

**FÉM NANORÉSZECSKÉK ÉS HISZTON-DEACETILÁZ
INHIBITOROK TUMORELLENES HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

IGAZ NÓRA

TÉMAVEZETŐ:

DR. CSONTNÉ DR. KIRICSI MÓNIKA

EGYETEMI ADJUNKTUS

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

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

SZEGED

2021

Tartalmi összefoglaló

A kemoterápia és a sugárkezelés napjainkban a legelterjedtebben használt kezelési módok a tumoros megbetegedések terápiája során. A kemoterápia folyamán használt tumorellenes anyagok között vannak genotoxikus, sejtosztódást gátló és antimetabolit hatású ágensek, de napjainkban előtérbe kerültek a célzott terápiára alkalmas szerek és az antitest alapú kezelések is. A sugárterápia során ionizáló sugárzást használnak, melyre a legérzékenyebbek a sejtek membrán struktúrái és az örökítőanyag. Az ionizáló sugárzás a tumorok mellett károsíthatja a tumorok környezetében lévő egészséges szöveteket, szerveket is, mely hatás csökkenthető lehet radioszenzitizáló szerek használatával, így mérsékelve a sugárkezelés mellékhatásait és növelve a terápia hatékonyságát.

A fém nanorészecskék a méretükből adódóan megnövekedett fajlagos felülettel rendelkeznek, ami miatt a tömbfázisú anyagokhoz képest eltérő fizikai, kémiai és biológiai aktivitásuk van. Az ezüst és arany nanorészecskék a legelterjedtebben alkalmazott nanoanyagok. Az ezüst nanorészecskék (AgNP) mikrobaelles aktivitását napjainkban is számos helyen kihasználják, míg az arany nanorészecskék (AuNP) biológiailag inertnek bizonyultak, mely tulajdonságuk miatt ezen részecskéket a hatóanyag szállítás területén igyekeznek hasznosítani. Az elmúlt évtizedben ezeknek a nanorészecskének a tumorellenes hatásait és felhasználási lehetőségeit számos kutatócsoport vizsgálta. Az AgNP önmagában képes oxidatív stresszt és apoptózist kiváltani a felületéről felszabaduló ezüst ionokon keresztül, mely tulajdonságuk nagyon előnyös lehet a tumorsejtek elpusztításakor. A nagy rendszámú fémek, mint az arany viszont potenciális radioszenzitizáló anyagok, mivel képesek az ionizáló sugárzás hatását fizikai úton felerősíteni, melyért az Auger és a Compton effektusok felelősek. Az AuNP ezen tulajdonsága is kiaknázzható az onkoterápia során.

A hiszton-deacetiláz enzimek (HDAC) gátlószereinek tumorellenes hatását több vérképző rendszeri és szolid tumor esetén is bizonyították, köztük a szuberoil-anilid-hidroxámsavat (SAHA) már a klinikumban is alkalmazzák tumorellenes szerként. Ezek a vegyületek képesek a fehérjék acetilációjának befolyásolásán keresztül serkenteni a sejtek differenciációját, és apoptózist indukálnak a programozott sejthalál több útvonalának aktiválásán keresztül. A hisztonok acetilációjának növelésén át nyitottabb kromatin szerkezetet alakítanak ki, mellyel a DNS sebezhetőségét is növelik. Ezen tulajdonságuk miatt genotoxikus

kombinációs partnerekkel, illetve sugárterápiában, más radioszenzitizáló szerekkel kombinációban, megnövelhetik a terápia specifitását és hatékonyságát.

Munkánk során a fém nanorészecskék és a HDAC gátlók kombinációjának szinergista tumorelles hatásait vizsgáltuk *in vitro* sejt kultúrákon, mégpedig az AgNP és Trichostatin A (TSA) kombináció citotoxikus, valamint az AuNP és SAHA együttes radioszenzitizáló képességének meghatározásával. Az AgNP és TSA szinergista módon képesek csökkenteni a tumoros sejtek életképességét és gátolják azok migrációját. Emellett a két szert kombinációban alkalmazva szignifikánsan megemelik a reaktív oxigén szabadgyökök mennyiségét, a DNS kettős szálú törések számát, és az apoptotizáló sejtek arányát a kezeletlen és az AgNP-, vagy TSA-kezelt rákos sejtekben tapasztaltakhoz képest.

Az AuNP és SAHA radioszenzitizáló képességét 2D és 3D tumoros sejt kultúrákon vizsgáltuk. Az AuNP és SAHA szinergista módon csökkentik a tumoros sejtek viabilitását ionizáló sugárzás hatására. A két szert kombinációban alkalmazva szignifikánsan csökken a tumoros sejtek kolóniaformáló képessége irradiációt követően, illetve szignifikánsan nő az ionizáló sugárzás DNS károsító hatása mind 2D, mind 3D sejt kultúrában a kezeletlen és a csak AuNP-, vagy csak SAHA-kezelt mintákhoz viszonyítva.

Mindkét kombináció alkalmazásakor a HDAC inhibitor által kialakított nyitottabb kromatin szerkezet a sejtek örökítő anyagát hozzáférhetőbbé teszi az azt károsító ágensek számára. Elsősorban az AgNP által indukált oxidatív stressz számára, másrészt az AuNP segítségével felerősített, az ionizáló sugárzás által okozott DNS károsító hatások számára, melyek a kombinációs kezelések során fokozódtak. Kísérleteinkben az AgNP és TSA szinergista tumorelles hatását, illetve az AuNP és SAHA szinergista radioszenzitizáló aktivitását mutattuk ki.

Tartalomjegyzék

Tartalmi összefoglaló	2
Rövidítések jegyzéke	6
Irodalmi áttekintés	10
A tumoros megbetegedések és a kemoterápia	10
A sugárterápia és hatásai.....	14
Nanorészecskék.....	18
Nanorészecskék a tumorterápiában.....	19
Ezüst nanorészecskék.....	21
Arany nanorészecskék	25
A hiszton-deacetiláz enzimek és azok gátlószerei	27
3D sejt kultúrák.....	30
Célkitűzés	33
Anyagok és módszerek.....	35
Fém nanorészecskék szintézise és karakterizálása	35
Humán sejt kultúra	36
A minták irradiációja	37
Elektronmikroszkópia	38
Citotoxicitás vizsgálatok.....	38
Scratch esszé	39
DCFDA festés	40
Immuncitokémia	40
Immunhisztokémia.....	41
Western blot.....	42
Tumoros sejtek kolóniaképző képességének vizsgálata	43

Statisztikai analízis.....	44
Eredmények	45
Az AgNP és AuNP képesek bejutni a tumoros sejtekbe és akkumulálódni a citoplazmában	45
A fém nanorészecskék nem befolyásolják a HDAC gátlók hatását a kombinációs kezelések során	46
Az AgNP és a HDAC gátló TSA szinergista módon csökkentik a tumoros sejtek viabilitását	47
Az AgNP és TSA kezelés csökkenti a HeLa sejtek migrációs aktivitását.....	49
A TSA által okozott nyitott kromatin szerkezet hatására megnő az AgNP-k DNS károsító hatása.....	50
Az AgNP és a TSA kezelés oxidatív stresszt és apoptózist indukál a HeLa sejtekben	52
Az AuNP és a HDAC gátló SAHA szinergista módon csökkentik a tumoros sejtek viabilitását ionizáló sugárzást követően	53
Az AuNP és SAHA kombinációs kezelés csökkenti a tumoros sejtek kolóniaformáló képességét ionizáló sugárzást követően	56
Az AuNP és SAHA kezelés szignifikánsan növeli az ionizáló sugárzás DNS károsító hatását	58
Az AuNP és SAHA kombinációs kezelés csökkenti a 3D sejt kultúrában növekvő tumoros sejtek kolóniaformáló képességét irradiáció után	61
Eredmények megbeszélése.....	65
Összefoglalás	73
Summary	78
Hivatkozások jegyzéke	83
Publikációk listája	98
Köszönetnyilvánítás	101
Függelék	103

Rövidítések jegyzéke

Ac-Lys	Acetilált lizin
AgNP	Ezüst nanorészecske
Akt	Szerin-treonin kináz AKT vagy protein kináz B
ANOVA	Variancia analízis (analysis of variance)
APL	Akut promielocitás leukémia
AP1	Aktivátor protein 1, c-Jun és c-Fos fehérjék komplexe
ATM	Szerin-treonin protein kináz fehérje (ataxia telangiectasia mutated)
ATP	Adenozin-trifoszfát
ATR	ATM és Rad3 proteinekből álló fehérje komplex (ATM-Rad3-related)
AuNP	Arany nanorészecske
Bax	Pro-apoptotikus fehérje, Bcl-2-asszociált-x fehérje
Bcl-2	Anti-apoptotikus fehérje (B-cell lymphoma 2)
Bcl-x	Apoptózis regulátor fehérje
bFGF	Alap fibroblaszt növekedési faktor (basic fibroblast growth factor)
BRCA1/2	Tumorsupresszor (Breast cancer gene 1/2)
BSA	Borjú szérum albumin
CAF	Tumor-asszociált fibroblaszt (Cancer-associated fibroblast)
CAT	Kataláz (catalase)
CBP	Hisztón acetiltranszferáz CBP (CREB (cAMP response element-binding protein)-binding protein)
CI	Kombinációs index (Combinational index)
c-Jun	Proto-onkogén transzkripció faktor, az AP-1 komplexet formálja a c-Fos fehérjével
CTCL	Cutan T-sejtes limfóma (cutaneous T-cell lymphoma)
DCFDA	2-7-dikloro-fluoreszcein-diacetát

DLS	Dinamikus fényszórás (Dynamic Light Scattering)
DMEM	Dulbecco-féle Módosított Médium (Dulbecco's modified Eagle Medium)
DMSO	Dimetil-szulfoxid
DNS	Dezoxiribonukleinsav
DNS-PK	DNS protein kináz
DTT	Ditiotreitol (1,4-bisz-(szulfanil)-bután-2,3-diol)
ECL	Erősített kemilumineszcenciás detektálás (Enhanced chemiluminescent)
ECM	Extracelluláris mátrix
ED	Hatásos dózis (Effective dose)
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav
EGF	Epidermális növekedési faktor (epidermal growth factor)
EMT	Epiteliális-mezenchimális tranzíció
EPR	Megnövekedett permeabilitás és visszatartás (enhanced permeability and retention)
Fa	Érintett frakció (Fraction affected)
FBS	Fötális borjú szérum (fetal bovine serum)
GSH	Glutation (redukált)
HAT	Hisztón-acetiltranszferáz
HDAC	Hisztón-deacetiláz
HER2	Humán epidermális növekedési faktor receptor 2-es típus
HP1 α	Heterokromatin protein 1 α izoformája
HR	Homológ rekombináció
ILK	Integrin-kapcsolt kináz (Integrin-linked kinase)
IPP	ILK, PINCH1 és Parvin fehérjékből álló fehérje komplex
KAT	Lizin-acetiltranszferáz

KDAC	Lizin-deacetiláz
Ku70	Kettős szálú DNS törés javító fehérje (NHEJ)
Ku80	Kettős szálú DNS törés javító fehérje (NHEJ)
LC3	Mikrotubulus asszociált fehérje 1A/1B könnyű lánc 3 (1A/1B light chain 3)
LDH	Laktát-dehidrogenáz
Mre11	Kettős szálú DNS törés javító fehérje MRE11 (meiotic recombination 11)
MRN	Mre11, Rad50, Nbs1 fehérjékből álló komplex
MTT	3-(4,5-dimetiltiazolil-2-il)-2,5-difenil tetrazólium bromid
Myc	Proto-onkogén transzkripció faktor
Nbs1	DNS hibajavító és telomer fenntartó protein Nbs1
NHEJ	Nem-homológ végek összekapcsolása DNS kettős szálú törések esetén (non-homologous end joining)
Nrf2	nukleáris faktor eritroid 2-vel összefüggő faktor 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2)
p300	Hisztón-acetiltranszferáz p300
PBS	Foszfát pufferes sóoldat (phosphate buffered saline)
PI3K	Foszfatidil-inozitol-3-kináz
PINCH1	Fokális adhézíós adaptor fehérje (Particularly interesting new cysteine-histidine-rich 1)
PML	Promielocitás leukémia
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid
poli-HEMA	Poli(2-hidroxietil-metakrilát)
PP2A	Protein foszfatáz 2A (protein phosphatase 2A)
PVP	Polivinilpirrolidon
p21	Ciklin-dependens kináz inhibitor 1
p53	TP53 tumorszupresszor fehérje
Rad50	Kettős szálú DNS törés hibajavító fehérje Rad50

Rad51	Kettős szálú DNS törés hibajavításában részt vevő fehérje
RAR	Retinsav receptor (retinoic acid receptor)
RARE	Retinsav receptor válaszelem (retinoic acid-responsive element)
Ras	Ras proto-onkogén, kis-G fehérje
Rb	Retinoblasztóma
ROS	Reaktív oxigén szabadgyök (reactive oxygen species)
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 Médium
SAHA	Szuberoil-anilid-hidroxámsav vagy vorinostat (suberoyl-anilide hydroxamic acid)
SDS	Nátrium-dodecyl-szulfát (Sodium-dodecyl-sulfate)
SOD	Szuperoxid-dizmutáz
STAT3	Jelátvivő és transzkripció aktivátor 3 (signal transducer and activator of transcription 3)
TNF- α	Tumor nekrosis faktor alfa
TAM	Tumor-asszociált makrofág
TEM	Transzmissziós elektronmikroszkóp
TSA	Trichostatin A
VEGF	Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (vascular endothelial growth factor)
γ H2AX	Foszforilált hiszton H2AX
2D	Két dimenzió
3D	Három dimenzió

Irodalmi áttekintés

A tumoros megbetegedések és a kemoterápia

A tumoros megbetegedések hátterében genetikai okok állnak. A genetikai állományban bekövetkező változások miatt a transzformált sejtek szabályozatlanul, felgyorsult módon osztódnak. A transzformált sejtek kontrollálatlan osztódását legtöbbször valamilyen proto-onkogén aktivációja, vagy tumorszupresszor inaktivációja okozza. Ezekhez a változásokhoz mutációk felhalmozódása szükséges az őket kódoló génekben. Mind a proto-onkogének, mind a tumorszupresszorok a sejtciklus szabályozásáért felelősek: a sejtciklus serkentése a proto-onkogének feladata, míg a tumorszupresszorok a sejtek osztódását gátolják. A proto-onkogének hatása domináns, egy allél rendellenes aktivitása elég ahhoz, hogy transzformált fenotípus alakuljon ki. Ezzel szemben a tumorszupresszorok hatása recesszív, ilyenkor mind a két allél inaktivációja szükséges a transzformált fenotípus kialakulásához [1].

A tumorok kialakulásában öröklött és/vagy környezeti hatások is közrejátszhatnak. A tumorszupresszor géneket érintő öröklött mutációk bizonyítottan növelik a rákos megbetegedések rizikóját. A tumorszupresszor retinoblasztóma (Rb), a p53 vagy a breast cancer gene 1 vagy 2 (BRCA1, BRCA2) mutációja az egyik allélben megnöveli az esélyét a rákos elváltozás kialakulásának [1]. Emellett az UV sugárzás vagy bizonyos káros szokások, mint a dohányzás is elősegíthetik a tumorok kialakulását [2], de számos, humán megbetegedést okozó vírus esetén is kimutatták már, hogy növelik a rák megjelenésének kockázatát. Ilyen a DNS vírusok közül a humán papillóma vírus (HPV) több törzse, melyek a méhnyakrák, vagy a Hepatitis B és C vírusok, melyek májkarcinómák kialakulását idézhetik elő. Az RNS vírusok közül a humán T-sejt leukémia vírus (HTLV) vagy a hepatocelluláris karcinóma vírus (HCV) bizonyítottan tumoros elváltozást indukálnak [3].

A tumoros sejtek metabolizmusa jelentősen eltér a nem tumoros sejtekéhez képest. A rákos sejtek sajátos anyagcseréjének központi szereplője a mitokondrium. A szövetekben, szervekben található egészséges, terminálisan differenciálódott sejtekben az ATP termelés maximalizálása a cél, mivel az elérhető tápanyag korlátozottan hozzáférhető. Ezekben a sejtekben a lebontó anyagcsere dominál, a mitokondriumokra az oxidatív foszforiláción keresztüli ATP termelés a jellemző. Ezzel ellentétben az osztódó sejtekben, mint a tumoros sejtekben is az anabolizmusra tevődik a hangsúly, így a szintetikus folyamatokhoz

nélkülözhetetlen prekursor molekulák előállítására és a makromolekulák szintézisére a meghatározó. A tumoros sejtekre aerob körülmények között is tejsavas erjedés jellemző. Ezt a jelenséget a tumoros sejtek felgyorsult növekedésével, osztódásával, illetve az ebből következő mitokondriális elváltozásokkal magyarázták [4].

Ezzel szemben napjainkban előtérbe került az a vélekedés, hogy a tumoros sejtek megváltozott anyagcseréje mitokondriális átprogramozás eredménye és nem a felgyorsult osztódás következménye. Továbbá kimutatták, hogy a mitokondriumok a tumoros sejtekben is épek, és képesek oxidatív foszforiláción keresztül ATP nyerésre, viszont ezekben a sejtekben az ATP termelés helyett az ATP felhasználás dominál. E hipotézis szerint a proto-onkogének aktivációjának és a tumorszupresszorok inaktivációjának elsődleges szerepe a sejt metabolizmusának átprogramozása [4]. A különböző növekedési faktorok hatására olyan szignáltranszdukciós útvonalak aktiválódnak, melyek eredményeképp a glikolízis és a citromsav-ciklus köztitermékei a felépítő folyamatokban hasznosulnak [4]. A differenciálódott sejtekben tapasztaltaktól eltérően a tumoros sejtekben az anyagcsere bizonyos enzimeinek másik izoformái aktívak, melyek szintén hozzájárulnak az anyagcsere anabolikus irányba történő átprogramozásához. Ilyen például a piruvát-kináz M2 izoformája, mely csökkent enzimaktivitást mutat az egészséges, terminálisan differenciálódott sejtekben található M1 izoformához képest [5]. A mitokondriumoknak a felépítő anyagcsere irányába történő átprogramozásának központi szereplői a PI3K, Akt és mTORC1 útvonalak, melyek többek között serkentik a sejtek glükóz felvételét, a glikolízist, és a *de novo* lipid és aminosav szintézist [4,6]. Továbbá, aerob körülmények között a glikolízis intermedierei a pentóz-foszfát úton hasznosulni tudnak a nukleotidok és a foszfolipidek szintéziséhez [7]. Ezek mellett olyan jelentősebb onkogének, mint a Myc [4,8] és a Ras [4,7], illetve tumorszupresszorok, mint a p53 [9,10] szerepét is feltárták a mitokondriumok és az anyagcsere átprogramozásában.

Az utóbbi évek kutatásai kimutatták, hogy a tumoros sejtek mellett, a tumoros szövetben található nem tumoros sejtek is fontos szerepet játszanak a tumorok progressziójában és az áttétképzésben. A tanulmányok leginkább a fibroblasztok és az immunsejtek, azokon belül is a makrofágok tumortámogató hatását vizsgálták és tárták fel [11]. A fibroblasztok átprogramozásával jönnek létre a tumor-asszociált fibroblasztok (CAF), melyek az extracelluláris mátrix (ECM) átrendezésével és számos gyulladásos citokin és növekedési faktor termelésével serkentik az angiogenezist és az immunszupressziót [12].

A tumor-asszociált makrofágok (TAM) szintén a tumorsejtek által végrehajtott átprogramozás eredményei. A TAM-ok több növekedési faktor és citokin termelésén keresztül képesek a tumoros sejtek osztódását serkenteni. A TNF- α segítségével angiogenezist indukálnak és képesek serkenteni az epitheliális-mezechimális tranzíciót (EMT), melynek révén a tumoros sejtek mobilitása nő, így erősödik a metasztatikus aktivitásuk is [13]. Ezenfelül proteázok termelésén keresztül segíthetik a tumoros sejtek kiszabadulását a nyirok- vagy vérkeringésbe, elősegítve ezzel szintén az áttétek képződését [14]. Ezek a sejtek jelentősen hozzájárulnak az immunszuppresszív környezet kialakításához is, mivel csökkentik a CD8⁺ T-sejtek aktivitását, amelyek normális esetben a tumoros sejtek felismeréséért és eliminációjáért felelősek [15].

A tumoros megbetegedések legelterjedtebb kezelési módja napjainkig a kemoterápia. A kemoterápia során a tumoros sejtek felgyorsult osztódását és megváltozott anyagcseréjét célozzák meg többféle hatásmechanizmusú tumorelles anyaggal. A klinikumban leggyakrabban genotoxikus anyagokat, sejtosztódást gátló anyagokat, illetve célzott terápiára lehetőséget adó immunterápiás anyagokat alkalmaznak [16].

Az intenzíven osztódó sejtek ellen gyakran használnak a sejtciklus egyes fázisaira specifikus kemoterápiás anyagokat. Az alkiláló szerek a sejtciklus bármely fázisában képesek közvetlenül kötődni a DNS-hez, alkilálják a bázisokat, lánctöréseket okoznak és apoptózist indukálnak [17]. Az alkiláló szerek közé sorolják többek között a platina tartalmú karboplatint vagy ciszplatint, amelyek így direkt módon károsítják az örökítőanyagot, DNS keresztkötéseket, lánctöréseket és apoptózist okoznak [18]. Az alkiláló szerek egy speciális csoportját képezik a nitrozourea vegyületek (például karmusztiin), amelyek képesek a vér-agy gáton átjutni, így jól használhatóak bizonyos agydaganatok ellen [19].

Az intenzíven osztódó sejtek jól célozhatóak az S-fázisra specifikus antimetabolitokkal, G2-fázisra specifikus szerekkel és M-fázisra specifikus anyagokkal. Az antimetabolitok közé tartozó molekulák vagy szerkezetileg nagyon hasonlítanak a sejtek számára fontos anyagcsere metabolitokra (pl. nukleotid analógok), vagy pedig képesek gátolni a nukleotid anyagcsere egyes lépéseit katalizáló enzimeket, ezzel gátolva a sejtek osztódását is. A nukleotid bioszintézis gátlására használt metotrexát egy folsav antagonistája, ami képes a dihidro-folát reduktáz enzim reverzibilis kompetitív gátlására, így nem keletkezik a purin és pirimidin nukleotidok szintéziséhez szükséges, C1-törredékeket szállító tetrahidro-folát, melynek révén a

nukleotidok *de novo* előállítása is gátlődik [20]. A nukleotid analógok, mint a pirimidin analóg 5-fluorouracil a sejtekben toxikus fluoro-uridin-monofoszfáttá alakul, ami irreverzibilisen gátolja a timidilát-szintáz, megakasztja a DNS szintézist és apoptózist indukál a sejtekben [21]. A G2 fázisra specifikus szerek között találjuk a nem-antraciklin típusú, a DNS-be interkalálódó antibiotikumot, a bleomicint, mely DNS lánc-töréseket okoz és alkalmazása megemeli a reaktív szabadgyökök mennyiségét is [19,22]. A citotoxikus vegyületek közé sorolják az M-fázisra specifikus, a mitotikus orsóra ható vinka alkaloidokat (pl. vinkrisztin), amelyek a mikrotubulusok polimerizációját gátolják, valamint a taxánokat (pl. paklitaxel), amik a mikrotubulusok depolimerizációját blokkolják. A mikrotubulusok polimerizációjának, illetve depolimerizációjának gátlása antimitotikus hatású, és a sejtek apoptózisát váltja ki. Ez a terápia szintén specifikus az osztódó sejtekre [23,24].

Kemoterápia során alkalmaznak tumorelles antibiotikumokat is, mint az antraciklinekhez tartozó doxorubicin. Ez a molekula nagy affinitással kötődik a DNS-hez, a replikációban szerepet játszó enzimekkel (pl. topoizomeráz II) interferálva megakadályozza a DNS megkettőződését. Emellett jelentős mértékű oxidatív stresszt vált ki, és a szabadgyökök mennyiségének növekedése által kettős szálú DNS törések jönnek létre [25]. A topoizomerázok a DNS replikációjakor vagy a kromatin szerkezet átrendezésekor a túltekeredett DNS szálakat hasítják, kitekerik és újraegyesítik, feloldva ezzel a túltekeredésből adódó feszültséget [26]. A topoizomeráz I. enzimeket a kamptotecinek (irinotekán és topotekán) képesek gátolni, amely a transzkripció és replikáció gátlásához vezet, valamint egyes szálú DNS törések alakulnak ki. A topoizomeráz II enzimek blokkolását idézik elő a podofillinek vagy epipodofilotoxinok, mint amilyen az etopozid, ami szintén DNS kettős szálú töréseket okoz és apoptózist indukál [19].

Egy adott tumorra jellemző specifikus sajátságok kihasználására épül a célzott daganatterápia, melynek egyik formája a per os adható tirozin-kináz inhibitorok alkalmazása. Ezek számos növekedési faktor receptor működését képesek gátolni, melyeknek aktivitása vagy expressziója számos tumor típus esetén növekedést mutat. A tirozin-kináz gátlók révén megakadályozható nem csupán a sejtosztódás és az angiogenezis, de hatásukra apoptózis is indukálódik, ahogy ezt több kutatócsoport is bizonyította szolid és vérképző rendszeri tumorok esetén [27,28]. Számos tumor típusnál eredményesnek bizonyult, így a klinikai gyakorlatban széles körben alkalmazott immunterápiás eljárások egyikében, a vaszkuláris endoteliális növekedési faktort (VEGF) monoklonális VEGF-ellenes antitesttel gátolni lehet [29].

Hasonlóképpen, a humán epidermális növekedési faktor 2-es típusú receptor (HER2) ellen termelt humanizált antitestek alkalmazása jelentősen megnövelte a kezelés eredményességét és a betegek túlélési esélyeit HER2-pozitív emlődaganatos páciensek terápiája során [30]. Emellett, hormonfüggő daganatok vagy hormon receptor-pozitív tumorok ellen számos esetben alkalmaznak hormonterápiás citosztatikumokat, amelynek az antiösztrogének, antiandrogének, gesztagének vagy aromatáz gátlók, amelyekkel a tumorok progresszióját szintén gátolni lehet.

A klinikai gyakorlatban már meglehetősen régóta a klasszikus kemoterápiás szerek hatékonyságának és specifitásának növelése érdekében eltérő hatásmechanizmusú anyagok kombinációját alkalmazzák, és a klasszikus kemoterápiás kezelés kiegészítésére gyakran használnak az előbbiekben bemutatott, új típusú immunterápiás szereket is. A kémiai ágensek kombinációja mellett a különféle terápiás modalitások, mint kemoterápia és sugárkezelés együttes alkalmazása is képes a terápia hatékonyságát jelentős mértékben megnövelni.

A sugárterápia és hatásai

A kemoterápia mellett a sugárkezelés a tumoros megbetegedések egyik legelterjedtebb kezelési módszere. Ennek lényege, hogy ionizáló sugárzás révén károsítsák a daganat sejtjeit annyira, hogy elpusztuljanak. A klasszikus radioterápia során külső sugárforrásból származó fotonokkal irradiálják a tumoros szövetet, több irányból is, így az egészséges szöveteket kisebb dózis éri, mint a kezelés centrumában lévő tumoros szövetet. Ezelőtt erre a célra kobalt (60-as kobalt izotóp) ágyút alkalmaztak, de manapság már legtöbbször lineáris gyorsítóval állítanak elő nagy energiájú fotonokat. A klinikumban, amikor erre lehetőség van, a külső sugárforrás alkalmazása helyett brachyterápiát alkalmaznak, amely során a tumorba, vagy annak közvetlen közelébe ültetik be a sugárzó anyagot, legtöbbször 125-ös jódom vagy 192-es irídium izotópot, ami lokálisan a tumorban fejti ki hatását. A brachyterápia során az egészséges szöveteket érintő sugárzás elhanyagolható, így a kezelés mellékhatásai is csökkenthetők [16].

A sugárkezelés közvetlenül és közvetetten is képes károsítani az élő szöveteket, sejteket. A nagy energiájú ionizáló sugárzásra a sejtek membránstruktúrái és a DNS a legérzékenyebbek. Az ionizáló sugárzás hatására végbemenő vízbontás az elsődleges induktor a reaktív szabadgyökök keletkezésében, mely oxidatív stresszt okoz. A reaktív oxigén gyökök (főként a reaktív hidroxil gyök, a szuperoxid anion, a hidrogén-peroxid) a lipidek peroxidációja, a fehérjék denaturálása, a nukleinsavakban létrehozott mutációk által károsítják a sejt

makromolekuláit és a sejtorganelleket. Az ionizáló sugárzás hatására, a mitokondriumok károsodása során másodlagosan felszabaduló elektronok révén is keletkeznek reaktív oxigén szabadgyökök [31]. Az így kiváltott DNS károsodások közül érdemes kiemelni a timin dimerek keletkezését, valamint az egyes szálú és kettős szálú DNS töréseket. Ha a DNS károsodás csak egy bázist érint, akkor a bázis kivágó hibajavítás glikozilázok segítségével képes orvosolni a hibát. Ha egy teljes nukleotidot érint a károsodás, akkor a nukleotid kivágó hibajavítás aktiválódik. Mind a bázis, mind a nukleotid kivágás és az egyes szálú törések esetében a javítás a komplementer szál alapján történik [32].

A legveszélyesebb a DNS kettős szálú törések kialakulása. Ekkor a hiba két úton javítható, homológ rekombinációval vagy nem homológ vég összekapcsolással. A kettős szálú DNS törések elsődlegesen a nem homológ vég összekapcsolás mechanizmusával (NHEJ) javítható. Ekkor a szabad DNS végekhez hozzákötődik a Ku70 és Ku80 fehérje, melyek heterodimert képeznek, majd további fehérjéket toboroznak a törés helyére, mint a Rad50 és egy DNS ligáz. Tanulmányok szerint a kettős szálú DNS törések felismeréséért a DNS-függő protein kináz (DNA-PK) a felelős [33]. A két összekapcsolni kívánt vég ligálása előtt mikrohomológia keresés történik, majd a tompa végek kialakítása után a két szabad DNS szál összekapcsolása lehetővé válik. Ez a hibajavítási mechanizmus mutációk kialakulását eredményezheti, előfordulhat, hogy nem jó végek kerülnek összekapcsolásra, illetve több nukleotid kieshet a végek összeillesztésekor [34].

Replikáció után van lehetőség a DNS kettős szálú törés kijavítására homológ rekombinációval (HR), mivel ilyenkor rendelkezésre áll a homológ szál. Ekkor először a törés helyén egyláncú DNS szakaszt alakít ki az Mre11, Rad50 és Nbs1 fehérjékből álló MRN komplex, majd további fehérjék, mint a Rad51 kötődnek be. Majd a 3' egyszálú vég inváziója történik a homológ szál helyére és a vele komplementer szálról elkezdődik a DNS szintézis. A szintézis után a kereszt feloldódik és az újonnan szintetizált és az eredeti DNS szál alapján megszintetizálódnak a komplementer szálak is. A hiba kijavítása tehát egy nem sérült homológ szál alapján történik, így teljes mértékű, hibátlan javítás történhet [35].

A DNS károsodás mértékét számos esetben a DNS kettős szálú törések mennyiségének megállapításával határozzák meg. A DNS kettős szálú törésnél a H2A hisztonok H2AX variánsa épül be, ez a törés felismerésének és javításának első lépése. A H2AX hiszton variáns a C-terminálisán erősen konzervált motívumot tartalmaz, egy szerint a 139-es helyen és egy

glutamint a 140-es helyen. A DNS törés után a következő lépésben a H2AX fehérje foszforilálódik a 139-es pozíciójú szerin aminosavján az ATM (ataxia telangiectasia mutated) és ATR (ATM-Rad3-related) komplexek által, melyek a PI3K útvonal komponensei is. A foszforilált és így aktivált hisztonformát γ H2AX-nek nevezik, mely számos, a DNS hibajavításában szerepet játszó faktorial lép kölcsönhatásba [36]. A γ H2AX mennyisége specifikus antitest használatával könnyen detektálható, és ebből következtetni lehet a DNS károsodás mértékére. A γ H2AX fókuszok számának megállapításával sejtenként is vizsgálható a különböző DNS-t károsító anyagok effektivitása, tehát ezzel az érzékeny módszerrel már egy meglehetősen korai stádiumban vizsgálhatjuk a DNS kettős szálú törések jelenlétét [37]. A DNS hibajavítás után a γ H2AX defoszforilálódik a protein foszfatáz 2A (PP2A) enzim által [38].

A DNS károsodásra válaszul az osztódó sejtekben aktiválódnak a sejtciklus ellenőrzőpontok kulcsmolekulái, megakasztva a sejtciklust, így időt adva a DNS hibajavításra. Ha a korrekció megtörtént, akkor az osztódó sejtekben a sejtciklus folytatódik, ha nem javítódott ki a hiba, akkor a sejtciklus megáll és a sejtek programozott sejthalál révén elpusztulnak. A terminálisan differenciálódott, nem osztódó sejtekben a DNS károsodásra válaszul közvetlenül bekapcsol a DNS hibajavítás, de súlyos DNS károsodás esetén ezek a sejtek is apoptózissal elpusztulnak. Ha genom instabilitás lép fel, mert a hibajavítás nem sikerül, akkor az egészséges sejtekben rákos elváltozást is kialakulhat [39]. Éppen ezért a sugárterápia alkalmazásakor rendkívül pontosan és szigorúan determinált az egyszeri kezelések és az összesen kapott sugárdózis mértéke, annak érdekében, hogy az egészséges szövetek károsodását, a még súlyosabb mellékhatások kialakulását és az ionizáló sugárzás rákkeltő hatását csökkentsék.

A klinikai gyakorlatban jelentős problémát okoz a radiorezisztencia jelensége, mely a sugárkezelés hatékonyságát nagyban csökkenti. A radiorezisztencia kialakulásának hátterében olyan folyamatokat azonosítottak, amelyek nagy szerepet játszanak a sugárkezelés hatására bekövetkező károsodások kijavításában. A radiorezisztens sejtekre jellemző például az apoptózis folyamatainak elmaradása, valamint a DNS hibajavító, illetve chaperon fehérjék aktivitásának növekedése [31,40]. De a hipoxiás környezet is nagyban felelőssé tehető a kialakuló radiorezisztenciájáért [41]. Bizonyos összejt jellegű tumoros sejteknél figyelték meg, hogy a keletkező reaktív oxigén szabadgyökök (ROS) szintje jelentősen alacsonyabb volt a

vártnál, amely ezen sejtek hatékonyabb antioxidáns kapacitásának volt köszönhető [42]. Emiatt ezek a sejtek az ionizáló sugárzás által kiváltott oxidatív stressz ellen hatékonyabban tudtak fellépni. Kimutatták, hogy az antioxidáns enzimek túltermelése hozzájárul a radiorezisztencia megjelenéséhez, mely folyamat központjában a redox szenzitív Nrf2 transzkripciós faktor megnövekedett aktivitása áll, amely számos citoprotektív enzim regulátora. Az Nrf2 transzkripciós faktor potenciális terápiás célpont, mivel ennek a gátlása a terápia során növeli a sejtek radioszenzitivitását és apoptózist indukál tumoros sejtekben ionizáló sugárzás alkalmazását követően [43]. Ezzel ellentétben prosztata rákos sejteken azt mutatták ki, hogy a sejtek túlélésében a mitokondrium által termelt ROS-nak nagy szerepe van [44]. A reaktív oxigén gyökök szerepét feltárták az epitheliális-mezenchimális tranzíció serkentésében is, ahol ROS és STAT3 hiányában gátlódott az EGF által indukált HIF-1 α és Twist-1 expressziója, mely az EMT visszaszorulását eredményezte [45,46]. Az EMT, mely indukálódhat hipoxia hatására is, kritikus komponensnek bizonyult a sejtek radiorezisztens fenotípusának kialakulásában. Ezt támasztja alá az a tanulmány is, melyben radiorezisztens tumoros sejtekben mutatták ki, hogy az epitheliális E-cadherin szintje alacsony, de a mezenchimális markerek, mint az N-cadherin és a vimentin mennyisége magas, amely bizonyítja a radiorezisztens tumoros sejtek mezenchimális fenotípusát [47].

In vitro és *in vivo* kísérletekben megfigyelték, hogy a radiorezisztens sejtpopulációban a sejtek nagy arányban találhatók a sejtciklus késői S-fázisában, melyben a sejtek ellenállóbbak az ionizáló sugárzás károsító hatásaival szemben [44,48,49]. Az ionizáló sugárzás hatására bekövetkező sejtciklus szabályozás központi szereplője az ATM fehérje, mely a sugárzás hatására aktiválódva képes a p53 fehérjén keresztül sejtciklus megállást okozni és hibajavítást serkenteni. Emellett az ATM aktiválja a CHK2 fehérjét, mely a Cdc25 foszfatázon keresztül hozzájárul a sejtciklus megállásához a G2 fázisban. Az ATM fehérjéhez köthető az NBS1 és BRCA1 fehérjék aktiválása is, melyek felelősek az S-fázison belüli ellenőrzőponthoz köthető javításokért [50]. A sejtek radiorezisztens jellegéhez a késői S-fázisban hozzájárulhat az is, hogy ebben a fázisban a DNS kettős szálú törések kijavításáért túlnyomórészt a HR felelős, ami a homológ szál alapján hibátlan javítást tesz lehetővé [50].

A sugárterápia hatékonyságának fenntartása vagy növelése, akár a radiorezisztens tumorok eliminálása is biztosítható radioszenzitiváló anyagok használatával. A klinikumban kemoterápiás kezelésekkor használt anyagok között is vannak bizonyítottan sugárkezelésre

érzékenyítő anyagok. Ilyenek a sejtsztódást gátló anyagok közé sorolt taxánok is, amelyek a radioszenzitív G2/M fázisban állítják meg a sejtciklust [51]. A klinikumban használt anyagokon túl számos új, potenciális rákellenes anyag mutat radioszenzitiváló aktivitást, ilyenek a fém nanorészecskék is, amelyek különleges fizikai, kémiai tulajdonságaiknak köszönhetően a tumorbiológiai kutatások középpontjába kerültek.

Nanorészecskék

Nanorészecskéknek azokat a partikulumokat nevezzük, amelyeknek legalább két dimenziójuk az 1-100 nm-es mérettartományba esik. Anyaguk alapján két csoportra oszthatjuk a nanopartikulumokat, megkülönböztetünk szerves- és szervetlen-alapú nanorészecskéket. A szerves-alapú nanorészecskék felépítésében valamilyen szerves anyag vesz részt, ilyenek a fehérjéből kialakított részecskék, a lipidekből létrehozott liposzómák, a szén alapú fullerének és a mesterségesen szerves anyagokból polimerizált elágazó szerkezetű dendrimerek. Ezen nanorészecskék jellemzője az önszerveződő képesség és a biokompatibilitás. A kis reakcióképességük és alacsony toxicitásuk miatt, a nanomedicina területén leginkább a hatóanyagok célzott szállítására és a képalkotó diagnosztika területén alkalmazzák őket [52].

A szervetlen alapú nanorészecskék anyaguktól függően speciális fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek, és különféle aktivitást mutatnak biológiai rendszerekkel szemben. A szervetlen részecskék közül a fém nanorészecskéket alkalmazzák a legszélesebb körben, nem csupán szervetlen ipari technológiákban, hanem a gyógyászatban és a diagnosztikában is. A hatóanyag szállításán túl önmagukban is jelentős biológiai hatásuk van, mely a tumorbiológiában előnyösen kihasználható [53,54].

A szervezetben lebomlani képes partikulumokkal ellentétben, a nem-lebomló nanorészecskék esetén mindig fontos tisztában lenni azzal, hogy az adott részecske hogyan képes kiürülni a szervezetből, illetve, hogy képes-e bizonyos szövetekben akkumulálódni. Ezeknek a jelenségeknek mindegyike függ a részecske méretétől, töltésétől és alakjától is. A kisméretű, 10 nm átmérőjű vagy annál kisebb gömb alakú arany nanorészecskék a vesében, tüdőben, szívben és agyban is megtalálhatóak voltak. A nagyobb méretű partikulumok nem mutattak ilyen széles szöveti eloszlást, ezek a májban és a lépben voltak jelen 24 órával a bejuttatást követően [55]. Ezt megerősítették további tanulmányok is, melyek szerint az 5 nm-nél kisebb gömb alakú részecskék gyorsan kiürülnek a véráramból a vesén keresztül, a 20-

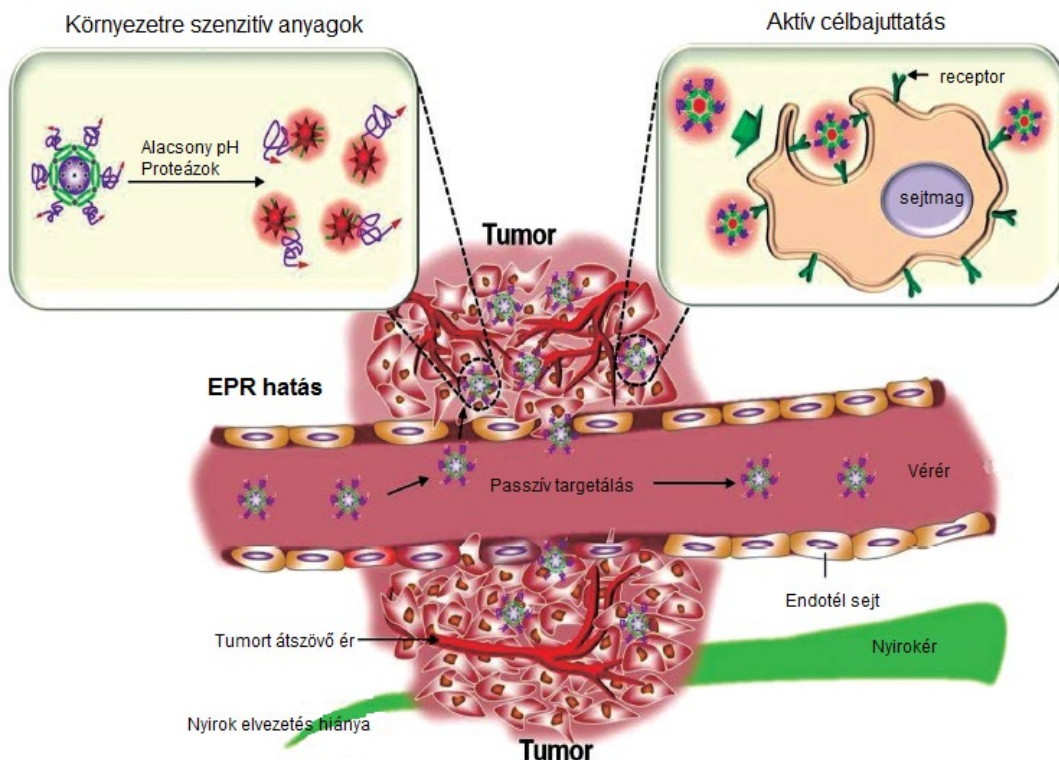
150 nm mérettartományba eső partikulumok a májban és a lépben, míg az ennél nagyobb részecskék a tüdőben, májban és lépben halmozódnak fel [56].

A partikulumok töltése is meghatározta a szervezetben történő eloszlásukat. Egy átfogó kísérleti munka rávilágított arra, hogy a körülbelül 10-15 nm nagyságú nanorészecskék esetében a neutrális, vagy enyhén negatívan vagy pozitívan töltött, hidrofil természetű részecskék a szívben és a véráramban, az erősen negatív vagy erősen pozitív töltéssel rendelkező, hidrofób természetű részecskék a májban és a lépben mutathatóak ki [57]. Egy másik tanulmány a gömb alakú 20-150 nm mérettartományba eső részecskéket vizsgálta. Ezek közül a pozitív felületi töltéssel rendelkezők dúsulnak fel inkább a májban és a lépben és kisebb mértékben a tüdőben, míg a neutrális és negatív töltésű partikulumok kis mennyiségben mutathatóak csak ki ezekben a szervekben.

Mindezek mellett a részecskék alakja is befolyásolja a szervezetben történő eloszlásukat. A korong alakú partikulumok a lépben, a májban és a tüdőben, a pálca alakúak elsősorban a májban és a lépben, kisebb mértékben a tüdőben, míg a gömb alakúak a májban és kisebb mértékben a lépben voltak kimutathatóak [56]. További kutatásokban megállapították, hogy minél nagyobb a részecske alaki tényezője (az az érték, mely megadja a részecske két dimenziója, például a szélessége és a hossza közötti arányt), annál lassabban ürül ki a véráramból. Továbbá, arany nanorészecskékkal végzett kísérletek során kimutatták, hogy a pálca alakú, tehát a nagy alaki tényezővel rendelkező partikulumokat kisebb mértékben képesek a makrofág sejtek bekebelezni, mint a gömb alakúakat [58].

Nanorészecskék a tumorterápiában

A nanorészecskék alkalmazása a tumorterápia során számos előnnyel járhat. A nanométeres mérettartományú részecskék feldúsulása a tumoros szövetben passzív módon is bekövetkezhet. A tumorok gyors növekedésének és a gyors vérér képződésnek köszönhetően a tumoros szövetre jellemző fenesztrált endotélium átteresztőképessége viszonylag nagy, így az intravénásan bejuttatott nanorészecskék egy idő után passzívan képesek feldúsulni a tumorokban. Ezt a jelenséget megnövekedett permeabilitás és visszatartás (enhanced permeability and retention, EPR) névvel illetik (**1. ábra**) [59].



1. ábra A nanorészecskék passzív és aktív célba juttatása. A tumorokban a nanorészecskék a méretüknél fogva, és a tumorokban található átjárhatóbb érendotélnek köszönhetően képesek passzívan feldúsulni. A környezetére érzékeny részecskék a tumorokra jellemző pH vagy proteázok hatására aktiválódhatnak. Az adott tumorra jellemző sejtfelszíni receptorokra specifikus ligandokkal funkcionalizált nanorészecskék aktívan is targetálhatják a rákos sejteket [60].

Kimutatták, hogy egerekben a kisebb méretű részecskék (2-3 nm) nagyobb mennyiségben képesek feldúsulni és mélyebbre képesek bejutni a tumoros szövetbe, mint a nagyobb méretű (7-25 nm) partikulumok [59]. Ahogy a nanopartikulumok szöveti disztribúciójának analízisekor is tapasztalták, a részecskék mérete mellett, azok felületi töltése is befolyásolja, hogy a tumoros szövetben milyen mértékben halmozódnak fel. A pozitív felületi töltés előnyösebb az osztódó sejtekben történő akkumuláció szempontjából, mint a negatív töltés, habár ez utóbbi nanorészecskék mélyebben hatoltak bele a szöveti állományba [61]. Amennyiben a részecskék valamilyen hatóanyagot hordoznak magukban vagy a felületükön, akkor a részecskék meghosszabbodott jelenléte a tumoros környezetben javíthatja a gyógyszer célbajuttatását és esetleg a hatóanyag leadás kinetikáját, ezáltal növelheti a kezelés hatékonyságát. Számos olyan lehetőség áll a rendelkezésre, amikor a hatóanyag leadás, vagy a bioinert anyag reaktívvá válása a környezetváltozás függvénye, így a részecskék a tumoros

szövetben, az ott lévő alacsonyabb pH, vagy a proteázok emelkedett mennyiségének hatására aktiválódhatnak, így növelve a kezelés specifitását [60].

A részecskék tumorspecifitása tovább növelhető, ha felületüket az adott tumorra jellemző, a sejtek felszínén megjelenő receptorokra specifikus ligandokkal, vagy antitestekkel, illetve más polimerekkel funkcionalizálják. Ennek fontos lépése, hogy a részecske szintézisekor a ligand denzitás a nanorészecske felszínén kontrollálható legyen. A ligand sűrűségének növelése sokszor a partikulum internalizációjának csökkenésével jár [62]. Ennek hátterében állhat többek között a nem megfelelő ligand irányultság, ami miatt nem képes a receptorhoz bekötődni vagy a nagyszámú ligand kompetíciója a sejt felszínén lévő kötőhelyért [63]. Emellett azt is kimutatták, hogy a részecske felszínén nagy denzitásban jelenlévő hidrofób ligandok hatására a makrofágok könnyebben felismerik és bekebelezik a részecskéket [64]. A megfelelő ligand kiválasztása az adott tumorra specifikusan történhet. Többek között sok emlő, petefészek és prosztata tumorra jellemző az ösztrogén vagy androgén receptorok túltermelése, de emlőrák esetében az epidermális növekedési faktor 2 receptorok (HER2) [65], a folsav receptorok [66] vagy a G-fehérje kapcsolt receptorok magasabb expressziója is sokszor megfigyelhető [67]. Ezzel az aktív, irányított targetálással még effektívebb tumorelles hatás érhető el, miközben az egészséges szervek szövetek érintettsége csökken.

Ezüst nanorészecskék

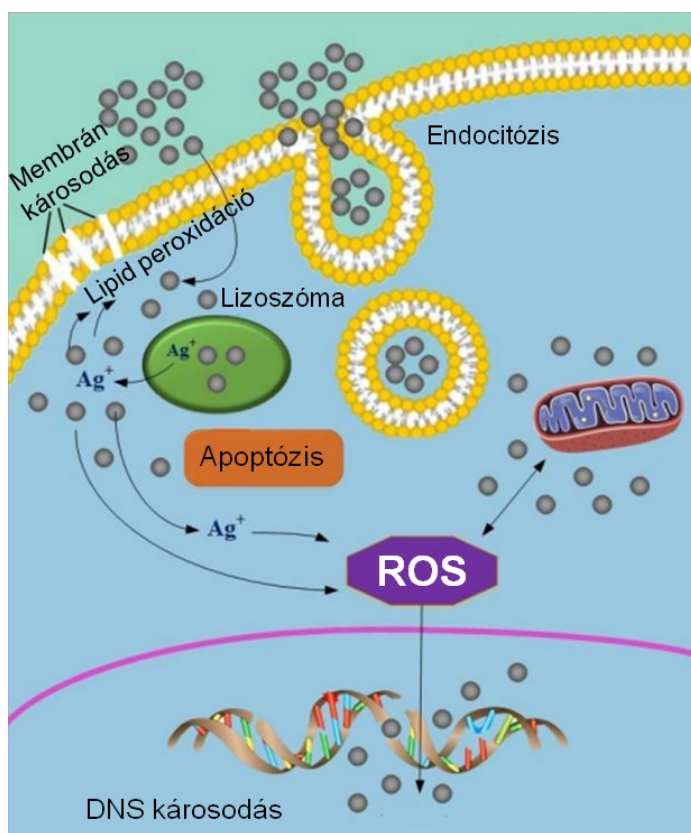
Az ezüst nanorészecskék a legelterjedtebben használt nanoanyagok. Számos területen alkalmazzák őket a jól definiált antibakteriális, antifungális és antivirális tulajdonságaiknak köszönhetően [68]. Az ezüst nanopartikulumok baktericid hatását mind a Gram-negatív [69], mind a Gram-pozitív baktériumokon kimutatták [70,71]. A Gram-negatív *Escherichia coli* esetén az ezüst nanorészecske kezelést követően a partikulumok a sejtmembránban akkumulálódtak, a sejtfalban pedig jellegzetes gödröket figyeltek meg. Ez a folyamat a sejtmembrán permeabilitását megnöveli, ami a baktérium sejtek halálához vezet [69]. Az AgNP antibakteriális aktivitása mögött a már említett sejtfal és sejtmembrán diszfunkció állhat, emellett megfigyelték, hogy a légzési lánc is gátlás alá kerül, ami oxidatív stresszhez vezet. Az ezüst nanorészecskék hatására károsodik a DNS, egyrészt az oxidatív stressz indukálásának eredményeképpen, másrészt maguk a részecskék képesek direkt módon is kölcsönhatni a DNS foszfát csoportjaival, és a baktériumokra jellemző foszforotiolált DNS-ben található kén

atomokkal [72], ami a DNS aggregációját okozza [73]. Az ezüst kötődése mind a foszfor, mind a kén atomokkal számos szignálutat és sejtfolyamatot gátol [74]. A legintenzívebb antibakteriális hatásért az ezüst nanorészecskék felszínéről leváló ezüst ionok felelősek, amelyek okozzák a fent felsorolt membrán struktúra, DNS és sejtfal károsodást [75]. Az ezüst ionok felszabadulásának szabályozásával az alkalmazott ezüst nanorészecskék toxicitása kontrollálható, melyet elérhetünk a részecske méret, alak vagy a részecskéket stabilizáló bevonó anyag változtatásával [75].

Újabb tanulmányok szerint az ezüst nanorészecskék képesek a multidrog rezisztens baktériumok elpusztítására is [76,77]. Ennek a mechanizmusa nem tér el a Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumok esetén leírtaktól. A multidrog rezisztens *Staphylococcus aureus* és *Pseudomonas aeruginosa* esetén is a reaktív oxigén szabadgyökök mennyiségének növekedése a lipidperoxidáció és a fehérjék és a szénhidrátok károsodása volt megfigyelhető. Emellett az ezüst nanorészecske kezelés csökkent laktát-dehidrogenáz (LDH) és ATP szintet eredményez és hatására az oxidatív stressz elleni védekezés is gyengül az alacsonyabb glutation (GSH), szuperoxid-dizmutáz (SOD) és kataláz (CAT) aktivitás miatt [76]. Egy másik tanulmány szerint bár a multidrog rezisztens *Pseudomonas aeruginosa* redox homeosztázisáért felelős gének expressziója nőtt, mégis a CAT és a peroxidázok csökkent aktivitása volt megfigyelhető az ezüst nanorészecske kezelések hatására [77]. Több kutatócsoport mutatott rá arra a tényre, hogy az ezüst nanorészecskék jelenlétében a bakteriális biofilm képződés is gátlódik a baktérium sejtek adhéziójának csökkentése miatt [78].

Az utóbbi évtizedben az ezüst nanorészecskék berobbantak a humán gyógyászatba, elsősorban a jól körül járt antimikrobiális hatásuknak köszönhetően. Mára már az antimikrobiális hatásuk mellett ismert az ezüst nanorészecskék angiogenezist gátló, gyulladáscsökkentő és tumorellenes aktivitása is [70]. A nanoezüst tumorellenes hatásának hátterében a tumoros sejtekben kiváltott oxidatív stressz és az apoptózis indukciója áll [79]. A folyamat során az ezüst nanorészecskéket a tumoros sejtek felveszik, ennek mechanizmusa a részecske méretétől és töltésétől is függ. A kisméretű részecskék képesek passzívan bejutni a sejtek citoplazmájába, míg a nagyobb méretű partikulumok aktív transzporttal, endocitózissal jutnak be a sejtekbe. Ezen belül makropinocitózis és klatrin-mediált endocitózis játszik fő szerepet a nanorészecskék felvételében [80].

A nanorészecskék endocitózisa után a citoplazmában a lizoszómális fúzió során egy savasabb környezetbe kerülnek, ahol megkezdődik az AgNP-k degradációja, felszínükről ezüst ionok szabadulnak fel, melynek mennyisége szintén függ a részecske méretétől és alakjától is. A kisebb méretű nanorészecskék felületéről a nagy felület/térfogat arányuknak köszönhetően nagyobb mennyiségű ezüst ion képes leszakadni, mint a nagyobb méretű partikulumokról [81]. Az AgNP-k sejten belüli akkumulációja a lizoszómák diszfunkcióját, destabilizációját eredményezi, ennek során a lizoszómákban a pH növekszik, mely szintén hozzájárul az AgNP-k citotoxicitásához (2. ábra) [82].



2. ábra Az ezüst nanorészecskék által kiváltott celluláris hatások. Az ezüst nanorészecskéket a sejtek többnyire endocitózis révén felveszik, majd az endoszómák lizoszómákkal történő fúziója után egy savasabb pH-jú környezetbe kerülve felszínükről ezüst ionok szabadulnak fel. Az ezüst ionok lipidperoxidációt, membránkárosodást okoznak és közvetlenül, illetve mitokondriális diszfunkción keresztül képesek a reaktív oxigén szabadgyökök mennyiségét növelni, amellyel DNS károsodást és apoptózist indukálnak [83].

A lizoszómák sérült funkciója autofágiához vezethet. Több tanulmány leírta, hogy a nanorészecskék autofágiát indukálnak, míg mások szerint az ezüst nanorészecskék inkább az autofagoszómák feldúsulását eredményezik, melyek a lizoszómális diszfunkció miatt

felszaporodnak a sejtekben, és ez végül a sejtek halálát okozza [82]. A nanorészecskék jelenléte képes a mitokondriumok külső membránjának átjárhatóságát is növelni, mely oxidatív stresszt eredményez [84]. Az ezüst ionok a mitokondriális diszfunkció mellett képesek endoplazmatikus retikulum stresszt indukálni, mely folyamatok összessége végső soron a sejtek apoptózisához vezet (**2. ábra**) [85].

Az AgNP kezelés *in vitro* genotoxikus és mutagén hatását több tanulmány is leírta. A kisméretű (5-20 nm) részecskék ebben az esetben is toxikusabb hatást fejtenek ki az örökítő anyagra, mint a nagyobb (40-100 nm) méretű partikulumok. Az AgNP mutagén hatása szintén függ a részecske méretétől. A 20 nm-es partikulumok magasabb mutációs rátával, míg a nagyobb méretű részecskék kisebb mutagén aktivitással rendelkeztek. AgNP hatására megnő a tumoros sejtekben a mikronukleuszok száma *in vitro* [86].

Az angiogenezis fontos tényező a tumorok progressziójában és az áttétek kialakításában is, ezért ennek gátlása potenciális tumorterápiás célpont lehet [87]. Kimutatták, hogy az ezüst nanorészecskék képesek blokkolni a PI3K/Akt útvonalat, illetve a VEGF által indukált angiogenezist az endotél sejtek migrációjának, inváziójának és a vérér képző képességének gátlásával *in vitro* és *in vivo* is [88].

A kutatócsoportunk több modellt alkalmazva vizsgálta az ezüst nanorészecskék tumorelles hatását *in vitro*. Kimutattuk, hogy az 5 és a 35 nm-es ezüst nanorészecskék képesek p53-függő és p53-független módon is apoptózist indukálni tumoros sejtekben mitokondriális stressz indukcióján keresztül [89]. Emellett bizonyítottuk, hogy eltérő hatásmechanizmusú kemoterápiás szerekkel kombinációban a kb. 30 nm-es ezüst nanorészecskék szinergista módon képesek csökkenteni a tumoros sejtek viabilitását szenzitív és multidrog rezisztens tumoros sejteken is. Az ezüst nanorészecske kezelés gátolja a multidrog rezisztenciáért felelős P-glikoprotein expresszióját, ezzel csökken a P-glikoprotein efflux aktivitása, ami a multidrog rezisztens sejtek érzékenyítését váltja ki a tumorelles szerek hatásával szemben [90]. A 75 nm nagyságú ezüst nanorészecskék szintén csökkentik a P-glikoprotein efflux aktivitását, ennek a háttérében azonban az ezüst nanorészecskék által kiváltott endoplazmatikus retikulum stressz áll. Ez a hatás méretfüggő, mivel az 5 nm nagyságú ezüst nanorészecskék nem csökkentették a P-glikoprotein efflux aktivitását [91].

Arany nanorészecskék

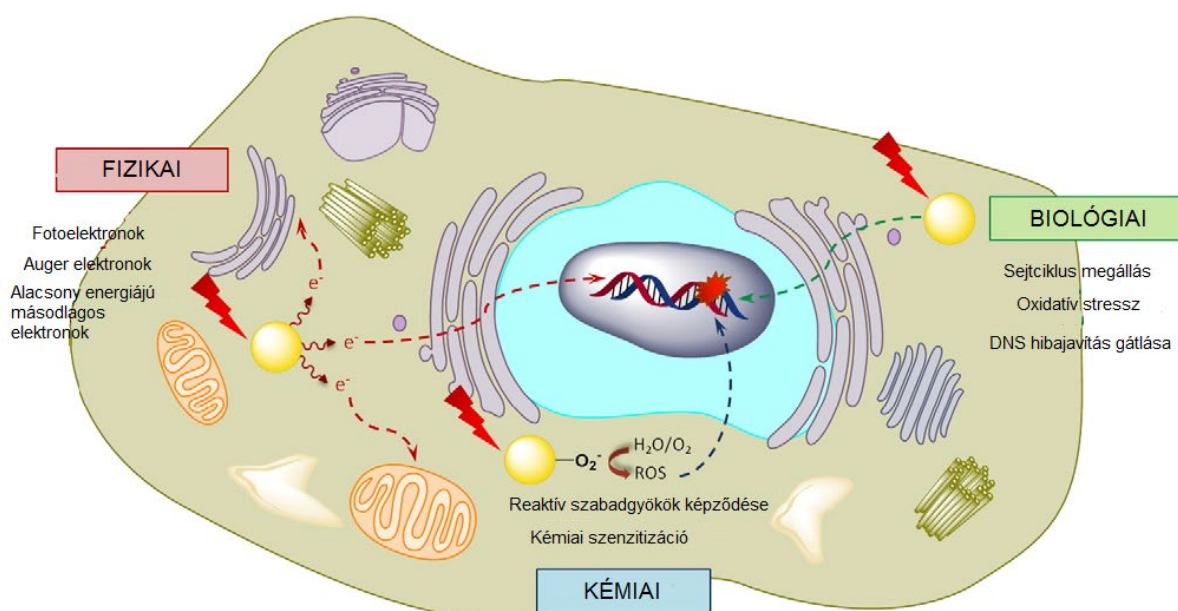
Az arany nanorészecskéket biológiailag inert, nem reaktív nanopartikulumként tartják számon. Mivel az élő rendszerekkel nem, vagy kevéssé reagálnak, ezért előszeretettel terveznek velük olyan kutatási projektekben, ahol a tumorelles anyagok aktív célbajuttatását szeretnék elérni. Emellett orvosi diagnosztikai felhasználásuk is ismert, hiszen kontraszt anyagokként is alkalmazzák őket különböző képalkotó eljárások során [92,93]. Az elfogadott kémiai inertségük ellenére több tanulmány leírta, hogy az AuNP-k képesek tumorelles hatást kifejteni, melynek mechanizmusa, az AgNP-hez hasonlóan, lizoszómális diszfunkcióval és autofágiával függ össze. Endocitózis után az AuNP-k hatására nő az autofagoszómák mennyisége a sejtekben, melynek oka a lizoszómális degradáció gátlása. Az autofágia gátlásának egyik bizonyítéka, hogy bár az autofagoszóma markerek, mint az LC3 mennyisége az AuNP kezelés hatására megemelkedik, az autofágia szubsztát p62 degradációja nem következik be, ami az autofágia blokkolását bizonyítja [94].

Az arany nanorészecskéknél egy további igen előnyös tulajdonsága, hogy radioszenzitizáló aktivitást mutatnak *in vitro* és *in vivo* is [95]. Az arany nagy rendszámú ($Z=79$) fém, mely alkalmassá teszi az ionizáló sugárzás hatásának felerősítésére a biológiai rendszerekben. Ennek a folyamatnak három fontos résztvevője van, a fizikai, a kémiai és a biológiai dózis felerősítés. A fizikai potencirozás során fotoelektromos, Auger és Compton effektus zajlik le. A kémiai felerősítéshez tartozik a sugárzás hatására közvetlenül kialakuló és a fizikai fázisban keletkező reaktív elektronok által kiváltott oxidatív stressz, míg a biológiai fázisban az előzőekben indukált destruktív hatások (biológiai membránok, DNS károsítás) sikertelen kijavítása, így végső soron a sejtek apoptózisa zajlik (**3. ábra**) [96,97].

A legfőbb fizikai kölcsönhatás a fotoelektromos hatás, mely az ionizáló sugárzás következtében jön létre, amikor az ionizáló sugár közvetlenül a nanorészecske egy atomjával találkozik és annak egyik belső elektronhéjáról egy elektron kilökését idézi elő. A fotoelektromos hatást általában az Auger kaszkád és a Compton szórás követi. Az Auger kaszkád során a belső elektronhéjon kialakult elektron hiányt egy külső elektronhéjról származó, eredetileg magasabb energiaszinten elhelyezkedő elektron pótolja, ami energiáját átadhatja egy másik elektronnak, mely így elhagyhatja az atomot. Ezt az elektront nevezik Auger elektronnak. A folyamat láncszerűen, további másodlagos, alacsony energiájú

elektronok kilépését okozhatja, ami miatt a jelenséget Auger kaszkádnak nevezték el [98]. A Compton szórás azt a fizikai jelenséget írja le, amikor a beérkező nagy energiájú foton leadja az energiájának egy részét az atomból általa kilökött elektronnak, így a beérkező sugárzás egy eltérő pályán, alacsonyabb energiájú, nagyobb hullámhosszú fotonként lép ki az atomból az ütközés után [99]. Ezen fizikai jelenségek következtében a beérkező ionizáló sugárzás hatása többszörösére képes felerősödni (**3. ábra**).

Az ionizáló sugárzás hatására vízbontás történik, mely közvetlenül oxidatív stresszt vált ki [31]. Az AuNP felszínéről leváló elektronok az oxigén molekulával reagálva szintén növelik az oxigén szabadgyökök mennyiségét, mely aztán károsítja többek között az örökítőanyagot, a mitokondriumokat és más membrán struktúrákat is. Az is fontos tényező, hogy az AuNP a tiol tartalmú antioxidánsokat (pl. glutation) Au-S kötés révén képes megkötni, mellyel tovább növeli az oxidatív stressz mértékét [100]. Ha a DNS hibajavítás nem, vagy csökkent mértékben működik, akkor az ionizáló sugárzás hatására bekövetkező egyes vagy kettős szálú DNS törések, bázis károsodások vagy timin dimerek kijavítása nem megy végbe, ezért ekkor a sugárzás hatására sejtciklus megállás, legvégső soron pedig apoptózis, vagy nagy sugárdózis hatására nekrozis indukálódik (**3. ábra**) [97].



3. ábra Az AuNP révén kialakuló, az ionizáló sugárzást potencírozó hatás, azaz a radioszenzitizáció elemei. Az AuNP kezelés képes fizikai, kémiai és biológiai úton felerősíteni az ionizáló sugárzás hatását [97].

Emellett napjainkban több tanulmány is foglalkozik annak vizsgálatával, hogy az AuNP kezelés hogyan hat a tumorok mikrokönyezetére. Hasnyálmirigy tumoros modellben kimutatták, hogy az AuNP-k interakcióba lépnek a sztróma sejtekkel és befolyásolják a tumoros sejtek és a sztróma sejtek közötti kommunikációt a különböző autokrin és parakrin szignalizációs faktorok, növekedési faktorok és citokinek szekréciójának csökkentésével. Ezáltal nem csupán a tumoros sejtek proliferációja, migrációja, valamint a tumorok progressziója csökken, hanem az AuNP-k hatására a sztróma sejtek proliferációja is visszaszorul, elsősorban a mitogén aktivált protein kináz gátlásán keresztül [101,102]. Egy kutatás szerint a citráttal stabilizált AuNP-k képesek megkötni, és a natív szerkezetüket megváltoztatva gátolni a heparin-kötő doménnel rendelkező citokineket, mint például a proangiogenikus VEGF vagy bFGF növekedési faktorokat, melynek révén gátolják a tumorokban az angiogenezist [103].

A hiszton-deacetiláz enzimek és azok gátlószerei

A fehérje acetiláció a foszforiláció után az egyik legfontosabb ko- és poszttranszlációs módosítás az eukarióta sejtekben. Egyes fehérjék acetilációja számos celluláris folyamatot befolyásolhat, mint pl. az anyagcsere egyes enzimatikus átalakulásait, a transzkripciót, a sejtosztódást és a sejthalált. Ezt a reverzibilis poszttranszlációs acetilációt és deacetilációt a hiszton-acetiltranszferáz (HAT) és a hiszton-deacetiláz enzimek (HDAC) alakítják ki. Ezen enzimek elnevezése megtévesztő, mert nem csak a hisztonok, hanem más fehérjék acetilációjáért és deacetilációjáért is felelősek, ezért legújabban lizin-acetiltranszferáz (KAT) vagy lizin-deacetiláz enzimeknek (KDAC) nevezik őket, mégis a HAT, HDAC megnevezés maradt fenn a mindennapi használatban [104].

A HAT enzimek az acetil-Koenzim A-ról viszik át az acetil-csoportot a célfehérje lizin aminosavjának ϵ -amino csoportjára, míg a HDAC enzimek az acetil-csoport eltávolítását katalizálják [104]. A hisztonok acetilációja a fehérjék N-terminálisának lizin aminosav oldalláncain neutralizálja a lizin pozitív töltését, ami csökkenti a hiszton fehérje és a DNS negatív töltésű cukor-foszfát gerince közötti elektrosztatikus kölcsönhatást, így lazább kromatinszerkezet jön létre. A hisztonok deacetilációjakor szorosabban csomagolt nukleoszóma alakul ki a pozitív töltésű hisztonok és a negatív töltésű DNS között megvalósuló elektrosztatikus vonzó hatások révén. A hisztonok acetilációjának mértéke tehát azt

befolyásolja, hogy mennyire legyen hozzáférhető a DNS a transzkripció faktoroknak és szabályozó fehérjéknek. A lizinek acetilációját/deacetilációját kialakító enzimek aktivitása függ a sejtek energiaellátásától, leginkább az acetyl-Koenzim A mennyiségétől [105,106]. Ebben a tekintetben az acetiláció nagyban különbözik a foszforilációtól, mely független a koenzimének, az ATP-nek a mennyiségétől [107,108].

Az acetiláció és deacetiláció egyensúlyának eltolódása számos celluláris folyamatot befolyásol. A csökkent acetiláció sokszor jellemző öregedéssel járó folyamatokra is, mert a neuroplaszticitásért felelős gének hipoacetilálódnak, azok transzkripciója csökken, így a szinapszisok fenntartása és normális működése sérül [109,110]. A csökkent acetiláció okozhat fejlődési rendellenességet is, mint a Rubinstein-Taybi szindróma esetén, ami a CBP és a p300 acetiltranszferázokat kódoló génekben történő mutációhoz köthető [111].

Emellett az alacsonyabb acetilációs szint hozzájárulhat bizonyos neurodegeneratív betegségek vagy rákos elváltozások kialakulásához is. Szintén a CBP és p300 géneket érintő inaktiváció okozta alacsonyabb hiszton acetiláció jellemző a kissejtes tüdőrákra, mely az egyik legagresszívabb tumor típus [112]. A szolid tumorokban megfigyelt emelkedett hiszton-deacetiláz aktivitás súlyosbítja a betegség kimenetelét [113,114]. Egy összehasonlító tanulmányban, ahol egészséges és tumoros sejtvonalakban, illetve primer sejtekben jelenlévő hiszton poszttranszlációs módosításokat hasonlítottak össze, kimutatták, hogy a tumoros sejtek többségét a H4 hiszton 16-os lizinjén (H4K16) lévő acetiláció és H4K20 trimetiláció hiánya jellemezte [115].

A HDAC enzimek szerepét a tumorok kialakulásában és progressziójában először vérvérképző rendszeri tumorokban azonosították. Akut promielocitás leukémiában (APL) a 15-ös és a 17-es kromoszóma között történő transzlokáció miatt egy kóros fúziós fehérje képződik, ami a retinsav receptorból (RAR) és a promielocitás leukémia (PML) fehérjéből áll. Ez a fúziós fehérje, amikor beköt a retinsav receptor válasszelemhez (RARE) a DNS-en odatoboroz egy HDAC enzimet, ami deacetilálja a hisztonokat. A kialakult fehérje komplex ezek után további kromatin módosító fehérjéket gyűjt erre a helyre, többek között DNS és hiszton-metiltranszferázokat, amelyek további, a mieloid differenciációért felelős gének csendesítését idézik elő. Ez egy differenciációs blokkot eredményez, ami transzformált fenotípushoz vezet [116,117]. Hasonló folyamatokat figyeltek meg más vérvérképző rendszeri és bizonyos szolid tumorok esetében is [118–120].

A hisztonok módosításán túl a HAT és HDAC enzimek számos más, nem-hiszton fehérje acetilációjáért is felelősek, melyeknek szerepe lehet a tumorgenezisben. A p53 fehérje acetilációja növeli annak stabilitását és DNS-kötő affinitását, miközben a HDAC enzimek hatására bekövetkező deacetiláció a p53 fehérje represszióját váltja ki [121]. A Ku70 fehérje acetilációja hozzájárul az apoptózis indukciójához. A deacetilált Ku70 fehérje a citoplazmában a Bax fehérjével heterodimert alkot, ám a Ku70 acetilációjakor a Bax felszabadul és a mitokondriumba vándorol, ahol apoptotikus folyamatokat indít el [122].

Az említett példákon keresztül is látszik, hogy a HAT és HDAC enzimek hatásai nagyon összetettek és számos fontos celluláris folyamatot befolyásolnak. Ennek ellenére a klinikumban egyes rákos megbetegedések kezelésére máig sikerrel alkalmaznak HDAC gátlókat. Ennek oka, hogy a HDAC gátlók tumorelles hatását még az előtt leírták, illetve azokat még azt megelőzően a tumorterápiában alkalmazni kezdték, hogy a HDAC enzimeket megismerték volna [120]. Az első feljegyzések 1970-ből származnak, mikor egy eritroleukémiás sejtvonalnál megfigyelték, hogy a hiszton-deacetiláz inhibitor butirát jelenlétében a differenciálatlan leukémia sejtek differenciálódtak [123], amelynek okát csak később fejtették meg [124]. A hiszton-deacetiláz gátlók kutatása a mai napig igen intenzív, tumorelles szerként való alkalmazásuk az évek során eljutott a klinikai használatig például akut promielocitás leukémia vagy a cutan t-sejtes limfóma (CTCL) esetén, valamint bizonyos szolid tumoroknál is bevetik ezt a hatóanyag csoportot [125,126].

A HDAC enzimeket 4 osztályba sorolják, az élesztő fehérjékkel való homológiájuk alapján. Az I. II. és IV. HDAC osztályok az aktív centrumukban Zn^{2+} ionokat tartalmaznak. A III. enzimosztályba tartoznak NAD^+ függő szirtuinok. Mivel az I., II és IV. osztályba tartozó hiszton-deacetilázok működéséhez Zn^{2+} ionokra van szükség, így ezeknek az enzimeknek a gátlása a Zn^{2+} ionok megkötésével kivitelezhető [127,128]. A HDAC inhibitorok aktivitását és szelektivitását három fő szerkezeti részük befolyásolja: a hidrofób vagy aromás sapka rész, a Zn-kötő, vagy kelátoló rész, és a kettőt összekötő lineáris vagy ciklikus, telített vagy telítetlen linker rész [129]. A legtöbb Zn^{2+} ion kötésen alapuló HDAC gátló, mint a ciklikus tetrapeptidok, nem specifikusak az egyes HDAC enzimosztályokra. A hidroxámsavak, mint például a SAHA (szuberoil-anilid-hidroxámsav) és a TSA (Trichostatin A), nagy Zn^{2+} ion-kötő affinitásuknak köszönhetően képesek az összes Zn^{2+} függő HDAC enzimet gátolni. A benzamidok esetén megfigyelték, hogy képesek specifikusan gátolni az I. típusú HDAC osztályba tartozó

enzimeket. Ezen enzimeknél eltérő a Zn^{2+} ion kötéseért felelős kémiai rész, amely a hidroxámsavakkal ellentétben kisebb affinitással köti a Zn^{2+} ionokat. A HDAC inhibitorok között eltérések lehetnek továbbá abban is, hogy a citoplazmatikus szubsztrátok acetiláltságát mennyire befolyásolják [128]. A NAD^+ függő szirtuinok csoportja nikotinamiddal, és azok származékaival gátolható, amilyen például a dihidrokumarin [130].

A HDAC inhibitorok tumorellenes hatásai közé tartozik, hogy gátolják a DNS hibajavítást és apoptózist indukálnak mitokondriális és oxidatív stressz révén [131,132]. A HDAC gátlók emelkedett citokróm c felszabadulást és kaszpáz-3 aktivációt idéznek elő [133], apoptózist indukálnak a fent említett Bax fehérjén keresztül [122], illetve a p21, Bcl-2-Bcl-x és c-Jun/AP1 útvonalak szabályozásán keresztül is [134]. Emellett kaszpáz aktivációtól függetlenül, a HDAC gátlók autofágia indukcióján keresztül is okoznak tumoros sejtekben sejthalált [133]. A HDAC inhibitorok, gátolva a tumorok progresszióját, hatásos tumor-ellenes anyagoknak bizonyultak mind *in vitro* és *in vivo* [135].

A HDAC inhibitorok nem csak önállóan, hanem más kemoterápiás szerrel kombinációban is alkalmazhatóak, mely kombinációs stratégia megnövelheti a kezelés hatékonyságát. A HDAC gátlók növelhetik a tumoros sejtek radioszenzitivitását, így sugárterápiával kiegészítve hatékony tumorellenes hatás érhető el [136], illetve más tumorellenes aktivitással rendelkező anyagok, mint a fém nanorészecskék potenciális terápiás partnerei lehetnek.

3D sejtkultúrák

A klasszikus 2D *in vitro* sejtkultúrák, mint kísérleti rendszerek rendkívül elterjedtek, segítségükkel farmakológiai, terápiás vagy diagnosztikai fejlesztések első tesztelése könnyedén megvalósítható és hozzájárulnak mind a sejtbiológia, mind a molekuláris biológia fejlődéséhez. Ennek ellenére ezek az *in vitro* modellek viselkedésükben és a stresszre adott válaszukban a valóságos, komplex biológiai rendszerektől számos ponton eltérhetnek.

Az *in vitro* sejtkultúrák egyik komplexebb, az *in vivo* biológiai rendszerekhez közelebb álló alternatíváját kínálják a 3D sejtkultúrák, ahol a sejtek alakja, viselkedése, elhelyezkedése realitásabban tükrözi az *in vivo* körülményeket. 3D kultúra kialakításakor gyakran a sejteket egy mesterséges mátrixba helyezik, melynek komponense lehet agaróz, kollagén vagy fibronektin,

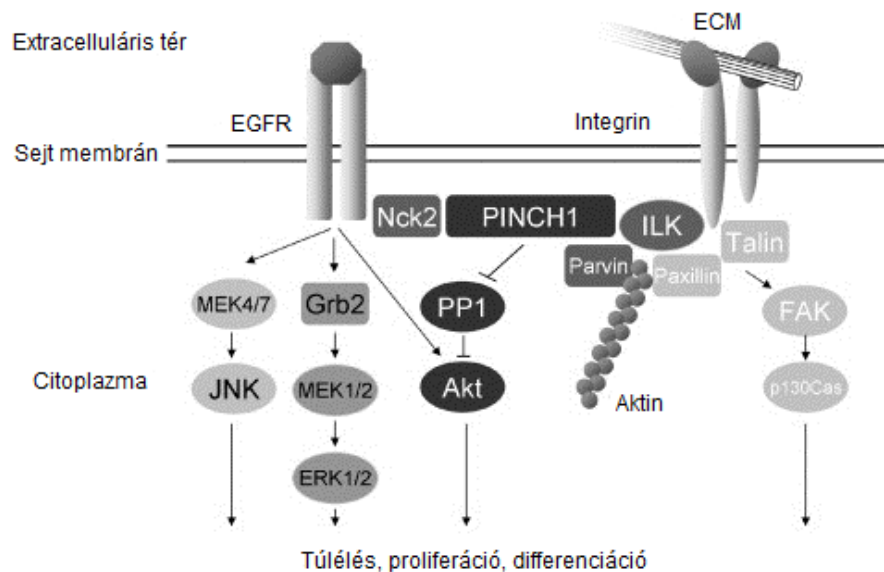
amely vázat képezve segíti a sejtpopuláció elrendeződését és növekedést. De vannak olyan rendszerek, ahol mesterséges mátrix nélkül a sejtek önmagukban egy gömbbé állnak össze, és saját maguk termelik meg az extracelluláris mátrixot. Mindkét esetben a sejt-extracelluláris mátrix és a sejt-sejt kapcsolatok száma megnő a klasszikus 2D elrendezésben növesztett sejt kultúrákhoz képest. Gyakoriak az úgynevezett monokultúrák, ilyenkor a 3D modell kialakításához csak egy fajta sejtípust használnak, de összeállíthatóak több sejtípusból álló kokultúrák is, melyben a tumoros sejteket sztróma sejtekkel, leggyakrabban fibroblasztokkal növesztik együtt, így növelve az *in vivo* rendszerekkel való hasonlóságot [137].

A 3D sejt kultúrában a sejtek valós morfológiájának kialakításában a szorosan szabályozott sejt-extracelluláris mátrix kapcsolatot kialakító fokális adhézis kapcsolatok és a citoszkeletális hálózat játszik szerepet. A gömb alakú sejteken belül magasabb fokú a heterokromatinizáció mértéke, mint a letapadó elnyúlt sejtekben [138]. Az egy rétegben növekvő sejtekhez képest a 3D rendszerben található sejtek gén és protein expressziója, túlélése, proliferációja és differenciációja nagymértékben különbözik. Megfigyelték, hogy a 3D sejt kultúrában tenyésztett sejtek nagyobb rezisztenciát mutatnak a kemoterápiás szerek és az ionizáló sugárzás káros hatásaival szemben. Ennek egyik oka a csökkent hiszton H3 acetiláció és a magas HP1 α expresszió által kiváltott heterokromatinizáció lehet. A kondenzáltabb kromatin szerkezetben az ionizáló sugárzás hatására kialakuló DNS kettős szálú törések száma kevesebb lehet, mint egy eukromatikus régióban [139].

Az emelkedett drog- és radiorezisztencia hátterében feltételezések alapján integrin-mediált folyamatok állnak. A sejtek a felszínükön található integrin receptorokon keresztül kapcsolódnak az extracelluláris mátrixhoz, ami hídként köti össze az ECM-ot a citoszkeleton aktin és intermedier filamentumaival. Az integrinek a fokális adhézis kinázok (FAK) aktiválásán keresztül befolyásolhatják a sejtek viselkedését és ellenállóképességét különféle behatásokkal szemben. A sugárkezelést követően foszforilálódott és aktiválódott FAK aktiválja a szubsztrátjait, a p130Cas és Paxillin fehérjéket, mellyel indirekt módon serkenti a sejtek túlélését proliferációját és differenciációját [140]. Az integrinek emellett a PINCH1 aktiválásával közvetve serkentik az Akt foszforilációját, mely szintén hozzájárul a tumoros sejtek túléléséhez és a proliferációjuk növekedéséhez (**4. ábra**).

Az integrinek aktivációja továbbá az IPP (ILK, PINCH, Parvin) protein komplexen keresztül indirekt módon képes a növekedési faktor receptorok jelátviteli útjait aktiválni

növekedési faktorok jelenléte nélkül is, mely szintén hozzájárul a megnövekedett túléléshez és a tumoros sejtek proliferációjához (4. ábra) [141]. A 3D sejtkultúrák viselkedésükben és a különböző stressz faktorokra, mint például kemoterápiás szerekre és irradiációra adott válaszukban nagyban hasonlítanak az *in vivo* rendszerekben található sejtekhez.



4. ábra Az integrinek által közvetített celluláris folyamatok. A sejt-sejt és sejt-ECM kapcsolatok az integrineken keresztül, befolyásolják a sejtek túlélését, differenciációját és a sejtosztódást [142].

A 3D sejtkultúrák használatából szerzett tudás hozzájárul a sejtműködés komplexebb megértéséhez, továbbá lehetőséget teremt arra, hogy *in vitro* rendszerben vizsgálhassuk az *in vivo* előforduló sejt-sejt kölcsönhatásokat és így *in vivo* rendszerek használata nélkül is tesztelhetünk potenciális tumorellenes anyagokat, így csökkentve a feláldozásra kerülő állatok mennyiségét.

Célkitűzés

Kísérleteink során arra próbáltunk választ kapni, hogy a fém nanorészecskék és a HDAC inhibitorok kombinációjának alkalmazása felerősíti-e ezen kemoterápiás anyagoknak a tumorelles hatását és a tumorterápia hatékonyságát akár más terápiás modalitással együtt alkalmazva.

Az első kísérleti megközelítésünkben az AgNP és a HDAC gátló TSA kombinációja által kifejtett hatásokat hasonlítottuk össze a külön AgNP és a külön TSA önálló kezelések hatásaival. A második kísérleti megközelítés során az önmagában nem toxikus AuNP és a már onkoterápiás használatban lévő HDAC gátló SAHA kombinációjának radioszenzitizáló hatását vizsgáltuk tumoros sejteken.

Az alkalmazni kívánt arany, illetve ezüst nanopartikulumok méretének kiválasztása irodalmi adatok alapján történt. A kisméretű AgNP-k (körülbelül 10 nm-ig) bizonyultak a legtoxikusabbaknak *in vitro* kísérletekben, míg a nagyméretű (75 nm-nél nagyobb) partikulumok biológiai aktivitása jelentősen kisebb a csökkent felület-térfogat arányuknak köszönhetően [143]. Mivel kísérleteinkben az AgNP-t kombinációs partnerként kívántuk alkalmazni, emiatt a kisebb citotoxicitást mutató, közepes méretű, körülbelül 35 nm nagyságú részecskéket választottuk.

A második kísérleti megközelítésünkhöz a körülbelül 10 nm átmérőjű arany nanorészecskéket választottuk, mivel a legnagyobb radioszenzitizáló aktivitást a körülbelül 13 nm átmérőjű gömb alakú AuNP-k esetében írták le *in vitro* és *in vivo* is [144].

Mindkét kísérletsorozatban megvizsgáltuk, hogy

- a tumoros sejtek a fém nanorészecskéket képesek-e felvenni,
- a nanorészecskék a HDAC gátlók hatását befolyásolják-e a kombinációs kezelések során,
- végül pedig hogy a két anyag kombinációja képes-e egymás hatását jelentősen pontencírozni.

Az AgNP és a TSA kombinációs kezelések tumorelles hatásának felderítéséhez célul tűztük ki:

- az AgNP és a TSA citotoxikus hatásának vizsgálatát tumoros sejteken külön-külön és kombinációban alkalmazva
- annak meghatározását, hogy a kombinációs kezelések során a két szer között antagonistá, additív vagy szinergista kölcsönhatás van-e
- hogy megvizsgáljuk a két szer kombinációjának DNS károsító hatása felerősödik-e a külön AgNP vagy TSA kezeléshez képest
- illetve arra kerestük a választ, hogy az AgNP és TSA kezelés képes-e oxidatív stresszt és apoptózist indukálni a tumoros sejtekben.

Az AuNP és a SAHA szinergista radioszenzitizáló hatásának megállapításához célunk volt megvizsgálni, hogy:

- a két szer irradiációt követően antagonistá, additív vagy szinergista tumorellenes kölcsönhatást fejt-e ki
- az AuNP és SAHA külön-külön és kombinációban történő alkalmazása hogyan befolyásolja a tumoros sejtek kolóniaformáló képességét irradiációt követően,
- az AuNP és a SAHA kombinációban felerősíti-e az ionizáló sugárzás DNS károsító hatását.
- ha a két szert külön-külön és kombinációban alkalmazzuk 3D sejt kultúrán, ez hogyan hat a tumoros sejtek kolóniaformáló képességére irradiációt követően,
- az AuNP és SAHA kezelés milyen mértékben növeli az ionizáló sugárzás DNS károsító hatását 3D sejt kultúra modellben.

Anyagok és módszerek

Fém nanorészecskék szintézise és karakterizálása

A kísérleteinkben felhasznált nanorészecskék szintézisét és karakterizálását a Szegedi Tudományegyetem Alkalmazott és Környezeti Kémiai Tanszékén végezte Dr. Rónavári Andrea és Bélteki Péter. Mind az AuNP, mind az AgNP szintéziséhez a Lee és Meisel által leírt kémiai redukciós módszert alkalmazták [145], mellyel a kívánt mérettartományban, kontrollált szintézissel állíthatóak elő gömb alakú fém nanorészecskék.

Az ezüst partikulumok előállítása többlépcsős szintetikus eljárással történt. Az első lépésben 1%-os ezüst nitrát oldat ezüst ionjainak redukálása zajlik 0,1%-os nátrium-borohidriddel, 1%-os nátrium-citrát jelenlétében, mellyel átlagosan 5 nm átmérőjű részecskék szintézise valósul meg. A második redukciós lépésben ezek az 5 nm-es részecskéket, mint szintetikus góccokat alkalmazzák, majd a folyamatot többször ismételve, végül átlagosan körülbelül 35 nm nagyságú, citráttal stabilizált, egységes negatív felületi töltéssel rendelkező AgNP-t tartalmazó kolloid oldatot kaptak.

Az AuNP szintézisekor hidrogén-tetrakloro-aurát oldatot használtak, és a redukciót szintén 0,1%-os nátrium-borohidrid és 1%-os nátrium-citrát jelenlétében valósították meg. A kapott 5 nm körüli partikulumokat egy további lépésben, azonos oldatok felhasználása mellett növesztették, mely során egy átlagosan 10 nm-es nagyságú arany nanorészecskéket tartalmazó kolloid oldatot nyertek.

Az előállított fém nanorészecskék morfológiáját és méreteloszlását transzmissziós elektronmikroszkópos felvételek alapján (TEM) (FEI Tecnai G² 20 X, FEI Corporate Headquarters, Hillsboro, OR, USA) határozták meg. A nanorészecskék átlagos méretének meghatározása és a partikulumok felületi töltésének mérése Zetasizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, UK) eszközzel történt. A szintetizált arany és ezüst nanorészecskék optikai jellemzőit, illetve az aranyra és az ezüstre jellemző abszorpciós spektrumokat UV-Vis spektrofotométerrel határozták meg (Ocean Optics 355 DH-2000-BAL UV-Vis spektrofotométer, Halma PRC, Largo, FL, USA).

A transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján az AgNP-k körülbelül 35 nm (1. függelék ábra (a), 1. táblázat), az AuNP-k nagyjából 10 nm átmérőjűek voltak

(**1. függelék ábra (c), 1. táblázat**), melyet mindkét részecske esetében dinamikus fényszórás (DLS) mérésekkel is bizonyítottak. A DLS eredmények azt mutatták, hogy a kolloid oldatban az AgNP részecskék legnagyobb számban a 30 és 40 nm-es mérettartományba estek, míg az AuNP-k átlagosan kb. 10 nm nagyságúnak bizonyultak (**1. függelék ábra (b,d)**). Az AgNP kolloid UV/látható fény spektrumában 400 nm-nél mutatott elnyelési maximumot, az AuNP esetében az abszorbancia maximuma 520 nm-nél volt tapasztalható. Ezek az abszorpciós maximumok karakterisztikusak az ezüst, illetve az arany nanorészecskékre (felületi plazmon rezonancia) (**1. táblázat, 2. függelék ábra**).

Mindkét kolloid oldat előállításakor nátrium-citrátot alkalmaztak redukáló és stabilizáló szerként, mely egységes negatív citrát burkot eredményezett a részecskék felszínén. Ennek köszönhetően a partikulumok a vizes oldatban erősen negatív felületi töltéssel rendelkeznek, a zeta potenciál mérés alapján ez az AgNP esetében -43,56 mV, az AuNP esetében -36,3 mV, mely értékek a kolloid oldatok stabilitását bizonyítják (**1. táblázat**).

Paraméterek	AgNP	AuNP
Méreteloszlás (nm)	34,73 ± 8,69	9,96 ± 2,14
Zeta potenciál (mV)	- 43,56	- 36,2
Elnyelési maximum (nm)	400	520

1. táblázat A fém nanorészecskék karakterizálása. Az előállított fém nanorészecskék méretének eloszlása TEM felvételek alapján, felületi töltésük zeta potenciál méréssel, a kolloid oldatok elnyelési maximumai az UV-Vis abszorpciós spektrumuk alapján lett meghatározva.

A nanorészecske szintézis során negatív felületi töltéssel rendelkező, stabil, citrát-burkolt AgNP és AuNP nanorészecskéket tartalmazó kolloid oldatokat állítottak elő.

Humán sejtkultúra

A kísérleteinkben HeLa humán cervikális karcinóma, U2Os humán oszteoszarkóma, 4T1 egér emlőkarcinóma, NIH-3T3 egér fibroblaszt, A549 humán tüdő adenokarcinóma, DU-145 és PC-3 humán prosztatárakos sejtvonalakat és MCF-7 humán emlő adenokarcinóma sejtvonalakat használtunk, melyeket az ATCC-től vásárolt a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék. A HeLa, U2Os és NIH-3T3 sejteket 1 g/l glükóz tartalmú DMEM médiumban (Biosera) növesztettük, amit a HeLa sejtek esetében 5%, míg a többi sejtvonal esetén 10% borjúsérummal (FBS, EuroClone), valamint minden esetben 2 mM L-glutaminnal

(Gibco), 0,01% sztreptomicinnel és 0,006% penicillinnel (Biosera) egészítettük ki. A 4T1, A549, DU-145, PC-3 és MCF-7 sejteket RPMI médiumban (Biosera) tartottuk fent, melyet 10% FBS-sel, 2 mM L-glutaminnal, 0,01% sztreptomicinnel és 0,006% penicillinnel komplementáltunk. A sejteket 37 °C-os inkubátorban 5% CO₂ és 95% páratartalom mellett tartottuk fent.

A 3D szferoidok összeállítását a Szegedi Biológiai Kutatóközpontban Dr. Vizler Csaba, Buhala Andrea és Dr. Marton Annamária végezte a Dr. Balogi Zsolt által optimalizált protokoll szerint. A 3D sejtkultúrák kialakításához és fenntartásához használt anyagokat 0,22 µm pórusméretű szűrőn (Merck) szűrték át. A szferoid képzéshez U-aljú 96-lyukú mikrotiter lemezt használtak, melyet előzőleg kétszer 15-15 µl 6 mg/ml koncentrációjú poli(2-hidroxietil-metakriláttal) (poli-HEMA, Sigma-Aldrich) vontak be. Az A549, DU-145, PC-3 és MCF-7 sejtekből 10000-10000 db sejtet osztottak ki a poli-HEMA-val bevont 96-lyukú lemez egyes zsebeibe, majd centrifugálták a lemezeket 280 g-n 5 percig, és 7 napig inkubálták 37 °C-on 5% CO₂ és 95% páratartalmat biztosító inkubátorban.

A minták irradációja

A sejtek irradációját az SZTE ÁOK Onkoterápiás Klinikán végeztük Prof. Dr. Hideghéty Katalin és Dr. Varga Zoltán segítségével. A besugárzást 6 MeV energiájú fotonnal hajtottuk végre, melyet egy lineáris gyorsító állított elő (Primus lineáris gyorsító, Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Németország). Az irradációt minden esetben 100 cm-es forrás-izocentrum távolság mellett végeztük a sejtkultúrákon, ahol sejteket tartalmazó mikrotiter lemezek 2 db 2 cm vastagságú polimetil-metakrilát lemez közé voltak helyezve, annak érdekében, hogy biztosítsuk az irradáció homogenitását. Minden mintánál az izocenter a lemezek középpontjához lett igazítva. A minták egyenletes kitettsége érdekében két irányból történt az irradáció. A tervezett dózis egyik felével kezeltük a mintákat felülről (0°), majd a sugárforrás 180°-kal történő elforgatása után a tervezett dózis másik felével alulról is besugarastuk a lemezeket. A kísérleteinkhez használt 2 Gy sugárdózis eléréséhez 1 percig tettük ki a mintákat 6 MeV energiájú fotonnal történő sugárzásnak, míg a 4 Gy sugárdózist 2 perces 6 MeV energiájú besugárzással értük el.

Elektronmikroszkópia

Az AgNP és az AuNP humán sejtekbe történő bejutását elektronmikroszkóppal vizsgáltuk. Ehhez a sejteket 0,4 μm pórusméretű membránra (Thermo Fisher Scientific) növesztettük, majd 24 óra inkubáció után a sejteket ezüst vagy arany nanorészecskékkel kezeltük. 24 órás kezelés után a nanorészecskét tartalmazó médiumot a sejtekről eltávolítottuk, a sejteket PBS-sel mostuk, majd 4%-os glutáraldehiddel fixáltuk. A minták előkészítését és az elektronmikroszkópos vizsgálatokat az SZTE ÁOK Patológiai Intézetében Dr. Rázga Zsolt és Németh Erika végezték. A mintákat először zselatinba ágyazták, majd ezekből 1-2 mm-es kockákat vágtak, amit aztán epoxigyantába (Embed 812, EMS, PA 19440) ágyaztak. A sejtréteg azonosításához 1 μm -es metszeteket készítettek, majd abból további 70 nm vékonyságú szeleteket vágtak, amit uranil- és ólom-acetát oldatokkal festettek. A mintákat Jeol JEM-1400 elektronmikroszkóppal (Jeol Ltd., Tokió, Japán) vizsgálták, 100 kV gyorsító feszültséget alkalmazva.

Citotoxicitás vizsgálatok

Az AgNP és TSA (Sigma-Aldrich) citotoxikus, és az AuNP és SAHA radioszenzitizáló hatását a tumoros sejteken MTT módszeren alapuló toxicitás vizsgálattal detektáltuk. A vizsgálathoz 10000 db HeLa sejtet osztottunk ki 96-lyukú mikrotiter lemezbe, majd 24 óra után kezeltük 0; 2; 4; 6 vagy 8 μM AgNP-vel, 0; 15; 30; 45 vagy 60 nM TSA-val vagy a kettő kombinációjával 1:7,5 állandó arányt tartva, 72 órán keresztül. Az inkubációs idő letelte után a sejteket mostuk PBS-sel, majd 0,5 mg/ml MTT (Sigma-Aldrich) reagenst mértünk a mintákra és ezzel inkubáltuk 1 órán át. A tetrazóliumból az élő sejtek által átalakított kristályos formazánt dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk vissza, majd a minták fényelnyelését 570 nm-en mértük mikrotiter lemez olvasóval (Synergy HTX, Biotek, Winooski, Vermont, USA). A kombinációs kezelések után a két szer közötti additív, szinergista vagy antagonisták kölcsönhatás meghatározása a kombinációs indexek kiszámolásával (CompuSyn Szoftver 1,0 Verzió, Ting-Chao Chou és Nick Martin) történt. A feltüntetett kombinációs index (CI) kiszámítása az effektív dózis (ED) 50, ED75, ED90 és ED95 értékeknél kapott kombinációs indexek átlagából történt.

Az AgNP és TSA kombinációs kezelések CI értékeit meghatároztuk MCF-7, U2Os, 4T1 és NIH-3T3 sejteken is. A sejtvonalakból 10000-10000 db sejtet osztottunk 96-lyukú lemezekbe, majd kezeltük 1,27; 5,08; 12,7; 24,5 μ M AgNP-vel, 23; 92; 230 és 443 nM TSA-val és a kettő kombinációjával 1:18,11 állandó arányt tartva. Az MTT esszét és a CI számítást 24 órás kezelést követően végeztük.

Az AuNP és SAHA (MedChemExpress) együttes kezelés radioszenzitizáló hatásának szinergista, additív vagy antagonistá együtműködését szintén MTT esszével határoztuk meg. Ehhez 5000 db A549, DU-145, PC-3 és MCF-7 sejtet osztottunk ki a 96-lyukú mikrotiter lemez egyes lyukaiba, majd hagytuk letapadni. A következő napon kezeltük a sejteket 6,8; 34 és 68 μ M AuNP-vel, 0,1; 0,5 és 1 μ M SAHA-val, vagy a két szer együttesével, majd 24 órát követően 0 és 2 Gy sugárdózissal irradiáltuk. A mintákon az AuNP és SAHA kezelés megkezdésétől számított 72 óra múlva MTT esszét végeztünk, majd a kapott értékekből a fent leírtak alapján meghatároztuk a CI értékeket.

A két szer közötti kölcsönhatás jellegét egy korábban közölt tanulmány alapján állapítottuk meg: ha a CI érték 1 alatti szám, az szinergista együtműködést jelent, ha egyenlő 1-gyel, az additív kölcsönhatást bizonyít, míg ha a CI érték nagyobb, mint 1 azt antagonistá kölcsönhatásnak tekintettük [146].

Scratch esszé

A HeLa sejtek migrációs aktivitását scratch esszével vizsgáltuk. Ehhez $3 \cdot 10^5$ db HeLa sejtet osztottunk ki 6-lyukú lemezbe. Miután a sejtek egy sejtrétegben konfluensre nőttek a tenyésztő lemez alját, egy P100-as pipettahegy segítségével sebést húztunk a konfluens sejtrétegbe függőleges és vízszintes irányban, így egy keresztet formálva. Ezután a tenyésztő médiumot lecseréltük és kezeltük a mintákat 6 μ M AgNP-vel, vagy 45 nM TSA-val vagy a kettő kombinációjával. Majd 0, 24, 48 és 72 órával a sebés után fényképeket készítettünk az egyes mintákról a kereszt fölött, a keresztben és a kereszt alatt, így biztosítva azt, hogy az összes időpontban az egyes mintákról megközelítőleg ugyanabban a pozícióban készüljön felvétel (Motic AE21, Nikon Eclipse 80i, Minato, Tokió, Japán). A képek alapján ImageJ szoftverrel lemértük a sebés területeit, és az adott kezelési időtartam leteltekor mért területeket a 0. időpontban lemert sebés területére normalizáltuk az alábbi képlet alapján: $(\text{terület}_{0h} - \text{terület}_{\text{kezelési idő}}) * 100 / \text{terület}_{0h}$.

DCFDA festés

Az AgNP és a TSA kezelés hatására keletkező reaktív oxigén szabadgyökök mennyiségét DCFDA festéssel detektáltuk. Ehhez $3 \cdot 10^5$ db sejtet osztottunk 6-lyukú lemezbe, amit másnap $6 \mu\text{M}$ AgNP-vel, 45 nM TSA-val, vagy a kettő kombinációjával kezeltünk 24 órán keresztül. Majd a kezelést eltávolítottuk a mintákról, PBS-sel mostuk őket és $10 \mu\text{M}$ DCFDA festéket (Sigma-Aldrich) mértünk a mintákra, mellyel 1 órán át inkubálódtak. A mintákat végül OLYMPUS BX51 (Olympus, Sindzsuku, Tokió, Japán) fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk, a felvételeket Olympus DP70 (Olympus, Sindzsuku, Tokió, Japán) kamerával készítettük. Az intracelluláris fluoreszcencia intenzitást ImageJ szoftver segítségével határoztuk meg.

Immuncitokémia

Az immunfestéshez a sejteket kör alakú, 13 mm átmérőjű üveg fedőlemezre (VWR) növesztettük, melyet előzetesen 24-lyukú lemezbe helyeztünk. Minden sejtvonal esetében $1 \cdot 10^5$ db sejtet osztottunk ki a 24-lyukú lemez egyes zsebeibe. Annak bizonyítására, hogy a fém nanorészecskék nem befolyásolják a HDAC inhibitorok hatását a kombinációs kezelések során, acetilált-lizin (ac-Lys) immunfestést végeztük. A HeLa sejteket a kiosztás után 24 órával megkezeltük $6 \mu\text{M}$ AgNP-vel, 45 nM TSA-val vagy a kettő kombinációjával, illetve a másik esetben az A549 sejteket $6,8 \mu\text{M}$ AuNP-vel, $0,1 \mu\text{M}$ SAHA-val vagy a két szer együttesével. A kezelő anyagokat tartalmazó médiumot 24 órás inkubáció után eltávolítottuk, majd a mintákat 4% formaldehidben (Sigma-Aldrich) fixáltuk. A sejteket 0,3% Triton-X-100 oldattal (Sigma-Aldrich) permeabilizáltuk, majd 5% borjú szérum albuminnal (BSA) (Sigma-Aldrich) blokkoltuk. Ezt követően a mintákon az elsődleges anti-ac-Lys ellenanyagot (Abcam) 1% BSA-ban 1:200 hígításban használtuk, amit a DyLight 549 fluorofórral konjugáltatott másodlagos antitesttel (Abcam) történő inkubáció követett (1:400). A citoplazma jelöléséhez anti-tubulin elsődleges ellenanyagot alkalmaztunk (1:600), majd Alexa 488 fluorofór konjugáltatott másodlagos antitestet (Invitrogen) használtunk, melyet 1% BSA-ban hígítottunk (1:1200). A sejtmagokat 300 nM DAPI (Thermo Fisher Scientific) vagy $3,25 \mu\text{M}$ Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) fluoreszcens festékekkel jelöltük. A mintákat OLYMPUS BX51 (Olympus, Sindzsuku, Tokió, Japán) mikroszkópon vizsgáltuk és a képeket Olympus DP70 kamerával (Olympus, Sindzsuku, Tokió, Japán) készítettük. Emellett az acetilált lizin mennyiségi elemzéséhez az

AuNP és SAHA kombinációjának tesztelésekor 96-lyukú mikrotiter lemezbe osztottunk A549 sejteket ($1 \cdot 10^4$ db sejt/lyuk), melyeket megfestettünk anti-ac-Lys ellenanyaggal a fent leírtak szerint. A fluoreszcencia intenzitást Synergy HTX mikrotiter lemez olvasóban (Biotek, Winooski, Vermont, USA) mértük le (Excitáció: 485/20; Emisszió: 528/20).

A DNS károsodás mértékét γ H2AX immunfestéssel vizsgáltuk. Az AgNP és a TSA kezelés DNS károsító hatásának vizsgálatához a HeLa sejteket $6 \mu\text{M}$ AgNP-vel, 45 nM TSA-val vagy a kettő kombinációjával kezeltük 24 órán keresztül. Annak vizsgálatára, hogy az AuNP és SAHA kezelés az ionizáló sugárzás DNS károsító hatását hogyan befolyásolja, az A549, DU-145, PC-3 és MCF-7 sejteket $6,8 \mu\text{M}$ AuNP-vel, $0,1 \mu\text{M}$ SAHA-val vagy $6,8 \mu\text{M}$ AuNP-vel és $0,1 \mu\text{M}$ SAHA-val kezeltük 24 órán keresztül, majd 0 és 2 Gy sugárdózissal irradiáltuk. A mintákat a besugárzást követően 1 órával 4% -os formaldehidben fixáltuk. A mintákat az immunreakciókhoz minden esetben a következő módon készítettük elő. A γ H2AX elsődleges antitestet (Thermo Fisher Scientific) $1:300$ hígításban használtuk, amit az Alexa 488 fluorofór konjugáltatott másodlagos ellenanyag (Invitrogen) követett, melyet 1% BSA-ban $1:600$ arányban hígítottunk. A sejtmagokat 300 nM DAPI (Thermo Fisher Scientific) vagy $3,25 \mu\text{M}$ koncentrációjú Hoechst 33342 festékkel (Sigma-Aldrich) jelöltük, majd a mintákat Olympus FV10i konfokális mikroszkóppal (Olympus, Sindzsuku, Tokió, Japán) vizsgáltuk. A mintákról készített képek alapján meghatároztuk a γ H2AX pozitív sejtek arányát, illetve a γ H2AX-szel festődő sejteken belül sejtmagonként megszámoltuk a γ H2AX fókuszok számát.

Az AgNP és a TSA kezelés apoptózist indukáló hatását kaszpáz-3 festéssel vizsgáltuk. Ehhez a HeLa sejteket $6 \mu\text{M}$ AgNP-vel, 45 nM TSA-val vagy a kettő kombinációjával kezeltük 24 órán keresztül, majd a mintákat az előzőekben leírt módon készítettük elő az immunfestéshez. A hasított kaszpáz-3 ellenes elsődleges ellenanyagot (Cell Signaling) $1:600$ -ban, majd a Dylight 549 fluorofór konjugáltatott másodlagos antitestet $1:1200$ -ban alkalmaztuk, melyek 1% BSA-ban voltak hígítva.

Immunhisztokémia

A 3D sejtkultúrákon az AuNP és a SAHA DNS károsító hatását a DNS-ben keletkező kettős szálú törések detektálásával határoztuk meg. A szferoidokat $34 \mu\text{M}$ AuNP-vel, $1 \mu\text{M}$ SAHA-val, vagy a kettő együttesével kezeltük 24 órán keresztül, majd irradiáltuk 0 , 2 és 4 Gy dózissal. A mintákat a besugárzást követően 1 órával lefixáltuk 4% formaldehidben és

beágyasztuk 3%-os agarózba. A minták immunhisztokémiai festését az SZTE ÁOK Patológiai Intézetében Prof. Dr. Tiszlavicz László és Daru Krisztián végezték. Az agaróz kockákat paraffinba ágyaszták, amiből 5 mm vastagságú szeleteket vágtak, majd a mintákat ezután deparaffinizálták. A hővel történő antigén feltárást követően a DNS kettős töréseket anti- γ H2AX elsődleges ellenanyaggal, majd tormaperoxidázzal konjugált másodlagos ellenanyaggal vizualizálták. A mintákat OLYMPUS BX51 mikroszkóppal vizsgáltuk, majd Olympus DP70 kamera (Olympus, Sindzsuku, Tokió, Japán) segítségével készítettünk képeket, és a felvételek alapján meghatároztuk a γ H2AX pozitív sejtek arányát a mintákban.

Western blot

A HDAC gátló TSA hatására bekövetkező reverzibilis kromatin módosításokat a HeLa sejtekben Western blottal vizsgáltuk, miután a szert egymagában, vagy AgNP kezeléssel kombinációban alkalmaztuk. A kísérletekhez $6 \cdot 10^5$ db HeLa sejtet osztottunk 6 cm átmérőjű petricsészébe, amit másnap kezeltünk $6 \mu\text{M}$ AgNP-vel, 45 nM TSA-val vagy a kettő kombinációjával. 24 órás inkubációt követően a hatóanyagokat tartalmazó tápfolyadékot eltávolítottuk a mintákról, mostuk PBS-sel, majd a sejteket összegyűjtöttük sejtkaparó segítségével. Ezt követően a sejteket 2000 rpm -en történő 5 perces centrifugálás után $50\text{--}50 \mu\text{l}$ lízis pufferben vettük fel (50 mM Trisz-(hidroximetil)-amino-metán, 2 mM EDTA, 50 mM NaCl, $0,5 \text{ mM}$ DTT, $0,5 \text{ mM}$ PMSF). Ezt követően mechanikai sejtfeltárást alkalmaztunk folyékony nitrogénben fagyasztva és felolvasztva a mintákat egymás után 5 alkalommal. A mintákat centrifugáltuk 13000 rpm -en 10 percig, majd a felülúszót, ami tartalmazza a fehérjéket átmértük új Eppendorf csőbe. A minták fehérje koncentrációját Bradford reagenssel (Bio-Rad) határoztuk meg a gyártó utasításai alapján. A mintákból $15\text{--}15 \mu\text{g}$ fehérjét kevertünk be fehérje loading pufferrel (60 mM Tris pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% β -merkaptoetanol, $0,002\%$ brómfenolkék), majd a mintákat 15% -os SDS-poliakrilamid gélen futtattuk meg. A fehérjéket a gélen történő szétválasztás után átblottoltuk nitrocellulóz membránra (Amersham), amit $0,005\%$ Tween-20 (Molar Chemicals) tartalmú TBS-ben oldott 5% -os sovány tejben blokkoltunk. A hiszton fehérjék bizonyos aminosav oldalláncain bekövetkezett acetilációjának mértékét 1% tejpor oldatban hígított acetilált H4K5 (Abcam, 1:4000 hígításban), acetilált H4K8 (Abcam, 1:3000 hígításban) és acetilált H3K23 (Abcam 1:3000 hígításban) elsődleges antitestek alkalmazásával detektáltuk. A membránokat egy éjszakán át az elsődleges ellenanyagok oldatában, majd ezt követően tormaperoxidázzal konjugált másodlagos antitesttel

(Dako, 1:4000 hígításban) inkubáltuk. Emellett vizsgáltuk a H3K9 trimetilációjának (Abcam 1:500 hígításban) megjelenését is, melynek nagy szerepe van a heterokromatin kialakításában [147,148]. Ehhez szintén tormaperoxidáz konjugált másodlagos antitestet (Dako) használtunk 1:1000 hígításban. Ahhoz, hogy bizonyítsuk, hogy minden mintából egyenlő mennyiségű fehérjét vittünk fel a géltre, a H3 és az α -aktin háztartási fehérjék mennyiségét detektáltuk. Az anti-H3 elsődleges ellenanyagot (Abcam) 1:2500-ban, az anti- α -aktin (Sigma) elsődleges antitestet 1:5000-ben használtuk, melyet tormaperoxidáz konjugált másodlagos antitesttel történő inkubálás követett 1:5000 és 1:10000-es hígításban. Az immunreakciók után a membránokra ECL reagenst (Immobilon) rétegeztünk a gyártó által megadott utasítások alapján, és a keletkezett kemilumineszcens jelet C-DIGIT Blot Scanner (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA) segítségével detektáltuk.

Tumoros sejtek kolóniaképző képességének vizsgálata

Az AuNP és a SAHA tumoros sejtekre kifejtett radioszenzitizáló hatását a sejtek kolóniaformáló képességének változásával detektáltuk. Ehhez $6 \cdot 10^5$ db sejtet osztottunk ki T25 sejtenyésző flakóba, amit 24 óra elteltével 6,8 μM AuNP-vel, 0,1 μM SAHA-val, vagy a kettő kombinációjával kezeltünk. 24 órás inkubációt követően a kultúrákat irradiáltuk 0, 2 vagy 4 Gy sugárdózissal. A következő napon tripszin kezelést követően Bürker kamrában megszámoltuk a sejteket, majd minden mintából 700-700 db sejtet osztottunk ki a 6-lyukú lemezek egyes lyukaiba 3-3 technikai párhuzamosban, amelyeket 2-2 ml 10% FBS tartalmú médiummal fedtünk. A kolóniákat 1 hétig hagytuk nőni, majd metanol-aceton elegyében (7:3) fixáltuk őket. A fixálást követően a kolóniákat megfestettük 25%-os metanolban oldott kristályibolyával. Végül a kolóniákat megszámoltuk és az adatokat a 0 Gy kezeletlen mintára normalizáltuk.

A 3D sejt kultúrák esetén a szferoidokat, a 3D sejt kultúrák kialakítása után 1 héttel 34 μM AuNP-vel, 1 μM SAHA-val vagy a két szer kombinációjával kezeltük. 24 órás kezelést követően a kultúrákat 0, 2 és 4 Gy sugárdózissal kezeltük ki, majd újabb 24 óra inkubáció után a szferoidokat Accumax (Invitrogen) segítségével 1-sejtes szuszpenzióvá szedtük szét. Ehhez a médiumot maradéktalanul eltávolítottuk a szferoidokról és 50-50 μl Accumax rámerése után 10 percig inkubáltuk őket 37 °C-on. A sejteket addig szuszpendáltuk, amíg 1-sejtes szuszpenziót nem kaptunk, amit mikroszkóp alatt ellenőriztünk. A sejtszámot Bürker kamrában

állapítottuk meg, majd minden egyes kezelésnek kitett mintából 700 db sejtet osztottunk ki 6-lyukú lemezre, amit 2 ml 10% FBS tartalmú médiummal fedtünk. A kolóniákat 1 hétig növesztettük, majd metanol-aceton 7:3 elegyében fixáltuk és 25%-os metanolban oldott kristályibolya oldattal festettük, majd a kolóniák számolása után az adatokat a 0 Gy kezeletlen kontrollra normalizáltuk.

Statisztikai analízis

A statisztikai analízis minden esetben GraphPad Prism 6 szoftverrel történt. Egyszempontos ANOVA (variancia analízis) Dunnett-féle összehasonlítást végeztünk az acetilált-lizin immunfestés eredményeként kapott adatokon, mely során a kezelt minták értékeit hasonlítottuk a kezeletlen mintához. A DCFDA festés eredményeinek kiértékelésekor, a kaszpáz-3 festésből származó adatok analízisekor, a γ H2AX pozitív sejtek arányában és a γ H2AX fókuszok számában megfigyelt különbségek analízisekor egyszempontos ANOVA Tukey-féle többszörös összehasonlítást alkalmaztunk, mely során az összes mintát összevetettük mindegyik minta értékével. Kétszempontos Sidak-féle többszörös összehasonlítást alkalmaztunk a western blot adatok analízisekor és kétszempontos ANOVA Tukey-féle többszörös összehasonlítás történt a viabilitás vizsgálatok eredményein, a scratch assay eredményeinek analízisekor, és a kolóniaképző képesség vizsgálatok kiértékelésekor.

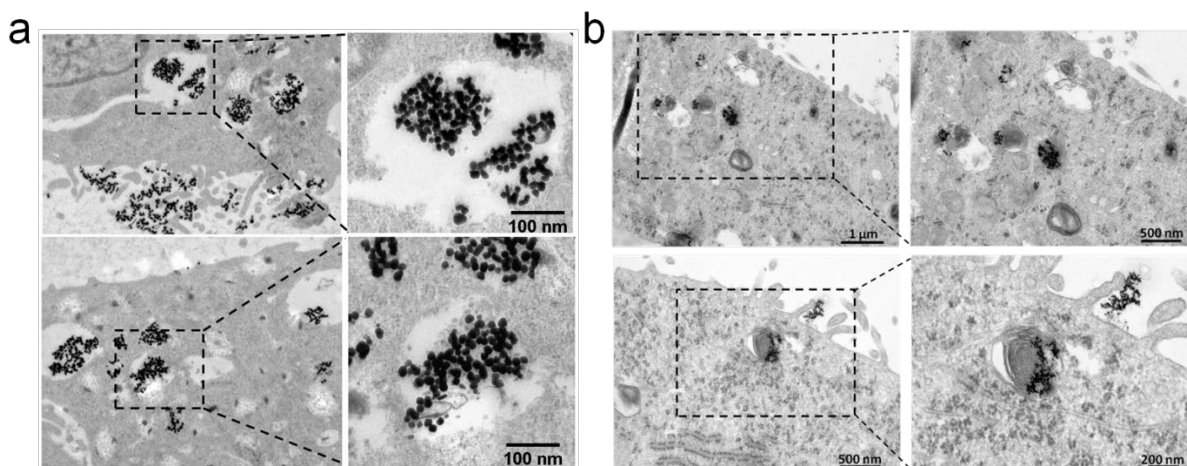
Eredmények

Az AgNP és AuNP képesek bejutni a tumoros sejtekbe és akumulálódni a citoplazmában

Annak bizonyítására, hogy a nanorészecskéket a tumoros sejtek felveszik, TEM felvételeket készítettünk HeLa sejtekről az AgNP kezelést követően, és az A549 sejtekről az AuNP-vel történő kezelés után (**5. ábra**).

AgNP aggregátumokat figyeltünk meg nagy számban a HeLa sejtek felszínén és azok citoplazmájában. A sejtek felszínén filopódiumokkal körbezárt részecskéket detektáltunk, míg intracellulárisan a partikulumok multilamelláris testecskékben helyezkedtek el, mely az endoszómális módon megvalósuló nanopartikulum felvétel egyik bizonyítéka lehet (**5. ábra (a)**).

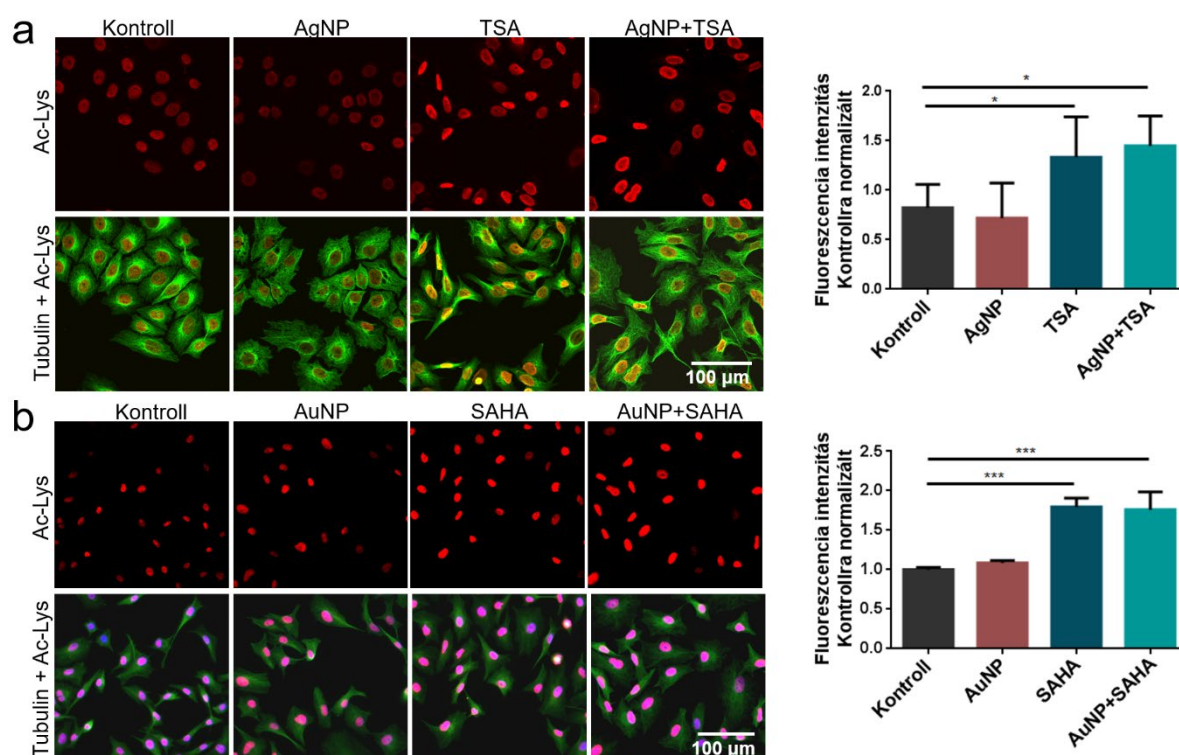
Az AgNP kezelt HeLa sejtekhez hasonlóan az A549 sejtek is képesek voltak a nanorészecskék, jelen esetben az AuNP-k felvételére. A TEM felvételeken jól látszódnak az AuNP nanorészecskék a sejtek felszínén és a citoplazmában. Az A549 sejtek felszínén filopódiumokkal asszociált AuNP aggregátumokat detektáltunk, míg a sejtek citoplazmájában a partikulumok multivezikuláris testecskékben helyezkedtek el (**5. ábra (b)**). Sem az AgNP kezelt HeLa sejtek, sem az AuNP kezelt A549 sejtek esetében nem detektáltunk nanorészecskét a sejtmagban.



5. ábra A fém nanorészecskék bejutnak a tumoros sejtek citoplazmájába. (a) A HeLa sejtek felszínén és a citoplazmában nagy számban figyeltünk meg AgNP aggregátumokat. (b) A TEM képek alapján megállapítható, hogy az A549 tumoros sejtek képesek voltak felvenni az AuNP részecskéket.

A fém nanorészecskék nem befolyásolják a HDAC gátlók hatását a kombinációs kezelések során

Az acetilált lizin mennyiségének kimutatásával az AgNP és TSA kombinációs kezelések, illetve az AuNP és SAHA kettős kezelések során alkalmazott két HDAC gátló hatását vizsgáltuk külön-külön és a fém nanorészecskék jelenlétében is. Mind a TSA kezelés a HeLa sejtekben (6. ábra (a)), mind pedig a SAHA kezelés az A549 sejtekben (6. ábra (b)) megnövelte az acetilált lizin mennyiségét a kontrollhoz és az AgNP vagy AuNP kezelt sejtekben tapasztaltnál képest.



6. ábra A fém nanorészecskék nem befolyásolják a HDAC gátlók hatását a tumoros sejtekben (a) Az AgNP jelenléte nem befolyásolta a HDAC inhibitor TSA által megnövekedett lizin acetiláció mértékét a HeLa sejtekben. Egyszempontos ANOVA Dunnett többszörös összehasonlítás, *P érték < 0,05; Méretarány: 100 μ m. **(b)** A SAHA kezelés és az AuNP és SAHA kombinációjának hatására szignifikánsan megnőtt az acetilált lizin mennyisége a sejtmagban. Egyszempontos ANOVA Dunnett többszörös összehasonlítás, ***P érték < 0,0005. Méretarány: 100 μ m.

Önmagukban az AgNP és AuNP kezelések nem befolyásolták az ac-Lys fluoreszcencia intenzitást a tumoros sejtekben, tehát a nanopartikulumok nem növelik vagy csökkentik a fehérjék lizin aminosav oldalláncainak acetilációját, illetve jelenlétük az immunfestés

hatékonyságát nem zavarja. A nanorészecske+HDAC inhibitor kezelések miatt jelenlévő fém nanorészecskék nem csökkentették a HDAC gátlók által megnövelt ac-Lys mennyiségét sem. Mindkét esetben szignifikánsan magasabb fluoreszcencia intenzitást mértünk a kontrollhoz, illetve a nanorészecskékkel kezelt mintákhoz képest a HDAC gátlókkal, valamint a fém nanorészecskék és HDAC inhibitorok kombinációjával történő kezelést követően (**6. ábra (a,b)**).

Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy a HDAC inhibitorok képesek gátolni a fehérjék lizin oldalláncainak deacetilációját végző enzimek működését fém nanorészecskék jelenlétében is.

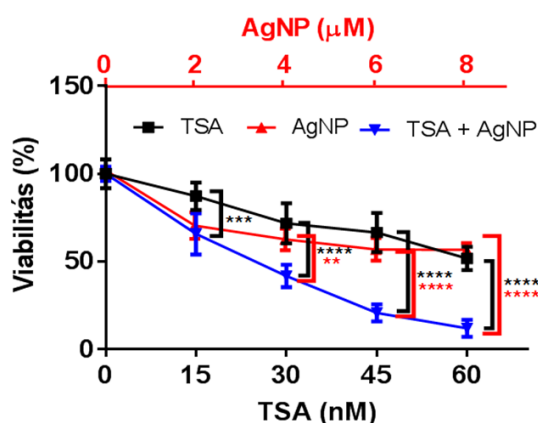
Az AgNP és a HDAC gátló TSA szinergista módon csökkentik a tumoros sejtek viabilitását

Az AgNP és a TSA kezelés hatását a HeLa sejtek viabilitására MTT módszerrel vizsgáltuk. A nanorészecske és a HDAC gátló együttes alkalmazásának hatására szignifikánsan csökkent a HeLa sejtek viabilitása a kontrollhoz és a csak AgNP vagy a csak TSA kezelt sejtekéhez képest, mind a 4 μM AgNP + 30 nM TSA, a 6 μM AgNP + 45 nM TSA és a 8 μM AgNP + 60 nM TSA kombinációk alkalmazásakor is, 72 órás kezelést követően (**7. ábra (a)**). A kapott eredményekből meghatároztuk az AgNP és a TSA kezeléshez tartozó IC_{50} értékeket, amelyek azt a koncentrációt adják meg, ahol a sejtek 50%-a elpusztul. Az AgNP esetében ez 8,15 μM , míg a TSA esetében 63,91 nM volt 72 órás kezelést követően (**7. ábra (b)**).

A további kísérleteinkben 6 μM AgNP és 45 nM TSA koncentrációt és 24 órás expozíciót alkalmaztunk minden esetben. Ebben a koncentrációban és kezelési időtartamban a két szer nem toxikus a HeLa sejtekre.

Annak megállapítására, hogy az AgNP és a TSA kombinációban történő alkalmazásakor megfigyelt erőteljesebb tumorelles hatás hátterében additív vagy szinergista kölcsönhatás áll-e CompuSyn szoftver segítségével meghatároztuk a kombinációs index értékeket. Ha a CI 1 alatti érték, az szinergista, ha egyenlő 1-gyel, az additív, ha pedig 1 feletti, az antagonistá kölcsönhatást feltételez a két anyag együttes hatását tekintve. Az AgNP és a TSA együttes alkalmazásakor kapott ED50, ED75, ED90 és ED95 értékekre számolt CI értékek átlaga 0,33 volt HeLa sejteken, mely az AgNP és a TSA erős szinergista hatására utal (**7. ábra (b)**).

a



b

	AgNP IC ₅₀ (μM)	TSA IC ₅₀ (nM)	Kombinációs index (AgNP+TSA)
HeLa	8,15	63,91	0,33

7. ábra Az AgNP és TSA szignifikánsan csökkenti a HeLa sejtek viabilitását (a) A HeLa sejtek viabilitása szignifikánsan csökken a 4 μM AgNP + 30 nM TSA; 6 μM AgNP + 45 nM TSA és a 8 μM AgNP + 60 nM TSA kettős kezelés hatására, az AgNP és a TSA külön-külön történő alkalmazásához viszonyítva, 72 órás kezelést követően. Kétszemponos ANOVA Tukey-féle többszörös összehasonlítás, **P érték < 0,01; ***P érték < 0,001; ****P érték < 0,0001 **(b)** 72 órás toxicitás vizsgálat alapján számolt IC₅₀ értékek és a CI érték az AgNP és TSA szinergista kölcsönhatását bizonyítja.

	Kombinációs index (AgNP+TSA)
U2OS	0,51
MCF-7	0,83
4T1	0,81
NIH-3T3	1,79

2. táblázat Az AgNP és TSA együttes adminisztrációja szinergista kölcsönhatást mutat a tumoros sejteken. A tesztelt tumoros sejtvonalakon a kombinációs kezelésekből számolt CI értékek 1-nél kisebbek voltak, mely a két szer szinergista kölcsönhatását bizonyítja. Az egér eredetű fibroblaszt sejtvonal esetében (NIH-3T3) antagonista kölcsönhatást figyeltünk meg.

Az AgNP és TSA szinergista kölcsönhatását további tumoros sejtvonalakon is bizonyítottuk. A U2Os oszteoszarkóma, MCF-7 emlő adenokarcinóma és 4T1 egér eredetű tumoros sejtvonalakon a 24 órás AgNP, TSA és AgNP+TSA kezeléseket követően számolt CI értékek 1-nél kisebbek voltak, amelyek a HeLa sejtekhez hasonlóan szinergista kölcsönhatásra

utalnak. Az NIH-3T3 egér eredetű nem tumoros fibroblaszt sejtek kezelése során a kiszámított CI érték 1,79 volt, mely a két szer közötti antagonista kölcsönhatásra utal (**2. táblázat**).

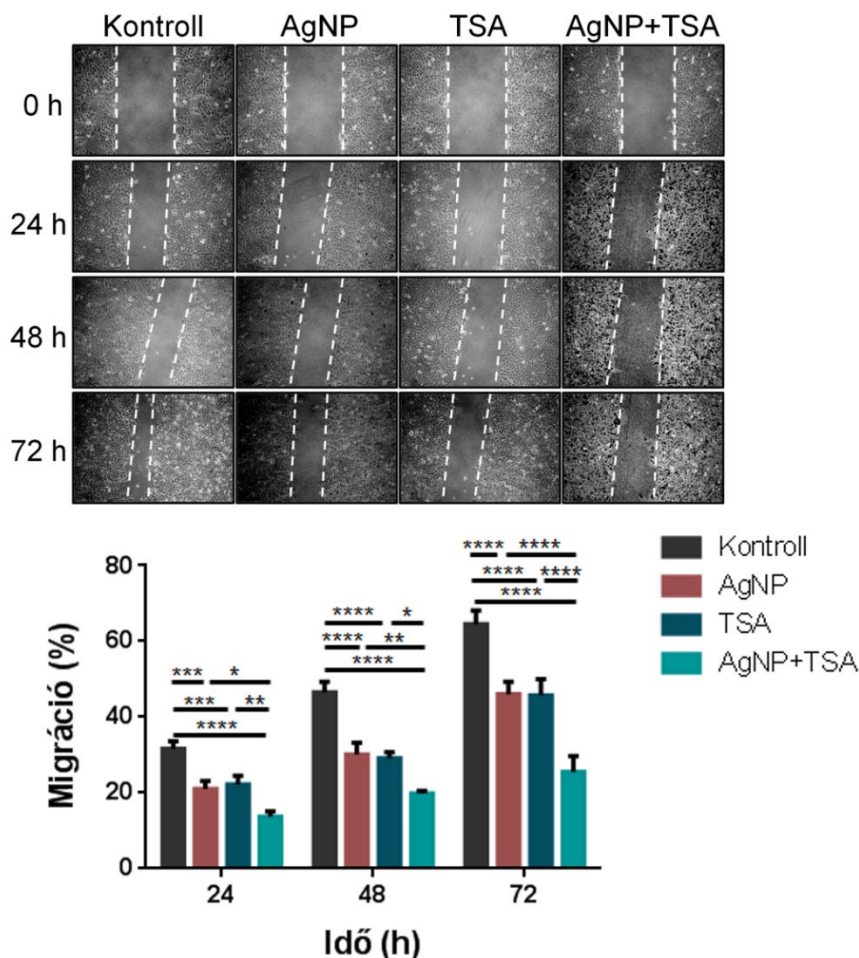
Az AgNP és TSA kombinációja szinergista módon csökkenti a tumoros sejtek életképességét, míg kísérleteinkben a nem tumoros sejtvonalon antagonizmust figyeltünk meg a két szer hatása között.

Az AgNP, a TSA és a kettő kombinációja is csökkenti a HeLa sejtek migrációs aktivitását

A HeLa sejtek migrációs aktivitását scratch esszével vizsgáltuk, amely során a konfluensre növesztett HeLa sejtrétegbe húzott sebzés méretét monitoroztuk 0, 24, 48 és 72 órával a kezelést követően. A scratch esszé során valójában a tumoros sejtek vándorlásának, azaz migrációjának és proliferációjának együttes hatását detektáljuk. Az egyszerűség kedvéért a továbbiakban ezt migrációs aktivitásnak nevezzük.

Megfigyeltük, hogy a kezeletlen sejtekhez képest már a 6 μ M AgNP kezelés, illetve a 45 nM TSA kezelés is szignifikánsan csökkentette a HeLa sejtek migrációs aktivitását mind 24, 48 és 72 óra elteltével a kezeletlen mintákhoz viszonyítva. Emellett a 6 μ M AgNP és 45 nM TSA kombinációja szignifikánsan csökkentette a HeLa sejtek migrációs aktivitását a kezeletlen, a csak AgNP-, illetve a csak TSA-kezelt mintákhoz képest is, amely változás a 72 órás kezelés után volt a legszembetűnőbb (**8. ábra**). Az AgNP és TSA kezelések hatása között nem detektáltunk szignifikáns különbséget, melyet az ábrán nem tüntettünk fel.

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az AgNP és TSA kettős kezelés csökkenti a tumoros sejtek migrációs képességét.

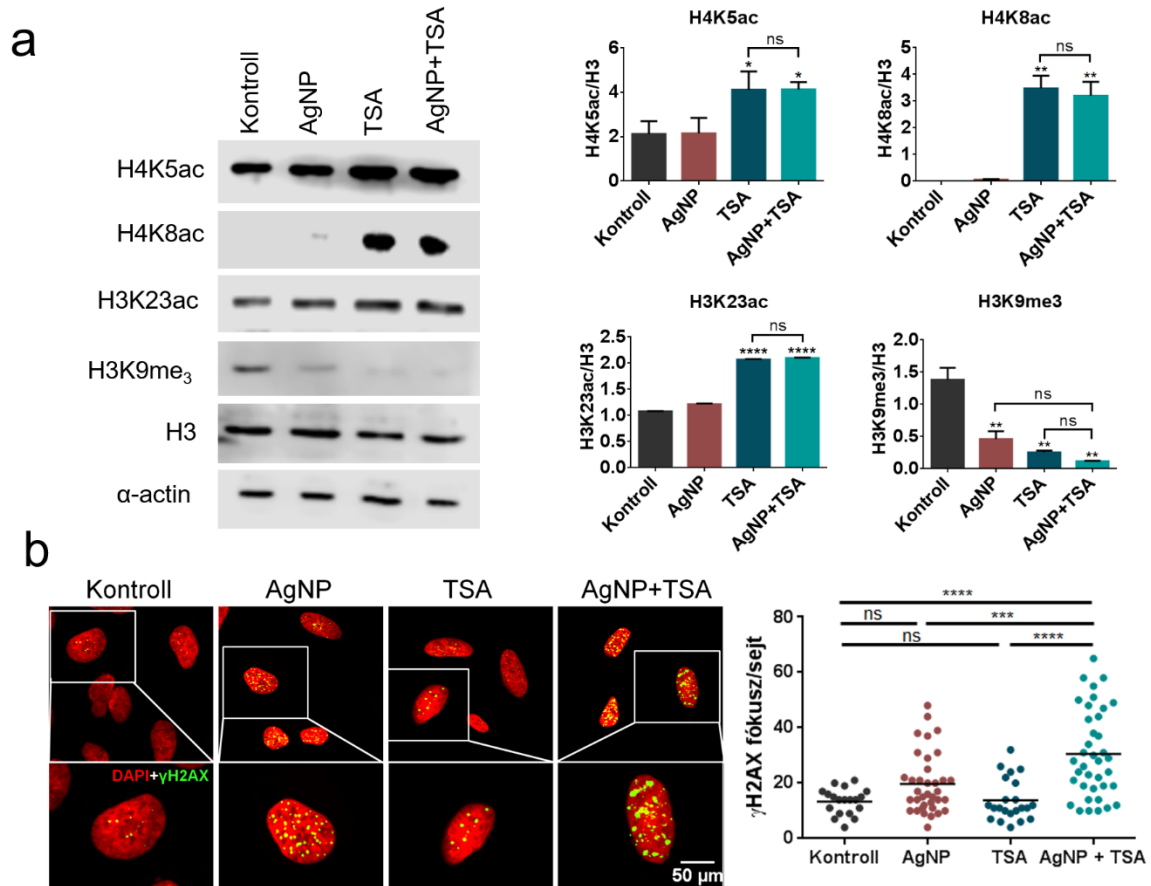


8. ábra Az AgNP és TSA kombinációja csökkenti a HeLa sejtek migrációs aktivitását. Szignifikánsan csökkent a HeLa sejtek migrációs aktivitása mind 24, 48 és 72 órás AgNP, TSA és a kettő kombinációjával végzett kezelés után a kezeletlen minták migrációs aktivitásához képest. Továbbá, az AgNP+TSA kombinációjának hatására szignifikánsan kisebb migrációt detektáltunk a csak AgNP- vagy csak TSA-kezelt mintákhoz viszonyítva. Kétszemponos ANOVA Tukey-féle többszörös összehasonlítás, *P érték < 0,05; **P érték < 0,005; ***P érték < 0,0005; ****P érték < 0,0001.

A TSA által okozott nyitott kromatin szerkezet hatására megnő az AgNP DNS károsító hatása

A HDAC inhibitor hatását a kromatin szerkezetre a hiszton fehérjék acetilációs állapotának meghatározásával vizsgáltuk, de emellett detektáltunk még hiszton metilációs módosulásokat is. A TSA kezelés által kialakított nyitottabb kromatin szerkezetet mind a H4K5, H4K8 és a H3K23 megnövekedett acetiláltsága bizonyítja, ami fennmaradt az AgNP és TSA kombinációs kezelések során is (9. ábra (a)). Emellett az AgNP+TSA kombinációjának hatására szignifikánsan lecsökkent a H3K9 trimetiláltsága is, mely elsősorban a kromatin

kondenzációjáért felelős módosulás. Ez a reverzibilis poszttranszlációs módosítás már az AgNP és a TSA külön-külön történő alkalmazásakor is szignifikánsan lecsökkent a kezeletlen mintához képest, de a legnagyobb mértékű változás a két szer együttes alkalmazása esetén volt detektálható (9. ábra (a)).



9. ábra A TSA kezelés a DNS-t hozzáférhetőbbé teszi az AgNP DNS károsító hatásának. (a) A TSA kezelés hatására megnő a hiszton fehérjék acetiláltsága, mely fennmarad az AgNP+TSA kettős kezelése során is. A H3K9 trimetiláltsága szignifikánsan lecsökken az AgNP és a TSA kezelés során, de a legnagyobb mértékű csökkenést a kombinációs kezelés hatására detektáltunk a kontroll mintához viszonyítva. Kétszemponyos ANOVA Sidak-féle többszörös összehasonlítás, *P érték < 0,05 **P érték < 0,01; ****P érték < 0,0001 (b) Az AgNP DNS károsító hatását jelző γH2AX fókuszok száma a TSA-val kombinációban történő alkalmazás hatására szignifikánsan nő mind a kezeletlen mintához, mind a TSA-val, illetve az AgNP-vel kezelt sejtekhez képest. Egyszemponyos ANOVA Tukey-féle többszörös összehasonlítás ***P érték: 0,0006; ****P érték < 0,0001. Méretarány: 50 μm.

A DNS károsodás mértékét a DNS kettős töréseket jelző γH2AX festéssel vizsgáltuk. A kontroll mintához képest az AgNP kezelés is növelte a γH2AX fókuszok számát a pozitívan

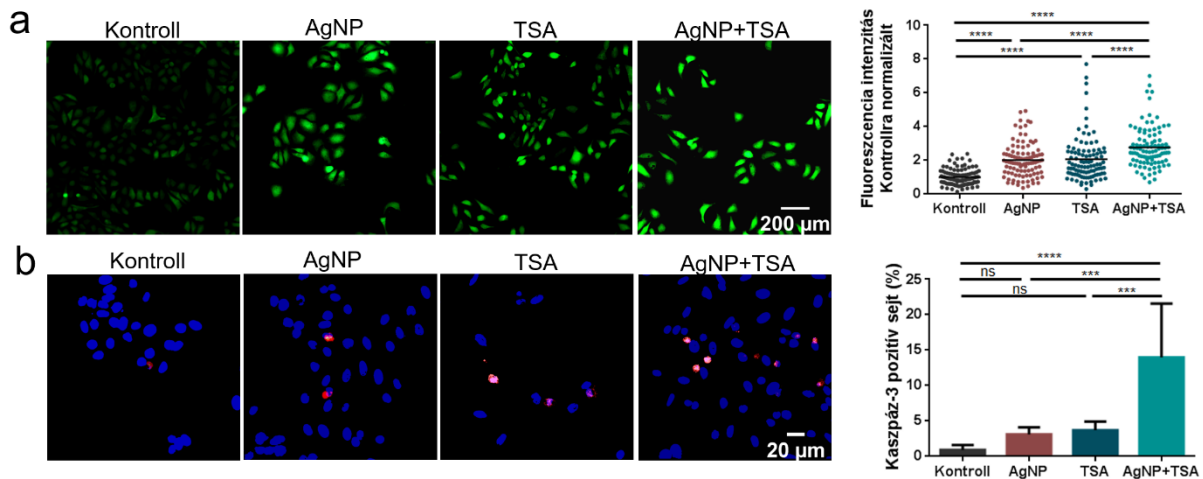
festődő sejteken belül, bár ez a változás nem volt szignifikáns. A TSA önmagában nem okozott DNS károsodást, viszont az AgNP és a TSA kombinációs kezelés mind a kontrollhoz, az AgNP, illetve a TSA kezeléshez képest is szignifikánsan megnövelte a γ H2AX fókuszok számát a tumorsejtekben (**9. ábra (b)**). Ennek a jelenségnek a hátterében a TSA által kialakított nyitottabb kromatin szerkezet állhat, amely miatt a DNS hozzáférhetőbbé válik az AgNP felszínéről felszabaduló ezüst ionok genotoxikus hatásának.

Az AgNP és a TSA kezelés oxidatív stresszt és apoptózist indukál a HeLa sejtekben

Az AgNP DNS károsító hatásának hátterében irodalmi adatok alapján a partikulumok felszínéről felszabaduló ezüst ionok állnak, melyek oxidatív stresszt indukálnak [79,149]. Emellett a HDAC enzimek gátlószereiről is kimutatták, hogy növelik a reaktív oxigén gyökök mennyiségét intracellulárisan [150]. Az AgNP, a TSA és a két szer együttes alkalmazása után DCFDA festéssel vizsgáltuk az oxidatív stressz mértékét a HeLa sejtekben. A kontrollhoz viszonyítva mind az AgNP, a TSA és a kombinációs kezelés hatására is szignifikánsan magasabb DCF fluoreszcencia intenzitást detektáltunk (**10. ábra (a)**). Az AgNP és a TSA kettős kezelés a két szer külön-külön történő alkalmazásához képest is szignifikánsan megnövelte a keletkező reaktív oxigén szabadgyökök mennyiségét a sejtekben (**10. ábra (a)**).

Az AgNP és TSA apoptózist kiváltó hatását hasított kaszpáz-3 detektálása révén immunfestéssel vizsgáltuk. Kísérleteink alapján elmondható, hogy az AgNP valamint a TSA alkalmazása kismértékben önmagában is megnövelte az apoptotizáló HeLa sejtek mennyiségét, de ez a változás nem volt szignifikáns a kezeletlen mintákhoz viszonyítva. A kombinációs kezelés hatására szignifikánsan megemelkedett a kaszpáz-3 pozitív sejtek aránya a mintákban mind a kezeletlen, mind az AgNP- és a TSA-kezelt mintákéhoz képest (**10. ábra (b)**). Az AgNP és a TSA együttes alkalmazása tehát szignifikánsan megnövelte a keletkező reaktív oxigén szabadgyökök mennyiségét és az apoptotizáló sejtek arányát a kezeletlen és a csak AgNP- vagy csak TSA-kezelt mintákhoz viszonyítva (**10. ábra**).

Eredményeink azt támasztják alá, hogy a HDAC inhibitor TSA által kialakított relaxált kromatin szerkezet miatt a tumoros sejtek érzékenyebbé válnak az AgNP következtében kialakuló oxidatív stressz sejtkárosító hatásainak, mely végül jelentősebb mértékű apoptózishoz, és így a tumorsejtek halálához vezet.



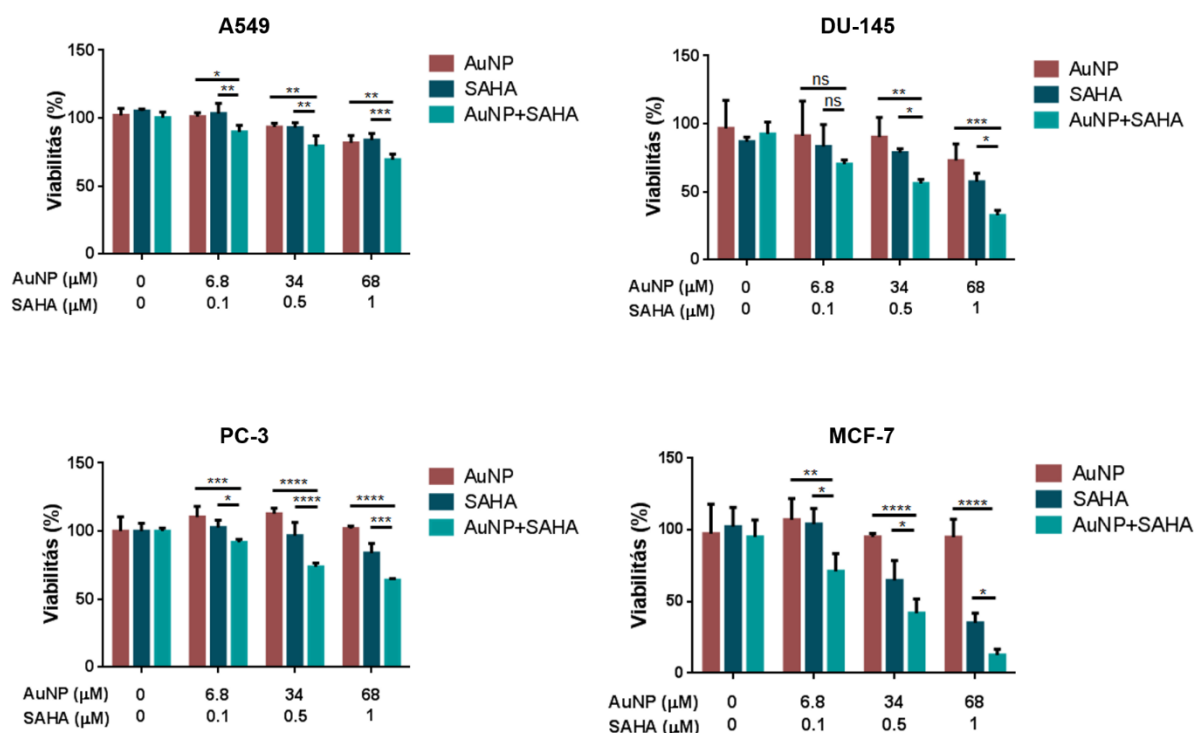
10. ábra Az AgNP és TSA kezelés oxidatív stresszt és apoptózist indukál a HeLa sejtekben. (a) Az AgNP és a TSA kombinációjának hatására megemelkedett a reaktív oxigén szabadgyökök mennyisége. A két szer együttes alkalmazásának következtében szignifikánsan megnőtt a DCF fluoreszcencia intenzitás mind a kezeletlen, mind a külön AgNP- vagy külön TSA-kezelt mintákéhoz képest. Egyszempontos ANOVA Tukey-féle többszörös összehasonlítás, ****P érték < 0,0001. Méretarány: 200 μ m. (b) Amennyiben a tumorsejteket AgNP és a TSA kombinációjával kezeltük, ennek hatására szignifikánsan nőtt a kaszpáz-3 pozitív sejtek aránya a mintákban a kezeletlen és az AgNP- vagy TSA-kezelt mintákban detektálthoz képest. Egyszempontos ANOVA Tukey-féle többszörös összehasonlítás, ***P érték < 0,0005; ****P érték < 0,0001. Méretarány: 20 μ m.

Az AuNP és a HDAC gátló SAHA szinergista módon csökkentik a tumoros sejtek viabilitását ionizáló sugárzást követően

A második kísérleti megközelítésünkben az AuNP és a HDAC inhibitor SAHA együttes radioszenzitizáló hatását vizsgáltuk A549 tüdő adenokarcinóma, DU-145 és PC-3 prosztatarákos és MCF-7 emlő tumoros sejtvonalakon. Ezen sejtvonalak közül irodalmi adatok alapján elmondhatjuk, hogy az A549 és a DU-145 sejtek radiorezisztens fenotípussal rendelkeznek, míg a PC-3 és MCF-7 sejtek radioszenzitív vonalak.

Ionizáló sugárzás hiányában sem az AuNP, sem a SAHA, sem a kettő kombinációja nem okozott viabilitás csökkenést 72 óra kezelés után (3. függelék ábra). Ha a kemoterápiát sugárterápiával kombináltuk, az AuNP+SAHA kezelt A549, PC-3 és MCF-7 sejtek esetén az összes kezelési koncentrációnál - a DU-145 sejtek esetén elsősorban a nagyobb kezelési koncentrációnál - tapasztaltunk szignifikánsan alacsonyabb viabilitást az AuNP-, illetve a

SAHA-kezelt minták életképességéhez képest, 2 Gy sugárdózissal történő kezelést követően (11. ábra).



11. ábra Az AuNP és SAHA kombinációs kezelés szignifikánsan csökkenti a tumoros sejtek viabilitását ionizáló sugárzás alkalmazását követően. Szignifikánsan alacsonyabb életképességet detektáltunk az AuNP+SAHA kettős kezelést és 2 Gy sugárdózissal történő irradiációt követően a csak AuNP- vagy csak SAHA-kezelt, irradiált mintákhoz képest. Kétszemponyos ANOVA Tukey-féle többszörös összehasonlítás, *P érték < 0,05; **P érték < 0,01; ***P érték < 0,001; ****P érték < 0,0001.

Az MTT vizsgálat eredménye alapján CompuSyn szoftver segítségével meghatároztuk az egyes AuNP és SAHA koncentrációkhoz tartozó CI értékeket egyenként, melyet ebben az esetben azért tartottuk fontosnak feltüntetni, mert 2 Gy sugárdózis alkalmazását követően az AuNP és SAHA kezelések sokszor a nagyobb alkalmazott koncentrációkban sem voltak toxikusak annyira, hogy az ED50, ED75, ED90 és ED95 értékhez tartozó CI érték reprezentatív legyen (11. ábra).

A CI értékek mellett feltüntetett Fa jelöli azt a sejtpopulációt vagy érintett frakciót, mely változást mutatott a kezelések során. A 0 jelöli a 100% viabilitást, míg az 1 a 100% sejtpusztulást. Minden tesztelt sejtvonal esetén az adott kezelési koncentrációhoz tartozó CI 1 alatti érték volt, mely a két szer szinergista együttműködését bizonyítja (3. táblázat). A PC-3

sejtvonal esetében tapasztalt 0,1 és 0,2 közötti CI értékek és az A549 sejteken mért 0,3 és 0,5 közötti CI értékek különösen erős szinergizmusra utalnak. **(3. táblázat)**. A DU-145 és MCF-7 sejtek viabilitás csökkenése nagyobb mértékű volt az AuNP és SAHA kezelés után 2 Gy sugárdózis alkalmazását követően. Az itt számolt CI értékek szintén szinergizmust mutatnak az AuNP és SAHA hatása között.

Az aktuális kezelési koncentrációkhoz tartozó CI értékek

AuNP (μM)	SAHA (μM)	A549		DU-145		PC-3		MCF-7	
		Fa	CI érték	Fa	CI érték	Fa	CI érték	Fa	CI érték
6,8	0,1	0,1018	0,4171	0,2971	0,4030	0,2035	0,1815	0,3195	0,4275
34	0,5	0,2049	0,4572	0,4393	0,8862	0,3828	0,1807	0,6539	0,8913
68	1	0,3054	0,3501	0,6726	0,5023	0,4802	0,1761	0,9154	0,6211

3. táblázat Az aktuális kezelési koncentrációkhoz tartozó CI és Fa értékek. Az AuNP és a SAHA szinergista módon csökkentik a tumoros sejtek viabilitását 2 Gy irradiáció után. Fa: érintett frakció (fraction affected), CI: kombinációs index (combinational index).

Az ED50, ED75, ED90 és ED95-höz tartozó CI értékek átlagából származó kombinációs index értékeket is meghatároztuk minden sejtvonal esetében a nanorészecske és a HDAC gátlóval, valamint a 2 Gy dózissal történő kezelést követően **(4. táblázat)**.

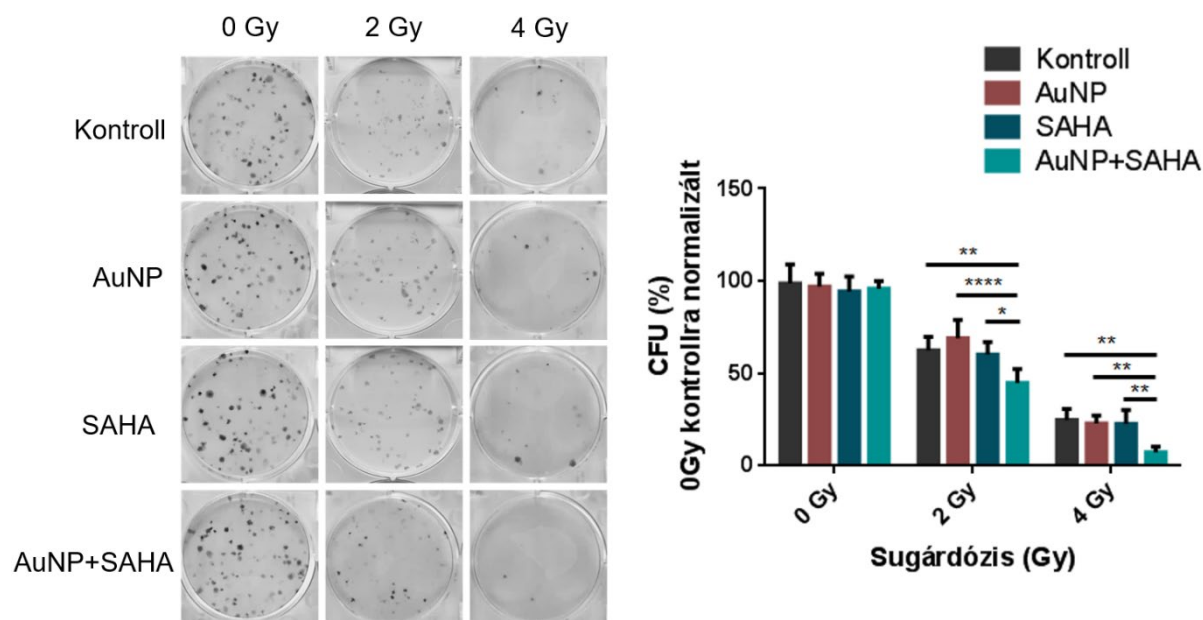
CI értékek (AuNP+SAHA)	
A549	0,41
DU-145	0,95
PC-3	0,19
MCF-7	0,72

4. táblázat Az AuNP és SAHA kezelések szinergista módon csökkentik a tumoros sejtek viabilitását 2 Gy sugárdózissal történő irradiációt követően. Az A549 és PC-3 sejtek esetén kapott CI értékek erős szinergizmusra utalnak, míg a DU-145 sejtek esetében számolt CI érték gyenge szinergizmusra utal.

Az A549 és PC-3 sejtek CI értéke 0,41 és 0,19, mely bizonyítja az erős szinergizmust az AuNP és SAHA hatása között. A DU-145 és MCF-7 sejtek esetében számolt 0,95 és 0,72 CI értékek gyenge szinergizmusra utalnak az AuNP és a SAHA hatása között 2 Gy irradiációt követően **(4. táblázat)**.

Az AuNP és SAHA kombinációs kezelés csökkenti a tumoros sejtek kolóniaformáló képességét ionizáló sugárzást követően

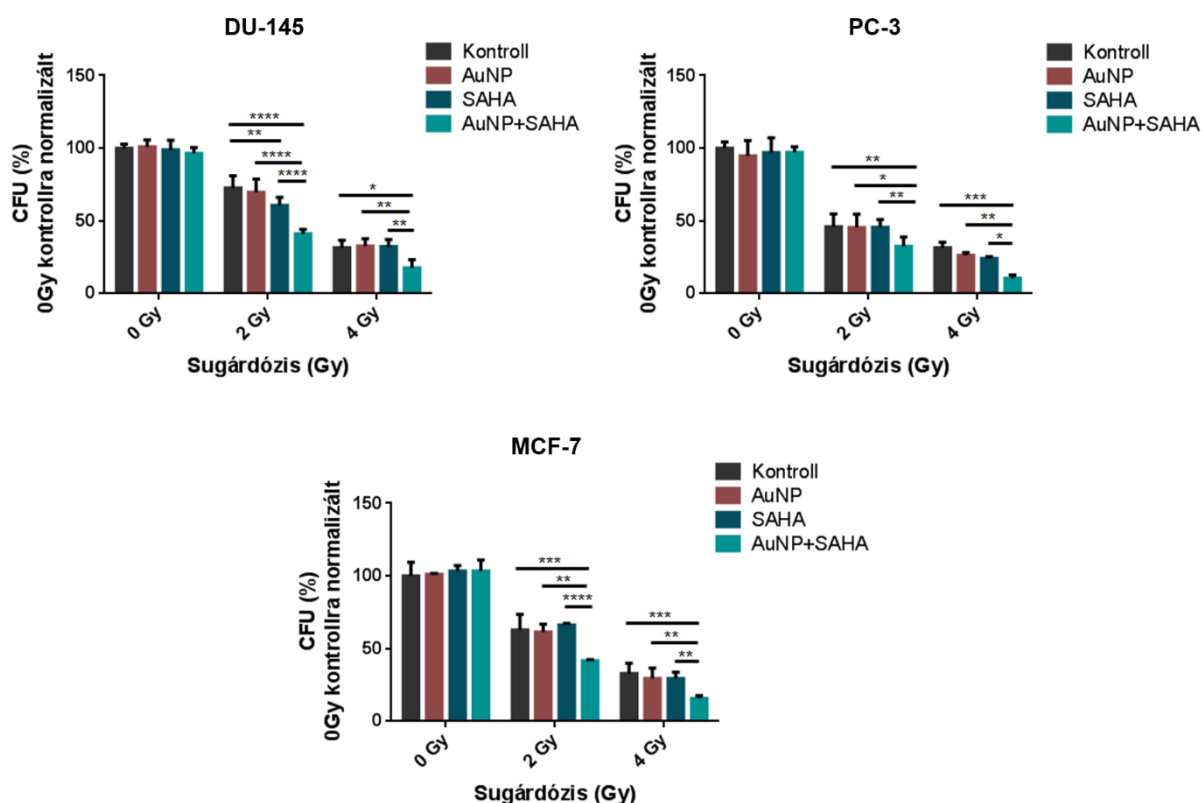
Az AuNP és SAHA kezelés radioszenzitizáló hatását a sejtek kolóniaképző képességének meghatározásával, illetve az ionizáló sugárzás DNS károsító hatásának detektálásával vizsgáltuk. A besugarazatlan A549 sejtek által formált kolóniák száma a kiválasztott 6,8 μM AuNP és 0,1 μM SAHA koncentrációk mellett nem mutatott eltérést a kezeletlen mintában számolt kolóniák számához képest. Az AuNP+SAHA kettős kezelésnek ugyanúgy nem volt hatása az A549 sejtek által formált kolóniák számára ionizáló sugárzás alkalmazása nélkül (12. ábra).



12. ábra Az AuNP és SAHA kombinációjának radioszenzitizáló hatása az A549 sejtekre. Az A549 sejtek kolóniaképző képessége szignifikánsan csökken az AuNP és SAHA kettős kezelés hatására 2 Gy és 4 Gy sugárdózis alkalmazása után a kezeletlen, az AuNP, illetve a SAHA kezeléshez képest. Kétszemponos ANOVA Tukey-féle többszörös összehasonlítás, *P érték < 0,05; **P érték < 0,01; ****P érték < 0,0001.

A 2 Gy és a 4 Gy sugárdózissal történő irradiáció csökkentette az A549 sejtek kolóniaképző képességét. Ez a csökkenés az AuNP és a SAHA kombinációs kezelés hatására szignifikánsan nagyobb lett mind a 2 Gy, mind a 4 Gy sugárdózissal kezelt, kontroll mintákhoz képest. Amikor a 6,8 μM AuNP-t és a 0,1 μM SAHA-t nem kombinációban, hanem önmagában alkalmaztuk, akkor nem tapasztaltunk radioszenzitizációt egyik sugárdózis mellett sem (12. ábra).

Az AuNP és SAHA radioszenzitiváló hatását megvizsgáltuk a DU-145, a PC-3 prosztata rákos és az MCF-7 emlő tumoros adenokarcinóma sejtvonalakon is (13. ábra, 4. függelék ábra).



13. ábra Az AuNP és SAHA kombinációs kezelés radioszenzitivációt okoz tumoros sejtekben. Az AuNP és SAHA kettős kezelés szignifikánsan csökkentette a DU-145, PC-3 és MCF-7 tumoros sejtek kolóniaképző képességét 2 és 4 Gy dózisú sugárzás után a kezeletlen és a csak AuNP- vagy SAHA-kezelt mintákhoz képest. Kétszemponyos ANOVA Tukey-féle többszörös összehasonlítás, *P érték < 0,05; **P érték < 0,01; ***P érték < 0,001; ****P érték < 0,0001.

Ionizáló sugárzás alkalmazása nélkül az AuNP, a SAHA és a kombinációjukkal történő kezelés nem befolyásolta a tumoros sejtek kolóniaformáló képességét az alkalmazott koncentrációknál. Az AuNP kezelés az alkalmazott koncentrációban nem növelte szignifikánsan az ionizáló sugárzás hatását egyik sejtvonal esetében sem. A HDAC inhibitor SAHA önmagában képes volt érzékenyíteni a DU-145 sejteket az ionizáló sugárzás károsító hatásaival szemben, viszont a PC-3 és MCF-7 sejtek kolóniaképző képességét az alkalmazott koncentrációban nem befolyásolta (13. ábra). Mind a 2 Gy, mind a 4 Gy sugárdózis hatására

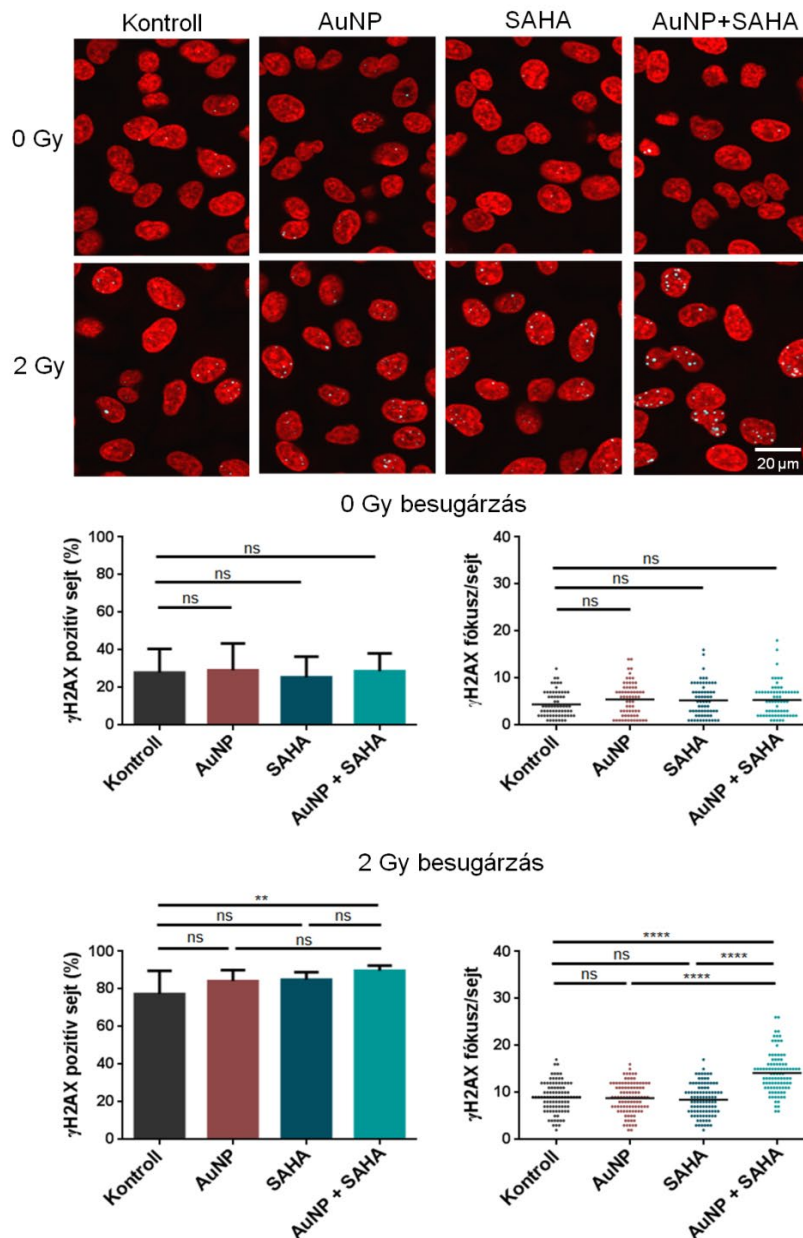
szignifikánsan csökkent a DU-145, PC-3 és MCF-7 sejtek által formált kolóniaszám az AuNP és SAHA kombinációban történő alkalmazásakor (**13. ábra**).

Az AuNP és SAHA kombinációja szignifikánsan növeli az ionizáló sugárzás DNS károsító hatását

Az ionizáló sugárzás DNS károsító hatásának változását az AuNP, SAHA és a kettő szer kombinációja mellett γ H2AX festéssel vizsgáltuk. A fluoreszcens mikroszkópos képek alapján meghatároztuk a γ H2AX pozitív sejtek százalékos arányát és a γ H2AX pozitív sejteken belül a γ H2AX fókuszok számát, ami a DNS kettős szálú törések mennyiségéről ad információt.

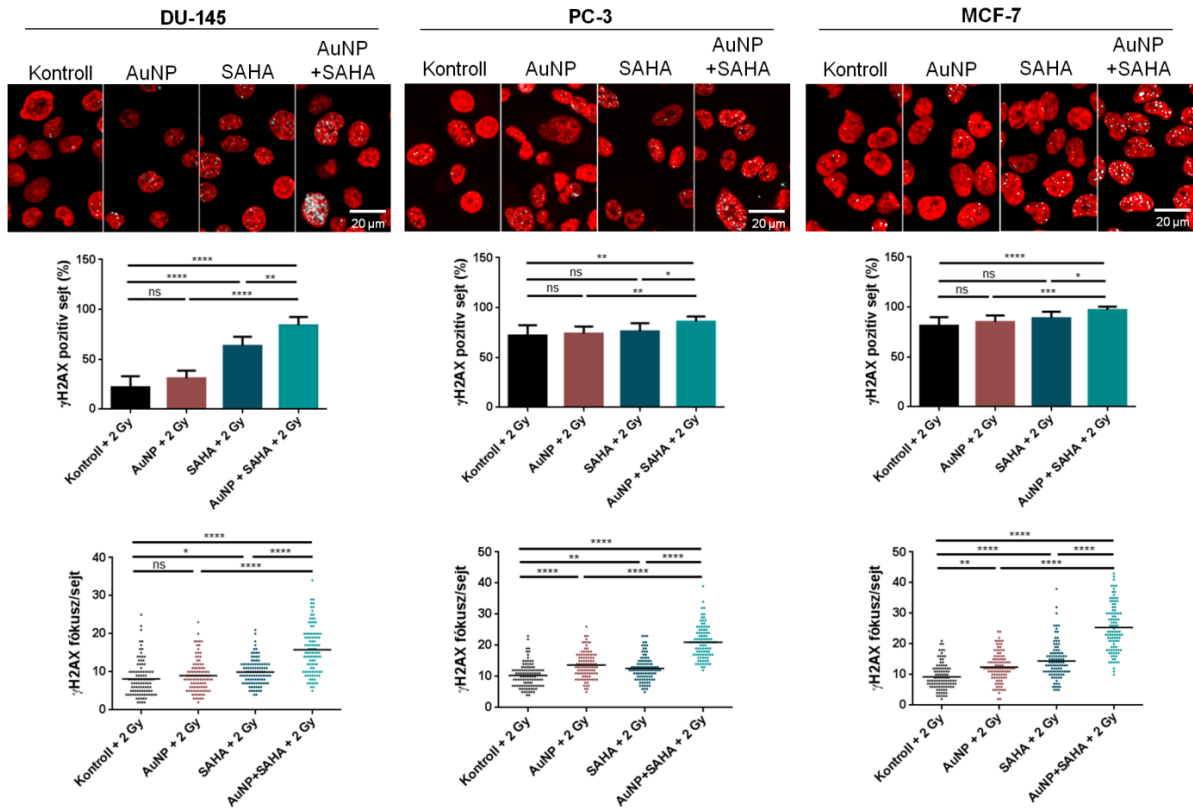
Irradiáció nélkül az A549 tumoros sejtekben a kontrollhoz képest egyik kezelés hatására sem változott a γ H2AX pozitív sejtek aránya, sem a DNS kettős szálú törések száma (**14. ábra**). Önmagukban tehát sem a 6,8 μ M AuNP, sem a 0,1 μ M SAHA, sem pedig a kettő kombinációja az alkalmazott koncentrációkban nem bír genotoxikus hatással.

A 2 Gy sugárdózis alkalmazása már önmagában is nagymértékben megnövelte a γ H2AX pozitív sejtek arányát a mintákban (kb. 80%), melyet az AuNP és SAHA önálló kezelések nem változtatottak meg szignifikáns mértékben. Egyedül az AuNP+SAHA kombinációs kezelés hatására detektáltunk szignifikáns növekedést a γ H2AX pozitív sejtek arányát illetően a kezeletlen, 2 Gy irradiált mintához viszonyítva, viszont ez a különbség nem volt szignifikáns az AuNP vagy SAHA önálló kezelésekhez képest (**14. ábra**). Az AuNP és SAHA kombinációjának alkalmazása során, 2 Gy sugárdózis hatására szignifikánsan megnőtt a γ H2AX fókuszok száma mind a kezeletlen, mind a csak AuNP- vagy csak SAHA-kezelt mintákhoz viszonyítva. 2 Gy irradiációt követően a γ H2AX antitesttel pozitívan festődő sejteken belül számolt γ H2AX fókuszok száma nem változott a csak AuNP- és a csak SAHA-kezelt mintákban (**14. ábra**).



14. ábra Az AuNP és SAHA együttes alkalmazása megnöveli az irradiáció DNS károsító hatását A549 sejtekben. Ionizáló sugárzás hiányában az AuNP, SAHA és a kettő kombinációja nem bírt DNS károsító hatással az A549 sejtekben. 2 Gy sugárdózis alkalmazása után az AuNP és SAHA kettős kezelés szignifikánsan növelte a γ H2AX pozitív sejtek számát a kontrollhoz viszonyítva, viszont nem detektáltunk különbséget az AuNP és SAHA önálló kezelésekhöz viszonyítva. A γ H2AX pozitív sejteken belül számolt γ H2AX fókuszok száma az AuNP+SAHA kezelés hatására szignifikánsan megemelkedett a kezeletlen és a külön-külön AuNP- vagy SAHA-kezelt mintákhoz képest. Egyszempontos ANOVA Tukey-féle többszörös összehasonlítás, **P érték: 0,0029; ****P érték < 0,0001; Méretarány: 20 μ m.

Az irradiáció DNS károsító hatását megvizsgáltuk DU-145, PC-3 és MCF-7 tumoros sejtekben is, ahol szintén meghatároztuk mind a γ H2AX pozitív sejtek arányát, mind a pozitívan festődő sejteken belül a γ H2AX fókuszok számát. Az AuNP és SAHA kettős kezelések során szignifikánsan megnőtt a γ H2AX pozitív sejtek aránya a kezeletlen mintához és a külön-külön AuNP- vagy SAHA-kezelt mintákhoz képest 2 Gy sugárdózis alkalmazását követően (15. ábra).



15. ábra Az AuNP és SAHA kettős kezelés szignifikánsan növeli az ionizáló sugárzás DNS károsító hatását tumoros sejteken. A γ H2AX pozitív sejtek aránya szignifikánsan magasabb az AuNP és SAHA kettős kezelés hatására 2 Gy sugárdózis alkalmazását követően a kezeletlen és az AuNP- vagy SAHA-kezelt mintához képest. Egyszempontos ANOVA, Tukey-féle többszörös összehasonlítás, *P érték < 0,05; **P érték < 0,01; ***P érték: 0,0006; ****P érték < 0,0001. Szignifikánsan több γ H2AX fókusz számoltunk a γ H2AX pozitív sejteken belül az AuNP és SAHA kettős kezelés után 2 Gy irradiációt követően mind a kezeletlen, mind az AuNP vagy a SAHA kezeléshez viszonyítva. Méret arány: 20 μ m. Egyszempontos ANOVA, Tukey-féle többszörös összehasonlítás, *P érték < 0,05; **P érték < 0,005; ****P érték < 0,0001. Méretarány: 20 μ m.

A pozitívan festődő sejteken belül a γ H2AX fókuszok száma is szignifikánsan nőtt a 2 Gy sugárzás után az AuNP és SAHA kettős kezelt mintákban mind a kezeletlen, mind az egyes

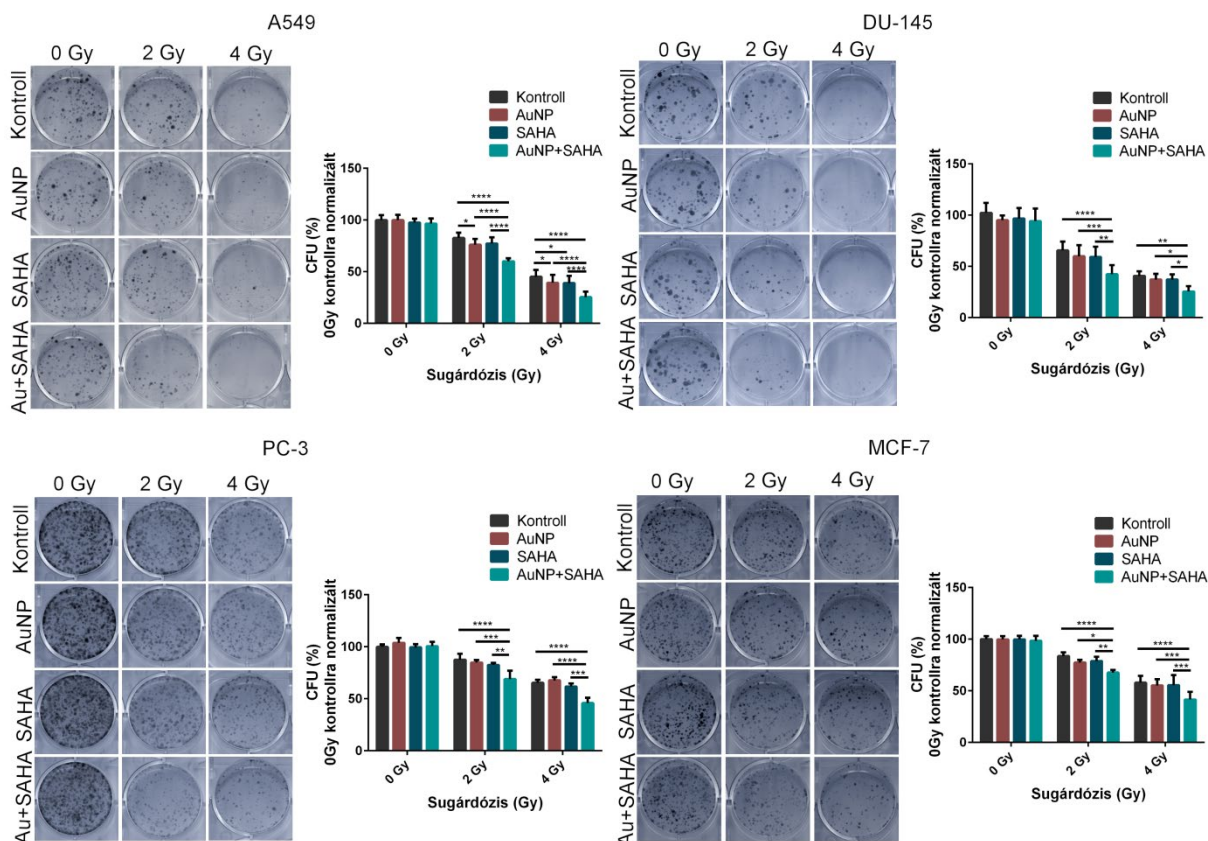
individuális kezeléseken átesett sejtekhez képest. A tesztelt sejtvonalakban a γ H2AX pozitív sejtek aránya a csak AuNP és a csak SAHA kezelés után nem változott szignifikánsan az irradiált kontrollhoz képest, egyedül a DU-145 sejtekben látható a SAHA kezelés hatására szignifikáns növekedés a γ H2AX pozitív sejtek arányában (**15. ábra**).

Ezzel szemben, a γ H2AX fókuszok száma a PC-3 és MCF-7 sejtekben már az önmagában alkalmazott AuNP vagy SAHA kezelés hatására is szignifikánsan nőtt a kezeletlen sejtekhez képest. Ez alól kivételt képeztek a DU-145 sejtek, ahol az AuNP kezelés nem befolyásolta a sejtekben képződő DNS kettős szálú törések mennyiségét ionizáló sugárzást követően a kezeletlen mintákhoz viszonyítva.

Az AuNP és SAHA kombinációja csökkenti a 3D sejtkultúra tumoros sejtjeinek kolóniaformáló képességét irradiáció után

Az AuNP és SAHA radioszenzitizáló hatását 3D sejtkultúrában tenyésztett A549, DU-145, PC-3 és MCF-7 sejteken is megvizsgáltuk a sejtek kolóniaformáló képességének meghatározásával (**16. ábra**). Tanulmányoztuk azt is, hogy az AuNP, a SAHA, vagy a kettő kombinációjával történő kezelés hogyan befolyásolja az ionizáló sugárzás DNS károsító hatását (**17. ábra**). A 3D sejtkultúrákon végzett vizsgálatok során a kezelési koncentrációkat megemeltük 6,8 μ M-ról 34 μ M-ra az AuNP esetén, és 0,1 μ M-ról 1 μ M-ra a SAHA esetén.

Irradiáció nélkül a tumoros sejtek kolóniaformáló képessége nem változott sem az AuNP, sem a SAHA, sem pedig a kettő kombinációjával történő kezelés során. Az A549 sejtek által képzett kolóniák száma szignifikánsan csökkent az AuNP és az AuNP+SAHA kezelés hatására 2 Gy sugárdózis mellett, a kezeletlen mintához képest. A kombinációs kezelés után kialakult kolóniaszám szignifikánsan alacsonyabb volt mind a külön AuNP-, mind a külön SAHA-kezelt mintában számolt kolóniaszámhoz képest. A 4 Gy sugárdózis alkalmazása mellett a sejtek kolóniaformáló készsége még tovább romlott. Az ionizáló sugárzásnak kitett kontrollhoz viszonyítva szignifikánsan csökkent a külön-külön AuNP- vagy SAHA-kezelt, valamint az AuNP+SAHA-kezelt mintákban a sejtek kolóniaformáló képessége. A nanorészecske + HDAC inhibitor kettőse ebben az esetben is a legerőteljesebb hatást érte el minden tumoros sejtípus esetén. A DU-145, PC-3 és MCF-7 tumoros sejtvonalakon az AuNP vagy a SAHA kezelés önmagában nem befolyásolta a kolóniaképző képességet sem 2 Gy, sem 4 Gy sugárdózis alkalmazását követően. (**16. ábra**)

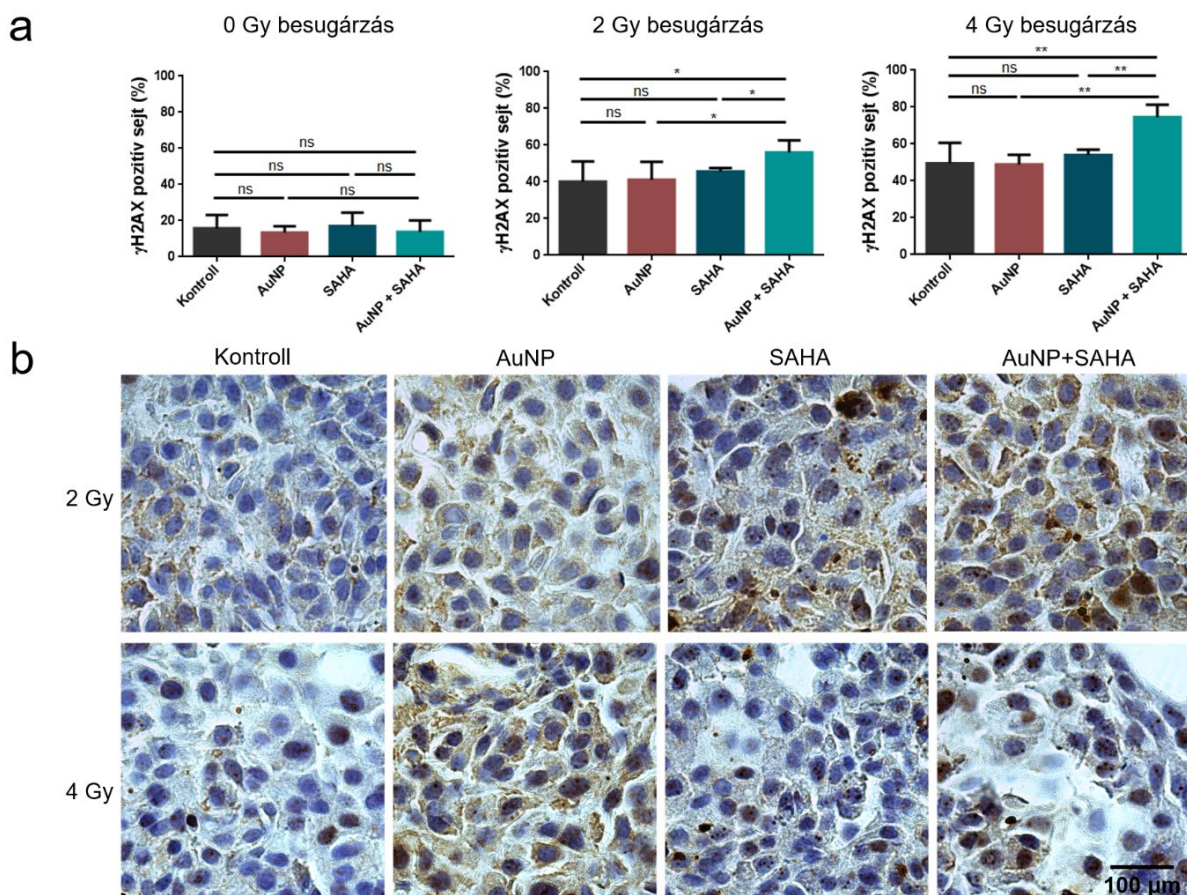


16. ábra Az AuNP és SAHA kettős kezelés szignifikánsan csökkenti a 3D sejtkultúrában található tumoros sejtek kolóniaformáló képességét irradiációt követően. Szignifikánsan alacsonyabb kolóniaszámot detektáltunk az AuNP és SAHA kettős kezelés után mind a 2 Gy, mind a 4 Gy sugárdózissal kezelt A549, DU-145, PC-3 és MCF-7 szferoidokat alkotó sejtek esetén a kontroll és az AuNP- vagy a SAHA-kezelt mintákhoz képest. Kétszemponyos ANOVA Tukey-féle többszörös összehasonlítás, *P érték < 0,05; **P érték < 0,01; ***P érték < 0,001; ****P érték < 0,0001.

A 3D tumoros sejtkultúrák kemo- és sugárkezelését követően a DNS károsodás mértékét szintén γ H2AX festéssel határoztuk meg. A γ H2AX pozitív sejtek arányát tudtuk csak meghatározni, a pozitívan festődő sejtekben található γ H2AX fókuszok számát nem, mivel a festéshez használt torna peroxidáz konjugált másodlagos antitest szenzitivitása és a detektálás felbontóképessége elmarad a fluoreszcens alapú meghatározástól.

Ionizáló sugárzás hiányában a 34 μ M AuNP, a 0,1 μ M SAHA és a kettő kombinációja nem befolyásolta a γ H2AX pozitív sejtek arányát a mintákban a kontrollhoz képest (17. ábra (a), 5. függelék ábra). Sem a 2 Gy, sem a 4 Gy sugárdózis nem módosította a γ H2AX pozitív sejtek arányát a 3D A549 sejtkultúrában az AuNP vagy a SAHA kezelés után,

viszont az AuNP és SAHA kombinációja szignifikánsan megnövelte a pozitívan festődő sejtek mennyiségét mind 2 Gy, mind 4 Gy sugárdózis alkalmazása után (17. ábra).



17. ábra Az AuNP és SAHA kombinációs kezelés szignifikánsan növeli az ionizáló sugárzás DNS károsító hatását a 3D sejtkultúrában növő A549 sejtekben (a) A γ H2AX pozitív sejtek aránya az AuNP-, a SAHA- és az AuNP+SAHA-kezelt mintákban 0, 2 és 4 Gy sugárdózis alkalmazását követően. Egyszempontos ANOVA Tukey-féle többszörös összehasonlítás, *P érték < 0,05; **P érték < 0,01; (b) Reprezentatív képek a γ H2AX festett kezeletlen, AuNP, SAHA és a kettő kombinációjával kezelt A549 szferoidok metszeteiről 2 és 4 Gy irradiációt követően. Méretarány: 100 μ m.

A 3D sejtkultúrán végzett kísérleteink alapján elmondható, hogy az AuNP és a SAHA kombinációjának használata radioszenzitizáló hatással bír a 3D struktúrában található tumoros sejtekre is. Kimutattuk, hogy szignifikánsan csökken az A549, DU-145, PC-3 és MCF-7 tumoros sejtek kolóniaformáló képessége (16. ábra), illetve a két szer szignifikánsan növeli az ionizáló sugárzás DNS károsító hatását a 3D struktúrában növő A549 sejtekben a csak AuNP-, vagy csak SAHA-kezelt sejtekhez képest (17. ábra).

Az eredményeinkből megállapíthatjuk, hogy az AuNP és SAHA kombinációs kezelések nem csak a klasszikus 2D sejtkultúrákon bizonyultak hatékony radioszenzitizáló anyagoknak, hanem a 3D szerkezetű szferoidok esetén is szignifikánsan növelték az irradiáció DNS károsító hatását és csökkentették a szferoidokat képző tumoros sejtek kolóniaformáló képességét.

Eredmények megbeszélése

A daganatos betegségek kezelése, akár kemoterápiáról, akár sugárkezelésről beszélünk, gyakran nem, vagy csak kevésbé hatékony, és a terápia következtében számos mellékhatás is kialakul. A klasszikus kemoterápia során a tumorok olyan tulajdonságait célozzák meg és használják ki, mint a kontrollálatlan sejtosztódás, az intenzív tápanyagfelvétel és a felgyorsult anyagcsere [151]. A klinikai gyakorlatban nagyszámú, eltérő kémiai szerkezetű és hatásmechanizmusú kemoterápiás szert alkalmaznak. Emellett, a klasszikus kemoterápia kiegészítéseként, a tumorok célzott targetálását lehetővé tevő immunterápiát is egyre szélesebb körben alkalmazzák, ahol a tumorok által túlexpresszált hormon vagy növekedési faktor receptorok működését befolyásolják, blokkolják [152]. A kemoterápia kiegészítésére gyakran sugárkezelést is alkalmaznak, melyhez vagy külső sugárforrást vesznek igénybe, vagy brachyterápiás módon végzik a kezelést, azaz a sugárforrást közvetlenül a tumorba, vagy annak közvetlen közelébe ültetik be [153]. Azonban ezek az eljárások mind rendkívül sok kellemetlen mellékhatást okoznak [154,155].

A tumorterápia specifikitásának növelése, a nem kívánt mellékhatások kiküszöbölése vagy csökkentése rendkívül intenzív nemzetközi kutatási aktivitás célpontja. Ezek a kísérletek a hatóanyag fejlesztéseken túl a tumorelles szerek hatékonyabb célbajuttatására is irányulnak [156,157]. A klasszikus kemoterápiás hatóanyagok mellett megjelentek olyan kis molekulású vegyületek, mint a HDAC inhibitorok, melyek több támadási ponton keresztül képesek a tumoros sejtek osztódását és életképességét csökkenteni. Ezek a vegyületek több útvonalon keresztül tudnak apoptózist indukálni, befolyásolják a heterokromatin és eukromatin arányát, melynek révén a gének expressziójára és a sejtek differenciációjára is hatással lehetnek. A HDAC inhibitorok a kromatin szerkezetén túl számos citoplazmatikus fehérje aktivitását, stabilitását, fehérje-fehérje és fehérje-DNS kölcsönhatásaik erősségét is befolyásolják, ezáltal számos celluláris folyamat modulálására képesek [158].

A kemoterápiás szerek hatékonysága szinergista módon tovább növelhető, ha megfelelő kombinációs partnerekkel együtt alkalmazzák őket. A HDAC gátlók ideálisak erre a célra, hiszen az általuk kialakított nyitottabb kromatin szerkezeten keresztül, vagy akár az HDAC gátlók által indukált apoptotikus folyamatok révén tovább fokozzák a kemoterápiás hatóanyagok DNS károsító vagy apoptózist kiváltó hatását.

A nanorészecskék alkalmazása szintén növelheti a tumorelles terápia hatékonyságát. Teszi ezt elsősorban az által, hogy a részecskék képesek passzívan feldúsulni a tumoros szövetben a tumorokat átszövő vérerek endotélrétegének fenesztráltsága miatt és így hosszabb ideig és nagy mennyiségben akkumulálódnak a tumoros szövetekben az egészséges szervekhez képest [59]. Ha a tumorban felhalmozódó nanorészecskék gyógyszerhordozók, akkor általuk növelhető a kemoterápiás szerek koncentrációja a daganatban [159,160]. Ám az eleve citotoxikus sajátságú nanoanyagok, mint amilyenek az ezüst nanorészecskék, a felhalmozódásukat követően kifejtetik tumorelles aktivitásukat [161]. Emellett egyes nanorészecskék (pl. AuNP) a sugárterápia hatékonyságát is növelhetik - radioszenzitizáló tulajdonságuk révén - mivel érzékenyítik a tumoros sejteket az ionizáló sugárzásra [162].

Munkánk során kimutattuk, hogy az AgNP és TSA kezelés kombinációja potenciálisan megnövelheti a tumorelles hatásuk erősségét. Vizsgálataink során bizonyítottuk, hogy a nanorészecskék a HeLa sejtekbe bejutnak, a sejteken belül a citoplazmában nagy mennyiségben aggregálódnak, és az aggregátumok elsődlegesen multivezikuláris testecskékben halmozódnak fel (**5. ábra (a)**). A legtöbb tanulmány szerint a nanorészecskék endocitózissal jutnak be a sejtekbe [80,163], majd az endoszómák és lizoszómák fúziója után savas környezetbe kerülnek, ahol a felszínükről reaktív ezüst ionok szabadulnak fel. Ezek az ezüst ionok és a hatásukra megjelenő reaktív szabadgyökök a sejtorganelumokat és a jelentősebb makromolekulákat károsítják. Ezt a hatásmechanizmust nevezi a szakirodalom trójai faló mechanizmusnak [164]. Mivel a nanorészecskékkel együtt egy HDAC inhibitort is alkalmaztunk, megbizonyosodtunk arról is, hogy ez a hatóanyag, a TSA, ki tudja fejteni hatását a kromatinon. A kombinációs partnerként alkalmazott AgNP a kettős kezelések során nem befolyásolja a TSA hiszton-deacetiláz gátló hatását, mivel a csak TSA-val kezelt mintához hasonlóan megnövekedett lizin acetilációt detektáltunk a kombinációs kezelés hatására is (**6. ábra (a)**). Vizsgálataink alapján azt is kijelenthetjük, hogy a TSA kezelés hatására, a vártak megfelelően, valóban egy nyitottabb kromatin struktúra keletkezik. Erre utalnak olyan hiszton poszttranszlációs módosítások, mint a TSA kezelés hatására kialakuló acetiláció növekedés a hiszton 4 fehérje 5. és 8. pozícióban található lizin aminosav oldalláncain (H4K5, H4K8), valamint a hiszton 3 esetében a 23. lizin acetilációs szintjének (H3K23) emelkedése, továbbá, a H3 hiszton esetében a 9. pozícióban lévő lizin oldallánc (H3K9) trimetilációjának csökkenése. Ezek a módosítások irodalmi adatok alapján is a relaxáltabb kromatin struktúrára jellemzőek [147,148]. A HeLa sejtek TSA kezelése után detektált poszttranszlációs hiszton módosítások az AgNP és TSA

kettős expozíció hatására is kialakultak, sőt a H3K9 trimetiláció szintje, mely az AgNP kezelés hatására szignifikáns csökkenést mutatott a kezeletlen mintához képest, tovább csökkent a nanorészecskével együtt alkalmazott TSA expozíció során (**9. ábra (a)**).

Eredményeink alapján az AgNP és TSA kombinációja szignifikánsan csökkenti a rákos sejtek viabilitását a külön-külön történő AgNP vagy TSA kezeléshez képest (**7. ábra (c)**). Sőt, a viabilitás csökkenés mértéke a hatóanyag kombináció hatására nagyobbak bizonyult, mint a két szer külön-külön történő alkalmazásakor megfigyelhető életképesség csökkenés összege. Ezt támasztották alá a számolt kombinációs index (CI) értékek is, melyek alapján kimondható, hogy az AgNP és TSA szinergista tumorelleses kölcsönhatást fejtenek ki több tumoros sejtvonalon is. A nem tumoros NIH-3T3 sejteken viszont az AgNP-TSA kettős kezelések után számolt CI érték antagonizmusra utalt, tehát a két szer nem hogy erősítette, inkább gyengítette egymás hatását (**2. táblázat**). De az AgNP és a TSA nem csak a sejtek életképességére, hanem migrációs aktivitására is hatással volt. A hatóanyagok külön-külön is szignifikánsan gátolták a HeLa sejtek migrációját, viszont a legnagyobb mértékű, még az egyéni kezelésekhöz képest is jelentősen nagyobb migráció-gátlást az AgNP-TSA kettős kezelés során tapasztaltuk (**8. ábra**).

Feltételeztük, hogy a TSA hatására kialakuló nyitottabb kromatin szerkezet miatt a sejtek DNS-e sokkal jobban hozzáférhető a DNS-t károsító anyagok számára. Mivel több korábbi tanulmány utalt az AgNP genotoxikus hatására [165,166], ezért megvizsgáltuk a DNS károsodás mértékét az egyes kezeléseket követően. Az AgNP kezelés növelte a DNS kettős szálú törések számát a kezeletlen mintához képest, ám az AgNP a HDAC gátlószerrel kombinációban még ennél is nagyobb mértékben okozott DNS károsodást, a kezelés által indukált DNS kettős szálú törések száma szignifikánsan nőtt a csak AgNP kezelt mintához képest is (**9. ábra (b)**).

Irodalmi adatok alapján az AgNP tumorelleses hatásának hátterében az oxidatív stresszt kiváltó képessége áll, melyért a sejtbe bejutás után a nanorészecske felszínéről leváló ezüst ionok felelnek [164]. Eredményeink megerősítették, hogy az AgNP kezelés növeli a reaktív oxigén gyökök mennyiségét HeLa sejtekben (**10. ábra (a)**), ami sejthalálhoz vezet (**10. ábra (b)**). Az AgNP és a TSA önmagukban is növelték az oxigén szabadgyökök mennyiségét és így az apoptotizáló sejtek arányát is. A két szert együttesen alkalmazva viszont szignifikánsan nagyobb mértékű oxidatív stresszt és apoptózist figyeltünk meg a külön-külön AgNP vagy TSA kezelt és a kezeletlen mintákhoz viszonyítva (**10. ábra**).

Eredményeinkből tehát az következik, hogy a sejtbe bejutó TSA a szubsztrátjainak acetilálásán keresztül egy nyitottabb kromatin szerkezetet alakít ki. A relaxáltabb kromatin szerkezet miatt a DNS hozzáférhetőbbé válik a károsító hatásoknak. Az AgNP kezelés során a sejtekbe bejutott és aggregálódott részecskék felszínéről ezüst ionok válnak le, melyek önmagukban is genotoxikus hatással bírnak, de közvetve, reaktív oxigén gyökök képződésének indukálásán át is képesek károsítani a sejteket. A TSA által hozzáférhetőbbé tett DNS kiszolgáltatottabbá válik az AgNP károsító hatásainak, mely végeredményben a tumoros sejtek pusztulásához vezet.

Az ezüsttel ellentétben, az arany nanorészecskéket a szakirodalom biológiailag inertnek tekinti [167,168]. Ezek a nanorészecskék azonban számos módon kihasználhatóak az experimentális és a klinikai tumorbiológiában. Az arany, nagy rendszámának köszönhetően, ugyanis radioszenzitizáló szerként alkalmazható a sugárterápia során. Az ionizáló sugárzás hatására az arany atomokból gerjesztett, reaktív elektronok lépnek ki, majd a keletkező lyukak helyére belépő elektronok miatt kialakuló Auger kaszkád és a Compton szóródás eredményeként másodlagos elektronok és alacsonyabb energiájú szórt fotonok keletkeznek. Ezek igen komoly károsodást okoznak a sejtek makromolekuláiban, elsődlegesen roncsolva a membránstruktúrákat és a DNS-t. Ezzel a fizikai jelenséggel a közvetlen ionizáló sugárzás hatása megtöbbszöröződik, hatékonysága fokozódik, és lehetőséget ad arra is, hogy ugyanakkora sejtroncsoló hatást kisebb sugárdózis alkalmazása mellett érjünk el. A fizikai felerősítés kémiai és biológiai folyamatokat indít el a rákos sejtekben, köztük a reaktív szabadgyökök keletkezését. A károsodás mértékétől függően ezek a folyamatok a sejtekben sejtciklus megállást okozhatnak, de a súlyos károsodás és a hibajavítás sikertelensége együtt a sejtek szenescenciájához és halálához vezet [97].

Egyes HDAC inhibitorokról is kimutatták már, hogy képesek a sejteket érzékenyíteni az ionizáló sugárzás okozta károsító hatásokra. Azt feltételezték, hogy ennek a háttérében a DNS hibajavítás gátlása és a kromatin szerkezet kitekerése állhat, ami miatt az örökítőanyagban az ionizáló sugárzás közvetlenül, és a reaktív oxigén szabadgyökök mennyiségén keresztül közvetve is nagyobb kárt tud tenni [120]. Mivel az AuNP, valamint az HDAC inhibitorok radioszenzitizáló hatását is kimutatták már, ennek bizonyítása nem volt a munkánk fő célja. Munkánk során elsősorban azt vizsgáltuk, hogy az AuNP és az HDAC inhibitor SAHA kombinációjával szinergista módon tovább növelhető-e ezen ágensek radioszenzitizáló hatása.

A viabilitás vizsgálatok eredményeiből megállapíthatjuk, hogy az AuNP és SAHA kombinációján alapuló kezelés az ionizáló sugárzás hatására bekövetkező életképesség csökkenést szinergista módon felerősítik. Szignifikánsan alacsonyabb sejtvitalitást detektáltunk az AuNP és SAHA kettős kezelés után irradiációt követően a csak AuNP vagy csak SAHA kezelt sejtek életképességéhez képest (**11. ábra, 3. és 4. táblázat**). Ugyanakkor azt is megállapíthattuk, hogy ionizáló sugárzás hiányában a két anyag a tesztelt koncentrációkban nem befolyásolta a sejtek életképességét (**3. függelék ábra**).

A viabilitás vizsgálat során tapasztalt rövidtávú hatások mellett az ionizáló sugárzás hosszú távú következményeinek felerősítését is tanulmányoztuk az AuNP+SAHA kombinációs kezeléseket követően. Fontosnak tartjuk kiemelni, hogy az AuNP és a SAHA is a további kísérletekhez kiválasztott alacsony ($6,8\ \mu\text{M}$ AuNP és $0,1\ \mu\text{M}$ SAHA) kezelési koncentrációkban, irradiáció nélkül nem befolyásolták a tumoros sejtek kolóniaformáló képességét, illetve nem voltak genotoxikus hatással a tesztelt tumoros sejtvonalakra. Kísérleteink során kimutattuk, hogy az AuNP és SAHA kombinációban történő alkalmazása ionizáló sugárzás mellett, szignifikánsan csökkenti a sejtek kolóniaformáló képességét mind a külön-külön AuNP- vagy SAHA-kezelt, mind a kezeletlen mintákhoz viszonyítva (**12. és 13. ábra**). Feltételeztük, hogy a tapasztalt viabilitás csökkenés és a kolóniaformáló képesség csökkenésének hátterében az ionizáló sugárzásnak, a keletkező reaktív elektronok és szabadgyökök miatt jelentős mértékben megnövekedett DNS károsító hatása áll. Ezzel összhangban szignifikánsan több DNS kettős szálú törést detektáltunk az AuNP és SAHA együttes kezelésnek kitett, irradiált mintákban, mint a kezeletlen vagy csak AuNP- vagy csak SAHA-kezelt, ionizáló sugárzásnak kitett sejtekben (**14. és 15. ábra**).

A 2D *in vitro* sejtkultúrán elvégzett kísérletek mellett fontosnak tartottuk az AuNP és SAHA együttes radioszenzitizáló hatását megvizsgálni 3D sejtkultúrákon is. Ezekben a rendszerekben (szferoidok, organoidok) nem csak jobban megközelítjük a valós tumorszerkezetet (pl. a sejt-sejt kapcsolatok megfelelnek a reális viszonyoknak), de az így kialakuló sejt-sejt és sejt-extracelluláris mátrix közötti kapcsolatok befolyásolják a tumorsejtek viselkedését, adott esetben a kemo- és sugárterápiára adott válaszát is. Valójában kimutatták már, hogy a 3D kultúrákban a sejtek közötti kontaktusok nagyobb száma és a sejtek által termelt extracelluláris mátrix mennyisége is jelentősebb, mely ténylegesen csökkenti a sejtek terápiás érzékenységet. Ennek a folyamatnak a hátterében integrin mediált jelátviteli utak aktiválódását

feltételezték a jelenséget vizsgáló kutatócsoportok [141,169]. Továbbá, nagyobb mértékű drog- és radiorezisztenciát is megfigyeltek már 3D sejtkultúrák alkalmazása esetén a klasszikus 2D rendszerekben tapasztaltakhoz képest [139,170,171]. Emiatt a tumorellenes szerek hatékonyságának a tesztelésekor mindenképpen előnyös a 3D sejtkultúrák használata, nem csupán azért, mert egy *in vivo* közeli rendszerben vizsgálódunk, hanem mert lehetőség nyílik a valódi tumorokban manifesztálódó hatékonyság csökkenés, esetleges érzéketlenség vagy rezisztencia detektálására is.

A kísérleteink során mi is tapasztaltuk, hogy a 2D sejtkultúrákon alkalmazott AuNP és SAHA dózisokat (6,8 μM AuNP és 0,1 μM SAHA) növelni kellett (34 μM AuNP és 1 μM SAHA) a 3D szferoidokon történő vizsgálatokhoz. Ugyanakkor eredményeink azt mutatták, hogy az AuNP és SAHA kombinációs kezelés a 3D szferoidokat alkotó sejtek kolóniaformáló képességét is szignifikánsan csökkentette irradiációt követően, mind a kezeletlen, mind az AuNP- vagy a SAHA-kezelt mintákhoz viszonyítva. Ez tehát arra enged következtetni, hogy az AuNP+SAHA korábban tapasztalt szinergista radioszenzitizáló hatása 3D rendszerben is manifesztálódik. Amennyiben az AuNP-t és a SAHA-t külön alkalmaztuk, ezek nem befolyásolták szignifikánsan a tumoros sejtek kolóniaképző képességét, ez alól csak az A549 sejtek voltak kivételek. Itt ugyanis a magas sugárdózis hatására mind az AuNP, mind a SAHA szignifikánsan csökkentette a kolóniák számát a kezeletlen, ionizáló sugárzásnak kitett kontrollhoz képest. (16. ábra). Továbbá tanulmányoztuk a DNS kettős szálú törések mennyiségét is, hogy alátámasztják-e az általunk megfigyelt szinergista sugárérzékenyítő hatást. Ezek a kísérletek azt mutatták, hogy a szferoidokat ért ionizáló sugárzás DNS károsító hatása szignifikánsan erősebb volt az AuNP+SAHA kettős kezelt mintákban, mint a kezeletlen, az AuNP vagy SAHA kezelt szferoidokban (17. ábra).

Így tehát elmondható, hogy az AuNP és SAHA kombinációja igen hatásos radioszenzitizáló hatóanyag társulás, tekintve, hogy szinergista módon képesek csökkenteni a tumoros sejtek viabilitását ionizáló sugárzás alkalmazása mellett. Az AuNP és a SAHA közösen képesek az ionizáló sugárzás DNS károsító hatását igen jelentősen felerősíteni, mely hosszú távon a sejtek kolóniaformáló képességének szignifikáns csökkenéséhez vezet az AuNP és SAHA külön-külön történő alkalmazásához viszonyítva. Ezért a két tumorellenes szer kombinációját mindképpen érdemes kihasználni a tumorterápiában, elsősorban a sugárterápia kiegészítőjeként.

Általánosságban elmondhatjuk, hogy a fém nanorészecskék és a hiszton-deacetiláz inhibitorok kombinációban történő alkalmazása ígéretes tumorterápiás lehetőséget nyújt. Amellett, hogy külön-külön alkalmazva is hatékonyak tudnak lenni számos tumortípus eliminálásában, a két szer egymás hatását ki is egészíti. A HDAC gátlók egyik támadáspontja a kromatint alkotó fehérjék acetilációján át a DNS hozzáférhetőségének növelése, ami így kiszolgáltatottabbá válik a különböző károsító hatásoknak. A sejten belüli károsító hatások nagymértékű fokozása megvalósítható lehet ionizáló sugárzással, illetve biológiailag reaktív fém nanorészecskék bejuttatásával is. A nagy rendszámú fémek az ionizáló sugárzás káros hatásait képesek tovább erősíteni, és ez által érzékenyíteni a tumoros sejteket. Eredményeink alapján a jelenség fordítva is igazolható: a fém nanorészecskék önmagukban is képesek a reaktív oxigén szabadgyökök képződésének felerősítésére, főként ionizáló sugárzás alkalmazása mellett, de az így kialakított radioszenzitizáció is tovább növelhető HDAC inhibitorok használatával.

A legfontosabb eredményeink az alábbi pontokban foglalhatóak össze:

1. A tumoros sejtek képesek a fém nanorészecskéket felvenni, amelyek a sejtek citoplazmájában, legtöbbször multivezikuláris testecskékben akkumulálódnak.
2. A fém nanorészecskék intracelluláris jelenléte nem befolyásolja a HDAC inhibitorok működését a tumoros sejtekben, a hisztonfehérjék acetilált állapota kialakul és megmarad AgNP vagy AuNP jelenléte mellett is.
3. Az AgNP-k és a hiszton-deacetiláz inhibitor TSA szinergista módon képesek csökkenteni a tumoros sejtek életképességét.
4. Az AgNP és TSA együttes alkalmazásának eredményeként szignifikánsan megnő a reaktív oxigén szabadgyökök mennyisége, a DNS kettős szálú törések száma, és ezáltal az apoptotizáló tumoros sejtek aránya a kezeletlen, és az önálló AgNP vagy TSA kezelésben részesült sejtekhez viszonyítva.
5. Az AuNP és a HDAC inhibitor SAHA kombinációja szinergista módon csökkenti a tumoros sejtek életképességét és kolóniaformáló képességét ionizáló sugárzást követően.
6. Az ionizáló sugárzás hatására a daganatos sejtekben keletkező DNS kettős szálú törések száma szignifikánsan nagyobb, ha az AuNP-t és SAHA-t együtt alkalmazzuk.

7. Az AuNP és a SAHA hatóanyag kombináció radioszenzitizáló hatása nem csak 2D-ban tenyésztett tumoros sejteken, hanem 3D szferoidokon is kimutatható, mivel a két hatóanyag kombinációs alkalmazása során szignifikánsan csökken a szferoidot alkotó tumoros sejtek kolóniaformáló képessége és megnő a sejtekben a DNS károsodás mértéke az irradiált kontrollhoz és az önálló AuNP vagy SAHA kezelésekhez képest.

8. A HDAC inhibitorok (TSA, SAHA) hatására egy nyitottabb kromatin struktúra alakul ki, mely hozzáférhetőbbé teszi a DNS-t a különféle károsító hatások számára. Ezek a károsító hatások, mint például az ionizáló sugárzás jelentősen fokozhatók AuNP-k alkalmazásával, vagy citotoxikus fém nanorészecskék, mint az AgNP-k, sejtbejuttatása révén.

Összefoglalás

A tumoros megbetegedések kezelésére a klasszikus kemoterápia mellett a sugárterápia a második leggyakrabban használt kezelési mód. Az ionizáló sugárzásra legérzékeny részek a sejtekben a membránstruktúrák és az örökítőanyag. A nagyenergiájú sugárzás képes közvetlenül is, de akár indirekt módon is, reaktív szabadgyökök indukálásán keresztül károsítani a sejtorganelumokat és makromolekulákat.

A fém nanorészecskék tumorelles hatásait és a jelenségek háttérében folyó molekuláris mechanizmusokat napjainkban számos csoport vizsgálja. A nanorészecskék a méretüknél fogva képesek a tumorokat átszövő érálózat endotél rétegének nagyobb átjárhatósága miatt a tumoros szövetben passzívan feldúsulni, így elérhető egy igen jelentős nanorészecske koncentráció a tumoros szövetben.

A biológiában és az orvoslásban legelterjedtebben használt nanopartikulumok az ezüst (AgNP) és az arany nanorészecskék (AuNP). Az ezüst nanorészecskék széles spektrumú antimikrobiális aktivitása mellett, tumorelles hatása is igazolást nyert az elmúlt évek során. Az AgNP trójai falóként képes bejutni a tumoros sejtek citoplazmájába, ahol felszínéről ezüst ionok szabadulnak fel, amelyek genotoxikus hatással bírnak, illetve oxidatív stresszt és apoptózist indukálnak a tumoros sejtekben. Velük ellentétben, az arany nanorészecskéket a szakirodalom igen gyakran biológiailag inertnek tekinti, annak ellenére, hogy képesek a tumorokban az angienezist és a sztróma és a tumor sejtek közötti kommunikációt is gátolni. Emellett, az arany nanorészecskék a tumoros sejteket érzékenyítik a sugárterápia sejtkárosító hatásaira. A nagy energiájú sugárzás a nagy rendszámú fémek atomjaiból, mint az arany atomokból ($Z=79$) elektronokat lökhet ki. Ezek az elektronok, illetve ezek gerjesztése következtében másodlagosan kialakuló Auger kaszkád és a Compton effektus során keletkező, alacsony energiájú reaktív elektronok és további alacsonyabb energiájú, szórt fotonok reakcióba lépnek a vízzel vagy más molekulákkal, melynek eredményeképpen a reaktív szabadgyökök mennyisége tovább növekedhet, majd ezek a reaktív gyökök kárt tehetnek a sejteket és az organelumokat felépítő molekulákban. Ez a láncreakció többszörösen megnöveli az irradáció hatására keletkező reaktív szabadgyökök mennyiségét.

A hiszton-deacetiláz (HDAC) enzimek gátlóinak tumorelles hatását még azelőtt felfedezték, hogy magukat az HDAC enzimeket és azok szerteágazó celluláris hatásait

megismerték volna. A HDAC enzimek megnövekedett expresszióját több tumor típus esetén is leírták már, így magától érthetőnek látszott a HDAC gátlók bevetése a tumorterápia során. A HDAC gátlók alkalmazása vérképző rendszeri tumorok és szolid tumorok esetén is hatékonynak bizonyult. A HDAC inhibitorok számos fehérje szerkezetét és aktivitását befolyásolhatják, hiszen a fehérjék acetilációjának növekedése növelheti azok stabilitását, befolyásolhatja lokalizációjukat, de az acetiláció hatására megnőhet az adott fehérjék DNS kötő affinitása is, amennyiben például transzkripció faktorokról van szó. Emellett a hisztonok acetilációjának jelentős növekedése (hiperacetiláció) megváltoztathatja egyes gének expresszióját és hatására akár nyitottabb kromatin szerkezet is kialakulhat.

Munkánk során fém nanorészecskék és HDAC inhibitorok tumorelles hatását vizsgáltuk *in vitro* sejtvonalakon. Mind az AuNP, mind az AgNP esetében kimutattuk, hogy ezek a részecskék a humán tumoros sejtekbe képesek bejutni és ott felhalmozódni. A HDAC inhibitorok, mint szuberoil-anilid-hidroxámsav (SAHA) és trichostatin A (TSA) alkalmazásának eredményeképpen a hiszton fehérjék acetilációs állapotának növekedését detektáltuk, és ez az emelkedett hiszton acetilációs szint megfigyelhető volt az HDAC inhibitorok fém nanorészecskékkal kombinációban történő alkalmazásakor is. Így megállapítható, hogy a SAHA és a TSA HDAC inhibitorok hatását nem befolyásolta a fém nanorészecskék jelenléte.

Első megközelítésünkben az AgNP és a HDAC gátló TSA közös tumorelles hatását vizsgáltuk HeLa humán cervikális adenokarcinóma sejteken *in vitro*. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az AgNP és a HDAC gátló TSA kombinációban alkalmazva szinergista módon csökkentette a HeLa sejtek életképességét. Több tumoros sejtvonalon is hasonló szinergista együttműködést figyeltünk meg az AgNP és TSA kombinációs kezeléskor, míg a nem tumoros NIH-3T3 sejtvonalon a két szer között antagonist hatást detektáltunk. Az AgNP és TSA kettős kezelés a HeLa sejtek viabilitásán túl azok migrációs aktivitását is befolyásolta. Az AgNP+TSA kettős kezelés hatására szignifikánsan lecsökkent a sejtek migrációs és proliferációs képessége a kezeletlen, és a csak AgNP vagy a csak TSA kezelt mintákhoz viszonyítva.

A HDAC gátló TSA hatására nő a hisztonok acetiláltsága, melyet kimutattunk a H4K5, H4K8 és H3K23 módosult hisztonok detektálása révén, melyek bizonyítékai a kezelés hatására kialakuló relaxált kromatin szerkezet megjelenésének. Emellett a H3K9 trimetilációja csökkent

a kezelések hatására, mely szintén a nyitottabb kromatin struktúra kialakulásáról ad bizonyítékot. Ezek a hiszton módosítások megjelentek az AgNP és TSA kettős kezelések során is, tehát az AgNP jelenléte nem befolyásolta a HDAC inhibitor aktivitását. Megfigyeltük, hogy a TSA kezelés által kialakított relaxáltabb kromatin szerkezet a DNS-t hozzáférhetőbbé teszi az AgNP DNS károsító hatásai számára. Az AgNP kezelés már önmagában is valamelyest növelte a DNS kettős szálú törések számát a kezeletlen mintához képest, de az AgNP és TSA kombinációjának alkalmazása mellett szignifikánsan több DNS kettős szálú törést detektáltunk, mint a csupán AgNP vagy külön TSA kezelt sejtekben.

Tanulmányok alapján az AgNP is és a HDAC inhibitorok is növelik az intracellulárisan keletkező reaktív oxigén szabadgyökök mennyiségét. Az AgNP kezelés esetében kimutatták, hogy a részecskék felszínéről leváló ezüst ionok felelősek az oxidatív stressz kiváltásáért. Kísérleteinkben mind az AgNP, mind a TSA kezelés megnövelte a reaktív oxigén szabadgyökök mennyiségét, illetve kis mértékben nőtt az apoptotizáló sejtek aránya is az AgNP, illetve a TSA individuális expozíciók hatására, de ezekhez képest szignifikánsan nagyobb mértékű oxidatív stresszt és apoptózist detektáltunk a AgNP+TSA kettős kezelt HeLa sejtekben.

A másik kísérleti megközelítésünkben szintén egy fém nanorészecske és egy HDAC gátló anyag, az AuNP és a SAHA, radioszenzitizáló hatását vizsgáltuk A549 tüdő eredetű adenokarcinóma, MCF-7 mellrákos, DU-145 és PC-3 prosztatarákos sejtvonalakon. Ionizáló sugárzás mellett az AuNP és SAHA kettős kezelés szignifikánsan csökkentette a tesztelt tumoros sejtvonalak életképességét nem csak a kontrollhoz, de az AuNP, illetve a SAHA kezelt mintákhoz képest is. Kimutattuk továbbá, hogy az AuNP és SAHA kezelés kombinációban alkalmazva szinergista módon csökkenti a tumoros sejtek viabilitását ionizáló sugárzást követően.

Az ionizáló sugárzás DNS károsító hatása szignifikáns mértékben nőtt a AuNP+SAHA kezelt sejtekben, mely magyarázható azzal, hogy a SAHA kezelés hatására egy nyitottabb kromatin szerkezet alakul ki, mely a DNS-t az azt károsító hatások számára jobban elérhetővé teszi. A DNS-t károsíthatja az ionizáló sugárzás közvetlenül is, illetve közvetve, oxidatív stressz generálásán keresztül is. Az AuNP képes az irradiáció által indukált reaktív szabadgyökök mennyiségét felsokszorozni az Auger és Compton hatásnak köszönhető fizikai felerősítésen keresztül. Az AuNP és SAHA kombinációja az ionizáló sugárzás rövidtávú hatásai mellett, a

hosszútávon érvényesülő kolóniaformáló képességet is befolyásolja. A két szer együttesével történő kezelés 2 és 4 Gy sugárdózissal történő expozíció után szignifikánsan csökkentette a tumoros sejtek által formált kolóniaszámot a kezeletlen és az AuNP vagy SAHA kezelt mintákhoz képest.

Az AuNP és SAHA radioszenzitizáló hatását 3D tumoros sejt kultúrákon is vizsgáltuk. 3D modellben a sejt kultúrát felépítő sejtek alakja, a kialakított sejt-sejt kapcsolatok és a sejt-extracelluláris mátrix (ECM) kapcsolatok száma az *in vivo* rendszerekben található sejtekéhez hasonló. De más jelenségek is megfigyelhetők, mikor a sejtek a megfelelő térbeli morfológiát tudják felvenni, például olyat, amilyen formát a tumorszövetben is magukra öltenek. Például 3D kultúrában növvő tumorsejteknél nagyobb arányú heterokromatinizációt figyeltek meg, mint a klasszikus 2D kultúrákban található kitapadt, lapos formát mutató sejtekben. Ez a heterokromatinizáció befolyásolhatja a sejtek expressziós profilját, illetve a stresszorokra adott válaszukat. A megnövekedett sejt-sejt és sejt-ECM kapcsolatok száma az integrin receptorokon keresztül befolyásolja a sejtek túlélését, osztódását, differenciálódását. Ezek összessége egy emelkedettebb rezisztenciát alakít ki a 3D kultúrában tenyésztett sejtekben, mind az ionizáló sugárzással, mind pedig a kemoterápiás szerekkel szemben. A 3D sejt kultúrák alkalmazása ezért fontos állomás lehet a tumorelles anyagok hatásosságának vizsgálatakor, az *in vitro* és *in vivo* tesztelés között.

A 3D sejt kultúrán végzett kísérleteinkből megállapíthatjuk, hogy a szferoidot alkotó tumoros sejtek kolóniaformáló képessége szignifikánsan csökken az AuNP és SAHA kettős kezelés során, ionizáló sugárzást követően, a kezeletlen és a csak AuNP- vagy csak SAHA-kezelt mintákhoz viszonyítva. Meg kell azonban jegyezni, hogy a szferoidok vizsgálata során az AuNP és SAHA kezelési koncentrációkat meg kellett emelni a 2D sejt kultúrán használtakhoz képest, mely tovább erősíti a 3D sejt kultúrában növvő sejtek eddig is feltételezett, nagyobb mértékű kemo- és radiorezisztens jellegét. Az ionizáló sugárzás DNS károsító hatása szignifikánsan nagyobbak bizonyult az AuNP és SAHA kombinációjával kezelt szferoidokat alkotó sejtekben mind a kontrollhoz, mind pedig az AuNP vagy SAHA kezelt szferoidokban detektált kettős szálú DNS törések számához képest. Így megállapítható, hogy az AuNP és a SAHA kombinációja hatásos radioszenzitizáló együttesnek bizonyul, és a két hatóanyag szinergista aktivitása nem csupán 2D, de 3D sejt kultúrán is manifesztálódik.

Az eredményeink összegzéséül elmondhatjuk, hogy a fém nanorészecskék és a HDAC gátlók együttes alkalmazása a tumorterápia során megnövelheti a kezelés hatásosságát. Az önmagában is tumorelles hatást mutató AgNP és a TSA HDAC gátló szinergista módon csökkentik a tumoros sejtek életképességét. Az AgNP és TSA kezelés szignifikánsan növeli a kiváltott oxidatív stresszt, a DNS károsodás mértékét és az apoptotizáló tumoros sejtek arányát a kezeletlen és a csak AgNP- vagy csak TSA-kezelt tumoros sejteken megfigyelthez viszonyítva.

Az önmagában biológiailag inertnek tekintett AuNP és a klinikai onkológiában már tumorelles hatóanyagként alkalmazott SAHA hiszton-deacetiláz inhibitor együttese növeli az ionizáló sugárzás által kiváltott DNS károsodás mértékét és szignifikánsan csökkenti a sejtek kolóniaképző képességét mind 2D, mind 3D sejt kultúrában növvő tumoros sejtek esetén. Az AuNP és a SAHA szinergista radioszenzitizáló hatása több tumoros sejtvonalon is bizonyítást nyert, így ez a hatóanyag kombináció potenciálisan kihasználható lehet a sugárterápia felerősítésére is.

Summary

Apart from chemotherapy, radiation therapy is one of the most commonly used treatment modalities for malignant cancerous diseases. The most sensitive parts of the cells exposed to ionizing radiation are membrane structures and the genetic material. Thus, high energy irradiation can cause damage in numerous cell organelles and modify macromolecules directly or via indirect effects by inducing the production of reactive oxygen species.

The intrinsic anti-tumor activity and the applicability of metal nanoparticles in oncotherapy have been investigated in recent years by many research groups. One highly advantageous property of nanometer-sized particles employed against tumors is provided by the increased permeability and retention effect, which allows the passive accumulation of nanoparticles in the tumor tissue. This way a massive amount of nanomaterials with or without payloads can be concentrated within the tumor microenvironment. Nevertheless, active targeting, achieved by conjugating certain receptor ligands onto the extremely large specific surface of the particles yields further increases in the intracellular nanoparticle concentration, since these ligands can assist the uptake of the particles (for example by endocytotic mechanisms) into the cancer cells.

The most commonly utilized nanomaterials are silver (AgNP) and gold nanoparticles (AuNP). Although the anti-microbial activity of AgNPs has been known for a while now, the anti-tumor effects of these materials have been highlighted only in recent years. AgNPs can be internalized by tumor cells via various endocytotic routes, along which the particles reach the acidic lysosomal environment, where particle degradation is initiated. Reactive silver ions are released from the surface of AgNPs, which will ultimately cause genotoxic stress, induce oxidative stress, and apoptosis. This mechanism of action, called the trojan horse type mechanism, explains the intrinsic cytotoxic nature of AgNPs.

AuNPs are regarded as biologically inert materials, however, several studies revealed their anti-angiogenetic properties, and it was also shown, that AuNPs can inhibit the paracrine communication between tumor and stroma cells. Apart from these biological activities, AuNPs manifest radiosensitizing effects as well. Radiation with high-energy beams can hit an electron from an inner electron shell of metals with a high atomic number such as gold ($Z=79$). Then the Compton effect and Auger cascade result in the release of secondary, lower energy electrons

and the scatter of secondary photons, which induce the production of reactive oxygen species and increase the harmful cellular effects of irradiation. Therefore, gold nanoparticles within tumor cells offer the possibility to induce cancer cell damage more efficiently and by utilizing lower irradiation doses.

The increased activity and the overexpression of histone deacetylase (HDAC) enzymes were observed in several tumor types, and the anti-tumor activity of HDAC inhibitors was also discovered before the wide range of cellular effects exhibited by HDAC enzymes were completely characterized. Immediately after the mechanistic details of the catalytic activity of this enzyme family was revealed the possible application of HDAC inhibitors in tumor therapy emerged. In fact, HDAC inhibitors were found to be highly effective against hematopoietic and solid tumors. Now it is known that HDAC inhibitors can affect the activity, the stability, and the intracellular localization of various proteins by maintaining acetylated protein forms, and can also modulate the DNA-binding affinity of acetylated transcription factors. Moreover, the hyperacetylation of histone proteins induced by the activity of HDAC inhibitors can influence gene expression and facilitates the formation of a relaxed chromatin structure.

In this study, we investigated the anti-tumor activity of metal nanoparticles (AgNP and AuNP) and HDAC inhibitors used in combination on tumor cell lines *in vitro*. We found that both AuNPs and AgNPs were internalized by the tumor cells. The HDAC inhibitory effect of suberoylanilide-hydroxamic acid (SAHA) and Trichostatin A (TSA) was also tested by detecting the acetylation levels of histone proteins. High amounts of acetylated histones were observed upon HDAC inhibitor treatment, and after combinational treatments using metal nanoparticles and HDAC inhibitors. These results indicated that the presence of metal nanoparticles did not influence the activity of HDAC inhibitors.

In our first study, we investigated the anti-tumor activity of AgNPs and the HDAC inhibitor TSA on HeLa cervical cancer and on other cancerous and non-cancerous cells *in vitro*. According to our results, AgNPs and TSA in combination synergistically decreased the viability of HeLa cells. We observed synergism between AgNPs and TSA on other tumor cell lines as well, while antagonism was detected between the two agents on NIH-3T3 non-tumoral mouse fibroblast cells. Moreover, besides the synergistic viability decrease upon AgNP+TSA exposure, the combinational treatment affected the migration activity of HeLa cells as well. AgNPs and TSA together significantly decreased the migration and the proliferation of HeLa

cells detected by scratch assay compared to the untreated samples and to the AgNP or TSA individual treatments.

HDAC inhibition by TSA increased the acetylation level of histone proteins at the position H4K5, H4K8, and H3K23, which indicated the formation of an opened chromatin structure. Moreover, a decreased level of H3K9 trimethylation was also observed, further demonstrating the presence of a newly established relaxed chromatin structure. These histone modifications were formed also in the case when cells were exposed to both AgNP and TSA, thus we could conclude that AgNPs do not affect the action of TSA during the combinational treatments. We assumed that in an opened chromatin structure the DNA is more vulnerable to the DNA-damaging effects of AgNPs. In fact, although the individual AgNP treatment already led to an increase in the number of DNA double-strand breaks compared to the untreated samples, nevertheless, the AgNP and TSA combinational treatments resulted in significantly more DNA double-strand breaks compared to both untreated conditions and to the AgNP or TSA individual treatments.

Based on the literature, exposure of cells to either AgNP or TSA can lead to an increased amount of intracellular reactive oxygen species (ROS). In our experiments, higher levels of ROS and an augmented number of apoptotic cells were detected upon AgNP and TSA individual exposures compared to the untreated samples. However, oxidative stress and apoptosis were significantly more pronounced after AgNP+TSA treatments of HeLa cells.

In our second study, the combined radiosensitizing effect of AuNPs and the HDAC inhibitor SAHA was investigated on A549 lung adenocarcinoma, MCF-7 breast cancer, DU-145, and PC-3 prostate cancer cell lines. Treatments with AuNP and SAHA combinations followed by exposures to ionizing radiation resulted in significantly decreased viability of the tested tumor cells compared to irradiated control as well as to cells receiving AuNP or SAHA individual treatments and ionizing radiation. Importantly, we observed synergistic radiosensitization between AuNPs and SAHA using them in combination upon viability assays.

The DNA damaging effect of ionizing radiation increased significantly upon AuNP+SAHA combinational treatments due to the opened chromatin structure resulted from SAHA exposures. The ionizing radiation can impair the DNA directly or indirectly via the generation of reactive radicals. AuNPs can physically multiply the number of reactive electrons,

leading to the formation of an extremely high quantity of reactive radicals, which are ready to attack the macromolecules of the tumor cells. Besides the short-term effects, such as reduced cancer cell viability, the AuNP and SAHA combinations can influence the behaviour of tumor cells on the long run, by modulating their colonyforming capabilities. The AuNP+SAHA combinational treatment decreased substantially the number of colonies formed by tumor cells after irradiation by 2 and 4 Gy doses, compared to the untreated, AuNP- or SAHA-treated samples.

The radiosensitizing effect of AuNP and SAHA was investigated on 3D cell cultures as well. In 3D cell cultures the cell shape, the number of cell-cell, and cell-extracellular matrix (ECM) interactions are similar to those found in the *in vivo* systems, which might affect the response of tumor cells to chemo- or radiotherapy. A higher level of heterochromatinization was found in cells with rounded shapes in a 3D structure than in adherent cells with a flat shape found in 2D cell cultures. Cell shape, as well as heterochromatinization, can affect the expression profile and the sensitivity of cells to various stressors. Therefore, the proper cell-cell and cell-ECM interactions in 3D spheroids might determine the survival, proliferation, and differentiation of cancer cells via integrin-mediated processes. All these events result in increased resistance to ionizing radiation and chemotherapeutic agents of cancerous cells growing in 3D cultures. Therefore, the application of 3D cell cultures should be part of the testing strategy between classical 2D *in vitro* and *in vivo* studies upon evaluating the efficiency of potential anti-tumor agents.

In our experiments using 3D cell cultures, we observed a significant decrease in the colonyformation of irradiated cells receiving AuNP and SAHA in combination, compared to the untreated, AuNP- or SAHA-treated counterparts. The DNA damaging effect of ionizing radiation, measured as the number of DNA double-strand breaks was significantly higher after AuNP and SAHA treatment than in the untreated, AuNP-, or SAHA-treated spheroids indicating that AuNP together with SAHA form an effective radiosensitizing combination. It has to be noted, however, that the concentrations of these agents had to be increased from 6.8 μ M AuNP and 0.1 μ M SAHA - used in the 2D cell cultures - to 34 μ M AuNP and 1 μ M SAHA, which demonstrates the higher chemoresistance of cells growing in 3D cell cultures.

To summarize our results, we can conclude that the application of metal nanoparticles and HDAC inhibitors in combination can increase the effectiveness of cancer therapy. AgNPs,

which show an intrinsic anti-tumor activity by themselves, together with the HDAC inhibitor TSA synergistically decreased the viability of tumor cells. The AgNP and TSA combination induced significantly greater oxidative stress, more DNA damage, and a higher level of apoptosis in tumor cells compared to the untreated conditions and to cells exposed to AgNP and TSA individual treatments.

The biologically inert AuNPs and the clinically utilized anti-tumor agent SAHA in combination increased significantly the DNA damaging effect of irradiation, decreased the colonyforming capabilities and the viability of tumor cells both in 2D and 3D cell cultures. The synergistic radiosensitizing effect of AuNPs and SAHA combinational treatment was demonstrated on several tumor cell lines, thus these agents together can be used as highly potent radiosensitizers which enhance synergistically the efficacy of each other upon radiation therapy.

Hivatkozások jegyzéke

- [1] H.F. Lodish, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, D. James, *Molecular Cell Biology*, 7th edition, (2013). 935-955. ISBN 0-7167-4366-3.
- [2] A.M. Lewandowska, M. Rudzki, S. Rudzki, T. Lewandowski, B. Laskowska, Environmental risk factors for cancer - review paper, *Ann. Agric. Environ. Med.* (2019). 26(1):1–7. <https://doi.org/10.26444/aaem/94299>.
- [3] N. Akram, M. Imran, M. Noreen, F. Ahmed, M. Atif, Z. Fatima, A. Bilal Waqar, Oncogenic role of tumor viruses in humans, *Viral Immunol.* (2017). 30(1):20-27. <https://doi.org/10.1089/vim.2016.0109>.
- [4] P.S. Ward, C.B. Thompson, Metabolic reprogramming: A cancer hallmark even Warburg did not anticipate, *Cancer Cell.* (2012). 21(3):297-308. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.014>.
- [5] H.R. Christofk, M.G. Vander Heiden, M.H. Harris, A. Ramanathan, R.E. Gerszten, R. Wei, M.D. Fleming, S.L. Schreiber, L.C. Cantley, The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth, *Nature.* (2008). 452. 230-233. <https://doi.org/10.1038/nature06734>.
- [6] R.J. DeBerardinis, J.J. Lum, G. Hatzivassiliou, C.B. Thompson, The biology of cancer: Metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation, *Cell Metab.* (2008). 7(1):11-20. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.002>.
- [7] F. Weinberg, R. Hamanaka, W.W. Wheaton, S. Weinberg, J. Joseph, M. Lopez, B. Kalyanaraman, G.M. Mutlu, G.R.S. Budinger, N.S. Chandel, Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2010). 107 (19) 8788-8793. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003428107>.
- [8] F. Li, Y. Wang, K.I. Zeller, J.J. Potter, D.R. Wonsey, K.A. O'Donnell, J. Kim, J.T. Yustein, L.A. Lee, C. V. Dang, Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis, *Mol. Cell. Biol.* (2005). 25(14):6225-34. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.14.6225-6234.2005>.
- [9] S. Matoba, J.G. Kang, W.D. Patino, A. Wragg, M. Boehm, O. Gavrilova, P.J. Hurley, F. Bunz, P.M. Hwang, p53 regulates mitochondrial respiration, *Science.* (2006). 312(5780):1650-3. <https://doi.org/10.1126/science.1126863>.
- [10] K. Bensaad, A. Tsuruta, M.A. Selak, M.N.C. Vidal, K. Nakano, R. Bartrons, E. Gottlieb, K.H. Vousden, TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis, *Cell.* (2006). 126(1):107-20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.036>.
- [11] D.F. Quail, J.A. Joyce, Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis, *Nat. Med.* (2013). 19(11):1423-37. <https://doi.org/10.1038/nm.3394>.
- [12] T. Liu, C. Han, S. Wang, P. Fang, Z. Ma, L. Xu, R. Yin, Cancer-associated fibroblasts: An emerging target of anti-cancer immunotherapy, *J. Hematol. Oncol.* (2019). 12(1):86. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0770-1>.

- [13] C. Wei, C. Yang, S. Wang, D. Shi, C. Zhang, X. Lin, Q. Liu, R. Dou, B. Xiong, Crosstalk between cancer cells and tumor associated macrophages is required for mesenchymal circulating tumor cell-mediated colorectal cancer metastasis, *Mol. Cancer*. (2019). 18(1):64. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0976-4>.
- [14] E. Giraudo, M. Inoue, D. Hanahan, An amino-bisphosphonate targets MMP-9 - Expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis, *J. Clin. Invest.* (2004). 114(5):623-33. <https://doi.org/10.1172/JCI200422087>.
- [15] J.W. Pollard, Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis, *Nat. Rev. Cancer*. (2004). 4(1):71-8. <https://doi.org/10.1038/nrc1256>.
- [16] A.B. Pardee, G.S. Stein, *The Biology and Treatment of Cancer: Understanding Cancer*, (2008). ISBN 978-0-470-00958, 9. 155-167. <https://doi.org/10.1002/9780470374252>.
- [17] M. Sanada, Y. Takagi, R. Ito, M. Sekiguchi, Killing and mutagenic actions of dacarbazine, a chemotherapeutic alkylating agent, on human and mouse cells: Effects of Mgmt and Mlh1 mutations, *DNA Repair (Amst)*. (2004). 3(4):413-20. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2003.12.008>.
- [18] Z.H. Siddik, Cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance, *Oncogene*. (2003). 22(47):7265-79. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206933>.
- [19] American Cancer Society, *Chemotherapy drugs : How they work, Understanding the life cycle of a cell*, Am. Cancer Soc. (2015).
- [20] B.N. Cronstein, The mechanism of action of methotrexate, *Rheum. Dis. Clin. North Am.* (1997). 23(4):739-55. [https://doi.org/10.1016/S0889-857X\(05\)70358-6](https://doi.org/10.1016/S0889-857X(05)70358-6).
- [21] D.B. Longley, D.P. Harkin, P.G. Johnston, 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies, *Nat. Rev. Cancer*. (2003). 3(5):330-8. <https://doi.org/10.1038/nrc1074>.
- [22] S.M. Hecht, Bleomycin: New perspectives on the mechanism of action, *J. Nat. Prod.* (2000). 63(1):158-68. <https://doi.org/10.1021/np990549f>.
- [23] A. Duflos, A. Kruczynski, J.M. Barret, Novel aspects of natural and modified Vinca alkaloids, *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents*. (2002). 2(1):55-70. <https://doi.org/10.2174/1568011023354452>.
- [24] V.A. De Weger, J.H. Beijnenb, J.H.M. Schellensa, Cellular and clinical pharmacology of the taxanes docetaxel and paclitaxel -A review, *Anticancer. Drugs*. (2014). 25(5):488-94. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000093>.
- [25] C.F. Thorn, C. Oshiro, S. Marsh, T. Hernandez-Boussard, H. McLeod, T.E. Klein, R.B. Altman, Doxorubicin pathways: Pharmacodynamics and adverse effects, *Pharmacogenet. Genomics*. (2011). 21(7):440-6. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833ffb56>.
- [26] S. Salerno, F. Da Settimo, S. Taliani, F. Simorini, C. La Motta, G. Fornaciari, A. M. Marini, Recent advances in the development of dual topoisomerase I and II inhibitors as Anticancer Drugs, *Curr. Med. Chem.* (2010). 17(35):4270-90.

<https://doi.org/10.2174/092986710793361252>.

- [27] K.J. Gotink, H.M.W. Verheul, Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: What is their mechanism of action?, *Angiogenesis*. (2010). 13(1):1-14. <https://doi.org/10.1007/s10456-009-9160-6>.
- [28] Q. Jiao, L. Bi, Y. Ren, S. Song, Q. Wang, Y. shan Wang, Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance, *Mol. Cancer*. (2018). 17(1):36. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0801-5>.
- [29] N. Ferrara, K.J. Hillan, W. Novotny, Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy, *Biochem. Biophys. Res. Commun*. (2005). 333(2):328-35. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.05.132>.
- [30] S. Ahmed, A. Sami, J. Xiang, HER2-directed therapy: current treatment options for HER2-positive breast cancer, *Breast Cancer*. (2015). 22(2):101-16. <https://doi.org/10.1007/s12282-015-0587-x>.
- [31] L. Chaiswing, H.L. Weiss, R.D. Jayswal, D.K. St. Clair, N. Kyprianou, Profiles of radioresistance mechanisms in prostate cancer, *Crit. Rev. Oncog*. (2018). 23(1-2):39-67. <https://doi.org/10.1615/CritRevOncog.2018025946>.
- [32] N. Chatterjee, G.C. Walker, Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis, *Environ. Mol. Mutagen*. (2017). 58(5):235-263. <https://doi.org/10.1002/em.22087>.
- [33] D. Durocher, S.P. Jackson, DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: Variations on a theme?, *Curr. Opin. Cell Biol*. (2001). 13(2):225-31. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00201-5](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00201-5).
- [34] E. Weterings, D.J. Chen, The endless tale of non-homologous end-joining, *Cell Res*. (2008). 18(1):114-24. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.3>.
- [35] W.D. Wright, S.S. Shah, W.D. Heyer, Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks, *J. Biol. Chem*. (2018). 293(27):10524-10535. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.000372>.
- [36] L.J. Kuo, L.X. Yang, ??-H2AX- A novel biomaker for DNA double-strand breaks, *In Vivo (Brooklyn)*. (2008). 22(3):305-9.
- [37] O.A. Sedelnikova, D.R. Pilch, C. Redon, W.M. Bonner, Histone H2AX in DNA damage and repair, *Cancer Biol. Ther*. (2003). 2(3):233-5. <https://doi.org/10.4161/cbt.2.3.373>.
- [38] D. Chowdhury, M.C. Keogh, H. Ishii, C.L. Peterson, S. Buratowski, J. Lieberman, γ -H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair, *Mol. Cell*. (2005). 20(5):801-9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.10.003>.
- [39] J.H. Houtgraaf, J. Versmissen, W.J. van der Giessen, A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells, *Cardiovasc. Revascularization Med*. (2006). 7(3):165-72. <https://doi.org/10.1016/j.carrev.2006.02.002>.
- [40] F. Pajonk, E. Vlashi, W.H. McBride, Radiation resistance of cancer stem cells: The 4

- R's of radiobiology revisited, *Stem Cells*. (2010). 28(4):639-48. <https://doi.org/10.1002/stem.318>.
- [41] A.E. Nahum, B. Movsas, E.M. Horwitz, C.C. Stobbe, J.D. Chapman, Incorporating clinical measurements of hypoxia into tumor local control modeling of prostate cancer: Implications for the α/β ratio, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* (2003). 57(2):391-401. [https://doi.org/10.1016/S0360-3016\(03\)00534-0](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(03)00534-0).
 - [42] M. Diehn, R.W. Cho, N.A. Lobo, T. Kalisky, M.J. Dorie, A.N. Kulp, D. Qian, J.S. Lam, L.E. Ailles, M. Wong, B. Joshua, M.J. Kaplan, I. Wapnir, F.M. Dirbas, G. Somlo, C. Garberoglio, B. Paz, J. Shen, S.K. Lau, S.R. Quake, J.M. Brown, I.L. Weissman, M.F. Clarke, Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells, *Nature*. (2009). 458(7239):780-3. <https://doi.org/10.1038/nature07733>.
 - [43] S. Zhou, W. Ye, Q. Shao, M. Zhang, J. Liang, Nrf2 is a potential therapeutic target in radioresistance in human cancer, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* (2013). 88(3):706-15. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.09.001>.
 - [44] N. McDermott, A. Meunier, B. Mooney, G. Nortey, C. Hernandez, S. Hurley, N. Lynam-Lennon, S.H. Barsoom, K.J. Bowman, B. Marples, G.D.D. Jones, L. Marignol, Fractionated radiation exposure amplifies the radioresistant nature of prostate cancer cells, *Sci. Rep.* (2016). 6:34796. <https://doi.org/10.1038/srep34796>.
 - [45] M. Montanari, S. Rossetti, C. Cavaliere, C. D'Aniello, M.G. Malzone, D. Vanacore, R. Di Franco, E. La Mantia, G. Iovane, R. Piscitelli, R. Muscariello, M. Berretta, S. Perdonà, P. Muto, G. Botti, A.A.M. Bianchi, B.M. Veneziani, G. Facchini, Epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer: An overview, *Oncotarget*. (2017). 8(21):35376-35389. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15686>.
 - [46] K.H. Cho, M.J. Choi, K.J. Jeong, J.J. Kim, M.H. Hwang, S.C. Shin, C.G. Park, H.Y. Lee, A ROS/STAT3/HIF-1 α signaling cascade mediates EGF-induced TWIST1 expression and prostate cancer cell invasion, *Prostate*. (2014). 74(5):528-36. <https://doi.org/10.1002/pros.22776>.
 - [47] J. Theys, B. Jutten, R. Habets, K. Paesmans, A.J. Groot, P. Lambin, B.G. Wouters, G. Lammering, M. Vooijs, E-Cadherin loss associated with EMT promotes radioresistance in human tumor cells, *Radiother. Oncol.* (2011). 99(3):392-397. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2011.05.044>.
 - [48] N. McDermott, A. Meunier, T.H. Lynch, D. Hollywood, L. Marignol, Isogenic radiation resistant cell lines: Development and validation strategies, *Int. J. Radiat. Biol.* (2014). 90(2):115-26. <https://doi.org/10.3109/09553002.2014.873557>.
 - [49] W.K. Sinclair, Cyclic X-ray responses in mammalian cells in vitro, *Radiat. Res.* (2012). 178(2):AV112-24. <https://doi.org/10.1667/RRAV09.1>.
 - [50] T.M. Pawlik, K. Keyomarsi, Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* (2004). 59(4):928-42. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2004.03.005>.
 - [51] F. Wenz, S. Greiner, F. Germa, K. Mayer, D. Latz, K.J. Weber, Radiochemotherapy with

- paclitaxel: Synchronization effects and the role of p53, *Strahlentherapie Und Onkol.* (1999). 175 Suppl 3:2-6. <https://doi.org/10.1007/bf03215919>.
- [52] G. Romero, S.E. Moya, Synthesis of organic nanoparticles, *Front. Nanosci.*, (2012). 4(1):115-141. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415769-9.00004-2>.
- [53] C. Núñez, S.V. Estévez, M. del Pilar Chantada, Inorganic nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer, *J. Biol. Inorg. Chem.* (2018). 23(3):331-345. <https://doi.org/10.1007/s00775-018-1542-z>.
- [54] S. Bayda, M. Hadla, S. Palazzolo, P. Riello, G. Corona, G. Toffoli, F. Rizzolio, Inorganic nanoparticles for cancer therapy: A transition from lab to clinic, *Curr. Med. Chem.* (2017). 25(34):4269-4303. <https://doi.org/10.2174/0929867325666171229141156>.
- [55] W.H. De Jong, W.I. Hagens, P. Krystek, M.C. Burger, A.J.A.M. Sips, R.E. Geertsma, Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration, *Biomaterials.* (2008). 29(12):1912-9. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.12.037>.
- [56] E. Blanco, H. Shen, M. Ferrari, Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery, *Nat. Biotechnol.* (2015). 33(9):941-51. <https://doi.org/10.1038/nbt.3330>.
- [57] H. Kobayashi, R. Watanabe, P.L. Choyke, Improving conventional enhanced permeability and retention (EPR) effects; What is the appropriate target?, *Theranostics.* (2014). 4(1):81-9. <https://doi.org/10.7150/thno.7193>.
- [58] M.B. Fish, A.J. Thompson, C.A. Fromen, O. Eniola-Adefeso, Emergence and utility of nonspherical particles in biomedicine, *Ind. Eng. Chem. Res.* (2015). 54(16):4043-4059. <https://doi.org/10.1021/ie504452j>.
- [59] M.R. Dreher, W. Liu, C.R. Michelich, M.W. Dewhirst, F. Yuan, A. Chilkoti, Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers, *J. Natl. Cancer Inst.* (2006). 98(5):335-44. <https://doi.org/10.1093/jnci/djj070>.
- [60] K. Park, Polysaccharide-based near-infrared fluorescence nanoprobe for cancer diagnosis., *Quant. Imaging Med. Surg.* (2012). 2(2):106-13. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4292.2012.05.01>.
- [61] B. Kim, G. Han, B.J. Toley, C.K. Kim, V.M. Rotello, N.S. Forbes, Tuning payload delivery in tumour cylindroids using gold nanoparticles, *Nat. Nanotechnol.* (2010). 5(6):465-72. <https://doi.org/10.1038/nnano.2010.58>.
- [62] D.R. Elias, A. Poloukhine, V. Popik, A. Tsourkas, Effect of ligand density, receptor density, and nanoparticle size on cell targeting, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* (2013). 9(2):194-201. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.05.015>.
- [63] P. Malik, T.K. Mukherjee, Recent advances in gold and silver nanoparticle based therapies for lung and breast cancers, *Int. J. Pharm.* (2018). 553(1-2):483-509. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.10.048>.
- [64] P.M. Valencia, M.H. Hanewich-Hollatz, W. Gao, F. Karim, R. Langer, R. Karnik, O.C.

- Farokhzad, Effects of ligands with different water solubilities on self-assembly and properties of targeted nanoparticles, *Biomaterials*. (2011). 32(26):6226-33. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.04.078>.
- [65] S. Loibl, L. Gianni, HER2-positive breast cancer, *Lancet*. (2017). 389(10087):2415-2429. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32417-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32417-5).
- [66] Y.G. Assaraf, C.P. Leamon, J.A. Reddy, The folate receptor as a rational therapeutic target for personalized cancer treatment, *Drug Resist. Updat*. (2014). 17(4-6):89-95. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2014.10.002>.
- [67] T. Ignatov, M. Claus, N. Nass, J. Haybaeck, B. Seifert, T. Kalinski, O. Ortmann, A. Ignatov, G-protein-coupled estrogen receptor GPER-1 expression in hormone receptor-positive breast cancer is associated with poor benefit of tamoxifen, *Breast Cancer Res. Treat*. (2019). 174(1):121-127. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-5064-8>.
- [68] S. Marin, G. Vlasceanu, R. Tiplea, I. Bucur, M. Lemnaru, M. Marin, A. Grumezescu, Applications and toxicity of silver nanoparticles: A recent review, *Curr. Top. Med. Chem*. (2015). 15(16):1596-604. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150414142209>.
- [69] I. Sondi, B. Salopek-Sondi, Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria, *J. Colloid Interface Sci*. (2004). 275(1):177-82. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.012>.
- [70] X.F. Zhang, Z.G. Liu, W. Shen, S. Gurunathan, Silver nanoparticles: Synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches, *Int. J. Mol. Sci*. (2016). 17(9):1534. <https://doi.org/10.3390/ijms17091534>.
- [71] K. Shameli, M.B. Ahmad, S.D. Jazayeri, P. Shabanzadeh, P. Sangpour, H. Jahangirian, Y. Gharayebi, Investigation of antibacterial properties silver nanoparticles prepared via green method, *Chem. Cent. J*. (2012). 6(1):73. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-6-73>.
- [72] Y. Yang, G. Xu, J. Liang, Y. He, L. Xiong, H. Li, D. Bartlett, Z. Deng, Z. Wang, X. Xiao, DNA backbone sulfur-modification expands microbial growth range under multiple stresses by its anti-oxidation function /631/326 /631/337 article, *Sci. Rep*. (2017). 7(1):3516. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02445-1>.
- [73] N. Durán, P.D. Marcato, R. De Conti, O.L. Alves, F.T.M. Costa, M. Brocchi, Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action, *J. Braz. Chem. Soc*. (2010). 21(6):949-959. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532010000600002>.
- [74] S. Shrivastava, T. Bera, A. Roy, G. Singh, P. Ramachandrarao, D. Dash, Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles, *Nanotechnology*. (2007). 18(22):225103. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/18/22/225103>.
- [75] Z.M. Xiu, Q.B. Zhang, H.L. Puppala, V.L. Colvin, P.J.J. Alvarez, Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles, *Nano Lett*. (2012). 12(8):4271-5. <https://doi.org/10.1021/nl301934w>.

- [76] Y.G. Yuan, Q.L. Peng, S. Gurunathan, Effects of silver nanoparticles on multiple drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from mastitis-infected goats: An alternative approach for antimicrobial therapy, *Int. J. Mol. Sci.* (2017). 18(3):569. <https://doi.org/10.3390/ijms18030569>.
- [77] S. Liao, Y. Zhang, X. Pan, F. Zhu, C. Jiang, Q. Liu, Z. Cheng, G. Dai, G. Wu, L. Wang, L. Chen, Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against multidrug-resistant *pseudomonas aeruginosa*, *Int. J. Nanomedicine.* (2019). 14:1469-1487. <https://doi.org/10.2147/IJN.S191340>.
- [78] I.A.J. van Hengel, M. Riool, L.E. Fratila-Apachitei, J. Witte-Bouma, E. Farrell, A.A. Zadpoor, S.A.J. Zaat, I. Apachitei, Selective laser melting porous metallic implants with immobilized silver nanoparticles kill and prevent biofilm formation by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Biomaterials.* (2017). 140:1-15. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.02.030>.
- [79] E.J. Park, J. Yi, Y. Kim, K. Choi, K. Park, Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism, *Toxicol. Vit.* (2010). 24(3):872-8. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.12.001>.
- [80] P. V. AshaRani, M.P. Hande, S. Valiyaveetil, Anti-proliferative activity of silver nanoparticles, *BMC Cell Biol.* (2009). 10:65. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-10-65>.
- [81] T. Miyayama, M. Matsuoka, Involvement of lysosomal dysfunction in silver nanoparticle-induced cellular damage in A549 human lung alveolar epithelial cells, *J. Occup. Med. Toxicol.* (2016). 11:1. <https://doi.org/10.1186/s12995-016-0090-0>.
- [82] S.T. Stern, P.P. Adiseshaiah, R.M. Crist, Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity, *Part. Fibre Toxicol.* (2012). 9:20. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-9-20>.
- [83] S. Yesilot, C. Aydin, Silver nanoparticles; a new hope in cancer therapy?, *East. J. Med.* (2019). 24(1):111-116. <https://doi.org/10.5505/ejm.2019.66487>.
- [84] G. Kroemer, M. Jäättelä, Lysosomes and autophagy in cell death control, *Nat. Rev. Cancer.* (2005). 5(11):886-97. <https://doi.org/10.1038/nrc1738>.
- [85] J.H. Quan, F.F. Gao, M. Lee, J.M. Yuk, G.H. Cha, J.Q. Chu, H. Wang, Y.H. Lee, Involvement of endoplasmic reticulum stress response and IRE1-mediated ASK1/JNK/Mcl-1 pathways in silver nanoparticles-induced apoptosis of human retinal pigment epithelial cells, *Toxicology.* (2020). 442:152540. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2020.152540>.
- [86] X. Guo, Y. Li, J. Yan, T. Ingle, M.Y. Jones, N. Mei, M.D. Boudreau, C.K. Cunningham, M. Abbas, A.M. Paredes, T. Zhou, M.M. Moore, P.C. Howard, T. Chen, Size- and coating-dependent cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using in vitro standard assays, *Nanotoxicology.* (2016). 10(9):1373-84. <https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1214764>.
- [87] P. Carmeliet, R.K. Jain, Angiogenesis in cancer and other diseases, *Nature.* (2000). 407(6801):249-57. <https://doi.org/10.1038/35025220>.

- [88] S. Gurunathan, K.J. Lee, K. Kalishwaralal, S. Sheikpranbabu, R. Vaidyanathan, S.H. Eom, Antiangiogenic properties of silver nanoparticles, *Biomaterials*. (2009). 30(31):6341-50. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.08.008>.
- [89] D. Kovács, N. Igaz, C. Keskeny, P. Béteky, T. Tóth, R. Gáspár, D. Madarász, Z. Rázga, Z. Kónya, I.M. Boros, M. Kiricsi, Silver nanoparticles defeat p53-positive and p53-negative osteosarcoma cells by triggering mitochondrial stress and apoptosis, *Sci. Rep.* (2016). 6:27902. <https://doi.org/10.1038/srep27902>.
- [90] D. Kovács, K. Szoke, N. Igaz, G. Spengler, J. Molnár, T. Tóth, D. Madarász, Z. Rázga, Z. Kónya, I.M. Boros, M. Kiricsi, Silver nanoparticles modulate ABC transporter activity and enhance chemotherapy in multidrug resistant cancer, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* (2016). 12(3):601-610. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.10.015>.
- [91] M.K. Gopisetty, D. Kovács, N. Igaz, A. Rónavári, P. Béteky, Z. Rázga, V. Venglovecz, B. Csoboz, I.M. Boros, Z. Kónya, M. Kiricsi, Endoplasmic reticulum stress: Major player in size-dependent inhibition of P-glycoprotein by silver nanoparticles in multidrug-resistant breast cancer cells, *J. Nanobiotechnology*. (2019). 17(1):9. <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0448-4>.
- [92] J.R. Nicol, D. Dixon, J.A. Coulter, Gold nanoparticle surface functionalization: A necessary requirement in the development of novel nanotherapeutics, *Nanomedicine*. (2015). 10(8):1315-26. <https://doi.org/10.2217/nmm.14.219>.
- [93] C.M. Copley, J. Chen, E.C. Cho, L. V. Wang, Y. Xia, Gold nanostructures: A class of multifunctional materials for biomedical applications, *Chem. Soc. Rev.* (2011). 40(1):44-56. <https://doi.org/10.1039/b821763g>.
- [94] X. Ma, Y. Wu, S. Jin, Y. Tian, X. Zhang, Y. Zhao, L. Yu, X.J. Liang, Gold nanoparticles induce autophagosome accumulation through size-dependent nanoparticle uptake and lysosome impairment, *ACS Nano*. (2011). 5(11):8629-39. <https://doi.org/10.1021/nn202155y>.
- [95] X. Yang, M. Yang, B. Pang, M. Vara, Y. Xia, Gold nanomaterials at work in biomedicine, *Chem. Rev.* (2015). 115(19):10410-88. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00193>.
- [96] Y. Liu, P. Zhang, F. Li, X. Jin, J. Li, W. Chen, Q. Li, Metal-based nanoenhancers for future radiotherapy: Radiosensitizing and synergistic effects on tumor cells, *Theranostics*. (2018). 8(7):1824-1849. <https://doi.org/10.7150/thno.22172>.
- [97] S. Her, D.A. Jaffray, C. Allen, Gold nanoparticles for applications in cancer radiotherapy: Mechanisms and recent advancements, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2017). 109:84-101. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.12.012>.
- [98] H. Nikjoo, D. Emfietzoglou, D.E. Charlton, The Auger effect in physical and biological research, *Int. J. Radiat. Biol.*, (2008). 84(12):1011-26. <https://doi.org/10.1080/09553000802460172>.
- [99] D.M. Herold, I.J. Das, C.C. Stobbe, R. V. Iyer, J.D. Chapman, Gold microspheres: A

- selective technique for producing biologically effective dose enhancement, *Int. J. Radiat. Biol.* (2000). 76(10):1357-64. <https://doi.org/10.1080/09553000050151637>.
- [100] Y. Pan, A. Leifert, D. Ruau, S. Neuss, J. Bornemann, G. Schmid, W. Brandau, U. Simon, W. Jahnen-Dechent, Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage, *Small.* (2009). 5(18):2067-76. <https://doi.org/10.1002/sml.200900466>.
- [101] J.R. Melamed, R.S. Riley, D.M. Valcourt, E.S. Day, Using gold nanoparticles to disrupt the tumor microenvironment: An emerging therapeutic strategy, *ACS Nano.* (2016). 10(12):10631-10635. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b07673>.
- [102] S. Saha, X. Xiong, P.K. Chakraborty, K. Shameer, R.R. Arvizo, R.A. Kudgus, S.K.D. Dwivedi, M.N. Hossen, E.M. Gillies, J.D. Robertson, J.T. Dudley, R.A. Urrutia, R.G. Postier, R. Bhattacharya, P. Mukherjee, Gold nanoparticle reprograms pancreatic tumor microenvironment and inhibits tumor growth, *ACS Nano.* (2016). 10(12):10636-10651. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b02231>.
- [103] R.R. Arvizo, S. Rana, O.R. Miranda, R. Bhattacharya, V.M. Rotello, P. Mukherjee, Mechanism of anti-angiogenic property of gold nanoparticles: Role of nanoparticle size and surface charge, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* (2011). 7(5):580-7. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.01.011>.
- [104] A. Drazic, L.M. Myklebust, R. Ree, T. Arnesen, The world of protein acetylation, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* (2016). 1864(10):1372-401. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.06.007>.
- [105] K.E. Wellen, G. Hatzivassiliou, U.M. Sachdeva, T. V. Bui, J.R. Cross, C.B. Thompson, ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation, *Science.* (2009). 324(5930):1076-80. <https://doi.org/10.1126/science.1164097>.
- [106] S. Peleg, C. Feller, A.G. Ladurner, A. Imhof, The metabolic impact on histone acetylation and transcription in ageing, *Trends Biochem. Sci.* (2016). 41(8):700-711. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.05.008>.
- [107] W.G. Kaelin, S.L. McKnight, Influence of metabolism on epigenetics and disease, *Cell.* (2013). 153(1):56-69. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.004>.
- [108] P. Gut, E. Verdin, The nexus of chromatin regulation and intermediary metabolism, *Nature.* (2013). 502(7472):489-98. <https://doi.org/10.1038/nature12752>.
- [109] Y. Zeng, M. Tan, J. Kohyama, M. Sneddon, J.B. Watson, Y.E. Sun, C.W. Xie, Epigenetic enhancement of BDNF signaling rescues synaptic plasticity in aging, *J. Neurosci.* (2011). 31(49):17800-10. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3878-11.2011>.
- [110] S. Peleg, F. Sananbenesi, A. Zovoilis, S. Burkhardt, S. Bahari-Javan, R.C. Agis-Balboa, P. Cota, J.L. Wittnam, A. Gogol-Doering, L. Opitz, G. Salinas-Riester, M. Dettenhofer, H. Kang, L. Farinelli, W. Chen, A. Fischer, Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice, *Science.* (2010). 328(5979):753-6. <https://doi.org/10.1126/science.1186088>.

- [111] T. Abel, R.S. Zukin, Epigenetic targets of HDAC inhibition in neurodegenerative and psychiatric disorders, *Curr. Opin. Pharmacol.* (2008). 8(1):57-64. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2007.12.002>.
- [112] M. Peifer, L. Fernández-Cuesta, M.L. Sos, J. George, D. Seidel, L.H. Kasper, D. Plenker, F. Leenders, R. Sun, T. Zander, R. Menon, M. Koker, I. Dahmen, C. Müller, V. Di Cerbo, H.U. Schildhaus, J. Altmüller, I. Baessmann, C. Becker, B. De Wilde, J. Vandesompele, D. Böhm, S. Ansén, F. Gabler, I. Wilkening, S. Heynck, J.M. Heuckmann, X. Lu, S.L. Carter, K. Cibulskis, S. Banerji, G. Getz, K.S. Park, D. Rauh, C. Grütter, M. Fischer, L. Pasqualucci, G. Wright, Z. Wainer, P. Russell, I. Petersen, Y. Chen, E. Stoelben, C. Ludwig, P. Schnabel, H. Hoffmann, T. Muley, M. Brockmann, W. Engel-Riedel, L.A. Muscarella, V.M. Fazio, H. Groen, W. Timens, H. Sietsma, E. Thunnissen, E. Smit, D.A.M. Heideman, P.J.F. Snijders, F. Cappuzzo, C. Ligorio, S. Damiani, J. Field, S. Solberg, O.T. Brustugun, M. Lund-Iversen, J. Sängler, J.H. Clement, A. Soltermann, H. Moch, W. Weder, B. Solomon, J.C. Soria, P. Validire, B. Besse, E. Brambilla, C. Brambilla, S. Lantuejoul, P. Lorimier, P.M. Schneider, M. Hallek, W. Pao, M. Meyerson, J. Sage, J. Shendure, R. Schneider, R. Büttner, J. Wolf, P. Nürnberg, S. Perner, L.C. Heukamp, P.K. Brindle, S. Haas, R.K. Thomas, Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer, *Nat. Genet.* (2012). 44(10):1104-10. <https://doi.org/10.1038/ng.2396>.
- [113] W. Weichert, HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies, *Cancer Lett.* (2009). 280(2):168-76. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.10.047>.
- [114] J. Suzuki, Y.Y. Chen, G.K. Scott, S. DeVries, K. Chin, C.C. Benz, F.M. Waldman, E.S. Hwang, Protein acetylation and histone deacetylase expression associated with malignant breast cancer progression, *Clin. Cancer Res.* (2009). 15(9):3163-71. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2319>.
- [115] M.F. Fraga, E. Ballestar, A. Villar-Garea, M. Boix-Chornet, J. Espada, G. Schotta, T. Bonaldi, C. Haydon, S. Ropero, K. Petrie, N.G. Iyer, A. Pérez-Rosado, E. Calvo, J.A. Lopez, A. Cano, M.J. Calasanz, D. Colomer, M.Á. Piris, N. Ahn, A. Imhof, C. Caldas, T. Jenuwein, M. Esteller, Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer, *Nat. Genet.* (2005). 37(4):391-400. <https://doi.org/10.1038/ng1531>.
- [116] R.J. Lin, D.A. Egan, R.M. Evans, Molecular genetics of acute promyelocytic leukemia, *Trends Genet.* (1999). 15(5):179-84. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(99\)01710-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(99)01710-2).
- [117] L. Di Croce, V.A. Raker, M. Corsaro, F. Fazi, M. Fanelli, M. Faretta, F. Fuks, F. Lo Coco, T. Kouzarides, C. Nervi, S. Minucci, P.G. Pelicci, Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor, *Science*. (2002). 295(5557):1079-82. <https://doi.org/10.1126/science.1065173>.
- [118] A. Insinga, P.G. Pelicci, S. Minucci, Leukemia-associated fusion proteins: Multiple mechanisms of action to drive cell transformation, *Cell Cycle*. (2005). 4(1):67-9. <https://doi.org/10.4161/cc.4.1.1400>.
- [119] S. Minucci, C. Nervi, F. Lo Coco, P.G. Pelicci, Histone deacetylases: A common molecular target for differentiation treatment of acute myeloid leukemias?, *Oncogene*.

- (2001). 20(24):3110-5. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204336>.
- [120] S. Minucci, P.G. Pelicci, Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer, *Nat. Rev. Cancer.* (2006). 6(1):38-51. <https://doi.org/10.1038/nrc1779>.
 - [121] A.M. Bode, Z. Dong, Post-translational modification of p53 in tumorigenesis, *Nat. Rev. Cancer.* (2004). 4(10):793-805. <https://doi.org/10.1038/nrc1455>.
 - [122] H.Y. Cohen, S. Lavu, K.J. Bitterman, B. Hekking, T.A. Imahiyerobo, C. Miller, R. Frye, H. Ploegh, B.M. Kessler, D.A. Sinclair, Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis, *Mol. Cell.* (2004). 13(5):627-38. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(04\)00094-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00094-2).
 - [123] A. Leder, S. Orkin, P. Leder, Differentiation of erythroleukemic cells in the presence of inhibitors of DNA synthesis, *Science.* (1975). 190(4217):893-4. <https://doi.org/10.1126/science.1059262>.
 - [124] M.G. Riggs, R.G. Whittaker, J.R. Neumann, V.M. Ingram, n-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells, *Nature.* (1977). 268(5619):462-4. <https://doi.org/10.1038/268462a0>.
 - [125] B.S. Mann, J.R. Johnson, M.H. Cohen, R. Justice, R. Pazdur, FDA Approval Summary: Vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-Cell lymphoma, *Oncologist.* (2007). 12(10):1247-52. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.12-10-1247>.
 - [126] W. Rasheed, M. Bishton, R.W. Johnston, H.M. Prince, Histone deacetylase inhibitors in lymphoma and solid malignancies, *Expert Rev. Anticancer Ther.* (2008). 8(3):413-32. <https://doi.org/10.1586/14737140.8.3.413>.
 - [127] M.S. Finnin, J.R. Donigian, A. Cohen, V.M. Richon, R.A. Rifkind, P.A. Marks, R. Breslow, N.P. Pavletich, Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors, *Nature.* (1999). 401(6749):188-93. <https://doi.org/10.1038/43710>.
 - [128] A.A. Lane, B.A. Chabner, Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy, *J. Clin. Oncol.* (2009). 27(32):5459-68. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.22.1291>.
 - [129] M. Manal, M.J.N. Chandrasekar, J. Gomathi Priya, M.J. Nanjan, Inhibitors of histone deacetylase as antitumor agents: A critical review, *Bioorg. Chem.* (2016). 67:18-42. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.05.005>.
 - [130] M. Porcu, A. Chiarugi, The emerging therapeutic potential of sirtuin-interacting drugs: From cell death to lifespan extension, *Trends Pharmacol. Sci.* (2005). 26(2):94-103. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.12.009>.
 - [131] K. Camphausen, W. Burgan, M. Cerra, K.A. Oswald, J.B. Trepel, M.J. Lee, P.J. Tofilon, Enhanced radiation-induced cell killing and prolongation of γ H2AX foci expression by the histone deacetylase inhibitor MS-275, *Cancer Res.* (2004). 64(1):316-21. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-2630>.
 - [132] A. Munshi, J.F. Kurland, T. Nishikawa, T. Tanaka, M.L. Hobbs, S.L. Tucker, S. Ismail,

- C. Stevens, R.E. Meyn, Histone deacetylase inhibitors radiosensitize human melanoma cells by suppressing DNA repair activity, *Clin. Cancer Res.* (2005). 11(13):4912-22. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2088>.
- [133] Y. Shao, Z. Gao, P.A. Marks, X. Jiang, Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2004). 101(52):18030-5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408345102>.
- [134] J.A. Vrana, R.H. Decker, C.R. Johnson, Z. Wang, W.D. Jarvis, V.M. Richon, M. Ehinger, P.B. Fisher, S. Grant, Induction of apoptosis in U937 human leukemia cells by suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) proceeds through pathways that are regulated by Bcl-2/Bcl-x(L), c-Jun, and p21(CIP1), but independent of p53, *Oncogene.* (1999). 18(50):7016-25. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203176>.
- [135] L.M. Butler, D.B. Agus, H.I. Scher, B. Higgins, A. Rose, C. Cordon-Cardo, H.T. Thaler, R.A. Rifkind, P.A. Marks, V.M. Richon, Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, suppresses the growth of prostate cancer cells in vitro and in vivo, *Cancer Res.* (2000). 60(18):5165-70.
- [136] K. Camphausen, P.J. Tofilon, Inhibition of histone deacetylation: A strategy for tumor radiosensitization, *J. Clin. Oncol.* (2007). 25(26):4051-6. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.11.6202>.
- [137] M. Ravi, V. Paramesh, S.R. Kaviya, E. Anuradha, F.D. Paul Solomon, 3D cell culture systems: Advantages and applications, *J. Cell. Physiol.* (2015). 230(1):16-26. <https://doi.org/10.1002/jcp.24683>.
- [138] J. Le Beyec, R. Xu, S.Y. Lee, C.M. Nelson, A. Rizki, J. Alcaraz, M.J. Bissell, Cell shape regulates global histone acetylation in human mammary epithelial cells, *Exp. Cell Res.* (2007). 313(14):3066-75. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.04.022>.
- [139] K. Storch, I. Eke, K. Borgmann, M. Krause, C. Richter, K. Becker, E. Schröck, N. Cordes, Three-dimensional cell growth confers radioresistance by chromatin density modification, *Cancer Res.* (2010). 70(10):3925-34. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3848>.
- [140] C. Beinke, D. Van Beuningen, N. Cordes, Ionizing radiation modules of the expression and tyrosine phosphorylation of the focal adhesion-associated proteins focal adhesion kinase (FAK) and its substrates p130cas and paxillin in A549 human lung carcinoma cells in vitro, *Int. J. Radiat. Biol.* (2003). 79(9):721-31. <https://doi.org/10.1080/09553000310001610231>.
- [141] L. Moro, M. Venturino, C. Bozzo, L. Silengo, F. Altruda, L. Beguinot, G. Tarone, P. Defilippi, Integrins induce activation of EGF receptor: Role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival, *EMBO J.* (1998). 17(22):6622-32. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.22.6622>.
- [142] I. Eke, N. Cordes, Radiobiology goes 3D: How ECM and cell morphology impact on cell survival after irradiation, *Radiother. Oncol.* (2011). 99(3):271-8. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2011.06.007>.

- [143] A.R. Gliga, S. Skoglund, I. Odnevall Wallinder, B. Fadeel, H.L. Karlsson, Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: The role of cellular uptake, agglomeration and Ag release, *Part. Fibre Toxicol.* (2014). 11:11. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-11-11>.
- [144] Y. Dou, Y. Guo, X. Li, X. Li, S. Wang, L. Wang, G. Lv, X. Zhang, H. Wang, X. Gong, J. Chang, Size-tuning ionization to optimize gold nanoparticles for simultaneous enhanced CT imaging and radiotherapy, *ACS Nano.* (2016). 10(2):2536-48. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b07473>.
- [145] Y. Wan, Z. Guo, X. Jiang, K. Fang, X. Lu, Y. Zhang, N. Gu, Quasi-spherical silver nanoparticles: Aqueous synthesis and size control by the seed-mediated Lee-Meisel method, *J. Colloid Interface Sci.* (2013). 394:263-8. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.12.037>.
- [146] T.C. Chou, Drug combination studies and their synergy quantification using the choutalalay method, *Cancer Res.* (2010). 70(2):440-6. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1947>.
- [147] J.S. Becker, D. Nicetto, K.S. Zaret, H3K9me3-Dependent Heterochromatin: Barrier to Cell Fate Changes, *Trends Genet.* (2016). 32(1):29-41. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.11.001>.
- [148] A.J. Bannister, P. Zegerman, J.F. Partridge, E.A. Miska, J.O. Thomas, R.C. Allshire, T. Kouzarides, Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain, *Nature.* (2001). 410(6824):120-4. <https://doi.org/10.1038/35065138>.
- [149] S. Kim, J.E. Choi, J. Choi, K.H. Chung, K. Park, J. Yi, D.Y. Ryu, Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells, *Toxicol. Vit.* (2009). 23(6):1076-84. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.06.001>.
- [150] F. Sultana, K.L. Manasa, S.P. Shaik, S.R. Bonam, A. Kamal, Zinc dependent histone deacetylase inhibitors in cancer therapeutics: Recent update, *Curr. Med. Chem.* (2018). 26(40):7212-7280. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180530094120>.
- [151] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: The next generation, *Cell.* (2011). 144(5):646-74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- [152] Y. Yang, Cancer immunotherapy: Harnessing the immune system to battle cancer, *J. Clin. Invest.* (2015). 125(9):3335-7. <https://doi.org/10.1172/JCI83871>.
- [153] G. Minniti, C. Goldsmith, M. Brada, Radiotherapy, *Handb. Clin. Neurol.*, (2012). 104: 215-228. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52138-5.00016-5>.
- [154] D. Meirow, D. Nugent, The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction, *Hum. Reprod. Update.* (2001). 7(6):535-43. <https://doi.org/10.1093/humupd/7.6.535>.
- [155] A.F. Mavrogenis, P.J. Papagelopoulos, M. Romantini, A. Angelini, P. Ruggieri, Side effects of chemotherapy in musculoskeletal oncology, *J. Long. Term. Eff. Med. Implants.* (2010). 20(1):1-12.

<https://doi.org/10.1615/JLongTermEffMedImplants.v20.i1.10>.

- [156] R.B. Eftekhari, N. Maghsoudnia, S. Samimi, A. Zamzami, F.A. Dorkoosh, Co-delivery nanosystems for cancer treatment: A review, *Pharm. Nanotechnol.* (2019). 7(2):90-112. <https://doi.org/10.2174/2211738507666190321112237>.
- [157] Y. Lu, Q. Hu, C. Jiang, Z. Gu, Platelet for drug delivery, *Curr. Opin. Biotechnol.* (2019). 58:81-91. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.11.010>.
- [158] J.J. McClure, X. Li, C.J. Chou, Advances and challenges of HDAC inhibitors in cancer therapeutics, *Adv. Cancer Res.*, (2018). 138:183-211. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2018.02.006>.
- [159] E. Pérez-Herrero, A. Fernández-Medarde, Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (2015). 93:52-79. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.03.018>.
- [160] G. Han, P. Ghosh, V.M. Rotello, Functionalized gold nanoparticles for drug delivery, *Nanomedicine.* (2007). 2(1):113-23. <https://doi.org/10.2217/17435889.2.1.113>.
- [161] M.M Rageh, R.H. El-Gebaly, M.M. Afifi, Antitumor activity of silver nanoparticles in Ehrlich carcinoma-bearing mice, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* (2018). 391(12):1421-1430. <https://doi.org/10.1007/s00210-018-1558-5>.
- [162] D.B. Chithrani, S. Jelveh, F. Jalali, M. van Prooijen, C. Allen, R.G. Bristow, R.P. Hill, D.A. Jaffray, Gold nanoparticles as radiation sensitizers in cancer therapy, *Radiat. Res.* (2010). 173(6):719-28. <https://doi.org/10.1667/rr1984.1>.
- [163] J. Rejman, V. Oberle, I.S. Zuhorn, D. Hoekstra, Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin-and caveolae-mediated endocytosis, *Biochem. J.* (2004). 377(Pt 1):159-69. <https://doi.org/10.1042/BJ20031253>.
- [164] F. You, W. Tang, L.Y.L. Yung, Real-time monitoring of the Trojan-horse effect of silver nanoparticles by using a genetically encoded fluorescent cell sensor, *Nanoscale.* (2018). 10(16):7726-7735. <https://doi.org/10.1039/c7nr05975b>.
- [165] A. Rodriguez-Garraus, A. Azqueta, A. Vettorazzi, A.L. de Cerain, Genotoxicity of silver nanoparticles, *Nanomaterials.* (2020). 10(2):251. <https://doi.org/10.3390/nano10020251>.
- [166] X. Wang, T. Li, X. Su, J. Li, W. Li, J. Gan, T. Wu, L. Kong, T. Zhang, M. Tang, Y. Xue, Genotoxic effects of silver nanoparticles with/without coating in human liver HepG2 cells and in mice, *J. Appl. Toxicol.* (2019). 39(6):908-918. <https://doi.org/10.1002/jat.3779>.
- [167] R. Shukla, V. Bansal, M. Chaudhary, A. Basu, R.R. Bhonde, M. Sastry, Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview, *Langmuir.* (2005). 21(23):10644-54. <https://doi.org/10.1021/la0513712>.
- [168] E. Boisselier, D. Astruc, Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity, *Chem. Soc. Rev.* (2009). 38(6):1759-82.

<https://doi.org/10.1039/b806051g>.

- [169] L.A. Hazlehurst, J.S. Damiano, I. Buyuksal, W.J. Pledger, W.S. Dalton, Adhesion to fibronectin via $\beta 1$ integrins regulates p27(kip1) levels and contributes to cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR), *Oncogene*. (2000). 19(38):4319-27. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203782>.
- [170] N. Cordes, V. Meineke, Cell adhesion-mediated radioresistance (CAM-RR): Extracellular matrix-dependent improvement of cell survival in human tumor and normal cells in vitro, *Strahlentherapie Und Onkol.* (2003). 179(5):337-44. <https://doi.org/10.1007/s00066-003-1074-4>.
- [171] J.S. Damiano, A.E. Cress, L.A. Hazlehurst, A.A. Shtil, W.S. Dalton, Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines., *Blood*. (1999). 93(5):1658-67.

Publikációk listája

MTMT azonosító: 10054252

Összesített impakt faktor: 69, 581

A dolgozat alapját képező publikációk:

1. Nóra Igaz, Dávid Kovács, Zsolt Rázga, Zoltán Kónya, Imre Miklós 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 2016 Oct 1; 146:670-7. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.07.004, Q1 besorolás, IF: 3,902
2. Nóra Igaz, Krisztina Szőke, Dávid Kovács, Andrea Buhala, Zoltán Varga, Péter Bélteky, Zsolt Rázga, László Tiszlavicz, Csaba Vizler, Katalin Hideghéty, Zoltán Kónya, Mónika Kiricsi: *Synergistic radiosensitization by gold nanoparticles and the histone deacetylase inhibitor SAHA in 2D and 3D cancer cell cultures*. Nanomaterials 2020 Jan 16; 10(1):158. doi: 10.3390/nano10010158, Q1 besorolás, IF: 4,324

Egyéb publikációk:

1. András Papp, Tamara Horváth, Nóra Igaz, Mohana Krishna Gopisetty, Mónika Kiricsi, Dániel Simon Berkesi, Gábor Kozma, Zoltán Kónya, Imola Wilhelm, Roland Patai, Tamás Ferenc Polgár, Tamás Bellák, László Tiszlavicz, Zsolt Rázga, Tünde Vezér: *Presence of Titanium and Toxic Effects Observed in Rat Lungs, Kidneys, and Central Nervous System in vivo and in Cultured Astrocytes in vitro on Exposure by Titanium Dioxide Nanorods*. International Journal of Nanomedicine 2020 Dec 8; 15:9939-9960. doi: 10.2147/IJN.S275937, Q1 besorolás, IF: 5,115
2. Bettina Szerencsés*, Nóra Igaz*, Ákos Tóbiás, Zsombor Prucsi, Andrea Rónavári, Péter Bélteky, Dániel Madarász, Csaba Papp, Ildikó Makra, Csaba Vágvolgyi, Zoltán Kónya, Ilona Pfeiffer, Mónika Kiricsi: *Size-dependent activity of silver nanoparticles on the morphological switch and biofilm formation of opportunistic pathogenic yeasts*. BMC Microbiology 2020 Jun 22; 20(1):176. doi: 10.1186/s12866-020-01858-9, Q2 besorolás, IF: 2,989

3. Heba Alaa Hosiny Abd Elhameed, Ditta Ungor, Nóra Igaz, Mohana Krishna Gopisetty, Mónika Kiricsi, Edit Csapó, Béla Gyurcsik: *High molecular weight poly(ethylenimine)-based water-soluble lipopolymer for transfection of cancer cells*. Macromolecular Bioscience 2020 Jul; 20(7):e2000040. doi: 10.1002/mabi.202000040, Q1 besorolás, IF: 3,416
4. Dávid Kovács, Nóra Igaz, Annamária Marton, Andrea Rónavári, Péter Bélteky, László Bodai, Gabriella Spengler, László Tiszlavicz, Zsolt Rázga, Péter Hegyi, Csaba Vizler, Imre M. Boros, Zoltán Kónya, Mónika Kiricsi: *Core-shell nanoparticles suppress metastasis and modify the tumour-supportive activity of cancer-associated fibroblasts*. International Journal of Nanobiotechnology 2020 Jan 21; 18(1):18. doi: 10.1186/s12951-020-0576-x, D1 besorolás, IF: 6,518
5. Péter Bélteky, Andrea Rónavári, Nóra Igaz, Bettina Szerencsés, Ildikó Tóth, Ilona Pfeiffer, Mónika Kiricsi, Zoltán Kónya: *Silver nanoparticles: aggregation behaviour in biorelevant conditions and its impact on biological activity*. International Journal of Nanomedicine 2019 Jan 18; 14:667-687. doi: 10.2147/IJN.S185965, Q1 besorolás, IF: 5,115
6. Diána Szabó, Dávid Kovács, Valéria Endrész, Nóra Igaz, Kitti Jenovai, Gabriella Spengler, László Tiszlavicz, József Molnár, Katalin Burián, Mónika Kiricsi, László Rovó: *Antifibrotic effect of mitomycin-C on human vocal cord fibroblasts*. Laryngoscope 2019 Jul; 129(7):E255-E262. doi: 10.1002/lary.27657, D1 besorolás, IF: 2,465
7. Gopisetty Mohana Krishna, Dávid Kovács, Nóra Igaz, Andrea Rónavári, Péter Bélteky, Zsolt Rázga, Viktória Venglovecz, Bálint Csoboz, Imre Boros Zoltán, Kónya, Mónika Kiricsi: *Endoplasmic reticulum stress: major player in size-dependent inhibition of P-glycoprotein by silver nanoparticles in multidrug-resistant breast cancer cells*. Journal of Nanobiotechnology 2019 Jan 22; 17(1):9. doi: 10.1186/s12951-019-0448-4, D1 besorolás, IF: 6,518
8. Horváth Tamara, Papp András, Kiricsi Mónika, Igaz Nóra, Trenka Vivien, Kozma Gábor, Tiszlavisz László, Rázga Zsolt, Vezér Tünde: *Titán-dioxid-nanopálcikák tüdőre kifejtett hatásának állatkísérletes vizsgálata szubakut patkánymodellben*. Orvosi Hetilap 2019 Jan; 160(2):57-66. doi: 10.1556/650.2019.31237, Q4 besorolás, IF: 0,497

9. Tamara Horváth, András Papp, Nóra Igaz, Dávid Kovács, Gábor Kozma, Vivien Trenka, László Tiszlavicz, Zsolt Rázga, Zoltán Kónya, Mónika Kiricsi: *Pulmonary impact of titanium dioxide nanorods: examination of nanorod-exposed rat lungs and human alveolar cells*. International Journal of Nanomedicine 2018 Nov 2; 13:7061-7077. doi: 10.2147/IJN.S179159, Q1 besorolás, IF: 4,471
10. Andrea Rónavári, Nóra Igaz, Gopisetty Mohana Krishna, Bettina Szerencsés, Dávid Kovács, Csaba Papp, Csaba Vágvölgyi, Imre Miklós Boros, Zoltán Kónya, Mónika Kiricsi, Ilona Pfeiffer: *Biosynthesized silver and gold nanoparticles are potent antimycotics against opportunistic pathogenic yeasts and dermatophytes*. International Journal of Nanomedicine 2018 Feb 1; 13:695-703. doi: 10.2147/IJN.S152010, Q1 besorolás, IF: 4,471
11. Ádám Baji, Tamás Kiss, János Wölfling, Dávid Kovács, Nóra Igaz, Gopisetty Mohana Krishna, Mónika Kiricsi, Éva Frank: *Multicomponent access to androstano-arylpyrimidines under microwave conditions and evaluation of their anti-cancer activity in vitro*. Journal of steroid biochemistry and molecular biology 2017 Sep; 172:79-88. doi: 10.1016/j.jsbmb.2017.06.001, Q1 besorolás, IF: 4,561
12. 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 2017 Jan 27; 12:871-883. doi: 10.2147/IJN.S122842, Q1 besorolás, IF: 4,320
13. Dávid Kovács, Nóra Igaz, Csilla Keskeny, Péter Bélteky, Tímea Tóth, Renáta Gáspár, Dániel Madarász, Zsolt Rázga, Zoltán Kónya, Imre Miklós Boros, Mónika Kiricsi: *Silver nanoparticles defeat p53-positive and p53-negative osteosarcoma cells by triggering mitochondrial stress and apoptosis*. Scientific Reports 2016 Jun 13; 6:27902. doi: 10.1038/srep27902, D1 besorolás, IF: 5,228
14. Dávid Kovács, Krisztina Szőke, Nóra Igaz, Gabriella Spengler, József Molnár, Tímea Tóth, Dániel Madarász, Zsolt Rázga, Zoltán Kónya, Imre Miklós Boros, Mónika Kiricsi: *Silver nanoparticles modulate ABC transporter activity and enhance chemotherapy in multidrug resistant cancer*. Nanomedicine 2016 Apr; 12(3):601-610. doi: 10.1016/j.nano.2015.10.015, D1 besorolás, IF: 5,671

Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek **Dr. Csontné Dr. Kiricsi Mónikának**, aki kitartó és fáradhatatlan munkájával és szakmai odafigyelésével és segítségével támogatott a munkám során és akihez minden körülmény között bizalommal fordulhattam. Szeretném megköszönni a SZTE TTIK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék volt és jelen tanszékvezetőjének, **Prof. Dr. Boros Imrének** és **Dr. Bodai Lászlónak** a folyamatos támogatását, ami elengedhetetlen volt a kísérleti munkám során. Hálás köszönet illeti **Prof. Dr. Kónya Zoltánt**, aki szakmai támogatásával segítette a tudományos munkánkat.

Külön köszönöm **Dr. Kovács Dávidnak** a laboratóriumi munka során nyújtott sok segítségét, és az elméleti, szakmai tanácsait, ami nagyban hozzájárult a szakmai fejlődésemhez és a dolgozat létrejöttéhez. Köszönöm **Szőke Krisztinának** a kísérletek elvégzésében nyújtott segítségét, **Huliák Ildikónak**, **Rusák-Makra Ildikónak**, **Adamecz Dórának** és **Mohana Krishna Gopisettynek**, **Jenovai Kittinek**, **Varajti Krisztinának** és a **Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék munkatársainak** a laboratóriumi munka során nyújtott segítségüket és tanácsaikat.

Köszönettel tartozom **Dr. Rónavári Andreának** és **Bélteky Péternek** a kísérletekhez használt nanorészecskék szintéziséért és a kémiai karakterizálásáért.

Szeretném megköszönni **Prof. Dr. Hideghéty Katalinnak** és **Dr. Varga Zoltánnak** a lehetőséget, hogy az Onkoterápiás Klinikán végezhattük a minták irradiációját, illetve köszönöm nekik a radiobiológiai vizsgálatokhoz nyújtott segítségüket és tanácsaikat.

Nagyon köszönöm **Dr. Vizler Csabának**, **Buhala Andreának**, **Dr. Marton Annamáriának** és **Dr. Balogi Zsoltnak** a 3D sejtkultúras kísérletek kivitelezéséhez nyújtott tanácsaikat és segítségüket.

Hálás köszönettel tartozom továbbá a transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok elvégzéséért **Dr. Rázga Zsoltnak** és **Németh Erikának**.

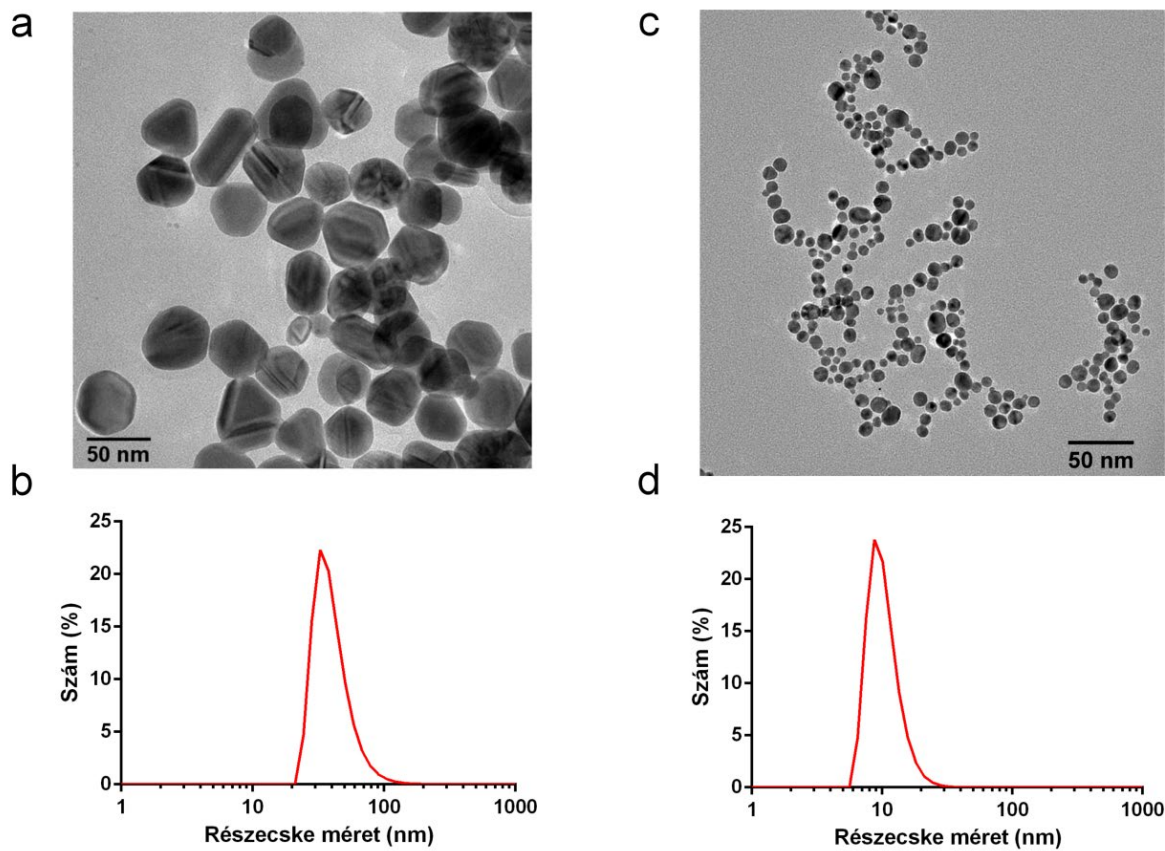
Nagyon köszönöm **Prof. Dr. Tiszlavicz Lászlónak** és **Daru Krisztiánnak** a 3D sejtkultúrákból származó hisztológiai metszetek készítését és festését.

Szeretném megköszönni a humán sejtekkel való munkához nyújtott segítségét **Ökrös Gyuláné Katinak**, és a laboratóriumi munkákhoz szükséges anyagok előkészítését **Pataki Edinának**.

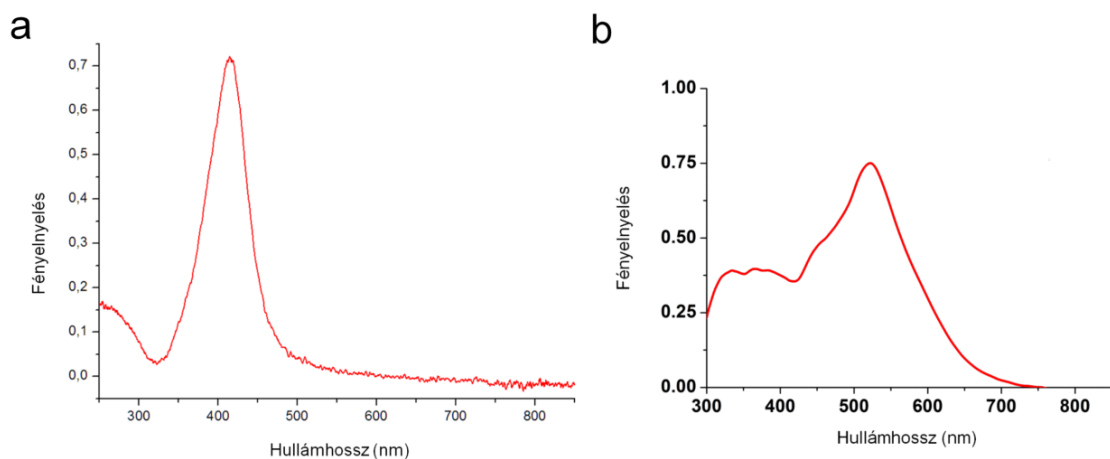
Végül szeretném megköszönni **családomnak** és **barátaimnak** a támogatást, mely nélkülözhetetlen volt a munkám során.

A dolgozat megvalósításához szükséges pénzügyi támogatást a Magyarország a Széchenyi 2020 keretében megjelent **GINOP-2.3.2-15-2016-00035**, a **GINOP-2.3.2-15-2016-00038** és az Emberi Erőforrások Minisztériuma által kiírt, az Új Nemzeti Kiválósági Program keretein belül megjelent **ÚNKP-18-3-I-SZTE-42** (I.N.), **ÚNKP-19-4-SZTE-14** (K.M.), **ÚNKP-20-5-SZTE-655** és **BO/00878/19/8** (K.M.) pályázatok nyújtották.

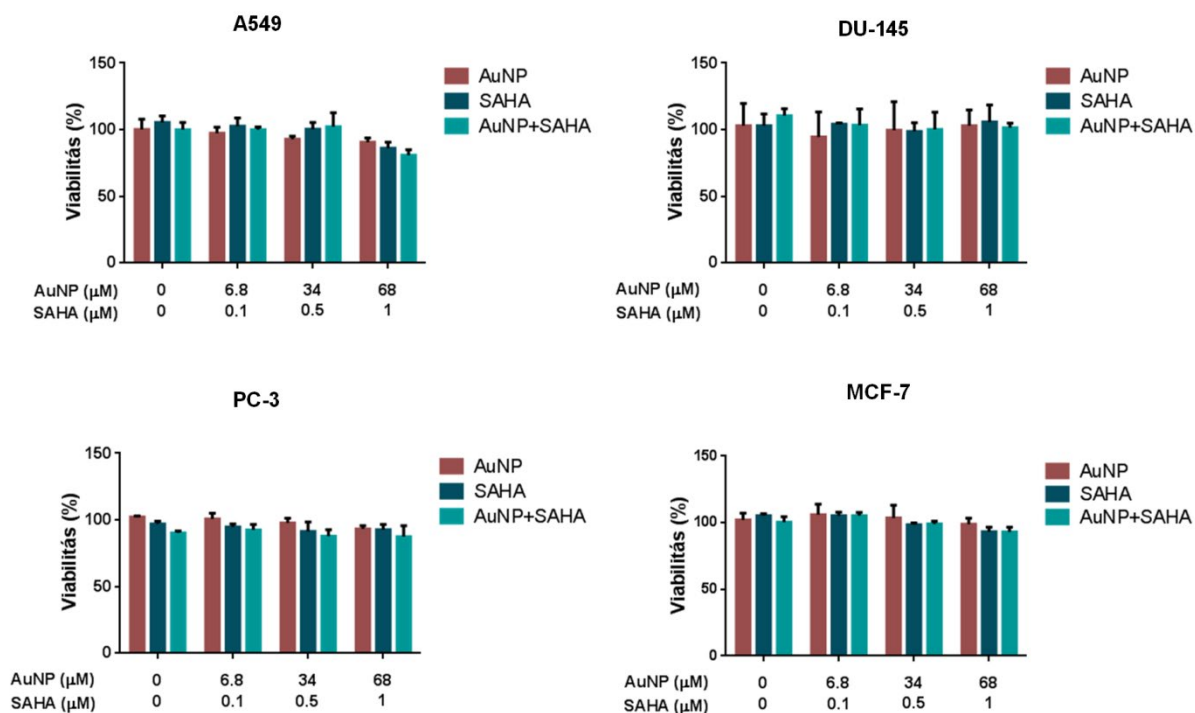
Függelék



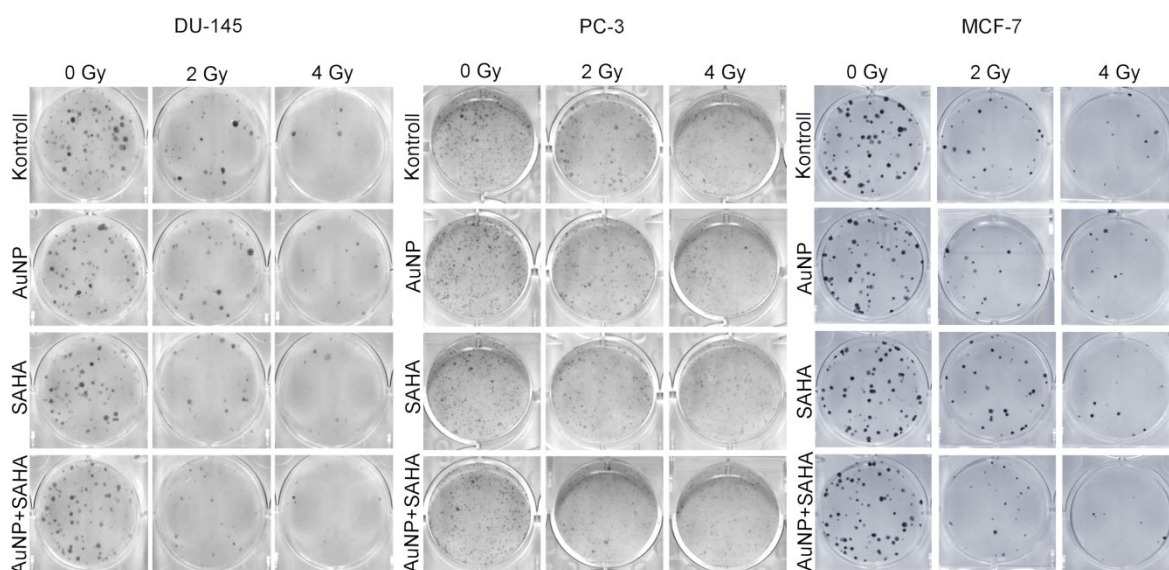
1. függelék ábra A fém nanorészecskék morfológiájának és méreteloszlásának meghatározása. (a) Az AgNP-k megközelítőleg szférikus morfológiával rendelkeznek, átmérőjük körülbelül 35 nm mind a TEM (b) mind a dinamikus fényszórás eredménye alapján. (c) Az AuNP-k megközelítőleg gömb alakúak, a méretük a TEM és (d) a DLS alapján átlagosan 10 nm.



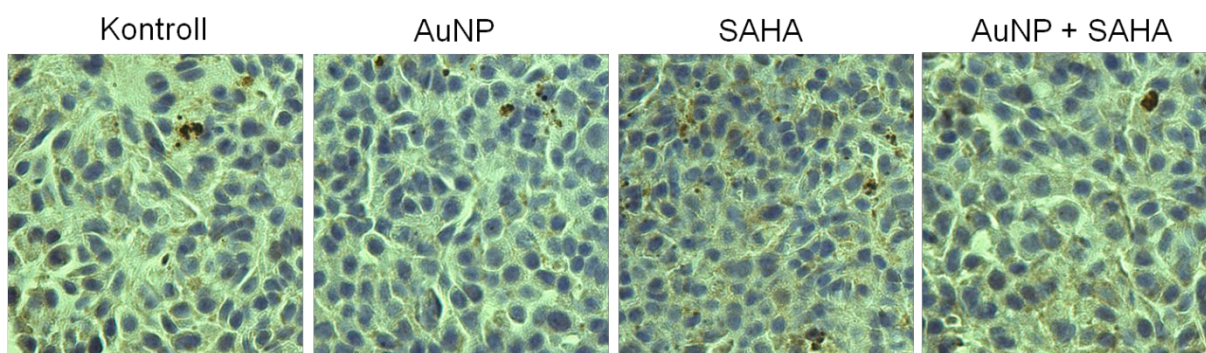
2. függelék ábra Az AgNP és AuNP UV és látható fény elnyelése. (a) Az AgNP kolloid oldat UV-Vis elnyelési spektruma 400 nm környékén mutat elnyelési maximumot, amely az ezüst nanorészecskékre jellemző. **(b)** Az AuNP kolloid oldat elnyelése 520 nm körül rendelkezik elnyelési maximummal, mely az arany nanopartikulumokra jellemző.



3. függelék ábra Az A549, DU-145, PC-3 és MCF-7 sejtek életképessége AuNP, SAHA és AuNP+SAHA kezelést követően, ionizáló sugárzás alkalmazása nélkül. Irradiáció nélkül az AuNP, SAHA és a kettő kombinációja nem befolyásolja a tumoros sejtek életképességét az alkalmazott kezelési koncentrációkban.



4. függelék ábra Reprezentatív képek a tumoros sejtek kolóniaformáló képességének változásáról 0, 2 és 4 Gy sugárdózis alkalmazása után a kezeletlen és az AuNP, SAHA vagy a kettő kombinációjával történő kezelést követően.



5. függelék ábra Reprezentatív képek a nem-irradiált kontroll, AuNP, SAHA és AuNP+SAHA kezelésben részesült szferoidok metszeteiről γ -H2AX-specifikus immunfestést követően. Az AuNP, SAHA és az AuNP+SAHA kezelés ionizáló sugárzás alkalmazása nélkül nem bír genotoxikus hatással.