

A FÉM NANORÉSZECSKÉK ÉS A HISZTON-DEACETILÁZ INHIBITOROK TUMORELLENES HATÁSÁNAK SOKSZÍNŰSÉGE

Igaz Nóra és Kiricsi Mónika

***Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai
Kar, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék***

Összefoglalás

A nanotechnológia fejlődése révén számos új diagnosztikai és terápiás megközelítésre nyílt lehetőség, melyek a jövőben forradalmasíthatják a rákos megbetegedések klinikai kezelését. Terápiás szempontból az arany (AuNP) és az ezüst nanorészecskék (AgNP) különleges tulajdonságai is jól kihasználhatók lehetnek: arany nanorészecskéket terápiás molekulák szállítására, radioszenzitizációra, ezüst nanorészecskéket egyedi apoptotikus tulajdonságai miatt alkalmazhatnák a rákos sejtek elpusztítására. A hiszton-deacetiláz enzimek (HDAC) gátlószerei a fehérjék acetilációs mintázatának befolyásolásán keresztül számos sejtbiológiai folyamatot modulálhatnak. A hiszton fehérjék acetilációjának növelésén át nyitottabb kromatin szerkezetet alakítanak ki, mellyel a DNS sebezhetőségét is növelik. Munkánk során AgNP, AuNP és HDAC gátlók kombinációjának tumorelles határait vizsgáltuk *in vitro* sejt kultúrákon. Megállapítottuk, hogy az AgNP és a HDAC inhibitor Trichostatin A szinergista módon csökkentik a tumoros sejtek életképességét és együttes alkalmazásuk szignifikánsan növeli a DNS kettősszalú törések számát. Az AuNP és a HDAC gátló szuberoil-anilid-hidroxámsav (SAHA) együttes alkalmazásakor radioszenzitizáló képességük jelentősen megnő, mivel az így kezelt tumoros sejtek kolóniaformáló képessége csökken, a DNS károsodás mértéke viszont jelentősen megnő irradiációt követően. A HDAC

inhibitor által kialakított nyitottabb kromatin szerkezet a DNS-t valószínűleg hozzáférhetőbbé teszi az AgNP által indukált oxidatív stressz és az AuNP segítségével felerősített, az ionizáló sugárzás által okozott károsító hatások számára.

Bevezetés

Az elmúlt évtizedben jelentős alap- és transzlációs kutatási aktivitás összpontosult a nanoméretű anyagok orvosbiológiai, elsődlegesen diagnosztikai és terápiás alkalmazhatóságának feltérképezésére, ám ezen belül is, a legjelentősebb erőfeszítéseket az onkológiai célú kutatásokba fektették. Ennek hátterében – részben legalábbis – a nanotechnológia jelentős fejlődése áll, mivel új eredményeinek köszönhetően innovatív stratégiák jöttek létre a rákos megbetegedések kezelését célzó fejlesztésekben is [1]. A nanotechnológia, olyan anyagok szintézisével, kémiai, fizikai, anyagtudományi karakterizálásával foglalkozó diszciplína, melyek a nanométeres mérettartományba esnek. Ebben a mérettartományban (legfőképpen 1-100 nm között) az anyagoknak nem csupán a fizikai-kémiai jellemzői, de a biológiai rendszerekkel kialakított kölcsönhatásai is megváltoznak, ami óriási lehetőségeket rejthet az orvostudomány számára is. Ennek a munkának az eredményeként jónéhány „nano-anyag” és ezt alkalmazó onkoterápiás kezelési eljárás került klinikai vizsgálati fázisba [2]. Annak ellenére, hogy ezek jelentősebb része a liposzómába csomagolt kemoterápiás hatóanyag bejuttatását célozta meg, a közelmúltban több más kémiai összetételű, főként fémalapú nanostruktúra került a figyelem középpontjába, mivel a kísérletes kemoterápiás vizsgálatok alapján ígéretes és hatékony anyagoknak bizonyultak. Ezek közül az anyagok közül a legszélesebb körben az ezüst (AgNP) és arany (AuNP) nanorészecskéket ismerik. Bár az AgNP-k ismertségüket elsősorban a már bevált antimikrobiális hatásaikkal érdemelték ki [3] ennek ellenére, a mikrobiális kórokozók mellett más, akár

emlős sejtekkel szemben is egyedülálló citotoxikus aktivitást fejthetnek ki, amely tulajdonságuk megalapozhatja felhasználásukat a tumorterápiában is.

Az ezüst nanorészecskék terápiás potenciálja egyedülálló módon arra a jelenségre támaszkodik, melyet „Trójai faló mechanizmus” névvel illetnek [4, 5]. Ennek háttérében az áll, hogy az AgNP-t főként endocitózissal veszik fel a tumoros sejtek, majd az internalizált részecskék felszínéről a késői endoszómákban, lizoszómákban a savas környezet hatására reaktív ezüst ionok szabadulnak fel, amelyek révén reaktív szabadgyökök termelése indukálódik, és ez végül oxidatív stresszhez és apoptózishoz vezet. Hogy a sejtek a nanorészecskék felvétele során milyen endocitotikus mechanizmust alkalmaznak, az függ a nanorészecskék méretétől, alakjától, felületi töltésétől, hidrofóbicitásától és a részecske felszínére tapadó fehérjéktől, azaz az ún. protein koronától is, és természetesen a kérdéses sejt típusától [6, 7].

Az ezüst részecskékhez képest az arany nanorészecskék (AuNP) gyakorlatilag inertnek tekinthetők, nem mutatnak különösebb citotoxikus hatást az emlős sejteken. Viszont az AuNP-nek, ahogy minden fém nanorészecskének, kis mérete és az extrém nagy fajlagos felülete jól kihasználható lehet az onkoterápiás eljárásokban. A nanorészecskék felszíne ugyanis változtatható, így különböző funkcionálizáló és célzó molekulák konjugációjának révén befolyásolhatjuk a nanorészecskék biológiai hatásait. Ezzel a módszerrel nem csupán a nanorészecskéket irányíthatjuk célzottan a rákos sejtekhez, de a felszínükre kapcsolt kemoterápiás gyógyszermolekulákat is, így növelhetjük a terápia tumorspecifitását [8]. Emellett az „aktív tumor-célzó” hatás mellett, a nanorészecskék „passzívan”, specifikus funkcionálizáló csoport nélkül is, felhalmozódhatnak a tumorokban. A szervezetben keringő, 5-100 nm mérettartományba eső nano-anyagoknak ezt a kivételes farmakokinetikai

viselkedését a tumoros szövetek megnövekedett áteresztőképességének és retenciójának, az ún. EPR (enhanced permeability and retention) hatásnak tulajdonítják, melynek háttérében a daganat egyedi vaszkularizációja, a fenesztrált endotél és a bazális membrán sajátos rendellenességei állnak [9, 10].

Ugyan a nano-hordozó funkció igen nagy jelentőséggel bír a kemoterápiás ágensek célbajuttatásakor, egyes fém nanorészecskék, mint az AuNP, a fototermális tumorterápiás eljárásokban is kiválóan felhasználhatók, ahol a kialakuló lokális hipertermia a rákos sejtek eliminálását indukálja [11]. De az arany nanorészecskék radioszenzitizáló jellege is kiaknázható ionizáló sugárzással kombinációban alkalmazva [12]. Ez utóbbi képesség annak tulajdonítható, hogy irradiáció hatására a nanorészecske arany atomjainak elektronhéjairól a gerjesztés következtében többféle reaktív elektron léphet ki, melyek más nanorészecskékben is kiválhatnak elektron felszabadulást, ionizációt vagy szabadgyök képződést okozhatnak, így erősítve a sugárkezelés hatását [13, 14].

A hisztonok és más fehérjék reverzibilis poszttranszlációs acetilációs módosítását katalizálják a hiszton-acetiltransferáz és a hiszton-deacetiláz (HDAC) enzimek. A hisztonok esetében leggyakrabban a fehérje N-terminális végén található lizin aminosav oldalláncokon történik acetiláció, mely gyengíti a hisztonok és a DNS közötti elektrosztatikus kölcsönhatást, ezáltal egy lazább, relaxáltabb kromatinszerkezet jön létre. A nyitottabb kromatinszerkezet hozzájárulóbbá teszi a DNS-t a transzkripció faktoroknak, szabályozó fehérjéknek, de akár a DNS-t károsító hatások számára is [15]. A HDAC enzimek aktivitása viszont az acetil-csoport eltávolítása révén egy szorosabban csomagolt, kompaktabb kromatinszerkezet kialakulásához vezet. A legtöbb HDAC enzim aktív centrumában Zn^{2+} ionokat köt, ezért olyan vegyületek, mint egyes hidroxámsavak - pl. a szuberoil-anilid-hidroxámsav (SAHA) és a

Trichostatin A (TSA) - nagy Zn^{2+} ion-kötő affinitásuknak köszönhetően képesek az összes Zn^{2+} függő HDAC enzimet gátolni [16]. Egyes HDAC inhibitorokról már ismert, hogy csökkentik a tumorok progresszióját, a DNS hibajavítást, és apoptózist indukálnak mitokondriális és oxidatív stressz révén [17, 18]. A HDAC inhibitorok ideális alkalmazása más kemoterápiás szerekkel kombinációban vagy sugárterápiával kiegészítve képzelhető el leginkább, így más tumorelles aktivitással rendelkező anyagok, mint a fém nanorészecskék, potenciális terápiai partnerei lehetnek.

Ezért kísérleteink során azt tanulmányoztuk, hogy az ezüst és arany nanorészecskék a HDAC inhibitorokkal kombinációban alkalmazva felerősítik-e egymás tumorelles hatását és képesek-e növelni a tumorterápia hatékonyságát.

Módszerek

A nanorészecskék szintézise, karakterizálása

A citráttal stabilizált ezüst és arany nanorészecskéket az SZTE Alkalmazott és Környezeti Kémiai Tanszékén állították elő többlépésben, kémiai redukciós eljárással, 1%-os ezüst nitrát, illetve hidrogén-tetrakloro-aurát oldat, 0,1%-os nátrium-borohidrid és 1%-os nátrium-citrát oldat felhasználásával. A nanorészecskék morfológiáját, méreteloszlását, felületi töltését és optikai jellemzőit transzmissziós elektronmikroszkóppal (FEI Tecnai G² 20 X, FEI Corporate Headquarters, Hillsboro, OR, USA), Zetasizer Nano ZS (Malvern, Worchestershire, UK) készülékkel és UV-Vis spektrofotométerrel (Ocean Optics 355 DH-2000-BAL UV-Vis spektrofotométer, Halma PRC, Largo, FL, USA) tanulmányozták. A karakterizálás eredményeképpen megállapították, hogy egy átlagosan 35 nm nagyságú AgNP-t tartalmazó kolloidot és egy átlagosan 10 nm-es nagyságú arany nanorészecskéket tartalmazó kolloid oldatot kaptak, amely minták spektrális tulajdonságai alátámasztották a nanorészecskék

jelenlétét. A részecskék nagyjából gömb alakúak, nagy negatív felületi töltésüknek megfelelően stabilaknak tekinthetők.

Sejtkultúra

Eredményeinket HeLa humán cervikális karcinóma és A549 humán tüdő adenokarcinóma sejteken mutatjuk be, de a kísérleteket elvégeztük U2Os humán oszteoszarkóma, 4T1 egér-eredetű emlőkarcinóma, NIH-3T3 egér fibroblaszt, humán prosztatárakos sejtvonalakon (DU-145 és PC-3) és MCF-7 humán emlő adenokarcinóma sejteken is. A sejtek tenyésztésekor 1 g/l glükóz tartalmú DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) médiumot használtunk (HeLa, U2Os és NIH-3T3 sejtek esetén), amit 5% (HeLa sejtek esetén) vagy 10% borjúsérummal (FBS), 2 mM L-glutaminnal, 0,01% sztreptomicinnel és 0,006% penicillinnel egészítettük ki. RPMI 1640 (Roosevelt Park Memorial Institute 1640) médiumban tenyésztettük a 4T1, A549, DU-145, PC-3 és MCF-7 sejteket, ezt a tápoldatot 10% FBS-sel, 2 mM L-glutaminnal, 0,01% sztreptomicinnel és 0,006% penicillinnel egészítettük ki. A sejteket 37 °C-os inkubátorban 5% CO₂ és 95% páratartalom mellett tartottuk fent.

Irradiáció

Az irradiációt a SZTE Onkoterápiás Klinikáján Dr. Varga Zoltán és Prof. Dr. Hideghéty Katalin végezte. A mintákat 6 MeV energiájú fotonnal sugarzták be, a 2 Gy sugárdózis alkalmazása esetén 1 percre, míg a 4 Gy sugárdózis adása során 2 percre. A fotonokat Primus lineáris gyorsító (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Németország) segítségével állították elő.

Viabilitás, kombinációs index

A kezeletlen, és a nanorészecskével, valamint a HDAC inhibitorral, illetve ezek kombinációjával kezelt sejtek viabilitását MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) módszerrel

(Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) határoztuk meg. A vizsgálathoz 10000 db HeLa sejtet, illetve 5000 db A549 sejtet osztottunk ki 96-lyukú lemezekbe. Másnap 0; 15; 30; 45; 60 nM TSA-val, vagy 0; 2; 4; 6; 8 μM AgNP-vel, vagy a kettő kombinációjával (1:7,5 arányban) 72 órán keresztül, illetve 6,8; 34; 68 μM AuNP-vel, vagy 0,1; 0,5 és 1 μM SAHA-val, vagy a kettő kombinációjával szintén 72 órán át kezeltük a sejteket. Az AuNP/SAHA-kezelt mintákat 24 óra múlva 2 Gy ionizáló sugárzásnak tettük ki. A mintákat mosást követően 0,5 mg/ml MTT reagenssel (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 1 órán át inkubáltuk, a kristályos formazánt dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk, majd a minták abszorbanciáját 570 nm-en megmértük (Synergy HTX, Biotek, Winooski, Vermont, USA). A kombinációs kezelések után CompuSyn Szoftver segítségével meghatároztuk a kombinációs indexeket az effektív dózis (ED) 50, ED75, ED90 és ED95 értékeknél kapott indexek átlaga alapján.

DNS károsodás detektálása γH2AX immunfestéssel

A 6 μM AgNP-vel, 45 nM TSA-val vagy a kettő kombinációjával kezelt HeLa sejtekben, valamint a 6,8 μM AuNP-vel, 0,1 μM SAHA-val vagy a kettő kombinációjával kezelt, 2 Gy sugárdózisnak kitett A549 sejtekben vizsgáltuk a DNS károsodás mértékét γH2AX immunfestéssel. A foszforilált H2AX hiszton (γH2AX) a DNS kettősszalú törések megjelenésekor alakul ki, ezért a DNS károsodás egyik markerének tekinthető. A mintákat a besugarozást követően 1 órával fixáltuk 4%-os formaldehidben. A sejteket γH2AX elsődleges antitesttel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, 1:300 hígítás) majd Alexa 488 fluorofór konjugáltatott másodlagos ellenanyaggal (Invitrogen, 1% BSA-ban 1:600 arányban hígítva) inkubáltuk. A sejtmagokat DAPI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, 300 nM) vagy Hoechst 33342 festékkel (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 3,25 μM) tettük láthatóvá, és Olympus FV10i (Olympus, Tokió, Japán) konfokális mikroszkóppal

vizsgáltuk. Meghatároztuk egyrészt a γ H2AX-pozitív sejtek arányát, másrészt a pozitívan festődő sejteken belül a γ H2AX fókuszok számát. A statisztikai analízist GraphPad Prism 6 szoftverrel végeztük.

Kolóniaformáló képesség

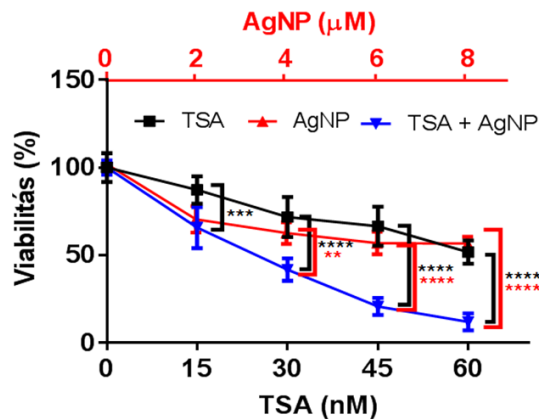
Az irradiáció hosszú távú károsító hatásainak, és az AuNP és a SAHA radioszenzitizáló képességének megállapítása céljából a sejtek kolóniaformáló képességét detektáltuk. Ennek érdekében 6×10^5 db sejtet osztottunk ki sejttenyésztő flaskába, majd $6,8 \mu\text{M}$ AuNP-vel, $0,1 \mu\text{M}$ SAHA-val vagy a kettő kombinációjával kezeltük. 24 óra múltán a kultúrákat 0, 2 vagy 4 Gy dózisu irradiációnak vetettük alá. Másnap, tripszin kezelést követően, mintánként 700 db sejtet osztottunk ki 6-lyukú lemezekbe. A sejteket 10% FBS tartalmú tápfolyadékban tartottuk. A kialakuló kolóniákat nőni hagytuk, majd egy hét múlva metanol-aceton (7:3) elegyében fixáltuk. A kolóniákat 25%-os metanolban oldott kristályibolyával festettük, számoltuk és az adatokat a nem-irradiált kezeletlen kontrollhoz viszonyítottuk. A statisztikai analízist GraphPad Prism 6 szoftverrel végeztük.

Eredmények

Mind az ezüst, mind az arany nanorészecskéket a tumorsejtek felveszik és a HDAC gátlók is bejutnak a sejtekbe. A nanorészecskék jelenléte nem befolyásolja a HDAC gátlók működését, azok hatására nagy mennyiségű acetilált-lizin detektálható és megnő a poszttranszlációsan acetilált H3, illetve H4 fehérjék aránya mind a HeLa, mind pedig az A549 sejtekben [19, 20]. Ezek alapján feltételezhető, hogy a HDAC gátlók jelenlétében valóban egy nyitottabb, támadhatóbb kromatin szerkezet alakul ki ezekben a tumorsejtekben.

MTT módszerrel vizsgáltuk az AgNP és a TSA kezelés hatását HeLa sejtek viabilitására. A nanorészecske és a HDAC gátló minden kombinációban

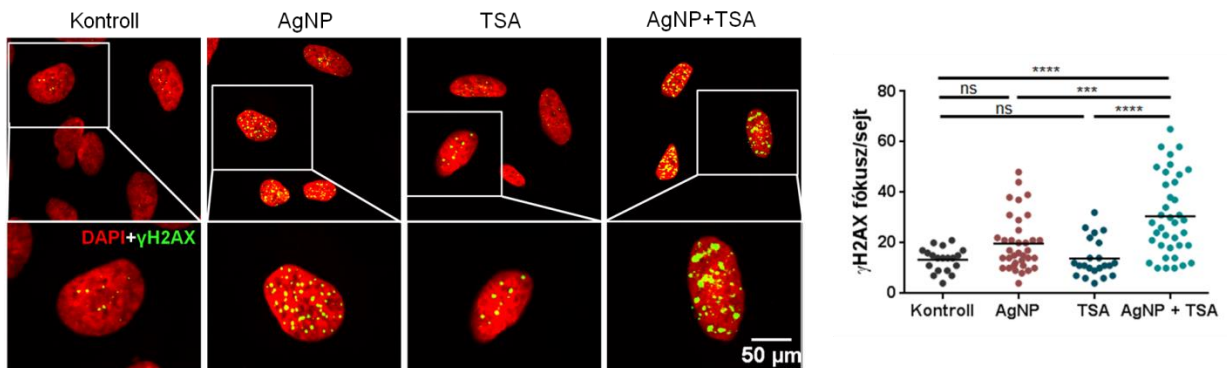
(4 μM AgNP + 30 nM TSA, vagy 6 μM AgNP + 45 nM TSA, vagy 8 μM AgNP + 60 nM TSA) szignifikánsan csökkentette a HeLa sejtek életképességét a kontrollhoz és a csak AgNP- vagy a csak TSA-kezelt sejtekéhez képest (1. ábra). Meghatároztuk az IC_{50} értékeket, mely azt a koncentrációt adja meg, amellyel történő kezelés hatására a sejtek életképessége 50%-ra csökkent. Az AgNP esetében az IC_{50} 8,15 μM , míg TSA esetében 63,91 nM volt 72 órás kezelést követően. Megállapítottuk a kombinációs indexet (CI) is, mely 0,33-nak bizonyult, ami erős szinergizmusra utal az AgNP és a TSA hatása között. A további kísérleteinkben az AgNP-t 6 μM , a TSA-t 45 nM koncentrációban alkalmaztuk 24 órás kezelések során HeLa sejteken.



1. ábra. Az ezüst nanorészecskék (AgNP) és a Trichostatin A (TSA) hatása a HeLa sejtek viabilitására. Az AgNP és a TSA kombinációjával kezelt HeLa sejtek viabilitása szignifikánsan csökkent az AgNP és a TSA külön-külön történő alkalmazásához viszonyítva. Kétszemponos ANOVA Tukey-féle többszörös összehasonlítás, **: P érték < 0,01; ***: P érték < 0,001; ****: P érték < 0,0001.

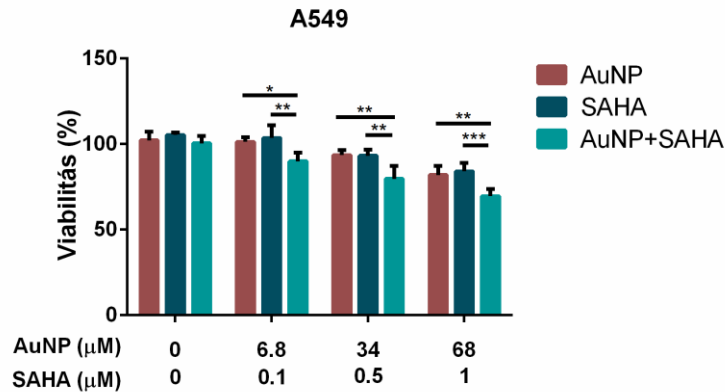
A DNS károsodás mértékét γH2AX festéssel vizsgáltuk az AgNP-vel, TSA-val vagy a kettő kombinációjával kezelt HeLa sejtekben. Az AgNP hatására kis mértékben megnőtt a γH2AX fókuszok száma a pozitívan festődő sejtekben a kontroll mintához képest, viszont a TSA önmagában nem váltott ki jelentősebb DNS károsodást. Viszont ha a HeLa sejteket AgNP és TSA együttesével kezeltük, az szignifikánsan megnövelte a γH2AX fókuszok számát nem csupán a kontrollhoz, de az AgNP, vagy TSA kezeléshez képest

is (2. ábra). Feltehetőleg a DNS jobban támadható az AgNP felszínéről leváló ezüst ionok és a keletkező reaktív oxigén gyökök számára a HDAC gátló TSA hatására kialakuló nyitottabb kromatin szerkezet miatt, amely DNS kettősszalú töréseket eredményez és apoptotikus sejthalált indukál.



2. ábra. Az ezüst nanorészecskék (AgNP) DNS károsító hatása Trichostatin A-val (TSA) kombinációban történő alkalmazás esetén. Bal oldal: Reprezentatív képek a kezelések hatására kialakuló DNS kettősszalú törések számának változásáról. Piros: DAPI festés, mely a sejtmagokat jelöli, zöld: γ H2AX fókuszok, melyek a DNS kettősszalú töréseket jelölik. Scale bar: 50 μ m. Jobb oldal: A γ H2AX fókuszok száma szignifikánsan nagyobb az AgNP és TSA együttes alkalmazását követően, mind a kezeltlen mintához, mind a TSA-val, illetve az AgNP-vel kezelt sejtekhez képest. Egyszempontos ANOVA, Tukey-féle többszörös összehasonlítás ***: P érték = 0,0006; ****: P érték < 0,0001.

A másik nanorészecske és HDAC gátló, azaz az AuNP és a SAHA hatásait is megvizsgáltuk irradiáció mellett és anélkül A549 sejteken. A besugarazatlan minták esetén sem az AuNP, sem a SAHA, sem a kettő kombinációja nem okozott viabilitás csökkenést az alkalmazott koncentrációkban 72 óra inkubációt követően. Viszont amennyiben sugárterápiával (2 Gy dózis) is kombináltuk az AuNP és SAHA expozíciót, akkor az AuNP+SAHA kezelt A549 sejtek szignifikánsan alacsonyabb viabilitást mutattak az AuNP-, illetve a SAHA-kezelt mintákéhoz képest (3. ábra).

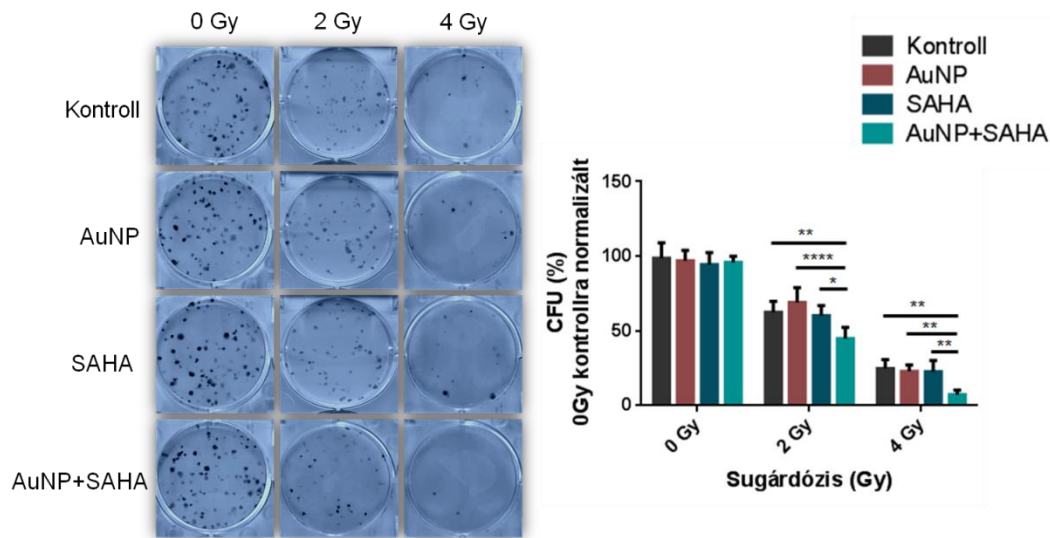


3. ábra. Az arany nanorészecskék (AuNP) és a szuberoil-anilid-hidroxámsav (SAHA) kombinációs kezelés hatása a tumoros sejtek viabilitására irradiációt követően. A 2 Gy sugárdózisnak kitett, AuNP+SAHA kezelésben részesült sejtek életképessége szignifikánsan alacsonyabb volt a csak AuNP- vagy csak SAHA-kezelt, besugarazott mintákhoz képest. Kétszemponyos ANOVA Tukey-féle többszörös összehasonlítás, *: P érték < 0,05; **: P érték < 0,01; ***: P érték < 0,001; ****: P érték < 0,0001.

CompuSyn szoftver segítségével meghatároztuk az A549 sejteken mért viabilitási adatok alapján az AuNP+SAHA párra a CI értéket, mely 0,41-nek bizonyult. Ez az 1-nél jóval kisebb értékű CI érték különösen erős szinergizmusra utal.

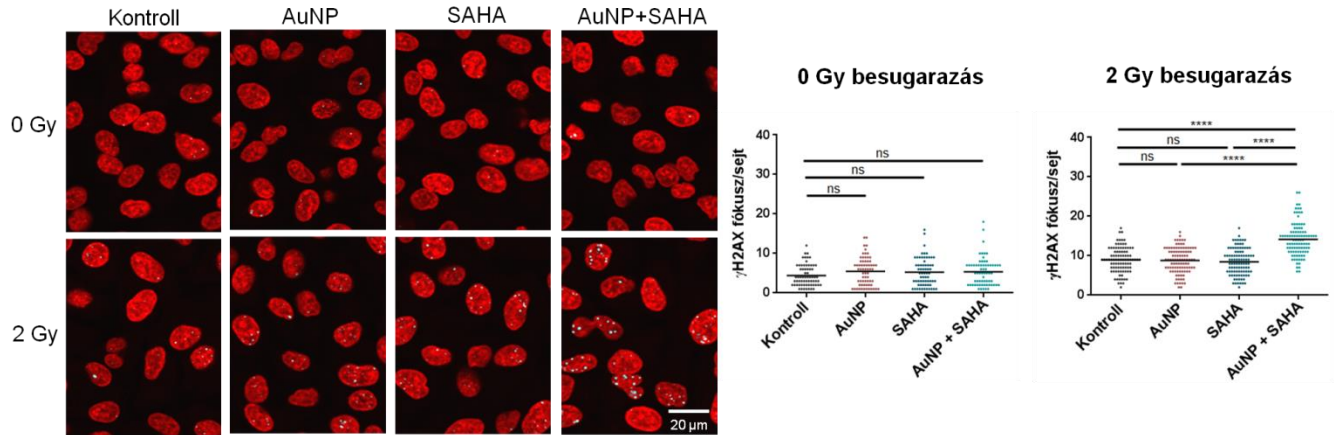
Azt, hogy az AuNP és SAHA kezelés radioszenzitizáló hatást fejt-e ki, az A549 sejtek kolóniaképző képességének vizsgálatával és a DNS kettősszálú törések mértékének meghatározásával tanulmányoztuk. Ahogy az várható volt, irradiáció nélkül a 6,8 μM AuNP vagy 0,1 μM SAHA kezelésben részesült és az ezek kombinációjának kitett (AuNP+SAHA) A549 sejtek által képzett kolóniák száma nem mutatott jelentősebb eltérést a kezeletlen mintában kialakult kolóniák mennyiségéhez képest. Amint a sejtek a kemoterápia mellett 2 Gy vagy 4 Gy sugárdózisban részesültek, a kolóniaképző képességük nagymértékben csökkent, elsősorban abban az esetben, mikor az AuNP-t és a SAHA-t együtt alkalmaztuk az A549 sejteken (4. ábra). Viszont egyik sugárdózis mellett sem tapasztaltunk

radioszenzitivációt akkor, ha a 6,8 μM AuNP-t és a 0,1 μM SAHA-t nem kombinációban, hanem önmagában alkalmaztuk.



4. ábra. Az aranynanorészecskék (AuNP) és szuberoil-anilid-hidroxámsav (SAHA) kombinációjának radioszenzitiváló hatása A549 sejteken. A 2 Gy vagy 4 Gy sugárdózisnak kitett, AuNP és SAHA kombinációjával kezelt sejtek kolóniaképző képessége szignifikánsan csökken a besugarozott kezeletlen, az AuNP, illetve a SAHA kezelésben részesülő sejtekhez képest. Kétutas ANOVA Tukey-féle többszörös összehasonlítás, *: P érték < 0,05; **: P érték < 0,01; ****: P érték < 0,0001.

Az AuNP, a SAHA és a kettő szer kombinációjával kezelt A549 sejtekben γH2AX festéssel vizsgáltuk az irradiáció DNS károsító hatásának mértékét, és meghatároztuk a γH2AX pozitív sejtekben belül a γH2AX fókuszok számát. Itt is azt tapasztaltuk, hogy az AuNP+SAHA kettős kezelésekre hatására a mintákban a γH2AX fókuszok száma szignifikánsan magasabbnak adódott az irradiációnak kitett, ám csak AuNP- vagy csak SAHA-kezelt, illetve a kezeletlen mintákhoz viszonyítva (5. ábra).



5. ábra. Az arany nanorészecskék (AuNP) és szuberoil-anilid-hidroxámsav (SAHA) alkalmazásának és az irradiációnak az együttes DNS károsító hatása A549 sejteken. Bal oldal: Reprezentatív képek a sejtekben keletkező DNS kettősszálú törések kialakulásáról a kezelések során, irradiációt követően. Piros: sejtmag, Kék: γ H2AX fókuszok, scale bar: 20 μ m. Jobb oldal: Ionizáló sugárzás nélkül az AuNP, SAHA és a kettő kombinációja nem okozott jelentős mennyiségű DNS kettősszálú törést, viszont 2 Gy sugárdózis hatására azokban a sejtekben, melyeket nanorészecskékkel és HDAC gátlóval is kezeltünk szignifikánsan több γ H2AX fókusz számoltunk a kezeletlen és a külön-külön AuNP- vagy SAHA-kezelt mintákhoz képest. Egyszemponyos ANOVA, Tukey-féle többszörös összehasonlítás ****; P érték < 0,0001

Eredmények megbeszélése

A klinikai gyakorlatban igen nagyszámú, eltérő kémiai szerkezetű és hatásmechanizmusú kemoterápiás szert, emellett leggyakrabban immunterápiát és sugárkezelést alkalmaznak a daganatos betegek kezelése során. A hatóanyag fejlesztéseken túl, a tumorellenes anyagok hatékonyabb célba juttatása, a tumorterápia specifitásának növelése, a nem kívánatos mellékhatások kiküszöbölése vagy csökkentése rendkívül intenzív nemzetközi kutatási aktivitás célpontja. A HDAC inhibitorok, több támadási ponton képesek a tumoros sejtek sejtbiológiai folyamatait befolyásolni. A kromatin szerkezet modulálásán túl számos fehérje aktivitását, stabilitását, fehérje-fehérje és fehérje-DNS kölcsönhatásaik erősségét is befolyásolják, ezáltal hatással vannak a génexpresszióra, a sejtek differenciációjára, proliferációjára, és több útvonalon keresztül

képesek apoptózist indukálni. A HDAC gátlók ideális kombinációs partnerek lehetnek a kemoterápiás hatóanyagok számára, hiszen az általuk kialakított nyitottabb kromatin szerkezeten keresztül, vagy az indukált apoptotikus folyamatok révén, tovább fokozhatják ezen kemoterápiás hatóanyagok DNS károsító vagy apoptózist kiváltó hatását.

A nanorészecskék alkalmazása is jelentős mértékben növelheti a tumorelles terápia hatékonyságát, mivel a részecskék képesek passzívan feldúsulni a tumoros szövetben. Ha a részecskéket hatóanyaghordozóként alkalmazzuk, akkor általuk növelhető a kemoterápiás szerek koncentrációja a daganatban, de az eleve citotoxikus sajátságú nanoanyagok, mint amilyenek az ezüst nanorészecskék, a felhalmozódásukat követően kifejtetik tumorelles aktivitásukat, vagy akár növelhetik a sugárterápia hatékonyságát radioszenzitizáló tulajdonságuk révén (pl. AuNP).

Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a fém nanorészecskék és a HDAC gátlók együtt jelentősen csökkentették a tumoros sejtek életképességét, kolóniaformáló képességét, jelentős mértékű oxidatív stresszt és DNS kettősszalú törést indukáltak, mely a rákos sejtek halálához vezetett [19, 20]. Eredményeink arra utalnak, hogy a hiszton-deacetiláz gátlók és a fém nanorészecskék kombinációban történő alkalmazása ígéretes tumorterápiás lehetőséget nyújt. Mindamellet, hogy külön-külön alkalmazva is hatékonyak, a két szer egymás hatását kiegészíti, felerősíti. A HDAC gátlók egyik támadáspontja a kromatint alkotó fehérjék acetilációja, melynek következtében a DNS sokkal kiszolgáltatottabbá válik a különböző károsító hatásoknak. Ezeknek a károsító hatásoknak a jelentős mértékű fokozása megvalósítható ionizáló sugárzás alkalmazásával, más hatásmechanizmusú és kémiai szerkezetű kemoterápiás hatóanyagok, vagy akár biológiailag reaktív fém nanorészecskék segítségével is. A HDAC gátlók és a fém nanorészecskék egymást potenciózó hatása úgy is értelmezhető, hogy már önmagában a fém nanorészecskék hatására igen

jelentős mértékben felerősödhet a reaktív oxigéngyökök képződése (pl. AgNP kezelés során), vagy AuNP jelenlétében ionizáló sugárzás alkalmazása mellett, de az így kialakított tumorsejt apoptózis vagy radioszenzitizáció is még tovább növelhető HDAC inhibitorok használatával.

Irodalomjegyzék

- [1] Pérez-Herrero, E., and Fernández-Medarde, A. (2015) Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 10.1016/j.ejpb.2015.03.018
- [2] Rudramurthy, G. R., and Swamy, M. K. (2018) Potential applications of engineered nanoparticles in medicine and biology: an update. *J. Biol. Inorg. Chem.* 10.1007/s00775-018-1600-6
- [3] Zhang, X. F., Liu, Z. G., Shen, W., and Gurunathan, S. (2016) Silver nanoparticles: Synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *Int. J. Mol. Sci.* 10.3390/ijms17091534
- [4] You, F., Tang, W., and Yung, L. Y. L. (2018) Real-time monitoring of the Trojan-horse effect of silver nanoparticles by using a genetically encoded fluorescent cell sensor. *Nanoscale.* 10.1039/c7nr05975b
- [5] Park, E. J., Yi, J., Kim, Y., Choi, K., and Park, K. (2010) Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. *Toxicol. Vitro.* 10.1016/j.tiv.2009.12.001
- [6] Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I. S., and Hoekstra, D. (2004) Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J.* 10.1042/BJ20031253
- [7] Wu, M., Guo, H., Liu, L., Liu, Y., and Xie, L. (2019) Size-dependent cellular uptake and localization profiles of silver nanoparticles. *Int. J.*

Nanomedicine. 10.2147/IJN.S201107

- [8] Jeong, E. H., Jung, G., Hong, C. A., and Lee, H. (2014) Gold nanoparticle (AuNP)-based drug delivery and molecular imaging for biomedical applications. *Arch. Pharm. Res.* 10.1007/s12272-013-0273-5
- [9] Sharma, H., Mishra, P. K., Talegaonkar, S., and Vaidya, B. (2015) Metal nanoparticles: A theranostic nanotool against cancer. *Drug Discov. Today.* 10.1016/j.drudis.2015.05.009
- [10] Das, R. P., Gandhi, V. V., Singh, B. G., and Kunwar, A. (2019) Passive and Active Drug Targeting: Role of Nanocarriers in Rational Design of Anticancer Formulations. *Curr. Pharm. Des.* 10.2174/1381612825666190830155319
- [11] Song, C. W. (1984) Effect of local hyperthermia on blood flow and microenvironment: A review. *Cancer Res.*
- [12] Chithrani, D. B., Jelveh, S., Jalali, F., Van Prooijen, M., Allen, C., Bristow, R. G., Hill, R. P., and Jaffray, D. A. (2010) Gold nanoparticles as radiation sensitizers in cancer therapy. *Radiat. Res.* 10.1667/RR1984.1
- [13] Kobayashi, K., Usami, N., Porcel, E., Lacombe, S., and Le Sech, C. (2010) Enhancement of radiation effect by heavy elements. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 10.1016/j.mrrev.2010.01.002
- [14] Liu, Y., Zhang, P., Li, F., Jin, X., Li, J., Chen, W., and Li, Q. (2018) Metal-based NanoEnhancers for future radiotherapy: Radiosensitizing and synergistic effects on tumor cells. *Theranostics.* 10.7150/thno.22172
- [15] Drazic, A., Myklebust, L. M., Ree, R., and Arnesen, T. (2016) The world of protein acetylation. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* 10.1016/j.bbapap.2016.06.007
- [16] Finnin, M. S., Donigian, J. R., Cohen, A., Richon, V. M., Rifkind, R. A.,

- Marks, P. A., Breslow, R., and Pavletich, N. P. (1999) Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature*. 10.1038/43710
- [17] Manal, M., Chandrasekar, M. J. N., Gomathi Priya, J., and Nanjan, M. J. (2016) Inhibitors of histone deacetylase as antitumor agents: A critical review. *Bioorg. Chem.* 10.1016/j.bioorg.2016.05.005
- [18] Shao, Y., Gao, Z., Marks, P. A., and Jiang, X. (2004) Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 10.1073/pnas.0408345102
- [19] Igaz, N., Kovács, D., Rázga, Z., Kónya, Z., Boros, I. M., and Kiricsi, M. (2016) Modulating chromatin structure and DNA accessibility by deacetylase inhibition enhances the anti-cancer activity of silver nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 10.1016/j.colsurfb.2016.07.004
- [20] Igaz, N., Szőke, K., Kovács, D., Buhala, A., Varga, Z., Bélteky, P., Rázga, Z., Tizslavicz, L., Vizler, C., Hideghéty, K., Kónya, Z., and Kiricsi, M. (2020) Synergistic radiosensitization by gold nanoparticles and the histone deacetylase inhibitor SAHA in 2D and 3D cancer cell cultures. *Nanomaterials*. 10.3390/nano10010158