

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 liczność komórek w medium hodowlanym zawierającym glukozę w stężeniu $5,5 \text{ mmol/dm}^3$ 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/dm^3 . 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.