



Gdański Uniwersytet Medyczny

Ewelina Barcińska

„Rola stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego w cytotoksycznym działaniu nanocząstek metali w badaniach in vitro”

Rozprawa doktorska

Praca została wykonana w Katedrze i Zakładzie Chemii Medycznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor: dr hab. Iwona Inkielewicz-Stępniak, prof. nadzw.

Gdańsk 2018

*Pragnę serdecznie podziękować wszystkim,
bez których niniejsza praca nie mogłaby powstać.*

**Mojemu promotorowi,
Pani Profesor Iwone Inkielewicz-Stępiak**
za przekazaną mi wiedzę i poświęcony czas
oraz nieocenioną pomoc przy realizacji niniejszej pracy.

**Panu Profesorowi Michałowi Woźniakowi, Kierownikowi
Katedry i Zakładu Chemii Medycznej GUMed** za
umożliwienie mi prowadzenia pracy naukowej.

Moim bliskim,
za okazane wsparcie, motywację i cierpliwość.

SPIS TREŚCI

WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ/ LIST OF MANUSCRIPTS INCLUDED IN THE DOCTORAL DISSERTATION	4
STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM.....	5
I. WYKAZ ZASTOSOWANYCH SKRÓTÓW.....	5
II. WPROWADZENIE	9
III. CELE PRACY	13
IV. MATERIAŁY I METODY	14
V. OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	17
VI. PODSUMOWANIE.....	24
SUMMARY IN ENGLISH.....	25
I. ABBREVIATIONS LIST	25
II. INTRODUCTION.....	29
III. THE AIM OF THE DOCTORAL DISSERTATION	32
IV. MATERIAL AND METHODS.....	33
V. REVIEW OF THE PUBLICATIONS, WHICH ARE THE PART OF DOCTORAL DISSERTATION.....	36
VI. SUMMARY	42
WYKAZ CYTOWANEGO PIŚMIENNICTWA/ CITATIONS LIST.....	43
PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ/ PUBLICATIONS INCLUDED IN THE DOCTORAL DISSERTATION.....	48

**WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH
W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

- Niska K*, Zielinska E*, Radomski MW, Inkielewicz-Stepniak I:
Metal nanoparticles in dermatology and cosmetology: Interactions with human skin cells.
Chem Biol Interact. 2017, pii: S0009-2797(16)30629-9
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279716306299?via%3Dihub>
5-letni/ 5-years Impact Factor: 3.308; Punktacja MNiSW: 30
**Wskazani autorzy mają jednakowy wkład w przygotowanie publikacji/
These authors contributed equally to this work.
- Zielinska E, Tukaj C, Radomski MW, Inkielewicz-Stepniak I:
Molecular Mechanism of Silver Nanoparticles-Induced Human Osteoblast Cell Death: Protective Effect of Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibitor.
PLoS One. 2016, 11(10):e0164137
<https://journals.plos.org/plosone/article/authors?id=10.1371/journal.pone.0164137>
5-letni/ 5 years Impact Factor: 3.352; Punktacja MNiSW: 35
- Zielinska E, Zauszkiewicz-Pawlak A, Wojcik M, Inkielewicz-Stepniak I:
Silver nanoparticles of different sizes induce a mixed type of programmed cell death in human pancreatic ductal adenocarcinoma.
Oncotarget. 2017, 9(4):4675-4697
<http://www.oncotarget.com/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path%5B%5D=22563&path%5B%5D=71320>
5-letni/ 5 years Impact Factor: 5.312; Punktacja MNiSW: 35
- Barcinska E, Wierzbicka J, Zauszkiewicz-Pawlak A, Jacewicz D, Dabrowska A, Inkielewicz-Stepniak I:
Role of Oxidative and Nitro-Oxidative Damage in Silver Nanoparticles Cytotoxic Effect Against Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells.
Oxid Med Cell Longev. 2018;
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6116403/pdf/OMCL2018-8251961.pdf>
5-letni/ 5-years Impact Factor 5.317; Punktacja MNiSW: 30

Łączny 5- letni współczynnik Impact Factor: 17,289

Łączna punktacja MNiSW: 130

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

I. WYKAZ ZASTOSOWANYCH SKRÓTÓW/ ABBREVIATIONS LIST

$^1\text{O}_2$	tlen singletowy
7-AAD	7-amino-aktynomycyna D
AgNPs	nanocząstki srebra
ATCC	American Type Culture Collection
AuNPs	nanocząstki złota
Bax	białko proapoptyczne
Bcl-2	białko antyapoptyczne
BrdU	Bromodeoksyurydyna
CAT	Katalaza
CuNPs	nanocząstki miedzi
DAX-J2 Orange	barwnik fluoescencyjny
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy
eNOS	endotelialna syntaza tlenku azotu
FeONPs	nanocząstki tlenku żelaza
GPX4	peroksydaza glutationowa 4
H₂O₂	nadtlenek wodoru

hFOB 1.19	linia komórkowa ludzkich płodowych osteoblastów
hTERT-HPNE	nietransformowane nowotworowo komórki wywodzące się z przewodu trzustkowego
IC₅₀	stężenie inhibitora hamujące w 50 %
iNOS	indukowalna syntaza tlenku azotu
K-Ras	(ang. <i>Kirsten Rat Sarcoma virus</i>), onkogen
LC3	(ang. <i>light chain 3</i>), białko cytozolowe, marker autofagii
LDH	dehydrogenaza mleczanowa
L-NIL	N6-1-iminoetylolizyna
MLKL	(ang. <i>mixed lineage kinase domain-like</i>), marker nekroptozy
MRI	rezonans magnetyczny
mRNA	matrycowy RNA
MTT	bromek 3- (4,5-dimetylotiazol-2-ilo) -2,5-difenylo-tetrazoliowy
Nec-1	nekrostatyna-1
NF-κB	(ang. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>), jądrowy czynnik czynnik transkrypcyjny
nNOS	neuronalna syntaza tlenku azotu
NO	tlenek azotu

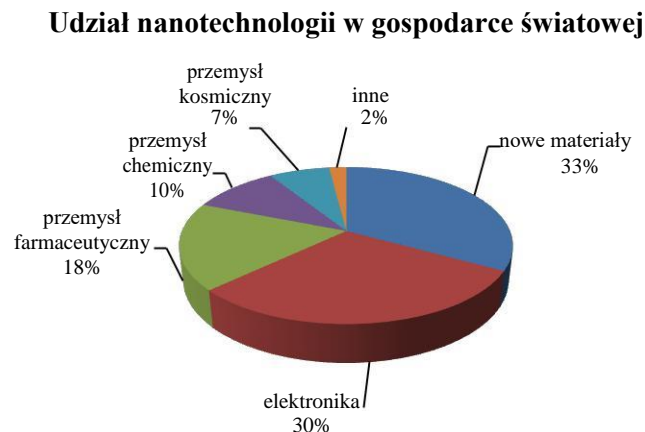
NOS	syntaza tlenku azotu
NT	3-nitrotyrozyna
O₂^{•-}	anionorodnik ponadtlenkowy
OH[•]	rodnik hydroksylowy
PANC-1	komórki raka trzustki wywodzące się z przewodu trzustkowego
PI	jodek propidyny
qPCR	ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy DNA
RFA	reaktywne formy azotu
RFT	reaktywne formy tlenu
RIP-1	(ang. <i>Receptor Interacting Protein-1</i>), marker nekroptozy
RIP-2	(ang. <i>Receptor Interacting Protein-2</i>), marker nekroptozy
RT-PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją
siRNA	krótki interferujący RNA
SOD1	cytoplazmatyczna dysmutaza ponadtlenkowa, miedziowo-cynkowa
SOD2	mitochondrialna dysmutaza ponadtlenkowa, manganowa

SOD3	zewnątrkomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa, miedziowo-cynkowa
TEM	transmisyjny mikroskop elektronowy
TiO₂NPs	nanocząstki ditlenku tytanu
UVA	promieniowanie ultrafioletowe typu A
UVB	promieniowanie ultrafioletowe typu B
ZnNPs	nanocząstki cynku
ZnONPs	nanocząstki tlenku cynku

II. WPROWADZENIE

Nanotechnologia to prężnie rozwijający się, interdyscyplinarny dział nauki skupiający się na projektowaniu, wytwarzaniu oraz modyfikowaniu struktur na poziomie atomów i cząsteczek. Podstawę nanotechnologii stanowią nanocząstki, czyli struktury o rozmiarach od 1 do 100 nm ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). Aby dać wyobrażenie jak niewielkie są to cząstki, szacuje się, że stosunek wielkości 1 nm nanocząstki do piłki futbolowej, jest taki sam, jak stosunek wielkości tej właśnie piłki do kuli ziemskiej [1]. Co więcej, potrzeba ośmiuset 100 nm nanocząstek, ustawionych obok siebie, aby dopasować je do szerokości ludzkiego włosa [2]. Minimalizacja do rozmiarów *nano* pozwala nadać substancjom nowe, unikalne właściwości, często odmienne od tych, które posiadają ich odpowiedniki w skali *makro*. Dlatego też, nanotechnologia cieszy się tak dużym zainteresowaniem współczesnej nauki i przemysłu. W ostatnim dziesięcioleciu zanotowano znaczącą dynamizację badań nad wykorzystaniem nanocząstek metali w medycynie, przemyśle tekstylnym i spożywczym, elektronice i inżynierii materiałowej [3].

W 2014 r. produkty wykorzystujące nanomateriały stanowiły 15% światowej produkcji przemysłowej o łącznej wartości 2,6 bilionów dolarów. Prognozy rynkowe sugerują, że w ciągu kolejnych 10-15 lat nanotechnologia może zwiększyć wartość produktów konsumpcyjnych i przemysłowych o około miliard dolarów [4]. Obecnie, notuje się około 30%, dziesięcioletni wzrost wprowadzanych na rynek produktów zawierających nanomateriały. W marcu 2015 r. liczba takich produktów wynosiła 1814, z których ponad 30% zawierało nanocząstki nieorganiczne – najczęściej nanocząstki srebra (AgNPs) [5-7].



Rysunek 1. Udział poszczególnych gałęzi przemysłu wykorzystujących nanotechnologię w gospodarce światowej [7].

Jednym z głównych czynników wpływających na ciągle rosnące zainteresowanie nanotechnologią, jest poszukiwanie nowych substancji, o określonych właściwościach, odpowiadających na potrzeby dzisiejszego świata. Proces ten, jest szczególnie widoczny w naukach biomedycznych: medycynie, biotechnologii, farmakologii, kosmetologii czy inżynierii tkankowej, gdzie poszukuje się coraz to nowych, bezpiecznych,

szybkodziałających, a przede wszystkim skutecznych substancji czynnych, które w przyszłości mogą zastąpić niedoskonałe lub nieskuteczne odpowiedniki [8, 9]. Ze względu na swoje unikalne właściwości: dużą powierzchnię w stosunku do rozmiaru oraz łatwość penetrowania przez błony biologiczne i bariery ustrojowe nanocząstki metali wydają się być ciekawą alternatywą dla obecnie stosowanych farmaceutyków. Co więcej, zastosowanie substancji w skali *nano* pozwala zmniejszyć stosowane dawki leku, a tym samym ograniczyć działania niepożądane oraz toksyczne [10, 11].

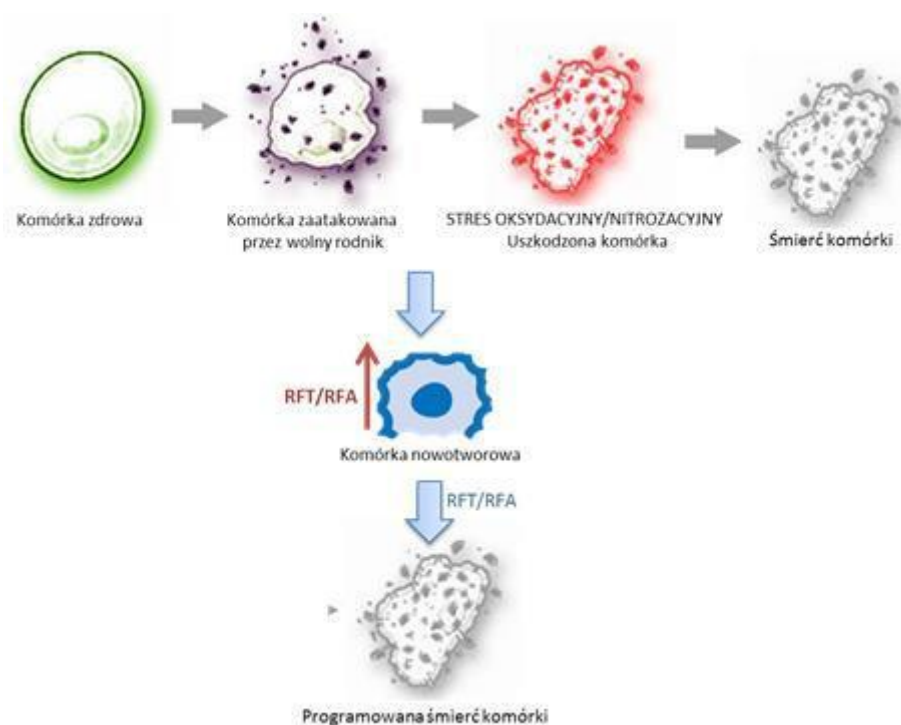
Jednymi z najczęściej stosowanych nanocząstek, o dużym potencjale aplikacyjnym, są nanocząstki srebra (AgNPs). Szacuje się, że do 2015 r. wyprodukowano ponad 1000 ton AgNPs do użytku w różnych produktach spożywczych, medycznych i przemysłowych [12]. Niesłabnące zainteresowanie naukowców, tym rodzajem nieorganicznych nanocząstek, wynika z ich silnych właściwości przeciwdrobnoustrojowych, o szerokim spektrum działania [13-15]. Dodane do produktów, przedłużają ich trwałość i biodostępność [16, 17]. Co więcej, właściwości przeciwzapalne, przeciwgrzybicze oraz wielokierunkowy mechanizm działania przeciwbakteryjnego, utrudniający wytworzenie mechanizmów lekooporności sprawiły, iż AgNPs stały się ciekawą alternatywą dla obecnie stosowanych preparatów leczniczych [15-17]. W medycynie stosuje się je głównie jako składnik: implantów ortopedycznych i stomatologicznych, preparatów przeciwbakteryjnych do miejscowego stosowania oraz nośniki substancji aktywnych [18]. W ostatnich latach pojawiły się również doniesienia literaturowe potwierdzające przeciwnowotworowe właściwości AgNPs wobec raka jajnika, raka piersi czy raka płuca [19-21]. Wzmogło to dynamizację badań nad zastosowaniem nanocząstek metali w terapii przeciwnowotworowej [22].

Jednak mały rozmiar i duża biodostępność nanocząstek metali i nanomateriałów, oprócz niekwestionowanych korzyści, niosą za sobą również niebezpieczeństwo dla zdrowia człowieka. Nanocząstki mogą przenikać do organizmu drogą wziewną, dermalną

(wątroby, nerek, śledziony, mózgu, serca czy jąder) i wywierać działanie toksyczne na poziomie komórkowym, tkankowym czy też ogólnoustrojowym [23, 24]. Do tej pory nie udało się jednoznacznie określić mechanizmu cytotoksycznego działania nanocząstek metali wobec komórek eukariotycznych. Wiadomo jednak, że nanocząstki wnikają do komórki, powodując uszkodzenia na poziomie ultrastrukturalnym w wyniku generowania stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego [25 -27].

Powstawanie reaktywnych form tlenu (RFT) i azotu (RFA) jest nieodłącznym elementem tlenowego metabolizmu komórek i w stężeniach fizjologicznych odgrywa ważną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu wielu procesów komórkowych (aktywacji czynników transkrypcyjnych (NF-kB, AP-1), regulacji procesów fosforylacji białek, czy regulacji poziomu wapnia w komórkach). Jednak wzmożona generacja RFT/ RFA lub uszkodzenie systemów antyoksydacyjnych prowadzi do zaburzenia homeostazy oksydacyjnej organizmu w kierunku reakcji utleniania [28, 29]. Wykazano, że nanocząstki mogą indukować wewnątrzkomórkowe powstawanie RFT i RFA [30, 31]. Nanocząstki tlenku cynku (ZnONPs), ditlenku tytanu (TiO₂NPs) oraz AgNPs przyczyniają się do powstawania rodników hydroksylowych (OH[•]), anionorodników nadadtlenkowych (O₂^{•-}), nadadtlenku

wodoru (H_2O_2), tlenu singletowego (1O_2), tlenku azotu (NO) oraz dwutlenku azotu (NO_2) w omórkach eukariotycznych [32-35]. Ponadto ZnONPs i AgNPs znacząco zmieniały ekspresję genów komórkowego systemu antyoksydacyjnego: dysmutazy ponadtlenkowej (SOD1, SOD2) i peroksydazy glutationowej (GPX4) [35, 36]. Zaobserwowano również istotne zmiany w aktywności SOD1, SOD2 oraz obniżenie poziomu glutationu, mającego za zadanie chronić komórkę przed uszkodzeniami oksydacyjnymi [36, 37]. W konsekwencji, stres oksydacyjny i nitrozacyjny generowany przez nanocząstki powoduje uszkodzenia struktur komórkowych, poprzez utlenianie białek, lipidów i DNA, które prowadzą do programowanej śmierci komórki [26, 37]. Z drugiej jednak strony, w przypadku komórek nowotworowych, stres oksydacyjny pełni dwojaką rolę. RFT/ RFA przyczyniają się do transformacji nowotworowej zdrowych komórek, a ich podwyższony poziom obserwuje się również w dalszym etapie funkcjonowania komórek nowotworowych [36]. Wzrost ten indukowany jest w procesie transdukcji komórkowych sygnałów onkogennych, takich jak K-Ras [37]. W konsekwencji, w komórkach nowotworowych dochodzi do zmiany przepuszczalności błony mitochondrialnej i aktywacji enzymów inicjujących proces apoptozy. Różnice w tolerancji poziomu RFT i RFA między komórkami nietransformowanymi nowotworowo a nowotworowymi sprawiają, że komórki nowotworowe są znacznie bardziej wrażliwe na zaburzenia potencjału redoks, co może być korzystne w opracowaniu nowych terapii przeciwnowotworowych [38].



Rysunek 2. Wpływ stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego na komórki eukariotyczne.

Należy podkreślić, że biologiczne efekty działania nanocząstek, w dużej mierze zależą od czynników fizykochemicznych tj. rodzaju, kształtu, rozmiaru, stopnia aglomeracji, funkcjonalizacji, stężenia, czasu inkubacji, jak również rodzaju narażonych komórek [39].

Dotychczasowe dane literaturowe nie są jednak wystarczające do jednoznacznego określenia molekularnego mechanizmu działania nanocząstek metali wobec komórek eukariotycznych, zarówno nowotworowych jak i nietransformowanych nowotworowo, oraz określenia roli stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego w cytotoksycznym działaniu nanocząstek. Z tego względu potrzebne są dalsze, szczegółowe badania nad wpływem nanocząstek na komórki eukariotyczne w celu maksymalizacji ich potencjału terapeutycznego przy zachowaniu bezpieczeństwa stosowania (*compliance*).

III. CELE PRACY:

Cel główny:

Określenie molekularnego mechanizmu cytotoksycznego działania nanocząstek metali wobec komórek eukariotycznych, ze zwróceniem szczególnej uwagi na rolę stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego.

Cele szczegółowe:

1. Analiza opisanych interakcji nanocząstek metali i tlenków metali z komórkami skóry (fibroblastami, keratynocytami, melanocytami). Ocena bezpieczeństwa stosowania oraz potencjalnego działania toksycznego nieorganicznych nanocząstek z uwzględnieniem roli stresu oksydacyjnego, w preparatach kosmetycznych i dermatologicznych w oparciu o dostępne dane literaturowe.
2. Określenie roli indukowalnej syntazy tlenku azotu (iNOS) i NO w cytotoksycznym działaniu AgNPs wobec ludzkich komórek osteoblastów w warunkach *in vitro*.
3. Określenie roli RFT i RFA oraz enzymatycznych przeciwutleniaczy w cytotoksycznym działaniu AgNPs wobec ludzkich komórek raka epitheloidalnego z przewodu trzustkowego w badaniach *in vitro*.

IV. MATERIAŁY I METODY

Nanocząstki

Komercyjnie dostępne, sferyczne AgNPs o rozmiarze 2 nm i 15 nm, zakupiono w US Research Nanomaterials (Houston, TX, USA).

Hodowle komórkowe

Do badań wykorzystano linie komórkowe: ludzkich płodowych osteoblastów hFOB 1.19, ludzkich komórek raka epithelioidalnego z przewodu trzustkowego PANC-1 oraz nietransformowanych nowotworowo komórek wywodzących się z przewodu trzustkowego hTERT-HPNE. Wszystkie linie pochodziły z kolekcji ATCC. Hodowle komórkowe prowadzone były w standardowych warunkach (37°C, 5% CO₂, wilgotność 95%), przy użyciu rekomendowanych pożywek hodowlanych [40, 41].

Charakterystyka fizykochemiczna AgNPs

W celu wykonania charakterystyki 2 nm i 15 nm AgNPs wykorzystano: transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM), analizę potencjału zeta, analizę masy cząsteczkowej z wykorzystaniem techniki dynamicznego rozpraszania światła (DLS), adsorpcyjną spektrometrię atomową (AAS) oraz spektrometrię mas sprzężoną z plazmą wzbudzaną indukcyjnie (ICP-MS). Nanocząstki charakteryzowano zarówno w roztworach wodnych jak i pożywkach hodowlanych.

Ocena cytotoksycznego działania AgNPs

Do oceny cytotoksycznego działania AgNPs wykorzystano testy kolorymetryczne: MTT (pomiar aktywności metabolicznej komórki), LDH (pomiar integralności błony komórkowej) i BrdU (ilościowy pomiar syntezy DNA w komórkach).

Ocena zdolności przenikania AgNPs przez błonę komórkową oraz indukcja zmian na poziomie ultrastrukturalnym

Zdolność penetrowania AgNPs przez błonę komórkową, lokalizację w komórce oraz zmiany ultrastrukturalne identyfikowano za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM).

Analiza procesu apoptozy i nekrozy

Wpływ AgNPs na proces apoptozy i nekrozy badano za pomocą cytometrii przepływowej - barwienia aneksyną V i jodkiem propidyny (PI). Ponadto charakterystyczne dla apoptozy i nekrozy zmiany ultrastrukturalne komórki, wywołane działaniem AgNPs identyfikowano za pomocą TEM. Proces nekrozy identyfikowano również za pomocą testu kolorymetrycznego LDH.

Identyfikacja procesu nekroptozy i nekrozy

Nekroptotyczną śmierć komórki odróżniano od nekrozy poprzez preinkubację komórek z selektywnym inhibitorem nekroptozy - nekrostatyną-1 a następnie przeprowadzając test LDH lub stosując cytometrię przepływową (barwienie aneksyną V i PI).

Poziom RTF

Poziom RFT badano za pomocą cytometrii przepływowej z wykorzystaniem 2,7-dichlorofluoresceiny (DCF-DA).

Poziom RFA: NO i NO₂

Poziom NO, po ekspozycji komórek na działanie AgNPs mierzono metodą Griess'a [42], oraz za pomocą cytometrii przepływowej przy użyciu Muse[®] Cell Analyzer (Merck, Poland) (barwienie DAX-J2 Orange). Natomiast poziom NO₂ badano z wykorzystaniem autorskiej metody spektrofotometrycznej dr hab. Dagmary Jacewicz z Uniwersytetu Gdańskiego [43].

Poziom białka markerów programowanej śmierci komórki, izoenzymów NOS, enzymów antyoksydacyjnych oraz 3-nitrotyrozyny (NT)

Do badania poziomu białka: markerów apoptozy (Bax, Bcl-2), autofagii (LC3), nekroptozy (RIP1, RIP3, MLKL), białka p53, enzymów antyoksydacyjnych: GPX4, SOD1, SOD2, izoenzymów NOS: indukowalnej iNOS, endotelialnej (eNOS), neuronalnej (nNOS) oraz NT wykorzystano metodę Western Blot.

Oznaczanie stężenia białka

Poziom białka w badanych próbkach mierzono metodą Bratforda [44].

Poziom mRNA markerów apoptozy (Bax, Bcl-2), izoenzymów NOS oraz enzymów antyoksydacyjnych

Do oceny poziomu mRNA genów kodujących: białko proapoptotyczne Bax, białko antyapoptotyczne Bcl-2, NOS (iNOS, eNOS, nNOS) oraz enzymy antyoksydacyjne: katalazę (CAT) i SOD1, SOD2, SOD3 wykorzystano łańcuchową reakcję polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym RT-PCR.

Pomiar poziomu 3-nitrotyrozyny

Poziom 3-nitrotyrozyny, markera potranslacyjnej modyfikacji białek przez RFA, badano za pomocą komercyjnie dostępnego testu ELISA (Abcam, Poland) oraz metodą Western Blot.

Wyciszanie ekspresji iNOS

W celu dokładniejszej identyfikacji związku pomiędzy wywołanym przez AgNPs wzrostem poziomu iNOS a śmiercią komórki, osteoblasty transfekowano siRNA iNOS w celu wyciszenia ekspresji iNOS. Badania przeprowadzono również w obecności N-iminoetylo-L-lizynę (L-NIL) - selektywnego inhibitora iNOS.

Zmiany potencjału mitochondrialnego i permeabilizacji błony komórkowej

Wpływ AgNPs na zmiany potencjału mitochondrialnego i permeabilizacji błony komórkowej analizowano za pomocą Muse MitoPotential Assay Kit (Merc, Poland) (barwienie 7-amino-aktynomycyną D (7-AAD)).

Analiza cyklu komórkowego

Wpływ AgNPs na regulację cyklu komórkowego przeprowadzono za pomocą cytometrii przepływowej – barwienie PI i analizowano za pomocą CellQuest Pro software.

Analiza statystyczna

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej za pomocą programu GraphPad Prism 5 oraz testu ANOVA jednokierunkowa i testu post-hock Tukey'a (przedział ufności 95%, $\alpha=0,05$).

V. OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Na rozprawę doktorską składają się cztery prace, w tym: jeden artykuł poglądowy stanowiący wprowadzenie w tematykę potencjalnego, bezpiecznego stosowania nanocząstek metali w kosmetologii i dermatologii z uwzględnieniem ich interakcji z komórkami skóry. Pozostałe trzy artykuły, to prace oryginalne, skupiające się na określeniu bezpieczeństwa stosowania oraz możliwości terapeutycznych AgNPs i tym samym ich zastosowania w medycynie (ortopedii i onkologii) ze zwróceniem szczególnej uwagi na dwojaką rolę stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego w cytotoksycznym działaniu nanocząstek.

1. Zastosowanie nanocząstek metali w dermatologii i kosmetologii. Interakcje nanocząstek z komórkami skóry.

Niska K*, Zielinska E*, Radomski MW, Inkielewicz-Stepniak I. *Metal nanoparticles in dermatology and cosmetology: Interactions with human skin cells*. Chem Biol Interact. 2017, pii: S0009-2797(16)30629-9.

**Wskazani autorzy mają jednakowy wkład w przygotowanie publikacji*

Rynek dermokosmetyczny, jest jednym z największych światowych rynków, korzystających z odkryć współczesnej nanotechnologii [5]. Nanocząstki, są powszechnym składnikiem wielu kremów, maści, środków czystości czy preparatów do dezynfekcji, używanych w życiu codziennym [45]. Jednak liczne doniesienia literaturowe wskazują na toksyczne efekty działania nanocząstek wobec komórek skóry [46]. Ogranicza to w znaczny sposób możliwość ich stosowania w preparatach dermokosmetycznych. Ponadto molekularne mechanizmy toksycznego działania nanocząstek nie zostały dotychczas jasno określone. Zwraca się jednak szczególną uwagę na istotną rolę stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego w cytotoksycznym działaniu nanocząstek [45].

W związku z powyższym, w pracy poglądowej skupiliśmy się na ocenie potencjału terapeutycznego, bezpieczeństwa stosowania oraz prawdopodobnego działania cytotoksycznego (z uwzględnieniem wzmoczonej generacji RFT) nanocząstek metali i tlenków metali, stosowanych w preparatach dermokosmetycznych, wobec komórek skóry: melanocytów, keratynocytów i fibroblastów.

Początkowo, krótko przedstawiliśmy historię nanotechnologii oraz jej szerokie zastosowanie w niemal wszystkich dziedzinach życia. Opisaliśmy znaczący wpływ kosmetologii i dermatologii na rozwój globalnego przemysłu nanotechnologicznego. Przedstawiliśmy dostępne na rynku produkty dermokosmetyczne, zawierające nanocząstki metali i tlenków metali. Przybliżyliśmy budowę i zastosowanie innych formułacji nanocząstek (nanosfer, nanokapsuł, niosomów i nanoemulsji) wykorzystywanych w preparatach służących do pielęgnacji skóry. Ponadto, scharakteryzowaliśmy rodzaje nanocząstek, najczęściej stosowanych w preparatach kosmetycznych i dermatologicznych (TiO₂NPs, ZnONPs, AgNPs) w celu poprawy jakości tych produktów. Zwróciliśmy szczególną uwagę na unikalne właściwości nieorganicznych nanocząstek tj. łatwość

penetrowania przez błony biologiczne i bariery ustrojowe oraz dużą powierzchnię w stosunku do rozmiaru, niosące za sobą zarówno korzyści stosowania jak i związane z nimi niebezpieczeństwa. Warto podkreślić, że duże znaczenie dla efektywności działania nanocząstek mają ich właściwości fizykochemiczne: rozmiar, kształt, stężenie, czas ekspozycji czy funkcjonalizacja. Decydują one o możliwości przenikania nanocząstek w głąb tkanki, lokalizacji w komórkach, potencjalnym działaniu cytotoksycznym oraz możliwościach zastosowania. W dalszej części pracy przedstawiliśmy przeciwdrobnoustrojowe właściwości nanocząstek metali: grzybobójcze działanie nanocząstek miedzi (CuNPs) i AgNPs oraz przeciwbakteryjne działanie nanocząstek cynku (ZnNPs), AgNPs, ZnONPs, TiO₂NPs, zarówno wobec szczepów referencyjnych jak i klinicznych (w tym lekoopornych). Podjęliśmy również próbę opisu molekularnych mechanizmów toksycznego działania wyżej wymienionych nanocząstek wobec komórek bakteryjnych i grzybiczych, które mimo licznych badań nadal pozostają niewyjaśnione. Wydaje się, że cytotoksyczne działanie nanocząstek metali jest związane z ich oddziaływaniem na błonę komórkową bakterii i grzybów, w wyniku czego nanocząstki przenikają do wnętrza komórek powodując

zaburzenia w funkcjonowaniu łańcucha oddechowego oraz prowadzą do powstawania stresu oksydacyjnego [47]. Dochodzi w ten sposób do hamowania podziałów komórkowych i uruchomienia mechanizmów śmierci komórki. Ponadto, scharakteryzowaliśmy hamujące działanie nanocząstek tlenu żelaza (II) (FeONPs), nanocząstek złota (AuNPs), AgNPs, ZnONPs na powstawanie biofilmu bakteryjnego. Biofilm bakteryjny najczęściej tworzy się w miejscach trudnodostępnych np. w jamie ustnej, na powierzchni implantów ortopedycznych

czy w ranach przewlekłych i stanowi duży problemem dla współczesnej medycyny, a nieleczony prowadzi do poważnych powikłań zdrowotnych. Skupiliśmy się również na zastosowaniu nanocząstek metali w walce z nowotworami skóry. Duży potencjał aplikacyjny w terapii celowanej wykazano dla AuNPs i FeONPs. Ponadto, mogą być one z powodzeniem stosowane do obrazowania skórnych zmian nowotworowych, jako środek kontrastowy w rezonansie magnetycznym (MRI). Z drugiej jednak strony zwróciliśmy szczególną uwagę na możliwość penetrowania nanocząstek w głąb skóry i związane z tym efekty cytotoksyczne wobec keratynocytów, melanocytów i fibroblastów skóry. Mimo, iż niektóre nanocząstki (ZnONPs, TiO₂NPs) są powszechnie stosowane w preparatach przeciwsłonecznych, w celu poprawy ich właściwości ochronnych, to poddane działaniu promieniowania ultrafioletowego (UVA, UVB) mogą wykazywać nasilone działanie fototoksyczne, fotoalergiczne i fotokancerogenne, poprzez generowanie RFT i RFA [48, 49]. W ostatniej części pracy opisaliśmy i porównaliśmy właściwości poszczególnych rodzajów nanocząstek: TiO₂NPs, ZnONPs, AuNPs i AgNPs. Zwróciliśmy szczególną uwagę na: absorpcje promieniowania UV, właściwości przeciwdrobnoustrojowe i przeciwzapalne, działanie cytotoksyczne, fototoksyczne, genotoksyczne, indukcję procesu kancerogenezy, możliwość penetrowania w głąb skóry i akumulację w komórkach, zmiany na poziomie ultrastruktury, generowanie stresu oksydacyjnego oraz indukcję programowanej śmierci komórki.

Podsumowując, praca stanowi wstęp do dalszych rozważań nad bezpiecznym stosowaniem nanocząstek w medycynie. Jednoznacznie identyfikuje ogromne możliwości

wynikające z zastosowania nanotechnologii do poszukiwania i opracowywania nowych preparatów leczniczych w celu poprawy ich skuteczności. Zwraca jednak zarazem uwagę

na konieczność monitorowania bezpieczeństwa stosowania wybranych nanocząstek, uwzględniając możliwość generowania przez nie RFT.

2. Rola indukowalnej NOS w cytotoksycznym działaniu AgNPs wobec ludzkich komórek osteoblastów.

Zielinska E, Tukaj C, Radomski MW, Inkielewicz-Stepniak I: *Molecular Mechanism of Silver Nanoparticles-Induced Human Osteoblast Cell Death: Protective Effect of Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibitor*. PLoS One. 2016, 11(10):e0164137

Ze wszystkich stosowanych w medycynie nanocząstek metali, największą uwagę przykuwają AgNPs. Ze względu na szerokie spektrum aktywności przeciwbakteryjnej trwają intensywne badania nad możliwością ich wykorzystania w produkcji implantów ortopedycznych [50-52]. Jednakże, informacje wskazujące na uwalnianie AgNPs z implantów i ich cytotoksyczne działanie oraz mało poznany mechanizm toksycznego działania wobec komórek kości znacznie ograniczają ich zastosowanie w praktyce klinicznej. Dotychczas dowiedziono, że AgNPs, podobnie jak inne nanocząstki, mają zdolność do wytwarzania RFA, w tym NO. Powstawanie RFA może być indukowane przez wszystkie trzy izoformy NOS: eNOS, nNOS i iNOS. Jednak największy związek z chorobami i urazami kości oraz uszkodzeniami osteoblastów wykazano dla iNOS. Zaburzenia metabolizmu NO, wywołane działaniem AgNPs mogą powodować stres nitrozacyjny, a co za tym idzie śmierć komórek [53].

Dlatego, podjęłam próbę identyfikacji molekularnych mechanizmów uszkodzenia i śmierci ludzkich komórek osteoblastów w wyniku ekspozycji na AgNPs wraz z oceną roli NO i iNOS w cytotoksycznym działaniu AgNPs.

Do badań wybrano linię komórkową ludzkich płodowych osteoblastów hFOB 1.19, która jest powszechnie stosowanym modelem uszkodzeń i regeneracji tkanki kostnej. Zgodnie z przeprowadzoną charakterystyką stosowanych AgNPs, określono ich rozmiar jako $18,3 \pm 2,6$ nm. Analiza ultrastrukturalna (TEM) wykazała, że w czasie 24-godzinnej ekspozycji, 18,3 nm AgNPs (w stężeniu 30 $\mu\text{g/ml}$) wnikają do komórek osteoblastów i akumulują się w wakuolach, tworząc agregaty. Zaobserwowano zależne od stężenia zmiany ultrastruktury charakterystyczne dla autofagii (tworzenie autofagolizosomów), apoptozy (zmniejszenie objętości komórek, kondensację chromatyny) i nekrozy (rozpad błony cytoplazmatycznej, rozpad chromatyny jądrowej, wakuolizację cytoplazmy). Dezintegracja błony komórkowej skutkowałą zwiększonym poziomem uwalnianego LDH z komórki, co w połączeniu z obserwacją ultrastruktury, może świadczyć o jej śmierci na drodze nekrozy lub nekroptozy. Ponadto cytometria przepływowa pozwoliła na identyfikację komórek apoptotycznych i nekrotycznych/ nekroptotycznych w badanych próbkach. W celu dalszej identyfikacji rodzaju śmierci komórki wywołanej przez AgNPs, zastosowano selektywny inhibitor nekroptozy – nekrostatynę 1 (Nec-1). Cytometria przepływowa (barwienie aneksyną V i PI) nie wykazała istotnych statystycznie zmian procentowej liczby martwych komórek (PI+) po zastosowaniu Nec-1, wskazując na nekrotyczną śmierć osteoblastów. Dodatkowo,

obserwowano wpływ AgNPs na wzrost stężenia markerów stresu nitrozacyjnego: NO i NT [54, 55] w komórkach osteoblastów w sposób zależny od stężenia i czasu inkubacji. Stwierdzono również pozytywną korelację pomiędzy stężeniem AgNPs i iNOS na poziomie białka i mRNA ($r = 0,837$, $r = 0,721$, odpowiednio; $p < 0,001$). Zastosowanie selektywnego inhibitora iNOS – L-NIL jak również wyciszenie ekspresji genu iNOS za pomocą siRNA powodowało brak wzrostu poziomu NO, NT oraz zahamowanie procesu apoptozy i nekrozy w komórkach osteoblastów inkubowanych z AgNPs.

Nasze wyniki jednoznacznie wskazują, że AgNPs w rozmiarze 18,3 nm wnikają do komórek osteoblastów i powodują zmiany w ultrastrukturze, prowadzące do apoptozy i nekrozy w wyniku indukowania stresu nitrozacyjnego. W związku z powyższym należy zachować szczególną ostrożność podczas stosowania AgNPs w implantach ortopedycznych. Jednocześnie, w toku dalszych badań dowiedliśmy, że selektywne hamowanie iNOS może okazać się skuteczną metodą pozwalającą na bezpieczne stosowanie implantów ortopedycznych powlekanych AgNPs.

3. Ocena przeciwnowotworowego mechanizmu działania AgNPs wobec komórek raka trzustki

Zielinska E, Zauszkiewicz-Pawlak A, Wojcik M, Inkielewicz-Stepniak I: *Silver nanoparticles of different sizes induce a mixed type of programmed cell death in human pancreatic ductal adenocarcinoma*. *Oncotarget*. 2017, 9(4):4675-4697.

W ostatnim dziesięcioleciu rozwój nanotechnologii wpłynął znacząco na dynamizację badań w dziedzinie farmakologii onkologicznej. Unikalne właściwości nanocząstek pozwoliły na ich zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej (jako nośników leków, w terapii celowanej oraz diagnostyce) [56]. Nadal jednak szuka się nowych, efektywniejszych metod leczenia wielu chorób nowotworowych, ze względu na dużą toksyczność oraz niezadowalającą skuteczność obecnie stosowanych terapii. Ciekawą alternatywą wydają się być AgNPs, ze względu na szeroki zakres aktywności biologicznej. Ponadto dane literaturowe potwierdzają cytotoksyczne działanie AgNPs wobec komórek raka piersi, płuca czy jajnika [19-21]. Nie należy jednak zapominać, o potencjalnej toksyczności AgNPs wobec komórek nietransformowanych nowotworowo. Prowadząc badania należy zawrócić szczególną uwagę na optymalizację stężeń nanocząstek, które pozwolą osiągnąć zadowalające efekty terapii przy możliwie najniższej toksyczności (działaniach ubocznych).

W związku z powyższym, celem naszych badań była ocena cytotoksycznego działania AgNPs na ludzkie komórki raka epителиoidalnego z przewodu trzustkowego (PANC-

1) w porównaniu z nietransformowanymi nowotworowo komórkami wywodzącymi się z tej samej tkanki (hTERT-HPNE) a następnie identyfikacja molekularnych mechanizmów śmierci komórek nowotworowych.

Nowotwór trzustki został wybrany ze względu na wysoką śmiertelność oraz brak skutecznej metody leczenia. Do badań wykorzystywano AgNPs o średnicach 2 nm i 15 nm,

w celu oceny wpływu rozmiaru nanocząstek na ich aktywność biologiczną. Charakterystyka AgNPs pozwoliła jednoznacznie zdefiniować ich rozmiar jako 2,6 oraz 18 nm. Wykazano, że AgNPs skuteczniej hamowały proliferację komórek nowotworu trzustki, w porównaniu z nietransformowanymi nowotworowo komórkami trzustki. Cytotoksyczne działanie AgNPs zależne było od ich rozmiaru i stężenia. Wyższą cytotoksyczność obserwowano dla nanocząstek o mniejszym rozmiarze - 2.6 nm. Wartości stężenia hamującego w 50 % (IC₅₀) uzyskane w przeprowadzonych badaniach cytotoksyczności AgNPs zestawiono w poniższej tabeli.

Tab.1 Wartości IC₅₀ uzyskane po ekspozycji komórek PANC-1 i hTERT-HPNE na AgNPs.

Linia komórkowa	Rozmiar AgNPs (nm)	IC₅₀ dla testu LDH (µg/ml)	IC₅₀ dla testu MTT (µg/ml)
PANC-1	2,6	3,19	1,67
	18	56,46	26,81
hTERT-HPNE	2,6	8,06	3,74
	18	160,3	58,46

IC₅₀, obliczono z następującego równania: log (inhibitor) względem krzywych odpowiedzi przy użyciu programu GraphPad Prism 5.

Ponadto analiza ultrastruktury komórek PANC-1 wykazała, że zarówno AgNPs w rozmiarze 2,6 nm jak i 18 nm wnikają do wnętrza komórki tworząc kaweole oraz powodują zmiany charakterystyczne dla autofagii (obecność autofagosomów), apoptozy (zmniejszenie wielkości komórek i kondensacji chromatyny), nekroptozy (obrzęk jądra komórkowego), nekrozy (rozpad błony cytoplazmatycznej, rozpad chromatyny jądrowej, wakuolizacja cytoplazmy oraz brak organelli) i katastrofy mitotycznej (multinukleacja jądra komórkowego). Zaobserwowaliśmy również, że preinkubacja komórek PANC-1 z Nec-1 istotnie statystycznie redukowało cytotoksyczne działanie 2,6 i 18 nm AgNPs wobec komórek raka trzustki, wskazując tym samym na nekroptotyczną śmierć komórki. Ponadto, analiza cytometryczna potwierdziła apoptotyczną i nekrotyczną/ nekroptotyczną śmierć komórek PANC-1. Dodatkowo, ekspozycja komórek raka trzustki na działanie 2,6 i 18 nm AgNPs zwiększała istotnie statystycznie poziom białek Bax, LC3, RIP-1, RIP-2, MLKL charakterystycznych dla apoptozy, autofagii i nekroptozy oraz obniżała poziom antyapoptotycznego białka Bcl-2. Wszystkie obserwowane efekty działania AgNPs zależne były od ich stężenia i rozmiaru.

Podsumowując, nasze badania dowodzą, że 2,6 nm i 18 nm AgNPs wykazują znacznie wyższą cytotoksyczność wobec komórek raka trzustki w porównaniu z nietransformowanymi nowotworowo komórkami wywodzącymi się z tej samej tkanki.

Zaobserwowaliśmy mieszany typ śmierci komórek PANC-1 na drodze apoptozy, nekroptozy, autofagii, nekrozy i katastrofy mitotycznej. Otrzymane wyniki mogą przyczynić się do polepszenia skuteczności walki z lekoopornością komórek nowotworowych oraz stanowią pierwszy krok w ocenie przydatności AgNP jako potencjalnej substancji o działaniu przeciwnowotworowym.

4. Rola stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego w cytotoksycznym działaniu AgNPs wobec komórek nowotworowych trzustki

Barcinska E, Wierzbicka J, Zauszkiewicz-Pawlak A, Jacewicz D, Dabrowska A, Inkielewicz-Stepniak I: *Role of Oxidative and Nitro-Oxidative Damage in Silver Nanoparticles Cytotoxic Effect Against Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells*. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;

Kontynuując nasze badania postanowiliśmy skupić się na roli stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego w indukowanym przez AgNPs, o rozmiarze 2.6 i 18 nm, mieszanym typie śmierci komórek raka trzustki. Liczne doniesienia naukowe wskazują na istotną rolę podwyższonego poziomu RFT i RFA w generowaniu programowanej śmierci komórek nowotworowych. Biorąc pod uwagę powyższe informacje, oraz różnice w odporności na stres oksydacyjny i nitrozacyjny w komórkach nowotworowych i nietransformowanych nowotworowo, oksydacyjny mechanizm śmierci komórek nowotworowych może okazać się przydatny w opracowaniu nowej, alternatywnej metody chemoterapii.

Dlatego celem naszych badań było określenie roli stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego w cytotoksycznym działaniu 2,6 i 18 nm AgNPs wobec komórek nowotworowych trzustki (PANC-1).

W badaniach wykazaliśmy, że ekspozycja komórek trzustki (PANC-1, hTERT-HPNE) na 2,6 i 18 nm AgNPs prowadzi do wzrostu poziomu RFT, wyższego dla komórek raka trzustki, w porównaniu z komórkami nietransformowanymi nowotworowo w sposób zależny od stężenia. Ponadto, zaobserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu RFA oraz wzrost wszystkich badanych izoform NOS na poziomie mRNA i białka w komórkach PANC-1.

Obserwacja ta wiązała się z obniżeniem poziomu mRNA i/ lub białka enzymów antyoksydacyjnych: SOD1, SOD2, GPX-4, CAT oraz wzrostem poziomu mRNA SOD3.

Należy zaznaczyć, że obniżenie ekspresji genu kodującego SOD3 wiąże się ze wzrostem agresywności i oporności na leczenie nowotworów trzustki, płuc czy nerek [57].

Zaobserwowaliśmy również obniżenie potencjału błonowego mitochondriów oraz akumulację populacji PANC-1 w fazie sub-G1 cyklu komórkowego, co może wskazywać na apoptotyczną śmierć komórki. Dodatkowo, wykazaliśmy zmiany ultrastrukturalne charakterystyczne dla stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego (pęcznienie i degradację grzebieni mitochondrialnych oraz kondensację mitochondriów) indukowane przez AgNP zarówno w rozmiarze 2,6 nm jak i 18 nm.

Podsumowując, otrzymane wyniki pozwoliły nam potwierdzić nasze przypuszczenia, że stres oksydacyjny i nitrozacyjny jest związany z cytotoksycznym działaniem i indukowaną

przez AgNPs programowaną śmiercią komórek we raka trzustki. Ponadto, różnice
wrażliwości komórek nowotworowych i nietrasformowanych nowotworowo
na prooksydacyjne działanie AgNPs mogą zostać wykorzystane do opracowania nowych
strategii nanoterapii raka trzustki.

V. PODSUMOWANIE

Nanotechnologia znalazła szerokie zastosowanie zarówno w medycynie jak i życiu codziennym. Nanocząstki metali, a szczególnie AgNPs wykazują duży potencjał aplikacyjny i terapeutyczny. Jednak ze względu na możliwość występowania efektów niepożądanych wywoływanych przez AgNPs, konieczne jest głębsze poznanie molekularnych mechanizmów ich działania, w celu optymalizacji leczenia i minimalizacji efektów ubocznych. Warto podkreślić, że efekt toksyczny nanocząstek w dużej mierze zależy od ich właściwości fizykochemicznych: rozmiaru, kształtu, stężenia, czasu inkubacji a także rodzaju eksponowanych komórek. W związku z tym nawet niewielka modyfikacja nanocząstek (np. zmniejszenie/ zwiększenie rozmiaru, zmiana kształtu, powierzchni) może znacząco wpłynąć na mechanizm ich działania, poprawiając biokompatybilność lub efekt selektywnej cytotoxyczności wobec komórek nowotworowych w porównaniu z komórkami nietransformowanymi nowotworowo.

Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej jednoznacznie wykazały cytotoxyczne, prooksydacyjne działanie nanocząstek wobec komórek eukariotycznych. Efekt ten, może być zarówno korzystny: wykorzystywany w terapii przeciwnowotworowej, jak i negatywny, jeśli dotyczy wpływu na komórki nietransformowane nowotworowo (komórki skóry, kości). Dlatego zastosowanie nanocząstek między innymi w produktach medycznych (protezach, implantach, opatrunkach) nadal pozostaje ograniczone. Należy zatem pamiętać o konieczności monitorowania ryzyka wynikającego ze stosowania nanocząstek metali i tym samym minimalizacji ich toksycznego działania np. poprzez kontrolowany wpływ na ścieżki sygnalizacyjne programowanej śmierci komórki czy funkcjonalizację nanocząstek.

Dużą nadzieję na powodzenie nanoterapii daje wykazana w naszych badaniach, większa wrażliwość komórek nowotworowych na działanie AgNPs (selektywna prooksydacyjna cytotoxyczność związana z generowaniem RFT i RFA). Ponadto, potwierdzony przez nas związek śmierci komórek eukariotycznych z indukowanym przez nanocząstki wytwarzaniem RFT i RFA może przyczynić się do opracowania nowych terapii przeciwnowotworowych, wykorzystujących ten mechanizm śmierci komórki.

SUMMARY IN ENGLISH

I. WYKAZ ZASTOSOWANYCH SKRÓTÓW/ ABBREVIATIONS LIST

$^1\text{O}_2$	singlet oxygen
7-AAD	7-aminoactinomycin D
AgNPs	silver nanoparticles
ATCC	American Type Culture Collection
AuNPs	gold nanoparticles
Bax	pro-apoptotic protein
Bcl-2	anti-apoptotic protein
BrdU	bromodeoxyuridine
CAT	catalase
CuNPs	copper nanoparticles
DAX-J2 Orange	fluorescent dye
DNA	deoxyribonucleic acid
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
FeONPs	iron oxide nanoparticles
GPX4	glutathione peroxidase 4
H₂O₂	hydrogen peroxide
hFOB 1.19	human fetal osteoblast cells line

hTERT-HPNE	immortalized human pancreas duct epithelial cells line
IC₅₀	the half maximal inhibitory concentration
iNOS	inducible nitric oxide synthase
K-Ras	Kirsten Rat Sarcoma virus, oncogene
LC3	light chain 3, cytosolic protein, autophagy marker
LDH	lactate dehydrogenase
L-NIL	L-N6-(1-Iminoethyl)lysine
MLKL	<i>mixed lineage kinase domain-like</i> , necroptosis marker
MRI	magnetic resonance imaging
mRNA	messenger RNA
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-diphenyl tetrazolium bromide
Nec-1	necrostatin-1
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell, crucial transcription factor</i>
nNOS	neuronal nitric oxide synthase
NO	nitric oxide
NOS	nitric oxide synthase
NT	3-nitrotyrosine

O₂⁻	superoxide anion radical
OH[•]	hydroxyl radical
PANC-1	human pancreas ductal adenocarcinoma cells
PI	propidium iodide
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
RFA	reactive nitrogen species
RFT	reactive oxygen species
RIP-1	<i>Receptor Interacting Protein-1</i> , necroptosis marker
RIP-2	<i>Receptor Interacting Protein-2</i> , necroptosis marker
RT-PCR	reverse transcriptase PCR
siRNA	small interfering RNA
SOD1	cytoplasmic, copper-zinc superoxide dismutase
SOD2	mitochondrial, manganese superoxide dismutase
SOD3	extracellular, copper-zinc superoxide dismutase
TEM	transmission electron microscope
TiO₂NPs	titanium dioxide nanoparticles
UVA	ultraviolet radiation type A
UVB	ultraviolet radiation type B

ZnNPs

zinc nanoparticles

ZnONPs

zinc oxide nanoparticles

II. INTRODUCTION

Nanotechnology is a dynamically developing, interdisciplinary field of science, which focuses on designing, manufacturing and modification of structures at the level of atoms and molecules. The basis of nanotechnology are nanoparticles - structures whose size is within the range of 1 to 100 nm ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). To illustrate how small the particles are, it is estimated that the ratio of 1 nm nanoparticles to the football ball is the same as the ratio of the size of his ball to the globe [1]. Furthermore, it takes eight hundred 100 nm nanoparticles, arranged next to each other to be equal the width of a human hair [2]. Minimizing to the *nano* size, allows substances to give new, unique properties, often different from those that have their counterpart on a *macro* scale. Therefore, nanotechnology has a rowing interest in modern science and industry. In the last decade, there has been a significant acceleration of research on the use of metal nanoparticles in medicine, the textile and food industries, electronics and material engineering [3].

In 2014, products using nanomaterials accounted for 15% of world industrial production with a total value of \$ 2.6 trillion. Market forecasts suggest that in the next 10-15 years, nanotechnology can increase the value of consumer and industrial products by about one billion dollars [4]. Currently, about 30%, a ten-year increase in the market for products containing nanomaterials is recorded. In March 2015, the number of such products was 1814, of which over 30% contained inorganic nanoparticles - most often silver nanoparticles (AgNPs) [5-7].

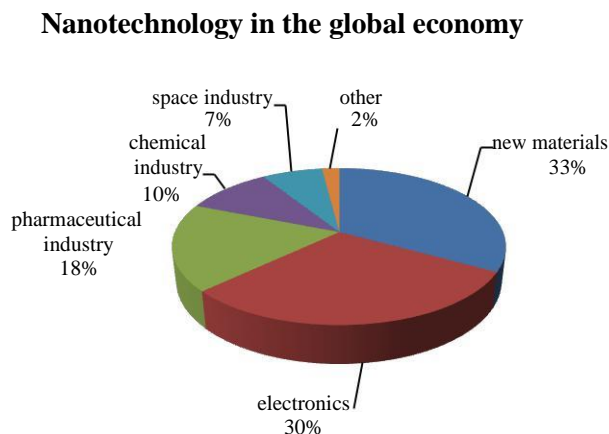


Figure 1. The share of individual industries using nanotechnology in the global economy [7].

One of the main factors affecting the ever-growing interest in nanotechnology is the search for new substances with specific properties responding to the expectations of today's world. This process is most visible in the biomedical sciences: medicine, biotechnology, pharmacology, cosmetology or tissue engineering, where new, safe and quick-acting, effective active substances are being sought. In the future, they may replace imperfect or ineffective equivalents [8, 9]. Due to their unique properties: large surface area in relation to the size and easy penetration through biological membranes and body barriers, metal nanoparticles seem to be an interesting alternative to currently used pharmaceuticals.

Moreover, the substance in the nano-scale can be used to reduce the concentration/dose, thereby reducing side effects and toxicity [10, 11].

One of the most commonly used nanoparticles with high application potential, are the silver nanoparticles (AgNPs). It is estimated that by 2015, over 1000 tons of AgNPs were produced for use in various food, medical and industrial products [12]. The unwavering scientists interest in this type of inorganic nanoparticles, due to their strong antimicrobial properties with a broad spectrum of biological activity [13-15]. Added to the product, prolonging their stability and bioavailability [16, 17]. Moreover, anti-inflammatory, antifungal and antibacterial multidirectional mechanism of action, obstructing the creation drug resistance mechanisms caused that AgNPs become an interesting alternative to currently used medicinal preparations [15-17]. In medicine, they are mainly used as a component of orthopedic and dental implants, anti-bacterial products and active substances carriers [18]. In recent years, there are also reports confirming the anti-cancer properties of AgNPs against ovarian cancer, breast cancer or lung cancer [19-21]. This actuation intensified studies on the use of metal nanoparticles in antitumor therapy [22].

However, the metal nanoparticles and nanomaterials small size and high bioavailability, in addition to the undisputed benefits also involve a danger to human health. The nanoparticles can penetrate into the body by inhalation, dermal and oral way, and with the bloodstream reach internal organs (liver, kidney, spleen, brain, heart or testis) and exert toxic effects at the cellular, tissue or systemic level [23, 24]. Until now, the metal nanoparticles cytotoxic mechanism on eukaryotic cells has not been clearly defined. However, it is known that nanoparticles penetrate through the cell, causing damage at the ultrastructural level, as a result of generating oxidative and nitro-oxidative stress [25-27].

The formation of reactive oxygen species (ROS) and nitrogen (RNS) is an integral part of the oxygen cell metabolism and in physiological concentrations it plays an important role in the proper functioning of many cellular processes (activation of transcription factors (NF- κ B, AP-1), regulation of protein phosphorylation processes, or regulation of calcium levels in cells). However, the increased generation of ROS / RNS and/ or damage of antioxidant systems leads to disturbance of cellular redox homeostasis [28, 29]. It has been shown that nanoparticles may induce intracellular ROS and RNS formation [30, 31]. Zinc oxide nanoparticles (ZnONPs), titanium dioxide nanoparticles (TiO₂NPs) and AgNPs contribute to the formation of hydroxyl radicals (OH[•]), superoxide anions (O₂^{•-}), hydrogen peroxide (H₂O₂), singlet oxygen (¹O₂), nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO₂) in eukaryotic cells [32-35]. In addition, ZnONPs and AgNPs significantly changed the expression of the cellular antioxidant system: superoxide dismutase (SOD1, SOD2) and glutathione peroxidase (GPX4) [35, 36]. Significant changes in the activity of SOD1, SOD2 and lowering level of reduced glutathione, which is intended to protect the cell from oxidative injury, were observed [36, 37]. Consequently, the oxidative and nitro-oxidative stress generated by the nanoparticles causes damage to cell structures, through oxidation of proteins, lipids and DNA. It leads to programmed cell death [26, 37]. On the other hand, in cancer cells, oxidative stress plays a double role. ROS/ RNS contribute to the malignant transformation of healthy cells and their increased level is also observed in the further stage

of cancer cells [36]. This increase is induced in the transduction of cellular oncogenic signals such as K-Ras [37]. Consequently, in the tumor cells changing in mitochondrial membrane permeability and activation of enzymes initiating apoptosis were observed. Differences in the tolerance level of ROS and RNS between non-transformed cells and cancer cells make the cancer cells much more sensitive to redox potential disorders, which may be beneficial in the development of new cancer therapies [38].

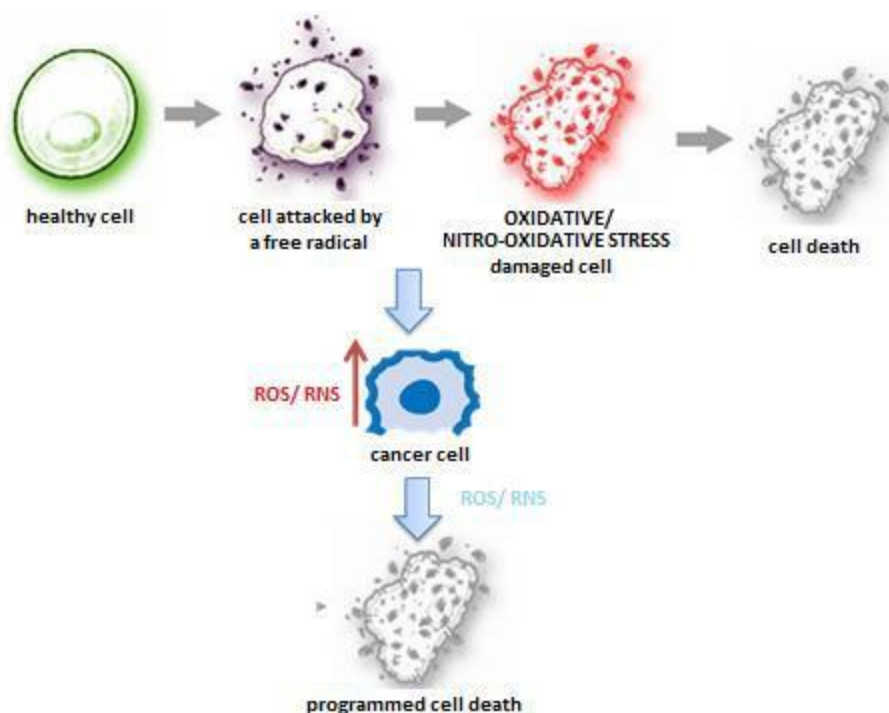


Figure 2. The influence of oxidative and nitro-oxidative stress on eukaryotic cells.

It should be emphasized that the biological effects of nanoparticles depend on physicochemical factors such as the type, shape, size, aggregation, functionalization, concentration, incubation time, as well as the type of cells [39]. The previous literature data are not sufficient to unambiguously determine the metals nanoparticles molecular mechanism of action in eukaryotic cells, both cancerous and non-cancerous, and to determine the role of oxidative and nitro-oxidative stress in the cytotoxic effect of nanoparticles. Therefore, further detailed studies on the nanoparticles effects on eukaryotic cells are needed in order to maximize their therapeutic potential while maintaining the safety of use (*compliance*).

III. THE AIM OF THE DOCTORAL DISSERTATION

The main aim of this study:

Determination of the metal nanoparticles molecular mechanism of cytotoxicity on eukaryotic cells, paying special attention to the role of oxidative and nitro-oxidative stress.

Detailed aim of study:

1. Analysis of the described interactions of metal and metal oxide nanoparticles with skin cells (fibroblasts, keratinocytes, melanocytes). Evaluation of safety assessment and potential toxic effects of inorganic nanoparticles, including the role of oxidative stress, in the cosmetic and dermatological preparations based on available literature data.
2. Determination of the role of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and NO in the AgNPs cytotoxic effect on human osteoblast cells under *in vitro* condition.
3. Determination of ROS, RNS and enzymatic antioxidants role in AgNPs cytotoxic effect on human pancreatic carcinoma cells in *in vitro* study.

IV. MATERIAL AND METHODS

Nanoparticles

Commercially available, spherical 2 nm and 15 nm AgNPs were purchased from the US Research Nanomaterials (Houston, TX, USA).

Cells culture

Human fetal osteoblast cells (hFOB 1.19), Human pancreas ductal adenocarcinoma cells (PANC-1) and immortalized human pancreas duct epithelial cells (hTERT-HPNE) were used for experiments. The cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). All cells were cultured under standard conditions (37°C, 5% CO₂ in a humidified atmosphere) using recommended culture media [40, 41]

Characterization of AgNPs

Characterization of 2 nm and 15 nm AgNPs were performed by Transmission Electron Microscopy (TEM), Zeta potential Dynamic Light Scattering (DLS), Atomic Adsorption Spectrometry (AAS) and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, (ICP-MS). Nanoparticles were characterized in water and cell culture media.

Evaluation of AgNPs cytotoxic effect

To assess the AgNPs cytotoxic effect, colorimetric assays were used: MTT (cells metabolic activity measurement), LDH (measurement of membrane integrity) and BrdU (a quantitative measurement of DNA synthesis in cells).

Uptake of AgNPs by cells and ultrastructural studies

The ability to penetrate AgNPs through the cell membrane, AgNPs localization in cell and ultrastructural changes was identified by transmission electron microscopy (TEM).

Apoptosis and necrosis detection

Apoptotic and necrotic cells were detected by flow cytometry - Annexin V/ propidium iodide (PI) double staining assay. In addition, caused by AgNPs activity the ultrastructural changes in cell, characteristic for apoptosis and necrosis were identified by TEM. The necrosis process was also noticed using LDH colorimetric assay.

Necroptosis and necrosis identification

Necroptotic cell death was distinguished from necrosis by preincubation of the cells with a selective necroptosis inhibitor - necrostatin-1 (Nec-1) and then using LDH colorimetric assay or by flow cytometry (annexin V and PI staining).

ROS level

Generation of intracellular ROS level was determined by flow cytometry, detected by 27-dichlorofluorescein (H₂DCF-DA).

RNS level: NO and NO₂

The NO level, after AgNPs exposure was measured by the Griess method [42], or by flow cytometry using Muse® Cell Analyzer (Merck, Poland) (DAX-J2 Orange staining). Furthermore, the NO₂ level was detected using the author's, dr. Dagmara Jacewicz from the University of Gdansk spectrophotometric method [43].

The protein level of programmed cell death markers, NOS isoenzymes, antioxidant enzymes and 3-nitrotyrosine (NT)

To evaluate protein level of apoptosis markers (Bax, Bcl-2), autophagy marker (LC3), necroptosis markers (RIP1, RIP3, MLKL), p53 proteins, antioxidant enzymes: GPX4, SOD1, SOD2, NOS isoenzymes: inducible iNOS, endothelial (eNOS), neuronal (nNOS) and NT, the Western Blot method was used.

Protein content

The method of Bradford was used to measure protein level [44].

mRNA level of apoptosis markers (Bax, Bcl-2), NOS isoenzymes and antioxidant enzymes

Changes in pro-apoptotic Bax, anti-apoptotic Bcl-2, NOS (iNOS, eNOS, nNOS) and antioxidant enzymes: catalase (CAT), SOD1, SOD2, SOD3) genes expression were analyzed by real-time PCR.

3-Nitrotyrosine measurement

The level of 3-nitrotyrosine, a marker of post-translational protein modification by NOS, was evaluated using a commercially available ELISA assay (Abcam, Poland) and Western Blot method.

iNOS siRNA silencing

In order to more accurately identify the relationship between AgNPs-induced increase in iNOS level and cell death, osteoblasts were transfected with siRNA iNOS to silence the expression of iNOS. The tests were also carried out in the presence of N-iminoethylo-L-lysine (L-NIL) - a selective inhibitor of iNOS.

Changes in Mitochondrial Membrane Potential

Changes in mitochondrial membrane potential caused by AgNPs were analyzed by Muse Cell Analyzer, using the Muse MitoPotential Assay Kit (7-amino-actinomycin D staining (7-AAD)).

Cell cycle analysis

The effect of AgNPs on cell cycle regulation was performed by flow cytometry - PI staining and analyzed using CellQuest Pro software.

Statistical Analysis

The obtained results were analyzed using one-way ANOVA and Tukey's post hoc test, and value < 0.05 was considered statistically significant. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 software.

V. REVIEW OF THE PUBLICATIONS, WHICH ARE THE PART OF DOCTORAL DISSERTATION

The doctoral dissertation consists of four papers: one review article that introduces to potential, safe usage of metal nanoparticles in cosmetology and dermatology, including their interaction with skin cells. The other three original papers focusing on the determination of AgNPs safety usage and their therapeutic potential in medicine (orthopedics and oncology). Furthermore, the dual role of oxidative and nitro-oxidative stress in the nanoparticle cytotoxic effect on cells were described.

1. *Metal nanoparticles in dermatology and cosmetology: Interactions with human skin cells.*

Niska K*, Zielinska E*, Radomski MW, Inkielewicz-Stepniak I. *Metal nanoparticles in dermatology and cosmetology: Interactions with human skin cells*. Chem Biol Interact. 2017, pii: S0009-2797(16)30629-9.

* *These authors contributed equally to this work.*

The dermocosmetic is one of the world's largest markets, benefiting from the discoveries of modern nanotechnology [5]. Nanoparticles are a common component in many creams, ointments, cleaning products and disinfectants used in everyday life [45]. However, numerous reports indicate toxic effects of nanoparticles on skin cells [46]. This information's significantly limits the possibility of their use in dermocosmetics. In addition, the molecular mechanisms of the nanoparticles toxic effects have not yet been clearly defined. Moreover, the special attention is paid to the important role of oxidative and nitro-oxidative stress in the cytotoxic effect of nanoparticles [45].

Therefore, in the review we focused on the evaluation of therapeutic potential, safety of use and potential cytotoxic effect of metal nanoparticles and metal oxides used in dermocosmetics for skin cells: melanocytes, keratinocytes and fibroblasts including the increased generation of ROS.

Initially, we briefly presented the history of nanotechnology and its wide application in almost all areas of life. We have described the significant impact of cosmetology and dermatology on the development of the global nanotechnology industry. Next, we have presented dermocosmetics, available on the market, containing metal and metal oxide nanoparticles. We have brought closer the construction and use of other nanoparticles formulations (nanospheres, nanocapsules, niosomes and nanoemulsions) used in preparations for skin care. In addition, we characterized nanoparticles: (TiO₂NPs, ZnONPs, AgNPs) most commonly used in cosmetic and dermatological preparations and their properties, improving the quality of these products. We have described the unique properties of inorganic nanoparticles, the ease of penetration through biological membranes and systemic barriers,

and a large surface area in relation to the size, carrying both, the benefits of use and the risks for human health. It is worth noting that the physicochemical properties of the nanoparticles: size, shape, concentration, exposure time or functionalization are very 36

important for the effectiveness of the nanoparticles. They determine the possibility of nanoparticles penetration into the tissue, localization in the cells, potential cytotoxic effect and application possibilities. In the further part of the work we presented antimicrobial properties of metal nanoparticles: antifungal activity of copper nanoparticles (CuNPs) and AgNPs and the antibacterial activity of zinc nanoparticles (ZnNPs), AgNPs, ZnONPs, TiO₂NPs, for reference and clinical strains (including drug resistant strains). We have attempted to describe the molecular mechanisms of the cytotoxic effect of nanoparticles on bacterial and fungal cells. Despite the numerous studies, these mechanisms remain unexplained. It seems that the cytotoxic effect of metal nanoparticles is related to their interaction with the bacterial and fungal cell membrane, as a result nanoparticles penetrate into the cells causing disturbances in the respiratory chain functioning and finally lead to oxidative stress [47]. Then, cell divisions are inhibited and cell death mechanisms are activated. In addition, we characterized the inhibitory effects of iron (II) oxygen (FeONPs), gold nanoparticles (AuNPs), AgNPs, ZnONPs on the bacterial biofilm formation. Bacterial biofilm is most often developed in places that are difficult to reach in the oral cavity, on the surface of orthopedic implants or in chronic wounds. This is a huge problem for today medicine, because untreated bacterial biofilm leads to serious health complications. We have also focused on the metal nanoparticles usage against skin cancers. High application potential in targeted therapy has been demonstrated for AuNPs and FeONPs. Moreover, they can be successfully used for imaging skin lesions as a contrast agent in magnetic resonance imaging (MRI). On the other hand, we have presented the ability of nanoparticles to penetrate deep into the skin and their cytotoxic effects on keratinocytes, melanocytes and skin fibroblasts. Although some nanoparticles (ZnONPs, TiO₂NPs) are widely used in sunscreen preparations to improve their protective properties, those exposed to ultraviolet (UVA, UVB) radiation may exhibit enhanced phototoxic, photoallergic and photocarcinogenic effects, by generating ROS and RNS [48, 49]. In the last part of the work, we described and compared the properties of different types of nanoparticles: TiO₂NPs, ZnONPs, AuNPs and AgNPs. We focused on UV absorption, antimicrobial and anti-inflammatory properties, cytotoxic, phototoxic, genotoxic effects, induction of carcinogenesis, possibilities to penetrate into the skin and accumulation in cell, changes at the ultrastructure level, generation of oxidative stress and induction of programmed cell death.

preparations to improve their effectiveness. However, it draws attention to the need to monitoring the safety of using nanoparticles, including the ability to generate ROS.

2. The role of inducible NOS in the cytotoxic effect of AgNPs on human osteoblast cells.

Zielinska E, Tukaj C, Radomski MW, Inkielewicz-Stepniak I: *Molecular Mechanism of Silver Nanoparticles-Induced Human Osteoblast Cell Death: Protective Effect of Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibitor*. PLoS One. 2016, 11(10):e0164137

AgNPs of all metal nanoparticles used in medicine, attract the most attention. Due to the broad spectrum of antibacterial activity, intensive research is underway on the possibility of using them for the production of orthopedic implants [50- 52]. However, information indicating the release of AgNPs from implants and their cytotoxic effects, and little-known mechanism of toxicity to bone cells, significantly limit their application in clinical practice. Until now, it has been demonstrated that AgNPs, like other nanoparticles, have the ability to produce RNS, including NO. The formation of RNS can be induced by all three NOS isoforms: eNOS, nNOS and iNOS. However, the largest association with bone disease, injuries and osteoblast damage has been demonstrated for iNOS. AgNPs-induced disturbances in NO metabolism can cause nitro-oxidative stress and lead to cell death [53].

Therefore, I attempted to identify molecular mechanisms of AgNPs-induced human osteoblast damage and death together with the assessment of the role of NO and iNOS in the cytotoxic effect of AgNPs.

A human fetal osteoblast cell line hFOB 1.19 was selected for this study, because it is a commonly used model of bone tissue damage and regeneration. According to the used AgNPs characteristics their size was determined as 18.3 ± 2.6 nm. Ultrastructural analysis (TEM) showed that during 24-hour exposure, 18.3 nm AgNPs (at a concentration of 30 $\mu\text{g/ml}$) penetrate through the osteoblast cells membrane and accumulate in vacuoles, forming aggregates. The concentration-dependent changes in ultrastructure, characteristic for autophagy (autophagosomes formation), apoptosis (cell volume reduction, chromatin condensation) and necrosis (cytoplasmic membrane disintegration, electron-lucent nuclear chromatin, heavily vacuolized cytoplasm) were observed. Disintegration of the cell membrane resulted in an increased level of released LDH into culture medium, which in connection with the ultrastructure observation, may indicate osteoblasts necrosis or necroptosis. Moreover, flow cytometry allowed the identification of apoptotic and necrotic/ necroptotic cells in the tested samples. In order to further identify the type of AgNPs-induced cell death, a selective necroptosis inhibitor necrostatin 1 (Nec-1) was used. Flow cytometry (annexin V and PI staining) did not showed significant changes in the percentage of dead cells (PI+) after osteoblasts preincubation with Nec-1. This result indicating the necrotic cells death. Furthermore, the effect of AgNPs on nitro-oxidative stress markers: NO and NT [54, 554] in osteoblast cells was observed in a concentration- and incubation-time dependent manner. A positive correlation between the AgNPs concentration and iNOS protein and mRNA level was found ($r = 0.837$, $r = 0.721$, respectively, $p < 0.001$). The use of selective inhibitor iNOS - L-NIL as well as silencing the iNOS gene expression by siRNA caused no increase in NO and NT levels and inhibition of apoptosis and necrosis in osteoblast cells exposed to AgNPs.

Our results clearly indicate that 18.3 nm AgNPs penetrate into osteoblast cells and cause changes in ultrastructure, leading to apoptosis and necrosis. Therefore, special care should be taken during use AgNPs in orthopedic implants. We have observed that induced cell death is associated with increased of iNOS, NO and NT expression. At the same time, our research proves that selective inhibition of iNOS can be an effective method allowing the safe use of AgNPs-coated orthopedic implants.

3. Evaluation of the AgNPs-induced anti-tumor mechanism against pancreatic cancer cells

Zielinska E, Zauszkiewicz-Pawlak A, Wojcik M, Inkielewicz-Stepniak I: *Silver nanoparticles of different sizes induce a mixed type of programmed cell death in human pancreatic ductal adenocarcinoma*. *Oncotarget*. 2017, 9(4):4675-4697.

In the last decade, the development of nanotechnology has significant impact on the development of cancer pharmacology research. The unique properties of nanoparticles allowed their usage in anticancer therapy (as a drug carriers, in targeted therapy and diagnostics) [56]. However, new and more effective treatment of many cancers are still being sought due to the high toxicity and the unsatisfactory efficacy of currently used therapies. An interesting alternative seems to be AgNPs, due to the wide range of biological activity. Moreover, literature data confirm the AgNPs cytotoxicity against breast, lung or ovarian cancer cells [19-21]. However, we should not forget about the potential toxicity of AgNPs to non-transformed cells. It is important to pay attention to the optimization of the nanoparticles concentration which will allow to achieve satisfactory effects of therapy with the lowest possible toxicity (side effects).

Accordingly, the aim of our study was to evaluate the cytotoxic effect of AgNPs on human pancreas ductal adenocarcinoma cells (PANC-1) compared to non-transformed immortalized human pancreas duct epithelial cells (hTERT-HPNE) and then the identification of molecular mechanisms of cancer cell death.

Pancreatic cancer has been selected because of high mortality and lack of an effective treatment method. The characteristics of AgNPs allowed to clearly define the size of AgNPs as 2.6 and 18 nm. It has been shown that AgNPs more effectively induced cytotoxicity in pancreatic cancer cells as compared to non-transformed pancreatic cells. The cytotoxic effect of AgNPs was dependent on their size and concentration. Higher cytotoxicity was observed for nanoparticles of smaller size - 2.6 nm.

The 50% inhibitory concentration values (IC₅₀) obtained in the AgNPs cytotoxicity studies are summarized in the Table1.

Table 1. IC₅₀ values obtained after treatment of PANC-1 and hTERT-HPNE cells with AgNPs.

Cell line	AgNPs Size	IC ₅₀ for LDH assay (µg/ml)	IC ₅₀ for MTT assay (µg/ml)
PANC-1	2.6	3.19	1.67
	18	56.46	26.81
hTERT-HPNE	2.6	8.06	3.74
	18	160.3	58.46

IC₅₀ values calculated from the following equation: log (inhibitor) versus response curves

using GraphPad Prism 5.

In addition, analysis of the ultrastructural study has shown that both 2.6 nm and 18 nm AgNPs penetrate into the PANC-1 cell *via* caveolae-mediated endocytosis and cause changes characteristic for autophagy (autophagosomes), apoptosis (nucleus and cytoplasm condensation and blebbing), necroptosis (intensive cytoplasm vacuolization, nuclear membrane dilatation, disrupted cellular membrane and cytoplasmic swelling), necrosis (cytoplasmic membrane, disintegration, electron-lucent nuclear chromatin, heavily vacuolized cytoplasm) and mitotic catastrophe (increased size of the cell and multinucleation). We observed that preincubation of PANC-1 cells with Nec-1 significantly reduced the cytotoxic effect of 2.6 and 18 nm AgNPs against pancreatic cancer cells, indicating the necroptotic cell death. In addition, flow cytometry analysis confirmed the PANC-1 apoptotic and necrotic/ necroptotic cell death. Furthermore, pancreatic cancer cells exposure to 2.6 and 18 nm AgNPs significantly increased the protein levels of Bax, LC3, RIP-1, RIP-2, MLKL, markers of apoptosis, autophagy and necroptosis, and decreased the antiapoptotic Bcl-2 protein level. All observed effects of AgNPs activity depended on their concentration and size.

In conclusion, our studies reported that 2.6 nm and 18 nm AgNPs exerted significantly higher cytotoxic effect on pancreatic cancer cells compared to non-transformed cells from the same tissue. We observed a mixed type of PANC-1 cell death by apoptosis, necroptosis, autophagy, necrosis and mitotic catastrophe. The results may contribute to improving the effectiveness of treatment of chemotherapy-resistant cancer cell and constitute the first step in assessing the suitability of AgNP as a potential agent with anticancer activity.

4. The role of oxidative and nitro-oxidative stress in the AgNPs cytotoxic effect against pancreatic tumor cells.

Barcinska E, Wierzbicka J, Zauszkiewicz-Pawlak A, Jacewicz D, Dabrowska A, Inkielewicz-Stepniak I: *Role of Oxidative and Nitro-Oxidative Damage in Silver Nanoparticles Cytotoxic Effect Against Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells.* *Oxid Med Cell Longev.* 2018;

Continuing our research, we decided to focus on the role of oxidative and nitro-oxidative stress in 2.6 and 18 nm AgNPs-induced mixed type of pancreatic cancer cell death. Numerous studies indicate the important role of increased level of ROS and RNS in programmed cancer cells death. With regard to the presented information, and the differences in resistance to oxidative and nitro-oxidative stress of tumor and non-tumor cells, the oxidative mechanism may be an important therapeutic window in anticancer therapy.

Therefore, the aim of our study was to determine the role of oxidative and nitro-oxidative stress in the 2.6 and 18 nm AgNPs cytotoxic effect against pancreatic cancer cells (PANC-1).

In our studies we showed that the pancreatic cells (PANC-1, hTERT-HPNE) exposure to 2.6 and 18 nm AgNPs leads to an increase in the level of ROS, higher for pancreatic cancer cells, compared to non-transformed pancreatic cells in a concentration-dependent manner. Furthermore, a significant increase in RNS level and an increase in NOS mRNA and protein level in PANC-1 cells was observed. This effect was associated with a decrease in mRNA and / or protein level of antioxidant enzymes: SOD1, SOD2, GPX-4, CAT and an increase in mRNA level of SOD3. It should be noted that lowering of the SOD3 gene expression is associated with an increase in aggressiveness and resistance to chemotherapy of pancreatic, lung or kidney cancer cells [57]. Moreover, we noticed reduction of mitochondrial membrane potential and accumulation of the PANC-1 population in the sub-G1 cell cycle phase, which may indicate apoptotic cell death. In addition, we demonstrated the 2.6 nm and 18 nm AgNPs-induced ultrastructural changes characteristic for oxidative and nitro-oxidative stress (swelling and degradation of mitochondrial cristae and mitochondrial condensation).

In conclusion, the obtained results confirm our hypothesis that oxidative and nitro-oxidative stress is associated with the AgNPs-induced cytotoxic effect and programmed pancreatic cancer cells death. Furthermore, differences in the sensitivity of cancer and non-cancer cells to pro-oxidative AgNPs activity can be used to develop new strategies for pancreatic cancer nanotherapy.

VI. SUMMARY

Nanotechnology has been widely used in medicine and everyday life. Metal nanoparticles, especially AgNPs, have a high application and therapeutic potential. However, due to the potential toxicity of AgNPs, it is necessary to better understand the molecular mechanisms of their action, to optimize treatment and minimize side effects. It has been identified that the cytotoxic effect of metal nanoparticles depends on their physicochemical properties: size, shape, concentration, incubation time and the type of exposed cells. Therefore, even a small modification of nanoparticles (eg, decrease/ increase in size) can significantly change the mechanism of their action, improving the biocompatibility or selective, cytotoxic effect against cancer cells. The research described in the doctoral dissertation clearly demonstrated the cytotoxic, pro-oxidant effect of AgNPs on eukaryotic cells. This effect may be beneficial: used in anticancer therapy as well as negative, if it affects non-tumor cells (skin cells, bones). Thus, the application of AgNPs in medical products (prostheses, implants, dressings) is still limited. However, monitoring the risk, resulting from the use of nanoparticles as well as understanding the molecular aspects of the cytotoxic action, allow to minimize their toxicity, for example, by influencing on the signaling pathways of programmed cell death or by nanoparticles functionalization. Moreover, demonstrated by us higher sensitivity of cancer cells compared with non-tumoral cells to AgNPs-induced pro-oxidant cytotoxic effect, associated with overgeneration of ROS and RNS, may contribute to the development of new anticancer nanotherapy.

WYKAZ CYTOWANEGO PIŚMIENICTWA/ CITATIONS LIST

1. Rezić I. *Engineered nanoparticles in textiles and textile wastewaters*. Compr Anal Chem. 2012; 59: 235–64.
2. Ahmed H. Rajendran R., Balakumar C. *Nanoherbal coating of cotton fabric to enhance antimicrobial durability*. Appl Chem. 2012; 45: 7840–3.
3. Jain P.K., Huang X., El-Sayed I.H. E-SM. *Noble Metals on the Nanoscale: Optical and Photothermal Properties and Some Applications in Imaging, Sensing, Biology, and Medicine*. Accounts Chem Reserch. 2008; 41(12): 1578–86.
4. Manoharan M. *Research on the frontiers of materials science: The impact of nanotechnology on new material development*. Technol Soc. 2008; 30: 401–4.
5. Vance M.E., Kuiken T., Vejerano E.P., McGinnis S.P., Hochella M.F., Hull D.R. *Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory*. Beilstein J Nanotechnol. 2015; 6: 1769–80.
6. Asghari S., Johari S.A., Lee J.H., Kim Y.S., Jeon Y.B., Choi H.J. et al. *Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in Daphnia magna*. J Nanobiotechnology. 2012; 10: 1–11.
7. Sargent J.F. *Nanotechnology: A policy primer*. Congr Res Serv. 2016; 7(5700): 1–25.
8. Salata O. V. *Applications of nanoparticles in biology and medicine*. J Nanobiotechnology. 2004; 2(3): 1–6.
9. Caruthers S.D., Wickline S.A., Lanza G.M. *Nanotechnological applications in medicine*. Curr Opin Biotechnol. 2007; 18(1): 26–30.
10. Doanea T.L., Burda C. *The unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery and therapy*. Chem Soc Rev. 2012; 41(7): 2885–911.
11. Giljohann D.A., Seferos D.S., Daniel W.L., Massich M.D., Patel P.C., Mirkin C.A. *Gold nanoparticles for biology and medicine*. Angew Chemie - Int Ed. 2010; 49(19): 3280–94.
12. Stensberg M.C., Wei Q., Mclamore E.S., Marshall D. *Toxicological studies on silver nanoparticles: challenges and opportunities in assessment, monitoring and imaging*. Nanomedicine (London). 2012; 6(5): 879–98.
13. Wei L., Lu J., Xu H., Patel A., Chen Z.S., Chen G. *Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications*. Drug Discov Today. 2015; 20(5): 595–601.
14. Gurunathan S., Han J.W., Kwon D-N., Kim J-H. *Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive*

- bacteria*. *Nanoscale Res Lett*. 2014; 1: 373.
15. Mirzajani F., Ghassempour A., Aliahmadi A., Esmaeili M.A. *Antibacterial effect of silver nanoparticles on Staphylococcus aureus*. *Res Microbiol*. 2011; 162(5): 542–9.
 16. Zhang F., Wu X., Chen Y., Lin H. *Application of silver nanoparticles to cotton fabric as an antibacterial textile finish*. *Fibers Polym*. 2009; 10(4): 496–501.
 17. Zhang X-F., Liu Z-G., Shen W., Gurunathan S. *Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches*. *Int J Mol Sci* 2016; 17(9): 1534.
 18. Bartłomiejczyk T., Lankoff A., Kruszewski M., Szumiel I. *Silver nanoparticles - Allies or adversaries?* *Ann Agric Environ Med*. 2013; 20(1): 48–54.
 19. Yuan Y-G., Peng Q-L., Gurunathan S. *Silver nanoparticles enhance the apoptotic potential of gemcitabine in human ovarian cancer cells: combination therapy for effective cancer treatment*. *Int J Nanomedicine*. 2017; 12: 6487–502.
 20. Gurunathan S., Raman J., Abd Malek S.N., John P.A., Vikineswary S. *Green synthesis of silver nanoparticles using Ganoderma neo-japonicum Imazeki: A potential cytotoxic agent against breast cancer cells*. *Int J Nanomedicine*. 2013; 8: 4399–413.
 21. He Y., Du Z., Huang H., Cheng S., Wu W., Zhang K. *Effects of green-synthesized silver nanoparticles on lung cancer cells in vitro and grown as xenograft tumors in vivo*. *Int J Nanomedicine*. 2016; 11: 1879–87.
 22. Baptista P. *Noble Metal*. *Nanoparticles Applications in Cancer*. *J Drug Deliv*. 2012; 2012: 751075
 23. Handy R.D., Shaw B.J. *Toxic effects of nanoparticles and nanomaterials: Implications for public health, risk assessment and the public perception of nanotechnology*. *Heal Risk Soc*. 2007; 9(2): 125–44.
 24. Ahamed M.A., ISalhi M., Siddiqui M. *Silver nanoparticle applications and human health*. *Clinica Chimica Acta*, 2010; 411(23-24): 1841-1848.
 25. Manke A., Wang L., Rojanasakul Y. *Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity*. *Biomed Res Int*. 2013; 2013: 942916.
 26. Lee Y., Cheng F., Chiu H., Tsai J., Fang C., Chen C., et al. *Cytotoxicity, oxidative stress, apoptosis and the autophagic effects of silver nanoparticles in mouse embryonic fibroblasts*. *Biomaterials*. 2014; 35: 4706–15.
 27. Esmailnejad B., Samiei A., Mirzaei Y. F-P.F. *Assessment of oxidative/nitrosative stress biomarkers and DNA damage in Haemonchus contortus, following exposure to zinc oxide nanoparticles*. *Acta Parasitol*. 2018; 63(3): 563–71.

28. Schieber M., Chandel N.S. *ROS function in redox signaling and oxidative stress*. *Curr Biol*. 2014; 24(10): R453–62.
29. Tee J.K., Ong C.N., Bay B.H. *Oxidative stress by inorganic nanoparticles*. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2016; 8(3): 414-38.
30. Stevens E.V., Wells A., Shin J.H., Liu J., Der C.J., Schoenfisch M.H. *Nitric oxide-releasing silica nanoparticle inhibition of ovarian cancer cell growth*. *Mol Pharm*. 2010; 317(3): 775–85.
31. Dayem A.A., Hossain M.K., Lee S.B., Kim K., Saha S.K., Yang G.M., et al. *The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles*. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(1): 1–21.
32. Fu L., Hamzeh M., Dodard S., Zhao Y.H., Sunahara G.I. *Effects of TiO₂ nanoparticles on ROS production and growth inhibition using freshwater green algae pre-exposed to UV irradiation*. *Environ Toxicol Pharmacol* 2015; 39(3): 1074–80.
33. Kim S., Choi J.E., Choi J., Chung K.H., Park K., Yi J., et al. *Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells*. *Toxicol Vitro* 2009; 23(6): 1076–84.
34. Lee S.H., Pie J.E., Kim Y.R., Lee H.R., Son S.W., Kim M.K. *Effects of zinc oxide nanoparticles on gene expression profile in human keratinocytes*. *Mol Cell Toxicol* 2012; 8(2): 113–8.
35. Zuberek M., Wojciechowska D., Krzyzanowski D., Meczynska-Wielgosz S., Kruszewski M., Grzelak A. *Glucose availability determines silver nanoparticles toxicity in HepG2*. *J Nanobiotechnology*. 2015; 13(1): 1.
36. Kivrak E.G., Yurt K.K., Kaplan A.A., Alkan I., Altun G. *Effects of electromagnetic fields exposure on the antioxidant defense system*. *J Microsc Ultrastruct* 2017; 5(4): 167–76
37. Pham-Huy L.A., He H., Pham-Huy C. *Free radicals, antioxidants in disease and health*. *Int J Biomed Sci* 2008; 4(2): 89–96.
38. Mcmanus E.J., Alessi D.R.. *Cancer , oncogenes and signal transduction*. *Genome Biol*. 2004; 5(7): 332.
39. Redza-Dutordoir M., Averill-Bates D.A. *Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species*. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2016; 1863(12): 2977–92.
40. Zielinska E., Zauszkiewicz-Pawlak A., Wojcik M., Inkielewicz-Stepniak I. *Silver nanoparticles of different sizes induce a mixed type of programmed cell death in human pancreatic ductal adenocarcinoma*. *Oncotarget*. 2017; 9(4): 4675-4697.

- 41 Zielinska E., Tukaj C., Radmski M.W., Inkielewicz-Stepniak I. *Molecular Mechanism of Silver Nanoparticles-Induced Human Osteoblast Cell Death: Protective Effect of Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibitor*. PLoS One, 2016; 11(10): e0164137.
- 42 Tatsch E., Bochi G.V., Pereira Rda S., Kober H., Agertt V.A., de Campos M.M., Gomes P., Duarte M.M., Moresco R.N. *A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate*. Clin Biochem. 2011; 44(4): 348-50.
- 43 Jacewicz D., Łapińska A., Dąbrowska A., Figarski A., Woźniak M., Chmurzyński L. *Reactions of NO₂ with chromium(III) complexes with histamine and pyridoxamine ligands studied by the stopped-flow technique*. Anal Biochem. 2006; 350(2): 256–62.
44. Bradford M.M. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem. 1976; 72: 248–54.
45. Helmlinger J., Sengstock C., Groß-Heitfeld C., Mayer C., Schildhauer T.A., Köller M., et al. *Silver nanoparticles with different size and shape: equal cytotoxicity, but different antibacterial effects*. RSC Adv 2016; 6(22): 18490–501.
46. Papakostas D., Rancan F., Sterry W., Blume-Peytavi U., Vogt A. *Nanoparticles in dermatology*. Arch Dermatol Res. 2011; 303(8): 533-50.
47. Wang L., Hu Ch., ShaL. *The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future*. Int J Nanomedicine. 2017, 12: 1227–49.
48. Fu L., Hamzeh M., Dodard S., Zhao Y.H., Sunahara G.I., *Effects of TiO₂ nanoparticles on ROS production and growth inhibition using freshwater green algae pre-exposed to UV irradiation* Environ. Toxicol. Pharmacol., 015; 39: 1074-80.
49. Kocbek P., Teskač K., Kreft M.E., Kristl J. *Toxicological aspects of long-term treatment of keratinocytes with ZnO and TiO₂ nanoparticles*. Small 2010; 6(17): 1908–17.
50. Crespo J., García-Barrasa J., López-de-Luzuriaga J.M., Monge M., Olmos M.E., Sáenz Y., et al. *Organometallic approach to polymer-protected antibacterial silver nanoparticles: optimal nanoparticle size-selection for bacteria interaction*. J Nanoparticle Res. 2012; 14(12): 1281.
51. Tautzenberger A., Kovtun A., Ignatius A. *Nanoparticles and their potential for application in bone*. Int J Nanomedicine. 2012; 7: 4545–57.
52. Girase B., Depan D., Shah J.S., Xu W., Misra R.D.K. *Silver–clay nanohybrid structure for effective and diffusion-controlled antimicrobial activity*. Mater Sci Eng C. 2011; 31: 1759–66.
53. Banerjee K., Ganguly A., Chakraborty P., Sarkar A., Singh S., Chatterjee M., et al.

ROS and RNS induced apoptosis through p53 and iNOS mediated pathway by a dibasic hydroxamic acid molecule in leukemia cells. Eur J Pharm Sci 2014; 52(1): 146–64.

54. Heinrich T.A., da Silva R.S., Miranda K.M., Switzer C.H., Wink D.A., Fukuto J.M. *Biological nitric oxide signalling: chemistry and terminology.* Br J Pharmacol. 2013; 169: 1417–1429.

55. Bentz M., Zaouter C., Shi Q., Fahmi H., Moldovan F., Fernandes J.C., et al.

Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents lipid peroxidation in osteoarthritic chondrocytes. J Cell Biochem. 2012; 113: 2256–2267.

56. Jeyaraj M., Sathishkumar G., Sivanandhan G., MubarakAli D., Rajesh M., Arun R., et al. *Biogenic silver nanoparticles for cancer treatment: An experimental report.* Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2013; 106: 86–92.

57. M. L. Teoh-Fitzgerald, M. P. Fitzgerald, T. J. Jensen et al. *Genetic and Epigenetic Inactivation of Extracellular Superoxide Dismutase Promotes an Invasive Phenotype in Human Lung Cancer by Disrupting ECM Homeostasis.* Molecular Cancer Research. 2012; 10 (1): 40–51.