

# **MOLEKULARNE MECHANIZMY AKTYWNOŚCI NANOCZĄSTEK SREBRA NA POZIOMIE KOMÓRKOWYM**

## **STRESZCZENIE**

### **WSTĘP**

Nanocząstki obecne w środowisku, zarówno pochodzenia naturalnego i antropogeniczne, mają wpływ na ludzkie zdrowie. Powszechne zastosowanie nanomateriałów w wielu gałęziach przemysłu skutkuje wzrastającą akumulacją nanocząstek w środowisku abiotycznym, oraz w tkankach organizmów żywych. Negatywnymi skutkami biologicznej aktywności nanocząstek wskazywanymi najczęściej są alergie, nowotwory, choroby układu naczyniowo-sercowego, zaburzenia w rozwoju embrionalnym, zaburzenia wzrostu, toksyczność względem układu immunologicznego, zaburzenia krzepnięcia krwi, toksyczność w barierze krew-mózg, choroby neurodegeneracyjne, oraz zapalne dróg oddechowych i choroby z nimi związane[1].

Reaktywne formy tlenu i reaktywne formy azotu są produkowane w komórkach w warunkach fizjologicznych, jako cząsteczki gwarantujące homeostazę wewnątrzkomórkową. Odgrywają one kluczową rolę w procesie transdukcji sygnałów wewnątrzkomórkowych.

Istotnym czynnikiem powodującym toksyczny efekt nanocząsteczek jest stres oksydacyjny, definiowany jako zaburzenie w równowadze między produkcją reaktywnych form tlenu i obroną antyoksydacyjną. Stres oksydacyjny związany jest z zaburzeniami komórkowego metabolizmu takimi jak zaburzenia w funkcjonowaniu łańcucha oddechowego i/lub glikolizy, wobec czego, stężenie glukozy jest jednym z kluczowych czynników warunkujących homeostazę redoks.

Zwiększenie ilości glukozy w środowisku zewnątrzkomórkowym powoduje zmianę metabolizmu energetycznego komórek z fosforylacji oksydacyjnej na glikolizę, co może zwiększyć produkcję reaktywnych form tlenu w komórce. To zjawisko jest tłumaczone zwiększeniem wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia, co skutkuje rozpadem mitochondriów i prowadzi do apoptozy. Dane literaturowe uzyskane w badaniach na liniach komórkowych są zbieżne z doświadczeniami z udziałem pacjentów cierpiących na cukrzycę typu drugiego, u których wykryto znaczącą utratę komórek  $\beta$  tłumaczoną zahamowaniem czynności glukozo-6-fosfatazy[2]. Metabolizm energetyczny większości komórek

prawidłowych,

w warunkach fizjologicznych, jest uzależniony od fosforylacji oksydacyjnej natomiast metabolizm komórek nowotworowych bazuje głównie na glikolizie[3]. To zjawisko, nazywane efektem Warburga, jest formą adaptacji komórek nowotworowych rozwijających się w warunkach hipoksji. Ograniczenie funkcji mitochondriów sprzyja jednocześnie ograniczeniu apoptozy, co jest jednym z objawów transformacji nowotworowej komórek.

Stres azotowy jest silnie powiązany ze stresem oksydacyjnym. Pierwotny rodnik azotowy – tlenek azotu jest syntezowany z udziałem argininy, tlenu i NADPH przez syntazy tlenku azotu. Mimo krótkiego czasu półtrwania, wynoszącego kilka milisekund, cząsteczki tlenku azotu dyfundują bez przeszkód przez błony biologiczne, dzięki czemu są jednymi z kluczowych, autokrynych i parakrynych cząsteczek sygnałowych u kręgowców. Uniwersalność tlenku azotu jako cząsteczki sygnałowej, warunkuje jej udział w procesach na poziomie organizmalnym, takich jak regulacja napięcia mięśni gładkich naczyń krwionośnych i odpowiedź immunologiczna, oraz na poziomie narządów i komórek. W przypadku wątroby niewielkie stężenie tlenku azotu ma na celu utrzymanie homeostazy oraz zapobieganie stanom patologicznym. Jest ono warunkowane ekspresją konstytutywnej syntazy tlenku azotu. Natomiast indukowalna syntaza tlenku azotu ulega ekspresji w zaburzeniach funkcjonowania komórek wątroby[4]. Tlenek azotu jest cząsteczką o ograniczonej reaktywności, która w reakcji z anionorodnikiem ponadtlenkowym tworzy nadtlenoazotyn. Nadtlenoazotyn jest z kolei efektywnym utleniaczem i czynnikiem nitrującym, którego obecność w komórce skutkuje obniżeniem stężenia wewnątrzkomórkowych antyoksydantów oraz uszkodzeniami białek, lipidów i kwasów nukleinowych.

Stres oksydacyjny jest zjawiskiem o dużym znaczeniu dla utrzymania homeostazy wewnątrzkomórkowej. Jest to związane nie tylko z potencjalnymi uszkodzeniami oksydacyjnymi cząsteczek budujących komórkę, ale również z rolą regulacyjną jaką pełnią wolne rodniki i inne reaktywne formy tlenu. Kluczowe szlaki przekazywania wewnątrzkomórkowego mogą być regulowane przez status redoks komórek, jak również może dochodzić do bezpośredniej aktywacji czynników transkrypcyjnych pod wpływem reaktywnych form tlenu. Aktywacja czynników transkrypcyjnych będzie w końcowym efekcie prowadziła do zmian w profilu ekspresyjnym genów i powstawania nowych białek. Dobrze udokumentowanym przykładem aktywacji czynnika transkrypcyjnego bezpośrednio przez status redoks jest aktywacja czynnika Nrf2, który ma zdolność do aktywacji genów, które w

sekwencji promotorowej zawierają element ARE, a także genów dla białek odpowiedzialnych za detoksykację, np. transferaz glutationowych. Wiele białek z nadrodziny ABC jest pod kontrolą czynników transkrypcyjnych zależnych od statusu redoks. Zaburzenia ekspresji transporterów ABC mogą mieć znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania komórki. W przypadku wystąpienia procesów chorobowych, takich jak nowotworzenie, mogą mieć znaczenie dla powodzenia stosowanego leczenia.

#### CELE PRACY

1. Ocena endogennej produkcji reaktywnych form tlenu zależnej od aktywności łańcucha oddechowego, jako czynnika modulującego toksyczność nanocząstek srebra.
2. Rozstrzygnięcie roli stresu azotowego w toksyczności nanocząstek srebra.
3. Ocena roli generowanych pod wpływem nanocząstek wolnych rodników tlenowych w procesie modulacji profilu mRNA dla wybranych białek ABC w dojrzałych dopaminergicznych neuronach oraz neuronach niezróżnicowanych.

#### METODY

Do realizacji celów rozprawy wykorzystano dwa komórkowe modele badawcze. Korzystano z linii HepG2 (linia wyprowadzona z raka wątrobowokomórkowego), oraz LUHMES (linia komórkowa wywodząca się ze śródmózgowia 8-tygodniowego płodu). Komórki linii HepG2 hodowano w medium DMEM w dwóch wariantach stężenia glukozy. Niższe stężenie (5,5 mmol/dm<sup>3</sup>) odpowiadało warunkom fizjologicznym, natomiast stężenie 25 mmol/dm<sup>3</sup> jest zbliżone do stężenia wykrywanym podczas ostrego epizodu hiperglikemii. Linia LUHMES stanowi model neuronów dla komórek dzielących się, a po różnicowaniu służy jako model dojrzałych dopaminergicznych neuronów. Różnicowanie komórek LUHMES w dojrzałe dopaminergiczne neurony przeprowadzono zgodnie z procedurą opublikowaną w pracy Stępkowski T i wsp., 2016[5]. Obie linie komórkowe zostały zakupione z kolekcji ATCC (American Type Culture Collection). Hodowle komórkowe prowadzono zgodnie z zaleceniami. Jako czynniki inicjujący odpowiedź biologiczną modeli badawczych wykorzystano nanocząstki srebra o średnicy nominalnej 20 nm. Ocenę przeżywalności przeprowadzono w oparciu test akumulacji czerwieni obojętnej w lizosomach komórek żywych. Pomiar wewnątrzkomórkowej produkcji anionorodnika ponadtlenkowego w mitochondriach i cytoplazmie, nadtlenu wodoru oraz tlenu azotu wykonano przy użyciu cytometrii

przepływowej w oparciu o fluorescencję specyficznych sond. Pomiar produkcji mitochondrialnego nadtlenku wodoru wykonano z użyciem białka reporterowego HyPer-mito i cytometrii przepływowej.

Izolacja kwasów nukleinowych została przeprowadzona za pomocą urządzenia MagNA Pure LC 2.0 (HepG2) oraz z użyciem odczynnika TRI (LUHMES). Reakcje odwrotnej transkrypcji przeprowadzono z użyciem SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix. Ekspresja genów na poziomie mRNA związanych ze stresem oksydacyjnym była badana z użyciem komercyjnie dostępnego zestawu starterów (HOSL-1 – The human oxidative stress library). Ekspresja genów na poziomie mRNA dla białek z rodziny ABC została oceniona z użyciem komercyjnie dostępnego zestawu starterów (Roche). Stężenie nitrotyrozyny zostało oznaczone za pomocą komercyjnie dostępnego zestawu immunochemicznego ELISA (Merck Milipore), natomiast poziom nitracji tyrozyny w układzie bezkomórkowym został zbadany przez pomiar intensywności fluorescencji nitrotyrozyny. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych została wyznaczona poprzez pomiar szybkości zmian w stężeniu odpowiednich substratów klasycznymi metodami absorpcyjnymi.

## WYNIKI

Badania przedstawione w ramach rozprawy zawarte są w trzech powiązanych tematycznie pracach. W pracach *Glucose availability determines silver nanoparticles toxicity in HepG2* oraz *Silver nanoparticles can attenuate nitrate stress* stwierdzono, że zmiana stężenia dostępnej glukozy w medium hodowlanym skutkowała ustaleniem nowej równowagi redoks. Stabilny status redoks, komórki uzyskiwały po 72 godzinach od momentu zmiany stężenia czynnika modulującego aktywność mitochondriów (glukozy). Ocenie poddano aktywność enzymów związanych z obroną antyoksydacyjną w komórkach hodowanych w medium suplementowanym różnymi stężeniami glukozy. Proces adaptacji komórek do obniżonego stężenia glukozy w środowisku spowodował wzrost znaczenia fosforylacji oksydacyjnej w energetycznym metabolizmie komórek. Obserwowany wzrost aktywności katalazy, S-transferazy glutationowej, dysmutazy ponadtlenkowej i reduktazy glutationowej świadczy o procesie adaptacji komórek do nowego stanu równowagi redoks. Zbadany został profil ekspresji genów związanych z obroną antyoksydacyjną w komórkach hodowanych na niższym stężeniu glukozy w stosunku do poziomu kontrolnego. Proces adaptacyjny komórek linii HepG2 został potwierdzony przez analizę transkryptomu odpowiedzialnego głównie za

odpowieć komórki na stres oksydacyjny. Zwiększonej ekspresji uległy geny NOS2, GSTM5, ALB, MBL2, SCARA3 i CAT. Jednocześnie zaobserwowano obniżenie ekspresji genów związanych

z metabolizmem glutationu (GSS, GSTZ1, GSTA4, GPX), co sugeruje, że detoksykacja reaktywnych form tlenu produkowanych w następstwie obniżenia stężenia glukozy zachodzi na drodze szybkich, enzymatycznych reakcji, a nie z udziałem drobnocząsteczkowych antyoksydantów. Ponadto, stopniowe i chroniczne obniżenie stężenia glutationu aktywuje szlak przekazywania NFκB, co kieruje metabolizm komórki na drogę indukcji mechanizmów antyoksydacyjnych.

Obserwacje te pozwoliły zaproponować mechanizm, który decydował o różnicach w przeżywalności komórek HepG2 pod działaniem nanocząstek srebra w zależności od zawartości glukozy w medium hodowlanym.

Stężenie glukozy w medium hodowlanym jest czynnikiem modulującym toksyczność nanocząstek srebra. Mechanizm tego zjawiska polega na stymulacji zdolności obrony antyoksydacyjnej komórek hodowanych w medium o obniżonym stężeniu glukozy przez intensyfikację fosforylacji oksydacyjnej związanej ze zwiększoną produkcją reaktywnych form tlenu. Śmierć 10 % komórek w hodowli prowadzonej z użyciem stężenia glukozy standardowo używanego w hodowli komórek HepG2 (25 mmol/dm<sup>3</sup>) wywołały nanocząstki srebra w stężeniu 1,4 raza niższym niż w przypadku hodowli utrzymywanej na medium o obniżonym poziomie glukozy (5,5 mmol/dm<sup>3</sup>) przez 24 godziny i 7,6 raza niższym niż w przypadku komórek hodowanych w medium o obniżonym poziomie glukozy przez miesiąc i dłużej.

Oceniono produkcję nadtlenu wodoru w mitochondriach oraz produkcję reaktywnych form tlenu i azotu w komórkach HepG2 hodowanych w medium suplementowanym różnymi stężeniami glukozy w obecności nanocząstek srebra.

Zaobserwowano, że nanocząstki srebra wywołują stres oksydacyjny w komórkach HepG2, objawiający się, zwiększeniem stężenia H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w mitochondriach o 18 % w stosunku do komórek kontrolnych. Hodowla komórek w medium o obniżonym stężeniu glukozy umożliwiła adaptację komórek do warunków podwyższonego stresu oksydacyjnego dzięki zwiększonej aktywności mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów, wobec czego nie zaobserwowano podwyższonego poziomu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> po dodaniu do komórek nanocząstek srebra.

Obniżenie stężenia glukozy w medium hodowlanym spowodowało spadek wykrywanych ilości rodnika ponadtlenkowego na poziomie komórkowym i mitochondrialnym, oraz

obniżenie poziomu nadtlenu wewnątrzkomórkowych. Nanocząstki srebra spowodowały wzrost poziomu mitochondrialnego anionorodnika ponadtlenkowego oraz nadtlenu w komórkach hodowanych na medium o wyższym stężeniu glukozy. Poziom badanych reaktywnych formy tlenu nie uległ zmianie pod wpływem nanocząstek srebra w komórkach hodowanych z użyciem medium o niższym stężeniu glukozy.

Aby ocenić czy nanocząstki srebra modulują nitrację tyrozyny w układzie bezkomórkowym wykonano doświadczenia *in vitro*. Wykazano, że nanocząstki srebra obniżają poziom nitracji tyrozyny, najprawdopodobniej przez przyspieszenie rozkładu nadtlenuazotynu.

Zweryfikowano hipotezę o roli reaktywnych form azotu i produktów stresu azotowego poprzez ocenę stężenia nitrotyrozyny w komórkach HepG2 hodowanych w mediach o różnym stężeniu glukozy, w obecności nanocząstek srebra.

Stwierdzono, że endogenne poziomy nitrotyrozyny w komórkach HepG2 był poza zasięgiem detekcji zestawu ELISA użytego w doświadczeniach. Nitracja białek wywołana egzogennym nadtlenuazotynem osiągnęła wyższy poziom w komórkach hodowanych w medium o obniżonym stężeniu glukozy. Nitrotyrozyna była szybciej usuwana w komórkach hodowanych w medium o wyższym stężeniu glukozy, co jest związane z większą aktywnością proteasomu. Podobny efekt zaobserwowano w komórkach hodowanych w medium o niższym stężeniu glukozy poddanych działaniu nanocząstek srebra, które na drodze szlaku przeźnictwa sygnałów NRF2 również powodują wzrost aktywności proteasomu.

W wyżej wymienionych pracach wykazaliśmy, że toksyczność nanocząstek srebra jest silnie zależna od statusu redoks komórek, który jest konsekwencją aktywności łańcucha mitochondrialnego. Pozwoliło to na postawienie tezy, że komórki których metabolizm silnie zależy od glikolizy są bardziej podatne na uszkodzenia wywołane działaniem nanocząstek srebra. Przykładem takich komórek są komórki neuronalne. Celem dalszych doświadczeń była ocena w jaki sposób stres oksydacyjny wywołany przez nanocząstki srebra może wpływać na profil mRNA genów kodujących białka z rodziny ABC. Białka z nadrodziny ABC są bardzo istotne dla prawidłowego funkcjonowania neuronów, warunkując równowagę lipidową w komórkach neuronalnych. Zmiana poziomu tych białek jest wiązana z procesem różnicowania oraz prawidłowym funkcjonowaniem przekąźnictwa wewnątrzkomórkowego.

W pracy *Exposure of human neurons to silver nanoparticles induces similar pattern of ABC transporters gene expression as differentiation: Study on proliferating and post-mitotic LUHMES cells* największe zmiany w transkryptomie badanych genów zaobserwowano dla

genów

z rodziny ABCA, między innymi dla genu ABCA1. Zapostulowano mechanizm, w którym internalizacja fragmentów błony bogatych w cholesterol towarzysząca endocytozie nanocząstek srebra, zwiększa pulę cholesterolu w komórce dostępnego dla reaktywnych form tlenu. Oksysterole będące efektem utleniania cholesterolu są czynnikiem aktywującym czynnik transkrypcyjny LXR, który warunkuje homeostazę cholesterolową w mózgu oraz wpływa na zwiększenie ekspresji białka ABCA1.

Stwierdzono, że komórki intensywnie proliferujące poddane działaniu nanocząstek srebra wykazują profil ekspresji mRNA dla białek ABC analogiczny do tego, który związany jest z procesem różnicowania się w dojrzałe neurony dopaminergiczne. Świadczyć to może o tym, że stres wywołany przez nanocząstki w komórkach proliferujących może powodować zaburzenia różnicowania w płodowych komórkach neuronalnych.

## WNIOSKI

1. Dostępność glukozy moduluje toksyczność nanocząstek srebra. Jest to związane z uaktywnieniem mechanizmów obrony antyoksydacyjnej przez wzmożoną aktywność łańcucha mitochondrialnego i co za tym idzie zwiększoną produkcję reaktywnych form tlenu.
2. Typy komórek silnie zależne od glikolizy są bardziej podatne na toksyczny efekt nanomateriałów indukujących stres oksydacyjny.
3. Nanocząstki srebra nie wywołują stresu azotowego, ale wpływają na potranslacyjne modyfikacje białek pośrednio, przez wpływ na ekspresję białek związanych z obroną przed stresem nitracyjnym.
4. Prekursorowe komórki neuronalne są bardziej podatne na zmiany w ekspresji genów dla białek ABC wywołane przez nanocząstki srebra niż zróżnicowane neurony dopaminergiczne.
5. Proces różnicowania neuronów powoduje podobny profil zmian w ekspresji genów dla białek ABC jak aktywność biologiczna nanocząstek srebra.
6. Nanocząstki srebra aktywują czynnik transkrypcyjny LXR, co skutkuje zwiększoną ekspresją genu ABCA1 i możliwymi zaburzeniami w homeostacie cholesterolu.

## **MOLECULAR MECHANISMS OF SILVER NANOPARTICLES ACTIVITY ON CELLULAR LEVEL**

### **SUMMARY**

#### **INTRODUCTION**

Nanoparticles present in the environment, both natural and anthropogenic, have a significant impact on human health. Wide range of nanomaterial application in various branches of industry results in their increasing accumulation in abiotic environment and in tissues of living organisms. Most often mentioned negative effects of nanoparticles biological activity are: inflammation of the respiratory tract and respiratory diseases, allergies, cancer, cardiovascular diseases, developmental toxicity, immune toxicity, toxicity to organs, thrombosis, toxicity in the blood-brain barrier and neurodegenerative diseases[1].

Both, reactive oxygen species and reactive nitrogen species are produced in cells as an important element of cellular physiology. They play a crucial regulatory role due to their involvement in intracellular signal transduction.

Oxidative stress is an important factor in producing undesirable effects by nanoparticles. Oxidative stress is defined as a disturbance in the balance between the production of reactive oxygen species and antioxidant defenses or, more recently, as disruption of redox signaling and control. Occurrence of the oxidative stress is often associated with disturbances in metabolic processes, such as deregulation of mitochondrial respiratory chain and/or glycolysis.

Especially, concentration of glucose has a significant effect on cellular metabolism, as increased glucose level results in switching of cells metabolism from oxidative phosphorylation (OXPHOS) to glycolysis in various cell types, that in turn increases ROS production. A proposed mechanism for this phenomenon involves an increase in intracellular calcium concentration resulting in mitochondrial fission through the function of dynamin-like protein 1, that leads to apoptosis. Results of *in vitro* studies on the link between increased glucose concentration and inhibition of cell proliferation in the model cell lines correlate with *in vivo* results. In patients with type 2 diabetes a massive loss of beta-cells is observed, which is associated with oxidative stress induced by inhibition of glucose-6-phosphatase[2]. In physiological conditions majority of normal cells rely on OXPHOS, whereas cancer cells metabolism is based mostly on glycolysis (so-called Warburg effect)[3]. The Warburg effect may be an adaptation to the limited oxygen supply, as an early development of cancer cells



usually takes place in hypoxic environment of the growing tumor that has limited blood supply until its own vasculature is developed. Limiting the function of mitochondria can also promote the reduction of apoptotic process probability, which is one of the symptoms of carcinogenesis.

The primordial nitrogen radical – nitric oxide is synthesized from arginine, oxygen and NADPH by nitric oxide synthases. Despite the short half-life of a few milliseconds, nitric oxide molecules diffuse freely through the biological membranes, which makes them one of the crucial, both autocrine and paracrine, signaling molecules in vertebrates. The universality of nitric oxide as an intermittent signal molecule determines its participation in many processes at the organismal level, such as the regulation of the smooth muscle tone in the blood vessels and contribution in the process of immune response. In the liver, a small concentration of nitric oxide is key factor in maintaining homeostasis and prevention of pathologies. The structural concentration of nitric oxide is maintained in the course of activity of constitutive nitric oxide synthase. In contrast, the inducible nitric oxide synthase is expressed in liver cells of disturbed functions[4]. Nitrate stress is strongly connected to oxidative stress. Primal nitrogen radical – nitric oxide, is a particle of mild reactivity. However, its reaction with superoxide anion produces, peroxynitrite a molecule effective as oxidant and nitrating agent. Peroxynitrite, due to its aforementioned properties depletes cellular antioxidants and damages proteins, lipids and nucleic acids.

Oxidative stress is a phenomenon of great importance for maintaining intracellular homeostasis. This is not only connected with potential oxidative damage of cell-building molecules, but also to the regulatory role played by free radicals and other reactive oxygen species. The key pathways of intracellular signal transmission can be regulated by the redox status of the cell, as well as through direct activation of transcription factors by reactive oxygen species. The activation of transcription factors will ultimately lead to changes in the gene expression profile. A well-documented example of activating a transcription factor directly through the redox status is activation of Nrf2 which has the ability to activate genes that contain the ARE element in the promoter sequence as well as genes coding for proteins responsible for the detoxification, such as GST. Many of the proteins from the ABC superfamily are under control of transcription factors dependent on the redox status. Disorders in the expression of ABC transporters can be important for the proper functioning of cells and may be important in the course of treatment of cancers.

In course of my research I focused on silver nanoparticles-induced oxidative and nitritative stress, with special attention devoted to mitochondria. The aim of this study was to extend the knowledge in the aspect of mechanism of action of nanoparticles on the cellular level.

#### AIMS

1. Evaluation of endogenous production of reactive oxygen species dependent on the activity of the respiratory chain, as a factor modulating toxicity of silver nanoparticles.
2. Resolving the role of nitrogen stress in the toxicity of silver nanoparticles.
3. Evaluation of the role of oxygen free radicals generated under the influence of nanoparticles in the process of modulation of mRNA profile for selected ABC proteins in mature dopaminergic neurons and undifferentiated neurons.

#### METHODS

Two cell lines were used as research models to achieve the goals of this dissertation: HepG2 cell line – derived from hepatocellular carcinoma and LUHMES cell line – derived from the midbrain of 8-week fetus. HepG2 cells were grown in DMEM medium in two variants of glucose concentration. The lower concentration (5.5 mmol / dm<sup>3</sup>) corresponded to the physiological conditions, whereas the concentration of 25 mmol / dm<sup>3</sup> is convergent with the concentration in acute diabetic shock. The LUHMES cell line is a model of dividing and mature dopaminergic neurons. Differentiation of LUHMES cells into mature dopaminergic neurons was performed according to work of Stepkowski et al [5]. Both cell lines were purchased from ATCC (American Type Culture Collection). Cell cultures were carried out in accordance with recommendations. Silver nanoparticles with a nominal diameter of 20 nm were used as agents initiating biological response. Survival assessment was based on the neutral red accumulation in lysosomes of living cells. Measurements of intracellular superoxide anion generation in the mitochondria and cytoplasm, hydrogen peroxide and nitric oxide levels were performed using flow cytometry readings employing specific probes. Measurements of the production of mitochondrial hydrogen peroxide were conducted using the HyPer-mito reporter protein with flow cytometry techniques.

Isolation of nucleic acids was carried out using the MagNA Pure LC 2.0 device (HepG2) and TRI reagent (LUHMES). Reverse transcription reactions were performed using SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMIX. Gene expression associated with oxidative stress on mRNA level was tested using commercially available set of primers (HOSL-1 – The

human oxidative stress library). Gene expression of ABC family proteins on mRNA level was evaluated using a commercially available set of primers (Roche). The concentration of nitrotyrosine was determined using commercially available ELISA kit (Merck Milipore), while the level of tyrosine nitration in the cell-free system was examined by measuring the fluorescence intensity of nitotyrosine. The activity of antioxidant enzymes was determined by measuring the rate of changes in level of appropriate substrates with classical absorption spectroscopy methods.

## RESULTS

The research presented in this dissertation is contained in three thematically related papers. In *Glucose availability determines silver nanoparticles toxicity in HepG2* and *Silver nanoparticles can attenuate nitrative stress*, it was shown that the change in the concentration of available glucose in the culture medium resulted in the establishment of new redox balance. Stable redox status of the cells was attained 72 hours after the change in concentration of glucose as mitochondria activity modulating factor. The activity of enzymes related to antioxidant defense in cells grown in media supplemented with different glucose concentrations was evaluated. The adaptation process of cells to reduced concentration of glucose in the environment caused an increase in the importance of oxidative phosphorylation in cells metabolism. The observable increase in catalase, glutathione S-transferase, superoxide dismutase and glutathione reductase activities indicates the process of cells adaptation to new redox equilibrium. In addition, the expression profile of genes related to antioxidant defense was examined in cells grown at a lower glucose level. The adaptation process of the HepG2 cells was confirmed by the analysis of the transcriptome responsible mainly for the cell response to oxidative stress. The NOS2, GSTM5, ALB, MBL2, SCARA3 and CAT genes have been upregulated. At the same time, the decrease in the expression of genes related to glutathione metabolism (GSS, GSTZ1, GSTA4, GPX) suggests that the detoxification of reactive oxygen species produced as a result of lowering glucose concentration is carried out through rapid enzymatic reactions and not by small antioxidant molecules. In addition, gradual and chronic reduction of glutathione levels activates NFκB signal transmission pathway, which induces antioxidative response.

These observations allowed us to propose a mechanism that was decisive in the differences in survival of HepG2 cells cultured in varying glucose concentrations after treatment with silver nanoparticles.

The concentration of glucose in the culture medium is a factor modulating the toxicity of silver nanoparticles. Reducing the concentration of glucose intensified oxidative phosphorylation accompanied by increase in reactive oxygen species production, which in turn, resulted in elevating intracellular antioxidative defense mechanisms. The death of 10 % of cells in high glucose culture was caused by silver nanoparticles in concentration 1.4 times lower than in case of culture sustained in low glucose for 24 hours and 7.6 times lower for culture sustained in low glucose for a month or more.

HepG2 cells were studied in context of production of hydrogen peroxide in the mitochondria and the production of reactive oxygen and nitrogen species in cytoplasm

It has been observed that silver nanoparticles caused oxidative stress in HepG2 cells, manifested by an increased concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the mitochondria by 18% in comparison to control cells. Culturing cells in a medium with reduced glucose concentration enabled the adaptation of cells to the conditions of increased oxidative stress due to increased activity of mitochondrial electron transport chain, so that no increase of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level was observed after treatment with silver nanoparticles.

Reduction of glucose concentration in the culture medium resulted in decrease in detected superoxide radicals at the cellular and mitochondrial level as well as decrease in intracellular peroxides. Silver nanoparticles caused an increase in the level of the mitochondrial superoxide anion and peroxides in cells grown in a medium with a higher concentration of glucose. The level of tested reactive oxygen species did not change after treatment with silver nanoparticles in cells cultured in a medium of lower glucose concentration.

To assess whether silver nanoparticles modulate tyrosine nitration in a cell-free system, *in-vitro* experiments were performed. Silver nanoparticles have been shown to lower the level of tyrosine nitration, most likely by accelerating the decomposition of peroxyxynitrite.

The hypothesis about the role of reactive nitrogen species and nitrogen stress product was verified by the assessment of nitrotyrosine concentration in HepG2 cells cultured in media with various concentration of glucose in the presence of silver nanoparticles.

It was found that the endogenous level of nitrotyrosine in HepG2 cells was beyond the detection range of the used ELISA kit. Protein nitration caused by exogenous peroxyxynitrite increased was higher in cell cultured in low glucose medium. Nitrotyrosine was removed faster in cells cultured in a medium with a higher concentration of glucose, which is associated with

higher proteasome activity. A similar effect was observed in cells grown in a medium with lower glucose concentration treated with silver nanoparticles, which, through activation of NRF2 signaling pathway also cause an increase in proteasome activity.

In the above mentioned works we have shown that the toxicity of silver nanoparticles is strongly dependent on the cellular redox status, which is a consequence of the activity of the mitochondrial chain. This allowed the thesis that the cells whose metabolism strongly depends on glycolysis are more susceptible to damage caused by the action of silver nanoparticles, neuronal cells being an example. The purpose of further experiments was to assess how the oxidative stress induced by silver nanoparticles can affect the mRNA profile of ABC proteins. The proteins from the ABC superfamily are very important for the proper functioning of neurons, conditioning the lipid balance in neuronal cells. The change in the level of these proteins is associated with the process of differentiation and the proper functioning of intracellular signal transmission.

In *Exposure of human neurons to silver nanoparticles induces similar pattern of ABC transporters gene expression as differentiation: Study on proliferating and post-mitotic LUHMES cells* biggest changes in the transcriptome of studied genes were observed for genes coding proteins from the ABCA family. A mechanism was proposed where the internalization of cholesterol-rich membrane fragments caused by endocytosis of silver nanoparticles increased the pool of cholesterol available for reactive oxygen species generated by silver nanoparticles. Oxysterols resulting from cholesterol oxidation can activate LXR, which determines the cholesterol homeostasis in the brain and increases the expression of the ABCA1 protein.

It has been found that intensely proliferating cells treated with silver nanoparticles have similar pattern of expression profile changes as cells during differentiated into mature dopaminergic neurons. This may indicate that stress induced by nanoparticles in proliferating cells may cause disturbances of differentiation in fetal neuronal cells.

## CONCLUSIONS

1. The availability of glucose modulates the toxicity of silver nanoparticles. This is related to the activation of antioxidant defense mechanisms through the increased activity of the mitochondrial chain and, consequently, increased production of reactive oxygen species.

2. Cell types strongly dependent on glycolysis are more susceptible to the toxic effect of nanomaterials inducing oxidative stress.
3. Silver nanoparticles do not induce nitrogen stress, but affect post-translational protein modifications indirectly, by affecting the expression of proteins associated with protection against nitrate stress.
4. Neuronal precursor cells are more susceptible to changes in gene expression for ABC proteins induced by silver nanoparticles than differentiated dopaminergic neurons.
5. The process of neuronal differentiation results in a similar profile of changes in gene expression of ABC proteins as the biological activity of silver nanoparticles.
6. Silver nanoparticles activate LXR transcription factor which results in increased expression of the ABCA1 gene and possible disturbances in the cholesterol homeostasis.

## Literatura/References

1. Zuberek, M. and A. Grzelak, *Nanoparticles-Caused Oxidative Imbalance*. Adv Exp Med Biol, 2018. **1048**: p. 85-98.
2. Zhang, Z., et al., *High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase, leading to increased oxidative stress and beta-cell apoptosis*. FASEB J, 2010. **24**(5): p. 1497-505.
3. Koppenol, W.H., P.L. Bounds, and C.V. Dang, *Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(5): p. 325-37.
4. Iwakiri, Y. and M.Y. Kim, *Nitric oxide in liver diseases*. Trends Pharmacol Sci, 2015. **36**(8): p. 524-36.
5. Stepkowski, T.M., S. Meczynska-Wielgosz, and M. Kruszewski, *mitoLUHMES: An Engineered Neuronal Cell Line for the Analysis of the Motility of Mitochondria*. Cell Mol Neurobiol, 2016.

