



Rycina 2. Róża damasceńska (*Rosa damascena*).  
Fot. Małgorzata Kalemba-Drożdż



# ROZDZIAŁ 1.

## AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA *IN VITRO* NANOCZĄSTEK ZŁOTA (Au@RD NPS) OTRZYMANÝCH PRZY UŻYCIU WODNEGO EKSTRAKTU Z RÓŻY DAMASCENSKIEJ (*ROSA DAMASCENA*)

**Agnieszka Cierniak<sup>1</sup>, Sylwia Łukasiewicz<sup>2</sup>, Agnieszka Kyzioł<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Krakowska Akademia im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego, Wydział Lekarski i Nauk o Zdrowiu, Zakład Biochemii, Kraków, Polska. ORCID: 0000-0001-6537-2954

<sup>2</sup> Uniwersytet Jagielloński, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Zakład Biochemii Fizycznej, Kraków, Polska. ORCID: 0000-0002-6574-1147

<sup>3</sup> Uniwersytet Jagielloński, Wydział Chemii, Zakład Chemii Nieorganicznej, Kraków, Polska. ORCID: 0000-0003-0751-5819

DOI: 10.48269/978-83-66007-99-4-001

### Streszczenie

Synteza nanocząstek metali (NPs) oparta na chemii zrównoważonego rozwoju staje się coraz popularniejszą ekologiczną metodą stosowaną zamiast syntezy chemicznej. W szczególności ekstrakty roślinne jako czynniki redukujące i stabilizujące są stopniowo wykorzystywane do syntezy metalicznych nanocząstek. Ekstrakty z róży damasceńskiej (*Rosa damascena*), wykazujące właściwości antyoksydacyjne, antibakteryjne, przeciwzapalne czy antynowotworowe, mogą być wykorzystane do syntezy nanocząstek złota.

Celem badań była ekologiczna i kontrolowana synteza nanocząstek złota z zastosowaniem ekstraktu wodnego z róży damasceńskiej (Au@RD NPs). Analizowano wpływ Au@RD NPs na przeżywalność, poziom uszkodzeń DNA i apoptozę w komórkach prawidłowych – ludzkich limfocytach, oraz nowotworowych: HL60 i A549.

W badaniach *in vitro* nie wykazano cyto- i genotoksyczności Au@RD NPs wobec komórek prawidłowych, natomiast dla komórek nowotworowych wykazano selektywną

cyto- i genotoksyczność oraz indukcję apoptozy. Uzyskane wyniki wskazują, że nanocząstki złota otrzymane zgodnie z zasadami chemii zrównoważonego rozwoju są atrakcyjnymi materiałami hybrydowymi dla badań biologicznych łączącymi dwa aktywne składniki – nanocząstki metali i polifenole roślinne.

**Słowa kluczowe:** nanocząstki złota; polifenole; apoptoza; uszkodzenia DNA

## Abstract

*In vitro* biological activity of gold nanoparticles (Au@RD NPs) obtained using aqueous extract of Damask rose (*Rosa damascena*)

Synthesis of metal nanoparticles (NPs) based on Sustainable Chemistry is an increasingly popular ecological method, instead of chemical synthesis. In particular, plant extracts as reducing and stabilizing agents are gradually used for the synthesis of metallic nanoparticles. Extracts of Damask rose (*Rosa damascena*) have antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory or anti-cancer properties that can be used to synthesize gold nanoparticles.

The aim of the study was the ecological and controlled synthesis of gold nanoparticles using Damask rose aqueous extract (Au@RD NPs). The effect of NPs Au@RD on survival, DNA damage and apoptosis in normal cells: human lymphocytes and cancer cells: HL60 and A549 was studied.

*In vitro* studies did not revealed cyto- and genotoxicity of Au@RD NPs in the case of normal cells, while for cancer cells: selective cyto- and genotoxicity and induction of apoptosis were demonstrated. The data show that gold nanoparticles obtained in accordance with the principles of Sustainable Chemistry are attractive hybrid materials for biological purposes combining two active components – metal nanoparticles and plant polyphenols.

**Key words:** gold nanoparticles; polyphenols; apoptosis; DNA damage

## Wprowadzenie

Synteza nanocząstek metali (NPs, ang. *nanoparticles*) oparta na założeniach chemii zrównoważonego rozwoju staje się coraz popularniejszą ekologiczną metodą stosowaną zamiast syntezy chemicznej. W szczególności ekstrakty roślinne jako czynniki redukujące i stabilizujące są stopniowo wykorzystywane do syntezy metalicznych nanocząstek, dlatego synteza ta jest potocznie określana „zieloną chemią” [Akhtar i wsp. 2013, Mittal i wsp. 2013, Bhaumik i wsp. 2015, Duan i wsp. 2015, Sasidharan i wsp. 2018]. Zainteresowanie zastosowaniem nanocząstek jest duże ze względu na relatywną łatwość ich syntezy, dobrą kontrolę rozmiarów i kształtów, właściwości optyczne i wysoką biokompatybilność powstałych nanocząstek.

Nanostruktury złota cieszą się dużym zainteresowaniem w badaniach naukowych ze względu na ich szerokie zastosowanie w fotonice, elektronice, katalizie, detekcji optycznej i obrazowaniu, terapii fototermalnej czy fotodynamicznej oraz w dostarczaniu substancji aktywnych i leków [Hu i wsp. 2006, Rao i Paria 2015, De Crozals i wsp. 2016, Peynshaert i wsp. 2014]. Fizykochemiczne i biologiczne właściwości nanostruktur złota różnią się w zależności od ich wielkości, kształtu, porowatości i modyfikacji powierzchni oraz wielu innych właściwości. Różne strategie i sposoby syntezy opisywane w literaturze pozwalają uzyskać różnorodne i różnowymiarowe nanocząstki, w tym nanosfery, nanopręty, nanoklatki czy nanopowłoki [Akhtar i wsp. 2013, Duan i wsp. 2015, Xia i wsp. 2009, Lofton i Sigmund 2005, Gharib i wsp. 2019]. Na podstawie badań *in vitro* udowodniono, że ogólna toksyczność wykazywana przez anizotropowe nanocząstki złota może pochodzić od środków redukujących i/lub stabilizujących stosowanych w ich syntezie [Gharib i wsp. 2019]. Jednakże dotyczy to przede wszystkim syntez z użyciem toksycznych odczynników organicznych, gdzie istnieje obawa o niedokładne oczyszczenie próbek w obróbce końcowej lub podczas dializy przy wymianianiu ligand powierzchniowych.

Zgodnie z proponowanym w literaturze mechanizmem generowania nanocząstek metalicznych to grupy funkcyjne, takie jak grupy hydroksylowe lub ketonowe flawonoidów, polifenoli oraz innych cząsteczek występujących w ekstraktach roślinnych, są utleniane do odpowiednich kwasów karboksylowych przy jednoczesnej redukcji odpowiednich jonów metali [Ghoreishi i wsp. 2011, Edison i Sethuraman 2012, Lee i Park 2011, Kasthuri i wsp. 2009]. Tak więc ekstrakty roślinne, zawierające zarówno pierwotne, jak i wtórne cząsteczki metabolitów bogatych we wspomniane grupy funkcyjne, można uznać za czynniki redukujące oraz stabilizujące, zapobiegające agregacji cząstek podczas początkowych etapów syntezy oraz późniejszej agregacji i aglomeracji syntetyzowanych z ich użyciem nanocząstek.

Ekstrakty roślinne zawierające polifenole mają szeroko udokumentowany licznymi badaniami *in vitro* i *in vivo* potencjał antyoksydacyjny zapobiegający uszkodzeniom DNA [Kalim i wsp. 2010, Estrela i wsp. 2017] oraz aktywność przeciwnowotworową, którą wykazano także dla nanocząstek złota [Avtanski i Poretsky 2018, Sztandera i wsp. 2019, Khan i wsp. 2019]. Na szczególną uwagę zasługują ekstrakty z róży damasceńskiej

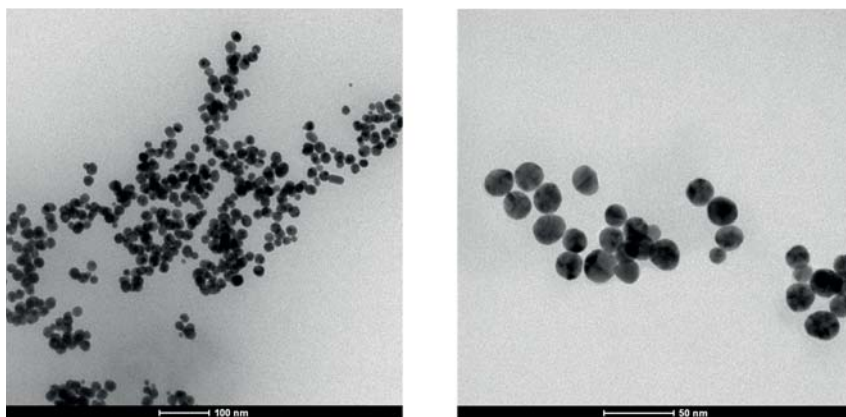
(*Rosa damascena*) (rycina 2, s. 15) bogate w różne substancje aktywne, m.in. terpeny, glikozydy, flawonoidy, antocyjany, taniny czy wielonienasycone kwasy tłuszczowe (np. kwas linolenowy). Odmiana ta jest bogata również w witaminy C i E, beta-karoten oraz minerały, takie jak: wapń, żelazo, potas, mangan, sód, fosfor i cynk [Akram i wsp. 2020]. Ekstrakty z płatków róży damasceńskiej zawierają mircen, kwas karboksylowy, kempferol i kwercetynę [Schiber i wsp. 2005]. Dzięki tak licznie reprezentowanym składnikom bioaktywnym ekstrakty te wykazują potwierdzone wieloma badaniami szerokie spektrum właściwości, m.in. działania: antyoksydacyjne, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwbólowe, moczopędne, przeciwkaszlowe, żółciopędne, rozkurczowe, przeciwcukrzycowe, przeciwzapalne [Mahboubi 2015]. Również wcześniejsze badania prowadzone na ludzkich limfocytach poddanych działaniu wyciągów z róży damasceńskiej potwierdziły właściwości ochronne ekstraktów różanych przeciwko oksydacyjnym uszkodzeniom DNA indukowanym  $25 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  [Kalemba-Drożdż i Cierniak 2013]. Obecnie, kiedy coraz więcej uwagi poświęca się rozwojowi biokompatybilnych i biodegradowalnych materiałów na bazie metabolitów roślinnych, hybrydowe biomateriały mogą być obiecującymi wektorami w dziedzinie zastosowań biomedycznych o kontrolowanym uwalnianiu, zwłaszcza w terapii nowotworów [Guo i wsp. 2019, Liang i wsp. 2018]. W szczególności biosyntezyzowane nanocząstki złota mogą stać się terapeutykami nowej generacji przeciwko różnym rodzajom nowotworów. Zaprojektowana wielofunkcyjność nanocząstek metali, polegająca na montażu/zakotwiczeniu metabolitów roślinnych z ich antyoksydacyjnymi właściwościami, może zapewnić selektywną aktywność w stosunku do komórek prawidłowych i nowotworowych.

Zatem, mając do dyspozycji dwie tak różne i jednocześnie posiadające tak szerokie spektra terapeutyczne jednostki budulcowe jak nanocząstki złota i ekstrakt z róży damasceńskiej, postanowiliśmy przeprowadzić syntezę bioaktywnych nanocząstek złota z wykorzystaniem tego ekstraktu i zbadać ich działanie w układzie *in vitro*. Celem badań była ekologiczna, wydajna i kontrolowana synteza nanocząstek złota z zastosowaniem ekstraktu wodnego z róży damasceńskiej (Au@RD NPs) bez użycia innych środków redukujących oraz określenie wpływu Au@RD NPs na przeżywalność, uszkodzenia DNA i proces apoptozy w komórkach prawidłowych – jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBML), oraz

w komórkach nowotworowych: ostrej białaczce promielocytowej (HL60) i ludzkim gruczolakoraku, tj. niedrobnokomórkowym raku płuc (A549).

## Materiały i metody

Metody opisujące syntezę Au@RD NPs, określenie właściwości fizykochemicznych (wielkość, kształt, stabilność) otrzymanych Au@RD NPs oraz zawartość polifenoli, flawonoidów, cukrów redukujących i właściwości antyoksydacyjne zostały szczegółowo opisane w publikacji *Towards plant-mediated chemistry – Au nanoparticles obtained using aqueous extract of Rosa damascena and their biological activity in vitro* [Kyzioł i wsp. 2021]. Ogólnie synteza nanocząstek Au@RD została zainicjowana przez dodanie 2 ml 5 mM wodnego roztworu  $\text{HAuCl}_4$  do 18 ml wodnego ekstraktu róży damasceńskiej (1 mg/ml) tak, aby końcowe stężenie kwasu Au(III) w mieszaninie reakcyjnej wyniosło 0,5 mM. Mieszanina reakcyjna była mieszana w sposób ciągły w temperaturze pokojowej 22°C, przy czym w ciągu 3 min rozwinęło się różowe zabarwienie wskazujące początek tworzenia się Au@RD NPs. Postęp reakcji monitorowano mierząc absorbancję mieszaniny reakcyjnej w regularnych odstępach czasu. Rycina 3 przedstawia zdjęcie TEM uzyskanych Au@RD NPs. W niniejszej pracy zaprezentowano wyniki eksperymentów *in vitro* z Au@RD NPs.



Rycina 3. Obraz z mikroskopu TEM przedstawiający nanocząstki złota uzyskane z użyciem wodnego ekstraktu z róży damasceńskiej w różnej skali [Kyzioł i wsp. 2021: 7]



## Izolacja limfocytów

Krew będąca źródłem limfocytów kontrolnych pochodziła ze stacji krwiodawstwa w Krakowie i była pobrana od 3 różnych dawców płci męskiej w wieku 23–45 lat. Pobraną krew wirowano [12 min, 1500 rpm ( $350 \times g$ ),  $4^{\circ}\text{C}$ ] w celu uzyskania osocza, a następnie krew rozcieńczoną w stosunku 1:1 z PBS wirowano w gradiencie gęstości [Histopaque 1077, 35 min, 1600 rpm ( $400 \times g$ ), w temperaturze pokojowej]. W kolejnym etapie warstwa limfocytarna została dwukrotnie odwirowana w PBS bez  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  [10 min, 1500 rpm ( $350 \times g$ ) w  $4^{\circ}\text{C}$ ]. Limfocyty zostały następnie zamrożone w  $-80^{\circ}\text{C}$  w pożywce: 40% RPMI (Roswell Park Memorial Institute 1640 medium), 50% płodowa surowica cielęca (FBS, *fetal bovine serum*), 10% dimetylosulfotlenek (DMSO).

## Hodowla komórek HL60 i A549

Komórki HL60 (ATCC: CCL 240<sup>TM</sup>) hodowano w zawiesinie o gęstości  $5 \times 10^5/\text{ml}$  w pożywce RPMI 1640 z dodatkiem 10% FBS oraz antybiotyków: penicyliny (100 U/ml) i streptomycyny (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Komórki A549 (ATCC: CCL-185<sup>TM</sup>) hodowano w zawiesinie  $5 \times 10^5/\text{ml}$  w pożywce DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) z L-glutaminą, czerwieńią fenolową i glukozą (4,5g/L) również z dodatkiem 10% FBS oraz antybiotyków: penicyliny (100 U/ml) i streptomycyny (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Hodowle prowadzono w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$ , w atmosferze zawierającej 5%  $\text{CO}_2$  o wilgotności 95%, zmieniając płyn hodowlany co 48 godzin. Wszystkie eksperymenty wykonywano w fazie logarytmicznego wzrostu komórek. Do eksperymentów komórki wysiewano na płytki 96-dołkowe w gęstości  $1,5 \times 10^4/\text{ml}$  i inkubowano przez 24 godziny. Po tym czasie pożywki wymieniano na świeże i do komórek dodawano Au@RD NPs w stężeniu 0–100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  i inkubowano przez 1, 24 i 48 godzin.

## Ocena żywotności komórek – test fluorescencyjny

W celu zbadania wpływu Au@RD NPs na komórki prawidłowe (ludzkie limfocyty) przeprowadzono różnicowe barwienie fluorescencyjne, w którym pod wpływem dwuocianu fluoresceiny komórki żywe barwią się na kolor zielony, a bromek etydyny wybarwia komórki martwe



na pomarańczowo. PBML o gęstości  $1,5 \times 10^4$ /ml inkubowano przez 1 i 24 godziny z Au@RD NPs w stężeniu 0–100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Następnie komórki odwirowano, zawieszono w 30  $\mu\text{l}$  PBS i mieszano w stosunku 1:1 z mieszaniną dwuoctanu fluoresceiny w acetonie o stężeniu 5  $\text{mg}/\text{ml}$ , bromku etydydy w PBS o stężeniu 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  i 4,6 ml PBS bez  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ . Preparaty analizowano pod mikroskopem fluorescencyjnym z użyciem niebieskiego filtra wzbudzającego, licząc 500 losowo wybranych komórek w każdym preparacie. Zliczano wyniki z trzech niezależnych eksperymentów.

#### Ocena żywotności komórek – test luminescencyjny CellTiter-blue®

Do monitorowania żywotności komórek HL60 i A549 zastosowano test CellTiter-Blue® (Promega). Oznacza się w nim zdolność żywych komórek do przekształcania barwnika (resazuryny) w produkt fluorescencyjny (rezorufinę). Tylko żywe komórki są w stanie metabolizować i redukować barwnik – komórki bez zdolności metabolicznej nie generują sygnału fluorescencyjnego. Dzień przed eksperymentami komórki wysiewano na 96-dółkowe czarne płytki w gęstość  $1,5 \times 10^4$  komórek na dółek. Następnie dodawano Au@RD NPs w ilości 0–100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Procedura testu jednorodnego obejmuje dodanie pojedynczego odczynnika bezpośrednio do komórek hodowanych w pożywce uzupełnionej surowicą. Dlatego po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji z Au@RD NPs pożywka z hodowli komórkowej została usunięta i zastąpiona świeżo przygotowaną pełną pożywką (50  $\mu\text{l}$  na dółek) uzupełnioną odczynnikami CellTiter Blue (10  $\mu\text{l}$  na dółek). Po 3 godzinach inkubacji w  $37^\circ\text{C}$ , w atmosferze 5%  $\text{CO}_2$ , mierzono fluorescencję za pomocą czytnika mikropłytek (TECAN Infinitive200). Długość fali wzbudzenia: 560 nm; długość fali emisji: 590 nm. Komórki bez Au@RD NPs służyły jako kontrola. Wyniki przedstawione w dalszej części opracowania prezentują średnią żywotność komórek z 6-krotnych powtórzeń (6 studzienek na każdy punkt pomiarowy) z trzech niezależnych eksperymentów dla każdej linii komórkowej.

#### Badanie uszkodzeń DNA na poziomie pojedynczej komórki – test kometowy

Test kometowy (ang. *comet assay*) polega na elektroforezie nukleoidów w żelu agarozowym i służy do wykrywania uszkodzeń DNA na poziomie

pojedynczej komórki. Jeśli doszło do uszkodzenia DNA w komórce, wówczas po zastosowaniu alkalicznej lizy ( $\text{pH} > 13$ ), a następnie elektroforezy, widoczny jest charakterystyczny obraz tzw. komety. „Ogon komety” odzwierciedla ilość uszkodzeń DNA wyrażoną jako % uszkodzeń DNA w pojedynczej komórce.

W przeprowadzonych doświadczeniach PBML komórki HL60 i A549 o gęstości  $5 \times 10^5/\text{ml}$  inkubowano przez 1, 24 oraz 48 godzin z Au@RD NPs w stężeniu 0–100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Następnie odwirowano je w PBS w warunkach:  $4^\circ\text{C}$ , 5 min,  $230 \times g$  (1200 rpm) i zawieszono w 50  $\mu\text{l}$  PBS bez  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ . Do zawiesiny komórek dodawano agarozę o obniżonej temperaturze topnienia (LMPA, ang. *low melting point agarose*), po czym nakładano ją na wcześniej przygotowane szkiełka podstawowe pokryte agarozą o normalnej temperaturze topnienia (NMPA, ang. *normal melting point agarose*). Po zastygnięciu agarozy preparaty zanurzano w buforze lizującym (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO, 1% Triton X-100,  $\text{pH} = 10$ ) na 16 godzin. Następnie prowadzono elektroforezę przez 30 min przy napięciu 0,74 V/cm i natężeniu 300 mA. Po neutralizacji (0,4 M Tris  $\text{pH} = 7,5$ ) preparaty zanurzano na 5 min w zimnym metanolu. Bezpośrednio przed analizą szkiełka inkubowano przez 5 min w wodzie destylowanej oraz barwiono jodkiem propidyny (2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Pomiarów dokonano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Olympus IX50. Analiza uszkodzeń DNA została przeprowadzona w programie Comet Assay 2.6 (Comet Plus, Theta System GmbH, Germany) określającym stopień uszkodzenia komórek. Wszystkie eksperymenty wykonano w trzech niezależnych powtórzeniach, a z każdego preparatu analizowano po 100 komórek. W dalszej analizie posłużono się % DNA zawartym w ogonie komety reprezentującym stopień uszkodzenia komórek.

### Apoptoza – poziom aktywności kaspazy 3/7

Apoptoza, czyli programowana śmierć komórki, jest procesem złożonym, który obejmuje kaskadę molekularnych zdarzeń doprowadzających do powstania tzw. ciał apoptotycznych, które są całkowicie przetwarzane z udziałem lizosomów komórek sąsiadujących z degradowaną komórką lub przez makrofagi. Ważnymi mediatorami apoptozy są kaspazy, które dzielimy na dwie grupy: inicjatorowe (kaspazy 2, 8, 9 i 10) oraz

wykonawcze (kaspazy 3, 6 i 7). Oznaczenie aktywności kaspaz wykonawczych jest jednym ze sposobów potwierdzenia, że komórka wchodzi na drogę apoptozy.

Aktywność kaspaz 3 i 7 mierzono za pomocą testu Caspase-Glo 3/7 (Promega, Madison, USA). Komórki HL60 i A549 ( $2 \times 10^5$  na dołek) wysiano na 12-dółkowych płytkach i wystawiono na działanie od 0 do 100  $\mu\text{g/ml}$  Au@RD NP przez 24 i 48 godzin. Ekstrakty białkowe (3  $\mu\text{g}$ ) zmieszano z 50  $\mu\text{l}$  odczynnika Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 i umieszczono na białych 96-dółkowych płytkach. Po 120 min inkubacji luminescencję mierzono za pomocą czytnika mikroplatek Infinite M200. Eksperymenty wykonano w trzech powtórzeniach a pomiary w duplikatach dla każdego punktu pomiarowego. Średnią wartość luminescencji dla każdego stężenia Au@RD NPs podzielono przez średnią wartość dla kontroli i przedstawiono jako % kontroli (kontrola traktowana jako 100%).

Apoptoza – wizualizacja komórek apoptotycznych z użyciem barwnika Hoechst 33342 i mikroskopii fluorescencyjnej

Za pomocą barwienia fluorescencyjnego możliwe jest odróżnienie komórek prawidłowych od tych, które weszły w apoptozę. Na poziomie morfologicznym komórki apoptotyczne wyraźnie różnią się od zdrowych: widoczne jest formowanie charakterystycznych ciałek apoptotycznych – struktur zawierających organelle i fragmenty chromosomów otoczonych błoną komórkową, które po zastosowaniu barwnika fluorescencyjnego (1  $\mu\text{g/ml}$  Hoechst 33342 w 3,7% paraformaldehydzie w PBS) jasno świecą. Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Olympus IX50.

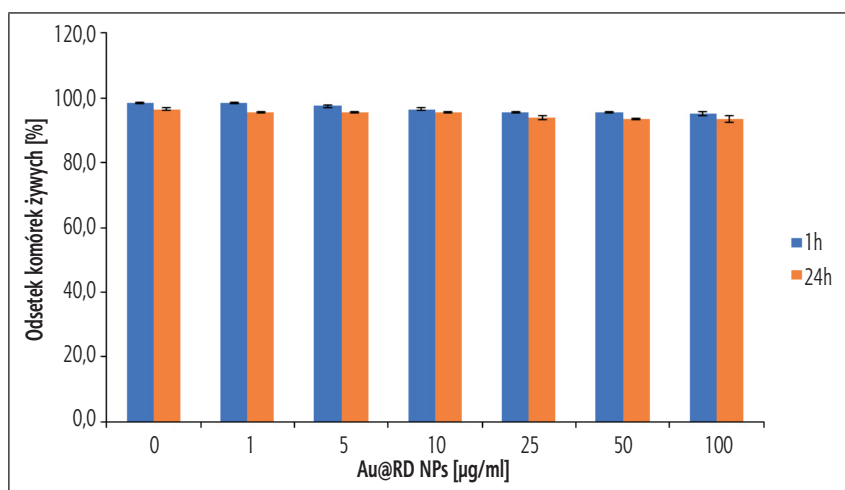
#### Analiza statystyczna

Analizy statystycznej wyników testu kometowego dokonano w programie Statistica 12.0 (StatSoft Polska), używając testu ANOVA popartego analizą post-hoc Tukeya (HSD). Wyniki przedstawiono w postaci średnich grupowych; słupki błędów oznaczają 1,96 SE (błędu standardowego). Różnice przy  $p < 0,05$  przyjęto za istotne statystycznie. W przypadku oceny żywotności oraz apoptozy zastosowano test *t*-studenta.

## Wyniki

### Wpływ Au@RD NPs na żywotność limfocytów

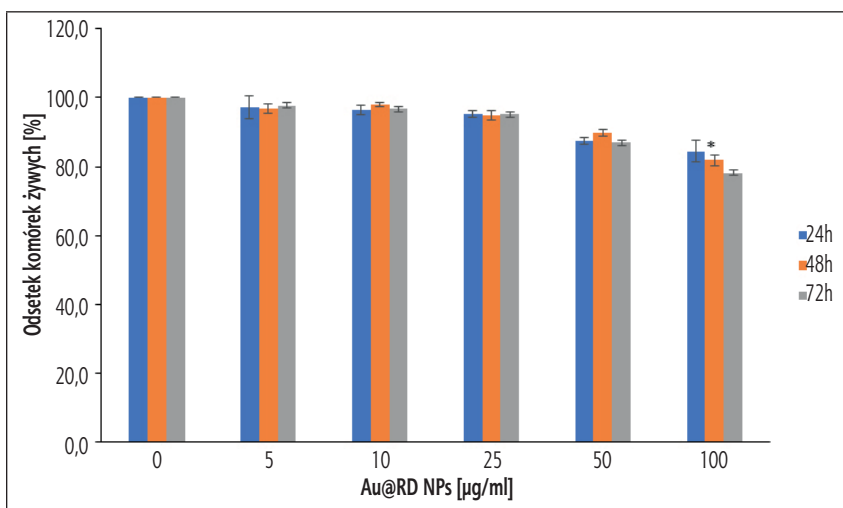
W celu zbadania wpływu nanocząstek złota z polifenolami róży damasceńskiej na żywotność limfocytów izolowanych z krwi zdrowych dawców, komórki traktowano Au@RD NPs przez 1 i 24 godziny w zakresie stężeń 0–100  $\mu\text{g/ml}$ . Nie wykazano cytotoksycznego wpływu Au@RD NPs na limfocyty ani istotnych statystycznie różnic pomiędzy czasem inkubacji wynoszącym 1 i 24 godziny dla wszystkich badanych stężeń. Wyniki przedstawiono na rycinie 4.



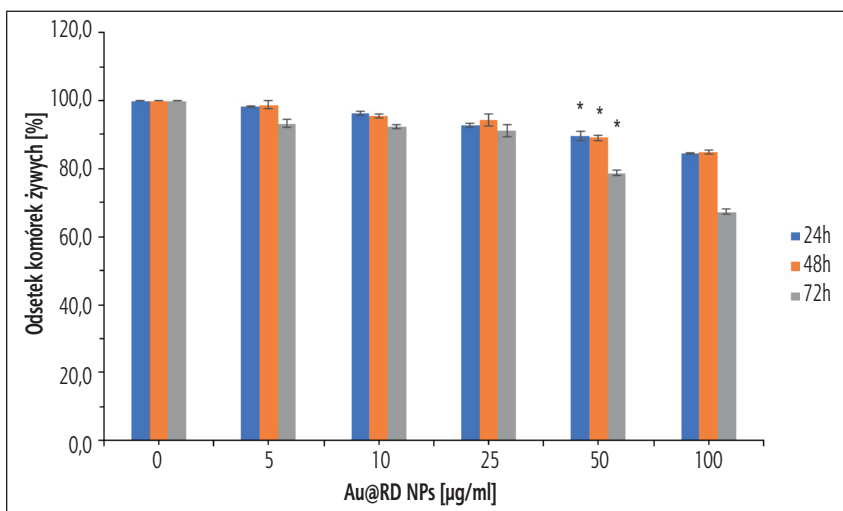
Rycina 4. Wpływ Au@RD NPs w zakresie stężeń 0–100  $\mu\text{g/ml}$  na żywotność limfocytów pobranych od zdrowych dawców

### Wpływ Au@RD NPs na żywotność komórek A549 i HL60

W celu zbadania wpływu nanocząstek złota z polifenolami róży damasceńskiej na przeżywalność komórek nowotworowych, linie komórkowe A549 oraz HL60 traktowano Au@RD NPs przez 24, 48 i 72 godziny w zakresie stężeń 0–100  $\mu\text{g/ml}$ . Wyniki przedstawiono na rycinach 5 (komórki A549) oraz 6 (komórki HL60).



Rycina 5. Wpływ Au@RD NPs w zakresie stężeń 0–100 µg/ml na żywotność komórek A549 po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji. \* – istotność statystyczna ( $p < 0,05$ ) w stosunku do kontroli (0)



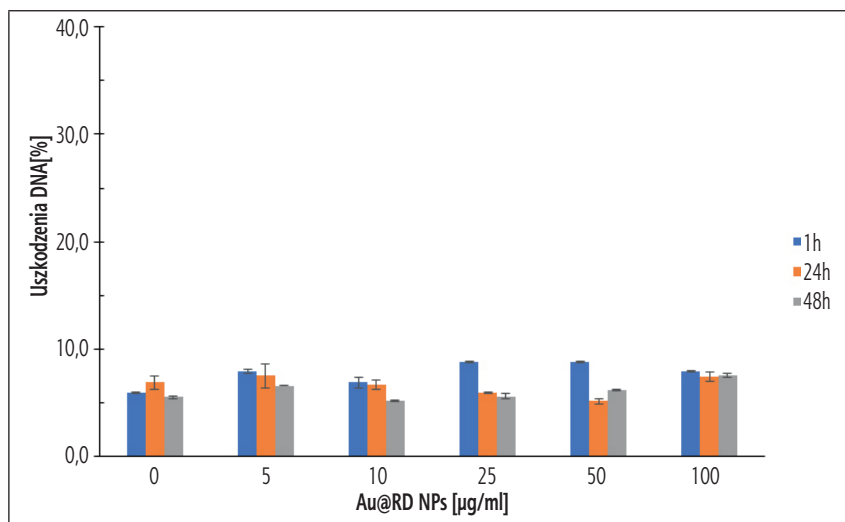
Rycina 6. Wpływ Au@RD NPs w zakresie stężeń 0–100 µg/ml na żywotność komórek HL60 po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji. \* – istotność statystyczna ( $p < 0,05$ ) w stosunku do kontroli (0)

Wykazano, że wraz ze wzrostem czasu inkubacji i stężenia Au@RD NPs zmniejsza się odsetek komórek żywych, co było szczególnie widoczne przy najwyższym zastosowanym stężeniu 100 µg/ml. Ponadto komórki białaczkowe HL60 wykazały większą wrażliwość na zastosowany

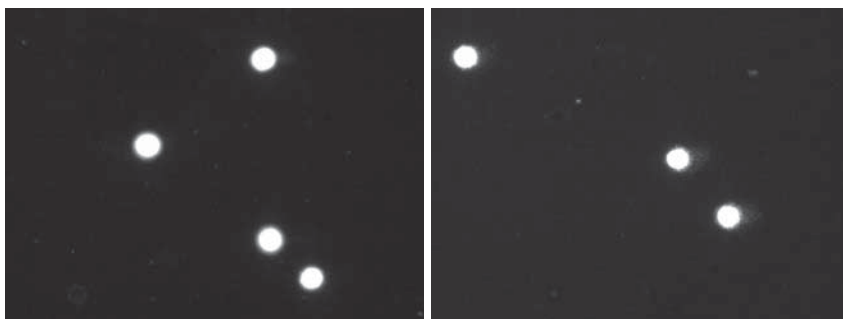
związek, co skutkowało obniżeniem odsetka komórek żywych o 35% przy najwyższym stężeniu po 72 godzinach inkubacji w porównaniu do komórek A549.

### Wpływ Au@RD NPs na uszkodzenia DNA w limfocytach

W limfocytach izolowanych od zdrowych dawców nie wykazano istotnych statystycznie uszkodzeń DNA w zakresie stosowanych stężeń 0–100  $\mu\text{g/ml}$  Au@RD NPs, nawet wydłużając czas inkubacji do 48 godzin. Wyniki przedstawiono na rycinach 7 oraz 8a i 8b.



Rycina 7. Wpływ Au@RD NPs na uszkodzenia DNA w limfocytach izolowanych od zdrowych dawców. Komórki inkubowano z Au@RD NPs w zakresie stężeń 0–100  $\mu\text{g/ml}$  przez 1, 24 i 48 godzin. Eksperyment powtórzono w trzech niezależnych doświadczeniach na komórkach izolowanych od 3 różnych dawców

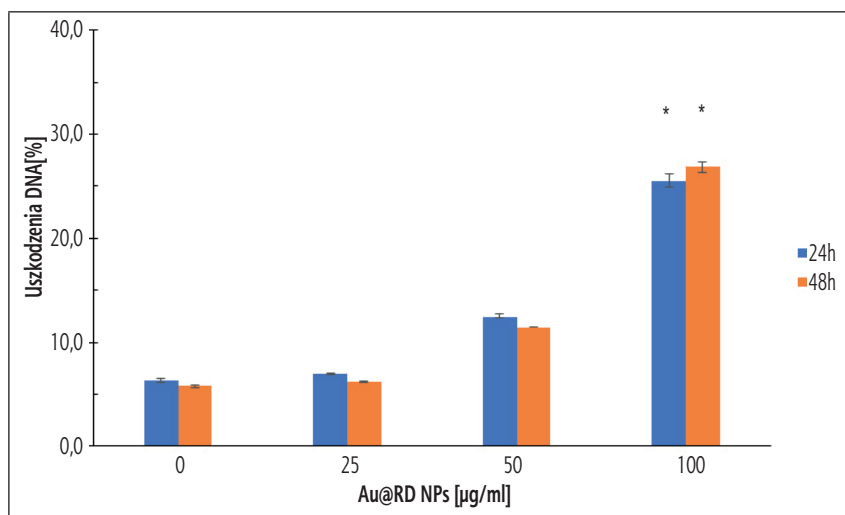


Rycina 8. Obraz z mikroskopu fluorescencyjnego (powiększenie 100x) przedstawiający: (8a) uszkodzenia DNA w limfocytach kontrolnych (nietraktowanych Au@RD NPs) oraz (8b) po 48 godzinach inkubacji z Au@RD NPs w stężeniu 100 µg/ml. Na obu rycinach brak charakterystycznego „ogona” komety odpowiadającego stopniowi uszkodzenia DNA w pojedynczej komórce

#### Wpływ Au@RD NPs na uszkodzenia DNA w komórkach A549 i HL60

Wykazano, że Au@RD NPs w zakresie stosowanych stężeń 0–100 µg/ml indukuje istotne statystycznie uszkodzenia DNA w sposób zależny od dawki i czasu inkubacji. Wyniki przestawiono na rycinach 9, 10a i 10b dla linii komórkowej A549 oraz na rycinach 11, 12a i 12b dla linii komórkowej HL60. Komórki białaczkowe HL60 wykazały większą wrażliwość na zastosowane nanocząstki złota z polifenolami róży w porównaniu do komórek raka płuc A549, co manifestowało się większym poziomem uszkodzeń DNA – 37% dla HL60 vs 26% dla A549.

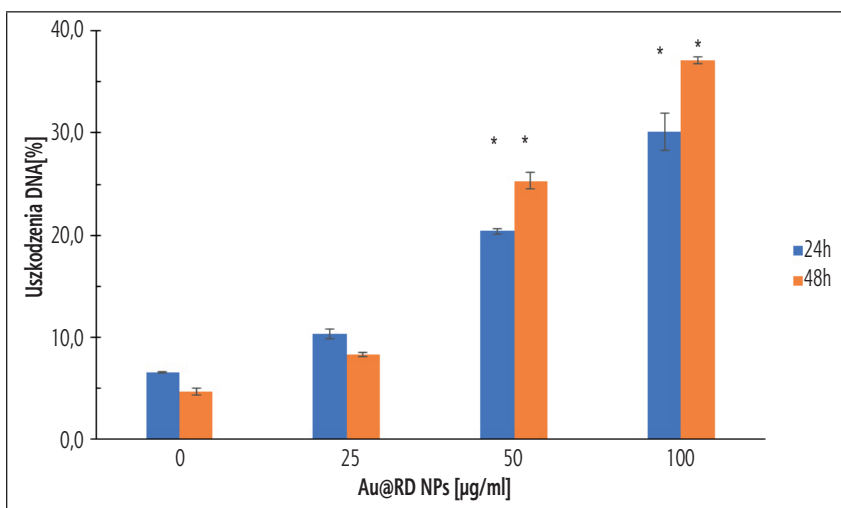




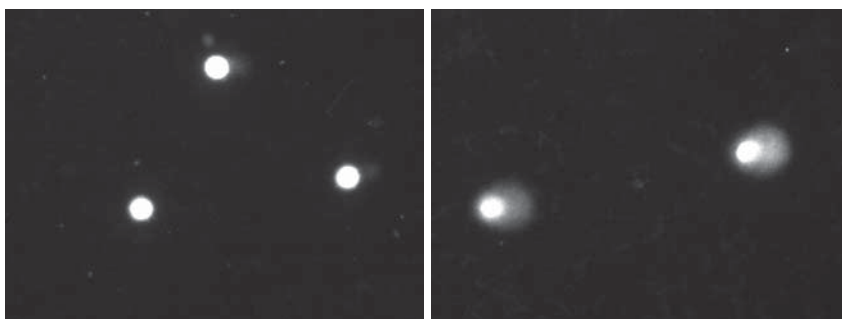
Rycina 9. Wpływ Au@RD NPs na uszkodzenia DNA w komórkach linii A549 po 24- i 48-godzinnej inkubacji z Au@RD NPs w zakresie stężeń 0–100 µg/ml. Wyniki reprezentują średnie wartości z trzech niezależnych eksperymentów. \* – oznaczono różnice istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ) względem próby kontrolnej (0)



Rycina 10. Obraz z mikroskopu fluorescencyjnego (powiększenie 100x) przedstawiający: (10a) uszkodzenia DNA w komórkach A549 kontrolnych (nietraktowanych Au@RD NPs) oraz (10b) po 48-godzinnej inkubacji z Au@RD NPs w stężeniu 100 µg/ml. Widoczny na obrazie charakterystyczny „ogon” komety odpowiada stopniowi uszkodzenia DNA w pojedynczej komórce



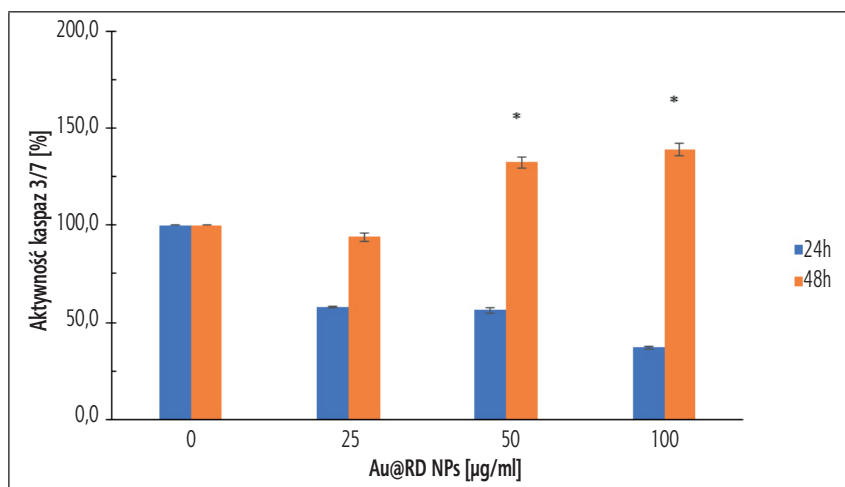
Rycina 11. Wpływ Au@RD NPs na uszkodzenia DNA w komórkach linii HL60 po 24- i 48-godzinnej inkubacji z Au@RD NPs w zakresie stężeń 0–100 µg/ml. Wyniki reprezentują średnie wartości z trzech niezależnych eksperymentów. \* – oznaczono różnice istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ) względem próby kontrolnej (0)



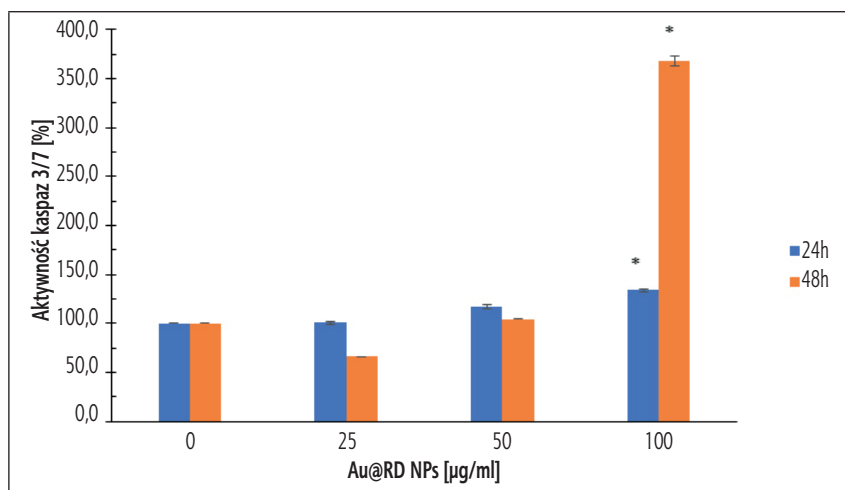
Rycina 12. Obraz z mikroskopu fluorescencyjnego (powiększenie 100x) przedstawiający: (12a) uszkodzenia DNA w komórkach HL60 kontrolnych (nietraktowanych Au@RD NPs) oraz (12b) po 48-godzinnej inkubacji z Au@RD NPs w stężeniu 100 µg/ml

### Apoptoza – aktywność kaspaz 3/7 oraz formowanie ciałek apoptotycznych

Wykazano, że 48-godzinna inkubacja komórek A549 z Au@RD NPs w stężeniach 50 i 100 µg/ml powoduje istotny statystycznie wzrost aktywności kaspaz efektorowych 3 i 7, które to kaspazy są decydującymi mediatorami procesu apoptozy. Wyniki przedstawiono na rycinie 13. Podobny, ale dużo silniejszy efekt zaobserwowano dla komórek białaczkowych HL60. Po 48 godzinach inkubacji ze 100 µg/ml Au@RD NPs aktywność kaspaz 3/7 wzrastała o ponad 250% w porównaniu do kontroli – wyniki przedstawiono na rycinie 14.

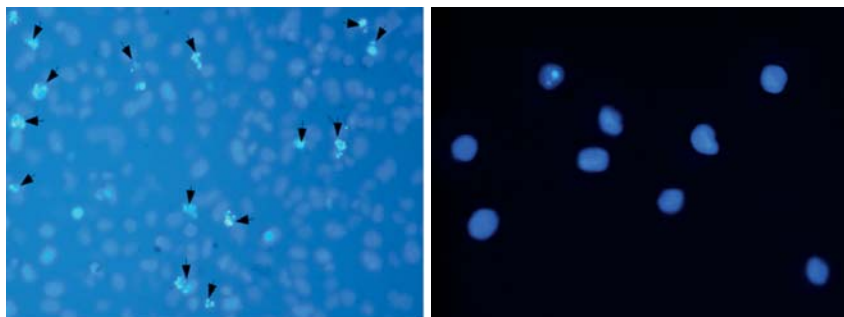


Rycina 13. Wpływ Au@RD NPs na aktywność kaspaz 3/7 w komórkach linii A549 po 24- i 48-godzinnej inkubacji z Au@RD NPs w zakresie stężeń 0–100 µg/ml. \* – różnice istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ) względem próby kontrolnej (0). Eksperymenty wykonano w trzech powtórzeniach a pomiary w duplikatach dla każdego punktu pomiarowego. Średnią wartość luminescencji dla każdego stężenia Au@RD NPs podzielono przez średnią wartość dla kontroli i przedstawiono jako % kontroli (kontrola traktowana jako 100%)



Rycina 14. Wpływ Au@RD NPs na aktywność kaspaz 3/7 w komórkach linii HL60 po 24- i 48-godzinnej inkubacji z Au@RD NPs w zakresie stężeń 0–100 µg/ml. \* – różnice istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ) względem próby kontrolnej (0). Eksperymenty wykonano w trzech powtórzeniach a pomiary w duplikatach dla każdego punktu pomiarowego. Średnią wartość luminescencji dla każdego stężenia Au@RD NPs podzielono przez średnią wartość dla kontroli i przedstawiono jako % kontroli (kontrola traktowana jako 100%)

Na poziomie morfologicznym również potwierdzono, że komórki nowotworowe A549 i HL60 po traktowaniu przez 48 godzin Au@RD NPs w stężeniu 100  $\mu\text{g/ml}$  weszły na drogę apoptozy. Zaobserwowano kondensację chromatyny i tworzenie ciałek apoptotycznych, które po zastosowaniu barwnika Hoechst 33342 wykazywały intensywną niebieską fluorescencję, co przedstawiono na rycinie 15a i 15b.



Rycina 15. Przykładowe zdjęcie (15a) komórek A549 oraz (15b) komórek HL60 wybarwionych Hoechst 33342. Strzałkami zaznaczono intensywnie świecące ciała apoptotyczne. Zdjęcie wykonano przy pomocy mikroskopu epifluorescencyjnego Olympus IX50 stosując powiększenie obiektywu 20x i używając aparatu fotograficznego Nikon D5000

## Dyskusja

W ostatnich latach coraz częściej poszukuje się nowych sposobów leczenia nowotworów. Oprócz standardowo stosowanych chemioterapii, hormonoterapii czy radioterapii, często skojarzonych ze składnikami aktywnymi pochodzącymi z roślin, stosuje się również terapię fototermiczną czy fotodynamiczną. Szczególnie dużym zainteresowaniem w zwalczaniu nowotworów cieszą się różnego rodzaju nanomateriały, w tym nanocząstki metali, np. złota.

Nanocząstki złota w porównaniu z innymi metalami charakteryzują się wyjątkowymi właściwościami fizycznymi, chemicznymi, biologicznymi [Fraga i wsp. 2013, Shah i wsp. 2014, Jeong i wsp. 2014]. Rozmiary nanocząstek, ich morfologia oraz sposób funkcjonalizacji powierzchni decydują w głównej mierze o ich szeroko pojętej aktywności i możliwościach aplikacyjnych, w tym diagnostycznych i terapeutycznych. Wysokie powinowactwo do komórek nowotworowych, łatwość modyfikacji

powierzchni oraz specjalne właściwości optyczne stwarzają podstawy do ich efektywnego wykorzystania jako wektorów do docelowej terapii przeciwnowotworowej [Shah i wsp. 2014, Jeong i wsp. 2014].

Obecnie coraz więcej uwagi poświęca się poszukiwaniu biokompatybilnych i biodegradowalnych nanomateriałów syntetyzowanych na bazie metabolitów roślinnych. Dlatego celem badań była ekologiczna i kontrolowana synteza nanocząstek złota z zastosowaniem ekstraktu z róży damasceńskiej. Synteza nanocząstek Au@RD została zrealizowana za pomocą prostej procedury opartej na redukcji kwasu tetrachlorozłotowego(III) wodnym roztworem ekstraktu z róży damasceńskiej. Tak otrzymane monodispersyjne nanocząstki złota posiadały rozmiar około 20 nm oraz były stabilne przez ponad rok w pH = 3,5. Przeprowadzona charakterystyka ekstraktu wykorzystywanego do syntezy wykazała dużą zawartość polifenoli ( $0,853 \pm 0,003$  mg/ml), flawonoidów ( $0,156 \pm 0,004$  mg/ml), cukrów redukujących ( $0,954 \pm 0,006$  mg/ml) oraz wysoką aktywność antyoksydacyjną ( $86,5 \pm 0,4\%$ ) [Kyzioł i wsp. 2021]. Również inne grupy badawcze stosowały ekstrakty roślinne w syntezie nanocząstek złota, np. Ghoreishi i wsp. [2019] stosując wyciąg z kwiatów róży damasceńskiej uzyskali nanocząstki złota o średnicy poniżej 20 nm. Ponadto Dubey i wsp. [2010] wykazali syntezę heksagonalnych nanocząstek Au ze średnią wielkością 11 nm przy zastosowaniu ekstraktu z liści *Rosa rugosa*. Przy pomocy ekstraktów roślinnych Nadagouda i wsp. [2014] uzyskali nanocząstki o rozmiarach od 20 do nawet 500 nm, w zależności od zastosowanego ekstraktu z jagód, jeżyn, granatów i kurkumy. Wskazuje to na zupełnie inny potencjał redukcji/stabilizacji ekstraktów pochodzących z różnych źródeł biologicznych. Wiadomo, że bogate w przeciwutleniające ekstrakty roślinne są zdolne do redukcji jonów metali i stabilizacji generowanych nanocząstek metalicznych. Jednak wciąż nie wskazano jednoznacznie, która grupa związków aktywnych pochodzenia roślinnego jest odpowiedzialna za te procesy i decydująco wpływa na rozmiary i kształty otrzymywanych nanocząstek. Choć wielu naukowców próbuje wyjaśnić mechanizm redukcji jonów metali z wykorzystaniem pojedynczych cząsteczek będących składnikami ekstraktów roślinnych, to wciąż mechanizm ten nie jest w pełni poznany. Warto jednak zauważyć, że zastosowana tzw. zielona synteza pozwala, aby powstałe nanocząstki z powłokami antyoksydacyjnymi (bogatymi także w wiele innych

makrocząsteczek pochodzących z ekstraktów roślinnych) mogły być potencjalnie stosowane w terapiach chemoprewencyjnych, dostarczających niezbędnych przeciwutleniaczy oraz/i związków o charakterze przeciwnowotworowym [Wang, Ding i wsp. 2016, Ma i wsp. 2017].

### Aktywność biologiczna *in vitro* Au@RD NPs

Nanocząstki złota są intensywnie badane w wielu dziedzinach biomedycznych, nie tylko jako indywidualne środki, ale także jako nośniki leków o doskonałej stabilności [Hu i wsp. 2016] i dużej biogodności (niska toksyczność i immunogenność) w szerokim zakresie ich rozmiarów (30–200 nm) [Woźniak i wsp. 2017, Sun i wsp. 2014]. Co ciekawe, ponieważ ich powierzchnię można łatwo sfunkcjonalizować za pomocą wielu cząsteczek, w tym chemioterapeutyków, oligonukleotydów czy białek, uzyskana w taki sposób aktywność może być całkowicie zmieniona. Na przykład nanocząstki złota modyfikowane kwercetyną, flawonoidem występującym w wielu różnych roślinach i składnikach diety człowieka, wykazywały selektywne działanie antyproliferacyjne i przeciwnowotworowe w stosunku do różnych ludzkich linii nowotworowych [Salehi i wsp. 2020]. To właśnie polifenole są prawdopodobnie jedną z najczęściej badanych klas związków naturalnych, ponieważ wykazują szerokie spektrum właściwości farmakologicznych, w tym działanie chemoprotekcyjne i chemioterapeutyczne [Kalim i wsp. 2010, Avtanski i Poretsky 2018, Mahboubi 2015, Begum i wsp. 2009].

W naszym przypadku oceniano aktywność cytotoksyczną nanocząstek Au@RD NPs *in vitro* wobec komórek prawidłowych – limfocytów krwi obwodowej, oraz względem dwóch linii komórek nowotworowych: ostrej białaczki promielocytowej (HL60) i ludzkiego gruczolakoraka płuc (A549). Nie wykazano aktywności cytotoksycznej względem komórek prawidłowych nawet po 24 godzinach inkubacji z Au@RD NPs w zakresie stężeń 0–100 µg/ml. Natomiast w przypadku komórek nowotworowych A549 i HL60 traktowanych tym samym zakresem stężeń Au@RD NPs przez 24, 48 i 72 godziny wykazano selektywną cytotoksyczność zależną od czasu inkubacji, stężenia i linii komórkowej. Spadek przeżywalności komórek A549 nie jest bardzo znaczący, np. po 72 godzinach przy najwyższym badanym stężeniu Au@RD NPs ich żywotność zmniejszyła się

o około 22%, podczas gdy żywotność komórek HL60 była wtedy zmniejszona o około 33%. Zatem można stwierdzić, że komórki ostrej białaczki są bardziej wrażliwe na Au@RD NPs niż komórki nowotworu płuc analizowane w ramach tego samego testu, stężenia i czasów inkubacji. Aby uzyskać lepszy wgląd w mechanizm cytotoksyczności indukowanej przez Au@RD NPs postawiono pytanie, czy nanocząstki złota z polifenolami róży powodują uszkodzenia DNA w badanych komórkach. W tym celu zastosowano test kometowy. W przypadku komórek prawidłowych nie zaobserwowano uszkodzeń DNA nawet po 48 godzinach inkubacji z 100  $\mu\text{g/ml}$  Au@RD NPs, podczas gdy uszkodzenia DNA wykazano w obu liniach nowotworowych. Określony poziom uszkodzenia DNA w ogonach komet był znacznie wyższy dla komórek HL60 niż dla komórek A549. W przypadku komórek A549 uszkodzenia DNA były widoczne po 24 godzinach przy wyższych stężeniach Au@RD NPs, ale nie wzrastały z czasem inkubacji. Co ważne, oznaczony poziom uszkodzeń DNA dla komórek HL60 był większy niż dla komórek A549 i rósł z czasem inkubacji, co daje zgodne wyniki z analizowaną przeżywalnością komórek. Różnica we wrażliwości komórek może być związana z różnicami w proporcji komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego lub różną aktywnością topoizomerazy II pomiędzy tymi liniami. Białko naprawy DNA – polimeraza 1 poli[adenozynodifosforanu (ADP)–rybozy] (PARP1) – ma tendencję do silnej ekspresji w nowotworach płuc, co może odpowiadać za mniejszą wrażliwość komórek niedrobnokomórkowego raka płuc na uszkodzenia DNA indukowane Au@RD w porównaniu do komórek białaczkowych. Badania przeprowadzone na obu liniach nowotworowych sugerują, że Au@RD NPs stosowane w wyższych dawkach (100  $\mu\text{g/ml}$ ) mogą w znaczny sposób przyczyniać się do eliminacji komórek nowotworowych, a jednocześnie nie generować cyto- i genotoksyczności wobec prawidłowych limfocytów krwi. Jest to o tyle ważne, że bardzo często chemioterapeutyki stosowane w tradycyjnym leczeniu nowotworów wykazują działania uboczne w stosunku do komórek prawidłowych, takie jak: mielosupresja, indukcja uszkodzeń DNA poprzez hamowanie topoizomerazy II czy generowanie wolnych rodników [Cierniak i wsp. 2018]. Zastosowane przez nas Au@RD NPs nie prowadzą do śmierci komórkowej i nie uszkadzają komórek prawidłowych, w szczególności tych tak ważnych z punktu widzenia odporności limfocytów.



Apoptoza jest kaskadą zdarzeń molekularnych prowadzących do eliminacji komórek. Sprzyja utrzymaniu ich stałej liczby w tkankach i narządach, a jednocześnie jest kluczowym procesem w eliminacji komórek nowotworowych. Podczas tego procesu dochodzi do kondensacji chromatyny, fragmentacji DNA oraz formowania ciałek apoptotycznych. Głównymi enzymami zaangażowanymi w proces apoptozy są kaspazy: inicjatorowe i wykonawcze. Kaspazy wykonawcze mogą aktywować inne proteazy, trawić docelowe białka (np. laminy jądrowe) oraz aktywować DNAzy powodując ich nieodwracalny rozpad [Sharifi i wsp. 2012, Sabella i wsp. 2014]. Dlatego oznaczenie aktywności kaspaz 3/7 jest jednym ze sposobów potwierdzenia, że komórka wchodzi na drogę apoptozy. Apoptozę można również potwierdzić wizualizując ciała apoptotyczne za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej. W naszych badaniach wykazaliśmy, że Au@RD NPs mogą kierować komórki nowotworowe na drogę apoptozy poprzez zwiększenie aktywności kaspaz efektorowych 3/7 o 38% dla komórek A549 i aż o 268% dla komórek HL60.

Apoptozę w komórkach nowotworowych indukują zarówno polifenole [Sharma i wsp. 2018, Abbaszadeh i wsp. 2020], w tym polifenole obecne w ekstraktach z róży damasceńskiej [Al-Oqail i wsp. 2021], jak i same nanocząstki złota [Sun i wsp. 2018]. Również wiele badań, w których otrzymano nanocząstki złota skoniugowane z polifenolami, np. kwercetyną [Balakrishnan i wsp. 2017], wykazuje, że takie biohybrydowe materiały indukują apoptozę w komórkach nowotworu piersi z resweratolem w komórkach nowotworu wątroby [Zhang, Zhang i wsp. 2019] lub z polifenoaliami z liści *Abutilon indicu* (rośliny z rodziny ślazowatych) w komórkach nowotworu jelita grubego [Mata i wsp. 2016].

Jak wynika z naszych badań oraz z doniesień innych naukowców, synteza nanocząstek złota z wykorzystaniem ekstraktów roślinnych jest obiecującą strategią w kierunku poszukiwania nowych sposobów leczenia nowotworów, łączącą dwa różne składniki o szerokim potencjale terapeutycznym – nanocząstki złota i ekstrakty roślinne. Podsumowując, wszystkie otrzymane przez nas wyniki dla komórek nowotworowych wskazują, że to komórki białaczkowe HL60 wydają się być docelowymi komórkami w dalszych badaniach nad terapeutycznym zastosowaniem Au@RD NPs wykazując większą wrażliwość na zastosowane nanocząstki.

## Wnioski

Wodny ekstrakt z róży damasceńskiej jest dobrym czynnikiem redukującym i stabilizującym, pozwalającym otrzymać stabilne i powierzchniowo sfunkcjonalizowane nanocząstki złota metodą ekologicznej, wydajnej i kontrolowanej syntezy. Otrzymane Au@RD NPs nie indukują cyto- i genotoksyczności w stosunku do komórek prawidłowych – limfocytów, jednocześnie wykazując selektywną cyto- i genotoksyczność względem dwóch badanych linii nowotworowych (rak płuca – A549 i białaczka, tj. HL60). Ponadto te hybrydowe nanomateriały są zdolne do indukowania apoptozy w komórkach nowotworowych. Wstępne wyniki aktualnie prowadzonych badań wypadają bardzo obiecująco, jednak wymagają dalszego potwierdzenia skuteczności i bezpieczeństwa stosowanych materiałów, tak wobec komórek prawidłowych, jak i nowotworowych.

## Podziękowania

Badania były finansowane przez Fundusz Badań Naukowych Krakowskiej Akademii im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego, projekt badawczy 26/2018 „Synteza nanocząstek złota z wykorzystaniem polifenoli roślinnych jako potencjalnych związków o charakterze przeciwnowotworowym”.