

**ARANY ÉS EZÜST NANORÉSZECSKÉK SEJTBIOLÓGIAI
HATÁSAINAK VIZSGÁLATA P53 DEFICIENS RÁKOS SEJTEKBEN
ÉS TUMOR METASZTÁZIS MODELLBEN**

**DOKTORI ÉRTEKEZÉS
KOVÁCS DÁVID**

**TÉMAVEZETŐ:
DR. KIRICSI MÓNICA**

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
BIOKÉMIAI ÉS MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI TANSZÉK**

SZEGED

2017

Tartalomjegyzék

1. Tartalmi összefoglaló	4
2. Rövidítések jegyzéke	6
3. Irodalmi áttekintés	10
3.1. A tumoros transzformáció és a p53 tumorszuppresszor szerepe a daganatos megbetegedések kialakulása során	10
3.2. A malignus transzformáció és az áttétképződés biológiai háttere	17
3.3. A tumor sztróma szerepe és a fibroblasztok aktiválódási mechanizmusai	19
3.4. A tumor-asszociált fibroblasztok tumor-támogató hatásai	24
3.5. A rákos megbetegedések terápiás lehetőségei	25
3.6. A nanomedicina lehetőségei a daganatos megbetegedések terápiájában.....	28
3.7. Fém nanorészecskék	32
3.8. Ezüst nanorészecskék.....	32
3.9. Arany nanorészecskék	38
4. Célkitűzések.....	41
5. Felhasznált anyagok és módszerek	44
5.1. Fém nanorészecskék szintézise és karakterizálása	44
5.2. Sejtkultúra	46
5.3. Transzmissziós, pásztázó elektronmikroszkópia és energiadiszperzív röntgenspektrometriás mérések	46
5.4. MTT esszé és IC ₅₀ értékek meghatározása	47
5.5. Immunocitokémia	48
5.6. Apoptózis detektálása áramlási citométerrel	48
5.7. Western blot analízis.....	49
5.8. Tranziens transzfekció és luciferáz aktivitás mérés.....	49
5.9. RT-qPCR.....	50
5.10. Mitokondriális membránpotenciál mérés JC-1 festéssel	51
5.11. „Wound healing” és migrációs esszé.....	51
5.12. „Transwell” inváziós esszé	52
5.13. Laktát-dehidrogenáz (LDH) aktivitás mérése.....	53
5.14. Fluoreszcens jelölés és direkt ko-kultúra	53

5.15. Indirekt ko-kultúra	54
5.16. Felülúszó minták töményítése.....	55
5.17. BrdU ELISA	55
5.18. Zselatin zimográfia	56
5.19. Transzkriptóm analízis.....	56
5.20. <i>In vivo</i> tumornövekedés és metasztázis vizsgálata	58
5.21. Statisztikai analízis.....	59
6. Eredmények és értékelésük.....	60
6.1. Az ezüst nanorészecskék megtapadnak és átjutnak az oszteoszarkóma sejtek plazmamembránján	60
6.2. Az ezüst nanorészecskék azonos mértékben csökkentik a U2Os és Saos-2 sejtek viabilitását	63
6.3. Az ezüst nanorészecskék kaspáz 3-függő apoptózist indukálnak oszteoszarkóma sejtekben	65
6.4. Az ezüst nanorészecskék aktiválják a p53-függő jelpályát.....	67
6.5. Az ezüst nanorészecskék mitokondriális stresszt okoznak	70
6.6. Az arany, ezüst és arany-ezüst hibrid részecskék eltérő mértékű citotoxikus hatást gyakorolnak adenokarcinóma és fibroblaszt sejteken	73
6.7. Az ezüst és arany-ezüst hibrid nanorészecskék gátolják az adenokarcinóma sejtek proliferációs és migrációs képességeit	75
6.8. Az ezüst és arany-ezüst nanorészecskék gátolják a fibroblasztok tumorsejt-támogató hatásait	78
6.9. Az ezüst és arany-ezüst nanorészecske kezelések gátolják a mátrix metalloproteázok felszabadulását	85
6.10. Az arany, ezüst és arany-ezüst nanorészecskék által indukált transzkriptomikai változások tumor-asszociált fibroblaszt sejtekben.....	87
6.11. Az arany-ezüst hibrid nanorészecskék gátolják a 4T1 tumorok metasztatikus aktivitását, és erősítik a kemoterápia tumornövekedést gátló hatását.....	91
7. Az eredmények összefoglalása és megbeszélése.....	95
8. Angol nyelvű összefoglaló	102
9. Irodalomjegyzék	107
10. Publikációk listája.....	119
11. Köszönetnyilvánítás.....	121

1. Tartalmi összefoglaló

A rákos megbetegedések komplexitását számos biológiai szerveződési szinten értelmezhetjük, és az ezekhez kapcsolódó folyamatok legjobb megértése nélkülözhetetlen a hatékony terápiás stratégiák kidolgozása szempontjából. A tumoros transzformáció során alapvető szerepet játszanak a különböző proto-onkogének és tumorsuppresszorok genetikai változásai, illetve a genomi instabilitás „optimális” mértékének beállítása is olyan érzékeny folyamatok eredménye, amelyek létrejötte mind a tumorsejtek folyamatos mikroevolúciójának terméke. A stabil proliferációs aktivitással rendelkező rákos sejtek populációjának kialakulását követően a tumoros sejtek képesek befolyásolni közvetlen környezetük viselkedését, így a genomikai változásokat követően a szolid tumorok saját mikrokörnyezetükben szabályozhatják a lokális szöveti homeosztázist is. A tumor mikrokörnyezete ilyen módon komplex ökológiai rendszerekhez hasonlítható, ahol számos eltérő sejttípus összehangolt működése, vagy éppen egymással való versenyzése, így vagy úgy, szelekciós előnyben részesíti a tumorsejteket. A genetikai, sejtbiológiai és szöveti szintű változások összessége végül olyan komplex képességekkel tudja felruházni a rákos sejteket, amelyek a test más sejtjeitől teljesen eltérő módon, lehetővé teszik a tumoros sejtek számára, hogy azok elhagyják eredeti környezetüket, túléljenek a véráramban, és távoli szervekben kolóniákat alkotva áttétek kialakulására legyenek képesek.

A nanotechnológia fejlődésével számos olyan új diagnosztikai és terápiás megközelítésre nyílt lehetőség, amelyek segítségével a jövőben lehetőséget kapunk arra, hogy forradalmasítsuk a rákos megbetegedések klinikai kezelését. Számos szerves, vagy szervetlen anyagból előállíthatunk nanorészecskéket, ám azok különböző fizikai-kémiai tulajdonságai alapvetően befolyásolhatják a különböző biológiai rendszerekkel történő kölcsönhatásaikat. Az eddig előállított nanorészecskék egyik nagy csoportját képezik a fém nanorészecskék, amelyek leggyakrabban ezüstből, vagy aranyból épülnek fel. Terápiás szempontból az arany- és az ezüst nanorészecskék egyedi tulajdonságai jól kihasználhatók lehetnek, ám a két fém eltérő kémiai természetéből eredően ezek a nanorészecskék igen különböző módon viselkednek élő rendszerekben. Míg az arany nanorészecskék biológiailag inert tulajdonságaik miatt elsősorban terápiás molekulák szállítására illetve radioszenzitizálásra alkalmasak, az ezüst nanorészecskék egyedi apoptotikus tulajdonságai jól kihasználhatók lehetnek a rákos sejtek elpusztításában.

Annak ellenére, hogy a fém nanorészecskék viselkedése különböző betegségek modelljeiben nagyon intenzíven kutatott területe ma az anyag- és élettudományoknak, meglepően kevés információ áll rendelkezésre arról, hogy a nanorészecskék alapvető fizikai-kémiai tulajdonságai – mint például méretük, vagy kémiai összetételük – hogyan befolyásolják biológiai hatásait. Ebből kifolyólag, munkánk során azt tűztük ki elsődleges célul, hogy vizsgáljuk a fém nanorészecskék méret- és anyagi összetétel-függő biológiai hatásait a rákos megbetegedések különböző szerveződési szintjeit modellező biológiai rendszerekben.

Munkánk során megállapítottuk, hogy a rákos sejtekben az ezüst nanorészecskék apoptózis indukáló hatása nem függ azok p53 státuszától. Ráadásul azt találtuk, hogy az 5 nm illetve a 35 nm átmérőjű ezüst nanorészecskék megegyező molekuláris útvonalakon indukálnak apoptotikus sejthalált oszteosarkóma sejtekben. Megállapítottuk, hogy az ezüst tartalmú nanorészecskék képesek befolyásolni a tumorok mikrokörnyezetében megtalálható tumor-asszociált fibroblasztok és rákos sejtek között kialakuló egyedi kommunikációt. Kiderítettük, hogy az aranyból és ezüsből felépülő hibrid nanorészecskék alkalmazása igen előnyös lehet, ugyanis eredményeink azt mutatják, hogy ezek a nanorészecskék kevésbé citotoxikusak, szelektív hatást gyakorolnak a rákos sejteken, valamint képesek *in vivo* csökkenteni a tumorok metasztázis képző aktivitásait.

2. Rövidítések jegyzéke

ABC	ATP kötő kazetta (<u>A</u> TP <u>B</u> inding <u>C</u> asette)
AgNP	Ezüst nanorészecske
AKT/PKB	Protein kináz B (<u>A</u> KT8 virus oncogene cellular homolog/ <u>P</u> rotein <u>K</u> inase <u>B</u>)
ALAT	Alanin aminoszferáz
Apaf-1	Apoptotikus proteáz aktiváló faktor 1 (<u>A</u> poptotic protease <u>a</u> ctivating factor <u>1</u>)
ASAT	Aszpartát aminoszferáz
<i>atg</i>	Autofágia kapcsolt géncsalád
ATP	Adenozin-trifoszfát
Au@Ag	Arany-ezüst hibrid nanorészecske
AuNP	Arany nanorészecske
Bad	Bcl-2 asszociált halál promóter (<u>B</u> cl-2-associated <u>d</u> eath promoter)
Bak	Bcl-2 homológ antagonista/killer (<u>B</u> cl-2 homologous <u>a</u> ntagonist/ <u>k</u> iller)
Bax	Bcl-2 asszociált x protein (<u>B</u> cl-2 associated <u>x</u> protein)
Bcl-2	B-sejtes limfóma 2 (<u>B</u> -cell lymphoma <u>2</u>)
Bcl-W	Bcl-2-szerű fehérje 2 (Bcl-2 like protein 2)
Bcl-X _L	B-sejtes limfóma hosszú izoforma (B-cell lymphoma large isoform)
Bcl-X _S	B-sejtes limfóma rövid izoforma (B-cell lymphoma short isoform)
Bfl-1	Bcl-2 rokonfehérje A2 (Bcl-2-related protein A1)
Bid	BH3 kölcsönható-domén halál agonista (<u>B</u> H3 interacting-domain <u>d</u> eath agonist)
Bik	Bcl-2 kölcsönható killer (<u>B</u> cl-2-interacting <u>k</u> iller)
BMDC	Csontvelő eredetű sejt (<u>B</u> one <u>M</u> arrow <u>D</u> erived <u>C</u> ell)
BrdU	5-bróm-2-dezoxiuridin
BSA	Borjú szérum albumin
CAD	Kaspáz Aktivált Dnáz (<u>C</u> aspase- <u>A</u> ctivated <u>D</u> nase)
CARD	Kaspáz Aktiváló és Toborzó Domén (<u>C</u> aspase <u>A</u> ctivation and <u>R</u> ecruitment <u>D</u> omain)
CBB	<u>C</u> oomassie <u>B</u> rilliant <u>B</u> lue
CXCL8	CXC-kemokin ligand 8 (<u>C</u> XC-chemokine ligand <u>8</u>)

CXCR4	4-es típusú C-X-C kemokin receptor (<u>C</u> - <u>X</u> - <u>C</u> chemokine <u>R</u> eceptor type 4)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DD	Halál domén (<u>D</u> eath <u>D</u> omain)
DED	Halál effektor domén (<u>D</u> eath <u>E</u> ffector <u>D</u> omain)
DISC	Halálindukáló szignalizációs komplex (<u>D</u> eath- <u>I</u> nducing <u>S</u> ignaling <u>C</u> omplex)
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium
DMSO	Dimetil-szulfoxid
DNS	Dezoxiribonukleinsav
DR3	Halál receptor 3 (<u>D</u> eath <u>R</u> eceptor 3)
DR6	Halál receptor 6 (<u>D</u> eath <u>R</u> eceptor 6)
DTT	Ditiotreitol
EDS	Energiadisziperzív Röntgenspektrometria (<u>E</u> nergy- <u>D</u> ispersive X-ray <u>S</u> pectroscopy)
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav
EGFP	Erősített zöld fluoreszcens fehérje (<u>E</u> nhanced <u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein)
EGFR	Epidermális növekedési faktor receptor (<u>E</u> pidermal <u>G</u> rowth <u>F</u> actor <u>R</u> eceptor)
EMT	Epitheliális-Mesenchymális Tranzíció (<u>E</u> pithelial- <u>M</u> esenchymal <u>T</u> ransition)
ER	Endoplazmatikus Retikulum
ERK	Extracelluláris jel által szabályozott kináz (<u>E</u> xtracellular signal- <u>R</u> egulated <u>K</u> inase)
FADD	Fas-asszociált, halál domént tartalmazó fehérje (<u>F</u> as- <u>A</u> ssociated protein with <u>D</u> eath <u>D</u> omain)
FAK	Fokális adhézión kináz (<u>F</u> ocal <u>A</u> dhesion <u>K</u> inase)
FAP1 α	Fibroblaszt aktiváló protein 1 α (<u>F</u> ibroblast <u>a</u> ctivation protein 1 α)
Fas	TNF szupercsalád receptor 6 (TNF superfamily receptor 6)
FBS	Fötális Borjú Szérum
FDA	Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerfelügyeleti Hatóság (US <u>F</u> ood and <u>D</u> rug <u>A</u> dministration)
FGF	Fibroblaszt növekedési faktor (<u>F</u> ibroblast <u>G</u> rowth <u>F</u> actor)
FOXC2	Forkhead box fehérje C2 (<u>F</u> orkhead box protein <u>C</u> 2)
FSP-1	Fibroblaszt specifikus protein 1 (<u>F</u> ibroblast <u>S</u> pecific <u>P</u> rotein 1)

HER2	Humán epidermális növekedési faktor receptor 2 (<u>H</u> uman <u>e</u> pidermal growth factor <u>r</u> eceptor <u>2</u>)
HGF	Hepatocita növekedési faktor (<u>H</u> epatocyte <u>G</u> rowth <u>F</u> actor)
HIF1 α	Hipoxia Indukálható Faktor 1 α (<u>H</u> ypoxia- <u>i</u> nducible <u>F</u> actor <u>1</u> α)
HIV	<u>H</u> umán <u>I</u> mmundeficiencia <u>V</u> írus
Hrk	Apoptózis harakiri aktivátor (Activator of apoptosis harakiri)
ICAD	Kaspáz Aktivált Dnáz Inhibitor (<u>I</u> nhibitor of <u>C</u> aspase- <u>A</u> ctivated <u>D</u> nase)
LDH	<u>L</u> aktát- <u>d</u> ehidrogenáz
LIF	Leukémia gátló faktor (<u>L</u> eukemia <u>I</u> nhibitory <u>F</u> actor)
Mcl-1	Mieloid leukémia 1 (<u>M</u> yeloid <u>c</u> ell <u>l</u> eukemia <u>1</u>)
Mdm2	<u>M</u> ouse <u>d</u> ouble <u>m</u> inute <u>2</u>
MDSC	Myeloid eredetű szuppresszor sejt (<u>M</u> yeloid <u>D</u> erived <u>S</u> uppressor <u>C</u> ell)
MMP	Mátrix metalloproteáz (<u>M</u> atrix <u>m</u> etalloprotease)
MSC	Mesenchymális őssejt (<u>M</u> esenchymal <u>S</u> tem <u>C</u> ell)
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-il)-2,5-difeniltetrazólium bromid
NADPH	Nikotinamid-adenin dinukleotid foszfát, redukált forma
PBS	Foszfát pufferes sóoldat (Phosphate buffered saline)
PCR	Polimeráz láncreakció
PDGF	Vérlemezke eredetű növekedési factor (<u>P</u> latelet- <u>D</u> erived <u>G</u> rowth <u>F</u> actor)
PEG	Polietilén glikol
PFA	Paraformaldehid
Pgp	P-glikoprotein
PI3-K	Foszfatidil inozitol-4,5-biszfoszfát 3 kináz
PIC	Proteáz inhibitor keverék (Protease <u>I</u> nhibitor <u>C</u> ocktail)
PTEN	Foszfátáz és Tensin homológ (<u>P</u> hosphatase and <u>T</u> ensin homologue)
RAF	<u>R</u> apidly <u>A</u> ccelerated <u>F</u> ibrosarcoma
RIP	Receptor-kölcsönható fehérje (<u>R</u> eceptor- <u>i</u> nteracting <u>P</u> rotein)
RIP1	Receptor-kölcsönható fehérje 1 (<u>R</u> eceptor- <u>i</u> nteracting <u>P</u> rotein <u>1</u>)
RIP3	Receptor-kölcsönható fehérje 3 (<u>R</u> eceptor- <u>i</u> nteracting <u>P</u> rotein <u>3</u>)
RNS	Ribonukleinsav
RPMI 1640	<u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute Medium 1640

SAHA	Suberoyl-Anilide-Hydroxamic acid
SDF-1 /CXCL12	Sztrómasejt eredetű faktor 1 (<u>S</u> tromal cell- <u>d</u> erived <u>f</u> actor <u>1</u>)
SDS	Nátrium dodecil szulfát
SEM	Szkenning Elektronmikroszkóp
SNAIL1/2	SNAI1/2 cink ujj fehérje (Zinc finger protein SNAI1)
TAT	Transzkripció transzaktivátor
TEM	TIE2-expresszáló monocita (<u>T</u> IE2 <u>E</u> xpressing <u>M</u> onocyte)
TEM	Transzmissziós Elektronmikroszkóp
TGF- β	Transzformáló növekedési faktor β (<u>T</u> ransforming <u>G</u> rowth <u>F</u> actor β)
TN-C	Tenascin-C
TNF α	Tumornekrózis faktor α (<u>T</u> umor <u>N</u> ecrosis <u>F</u> actor α)
TRAIL- R1/R2	TNF rokon apoptózis-indukáló ligand receptor 1/2 (<u>T</u> NF- <u>r</u> elated <u>a</u> poptosis- <u>i</u> nducing <u>l</u> igand <u>r</u> eceptor <u>1/2</u>)
TWIST1/2	Twist kapcsolt fehérje 1/2 (Twist-related protein 1/2)
VEGF	Vaszkuláris-endotheliális Növekedési Faktor (<u>V</u> ascular- <u>E</u> ndothelial <u>G</u> rowth <u>F</u> actor)
XIAP	X-kapcsolt Apoptózis Inhibitor (<u>I</u> nhibitor of <u>a</u> poptosis, <u>x</u> -linked)
ZEB1/2	E-box kötő cink ujj homeobox 1/2 (<u>Z</u> inc finger <u>E</u> - <u>b</u> ox-binding homeobox <u>1/2</u>)
α SMA	α simaizom aktin (α <u>S</u> mooth <u>M</u> uscle <u>A</u> ctin)

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A tumoros transzformáció és a p53 tumorszuppresszor szerepe a daganatos megbetegedések kialakulása során

Az emberi test sejt, illetve szöveti szintű homeosztázisának fenntartása nagyon szigorúan és pontosan szabályozott folyamatokat igényel. Azok a sejtek, amelyek valamilyen okból kifolyólag sérülést szenvednek és károsodnak, genetikailag programozott és precízen kontrollált sejthalált követnek el. A programozott sejthalál miatt a „hibás” sejtek nem örökítik tovább rendellenességeiket, és a sejt eliminációja mellett a szöveti funkciók továbbra is gond nélkül működhetnek. A programozott sejthalál egyes típusait jellegzetes morfológiai, valamint biokémiai tulajdonságaik alapján több csoportba lehet sorolni [5]. A programozott sejthalál legjobban részletezett és feltérképezett típusa az apoptózis, amelyet extra- és intracelluláris szignálok egyaránt inicializálhatnak, jellegzetesen a DNS állomány fragmentálódásával jár együtt. Az apoptózison kívül az autofágia túlműködés is eredményezhet programozott sejthalált, valamint, ma már a nekrotikus sejtpusztulást is jól szabályozott molekuláris program által kontrollált folyamatnak tekintik [5].

A leggyakrabban előforduló programozott sejthalál típus – az apoptózis – jellemzően javíthatatlan DNS károsodás esetén aktiválódik a sejtekben. Az apoptózis intrinsic útvonalának inicializálásához számos mitokondriális fehérje közreműködése szükséges. Apoptotikus szignálok esetén a külső mitokondriális membrán potenciálja csökken és permeabilizálódik, ami hatására a mitokondriumban található Citokróm c fehérje a citoplazmába áramlik. A citoplazmába jutott Citokróm c – ATP jelenlétében – az Apaf-1 és a pro-kaspáz 9 fehérjékkel egy apoptoszómának nevezett szupramolekuláris komplexet hoznak létre. Az apoptoszómák kialakulása szempontjából nélkülözhetetlen szerepet játszanak az Apaf-1 és a pro-kaspáz 9 fehérjék CARD motívumai, ugyanis ezek a peptid részletek fehérje-fehérje kölcsönhatásokat tesznek lehetővé az apoptoszómában található fehérjék között [6, 7]. Az apoptoszóma összeszerelődésének következtében a komplexben jelen lévő pro-kaspáz 9 aktiválódik és beindul a pro-kaspáz 3, 6 és 7 proteolitikus hasításaival végződő kaspáz kaszkád. A végső effektor kaspázok – a pro-kaspáz 3, 6 és 7 – aktiválódása már visszafordíthatatlan következményekkel jár, ugyanis beindul a sejtállomány enzimatis lebonthatása, ami a

programozott apoptózis végső szakasza. Az apoptózis utolsó fázisában a strukturális fehérjék emésztése mellett a DNS állomány lebontása is az effektor kaspázok miatt indukálódik. Normális körülmények között az ICAD fehérje megköti a citoplazmatikus CAD (kaspáz aktivált DNáz) enzimet, ami így inaktív. Azonban a pro-kaspáz 3 aktiválódása megszünteti ezt az inaktív állapotot, ugyanis képes specifikusan hasítani az ICAD fehérjét, melynek következtében a CAD felszabadul a gátlás alól, dimerizálódik, és a sejtmagba transzlokálódva, DNáz aktivitásának köszönhetően feldarabolja a sejt örökítő anyagát. Fontos megemlíteni, hogy a plazmamembrán citoplazmatikus oldalán található foszfatidil-szerin a plazmamembrán extracelluláris felszínére kerül az apoptózis során. A foszfatidil-szerin externalizációjával az apoptotizáló sejtek jelzik környezetük felé a sejthalál program elindulását, ennek köszönhetően a sejt halála később nem okoz fennakadást a környező szövet további működésében [8].

Az apoptózis folyamatának rendkívül sok szabályozó szereplője van. A legfontosabbak a Bcl-2 család tagjai, melyek anti-, illetve pro-apoptotikus szerepet is egyaránt betölthetnek. A családba tartozik például a pro-apoptotikus Bax, Bak, Bad, Bcl-X_S, Bid, Bik, Bim és Hrk, valamint az anti-apoptotikus Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, Bfl-1 és Mcl-1 fehérjék [9]. A pro-apoptotikus fehérjék apoptotikus szignálok hatására poszttranszlációs módosításokon – például foszforiláció vagy proteolitikus hasítás – mennek keresztül, melyek következtében aktiválódnak. Javíthatatlan DNS károsodás esetén például aktiválódnak a Bim, Bid és Bad fehérjék, majd elősegítik a Bax és a Bak fehérjék oligomerizációját. Ez az oligomerizálódott forma képes a mitokondriumhoz transzlokálódni, melynek hatására – ma még nem teljesen ismert módon – lecsökken a mitokondriális membránpotenciál és a Citokróm c kiszabadul a citoplazmába [10-12]. Ezt a folyamatot azonban gátolhatják az anti-apoptotikus Bcl-2, Bcl-X_L és Mcl-1 fehérjék, melyek így végső soron megakadályozzák az apoptotikus folyamatok előrehaladását [13]. Anti-apoptotikus szerepet tölt be a XIAP fehérje is, ugyanis képes az Apaf-1-en keresztül az apoptoszómába kötni, ahol kölcsönhatásba lép az aktiválódott kaspáz 3-al, így gátolva annak felszabadulását. A folyamat során egy Apaf-1/XIAP/kaspáz 3 komplex alakul ki, amely végül gátolja a kaspáz 3-függő apoptotikus folyamatokat [14-16].

A sejtben keletkezett javíthatatlan hibák által kiváltott intrinsic sejthalál mellett az apoptózis program külső jelek hatására is képes bekapcsolni. Ilyen esetben valamilyen sejtfelszíni receptor aktivációja indítja el a sejthalál extrinsic útvonalát. Apoptózist tudnak okozni például a halál receptorok családjába tartozó Fas, DR3, TRAIL-R1/R2 és DR6

receptorok aktivációja [17]. Ezeknek a transzmembrán fehérjéknek közös tulajdonsága, hogy citoplazmatikus felszínükön egy úgynevezett DISC komplex alakul ki. A DISC komplexben a receptor – halál doménjén (DD) keresztül – kapcsolódik a FADD fehérje halál doménjéhez, ami – halál effektor doménje (DED) segítségével – további fehérje-fehérje kapcsolatot képez a kaszpáz 8 pro-formájával. Fas ligand kötődése esetén a trimerizálódott receptorok aktiválódását követően a citoplazmatikus felszínen létrejött fehérje komplexben végül sor kerül a pro-kaspáz 8 aktiválódására, ami elindítja a kaszpáz kaszkád [18-20]. Az apoptózis extrinsic és intrinsic útvonalai között kapcsolatot képez a Bid fehérje. A Fas Ligand kötődése miatt aktiválódott kaszpáz 8 a kaszpáz kaszkád elindítása mellett képes hasítani a Bid pro-apoptotikus fehérjét is, ami így elősegíti a Bax/Bak oligomer által kiváltott mitokondriális membránpotenciál csökkenést, ezáltal aktiválja a mitokondriális eredetű programozott sejthalált is. Fas ligandon kívül számos más növekedési faktor, illetve extracelluláris szignál is befolyásolja a sejt apoptotikus folyamatait. Növekedési faktorok által indukált jelátviteli folyamatok például képesek aktiválni az ERK, RAF és AKT/PKB kinázokat, melyek számos transzkripciós faktor foszforilálásán keresztül szabályozzák az anti-apoptotikus faktorok kifejeződését, így serkentve a sejt túlélését [5].

A programozott sejthalál szabályozásában a fehérje természetű faktorok mellett igen fontos szerep jut a génműködés kifejeződését szabályozó mikro RNS molekuláknak is. Úgy tűnik, hogy a miR15-a és a miR-16-1 kis RNS-ek például képesek csendesíteni az anti-apoptotikus Bcl-2 fehérje kifejeződését, így elősegítik a mitokondrium-függő apoptotikus folyamatokat [21, 22].

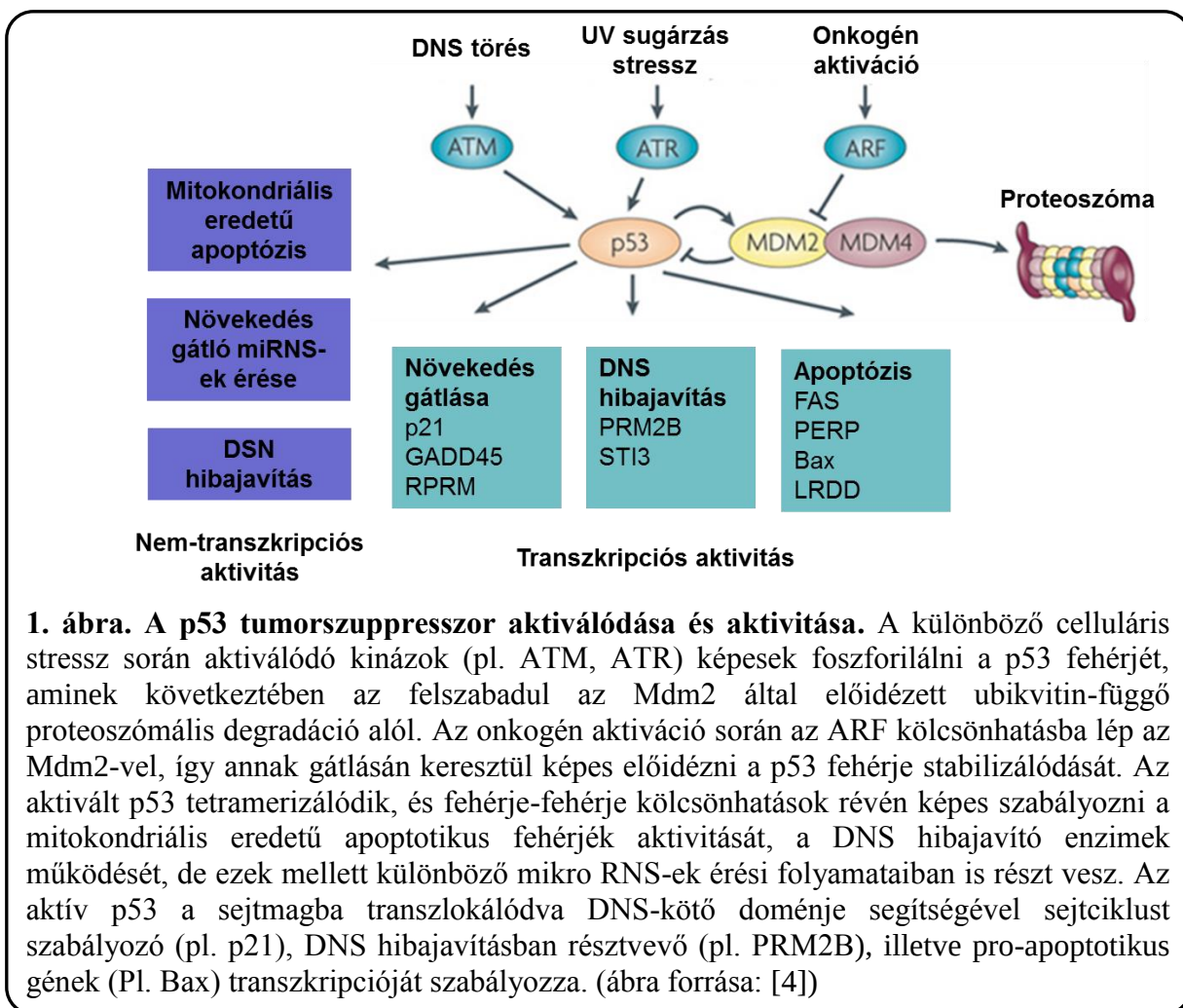
Apoptózis mellett autofágia is okozhat sejthalált. Az autofágia egy fontos katabolikus, energiaszerző folyamat, melyet elsősorban *atg* gének (autofágia-kapcsolt gének) szabályoznak tápanyagszegény kondíciók esetén. Autofágia során a sejt kettős membránnal határolja el saját sejtalkotóit a citoplazmától. Ezek után a kialakult autofagoszómák lizoszómákkal fuzionálnak, majd az elhatárolt organellumok lebomlanak. A folyamat nem csak egy alternatív energiaszerző útvonal, de fontos szerepet játszik a hibásan működő sejtalkotók eltávolításában is. A változatos extra- és intracelluláris jelek által aktivált autofágia túlműködése autofágia-függő sejthalált okozhat. Habár a molekuláris részletek még nagy részben ismeretlenek, minden jel arra utal, hogy az autofágia is a programozott sejthalál egyik típusa lehet [5, 23].

Sokáig úgy gondolták, hogy a plazmamembrán integritásának elvesztésével járó nekrotikus sejthalál egy nem szabályozott, véletlenszerű folyamat és elsősorban a lokális szöveti gyulladásos folyamatok során következik be. Ma már több molekuláris részletét ismerjük, és úgy tűnik, hogy – az apoptózishoz hasonlóan – a nekrozis is egy jól szabályozott formája programozott sejthalálnak. Ráadásul, többen úgy gondolják, hogy a folyamat szükséges kiváltó komponense, nem pedig következménye a gyulladásos folyamatoknak [24]. A programozott nekrozis fő szabályozói a RIP (Receptor-interacting serine-threonine kinase) kinázok. Normális körülmények között a RIP1 fehérjét a kaszpáz 8 aktív formája elbontja. Azonban abban az esetben, ha valamilyen okból kifolyólag a kaszpázok aktivitása gátolt, számos receptor (pl. TNF α receptor) ligandkötése esetén egy RIP1, RIP3, kaszpáz 8 és FADD adapter fehérjéből álló úgynevezett pro-nekrotikus komplex alakul ki a sejtekben. A kialakult komplex ezután képes kölcsönhatásba lépni számos, a sejtek anyagcseréjében kulcsszerepet játszó fehérjével, mint például a glikogén-foszforiláz és a glutamát dehidrogenáz. Az így megemelkedett metabolikus ráta következtében reaktív oxigénformák képződnek a mitokondriumokban, melyek a mitokondriális membránok permeabilizálásán keresztül végül a sejt halálát eredményezik [25]. Úgy tűnik, hogy számos stresszor képes kiváltani a RIP1 és RIP3 kinázok kölcsönhatását és aktiválódását, és közvetlenül, vagy közvetve a NADPH-oxidáz aktivitásának befolyásolásán keresztül képesek reaktív oxigénformák keletkezését előidézni, ami így a sejt nekrotikus halálát eredményezi [26-28].

A programozott sejthalál határfoka, illetve a szöveti szintű szabályozás robosztus működése miatt a károsodott sejtek túlélésére igen csekély az esély. Ennek ellenére, az apoptózist elkerülő, tumoros transzformáción átesett sejtek kialakulására mégis igen gyakran sor kerülhet. Ezt megerősítik azok a statisztikák, melyek szerint 2012-ben 8.2 millióan haltak meg valamilyen rákos megbetegedésben világszerte [29], és ami szerint napjainkban is a rákos megbetegedésekből származó halálesetek világszinten vezetik a halálozási listákat.

Az egészséges sejtek tumoros transzformációja igen bonyolult, időigényes biológiai folyamat, és elsősorban genetikai okokra vezethetőek vissza. A folyamat komplexitását és időigényességét epidemiológiai megfigyelések is alátámasztják: néhány szélsőséges esettől eltérve úgy tűnik, hogy a tumoros megbetegedések elsősorban a társadalmak idősebb korosztályát érintik.

A tumoros transzformáción átesett sejtek legnagyobb részére jellemző, hogy a sejtciklus helytelen szabályozása miatt képesek korlátlan sejtosztódásra, instabil genommal rendelkeznek, valamint hatékonyan elkerülik a programozott sejthalál egyes formáit. Az egész folyamat során meghatározó szerepet játszanak az egyes kulcsgéneket érintő funkcióvesztéses és funkciónyeréses mutációk. Abban az esetben, ha a mutáció következtében az adott gén által kódolt fehérjetermék valamilyen sejtosztódást serkentő funkciónyerése következik be, proto-onkogén aktivációról beszélhetünk. Ellenkező esetben, ha valamilyen sejtosztódást gátló faktor funkcióvesztést szenved a kialakult mutáció miatt, tumorszuppresszor inaktiváció következik be. A tumorsejtekben megfigyelhető mutációs események eredetüket tekintve két osztályba sorolhatóak. Azokat a mutációkat, amelyek valamilyen proto-onkogén aktivációt vagy tumorszuppresszor inaktivációt eredményeznek – és ezzel nagymértékben elősegítik a malignus transzformációt – „driver” mutációknak nevezzük, míg azok a mutációk, amelyek a „driver” mutációk által indukált változások miatt következnek be a genomban „passanger” mutációkként értelmezhetőek. Könnyen elképzelhető, hogy egy „driver” mutáció például valamilyen DNS hibajavítási folyamatban szerepet játszó fehérjét érint, aminek következtében nagymértékű genomi instabilitás lesz jellemző az adott sejtre. Abban az esetben, ha ez a hibajavításban szerepet játszó faktor nem képes már ellátni meghatározott szerepét – a keletkezett mutációk javítását – a hiba terület engedhet további „passanger” mutációk megjelenésének. Belátható, hogy az így létrejött sejtek instabil genomjuk miatt folyamatosan új genotípusú tumorsejtek képződését teszik lehetővé, ami – az evolúciós események során is meghatározó szerepet játszó – szelekciós nyomás hatására, egy-egy funkcióra specializált sejtek előfordulását eredményezi a kialakuló tumoros szövetben. Habár a folyamatosan új funkcióra specializált tumorsejtek létrehozását végző tumor-össejtek jelenléte még nem tisztázott teljes mértékben, számos klinikai, szövettani, illetve molekuláris biológiai vizsgálat igazolja nélkülözhetetlen szerepüket a tumoros megbetegedések számos fázisa során [30].



Az egyik legfontosabb folyamat, ami a legtöbb daganatos betegség kialakulása során megfigyelhető, a kulcsfontosságú tumorszuppresszorok funkciójának kikapcsolása. A tumorszuppresszor fehérjék az egészséges sejtekben a sejtosztódás szabályozásában játszanak nélkülözhetetlen szerepet [31]. Míg a tumoros transzformáció során a proto-onkogének funkciónyeréses mutációja juttatja a rákos sejteket szelekciós előnyhöz, egy tumorszuppresszor kiiktatásával, az általa fenntartott gátló hatás megszűnése miatt válik lehetővé a daganatos sejtekre jellemző korlátlan sejtosztódás. A legjobban jellemzett tumorszuppresszor fehérje az 53 kDa molekulásúlyú p53, amelynek funkcióvesztése sorsdöntő szerepet játszik a rákos megbetegedések kialakulása során. Normális körülmények között a p53 folyamatos ubiquitin-függő proteosómális degradáció miatt nagyon alacsony mennyiségben van jelen a sejtekben. Abban az esetben, ha a sejtet valamilyen stressz éri, például reaktív gyökök képződnek, törések keletkeznek a DNS-ben, vagy esetleg valamilyen proto-onkogén aktiválódik, a p53 felszabadul

az Mdm2 által fenntartott gátlás alól és aktiválódik [32]. A p53 tumorszuppresszor fehérje aktivált formája fehérje-fehérje kölcsönhatásokat alakít ki, valamint a sejtmagba transzlokálódik, ahol DNS-kötő doménje segítségével képes befolyásolni célgénjei transzkripcióját. A p53-függő gének több csoportba oszthatóak: A p53 aktiválódása során elsősorban olyan gének transzkripcióját indítja be, melyek a sejtciklus előrehaladásának leállítását végzik. Ilyen például a p21 nevű ciklin dependens kináz inhibitor fehérje génje, mely aktivitása során a sejtciklus G1 fázisban történő felfüggesztését eredményezi. A sejtciklus megállítása során a sejt lehetőséget kap a keletkezett hibák javítására, illetve a sejtosztódás leállítása miatt lehetetlenné válik az esetleges hibák örökítése az utódsejtekbe. A p53 célgénjei közé sorolhatóak a különböző hibajavítást végző enzimek génjei is. Abban az esetben, ha a javítási folyamat sikertelen, vagy valamiért nem végezhető el, a p53 pro-apoptotikus gének transzkripcióját aktiválja (pl. Bax), melyek meghatározó komponensei az apoptózis program végrehajtásának [33-35] (**1. ábra**).

A p53 ilyen funkcióját a tumor sejtek rendkívül változatos mechanizmusokkal képesek kiiktatni. A leggyakrabban megfigyelt, p53-at érintő genetikai változások olyan „driver” mutációk, amelyek a tumorszuppresszor fehérje DNS-kötő doménjében eredményeznek aminosav cseréket. Az ilyen pontmutációk miatt a p53-nak egy olyan mutáns változata jön létre a sejtben, ami nem képes a célgénjeinek promóter régiójába kötni. A megszűnt transzaktivációs képesség miatt a mutáns p53 nem tudja a megfelelő gének expresszióját aktiválni, így a sérült sejtek továbbra is osztódóképesek maradnak, valamint az apoptózis indukciója is jelentősen körülményesebbé válik [36, 37]. Különböző kromoszóma-mutációk és genomi átrendeződések miatt az is lehetséges, hogy a p53 gént kódoló lókuszt teljesen deletálódik a sejt genomjából, és így p53-deficiens tumor sejtek képződhetnek. Fontos megemlíteni, hogy a tumorszuppresszor fehérjéket kódoló lókusztok is két kópiában vannak jelen a diploid sejtekben, így a teljes funkcióvesztéshez két genetikai változásra is szükség van. A genetikai változások mellett azonban a tumorkeltő vírusok fertőzései is képesek a p53-specifikus funkciók csendesítésére. Például, humán papilloma vírus által kiváltott méhnyakrák esetén a vírus genom által kódolt E6 nevű fehérje képes specifikusan kötni a gazdasejtben található p53 fehérjét, ezáltal gátolva annak aktiválódását [38].

Annak köszönhetően, hogy a p53-at érintő genetikai változások a humán tumorok több mint 50%-ában megfigyelhetők, az adott tumor p53 státuszának ismerete igen fontos

diagnosztikai és terápiás jelentőséggel bír [39]. Mivel a p53 funkciójának csökkenése, vagy hiánya sejthalál helyett a tumorsejtek túléléséhez vezet, a p53-negatív tumorok válasza jelentősen gyengül a különböző kemoterápiás kezelések során is, ami a tumoros megbetegedés terápiájának sikerességét nagymértékben csökkenti [39-41]. A p53 gyakori hiánya miatt különösen ígéretes tumorterápiás eszközöknek tűnnek azok a hatóanyagok, amelyek képesek p53-független módon is programozott sejthalált indukálni rákos sejtekben. Alternatív stratégiának tűnhet például közvetlenül a tumoros sejtekben található mitokondriumok károsítása, ugyanis így lehetőség van direkt módon aktiválni az apoptózis intrinsic útját. Emellett leírták azt is, hogy az ER stressz, illetve a túlműködött autofágia is képes p53-független módon programozott sejthalált indukálni tumoros sejtekben [42-45].

3.2. A malignus transzformáció és az áttétképződés biológiai háttere

Miután megtörtént az egészséges sejtek tumoros transzformációja és kialakult a stabil proliferációs aktivitással rendelkező primer rákos sejtpopuláció, a további oxigén- és tápanyagellátás érdekében, a tumoros szövet képes vaszkularizációt indukálni mikrokörnyezetében, melynek következtében a tumort új vérerek kolonizálják. Az angiogenezis elsődleges inducere a tumorok belső részében jelentkező lokális hipoxia. A részleges oxigénhiány a tumorsejtekben számos szignalizációs utvat aktivál. A legfontosabb ezek közül a hipoxia indukált faktorok (pl. HIF1 α) aktivációja, melyek végső soron a vaszkuláris-endotheliális növekedési faktor (VEGF) lokális szekrécióját eredményezik. A tumorsejtek környezetében megemelkedett VEGF koncentráció hatására a sejtek képesek endothelsejteké differenciálódni, melynek eredményeként új vérerek képződnek, és ezek további oxigénnel és tápanyaggal látják el a tumoros szövetet [46].

Habár a tumor nekrozisának elkerülése szempontjából az új vérerek kialakítása létfontosságú, az angiogenezis képessége nemcsak a tumor további túlélését biztosítja, de lehetőséget nyújt az áttétek kialakulására is. Annak ellenére, hogy a rákos betegek túlélési esélyeit a metasztatizáció jelenléte drasztikusan csökkenti [29], az áttétképződés biológiája teljes részleteiben még nem ismert. Primer emlőtumorok és a belőlük kialakult agyi metasztatikus szövetek teljes genomi DNS szekvenciájának vizsgálata során kiderült, hogy a primer tumorokban megtalálható és a metasztatikus szövetekben detektált mutációk között nincs

jelentős eltérés [47]. Ráadásul, a metasztázisokban feldúsult mutációk a primer tumorban mindössze egy jól definiált sejtpopulációban voltak megfigyelhetők. Ez azt bizonyítja, hogy a primer tumor folyamatos evolúcióra képes, amely során megjelennek metasztázisra képes szubpopulációk, melyek végül képesek elhagyni eredeti környezetüket. Hasnyálmirigy tumorokból származó metasztázisok DNS szekvencia vizsgálata szintén alátámasztotta, hogy mindössze néhány újabb „driver” mutáció kialakulása elegendő lehet ahhoz, hogy megjelenjenek invazív sejtek is a primer tumorban. Ezen felül úgy gondolják, hogy léteznek olyan mutációk is, amelyek lehetővé teszik a tumorsejtek számára, hogy célszerv-specifikusan tudjanak a távoli szervben, vagy szövetben kolonizálni [48, 49]. Ezek a vizsgálatok arra utalnak, hogy miután egy korlátlanul proliferáló sejt transzformálódott, elég néhány további, specifikus mutáció „beszerzése” ahhoz, hogy a tumor képes legyen áttéteket kialakítani a test további részein. Ezekből az eredményekből az is feltételezhető, hogy egy kialakult tumor invazívvá válása nem igényel különösebben hosszú időt. Úgy tűnik, hogy egy invazív képességeket nyert tumor, kevesebb, mint két év alatt képes metasztázisokat kialakítani, míg egy benignus elváltozás malignus transzformációja ennél sokkal több időt vesz igénybe [50].

A tumoros szövet terjedéséhez a genomikai változások mellett nagyban hozzájárul a rákos sejtek epitheliális-mesenchymális tranzíciója (EMT) is. Az epitheliális-mesenchymális tranzíció során olyan molekuláris változások történnek a sejtekben, aminek eredményeként a polarizált, epitheliális típusú sejtek új, mesenchymális sejtekre jellemző tulajdonságokat nyernek. Ilyen tulajdonság például a sejtek megemelkedett migrációs képessége, ami alapvetően meghatározza a tumorsejtek invazív tulajdonságait. Epitheliális-mesenchymális tranzíció során az E-cadherin csökkent kifejeződése miatt gyengülnek a sejtek közti adhézios kapcsolatok és a sejtek citoszkeletális rendszere nagymértékben átszerveződik. Habár a szöveti környezettől függően a molekuláris biológiai részletekben lehet különbség, alapvetően a TWIST1/2, SNAIL1/2, ZEB1/2 és a FOXC2 transzkripciós faktorok szerepe a legfontosabb az EMT tranzíciós programjában. Az epitheliális-mesenchymális tranzíción átesett sejtek nem csak megemelkedett migrációs képességgel rendelkeznek, de nagyobb ellenállást mutatnak az apoptózissal, valamint a kemoterápiás hatóanyagokkal szemben is [51-53]. Az EMT program dinamikusan tud változni a tumor metasztázisok kialakulása során: míg az epitheliális-mesenchymális tranzíció elősegíti a tumorsejtek invázióját, intra- valamint extravazációját,

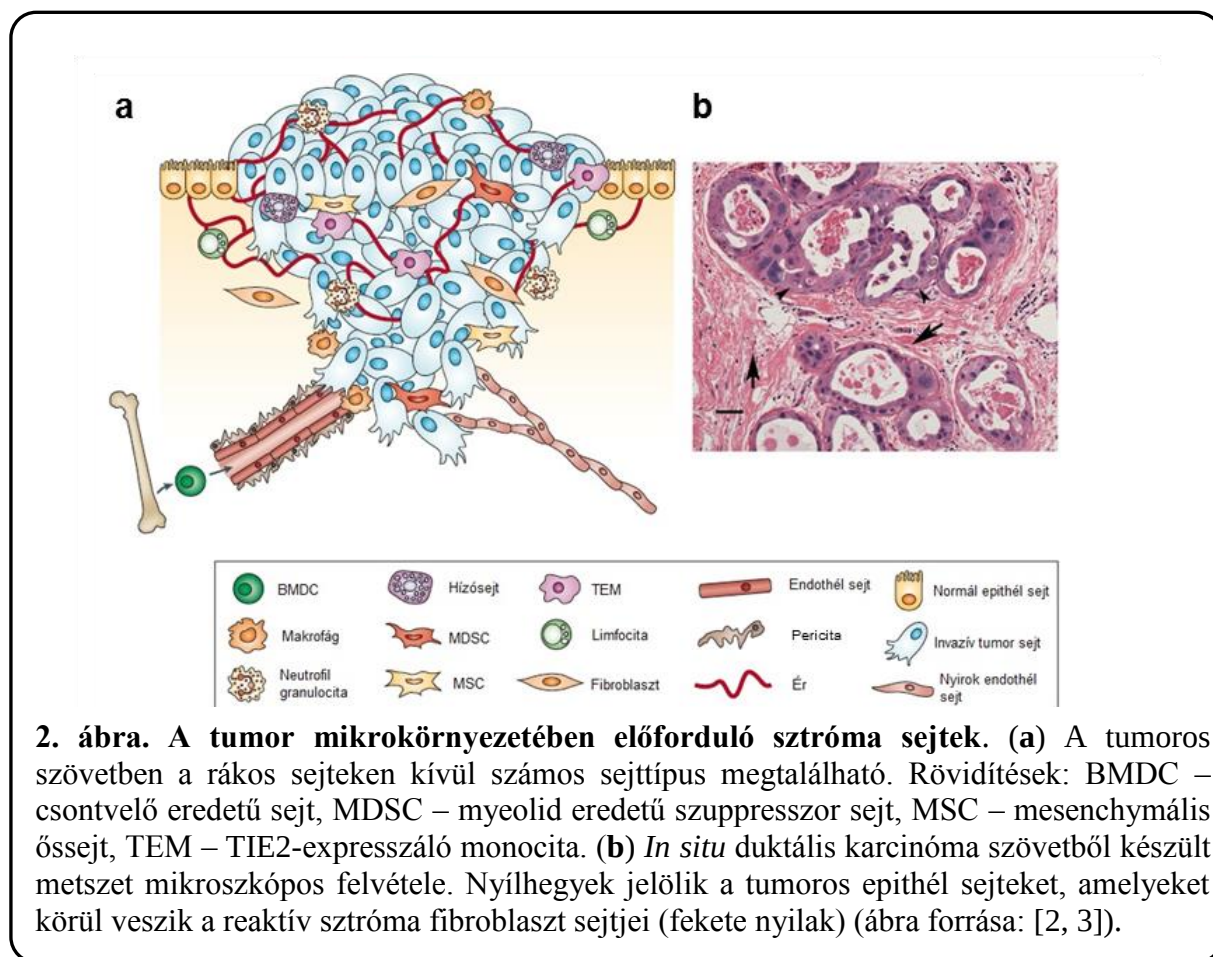
addig a program reverz változata – a mesenchymális-epitheliális tranzíció – nélkülözhetetlen szerepet játszik a tumorsejtek távoli szövetekben történő kolonizációja során [54, 55].

3.3. A tumor sztróma szerepe és a fibroblasztok aktiválódási mechanizmusai

A tumoros szövetet nem csak a rákos sejtek heterogén populációja építi fel, hanem különféle – a környező szövetekből származó – nem tumoros, úgynevezett sztróma sejteket is tartalmaz. A tumor mikrokörnyezetébe toborzott nem-tumoros sejtek támogató miliőt alakítanak ki a rákos sejtek számára, ami így végső soron számos előnyhöz juttatja a tumort. Ma már tudjuk, hogy igen intenzív kommunikáció zajlik a rákos sejtek és a környező szövetekből toborzott sztróma sejtek között. Ez a kommunikáció számtalan oldékony faktor, exoszóma és kis szabályozó RNS összehangolt működésén alapszik és befolyásolja a tumor alapvető működését. A sztróma sejtek hatására könnyebben megindul az angiogenezis a tumorban, de a tumor-asszociált reaktív sztróma serkenti a rákos sejtek proliferációját, és a metasztázisok kialakításában is nélkülözhetetlen. A tumor-támogató sztróma sejtek sokféle szolubilis kemokin és citokin szekrécióján keresztül képesek elősegíteni például a tumorsejtek migrációs képességét. Ráadásul, a tumor mikrokörnyezetében található sztróma sejtek meghatározó szerepet játszanak a terápia-rezisztencia kialakításában is [56].

A tumoros szövetben található sztróma összetétele rendkívül változatos lehet. Általánosan igaz, hogy eltérő anatómiai lokalizációjuk miatt a különféle típusú tumorok között alapvető különbségeket állapíthatunk meg a sztróma összetételét és eredetét tekintve. Számos célszövetet és sejttípust azonosítottak már, amelyeket a rákos sejtek képesek aktívan mikrokörnyezetükbe toborozni. Úgy tűnik, hogy a mesenchymális őssejteket tartalmazó csontvelő, az endothél és pericita sejtek, számos típusú immunsejt, adipociták, valamint a szöveti fibroblasztok is áldozatul eshetnek a tumorsejtek aktiváló hatásának [57, 58] **(2. ábra)**. A tumorok mikrokörnyezetében lejátszódó sztróma-toborzó folyamatok nagy hasonlóságot mutatnak a különböző szöveti sérülések során lejátszódó regenerációs folyamatokkal: sokszor úgy is említik a tumoros szövetet, mint egy „seb, ami nem gyógyul meg” [59]. Mind a szöveti regeneráció és a sztróma kialakítása során megfigyelhető a nyugvó, szöveti fibroblasztok aktivációja, immunsejt infiltráció, valamint intenzív extracelluláris mátrix átrendezés. A sztróma sejtek toborzását a tumorsejtek különböző szolubilis faktorok szekréciójával érik el.

Ezek a faktorok parakrin módon képesek befolyásolni a környező egészséges szövet működését. Ilyen lehet többek között a fibroblaszt növekedési faktor (FGF), a VEGF család tagjai, a vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF), az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) számos ligandja, interleukinok, kolónia-stimuláló faktorok, illetve a sokrétű biológiai hatással rendelkező transzformáló növekedési faktor- β (TGF- β) is [60].



A tumor mikrokörnyezetében leggyakrabban megfigyelt nem-tumoros sejtek a tumor-asszociált fibroblasztok. Egészséges szövetekben ezek a sejtek nyugvó állapotban vannak jelen, azonban ha valamilyen szöveti stressz – például vágási seb vagy égés – történik, a környező sejtekből felszabaduló jelmolekulák hatására a nyugvó fibroblasztok képesek tranzienst módon aktiválódni. A fibroblasztok aktivációját számos különféle hatás, de jellemzően a TGF- β által indukált szignalizáció váltja ki [61]. A szöveti fibroblasztok aktivációja során jelentős változások történnek a sejtek génexpressziós mintázatában is. Az aktivált fibroblasztok, vagy másnéven myofibroblasztok, emelkedett mennyiségű alfa simaizom aktint (α SMA) fejeznek ki,

aminek köszönhetően ezek a sejtek kontrakcióra képesek. Az aktivált fibroblasztok kontraktilis képességük mellett emelkedett migrációs aktivitással is rendelkeznek, mátrix metalloproteáz (MMP) enzimek szekrécióján keresztül pedig aktív szerepet játszanak a sérült szövet extracelluláris összetevőinek újrendezésében. A sérülés helyén, az aktivált fibroblasztok kolónia stimuláló faktorok szekrécióján keresztül számos immunsejt infiltrációját is elősegítik, így ezeknek a sejteknek a gyulladásos folyamatok kialakulásában is szerepük van. Fontos azonban megjegyezni, hogy ezek a változások tranziens természetűek, ami azt jelenti, hogy amint lecseng az aktivált állapotot kiváltó szignál, illetve helyreáll a normális szöveti homeosztázis, a fibroblasztok is elvesztik emelkedett migrációs képességüket. Amennyiben a transzformált állapot mégis megmarad, fibrózis alakulhat ki, ami egyes esetekben súlyos patológiás következményekkel járhat [61].

Nagyon hasonló folyamatok játszódnak le akkor is, amikor a tumorsejtek indukálják a környező fibroblasztok aktivációját: a tumorsejtek leggyakrabban TGF- β és PDGF szekrécióján keresztül képesek aktiválódásra készíteni a környező nyugvó fibroblasztokat. Emellett arra is van lehetőség, hogy a rákos sejtek közvetlenül a csontvelő progenitor sejtjeiből indukálják a tumor-asszociált fibroblasztok differenciálódását [62]. A tumorok mikrokörnyezetébe toborzott fibroblasztok számos hisztológiai markerrel rendelkeznek, melyek részben átfednek az aktivált fibroblasztokra is jellemző fehérjékkel. Tumor-asszociált fibroblasztokra jellemző például az α SMA, a sztrómasejt eredetű faktor 1 (SDF-1 vagy CXCL12), a fibroblaszt aktiváló protein 1 α (FAP1 α), a vimentin és fibronektin, valamint a fibroblaszt specifikus protein 1 (FSP-1) emelkedett kifejeződése [62-65]. A legmagasabb mértékű fibroblaszt infiltráció az emlő, a prosztata, a tüdő, a vastagbél és a hasnyálmirigy eredetű karcinómákban detektálható. Továbbá azt is kimutatták, hogy azoknak a betegeknek, akiknek tumoros szöveteiben emelkedett mennyiségben myofibroblaszt-specifikus markerek figyelhetők meg, jellemzően rosszabb a betegségük kimenetele is [66-68].

A sztrómában megtalálható tumor-asszociált fibroblasztok a tumor fejlődése során együtt evolválódnak a rákos sejtekkel. Így nem meglepő az sem, hogy a különböző anatómiai területekről származó tumorokból igen eltérő fibroblaszt populációkat lehet izolálni, melyeknek génexpressziós mintázataiban is jelentős különbségek figyelhetők meg [69]. Azonban nem csupán egyes tumorok között, hanem egy adott tumoron belül is találhatunk heterogén fibroblaszt populációkat [70-72]. Valószínű, hogy ennek a heterogenitásnak elsősorban az egyes

tumor-asszociált fibroblaszt populációk eltérő szöveti eredete lehet az oka, de az sem kizárt, hogy a tumorba toborzott fibroblasztok a tumorszövet eltérő alkotóelemeivel érintkezve eltérő differenciálódási útvonalakon mennek keresztül [73]. Az eltérő eredetű tumor-asszociált fibroblasztok között néhány jelátviteli útvonal aktiválását tekintve megfigyelhető számos hasonlóság is. A TGF- β által indukált jelátviteli útvonal során aktiválódott extracelluláris mátrix fehérjék megemelkedett kifejeződése, illetve a FAK és ERK kinázok által szabályozott – a sebgyógyulás során is megfigyelhető jelátviteli folyamatok – univerzális szignalizációs útvonalaknak tűnnek a tumor-asszociált fibroblasztokban [74].

A tumorsejtekből felszabaduló faktorok széles skálájáról bizonyosodott már be, hogy képesek nyugvó fibroblasztokat aktiválni, vagy a mesenchymális őssejteket fibroblaszt irányú differenciálódásra készíteni. A legfontosabb ezek közül a már említett TGF- β és a PDGF, de a Shh (Sonic hedgehog), a Wnt7a, az interleukin-1 β , a leukémia gátló faktor (LIF) és exoszómák is képesek indukálni a tumor-asszociált fibroblasztok képződését [75-79]. A parakrin módon ható TGF- β hatására a fibroblaszt sejtekben heterotetramerizálódik és autofoszforylációt szenved a TGF- β receptor, és így képes foszforylálni a Smad2, Smad3 fehérjéket. A foszforyláció következtében aktiválódott Smad2 és Smad3 fehérjék komplexet képeznek a Smad4 fehérjével és transzlokálódnak a sejtmagba, ahol számos DNS-kötő doménnel rendelkező transzkripciós faktorról, ko-represszorról, ko-aktivátorral és kromatin módosító enzimekkel létesítenek kölcsönhatást, így szabályozva számtalan, változatos funkciójú gén kifejeződését. TGF- β stimulus hatására jónéhány proliferációt serkentő gén kifejeződése is megemelkedik (pl. a PDGF-et kódoló gén), de az angiogenezist serkentő VEGF, valamint a metasztázisok kialakulásában szerepet játszó MMP-2 és MMP-9 extracelluláris proteázok fokozott expressziója is megfigyelhető. Annak ellenére, hogy a TGF- β a fibroblaszt sejtekre elsősorban aktiváló hatást gyakorol, azt is fontos megemlíteni, hogy forrástól és célsejttől függően, akár tumor szuppresszálo hatást is kifejthet. A p21 ciklin-dependens kináz inhibitor expressziójának aktiválásán keresztül a TGF- β szignalizáció számos esetben eredményezheti a sejtciklus előrehaladásának felfüggesztését, de a pro-apoptotikus Bik, Bim és Fas transzkripciójának serkentése révén apoptotikus sejthalált is kiválthat [80]. A tumorban a fibroblasztokra nem csak a rákos sejtekből származó TGF- β gyakorolhat hatást. Úgy tűnik, hogy TGF- β szekrécióra az aktivált fibroblasztok és képesek, így azok autokrin módon fenntarthatják aktivált állapotukat [81].

Jól ismert tény, hogy a tumoros sejtek metabolizmusa számos ponton eltér az egészséges sejtekben folyó anyagcserétől, hiszen a tumoros sejtekben elsősorban az anaerob glikolízis dominál (Warburg effektus). A tumor mikrokörnyezetében található tumor-asszociált fibroblasztokban viszont gyakran az aerob glikolízis szolgál elsődleges energianyerő útvonalként (reverz Warburg effektus) [82]. Tömegspektrometriás vizsgálatok arra is rávilágítottak, hogy ezekben a sztróma fibroblaszt sejtekben az autofágia, katabolikus folyamatai révén, hozzájárul az ATP szintéziséhez, ami végül a tumor sejtek támogatására fordítódik [83]. Habár még nagyon kevés információ áll rendelkezésre a tumor-asszociált fibroblasztok metabolikus tulajdonságairól, úgy tűnik, hogy a tumorsejtek képesek az alapvető energianyerő folyamatokat is befolyásolni ezekben a sejtekben.

A tumor-asszociált fibroblasztokban számos esetben tapasztalható a PTEN, a p21, a p53, illetve más létfontosságú tumorsuppresszorok funkciójának csökkenése, vagy elvesztése [84, 85]. Habár ez a tulajdonság a tumoros sejtekben általánosan megfigyelhető, a tumor-asszociált fibroblasztokban ezeket a változásokat elsősorban transzkripciós csendesítések eredményezik, és főként epigenetikai, csak ritka esetben genetikai változások állnak a háttérben [86, 87]. Ebből adódóan a legtöbb – a tumorok által indukált változás – reverzibilis a fibroblasztokban, és eltűnik abban az esetben, ha a fibroblasztok új környezetbe kerülnek, ahol nincsenek jelen a tumorsejtek által termelt faktorok [61]. Habár a fibroblaszt aktiváció epigenetikai hátterét többször vizsgálták már, az eredmények sok esetben nem egyértelműek, vagy ellentmondóak. A DNS globális hypometilációja figyelhető meg például tumor-asszociált fibroblasztokban, viszont pontosan nem ismert, hogy ez milyen szerepet játszik a fibroblaszt – tumor-asszociált fibroblaszt tranzíció során [88-91]. Leírtak már megváltozott hiszton poszttranszlációs módosításokat is aktivált fibroblasztokban: emelkedett trimetilációt tapasztaltak patkányokból származó máj sztellát sejt eredetű myofibroblasztokban az α SMA és a TGF- β gének promóterét borító H3 hiszton K4-es lizinjén [92]. Ez az eredmény nem meglepő, hiszen ezekről a génekről fokozott transzkripció történik aktivált fibroblasztokban, és a H3K4me³ elsősorban transzkripcionálisan aktív kromatin régiókat jelöl ki. Arra is van bizonyíték, hogy a fehérjék acetilációs szintje is szerepet játszik a fibroblasztok aktivációja során, ugyanis bőr és tüdő eredetű fibroblasztokban kimutatták, hogy a TGF- β -függő fibroblaszt transzformációhoz szükséges a sejtekben található hiszton deacetiláz enzimek aktivitása [93]. Az epigenetikai vizsgálatok eredményeinek sokfélesége szintén alátámasztja, hogy a tumorban megfigyelhető

fibroblasztok heterogenitása igen nagymértékű, ezért érdemes lenne további alosztályok bevezetését alkalmazni ezeknek a sejteknek a mélyreható vizsgálatai során.

3.4. A tumor-asszociált fibroblasztok tumor-támogató hatásai

A tumor-asszociált fibroblasztok számos ponton képesek elősegíteni a tumorok malignus átalakulását. A tumorokban megtalálható fibroblasztok támogatják a karcinóma sejtek proliferációját, gátolják a tumoros sejtek apoptózisát, megkönnyítik a rákos sejtek invázióját a környező szövetekbe, elősegítik a metasztatikus folyamatokat, befolyásolják a tumorsejtek metabolizmusát, angiogenezist indukálnak, stimulálják a tumorban található immunsejteket, elősegítik a terápia rezisztencia kialakulását, valamint a tumoros szövet extracelluláris mátrixát is képesek átalakítani. A tumor-asszociált fibroblasztok ezeket a hatásokat szekretált, oldékony faktorok, citokinek és exoszómák felszabadításán keresztül, valamint direkt sejt-sejt interakciókkal is képesek elérni. A tumor-asszociált fibroblasztok CXC-kemokin ligand 8 (CXCL8), interleukin-4 valamint interleukin-6 szekrécióján keresztül képesek elősegíteni a tumorokban található makrofágok tumor támogató, M2 irányú polarizációját [94]. Kimutatták, hogy a tumor-asszociált fibroblasztok VEGF, FGF2 és SDF-1 termelésével elősegítik a rákos szövetekben az új véredények képződését [81, 95-99], valamint Tenascin-C (TN-C) és hepatocita növekedési faktor (HGF) szekréciójával elősegítik számos karcinóma sejt invázióját [100, 101]. Az exoszómák szerepéről a daganatos megbetegedések során egyre több információ áll rendelkezésünkre [102]. Ezek jellemzően 20-100 nm átmérőjű, membránnal burkolt extracelluláris vezikulák, melyek számos szabályozó faktort, fehérjét, mikro RNS-eket, valamint DNS-t is tartalmazhatnak. Kimutatták, hogy a tumor-asszociált fibroblasztok is képesek exoszómák felszabadítására. A fibroblasztokból származó Cd81⁺ exoszómák például Wnt11 felszabadulást indukálnak emlőtumor sejtekben. Ez végeredményben a Wnt szignalizáció aktiválódásához vezet, melynek hatására ezek a tumoros sejtek további migrációs és metasztatikus képességeket nyernek [103]. Kimutatták, hogy a terápia-rezisztencia kialakulásában is szerepet játszanak a tumor-asszociált fibroblaszt eredetű exoszómák. Abban az esetben, ha a fibroblaszt sejteket a kemoterápia során is gyakran alkalmazott gemcitabinnal kezelték, azok több exoszómát szabadítottak fel, melyek tovább fokozták a tumoros sejtek proliferációját [104]. Amennyiben a tumorsejteket olyan médiumban tenyésztették, mely nagy

koncentrációban tartalmazott tumor-asszociált fibroblaszt eredetű citokineket és oldékony faktorokat, a tumorsejtekben megfigyelhető volt a TGF- β -Smad2-Smad3, illetve a CXCR4 jelátviteli útvonalak aktiválódása, mely a tumorsejtek epitheliális-mesenchymális tranzícióját eredményezte. A fibroblaszt sejtek által kiváltott EMT ezekben a tumorsejtekben is emelkedett motilitást, migrációs és metasztatikus aktivitást eredményezett [71, 105, 106]. A kis molekulású extracelluláris jelmolekulák mellett a tumor-asszociált fibroblasztok számos proteázt is termelnek, melyek segítségével aktívan képesek átrendezni a tumor szövet extracelluláris alkotóelemeit. A fibroblaszt kultúrák tápfolyadékában elsősorban MMP-2 és MMP-9 aktivitás mutatható ki. Ezek az enzimek azáltal segítik a metasztázisok kialakulását, hogy proteáz aktivitásuk révén átrendezik a szöveti struktúrákat, mintegy „szabad utat” biztosítva így a migráló tumorsejteknek, melyek ez által könnyebben jutnak el a keringésbe [107].

3.5. A rákos megbetegedések terápiás lehetőségei

Jelenleg a klinikai gyakorlatban a rákos betegek kezelése során a leggyakrabban alkalmazott és a leginkább eredményre vezető megközelítés, a tumor sebészi úton történő eltávolítása. Azonban, az összes tumoros sejt elpusztítása érdekében a legtöbb esetben szükséges a műtét előtt, vagy azt követően kemoterápiát vagy sugárterápiát is alkalmazni. Ezen kívül az integratív orvoslás is segíthet, különböző alternatív megoldásokkal (pl. jóga, meditáció) a betegség legyőzésében, de létezik olyan eset is, amikor már csupán életminőséget javító, palliatív medicinát alkalmaznak. A kemoterápiás hatóanyagok fejlesztésénél az egyik legfontosabb szempont, hogy a hatóanyag képes legyen differenciálni az egészséges, illetve a tumoros sejtek között valamilyen biológiai tulajdonság alapján. Mivel a tumoros sejtek magas proliferációs aktivitásuk fenntartásához nagy mennyiségben szintetizálnak nukleinsavakat, a DNS anyagcseréjének célzása jó terápiás stratégiának bizonyul, így számos, jelenleg is használt kemoterápiás hatóanyag valamilyen módon interferál a sejtek DNS molekuláival. A platina tartalmú kemoterápiás szerek (pl. Ciszplatin, Karboplatin) például komplexet formálnak a DNS molekulával, ami gátolja a replikációban résztvevő enzimek működését. A topoizomeráz I és II enzimek végzik a DNS szerkezetének megnyitását a transzkripció és a replikáció fehérjéi számára, és gátlószerek (pl. Topotecan, Irinotecan, Etopozid, Doxorubicin) szintén

kemoterápiás célokra használt hatóanyagok. A nukleotid szintézis gátlószereinek (pl. 5-fluorouracil, Methotrexát) alkalmazása szintén előnyös, hiszen a replikációhoz szükséges nukleotidok bioszintézise esszenciális a magas proliferációs aktivitással rendelkező sejtek számára. Ezek mellett a mikrotubulusok dinamikájának gátlása is eredményezhet citosztatikus hatást, így az ilyen hatású vegyületek (pl. Vincristine, Vinblastine, Paclitaxel, Docetaxel) szintén gyakran alkalmazott kemoterápiás hatóanyagok. A tradicionális kemoterápiás hatóanyagok mellett más típusú vegyületek is ígéretesnek tűnnek, mint például a hiszton-deacetiláz inhibitorok, melyek közül a SAHA az Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerfelügyeleti Hatóság (FDA) által már klinikai alkalmazásra is engedélyt kapott [108].

A tradicionális kemoterápiás hatóanyagok mellett ma már elérhetőek újgenerációs gyógyszerek is, melyek célzott terápiás lehetőségeket biztosítanak. Ezek jellemzően kis molekulású kináz inhibitorok, vagy specifikus epitópokat megkötő monoklonális antitestek. Egyik első képviselőjük a kis molekulású kináz inhibitor Imatinib volt, ami specifikusan gátolta a myeloid leukémia sejtekben kialakult Philadelphia kromoszóma következtében expresszáldó, konstitutív kináz aktivitással rendelkező Bcr-Abl kiméra fehérjét [109]. Egy másik, szintén a legelsőként alkalmazott humanizált antitest-alapú terápia során az emlőtumorsejt 25%-ában túlermelődő HER2 fehérjét célozták. A HER (human epidermal growth factor) receptorok családjába tartozik az EGFR (HER1), a HER2, 3 és 4 sejtfelszíni receptorok. A receptorcsalád tagjai közül a HER2 csonkolt formában fejeződik ki a sejtekben, ezért nem képes ligandkötésre, viszont rendelkezik intracelluláris kináz aktivitással. Ezzel szemben a család többi tagjai, így a HER3 is, meg tudják kötni az extracelluláris növekedési faktorokat, viszont nem rendelkeznek saját enzimaktivitással. Abban az esetben, ha a HER3 megköti ligandját, egy heterodimer komplex alakul ki a HER2 és a HER3 között. A heterodimer kialakulásának következtében a HER2 foszforilálja önmagát, majd a HER3 fehérjét is. A foszforilációs események aktiválják a PI3-K függő jelutatót, ami végül az AKT sejtmagi transzlokációját eredményezi. A receptor aktiválódása miatt bekövetkező sejtmagi események elsősorban proliferációt és túlélést serkentő gének kifejeződését serkentik, így a növekedési faktorok megkötése a tumorsejt fokozott osztódását eredményezi. A trastuzumab nevű monoklonális antitest képes bekötni a HER2 fehérje juxtamembrán doménjébe, ezért a HER3 ligandkötése esetén a két fehérje dimerizációja gátolt, és így a teljes mitogén szignalizáció blokkolódik. A klinikai vizsgálatok azt mutatták, hogy az HER2-specifikus antitest terápia

legjobb hatásfokát Paclitaxellel vagy Docetaxellel történő kombinációban érte el, azonban azt is megállapították, hogy a legtöbb betegben a terápia kezdetét követő egy éven belül rezisztencia alakult ki az alkalmazott hatóanyagokkal szemben [110].

Sajnos a kemoterápiás hatóanyagok ismételt adagolása az esetek egy részében terápia rezisztencia kialakulásához vezethet, ami akár a teljes kemoterápiás kezelés hatástalanságát eredményezheti. Mivel a terápia rezisztencia hátterében elsősorban a széles szubsztrátspecifitással rendelkező ABC transzporterek emelkedett efflux aktivitásai állnak, gyakran fordul elő multidrog rezisztencia is, ami azt jelenti, hogy a tumor nem csupán egy adott, de számos eltérő típusú kemoterápiás szerrel szemben is ellenálló. Több eltérő molekuláris biológiai mechanizmus állhat a multidrog rezisztencia hátterében. Sok esetben a széles szubsztrátspecifitású P-glikoprotein (Pgp) emelkedett expressziója okozza a tumorsejtek multidrog rezisztenciáját, de más fehérjék, illetve transzmembrán pumpák működése is eredményezhet emelkedett ellenálló képességet [111]. Úgy tűnik, hogy a drogrezisztencia kialakulásában epigenetikai folyamatok is szerepet játszanak, ugyanis a kromatinállomány poszttranszlációs módosításai alapvető szerepet töltenek be az egyes gének – így az ABC transzporterek génjeinek – transzkripció szabályozásában [112]. Léteznek hatóanyagok, melyek képesek specifikusan az ABC transzporterek aktivitását gátolni, de mivel ezek a transzporterfehérjék fontos szerepet kapnak számos nélkülözhetetlen élettani folyamat során is, az ilyen inhibitorok alkalmazása súlyos mellékhatásokkal járhat, ezért sosem kerültek klinikai gyakorlatba [113].

A tumoros megbetegedések kezelése során gyakran alkalmazott eljárás a sugárterápia is. A sugárterápia folyamán magas energiájú gamma- vagy röntgensugarakat (fotonok), esetleg ionizált atomokat (pl. proton) juttatnak a tumoros szövetbe, ami visszafordíthatatlan károsodásokat okoz a rákos sejtekben [114]. A sejtekbe jutott fotonok vagy ionok képesek közvetlenül is kárt okozni a DNS szerkezetében, de előidézik különböző reaktív gyökök képződését is, melyek tovább károsítják a tumorsejtek DNS állományát. A gamma- és röntgensugarak által kiváltott DNS károsodások elsősorban bázismódosulások vagy egyszálú DNS törések lehetnek, melyeket a sejtek javítómechanizmusai hatékonyan helyreállítanak. Jóval kisebb arányban fordulnak elő kettős szálú DNS törések, ugyanakkor mivel ezek javítása nehezebb a sejtek számára, ha nagy mennyiségben vannak jelen, a sejtek apoptotikus halálát eredményezhetik [115]. Azonban akárcsak a kemoterápia, a sugárterápia sem tumor specifikus

hatású, így nem csak a tumorsejtek, hanem a sugárnyaláb által érintett egészséges szövetek és szervek is károsodhatnak a kezelés során. Jelenleg az egészséges szövetek károsodását úgy próbálják csökkenteni, hogy a tumoros szövetet több szögből sugarazzák be és a tumor ezeknek a sugaraknak a keresztmetszetébe esik. Ilyen módon a rákos szövetet magasabb dózisú károsító hatás éri, míg az egészséges szövetek csak kisebb dózisban részesülnek [114]. Az egészséges szövetek károsodását csökkentheti számos tumorsejt szelektív, radioszenzitizáló vegyület használata. A radioszenzitizáló vegyületek a tumoros sejteket érzékenyebbé teszik a sugárkezeléssel szemben, így kisebb dózis alkalmazásával is elérhető a kívánt tumorsejt károsító hatás, míg az egészséges szövetek sérülése csökkenhet [116].

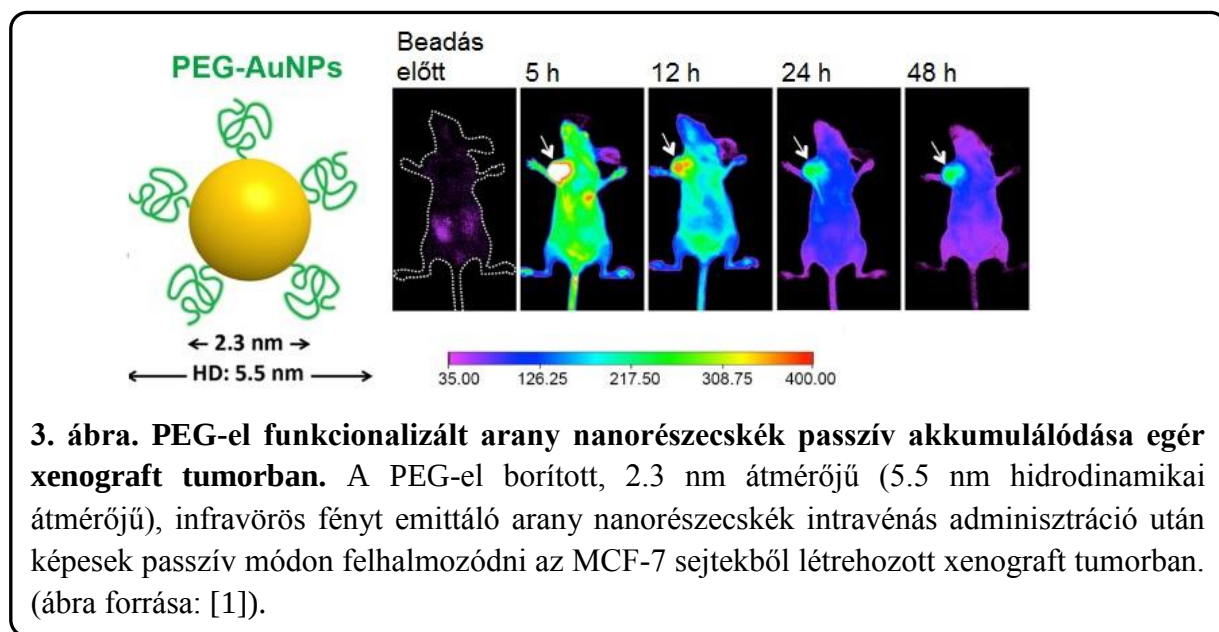
3.6. A nanomedicina lehetőségei a daganatos megbetegedések terápiájában

Annak ellenére, hogy az elmúlt években jelentős mennyiségű információ halmozódott fel a rákos megbetegedések hátterében álló különböző molekuláris biológiai folyamatokról, a tumoros elváltozások felismerése, kezelése, illetve a betegség teljes gyógyítása még mindig nagy kihívás az orvostudomány számára. Jóllehet, a mai terápiás eljárások igen hatékonyak, nem elhanyagolandó, hogy ennek feltétele a betegség korai diagnózisa. Ráadásul nem szabad megfeledkezni arról sem, hogy a tradicionális kemoterápia során alkalmazott citotoxikus vegyületek nem rendelkeznek célzott, tumor sejt specifikus hatással, ezért sokszor visszafordíthatatlan mértékű mellékhatásokat okoznak az egészséges, osztódó sejtek károsításával. A nanotechnológia innovatív eredményeinek köszönhetően új stratégiák alakultak ki a rákos megbetegedések terápiáját célzó fejlesztések területén is. A nanotechnológia a nanométeres mérettartományba eső anyagok szintézisével, fizikai-kémiai jellemzésével, illetve alkalmazásával foglalkozó ága az anyagtudományoknak. Mivel az anyagok fizikai-kémiai jellemzői és biológiai rendszerekkel történő kölcsönhatásai jelentősen megváltoznak, ha méretük az 1-től 100 nm-ig terjedő tartományba esik, a „nano” méretű részecskék használata hatalmas potenciált jelenthet az orvostudomány számára is [117, 118]. Számtalan „nano” méretű anyagot teszteltek már humán betegségek *in vitro* és *in vivo* modelljeiben. Jól jelzi a nanobiotechnológiai kutatások eredményességét, hogy az Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerfelügyeleti Hatóság (FDA) már jelentős számú, nanométeres tartományba eső gyógyszerkészítmény klinikai alkalmazását jóváhagyta [119].

A nanorészecskék számos egyedi tulajdonsággal rendelkeznek, melyek ígéretes terápiás eszközökké teszik őket. Legfontosabb ezek közül a méretükhöz viszonyított hatalmas relatív felszínük és az ebből következő nagy felület:térfogat arányuk. Mivel a nanorészecskék felszíne a részecske kémiai tulajdonságától függően változtatható, lehetőség van arra, hogy befolyásoljuk különböző funkcionizáló és célzó molekulák kötésével a nanorészecskék biológiai hatásait [120]. Ilyen módon a nanorészecskék már ismert és sikeresen alkalmazott kemoterápiás gyógyszer-molekulák hordozóivá is válhatnak. Ráadásul, a felületi módosításokon kívül, az üreges szerkezetű részecskék belső pórusaiba különböző típusú gyógyszer-molekulákat lehet „nano kapszulázni” [121]. Nanorészecskék segítségével terápiás nukleinsavak célba juttatása is megvalósítható. Ilyen esetekben kis RNS molekulákat kötnek a nanorészecskék felszínére, melyek célgénjeik csendesítésén keresztül képesek befolyásolni a rákos sejtek génexpressziós tulajdonságait [122]. A terápiás molekulák kötésén kívül azonban számos egyéb csoporttal is funkcionizálhatunk nano-hordozókat, melyek elősegíthetik a kemoterápiás hatóanyagok célzott irányítását a rákos sejtekbe, így megnövelve a tumorterápia specifikusságát. Gyakran alkalmazott „célzó” molekula például a folsav, mivel a folsavat felismerő receptor a tumorsejtek nagy részében túltermelődött. A folsav receptorok megemelkedett mennyisége miatt a rákos sejtek nagyobb affinitással veszik fel a folsavval konjugált nanorészecskéket, mint az egészséges sejtek, így a nanorészecskék felszínére kötött folsav emelkedett tumorsejt specifitást tesz lehetővé [123]. Abból a célból, hogy a nanorészecskéket specifikusan a rákos sejtekbe juttassák, gyakorta kötnek tumor specifikus antitesteket is a részecskék felszínére, de a nukleinsav természetű aptamerek is ígéretes célzó molekuláknak bizonyulnak [124].

Sok esetben a nanorészecskék „passzív célzó” hatása miatt felszínre kötött funkcionizáló csoport nélkül is elérhető a „nano” méretű anyagok tumor specifikus akkumulációja. A nanorészecskék passzív célba juttatását és egyedi farmakokinetikai viselkedését a tumoros szövetek emelkedett áteresztőképessége és növekedett retenciója teszi lehetővé (EPR hatás). Megfigyelték ugyanis, hogy a szervezetben keringő 5-100 nm mérettartományba eső részecskék pusztán fizikai tulajdonságaik miatt akkumulálódnak a tumorszövetben. Habár a passzív célba juttatás pontos sejtbiológiai mechanizmusa még nem ismert, valószínűnek tűnik, hogy a jelenség hátterében a daganat sajátos vaszkularizációja, a fenesztrált endothél és a bazális membrán egyedi rendelkezései állnak [125] **(3. ábra)**. A

tumorok egyedi anatómiája mellett azonban a nanorészecskék alapvető fizikai tulajdonságai is meghatározzák szervezetben belüli eloszlásukat és sorsukat. Az egyes szövetekben található makrofágok és fagocita sejtek például képesek hatékonyan kiszűrni a „nano” méretű partikulumokat, mielőtt azok eljuthatnának a tumorba. Szerencsére az immunrendszer „szűrő” hatása különböző felszíni molekulák alkalmazásával elkerülhető. A monoklonális antitestekhez hasonlóan, a nanorészecskék felszínét is lehet polietilén-glikollal (PEG) módosítani, melynek hatására csökkennek a részecskék adszorpciós tulajdonságai. Ennek következtében a vérben keringő antitestek kikötődése a nanorészecskék felszínére jelentősen gátolt, így a blokkolt opszonizáció következtében megnő a nanopartikulumok keringési rendszerben eltöltött ideje [126]. A nanorészecskék mérete szintén kulcsfontosságú lehet. Megfigyelték például, hogy a kisebb, 5 nm körüli nanorészecskék könnyen ürülnek a szervezetből a vesén keresztül, míg a nagyobb, 150 nm méretű partikulumok passzív módon akkumulálódnak a tüdőben. A keringésben eltöltött időt befolyásolja az alkalmazott nanorészecskék alakja is: míg a diszkosz, vagy pálcika alakú nanorészecskék jobban megtapadnak az endothél sejteken, ez a gömb formájú nanorészecskékénél kisebb mértékben történik meg, így tovább keringhetnek a véráramban [127].



Annak ellenére, hogy a részecskék fizikai tulajdonságai és a célba juttatását szolgáló funkcionizáló csoportok természete alapvetően befolyásolják a nanopartikulumok viselkedését az egyes biológiai rendszerekben, a nanorészecskék kémiai összetétele messze az egyik legmeghatározóbb tulajdonsága a „nano” méretű anyagoknak. A nanorészecskéket kémiai összetételük alapján a következőképpen csoportosíthatjuk: megkülönböztethetünk szén-alapú, fém, fém-oxid, polimer-alapú és kerámia részecskéket [128-132]. Léteznek bio-polimerből kialakított nanorészecskék is [133], ahol a részecske alapjául szolgáló vegyület megtalálható a sejteket felépítő makromolekulákban is. Leggyakrabban lipideket (liposzómák) vagy szénhidrátokat használnak ilyen részecskék előállítására [134, 135]. A legnagyobb sikereket a liposzómákba csomagolt hatóanyagokkal érték el, hiszen számos tradicionális kemoterápiás hatóanyag liposzómákba csomagolt formája már engedélyt kapott klinikai alkalmazásra is [136]. A liposzómák mellett azonban léteznek olyan nanorészecskék is, ahol lipidek helyett valamilyen vitamin molekula polimerje alkotja a partikulum fő komponensét. Ezek a nanoanyagok nemcsak a hordozott hatóanyag szempontjából előnyösek, de maga a hordozó is jótékony biológiai hatással rendelkezik [137]. További rendkívül ígéretes nanoanyagok a szilika-alapú nanorészecskék is, mivel szilika felhasználásával könnyen szintetizálhatóak olyan pórusos szerkezetű nanopartikulumok, amelyek üregei különleges felületet biztosítanak kis gyógyszer-molekulák szállítására [138]. Így a gyógyszer-molekulák eltérő oldékonyságából adódó farmakológiai problémák is könnyen kezelhetővé válnak. Ráadásul, a szilika nanorészecskék pórusai pH szenzitív „fedéllel” is elláthatóak. Ilyen esetben a nanorészecske csak akkor engedi ki a benne lévő hatóanyagot, ha alacsonyabb kémhatású közegbe kerül [139]. A pH függő hatóanyag kibocsájtás könnyen eredményezheti a citotoxikumok tumor specifikus felszabadulását, ugyanis a tumorok mikrokörnyezetében az egészséges szövetektől eltérő, enyhén savas pH figyelhető meg. A fém alapú nanorészecskék, kitűnő optikai tulajdonságaik miatt, szintén egyedülálló szerepet tölthetnek be a képalkotó diagnosztika területén, és könnyen módosítható felszínük miatt kiváló hordozók kemoterápiás gyógyszerek számára is, ezért ígéretesnek tűnnek a jövő „teranosztikai” (diagnózis + terápia) eszköztárában [125].

3.7. Fém nanorészecskék

Fémek felhasználásával leggyakrabban vas- és vas-oxid-, cink-, arany- illetve ezüstalapú nanorészecskéket készítenek orvosi felhasználásra. Az elmúlt időszakban a fém nanorészecskék elsősorban különleges felületi plazmon rezonancia tulajdonságaik, katalitikus aktivitásuk és hatóanyag hordozására alkalmas, könnyen módosítható felszínük miatt váltak népszerűvé. Ráadásul, a fémalapú nanorészecskék optikai jellemzőik és citotoxikus hatásuk miatt különösképpen alkalmas eszközöknek bizonyulnak a tumoros megbetegedések diagnózisában és terápiájában egyaránt [140, 141]. A fém nanorészecskéknek már jelenleg is számos felhasználási területe van az orvostudományban. A vas-alapú nanorészecskék kontrasztanyagokként működnek MRI képalkotás során [142], de egyedi mágneses tulajdonságaik miatt hipertermiás terápiában is alkalmazhatóak [143]. Ilyenkor a tumorban lokalizálódó nanopartikulumokat váltakozó irányú mágneses térnek teszik ki, a mágnesesség frekvenciájától függően a nanorészecskék mágneses dipólusai gyorsan váltakoznak és eközben a részecskék jelentős energiát veszítenek. Az energiavesztés fokozott hőtermeléssel jár, ami a tumoros szövet hőmérsékletét 40-45°C-ra képes melegíteni. Az így generált helyi hipertermia hatására a tumorszövet sejtjeiben apoptózis indukálódik, ami a tumorsejtek halálát eredményezi [125]. Más célokra használják fel az aranyból készült nanopartikulumokat: annak ellenére, hogy az arany nanorészecskék nem reaktívak és biológiailag közömbösnek bizonyultak, kiemelkedően erős radioszenzitizáló hatásuk miatt hatalmas lehetőségeket rejtenek a sugárkezelésen alapuló terápiák fejlesztésében [144, 145].

3.8. Ezüst nanorészecskék

Az ezüst nanorészecskék (AgNP) egyedi anti-mikrobiális hatásukkal kiemelkednek az egyéb típusú, fém-alapú nanopartikulumok közül. Jól jellemzett baktericid, anti-virális és gombaellenes aktivitásuk miatt az ezüst alapú nanopartikulumok a leggyakrabban használt nano természetű anyagok közé tartoznak [146]. Anti-mikrobiális hatásuknak köszönhetően gyakran alkalmazzák őket kórházi festékek aktív összetevőjeként, így a kezelt felületeket csíramentesen tarthatják [143, 147]. Ezüst nanorészecskéket hasznosítanak már kozmetikai és egyéb háztartási

termékekben is. Sőt, sebek kezelésére tervezett textilekben is használnak ezüst nanorészecskéket, mivel gyulladáscsökkentő hatásuk miatt elősegítik a seb gyógyulását és egyben hozzájárulnak a sérülés felszínén lévő kórokozók pusztulásához [148-150]. Ezüst nanorészecskékkal impregnált polimereket alkalmaznak már orvosi műszerek felszínén is, annak érdekében, hogy csökkentsék a kórházakban a különböző kórokozók által terjesztett fertőzéseket [151]. Gyakori alkalmazásuk miatt az ezüst nanorészecskék aktivitása mögött rejlő biológiai folyamatokat már jól jellemezték különböző mikrobiológiai modellekben [152], rákellenes aktivitásukat viszont csak az elmúlt néhány évben írták le először megbízhatóan.

Több *in vitro* tumorsejtes rendszerben is megfigyelték már, az ezüst nanorészecskék anti-proliferatív, sejtciklus gátló, illetve apoptózis indukáló tulajdonságait [153-159]. Ezüst nanorészecskékkal kezelt, egérből származó fibroszarkóma sejteken csökkent proliferációt, illetve a sejtekben megnagyobbodott méretű sejtmagokat figyeltek meg. További vizsgálatok során kiderült, hogy a jelenség mögött a kromoszómák szegregációjának gátlása állt [160]. A kezdeti biztató *in vitro* eredmények után az ezüst nanorészecskék rákellenes hatását több *in vivo* kísérleti rendszerben is megerősítették: patkányokban az ezüst nanorészecskék gátolták a Pliss limfoszarkóma sejtek proliferációját [161], míg egér Dalton aszcitesz tumor modellben kimutatták, hogy csökkent a tumor progresszió mértéke az ezüst nanorészecske kezelés hatására [162]. Az ezüst nanorészecskék felületi módosításának hatékonyságát is bizonyították már. A HIV vírusból származó, sejt-penetráló TAT peptiddel konjugált ezüst nanorészecskék tumor ellenes hatása jelentősen megemelkedett a „csupasz” nanorészecskéhez képest. A TAT-peptiddel konjugált nanorészecskék szignifikánsan erősebben csökkentették a multidrog rezisztens sejtekből előállított xenograft tumor növekedését egerekben, mint a TAT fehérjét nem kötött részecskék. Annak ellenére, hogy tumorok progressziójának azonos mértékű gátlását Doxorubicin kezeléssel is ki tudták váltani, ez a kemoterápiás hatóanyag jelentős károkat okozott az állatok többi szervében. Ezzel ellentétben, a TAT-módosított ezüst nanorészecskék szelektíven, csak a tumorokban indukáltak szöveti károsodást [163].

Az ezüst nanorészecskék citotoxikus hatásáért felelős sejten belüli folyamatokról viszonylag sok molekuláris részlet kiderült már. Több munka is azt támasztja alá, hogy az ezüst nanorészecskék apoptotikus hatása mögött egy „trójai faló” típusú mechanizmus áll. Ez azt jelenti, hogy a nanorészecskék intakt formában képesek bejutni a sejtekbe, ahol toxikus ezüst ionok szabadulnak fel a nanorészecskék felszínéről [164]. Az ezüst ionok reaktív oxigén formák

képződését segítik elő, melyek a sejt oxidatív homeosztázisának felborulása mellett különböző sejtorganelumokat károsítanak, így a keletkezett membrán rendellenességek, DNS törések és a citoszkeletális rendszer károsodása miatt, bekapcsolódik a sejt halálát eredményező apoptotikus program [165-168]. Habár az ezüst ionok által indukált oxidatív stressz-függő apoptózis jól magyarázza az ezüst nanorészecskék citotoxikus hatásai mögött álló mechanizmusokat, arra is létezik bizonyíték, hogy más folyamatok is szerepet játszanak a részecskék által kiváltott apoptotikus események aktiválásában. Mivel az ezüst nanorészecskék és a reaktív ezüst ionok eltérő fehérjéket és sejt organelumokat képesek károsítani, valószínű, hogy a nanorészecskék toxikus hatása nem pusztán az ezüst ionoknak tulajdonítható [169]. Fontos figyelembe venni azt is, hogy a fém nanorészecskék képesek passzíválódni. Ez azt jelenti, hogy egy adott mennyiségű ezüst ion keletkezése után visszamarad a nanorészecskéből egy mag, amelyről már több ion nem képes oldatba jutni [170]. Tehát a nanorészecskék csak egy adott mennyiségű reaktív ion képződését biztosítják, és ez erősen függhet a nanorészecskék méretétől és egyéb fizikai-kémiai tulajdonságaitól is. Ha kizárólag a nanorészecskék felszínéről felszabaduló reaktív ionok felelősek a megfigyelt anti-proliferatív hatásért, tervezésük során számításba kell venni a nanorészecskék "passzíválódási" képességét is.

Az ezüst nanorészecskék szintézisére több módszert is fejlesztettek már, azonban a leggyakoribb eljárások az ezüst-nitrát oldatában lévő ezüst ionok redukálásán alapulnak. A szintézis során alkalmazott redukáló szer fontos szerepet játszik az előállított nanorészecske biológiai hatásában, mivel jelen lesz a nanorészecske kolloid oldatában illetve a részecskék felszínén is. Leggyakrabban nátrium-borohidridet, keményítőt vagy citrátot alkalmaznak, de egyre többször használnak különböző biológiai forrásokból származó redukáló szereket is [171, 172]. Ilyen esetekben általában valamilyen gyógyászati szempontból fontos növény kivonatát alkalmazzák redukáló szerként, így az ezüst-nitrát redukciója egy heterogén, különböző biológiai aktív molekulákat tartalmazó redukáló keverékben történik. Gyakran a redukáló szer molekulái egyben stabilizálják is a keletkező nanorészecskét, megkötődnek annak felszínén és az ezüst nanorészecskék biológiai hatásait is jelentős mértékben módosíthatják. Ezek a felületet burkoló anyagok befolyásolják a részecske felületi töltéeloszlását is, ami pedig alapvetően meghatározza a nanorészecskék sejtekbe történő felvételét. Habár a felszínen lévő burkoló molekulák fontos szerepet játszanak a nanorészecskék felvételében, abban az esetben, amikor egy negatív felületi töltésű részecske egy biológiai médiumba – pl. vér vagy tápfolyadék

– kerül, a részecske felületén spontán módon adszorbeálódhatnak a közegben lévő fehérjék és így „protein koronát” alakítanak ki [173]. Legnagyobb mértékben albumin és egyéb szérumbeloldható fehérjék alkotják a nanorészecske körül képződő protein koronát, és ezek szerepet játszanak a nanorészecske biológiai felismerésében is [174]. Ez igen előnyös tulajdonság, mivel a szérumbeloldható fehérjék elfedik a fém részecske idegen természetű felszínét és ez gyakorlatilag akadálytalanná teszi a részecskék felvételét, ugyanakkor a kialakult protein korona eltakarhatja a hordozó felületére kötött funkcionális csoportokat is. Annak érdekében, hogy ezt elkerüljék, különböző hosszúságú linkereken keresztül kapcsolják a funkcionális csoportokat a hordozók felszínére. A hosszú linkerek segítségével a funkcionális csoport „túllóg” a hordozó felszínén kialakult protein koronán, így érvényesítheti biológiai hatását. Annak ellenére, hogy a részecske fizikai-kémiai tulajdonságai alapvetően meghatározzák biológiai hatásukat, nagyon kevés információ áll rendelkezésre arról, hogy a különböző redukáló szerek, különböző méretű nanorészecskék felszínén hogyan befolyásolják a protein korona kialakulását, és hogy ez milyen hatással van a nanorészecskék és a különböző típusú sejtek kölcsönhatására.

Habár sok ígéretes eredmény született az ezüst nanorészecskék felhasználási lehetőségeiről, alkalmazásukat jelentős mértékben korlátozzák szisztémás toxikus hatások, amelyeket ma még csak nagyon csekély mértékben ismerünk. Egy tanulmány során 28 napon keresztül, intravénásan adagoltak 20-100 nm méretű ezüst nanorészecskéket patkányokba, majd a kísérlet végén megfigyelték a kiváltott krónikus hatásokat. A kezelés hatására jelentősen megnövekedett a kísérleti állatok lépe, valamint a lépben található T illetve B sejtek száma. Az egyes szervek hisztopatológiai vizsgálata megerősítette az ezüst nanorészecskék felhalmozódását a lépben, májban valamint a nyirokcsomókban is. Az állatok májának károsodását alátámasztotta a vérben mért emelkedett ASAT valamint ALAT aktivitás is [175]. Egy másik vizsgálat során megállapították, hogy a *per os* bejuttatott ezüst nanorészecskék képesek a portális vénán keresztül az emésztőtraktusból a májba jutni és ott citotoxikus hatást kiváltani [176]. Az *in vitro* vizsgálatok azt mutatták, hogy az ezüst nanorészecske kezelése hatására megváltozott a májsejtek alakja, valamint ezekben a sejtekben abnormális morfológiai tulajdonságokat mutató mitokondriumok voltak megfigyelhetők [177]. A toxikológiai tanulmányok megállapították, hogy az ezüst nanorészecskék hatása elsősorban méretüktől, morfológiájuktól és ezüst ion felszabadító képességüktől függ. Abban az esetben azonban, ha az ezüst nanorészecskék ionizációja gátolt, hatásuk is nagymértékben csökkent. Ugyanebben a

tanulmányban számszerűen megállapították, hogy az ezüst nanorészecskék toxicitása 7665-ször kisebb, mint az ezüst-nitrátból felszabaduló ezüst ionoké [178]. Zebrahal embriókban is vizsgálták a különböző méretű ezüst nanorészecskékkel történő kezelések mérgező hatását. Megállapították, hogy a zebrahal embriókon a kisebb méretű nanorészecskék erősebb toxicitást mutattak a nagyobb átmérőjű változataiknál [179]. Mivel ezüst nanorészecskéket csont implantátumok felszínén is alkalmazhatnak annak érdekében, hogy elkerüljék a műtétek utáni fertőzéseket, Pauksch és munkatársai mesenchymális őssejteken valamint oszteoblasztokon vizsgálták az ezüst nanorészecskék toxikus hatásait. A vizsgálat során 21 napig tartó ezüst nanorészecske expozíciót alkalmaztak, melynek végén csökkent viabilitást tapasztaltak az alkalmazott sejteken. A vizsgálat során a szerzők megállapítottak egy kritikus koncentrációt (10 $\mu\text{g/g}$), ami felett az ezüst nanorészecskék már toxikus hatást gyakorolhatnak a csontszövetekre [180]. Egy másik fontos vizsgálat során 122 egészséges önkéntes bevonásával vizsgálták a kereskedelembe is forgalmazott 10 illetve 32 ppm koncentrációjú ezüst nanorészecske készítmények *per os* fogyasztásának hatásait. A résztvevők 14 napig fogyasztották a készítményeket, majd általános laboratóriumi diagnosztikai, illetve klinikai vizsgálatokat végeztek rajtuk. Az eredmények azt mutatják, hogy a résztvevők között nem történt semmilyen megfigyelhető szervi morfológiai változás, és a hematológiai értékekben sem tapasztaltak különbséget a placebo csoport és a nanorészecske készítményeket fogyasztó csoportok között [181]. Mivel az ezüst nanorészecskék alkalmazásának akut vagy krónikus toxikus hatásait tekintve a kutatások eredményei nem tekinthetők konklúzívnak, további vizsgálatok szükségesek ezen „nano” anyagok bármilyen orvosi célú felhasználását megelőzően.

3.9. Arany nanorészecskék

Az arany nanorészecskék (AuNP) számos tulajdonságukban nagy hasonlóságot mutatnak az ezüsből készült partikulumokkal, azonban eltérő kémiai jellegzetességeik miatt egészen más tumor terápiás szerepet tölthetnek be. A szintézis-eljárások optimalizálása miatt igen változatos formában előállíthatóak arany nanorészecskék. Lehetőség van gömb, csillag és pálca alakú arany nanorészecskék előállítására, de aranyból készült nano-ketrecek szintézise is megvalósítható [182, 183]. Az ezüst nanorészecskékkel szemben, az aranyból készült nano-

anyagok biológiailag inert természetűek, ugyanis önmagukban nem reaktívak. Emiatt az arany nanorészecskék biokompatibilis anyagoknak tekinthetők, és ez a tulajdonság messzemenően megnöveli terápiás felhasználási lehetőségeiket is.

Míg a szerves anyagokból felépülő hordozók – például liposzómák, vagy szerves polimerek – felszíni módosítása sok esetben nehézkes, az arany nanorészecskék esetén ez sokkal könnyebben megoldható [184]. A könnyű felületi kémiajuknak köszönhetően előállítottak már olyan arany nanorészecskéket, amelyek képesek hatóanyagot juttatni tumoros sejtekbe [185]. Szintetizáltak olyan arany-alapú nanorészecskéket is, amelyek felszínére polimert kötöttek, amire egy pH-szenzitív linkeren keresztül Doxorubicin valamint folsav molekulákat kapcsoltak. A folsav miatt a metasztatikus, folsav receptort nagy mennyiségben kifejező 4T1 sejtek a nanorészecskéket hatékonyan felvették, a pH-szenzitív linker pedig biztosította a hatóanyag felszabadulását a tumor savas kémhatású mikrokörnyezetben, illetve a sejtek savas organelumaiban [186]. Hatóanyagokon kívül számos célzó molekulát is kapcsoltak már arany nanorészecskék felszínére. Tumor nekrosis faktorra (TNF) konjugált arany nanorészecskék például hatékony tumor specifikus akkumulációra képesek. A TNF-el konjugált arany nanorészecskék elsősorban a tumorok vaszkuláris rendszerében halmozódtak fel, és a szabad TNF-hez képest eredményesebben csökkentették a tumor növekedését egerekben [187]. Terápiás céllal különféle nukleinsavak is sejtekbe juttathatóak arany nanorészecskék felhasználásával. Arany nanorészecskékre kötött antiszensz DNS segítségével számos, EGFP-t expresszáló sejtvonalban elérték a konstitutívan kifejeződő fluoreszcens riporter expressziójának teljes eltűnését [188].

Az arany nanorészecskéknek felületi-fizikai tulajdonságaik miatt kiemelkedő radioszenzitizáló hatásuk van, de a fototermális terápiás megközelítések során is magas potenciállal rendelkeznek. Az arany nanorészecskék radioszenzitizáló hatása mögött két mechanizmus áll: egyrészt a nanorészecskék képesek visszaverni a felszínre beérkezett elektronokat, ezáltal magasabb szabadgyök képződést indukálnak közvetlen környezetükben. Azonban, röntgen és gamma sugárzás hatására az arany nanorészecskék atomjait felépítő elektronok gerjesztésének következtében a nanorészecske maga is képes további elektronok leadására, így erősítve a sugárkezelés hatását. Abban az esetben, ha a sugárkezelés során leadott foton a nanorészecske belső részében vált ki excitációt, úgynevezett Auger elektronok képződnek, amelyek további excitációt indukálnak a nanorészecskében. A folyamat során egy kaszkád

alakul ki, aminek hatására sokszorozódik a nanorészecskéből felszabaduló reaktív elektronok mennyisége. Az így felszabadult elektronok később, más nanorészecskékben is kiválthatnak elektron felszabadulást, vagy abszorbeálódhatnak a környező biológiai médiumban, és ezáltal ionizációt vagy szabadgyök képződést okozhatnak, így a sejtek károsodását eredményezik [114, 115, 189]. Az arany nanorészecskék radioszenzitizáló hatását számos *in vivo* tumor modellben megerősítették már [190]. Úgy tűnik, hogy az arany nanorészecskék erősítik a sugárkezelés hatását hipoxiás tumorban, illetve intracraniális gliómában is [191]. Ráadásul, az arany nanorészecskék esetén jellemzett radioszenzitizáló hatást megfigyelték ezüst nanorészecskéknél is, és mivel ezutóbbiak önmagukban is képesek apoptózist indukálni a rákos sejtekben, a terápiás hatékonyság ezüst nanorészecskék felhasználásával még magasabbnak bizonyult [192].

Az arany nanorészecskék felületi plazmon rezonancia tulajdonságai miatt, megfelelő hullámhosszúságú fény abszorpciójának hatására az energia hő formájában szabadulhat fel a nanorészecskéből. Ez a jelenség az arany nanorészecskék felszínén történő elektron-foton és foton-foton interakciók eredménye, és kihasználható lehet a tumorok terápiája során is, mivel a szövetekben kiváltott hipertermia a sejtek apoptotikus halálát eredményezi [193]. Ráadásul, a tumorokban kialakított lokális hipertermia a tradicionális kemoterápia hatásfokát is emelheti, ugyanis a legtöbb citotoxikus hatóanyag 40.5-43°C-os környezetben sokkal hatékonyabb [143]. Egy tanulmányban PEG-el funkcionizált arany nanorészecskéket adtak be intravénásan egerekbe, majd az MDA-MB 435 emlő tumor sejtekből létrehozott xenograft tumort közeli infravörös fénnel világították meg. A fototermális terápia hatására nem csupán csökkent az állatokban indukált xenograft tumorszövet növekedése, hanem a tumor teljesen eltűnt, sőt, a kontroll csoporttal ellentétben, 10 nappal a kezelések után sem alakultak ki újra tumorok [194].

Akárcsak más nanorészecskék esetén, az arany nanopartikulumok toxikológiai tulajdonságainak megértése is elengedhetetlen fontosságú klinikai alkalmazásuk előtt. Bár az arany nanorészecskék mérgező hatásai jóval csekélyebbek, mint például az ezüst nanorészecskéké, azonban ezek is képesek önmagukban sejthalált okozni [195]. Az arany nanorészecskék esetén is megállapítható, hogy tumorelles hatásaik méretüktől és a stabilizáló anyag tulajdonságától függ, de úgy tűnik, hogy ezen faktorok mellett, az arany nanorészecskék toxicitásában a célsejtek típusa szintén meghatározó lehet [196, 197].

4. Célkitűzések

Az eddig felhalmozódott tudományos munkák alapján kijelenthetjük, hogy a fém nanorészecskék – különösen az ezüst- és arany-alapú nanoanyagok – ígéretes jellemzőkkel rendelkeznek, és lehetséges, hogy egyedi tulajdonságaik a tumoros megbetegedések terápiája során is kihasználhatóak. Ehhez azonban előbb meg kell értenünk, hogy a fém nanorészecskék egyes tulajdonságai hogyan befolyásolják biológiai aktivitásaikat. Annak érdekében, hogy a fém nanorészecskék biológiai hatásait jobban megismerjük, munkánk során fő célunk az volt, hogy különböző, fizikai-kémiai paramétereikben eltérő fém nanorészecskék viselkedését és hatásait tanulmányozzuk tumoros megbetegedéseket modellező *in vitro* és *in vivo* rendszerekben.

Annak ellenére, hogy több tanulmány szerint a kisebb nanorészecskéknek erősebb biológiai hatásuk van, mint a nagyobb partikulumoknak, az még nem tisztázott, hogy az eltérő méretű nanorészecskék különböző, vagy megegyező sejten belül kiváltott mechanizmusokon keresztül fejtik-e ki hatásukat. Annak érdekében, hogy a nanorészecskék méretfüggő tulajdonságait vizsgálhassuk, 5 nm illetve 35 nm átmérőjű ezüst nanorészecskéket állítottunk elő, és megfigyeltük a két eltérő méretű nanorészecske apoptotikus hatásait. Mivel a humán tumoros megbetegedések során a p53 tumorsuppresszor hiánya miatt jelentősen csökken a rákos sejtek apoptotikus válasza az egyes kemoterápiás hatóanyagokat alkalmazó kezelésekre, úgy döntöttünk, hogy az 5 nm és a 35 nm átmérőjű ezüst nanorészecskék apoptózis-indukáló hatásait vad típusú p53-at tartalmazó és p53 null mutáns oszteoszarkóma sejtekben is megvizsgáljuk. Célul tűztük ki, hogy:

- megvizsgáljuk, képesek-e a tumoros sejtek felvenni az eltérő méretű nanorészecskéket.
- összehasonlítsuk a vad típusú p53-at kifejező U2Os és a p53-at nem tartalmazó Saos-2 sejtekben az 5 nm illetve a 35 nm átmérőjű ezüst nanorészecskék citotoxikus hatásait.

- megvizsgáljuk, hogy az ezüst nanorészecskék képesek-e p53 hiányában is apoptózist okozni oszteosarkóma sejtekben.
- vizsgáljuk, hogy az ezüst nanorészecske kezelések aktiválják-e a p53-függő jel pályát p53-at kifejező oszteosarkóma sejtekben.
- megfigyeljük, az 5 nm illetve a 35 nm átmérőjű ezüst nanorészecskék képesek-e mitokondriális károsodást, és ennek következményeként mitokondrium-függő sejthalált okozni oszteosarkóma sejtvonalakban.

A nanorészecskék és a biológiai rendszerek kölcsönhatásai során, méretük mellett a nanoanyagok kémiai összetétele is meghatározó szerepet játszik. Ezért arany, illetve ezüst nanorészecskéket szintetizáltunk, továbbá előállítottunk arany magból és ezüst héjból felépülő „core-shell” szerkezetű arany-ezüst hibrid nanorészecskéket is, és megvizsgáltuk, milyen különbségek vannak az eltérő fémekből felépülő nanorészecskék biológiai hatásai között. Mivel a tumor mikrokörnyezetében található reaktív sztróma fibroblaszt sejteji meghatározó szerepet játszanak a metasztázisok kialakulása során is, kíváncsiak voltunk arra, hogy a különböző típusú fém nanorészecskék a tumorok mikrokörnyezetében befolyásolják-e a fibroblasztok és a tumoros sejtek közötti kommunikációt. Ha igen, akkor ki lehet-e ezt a képességet előnyösen használni a tumorterápia folyamán. Ennek érdekében célul tűztük ki, hogy *in vivo* rendszerben megvizsgáljuk, a tumorok mikrokörnyezetébe került fém nanorészecskék képesek-e befolyásolni kemoterápia mellett, illetve annak hiányában a tumorok növekedését, valamint a primer tumorok metasztázis képző tulajdonságait. A kísérletsorozat során céljaink voltak, hogy:

- megvizsgáljuk, hogy nem-toxikus, dózisban hogyan befolyásolják az arany, ezüst, valamint az arany-ezüst hibrid nanorészecskék a 4T1 és MCF-7 adenokarcinóma, valamint az NIH/3T3 és MRC-5 fibroblaszt sejtek proliferációs, inváziós, valamint migrációs képességeit.

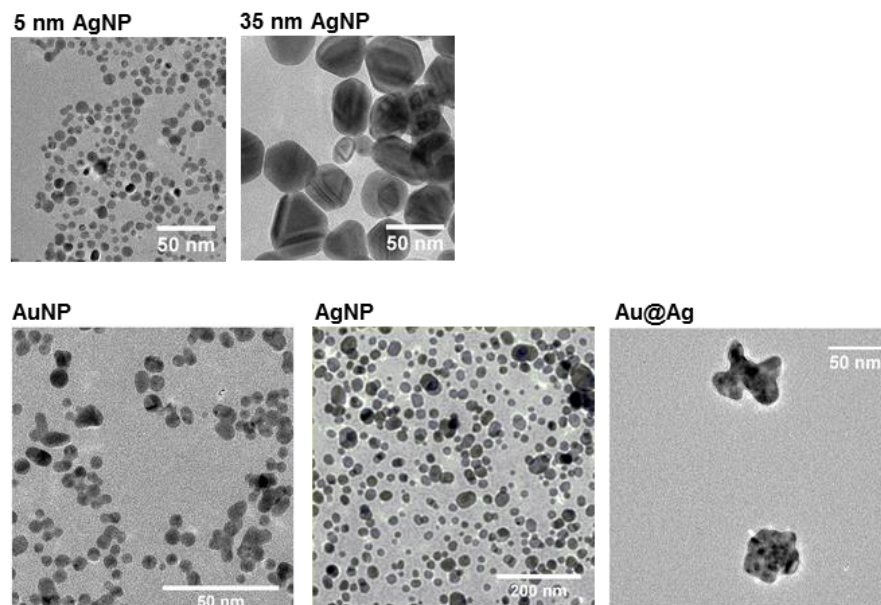
- vizsgáljuk, a tumor-asszociált fibroblaszt sejtek tumor-támogató hatásait befolyásolják-e az egyes fém nanorészecske kezelések. Amennyiben befolyásolják, célul tűztük ki, hogy kiderítsük, a fibroblasztok által termelt oldékony faktorok szerepet játszanak-e a tumor-támogató hatásokban.
- megállapítsuk, milyen transzkriptomikai változásokat okoznak az arany, ezüst, valamint az arany-ezüst hibrid nanorészecske kezelések a tumor-asszociált fibroblaszt sejtekben.
- tanulmányozzuk, hogy az arany-ezüst hibrid nanorészecskék Doxorubicin terápia mellett, vagy hiányában hogyan képesek befolyásolni *in vivo* a tumorok növekedését, valamint metasztatikus aktivitását.

5. Felhasznált anyagok és módszerek

5.1. Fém nanorészecskék szintézise és karakterizálása

A nanorészecskék szintézise, és részletes anyagtudományi jellemzése a SZTE-TTIK Alkalmazott és Környezeti Kémiai Tanszékén történt, a tanszék munkatársainak közreműködésével. Az ezüst nanorészecskéket a Lee és Meisel által kidolgozott, kémiai redukción alapuló módszerrel készítettük, melynek eredményeként kapott nanorészecskéket citrát ionok stabilizálták [198]. A kisebb méretű ezüst nanorészecskék (5 nm AgNP) előállításához 100 mL végtérfogatban 1%-os AgNO_3 oldatot 70°C -on, 0.1% nátrium-borohidrid és 1% nátrium-citrát jelenlétében redukáltunk. A kapott nanorészecskéket kiindulási gócpontként használtuk a nagyobb nanorészecskék (35 nm AgNP) nukleációjához. Az arany nanorészecskék (AuNP) előállításához az 5 nm-es ezüst nanorészecskék készítésénél használt protokollt követtük, azzal a különbséggel, hogy AgNO_3 oldat helyett hidrogén-tetrakloroaurátot (HAuCl_4) alkalmaztunk. Az arany-ezüst hibrid „core-shell” szerkezetű nanorészecskék (Au@Ag) szintéziséhez a korábban kapott arany nanorészecskéket használtuk (AuNP) kiindulási gócpontként, és AgNO_3 , illetve redukáló szer hozzáadását követve egy újabb redukciós ciklust végeztünk el.

A kapott nanorészecske kolloid oldatok méreteloszlását, és morfológiáját transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) (FEI Tecnai G2 20 x) ellenőriztük 200 kV gyorsító feszültség mellett (**4. ábra**). A nanorészecskékről készített TEM képeket ImageJ szoftver és GraphPad Prism 7 szoftver segítségével kiértékeltek, így meghatároztuk az egyes kolloid oldatokban található részecskék méreteloszlását. Az egyes nanorészecskék vizes oldatban mérhető felületi töltéseloszlását (zeta potenciál) Zetasizer Nano (Malvern) készülékkel határoztuk meg (**1. táblázat**).



4. ábra. A kísérletek során alkalmazott nanorészecskék transzmissziós elektronmikroszkópos felvételei. AgNP – ezüst nanorészecske, AuNP – arany nanorészecske, Au@Ag – arany-ezüst hibrid nanorészecske. Az arany és az ezüst nanorészecskék szférikus morfológiát mutatnak, míg az arany-ezüst hibrid nanorészecskék esetén, az arany magon kialakult ezüst réteg egyenetlen eloszlása volt megfigyelhető.

Név	Rövidítés	Zeta potenciál	Méreteloszlás
5 nm ezüst nanorészecske	5 nm AgNP	-41,93 mV	5,19 ± 0,91
35 nm ezüst nanorészecske	35 nm AgNP	-23,63 mV	34,73 ± 0,90
arany nanorészecske	AuNP	-6,39 mV	4,47± 1,35
ezüst nanorészecske	AgNP	-6,8 mV	16.93± 4,8
arany-ezüst hibrid nanorészecske	Au@Ag	-18,6 mV	24,97± 12,34

1. táblázat. A kísérletek során alkalmazott nanorészecskék karakterizálása

5.2. Sejtkultúra

Az oszteoszarkóma eredetű U2Os és Saos-2 sejteket, valamint a humán MRC-5 fibroblaszt sejteket 2 mM L-glutaminnal, 0,001% sztreptomicinnel és 0,005% ampicillinnel kiegészített 1 g/L glükóz tartalmú DMEM médiumban tenyésztettük. A U2Os és MRC-5 sejtek tápfolyadék 10% borjú szérumot (FBS), míg a Saos-2 médium 5% FBS-t tartalmazott. Az egér eredetű NIH/3T3 fibroblasztoid sejteket 2 mM L-glutaminnal, 0,001% sztreptomicinnel és 0,005% ampicillinnel, valamint 10% FBS-el kiegészített 4,5 g/L glükóz tartalmú DMEM médiumban tenyésztettük. Az egér eredetű 4T1 és a humán MCF-7 adenokarcinóma sejteket 10% FBS-el, 2 mM L-glutaminnal, 0,001% sztreptomicinnel és 0,005% ampicillinnel kiegészített RPMI 1640 médiumban tartottuk fent. Minden sejtvonalat 5% CO₂-t tartalmazó, 37°C-os inkubátorban növesztettünk sztenderd sejtenyésztési körülmények között.

5.3. Transzmissziós, pásztázó elektronmikroszkópia és energiadiszerzív röntgenspektrometriás mérések

A biológiai minták transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) analíziséhez 10⁵ sejtet növesztettünk 0.4 µm pórusméretű poliészter membrán inszerteken (Corning), majd a mintákat ezüst nanorészecskékkel kezeltük 24 óráig. A kezeléseket után a sejteket óvatosan mostuk PBS-el, majd 4%-os glutáraldehid segítségével 2 órán keresztül fixáltuk és 2%-os zselatinba ágyaztuk. A minták körülbelül 1-2 mm vastagságú metszeteit epoxi gyantába (Epon 812, EMS, PA 19440) ágyaztuk, majd először 1 µm vastagságú félvékony szeleteket készítettünk, aztán azok további metszése után 70 nm vastagságú szeleteket állítottunk elő, melyeket uranil- és ólom-acetát oldatokkal festettük. Az elkészült TEM preparátumokat Megaview G2 digitális kamerával (ITEM, Olympus Soft Imaging Solution GmbH, Münster) felszerelt Philips CM10 elektronmikroszkóppal vizsgáltuk 100 kV gyorsító feszültség alkalmazásával az SZTE-ÁOK Patológia Intézetében.

A pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz (SEM) a sejteket műanyag fedőlemezen növesztettük, majd nanorészecskékkel kezeltük 24 óráig. A kezelés után PBS-el mostuk majd egy éjszakan keresztül 2,5%-os glutáraldehid oldat segítségével 4°C-on fixáltuk a sejteket. A mintákat felszálló koncentrációjú alkoholsorozatban dehidráltuk (50%, 70%, 80%,

95%, 98%, 100%), majd terc-butanol:etanol változó arányú elegyével (1:2, 1:2, 2:1) kezeltük, végül a sejteket egy éjszakán keresztül 4°C-on terc-butanolban tartottuk és liofilizáltuk. A minták felszínét 4-5 nm vastagságban arany-palládium keverékkel borítottuk majd a sejteket Hitachi S4700 szekning elektronmikroszkóp segítségével vizsgáltuk 10 kV gyorsító feszültség mellett a SZTE-TTIK Alkalmazott és Környezeti Kémiai Tanszék munkatársainak segítségével. A minták elemi összetételét Röntec QX2 EDS detektor alkalmazásával határoztuk meg 20 kV gyorsító feszültség használata mellett.

5.4. MTT esszé és IC₅₀ értékek meghatározása

A sejtek viabilitását MTT esszé segítségével mértük. Ehhez 96-lyukú mikrotiter lemezek egyes celláiba 10⁴ sejtet osztottunk, majd másnap a sejteket kezeltük a tesztelni kívánt anyagokkal. A kezeléseket után a sejteket PBS-es mosást követően egy órán keresztül 0,5 mg/mL (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid oldatot (MTT reagenst) (Sigma-Aldrich) tartalmazó médiumban inkubáltuk 37°C-on. Az inkubálás után a PBS-el mosott sejtekben a formazán kristályokat dimetil-szulfoxidban (DMSO) feloldottuk és a minták abszorbanciáját Synergy HTX plate reader segítségével meghatároztuk. Az MTT esszé során minden esetben legalább 4 biológiai párhuzamot használtunk, és a kísérleteket háromszor ismételtük. Az adatok kiértékelése során a nem kezelt, kontroll minták abszorbanciájához százalékosan viszonyítottuk a kezelt minták értékeit. Az IC₅₀ értékek meghatározásához a tesztelni kívánt anyagokat 12 lépéses lineárisan, vagy logaritmikusan növekvő hígítási sorozatban alkalmaztuk a megadott kezelési időn keresztül, majd MTT esszé segítségével meghatároztuk az egyes koncentrációkhoz tartozó viabilitási értékeket. Az egyes pontokra GraphPad Prism 7 szoftver segítségével egyenest illesztettünk, és meghatároztuk az y=50 értékhez tartozó „x” koncentrációkat.

5.5. Immunocitokémia

Az apoptózist jelző prokaspáz 3 hasítását aktivált kaszpáz 3-at felismerő ellenanyag segítségével vizsgáltuk. Ennek érdekében a U2Os és Saos-2 sejteket tárgylemezeken növesztettük, majd a mintákat a kezelések után 4%-os paraformaldehid (PFA) segítségével fixáltuk. A sejteket 0,3%-os Triton-X-100 detergens segítségével permeabilizáltuk, majd az aspecifikus fehérjekötő helyeket 5%-os borjú szérum albumin (BSA) segítségével blokkoltuk. A kaszpáz 3 aktiválódás detektálása érdekében a mintákat hasított kaszpáz 3-at felismerő ellenanyaggal (Cell Signaling) festettük 1:600 hígításban. Ezt követően a mintákat megfelelő nyúl-elleni Alexa 647 fluorofórral jelölt másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk (Abcam) majd a sejtmagokat DAPI-val jelöltük. A mintákról Olympus BX51 epifluoreszcens mikroszkóp segítségével készítettünk felvételeket. A hasított kaszpáz 3-at tartalmazó sejtek százalékos megoszlását ImageJ szoftver segítségével határoztuk meg.

5.6. Apoptózis detektálása áramlási citométerrel

A korai és késői apoptotikus folyamatok aktiválódását a sejtek Annexin V/Propídium-jodid festődése alapján detektáltuk. Ehhez a U2Os és Saos-2 sejtekből 3×10^5 sejtet osztottunk 6 -lyukú plate-ek egyes celláiba, majd másnap a sejteket nanorészecskékkal kezeltük. 4T1 és MCF-7 sejtek esetén a „wound healing” esszé elvégzését követően, a 24 óráig kezelt sejteket használtuk a vizsgálathoz. A kezelések után PBS-el mostuk, majd tripszin segítségével összegyűjtöttük a sejteket. Centrifugálással üleptítettük, majd Annexin V-kötő pufferben újra felfuszpendáltuk a sejteket. A sejteket Alexa 488 fluorofórral konjugált Annexin V-el és Propídium-jodiddal festettük a gyártók utasítása szerint (Life Technologies), majd az egyes festékek fluoreszcenciáját BD FACScalibur áramlási citométer segítségével meghatároztuk. A kísérlet során 10 000 mérési eseményhez tartozó fluoreszcencia értéket regisztráltunk és a citometriás méréseket FlowJo V10 szoftver segítségével értékeltük ki. A kvadránsokat a kapott citogramokon úgy helyeztük el, hogy az adott sejtvonal festetlen mintája esetén mért sejtpopuláció minden tagja a bal alsó régióba kerüljön. Minden kísérletet háromszor ismételtünk legalább két biológiai párhuzamos felhasználásával.

5.7. Western blot analízis

Az endogén és az ektopikusan expresszált p53 illetve a Citokróm c fehérjék detektálását western blot analízis segítségével végeztünk el. Ehhez 6×10^5 sejtet osztottunk 6 cm átmérőjű csészékbe majd a kezelések után a teljes sejtlizátum készítéséhez szonikációs pufferben (50 mM TRIS pH=8.9, 2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 50 mM NaCl, 1x PIC) lizáltuk a sejteket. Az extraktumot centrifugáltuk 13 000 rpm fordulatszámon (Heraeus Fresco 17), így a sejttörmeléket, amely a mitokondriumokat is tartalmazta, kiülepítettük a csövek falára. Az így kapott lizátum felülúszóját citoplazmatikus frakcióként használtuk. Az elkészített sejtlizátumok fehérjekoncentrációját Bradford reagens segítségével meghatároztuk, és mintánként 20 µg fehérjét SDS-akrilamid gélen megfuttatunk. Az elválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra (Amersham) transzferáltuk, majd az aspecifikus fehérjekötő helyeket 5%-os tejpor-TBST (Tris Buffered Saline Tween 20) oldattal blokkoltuk. A p53-specifikus ellenanyagot (DAKO) 1:2000 hígításban, a Citokróm c-t felismerő antitestet (Abcam) 1:500-ban, az anti-FLAG ellenanyagot (Sigma-Aldrich) pedig 1:2500 hígításban alkalmaztuk. Loading kontrollként tubulin-specifikus ellenanyagokkal (Sigma-Aldrich) inkubáltuk a membránokat. Az elsődleges ellenanyagok használata után megfelelő, torna-peroxidázzal konjugált másodlagos ellenanyagokat alkalmaztunk. A membránokat ECL reagenssel kezeltük (Millipore) majd a képződött kemilumineszcens jelet C-DiGit Blot Scanner (LI-COR) segítségével detektáltuk.

5.8. Tranziens transzfekció és luciferáz aktivitás mérés

A U2Os és Saos-2 sejtek tranziens transzfektálásához 3×10^5 sejtet osztottunk 6-lyukú lemezek celláiba. A transzfektálások során 1 µg pGL2-Mdm2-promoter-Luc riporter plazmidot [199] juttattunk a sejtekbe ExGen (Fermentas) és TurboFect (Thermo Scientific) transzfekciós reagenssek segítségével, a gyártók utasítása szerint. Saos-2 sejtekbe 1 µg pCDNA3-p53-FLAG plazmidot transzfektáltunk 24-lyukú lemezen növesztett sejtekbe. Negatív kontrollként üres pCDNA3 plazmiddal transzfektáltuk a sejteket, míg a luciferáz mérések pozitív kontrolljaként a magas bazális aktivitású citomegalovírus promóterét tartalmazó pCMV-Luc riporterplazmidot használtuk. A transzfektálások után 24 órával a sejteket további 24 óráig kezeltünk nanorészecskékkal. A luciferáz enzimaktivitás méréséhez kaparóval összegyűjtöttük a sejteket,

majd centrifugálás után lízis pufferben (Promega) feltártuk a mintákat. A lizátumok fehérjetartalmát Bradford reagenssel meghatároztuk és a minták luciferáz aktivitását luciferáz esszé kit (Promega) segítségével meghatároztuk. A biolumineszcens jelet Orion L Microplate Luminometer felhasználásával mértük és a kapott értékeket az egyes minták fehérjetartalmával korrigáltuk. A transzfekciós kísérleteket háromszor ismételtük, legalább három biológiai párhuzamos felhasználásával.

5.9. RT-qPCR

A génexpressziós vizsgálatokhoz 6×10^5 sejtet osztottuk 6 cm átmérőjű csészékbe, majd a kezelések után RNS-t izoláltunk RNeasy Kit (Qiagen) segítségével. A cDNS készítéséhez mintánként 2 µg RNS-t írtunk át Taqman Reverz Transzkripció Kit (Applied Biosystems) felhasználásával. A kísérletek során génspecifikus primerek alkalmazásával (**2. táblázat**) és SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) felhasználásával meghatároztuk a *p53*, *p21*, *Survivin*, *Bax* és a *Caspase 3* specifikus transzkriptek relatív szintjét Pico Real-Time qPCR rendszer (Thermo Scientific) segítségével. Az analízis során belső referencia kontrollként 18S RNS specifikus primereket használtunk. A relatív messenger szinteket $\Delta\Delta C_t$ analízis segítségével határoztuk meg. Az RT-qPCR kísérleteket háromszor ismételtük meg, három biológiai párhuzamos felhasználásával.

Célgén	Forward primer	Reverse primer
<i>p53</i>	5' CCCTTCCCAGAAAACCTACC 3'	5' CTCCGTCATGTGCTGTGACT 3'
<i>p21</i>	5' - CAGCAGAGGAAGACCATGTG - 3'	5'- GCGGTTTGGAGTGGTAGAAA - 3'
<i>Bax</i>	5' - TGCTTCAGGGTTTCATCCAG - 3'	5' - GGCGGCAATCATCCTCTG - 3'
<i>Survivin</i>	5' - AGAACTGGCCCTTCTTGGAGG - 3'	5' - CTTTTTATCTTCCTCTATGGGGTC - 3'
<i>Caspase 3</i>	5' - ACATGGCGTGTGCATAAAATACC -3'	5' - CACAAAGCGACTGGATGAAC - 3'
<i>18S RNS</i>	5' - AAACGGCTACCACATCCAAG - 3'	5' - CGCTTCCAAGATCCAACACTAC - 3'

2. táblázat. Az RT-qPCR mérések során felhasznált primerek szekvenciái.

5.10. Mitokondriális membránpotenciál mérés JC-1 festéssel

Az ezüst nanorészecske kezelések során bekövetkezett mitokondriális membránpotenciál változást JC-1 festéssel határoztuk meg. Ehhez a sejteket fedőlemezre növesztettük, majd a kezelések után előmelegített PBS-el mostuk a mintákat és 10 µg/mL koncentrációjú JC-1 (Life Technologies) festéket tartalmazó, szérummentes tápfolyadékban inkubáltuk a sejteket 15 percig 37°C-on. A festés után lecseréltük a festéket tartalmazó médiumot és a minták zöld, illetve piros fluoreszcenciáját Olympus BX51 mikroszkóp segítségével meghatároztuk. A felvételek készítése során azonos expozíciós időt használtuk az összes minta esetén. A piros/zöld fluoreszcencia arányát ImageJ szoftver segítségével határoztuk meg. A kísérletet háromszor ismételtük, és legalább 20 felvételt készítettünk mintánként.

5.11. „Wound healing” és migrációs esszé

4T1 és MCF-7 sejtek esetén a „wound healing” esszé során 5×10^5 sejtet osztottuk 6-lyukú lemezek egyes welljeibe. Miután a sejtek konfluensre nőttek a tenyésztőedényeket, P2-es pipettahegy és vonalzó segítségével két egymásra merőleges vonalat húztunk a sejtmezőbe. A két vonal metszésével létrehozott „+” alakú sejtmentes zóna jelenléte biztosította, hogy az eltérő időpontokban is azonos területről készíthessünk felvételeket. A sebzés után a sejteket kétszer mostuk PBS-el annak érdekében, hogy eltávolítsuk a sebzés következtében felúszott sejteket, majd nanorészecskéket tartalmazó, friss tápfolyadékot helyeztünk a sejtekre és a kísérlet további része során 37°C-os inkubátorban tartottuk a mintákat. A mintákban létrehozott sejtmentes terület meghatározott részeiről Nikon Coolpix 4500 kamerával felszerelt Nikon Eclipse TS100 inverz mikroszkóp segítségével felvételeket készítettünk egyből a sebzést követően (0 h) valamint 12 és 24 óra elteltével. A sejtmentes zóna területét az egyes felvételeken ImageJ szoftver segítségével határoztuk meg, majd a sejtmentes zóna csökkenését az alábbi képlet segítségével számoltuk ki:

$$\left(\frac{\text{Kezelt minta sejtmentes területe } 0 \text{ h} - 24 \text{ h}}{\text{Kontroll minta sejtmentes területe } 0 \text{ h} - 24 \text{ h}} \right) \times 100$$

Az MRC-5 és NIH/3T3 sejtek esetén is hasonlóan jártunk el, viszont a fibroblaszt sejtek esetén a 24 órás időpontban a mintákat metanol:aceton 70:30 arányú keverékével fixáltuk és a jobb detektálhatóság érdekében a sejteket kristály ibolyával festettük. A festés után a mintákról felvételeket készítettünk, és a 0 h időpontban készült felvételek felhasználásával kijelöltük a képeken a létrehozott sejtmentes zóna határait, majd ImageJ szoftver segítségével meghatároztuk a sejtmentes területre vándorolt fibroblaszt sejtek számát.

A „wound healing” kísérletek során minden mintáról 3 pozícióban készítettünk felvételeket („+” felső, középső és alsó része), és ezek adatait átlagoltuk. Az egyes kezeléseket minden esetben 3 biológiai párhuzamos felhasználásával végeztük el.

5.12. Transwell inváziós esszé

A 4T1 sejtek inváziós és migrációs képességeit az egyes kezelések során transwell esszé segítségével határoztuk meg. A kísérlethez 8 μm pórusátmérőjű, 0,33 cm^2 területű inszerteket (Corning) vontunk be matrigéllal. A matrigéles kezeléshez az inszertek felső felszínére 100 μL , RPMI-ben hígított, 200 $\mu\text{g/mL}$ koncentrációjú Engelbreth-Holm-Swarm szarkóma extracelluláris mátrix kivonatot (Sigma) pipettáztunk -20°C -osra hűtött pipettahegyekkel, majd az inszerteket 24-lyukú lemezbe helyeztük és 37°C -os inkubátorban tároltuk két órán keresztül. Miután az inszertek felszínén megszilárdult az extracelluláris mátrix, eltávolítottuk a maradék folyadékot és az egyes inszertek felső kamráiba $2,5 \times 10^4$ sejtet osztottunk 1%-os FBS-t tartalmazó RPMI-ben hígított nanorészecskék jelenlétében. A 24-lyukú lemezek alsó kamráiba kemoattraktánsként 20% FBS-t tartalmazó tápfolyadékot helyeztünk, majd a transwelleket tartalmazó lemezeket 37°C -os inkubátorban tartottuk 24 órán keresztül. Az inkubációs idő elteltével az inszerteket háromszor mostuk PBS-ben, majd a sejteket metanol:aceton 70:30 arányú keverékével fixáltuk. Fixálás után a mintákat kristály ibolyával festettük, majd az inszertek felső felszínéről fültisztító segítségével eltávolítottuk a sejteket és az extracelluláris mátrixot. Az inszertek membránjait kivágtuk, és tárgylemezre helyezve Nikon Eclipse TS100 inverz mikroszkóp segítségével felvételeket készítettünk az alsó felszínre átvándorolt sejtekről. Minden inszertről 5 fényképet készítettünk, majd átlagoltuk az egyes látóterekben megszámlolt sejteket. A kísérleteket három biológiai párhuzamos felhasználásával végeztük el, és a sejtek

inváziós képességét úgy számoltuk ki, hogy a transzmigrált sejtek számát %-osan viszonyítottuk a nanorészecskéket nem tartalmazó kontroll minták esetén tapasztalt értékekhez.

5.13. Laktát-dehidrogenáz (LDH) aktivitás mérése

A sejtek felülúszójából Dojindo LDH esszé kit segítségével határoztuk meg a laktát dehidrogenáz (LDH) enzim aktivitását. Ehhez 96-lyukú mikrotiter lemezbe 2000 NIH/3T3 sejtet osztottunk cellánként, majd másnap a sejteket nanorészecskékkal kezeltük 24 órán keresztül. A kezelések vége előtt 1 órával a pozitív kontroll sejtjeit a kit-ben található detergenssel kezeltük, majd egy óra múlva a sejtek felülúszóját átmértük egy új 96-lyukú lemezbe, és elvégeztük az enzimaktivitás meghatározását a gyártó utasításait követve. A reakció végén keletkező színes terméket Synergy HTX plate reader segítségével határoztuk meg. Minden kezelést 4 párhuzamos minta segítségével végeztünk el. Az egyes kezelések során tapasztalt abszorbancia értékeket a pozitív kontrollhoz hasonlítva %-os értékben adtuk meg.

5.14. Fluoreszcens jelölés és direkt ko-kultúra

Direkt ko-kultúrák során a 4T1 sejteket a membránba épülő piros fluoreszcenciát mutató PKH26 festékkel (Sigma) jelöltük. A 4T1 sejteket T75-ös flaskában szaporítottuk fel, majd tripszinezettük. A festéshez 5 millió sejtet használtunk. Az 5 millió sejtet tartalmazó szuszpenziót centrifugálással üleptítettük, majd a sejteket kétszer mostuk szérummentes RPMI-vel. A mosást követően a sejteket 1 mL Diluent C-ben (Sigma) szuszpendáltuk fel, majd centrifugálással üleptítettük. A sejtpelletet ismét 1 mL Diluent C-ben felsuszpendáltuk, majd 1 mL, Diluent C-ben hígított, 5 μ M koncentrációjú PKH26 festéket adtunk a mintához. A mintát pipettával alaposan összekevertük, majd 3 perc múlva 2 mL borjú szérumot (FBS) adtunk a sejtekhez annak érdekében, hogy megkössük az oldatban maradt festékmolekulákat. Hogy a lehető legkevesebb szabad festékmolekula maradjon az oldatban, a sejteket egymást követően négyszer centrifugáltuk és újra szuszpendáltuk tápfolyadékban. A sejtszuszenzióban található sejtek számát Bürker kamra segítségével meghatároztuk, majd megegyező számú sejtet tartalmazó, frissen tripszinezett, RPMI médiumban hígított NIH/3T3 szuszpenzióval alaposan összekevertük. Ezt követően fedőlemezeket tartalmazó 6-lyukú lemezekbe osztottuk a

szuszpenziót úgy, hogy minden wellbe $1,5 \times 10^5$ jelölt 4T1 és $1,5 \times 10^5$ jelöletlen NIH/3T3 sejt került. Másnap a mintákat nanorészecskével kezeltük, majd a kezeléseket követően a fedőlemezeket eltávolítottuk a lemezekből, és 4%-os PFA-val fixáltuk. A fixált mintákat 1:1000 hígításban DAPI-val festettük, majd Olympus BX51 epifluoreszcens mikroszkóp segítségével felvételeket készítettünk a sejtekről.

A 6-lyukú lemezben maradt sejteket 3-szor mostuk PBS-el, majd tripszin segítségével összegyűjtöttük a mintákat. A szuszpenzió sejtjeit centrifugálással összegyűjtöttük, PBS-el mostuk, majd FL-2 filtert használva, 10 000 eseményt meghatározva BD FACScalibur áramlási citométer segítségével megmértük az egyes sejtek fluoreszcencia intenzitását. A kezeletlen, ko-kultúras mérésből kapott citogramokon, optikai jellemzőik alapján (FSC+SSC) kiválasztottuk az élő sejteket mérő eseményeket, majd ezt a kaput alkalmaztuk az összes minta esetén. Az így kapott sejtpopuláción újabb kapuzást alkalmaztunk: festetlen illetve festett 4T1 sejteket tartalmazó monokultúrák esetén kapott citogramok alapján meghatároztuk a pozitív és negatív sejteket átengedő kapukat, majd ezeket is érvényesítettük a kísérlet során alkalmazott mintákon. Az áramlási citométeres adatok analízisét FlowJo V10 szoftver segítségével végeztük el.

5.15. Indirekt ko-kultúra

A fibroblaszt sejtek tumorsejt-támogató hatásait indirekt ko-kultúra kísérletek segítségével vizsgáltuk. A ko-kultúrákhoz 6-lyukú lemezbe helyezhető, $0,4 \mu\text{m}$ pórusátmérőjű polikarbonát membránt tartalmazó NUNCTM inszerteket (Sigma) használtunk. A kísérlet első napján 2×10^5 4T1 sejtet osztottunk 6-lyukú lemezek egyes welljeibe, illetve 2×10^5 NIH/3T3 sejtet a ko-kultúra inszertek felső kamráiba. Másnap a 4T1 sejtekre friss RPMI tápfolyadékot helyeztünk, majd a fibroblasztokat tartalmazó inszerteket óvatosan áthelyeztük a 4T1 sejteket tartalmazó lemezek welljeibe. Ezt követően eltávolítottuk a felső kamrákban található fibroblaszt médiumot, és nanorészecskéket tartalmazó RPMI tápfolyadékot helyeztünk a fibroblaszt sejtekre. A két sejtípust 24 órán keresztül tartottuk együtt, majd az NIH/3T3 sejtek eltávolítása után a konfluensre nőtt 4T1 sejteken „wound healing” esszét végeztünk el. A sejtmentes zóna méretének csökkenését a 12 órás időpontban abbahagytuk, ugyanis 24 óra után a fibroblasztok serkentő hatása miatt ezekben a mintákban már nem volt detektálható méretű sejtmentes zóna. Az NIH/3T3 sejteket tartalmazó inszerteket a ko-kultúra végén PBS-ben

mostuk, metanol:aceton 70:30 arányú keverékével fixáltuk, majd kristály ibolyával megfestettük a sejteket. A megfestett inszerteket fáziskontraszt mikroszkóp segítségével vizsgáltuk annak érdekében, hogy meggyőződjünk arról, hogy a fibroblasztok a kísérlet végén is konfluens sejtfelszínt alkottak.

5.16. Felülúszó minták töményítése

A sejtek által szekretált faktorok vizsgálatához a nanorészecskékkel előkezelt NIH/3T3 és a 4T1 sejtek által termelt faktorokat Amicon Ultra-4 (Millipore) 10 KDa Cut-off filterrel rendelkező centrifugacsövekkel töményítettük. Ehhez 8×10^5 sejtet osztottunk ki 10 cm átmérőjű csészékbe, majd másnap nanorészecskékkel kezeltük a sejteket 24 órán keresztül. A kezelések után a sejteket háromszor mostuk PBS-el, majd 8 mL szérummentes tápfolyadékot helyeztünk a csészékbe. 12 óra múlva a médiumot összegyűjtöttük és a töményítő centrifugacsövek felhasználásával a gyártó utasításait követve koncentráltuk a mintákat. A töményített minták fehérjekoncentrációját Bradford módszer segítségével határoztuk meg.

5.17. BrdU ELISA

A 4T1 sejtek proliferációs aktivitását a mesterséges 5-bróm-2-dezoxiuridin (BrdU) nukleotid analóg genomi integrációjának mértékével határoztuk meg. A kísérlethez kolorimetriás BrdU cell proliferation ELISA kitet (Roche) alkalmaztunk. A kísérlethez 96-lyukú lemezek egyes celláiba 2000 4T1 sejtet osztottunk ki, majd másnap a sejteket kezeltük az NIH/3T3 sejtek koncentrált felülúszójával. A 24 órás kezelés utolsó két órájában a sejtek médiumába 1:5000 koncentrációban BrdU labelling oldatot tettünk. A két órás inkubáció után eltávolítottuk a BrdU oldatot tartalmazó felülúszót, a sejteket fixáltuk és a gyártó utasításai szerint elvégeztük a kísérleti protokollt. A kísérlet során negatív kontrollként, BrdU-t nem tartalmazó sejteket használtunk. A kísérlet utolsó fázisában az enzime reakció kinetikáját a kromogén termék abszorbanciájának meghatározásával követtük nyomon Synergy HTX plate reader segítségével. Az enzime reakció kinetikáját a plató fázis eléréséig regisztráltuk, majd kiválasztottuk azt az időpontot, ahol az egyes mintákban a termék koncentrációjának növekedése exponenciális tendenciát mutatott. Az ezen a ponton mért abszorbancia értékeket a

kezeletlen kontroll értékeihez százalékosan viszonyítottuk. A kísérlet során minden kezelést 4 párhuzamos felhasználásával végeztünk el.

5.18. Zselatin zimográfia

A 4T1 és NIH/3T3 sejtek által termelt mátrix metalloproteázok aktivitásának meghatározását zselatin zimográfia segítségével végeztük. A töményített fehérjemintákból 40 µg fehérjét összekevertünk nem-denaturáló loading pufferrel, majd a mintákat 0,2% zselatint tartalmazó, 8%-os SDS PAGE-en megfuttattuk. Az elektroforézist követően a géleket háromszor 20 percig mostuk 2,5%-os Triton-X-100 oldattal, hogy az SDS-t kimossuk a gélekből. Majd a géleket inkubáló pufferben (150 mM NaCl, 25 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 50 mM TRIS, 8 mM NaN_3 pH=8.0) ringattuk 8 órán keresztül, 37°C-on. Az inkubáció után a gélét Coomassie Brilliant Blue (CBB) festékkel festettük, végül 4% metanolt és 8% ecetsavat tartalmazó oldattal színtelenítettük. A színtelenítés után a géleket szkenneltük és méretük alapján azonosítottuk az MMP-9 (~90 KDa) és MMP-2 (~60-65 KDa) mátrix metalloproteázok aktivitását jelző feltisztulási sávokat. Minden mintát duplikátumban vittünk fel a gélekre, és az egyes enzimeket jelző feltisztulási sávok intenzitását ImageJ szoftver segítségével számszerűsítettük.

5.19. Transzkriptóm analízis

4T1 és NIH/3T3 sejtekből indirekt ko-kultúrákat készítettünk annak érdekében, hogy vizsgáljuk a fém nanorészecskék által indukált transzkriptomikai változásokat tumor-asszociált fibroblasztokban. Ehhez 6-lyukú lemezek egyes welljeibe 3×10^5 NIH/3T3 fibroblaszt sejtet osztottunk, majd ugyanennyi 4T1 sejtet ültettünk 0,4 µm pórusátmérőjű transwell inszertek felső kamráiba. Néhány óra múlva, amikor a sejtek letapadtak a rendelkezésre álló felszínre, a 4T1 sejteket tartalmazó inszerteket a NIH/3T3 sejtekre helyeztük. Másnap az alsó kamrában található sejtekre nanorészecskéket tartalmazó, friss médiumot helyeztünk, és a sejteket 24 órán keresztül kezeltük. Minden mintából két biológiai párhuzamost készítettünk a teljes kísérlet során. A 24 órás kezelést követően a 4T1 sejteket tartalmazó inszerteket eltávolítottuk, majd

fixálás és kristály-ibolyás festést követően megbizonyosodtunk a 4T1 sejtek jelenlétéről az inszerteken.

A 6 lyukú lemezben maradt NIH/3T3 sejtekből RNeasy Kit (Qiagen) segítségével RNS-t izoláltunk. A kapott RNS-ek koncentrációját Qubit RNA HS reagens és Qubit 2.0 fluoriméter segítségével meghatároztuk, majd az izolált RNS-ek minőségét Agilent RNA 6000 Nano Chip felhasználásával kapilláris gélelektroforézissel ellenőriztük Agilent Bioanalyzer 2100 készülékkel. Mivel minden RNS minta RNS integritás (RIN) értéke megfelelt a kritériumoknak ($RIN \geq 8$), a mintákból mintánként 1 μ g totál RNS-t felhasználva nem-szálspecifikus szekvenáló könyvtárakat készítettünk Illumina TruSeq RNA Sample Prep v2 kittel a gyártó által kidolgozott LS protokoll szerint. Ennek során a totál RNS mintából poliA szelekcióval mRNS-t izoláltunk, ebből kémiai fragmentálást követően kettősszalú cDNS-t készítettünk, amelyhez ligáltuk az indexált szekvenáló adaptereket. Az elkészült szekvenáló könyvtárak méret eloszlását Agilent DNA 1000 Chip felhasználásával Agilent Bioanalyzer 2100 segítségével kapilláris gélelektroforézissel ellenőriztük, majd az egyes könyvtárakat NEBNext Library Quant Kit (New England BioLabs) alkalmazásával Pico Real-Time qPCR rendszerben (Thermo Scientific) kvantifikáltuk. A kvantifikálást követően az egyes mintákon Illumina MiSeq NGS platformon MiSeq Reagent kit V3-150 szekvenáló reagenssel 2x75 bp paired-end szekvenálást végeztünk el.

A szekvenálási adatok elsődleges analízisét (bázis azonosítás, demultiplexálás, fastq fájl generálás) a MiSeq Control Software (MSC v2.6.2.1) részét képező Run-Time Analysis (RTA v1.18.54) szoftver végezte. A szekvenálás során azonosított bázisok 98,15%-a rendelkezett Q30-nál magasabb minőségi mutatóval. A fastq szekvencia fájllokból a rövid (<36 bázis) leolvasásokat, illetve az alacsony minőségű (<Q20) szekvencia részeket Trimmomatic 0.33 szoftverrel távolítottuk el paired-end üzemmódban a következő paraméterekkel: TRAILING:10 SLIDINGWINDOW:4:20 MINLEN:36. A párral rendelkező szekvenciákat TopHat 2.0 program segítségével illesztettük (a következő paraméterekkel: --library-type fr-unstranded --b2-very-sensitive --coverage-search -r 0) a Bowtie 2 programmal indexált GRCm38.p5 egér referencia genomra (forrás: <http://www.genencodegenes.org>). Az így létrehozott bam illesztési fájlokat samtools programmal rendeztük és deduplikáltuk; majd differenciális génexpresszió analízist végeztünk Cuffdiff programmal (-library-type fr-unstranded paraméterrel)

felhasználva a referencia genomnak megfelelő gén annotációs fájlt (gencode.vM12.annotation.gtf).

Az adatokon HeatMapper alkalmazás felhasználásával hierarchikus klaszterezést végeztünk, és hőtésképen ábrázoltuk azon gének expressziós értékeit, amelyek kifejeződése legalább az egyik nanorészecske kezelés során szignifikáns változást mutatott. A klaszterezések során átlagos láncmódszert (Average linkage) és euklideszi távolság meghatározási módszert alkalmaztunk. A génontológiai analízis során a statisztikailag várhatónál nagyobb számú szignifikánsan változó expressziójú gént tartalmazó (halmozódást mutató) GO kategóriákat binomiális teszten alapuló „PANTHER statistical overrepresentation” teszttel azonosítottuk, a többszörös összehasonlítás miatt a P érték meghatározásához Bonferroni korrekciót alkalmaztunk. Azon génontológiai csoportok esetén tekintettük szignifikánsnak a halmozódást, ahol a $P < 0,01$ volt. A szignifikáns dúsulást mutató génontológiai csoportokhoz tartozó P értékeket GraphPad Prism 7 szoftver segítségével hőtésképen ábrázoltuk az egyes kezelések függvényében.

5.20. *In vivo* tumornövekedés és metasztázis vizsgálata

Az *in vivo* kísérleteket az MTA Szegedi Biológia Kutatóközpont Biokémiai Intézetében, Dr. Vizler Csaba csoportjának közreműködésével végeztük el. A kísérletek előtt 8 hetes, nőstény Balb/c egereket 6-7 egyedből álló csoportokba osztottunk, majd az egyes állatok emlőszövetébe 100 000 4T1 tumorsejtet oltottunk. Miután a tumorok a 4T1 sejtek transzplantációját követő 5. napon jól tapinthatóvá váltak, az állatokat a csoportoknak megfelelő kezeléseket részesítettük. Az állatokat a kísérlet során négyszer kezeltük (az 5., 7., 9. és 12. napon). A PBS-ben oldott Doxorubicint (Sigma) 4 mg/kg dózisban, intravénás adminisztrációban alkalmaztuk ($V=100 \mu\text{L}$), míg az arany-ezüst hibrid nanorészecskéket peritumorálisan ($V=4 \times 20 \mu\text{L}$) juttatuk az állatokba 4,8 $\mu\text{mol/kg}$ dózisban. A kísérlet során az intravénás és a peritumorális adminisztrációk mellett is alkalmaztunk placebo kontroll csoportokat, ahol a beadott anyagok mennyiségével megegyező térfogatú PBS-t juttattunk az állatokba. A kísérletek során folyamatosan regisztráltuk a tumorok térfogatát. A tumorok szélességét, magasságát és mélységét digitális tolómérő segítségével mértük meg, és a tumoros szövet térfogatát a három mért paraméter szorzatával fejeztük ki. A tumorsejtek transzplantációját követő 14. napon

abbahagytuk a primer tumorok méretének regisztrálását, és további 14 napot vártunk annak érdekében, hogy a tüdőben kolonizált tumorsejtek detektálható méretűre fejlődjenek. A kísérlet végén az állatokat eutanáziában részesítettük, majd eltávolítottuk az állatok tüdejét, máját, lépét valamint a primer tumort. Az egyes szervek friss tömegét analitikai mérleg segítségével meghatároztuk, majd 4%-os formalin oldatban fixáltuk. A tüdők dorzális és ventrális felszínéről Nikon Coolpix 4500 kamerával felszerelt Nikon SMZ1000 sztereomikroszkóp segítségével felvételeket készítettünk, majd meghatároztuk az egyes tüdőkön található felszíni metasztatikus nodulusok számát. A formalinban fixált tüdőket az SZTE Pathológia Intézetében paraffinba ágyzták, metszették és a kapott metszeteket hematoxylinnal és eozinnal festették. A metszetekről átfedő fényképeket készítettünk Olympus BX51 mikroszkóp segítségével, majd a felvételeket Hugin szoftver segítségével összeillesztettük. A teljes tüdőt reprezentáló képeken a metasztatikus szövetek illetve a teljes metszet területét ImageJ program segítségével határoztuk meg, és a kapott morфомetriai adatok segítségével kiszámoltuk az egyes metszetekben található metasztatikus területek százalékos mennyiségét.

5.21. Statisztikai analízis

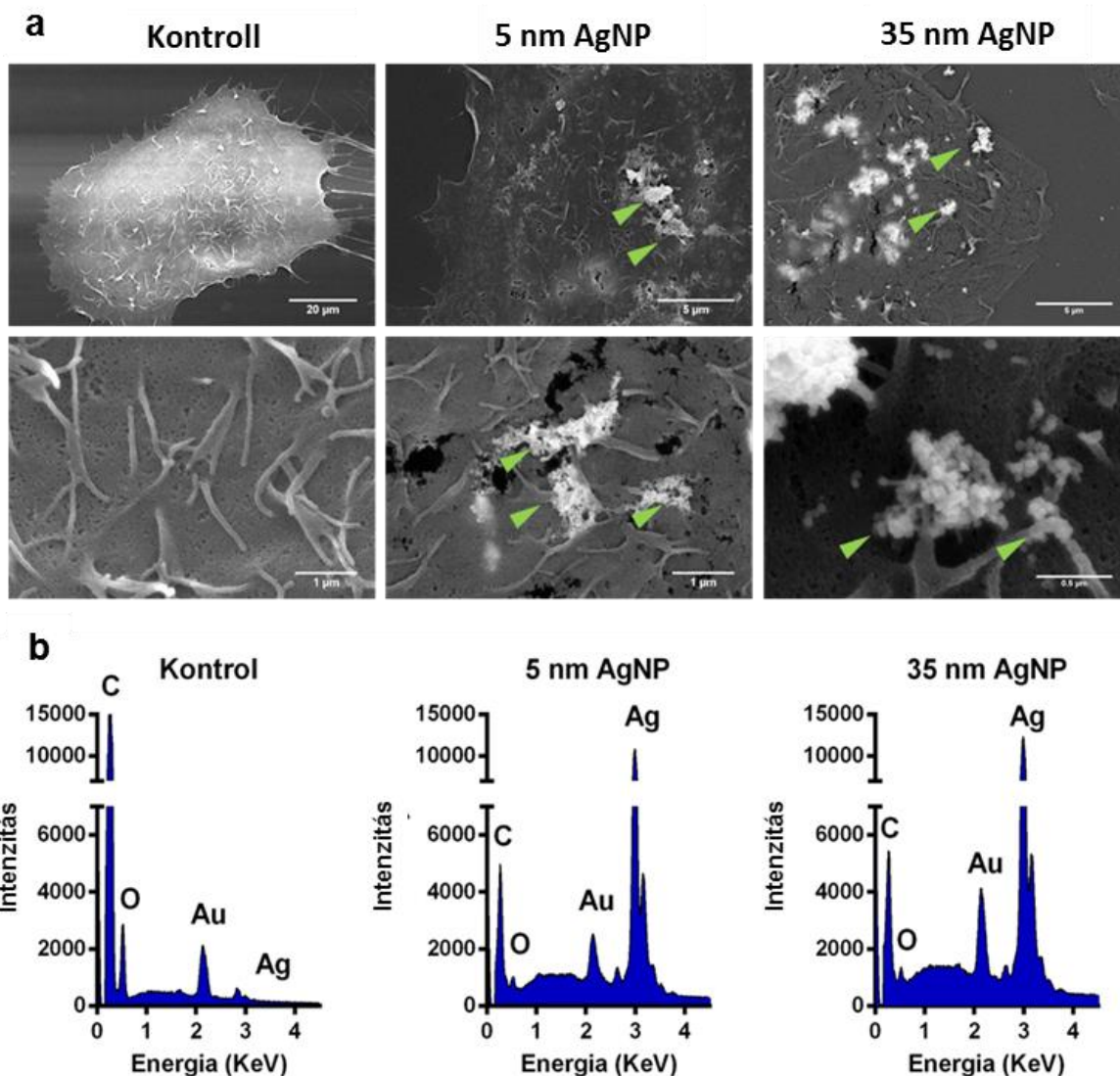
A nyersadatok statisztikai elemzését és az adatsorok grafikus ábrázolását GraphPad Prism 7 szoftver alkalmazásával végeztük el. Minden esetben az ábraalírásokban feltüntettük, milyen statisztikai tesztet végeztünk el az adott kísérlet során. Az egyes különbségeket akkor vettük statisztikailag szignifikánsnak, ha a meghatározott P érték kisebb volt, mint 0,05. Az egyes rövidítések a következőket jelölik: $*P \leq 0,05$; $**P \leq 0,01$; $***P \leq 0,001$; $****P \leq 0,0001$.

6. Eredmények és értékelésük

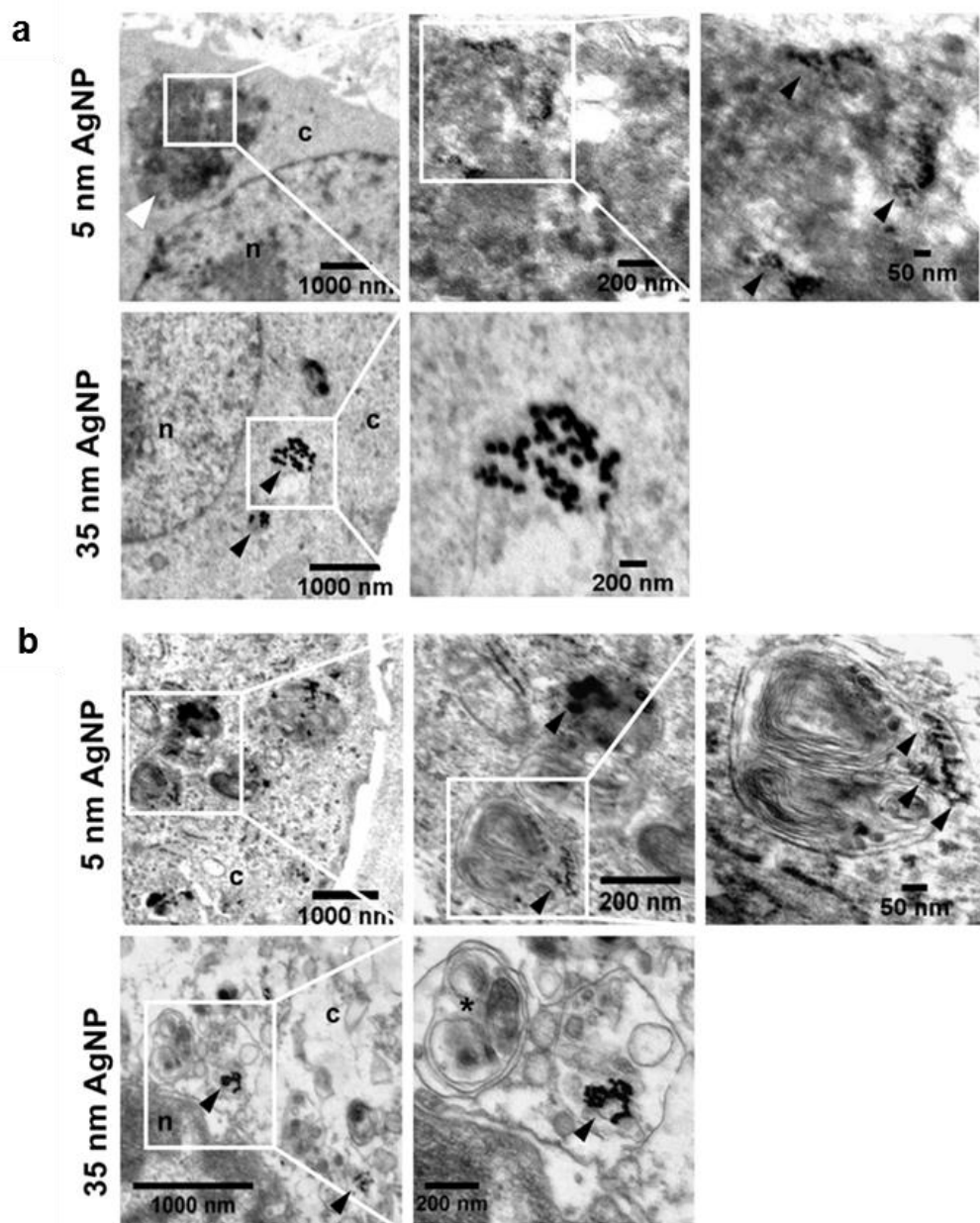
6.1. Az ezüst nanorészecskék megtapadnak és átjutnak az oszteoszarkóma sejtek plazmamembránján

Munkánk során először azt vizsgáltuk, hogy az előállított nanopartikulumok képesek-e bejutni oszteoszarkóma sejtekbe. Mivel a nanorészecskék felvételének első lépése a részecskék megtapadása a sejtek felszínén, fontos volt ellenőrizni, hogy a kezelések során alkalmazott 5 illetve 35 nm átmérőjű nanorészecskék megtapadnak-e a sejtek plazmamembránján. Ennek érdekében U2Os sejteket kezeltünk a készített 5 és 35 nm méretű nanorészecskékkel és 24 óra után SEM segítségével vizsgáltuk a plazmamembrán felszínén lévő nanorészecskéket (**5. ábra**). A SEM felvételeken jól látható, hogy a kezelések után mind a nagyobb, mind a kisebb méretű nanorészecskék megtapadtak és aggregátumokat képeztek a U2Os sejtek felszínén. EDS detektor segítségével meghatároztuk a minták elemi összetételét is (**5. ábra**). Míg a kontroll minta esetén, a hisztogramon csak a biológiai mintákra jellemző szén, oxigén és a SEM mintakészítésnél alkalmazott aranyat jelző csúcsok vannak jelen, addig a nanorészecskékkel kezelt mintákban ezüst is található, ami bizonyítja, hogy a sejtek membránján megtapadt részecskék valóban ezüst-alapú partikulumok.

Az ezüst nanorészecskékkel kezelt sejtek transzmissziós elektronmikroszkópos megfigyelésével (TEM) azt vizsgáltuk, hogy az alkalmazott nanorészecskék bejutnak-e a felhasznált U2Os és Saos-2 oszteoszarkóma sejtekbe. A TEM felvételek analízise során mindkét vizsgált sejtvonalban jól felismerhető, elektrondenz, szférikus nanopartikulumokat azonosítottunk az ezüst nanorészecskékkel kezelt sejtekben. A reprezentatív felvételek jól demonstrálják, hogy a U2Os (**6a. ábra**) és a Saos-2 sejtek (**6b. ábra**) is képesek felvenni az 5 és 35 nm méretű ezüst nanorészecskéket. A nanorészecskék a sejtmagokban nem voltak detektálhatóak, viszont nanorészecskéket találtunk elektrondenz, membránnal burkolt vezikulákban, multivezikuláris testekben illetve a citoplazmában is. A nanorészecskékkel kezelt sejtekben membránba csomagolt sejtorganellumokat is azonosítottunk, ami az autofágiához kapcsolható sejtbiológiai folyamatok aktiválódására utal.



5. ábra. Az ezüst nanorészecskék megtapadnak az oszteoszarkóma sejtek plazmamembránján. **(a)** A két eltérő méretű ezüst nanorészecskével kezelt U2Os sejtek SEM felvételei. Zöld nyilak jelzik a plazmamembrán felszínén aggregálódott nanorészecskéket. **(b)** A SEM preparátumok elemi összetételét mutató EDS hisztogramok.



6. ábra. Az oszeoszarkóma sejtek felveszik az ezüst nanorészecskéket. Az 5 és 35 nm átmérőjű ezüst nanorészecskékkal kezelt U2Os (a) és Saos-2 (b) sejtek transzmissziós elektronmikroszkópos felvételei. A fehér nyíl elektrondenz, membránnal burkolt, nanorészecskéket tartalmazó vezikulákra mutat. Fekete nyilak jelzik a sejten belül található nanorészecskéket. (* – membránnal burkolt sejt organelumok, c – citoplazma, n – sejtmag)

6.2. Az ezüst nanorészecskék azonos mértékben csökkentik a U2Os és Saos-2 sejtek viabilitását

Azért, hogy kiderítsük, az eltérő méretű ezüst nanorészecskék milyen hatékonysággal képesek csökkenteni p53-at expresszáló és p53-deficiens tumorsejtek életképességét, vad típusú p53-at kifejező U2Os és p53-hiányos Saos-2 oszteoszarkóma sejteken vizsgáltuk a két eltérő mérettartományú ezüst kolloid oldat biológiai hatásait. Mivel az irodalom előzetes eredményei alapján úgy gondoltuk, hogy a kisebb nanorészecskéknek erősebb citotoxikus hatásuk van, mint a nagyobbaknak, az 5 nm átmérőjű nanorészecskéket 5 – 25 μM koncentrációban, a nagyobb, 35 nm átmérőjű részecskéket pedig ennél magasabb, 20 – 100 μM koncentrációtartományban alkalmaztuk a sejteken, majd 24 és 48 óra múlva MTT esszé segítségével meghatároztuk a sejtek viabilitását. A kapott pontokra egyeneseket illesztettünk és kiszámoltuk az egyes kezelésekhez tartozó IC_{50} értékeket, amely azokat a nanorészecske koncentrációkat mutatja, ahol a sejtek viabilitása a felére csökken a kezeletlen, kontroll minták életképességéhez képest (**3. táblázat**).

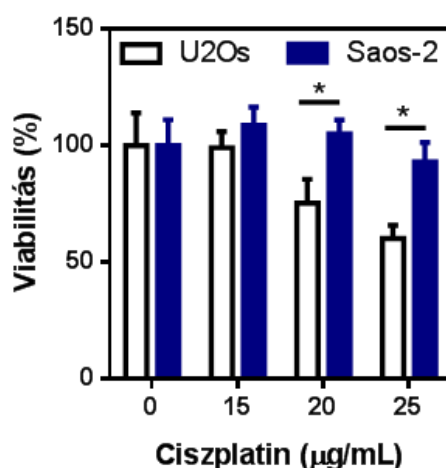
Sejtvonal	Kezelés (óra)	IC_{50} (μM)	
		5 nm AgNP	35 nm AgNP
U2Os	24	30,3	91,1
	48	15,6	46,8
Saos-2	24	20,6	87,8
	48	13,9	44,5

3. táblázat. Az egyes kezelésekhez tartozó IC_{50} értékek U2Os és Saos-2 sejteken.

A kapott egyenesek és a kiszámolt IC_{50} értékek alapján megállapítható, hogy ez ezüst nanorészecskék koncentráció- és időfüggő módon képesek csökkenteni a vizsgált oszteoszarkóma sejtek viabilitását. Ezt alátámasztja az, hogy a 48 óráig tartó kezelések után számított IC_{50} értékek minden esetben körülbelül az 50%-ai voltak azoknak az értékeknek, amelyeket a 24 óra kezelés után kapott adatokból számítottunk. Mivel az IC_{50} értékek

tekintetében nem tapasztaltunk jelentős különbségeket a vizsgált sejtvonalak között, úgy tűnik, hogy az ezüst nanorészecskék ugyanolyan hatékonysággal képesek a vad típusú p53-at kifejező U2Os és a p53-at nem tartalmazó Saos-2 sejtek életképességét is csökkenteni. Mivel mindkét sejtvonal esetén, minden kezelés után alacsonyabb IC₅₀ értékeket határoztunk meg a kisebb nanorészecskével történő kezelések után, egyértelműen látszik, hogy az 5 nm átmérőjű ezüst nanorészecskék toxikusabbak, mint a nagyobb, 35 nm méretű partikulumok.

Hasonló kísérletet végeztünk el a kemoterápia során gyakran alkalmazott Ciszplatin felhasználásával is, hogy összehasonlítsuk a két sejtvonal túlélését egy klinikailag alkalmazott citotoxikus hatóanyaggal szemben is. U2Os és Saos-2 sejteket kezeltünk Ciszplatinnal 15 – 25 µg/mL koncentrációban 24 óráig, majd MTT esszé segítségével meghatároztuk a sejtek viabilitását (7. ábra). Jól látszik, hogy míg a vad típusú p53-at kifejező U2Os sejtek életképessége a Ciszplatin növekvő dózisával együtt koncentrációfüggő módon csökkent, addig a p53-hiányos Saos-2 sejtek ellenálltak a kezelésnek.



7. ábra. A Ciszplatin hatása U2Os és Saos-2 sejtek viabilitására. Míg a vad típusú p53-at kifejező U2Os sejtek koncentrációfüggő módon reagálnak, a p53-hiányos Saos-2 sejtek ellenállnak a Ciszplatin kezelésnek. (Kétutas ANOVA)

A további kísérletek során az ezüst nanorészecskéket minden esetben 24 órás kezelésekként alkalmaztunk. Mivel arra szeretnénk volna választ kapni, hogy a két eltérő méretű nanorészecske ugyanolyan útvonalakon vagy eltérő sejten belüli célpontokon keresztül, különböző mechanizmusok során fejti ki citotoxikus hatását, a további kísérletek során mindkét

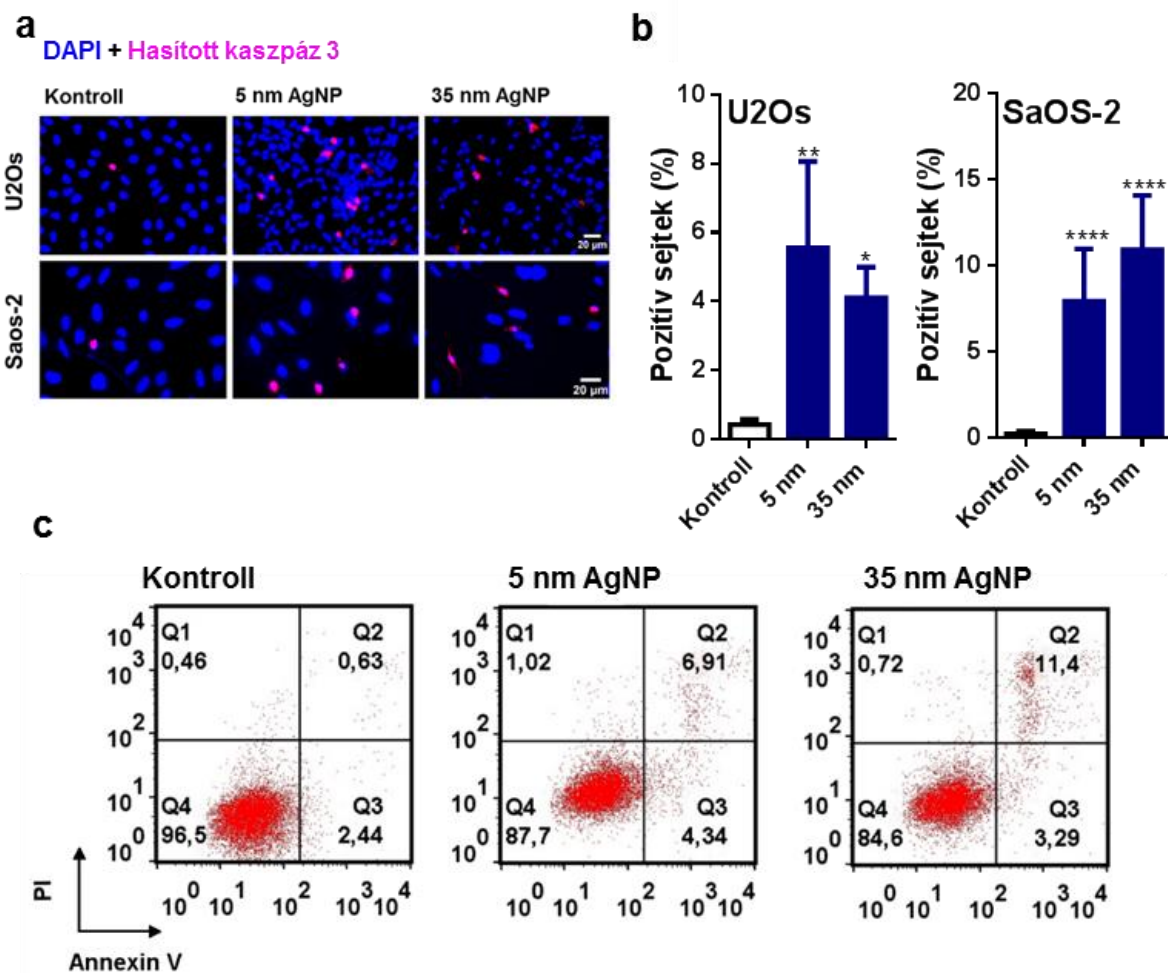
méretű nanorészecskét olyan koncentrációban alkalmaztuk, melyek megközelítőleg ugyanolyan mértékű biológiai hatást váltanak ki. Ez azt jelenti, hogy az 5 nm átmérőjű részecskéket 25 μM , a 35 nm átmérőjű ezüst nanorészecskéket pedig 85 μM koncentrációban alkalmaztuk, melyek megközelítik a tapasztalt IC_{50} értékeket, tehát körülbelül 50%-al csökkentik a sejtek viabilitását.

6.3. Az ezüst nanorészecskék kaspáz 3-függő apoptózist indukálnak oszteosarkóma sejtekben

Habár az ezüst nanorészecskék a Ciszplatinnal ellentétben, egyenlő mértékben csökkentették a U2Os és a Saos-2 sejtek viabilitását, szerettünk volna megbizonyosodni arról is, hogy citotoxikus hatásuk hátterében az apoptotikus folyamatok aktiválódása áll. Annak érdekében, hogy detektáljuk az ezüst nanorészecskék által okozott apoptotikus sejthalált, vizsgáltuk a kaspáz 3 apoptózis effektor aktiválódását ezüst nanorészecske kezelések során. Azt is szerettük volna megtudni, hogy az ezüst nanorészecskék által indukált sejthalál során a p53-hiányos sejtekben ugyanolyan mértékben indukálódik-e az apoptózis egyik effektor kaspázának aktiválódása, mint vad típusú p53-at kódoló sejtekben. Ennek érdekében 24 órán keresztül kezeltünk U2Os és Saos-2 sejteket 25 μM koncentrációban 5 nm, illetve 85 μM koncentrációban 35 nm átmérőjű ezüst nanorészecskékkel, majd fixálást követően hasított kaspáz 3-at felismerő ellenanyag segítségével festettük a mintákat, annak érdekében, hogy meghatározzuk a hasított kaspáz 3-at tartalmazó sejtek százalékos mennyiségét (**8a, b ábra**). Az ezüst nanorészecske kezelések hatására megemelkedett azoknak a sejteknek a mennyisége, melyekben aktiválódott az apoptózis effektor kaspáza, ráadásul, az 5 nm és a 35 nm átmérőjű nanorészecskék az alkalmazott koncentrációkban egyenlő mértékben indukálták a kaspáz 3 aktiválódását. Mivel a nanorészecskék a Saos-2 sejtekben is indukáltak kaspáz 3 aktiválódást, feltételezhető, hogy az ezüst nanorészecskék p53-független úton is képesek apoptotikus sejthalált indukálni.

Az apoptózis mellett nekrosis is okozhat sejthalált. Hogy megbizonyosodjunk arról, hogy az ezüst nanorészecske kezelések következtében a p53-hiányos Saos-2 sejtek apoptotikus folyamatok, vagy nekrosis miatt pusztulnak el, az 5 és 35 nm átmérőjű ezüst nanorészecskékkel kezelt sejteket Annexin V-el és Propídium-jodiddal festettük, majd áramlási citométer

segítségével vizsgáltuk (**8c ábra**). A reprezentatív citogramokon jól látszik, hogy a kezelések hatására kizárólag a 2-es és a 3-as kvadránsban (Q2, Q3) emelkedik meg a sejtek száma, ami arra utal, hogy a sejtek haláluk során externalizálják a foszfatidil-szerin molekulákat, tehát apoptotizálnak.



8. ábra. Az ezüst nanorészecskék kaszpáz 3-függő apoptózist okoznak oszteosarkóma sejtekben. (a-b) Az 5 illetve 35 nm átmérőjű nanorészecskék kaszpáz 3 aktiválódást indukálnak U2Os és Saos-2 sejtekben is. A kezelt sejteket hasított kaszpáz 3-at felismerő ellenanyaggal festettük, majd meghatároztuk a festődött sejtek %-os mennyiségét. (egyszempontos ANOVA). **(c)** Az ezüst nanorészecskékkel kezelt Saos-2 sejteket Annexin V-el és Propídium-jodiddal festettük, majd az egyes sejteket áramlási citométerrel vizsgáltuk. Jól látszik, hogy az egyes kezelések emelik az Annexin V-, és Annexin V/Propídium-jodid-pozitív sejtek számát.

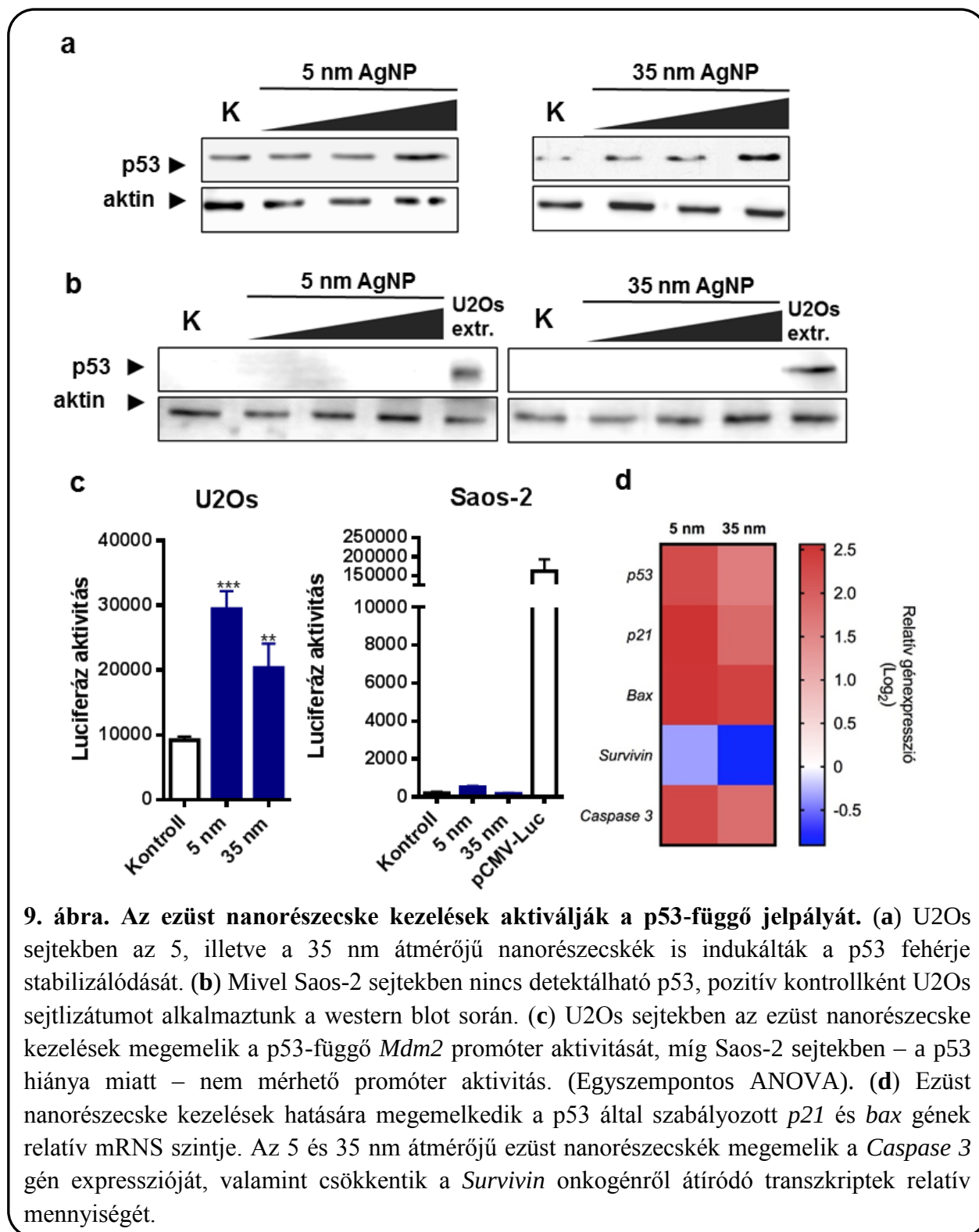
6.4. Az ezüst nanorészecskék aktiválják a p53-függő jelpályát

Habár azt tapasztaltuk, hogy az ezüst nanorészecskék p53 hiányában is képesek apoptózist okozni a vizsgált tumorsejtekben, kíváncsiak voltunk arra is, hogyan változik a p53-függő jelátviteli útvonal működése ezüst nanorészecske kezelések hatására. Először azt szeretnénk volna megvizsgálni, hogy az ezüst nanorészecskék indukálják-e a p53 fehérje stabilizálódását. Ennek érdekében 0; 10; 15 és 20 μM koncentrációkban kezeltük a sejteket az 5 nm átmérőjű nanorészecskékkel, míg a 35 nm átmérőjű nanorészecskéket 0; 40; 60 és 85 μM koncentrációkban alkalmaztuk U2Os és Saos-2 sejteken, majd 24 óra múlva western blot segítségével vizsgáltuk a p53 fehérje mennyiségét a sejtlizátumokban (**9a, b. ábra**). Jól látszik, hogy a két eltérő méretű nanorészecske a legmagasabb alkalmazott koncentrációkban a p53 fehérje jelentős stabilizálódását okozta U2Os sejtekben. Saos-2 sejtekben, a vártan megfelelően, nem detektáltunk p53 fehérjét.

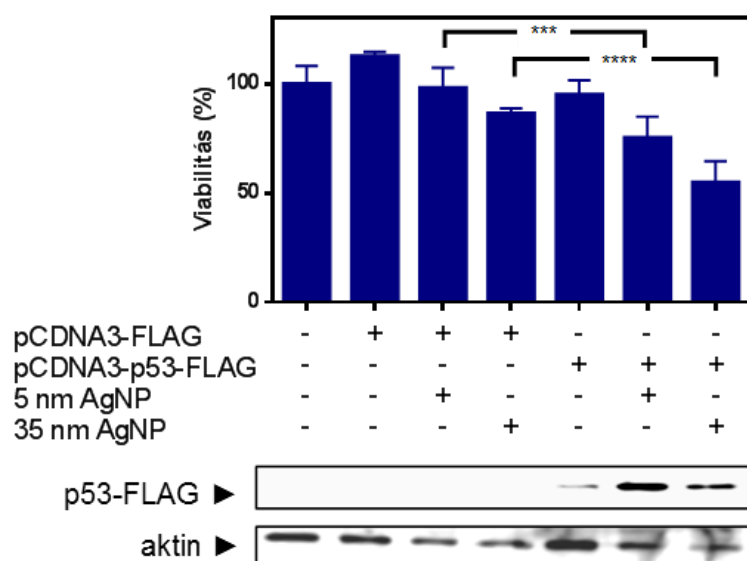
Mivel azt feltételeztük, hogy a p53 fehérje a nanorészecske kezelések során nem csak stabilizálódik, hanem funkcionálisan is aktiválódik, a tumorszuppresszor fehérje transzaktivációs képességét is megvizsgáltuk az ezüst nanorészecske kezelések során. Ehhez a sejteket olyan riporter plazmiddal transzfektáltuk, amin a luciferáz riporter gén transzkripciója az *Mdm2* gén p53-függő promóterének szabályozása alatt áll. A transzfektálás után 24 órával a sejteket ezüst nanorészecskékkel kezeltük, majd újabb 24 órát követően meghatároztuk a luciferáz riporter gén aktivitását az egyes mintákban (**9c. ábra**). A p53 hiányos Saos-2 sejtekben nem detektáltunk luciferáz aktivitást, tehát igazoltuk, hogy a U2Os sejtekben mért riporter aktivitás kizárólag a p53 transzkripciót szabályozó működéséből adódik. Mivel Saos-2 sejtekben a plazmidon lévő *Mdm2* promóternek nincs aktivitása, a transzfekció során pozitív kontrollként, magas bazális aktivitású CMV promótert tartalmazó luciferáz riporter plazmidot transzfektáltunk a p53-deficiens sejtekbe. Mivel a U2Os sejtekben a kezelt mintákban tapasztaltakhoz képest az ezüst nanorészecske kezelések szignifikánsan megnövelték a p53-függő riporter gén által kódolt luciferáz enzim aktivitását, igazoltuk, hogy az ezüst nanorészecske kezelések megemelték a p53 transzaktivációs képességét.

Annak érdekében, hogy a teljes p53-függő jelpálya működését megvizsgáljuk, U2Os sejtekben tanulmányoztuk a p53 által szabályozott *p21* és *bax* gének mRNS szintjének változását is ezüst nanorészecske kezelések hatására (**9d. ábra**). Mindkét, eltérő méretű ezüst

nanorészecske kezelés hatására jelentősen megnőtt a p53-függő *p21* és *Bax*, valamint a *p53* és *Caspase 3* gének relatív mRNS szintje is, míg a kezelések csökkentették a *Survivin* onkogén relatív expresszióját.



Úgy tűnik, hogy U2Os sejtekben a kisebb és nagyobb méretű ezüst nanorészecske kezelések is aktiválják a teljes p53-függő jelpályát. Azonban kíváncsiak voltunk arra is, hogyan reagálnak a p53-hiányos sejtek a nanorészecske kezelésekre abban az esetben, ha p53 fehérjét termeltetünk bennük. Ezért FLAG-peptiddel jelölt p53-at expresszáló pCDNA3 plazmiddal Saos-2 sejteket transzfektáltunk, majd vizsgáltuk a nanorészecske kezelések citotoxikus hatását (10. ábra).



10. ábra. Az ektopikusan expresszált p53 megemeli az ezüst nanorészecskék citotoxikus hatását Saos-2 sejtekben. A Saos-2 sejteket FLAG-jelölt p53-at expresszáló pCDNA3 vektorral transzfektáltuk, majd MTT esszé segítségével vizsgáltuk az ezüst nanorészecskék citotoxikus hatását. A transzgén sikeres kifejeződését western blot segítségével ellenőriztük. (Egyszempontos ANOVA)

A transzfekció kontrolljaként üres pCDNA3-FLAG vektort juttattunk a sejtekbe. A transzfektálások után 24 órával ezüst nanorészecskékkel kezeltük a sejteket, majd MTT esszé segítségével vizsgáltuk a sejtek viabilitását. A kezelések során olyan koncentrációban alkalmaztuk a nanorészecskéket, amelyeknek önmagukban nincs mérhető hatása a sejtek viabilitására. Ez azt jelenti, hogy az 5 nm-es részecskéket 10 μ M, a 35 nm átmérőjű nanopartikulumokat pedig 50 μ M koncentrációban alkalmaztuk a sejteken. A 24 órás kezeléseket követően a párhuzamos minták egyik felében MTT esszé segítségével meghatároztuk a sejtek viabilitását, a minták másik részében pedig western blot segítségével

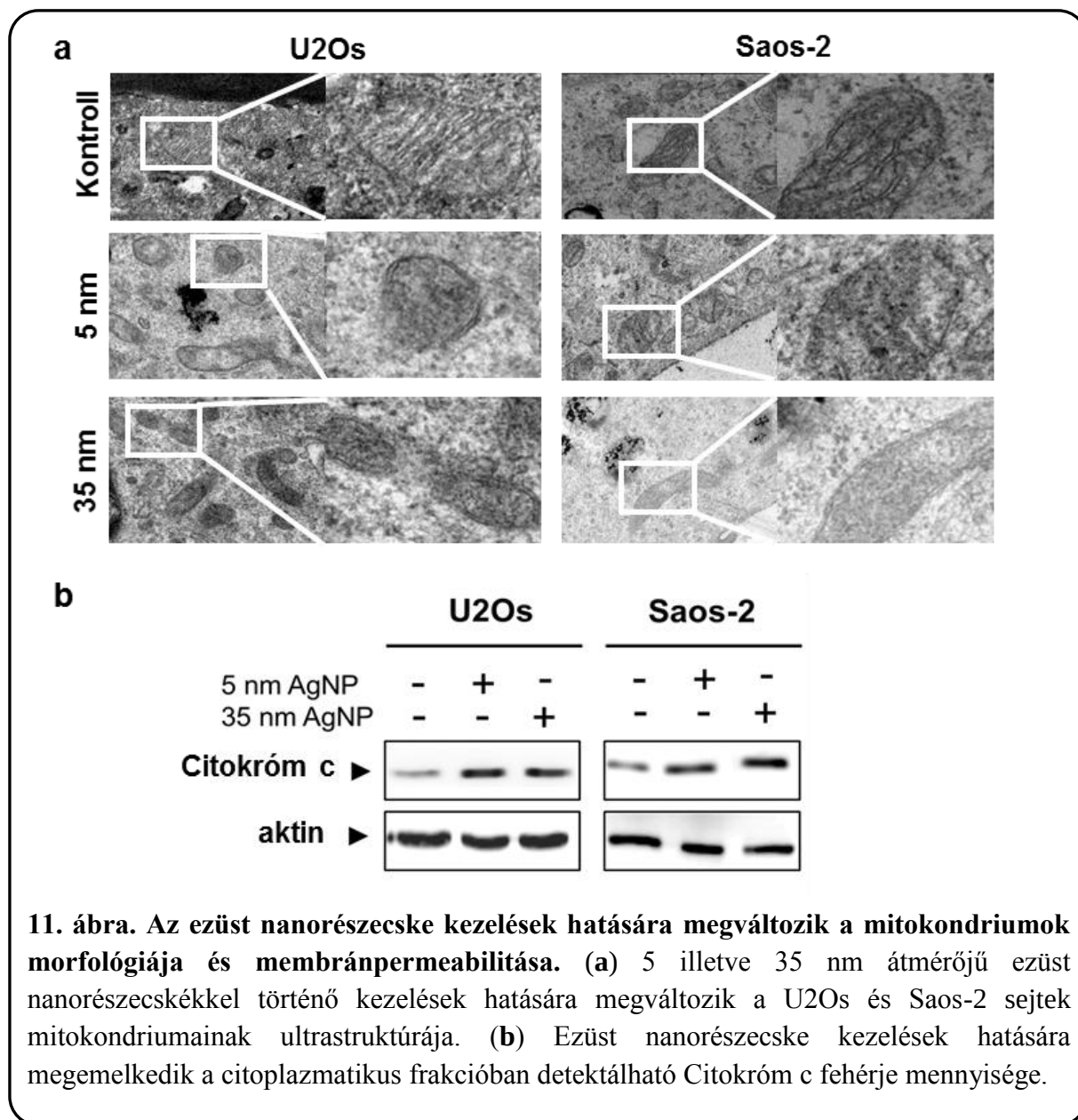
igazoltuk a FLAG-fúzionált p53 sikeres ektopikus expresszióját. Az üres, pCDNA3-FLAG vektorral, az ektopikus p53-at kifejező pCDNA-p53-FLAG plazmiddal, illetve az üres vektorral transzfektált és egyben nanorészecskékkel is kezelt sejtek viabilitása nem tért el jelentősen a kezeletlen, kontroll mintában mért értékektől (**10. ábra**, diagram 1 és 2-4 oszlopok). Abban az esetben azonban, amikor a sejtekben p53-at fejeztünk ki és nanorészecske kezeléseket is alkalmaztunk, a sejtek viabilitása szignifikánsan alacsonyabb volt, mint akkor, amikor a p53-at kifejező vektor helyett üres plazmiddal transzfektáltuk a sejteket (**10. ábra**, diagram, 3-4 és 6-7 oszlopok). Érdekes módon, a U2Os sejtekben megfigyelt endogén p53 fehérjéhez hasonlóan, az ezüst nanorészecske kezelés hatására az ektopikusan kifejezett p53 fehérje szintje is megemelkedett Saos-2 sejtekben a kezeletlen mintákhoz képest (**10. ábra**). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a p53 ektopikus expressziója befolyásolja az ezüst nanorészecskék citotoxikus hatását Saos-2 sejtekben.

6.5. Az ezüst nanorészecskék mitokondriális stresszt okoznak

Habár U2Os sejtekben az ezüst nanorészecske kezeléseket aktiválták a p53-függő jel pályát, az ezüst nanorészecskék a p53-at nem tartalmazó Saos-2 sejtekben hasonló mértékben képesek apoptózist indukálni, mint U2Os sejtekben. Úgy gondoltuk, hogy a megfigyelt p53 aktiválódás csak egy másodlagos hatás lehet, és az ezüst nanorészecskék elsődlegesen valamilyen eltérő, p53-független úton okoznak sejthalált. Mivel a mitokondrium károsodása közvetlenül képes a programozott sejthalál elindítására, azt feltételeztük, hogy az ezüst nanorészecskék apoptotikus hatásai mögött a mitokondriális funkciók közvetlen károsítása áll. Hogy ezt a hipotézist teszteljük, a sejteket ezüst nanorészecskékkel kezeltük, majd olyan kísérleteket végeztünk el, melyek a mitokondriumok morfológiáját, a mitokondriális membrán áteresztőképességét és membránpotenciálját vizsgálja.

Először TEM segítségével megvizsgáltuk a 24 órán keresztül 25 μM koncentrációjú 5 nm-es, illetve 85 μM koncentrációban alkalmazott 35 nm átmérőjű ezüst nanorészecskékkel kezelt U2Os és Saos-2 sejtek mitokondriális ultrastruktúráit (**11a. ábra**). A reprezentatív elektronmikroszkópos felvételeken jól látszik, hogy a kontroll mintában megfigyelhető ép mitokondriális morfológiától eltérően, az ezüst nanorészecske kezelt sejtekben részleges, vagy

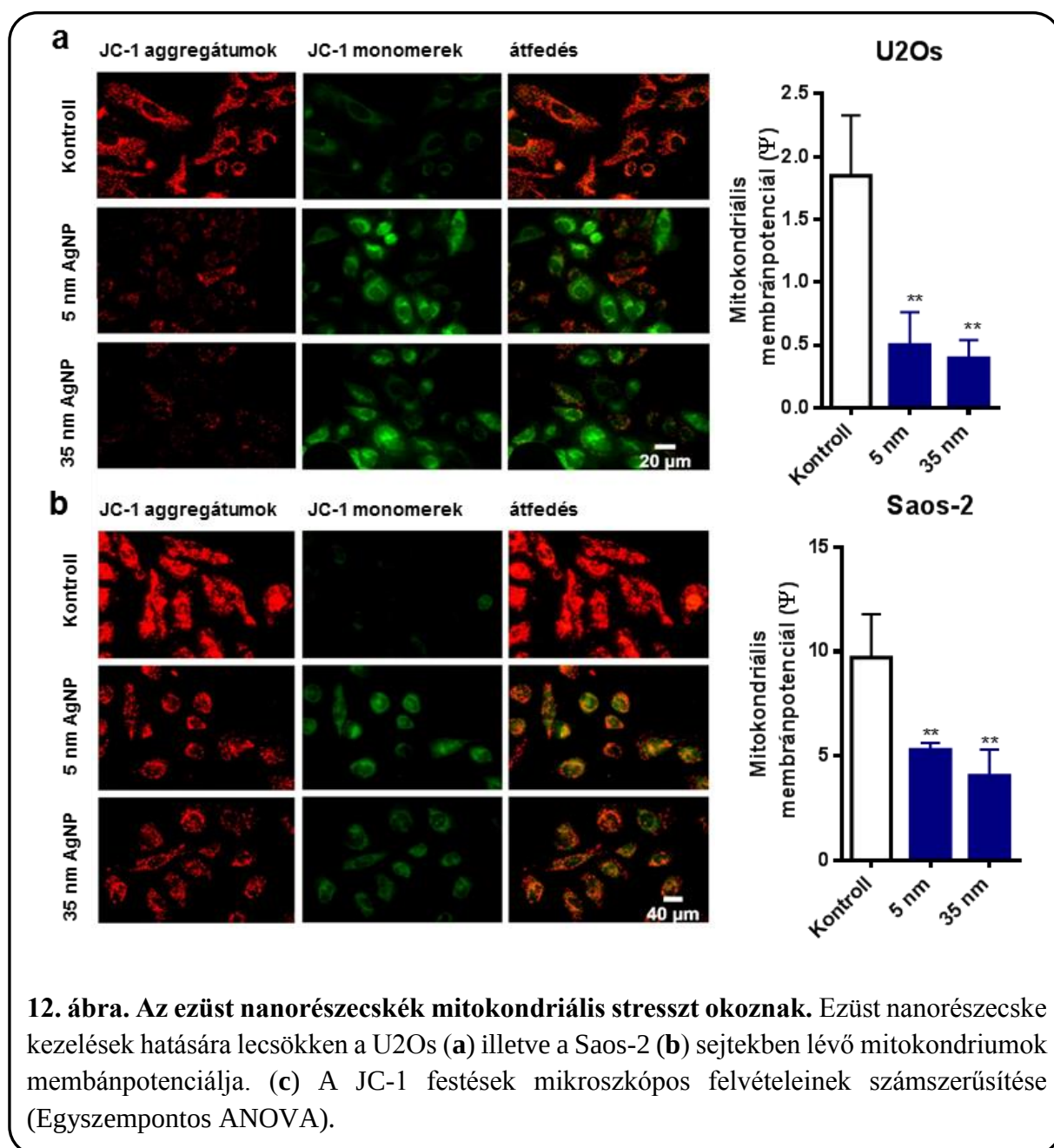
teljes krisztolízis figyelhető meg, illetve a mitokondriumok elektrondenzebbé – savasabb kémhatásúvá – válnak a kezelések hatására.



A morfológiai analízist követően Western blot segítségével vizsgáltuk az ezüst nanorészecskékkel kezelt sejtek citoplazmatikus frakcióiban található mitokondriális eredetű Citokróm c fehérje mennyiségét a korábbi kísérletekkel megegyező koncentrációjú ezüst nanorészecskékkel kezelt sejtekben. A kísérlet során emelkedett mennyiségű Citokróm c fehérjét detektáltunk a nanorészecskékkel kezelt sejtek citoplazmatikus frakcióiban, ami jelzi,

hogy a nanorészecske kezelések hatására megnő a mitokondriális membránok áteresztő képessége (11b. ábra).

Mivel ilyen jelentős változást tapasztaltunk a mitokondriumok morfológiájában, valamint permeabilitásában, mindkét sejtvonalban megvizsgáltuk, hogyan módosul a mitokondriumok membránpotenciálja ezüst nanorészecske kezelések hatására. Ehhez a mitokondriális membránpotenciál érzékeny JC-1 festékkal festettük az 5 és 35 nm átmérőjű ezüst nanorészecskékkal kezelt U2Os és Saos-2 sejteket (12. ábra).



Egészséges sejtekben a JC-1 festék akkumulálódik az ép mitokondriumokban és jól detektálható piros fluoreszcenciát mutat. Abban az esetben azonban, ha a mitokondriális membránpotenciál valamilyen okból kifolyólag lecsökken, a JC-1 festék nem képes felhalmozódni a mitokondriumokban és a citoplazmában monomer formába kerül, ahol zöld fluoreszcens jelet ad. A festékből származó fluoreszcens jel epifluoreszcens mikroszkóp felhasználásával jól detektálható és a mikroszkópos felvételek alapján meghatározott zöld és piros fluoreszcencia értékek hányadosai megadják a kísérlet során tapasztalt mitokondriális membránpotenciált (Ψ).

Látható, hogy a U2Os és a Saos-2 sejtekben az ezüst nanorészecske kezelések hatására lecsökkent az ép mitokondriumokat jelölő piros fluoreszcencia intenzitása, a citoplazmába áramló festék zöld fluoreszcenciája pedig megemelkedett. Az értékek számszerűsítése után egyértelműen látszik, hogy a vizsgált sejtekben az ezüst nanorészecske kezelések jelentősen csökkentik a mitokondriumok membránpotenciálját. Az eredményeink azt mutatják, hogy a két eltérő méretű nanorészecske ugyanolyan mértékben csökkentette a mitokondriális membránpotenciált az alkalmazott koncentrációkban.

6.6. Az arany, ezüst és arany-ezüst hibrid részecskék eltérő mértékű citotoxikus hatást gyakorolnak adenokarcinóma és fibroblaszt sejteken

Az eltérő méretű ezüst nanorészecskék apoptotikus hatásainak tanulmányozása mellett azt is szeretnénk volna megvizsgálni, hogy az eltérő összetételű, fém-alapú nanorészecskék jelenléte a tumorok mikrokörnyezetében képes-e befolyásolni a tumoros szövetekben lévő fibroblasztok és a rákos sejtek közötti kommunikációt. Ennek érdekében újból előállítottunk ezüst nanorészecskéket (AgNP), valamint készítettünk arany nanorészecskéket (AuNP) is. Ezek mellett, az előállított arany nanorészecskék felhasználásával szintetizáltunk arany-ezüst mag-héj szerkezetű hibrid részecskéket (Au@Ag) is.

A vizsgálatok első lépéseként a három előállított nanorészecske készítmény citotoxikus hatásait vizsgáltuk adenokarcinóma és fibroblaszt sejteken. Emlő tumor eredetű, humán MCF-

7, és egér 4T1 adenokarcinóma sejteken, valamint a humán MRC-5 és egér NIH/3T3 fibroblaszt sejteken, 24 órás kezelések után meghatároztuk az arany, ezüst, és az arany-ezüst hibrid nanorészecskék IC₅₀ értékeit MTT esszé segítségével (**4. Táblázat**). Míg a humán eredetű MCF-7 sejtek nem invazívak, addig a 4T1 sejtek igen erőteljes inváziós képességekkel rendelkeznek. A 4T1 sejtek invazív tulajdonsága leginkább *in vivo* körülmények között mutatkozik meg, ugyanis ezek a sejtek immunkompetens egérbe transzplantálva metasztázisra képes tumort alakítanak ki. Az arany nanorészecskék esetén az MRC-5 fibroblasztokon kívül egy esetben sem detektáltunk citotoxikus hatást a vizsgált koncentráció tartományban (2-500 µM arany). Az ezüst és a hibrid nanorészecskék esetén, a kezelések során a sejtek médiumában alkalmazott ezüst koncentrációt tekintve határoztuk meg az IC₅₀ koncentrációk értékeit. A kiszámolt IC₅₀ értékeken jól látszik, hogy az MCF-7 és 4T1 adenokarcinóma sejtek jelentősen érzékenyebbek voltak a kezelésekre, mint az MRC-5 és az NIH/3T3 fibroblaszt sejtek. Ezen kívül, az IC₅₀ értékek alapján úgy tűnik, hogy az arany-ezüst hibrid nanorészecskék kevésbé citotoxikusak, mint a csak ezüsből készült nanorészecskék. A további kísérletek során a fém nanorészecskéket nem-toxikus dózisban alkalmaztuk a sejteken, ugyanis szerettük volna elkerülni a kezelések citotoxikus természetéből adódó hatásokat. Így az arany nanorészecskéket 25 és 50 µM koncentrációban, az ezüst nanorészecskéket 20 és 40 µM koncentrációban használtuk, míg az arany-ezüst hibrid nanorészecskéket olyan mennyiségben adtuk a sejtekhez, hogy az oldat koncentrációja aranyra nézve 25 és 50 µM, ezüstre pedig 20 és 40 µM legyen.

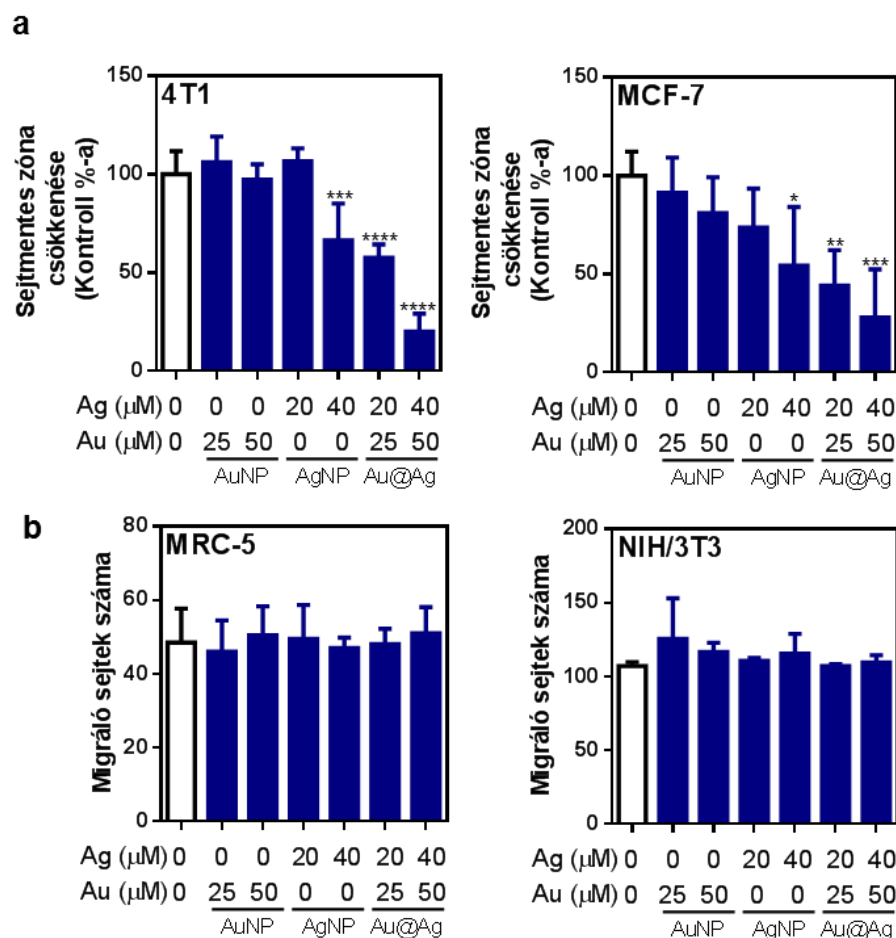
Sejtvonal	IC ₅₀ (µM)		
	AuNP	AgNP	Au@Ag
MCF-4	n.d.	68,0	133,6
4T1	n.d.	61,1	228,6
MRC-5	154,4	122,3	380,9
NIH/3T3	n.d.	109,0	316,2

4. táblázat. Az egyes fém nanorészecske kezelésekhez tartozó IC₅₀ értékek MCF-7 és 4T1 adenokarcinóma, valamint MRC-5 és NIH/3T3 fibroblaszt sejteken.

6.7. Az ezüst és arany-ezüst hibrid nanorészecskék gátolják az adenokarcinóma sejtek proliferációs és migrációs képességeit.

Mivel a tumorsejtek és a fibroblasztok proliferációs és migrációs képességei, valamint motilitásuk alapvető biológiai funkcióikat biztosító sejtbiológiai tulajdonságaik közé tartoznak, szerettük volna megvizsgálni, hogy az egyes fém nanorészecske kezelések befolyásolják-e a sejteknek ezeket a képességeit. Ennek érdekében tumorsejtekből illetve fibroblaszt sejtekből készült konfluens kultúrákat nem-toxikus dózisban, fém nanorészecskékkel kezeltük, majd „wound healing” esszé segítségével megvizsgáltuk a sejtek viselkedését. A kezeletlen adenokarcinóma sejt kultúrák a sebzés után 24 órával képesek majdnem teljes mértékben regenerálni a létrehozott sejtmentes területet. Fontos megjegyezni azonban, hogy a seb záródása során az MFC-7 és 4T1 sejtek esetén, a sejt-sejt kapcsolatok megmaradnak, ami azt eredményezi, hogy a sejtmentes zóna területe fokozatosan csökken az idő haladásával. A sejtmentes terület csökkenésének mérésével általános képet kaphatunk a kultúrában lévő sejtek motilitási képességeiről és proliferációs aktivitásairól is. Ezzel szemben, a fibroblaszt sejtek sebzés hatására képesek megszüntetni a konfluens kultúrában kialakult sejt-sejt kapcsolataikat, ami azt eredményezi, hogy a sebzést követő 24 órában a sejtmentes terület záródása helyett egyedi sejtek „migrációja” figyelhető meg. A jelenség miatt hasonló kísérlet elvégzésével az adenokarcinóma és a fibroblaszt sejtek eltérő tulajdonságai vizsgálhatóak.

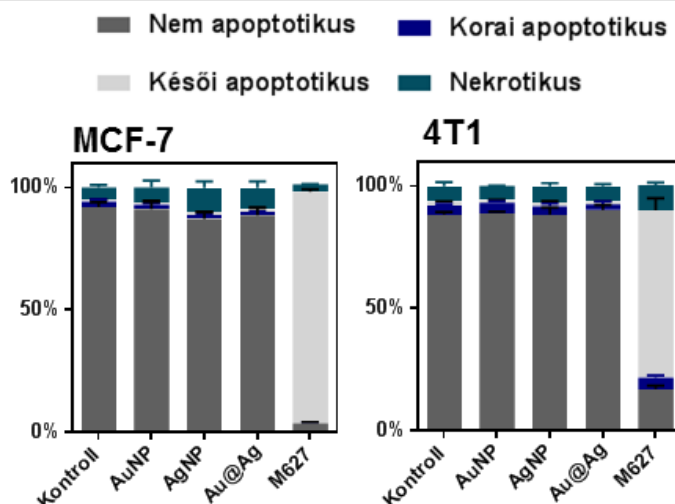
A kísérlet során azt tapasztaltuk, hogy az MCF-7 és a 4T1 adenokarcinóma sejtek hasonlóan viselkednek az egyes fém nanorészecskék jelenlétében (**13a. ábra**). Az arany nanorészecskékkel történő kezelés során nem tapasztaltunk semmilyen mérhető eltérést a kontroll és a kezelt sejtek sebzáródási hatékonysága között. Abban az esetben azonban, amikor ezüst, vagy arany-ezüst hibrid nanorészecskékkel kezeltük a sejteket, a sejtmentes terület záródása szignifikánsan lassult a kezeletlen mintákhoz képest. A kísérletet elvégeztük MRC-5 és NIH/3T3 fibroblaszt sejtekkel is, ebben az esetben azonban a sebzés után 24 órával nem a sejtmentes zóna méretét, hanem a sejtmentes területre migrált egyedi fibroblaszt sejtek számát határoztuk meg (**13b. ábra**). A kísérlet során egyik kezelés sem befolyásolta a fibroblaszt sejtek migrációs képességét.



13. ábra. A fém nanorészecske kezelések befolyásolják az adenokarcinóma sejtek „wound healing” aktivitását és nem gátolják a fibroblaszt sejtek migrációs képességeit. (a) Az adenokarcinóma sejtek esetén mért sejtmentes zóna csökkenésének számszerűsítése. (b) A sebést követő 24. órában a sejtmentes területre migrált fibroblaszt sejtek száma (Egyszempontos ANOVA).

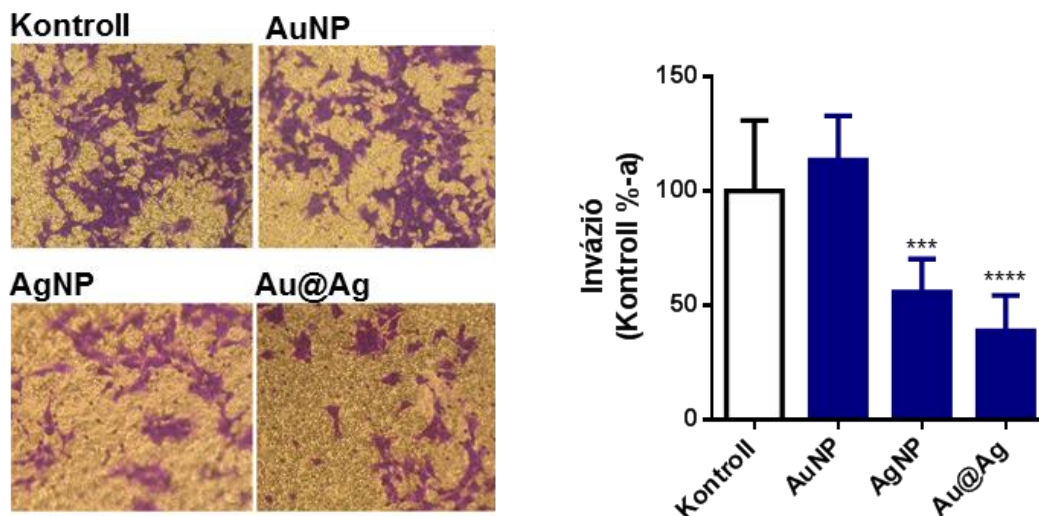
Annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a tumoros sejteken megfigyelt sebzárodást gátló hatások nem a sejtekben indukált apoptotikus folyamatok miatt következtek be, a „wound healing” esszék elvégzése után a magasabb koncentrációkkal kezelt sejteket szuszpenzióba vittük, Annexin V és Propídium-jodid segítségével megfestettük, majd áramlási citométeres vizsgálattal meghatároztuk a mintákban lévő nem apoptotikus, korai és késői apoptotikus, valamint nekrotikus sejtek arányát (**14. ábra**). Jól látszik, hogy a kezelések hatására nem változott az apoptotizáló sejtek száma a kezeletlen kontroll mintákhoz képest, tehát a „wound healing” esszék során megfigyelt gátló hatások nem a sejtekben kiváltott apoptotikus

folyamatok miatt következtek be. A kísérlet során pozitív kontrollként a jól jellemzett M624 apoptózis indukáló hatóanyaggal kezeltük a sejteket 24 órán keresztül [200].



14. ábra. A kísérletek során alkalmazott koncentrációkban az arany, ezüst és arany-ezüst hibrid nanorészecske kezelések nem váltanak ki sejthalált az MCF-7 és 4T1 adenokarcinóma sejtekben. A „wound healing” esszé végén a sejteket összegyűjtöttük, Annexin V-el és Propídium-jodiddal festettük, majd a mintákat áramlási citométer segítségével vizsgáltuk. Az a festődés alapján meghatároztuk az egyes sejtípusok százalékos arányát az egyes mintákban.

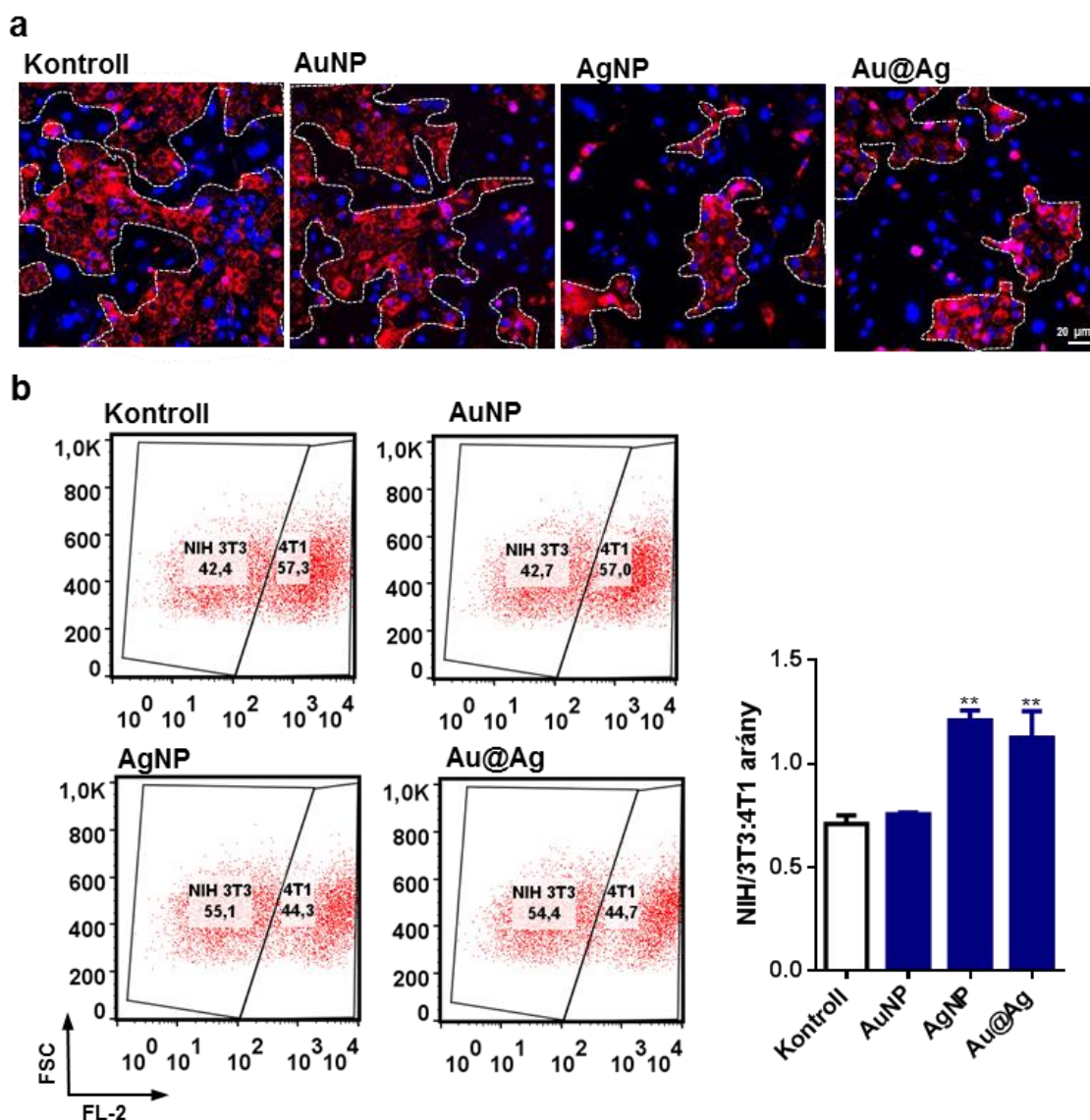
Annak érdekében, hogy megtudjuk, az ezüst és az arany-ezüst nanorészecskék képesek-e a tumoros sejtek inváziós képességét is gátolni, 8 μ m pórusátmérőjű inszertek felszínét kezeltük extracelluláris mátrix géllel és ezt követően a nanorészecskék jelenlétében 4T1 sejteket osztottunk az inszertek felső kamráiba, míg az alsó kamrába kemoattraktánsként 20% szérumot tartalmazó sejt kultúra médiumot helyeztünk. 24 óra elteltével eltávolítottuk a felső felszínen lévő sejteket és az extracelluláris mátrix gél, az inszertek alsó felszínén lévő sejteket fixáltuk és kristály ibolyával festettük, majd megvizsgáltuk, hogy a sejtek milyen mértékben migráltak át az inszertek membránjainak ellenkező oldalára (**15. ábra**). A mikroszkópos felvételekből készült számszerűsített adatok azt mutatják, hogy az ezüst és az arany-ezüst nanorészecskék képesek szignifikánsan csökkenteni az invazív 4T1 sejtek transzmigrációs képességét.



15. ábra. Az ezüst és arany-ezüst hibrid nanorészecskék gátolják a 4T1 adenokarcinóma sejtek inváziós képességét. Ezüst és arany-ezüst hibrid nanorészecske kezelésekre a 4T1 sejtek kisebb hatékonysággal képesek átmenni a matrigéllal bevont, 8 μ m pórusátmérőjű inszertek ellenkező felületére. A kísérlet végén az inszerteket fixáltuk, kristály ibolyával festettük, majd meghatároztuk az ellenkező oldalra migrált sejtek számát. (Egyszempontos ANOVA).

6.8. Az ezüst és arany-ezüst nanorészecskék gátolják a fibroblasztok tumorsejt-támogató hatásait

Több publikáció is beszámolt már arról, hogy az embrionális eredetű NIH/3T3 fibroblasztoid sejtek aktivált myofibroblaszt markereket hordoznak (pl. α SMA expresszió, magas migrációs képesség), ráadásul bizonyították, hogy *in vitro* körülmények között képesek elősegíteni a tumorsejtek proliferációját és invazív képességeit is [201, 202]. Ezen tulajdonságaik alkalmassá teszik ezeket a sejteket arra, hogy adenokarcinóma sejtekkel együtt nevelve, tumor-asszociált fibroblaszt modellként használjuk őket. Annak ellenére, hogy a fém nanorészecske kezelése nem befolyásolták a fibroblaszt sejtek migrációs képességeit, szeretnénk volna megállapítani, hogy vajon megfigyelhető-e a fibroblasztok tumorsejt-támogató hatása abban az esetben is, ha fém nanorészecskékkal kezeljük őket.



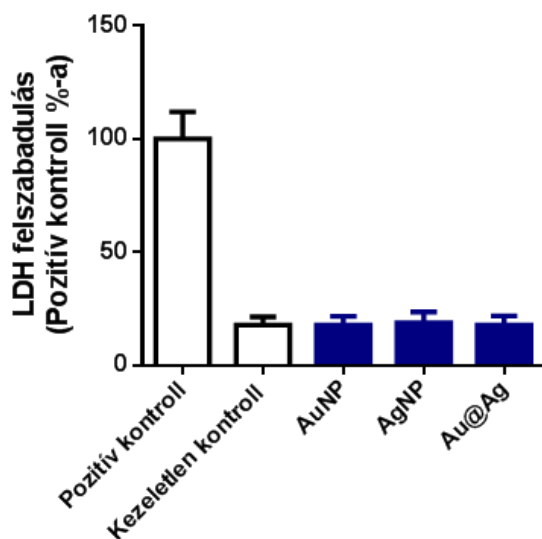
16. ábra. Az ezüst és arany-ezüst hibrid nanorészecskék befolyásolják a tumorsejtekből és fibroblasztokból álló direkt ko-kultúrák összetételét. (a) A PKH26-al jelölt 4T1 sejtek szigetekbe rendeződnek a direkt ko-kultúrák során. Ezüst és arany-ezüst hibrid nanorészecske kezelésekre hatására a megfigyelhető tumorsejt szigetek mérete kisebb, mint a kontroll és arany nanorészecskékkel kezelt minták esetén. (b) Az ezüst és arany-ezüst hibrid nanorészecske kezelésekre hatására csökken a tumorsejtek mennyisége a direkt ko-kultúrákban. (Egyszempontos ANOVA).

Először azt vizsgáltuk, hogyan változik az adenokarcinóma és a fibroblaszt sejtekből álló direkt ko-kultúrák struktúrája és összetétele abban az esetben, ha különböző fém nanorészecskékkel kezeljük őket. Ehhez piros fluoreszcenciát mutató PKH26 festékkel jelöltük

a 4T1 adenokarcinóma sejteket, majd ezt követően a szuszpenziót 1:1 arányban összekevertük jelöletlen NIH/3T3 fibroblaszt sejtekkel. Az adenokarcinóma sejtekből és fibroblasztokból álló szuszpenziót fedőlemezeket tartalmazó 6-lyukú lemezekbe ültettük, majd másnap a letapadt sejteket arany, ezüst illetve arany-ezüst hibrid nanorészecskékkel kezeltük 24 órán keresztül. A kezeléseket követően a fedőlemezeket eltávolítottuk, a mintákat DAPI-val festettük, majd fluoreszcens mikroszkóp segítségével megvizsgáltuk a sejteket (**16a. ábra**). A kontroll, és arany nanorészecskékkel kezelt ko-kultúrák esetén a 4T1 adenokarcinóma sejtek nagyméretű szigeteket alkottak, amelyeket körülvettek az NIH/3T3 fibroblaszt sejtek. Abban az esetben, ha a mintákat ezüst, vagy arany-ezüst hibrid nanorészecskékkel kezeltük, a fibroblasztok által kialakított mátrixban kisebb területű tumorsejtekből álló szigeteket figyeltünk meg. Annak érdekében, hogy kvantitatívan is megállapíthassuk az egyes sejttípusok mennyiségét a ko-kultúrákban, a 6-lyukú lemezekben maradt sejteket összegyűjtöttük, majd a PKH26-pozitív 4T1, illetve PKH26-negatív NIH/3T3 sejtek arányát áramlási citométer segítségével meghatároztuk (**16b. ábra**). A két sejtvonal aránya megváltozik az ezüst és arany-ezüst hibrid nanorészecskék esetén, ami azt jelenti, hogy a kezelésekre hatására csökken a ko-kultúrákban található 4T1 adenokarcinóma sejtek mennyisége.

Szerettük volna megvizsgálni szelektíven a tumorsejteken a nanorészecskékkel kezelt fibroblaszt sejtek hatásait. Ennek érdekében indirekt ko-kultúrát állítottunk be, ahol a 0.4 μm pórusátmérőjű membránokat tartalmazó inszertek felső kamráiban tartottuk és kezeltük a fibroblaszt sejteket, az alsó kamrákban pedig megfigyeltük a 4T1 tumorsejtek proliferációs aktivitásait. Azért volt indokolt a 0,4 μm -es pórusátmérőjű inszertek alkalmazása, mert ezen keresztül a fibroblaszt sejtek nem képesek átjutni, a szekretált oldékony faktorok viszont igen, így az alkalmazott két sejttípus között kémiai kommunikáció valósulhat meg. Fontos továbbá, hogy a fibroblaszt sejtek a kezeléskor konfluens pázsitot alkossanak a felső kamrában, ugyanis így elkerülhető a nanorészecskék paracelluláris átjutása az alsó kamrába, ahol a tumorsejtek találhatók. Hogy megbizonyosodjunk arról, a kísérlet során nem a fibroblaszt sejtek lízise miatt felszabaduló intracelluláris faktorok stimulálják a tumorsejteket, először meg kellett vizsgálni, hogy a nanorészecske kezelésekre hatására nem történik membránkárosodás az NIH/3T3 fibroblaszt sejteken. Ennek érdekében az NIH/3T3 fibroblaszt sejteket 24 óráig kezeltük 25 μM koncentrációjú arany, 20 μM koncentrációjú ezüst nanorészecskékkel, valamint megegyező koncentrációjú arany-ezüst hibrid nanorészecskékkel, majd LDH esszé segítségével

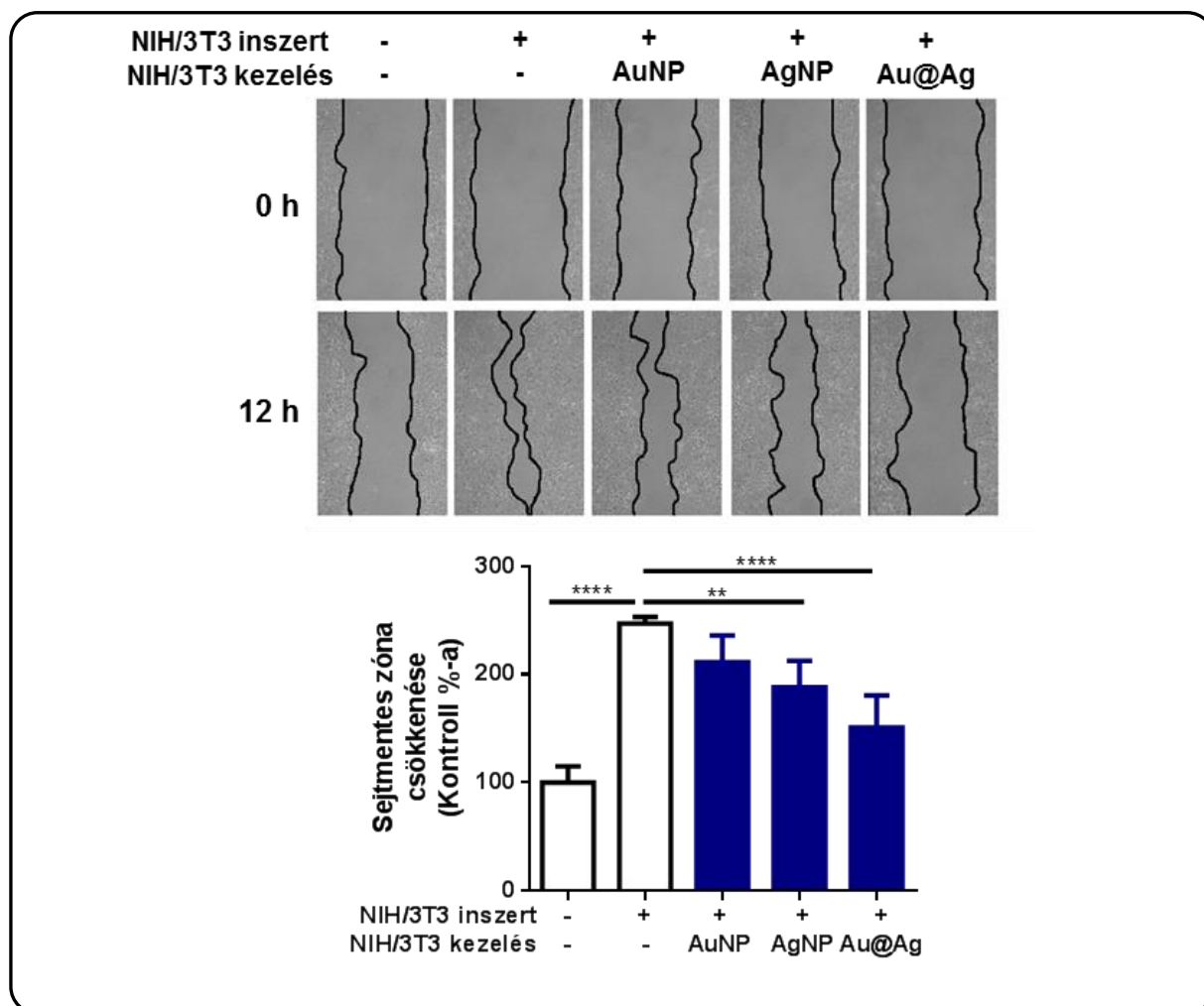
meghatároztuk a sejtekből a felülúszóba került laktát-dehidrogenáz enzimek aktivitását (**17. ábra**). A kísérlet során a pozitív kontroll sejtjeit lizáltuk a kit-ben található detergens segítségével, így nagyjából az összes detektálható intracelluláris LDH felszabadult ezekből a sejtekből. A kezeletlen és a kezelt minták felülúszójából mért LDH aktivitását százalékosan arányosítottuk a pozitív kontroll esetén mért értékekhez. A kezeletlen és a nanorészecskékkel kezelt sejtekben is elhanyagolható mennyiségű LDH aktivitást tudtunk mérni, tehát úgy tűnik, hogy a kezelések nem okoznak jelentős membránkárosodást a fibroblaszt sejteken.



17. ábra. A kísérletek során alkalmazott nanorészecske kezeléseknek nincs plazmamembránkárosító hatása NIH/3T3 fibroblaszt sejteken. A fibroblasztok felülúszójában tapasztalt LDH aktivitás a kontroll és a kezeletlen minták esetén nem volt eltérő. A felülúszóban mért LDH aktivitást a pozitív kontroll esetén kapott értékek százalékában határoztuk meg.

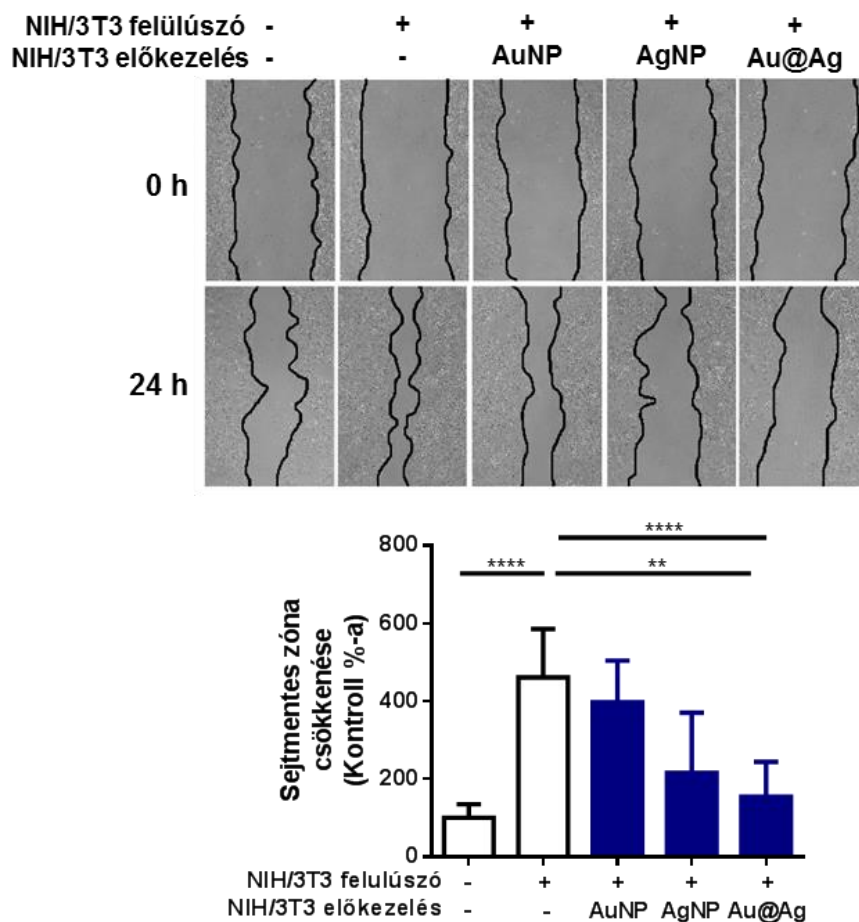
Az indirekt ko-kultúra kísérletek során NIH/3T3 fibroblasztokat ültettünk az inszertek felső felszínére, illetve 4T1 adenokarcinóma sejteket a 6-lyukú lemezek egyes celláiba. Miután mindkét sejttípus kitapadt a rendelkezésre álló felszínre, a konfluens fibroblaszt réteget tartalmazó kamrába 25 μ M koncentrációjú arany nanorészecskékkel, 20 μ M koncentrációjú ezüst nanorészecskékkel, vagy ezekkel megegyező koncentrációjú hibrid nanorészecskékkel kiegészített tápoldatot helyeztünk, majd összeállítottuk a két sejttípust tartalmazó ko-kultúrákat. 24 óra együtt tartás után a fibroblasztokat eltávolítottuk a karcinóma sejteket tartalmazó lemezekről, majd a tumoros sejteken „wound healing” esszét végeztünk. Arról, hogy a kezelés során intakt maradt a fibroblasztok által létrehozott konfluens sejtpázsit, úgy győződünk meg, hogy az inszerteket fixáltuk, kristály ibolyával festettük, majd a sejteket mikroszkóp

segítségével megvizsgáltuk. A mikroszkópos vizsgálat segítségével megállapítottuk, hogy a kezelések során nem lazultak a fibroblasztok közötti adhézisos kapcsolatok, így a nanorészecskék nem juthattak át a sejtek közt az alsó kamrába. A „wound healing” esszé során a 4T1 sejtpázsit sebzése után egyből, valamint a sebzést követően 12 óra múlva készítettünk felvételeket a sejtmentes területről (**18. ábra**). A kísérlet során készített mikroszkópos felvételek számszerűsítéséből jól látszik, hogy az NIH/3T3 sejtek jelenléte szignifikánsan megemeli a 4T1 adenokarcinóma sejtek sebzáródási képességét. Arany nanorészecske kezelések mellett, a fibroblasztok serkentő hatása továbbra is megmaradt, viszont, amennyiben ezüst, vagy arany-ezüst hibrid nanorészecskékkel kezeltük a fibroblasztokat, a tumoros sejtek sebzáródási képessége szignifikánsan lecsökkent.



18. ábra. Az ezüst és arany-ezüst hibrid nanorészecske kezelések csökkentik a fibroblaszt sejtek tumorsejt-támogató aktivitását. Kezeletlen és különböző nanorészecskékkel kezelt fibroblasztokat tartottunk együtt adenokarcinóma sejtekkel 24 órán keresztül, majd a fibroblaszt sejtek eltávolítása után megvizsgáltuk az adenokarcinóma sejtek proliferációs aktivitását „wound healing” esszé segítségével. Az ezüst, illetve arany-ezüst részecskékkel kezelt fibroblasztokkal történt ko-kultúra után csökkent a tumorsejtek sebzáródási hatékonysága a kezeletlen fibroblasztokat tartalmazó mintában megfigyeltekhez képest. (Egyszempontos ANOVA).

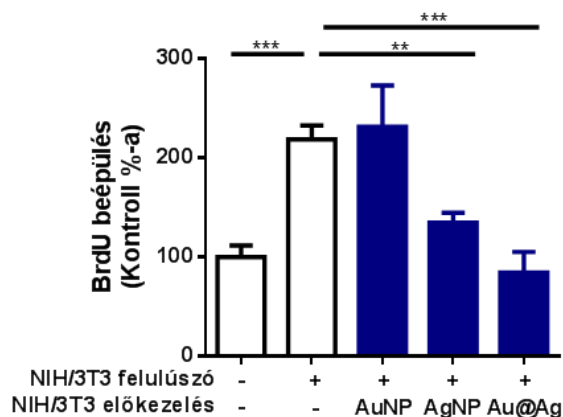
Szerettük volna azt is megvizsgálni, hogy a ko-kultúra kísérlet során tapasztalt hatások a fibroblasztok által termelt oldékony faktorok szekréciójának változásai miatt következnek-e be. Ennek érdekében NIH/3T3 fibroblaszt sejteket ültettünk ki 10 cm átmérőjű csészékbe, majd 24 óráig kezeltük a sejteket fém nanorészecskékkel az előző kísérletek során alkalmazott koncentrációkban. A kezelés után eltávolítottuk a sejtekről a nanorészecskéket tartalmazó sejtkultúra médiumot, és PBS-es mosások után szérummentes tápfolyadékot helyeztünk a sejtekre. 12 óra inkubáció után a médiumot összegyűjtöttük, majd a sejtek által termelt faktorokat 10 KDa-nál nagyobb fehérjét összegyűjtő koncentráló csőben dúsítottuk. A kapott, fibroblaszt eredetű szekretált fehérjét 24-lyukú lemezben konfluensre növesztett 4T1 sejteken alkalmaztuk 1 $\mu\text{g/mL}$ koncentrációban, majd a 4T1 sejtpázsiton „wound healing” esszét végeztünk el (**19. ábra**). Jól látszik, hogy a NIH/3T3 sejtekből származó szekretált faktorok nagymértékben megemelték a 4T1 adenokarcinóma sejtek sebzáródási képességét, tehát a fibroblasztok által termelt oldékony faktorok serkentik a tumoros sejtek proliferációs aktivitását. Hasonló megfigyelést tehettük abban az esetben, amikor arany nanorészecskékkel előkezelt fibroblasztok szekretált faktoraival kezeltük a 4T1 sejteket. Amikor azonban ezüst, vagy arany-ezüst hibrid nanorészecskékkel előkezelt fibroblasztokból származó szekretált faktorokat juttattunk a 4T1 sejtek tápfolyadékába, a tapasztalt serkentő hatás szignifikánsan kisebb mértékű volt.



19. ábra. Az ezüst és arany-ezüst hibrid nanorészecskéke kezelése hatására csökken a fibroblasztok által szekretált faktorok tumorsejt támogató hatása. NIH/3T3 fibroblasztokat kezeltünk nanorészecskékkal, majd a kezeléseket követően a sejtekből származó szekretált, oldékony faktorokat töményítettük és 4T1 adenokarcinóma sejteken alkalmaztuk. A kezeléseket követően megfigyeltük a 4T1 sejtek „sebzáradási” aktivitását. Az ezüst és arany-ezüst hibrid nanorészecskékkal kezelt fibroblasztok által szekretált oldékony faktorok kevésbé emelték meg a 4T1 sejtek „sebzáradási” képességét, mint a kezeltlen sejtekből származó szekretált faktorok. (Egyszempontos ANOVA).

A kísérletet megismételtük egy másik módszerrel is, hogy precízebben is meghatározzuk a fibroblaszt eredetű oldékony faktorok tumoros sejtekre kifejtett proliferáció-serkentő hatását. Ennek érdekében a BrdU nukleotid analóg genomba történő beépülését vizsgáltuk a 4T1 sejteken. A beépült BrdU mennyiségéből következtethetünk a sejtek proliferációs aktivitására, ugyanis ez a nukleotid analóg kizárólag S-fázis-függő módon képes beépülni a sejtek DNS-ébe. A kísérlet során a 4T1 sejtek 24 órás kezelésének utolsó két órájában BrdU-val egészítettük ki a sejtek tápfolyadékát, majd fixálás után BrdU specifikus ELISA segítségével meghatároztuk

a genomba épült BrdU nukleotidok mennyiségét (**20. ábra**). A kísérlet során nagyon hasonló eredményeket kaptunk a „wound healing” vizsgálat esetén kapottakkal. A kezeletlen fibroblasztokból származó szekretált faktorok jelentősen megemelték a tumoros sejtek proliferációs aktivitását. Míg az arany nanorészecskékkel történő kezelés nem befolyásolta a fibroblasztok tumorsejt-támogató hatását, addig az ezüst és arany-ezüst nanorészecskékkel előkezelt fibroblasztokból származó szekretált faktorok proliferáció serkentő hatása eltűnt.

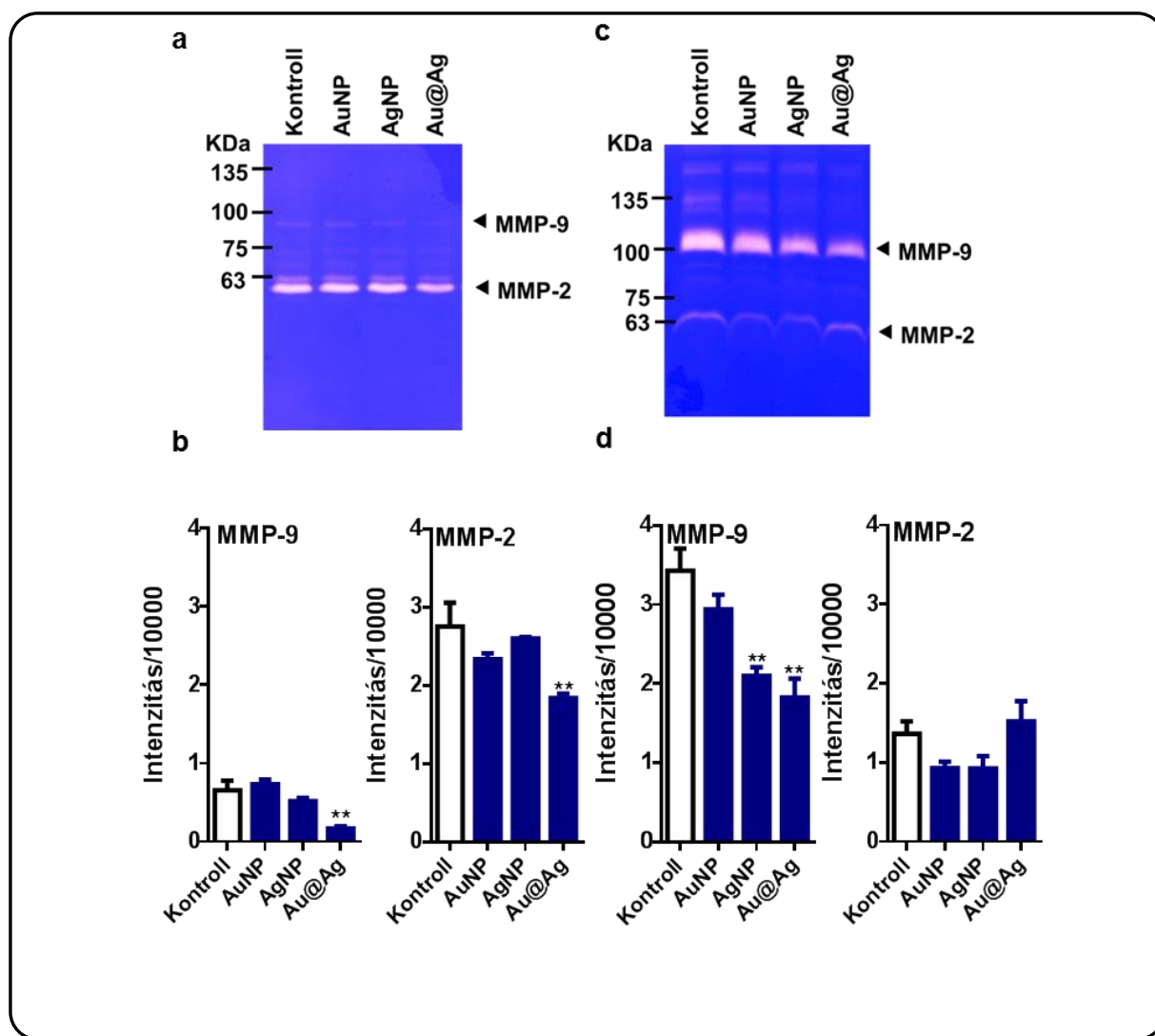


20. ábra. Az ezüst és arany-ezüst hibrid nanorészecske kezelések csökkentik a fibroblasztok tumorsejtekre kifejtett proliferációt serkentő hatását. NIH/3T3 fibroblasztokat kezeltünk nanorészecskékkel, majd a kezelések után a sejtekből származó szekretált, oldékony faktorokat töményítettük és 4T1 adenokarcinóma sejteken alkalmaztuk. A kezelések után 24 órával BrdU esszé segítségével meghatároztuk a 4T1 sejtek proliferációs aktivitását. (Egyszempontos ANOVA).

6.9. Az ezüst és arany-ezüst nanorészecske kezelések gátolják a mátrix metalloproteázok felszabadulását

Mivel a tumorokban felszabaduló mátrix metalloproteázok aktivitása fontos szerepet játszik a metasztázisok kialakulása során, az előző kísérletből származó NIH/3T3 fibroblasztok által szekretált faktorokat tartalmazó felulúszó mintákban megvizsgáltuk a zselatináz aktivitással rendelkező MMP-2 és MMP-9 mátrix metalloproteázok aktivitását (**21a, b. ábra**). Mivel a mátrix metalloproteázok nem csak a fibroblasztokból, hanem a tumorsejtekből is felszabadulhatnak, arany, ezüst és arany-ezüst hibrid nanorészecskékkel előkezelt 4T1 sejtek felulúszójából is készítettünk koncentrált oldatokat, és ezekben a mintákban is megvizsgáltuk a

proteáz enzimek aktivitását zselatin zimográfia segítségével (21c, d. ábra). Mindkét sejtípus szekretál MMP-2 és MMP-9 mátrix metalloproteáz enzimeket is, azonban, érdekes módon, a fibroblasztok felülúszójában az MMP-2, a tumorsejtek felülúszójában pedig, ezzel ellenkező módon, az MMP-9 aktivitása dominált. A Coomassie-festett gélek szkennelése és az egyes feltisztulási sávok intenzitásának számszerűsítésével megállapítottuk, hogy az NIH/3T3 fibroblaszt sejtek esetén az arany-ezüst hibrid nanorészecskékkel történő előkezelések képesek szignifikánsan csökkenteni a szekretált fehérjéket tartalmazó felülúszók MMP-2 és MMP-9 aktivitását. 4T1 tumorsejtek esetén az ezüst, valamint az arany-ezüst nanorészecske kezelések hatására szignifikánsan csökkent a töményített felülúszók MMP-2 aktivitása, míg az előkezelések nem befolyásolták az MMP-9 enzim aktivitását.



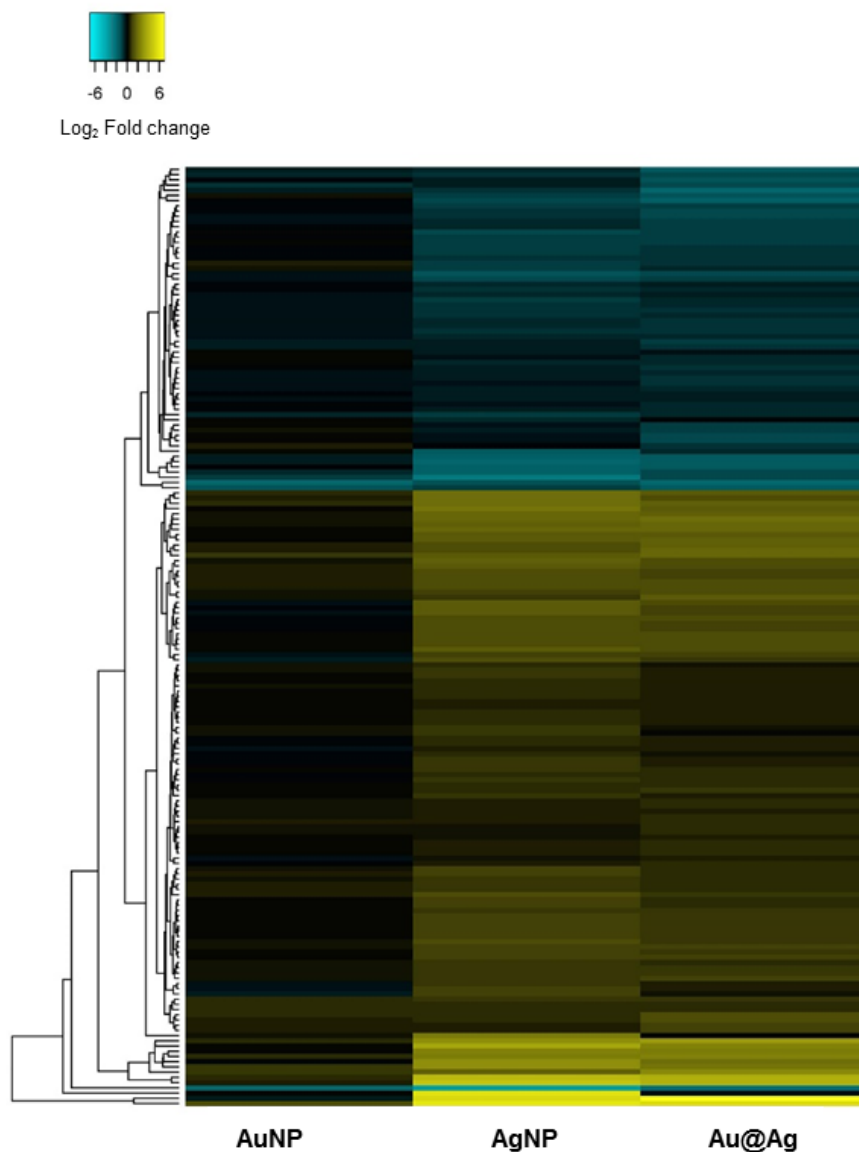
21. ábra. Az arany-ezüst hibrid nanorészecske kezelések hatására csökken a mátrix metalloproteázok aktivitása a 4T1 és a NIH/3T3 sejtek felülúszójában. Az arany, ezüst és arany-ezüst hibrid nanorészecskékkel előkezelt NIH/3T3 (a) és 4T1 (c) sejtek felülúszóját töményítettük, majd a mintákat zselatin zimográfia segítségével vizsgáltuk. A festett gélek szkennelése után számszerűsítettük a NIH/3T3 (b) és a 4T1 (d) sejtek felülúszójából származó mintákban a mátrix metalloproteázok aktivitása miatt kialakult feltisztulási sávokat. (Egyszempontos ANOVA).

6.10. Az arany, ezüst és arany-ezüst nanorészecskék által indukált transzkriptomikai változások tumor-asszociált fibroblaszt sejtekben

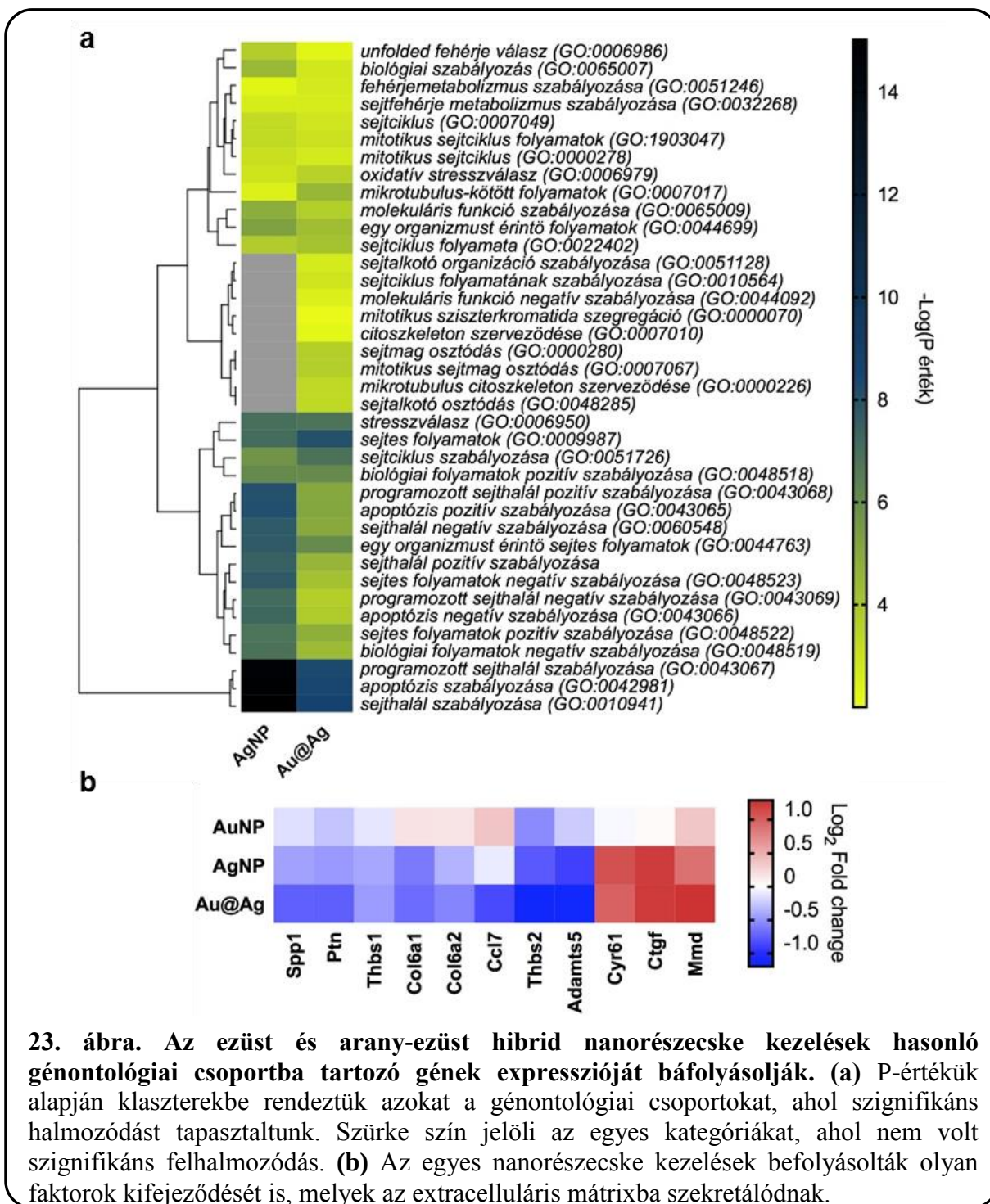
Szerettük volna megérteni, hogy az eltérő kémiai összetételű fém nanorészecskék milyen transzkriptóm szintű génexpressziós változásokat okoznak a tumor-asszociált fibroblaszt sejtekben. Ehhez 4T1 tumorsejtekkel ko-kultúrában tartott NIH/3T3 fibroblasztokat kezeltünk 24 órán keresztül 25 μ M arany, 20 μ M ezüst valamint 25 μ M aranyat és 20 μ M ezüstöt tartalmazó arany-ezüst hibrid nanorészecskékkel, majd ezt követően a sejtekből RNS-t izoláltunk és Illumina MiSeq NGS platform segítségével újgenerációs szekvenálást végeztünk el. A szekvenálás során nyert leolvasásokat GRCm38.p5 egér referencia genomhoz illesztettük, majd az ennek megfelelő gén annotáció segítségével határoztuk meg az egyes gének expressziós szintjét a mintákban. A szekvenálás során mintánként átlagosan $1,05 \pm 0,3$ millió leolvasáspárt azonosítottunk. Ez a leolvasás szám nem feltétlenül elegendő alacsony szinten kifejeződő gének mRNS szintjében mutatkozó eltérések statisztikai igazolására; ezért statisztikailag szignifikáns változásokat elsősorban a markánsan kifejeződő gének között állapíthattunk meg.

Érdekes módon, az arany nanorészecskékkel kezelt mintákban nem találtunk szignifikáns eltérést a kezeletlen kontroll mintához hasonlítva. Ezzel ellentétben az ezüst- és az arany-ezüst nanorészecske kezelések szignifikáns változásokat okoztak a fibroblaszt sejtek transzkriptációs profiljaiban. Klaszterekbe rendeztük azokat a géneket, amelyek kifejeződése valamelyik kezelés hatására szignifikánsan változott, majd az egyes génekhez tartozó relatív expressziós értékeket hőtésképen ábrázoltuk (22. ábra). A hőtésképen jól látszik, hogy az ezüst és az arany-ezüst nanorészecskék hatására igen hasonló transzkriptomikai változások történtek a tumor-asszociált fibroblaszt sejtekben. Az ezüst nanorészecskék hatására 97 gén expressziója nőtt és 33 gén kifejeződése csökkent. Hasonló értékeket tapasztaltunk az arany-ezüst hibrid

nanorészecske kezelések esetén is. Ebben az esetben a fibroblasztokban 85 gén expressziója emelkedett és 49 gén relatív mRNS szintje csökkent a kezeletlen sejtekhez viszonyítva.



22. ábra. Az ezüst és arany-ezüst hibrid nanorészecske kezelések hasonló transzkriptomikai változásokat okoznak tumor-asszociált fibroblaszt sejtekben. A 4T1 tumorsejtekkel ko-kultúrában tartott NIH/3T3 sejteket nanorészecskékkel kezeltük, majd az RNS-ek kivonása után transzkriptóm analízis végeztünk el. A hőtésképen azoknak a géneknek a relatív expressziós adatait ábrázoltuk, amelyek legalább valamelyik kezelés során szignifikáns változást mutattak a kezeletlen kontroll mintákhoz viszonyítva.



A kezelések esetén tapasztalt szignifikánsan változott gének listáját felhasználva PANTHER overrepresentációs tesztet végeztünk el annak érdekében, hogy megállapítsuk, ezek a gének mutatnak-e felhalmozódást valamilyen biológiai funkciót jelölő génontológiai csoportban [203]. Számos biológiai funkciót jelölő génontológiai csoport esetén tapasztaltunk olyan mértékű felhalmozódást, ami az analízishez használt gének számából adódó várt értéknél

szignifikánsan magasabb volt. Mindkét kezelés elsősorban az apoptózishoz kapcsolható génontológiai csoportokban eredményezett halmozódást, azonban fontos megemlíteni, hogy a ezekben a csoportokban dúsulás mértéke magasabb volt az ezüst nanorészecske kezelések esetén, mint az arany-ezüst hibrid nanorészecske kezelések során (**23a. ábra**). Ezen kívül felülreprezentáltak voltak a sejtciklus szabályozását végző gének ontológiai csoportjai és a stresszválaszban szerepet játszó géneket magába foglaló gének csoportjai is. Érdekes módon, a különböző citoskeletális funkciókhoz kapcsolható géneket magába sűrítő géncsoportok csak az arany-ezüst nanorészecske kezelések esetén eredményeztek szignifikáns felhalmozódást.

Az ezüst, vagy arany-ezüst hibrid nanorészecske kezelések során szignifikánsan változó gének között azonosítottunk olyanokat is, amelyek termékei szekretálódnak az extracelluláris térbe, és valamilyen módon szerepet játszanak a metasztatikus folyamatokban (**23b ábra**). Az ezüst és az arany-ezüst hibrid nanorészecske kezelések egyaránt csökkentették a Thrombospondin 1 és 2 expresszióját (Thbs1, Thbs2). Ezek az extracelluláris mátrix komponensek fontos szerepet játszanak a tumorok mikrokörnyezetében és a metasztázisok kialakításában. A sztrómasejt eredetű Thrombospondin 1 például képes növelni a szájüregi karcinóma sejtek migrációs és inváziós képességeit [204], a kolonizáló tumorsejtekből származó Thrombospondin 2-ről pedig leírták, hogy képes aktiválni a tüdőszövetben található fibroblaszt sejteket, amelyek így végső soron elősegítik a tumorsejtek metasztatikus kolonizációját a tüdőben [205]. Az extracelluláris mátrix felépítésében résztvevő Kollagén VI expresszióját biztosító Col6a1 és Col6a2 gének kifejeződése is lecsökkent az ezüst és az arany-ezüst nanorészecske kezelések hatására. Ez tumorbiológiai szempontból szintén fontos lehet, ugyanis megfigyelték, hogy a COL6A1 emelkedett szekréciója a tumorokban összefüggésbe hozható a tumorok csontszövet specifikus áttétképző aktivitásával [206], petefészek tumorokban pedig a Col6a2 magas expressziója korrelációt mutat az emelkedett metasztatikus hatékonysággal és a betegség alacsony túlélésével [207]. A kezelések hatására csökkent az Adamts5 kifejeződése is, melynek terméke a metalloproteináz aktivitással rendelkező ADAMTS5, amiről leírták, hogy elősegíti a tumorok invázióját a közeli nyirokcsomókba, és segíti az áttétek kialakítását [208]. Az Oszteopontin (Spp1) kifejeződése elsősorban az arany-ezüst nanorészecske kezelések során csökkent jelentősen. Ez szintén releváns lehet, ugyanis az Oszteopontinról számos alkalommal leírták már, hogy növeli a tumorsejtek proliferációs aktivitását, és elősegíti a primer tumorok áttétképzését [209]. Az ezüst és arany-ezüst nanorészecske kezelések hatására csökkent

expressziót mutató Ptn gén terméke a multifunkciós biológiai szereppel rendelkező neurit növekedési faktor 1 (NEGF1, pleiotrophin), elősegíti a tumorokban az angiogenezist és serkenti a metasztázis kialakulását [210]. Az arany-ezüst nanorészecskék csökkentették a CCL7 kemokin expresszióját biztosító gén (Ccl7) kifejeződését is, amiről bebizonyosodott már, hogy a CCR3 receptor aktiválásán keresztül epitheliális-mesenchymális tranzíciót okoz a tumorsejtekben, így növelve azok metasztázis-képző hatékonyságát [211]. A szekretált faktorokat kódoló gének közül, mindössze három esetén tapasztaltunk expresszió növekedést. Az ezüst és arany-ezüst nanorészecskék megemelték a monociták makrofág irányba történő polarizációját elősegítő szekretált faktort kódoló gén kifejeződését (Mmd). Ezen felül további két extracelluláris faktor kifejeződése is megemelkedett. Az egyik ilyen a pro-fibrotikus hatású kötőszöveti növekedési faktor génje (Ctgf), a másik pedig az angiogenikus hatású CYR61-et kódoló gén, ami szintén képes pozitívan szabályozni a tumorok invazív tulajdonságait [55, 212].

6.11. Az arany-ezüst hibrid nanorészecskék gátolják a 4T1 tumorok metasztatikus aktivitását, és erősítik a kemoterápia tumornövekedést gátló hatását

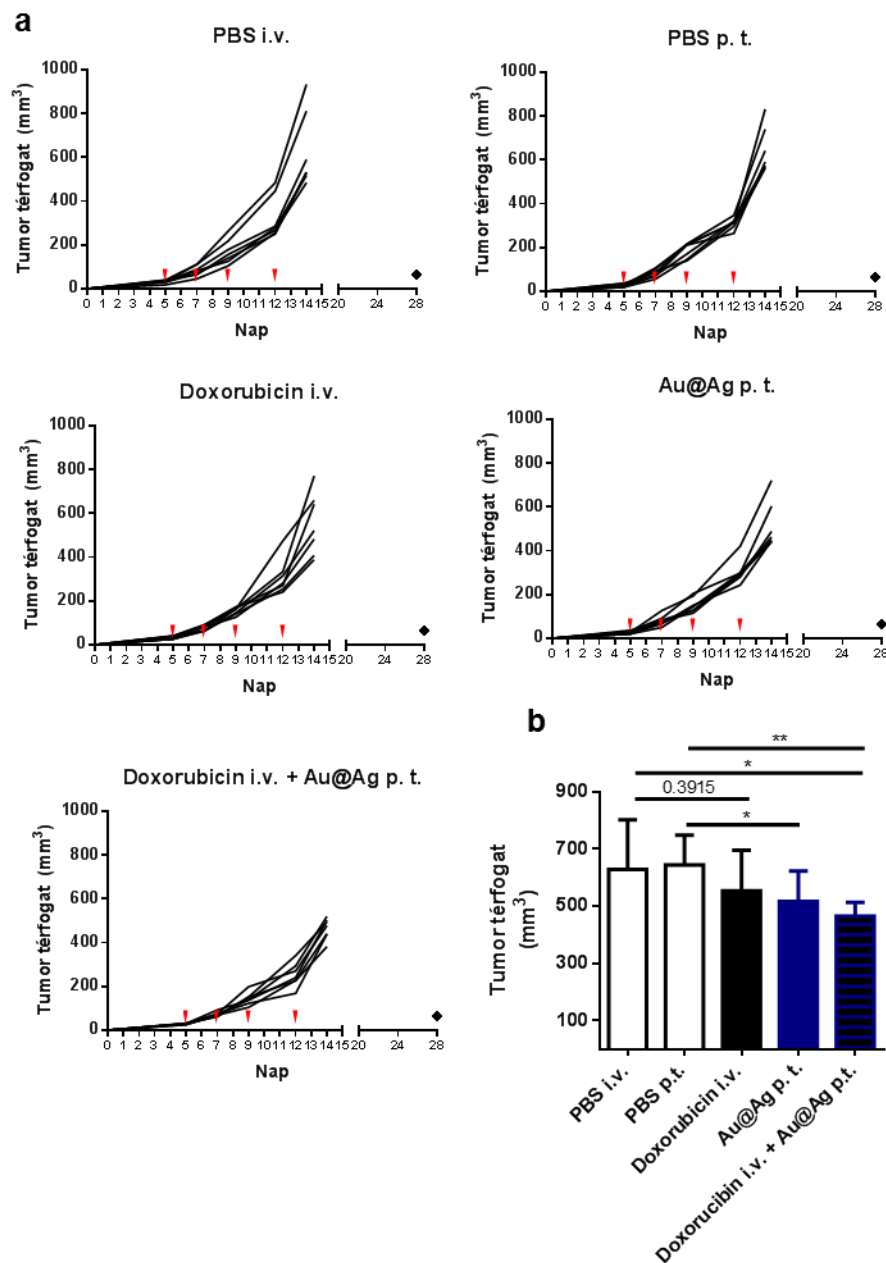
Mivel az *in vitro* kísérletek során igen ígéretes eredményeket kaptunk, szerettünk volna megbizonyosodni a fém nanorészecske kezelések *in vivo* tumor-ellenes hatásairól is. Az *in vitro* kísérletek azt mutatták, hogy az arany-ezüst hibrid nanorészecskék gátolják legnagyobb mértékben a 4T1 sejtek migrációs-proliferációs képességeit, valamint a fibroblasztok tumor-támogató hatásait is ezek a nanorészecskék csökkentették a leghatékonyabban. Mivel a 4T1 sejtek képesek metasztatikus tumorokat alkotni immunkompetens Balb/c egérben, úgy döntöttünk, hogy az arany-ezüst hibrid nanorészecskék hatásait 4T1 sejtekből létrehozott tumor modellben vizsgáljuk. A kísérlet során a nanorészecskéket közvetlenül a tumor köré juttattuk be, annak érdekében, hogy hatékonyabban vizsgálhassuk a tumor mikrokörnyezetébe került nanorészecskék hatásait. A nanorészecske kezelésekben részesülő állatok mellett olyan csoportot is létrehoztunk, ahol a nanorészecske kezelésekkel párhuzamosan kemoterápiában is részesültek az állatok, így azt is megfigyelhettük, hogyan működnek együtt az arany-ezüst nanorészecskék tradicionális kemoterápiával. A placebo csoportokban az állatok a kezelésekkel megegyező térfogatú PBS-t kaptak a megfelelő adminisztrációban. A kísérlet során az állatokat

a következő csoportokba osztottuk: (i) PBS intravénás adminisztrációban, (ii) PBS peritumorális adminisztrációban, (iii) Doxorubicin intravénás adminisztrációban, (iv) Au@Ag peritumorális adminisztrációban, (v) Doxorubicin intravénás adminisztrációban + Au@Ag peritumorális adminisztrációban. Az egyes csoportokban 6-7 állat volt.

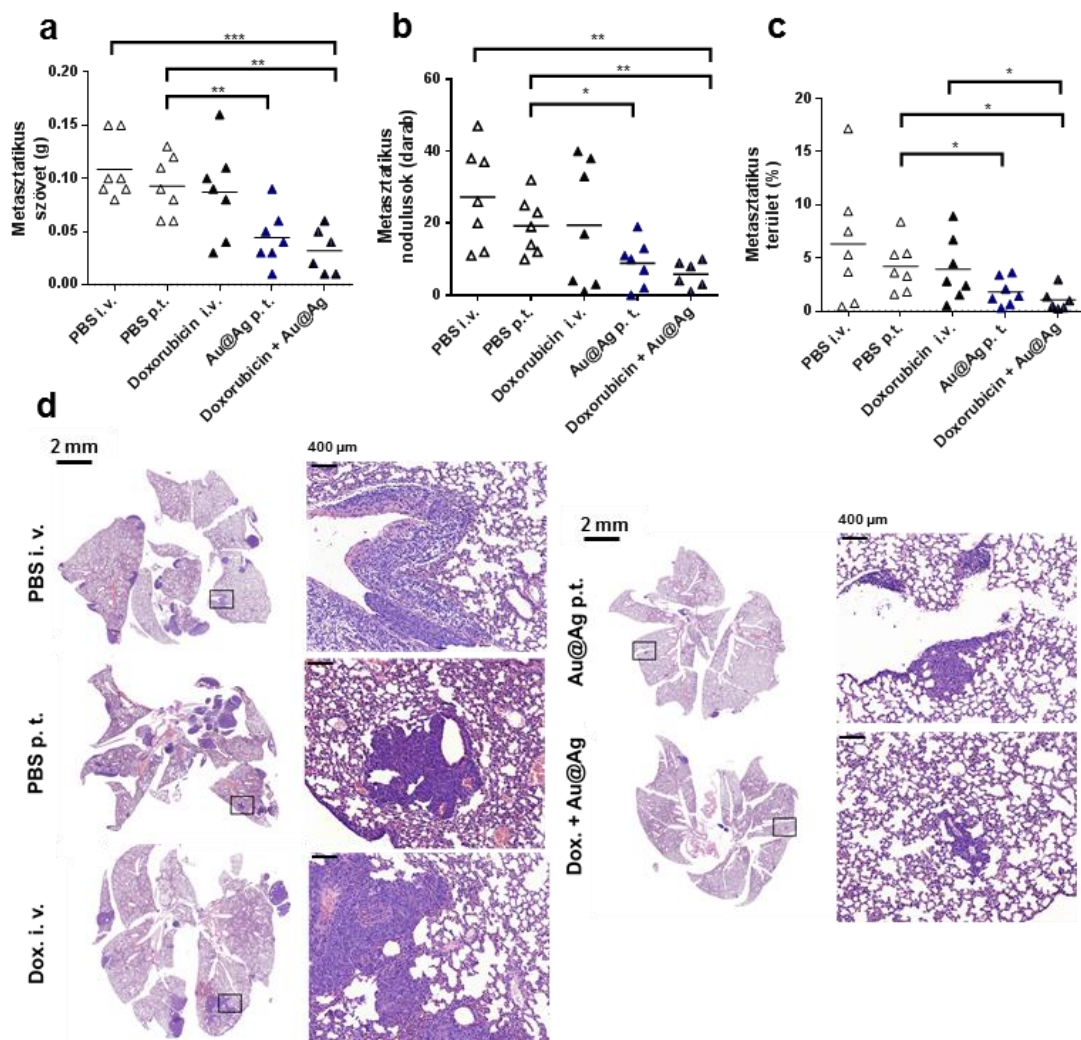
Mivel a 4T1 sejtek már a transzplantáció során is rendelkeznek invazív, metasztatikus képességekkel, a tumor progressziójának már igen korai fázisában képesek metasztázisokat kialakítani az állatok tüdőiben. Emiatt érdemes az anyagok adminisztrációját minél korábban elkezdni, annak érdekében, hogy vizsgálhassuk az egyes kezelések metasztázis-gátló hatásait. Miután az emlőszövetbe oltott 4T1 sejtek mérhető méretű tumort alkottak, az állatokat négy alkalommal részesítettük (a sejtek transzplantációja utáni 5-dik, 7-dik, 9-dik, illetve 12-dik napon) a csoportoknak megfelelő kezeléseken, miközben folyamatosan regisztráltuk az egyes tumorok méretét. A 14-dik napon abbahagytuk a tumorok méretének regisztrálását, és további 14 napot vártunk, hogy a tüdőben kialakult áttétek detektálható méretűvé fejlődjenek, majd a sejtek transzplantációját követő 28-dik napon eutanáziában részesítettünk az állatokat (**24. ábra**).

Az egyes csoportokban detektált tumornövekedési diagramokon jól látható, hogy a Doxorubicint alkalmazó kemoterápia nem csökkentette önmagában szignifikánsan a 4T1 tumorok méretének növekedését, és az arany-ezüst nanorészecske kezeléseknél is csak kis hatása volt. Abban az esetben viszont, amikor az állatok mind nanorészecske, mind Doxorubicin kezelésben részesültek, a tumorok növekedése lassabb volt, és a 14. napon szignifikánsan kisebb volt a tumorok térfogata, a placebo csoportokhoz viszonyítva (**24b. ábra**).

A kísérlet végén *ex vivo* megvizsgáltuk az állatok tüdejében található metasztatikus szövetek mennyiségét. A tüdő metasztázisok mennyiségét három módszer segítségével határoztuk meg. Megmértük a tüdők súlyát, majd kivontuk a mért értékekből az egészséges állatok tüdejének átlagos súlyát (0.17 gramm), így megkaptuk az egyes tüdőkben található tumoros szövet tömegét. A tüdőkről sztereomikroszkópos felvételeket is készítettünk, és megszámoltuk az egyes állatok tüdején található felszíni metasztatikus nodulusokat. Ezek után a szöveteket paraffinba ágyaztuk, metszettük, majd a hematoxilinnal és eozinnal festett metszetekben meghatároztuk a metasztatikus szövet százalékos mennyiségét (**25. ábra**).



24. ábra. A peritumoriálisan alkalmazott arany-ezüst hibrid nanorészecskék csökkentik a 4T1 tumorok növekedését Balb/c egerekben és erősítik a Doxorubicin tumornövekedés gátló hatását. **(a)** Az egyes csoportok esetén tapasztalt tumornövekedési görbék. Az ábrákon a csoportok összes tagjának (n=7) egyedi tumornövekedési dinamikája van feltüntetve. A tumorsejtek transzplantációja után négy alkalommal részesültek az állatok a csoportnak megfelelő kezelésben (piros nyilak), a 14. nap után a tumorok méretének regisztrálását nem folytattuk. A tumorsejtek transzplantációját követő 28. napon feláldoztuk az állatokat (fekete rombuszok). **(b)** A 14. napon a tumorok méretei között szignifikáns eltéréseket tapasztaltunk. (*t*-próba).



25. ábra. Az arany-ezüst hibrid nanorészecske kezelések *in vivo* gátolják a 4T1 tumorok áttétképződését. A kísérlet végén *ex vivo* vizsgáltuk az állatok tüdejét. A primer tumor áttétképzését a tüdőben található metasztatikus szövet tömegének meghatározásával (**a**), a tüdő felszínén látható metasztatikus nodulusok számával (**b**), illetve a tüdőből készült metszetekben meghatározott metasztatikus terület százalékos arányával jellemeztük (**c**) (**d**) Reprezentatív mikroszkópos felvételek az egyes csoportokban található állatok tüdejéről (*t*-próba).

A kísérlet során azt tapasztaltuk, hogy a Doxorubicin kezelések az alkalmazott dózisban nem csökkentették a 4T1 tumorok metasztázis képződését. Ezzel szemben, amikor Au@Ag hibrid nanorészecskét kaptak az állatok, kevesebb metasztatikus szövet volt detektálható az állatok tüdejében. A nanorészecske metasztázis-gátló hatása a kombinációs kezelések során is megmaradt, habár a kettős kezelések nem csökkentették jobban a primer tumorok áttétképző aktivitását a csak nanorészecskét kapott állatokhoz viszonyítva.

7. Az eredmények összefoglalása és megbeszélése

A tumoros megbetegedések kezelése során a tumor méretét és progresszióját leggyakrabban citotoxikus gyógyszermolekulákat alkalmazó terápiával próbálják visszaszorítani. Azonban a kezelés sok esetben jelentős mellékhatásokkal jár, és a tumorsejtek választól függően teljesen hatástalan is lehet. A nanotechnológia új eredményeinek köszönhetően lehetőség van arra, hogy a nanométeres mérettartományba eső részecskéket felhasználjuk terápiás, illetve diagnosztikai célokra. A fém-alapú nanorészecskék különösen ígéretes eszközöknek bizonyulnak, mivel számos kitűnő fizikai és kémiai tulajdonsággal rendelkeznek, amelyek alkalmassá teszik őket orvosi célokra is. Felszínük egyszerűen módosítható, melynek révén kismolekulák hordozóiként alkalmazhatók, illetve így szabályozhatóvá válik a gyógyszermolekulák szervezeten belüli útja is. Az ezüst nanorészecskék erős apoptotikus hatásuk miatt kiemelkednek a többi fém-alapú nanorészecskék közül, az arany nanorészecskék pedig biokompatibilis, valamint radioszenzitizáló tulajdonságaik miatt szintén egyedi terápiás lehetőségekkel rendelkeznek. Habár sok tanulmány vizsgálta már a fém nanorészecskék által indukált molekuláris biológiai mechanizmusokat tumoros modellekben, az, hogy a nanorészecskék különböző fizikai-kémiai paraméterei hogyan befolyásolják biológiai aktivitásukat még messze nem ismert teljes részleteiben. Munkánk során a fém nanorészecskék két paraméterének hatását vizsgáltuk: kíváncsiak voltunk arra, hogy a nanorészecskék mérete, illetve fémösszetétele hogyan befolyásolja azok viselkedését különböző tumoros modellekben.

Egyik elsődleges célunknak tűztük ki, hogy vizsgáljuk az ezüst nanorészecskék méretfüggő apoptotikus tulajdonságait, ezért a kísérletek során 5 nm illetve 35 nm átmérőjű ezüst nanorészecskék hatásait hasonlítottuk össze. Mivel a humán daganatok döntő részében a p53 tumorszuppresszor funkcióvesztést szenved, a citotoxikus gyógyszermolekulákat alkalmazó kezelésekre a tumorsejtek nagy része képtelen p53-függő apoptózissal válaszolni. Ezért nagyon fontos, hogy olyan új tumorelleses gyógyszereket vezessünk be a klinikai gyakorlatba, melyek képesek p53-független útvonalon is apoptózist indukálni a tumorsejtekben. Azért, hogy kiderítsük, az ezüst nanorészecskék képesek-e p53 hiányában is apoptózist indukálni, vad típusú p53-at kifejező, illetve p53-deficiens oszteoszarkóma sejteken vizsgáltuk a nanorészecskék hatásait.

Az ezüst nanorészecske kezelések által aktiválódó folyamatokat először oszteoszarkóma eredetű, vad típusú p53-at kifejező U2Os, illetve p53-hiányos Saos-2 sejteken figyeltük meg. Azt találtuk, hogy az ezüst nanorészecskék képesek megtapadni, és hatékonyan átjutni az alkalmazott oszteoszarkóma sejtek membránján. Mivel a nanopartikulumok membránburkolt vezikulákban is megfigyelhetők voltak, úgy tűnik, hogy a részecskéket endocitózis-függő folyamatok segítségével veszik fel ezek a sejtek. Habár többen leírták már, hogy a nanorészecskék felvételében elsősorban pinocitózis-szerű folyamatok játszanak szerepet [213], a nanorészecskék sejtekbe jutása mögött álló pontos mechanizmusok még nem teljesen tisztázottak. Az elektronmikroszkópos képeken a sejtek citoplazmájában szabadon, a vezikulákon kívül is detektáltunk nanorészecskéket. Ez azt sugallja, hogy a részecskék többféle módon is képesek a sejtekbe kerülni, illetve a nanorészecskék sejten belüli sorsa esetenként eltérő is lehet. Fontos szem előtt tartanunk, hogy a vezikulákba csomagolt nanorészecskék jelenléte nem csak a felvételi mechanizmusokról tanúskodhat, de tükrözheti a sejtekben indukálódott védekező reakciók működését is. Elképzelhető, hogy a toxikus fémektől úgy próbál megszabadulni a sejt, hogy membránok segítségével elhatárolja a nanorészecskéket citoplazmából, majd ezt követően exocitózissal kiüríti a vezikulákat az extracelluláris térbe. A nanorészecskék felvételének, sejten belüli pozicionálásának, illetve hosszú távú sorsának további vizsgálata elengedhetetlen ahhoz, hogy pontosabban megértsük a nanoanyagok kölcsönhatásait élő rendszerekkel.

Miután meggyőződünk arról, hogy az 5 és a 35 nm átmérőjű részecskék is képesek bejutni az alkalmazott U2Os és Saos-2 sejtekbe, megvizsgáltuk a felhasznált nanorészecskék toxikus hatásait. Eredményeink, több korábban publikált tanulmányhoz hasonlóan azt mutatják, hogy a kisebb nanorészecskék jelentősen toxikusabb hatást gyakorolnak a nagyobb méretű részecskékkal összehasonlítva. Logikusnak tűnik az a hipotézis, hogy a kisebb átmérőjű nanorészecskék nagyobb relatív felszínéről több ezüst ion szabadulhat ki az oldatba, ezért a kisebb átmérőjű nanorészecskéknek erősebb biológiai hatása van, azaz sokkal reaktívabbak, mint a nagyobbak. Több különböző sejtvonalon is bizonyították már, hogy az 5 nm átmérőjű részecskék toxikusabbak a nagyobb, 10 nm és 50 nm átmérőjű részecskékhez viszonyítva [214]. Továbbá, a 8 nm átmérőjű ezüst nanorészecskék nagyobb mértékű interleukin-8 szekréciót és intenzívebb oxidatív stresszt indukáltak, mint a nagyobb részecskék [215]. Habár ezek az eredmények egymástól függetlenül igazolják a kisebb részecskék toxikusabb hatását, más

tanulmányokban leírták, hogy a 100 nm átmérőjű részecskékkel történő kezelés esetén a sejtekből felszabaduló laktát-dehidrogenáz enzim mennyisége nagyobb, és ezzel egy időben a sejtek viabilitása alacsonyabb volt, mint amikor 10 nm és 50 nm átmérőjű nanorészecskékkel kezelték a sejteket [216]. Ezek az ellentmondó eredmények azt sugallják, hogy nincs egyértelmű összefüggés a nanorészecskék mérete és toxikus hatása között. Ráadásul, amellett, hogy a sejtek eltérő affinitással vehetik fel a különböző méretű részecskéket, a részecskék bejutását méretüknél sokkal jobban befolyásolta az ezüst nanorészecskék felszínét borító burkoló vegyület kémiai tulajdonsága [217, 218].

Hogy kiderítsük, vajon a két eltérő méretű nanorészecske citotoxikus hatásai mögött megegyező, vagy esetleg különböző molekuláris biológiai mechanizmusok állnak, a részecskéket olyan koncentrációkban alkalmaztuk, melyek egyenlő mértékben csökkentik a sejtek viabilitását (IC_{50} értéket megközelítő koncentrációk).

Azt találtuk, hogy mindkét nanorészecske képes volt nem csak a vad típusú p53-at kifejező U2Os, de a p53-hiányos Saos-2 sejtekben is apoptózist indukálni. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a p53 nem játszik meghatározó szerepet az ezüst nanorészecskék által indukált apoptotikus folyamatok során. Habár úgy tűnik, hogy a kezelések során a p53 apoptózist indukáló szerepe nem jelentős, megvizsgáltuk, hogyan változik a p53-függő jelátviteli útvonal a két eltérő méretű ezüst nanorészecske kezelés hatására U2Os sejtekben. Az eredményeink arra engednek következtetni, hogy a nanorészecskék hatására a p53 tumorsuppresszor fehérje stabilizálódik és transzaktivációs képessége is indukálódik. Ráadásul, mivel jelentős emelkedést tapasztaltunk a p53-függő gének mRNS-szintjében, úgy tűnik, hogy az ezüst nanorészecskék a teljes p53-függő jelpályát képesek aktiválni. Mivel az ezüst nanorészecskék egyenlő mértékben csökkentik a p53-at tartalmazó és a p53-hiányos sejtek túlélését, úgy gondoljuk, hogy a p53 aktiválódása csak egy másodlagos hatás, és az ezüst nanorészecskék apoptotikus hatása mögött elsődlegesen más folyamatok állnak.

Mivel a mitokondriális funkciók sérülése képes közvetlenül is apoptotikus halált kiváltani a sejtekben, megvizsgáltuk, hogyan változik a mitokondriumok működése az ezüst nanorészecske kezelések hatására U2Os és Saos-2 sejtekben. Megállapítottuk, hogy az ezüst nanorészecskék módosították az oszteoszarkóma sejtek mitokondriumainak ultrastruktúráit, mitöbb, a vizsgált oszteoszarkóma sejtvonalakban jelentősen lecsökkent a mitokondriális membránpotenciál is az ezüst nanorészecske kezelések hatására. Az ezüst nanorészecskék

mitokondriális stresszt indukáló hatását az is megerősíti, hogy a kezeléseket követően emelkedett mennyiségű mitokondriális Citokróm c fehérjét detektáltunk a sejtek citoplazmatikus frakcióiban. A citoplazmatikus Citokróm c jelzi, hogy a mitokondriális membránpotenciál csökkentése mellett, a nanorészecske kezelések emelkedett mitokondriális membrán permeabilitást is kiváltottak. Mivel a mitokondriális fehérjék citoplazmatikus lokalizációja közvetlen úton képes indukálni az apoptozómák összeszerelődését [219], úgy gondoljuk, hogy a megfigyelt mitokondriális diszfunkció lehet az ezüst nanorészecskék apoptotikus hatásának elsődleges oka.

Mivel a sejtek transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatait során nem találtunk nanopartikulumokat a mitokondriumokban, úgy véljük, hogy a kiváltott mitokondriális stresszt elsősorban a citoplazmába jutott nanorészecskék felszínéről felszabadult ezüst ionok okozzák. Ez azt jelenti, hogy az ezüst nanorészecskék toxikus hatása mögött a részecskék fizikai tulajdonságai („nano tulajdonság”) helyett, inkább a kémiai összetételük („ezüst tulajdonság”) a meghatározó. Ezt a feltételezést megerősíti az is, hogy a kísérleteink során azt találtuk, hogy az 5 nm és a 35 nm átmérőjű ezüst nanorészecskék azonos útvonalakon keresztül indukálnak apoptózist tumorsejtekben. Mivel a két eltérő méretű ezüst nanorészecskét olyan koncentrációkban alkalmaztuk, amelyek egyforma mértékben csökkentették a sejtek életképességét, ezekben a koncentrációkban a kétféle részecske szintén azonos fokú apoptózist, p53 aktiválódást, valamint mitokondriális károsodást indukált.

Munkánk további részében aranyból, valamint ezüsből készült nanorészecskék által kiváltott biológiai válaszokat hasonlítottuk össze annak érdekében, hogy a nanorészecskék kémiai összetételének sejtelettani hatásait megállapítsuk. Továbbá előállítottunk és jellemeztünk mag-héj szerkezetű, arany-ezüst hibrid nanorészecskéket is, így a vizsgálatok során a két fém együttes hatását is megfigyelhettük.

Sok információ áll már rendelkezésre a nanorészecskék és a tumorsejtek közötti kölcsönhatások molekuláris hátteréről, azonban a valóságban a szolid tumorokat nem csak rákos sejtek homogén populációja alkotja. A tumorokban található reaktív sztróma meghatározó alkotóeleme a tumoros szövetnek, és a sztróma-tumorsejt kölcsönhatás alapvetően befolyásolhatja a tumor viselkedését. A sztróma leggyakoribb elemét a fibroblasztok képezik, amelyek számos módon képesek támogatni a tumorsejteket, így elősegítve azok invazív, metasztatikus képességeit. Manapság igen intenzíven vizsgált, ígéretes stratégiának bizonyul a

tumor-sztróma sejtjeinek – például a fibroblasztoknak – terápiás célzása nanorészecskékkel, mely a terápia kimenetelét tekintve különösen előnyös lehet, hiszen így egyúttal a metasztázisok kialakulásának gátlása is megvalósulhat [220]. Továbbá, a sztróma egyedi sejtípusai és a tumor mikrokörnyezetének sajátos fizikai tulajdonságai (pl. enyhén savas pH) lehetőséget adnak az egyes hatóanyagok tumor-specifikus felszabadításra is. Mivel a fém nanorészecskék hatásait még nem ismerjük a tumor-sztróma sejtjein, vizsgálataink során szeretnénk tudni, hogy az előállított arany, ezüst, illetve arany-ezüst hibrid nanorészecskék képesek-e befolyásolni a reaktív sztróma fibroblaszt sejtjei és a tumorsejtek között kialakuló molekuláris kommunikációt, és ha igen, ki lehet-e használni ezt a jelenséget a tumorterápia során.

Kísérleteinkben az arany nanorészecskék biokompatibilisnek bizonyultak, ugyanis az alkalmazott sejtvonalakon csak minimális toxikus hatást detektáltunk arany nanorészecske kezelések során. A vártak megfelelően, az ezüst részecskék ennél jelentősebb toxicitást mutattak, viszont érdekes módon, az arany-ezüst hibrid nanorészecskék kevésbé voltak mérgezőek, mint a csak ezüsből készült partikulumok. Ennek a jelenségnek a hátterében valószínűleg a kétféle nanorészecske eltérő fizikai-kémiai tulajdonságai állhatnak. Elképzelhető, hogy a hibrid nanorészecskék esetén a biológiai hatást kiváltó ezüst ionok felszabadulása kisebb mértékű, vagy időben jelentősen elnyújtott, míg a csak ezüsből álló nanorészecskék esetén sokkal nagyobb mértékben és gyorsabban valósul meg az ezüst ionizációja. Ez a tulajdonság előnyös lehet, mivel így a mag-héj szerkezet összetételének és arányainak változtatásával lehetőség nyílik a reaktív ezüst ionok „irányított” felszabadítására, valamint az ionizáció és a disszociáció kinetikájának modulálására. A hibrid nanorészecskék mag-héj szerkezetének megfelelő megválasztásával lehetővé válhat, hogy csak egy adott stimulus, például sugárkezelés, hatására szabaduljanak fel a reaktív ionok az arany hordozó felszínéről. Ez a tulajdonság rendkívül hasznos lenne, ugyanis így a sugárterápia során kiváltott károsító hatás erősíthető, és egyben lokalizálható is lehetne a tumorokban és mikrokörnyezetükben. Habár mások is előállítottak már mag-héj szerkezetű, arany-ezüst hibrid nanorészecskéket, a pontos fizikai-kémiai jellemzőik és egyedi tulajdonságaik lehetséges kihasználása még további vizsgálatokat igényel [221, 222].

A kísérletek során megállapítottuk, hogy nem-toxikus koncentrációban, az ezüst tartalmú nanorészecskék képesek csökkenteni az invazív 4T1 sejtek migrációs tulajdonságait, és gátló hatásuk jóval erősebbnek bizonyult a tumorsejtekre mint a nem-tumoros sejtekre. Több

in vitro tumorsejtes rendszerben is megfigyelték már, az ezüst tartalmú nanorészecskék anti-proliferatív, sejtciklus gátló, illetve apoptózis indukáló tulajdonságait [153-159]. Ráadásul az ezüst nanorészecskék anti-proliferatív hatásainak vizsgálata során az is kiderült, hogy az ezüst nanorészecskék erősebb gátló hatást gyakorolnak tumorsejtekre, mint egészséges, immortalizált sejtvonalakra [171, 223]. A nanorészecskék tumorsejt-specifikus hatása valószínűleg abban rejlik, hogy a rákos sejtek az intenzív tápanyagfelvétel érdekében sokkal hatékonyabb endocitózis-, illetve pinocitózis-mediált részecske-felvételt fejlesztettek ki, így végeredményben több citotoxikus nanorészecskét akkumulálnak, mint az egészséges sejtek [224].

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy az ezüst, illetve az arany-ezüst hibrid nanorészecske kezelések képesek voltak csökkenteni a tumor-asszociált fibroblaszt sejtek tumorsejt-támogató hatásait, valamint azt is, hogy ez a hatás a fibroblasztok által szekretált oldékony faktorok valamilyen tulajdonságának változásán keresztül történik. Ezt alátámasztják azok a megfigyeléseink is, miszerint a tumorsejt kultúrák felülszójából mért mátrix metalloproteáz aktivitás is csökkent az ezüst és arany-ezüst nanorészecskék hatására. A ko-kultúrák kísérletek során a NIH/3T3 fibroblaszt sejteket mindössze 24 órán keresztül tartottuk együtt a 4T1 sejtekkel. Jóllehet, több kutatócsoport is hosszab ko-inkubációs időt alkalmazott a kísérleteik során, mi azonban szerettük volna ezt az időt minimalizálni. Ennek fő oka az volt, hogy a kísérletek során nem a tumorsejtek hatását terveztük vizsgálni a fibroblasztok transzformációjára, hanem ellenkezőleg, a fibroblasztok hatásait a tumorsejtek viselkedésére. Ráadásul, mivel a NIH/3T3 fibroblaszt sejtek önmagukban is aktivált fibroblaszt sejtekre jellemző markereket hordoznak – például magas α SMA expresszió és migrációs aktivitás – nem tartottuk szükségesnek a fibroblasztok további aktiválását a tumorsejtekből származó növekedési- és egyéb faktorok felhasználásával. Emellett, a kísérletek során megfigyeltük, hogy az alkalmazott NIH/3T3 fibroblasztok igen intenzív anyagcserét folytatnak, melynek következtében a tápfolyadék pH-ja gyorsan csökken a kultúrában. A savas pH toxikus a kultúrában tartott sejtek számára, ezért gyakran kell cserélni, viszont a tápfolyadék gyakori frissítése megakadályozza a tumorsejtek által termelt faktorok transzformáló hatásának megvalósulását. Mindazonáltal az indirekt ko-kultúrák rendszerek hátránya, hogy az egymástól térben szeparált sejtek kommunikációja nem modellezi megfelelően az *in situ* szöveti közegben megfigyelhető sejt-sejt kapcsolatokat. A probléma elkerülése érdekében további terveink között

szerepel a direkt ko-kultúrák rendszerek alkalmazása, ugyanis ma már jól ismert, hogy a közvetlen sejt-sejt kapcsolatok a tumorsejtek és a reaktív sztróma sejtjei között igen meghatározóak lehetnek [225]. A direkt ko-kultúrák alkalmazása további tényezők miatt is előnyös lehet, hiszen így akár lehetőség nyílik primer, humán tumor eredetű fibroblasztok kísérletes vizsgálatára is.

Annak érdekében, hogy képet kaphassunk arról, milyen mechanizmusok állhatnak az ezüst és az arany-ezüst nanorészecskék megfigyelt fibroblaszt-gátló hatásainak hátterében, 4T1 tumorsejtekkel ko-kultúrában tartott NIH/3T3 fibroblasztokat nanorészecskékkel kezeltük, majd RNS izolálást követően transzkriptóm analízist végeztünk. Az arany nanorészecske kezelések nem okoztak jelentős változást a tumor-asszociált fibroblaszt sejtek génexpressziós mintázatában, ezzel szemben szignifikáns változásokat tapasztaltunk az ezüst és az arany-ezüst kezelések esetén. Az ezüst és arany-ezüst nanorészecske kezelések hasonló génexpressziós mintázatot idéztek elő a tumor-asszociált fibroblaszt sejtek transzkripciós profiljaiban, és génontológiai analízissel is alátámasztottuk, hogy a két ezüstartalmú nanorészecske nagyjából hasonló változásokat indukált. Ez a megfigyelés megerősíti azt, hogy a hibrid nanorészecskék aktív alkotóeleme a héjat alkotó ezüst. Mind az ezüst nanorészecske, mind az arany-ezüst hibrid nanorészecskékkel történt kezelés elsősorban az apoptózishoz, valamint a stresszválaszhoz kapcsolható génontológiai csoportokba tartozó gének kifejeződésében okozott jelentős változást, ami megerősíti, hogy az alkalmazott, nem-toxikus dózis ellenére, a megfigyelt hatásokat elsősorban a sejtekben bekövetkező intracelluláris stressz váltja ki. Elteréseket is azonosítottunk az ezüst és az arany-ezüst nanorészecske kezelések hatására bekövetkezett transzkripciós változások között. Úgy tűnik, hogy az arany-ezüst hibrid nanorészecskék valamilyen módon képesek befolyásolni a citoskeletális rendszer működését is, míg ezekben a génontológiai csoportokban nem jelentkezett szignifikáns dúsulás az ezüst nanorészecske kezelések esetén.

Fontos megemlíteni, hogy számos irodalmi adat azt mutatja, hogy a részecskék felületi töltéseloszlása meghatározza azok biológiai aktivitását is [226]. A kísérleteinkben használt ezüst illetve arany-ezüst nanorészecskék zeta-potenciálja – habár mindkettő negatív – eltér egymástól. Míg az ezüst nanorészecske zeta potenciálja $-6,8$ mV, a hibrid nanorészecskék esetén ez $-18,6$ mV. Ezzel ellentétben, a transzkriptóm analízis során mégis igen hasonló génexpressziós mintázatot indukált a két eltérő zeta-potenciállal rendelkező nanorészecske. Ez a jelenség több

lehetséges magyarázattal is alátámasztható. Elképzelhető, hogy a negatívabb felületi töltéseloszlás nem eredményez kifejezettebb protein koronát a részecske felületén, tehát hiába alacsonyabb a töltése az egyik nanorészecske felszínének, mint a másiknak, ha ez eléri egy kritikus értéket, akkor nem lehet több fehérjével borítani a részecske felszínét. A nagyjából azonos méretű protein koronának köszönhetően a részecskék sejtekbe történő felvételének mértéke valószínűleg hasonló, illetve a sejten belül felszabadult aktív komponens – az ezüst – mennyisége is egymáshoz mérhető a két nanorészecske esetén. Valószínűleg egészen markánsabb különbségeket tapasztaltunk volna abban az esetben, ha egy pozitív és egy negatív felületi töltésű nanorészecske hatásait hasonlítottunk volna össze. Az ezüst és arany-ezüst hibrid részecske kezelések során kapott hasonló transzkriptomikai változásokat szintén magyarázhatja az ezüst nanorészecskék passziválódási képessége. Ez azt jelenti, hogy hiába tartalmaznak több ezüstöt a csak ezüsből álló nanorészecskék, a sejten belül csak korlátozott mennyiségű reaktív ion felszabadítására képesek. Valójában pontosan ezt a tulajdonságot szeretnénk kihasználni a hibrid nanorészecskék alkalmazásával, így ugyanis lehetőség nyílik arra, hogy csupán a felszabadulásra képes mennyiségű ezüsttel borítsuk az arany hordozó felszínét, így csökkentve a nanorészecskék toxikus hatását a nem-cél szervekben. A transzkriptóm analízis során azonosítottunk néhány olyan gént is, amelyek termékei szekretálódnak az extracelluláris mátrixba, és expressziójuk változik arany-ezüst hibrid nanorészecske kezelések során. Úgy gondoljuk, hogy ezek a változások fontos szerepet játszhatnak a tumor-asszociált fibroblasztokban megfigyelt, tumorsejt-serkentő aktivitást befolyásoló mechanizmusok során is, habár ennek pontosítása még további vizsgálatokat igényel.

Mivel az arany-ezüst hibrid nanorészecskék felhasználásával ígéretes *in vitro* eredményeket értünk el, megvizsgáltuk a nanorészecskék hatásait *in vivo* rendszerben is. A kísérlet során megállapítottuk, hogy a tumor mikro környezetébe juttatott arany-ezüst hibrid nanorészecskék önmagukban is képesek voltak kis mértékben csökkenteni a tumoros szövet növekedését. Még ennél is fontosabb eredmény, hogy ezek a nanorészecskék a 4T1 tumorok áttétképzését is jelentősen csökkentették. A nanorészecskék hatását doxorubicin terápia mellett is megvizsgáltuk. Habár ebben az esetben a tumorméret növekedésének gátlása nagyobb mértékű volt, a metasztázisok száma nem tért el jelentősen az arany-ezüst hibrid nanorészecskékkel kezelt csoportok esetén tapasztalt értékektől. Érdekes módon a doxorubicin önmagában nem csökkentette a 4T1 tumorsejtek metasztatizáló képességét. Az *in vivo* kísérlet

eredményei azt mutatják, hogy az arany-ezüst nanorészecskék a tumor mikrokörnyezetben képesek jelentősen gátolni a tumorok metasztázis képző aktivitását, és emellett erősíteni az intravénás doxorubicin terápia hatásfokát is. Mások eredményeihez hasonlóan ezek a kísérletek is azt bizonyítják, hogy a fém nanorészecskék igazán hatékony kombinációs partnerek lehetnek különböző kemoterápiás hatóanyagok mellett [227]. Méhnyakrák sejteken tesztelték már ezüst- és más nanorészecskék együttes hatását a kemoterápia során gyakran alkalmazott etopoziddal. A kísérlet eredményei azt mutatták, hogy a nanorészecskék és az Etopozid együtt szinergikus hatást gyakoroltak, mivel a kombinációs kezelések során a gátló hatás sokkal erősebb volt a rákos sejteken, mint amikor a kétféle anyagot külön-külön adagolták. Habár ebben a kísérletben a felhasznált Etopozid nem volt kovalensen kötve a nano hordozó felületére, a megfigyelt szinergista hatás bizonyította a nanoezüst kombinációs partnerként történő alkalmazását különböző kemoterápiás hatóanyagokat tartalmazó keverékekben [228].

Annak érdekében, hogy megállapítsuk, milyen mechanizmusok állnak pontosan az arany-ezüst nanorészecskék metasztázis-gátló hatásai mögött, további kísérleteket tervezünk. Szeretnénk megvizsgálni, hogy az *in vitro* körülmények között azonosított fibroblaszt-specifikus, szekretált faktorok változása megtörténik-e *in vivo* is az egyes nanorészecske kezelések hatására. A tumor-sztróma fibroblaszt sejtjei mellett azonban érdemes más sejttípusokra is figyelmet fordítani. Fontos lenne vizsgálni például a tumorszövetbe toborzott M2 polarizációs irányba differenciálódott makrofágokat, ugyanis a közelmúltban megállapították, hogy az ezüst nanorészecskék képesek gyulladást kelteni a tumorszövetben, ami végső soron *in vivo* emeli ezen nanorészecskék tumorelleses hatásait [229]. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a tumorsejteken és fibroblasztokon kívül, a tumor-asszociált makrofágok is jó terápiás célpontjai lehetnek a fém nanorészecskéknek. A jövőben további fontos célunk, hogy megállapítsuk, az arany nanorészecskék felszínén hordozott ezüst tumor-specifikus gátló hatása milyen fizikai paraméterek között érvényesülhet maximális mértékben. Szeretnénk meghatározni például azt, hogyan befolyásolja az ezüst réteg vastagsága, illetve a két fém nanorészecskén belüli aránya a részecskék biológiai hatásait. Végül, a célzott, tumor-specifikus hatás kialakításának érdekében, szeretnénk azokat a módszereket is azonosítani, melyek révén az ezüst ionok felszabadulása a nanorészecske felszínről csak kontrollált stimulusokra valósul meg.

Munkánkkal nagymértékben hozzájárultunk ahhoz, hogy jobban megértsük a nanoanyagok biológiai rendszerekkel történő kölcsönhatásait. Megállapítottuk, hogy az eltérő méretű ezüst nanorészecskék megegyező molekuláris útvonalon keresztül indukálnak p53-független apoptózist. Megerősítettük, hogy az arany nanorészecskék önmagukban minimális hatást gyakorolnak tumorsejtekre, míg az ezüst tartalmú nanorészecskék igen intenzív biológiai aktivitással rendelkeznek. A nanorészecskék klinikai felhasználását tekintve nagyon sok kérdés még továbbra is nyitott marad. Mivel intravénás alkalmazásuk jelentős szisztémás toxicitásuk miatt limitált lehet, tradicionális kemoterápiás felhasználás helyett, a fém nanorészecskék valamilyen új megközelítésű terápiás szerepet foglalhatnak el a gyakorlatban. Véleményem szerint, nagyon hasznos lehetne a fém nanorészecskék lokális, intra- vagy peritumorális alkalmazása. A részecskéket akár szabad formájukban, vagy valamilyen biokompatibilis mátrixba, például hidrogélbe ágyazva, juttathatnák a tumor mikrokörnyezetébe. Ilyen esetben, a brachyterápiához hasonlóan, a tumor közelébe transzplantált nanorészecskék jelenléte végül képes lenne emelni a kemo- és sugárterápia hatásfokát. A tumorok sebészeti úton történő eltávolítása után a nanorészecskék lokális alkalmazása a tumor helyén szintén előnyös lehet, ugyanis a nanorészecskék a visszamaradt tumorsejteket gátolva megakadályozhatnák a tumor kiújulását is. Habár számos ígéretes lehetőség rejlik a fém nanorészecskék klinikai felhasználásában, a pontos biológiai aktivitásuk meghatározása érdekében, további vizsgálatok szükségesek.

8. Angol nyelvű összefoglaló

Although the success rate of the cytotoxic compound-based traditional chemotherapy is strongly limited, it still represents the first line in the clinical treatment of cancerous diseases. Numerous novel, nanotechnology-based synthesis strategies have gathered grounds recently, generating new possibilities for future cancer medicine. Significant scientific effort focuses on nanotechnology research, and many different nanoparticle-based systems have already been developed for various clinical applications. Furthermore, the successful experimental performance of such nano-based systems clearly indicates their potentials in the fields of cancer diagnosis and therapy. Metal-based nanoparticles excel among nanomaterials due to their easily controllable synthesis, distinctive surface chemistry and unique biological activities. While gold nanoparticles represent biocompatible tools for targeted drug delivery and radiosensitization, silver-based nanosystems have excellent apoptotic potential, which could be exploited upon targeted elimination of malignant cells as well. Although the molecular changes induced by metal-based nanoparticles have been investigated extensively and are relatively well-characterized in various biological systems, it is still not fully understood how the different physico-chemical parameters of the nanoparticles influence their interactions with living systems. Therefore, our main aim was to investigate, how the basic physico-chemical parameters, such as size and metal composition, affect the biological performance of silver and gold nanoparticles.

Loss of function of the tumor suppressor p53 is frequently observed in human cancers. Normally, p53 serves as a multifunctional platform to overcome cellular impairments such as DNA damage, oxidative stress, hypoxia, heat shock and activation of oncogenes. Cells with defected or mutated p53 tend to accumulate mutations and proceed to uncontrolled cell division. It has been demonstrated, that the lack of cell cycle regulating and cell death initiating functions of the tumor suppressor p53 also challenges the drug therapy-induced apoptotic elimination of cancer cells. Since AgNPs are considered potent apoptosis inducers, we raised the question, whether the apoptotic capacity of these nanoparticles depends on the actual p53 status of the cancerous cells or on the physical size of nanoparticles. For this purpose, we synthesized and characterized citrate capped silver nanoparticles of two distinct sizes, with an average diameter of 5 nm and 35 nm, respectively. Then we compared the apoptotic response of p53-proficient

U2Os and p53-deficient Saos-2 osteosarcoma cells upon 5 nm and 35 nm sized AgNP treatments. Similarly to the results of recent studies on the size-dependent toxicity of nanoparticles, we observed that the smaller, 5 nm sized nanoparticles had stronger cytotoxic effects compared to the larger, 35 nm sized counterparts in both tested cell lines. Viability studies also revealed that both p53-expressing U2Os and p53-deficient Saos-2 cells were killed with almost the same degree upon AgNP treatments. Furthermore, we verified that the AgNP-induced cell death was the result of the activated apoptotic machinery. Since the extent of the apoptosis activation was comparable in p53-proficient and in p53-deficient cells, we concluded, that AgNPs are able to induce cancer cell apoptosis in a p53-independent way.

As mitochondrial stress can lead directly to apoptotic cell death, we investigated whether mitochondrial functions have been compromised in AgNP-treated osteosarcoma cells. We detected altered mitochondrial ultrastructure, decreased mitochondrial membrane potential as well as increased mitochondrial protein leakage into the cytoplasm, indicating that AgNP treatments induced mitochondrial stress in both cell lines. Since these cellular impairments can lead to p53 activation, we examined whether p53 functions were altered in AgNP-treated U2Os cells. We observed not only the stabilization of p53, but also elevated transactivating capability and stimulated p53 signaling upon both sized AgNP expositions. Moreover, we observed decreased viability of AgNP-treated Saos-2 cells, which expressed p53 ectopically, providing further support to the idea that p53 contributed to AgNP-induced apoptosis. Although AgNP treatments stimulated p53 signaling in U2Os cells, the viability results on p53-lacking Saos-2 cells implicated that the AgNP-induced apoptosis can also be the result of p53-independent events such as the previously verified mitochondrial dysfunction. As we have not detected any nanoparticles in mitochondria, it can be hypostatized that silver ions released from the nanoparticles could be responsible for the observed mitochondrial stress in both p53-expressing U2Os and p53-negative Saos-2 cells.

Since both 5 nm and 35 nm sized AgNPs - in the applied, IC₅₀-approximating concentrations - had a comparable impact on every examined cellular feature, our results suggest that the differently sized AgNPs have common cellular targets, and induce cancer cell apoptosis via identical molecular mechanisms.

During the second part of our investigation, we aimed to compare the biological effects of metal nanoparticles with different chemical compositions. Consequently, we synthesized and

characterized gold (AuNP) and silver nanoparticles (AgNP). Additionally, we successfully produced gold and silver containing, core-shell structured hybrid nanoparticles (Au@Ag) as well.

Although a high number of recent studies deal with the molecular background of the interactions between metal nanoparticles and specific cancer cell lines, in reality, solid tumors are not homogenous cell masses, but contain a variety of non-cancerous stroma cells. This reactive stroma has an indispensable role in tumor development as it has been observed, that these non-cancerous cells are recruited from nearby tissues in order to provide a supportive milieu to the cancer cells. Activated fibroblasts are the most abundant cells in the reactive tumor stroma, and by the secretion of various soluble factors, these cells facilitate the proliferation, invasion and also the metastatic spread of malignant cells. It has been reported, that the extent of the fibrotic tumor stroma directly correlates with the therapeutic outcome, therefore, disrupting the interaction between tumor-associated fibroblasts and cancer cells seems an advantageous strategy to overcome cancer invasion and metastasis.

During our investigation, we aimed to examine whether the presence of different metal nanoparticles in the tumor microenvironment affects the stroma cell-cancer cell communication. If the nanoparticle treatments can in fact influence the stroma-cancer cell crosstalk, we aimed to find out, whether this phenomenon can be therapeutically exploited. According to our results on the biological effects of gold nanoparticles, we can further strengthen the previously established concept regarding their biocompatibility, as these nanoparticles were non-toxic in our model systems. Based on our viability experiments, it seems that Au@Ag hybrid nanoparticles can effectively cause cancer cell death, however are less toxic than AgNPs, which is probably due to the different physico-chemical properties of such nanoparticles. Owing to the core-shell structure of the hybrid nanoparticles, the kinetics of reactive silver ion release and therefore the toxic nature of Au@Ag can be different from that of AgNPs. With further chemical optimization and characterization targeted silver ion release might also be achieved using such Au@Ag core-shell particles in biological systems. Interestingly, we found that silver containing AgNPs and Au@Ag nanoparticles have the capability to distinguish between cancerous and non-cancerous cells, since we observed higher cytotoxic activities in breast cancer than in fibroblast cells upon both monoculture and co-culture conditions. We presume, that the reason behind this phenomenon is the elevated endocytic and particle uptake capability of cancer cells,

a common feature, which is used to cover their elevated nutritional demand. In line with this hypothesis, it seems reasonable, that the enhanced cancer cell-specific particle uptake capability leads directly to elevated intracellular accumulation of nanoparticles, consequently resulting a higher cytotoxic effect in cancer cells. In addition to the observed selective cytotoxic properties, we also found, that in non-toxic concentrations, AgNP and Au@Ag treatments inhibited the migration and invasion of metastatic cancer cells.

Our results indicate, that in non-toxic concentrations, silver containing AgNPs and Au@Ag nanoparticles have the capability to force tumor-associated fibroblasts to re-program their tumor supportive behavior. We also found, that AgNP and Au@Ag nanoparticle treatments result in a reduced cancer cell proliferation-promoting fibroblast phenotype, realized by an altered secretion profile. In line with this observation decreased matrix metalloproteinase activity could be verified in the supernatant of AgNP- and Au@Ag-treated fibroblast cells.

In order to explore potential molecular mechanisms behind the supposed fibroblast re-programming effects, AuNP, AgNP and Au@Ag nanoparticle-treated cancer-associated fibroblasts were subjected to transcriptome analysis using next generation sequencing approach. Interestingly, compared to the untreated control, no significant changes were identified in the gene expression profile of AuNP-exposed fibroblast cells, while AgNP and Au@Ag treatments induced considerable transcriptomical alterations. Although the pattern of the transcriptional profiles of AgNP- and Au@Ag-treated fibroblasts were largely similar, using GO term enrichment analysis, remarkable differences were identified between the two nanoparticle-treated fibroblast cells. Both treatments induced primarily stress-response and apoptosis-related gene expression, however, the enrichment of the cell death-associated GO terms was considerably higher in AgNP-treated cells, than in Au@Ag-treated fibroblasts. Based on the GO term analyses, Au@Ag treatments influence also cytoskeletal organization-specific gene expression changes, while these functions did not show significant enrichments in AgNP-treated fibroblasts. In Au@Ag-treated fibroblasts we also identified expressional changes in a small set of genes, which control the cancer cell-promoting activities of cancer-associated fibroblasts. Although these latter positive hits represent secreted, extracellular factors, which enhance the proliferation and metastatic invasion of cancer cells, the impact of these transcriptional changes should be examined more precisely to verify their role in the previously observed re-programming mechanisms of cancer-associated fibroblast cells.

Since Au@Ag nanoparticles had remarkable *in vitro* performance, we decided to test their *in vivo* efficacy as well using the 4T1 cell-based cancer metastasis model. We found, that locally administered Au@Ag nanoparticles have considerable tumor growth inhibiting effects. More importantly, our results indicated that the metastatic spreading of 4T1 cells was suppressed significantly in the Au@Ag-treated animals. Additionally, our findings suggest that Au@Ag nanoparticles could enhance the anti-tumor effect of intravenously applied doxorubicin, therefore, are excellent combinational partners of conventional chemotherapy.

As a conclusion, we can state that this work provides further support to the potential application of metal nanoparticles in cancer therapy. We found, that silver nanoparticles induce p53-independent apoptosis irrespective of nanoparticle size. We also verified that while gold nanoparticles can be regarded as biocompatible materials, silver-containing nanoparticles interfere strongly with a wide range of biological functions in the tumor microenvironment. There is solid evidence, that gold nanoparticles can be applied as carriers of biologically active silver ions, and the rational design of such nanoparticle systems could be exploited in the future for the development of therapeutically useful nanomaterials.

9. Irodalomjegyzék

1. Liu, J., et al., *PEGylation and zwitterionization: pros and cons in the renal clearance and tumor targeting of near-IR-emitting gold nanoparticles*. Angew Chem Int Ed Engl, 2013. **52**(48): p. 12572-6.
2. Joyce, J.A. and J.W. Pollard, *Microenvironmental regulation of metastasis*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(4): p. 239-52.
3. Sadlonova, A., et al., *Breast fibroblasts modulate epithelial cell proliferation in three-dimensional in vitro co-culture*. Breast Cancer Res, 2005. **7**(1): p. R46-59.
4. Brown, C.J., et al., *Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(12): p. 862-73.
5. Ouyang, L., et al., *Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis*. Cell Prolif, 2012. **45**(6): p. 487-98.
6. Chen, M. and J. Wang, *Initiator caspases in apoptosis signaling pathways*. Apoptosis, 2002. **7**(4): p. 313-9.
7. Kurokawa, M. and S. Kornbluth, *Caspases and kinases in a death grip*. Cell, 2009. **138**(5): p. 838-54.
8. Segawa, K. and S. Nagata, *An Apoptotic 'Eat Me' Signal: Phosphatidylserine Exposure*. Trends Cell Biol, 2015. **25**(11): p. 639-50.
9. Engel, T. and D.C. Henshall, *Apoptosis, Bcl-2 family proteins and caspases: the ABCs of seizure-damage and epileptogenesis?* Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol, 2009. **1**(2): p. 97-115.
10. Shamas-Din, A., et al., *BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(4): p. 508-20.
11. Zou, H., et al., *Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3*. Cell, 1997. **90**(3): p. 405-13.
12. Li, P., et al., *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade*. Cell, 1997. **91**(4): p. 479-89.
13. Kelly, P.N. and A. Strasser, *The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumorigenesis and cancer therapy*. Cell Death Differ, 2011. **18**(9): p. 1414-24.
14. Bratton, S.B., et al., *Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes*. EMBO J, 2001. **20**(5): p. 998-1009.
15. Kuida, K., et al., *Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9*. Cell, 1998. **94**(3): p. 325-37.
16. Martin, M.C., et al., *Protein kinase A regulates caspase-9 activation by Apaf-1 downstream of cytochrome c*. J Biol Chem, 2005. **280**(15): p. 15449-55.
17. Sayers, T.J., *Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy*. Cancer Immunol Immunother, 2011. **60**(8): p. 1173-80.
18. !!! INVALID CITATION !!!
19. Sun, S.Y., *Understanding the Role of the Death Receptor 5/FADD/caspase-8 Death Signaling in Cancer Metastasis*. Mol Cell Pharmacol, 2011. **3**(1): p. 31-34.
20. Bell, B.D., et al., *FADD and caspase-8 control the outcome of autophagic signaling in proliferating T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(43): p. 16677-82.
21. Lima, R.T., et al., *MicroRNA regulation of core apoptosis pathways in cancer*. Eur J Cancer, 2011. **47**(2): p. 163-74.

22. Garzon, R., G.A. Calin, and C.M. Croce, *MicroRNAs in Cancer*. Annu Rev Med, 2009. **60**: p. 167-79.
23. Tsujimoto, Y. and S. Shimizu, *Another way to die: autophagic programmed cell death*. Cell Death Differ, 2005. **12 Suppl 2**: p. 1528-34.
24. Wallach, D., et al., *Programmed necrosis in inflammation: Toward identification of the effector molecules*. Science, 2016. **352**(6281): p. aaf2154.
25. Zhang, D.W., et al., *RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis*. Science, 2009. **325**(5938): p. 332-6.
26. Kim, Y.S., et al., *TNF-induced activation of the Nox1 NADPH oxidase and its role in the induction of necrotic cell death*. Mol Cell, 2007. **26**(5): p. 675-87.
27. Cho, Y.S., et al., *Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation*. Cell, 2009. **137**(6): p. 1112-23.
28. He, S., et al., *Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha*. Cell, 2009. **137**(6): p. 1100-11.
29. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2015*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(1): p. 5-29.
30. Nguyen, L.V., et al., *Cancer stem cells: an evolving concept*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(2): p. 133-43.
31. Petitjean, A., et al., *TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes*. Oncogene, 2007. **26**(15): p. 2157-65.
32. Malkin, D., et al., *Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms*. Science, 1990. **250**(4985): p. 1233-8.
33. Guo, L., et al., *Ionizing radiation induces a dramatic persistence of p53 protein accumulation and DNA damage signaling in mutant p53 zebrafish*. Oncogene, 2013. **32**(34): p. 4009-16.
34. Endo, A., et al., *Nuclear mitotic apparatus protein, NuMA, modulates p53-mediated transcription in cancer cells*. Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e713.
35. Chipuk, J.E. and D.R. Green, *Dissecting p53-dependent apoptosis*. Cell Death Differ, 2006. **13**(6): p. 994-1002.
36. Muller, P.A. and K.H. Vousden, *p53 mutations in cancer*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(1): p. 2-8.
37. Joerger, A.C. and A.R. Fersht, *The tumor suppressor p53: from structures to drug discovery*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(6): p. a000919.
38. Au Yeung, C.L., et al., *Human papillomavirus type 16 E6 suppresses microRNA-23b expression in human cervical cancer cells through DNA methylation of the host gene C9orf3*. Oncotarget, 2017.
39. O'Connor, P.M., et al., *Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents*. Cancer Res, 1997. **57**(19): p. 4285-300.
40. Lewis, V.O., et al., *Outcome of postradiation osteosarcoma does not correlate with chemotherapy response*. Clin Orthop Relat Res, 2006. **450**: p. 60-6.
41. Lowe, S.W., et al., *p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents*. Cell, 1993. **74**(6): p. 957-67.
42. Hu, T., et al., *Sensitivity of apoptosis-resistant colon cancer cells to tanshinones is mediated by autophagic cell death and p53-independent cytotoxicity*. Phytomedicine, 2015. **22**(5): p. 536-44.

43. Corazzari, M., et al., *Fenretinide: a p53-independent way to kill cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **331**(3): p. 810-5.
44. Lien, J.C., et al., *Naphthoquinone derivative PPE8 induces endoplasmic reticulum stress in p53 null H1299 cells*. Oxid Med Cell Longev, 2015. **2015**: p. 453679.
45. Pishas, K.I., et al., *XI-006 induces potent p53-independent apoptosis in Ewing sarcoma*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 11465.
46. Weis, S.M. and D.A. Cheresh, *Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1359-70.
47. Ding, L., et al., *Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft*. Nature, 2010. **464**(7291): p. 999-1005.
48. Campbell, P.J., et al., *The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer*. Nature, 2010. **467**(7319): p. 1109-13.
49. Yachida, S., et al., *Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer*. Nature, 2010. **467**(7319): p. 1114-7.
50. Sethi, N. and Y. Kang, *Unravelling the complexity of metastasis - molecular understanding and targeted therapies*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(10): p. 735-48.
51. Valdes, F., et al., *The epithelial mesenchymal transition confers resistance to the apoptotic effects of transforming growth factor Beta in fetal rat hepatocytes*. Mol Cancer Res, 2002. **1**(1): p. 68-78.
52. Ansieau, S., et al., *Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence*. Cancer Cell, 2008. **14**(1): p. 79-89.
53. Browne, G., A.E. Sayan, and E. Tulchinsky, *ZEB proteins link cell motility with cell cycle control and cell survival in cancer*. Cell Cycle, 2010. **9**(5): p. 886-91.
54. De Craene, B. and G. Berx, *Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(2): p. 97-110.
55. Tsai, J.H., et al., *Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis*. Cancer Cell, 2012. **22**(6): p. 725-36.
56. Hanahan, D. and L.M. Coussens, *Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment*. Cancer Cell, 2012. **21**(3): p. 309-22.
57. Kidd, S., et al., *Origins of the tumor microenvironment: quantitative assessment of adipose-derived and bone marrow-derived stroma*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e30563.
58. Xiong, Y., et al., *Hematopoietic stem cell-derived adipocytes and fibroblasts in the tumor microenvironment*. World J Stem Cells, 2015. **7**(2): p. 253-65.
59. Mezawa, Y. and A. Orimo, *The roles of tumor- and metastasis-promoting carcinoma-associated fibroblasts in human carcinomas*. Cell Tissue Res, 2016. **365**(3): p. 675-89.
60. Mueller, M.M. and N.E. Fusenig, *Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(11): p. 839-49.
61. Kalluri, R., *The biology and function of fibroblasts in cancer*. Nat Rev Cancer, 2016. **16**(9): p. 582-98.
62. Orimo, A. and R.A. Weinberg, *Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type*. Cell Cycle, 2006. **5**(15): p. 1597-601.
63. Huang, M., et al., *Breast cancer stromal fibroblasts promote the generation of CD44⁺CD24⁻ cells through SDF-1/CXCR4 interaction*. J Exp Clin Cancer Res, 2010. **29**: p. 80.
64. Schauer, I.G., et al., *Cancer-associated fibroblasts and their putative role in potentiating the initiation and development of epithelial ovarian cancer*. Neoplasia, 2011. **13**(5): p. 393-405.

65. Sugimoto, H., et al., *Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment*. *Cancer Biol Ther*, 2006. **5**(12): p. 1640-6.
66. Cardone, A., et al., *Prognostic value of desmoplastic reaction and lymphocytic infiltration in the management of breast cancer*. *Panminerva Med*, 1997. **39**(3): p. 174-7.
67. Maeshima, A.M., et al., *Modified scar grade: a prognostic indicator in small peripheral lung adenocarcinoma*. *Cancer*, 2002. **95**(12): p. 2546-54.
68. Yamashita, M., et al., *Role of stromal myofibroblasts in invasive breast cancer: stromal expression of alpha-smooth muscle actin correlates with worse clinical outcome*. *Breast Cancer*, 2012. **19**(2): p. 170-6.
69. Chang, H.Y., et al., *Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(20): p. 12877-82.
70. Anderberg, C. and K. Pietras, *On the origin of cancer-associated fibroblasts*. *Cell Cycle*, 2009. **8**(10): p. 1461-2.
71. Dumont, N., et al., *Breast fibroblasts modulate early dissemination, tumorigenesis, and metastasis through alteration of extracellular matrix characteristics*. *Neoplasia*, 2013. **15**(3): p. 249-62.
72. Herrera, M., et al., *Functional heterogeneity of cancer-associated fibroblasts from human colon tumors shows specific prognostic gene expression signature*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(21): p. 5914-26.
73. Orimo, A. and R.A. Weinberg, *Heterogeneity of stromal fibroblasts in tumors*. *Cancer Biol Ther*, 2007. **6**(4): p. 618-9.
74. Navab, R., et al., *Prognostic gene-expression signature of carcinoma-associated fibroblasts in non-small cell lung cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(17): p. 7160-5.
75. Bailey, J.M., et al., *Sonic hedgehog promotes desmoplasia in pancreatic cancer*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(19): p. 5995-6004.
76. Avgustinova, A., et al., *Tumour cell-derived Wnt7a recruits and activates fibroblasts to promote tumour aggressiveness*. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 10305.
77. Erez, N., et al., *Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner*. *Cancer Cell*, 2010. **17**(2): p. 135-47.
78. Albregues, J., et al., *Epigenetic switch drives the conversion of fibroblasts into proinvasive cancer-associated fibroblasts*. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 10204.
79. Paggetti, J., et al., *Exosomes released by chronic lymphocytic leukemia cells induce the transition of stromal cells into cancer-associated fibroblasts*. *Blood*, 2015. **126**(9): p. 1106-17.
80. Kamato, D., et al., *Transforming growth factor-beta signalling: role and consequences of Smad linker region phosphorylation*. *Cell Signal*, 2013. **25**(10): p. 2017-24.
81. Kojima, Y., et al., *Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(46): p. 20009-14.
82. Carito, V., et al., *Metabolic remodeling of the tumor microenvironment: migration stimulating factor (MSF) reprograms myofibroblasts toward lactate production, fueling anabolic tumor growth*. *Cell Cycle*, 2012. **11**(18): p. 3403-14.

83. Chaudhri, V.K., et al., *Metabolic alterations in lung cancer-associated fibroblasts correlated with increased glycolytic metabolism of the tumor*. Mol Cancer Res, 2013. **11**(6): p. 579-92.
84. Mao, Y., et al., *Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2013. **32**(1-2): p. 303-15.
85. Ferrara, N., *VEGF as a therapeutic target in cancer*. Oncology, 2005. **69 Suppl 3**: p. 11-6.
86. Herrera, M., et al., *Cancer-associated fibroblast and M2 macrophage markers together predict outcome in colorectal cancer patients*. Cancer Sci, 2013. **104**(4): p. 437-44.
87. Patocs, A., et al., *Breast-cancer stromal cells with TP53 mutations and nodal metastases*. N Engl J Med, 2007. **357**(25): p. 2543-51.
88. Hu, M., et al., *Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers*. Nat Genet, 2005. **37**(8): p. 899-905.
89. Jiang, L., et al., *Global hypomethylation of genomic DNA in cancer-associated myofibroblasts*. Cancer Res, 2008. **68**(23): p. 9900-8.
90. Shakya, R., et al., *Hypomethylating therapy in an aggressive stroma-rich model of pancreatic carcinoma*. Cancer Res, 2013. **73**(2): p. 885-96.
91. Yu, J., et al., *Unlike pancreatic cancer cells pancreatic cancer associated fibroblasts display minimal gene induction after 5-aza-2'-deoxycytidine*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e43456.
92. Perugorria, M.J., et al., *Histone methyltransferase ASH1 orchestrates fibrogenic gene transcription during myofibroblast transdifferentiation*. Hepatology, 2012. **56**(3): p. 1129-39.
93. Glenisson, W., V. Castronovo, and D. Waltregny, *Histone deacetylase 4 is required for TGFbeta1-induced myofibroblastic differentiation*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(10): p. 1572-82.
94. Turley, S.J., V. Cremasco, and J.L. Astarita, *Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(11): p. 669-82.
95. Fukumura, D., et al., *Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells*. Cell, 1998. **94**(6): p. 715-25.
96. Guo, X., et al., *Stromal fibroblasts activated by tumor cells promote angiogenesis in mouse gastric cancer*. J Biol Chem, 2008. **283**(28): p. 19864-71.
97. Orimo, A., et al., *Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion*. Cell, 2005. **121**(3): p. 335-48.
98. Pietras, K. and A. Ostman, *Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma*. Exp Cell Res, 2010. **316**(8): p. 1324-31.
99. Yang, F., et al., *Stromal expression of connective tissue growth factor promotes angiogenesis and prostate cancer tumorigenesis*. Cancer Res, 2005. **65**(19): p. 8887-95.
100. Grugan, K.D., et al., *Fibroblast-secreted hepatocyte growth factor plays a functional role in esophageal squamous cell carcinoma invasion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(24): p. 11026-31.
101. Daly, A.J., L. McIlreavey, and C.R. Irwin, *Regulation of HGF and SDF-1 expression by oral fibroblasts--implications for invasion of oral cancer*. Oral Oncol, 2008. **44**(7): p. 646-51.
102. Whiteside, T.L., *Tumor-Derived Exosomes and Their Role in Cancer Progression*. Adv Clin Chem, 2016. **74**: p. 103-41.

103. Luga, V., et al., *Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration*. Cell, 2012. **151**(7): p. 1542-56.
104. Richards, K.E., et al., *Cancer-associated fibroblast exosomes regulate survival and proliferation of pancreatic cancer cells*. Oncogene, 2016.
105. Bertolini, G., et al., *Microenvironment-Modulated Metastatic CD133+/CXCR4+/EpCAM- Lung Cancer-Initiating Cells Sustain Tumor Dissemination and Correlate with Poor Prognosis*. Cancer Res, 2015. **75**(17): p. 3636-49.
106. Zhuang, J., et al., *TGFbeta1 secreted by cancer-associated fibroblasts induces epithelial-mesenchymal transition of bladder cancer cells through lncRNA-ZEB2NAT*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 11924.
107. Deryugina, E.I. and J.P. Quigley, *Matrix metalloproteinases and tumor metastasis*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(1): p. 9-34.
108. Thaler, F., *Current trends in the development of histone deacetylase inhibitors: a review of recent patent applications*. Pharm Pat Anal, 2012. **1**(1): p. 75-90.
109. Kang, Z.J., et al., *The Philadelphia chromosome in leukemogenesis*. Chin J Cancer, 2016. **35**: p. 48.
110. Wahid, M., et al., *Therapeutic potential and critical analysis of trastuzumab and bevacizumab in combination with different chemotherapeutic agents against metastatic breast/colorectal cancer affecting various endpoints*. Crit Rev Oncol Hematol, 2016. **104**: p. 124-30.
111. Szakacs, G., G.K. Chen, and M.M. Gottesman, *The molecular mysteries underlying P-glycoprotein-mediated multidrug resistance*. Cancer Biol Ther, 2004. **3**(4): p. 382-4.
112. Sike, A., et al., *mRNA levels of related Abcb genes change opposite to each other upon histone deacetylase inhibition in drug-resistant rat hepatoma cells*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e84915.
113. Teodori, E., et al., *The functions and structure of ABC transporters: implications for the design of new inhibitors of Pgp and MRP1 to control multidrug resistance (MDR)*. Curr Drug Targets, 2006. **7**(7): p. 893-909.
114. Haume, K., et al., *Gold nanoparticles for cancer radiotherapy: a review*. Cancer Nanotechnol, 2016. **7**(1): p. 8.
115. Kobayashi, K., et al., *Enhancement of radiation effect by heavy elements*. Mutat Res, 2010. **704**(1-3): p. 123-31.
116. Linam, J. and L.X. Yang, *Recent developments in radiosensitization*. Anticancer Res, 2015. **35**(5): p. 2479-85.
117. Oberdorster, G., E. Oberdorster, and J. Oberdorster, *Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles*. Environ Health Perspect, 2005. **113**(7): p. 823-39.
118. Lanone, S. and J. Boczkowski, *Biomedical applications and potential health risks of nanomaterials: molecular mechanisms*. Curr Mol Med, 2006. **6**(6): p. 651-63.
119. Lytton-Jean, A.K., et al., *Cancer nanotherapeutics in clinical trials*. Cancer Treat Res, 2015. **166**: p. 293-322.
120. Jeong, E.H., et al., *Gold nanoparticle (AuNP)-based drug delivery and molecular imaging for biomedical applications*. Arch Pharm Res, 2014. **37**(1): p. 53-9.
121. Zhang, G., X. Zeng, and P. Li, *Nanomaterials in cancer-therapy drug delivery system*. J Biomed Nanotechnol, 2013. **9**(5): p. 741-50.

122. Zhao, J. and S.S. Feng, *Nanocarriers for delivery of siRNA and co-delivery of siRNA and other therapeutic agents*. Nanomedicine (Lond), 2015. **10**(14): p. 2199-228.
123. Rezaei, F., et al., *Fabrication of poly hydroxybutyrate-polyethylene glycol-folic acid nanoparticles loaded by paclitaxel*. Curr Drug Deliv, 2016. **13**(1): p. 57-64.
124. Han, Z., et al., *Synergistically enhanced photocatalytic and chemotherapeutic effects of aptamer-functionalized ZnO nanoparticles towards cancer cells*. Phys Chem Chem Phys, 2015. **17**(33): p. 21576-82.
125. Sharma, H., et al., *Metal nanoparticles: a theranostic nanotool against cancer*. Drug Discov Today, 2015. **20**(9): p. 1143-51.
126. Ernsting, M.J., et al., *Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles*. J Control Release, 2013. **172**(3): p. 782-94.
127. Blanco, E., H. Shen, and M. Ferrari, *Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery*. Nat Biotechnol, 2015. **33**(9): p. 941-51.
128. Bianco, A., K. Kostarelos, and M. Prato, *Opportunities and challenges of carbon-based nanomaterials for cancer therapy*. Expert Opin Drug Deliv, 2008. **5**(3): p. 331-42.
129. Bhattacharya, R. and P. Mukherjee, *Biological properties of "naked" metal nanoparticles*. Adv Drug Deliv Rev, 2008. **60**(11): p. 1289-306.
130. Li, Y.F. and C. Chen, *Fate and toxicity of metallic and metal-containing nanoparticles for biomedical applications*. Small, 2011. **7**(21): p. 2965-80.
131. Cheng, Z., et al., *Improved tumor targeting of polymer-based nanovesicles using polymer-lipid blends*. Bioconj Chem, 2011. **22**(10): p. 2021-9.
132. Zako, T., et al., *Cancer-targeted near infrared imaging using rare earth ion-doped ceramic nanoparticles*. Biomater Sci, 2015. **3**(1): p. 59-64.
133. Nishimura, Y., et al., *Genetic engineering of bio-nanoparticles for drug delivery: a review*. J Biomed Nanotechnol, 2014. **10**(9): p. 2063-85.
134. Charron, D.M., J. Chen, and G. Zheng, *Theranostic lipid nanoparticles for cancer medicine*. Cancer Treat Res, 2015. **166**: p. 103-27.
135. Kesharwani, P. and A.K. Iyer, *Recent advances in dendrimer-based nanovectors for tumor-targeted drug and gene delivery*. Drug Discov Today, 2015. **20**(5): p. 536-47.
136. Anselmo, A.C. and S. Mitragotri, *Nanoparticles in the clinic*. Bioengineering & Translational Medicine, 2016. **1**(1): p. 10-29.
137. Zhang, J., et al., *Doxorubicin-loaded star-shaped copolymer PLGA-vitamin E TPGS nanoparticles for lung cancer therapy*. J Mater Sci Mater Med, 2015. **26**(4): p. 165.
138. Li, L., et al., *Multifunctional silica-based nanocomposites for cancer nanotheranostics*. J Biomed Nanotechnol, 2014. **10**(9): p. 1784-809.
139. Roik, N.V. and L.A. Belyakova, *Mesoporous silica nanoparticles equipped with surface nanovalves for pH-controlled liberation of doxorubicin*. Interface Focus, 2016. **6**(6): p. 20160041.
140. Cole, A.J., V.C. Yang, and A.E. David, *Cancer theranostics: the rise of targeted magnetic nanoparticles*. Trends Biotechnol, 2011. **29**(7): p. 323-32.
141. Gautier, J., et al., *Recent advances in theranostic nanocarriers of doxorubicin based on iron oxide and gold nanoparticles*. J Control Release, 2013. **169**(1-2): p. 48-61.
142. Akbarzadeh, A., M. Samiei, and S. Davaran, *Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine*. Nanoscale Res Lett, 2012. **7**(1): p. 144.
143. Chatterjee, D.K., P. Diagaradjane, and S. Krishnan, *Nanoparticle-mediated hyperthermia in cancer therapy*. Ther Deliv, 2011. **2**(8): p. 1001-14.

144. Jeremic, B., A.R. Aguerri, and N. Filipovic, *Radiosensitization by gold nanoparticles*. Clin Transl Oncol, 2013. **15**(8): p. 593-601.
145. Zhang, X.D., et al., *Size-dependent radiosensitization of PEG-coated gold nanoparticles for cancer radiation therapy*. Biomaterials, 2012. **33**(27): p. 6408-19.
146. Alarcon, E.I., et al., *The biocompatibility and antibacterial properties of collagen-stabilized, photochemically prepared silver nanoparticles*. Biomaterials, 2012. **33**(19): p. 4947-56.
147. Ahamed, M., M.S. Alsalhi, and M.K. Siddiqui, *Silver nanoparticle applications and human health*. Clin Chim Acta, 2010. **411**(23-24): p. 1841-8.
148. Hebeish, A., et al., *Antimicrobial wound dressing and anti-inflammatory efficacy of silver nanoparticles*. Int J Biol Macromol, 2014. **65**: p. 509-15.
149. Wu, J., et al., *In situ synthesis of silver-nanoparticles/bacterial cellulose composites for slow-released antimicrobial wound dressing*. Carbohydr Polym, 2014. **102**: p. 762-71.
150. Li, D., et al., *Fabrication of new chitosan-based composite sponge containing silver nanoparticles and its antibacterial properties for wound dressing*. J Nanosci Nanotechnol, 2011. **11**(6): p. 4733-8.
151. Furno, F., et al., *Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection?* J Antimicrob Chemother, 2004. **54**(6): p. 1019-24.
152. Shahverdi, A.R., et al., *Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against Staphylococcus aureus and Escherichia coli*. Nanomedicine, 2007. **3**(2): p. 168-71.
153. Govender, R., et al., *Silver nanoparticles of Albizia adianthifolia: the induction of apoptosis in human lung carcinoma cell line*. J Nanobiotechnology, 2013. **11**: p. 5.
154. Boca, S.C., et al., *Chitosan-coated triangular silver nanoparticles as a novel class of biocompatible, highly effective photothermal transducers for in vitro cancer cell therapy*. Cancer Lett, 2011. **311**(2): p. 131-40.
155. Durai, P., et al., *Synthesis and characterization of silver nanoparticles using crystal compound of sodium para-hydroxybenzoate tetrahydrate isolated from Vitex negundo. L leaves and its apoptotic effect on human colon cancer cell lines*. Eur J Med Chem, 2014. **84**: p. 90-9.
156. Gurunathan, S., et al., *Cytotoxicity of biologically synthesized silver nanoparticles in MDA-MB-231 human breast cancer cells*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 535796.
157. Sanpui, P., A. Chattopadhyay, and S.S. Ghosh, *Induction of apoptosis in cancer cells at low silver nanoparticle concentrations using chitosan nanocarrier*. ACS Appl Mater Interfaces, 2011. **3**(2): p. 218-28.
158. Miethling-Graff, R., et al., *Exposure to silver nanoparticles induces size- and dose-dependent oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells*. Toxicol In Vitro, 2014. **28**(7): p. 1280-9.
159. Pandurangan, M., et al., *Time and Concentration-Dependent Therapeutic Potential of Silver Nanoparticles in Cervical Carcinoma Cells*. Biol Trace Elem Res, 2015.
160. Nallathamby, P.D. and X.H. Xu, *Study of cytotoxic and therapeutic effects of stable and purified silver nanoparticles on tumor cells*. Nanoscale, 2010. **2**(6): p. 942-52.
161. Rutberg, F.G., et al., *Effect of silver oxide nanoparticles on tumor growth in vivo*. Dokl Biochem Biophys, 2008. **421**: p. 191-3.
162. Sriram, M.I., et al., *Antitumor activity of silver nanoparticles in Dalton's lymphoma ascites tumor model*. Int J Nanomedicine, 2010. **5**: p. 753-62.

163. Liu, J., et al., *TAT-modified nanosilver for combating multidrug-resistant cancer*. Biomaterials, 2012. **33**(26): p. 6155-61.
164. Park, E.J., et al., *Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism*. Toxicol In Vitro, 2010. **24**(3): p. 872-8.
165. Kim, S., et al., *Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells*. Toxicol In Vitro, 2009. **23**(6): p. 1076-84.
166. Arora, S., et al., *Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies*. Toxicol Lett, 2008. **179**(2): p. 93-100.
167. Xu, F., et al., *Silver nanoparticles (AgNPs) cause degeneration of cytoskeleton and disrupt synaptic machinery of cultured cortical neurons*. Mol Brain, 2013. **6**: p. 29.
168. Nymark, P., et al., *Genotoxicity of polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles in BEAS 2B cells*. Toxicology, 2013. **313**(1): p. 38-48.
169. Verano-Braga, T., et al., *Insights into the cellular response triggered by silver nanoparticles using quantitative proteomics*. ACS Nano, 2014. **8**(3): p. 2161-75.
170. Liu, J., et al., *Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces*. ACS Nano, 2010. **4**(11): p. 6903-13.
171. Patra, S., et al., *Green synthesis, characterization of gold and silver nanoparticles and their potential application for cancer therapeutics*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2015. **53**: p. 298-309.
172. Gurunathan, S., et al., *Green synthesis of silver nanoparticles using Ganoderma neo-japonicum Imazeki: a potential cytotoxic agent against breast cancer cells*. Int J Nanomedicine, 2013. **8**: p. 4399-413.
173. Shannahan, J.H., et al., *Silver nanoparticle protein corona composition in cell culture media*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e74001.
174. Duran, N., et al., *Silver nanoparticle protein corona and toxicity: a mini-review*. J Nanobiotechnology, 2015. **13**: p. 55.
175. De Jong, W.H., et al., *Systemic and immunotoxicity of silver nanoparticles in an intravenous 28 days repeated dose toxicity study in rats*. Biomaterials, 2013. **34**(33): p. 8333-43.
176. Trop, M., *Silver-coated dressing acticoat caused raised liver enzymes and argyria-like symptoms in burn patient*. J Trauma, 2006. **61**(4): p. 1024.
177. Xia, T., et al., *Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm*. Nano Lett, 2006. **6**(8): p. 1794-807.
178. Xiu, Z.M., et al., *Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles*. Nano Lett, 2012. **12**(8): p. 4271-5.
179. Bar-Ilan, O., et al., *Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos*. Small, 2009. **5**(16): p. 1897-910.
180. Pauksch, L., et al., *Biocompatibility of silver nanoparticles and silver ions in primary human mesenchymal stem cells and osteoblasts*. Acta Biomater, 2014. **10**(1): p. 439-49.
181. Munger, M.A., et al., *In vivo human time-exposure study of orally dosed commercial silver nanoparticles*. Nanomedicine, 2014. **10**(1): p. 1-9.
182. Sun, Y. and Y. Xia, *Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles*. Science, 2002. **298**(5601): p. 2176-9.
183. Yuan, Z., et al., *Selective Colorimetric Detection of Hydrogen Sulfide Based on Primary Amine-Active Ester Cross-Linking of Gold Nanoparticles*. Anal Chem, 2015. **87**(14): p. 7267-73.

184. Kolemen, S., et al., *Remote-Controlled Release of Singlet Oxygen by the Plasmonic Heating of Endoperoxide-Modified Gold Nanorods: Towards a Paradigm Change in Photodynamic Therapy*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016. **55**(11): p. 3606-10.
185. Fernandes, A.R., et al., *Multifunctional gold-nanoparticles: A nanovectorization tool for the targeted delivery of novel chemotherapeutic agents*. *J Control Release*, 2017. **245**: p. 52-61.
186. Prabakaran, M., et al., *Gold nanoparticles with a monolayer of doxorubicin-conjugated amphiphilic block copolymer for tumor-targeted drug delivery*. *Biomaterials*, 2009. **30**(30): p. 6065-75.
187. Paciotti, G.F., et al., *Colloidal gold: a novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery*. *Drug Deliv*, 2004. **11**(3): p. 169-83.
188. Rosi, N.L., et al., *Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation*. *Science*, 2006. **312**(5776): p. 1027-30.
189. Porcel, E., et al., *Platinum nanoparticles: a promising material for future cancer therapy?* *Nanotechnology*, 2010. **21**(8): p. 85103.
190. Her, S., D.A. Jaffray, and C. Allen, *Gold nanoparticles for applications in cancer radiotherapy: Mechanisms and recent advancements*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015.
191. Kim, M.S., et al., *Gold nanoparticles enhance anti-tumor effect of radiotherapy to hypoxic tumor*. *Radiat Oncol J*, 2016. **34**(3): p. 230-238.
192. Liu, P., et al., *Silver nanoparticles outperform gold nanoparticles in radiosensitizing U251 cells in vitro and in an intracranial mouse model of glioma*. *Int J Nanomedicine*, 2016. **11**: p. 5003-5014.
193. Song, C.W., *Effect of local hyperthermia on blood flow and microenvironment: a review*. *Cancer Res*, 1984. **44**(10 Suppl): p. 4721s-4730s.
194. von Maltzahn, G., et al., *Computationally guided photothermal tumor therapy using long-circulating gold nanorod antennas*. *Cancer Res*, 2009. **69**(9): p. 3892-900.
195. Pan, Y., et al., *Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles*. *Small*, 2007. **3**(11): p. 1941-9.
196. Patra, H.K., et al., *Cell selective response to gold nanoparticles*. *Nanomedicine*, 2007. **3**(2): p. 111-9.
197. Tsoli, M., et al., *Cellular uptake and toxicity of Au55 clusters*. *Small*, 2005. **1**(8-9): p. 841-4.
198. Wan, Y., et al., *Quasi-spherical silver nanoparticles: aqueous synthesis and size control by the seed-mediated Lee-Meisel method*. *J Colloid Interface Sci*, 2013. **394**: p. 263-8.
199. Zencir, S., et al., *Identification of transcriptional and phosphatase regulators as interaction partners of human ADA3, a component of histone acetyltransferase complexes*. *Biochem J*, 2013. **450**(2): p. 311-20.
200. Mucsi, I., et al., *Interaction between various resistance modifiers and apoptosis inducer 12H-benzo[alpha]phenothiazine*. *Anticancer Res*, 2002. **22**(5): p. 2833-6.
201. Rama-Esendagli, D., et al., *Spheroid formation and invasion capacity are differentially influenced by co-cultures of fibroblast and macrophage cells in breast cancer*. *Mol Biol Rep*, 2014. **41**(5): p. 2885-92.
202. Priwitaningrum, D.L., et al., *Tumor stroma-containing 3D spheroid arrays: A tool to study nanoparticle penetration*. *J Control Release*, 2016. **244**(Pt B): p. 257-268.
203. Mi, H., A. Muruganujan, and P.D. Thomas, *PANTHER in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees*. *Nucleic Acids Res*, 2013. **41**(Database issue): p. D377-86.

204. Pal, S.K., et al., *THBS1 is induced by TGFB1 in the cancer stroma and promotes invasion of oral squamous cell carcinoma*. J Oral Pathol Med, 2016. **45**(10): p. 730-739.
205. Del Pozo Martin, Y., et al., *Mesenchymal Cancer Cell-Stroma Crosstalk Promotes Niche Activation, Epithelial Reversion, and Metastatic Colonization*. Cell Rep, 2015. **13**(11): p. 2456-69.
206. Blanco, M.A., et al., *Global secretome analysis identifies novel mediators of bone metastasis*. Cell Res, 2012. **22**(9): p. 1339-55.
207. Cheon, D.J., et al., *A collagen-remodeling gene signature regulated by TGF-beta signaling is associated with metastasis and poor survival in serous ovarian cancer*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(3): p. 711-23.
208. Haraguchi, N., et al., *High expression of ADAMTS5 is a potent marker for lymphatic invasion and lymph node metastasis in colorectal cancer*. Mol Clin Oncol, 2017. **6**(1): p. 130-134.
209. Jia, R., et al., *Osteopontin facilitates tumor metastasis by regulating epithelial-mesenchymal plasticity*. Cell Death Dis, 2016. **7**(12): p. e2564.
210. Elahouel, R., et al., *Pleiotrophin exerts its migration and invasion effect through the neuropilin-1 pathway*. Neoplasia, 2015. **17**(8): p. 613-24.
211. Lee, Y.S., et al., *Crosstalk between CCL7 and CCR3 promotes metastasis of colon cancer cells via ERK-JNK signaling pathways*. Oncotarget, 2016. **7**(24): p. 36842-36853.
212. Huang, Y.T., et al., *The matricellular protein CYR61 promotes breast cancer lung metastasis by facilitating tumor cell extravasation and suppressing anoikis*. Oncotarget, 2016.
213. Hillaireau, H. and P. Couvreur, *Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(17): p. 2873-96.
214. Liu, W., et al., *Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size*. Nanotoxicology, 2010. **4**(3): p. 319-30.
215. Avalos, A., et al., *Cytotoxicity and ROS production of manufactured silver nanoparticles of different sizes in hepatoma and leukemia cells*. J Appl Toxicol, 2014. **34**(4): p. 413-23.
216. Kim, T.H., et al., *Size-dependent cellular toxicity of silver nanoparticles*. J Biomed Mater Res A, 2012. **100**(4): p. 1033-43.
217. Gliga, A.R., et al., *Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release*. Part Fibre Toxicol, 2014. **11**: p. 11.
218. El Badawy, A.M., et al., *Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles*. Environ Sci Technol, 2011. **45**(1): p. 283-7.
219. Wu, C.C. and S.B. Bratton, *Regulation of the intrinsic apoptosis pathway by reactive oxygen species*. Antioxid Redox Signal, 2013. **19**(6): p. 546-58.
220. Chen, B., et al., *Current Multistage Drug Delivery Systems Based on the Tumor Microenvironment*. Theranostics, 2017. **7**(3): p. 538-558.
221. Merrifield, R.C., C. Stephan, and J. Lead, *Determining the Concentration Dependent Transformations of Ag Nanoparticles in Complex Media: Using SP-ICP-MS and Au@Ag Core-Shell Nanoparticles as Tracers*. Environ Sci Technol, 2017.
222. Yang, L., et al., *An enzyme-induced Au@Ag core-shell nanoStructure used for an ultrasensitive surface-enhanced Raman scattering immunoassay of cancer biomarkers*. Nanoscale, 2017. **9**(7): p. 2640-2645.

223. Ortega, F.G., et al., *Study of antitumor activity in breast cell lines using silver nanoparticles produced by yeast*. Int J Nanomedicine, 2015. **10**: p. 2021-31.
224. Rima, W., et al., *Internalization pathways into cancer cells of gadolinium-based radiosensitizing nanoparticles*. Biomaterials, 2013. **34**(1): p. 181-95.
225. Brandner, J.M. and N.K. Haass, *Melanoma's connections to the tumour microenvironment*. Pathology, 2013. **45**(5): p. 443-52.
226. Dausend, J., et al., *Uptake mechanism of oppositely charged fluorescent nanoparticles in HeLa cells*. Macromol Biosci, 2008. **8**(12): p. 1135-43.
227. Kovacs, D., et al., *Silver nanoparticles modulate ABC transporter activity and enhance chemotherapy in multidrug resistant cancer*. Nanomedicine, 2016. **12**(3): p. 601-10.
228. Mahmood, M., et al., *Cytotoxicity and biological effects of functional nanomaterials delivered to various cell lines*. J Appl Toxicol, 2010. **30**(1): p. 74-83.
229. Manshian, B.B., et al., *Presence of an Immune System Increases Anti-Tumor Effect of Ag Nanoparticle Treated Mice*. Adv Healthc Mater, 2017. **6**(1).

10. Publikációk listája

A dolgozat alapját képező publikáció:

Dávid Kovács, Nóra Igaz, Csilla Keskeny, Péter Bélteky, Tímea Tóth, Renáta Gáspár, Dániel Madarász, Zsolt Rázga, Zoltán Kónya, Imre M. Boros, Mónika Kiricsi: *Silver nanoparticles defeat p53-positive and p53-negative osteosarcoma cells by triggering mitochondrial stress and apoptosis*. Scientific Reports 06/2016; 6., DOI:10.1038/srep27902 IF: 5.228

Egyéb publikációk:

Dávid Kovács, Krisztina Szőke, Nóra Igaz, Gabriella Spengler, József Molnár, Tímea Tóth, Dániel Madarász, Zsolt Rázga, Zoltán Kónya, Imre M. Boros, Mónika Kiricsi: *Silver nanoparticles modulate ABC transporter activity and enhance chemotherapy in multidrug resistant cancer*. Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine 12/2015; 12(3), DOI:10.1016/j.nano.2015.10.015 IF: 5.671

Nóra Igaz, Dávid Kovács, Zsolt Rázga, Zoltán Kónya, Imre M. Boros, Mónika Kiricsi: *Modulating chromatin structure and DNA accessibility by deacetylase inhibition enhances the anti-cancer activity of silver nanoparticles*. Colloids and surfaces B: Biointerfaces 07/2016; 146., DOI:10.1016/j.colsurfb.2016.07.004 IF: 3.902

Andrea Rónavári, Dávid Kovács, Nóra Igaz, Csaba Vágvölgyi, Imre Miklós Boros, Zoltán Kónya, Ilona Pfeiffer, Mónika Kiricsi: *Biological activity of green-synthesized silver nanoparticles depends on the applied natural extracts: a comprehensive study*. International Journal of Nanomedicine 01/2017; Volume 12., DOI:10.2147/IJN.S122842 IF: 4.320

Renáta Gáspár, Márton Pipicz, Fatime Hawchar, Dávid Kovács, Luna Djirackor, Anikó Görbe, Zoltán V. Varga, Mónika Kiricsi, Goran Petrovski, Attila Gácsér, Csaba Csonka, Tamás Csont: *The cytoprotective effect of biglycan core protein involves Toll-like receptor 4 signaling in cardiomyocytes.* Journal of Molecular and Cellular Cardiology 08/2016; 99., DOI:10.1016/j.yjmcc.2016.08.006 IF: 4.874

Andrea Rónavári, Dávid Kovács, Csaba Vágvölgyi, Zoltán Kónya, Mónika Kiricsi, Ilona Pfeiffer: *Ion exchange defines the biological activity of titanate nanotubes.* Journal of Basic Microbiology 03/2016;, DOI:10.1002/jobm.201500742 IF: 1.585

Barbara N Borsos, Tibor Pankotai, Dávid Kovács, Christina Popescu, Zoltán Páhi, Imre M Boros: *Acetylations of Ftz-F1 and histone H4K5 are required for the fine-tuning of ecdysone biosynthesis during Drosophila metamorphosis.* Developmental Biology 05/2015; 404(1)., DOI:10.1016/j.ydbio.2015.04.020 IF: 3.155

11. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, és első számú mentoromnak, **Dr. Kiricsi Mónikának**, aki kitartó és inspiráló munkájával mindig támogatta és irányította szakmai fejlődésem, és aki nélkül a dolgozat és publikációink nem jöhettek volna létre. Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Boros Imrének**, aki folyamatos támogatásával lehetővé tette, hogy az SZTE-TTIK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszékén elvégezhessem a munkánkhoz szükséges kísérleteket. Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Kónya Zoltánnak**, az SZTE-TTIK Alkalmazott és Környezeti Kémiai Tanszék vezetőjének, hogy szakmai támogatásával segítette tudományos munkánkat.

Hálásan köszönöm a tanszéken működő „Nano csoport” korábbi és jelenlegi tagjainak, főképpen **Igaz Nórának** és **Mohan G. Krishna-nak**, akik szorgalmas és érdeklődő, sokszor éjszakába nyúló munkájukkal rengeteg segítséget nyújtottak a kísérletek elvégzése és értékelése során. Köszönöm **Bélteky Péter** segítségét, aki elvégezte a kísérletek során felhasznált nanorészecskék kémiai szintézisét és karakterizálását.

Hálás köszönet illeti **Dr. Bodai Lászlót**, aki nélkülözhetetlen segítséget nyújtott az RNS szekvenálás elvégzése és bioinformatikai értékelése során.

Köszönöm **Marton Annamáriának**, és **Dr. Vizler Csabának** a kimagasló segítségét, amit az *in vivo* kísérletek elvégzésében, valamint a 4T1 sejtek készsleges felajánlása során nyújtottak.

Köszönet illeti **Dr. Rázga Zsoltot**, és **Madarász Dánielt**, az elektronmikroszkópos vizsgálatok során nyújtott segítségük miatt.

Számos szakmai segítsége, és a fibroblaszt sejtek felajánlása miatt hálás köszönettel tartozom **Dr. Spengler Gabriellának**.

Köszönettel tartozom **Dr. Hideghéty Katalinnak** és **Dr. Puskás Lászlónak**, hogy rövid hatáirővel bírálatot készítettek a dolgozatról, és hogy elvállalták opponensi munkájukat a dokozatszerzési eljárás során.

A sejt kultúrák fenntartása és más laboratóriumi munkák során végzett nélkülözhetetlen segítségük miatt köszönettel tartozom **Ökrösné „Kis” Katinak** és **Pataki Edinának** is.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm **családomnak** és **barátaimnak**, akik folyamatosan támogattak, és így lehetővé tették, hogy elkészüljön a dolgozatom.

A dolgozat megvalósításához hozzájárult az Emberi Erőforrások Minisztériuma által hirdetett **Nemzet Fiatal Tehetségeiért Ösztöndíj, NTP-NFTÖ-16-0766** számú pályázati forrás, valamint **a genom instabilitás és a karcinogenezis molekuláris térképezése, MolMedEx TUMORDNS” GINOP_2.3.2-15-2016-00020** pályázat.



Európai Unió
Európai Regionális
Fejlesztési Alap



BEFEKTETÉS A JÖVŐBE