote the proliferation of breast cancer cells through GTPases*. Breast Cancer (Dove Med Press), 2017. **9**: p. 429-436.
194. Han, J., et al., *Glucose promotes cell proliferation, glucose uptake and invasion in endometrial cancer cells via AMPK/mTOR/S6 and MAPK signaling*. Gynecol Oncol, 2015. **138**(3): p. 668-75.
195. Ito, M., et al., *High Glucose Accelerates Cell Proliferation and Increases the Secretion and mRNA Expression of Osteopontin in Human Pancreatic Duct Epithelial Cells*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(4).
196. Saraste, A., *Morphologic criteria and detection of apoptosis*. Herz, 1999. **24**(3): p. 189-95.
197. Zhang, S., et al., *hsa-miR-29c-3p regulates biological function of colorectal cancer by targeting SPARC*. Oncotarget, 2017. **8**(61): p. 104508-104524.
198. Zou, T., Y. Gao, and M. Qie, *MiR-29c-3p inhibits epithelial-mesenchymal transition to inhibit the proliferation and metastasis of cervical cancer cells by targeting SPARC*. Ann Transl Med, 2021. **9**(2): p. 125.
199. Panday, A., et al., *NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies*. Cell Mol Immunol, 2015. **12**(1): p. 5-23.
200. Gao, H., et al., *miR-100-5p in human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes mediates eosinophilic inflammation to alleviate*

- atherosclerosis via the FZD5/Wnt/beta-catenin pathway. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2021. 53(9): p. 1166-1176.*
201. Ye, Y., S.L. Li, and J.J. Wang, *miR-100-5p Downregulates mTOR to Suppress the Proliferation, Migration, and Invasion of Prostate Cancer Cells. Front Oncol, 2020. 10: p. 578948.*
 202. Zhang, Z., et al., *miR-103/107 promote ER stress-mediated apoptosis via targeting the Wnt3a/beta-catenin/ATF6 pathway in preadipocytes. J Lipid Res, 2018. 59(5): p. 843-853.*
 203. Zhang, H., et al., *Interference of miR-107 with Atg12 is inhibited by HULC to promote metastasis of hepatocellular carcinoma. MedComm (2020), 2020. 1(2): p. 165-177.*
 204. Xia, H., et al., *MiR-195-5p represses inflammation, apoptosis, oxidative stress, and endoplasmic reticulum stress in sepsis-induced myocardial injury by targeting activating transcription factor 6. Cell Biol Int, 2022. 46(2): p. 243-254.*
 205. Xu, Y., et al., *miR-195-5p alleviates acute kidney injury through repression of inflammation and oxidative stress by targeting vascular endothelial growth factor A. Aging (Albany NY), 2020. 12(11): p. 10235-10245.*
 206. Zhou, M., et al., *MicroRNA-195-5p suppresses the proliferation, migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition of laryngeal cancer cells in vitro by targeting E2F3. Exp Ther Med, 2021. 22(4): p. 1078.*
 207. Scalavino, V., et al., *miR-195-5p Regulates Tight Junctions Expression via Claudin-2 Downregulation in Ulcerative Colitis. Biomedicines, 2022. 10(4).*
 208. Zhu, L., et al., *Notoginsenoside R1 upregulates miR-221-3p expression to alleviate ox-LDL-induced apoptosis, inflammation, and oxidative stress by inhibiting the TLR4/NF-kappaB pathway in HUVECs. Braz J Med Biol Res, 2020. 53(6): p. e9346.*
 209. Chen, Z., et al., *The lncRNA-GAS5/miR-221-3p/DKK2 Axis Modulates ABCB1-Mediated Adriamycin Resistance of Breast Cancer via the Wnt/beta-Catenin Signaling Pathway. Mol Ther Nucleic Acids, 2020. 19: p. 1434-1448.*
 210. Tian, F., et al., *miR-107 modulates chondrocyte proliferation, apoptosis, and extracellular matrix synthesis by targeting PTEN. Int J Clin Exp Pathol, 2019. 12(2): p. 488-497.*
 211. Chen, P., et al., *Oncogenic miR-100-5p is associated with cellular viability, migration and apoptosis in renal cell carcinoma. Mol Med Rep, 2017. 16(4): p. 5023-5030.*
 212. Wang, H., et al., *MicroRNA-195 reverses the resistance to temozolomide through targeting cyclin E1 in glioma cells. Anticancer Drugs, 2019. 30(1): p. 81-88.*
 213. Gao, L. and X. Zhang, *Propofol enhances the lethality of cisplatin on liver cancer cells by up-regulating miR-195-5p. Tissue Cell, 2022. 74: p. 101680.*
 214. Yang, H., L. Zhang, and Q. Wang, *MicroRNA-221-3p alleviates cell apoptosis and inflammatory response by targeting cyclin dependent kinase inhibitor 1B in chronic obstructive pulmonary disease. Bioengineered, 2021. 12(1): p. 5705-5715.*
 215. Wang, S., et al., *miR-107 regulates tumor progression by targeting NF1 in gastric cancer. Sci Rep, 2016. 6: p. 36531.*
 216. Mahati, S., et al., *miR-29a suppresses growth and migration of hepatocellular carcinoma by regulating CLDN1. Biochem Biophys Res Commun, 2017. 486(3): p. 732-737.*

217. Brzoska, K., et al., *Adaptation of HepG2 cells to silver nanoparticles-induced stress is based on the pro-proliferative and anti-apoptotic changes in gene expression*. *Mutagenesis*, 2015. **30**(3): p. 431-9.
218. Merrill, C.L., et al., *Etomoxir-induced oxidative stress in HepG2 cells detected by differential gene expression is confirmed biochemically*. *Toxicol Sci*, 2002. **68**(1): p. 93-101.
219. Minervini, G., et al., *Novel interactions of the von Hippel-Lindau (pVHL) tumor suppressor with the CDKN1 family of cell cycle inhibitors*. *Sci Rep*, 2017. **7**: p. 46562.
220. Krause, G., et al., *Structure and function of claudins*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1778**(3): p. 631-45.
221. Orr, S.E., et al., *Alteration in the mRNA expression of genes associated with gastrointestinal permeability and ileal TNF-alpha secretion due to the exposure of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats*. *J Nanobiotechnology*, 2019. **17**(1): p. 63.
222. Yao, S., et al., *Clinical characteristics and outcomes of phase I cancer patients with CCNE1 amplification: MD Anderson experiences*. *Sci Rep*, 2022. **12**(1): p. 8701.
223. Zucker, R.M., et al., *Detection of silver nanoparticles in cells by flow cytometry using light scatter and far-red fluorescence*. *Cytometry A*, 2013. **83**(10): p. 962-72.
224. Satapathy, S.R., et al., *The Apoptotic Effect of Plant Based Nanosilver in Colon Cancer Cells is a p53 Dependent Process Involving ROS and JNK Cascade*. *Pathol Oncol Res*, 2015. **21**(2): p. 405-11.
225. Souza, T.A., et al., *Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles of different sizes in CHO-K1 and CHO-XRS5 cell lines*. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2016. **795**: p. 70-83.
226. Mukherjee, S.G., et al., *Comparative in vitro cytotoxicity study of silver nanoparticle on two mammalian cell lines*. *Toxicol In Vitro*, 2012. **26**(2): p. 238-51.
227. Ottoni, C.A., et al., *Biogenic Aspergillus tubingensis silver nanoparticles' in vitro effects on human umbilical vein endothelial cells, normal human fibroblasts, HEPG2, and Galleria mellonella*. *Toxicol Res (Camb)*, 2019. **8**(6): p. 789-801.
228. Bode, A.M. and Z. Dong, *The functional contrariety of JNK*. *Mol Carcinog*, 2007. **46**(8): p. 591-8.
229. Gupta, S.C., et al., *Acidosis promotes invasiveness of breast cancer cells through ROS-AKT-NF-kappaB pathway*. *Oncotarget*, 2014. **5**(23): p. 12070-82.
230. Que, Y.M., et al., *Size dependent anti-invasiveness of silver nanoparticles in lung cancer cells*. *RSC Adv*, 2019. **9**(37): p. 21134-21138.
231. Zhao, M.X., et al., *Intracellular catalase activity instead of glutathione level dominates the resistance of cells to reactive oxygen species*. *Cell Stress Chaperones*, 2019. **24**(3): p. 609-619.
232. Bouallegui, Y., et al., *Redox proteomic insights into involvement of clathrin-mediated endocytosis in silver nanoparticles toxicity to Mytilus galloprovincialis*. *PLoS One*, 2018. **13**(10): p. e0205765.
233. Khan, I. and P.S. Steeg, *Endocytosis: a pivotal pathway for regulating metastasis*. *Br J Cancer*, 2021. **124**(1): p. 66-75.

234. Lv, T., et al., *MicroRNA-29c-3p acts as a tumor suppressor gene and inhibits tumor progression in hepatocellular carcinoma by targeting TRIM31*. *Oncol Rep*, 2020. **43**(3): p. 953-964.
235. Zhang, X., et al., *miR-100-5p Is a Novel Biomarker That Suppresses the Proliferation, Migration, and Invasion in Skin Cutaneous Melanoma*. *Stem Cells Int*, 2022. **2022**: p. 3585540.
236. Li, X.Y., et al., *MiRNA-107 inhibits proliferation and migration by targeting CDK8 in breast cancer*. *Int J Clin Exp Med*, 2014. **7**(1): p. 32-40.
237. Long, Z. and Y. Wang, *miR-195-5p Suppresses Lung Cancer Cell Proliferation, Migration, and Invasion Via FOXK1*. *Technol Cancer Res Treat*, 2020. **19**: p. 1533033820922587.
238. Wu, Q., et al., *MiR-221-3p targets ARF4 and inhibits the proliferation and migration of epithelial ovarian cancer cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018. **497**(4): p. 1162-1170.
239. Loh, C.Y., et al., *The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges*. *Cells*, 2019. **8**(10).
240. Onder, T.T., et al., *Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways*. *Cancer Res*, 2008. **68**(10): p. 3645-54.
241. Wang, M., et al., *N-cadherin promotes epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell-like traits via ErbB signaling in prostate cancer cells*. *Int J Oncol*, 2016. **48**(2): p. 595-606.
242. Hult, J., et al., *N-cadherin signaling potentiates mammary tumor metastasis via enhanced extracellular signal-regulated kinase activation*. *Cancer Res*, 2007. **67**(7): p. 3106-16.
243. Yilmaz, M. and G. Christofori, *EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion*. *Cancer Metastasis Rev*, 2009. **28**(1-2): p. 15-33.
244. Kyuno, D., et al., *Role of tight junctions in the epithelial-to-mesenchymal transition of cancer cells*. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2021. **1863**(3): p. 183503.
245. Cao, Z., et al., *Detection of differentially expressed genes in healing mouse corneas, using cDNA microarrays*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002. **43**(9): p. 2897-904.
246. Polette, M., et al., *Beta-catenin and ZO-1: shuttle molecules involved in tumor invasion-associated epithelial-mesenchymal transition processes*. *Cells Tissues Organs*, 2007. **185**(1-3): p. 61-5.
247. Balda, M.S., M.D. Garrett, and K. Matter, *The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density*. *J Cell Biol*, 2003. **160**(3): p. 423-32.
248. Kaihara, T., et al., *Dedifferentiation and decreased expression of adhesion molecules, E-cadherin and ZO-1, in colorectal cancer are closely related to liver metastasis*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2003. **22**(1): p. 117-23.
249. Nagai, T., et al., *Impact of Tight Junction Protein ZO-1 and TWIST Expression on Postoperative Survival of Patients with Hepatocellular Carcinoma*. *Dig Dis*, 2016. **34**(6): p. 702-707.
250. Suh, Y., et al., *Claudin-1 induces epithelial-mesenchymal transition through activation of the c-Abl-ERK signaling pathway in human liver cells*. *Oncogene*, 2017. **36**(8): p. 1167-1168.
251. Yao, L., et al., *MicroRNA miR-29c-3p modulates FOS expression to repress EMT and cell proliferation while induces apoptosis in TGF-beta2-treated lens*

- epithelial cells regulated by lncRNA KCNQ1OT1*. Biomed Pharmacother, 2020. **129**: p. 110290.
252. Sha, S., et al., *Mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles ameliorate Alzheimer's disease in rat models via the microRNA-29c-3p/BACE1 axis and the Wnt/beta-catenin pathway*. Aging (Albany NY), 2021. **13**(11): p. 15285-15306.
 253. Zhu, H., et al., *MiR-195-5p suppresses the proliferation, migration, and invasion of gallbladder cancer cells by targeting FOSL1 and regulating the Wnt/beta-catenin pathway*. Ann Transl Med, 2022. **10**(16): p. 893.
 254. Tsukita, S., M. Furuse, and M. Itoh, *Multifunctional strands in tight junctions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(4): p. 285-93.
 255. Anderson, J.M. and C.M. Van Itallie, *Physiology and function of the tight junction*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(2): p. a002584.
 256. Singh, A.B., A. Sharma, and P. Dhawan, *Claudin family of proteins and cancer: an overview*. J Oncol, 2010. **2010**: p. 541957.
 257. Zhou, B., et al., *Claudin 1 in Breast Cancer: New Insights*. J Clin Med, 2015. **4**(12): p. 1960-76.
 258. Usami, Y., et al., *Reduced expression of claudin-7 correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus*. Hum Pathol, 2006. **37**(5): p. 569-77.
 259. Honda, H., et al., *Crucial roles of Sp1 and epigenetic modifications in the regulation of the CLDN4 promoter in ovarian cancer cells*. J Biol Chem, 2006. **281**(30): p. 21433-21444.
 260. Xue, Y., et al., *Cytotoxicity and apoptosis induced by silver nanoparticles in human liver HepG2 cells in different dispersion media*. J Appl Toxicol, 2016. **36**(3): p. 352-60.
 261. Holmila, R.J., et al., *Silver Nanoparticles Induce Mitochondrial Protein Oxidation in Lung Cells Impacting Cell Cycle and Proliferation*. Antioxidants (Basel), 2019. **8**(11).
 262. Mohsin, A., et al., *Oxidative Stress Induced Cell Cycle Arrest: Potential Role of PRX-2 and GSTP-1 as Therapeutic Targets in Hepatocellular Carcinoma*. Protein Pept Lett, 2021. **28**(12): p. 1323-1329.
 263. Zuberek, M., et al., *Silver nanoparticles can attenuate nitrative stress*. Redox Biol, 2017. **11**: p. 646-652.
 264. Zamzami, N., et al., *Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death*. J Exp Med, 1995. **182**(2): p. 367-77.
 265. Buttke, T.M. and P.A. Sandstrom, *Oxidative stress as a mediator of apoptosis*. Immunol Today, 1994. **15**(1): p. 7-10.
 266. Morel, Y. and R. Barouki, *Repression of gene expression by oxidative stress*. Biochem J, 1999. **342 Pt 3**(Pt 3): p. 481-96.
 267. Kelly, J.D., et al., *Apoptosis and its clinical significance for bladder cancer therapy*. BJU Int, 1999. **83**(1): p. 1-10.
 268. Rohde, M.M., et al., *The mechanism of cell death induced by silver nanoparticles is distinct from silver cations*. Part Fibre Toxicol, 2021. **18**(1): p. 37.
 269. Brandt, R. and A.S. Keston, *Synthesis of Diacetyldichlorofluorescein: A Stable Reagent for Fluorometric Analysis*. Anal Biochem, 1965. **11**: p. 6-9.
 270. Zhu, H., et al., *Oxidation pathways for the intracellular probe 2',7'-dichlorofluorescein*. Arch Toxicol, 1994. **68**(9): p. 582-7.

271. Royall, J.A. and H. Ischiropoulos, *Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells*. Arch Biochem Biophys, 1993. **302**(2): p. 348-55.
272. Kumar, A., et al., *Alpha-calcitonin gene-related peptide prevents pressure-overload induced heart failure: role of apoptosis and oxidative stress*. Physiol Rep, 2019. **7**(21): p. e14269.
273. Linna-Kuosmanen, S., et al., *NRF2 is a key regulator of endothelial microRNA expression under proatherogenic stimuli*. Cardiovasc Res, 2021. **117**(5): p. 1339-1357.
274. Wang, R., et al., *miR-29c-3p regulates TET2 expression and inhibits autophagy process in Parkinson's disease models*. Genes Cells, 2021. **26**(9): p. 684-697.
275. Li, J.J., et al., *Soluble beta-amyloid peptides, but not insoluble fibrils, have specific effect on neuronal microRNA expression*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e90770.
276. Wang, W.X., et al., *miR-107 regulates granulin/progranulin with implications for traumatic brain injury and neurodegenerative disease*. Am J Pathol, 2010. **177**(1): p. 334-45.
277. Zhuang, Y., et al., *miR-107 inhibition upregulates CAB39 and activates AMPK-Nrf2 signaling to protect osteoblasts from dexamethasone-induced oxidative injury and cytotoxicity*. Aging (Albany NY), 2020. **12**(12): p. 11754-11767.
278. Shu, B., et al., *MicroRNA-107 prevents amyloid-beta-induced neurotoxicity and memory impairment in mice*. Int J Mol Med, 2018. **41**(3): p. 1665-1672.
279. Paciorek, P., M. Zuberek, and A. Grzelak, *Products of Lipid Peroxidation as a Factor in the Toxic Effect of Silver Nanoparticles*. Materials (Basel), 2020. **13**(11).
280. Cunningham, B., et al., *Silver Nanoparticles Stable to Oxidation and Silver Ion Release Show Size-Dependent Toxicity In Vivo*. Nanomaterials (Basel), 2021. **11**(6).
281. Park, H.J., et al., *Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity*. Water Res, 2009. **43**(4): p. 1027-32.
282. Bell, R.A. and J.R. Kramer, *Structural chemistry and geochemistry of silver-sulfur compounds: Critical review*. Environmental Toxicology and Chemistry, 1999. **18**(1): p. 9-22.
283. Smith, J.N., et al., *All that is silver is not toxic: silver ion and particle kinetics reveals the role of silver ion aging and dosimetry on the toxicity of silver nanoparticles*. Part Fibre Toxicol, 2018. **15**(1): p. 47.
284. Symersky, J., et al., *Oligomycin frames a common drug-binding site in the ATP synthase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(35): p. 13961-5.
285. Ebanks, B. and L. Chakrabarti, *Mitochondrial ATP Synthase is a Target of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases*. Front Mol Biosci, 2022. **9**: p. 854321.
286. Xue, Y., et al., *Comparative cytotoxicity and apoptotic pathways induced by nanosilver in human liver HepG2 and L02 cells*. Hum Exp Toxicol, 2018. **37**(12): p. 1293-1309.
287. Xiao, H., Y. Chen, and M. Alnaggar, *Silver nanoparticles induce cell death of colon cancer cells through impairing cytoskeleton and membrane nanostructure*. Micron, 2019. **126**: p. 102750.
288. Xiao, W., et al., *NAD(H) and NADP(H) Redox Couples and Cellular Energy Metabolism*. Antioxid Redox Signal, 2018. **28**(3): p. 251-272.

289. Reyes, L.A., et al., *Depletion of NADP(H) due to CD38 activation triggers endothelial dysfunction in the postischemic heart*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(37): p. 11648-53.
290. Abdeen, S.M., et al., *The predictive value of CD38 positive hepatic stellate cell count for assessing disease activity and fibrosis in patients with chronic hepatitis*. Acta Histochem, 2009. **111**(6): p. 520-30.
291. Li, S., et al., *ImmunoPET imaging of CD38 expression in hepatocellular carcinoma using (64)Cu-labeled daratumumab*. Am J Transl Res, 2019. **11**(9): p. 6007-6015.
292. Mugabo, Y., et al., *Metabolic fate of glucose and candidate signaling and excess-fuel detoxification pathways in pancreatic beta-cells*. J Biol Chem, 2017. **292**(18): p. 7407-7422.
293. Dong, K., et al., *ROS-mediated glucose metabolic reprogram induces insulin resistance in type 2 diabetes*. Biochem Biophys Res Commun, 2016. **476**(4): p. 204-211.
294. Winkler, B.S., N. DeSantis, and F. Solomon, *Multiple NADPH-producing pathways control glutathione (GSH) content in retina*. Exp Eye Res, 1986. **43**(5): p. 829-47.
295. Wang, Z., et al., *[Estimation of the normal range of blood glucose in rats]*. Wei Sheng Yan Jiu, 2010. **39**(2): p. 133-7, 142.
296. Crawley, D.J., et al., *Serum glucose and risk of cancer: a meta-analysis*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 985.
297. Vigneri, P., et al., *Diabetes and cancer*. Endocr Relat Cancer, 2009. **16**(4): p. 1103-23.
298. Esteves, J.V., et al., *Diabetes Modulates MicroRNAs 29b-3p, 29c-3p, 199a-5p and 532-3p Expression in Muscle: Possible Role in GLUT4 and HK2 Repression*. Front Endocrinol (Lausanne), 2018. **9**: p. 536.
299. Assmann, T.S., et al., *MicroRNA expression profiles and type 1 diabetes mellitus: systematic review and bioinformatic analysis*. Endocr Connect, 2017. **6**(8): p. 773-790.
300. Simoniene, D., et al., *Clinical Role of Serum miR107 in Type 2 Diabetes and Related Risk Factors*. Biomolecules, 2022. **12**(4).
301. Hu, Y., et al., *Serum miR-195-5p Exhibits Clinical Significance in the Diagnosis of Essential Hypertension with Type 2 Diabetes Mellitus by Targeting DRD1*. Clinics (Sao Paulo), 2021. **76**: p. e2502.
302. Valadi, H., et al., *Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(6): p. 654-9.
303. Heijnen, H.F., et al., *Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules*. Blood, 1999. **94**(11): p. 3791-9.
304. Li, W., et al., *Effects of hyperglycemia on the progression of tumor diseases*. J Exp Clin Cancer Res, 2019. **38**(1): p. 327.