

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Kovács Patrik Bence

**Másodlagos epesavak szerepének vizsgálata emlő- és
hasnyálmirigy daganatokban**

DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2024

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Másodlagos epesavak szerepének vizsgálata emlő- és
hasnyálmirigy daganatokban**

Kovács Patrik Bence

Témavezető: Kapitányné Dr. Mikó Edit



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2024

TARTALOMJEGYZÉK

1. Rövidítések.....	5
2. Bevezetés.....	9
2.1. A mikrobiom szerepe a betegségek kialakulásában	9
3. Irodalmi áttekintés.....	11
3.1. A humán mikrobiom.....	11
3.2. Az emésztőrendszeri mikrobióta	11
3.3. Az emlődaganatok	13
3.3.1. Az emlődaganatok osztályozása.....	14
3.4. A hasnyálmirigy adenokarcinóma	15
3.5. Onkobiózis.....	17
3.5.1. Onkobiózis az emlődaganatokban.....	17
3.5.2. Onkobiózis a hasnyálmirigy daganatokban.....	18
3.6. A másodlagos epesavak.....	20
3.7. A tumoros sejtekre jellemző tulajdonságok.....	24
3.8. Antineoplasztikus hatások	26
3.8.1. Szabad gyökök, antioxidánsok	26
3.8.2. Oxidatív/nitrozatív stressz.....	28
3.8.3. Eiteliális-mezenhimális tranzíció	30
3.8.4. Daganatőssejtek.....	32
4. Célkitűzés	34
5. Anyagok és módszerek.....	35
5.1. Alkalmazott anyagok	35
5.2. Alkalmazott sejtvonalak	36
5.3. Sejtprolifерáció vizsgálat	36
5.4. SDS-PAGE és Western blot	37
5.4.1. Az alkalmazott NRF2 antitestek specificitásának a vizsgálata	38
5.5. Géncsendesítés.....	40
5.6. RNS izolálás, reverz transzkripció és RT-qPCR	40
5.7. Sejtinvázió vizsgálata	41
5.8. Lipidperoxidáció vizsgálata.....	43
5.9. Aldehyd-dehidrogenáz pozitivitás vizsgálat.....	44
5.10. Mitokondriális oxigénfogyasztás és az extracelluláris savasodási ráta meghatározása	44
5.11. Állatkísérletek.....	44
5.12. Teljes antioxidáns képesség meghatározása.....	45

5.13. Szöveti mikroarray és immunhisztokémia	46
5.14. <i>In silico</i> vizsgálatok	48
5.15. Statisztikai analízis	48
6. Eredmények.....	49
6.1. A litokólsav hatásai az emlőtumorsejtekre	49
6.1.1. A litokólsav antiproliferatív hatása az NRF2 gátlásán keresztül valósul meg ...	49
6.1.2. A litokólsav az NRF2 gátlásán keresztül oxidatív stresszt indukál, mely citosztázishoz vezet	51
6.1.3. A litokólsav hatásai humán emlődaganatsejtekben is kimutathatóak	54
6.1.4. Az elsődleges epesavak nem befolyásolják az emlődaganatsejtek proliferációját	56
6.1.5. A litokólsav okozta oxidatív stresszt a TGR5 és CAR receptorok közvetítik ...	56
6.1.6. Az LCA gátolta az antioxidáns védelmet az emlődaganat egérmodelljében	58
6.1.7. A litokólsav által kiváltott daganatellenes útvonal elemei korrelációt mutattak a betegség stádiumával, grádusával és a receptor státusszal.....	60
6.2. A dezoxikólsav hatása hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekre.....	68
6.2.1. A dezoxikólsav csökkenti az EMT folyamatban szerepet játszó gének expresszióját és a sejtek inváziós képességét.....	68
6.2.2. A dezoxikólsav oxidatív-nitrozatív stresszt indukál a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben	70
6.2.3. A dezoxikólsav emeli a mitokondriális aktivitást a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben	71
6.2.4. A dezoxikólsav csökkenti az összejszerúséget	72
7. Megbeszélés	74
7.1. A litokólsav szerepe emlődaganatokban	75
7.2. A dezoxikólsav szerepe hasnyálmirigy daganatokban	79
8. Összefoglalás.....	82
9. Summary	83
10. Irodalomjegyzék.....	84
11. Tárgyszavak	103
12. Köszönetnyilvánítás	104
13. Publikációs lista.....	105
14. Függelék.....	107

1. RÖVIDÍTÉSEK

bai operon	epesav indukálható operon
4HNE	4-hidroxinonenál
ABTS	2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolin)-6-szulfon sav
BCA	bikinolinil-dikarbonsav
BRCA1/2	emlőrák 1/2 gén
BSH	epesav-hidroláz
CA	kólsav
CAR	konstitutív androsztán receptor
CAT	kataláz
CDCA	kenodezoxikólsav
CDKN2A	ciklin dependens kináz inhibitor 2A
CSC	daganatössejt
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DCA	dezoxikólsav
DNS	dezoxiribonukleinsav
ECAR	extracelluláris savasodási ráta
ECM	extracelluláris mátrix
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EGF	epidermális növekedési faktor
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor
EMT	epiteliális-mezenchimális tranzíció
ER	ösztrogén receptor
FBS	hőinaktivált főtális marhaszérum
FOLFIRINOX	Folinsav-Fluorouracil-Irinotecan-Oxaliplatin
FOLFOX	Folinsav acid-Fluorouracil–Oxaliplatin
FXR	farnezoid X receptor
GCLC	glutamát-cisztein ligáz katalitikus alegység
GPX2-3	glutation-peroxidáz 2-3
GR	glutation-reduktáz
GSH	redukált glutation
GSSG	glutation diszulfid

H ₂ O ₂	hidrogén-peroxid
HER2	humán epidermális növekedési faktor receptor
HMOX1	hemoxigenáz 1
HR	veszélyességi arány
HSDH	hidroxiszteroid-dehidrogenáz
iNOS	indukálható nitrogén-monoxid szintáz
KEAP1	Kelch-like ECH-associated protein 1
KRAS	Kirsten rat sarcoma vírus gén
LCA	litokólsav
LPS	lipopoliszacharid
LXR	máj X receptor
MD	patogén mentes
MDA	malondialdehid
MET	mezenchimális-epiteliális tranzíció
mTOR	mammalian target of rapamycin
Na ₃ VO ₄	nátrium-vanadát
NAC	N-acetil-cisztein
NaF	nátrium-fluorid
NF-κB	nukleáris faktor kappa-B
nNOS	neuronális nitrogén-monoxid szintáz
NO	nitrogén-monoxid
NOS	reaktív nitrogén intermedierek
NOX4	NADPH oxidáz 4
NQO1	NAD(P)H kinon-dehidrogenáz 1
NRF2	nuclear factor, erythroid 2-like 2
O ₂ ^{•-}	szuperoxid anion
OCR	oxigénfogyasztási ráta
OH•	hidroxil gyök
ONOO ⁻	peroxinitrit
ORF	nyitott olvasási keret
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PBS	foszfát-puffer oldat
PDAC	hasnyálmirigy duktális adenokarcinóma
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid

PR	progeszteron receptor
PXR	pregnán X receptor
qPCR	kvantitatív polimeráz láncreakció
Rb	retinoblasztóma
RNI	reaktív nitrogén intermedier
RNS	ribonukleinsav
ROS	reaktív oxigén formák
RT	reverz transzkripció
SDF-1	sztrómasejt eredetű faktor-1
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SLUG	snail család transzkripció represszor-2
SMAD4	SMAD Family Member 4
SNAIL	snail család transzkripció represszor-1
SOD1-3	szuperoxid-dizmutáz 1-3
SPF	specifikus patogén mentes környezet
SRB	szulforodamin B
TAAR	trace-amin kapcsolt receptorok
TBA	tiobarbitursav
TBARS	tiobarbitursav-reaktív termékek
tBHQ	terc-butilhidrokinon
TBS	tris puffereelt sóoldat
TCA	triklór-ecetsav
TGF- β	transzformáló növekedési faktor- β
TGR5	Takeda G-fehérje kapcsolt receptor
TLR	Toll-like receptor
TMA	szöveti mikroarray
TNBC	tripla negatív emlődaganat
TNM	Tumor-Nódus-Metasztázis
TWIST1	twist család BHLH transzkripció faktor-1
UDCA	urzodezoxikólsav
VDR	vitamin D receptor
VEGF-A	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
WHO	Egészségügyi Világszervezet
WNT	wingless jelátviteli út vonal

WNT5B

ZEB1

β -CATENIN

Wnt family 5B

cink-ujj E-box kötő homeobox-1

catenin beta-1

2. BEVEZETÉS

Az emberi test külső felületét, valamint a nyálkahártyákkal borított belső felszíneit számos szimbióta, kommenzalista és patogén mikroorganizmus kolonizálja [1]. A vírusok, gombák és baktériumok alkotta rendszert humán mikrobióta néven ismerjük, valamint ezen mikroorganizmusok kollektív genomját humán mikrobiomnak hívjuk [2]. A humán mikrobióta jelenléte és diverzitása elengedhetetlen a szervezet egészségének megőrzéséhez és a homeosztázis fenntartásához. A mikrobióta összetétele nem állandó. A születéstől kezdődően a kor előrehaladtával folyamatosan érik és változik [3]. A gasztrointesztinális régió az egyik legnagyobb mértékben kolonizált szakasz a szervezetben. A bél mikrobiomja döntő szerepet játszik az immunválaszban, a viselkedésben, a kardiovaszkuláris funkciókban, az anyagcsere-útvonalakban, a központi idegrendszer működésében, valamint szabályozza az endokrin funkciókat és védelmet nyújt a kórokozók túlszaporodásával szemben [4].

2.1. A mikrobiom szerepe a betegségek kialakulásában

Mivel a mikrobiom nagyon változatos funkcióval bír, nem meglepő, hogy a betegségek széles skálájával hozzák összefüggésbe. A mikrobiom összetételében bekövetkező egyensúlyvesztést diszbiózisnak nevezzük. A legújabb tanulmányok rávilágítanak arra, hogy a mikrobiom összetételének vagy arányának a megváltozása és bizonyos bakteriális metabolitok mennyiségének a módosulása patofiziológiai folyamatok széles körét befolyásolja, az anyagcserezavarokon át a pszichiátriai betegségekig [5–7]. A daganatos kórképekkel társuló diszbiózist onkobiózis néven ismerjük. Ma már tudjuk, hogy az onkobiózis a daganatokra jellemző folyamatok támogatásával a bélben [8], húgyutakban és prosztatában [9], tüdőben [10], hasnyálmirigyben [11], gégében [12], bőrön [13], méhnyakban [14], és emlőben [15] is segítheti a tumorprogressziót. Bár a fent említett daganatos megbetegedések többsége a mikrobákkal közvetlenül érintkező szerveket érinti, a legújabb adatok arra utalnak, hogy a baktériumok a mikrobiomtól távoli szervekre is hatással lehetnek a mikrobiális metabolitokon keresztül. A mikrobiom által termelt metabolitok felszívódhatnak, így bekerülhetnek a szisztémás keringésbe, és biológiai hatásukat a szervezet távoli helyein is képesek kifejteni [16–21]. A mikrobiom összetételében bekövetkező változások összefüggésbe hozhatóak olyan anyagcsere-betegségekkel (II.-es típusú cukorbetegség, elhízás) [22], amelyek bizonyos daganattípusok, köztük az emlőrák kockázati tényezői [23,24], ami tovább erősíti a bakteriális

metabolitok jelentőségét. A másodlagos epesavak [18,25], a rövid szénláncú zsírsavak [26], a kadaverin [15] az ösztrogén-származékok [27], valamint a triptofán eredetű metabolitok, mint az indolpropánsav [20] és az indoxil szulfát [21], bizonyítottan citosztatikus hatást gyakorolnak az emlődaganatokra, de azok a molekuláris mechanizmusok, amelyeken keresztül a bakteriális metabolitok kifejtik hatásukat, nagyrészt ismeretlenek.

A disszertációm alapjául szolgáló közleményekben a másodlagos epesavak, mint bakteriális metabolitok szerepét tanulmányoztuk az emlő- és hasnyálmirigy daganatok patológiájában.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A humán mikrobiom

Minden élőlényben mikroorganizmusok komplex közösségei élnek, amelyek nélkülözhetetlenek a gazdaszervezet homeosztázisának a megőrzéséhez [28]. A baktériumok, gombák, protozoák és vírusok, valamint ezek kollektív genomjai alkotják a humán mikrobiomot [29,30]. A mikrobiom a gazdaszervezet élete során jelentős és dinamikus változásoknak van kitéve, amelyre számos tényező, többek között az életmód, az étrend, a környezeti behatások, a betegségek, az orvosi beavatkozások, a gyógyszerek szedése, a genetikai háttérünk és az immunrendszerünk mindennapi működése mind hatással vannak [31,32].

3.2. Az emésztőrendszeri mikrobióta

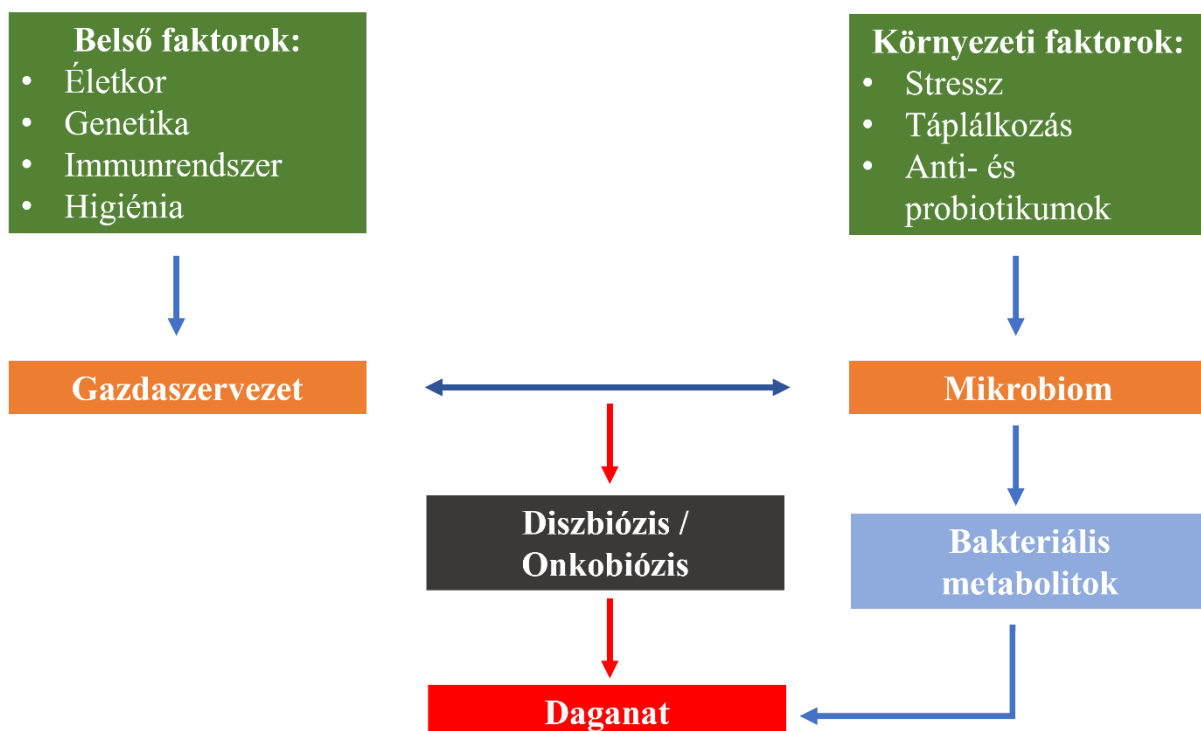
Az embereknél a bélmikrobióta tartalmazza a legnagyobb mennyiségű mikroorganizmust és a legnagyobb fajszámot a test más részeihez viszonyítva. Több ezer mikroorganizmusból, köztük baktériumokból, vírusokból és néhány eukariótából áll, amelyek közvetlenül a születés után kolonizálják az emésztőrendszert [33,34]. A gasztrointesztinális rendszerben előforduló mikrobióta a teljes mikrobiom 90%-át teszi ki, az itt található baktériumok száma elérheti a 10^{14} -et [35]. Ezt megerősíti egy másik tanulmány, mely során egészséges emberi székletet vizsgálva, több mint 9,9 millió különböző bakteriális gént azonosítottak sikeresen [36]. A gasztrointesztinális szakaszon leggyakrabban előforduló baktériumok 90%-a a *Bacteroides* és *Firmicutes* törzsekhez tartoznak, de emellett kisebb mennyiségben jelen vannak még az *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Lentisphaerae*, *Proteobacteria*, *Tenericutes* és *Verrucomicrobia* törzsek is [37]. A leggyakrabban előforduló nemzetségek pedig a *Alistipes*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, *Lactobacillus*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, és *Streptomyces* nemzetségek [38,39].

A gasztrointesztinális mikrobióta számos jelentős funkcióval rendelkezik az emberi szervezetben [40]. Nagy szerepet játszik a gazdaszervezet homeosztázisának kialakításában. Aktív szerepet játszik a felvett táplálék emésztésében és a felszívódásában, befolyásolja a

szervezet energiafelhasználását és tárolását [41,42]. A mikrobiom szabályozza az immunsejtek érési folyamatát [43], valamint különböző antimikrobiális anyagok termelésével véd a patogén mikroorganizmusoktól és gátolja az allergiás reakciók kialakulását [44]. A bélflóra metabolikus aktivitása révén segít különböző vitaminok és enzimek előállításában [45]. Működése során számos ingerület átvivő anyagot termel, amelyek befolyásolják az agy-bél kommunikációt és ezáltal a gazdaszervezet mentális és neurológiai funkcióit [46].

A mikrobiom segíti az epesavak és a szterolok kialakulását, így szabályozva a zsírok emésztését és a koleszterinszintet a szervezetben [47]. Összefoglalva a bél mikrobióta nagy szerepet játszik a szervezeten belül zajló folyamatok szabályozásában, valamint a normál bélfiziológia és egészség fenntartásában [40] (1. ábra).

A gasztrointesztinális szakaszon elhelyezkedő mikrobióta összetételét és működését számos tényező befolyásolja. Ilyen például az életkor, a gazdaszervezet genetikai háttere, a mindennapi stressz, a személyes higiénia, a táplálkozás minősége és a pro- és antibiotikumok alkalmazása. A bélmikrobióta-populáció zavara számos humán fertőzéssel, például gyulladós bélbetegségekkel [48], elhízással és cukorbetegséggel [49], allergiával [50], autoimmun betegségekkel [51], illetve szív- és érrendszeri betegségekkel [52] hozható összefüggésbe.



1. ábra A gazdaszervezt és mikrobiom közötti kapcsolat

A gazdaszervezet és a mikrobiom kölcsönösen képesek befolyásolni egymás állapotát. A különböző külső és belső tényezők hatással vannak a mikrobiom összetételére és működésére. A mikrobiom összetételében bekövetkező egyensúlyvesztést diszbiózisnak, a tumoros transzformációval járó változást pedig onkobiózisnak nevezzük. A

mikrobiom működése során termelődő mikrobiális metabolitok képesek befolyásolni a tumorsejtek tulajdonságait [53].

3.3. Az emlődaganatok

Az emlődaganat a világon a harmadik leggyakoribb daganattípus, nők körében pedig az első helyen áll a daganatos megbetegedések között [54]. Az emlődaganatok kialakulásának száma nagyfokú eltérést mutat a különböző geográfiai és gazdasági régiókban. Megfigyelhető, hogy a fejlett országokban magasabb a betegség incidenciája [55]. Az emlőrák becsült, életkorral korrigált éves incidenciája Európában 2012-ben 94,2 volt 100.000 lakosra vetítve, amelyhez 23,1 halálozás/100.000 fő életkorral korrigált éves halálozási arány társult [56]. Az Amerikai Egyesült Államokban az újonnan diagnosztizált invazív emlőrákos esetek számát 268.000-re, míg az újonnan diagnosztizált *in situ* esetek számát 62.930-ra becsülik. Ezekből az esetekből a statisztikai mutatók becslése szerint várhatóan 41.760 nő fogja életét veszíteni az emlők daganatos megbetegedése miatt [57]. Az American Cancer Society 2022-es közleménye szerint a 2010 és 2019 közötti időszakban az emlőrakkal diagnosztizált betegek száma évente 0,5%-kal emelkedett [58]. A Magyar Nemzeti Rákregiszter adatai alapján 2019-ben Magyarországon 8250 új emlődaganatos megbetegedést regisztráltak [59]. Az emelkedő incidencia ellenére az emlődaganathoz köthető halálozások száma azonban csökkenő tendenciát mutat. A fejlett országokban az egyre terjedő és modernebb szűrőprogramoknak, az egyre fejlettebb orvosi-, sebészeti-, és radiológiai eljárásoknak, valamint az egyre korszerűbb molekuláris biológiai technikáknak köszönhetően az emlőrák öt éves túlélési aránya 80% feletti számot mutat [60].

Az emlődaganatok kialakulásának számos kockázati tényezőjét leírták már eddig, ennek ellenére az újonnan diagnosztizált nők többségénél nem figyelhető meg nyilvánvaló kockázati tényező [61]. Kialakulásának elsődleges kockázati tényezőjeként az életkort tartjuk számon, mivel a menopauza beállta után ugrásszerűen megnő az emlődaganattal diagnosztizált nők száma [61]. A hormonpótló terápiák, a hormontartalmú fogamzásgátlók fogyasztása a korai menarche, illetve a késői menopauza révén meghosszabbodott női hormonterhelés szintén növelik az emlőrák kockázatát [62], de a sűrű emlőállomány is növeli a daganat kialakulásának az esélyét [63]. A familiárisan veszélyeztetett személyek esetében gyakori a BRCA1, BRCA2 gének mutációja [64], illetve az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) és a humán epidermális növekedési faktor receptor (HER2) fokozott kifejeződése [62].

Az emlőrák kezelési lehetőségei közé tartoznak a sebészeti eljárások, a kemoterápia, a célzott terápia, az endokrin- és a sugárterápia [54]. Az emlőrák kialakulásának az esélye

csökkenthető az általános állapot javításával, a rendszeres testmozgás bevezetésével, a megfelelő táplálkozással, illetve a dohányzás és alkoholfogyasztás elkerülésével [65].

3.3.1. Az emlődaganatok osztályozása

A daganatok nem egyedi sejtekből álló sejthalmazok, hanem egy összetett, komplex rendszert alkotnak [66]. Éppen ezért a megfelelő besorolásuk és osztályozásuk elengedhetetlen, a megfelelő terápiás módszer kiválasztásához. Az emlődaganatok esetében különféle osztályozási rendszerek alakultak ki: a szövettani típus, Nottingham-grádus, TNM státusz és a receptor státusz meghatározása nagy jelentőséggel bír.

Szövettani eredet

A szövettani eredet a daganatsejtek differenciáltsági fokáról ad információt. Az emlő rosszindulatú daganatai az eredési helyük alapján két nagy csoportra oszthatóak: a mezenchima eredetű szarkómák és a hám eredetű karcinómák. Az emlődaganatok esetében a leggyakoribbak a hám eredetű duktális vagy lobuláris karcinómák. A duktális karcinómák az emlőmirigyek kivezető csöveinek a hám régiójából indulnak, míg a lobuláris típus az emlőmirigyek állományából ered. Továbbá különbséget teszünk a duktuszokon belül megmaradó *in situ*, és a bazális membránon áttörő invazív típus között [67].

Nottingham-grádus

A szövettani fokozat megállapítására a Nottingham-grádus alkalmazható. Ez a rendszer figyelembe veszi a tubulus formálási tendenciát, a nukleáris pleomorfizmust, a mitotikus aktivitást (mitózis index), valamint a tumor filtrációját a nyirokerekbe és az érbe történő inváziót. A rendszer három grádust tesz elkülöníthetővé.

- Az 1-es grádusú tumorok általában jól differenciált, kedvező prognózisú daganatok. Főbb jellemzőik: jelentős mértékű mirigyképződés, alacsony fokú osztódás és kisebb, viszonylag szabályos sejtmagok.
- A 2-es grádusú tumorok vegyes tulajdonságokat mutatnak, közepesen differenciáltak és mérsékelt mitotikus ráta jellemző rájuk.
- A 3-as grádusú tumorok erősen invazív és áttétképzésre hajlamos daganatok, amelyek rosszul differenciáltak és gyors növekedést mutató pleomorfikus tumorsejtekből állnak [68].

TNM rendszer

A Tumor-Nódus-Metasztázis (TNM) rendszer a primer tumor mérete, a környékbeli nyirokcsomók érintettsége és a kialakult áttétek száma alapján osztályozza a tumorokat [69]. Öt csoport különíthető el.

- A 0-ás csoportnál nincsen tumor vagy az *in situ* karcinómát jelenti.
- Az 1-es, 2-es és 3-as csoportok a primer tumor mérete alapján és a nyirokcsomók infiltráltsága alapján kerülnek besorolásra. További jellemző, hogy nem figyelhető meg áttét.
- A 4-es csoportba tartozó tumoroknál már metasztázis is megfigyelhető. A legrosszabb prognózissal a 4-es csoport jellemezhető [70].

Immunhisztokémiai besorolás

Az emlődaganatok osztályozhatóak a tumorsejtek felszínén kifejezett hormon receptorok alapján. Ezek a receptorok kulcsfontosságúak a betegség prognózisához, valamint a megfelelő terápiás módszer kiválasztásához, mivel ezek a receptorok terápiás célpontként szolgálhatnak. Három receptort különböztetünk meg: ösztrogén receptor (ER), progeszteron receptor (PR), valamint a humán epidermális növekedési faktor receptor 2 (HER2). Az ER+ és PR+ daganatok általánosságban jobb kimenetellel rendelkeznek, míg a HER2-t kifejező daganatok rosszabb prognózissal jellemezhetőek [71]. A tripla negatív emlő daganatok (TNBC; ER-, PR-, HER2-) célzott kezelések híján szintén rossz prognózissal jellemezhetőek [71]. Az emlőtumorkok immunfenotípusuk alapján a következő molekuláris altípusokba sorolhatóak [72]:

- Luminális A: ER+, PR+, HER2-, alacsony proliferációs aktivitás
- Luminális B (HER2 -): ER+, PR-, HER2-, magas proliferációs aktivitás
- Luminális B (HER2+): ER+, PR+, HER2+, alacsony/magas proliferációs aktivitás
- HER2+: ER- vagy PR-, HER2+
- Tripla negatív (TNBC): ER-, PR-, HER2-, gyakori a BRCA1 génmutáció

3.4. A hasnyálmirigy adenokarcinóma

A hasnyálmirigy rosszindulatú daganatai az emésztőszervi malignus tumorok több mint 10%-át teszik ki. A hasnyálmirigy duktális adenokarcinóma (PDAC) a korai diagnózis hiánya, valamint a kemoterápiás kezelésekkel szembeni nagyfokú rezisztencia miatt rendkívül

agresszív és magas mortalitási rátával jellemezhető. A PDAC esetében a betegek ötéves túlélési esélye kevesebb mint 5% [73]. Világszerte 2018-ban 458.918 esetet jelentettek és 432.242 haláleset volt a PDAC-hoz köthető [74]. A PDAC a hasnyálmirigy daganatos megbetegedéseinek leggyakoribb típusa, amely a hasnyálmirigy exokrin állományában alakul ki és a hasnyálmirigyrákos esetek több mint 90%-át teszi ki [75].

A PDAC kialakulása bonyolult és multifaktoriális jellege miatt rossz prognózissal jár. A PDAC kialakulása szempontjából számos rizikófaktor ismert, amelyek képesek emelni a kialakulás esélyét. Ilyen kockázati tényező a kor, a dohányzás, az alkoholizmus, az elhízottság és a krónikus hasnyálmirigy gyulladás [76].

Tovább nehezíti a helyzetet, hogy a korai felismerési módszerek nem megfelelőek és a tünetek csak késői stádiumban jelentkeznek, így a diagnosztizálás csak akkor történik meg amikor a betegség már előrehaladott és távoli áttétek alakultak ki [77].

A PDAC kezelésének lehetőségei közé tartozik a daganatok sebészeti úton való eltávolítása, de ez csak a betegek 10-15%-a esetében lehetséges, mivel a PDAC gyakran a vérerek körül növekszik. Azonban a neoadjuváns terápiák alkalmazása csökkentheti a tumor méretét, lehetővé téve a tumor sebészeti kimetszését [78]. A PDAC kemoterápiás kezelési módjai közé tartoznak a nukleozid-analógok (gemcitabine, capecitabine), antimetabolitok (5-fluorouracil), topoizomeráz-gátlók (irinotecan) és platinavegyületeket (oxaliplatin) alkalmazása [79]. Továbbá kombinatorikus kemoterápia során alkalmazhatóak a FOLFIRINOX (Folinic Acid-Fluorouracil-Irinotecan-Oxaliplatin) és FOLFOX (Folinic Acid-Fluorouracil–Oxaliplatin) kezelések [79].

A PDAC kezelésének nehézségei mind genetikai, mind sejtszinten jelentkeznek. A hasnyálmirigy daganatokban a mutációs változások mértéke géinstabilitást generál, amely a jelek szerint fontos szerepet játszik a tumor növekedésében és a kezelésekkal szembeni rezisztenciában. Bár a PDAC mögöttes biológiája még nem teljesen tisztázott, úgy tűnik, hogy bizonyos gének, például a Kirsten rat sarcoma vírus gén (KRAS), ciklin-dependens kináz inhibitor 2A (CDKN2A/p16), p53 fehérje és SMAD Family Member 4 (SMAD4) gének kulcsfontosságú mutációi és a downstream jelátviteli útvonalak egyidejű aktiválása alapvető szerepet játszik a kezelésekkal szembeni rezisztenciában [80].

3.5. Onkobiózis

A daganatos betegségekre jellemző, megváltozott összetételű mikrobiomot onkobiomnak nevezünk [81,82]. Hanahan és Weinberg alkotta meg a „Hallmarks of Cancer” kifejezést, amely az onkogenezist irányító és a daganatos sejtek korlátlan szaporodását segítő biológiai folyamatok összességére utal [66]. Az onkobiom közvetlenül vagy közvetetten, de szerepet játszik ezen biológiai folyamatok kialakításában és szabályozásában [78]. Az onkobiom részt vesz az immunfolyamatok elkerülésében, a daganatot elősegítő gyulladás fokozásában, az invázió fokozásában, a metasztázisok kialakításában, az angiogenezis indukálásában, a genom instabilitásának és mutációinak indukálásában, valamint a sejtek energetikájának deregulálásában [78].

A tartós gyulladás és az ebből következő oxidatív stressz DNS-károsodáshoz és genomi instabilitáshoz vezethet, amelyek a mutációk felhalmozódásának, majd a rákos átalakulásnak a kockázati tényezői [83]. A diszbiotikus mikrobiom helyi gyulladás kialakulását okozhatja és ezért a karcinogenezis, köztük a hasnyálmirigy adenokarcinóma kialakulásának egyik hajtóereje lehet [84]. Ezzel ellentétben a fokozott oxidatív stressz bizonyos malignus daganatokban, például emlőrákban, citosztatikus hatású lehet [19].

Számos esetben bizonyították, hogy az onkobiotikus transzformáció támogathatja a daganatsejtek proliferációját, az invázió fokozódását, a metasztázisok kialakulását, illetve a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor expressziójának a fokozásával támogatja a tumor vaszkularizációját. A napjainkig közzétett tanulmányok azt mutatják, hogy ezek a folyamatok az onkobiózis és az onkobiotikus bakteriális metabolitok fő célpontjai. A bakteriális metabolitok módosíthatják a daganatos sejtek redox állapotát, valamint a daganatos sejtek anyagcsere folyamatait. Ezek a folyamatok a citosztázisban, az epiteliális-mezenchimális átmenet átprogramozásában csúcsosodnak ki, ami a rákos őssejtek csökkenéséhez vezet [16–19,78].

3.5.1. Onkobiózis az emlődaganatokban

Az onkobiom lehetséges patológiai szerepét az emlőrákban először 1971-ben említették [85] és az onkobiomot ma már a tumoros mikro környezet összetevőjének tekintik [86]. Az emlőrák során több mikrobiális kompartment is onkobiotikus átalakuláson megy keresztül, beleértve az emlőszövetet [87], a tejszatórnákat [88], az emlőkarcinóma inherens mikrobiomját [89], a gasztrointesztinális rendszert [90–93], valamint a húgyutak mikrobiomját [94]. Az

emlődaganattal diagnosztizált betegek esetében a mikrobiom diverzitásbeli csökkenését figyelték meg [93]. További kockázati tényező az antibiotikum túladagolás, amely alacsonyabb diverzitás kialakulásához vezet és ezáltal növeli az emlőrák kialakulásának a kockázatát [95], míg a probiotikumok a diverzitást növelő hatásuk révén csökkenthetik a daganat kialakulásának esélyét [96]. Emlődaganatos betegek esetében jellegzetes változásokat figyeltek meg a mikrobiomban az eltérő klinikai stádiumokba és a grádusokba sorolt, valamint az eltérő receptor státusszal jellemezhető betegek között [97,98].

A mikrobiom által szintetizált bioaktív metabolitok hormonszerű hatásokat fejthetnek ki és általuk kapcsolat alakulhat ki a mikrobiom és a távolabb elhelyezkedő daganatos sejtek között [16–19,78,99–101]. Mivel a gasztrointesztinális szakasz a baktériumok számát tekintve a legnagyobb a szervezetben, ezáltal a metabolikus kapacitása is jelentős. Az onkobiom bioszintetikus kapacitása a normál mikrobiomhoz képest leregulálódik [102].

Kutatások során bizonyították, hogy a másodlagos epesavak [17–19], a kadaverin [16], az indoxil szulfát [21], az indolpropánsav [20], és a rövidszénláncú zsírsavak [78] mind olyan bioaktív bakteriális metabolitok, amelyek képesek modulálni az emlődaganatok viselkedését. Az onkobiom hozzájárulhat a Warburg-anyagcsere indukciójához a tumorsejtekben [18] ezáltal támogatva az EMT folyamatát [103], a migrációt és inváziót [16], az ALDH1-pozitív rákos őssejtek növekedését [20], valamint a tumorimmunitás elnyomását [104]. Ezek a folyamatok együttesen támogatják az áttétképződést és a betegség kiújulását emlődaganatos betegekben [105].

3.5.2. Onkobiózis a hasnyálmirigy daganatokban

A hasnyálmirigy közeli anatómiai elhelyezkedése a gyomor-bél traktushoz támogatja a bél és a hasnyálmirigy közötti kétirányú kommunikációt, amelyet gyakran bél-hasnyálmirigy tengelynek neveznek. A mikrobiom és a hasnyálmirigy adenokarcinóma közötti kapcsolatra először az a felfedezés utalt, melyben a hasnyálmirigy-gyulladást összefüggésbe hozták a *Helicobacter pylori* kolonizációval [106]. Ezután több tanulmány bizonyította a gasztrointesztinális régió [107], a szájüreg [108], a hasnyálmirigy [109], valamint a széklet mikrobiomja [110] és a hasnyálmirigy daganatok közötti kapcsolatot. Továbbá egyes baktériumfajok szoros összefüggést mutattak a hasnyálmirigy adenokarcinómával. A *Porphyromonas gingivalis*, a *Helicobacter pylori*, az *Enterobacter*, az *Enterococcus*, a

Fusobacteria és az *E. coli* mennyisége növekedett hasnyálmirigy adenokarcinómás betegek esetében [78].

Az orális és bélrendszeri mikrobák transzlokálódhatnak és kolonizálhatják a hasnyálmirigy járatait és a hasnyálmirigyét, így elősegítik a gyulladós folyamatok kialakulását és támogatják a tumorigenezist, valamint a tumorprogressziót [107,111,112]. Az invazív baktériumok gyakran lipopoliszacharid (LPS) termelésük révén proinflammatorikus citokinek termelését indukálják és ezáltal immunogén hatást fejtenek ki [113]. Egyelőre nincsen konszenzus arról, hogy a mikrobiom diverzitása pontosan hogyan változik hasnyálmirigy adenokarcinómában [78].

A mikrobiom közvetlen immunogenitása mellett a hasnyálmirigy adenokarcinómában is megfigyelték a mikrobiom endokrinszerű funkcióit [78]. A mikrobiom diszbiózisából következően a bakteriális metabolizmus nagymértékben diszregulált a hasnyálmirigy adenokarcinómában [110]. A rövidláncú zsírsavak, a poliaminok, a bakteriális lipopoliszacharidok, a triptofán származékok és a másodlagos epesavak egyaránt képesek befolyásolni a hasnyálmirigy daganatok progresszióját.

A legtöbb epesavnak karcinogén szerepe van a hasnyálmirigy adenokarcinómában [114,115]. Az epesavak modulálják a hasnyálmirigy adenokarcinóma kockázati tényezőit, mivel hatással vannak a hasnyálmirigy gyulladásra és az epesavkiáramlási zavarokra, a II. típusú cukorbetegségre, az elhízásra és a hiperlipidémiára. Továbbá az epesavak csökkentik az apoptózisra való fogékonyságot, gyulladós mediátorokat indukálhatnak és a biológiai membránok károsításával befolyásolhatják a mozgását [116].

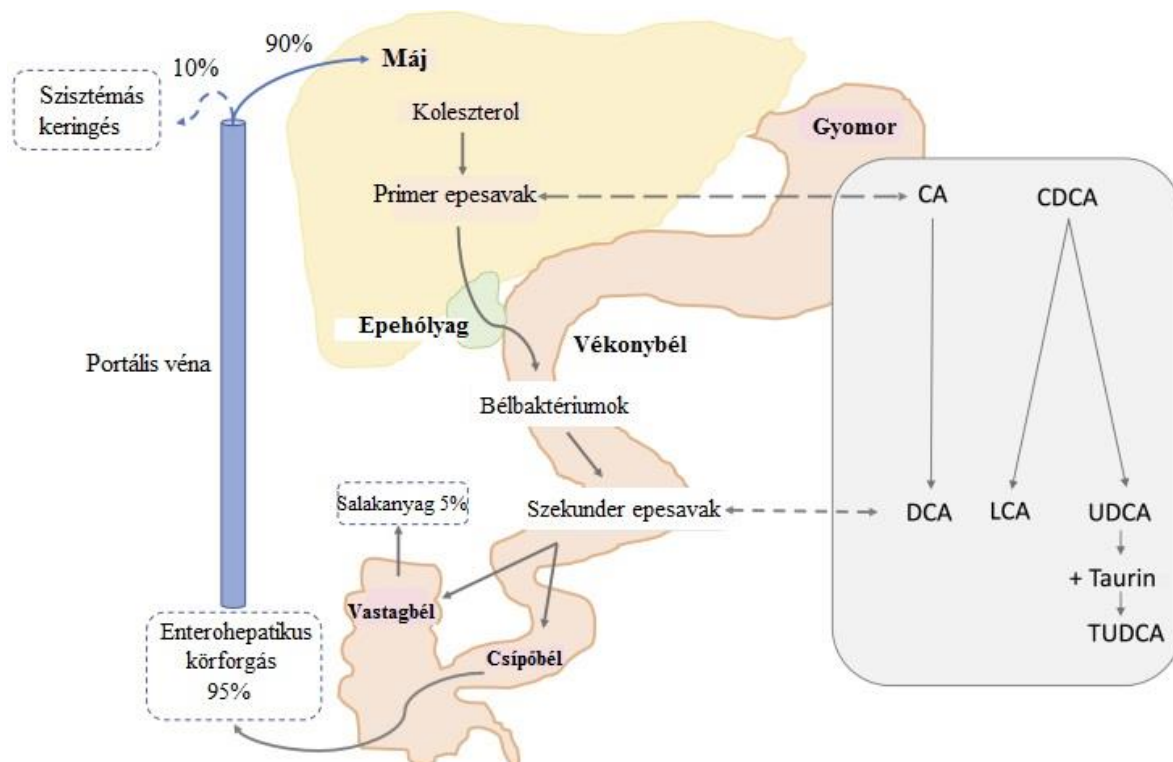
A dezoxikólsav (DCA) a TGR5 receptorhoz való kötődésen keresztül aktiválhatja az EGFR, a mitogén-aktivált protein kináz és a STAT3 jelátviteli útvonalakat a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben és ezáltal sejtciklus-progressziót indukálhat [117]. Ezzel ellentétben a litokólsav (LCA) és ursodezoxikólsav (UDCA) képes gátolni az epiteliális-mezenchimális átmenetet, fokozni az oxidatív stressz folyamatait, valamint csökkenteni az daganatossejt markerek szintjét és ezáltal antikarcinogén hatásokat fejthet ki a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtvonalakban [101,118].

Összességében az onkobiózis szerepe az emlő- és hasnyálmirigy daganatokban összetett, és egyértelműen bizonyítja, hogy a mikrobiom átalakulását követő metabolikus átrendeződés jelentős tényező lehet a daganatok progressziójában, beleértve a tumor növekedését, invázióját és metasztázisát, valamint a terápiás válaszokat [119].

3.6. A másodlagos epesavak

A gasztrointesztinális rendszerben elhelyezkedő mikrobiom az anyagcseréje során számos metabolitot állít elő. A daganatos megbetegedéshez kapcsolódó onkobiótikus átrendeződésnek köszönhetően nemcsak a daganatos és egészséges egyedek esetében, de akár a daganat progressziójának az előrehaladtával is a metabolitok mennyisége nagyfokú eltérést mutat a különböző stádiumú betegeknél [18]. A bakteriális metabolitok által kifejtett hatások a daganatos megbetegedés típusától és a vizsgált metabolit koncentrációjától függően lehetnek akár pro- [115] vagy antineoplasztikus [16–21,101] hatásúak.

A kólsav (CA) és a kenodezoxikólsav (CDCA) elsődleges epesavak [113] főként a máj hepatocita sejtjeiben szintetizálódnak [120]. Az epesavakat a máj ezután tovább konjugálja, így a CA és CDCA glicinnel vagy taurinnal konjugálódnak és ionizált formában lesznek jelen [121]. Az epesavak az epével az epehólyagba szekretálódnak, ahol az emésztések közötti időszakban koncentráálódnak. Étkezés után az epe a nyombélbe áramlik, ahol az epesavak rendkívül hatékony detergensként szolgálnak, elősegítik a lipidek és a lipidben oldódó tápanyagok emulgeálását, felszívódását és emésztését, valamint a szintézisük segíti a normál koleszterinszint megőrzését. Az epesavak ezután a disztális ileumban lévő enterocitákon keresztül visszaszívódnak és a portális keringésen keresztül a májba jutnak újrafelvételre és újra felhasználásra. Ezt nevezzük enterohepatikus körforgásnak (2. ábra) [122].



2. ábra Az epesavak enterohepatikus körforgása

A májban szintetizálódó elsődleges epesavak az epehólyagban koncentrálnak. Szekréciójuk során a bélbe jutnak, ahol a bélmikrobiom hatására másodlagos epesavakká alakulnak. Az epesavak a disztális ileumban visszaszívódva a portális vénán keresztül visszajutnak a májba, ahol újra felhasználásra kerülnek. Az epesavak egy része elhagyja a portális keringést és a szisztémás keringésbe kerül [123].

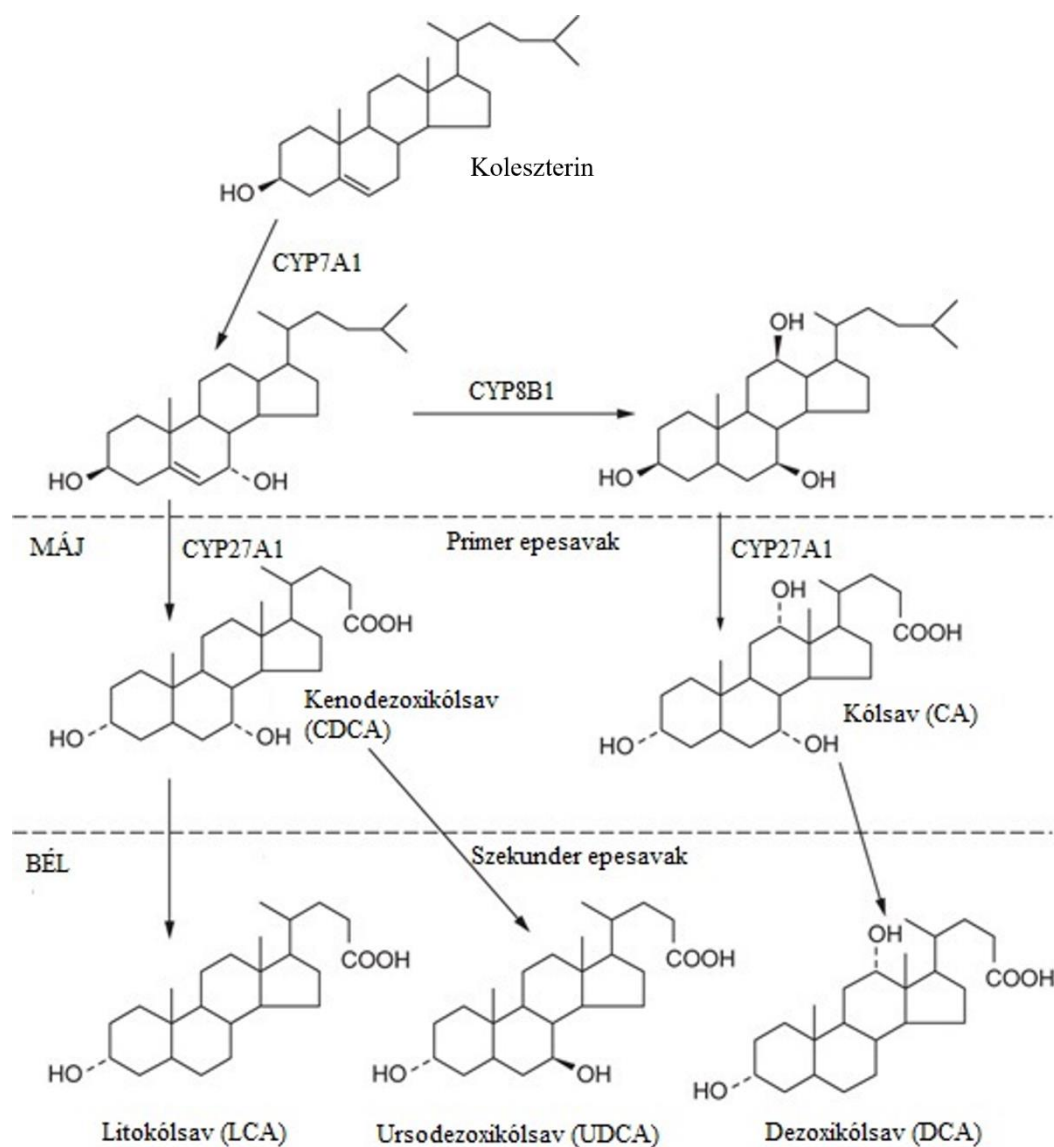
Annak ellenére, hogy az epesók visszaszívása rendkívül hatékony, így is naponta 400–800 mg epesav hagyja el a körforgást, amelyek ezután a vastagbélben élő mikrobióták szubsztrátjává válnak [124] és másodlagos epesavakká alakulnak. Az emberi szervezetben a fő másodlagos epesavak a litokólsav (LCA), a dezoxikólsav (DCA) és az urzodezoxikólsav (UDCA) [124,125]. Az elsődleges epesavak másodlagos epesavakká alakítása a bélmikrobiomhoz kapcsolódik. Elsősorban a vastagbélben található baktériumok felelősek az epesavak átalakulásért, de a gyomor-bél traktus felsőbb szakaszai is szerepet játszhatnak az epesav átalakulásban. A másodlagos epesavtermelésben részt vevő baktériumokban az átalakítást végző enzimek egy epesav indukálható (bai) operonban rendeződnek [123].

A bélbaktériumokban található epesav-hidrolázok (BSH) a glicin- és taurin-konjugátumok hidrolízisével dekonjugálják az elsődleges epesavakat. A BSH széles körben expresszálódik a *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Listeria* és *Enterococcus* baktériumokban [124]. Egy másik kritikus átalakulási lépést a $7\alpha/\beta$ -dehidroxiláz katalizálja, amely főként *Clostridium* és *Eubacterium* fajokban található meg [126]. Az elsődleges epesavak dekonjugálását követően a CA és a CDCA bakteriális $7\alpha/\beta$ -

dehidroxilációja ($7\alpha/\beta$ -HSDH) következik be, ami DCA vagy LCA képződését eredményezi. A CA 7α -dehidroxilációját követően DCA keletkezik, amíg a CDCA 7α -dehidroxilációja vagy az UDCA 7β -dehidroxilációja LCA kialakulásához vezet (3. ábra) [127]. Az elsődleges epesavak 7 -dehidroxilációját közvetítő enzimek a bai operon baiH régiójában kódolódnak, ami a legtöbb baktériumfajban az LCA és DCA szintéziséért felelős [123]. A másodlagos epesavak nagy része a terminális ileumban és a vastagbélben visszavételre kerül és a portális vénán keresztül visszatér a májba, ahol újra glicinnel és taurinnal konjugálódik, míg egy részük a szisztémás keringésbe kerülve a szervezet távoli pontjain szignalizációs útvonalakat aktiválhat. Az LCA referencia szérumszintje 30-50 nM, azonban az emlőben akár az 1 μ M-os koncentrációt is elérheti [128]. Ezzel szemben a DCA jóval nagyobb mennyiségben van jelen, a referencia szérumszintje 500-700 nM [126]. Emlődaganatos betegek vizsgálata során a későbbi stádiumú, valamint magasabb grádusú csoportok esetében az LCA alacsonyabb szintjét írták le a korai stádiumú betegekhez képest [93].

Az epesavaknak több ismert receptora van. Magreceptorok közé tartozik a vitamin-D-receptor (VDR), farnezoid-X-receptor (FXR), konstitutív androsztán receptor (CAR), pregnán-X-receptor (PXR), máj-X-receptor (LXR), illetve membránreceptokhoz tartozó Takeda G-fehérje kapcsolt receptor (TGR5) [78]. Ezek a receptorek keresztül az epesavak hatással vannak az immunválaszokra, a gasztrointesztinális nyálkahártya barrier funkciójára, a gesztációra [129], a karcinogenezisre [18,19] és a metabolikus betegségekre [130], így ezen receptorek kulcsszerepet játszhatnak a daganatos sejtek viselkedésének szabályozásában.

A másodlagos epesavakat sokáig prokarcinogén vegyületeknek tekintették [131], de ma már tudjuk, hogy a daganat típusától és az epesavak koncentrációjától függően egyaránt kifejthetnek pro- és antikarcinogén hatást is [17,18,19,101,126,132]. Az LCA egyaránt képes a TGR5, PXR, FXR, VDR receptorekhez kapcsolódni, de amíg az emlő-, prosztata-, illetve béldaganatok és neuroblasztóma esetében antineoplasztikus hatású addig, a nyelőcső-, epevezeték- és hepatocelluláris karcinóma esetében prokarcinogén hatásait írták le [126]. A DCA esetében megfigyelték, hogy a TGR5, az FXR és a PXR receptorek keresztül a nyelőcső-, gyomor-, petefészek-, bél- és epehólyag daganatok esetén gátló hatású, míg hasnyálmirigy-, bél-, hepatocelluláris-, és kis sejtű tüdődaganatokban prokarcinogén hatású [126] lehet.



3. ábra A másodlagos epesavak szintézisének lépései

A májban koleszterinből szintetizálódó elsődleges epesavak (kólsav, kenodezoxikólsav) a gasztrointesztinális szakasz mikrobiótájának a hatására másodlagos epesavakká (litokólsav, ursodezoxikólsav, dezoxikólsav) alakulnak [123].

Emlődaganatok esetében bizonyították, hogy az LCA visszafordítja az EMT folyamatát, csökkenti a VEGF expresszióját, a tumorellenes immunitást, valamint a daganat anyagcseréjének változását és ezáltal csökkenti az áttétképződést. Továbbá azt is kimutatták, hogy az LCA ezen hatásait a TGR5 receptoron keresztül fejti ki [18].

A hasnyálmirigy daganatos betegek epéjében az epesavak szintje jóval magasabb az egészséges egyénekhez képest [129]. A hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben az epesavak csökkentik az apoptotikus jelekre való érzékenységet, fokozzák a sejtciklus progresszióját, a gyulladásos mediátorok expresszióját, a sejtmigrációt, valamint nagy koncentrációban a biomembránok károsodását okozhatják [116,117]. Ezzel ellentétben az UDCA gátolja az EMT

folyamatát, csökkenti az őssejtszerűséget, vagyis antineoplasztikus hatásokat fejtett ki a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtvonalakban [118].

3.7. A tumoros sejtekre jellemző tulajdonságok

A tumorszövet és az azt körülvevő tumor mikrokörnyezet aktív kommunikáció révén képesek hatni egymásra [130]. A sejtek tumoros transzformációja egy többlépcsős folyamat, amely során a neoplasztikus sejtek fokozatosan elvesztik érzékenységüket a sejtosztódást gátló szignálokkal szemben és korlátlan osztódási képességre tesznek szert.

A tumorsejtekre jellemző tulajdonságokat a szakirodalom „Hallmarks of Cancer” [130] néven foglalja össze (4. ábra). Az egészséges szövetek gondosan szabályozzák a növekedést elősegítő szignálok termelését annak érdekében, hogy fenntartsák a normál szöveti homeosztázist, szerkezetet és funkciókat. A daganatos sejtek azonban többféle módon képesek fenntartani a *proliferatív jelek folytonosságát*. Ennek oka gyakran mutációk kialakulása, amelyek legsűrűbben a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) jelátviteli útvonalat [131], a szerin/ treonin kináz B (AKT) vagy a foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K) jelátviteli útvonalat érintik [132,133]. Továbbá gyakori probléma a mammalian target of rapamycin (mTOR) gén hibás működése, ami miatt gátlódnak a negatív visszacsatolási mechanizmusok [134].

A daganatsejtek jellemzője a *növekedést szabályozó mechanizmusokkal szembeni érzékenység elvesztése*. A növekedés és a proliferáció szabályozásában főszerepet játszó gének a retinoblasztóma (Rb) és a p53 [135]. Azokban a sejtekben, amelyekben ezen gének hibásak vagy funkcióvesztéses mutációjuk lép fel - hiányoznak a sejtciklust és sejtnövekedést gátló funkciók- az apototikus utak elkerülése révén tumornövekedést indukálhatnak.

A daganatos sejtek számos stratégiát alkalmaznak az *apoptózis elkerülése* vagy korlátozása érdekében. Leggyakoribb a p53 fehérje funkcióvesztéses mutációja, de gyakori jelenség az antiapoptotikus szabályozó molekulák termelése, a túlélést segítő szignálok túltermelése és a gyulladással szembeni ellenállás növelése. Ennek eredményeként a daganatos sejtek képesek a sejthalál elkerülésére [136].

Az egészséges sejtek általában korlátozott számú sejtosztódáson képesek sikeresen átesni. Ezzel ellentétben a daganatos sejtek *korlátlan replikatív potenciállal* rendelkeznek. A replikációk folyamatának köszönhetően a DNS-ek végén a telomerek folyamatosan rövidülnek, melynek eredményeként a normál sejtek egy idő után elveszítik osztódási képességüket. A

daganatos sejtekben a telomeráz enzim fokozott aktivitása ellensúlyozza ezt a folyamatot, lehetővé téve a korlátlan számú osztódást [137].

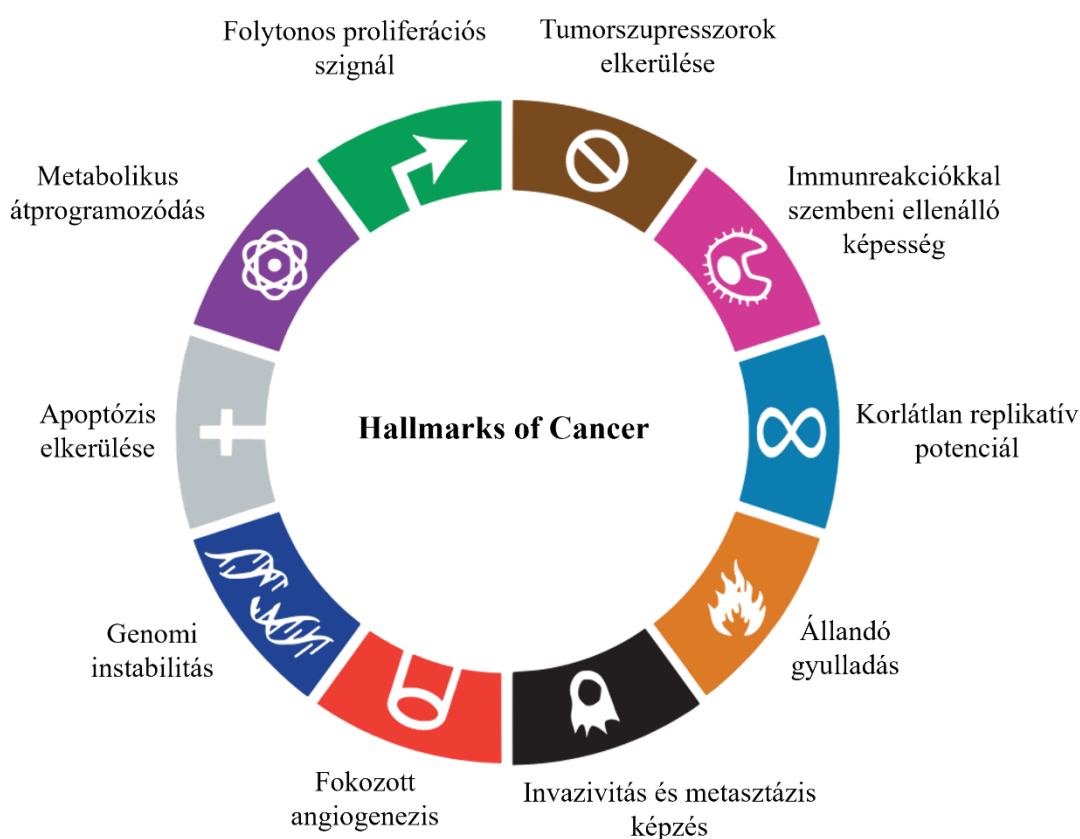
A megfelelő oxigén és tápanyagellátottság érdekében a tumorok fokozzák a környezetükben az **angiogenezis** folyamatát. A fokozott érképződés már a tumoros transzformáció korai szakaszában jelentkezik és a teljes életszakaszukban magas szinten zajlik. A folyamatban legnagyobb szerepet a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor A (VEGF-A), a trombocita eredetű növekedési faktorok és fibroblaszt növekedési faktorok játszik [138].

A daganatos sejtekre jellemző, hogy az extracelluláris mátrixban (ECM) lévő sejtdhéziós változások hatására megnő a sejtek **inváziós képessége** és ezáltal képesek lesznek a szervezet távoli pontjain új sejtcsoportosulások, **metasztázisok képzésére**. Az eddig legjobban körülírt változás az E-cadherin és N-cadherin expressziós mintázatának a megváltozása. Az E-cadherin egy olyan epiteliális fehérje, amely elengedhetetlen szerepet játszik a sejtdhéziók kialakításában [139]. Ezzel szemben a migrációra képes neuronokra és a mezenchimális morfológiával rendelkező sejtekre jellemző N-cadherin expressziójának emelkedését figyelték meg számos invazív tumorsejten [140].

A daganatos sejtekre jellemző, hogy a fokozott energiaigényük kielégítésének céljából **megváltoztatják az anyagcseréjüket**. A daganatok anyagcseréjére jellemző a Warburg-effektus, mely [141] során a sejtek még megfelelő mennyiségű oxigén jelenlétében is a glikolízis alapú energiatermelést részesítik előnyben.

A tumorsejtek további jellemzője a mutagén ágensekkel szembeni rendkívüli érzékenység, amely fokozza a **genetikai állományuk instabilitását**, hozzájárulva a további genetikai deformitások kialakulásához és tumoros transzformációhoz [142].

Kutatások bizonyítják, hogy a tumorok környezetében kialakult **krónikus gyulladás** elősegítheti a tumorprogressziót, mivel fokozza az előzetesen leírt jellemzők kialakulását: serkenti a tumorsejtek osztódását, túlélését, fokozza az angiogenezist, elősegíti a metastázisok kialakulását, fokozza az epiteliális– mezenchimális tranzíciót, és az immunrendszer modulálásával csökkenti a terápiás lehetőségeket [143].



4. ábra Daganatos sejtekre jellemző folyamatok

Az ábra magába foglalja a daganatos sejtekre jellemző folyamatokat, amelyek hozzájárulnak a tumorsejtek túléléséhez, növekedéséhez és a szervezeten belüli terjedéséhez [130].

3.8. Antineoplasztikus hatások

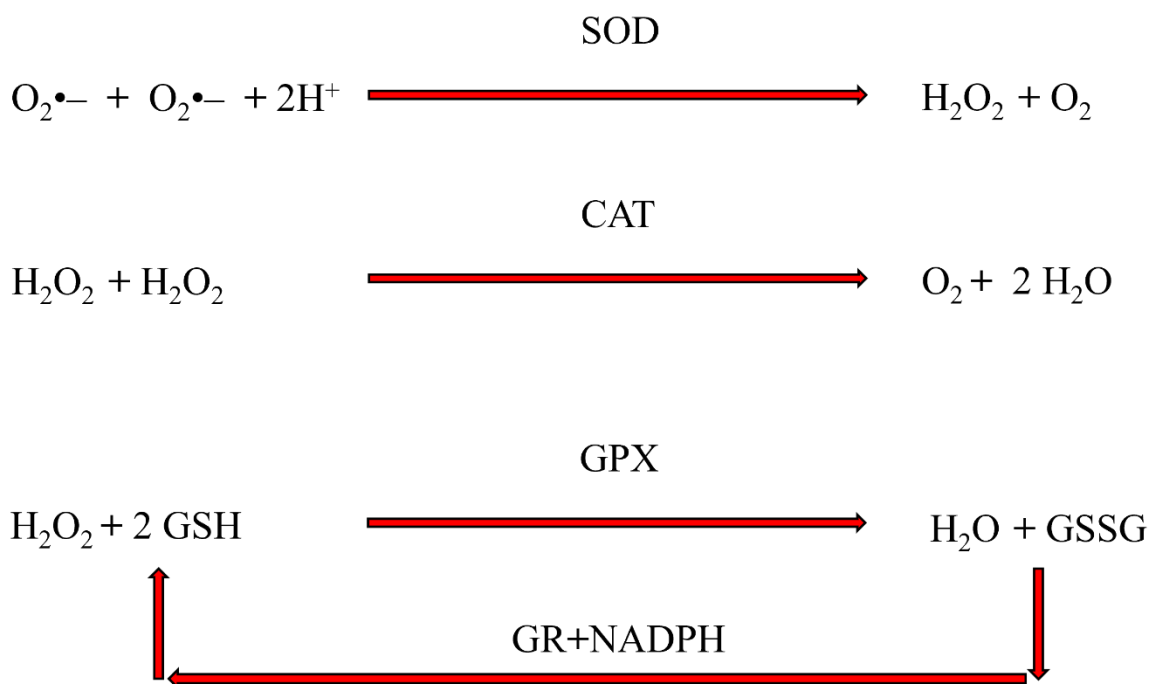
3.8.1. Szabad gyökök, antioxidánsok

Azokat a molekula származékokat, amelyek külső elektronhéjukon egy vagy több párosítatlan elektront tartalmaznak szabad gyököknek nevezzük. A szabad gyökök között megkülönböztetünk reaktív oxigén formákat (ROS) és reaktív nitrogén intermediereket (RNI). A legfontosabb ROS-ok közé soroljuk a szuperoxid aniont ($O_2^{\bullet-}$) és hidroxil gyököt (OH^{\bullet}), illetve a nem szabad gyök természetű, de erős reakciós készséggel rendelkező hidrogén-peroxidot (H_2O_2) [144]. Az RNI közé soroljuk a nitrogén-monoxidot (NO), valamint az NO és $O_2^{\bullet-}$ reakciójából keletkező peroxinitritet ($ONOO^-$) [145].

Annak ellenére, hogy a köztudatban ezek a szabad gyökök károsító hatásukról ismertek, számos létfontosságú feladatért felelősek. Fontos szerepet töltenek be szervezet homeosztázisának a megőrzésben, különböző jelátviteli útvonalban neurotranszmitterként hatnak, számos szabályozó funkcióval rendelkeznek, illetve a patogén kórokozók elleni védelemben is fontos szerepet játszanak [146].

A szabad gyökökkel szembeni védekezés és a megfelelő redox-állapot fenntartásáért az enzimatikus és nem enzimatikus antioxidáns rendszerek felelősek. Az enzimatikus antioxidánsok közé tartozik például a szuperoxid-diszmutáz (SOD), a glutation peroxidáz (GPX) és a kataláz (CAT). A nem enzimatikus antioxidánsok csoportjába soroljuk a glutationt (GSH), az N-acetil-ciszteint (NAC), a nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfátot (NADPH), illetve az exogén eredetű vitaminokat, mint például az A-, C- és E-vitaminokat [147].

A SOD katalizálja a $O_2^{\bullet-}$ és H_2O reakcióját, mely során H_2O_2 képződik. A H_2O_2 a CAT hatására vízzé és oxigénné redukálódik. A H_2O_2 -ből GPX katalizálta reakció során a GSH jelenlétében H_2O és glutation-diszulfid (GSSG) keletkezik. A GSSG visszaalakulását GSH-vá a glutation-reduktáz (GR) enzim végzi NADPH jelenlétében (5. ábra) [148].



5. ábra Az enzimatikus antioxidáns védelmi rendszer

Az aerob szervezetekben elsődleges antioxidáns enzimek, a szuperoxid-diszmutáz (SOD), a kataláz (CAT), a glutation peroxidázok (GPX) és a glutation-reduktáz (GR) által katalizált reakciók a szabadgyökök és a hidrogén-peroxid (H_2O_2) eltávolítása céljából [149].

3.8.2. Oxidatív/nitrozatív stressz

Normál körülmények között a szabad gyökök termelődése és az antioxidáns rendszerek működése egyensúlyban vannak, ezáltal védve a szervezetet a szabad gyökök biomolekulákat károsító hatásaitól. A daganatos sejtekben a fokozott szabadgyök termelés és a csökkent antioxidáns termelés miatt egyensúlyzavar lép fel, ami oxidatív- és nitrozatív stressz kialakulásához vezet. A felhalmozódó szabadgyökök hatására a DNS szerkezetében szimpla vagy dupla szálú törések, báziskárosodások, mutációk, deléciók alakulhatnak ki, illetve a DNS kóros metilációja gátolhatja a DNS javító folyamatokat [78,83].

Oxidatív stressz során a foszfolipidek többszörösen telítetlen zsírsav oldalláncainak a módosításával lipidgyökök keletkeznek. A lipidgyökök O_2 -vel egyesülve peroxil-gyökké, majd endoperoxiddá alakulnak, amelyből malondialdehid (MDA) keletkezik, amely tiobarbitursavval reagálva színes reakcióterméket eredményez [150]. A lipidperoxidáció egy másik terméke egy erősen reaktív aldehyd, a 4-hidroxinonenál (4HNE). A 4HNE a fehérjék oldalláncaihoz kapcsolódva stabil terméket eredményez [151]. Az MDA és 4HNE ezáltal kiváló biomarker a sejtekben zajló lipiperoxidáció szintjének a vizsgálatára [150,151].

A fokozott ROS és RNI termelés hatására a fehérjék tiol, cisztein csoportjai módosulhatnak, illetve a tirozin oldalláncok nitrálása során nitrotirozin alakulhat ki, mely képes megváltoztatni a fehérjék konformációját. Ezek a szerkezeti változások a fehérjék funkcióvesztését, valamint inaktiválódását okozhatják [152].

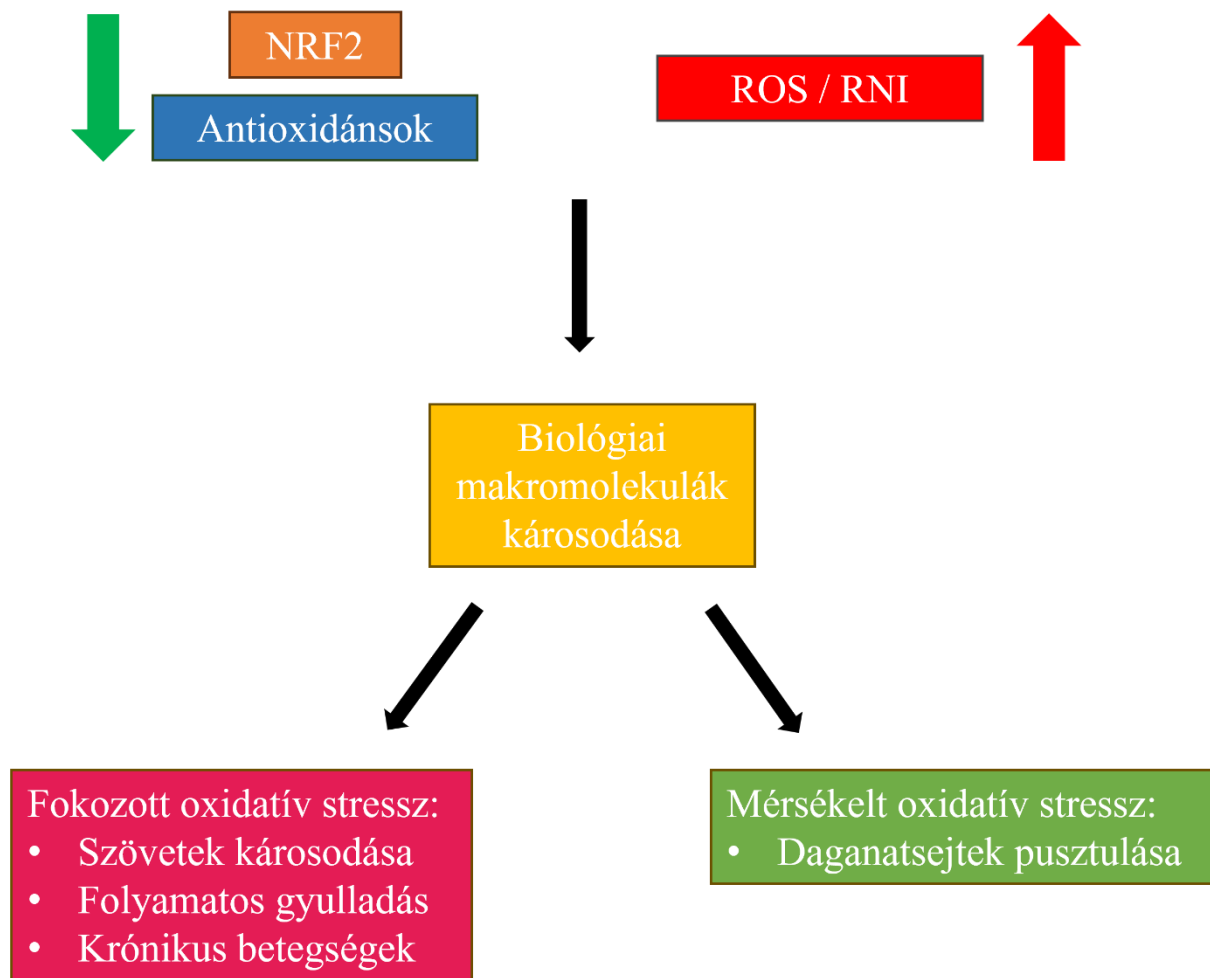
A DNS-törések, lipid peroxidáció vagy a fehérjék oxidációja a sejtek apoptotikus vagy nekrotikus pusztulásához vezethetnek. Számos különböző betegség patomechanizmusában írták le a reaktív intermedierek károsító hatásait, mint például az arteriosclerosis, ischaemia/reperfúzió okozta károsodás, tüdő- és szívelégtelenségek, gyulladásos-, mozgásszervi- és neurodegeneratív elváltozások, autoimmun megbetegedések, cukorbetegség [148]. Emellett kutatások igazolják, hogy a redox egyensúly felborulása számos daganatos megbetegedés esetében is kimutatható [19,153,154].

Ezzel párhuzamosan malignus daganatokban a fokozott oxidatív stressz citosztatikus hatását is leírták. Több tanulmányban kimutatták, hogy az emlő- és hasnyálmirigy daganatokban a fokozott oxidatív stressz gátolta a sejtproliferációt és az epiteliális-mezenhimális tranzíció folyamatát, valamint csökkentette daganatsejtek összejtszerűségét [19,101].

A sejtek redox egyensúlya a prooxidánsok és antioxidánsok egyensúlya által szorosan szabályozott. Daganatos sejtekben a redox-egyensúly gyakran felborul. A nuclear factor, erythroid 2-like 2 (NRF2) egy transzkripciós faktor, amely döntő szerepet játszik az antioxidáns gének expressziójának indukciójában és ezáltal létfontosságú a sejtek redox egyensúlyának fenntartásában. Az NRF2 fő feladata, hogy biztosítsa a sejtek védelmét az oxidatív stressz által kiváltott külső és belső behatásokkal szemben, amelyek károsíthatják a sejten belül található lipideket, fehérjéket, nukleinsavakat és szénhidrátokat [155].

A Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1) a citoplazmában található represszor fehérje, melynek feladata az NRF2 gátlása. Normál körülmények között a KEAP1 segíti az NRF2 poliubiquitinálódását és a proteozómákban történő lebontását. Oxidatív stressz során az NRF2 felszabadul a KEAP1 gátlása alól. A gátlás alól felszabadult NRF2 a sejtmagba transzlokálódik, indukálja a génátíródást, majd ezután a citoplazmába exportálódva degradálódik [156–158]. Az NRF2 célgénjei között több mint 1.000 különböző gént azonosítottak, ide tartoznak a SOD, CAT és GPX gének is [159].

Az NRF2 citoprotektív hatásainak köszönhetően, pozitívan hat a daganatok progressziójára, mivel gátolja az apoptózist, modulálja a sejtek anyagcseréjét, segíti a tumorsejtek proliferációját, elősegíti a metasztázisok képződését, továbbá fokozott aktivitása rezisztencia kialakulását okozhatja a terápiás eljárásokkal szemben [160].



6. ábra Az oxidatív és nitrozatív stressz hatásai

Az antioxidánsok expressziójának a csökkenése, valamint a ROS és RNI fokozott termelődése a sejtek redox állapotának a megváltozásához vezet, amely következtében a sejtekben fokozódik az oxidatív és nitrozatív stressz szintje. A fokozott oxidatív és nitrozatív stressz során károsodhatnak a sejtekben található biológiai makromolekulák, amely kóros elváltozások kialakulásához vezethet. A mérsékelt oxidatív és nitrozatív stressz azonban a daganatos sejtek elpusztításával antikarcinogén hatást is kifejthet.

3.8.3. Epiteliális-mezenchimális tranzíció

Az epitheliális-mezenchimális tranzíció (EMT) egy olyan sejtfajlárdési folyamat, amely lehetővé teszi a hámsejtek számára, hogy átalakuljanak és mezenchimális sejtekké váljanak. Ennek a folyamatnak a során a sejtek elveszítik sejt-sejt kapcsolataikat, apikális-bazális polaritásukat, a bazális membránnal való kapcsolatukat és invazív tulajdonságokra tesznek szert (7. ábra) [161].

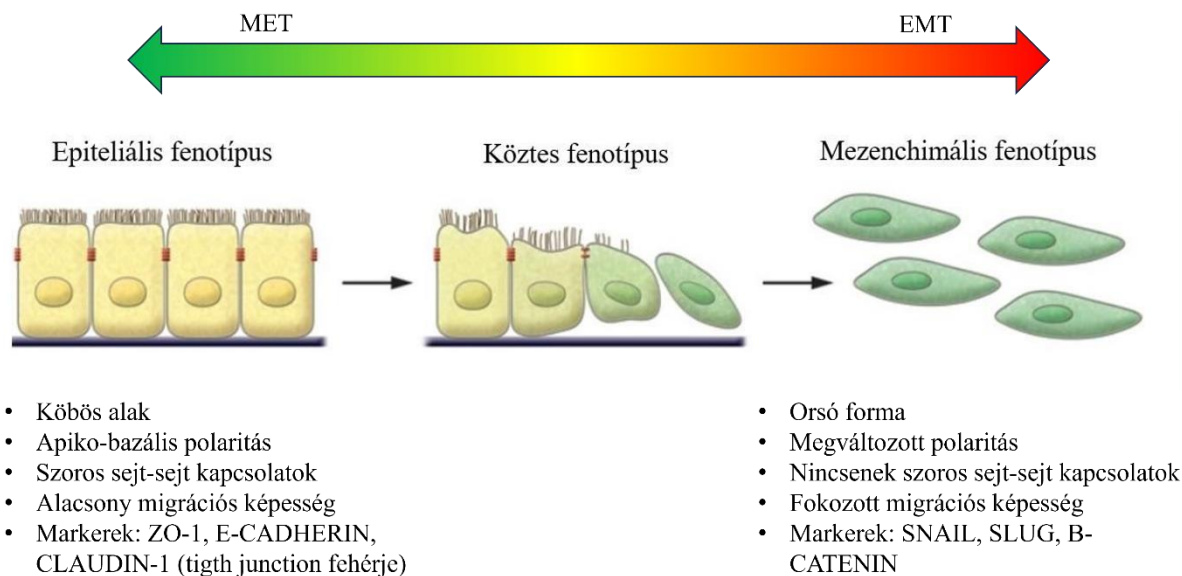
Az EMT esetében három típust különböztünk el egymástól. Az I.-típusú EMT az embrionális egyedfejlődéshez elengedhetetlen, amely lehetővé teszi, hogy az embrionális epitelsejtek mezenchimális jellegűvé váljanak, és távoli helyekre vándorolva, újabb szövetek

és szervek kialakulását iniciálhatják. A II.-típusú EMT a sebgyógyulásban és a fibrózisban játszik fő szerepet. A sebgyógyulás folyamatában az EMT során bekövetkező változások lehetővé teszik a sérült szélek vándorlását a sebzáródás érdekében [162]. A III.-típusú, onkogén EMT a karcinóma sejtekben figyelhető meg és összefügg a tumor progressziójával, mivel lehetővé teszi a neoplasztikus sejtek számára, hogy a bazális membránon keresztül behatoljanak a keringésbe és így távoli metasztázisokat alakítsanak ki [161].

Több molekuláris eseményről, valamint mediátor molekuláról bebizonyították, hogy képes EMT-t indukálni emlő- és hasnyálmirigy daganatokban. A DNS mutációja, a hipermetilált állapot, illetve az E-cadherin transzkripciójának a csökkenése is hozzájárul a metasztatikus potenciál növeléséhez [163,164]. Az EMT szabályozásában nagy szerepet tulajdonítanak a mikroRNS-eknek. A mikroRNS-ek poszttranszkripció szinten gátolják a génexpressziót, ezáltal módosítva az EMT-t indukáló transzkripció faktorokat [165,166]. Emlődaganatok esetében megfigyelték, hogy a miRNS-335 metasztatikus gének expressziójának csökkenését okozta [167]. Ugyanakkor miRNS-200 család, valamint miRNS-34 hasnyálmirigy daganatokban való vizsgálata során megfigyelték, hogy fokozott metasztázissal és csökkent invázióval egyaránt társulhat a hatásuk, így segítve az epiteliális-mezenchimális egyensúly fenntartását [168–170].

Annak ellenére, hogy az EMT-t indukáló jelátviteli ágensek teljes spektruma továbbra is tisztázatlan, emlő- és hasnyálmirigy daganatokban egyaránt azonosítottak számos transzkripció faktorot, amelyekről megállapították, hogy támogatja az EMT folyamatát és fontos szerepet töltenek be az összejtszerű állapot kialakításában [171]. A snail család transzkripció represszor 1 (SNAIL), a snail család transzkripció represszor 2 (SLUG), a cink-ujj E-box binding homeobox 1 (ZEB1), a twist family BHLH transzkripció faktor 1 (TWIST) transzkripció faktorok a TGF- β , EGF, WNT/ β -CATENIN, Notch és Hedgehog útvonalakon keresztül képesek különböző jelátviteli fehérjék, mint például a β -CATENIN, zona occludens 1 (ZO-1), CLAUDIN-1, E-CADHERIN indukációjára, valamint repressziójára emlődaganatban és hasnyálmirigy daganatban egyaránt [161,165,172,173].

Összességében az EMT a rákos sejteket fokozott metasztatikus potenciállal ruházza fel, ami a legtöbb klinikai esetben a tumor kiújulásáért felelős. Így az EMT célzott kezelése olyan terápiás lehetőség lehet, amely esélyt ad a rákos betegek gyógyulására [174].



7. ábra Az epitheliális-mezenchimális tranzíció folyamata

Az EMT folyamata során a sejtek morfológiai változásokon mennek keresztül. Megváltozik a polaritása, elveszítik az egymással való kapcsolatukat, változik a migrációra való képességük, valamint eltérő markerek expressziója lesz rájuk jellemző. Az EMT visszafordítható folyamat, ellentéte a MET [161].

3.8.4. Daganatőssejtek

A daganatos szövetek heterogén sejtpopulációkból épülnek fel. A sejtek között megkülönböztethető egy nagyobb populációnyi differenciált, korlátozott proliferációs potenciállal rendelkező sejt, valamint egy kisebb sejtpopuláció, amely állandó proliferációra képes [175]. A daganatot alkotó sejtek közül a daganatőssejteket tartják felelősnek a daganatok kialakulásáért, a metasztázisok kialakulásáért, a terápiás eljárásokkal szembeni rezisztenciáért, valamint a daganat kiújulásáért [175]. A daganatőssejtekre jellemző a metabolikus plaszticitás, amely nagyban hozzájárul a gyógyszerrezisztencia kialakulásához [176].

A daganatőssejtek azonosítása általánosan specifikus markerek alapján történik. Emlő- és hasnyálmirigy daganatok esetében gyakran alkalmazott eljárás az aldehid-dehidrogenáz-1 (ALDH1) enzim detektálása [177]. Az aldehid-dehidrogenázok olyan intracelluláris enzimek, amelyek az aldehidek oxidációját végzik [178]. Egy tanulmányban állatkísérletek során bebizonyították, hogy humán emlődaganatokból izolált, ALDH1 pozitív daganatőssejtek egérmodellbe graftolva képesek voltak daganatokat indukálni [179]. Hasnyálmirigy daganatok esetében kimutatták, hogy az ALDH1 pozitív sejtek magasabb klonogén kapacitással rendelkeznek az ALDH1 negatív sejtekhez képest, mivel alacsony sejtszám mellett képesek

tumor kialakulását kezdeményezni, valamint támogatták az EMT folyamatait hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben [180].

A daganatóssejtekben az antioxidáns gének emelkedett expressziója miatt, jóval alacsonyabb a ROS szintje. A normál sejtekkel ellentétben a daganatos sejtek jóval szenzitívebbek a magas ROS szintre. Az ALDH1 aktivitása hozzájárul a daganatsejtek túléléséhez azáltal, hogy csökkenti a ROS mennyiségét [181]. Ebből fakadóan az oxidatív stressz folyamatainak a fokozása a tumorsejtekben alkalmas lehet a daganatos sejtek szelektív elpusztítására [182].

4. CÉLKITŰZÉS

A bélmikrobióta által termelt bakteriális metabolitok, jelentős szerepet játszanak a gazdaszervezet homeosztázisának a fenntartásában és számos életviteli folyamatának a szabályozásában. A bélmikrobióta által szintetizált másodlagos epesavak, az LCA és a DCA, a keringési rendszeren keresztül képesek eljutni a távoli daganatsejtekhez és befolyásolni a daganatos sejtek viselkedését. A disszertációm alapját képező tanulmányokban a mikrobiom és az emlődaganatok, valamint a mikrobiom és hasnyálmirigy adenokarcinóma közötti szoros kapcsolatra kívántunk rávilágítani.

Vizsgálataink fő céljainak a következőket tűztük ki:

Az emlődaganatos sejtek vizsgálata során a következő kérdésekre keretük a választ.

- Képes-e befolyásolni az LCA a sejtek redox-homeosztázisát.
- Az LCA mely receptoron keresztül fejti ki a hatásait.
- Hogyan hat az LCA az emlődaganat sejtek redox-állapotára in vivo.
- Hogyan változik az oxidatív-nitrozatív stressz markerek szintje emlődaganatos betegekben.
- Van-e összefüggés az emlődaganatos betegek túlélése és az LCA indukált oxidatív-nitrozatív stressz markerek expressziója között.

A hasnyálmirigy-daganatos sejtek vizsgálata során a következő kérdésekre keretük a választ.

- Képes-e befolyásolni a DCA sejtek redox-homeosztázisát.
- Hogyan hat a DCA az epiteliális-mezenchimális tranzíció folyamatára.
- Milyen hatással van a DCA az őssejtszerűsége.
- Befolyásolja-e a DCA a sejtek energiaháztartását.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. Alkalmazott anyagok

A kísérleteinkhez használt anyagokat és azok kezelésekhöz alkalmazott koncentrációt az 1. táblázat tartalmazza.

Anyag	Katalógusszám	Gyártó	Koncentráció
CA	C1129	Sigma-Aldrich	0,01-10 μ M
CDCA	C9377	Sigma-Aldrich	0,01-10 μ M
CINPA1	HY-110249	MedChemExpress	5 μ M
DCA	D2510	Sigma-Aldrich	0,7 μ M
DY268	HY-110267	MedChemExpress	5 μ M
GSH	G4251	Sigma-Aldrich	5 mM
GSK2033	HY-108688	MedChemExpress	5 μ M
LCA	L6250	Sigma-Aldrich	0,1-1 μ M
MG-132	474790	Calbiochem	50, 100 mM
NAC	A7250	Sigma-Aldrich	5 mM
NF449	480420	Sigma-Aldrich	5 μ M
RA839	5707	Tocris Bioscience	5, 10 μ M
siCAR	#1 s19369 #2 s19370 #3 s19368	Thermo Fisher Scientific	30 nM
siNEG	4390843	Thermo Fisher Scientific	30 nM
siNRF2	#1 s9493 #2 s9492 #3 s9491	Thermo Fisher Scientific	30 nM
siPXR	s16910	Thermo Fisher Scientific	30 nM
siTGR5	#1 s195791 #2 s45559 #3 s45558	Thermo Fisher Scientific	30 nM
siVDR	s14777	Thermo Fisher Scientific	30 nM
tBHQ	112941	Sigma-Aldrich	5, 10 μ M

1. táblázat A kezelésekhöz használt anyagok listája

5.2. Alkalmazott sejtvonalak

A vizsgálataink során alkalmazott sejtvonalat az American Type Culture Collection-től (ATCC) szereztük be. A kísérletek során a sejt kultúrákat 5% szén-dioxid tartalmú, 37°C hőmérsékletű termosztátban tenyésztettük.

A 4T1 egér emlőtumor adenokarcinóma sejteket RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA, R5886) sejttenyésztő médiumban tartottuk fent. A médium 10% hőinaktivált főtális marhaszérumot (FBS; Sigma-Aldrich, F2442), 1% penicillin-streptomycint (Sigma-Aldrich, P4333), 2 mM L-glutamint (Sigma-Aldrich, G7513) és 1% piruvátot (Sigma-Aldrich, S8636) tartalmazott.

A BxPC-3 humán hasnyálmirigy adenokarcinóma sejteket RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, R5886) sejttenyésztő médiumban tartottuk fent. A médium 10% hőinaktivált FBS-t, 1% penicillin-streptomycint és 2 mM L-glutamint tartalmazott.

Az MCF7 humán emlőtumor adenokarcinóma és CAPAN-2 humán hasnyálmirigy adenokarcinóma sejteket Minimum Essential Mediumban (MEM; Sigma-Aldrich, R8042) tartottuk fent. A médium 10% FBS-t, 1% penicillin-streptomycint és 2 mM L-glutamint tartalmazott.

Az SKBR-3 humán emlőtumor adenokarcinóma sejteket Dulbecco's Modified Eagle's Medium low glucose (DMEM; Sigma-Aldrich, 1000 mg/L glükóz; D5523) sejttenyésztő médiumban tartottuk fent. A médium 10% FBS-t, 1% penicillin-streptomycint és 2 mM L-glutamint tartalmazott.

A humán primer fibroblaszt sejteket Dulbecco's Modified Eagle's Medium low glucose (DMEM; Sigma-Aldrich, 1000 mg/L glükóz; D5523) sejttenyésztő tápfolyadékban tartottuk fent. A médium 20% FBS-t, 1% penicillin-streptomycint, 2 mM L-glutamint és 10 mM HEPES-t (Sigma-Aldrich, 15630080) tartalmazott.

A sejt kultúrák mycoplasma fertőzöttségének hiányát folyamatosan ellenőriztük.

5.3. Sejtproliferáció vizsgálat

A sejtek proliferációjának vizsgálatához szulforodamin B (SRB; Sigma-Aldrich, 230162) festést alkalmaztunk. A sejteket 96-lyukú tenyésztőedényben (4T1-1500 sejt/lyuk) szélesztettük a kezelést megelőző napon. Ezután a sejteket 48 órán át kezeltük, majd triklórecetsavval (TCA; Sigma-Aldrich, T6399) fixáltuk 10% végkoncentrációban 1 órán keresztül

4°C-on. Ezután a sejteket tartalmazó lyukakat ötször mostuk desztillált vízzel és 1%-os ecetsavban oldott 0,4%-os (m/V) SRB festékkel festettük a sejteket 10 percig. Ezt követően a sejteket ötször egymás után mostuk 1%-os ecetsavval, hogy a nem kötődött festéket eltávolítsuk. A kötött festéket 10 mM-os Tris-BASE oldatban oldottuk fel. Az abszorbancia értéket spektrofotométer (Thermo LabSystems Multiskan MS, Waltham, MA, USA) segítségével 540 nm hullámhosszon rögzítettük.

5.4. SDS-PAGE és Western blot

A fehérje izolálás folyamatát végig jégen végeztük a fehérjék minőségének megőrzése érdekében. A kezelések letelte után a sejteket 1x PBS oldattal mostuk. A sejtek feltárása hideg RIPA pufferben (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% TritonX 100, 0,5% nátrium-deoxikolat, 1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, proteáz inhibitor koktél) történt, mely közben a mintáinkat a megfelelő feltárás érdekében jégen hűtve, háromszor 10 mp-ig, 2-es fokozaton, szonikáltuk (Qsonica Q125 Sonicator, Newtown, Connecticut, USA). A minták fehérje koncentrációját PierceTM BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, 23225) segítségével mértük. A mintákhoz ezután 5x SDS mintapuffert (50% glicerol, 10% SDS, 310 mM Tris-HCl, pH 6.8, 100 mM DTT, 0.01% brómfenol kék) és β-merkaptó-etanolt adtunk.

A fehérjeminták (20 µg) molekulatömeg szerinti szeparációját SDS poliakrilamid gélen (8 vagy 10%) végeztük el. A szeparált mintákat ezután nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A nitrocellulóz membrán aspecifikus kötőhelyeit 5%-os 1x TBS-Tween pufferben oldott BSA-val blokkoltuk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. Az elsődleges antitesteket (2. táblázat) 2,5%-os BSA (1x TBS-Tween-ben készítve) oldatban hígítottuk és a membránt ezzel inkubáltuk egy éjszakán keresztül. Ezt követően a membránt háromszor 10 percig mostuk 1x TBS-Tween pufferben. A peroxidázzal jelölt másodlagos antitesteket (2. táblázat) 2,5%-os BSA (1x TBS-Tween-ben készítve) oldatban hígítva, 1 órán keresztül hagytuk a membránon. A membránokat ezután háromszor 10 percig mostuk 1x TBS-Tween pufferben. Az antitestekkel jelölt fehérjesávokat kemilumineszcens reakció segítségével (SuperSignal West Pico Solutions, Thermo Fisher Scientific, 35060) tettük láthatóvá. A detektálás ChemiDoc Touch Imaging géldokumentációs rendszer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) segítségével történt. A sávok denzitometráálására Image Lab 6.1 szoftvert (Bio-Rad) használtunk.

Antitest	Hígítás	Forgalmazó/ katalógusszám
4HNE	1: 1000	Abcam (ab46545)
ALDH1	1: 1000	Abcam (ab227948)
Anti-egér IgG, Peroxidáz jelölt	1: 2000	Sigma-Aldrich (A9044)
CAR	1: 1000	Abcam (ab186869)
CLAUDIN-1	1: 1000	Cell Signaling (13255)
E-CADHERIN	1: 1000	Cell Signaling (3195)
GPX3	1: 1000	Abcam (ab104448)
iNOS	1: 1000	Novus (NB300-605)
KEAP1	1: 1000	Cell Signaling (8047)
Nitrotirozin	1: 1000	Millipore (06-284)
Nitrotirozin	1: 1000	Thermo Fisher (A21285)
NRF2	1: 1000	Abcam (ab31163)
NRF2	1: 1000	Novus (NBP1-32822)
SLUG	1: 1000	Cell Signaling (9585)
SNAIL	1: 1000	Cell Signaling (3879)
TGR5/GPBAR1	1: 1000	Novus (NBP2-23669)
ZO-1	1: 1000	Cell Signaling (8193)
β -actin	1:20000	Sigma-Aldrich (A3854)
β -CATENIN	1: 1000	Cell Signaling (8480)

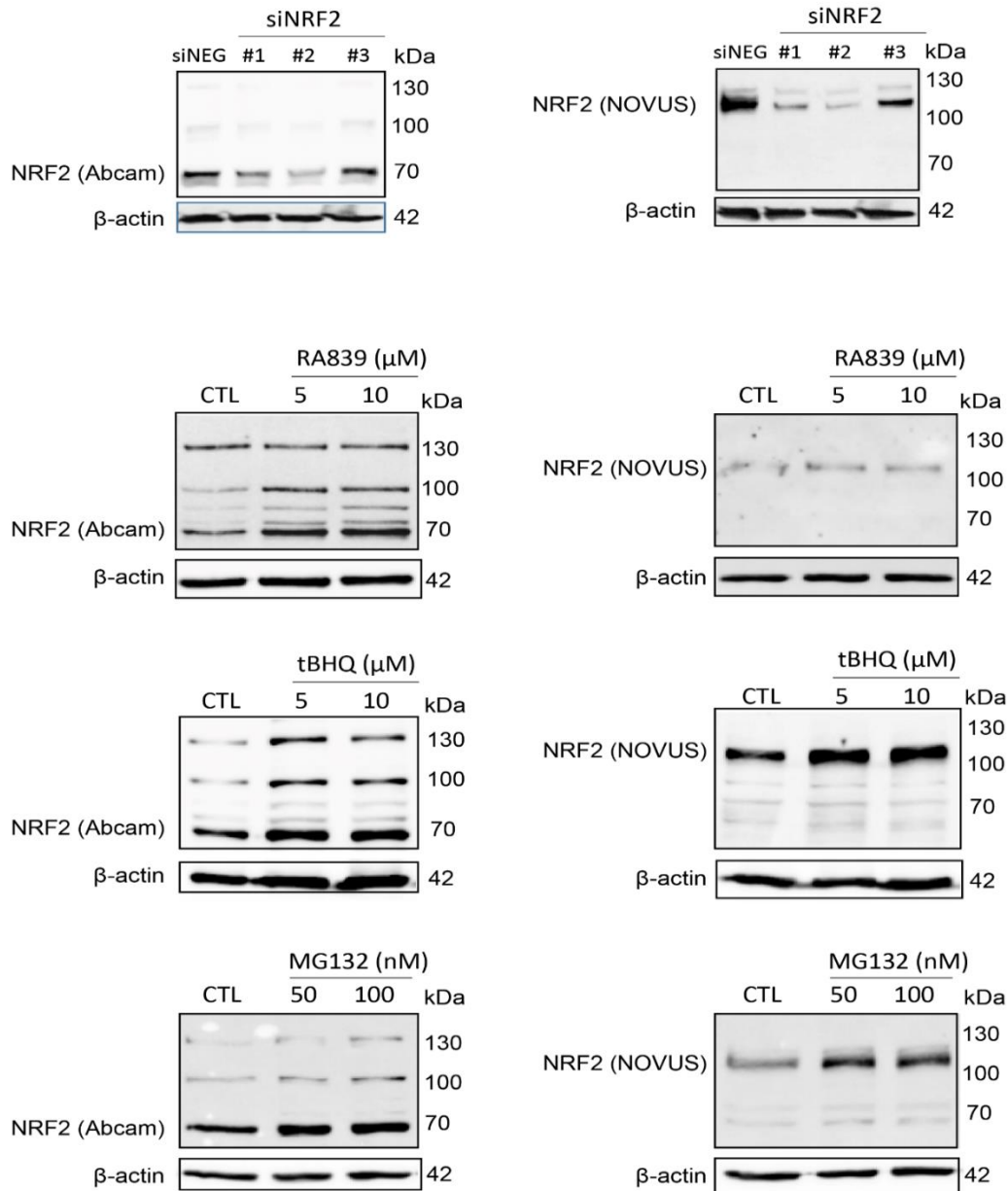
2. táblázat A Western blot módszerhez alkalmazott antitestek

5.4.1. Az alkalmazott NRF2 antitestek specificitásának a vizsgálata

Mivel kutatásaink egyik kulcsfontosságú lépése az NRF2 változások karakterizálása volt, ezért a vizsgálathoz használni kívánt antitesteket először validálnunk kellett. Az NRF2 vizsgálatához két különböző cégtől rendelt NRF2 specifikus antitestet alkalmaztunk, az egyik antitest (Abcam: ab31163) egy 68 kDa méretű fehérjét detektál, míg a másik antitest (NOVUS: NBP1-32822) egy 110 kDa körüli fehérjét. Kísérleteink során MCF7 humán emlőtumor sejtvonalon siRNS technika segítségével tranziensen csendesítettük az NRF2 gént, majd Western blot módszerrel vizsgáltuk az NRF2 fehérje expresszió mértékét. Eredményeink azt mutatták, hogy az NRF2 csendesített mintákban az NRF2 fehérje szintje csökkent a negatív kontroll siRNS mintához képest (8.A. ábra). Mindkét NRF2 antitest esetében ugyanazt az eredményt kaptuk. Emellett 4T1 egér emlőtumor sejtvonalat kezeltünk NRF2 aktivátorokkal (RA839 és tBHQ), valamint MG132 proteoszóma inhibitorral. Az RA839 valamint a tBHQ farmakológiai szerek az NRF2-KEAP1 interakció gátlásán keresztül képesek az NRF2 aktiválására [183,184]. Ezután szintén Western blot módszer segítségével vizsgáltuk az NRF2 fehérje mennyiségét. Megfigyeltük, hogy az alkalmazott farmakonok hatására az NRF2 fehérje expressziója

emelkedett a kontroll mintához képest (8.B-D. ábra). Mivel mindkét NRF2 antitesttel ki tudtuk mutatni az NRF2 expresszió specifikus változását, ezért úgy gondoljuk, hogy az alkalmazott antitestek alkalmasak az NRF2 további vizsgálatához.

A



8. ábra Az NRF2 antitestek validálása

(A) Az MCF7 sejteket NRF2 specifikus siRNS-el és negatív kontroll siRNS-el transzfektáltuk 48 órán keresztül. Ezután két különböző NRF2 antitestet (Abcam: ab31163; NOVUS: NBP1-32822) alkalmazva Western blot technikával vizsgáltuk az NRF2 fehérje expresszióját. (B-D) A 4T1 sejteket NRF2 aktivátorokkal (RA839 és tBHQ), valamint MG132 proteasóma inhibitorral kezeltük 48 órán keresztül. Ezután két különböző NRF2 antitestet (Abcam: ab31163; NOVUS: NBP1-32822) alkalmazva Western blot technikával vizsgáltuk az NRF2 fehérje expresszióját.

Rövidítések: NRF2 (nuclear factor, erythroid 2-like 2), tBHQ (terc-butilhidrokinon)

5.5. Géncsendesítés

Az MCF7 sejteket 24 lyukú tenyésztőedényben (50.000 sejt/lyuk) tenyésztettük egy éjszakán keresztül. A transzfekció során siRNS-eket alkalmaztunk a célgén specifikus csendesítésére, 30 nM végkoncentrációban. A siRNS-eket Lipofectamine RNAiMAX transzfekciós reagens (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA, 13778150) segítségével juttattuk be a sejtekbe, a gyártó által javasolt protokoll szerint. A kezeléshez először a transzfekciós komplexeket készítettük elő, amelyekhez a siRNS-t Opti-MEM médiumban (Life Technologies Corporation, Grand Island, NY 14072, USA, 31985-062) hígítottuk. Egy másik csőben a Lipofectamine RNAiMAX reagenst szintén Opti-MEM médiumban hígítottuk. A két komponenst összekevertük, majd 15 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk a stabil komplexek kialakulásához. A sejtekről eltávolítottuk a médiumot majd a friss, transzfekciós komplexet tartalmazó médiumot óvatosan pipettázva a sejtekhez adtuk. Kontrollként DMSO-t és negatív siRNS-t használtunk, hogy kizárjuk a nem-specifikus hatásokat. A kezelés 48 órán keresztül tartott LCA (0,3 μ M) jelenlétében. A kezelés letelte után fehérjét izoláltunk az 5.4 fejezetben leírtaknak megfelelően.

5.6. RNS izolálás, reverz transzkripció és RT-qPCR

Az RNS izolálás folyamatát végig jégen végeztük a nukleinsav minőségének megőrzése érdekében. A sejteket 6 lyukú tenyésztőedényben (CAPAN-2 – 10.000 sejt/lyuk, 4T1 – 5.000 sejt/lyuk) tenyésztettük egy éjszakán keresztül. A kezeléseket 48 órán keresztül tartottuk, majd a sejtekből TRIzol reagens (Invitrogen Corporation, 15596026) segítségével totál RNS-t izoláltunk a gyártói utasításnak megfelelően. Az állatkísérletek során eltávolított primer daganatokból származó szövetmintákat golyós homogenizátorral (Qiagen Tissuelyser II; Qiagen, Mexikóváros, Mexikó) folyamatos hűtés mellett TRIzol reagensben roncsoltuk. Az RNS mintákból a DNS szennyeződést DNáz kezeléssel távolítottuk el (Sigma-Aldrich, 10104159001). A minták koncentrációját és minőségét NanoDrop1000 készülékkel (Thermo Labsystems Multiskan MS, Waltham, MA, USA) állapítottuk meg. Reverz transzkripció során High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-et (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, 4368814) alkalmazva a gyártói utasításoknak megfelelően 2 μ g RNS mintát cDNS-sé írtunk át. A qPCR reakciót 10 μ l végtérfigatban végeztük el, a reakcióelegy 0,5 μ M primereket, 20 ng cDNS mintát és qPCRBIO SyGreen Lo-ROX Supermixet (PCR Biosystems Ltd.,

London, Egyesült Királyság, PB20.11-01) tartalmazott. A valós idejű kvantitatív PCR-t LightCycler 480 II készüléken (Roche Applied Science, Bázél, Svájc) mértük. Normalizálásra a 36B4 és cyclophilin háztartási gének Cp értékeinek mértani középértékéből számolt normalizáló faktort alkalmaztuk. A vizsgált gének relatív expresszióját a mintákban $2^{-\Delta\Delta CP}$ módszer segítségével határoztuk meg. A valós idejű kvantitatív PCR-hoz alkalmazott primerek szekvenciáit a 3. táblázat tartalmazza.

Egér primerek		
Gén neve	Forward primer (5'-3')	Reverz primer (5'-3')
36B4	AGATTCGGGATATGCTGTTGG	AAAGCCTGGAAGAAGGAGGTC
CAT	CCTTCAAGTTGGTTAATGCAGA	CAAGTTTTTGATGCCCTGGT
GCLC	GATTCGGGATGGGCAACT	AAAGGTATCTTGCCTCAGATATGC
GPX2	GTTCTCGGCTTCCCTTGC	TTCAGGATCTCCTCGTTCTGA
GPX3	GGCTTCCCTTCCAACCAA	CCCACCTGGTGAACATACT
HMOX1	AGGCTAAGACCGCCTTCCT	TGTGTTTCCTCTGTCAGCATCA
iNOS	GAAGTGCAAAGTCTCAGACATGG	GATTCTGGAACATTCTGTGCTGTC
NOX4	GCAGATTTACTCTGTGTGTTGCAT	TCCCATCTGTTTGACTGAGGT
NQO1	AGCGTTCGGTATTACGATCC	AGTACAATCAGGGCTCTTCTCG
NRF2	CATCAGGCCAGTCCCTCAAT	CAGCGGTAGTATACAGCCAGCT
SOD1	CCATCAGTATGGGACAATACA	GGTCTCCAACATGCCTCTCT
SOD2	TGCTCTAATCAGGACCCATTG	GTAGTAAGCGTGCTCCCACAC
SOD3	CTCTTGGGAGAGCCTGACA	GCCAGTAGCAAGCCGTAGAA

Humán primerek		
Gén neve	Forward primer (5'-3')	Reverz primer (5'-3')
36B4	CCA TTG AAA TCC TGA GTG ATGTG	GTC GAA CAC CTG CTG GAT GAC
CYCLOPHILIN	GTC TCC TTT GAG CTG TTT GCA GAC	CTT GCC ACC AGT GCC ATT ATG
SNAIL	GCT GCA GGA CTC TAA TCC AGA	ATC TCC GGA GGT GGG ATG
TCF7L2	ACG TAC AGC AAT GAA CAC TTCAC	GGC GAT AGT GGG TAA TAC GG
TWIST1	GGG CCG GAG ACC TAG ATG	TTT CCA AGA AAA TCT TTG GCATA
WNT5B	CGG GAG CGA GAG AAG AAC T	CGT CTG CCA TCT TAT ACA CAGC
β -CATENIN	TGT TAA ATT CTT GGC TAT TAC GAC A	CCA CCA CTA GCC AGT ATG ATGA

3. táblázat A valós idejű kvantitatív PCR-hoz alkalmazott primerek szekvenciái

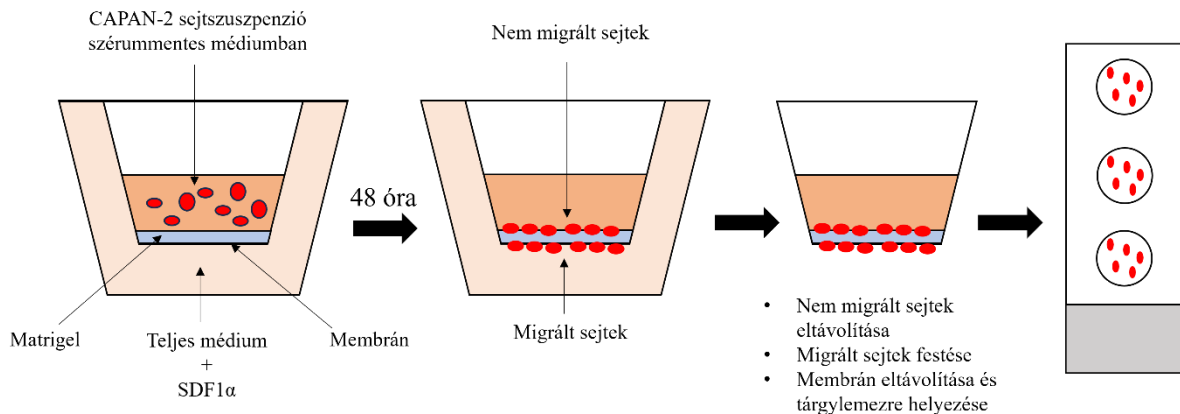
5.7. Sejtinvázió vizsgálata

A sejtinváziós vizsgálatokat 8 μ m vastagságú PET membránnal ellátott, Corning BioCoat Matrigel Inváziós Kamra (Corning, NY, USA 354480, 354481) alkalmazásával végeztük el (9. ábra). A felső kamrában a CAPAN-2 sejteket (20.000 sejt/lyuk) egy éjszakán keresztül

szérummentes médiumban tenyésztettük. Másnap a sejteket a felső kamrában DCA-val (0,7 μ M) kezeltük szérummentes médiumban, míg az alsó kamrákba 10% FBS-t, DCA-t (0,7 μ M) és sztrómasejt eredetű faktor-1 (SDF1- α) kemoattraktánst (végkoncentráció: 100 ng/ml, Sigma-Aldrich; SRP4388) tartalmazó médiumot raktunk. 48 óra eltelte után a membrán felső részén maradt, nem migrált sejteket vattával és többszöri PBS-es mosással eltávolítottuk. A membrán alsó részére átjutott sejteket 100%-os metanollal fixáltuk. Szárítás után a sejtmagokat 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) festékkel festettük és a membránt tárgylemezre helyeztük. A migrált sejtek magjait Opera Phoenix High Content Screening System segítségével számoltuk, a képek elemzése pedig Harmony 4.6 szoftver segítségével történt. A matrigélt tartalmazó membránon keresztül átjutó sejtek és a kontroll membránon keresztül átjutó sejtek arányából inváziós indexet számoltunk az alábbiak szerint:

Invázió % = (a matrigél tartalmú membránon keresztül átjutó sejtek átlaga / a kontroll membránon keresztül átjutó sejtek átlaga) *100

Inváziós index = Invázió % kezelt sejtek / Invázió % kontroll (kezeletlen) sejtek



9. ábra A sejtinváziós teszt összefoglalása

A CAPAN-2 sejteket szérumban lévő felső kamrába raktuk egy éjszakára, majd ezt követően 48 órán keresztül DCA-val kezeltük. Az alsó kamrában a tenyésztőmédium a DCA kezeléssel kívül FBS-t és SDF1- α kemoattraktánst is tartalmazott. 48 óra után a nem migrált sejteket mosással eltávolítottuk, a migrált sejteket fixáltuk és DAPI-val festettük. A membránt ezután tárgylemezre fordítottuk és elemeztük.

5.8. Lipidperoxidáció vizsgálata

Az emelkedett oxidatív- és nitrozatív stressz hatására felhalmozódott reaktív gyökök (ROS/RNI) a sejtekben található többszörösen telítetlen lipidek peroxidációját indukálják, ami reaktív elektrofil aldehidek kialakulását eredményezi, mint a 4-hidroxinonenál (4HNE) vagy a malondialdehid (MDA) [151]. Ezek a reaktív molekulák stabil kovalens kötések kialakítására képesek a fehérjék lizin, cisztein és hisztidin oldalláncaival [185] és ezáltal jó biomarkerként szolgálnak a sejtekben zajló oxidatív folyamatok kimutatására. Vizsgálataink során a lipidperoxidáció mértékét a 4HNE-fehérje adduktumok Western blot analízisével és a tiobarbitursav reaktív anyagok (TBARS) szintjének a vizsgálatával határoztuk meg [186]. Az MDA tiobarbitursavval (TBA) reagálva színes reakcióterméket eredményez, mellyel jól vizsgálható a lipidperoxidáció mértéke. A TBARS vizsgálatához a 4T1 sejteket T150-es tenyésztőflaskában növesztettük egy éjszakán keresztül. A 48 órás kezeléseket letele után a sejteket 1x PBS-el mostuk és Eppendorf csövekbe gyűjtöttük. Centrifugálás után a sejtpellethez 8,1% SDS-t, 20% ecetsavat, 0,8% TBA-t (Sigma-Aldrich, T5500) és desztillált vizet adtunk, majd 1 órán keresztül 96°C-on inkubáltuk. Centrifugálás után a felülúszó abszorbanciáját spektrofotométer (Thermo Labsystems Multiskan MS) segítségével, 540 nm hullámhosszon mértük.

5.9. Aldehid-dehidrogenáz pozitivitás vizsgálat

Az aldehid-dehidrogenáz-1 (ALDH1) pozitív sejtek mennyiségének a mérését a kezelések hatására Aldefluor összejt kit (StemCell Technologies, Vancouver, Kanada, 01700) segítségével végeztük. A CAPAN-2 sejteket 6 lyukú tenyésztőedényben (100.000 sejt/lyuk) egy éjszakán keresztül tenyésztettük. Ezután 48 órán keresztül DCA-val (0,7 μM) kezeltük. A kezelés letele után a sejteket 0,5 ml ALDH1 szubsztrát tartalmú (5 $\mu\text{l/ml}$) Aldefluor assay pufferben 45 percig 37°C-on inkubáltuk. A negatív kontrollként alkalmazott sejteket az ALDH1 inhibitoraként ismert dietil-amino benzaldehyddel (DEAB; 50 mmol/l) kezeltük. A mintákban lévő ALDH1 pozitív sejtek arányát áramlási citométer segítségével határoztuk meg. A kapott eredményeket Flowing Software 2.5.1 programmal elemeztük.

5.10. Mitokondriális oxigénfogyasztás és az extracelluláris savasodási ráta meghatározása

A CAPAN-2 sejtek oxigénfogyasztását (oxygen consumption rate (OCR) - a mitokondriális oxidáció mértéke) és a pH-változás mértékét, az extracelluláris savasodási rátát (extracellular acidification rate (ECAR) - a glikolitikus fluxus mértéke) Seahorse XF96 oximéter (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) segítségével határoztuk meg. A CAPAN-2 sejteket 96 lyukú Seahorse tenyésztőedényben (5.000 sejt/lyuk) tenyésztettük egy éjszakán keresztül, majd 48 órán át DCA-val (0,7 μM) kezeltük. A kezelés letele után a sejteket előmelegített XF assay médiumban inkubáltuk 1 órán át 37°C-on, CO₂-mentes inkubátorban. Az alapszintű (baseline) OCR értékét 5 percen keresztül öt alkalommal rögzítettük. Ezután a sejtekhez etomoxirt (50 μM), oligomycint (10 μM) és antimycint (10 μM) adtunk. Minden új anyag hozzáadása után mértük az OCR értéket 5 alkalommal 5 percig. Végül az adatokat a fehérjetartalomra normalizálva elemeztük. A fehérjetartalom méréséhez SRB festést alkalmaztunk az 5.3 részben leírtak szerint.

5.11. Állatkísérletek

Az állatkísérleteket a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága által elfogadott és regisztrált engedély alapján (engedélyszám: 1/2015/DEMÁB) végeztük. A 3R elvének megfelelően korábbi kísérleteinkből származó primer daganatokból izoláltunk totál RNS-t. A

kísérlet során 4T1 emlőtumor sejteket nőstény Balb/c egerekbe oltottunk és vizsgáltuk az LCA hatását a kialakult tumor növekedésére és viselkedésére [18]. Az egereket a Debreceni Egyetem Élettudományi Központ Kísérleti Állatház SPF (specifikus kórokozómentes) minősítésű részlegén szaporították. Kezeléseinket ugyanezen állatház „MD” (minimal disease) részlegén végeztük. Az egereket a szabályozásoknak megfelelő, standard méretű ketrecekben (65 × 207 × 140 mm, területe 530 cm²; Techniplast, 1284 L Eurostandard Type II. L) helyeztük el Lignocel Select Fine (J. Rettenmaier und Söhne) alom használatával. Egy ketrecben legfeljebb hat állat tartózkodott. Az egerek korlátlan hozzáféréssel rendelkeztek élelemhez és ivóvízhez (sterilizált csapvíz). A világos és sötét ciklusok 12 óránként váltották egymást. Az állatház hőmérséklete 22 ± 1 °C volt. Az állatok hetente kaptak tiszta ketrecet és almot. Minden állat az irányelveknek megfelelő humánus bánásmódban részesült, gondozásukat állatorvosi felügyelet mellett, szakképzett személyzet végezte el. Ehhez a tanulmányhoz összesen 10 állatot használtunk fel. A kísérleteinkhez 8-10 hetes (20-25 g) nőstény Balb/c egereket használtunk.

A xenograftok kialakításához a 4T1 sejteket hideg PBS-ben szuszpendáltuk (2 × 10⁶/ml) majd a sejtszuszpenzióból és hideg matrigel-ből (Sigma-Aldrich; E1270) 1:1 arányú szuszpenziót készítettünk. Az egerek ebből a szuszpenzióból injekciós tűvel a második inguinális emlőbimbójuk alá kaptak 50 µl térfogatú injekciót (10⁵ sejt/oltási hely). Az egerek állapotát és a tumorok növekedési ütemét naponta ellenőriztük.

A kezeléshez használt LCA-t 96%-os etanolban 7,5 mM koncentrációban -20°C-on tároltuk. A kezeléshez használt mennyiséget és a kontroll mintaként alkalmazott vehikulumot minden nap 1x PBS-ben hígítottuk a megfelelő koncentrációra (200 µl / 30 ttg). Az egerek minden nap 8:00 és 10:00 óra között „*per os*” kapták a kezeléseket. Az oltást követő 18. napon az egereket a nyaki csigolya diszlokációjával termináltuk és ezután eltávolítottuk a primer tumorokat és az esetleges áttéteket. Az eltávolított primer tumorokból ezután külön-külön totál mRNS-t izoláltunk.

5.12. Teljes antioxidáns képesség meghatározása

A teljes antioxidáns képesség meghatározásának egyik módszere a 2,2'-azinobis-3-etilbenzothiazolin-6-szulfonát (ABTS) vegyület oxidációján alapul [187]. Az ABTS-ből káliumperszulfáttal előállított zöld színű ABTS-kation gyök a mintában lévő antioxidánsokkal reagálva elszíntelenedik. Az elszíntelenedés mértéke egyenesen arányos az elreagált gyökök mennyiségével és így megállapítható a minta antioxidáns tartalma.

Az ABTS gyökök generálásához a vizsgálatot megelőző este az ABTS-oldathoz (7,4 mM) 10% kálium-persulfát oldatot (24,5 mM) adtunk. A kísérlet előtt az ABTS-oldat abszorbanciáját 50 mM-os, pH 4,5 Gly-HCl oldattal 1,2-re állítottuk be. A vizsgálni kívánt aszkorbinsavat és az LCA-t DMSO-ban oldottuk be és hígítottuk a kívánt koncentrációkra. Az ABTS-oldatból 50 µl-t adtunk 5 µl vizsgálandó mintához. Az elegyet ezután 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A minták abszorbanciáját Tecan Spark multi-label reader segítségével 405 nm hullámhosszon rögzítettük. Az antioxidáns aktivitást a kontroll minták százalékában fejeztük ki. Pozitív kontrollként aszkorbinsav-koncentrációsorozatot alkalmaztunk.

5.13. Szöveti mikroarray és immunhisztokémia

A tumorszöveten belül megfigyelhető 4HNE, iNOS és TGR5 expresszió vizsgálatához szöveti mikroarrayt (tissue microarray, TMA) végeztünk 88 emlődaganatos beteg archivált szövetblokkjának a felhasználásával, melyeken immunhisztokémiai vizsgálatok történtek.

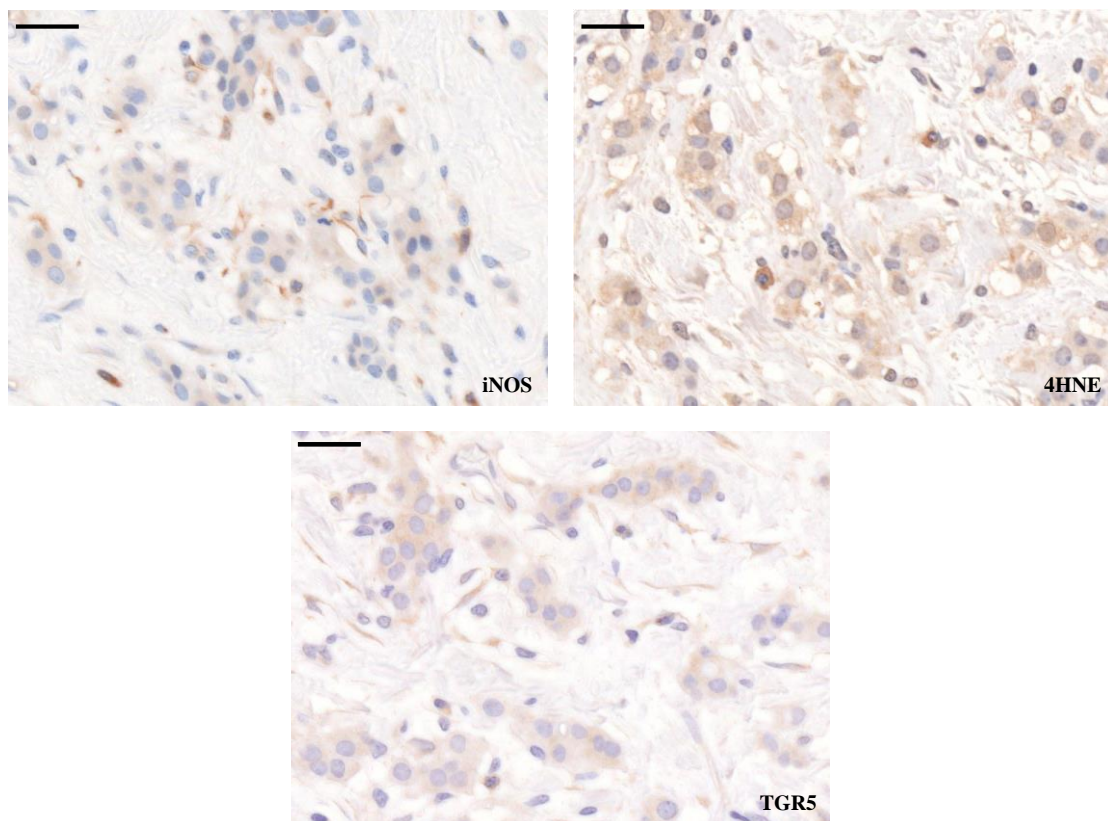
Az emlődaganatos szövetek sebészeti eltávolításukat követően formalinnal lettek fixálva és paraffinba lettek ágyazva. A vizsgálatához ezek a szöveti mikroblokkok lettek felhasználva. A vizsgálatához szöveti blokkonként három technikai párhuzamos készült. Az immunhisztokémiához a *Leica Bond MaxTM* protokollját [188] használtuk. Azimmunhisztokémiához alkalmazott antitesteket és körülményeket a 4. táblázat foglalja össze.

A metszetek immunhisztokémiai festés után „H-score” pontrendszer alkalmazásával lettek pontozva, amely figyelembe veszi a festődés intenzitását és százalékos arányát [189].

Antitest	Forgalmazó	Antigén feltárás	Hígítás	Detektálási mód
iNOS	Thermo Fisher Scientific (PA5-16855)	Ventana BenchMark ULTRA/Roche Cell Conditioning 1 (CC1) 20 perc, 95°C	1:100	UltraView Universal DAB Detection kit/Roche
4HNE	Abcam (ab46545)	Ventana BenchMark ULTRA/Roche Cell Conditioning 1 (CC1) 20 perc, 95°C	1:1000	UltraView Universal DAB Detection kit/Roche
TGR5	GeneTEX (GTX100026)	pressure cooker (Avair) 1m citrát puffer, pH=6	1:1000	EnVision Flex (K8000, Dako, Santa Clara, CA, USA)

4. táblázat Az immunhisztokémiához alkalmazott antitestek

Az immunhisztokémiához használt antitestek tipikus festődési mintázatát a 10. ábra mutatja.



10. ábra A vizsgálatban használt antitestek festési mintázata

A TMA-ban lévő emlődaganat szöveteket a jelzett antitestekkel festettük meg, és az immunreakciók előhívása 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) segítségével történt. A skála 50 µm-t jelöl.

Rövidítések: TMA (szöveti mikroarray), 4HNE (4-hidroxinonenál), iNOS (indukálható nitrogén-monoxid szintáz) TGR5 (Takeda G-fehérje kapcsolt receptor)

A vizsgálat a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottságának engedélyével valósult meg. A szövettani minták sztratifikálása a következő szempontok alapján történt: TNM stádium, Nottingham grádus, receptor pozitivitás és mitózis index. A TMA vizsgálatok a Debreceni Egyetem Patológiai Intézetében történtek, a patológiai leletezést Dr. Csonka Tamás végezte.

5.14. *In silico* vizsgálatok

Az emlődaganatban szenvedő betegek túlélési ideje és a vizsgált gének (CAR, TGR5, NRF2, KEAP1, iNOS, nNOS(a), nNOS(b), NOX4) kifejeződése közötti összefüggést a Kaplan-Meier plotter adatbázis (<https://kmplot.com/analysis/>) felhasználásával elemeztük.

5.15. Statisztikai analízis

Minden kísérletet legalább három független alkalommal végeztünk el. Az adatok statisztikai értékeléséhez GraphPad Prism 8.0.1 programot használtunk. A normál eloszlás elérése érdekében a fold change adatokat log₂ transzformáltuk. Két csoport összehasonlításához Student-féle t-próbát használtunk. A több csoport összehasonlítása esetén egyutas ANOVA statisztikai tesztet használtunk, melyeket Tukey-féle poszthoc teszt vagy Dunnett posthoc teszt követett. Az adatok az átlag ± SEM értékeket jelzik. A statisztikai analíziseink során a $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikáns különbségnek. A korrelációs vizsgálatokat Pearson-korrelációs teszttel és lineáris regresszió segítségével végeztük. Analízis előtt a mitotikus indexet log₂ transzformáltuk. A számítások R projekt (3.5.2 verzió) segítségével történtek.

6. EREDMÉNYEK

6.1. A litokólsav hatásai az emlőtumorsejtekre

Előzetes eredményeinkben kimutattuk, hogy az LCA csökkenti az emlődaganatsejtek növekedését és agresszivitását. Az LCA antitumor immunválaszt indukál és átalakítja az emlődaganatsejtek metabolizmusát. Kimutattuk, hogy az LCA bakteriális termelése csökkent az emlődaganat korai stádiumában, ami összhangban volt a szérumban mért alacsony litokólsav szinttel [18].

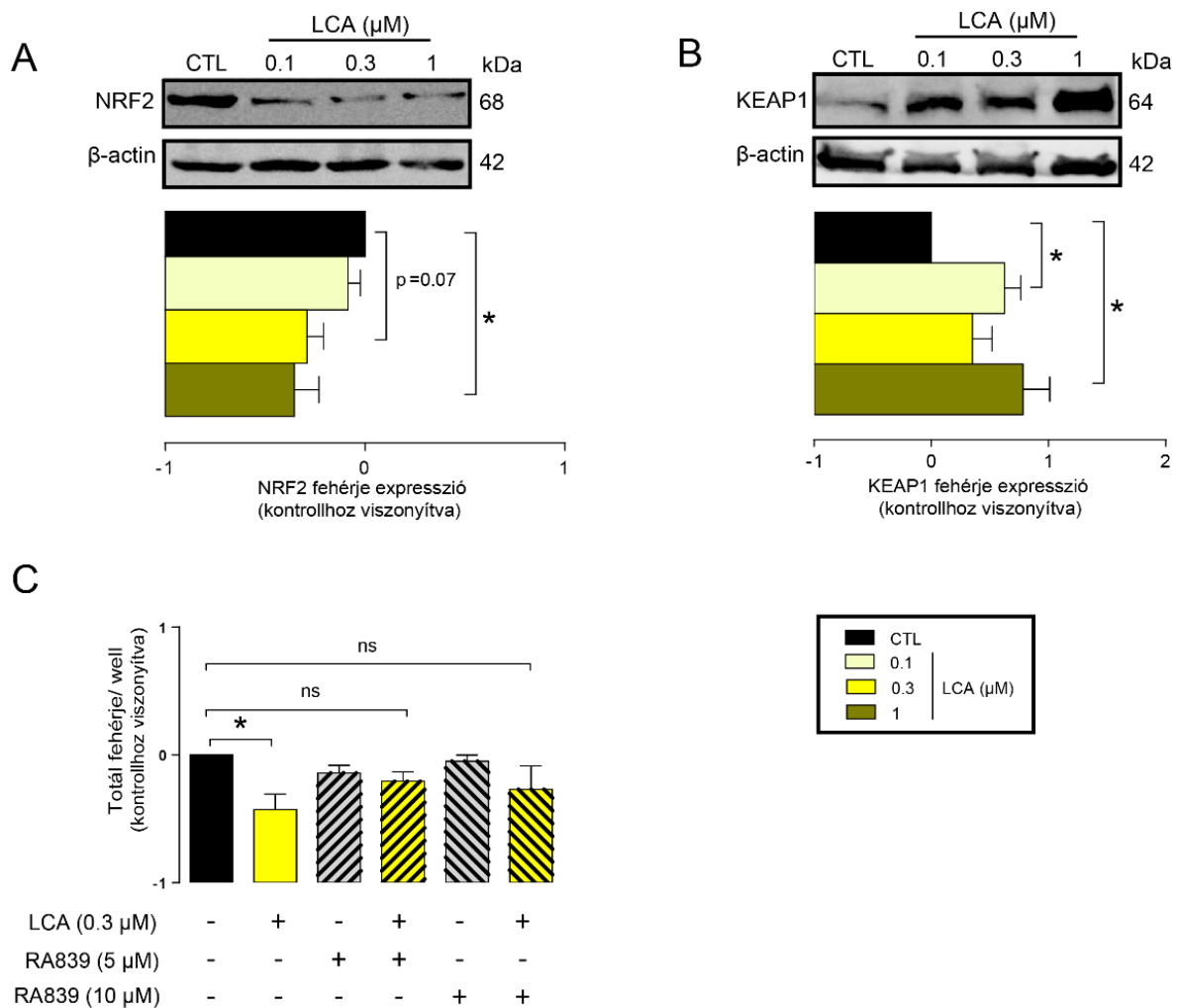
A disszertációm alapjául szolgáló tanulmányban arra kerestük a választ, hogy az LCA képes-e befolyásolni a redox-homeosztázist az emlőtumorsejtekben, vagyis hatással van-e az anti- és prooxidáns rendszerek közötti egyensúlyra. Sejtes és egér modelleken, valamint humán emlődaganatos egyénekből származó mintákon keresztül tanulmányoztuk az LCA hatását.

6.1.1. A litokólsav antiproliferatív hatása az NRF2 gátlásán keresztül valósul meg

Kísérleteinkben először azt vizsgáltuk meg, hogy az LCA befolyásolja-e az NRF2/ KEAP1 antioxidáns útvonal kulcsfontosságú elemeinek expresszióját. A kísérleteink során alkalmazott LCA koncentrációk megfeleltek az emberi emlőszövetben mért normál humán LCA koncentrációnak (0,1–1 μM) [128]. Kimutattuk, hogy a 4T1 egér emlődaganatsejtekben az LCA kezelés csökkentette az NRF2 fehérje szintjét (11.A. ábra), ezzel párhuzamosan az NRF2-t gátló KEAP1 fehérje szintjét emelte (11.B. ábra).

Korábbi tanulmányunkban kimutattuk, hogy az LCA csökkenti az emlőtumorsejtek proliferációját, ugyanakkor a nem transzformált sejtek növekedésére nincs hatással [18]. Kíváncsiak voltunk arra, hogy az LCA proliferációt gátló hatása visszafordítható-e az NRF2 farmakológiai aktiválásával. A 4T1 sejteket LCA-val és egy NRF2 aktivátorral, az RA839-el kombináltan kezeltük, és azt találtuk, hogy az NRF2 aktivációja megszüntette az LCA antiproliferatív hatását (11.C. ábra). Az RA839 hatékonyságát az NRF2 célgének mRNS expressziójának a mérésével ellenőriztük. Az RA839 kezelés emelte a NAD(P)H kinon-dehidrogenáz 1 (NQO1), a glutamát-cisztein ligáz katalitikus alegység (GCLC), a kataláz (CAT) és a hemoxigenáz 1 (HMOX1) gének mRNS expresszióját (12. ábra).

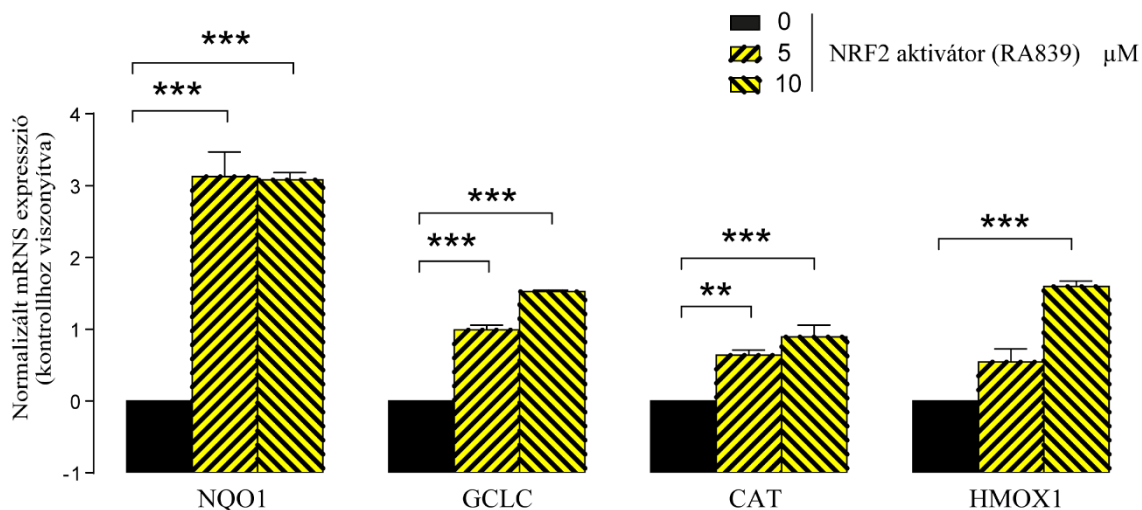
Mindezen eredmények összességében azt mutatják, hogy az NRF2 kifejeződésének a csökkenése kulcsszerepet játszik az LCA citosztatikus hatásainak kialakításában.



11. ábra Az LCA kezelés gátolta az NRF2/KEAP1 rendszer elemeinek a kifejeződését a 4T1 emlőtumorsejtekben

A 4T1 sejteket LCA-val kezeltük 48 órán keresztül a jelölt koncentrációkban, majd Western blot technika segítségével vizsgáltuk az **(A)** NRF2 és **(B)** KEAP1 fehérjék expresszióját. Az ábrák felső részén egy reprezentatív eredmény van feltüntetve, míg az ábrák alsó részén a Western blot eredmények denzitometriás értékelése látható (n=3). **(C)** A 4T1 sejteket LCA-val (0,3 μM) és NRF2 aktivátorral, RA839 (5 μM és 10 μM) –el kezeltük 48 órán keresztül, majd szulforodamin-B festéssel meghatároztuk a teljes fehérje mennyiséget (n=5). A kontroll mintához viszonyított adatokat (fold change) log2 transzformáltuk, az adatokat átlag \pm SEM formában adtuk meg. A * szignifikáns különbséget jelez a kontroll és LCA kezelt minta között, ahol $p < 0,05$.

Rövidítések: LCA (litokólsav), ns (nem szignifikáns), NRF2 (nuclear factor, erythroid 2-like 2), KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1)



12. ábra Az NRF2 farmakológiai aktiválása fokozta az NRF2 célgénjeinek az expresszióját a 4T1 emlőtumorsejtekben

A 4T1 sejteket NRF2 aktivátorral (RA839) kezeltük 48 órán keresztül a jelölt koncentrációkban, majd RT-qPCR segítségével megmértük az NRF2 célgénjeinek, az NQO1, GCLC, CAT ÉS HMOX1 expresszióját (n=3). A fold change adatokat log2 transzformáltuk és átlag ± SEM formában adtuk meg. A ** és *** statisztikai szignifikanciát mutat a kontroll és RA839-el kezelt csoportok között, ahol p < 0,01 és p < 0,001.

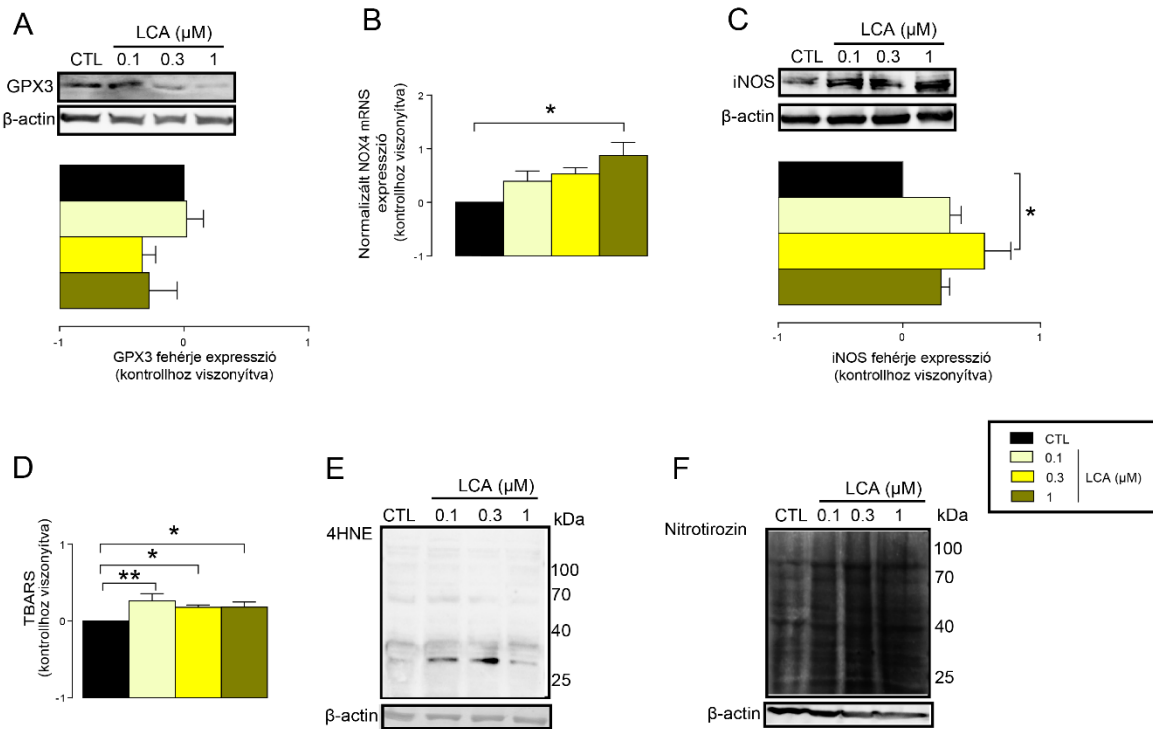
Rövidítések: NRF2 (nuclear factor, erythroid 2-like 2), NQO1 (NAD(P)H kinon-dehidrogenáz 1), GCLC (glutamát-cisztein ligáz katalitikus alegység), HMOX1 (hemoxigenáz 1), CAT (kataláz), RT-qPCR (valós idejű kvantitatív PCR)

6.1.2. A litokólsav az NRF2 gátlásán keresztül oxidatív stresszt indukál, mely citosztázishoz vezet

Az előzőekben kimutattuk, hogy az LCA kezelés befolyásolja a sejtek antioxidáns védelmét. Ezzel összhangban azt találtuk, hogy az NRF2 mellett egy másik antioxidáns, a GPX3 fehérje szintje is csökkent az LCA kezelés hatására (13.A. ábra). Az antioxidáns és prooxidáns rendszerek közötti egyensúly felborulása oxidatív-nitrozatív stressz kialakulásához vezet. Több kutatócsoport rámutatott arra, hogy az oxidatív stressz emelkedése a daganatsejtekben felelős lehet a sejtek pusztulásáért [17–19]. Az antioxidánsok mellett megvizsgáltuk néhány prooxidáns gén kifejeződését is az LCA kezelés hatására. Azt találtuk, hogy az LCA emelte egy fontos ROS termelő enzim, a NADPH oxidáz 4 (NOX4) mRNA expresszióját (13.B. ábra), valamint az iNOS fehérje szintjét, ami a sejtekben az egyik fő NO forrás (13.C. ábra). Ezenkívül az LCA fokozta a lipidperoxidációt a 4T1 sejtekben, amit a TBARS (13.D ábra) és 4HNE-adduktumok emelkedett szintje jelzett (13.E ábra).

Az iNOS fehérje emelkedett kifejeződése egy megnövekedett ONOO⁻ termelésre utalhat a sejtekben, ami fokozott nitrozatív stresszt jelez [190]. A szuperoxid és a nitrogén monoxid reakciójában keletkező peroxinitrit egy káros reaktív gyök, amely képes módosítani

az aromás aminosavakat is, így például a nitrotirozin képződése a fehérjékben a peroxinitrit-képződés egyik biomarkerének tekinthető. Kimutattuk, hogy az LCA-val kezelt 4T1 sejtekben megemelkedik a nitrotirozin szintje (13.F ábra).



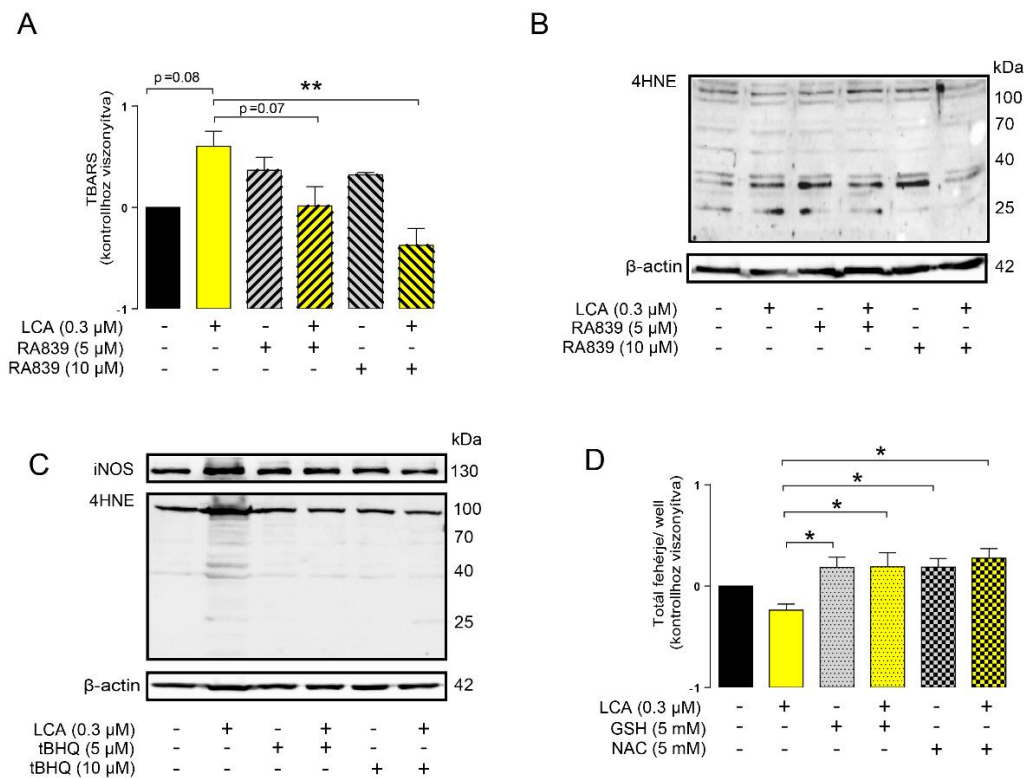
13. ábra Az LCA fokozta az oxidatív-nitrozatív stresszt a 4T1 emlőtumorsejtekben

(A-F) A 4T1 sejteket LCA-val kezeltük a jelölt koncentrációkban 48 órán keresztül. (A) A GPX3 antioxidáns fehérje szintjét Western blot módszerrel elemeztük (n=4). (B) A NOX4 gén mRNS expresszióját RT-qPCR módszerrel vizsgáltuk (n=4). (C) Az iNOS fehérje mennyiségét Western blot technikával elemeztük (n=3). (D) A lipidperoxidáció mértékét TBARS módszerrel határoztuk meg (n=3). (E) A 4HNE fehérje adduktumok szintjét Western blot módszerrel vizsgáltuk (representatív ábra, n=3). (F) A Nitrotirozin mennyiségét Western blot módszerrel vizsgáltuk (representatív ábra, n=3). A 4HNE és Nitrotirozin esetében a három független kísérlet hasonló eredményt mutatott. A föld adatokat log₂ transzformáltuk és átlag ± SEM formában adtuk meg. A * és ** statisztikai szignifikanciát mutat a kontroll és LCA kezelt minták között, ahol p < 0,05 és p < 0,01.

Rövidítések: LCA (litokólsav), GPX3 (glutation-peroxidáz-3), NOX4 (NADPH oxidáz 4), iNOS (indukálható nitrogén-monoxid szintáz), TBARS (tiobarbitursav reaktív anyagok), 4HNE (4-hidroxinonenál)

Kíváncsiak voltunk arra, hogy az NRF2 aktivációja milyen hatással van a fent leírt változásokra, vagyis az LCA okozta oxidatív-nitrozatív stressz NRF2 függő módon valósul-e meg. Kimutattuk, hogy az NRF2 farmakológiai aktivációja (RA839, tBHQ) megakadályozta mind a TBARS (14.A ábra) és 4HNE (14.B ábra) szintjének emelkedését, mind az iNOS fehérje szintjének növekedését, amikor együtt alkalmaztuk az LCA-val (14.C ábra). Ezen eredményekből arra következtettünk, hogy az LCA az NRF2 gátlásán keresztül képes fokozni az oxidatív-nitrozatív stressz folyamatokat az emlőtumorsejtekben.

Ezt követően azt vizsgáltuk meg, hogy az LCA-indukálta oxidatív stressz szerepet játszik-e az LCA antiproliferatív hatásának kialakításában. Ennek érdekében a sejteket tiol-antioxidánsokkal, GSH-val és NAC-cal kezeltük 5mM végkoncentrációban [191] LCA jelenlétében. A GSH és a NAC antioxidáns hatásuk révén fontos szerepet játszanak a sejtek egészségének megőrzésében és az oxidatív stressz elleni védelemben [192]. Azt tapasztaltuk, hogy mind a GSH, mind a NAC gátolták az LCA által kiváltott antiproliferatív hatást (14.D ábra).



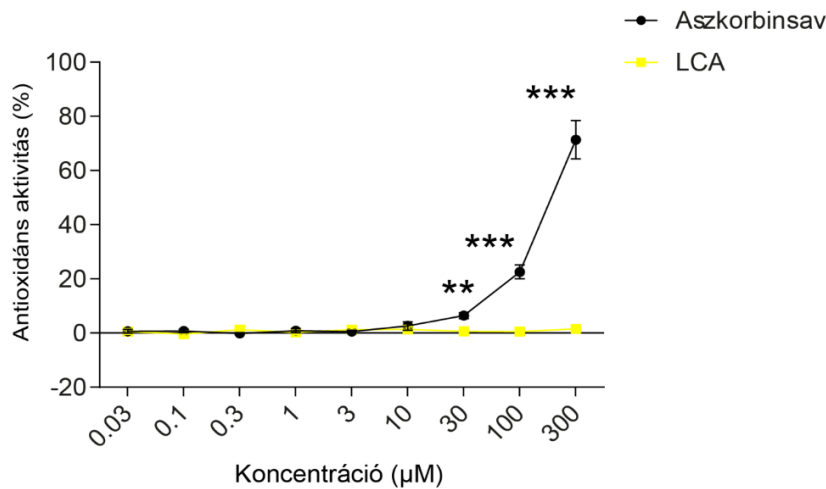
14. ábra Az NRF2 aktiválása befolyásolta az LCA-indukált oxidatív stresszt a 4T1 emlőtumorsejtekben

A 4T1 sejteket LCA-val és NRF2 aktivátorokkal (RA839 és tBHQ) kezeltük a jelölt koncentrációkban 48 órán keresztül. A lipidperoxidáció mértékét (A) TBARS (n=4) próbával és (B, C) a 4HNE fehérje adduktumok szintjének Western blot analízisével vizsgáltuk. (D) A 4T1 sejteket LCA, NAC, GSH anyagokkal kezeltük önmagukban és kombinálva is 48 órán keresztül, majd szulforodamin B festés segítségével vizsgáltuk a teljes fehérjemennyiséget. A statisztikai analízishez ANOVA, Dunnett post-hoc tesztet végeztünk. Az adatokat átlag \pm SEM formában adtuk meg. A* és ** statisztikai szignifikanciát mutat a jelölt minták között, ahol $p < 0,05$ és $p < 0,01$.

Rövidítések: LCA (litokólsav), TBARS (tiobarbitursav reaktív anyagok), 4HNE (4-hidroxinonenál), NAC (N-acetil-cisztein), GSH (glutation), iNOS (indukálható nitrogén-monoxid szintáz), tBHQ (terc-butilhidrokinon)

Kimutattuk azt is, hogy az LCA-nak önmagában nincs gyökfogó hatása a vizsgálatunkban használt koncentrációban (0,1-1 μ M), illetve magasabb koncentrációban (300 μ M-ig) sem, ahol az aszkorbinsav antioxidánsként hatott (15. ábra). Ezen eredmények azt

jelzik, hogy az LCA az NRF2 gátlásán keresztül oxidatív stresszt indukál, mely citosztázist idéz elő.



15. ábra Az LCA önmagában nem fejt ki antioxidáns hatást

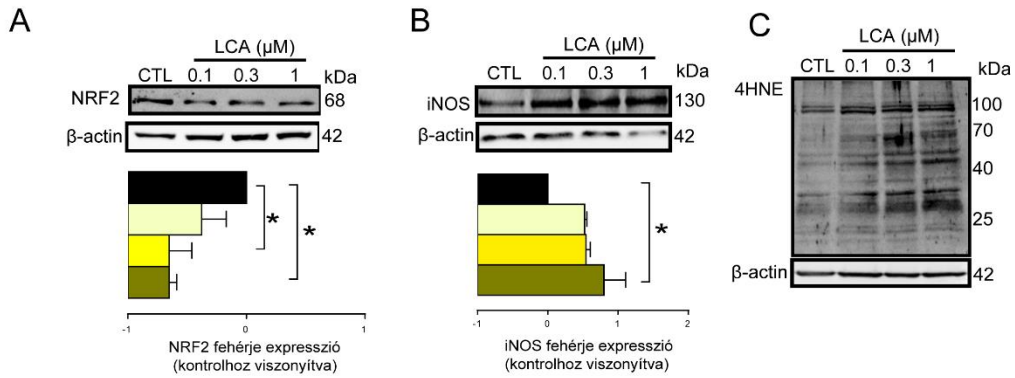
Az ABTS-gyökfogó vizsgálatot 96 lyukú tenyésztőedényben végeztük három technikai párhuzamost alkalmazva. Az LCA-t 0,03-300 µM koncentráció tartományban vizsgáltuk. Pozitív kontrollként aszkorbinsavat használtunk. Az antioxidáns aktivitást a kontroll minták százalékában fejeztük ki. Az adatokat átlag ± SEM formában adtuk meg. A ** és *** statisztikai szignifikanciát mutat az LCA-val és aszkorbinsavval kezelt csoportok között, ahol $p < 0,01$ és $p < 0,001$.

Rövidítések: LCA (litokólsav)

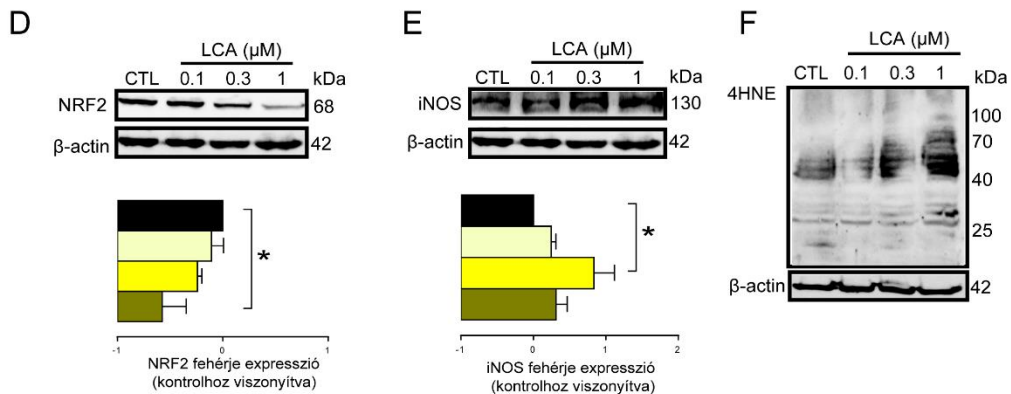
6.1.3. A litokólsav hatásai humán emlődaganatsejtekben is kimutathatóak

Annak érdekében, hogy megállapítsuk az LCA-okozta változások nemcsak a 4T1 egér emlődaganatsejtekre korlátozódnak, MCF7 és SKBR-3 humán emlőkarcinóma sejtekben is megvizsgáltunk néhány LCA-okozta változást. Hasonlóan a 4T1 sejtekhez, az LCA kezelés csökkentette az NRF2 fehérje kifejeződését (16.A ábra) és növelte mind az iNOS (16.B ábra), mind a 4HNE szintjét (16.C ábra) mindkét humán emlőkarcinóma sejtvonalban. Az LCA nem befolyásolta az NRF2, a KEAP1 vagy a 4HNE fehérje adduktumok szintjét a nem transzformált, humán fibroblasztokban (16.G,H ábra), ami azt mutatja, hogy az LCA hatásai emlődaganatra specifikusak.

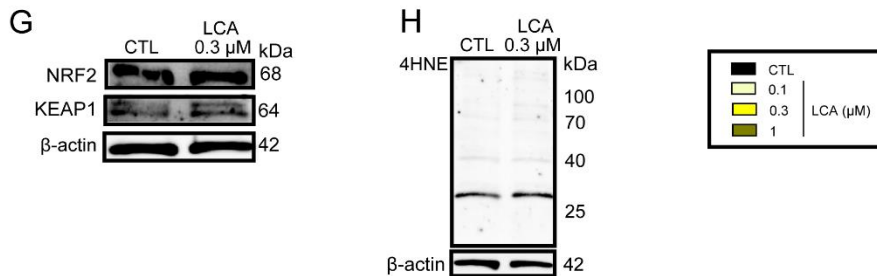
MCF7



SKBR-3



Fibroblaszt



16. ábra Az LCA oxidatív stresszt indukált az MCF7 és SKBR-3 humán emlőtumorsejtekben, míg a humán fibroblaszt sejtekben nem fejtett ki hatást

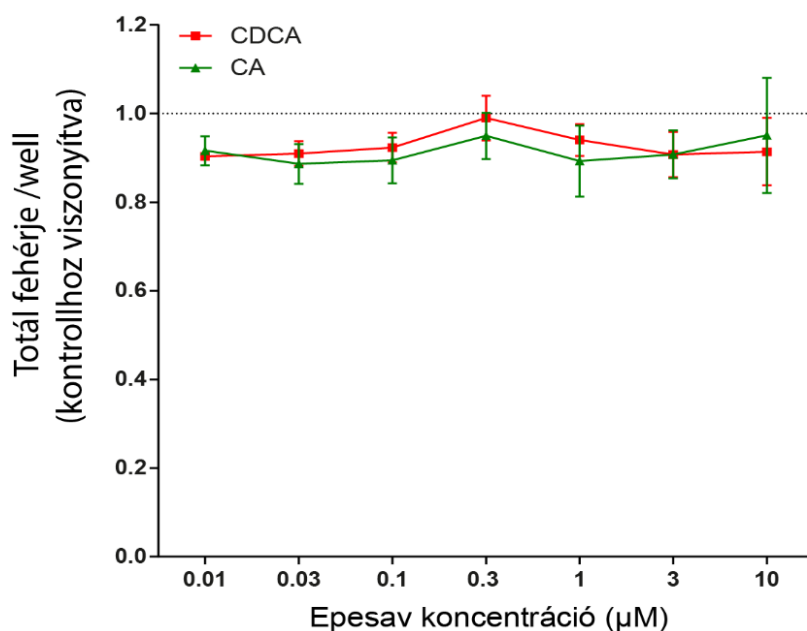
(A-C) Az MCF7 sejteket 48 órán keresztül LCA-val kezeltük a megadott koncentrációkban, majd az (A) NRF2, (B) iNOS, (C) 4HNE fehérje szintjét Western blot technikával vizsgáltuk meg ($n = 3$). (D-F) Az SKBR-3 sejteket 48 órán keresztül LCA-val kezeltük a jelölt koncentrációkban, majd az (D) NRF2, (E) iNOS, (F) 4HNE expresszióját Western blot módszerrel határoztuk meg ($n = 3$). A felső paneleken egy reprezentatív eredmény, míg az alsó paneleken a Western blot kísérletek denzitometriás eredménye látható. A 4HNE esetében a három független kísérletben hasonló eredményeket kaptunk. (G, H) A humán fibroblaszt sejteket $0,3 \mu\text{M}$ LCA-val kezeltük 48 órán keresztül, majd az (G) NRF2, KEAP1 és (H) 4HNE fehérje szintjét Western blot módszerrel határoztuk meg. Az adatokat átlag \pm SEM formában adtuk meg. A * statisztikai szignifikanciát mutat a kontroll és LCA-val kezelt csoportok között, ahol $p < 0,05$.

Rövidítések: LCA (litokólsav), NRF2 (nuclear factor, erythroid 2-like 2), KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), 4HNE (4-hidroxinonenál), iNOS (indukálható nitrogén-monoxid szintáz)

6.1.4. Az elsődleges epesavak nem befolyásolják az emlődaganatsejtek proliferációját

Az elsődleges epesavakból a bél mikrobiomja közreműködésével másodlagos epesavak keletkeznek, az utóbbiakat tekintjük bakteriális metabolitoknak. A CA elsődleges epesavból DCA, míg a CDCA-ból LCA és UDCA keletkeznek. Az LCA a CDCA-konjugátumok dekonjugációjával és a 7-es szénatom 7-HSDH általi dehidroxilálásával keletkezik [126].

A következőkben azt vizsgáltuk meg, hogy az elsődleges epesavak képesek-e befolyásolni az emlődaganatsejtek proliferációját. Kísérleteinkben azt találtuk, hogy az elsődleges epesavak, a CA és a CDCA, a humán szérumban mért koncentrációjuknak megfelelő koncentrációban [128] nem csökkentették szignifikánsan a 4T1 emlődaganatsejtek proliferációját (17. ábra).



17. ábra Az elsődleges epesavak nem befolyásolták a 4T1 emlőtumorsejtek proliferációját

A 4T1 sejteket CA-val és CDCA-val kezeltük a jelölt koncentrációkban 48 órán keresztül, majd szulfuradamin B festés segítségével meghatároztuk a teljes fehérje mennyiséget (n=4). Az adatokat átlag ± SEM formában adtuk meg.

Rövidítések: CA (kólsav), CDCA (kenodezoxikólsav)

6.1.5. A litokólsav okozta oxidatív stresszt a TGR5 és CAR receptorok közvetítik

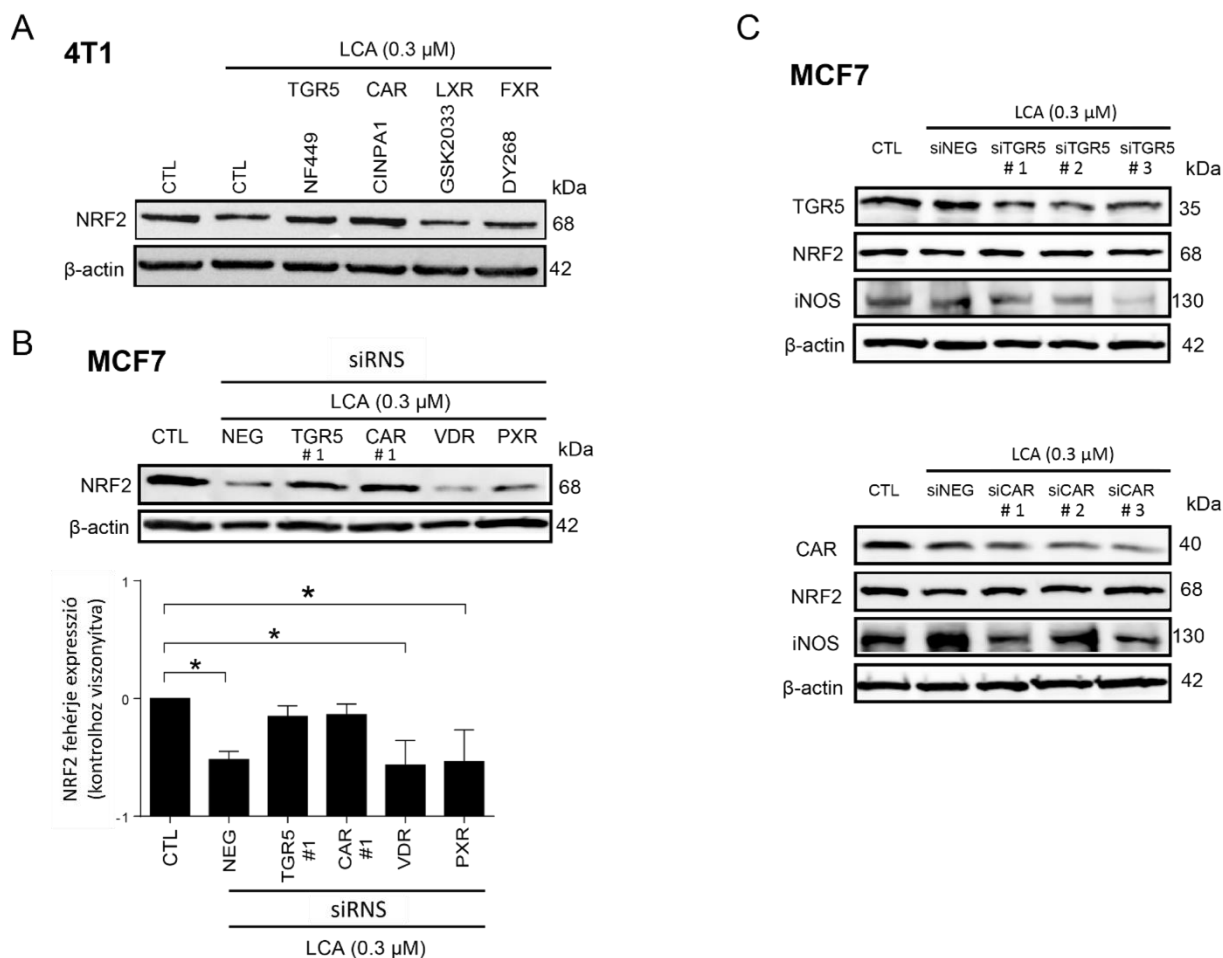
További célunk az volt, hogy azonosítsuk azt a receptort vagy receptorokat, melyeken keresztül az LCA hatásait kifejtheti. Az LCA számos magreceptorhoz, mint a VDR, FXR, CAR, PXR, LXR és membránreceptorhoz, köztük a TGR5 receptorhoz is képes kötődni és rajtuk keresztül hatást kifejteni [18].

A receptorok gátlására először farmakológiai szereket alkalmaztunk LCA-val (0,3 μ M) kombinált kezelésben 5 μ M végkoncentrációban [193–196]. Az NF449, a CINPA1, a GSK2033, és a DY268 képesek az epesavak ismert receptorainak a szelektív gátlására, így általuk vizsgálható, hogy az LCA mely receptorokon keresztül képes közvetíteni az előzőleg leírt hatásait. Eredményeink azt mutatták, hogy az LCA-indukálta NRF2 fehérje szint csökkenést a TGR5 útvonalat gátló NF449 és a CAR-t gátló CINPA1 gátlószer megakadályozták, míg a LXR-t gátló GSK2033 és a FXR-t gátló DY268 inhibitorok hatástalanok voltak (18.A ábra).

A fent említett farmakológiai kísérleteket siRNS-depléciós kísérletekkel egészítettük ki. A TGR5 és CAR receptorok a farmakológiai kísérletek alapján potenciális receptorok lehetnek, melyek az LCA hatásait közvetítik. Ezeken kívül egyéb lehetséges LCA receptort, köztük a VDR és PXR receptorokat is megvizsgáltuk ebben a kísérletsorozatban. Annak érdekében, hogy egy átfogóbb képet kapjunk csendesítettük a TGR5, CAR, VDR és PXR receptorokat az MCF7 humán emlőtumor sejtvonalban.

A farmakológiai szerekekhez hasonlóan a TGR5 és CAR receptorok csendesítése hatékonyan blokkolta az LCA által indukált NRF2 fehérje szint csökkenését (18.B ábra), míg a VDR és PXR receptorok csendesítése nem befolyásolta az NRF2 fehérje szintjét (18.B ábra). Vizsgáltuk az iNOS fehérje kifejeződését is a TGR5 és CAR receptorok csendesítése után és azt tapasztaltuk, hogy mind a TGR5, mind a CAR receptor csendesítése tompította az LCA- okozta emelkedett iNOS fehérje kifejeződését (18.C ábra).

Ezen eredmények az mutatják, hogy az LCA a TGR5 és a CAR receptorokon keresztül fejti ki az oxidatív stresszre gyakorolt hatásait az emlődaganatsejtekben.



18. ábra Az LCA által kiváltott oxidatív stressz válaszokat a TGR5 és a CAR receptorok közvetítik

(A) A 4T1 emlőtumorsejteket 0,3 μM LCA-val és NF449, CINPA1, DY268, vagy GSK2033 receptor inhibitorokkal kezeltük (5 μM) 48 órán keresztül, majd az NRF2 fehérje expresszióját Western blot módszer segítségével detektáltuk (reprezentatív ábra, n=2). (B, C) Az MCF7 emlőtumorsejtekben siRNS technikával csendesítettük a TGR5, CAR, VDR és PXR receptorokat. 48 óra elteltével az (B, C) NRF2 és (C) iNOS fehérjék szintjét Western blot módszerrel határoztuk meg (n=3). Az adatokat átlag ± SEM formában adtuk meg. A * statisztikai szignifikanciát mutat a kontroll és a kezelt csoportok között, ahol p < 0,05

Rövidítések: LCA (litokólsav), NRF2 (nuclear factor, erythroid 2-like 2), iNOS (indukálható nitrogén-monoxid szintáz) CAR (konstitutív androsztán receptor), FXR (farnezooid X-aktivált receptor), LXR (máj X receptor), PXR (pregnán X receptor), TGR5 (Takeda G-fehérje kapcsolt receptor), VDR (vitamin D receptor)

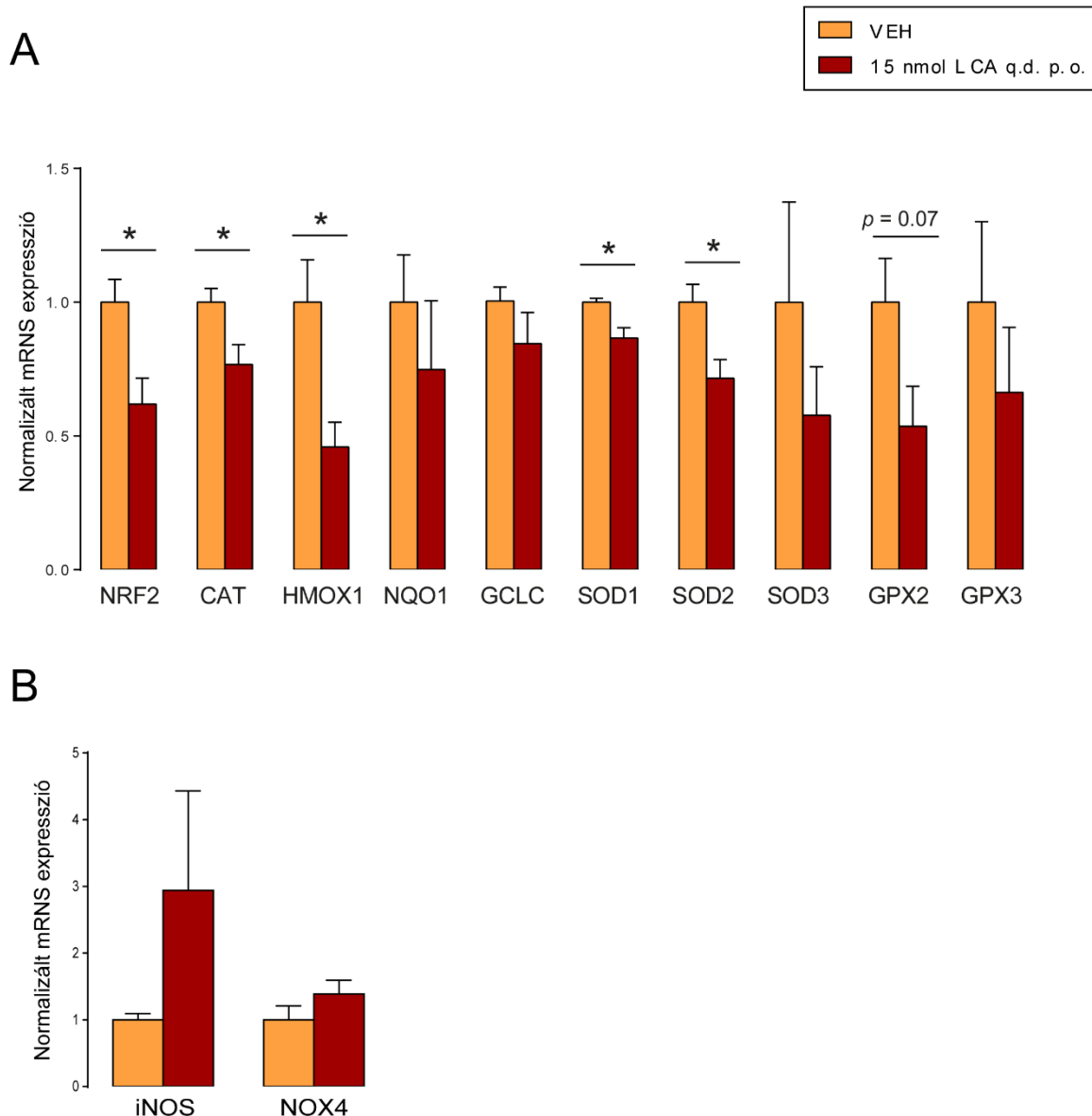
6.1.6. Az LCA gátolta az antioxidáns védelmet az emlődaganat egérmódeljében

A következőkben azt vizsgáltuk meg, hogy az LCA befolyásolja-e a tumorok redox állapotát *in vivo* környezetben. Korábbi vizsgálatunkból származó mintákon végeztünk méréseket. Abban a tanulmányban Balb/c nőstény egereket oltottunk 4T1 egér emlőtumorsejtekkel, és naponta 15 nmol LCA-val kezeltük az állatokat orálisan két héten keresztül. A vizsgálat végén az egereket feláldoztuk és a tumorokat begyűjtöttük. Abban a tanulmányban kimutattuk, hogy az LCA

kezelés *in vivo* gátolja a tumornövekedést, a metasztázis képződést, az EMT folyamatát és a bioenergetikai változásokat [18].

Jelen vizsgálatban a kontroll és LCA kezelt egerekből származó tumorokban az anti- és pro-oxidáns gének mRNS expresszióját mértük meg. Az LCA szignifikánsan csökkentette az antioxidáns NRF2, CAT, HMOX1, SOD1 és SOD2 gének mRNS szintjét (19. ábra). Továbbá, az LCA-val kezelt egerekben a prooxidáns iNOS és NOX4 expressziója emelkedő tendenciát mutatott (19.B ábra).

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az LCA képes befolyásolni a daganatsejtek redox egyensúlyát *in vivo* is, ami kedvező hatással lehet a betegség kimenetelére.



19. ábra Az LCA befolyásolta az antioxidáns és prooxidáns gének expressziós szintjét *in vivo*

(A, B) Nőstény Balb/c egereket 4T1 emlőtumorsejtekkel oltottunk be, és naponta kezeltük őket LCA-val (15 nmol q.d. p.o.) vagy vehikulummal ($n = 5/5$) két héten keresztül. Az antioxidáns és prooxidáns gének expressziós szintjét RT-qPCR segítségével határoztuk meg a tumorokban. Az adatokat átlag \pm SEM formában adtuk meg. A * statisztikai szignifikanciát mutat a kontroll és kezelt csoportok között, ahol $p < 0,05$.

Rövidítések: LCA (litokólsav), CAT (kataláz), GCLC (glutamát-cisztein ligáz katalitikus alegység), GPX2-3 (glutation-peroxidáz 2-3), HMOX1 (hemoxigenáz 1), iNOS (indukálható nitrogén-monoxid szintáz), NOX4 (NADPH oxidáz 4), NQO1 (NAD(P)H kinon-dehidrogenáz 1), NRF2 (nuclear factor, erythroid 2-like 2), SOD1-3 (szuperoxid-dizmutáz 1-3), VEH (vehikulum)

6.1.7. A litokólsav által kiváltott daganatellenes útvonal elemei korrelációt mutattak a betegség stádiumával, grádusával és a receptor státusszal

Az LCA-indukált oxidatív/nitrozatív stressz markereinek (TGR5, iNOS és 4HNE) expresszióját 88 emlőrákos beteg tumormintáiból készített szöveti mikroarray (TMA)

segítségével vizsgáltuk. Ezzel párhuzamosan adatgyűjtésre a rendelkezésre álló nyilvános expressziós adatbázisokat, a GEO Profiles-t (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles/>) és a Kaplan-Meier Plotter-t (<https://kmplot.com/analysis/>) [50] használtuk.

Először a betegeket (TMA-hoz használt betegek szövetszövetmintái) a betegség stádiuma alapján (I-IV. stádium) sztratifikáltuk, ami a primer tumor méretet, a nyirokcsomó érintettségét és a távoli áttéteket veszi figyelembe [197]. Korábban már kimutattuk, hogy a bélmikrobiom LCA-termelése csökkent az emlődaganatban, és ez a csökkenés az emlődaganat korai stádiumára volt jellemző [18]. Ebben a tanulmányban az találtuk, hogy az iNOS és a 4HNE szintje csökkent a II. és III. stádiumú betegeknél az I. stádiumú betegekhez képest, és tovább csökkent a IV. stádiumú betegeknél (20.A ábra).

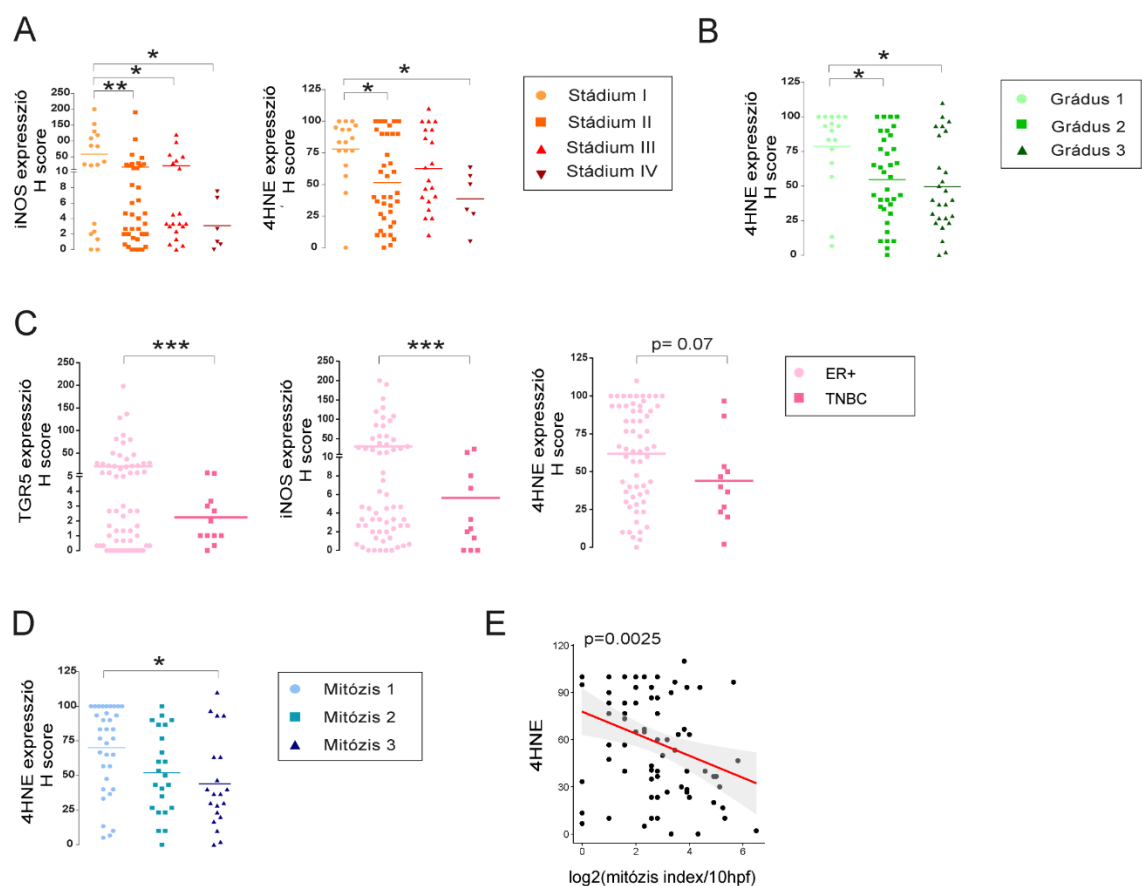
Ezután a betegeket a betegség patológiai grádusa (Nottingham grádus) alapján is osztályoztuk. A 4HNE expressziója szignifikánsan csökkent az 2-es és 3-as grádusú betegeknél az 1-es grádusú betegekhez képest (20.B ábra). Ezzel összhangban a KEAP1 magas expressziója a 2-es grádusú betegek jobb túlélésével, míg a CAR magas expressziója a 3-as grádusú betegek jobb túlélésével korrelált (5. táblázat).

A betegeket receptor státuszuk alapján is besoroltuk, TNBC és ER+ esetekre. A TGR5, iNOS és a 4HNE expressziója csökkent a TNBC esetekben az ER+ esetekhez képest (20.C ábra). Ezzel összhangban az összes beteg, illetve az ER+ betegcsoportok esetében a CAR, KEAP1, iNOS, nNOS, NOX4 magas expressziója és az NRF2 alacsony expressziója a betegek jobb túlélésével járt együtt. Ez a TNBC esetekre ez nem volt igaz (21. ábra).

Végül a betegeket a sejtosztódási index (mitosis score) alapján is osztályoztuk. A szöveti oxidatív károsodás direkt indikátorának, a 4HNE-nek a festődése a sejtosztódási index növekedésével csökkent (20.D ábra). 4HNE festődés erős negatív korrelációt mutatott a mitotikus indexszel (20.E ábra).

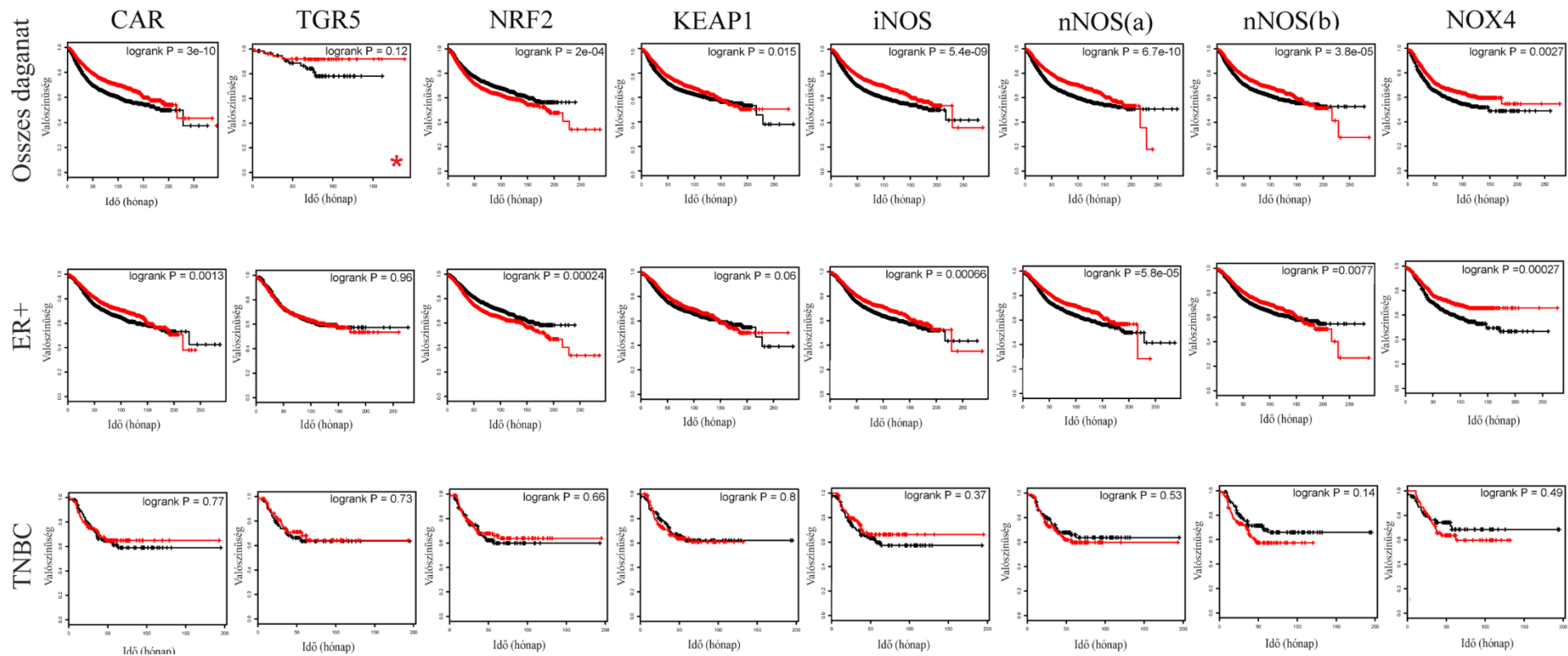
Ezekkel összhangban a TMA-vizsgálatban megfigyeltük, hogy az iNOS festődése jól megőrződött a környező egészséges emlőszövetben, míg a daganatszövetekben elveszett; az NRF2 expressziója a daganatszövetben magas volt a szomszédos egészséges szövetekhez képest. Megfigyeléseinket alátámasztotta az is, hogy a GEO adatbázisban találtunk egy adathalmazt [62], amelyben a TGR5 receptor expressziója alacsonyabb volt a ductus in situ (DCIS) esetekben a kontroll, egészséges emlőszövethez képest.

Összességében elmondható, hogy az LCA-TGR5-oxidatív stressz útvonal elemeinek overexpressziója jobb túlélést biztosított az emlődaganatos betegek esetében. Az LCA-TGR5-oxidatív stressz útvonal protektív funkcióval bírhat az emlődaganatban, ezen útvonal génjeinek elvesztése rossz klinikai prognózissal társul.



20. ábra Az LCA-indukált oxidatív stressz útvonal védő hatású az emberi emlődaganatban

(A-D) Az oxidatív/nitrozatív stressz markerek expressziós szintjeit 88 emlődaganatos beteg tumormintáiban elemeztük szöveti mikroarray (TMA) segítségével. (A) A betegeket a betegség stádiuma (stádium I-IV), (B) a betegség patológiai grádusa (grádus 1-3), (C) ER+ és TNBC esetek és (D) mitózis index (1-3) alapján sztratifikáltuk, és az ábrán jelzett markergének expressziós szintjét IHC-analízis segítségével határoztuk meg. (E) A 4HNE expressziós szintje és a mitózis index közötti korreláció lineáris regresszióját R projekt segítségével végeztük; 4HNE: Pearson $r = -0,34$; $p = 0,0025$. A vonal az adatok lineáris regresszióját mutatja; 4HNE: $y = 78 - 7x$. A *, ** és *** betegcsoportok közötti szignifikáns különbségeket jelzi, ahol $p < 0,05$, $p < 0,01$ vagy $p < 0,001$. Rövidítések: TGR5 (Takeda G-fehérje kapcsolt receptor), 4HNE (4-hidroxinonenál), TNBC (tripla negatív emlődaganat), ER (ösztrogén receptor), iNOS (indukálható nitrogén-monoxid szintáz)



21. ábra Az LCA-TGR/CAR útvonal komponensei védő hatásúak az emberi emlőrákban

A CAR, TGR5, NRF2, KEAP1, iNOS, nNOS és NOX4 expressziójának az emlőrákos betegek túlélésére gyakorolt hatását a kmpot.com adatbázis használatával vizsgáltuk. Az vizsgálat során az összes daganatos esetet, valamint az ER-pozitív és a TNBC csoportba sorolható eseteket elemeztük. Az ER+ populációba azok a betegek is beletartoztak, akiknél az ER-státuszt génexpressziós adatokból vezették le. A TNBC esetek közé a mindhárom receptorra (ER, PR, HER2) negatív esetek tartoztak, beleértve azokat a betegeket is, ahol az ER-státuszt génexpressziós adatokból vezették le. A piros vonal magas, míg a fekete vonal alacsony expressziós szintet jelez. A próbák azonosítóit, a kockázati számokat és a kockázati arányokat az 5. táblázatban gyűjtöttük össze. Az 1-es grádusba tartozó betegeket * jelöli.

Rövidítések: CAR (konstitutív androsztán receptor), TGR5 (Takeda G-fehérje kapcsolt receptor), NRF2 (nuclear factor, erythroid 2-like 2), KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), iNOS (indukálható nitrogén-monoxid szintáz), nNOS (neuronális nitrogén-monoxid szintáz), NOX4 (NADPH oxidáz 4), ER (ösztrogén receptor)

CAR (207007_a_at)	HR	p-érték
Összes emlőrákos eset, N = 3951	0.7	3.00 × 10⁻¹⁰
Grádus 1, N = 345	1.15	0.61
Grádus 2, N = 901	0.88	0.3
Grádus 3, N = 903	0.72	0.0036
ER(+), N = 3082	0.81	0.0013
ER(-), N = 869	0.62	9.20 × 10⁻⁶
PR(+), N = 589	0.72	0.063
PR(-), N = 549	0.9	0.49
Nyirok(+), N = 1133	0.97	0.73
Nyirok(-), N = 2020	0.99	0.93
HER2(+), N = 252	0.69	0.1
HER2(-), N = 800	1.13	0.37
ER(+), PR(+), N = 577	0.79	0.19
ER(+), PR(+), Nyirokcsomó (+), N = 344	0.99	0.97
ER(+), PR(+), Nyirokcsomó (-), N = 228	0.5	0.037
ER(-), PR(-), N = 298	0.74	0.14
ER(-), PR(-), Nyirokcsomó(+), N = 127	0.76	0.3
ER(-), PR(-), Nyirokcsomó(-), N = 167	0.97	0.93
ER(-), PR(-), HER2(-), N = 198	0.93	0.77
Bazális altípus, N = 618	0.68	0.0025
Luminális A, N = 1933	0.76	0.0015
Luminális B, N = 1149	0.77	0.0069
ER(+), HER2(+), N = 156	1.21	0.53
ER(-), HER2(+), N = 96	0.61	0.12
TGR5 (1552501_at)	HR	p-érték
Összes emlőrákos eset, N = 3951	0.91	0.25
Grádus 1, N = 345	0.41	0.12
Grádus 2, N = 901	1.21	0.46
Grádus 3, N = 903	0.77	0.1
ER(+), N = 3082	1	0.98
ER(-), N = 869	0.74	0.025
PR(+), N = 589	1.21	0.33
PR(-), N = 549	0.96	0.81
Nyirokcsomó(+), N = 1133	0.98	0.9
Nyirokcsomó(-), N = 2020	0.91	0.61
HER2(+), N = 252	1.12	0.68
HER2(-), N = 800	0.91	0.51
ER(+), PR(+), N = 577	1.18	0.4
ER(+), PR(+), Nyirokcsomó(+), N = 344	1.39	0.19
ER(+), PR(+), Nyirokcsomó(-), N = 228	0.76	0.4
ER(-), PR(-), N = 298	0.96	0.86
ER(-), PR(-), Nyirokcsomó(+), N = 127	0.96	0.89
ER(-), PR(-), Nyirokcsomó(-), N = 167	1.25	0.61
ER(-), PR(-), HER2(-), N = 198	0.9	0.73
Bazális altípus, N = 618	0.79	0.15
Luminális A, N = 1933	1.1	0.44
Luminális B, N = 1149	0.83	0.24
ER(+), HER2(+), N = 156	1.07	0.88
ER(-), HER2(+), N = 96	0.94	0.86
NRF2 (201145_at)	HR	p-érték
Összes emlőrákos eset, N = 3951	1.23	2.00 × 10⁻⁴
Grádus 1, N = 345	1.1	0.72
Grádus 2, N = 901	0.87	0.25
Grádus 3, N = 903	1.06	0.63
ER(+), N = 3082	1.27	2.40 × 10⁻⁴
ER(-), N = 869	1.04	0.71
PR(+), N = 589	1.23	0.24
PR(-), N = 549	1.49	0.0075
Nyirokcsomó(+), N = 1133	1.14	0.21
Nyirokcsomó(-), N = 2020	1.11	0.21
HER2(+), N = 252	1.32	0.21
HER2(-), N = 800	1.34	0.031
ER(+), PR(+), N = 577	1.27	0.19
ER(+), PR(+), Nyirokcsomó (+), N = 344	1.08	0.71
ER(+), PR(+), Nyirokcsomó (-), N = 228	1.96	0.051
ER(-), PR(-), N = 298	1.01	0.95
ER(-), PR(-), Nyirokcsomó (+), N = 127	1.23	0.45
ER(-), PR(-), Nyirokcsomó (-), N = 167	0.93	0.8
ER(-), PR(-), HER2(-), N = 198	0.9	0.66
Bazális altípus, N = 618	1.01	0.95
Luminális A, N = 1933	1.33	0.0011
Luminális B, N = 1149	1.26	0.017
ER(+), HER2(+), N = 156	1.69	0.097
ER(-), HER2(+), N = 96	1.26	0.47

KEAPI (202417_at)	HR	p-érték
Összes emlőrákos eset, N = 3951	0.84	0.0015
Grádus 1, N = 345	0.98	0.94
Grádus 2, N = 901	0.73	0.012
Grádus 3, N = 903	0.93	0.54
ER(+), N = 3082	0.89	0.06
ER(-), N = 869	0.92	0.41
PR(+), N = 589	1.09	0.64
PR(-), N = 549	0.91	0.55
Nyirokcsomó(+), N = 1133	0.76	0.006
Nyirokcsomó(-), N = 2020	0.98	0.83
HER2(+), N = 252	1.14	0.57
HER2(-), N = 800	0.92	0.55
ER(+), PR(+), N = 577	1.06	0.76
ER(+), PR(+), Nyirokcsomó (+), N = 344	0.98	0.91
ER(+), PR(+), Nyirokcsomó (-), N = 228	1.38	0.33
ER(-), PR(-), N = 298	0.95	0.82
ER(-), PR(-), Nyirokcsomó (+), N = 127	1	1
ER(-), PR(-), Nyirokcsomó (-), N = 167	1.12	0.72
ER(-), PR(-), HER2(-), N = 198	1.07	0.8
Bazális altípus, N = 618	1	0.98
Luminális A, N = 1933	0.9	0.24
Luminális B, N = 1149	0.91	0.36
ER(+), HER2(+), N = 156	0.89	0.7
ER(-), HER2(+), N = 96	1.18	0.61
iNOS (210037_at)	HR	p-érték
Összes emlőrákos eset, N = 3951	0.72	5.40 × 10⁻⁹
Grádus 1, N = 345	1.21	0.48
Grádus 2, N = 901	0.95	0.68
Grádus 3, N = 903	0.85	0.15
ER(+), N = 3082	0.8	0.00066
ER(-), N = 869	0.63	1.40 × 10⁻⁵
PR(+), N = 589	1.34	0.099
PR(-), N = 549	1.01	0.95
Nyirokcsomó(+), N = 1133	1.12	0.25
Nyirokcsomó(-), N = 2020	1	0.96
HER2(+), N = 252	0.79	0.3
HER2(-), N = 800	1.04	0.75
ER(+), PR(+), N = 577	1.32	0.13
ER(+), PR(+), Nyirokcsomó (+), N = 344	1.52	0.058
ER(+), PR(+), Nyirokcsomó (-), N = 228	1.04	0.9
ER(-), PR(-), N = 298	0.90	0.59
ER(-), PR(-), Nyirokcsomó (+), N = 127	1.03	0.91
ER(-), PR(-), Nyirokcsomó (-), N = 167	0.91	0.77
ER(-), PR(-), HER2(-), N = 198	0.8	0.37
Bazális altípus, N = 618	0.63	0.00042
Luminális A, N = 1933	0.75	0.00082
Luminális B, N = 1149	0.77	0.0077
ER(+), HER2(+), N = 156	1.04	0.9
ER(-), HER2(+), N = 96	0.92	0.79
mNOS(a) (207309_at)	HR	p-érték
Összes emlőrákos eset, N = 3951	0.71	6.70 × 10⁻¹⁰
Grádus 1, N = 345	0.85	0.55
Grádus 2, N = 901	0.99	0.96
Grádus 3, N = 903	0.91	0.41
ER(+), N = 3082	0.77	5.80 × 10⁻⁵
ER(-), N = 869	0.68	2.80 × 10⁻⁴
PR(+), N = 589	0.79	0.19
PR(-), N = 549	1.07	0.67
Nyirokcsomó(+), N = 1133	1.08	0.47
Nyirokcsomó(-), N = 2020	0.91	0.25
HER2(+), N = 252	0.7	0.11
HER2(-), N = 800	0.92	0.51
ER(+), PR(+), N = 577	0.86	0.41
ER(+), PR(+), Nyirokcsomó (+), N = 344	1.23	0.35
ER(+), PR(+), Nyirokcsomó (-), N = 228	0.34	0.0055
ER(-), PR(-), N = 298	0.96	0.83
ER(-), PR(-), Nyirokcsomó (+), N = 127	1.07	0.8
ER(-), PR(-), Nyirokcsomó (-), N = 167	1.55	0.16
ER(-), PR(-), HER2(-), N = 198	1.17	0.53
Bazális altípus, N = 618	0.73	0.013
Luminális A, N = 1933	0.72	0.00019
Luminális B, N = 1149	0.69	0.00014
ER(+), HER2(+), N = 156	1.4	0.28
ER(-), HER2(+), N = 96	0.48	0.024

nNOS(b) (207310_at)	HR	p-érték
Összes emlőrákos eset, N = 3951	0.8	3.80 × 10⁻⁵
Grádus 1, N = 345	1.27	0.37
Grádus 2, N = 901	1.20	0.14
Grádus 3, N = 903	0.89	0.27
ER(+), N = 3082	0.84	7.70 × 10⁻³
ER(-), N = 869	0.72	1.90 × 10⁻³
PR(+), N = 589	1.07	0.72
PR(-), N = 549	1.04	0.8
Nyirokcsomó(+), N = 1133	1	0.97
Nyirokcsomó(-), N = 2020	1.09	0.34
HER2(+), N = 252	0.78	0.26
HER2(-), N = 800	1	0.97
ER(+), PR(+), N = 577	1.07	0.73
ER(+), PR(+), Nyirokcsomó (+), N = 344	1.51	0.06
ER(+), PR(+), Nyirokcsomó (-), N = 228	0.59	0.13
ER(-), PR(-), N = 298	1.18	0.41
ER(-), PR(-), Nyirokcsomó (+), N = 127	1.02	0.93
ER(-), PR(-), Nyirokcsomó (-), N = 167	1.42	0.25
ER(-), PR(-), HER2(-), N = 198	1.44	0.14
Bazális altípus, N = 618	0.76	0.037
Luminális A, N = 1933	0.75	0.0011
Luminális B, N = 1149	0.85	0.09
ER(+), HER2(+), N = 156	1.15	0.65
ER(-), HER2(+), N = 96	0.45	0.013
NOX4 (236843_at)	HR	p-érték
Összes emlőrákos eset, N = 3951	0.75	0.00027
Grádus 1, N = 345	0.76	0.6
Grádus 2, N = 901	0.68	0.14
Grádus 3, N = 903	0.69	0.79
ER(+), N = 3082	0.7	0.00027
ER(-), N = 869	0.8	0.1
PR(+), N = 589	0.71	0.082
PR(-), N = 549	1.04	0.85
Nyirokcsomó(+), N = 1133	0.78	0.057
Nyirokcsomó(-), N = 2020	1.08	0.71
HER2(+), N = 252	1.31	0.33
HER2(-), N = 800	0.81	0.16
ER(+), PR(+), N = 577	0.69	0.06
ER(+), PR(+), Nyirokcsomó (+), N = 344	0.73	0.21
ER(+), PR(+), Nyirokcsomó (-), N = 228	0.97	0.93
ER(-), PR(-), N = 298	1.23	0.41
ER(-), PR(-), Nyirokcsomó (+), N = 127	1.35	0.34
ER(-), PR(-), Nyirokcsomó (-), N = 167	1.07	0.87
ER(-), PR(-), HER2(-), N = 198	1.25	0.49
Bazális altípus, N = 618	0.72	0.046
Luminális A, N = 1933	0.71	0.0061
Luminális B, N = 1149	0.77	0.089
ER(+), HER2(+), N = 156	1.34	0.51
ER(-), HER2(+), N = 96	1.5	0.25

5. táblázat A CAR, TGR5, NRF2, KEAP1, iNOS, nNOS és NOX4 expresszió és az emlődaganatos betegek túlélése közötti összefüggés

Az CAR, TGR5, NRF2, KEAP1, iNOS, nNOS és NOX4 expresszió az emlődaganatos betegek túlélési arányára kifejtett hatását egy nyíltan elérhető adatbázis (<https://kmplot.com/analysis/>) használatával vizsgáltuk. A táblázatban feltüntetett adatok az eltérő emlőrák szubpopulációkba sorolt eseteket és az összes esetet is mutatják. A félkövér betűkkel szedett számok statisztikailag szignifikáns adatokat jelentenek, ahol $p < 0,05$.

Rövidítések: CAR (konstitutív androsztán receptor), TGR5 (Takeda G-fehérje kapcsolt receptor), NRF2 (nuclear factor, erythroid 2-like 2), KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), iNOS (indukálható nitrogén-monoxid szintáz), nNOS (neuronális nitrogén-monoxid szintáz), NOX4 (NADPH oxidáz 4), ER (ösztrogén receptor), HR (veszélyességi arány), PR (progeszteron receptor), HER2 (humán epidermális növekedési faktor receptor)

			Túlélési idő (hónap)						HR	
			0	50	100	150	200	250		
Összes daganattípus	Veszélyeztetettek száma	CAR	alacsony	1998	1154	486	124	10	2	0.7
		207007_at	magas	1953	1365	589	117	17	1	(0.63-0.79)
		TGR5	alacsony	58	41	13	1			0.41
		1552501_a_at	magas	50	44	15	4			(0.13-1.3)
		NRF2	alacsony	1977	1368	624	145	11	0	1.23
		201146_at	magas	1974	1151	451	96	16	3	(1.1-1.37)
		KEAP1	alacsony	1978	1181	513	131	17	2	0.84
		202417_at	magas	1973	1338	562	110	10	1	(0.75-0.93)
		iNOS	alacsony	1993	1154	446	107	14	2	0.72
		210037_s_at	magas	1958	1365	629	134	13	1	(0.65-0.81)
		nNOS	alacsony	1981	1128	454	114	14	3	0.71
		207309_at	magas	1970	1391	621	127	13	0	(0.64-0.79)
		nNOS	alacsony	2016	1185	470	112	15	2	0.8
		207310_s_at	magas	1935	1334	605	129	12	1	(0.71-0.89)
NOX4	alacsony	885	464	145	32	6	1	0.75		
236843_at	magas	879	513	200	36	4	1	(0.64-0.88)		
ER+	Veszélyeztetettek száma	CAR	alacsony	1561	1024	443	114	12	3	0.81
		207007_at	magas	1521	1092	476	87	10	0	(0.71-0.92)
		TGR5	alacsony	628	382	149	25	5	1	1
		1552501_a_at	magas	620	399	139	35	5	1	(0.83-1.22)
		NRF2	alacsony	1541	1132	525	113	6	0	1.27
		201146_at	magas	1541	984	394	88	16	3	(1.12-1.44)
		KEAP1	alacsony	1544	1011	448	106	14	2	0.89
		202417_at	magas	1538	1105	471	95	8	1	(0.78-1.01)
		iNOS	alacsony	1543	995	393	97	14	2	0.8
		210037_s_at	magas	1539	1121	526	104	8	1	(0.71-0.91)
		nNOS	alacsony	1544	986	407	105	17	3	0.77
		207309_at	magas	1538	1130	512	96	5	0	(0.68-0.88)
		nNOS	alacsony	1561	1013	409	101	12	2	0.84
		207310_s_at	magas	1521	1103	510	100	10	1	(0.74-0.96)
NOX4	alacsony	639	387	129	28	6	1	0.7		
236843_at	magas	609	394	159	32	4	1	(0.57-0.85)		
Tripla negatív esetek	Veszélyeztetettek száma	CAR	alacsony	99	42	13			0	0.93
		207007_at	magas	99	41	6	1 1		0	(0.57-1.51)
		TGR5	alacsony	64	30	8	1	0		0.9
		1552501_a_at	magas	62	29	9	1	0		(0.48-1.68)
		NRF2	alacsony	99	41	5		0		0.9
		201146_at	magas	99	42	14	1 1	0		(0.55-1.45)
		KEAP1	alacsony	99	44	12		0		1.07
		202417_at	magas	99	39	7	2 0	0		(0.66-1.73)
		iNOS	alacsony	99	44	15	1	0		0.8
		210037_s_at	magas	99	39	4	1	0		(0.49-1.3)
		nNOS	alacsony	100	44	16	1	0		1.77
		207309_at	magas	98	39	3	1	0		(0.72-1.9)
		nNOS	alacsony	102	51	14	2	0		1.44
		207310_s_at	magas	96	32	5	0	0		(0.89-2.35)
NOX4	alacsony	64	30	8	2	0		1.25		
236843_at	magas	62	29	9	0	0		(0.66-2.35)		

6. táblázat Numerikus értékek a kmpot adatbázisból származó adatok elemzéshez

6.2. A dezoxikólsav hatása hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekre

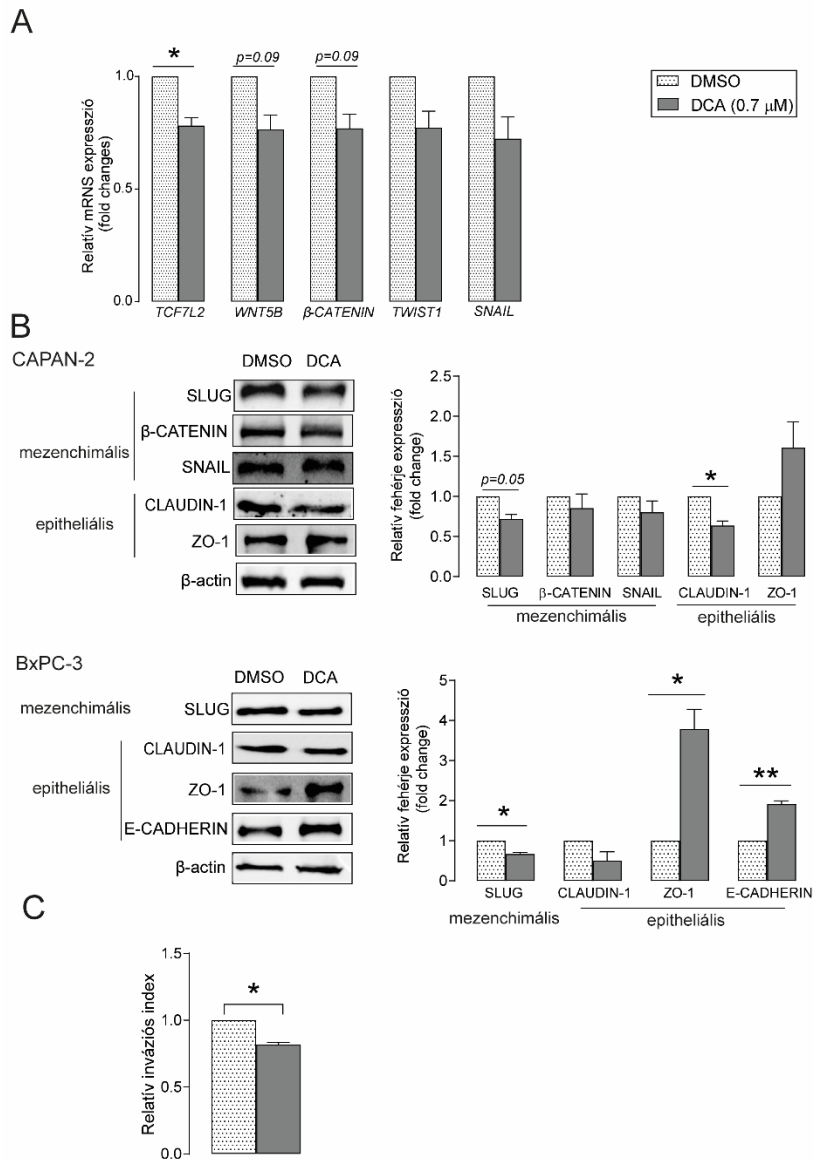
Kutatócsoportunk vizsgálja a bakteriális metabolitok hatásait más, nagy populációt érintő agresszív daganattípusokban is. Többek között vizsgáltuk egy másik másodlagos epesav, a dezoxikólsav (DCA) hatásait a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben. A daganatok klasszikus jellemvonásainak (cancer hallmarks) vizsgálatán keresztül azt tanulmányozzuk, hogyan hat a DCA a daganatsejtek működésére. Elsősorban az EMT folyamatára, az oxidatív stresszre, az összejtszerűsége és a mitokondriális aktivitásra gyakorolt hatásokra fókuszáltunk.

6.2.1. A dezoxikólsav csökkenti az EMT folyamatban szerepet játszó gének expresszióját és a sejtek inváziós képességét

Elsőként az EMT folyamatban szerepet játszó epiteliális és mezenchimális markergének mRNS és fehérje szintű kifejeződését vizsgáltuk meg a DCA kezelés hatására. A kísérleteinkben használt DCA koncentráció (0,7 μ M) megfelelt a DCA normál koncentrációjának a humán szérumban [128]. A DCA kezelés csökkentette a mezenchimális gének, TCF7L2, WNT5B, B-CATENIN, TWIST1 és SNAIL, mRNS expresszióját a CAPAN-2 humán hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben (22.A ábra).

Kimutattuk, hogy DCA hatására szignifikánsan csökkent a SLUG fehérje szintje a BxPC-3 sejtekben. Az epiteliális markerek vizsgálata során az találtuk, hogy a DCA kezelés szignifikánsan emelte a ZO-1 és E-CADHERIN fehérje szintjét a BxPC-3 sejtekben, továbbá a CLAUDIN-1 epiteliális adhéziós fehérje, amelynek expressziós csökkenése jobb túléléssel párosul, csökkent expressziót mutatott DCA kezelés hatására CAPAN-2 sejtekben (22.B ábra). A sejtek inváziójára gyakorolt hatások kimutatására matrigél inváziós kamrát alkalmaztunk. A DCA kezelés szignifikánsan csökkentette a CAPAN-2 sejtek inváziós képességét a kontroll mintához képest (22.C ábra).

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a DCA gátolhatja az EMT folyamatát a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben az EMT folyamatban kulcsfontosságú gének expressziójának és a sejtek inváziós képességének a csökkentésén keresztül.



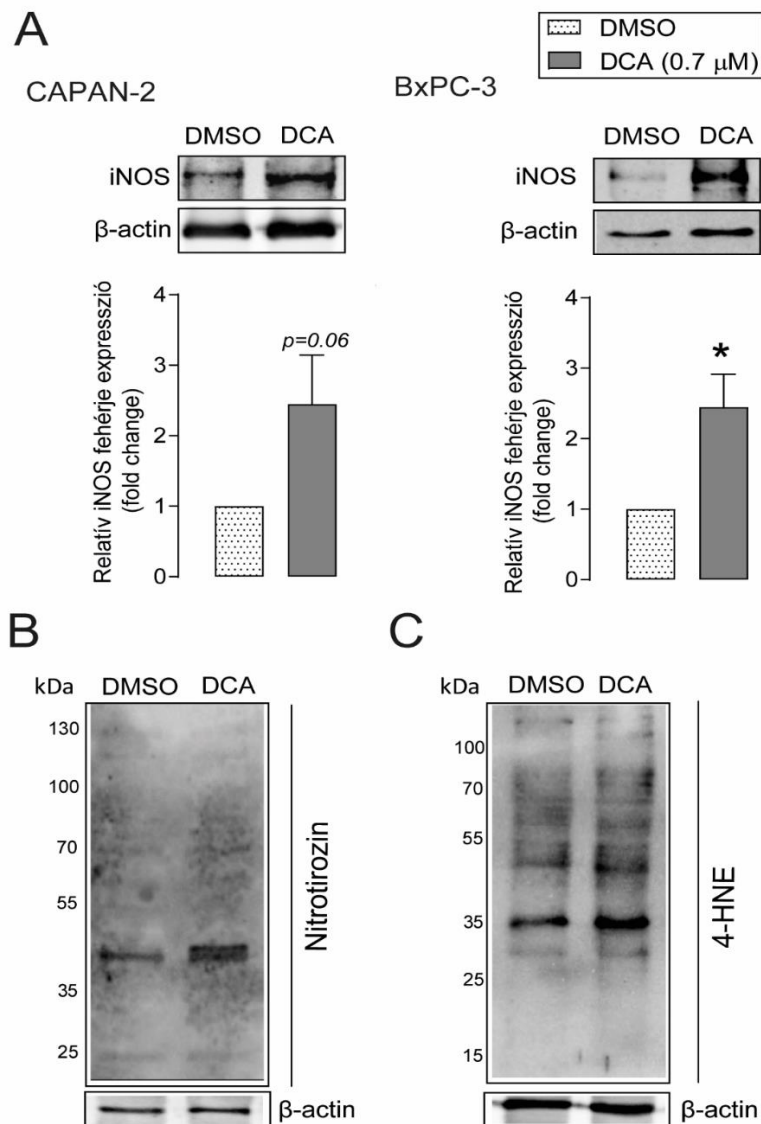
22. ábra A DCA kezelés csökkenti az EMT markerek expresszióját és a sejtek inváziós képességét

A CAPAN-2 és BxPC-3 sejteket DCA-val kezeltük (0,7 μM) 48 órán keresztül. (A) Az EMT folyamatában szerepet játszó gének, TCF7L2, WNT5B, β-CATENIN, TWIST1, SNAIL, mRNS expressziós szintjét RT-qPCR segítségével határoztuk meg a CAPAN-2 sejtekben (n=3). (B) Az EMT-ben részt vevő fehérjék (mezenchimális: β-CATENIN, SNAIL, SLUG és CLAUDIN-1; epitheliális: ZO-1 és E-CADHERIN) kifejeződését Western blot módszer segítségével vizsgáltuk (n=3, bal oldali panelek: reprezentatív ábrák, jobb oldali panelek: a Western blot eredmények denzitometriai elemzése). (C) A CAPAN-2 sejteket 48 órán keresztül 0,7 μM DCA-val kezeltük, és a sejtek inváziós képességét Corning Matrigel inváziós kamra segítségével vizsgáltuk meg (n=3). Az adatokat átlag ± SEM formában adtuk meg A * és ** statisztikai szignifikanciát mutat a kontroll és a DCA-val kezelt csoportok között, ahol $p < 0,05$ és $p < 0,01$.

Rövidítések: DCA (dezoxikólsav), DMSO (dimetil-szulfoxid), ZO-1 (zona occludens 1), SNAIL (family transcriptional repressor 1), SLUG (snail family transcriptional repressor 2), TCF7L2 (transzkripciós faktor 7-like 2), TWIST1 (twist family BHLH transzkripciós faktor 1), WNT5B (Wnt family 5B)

6.2.2. A dezoxikólsav oxidatív-nitrozatív stresszt indukál a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben

A sejtek redox állapotának tanulmányozásához néhány oxidatív-nitrozatív stressz marker kifejeződését követtük nyomon. A nitrogén-monoxid termelésért felelős iNOS fehérje szintje emelkedett a CAPAN-2 és BxPC-3 sejtekben a DCA kezelést követően (23.A ábra). Az emelkedett iNOS expresszió következménye lehet egy fokozott ONOO⁻ termelődés, ami a szuperoxid és a nitrogén monoxid reakciójában keletkezik. A nitrotirozin képződése a fehérjékben egy peroxinitrit által közvetített fehérjemódosítás. A DCA kezelés hatására emelkedett a nitrotirozin szintet mutattunk ki a CAPAN-2 sejtekben (23.B ábra). Továbbá, a DCA emelte a lipidperoxidáció mértékét, amelyet a 4HNE-fehérje adduktumok szintjének emelkedésével igazoltunk (23.C ábra).



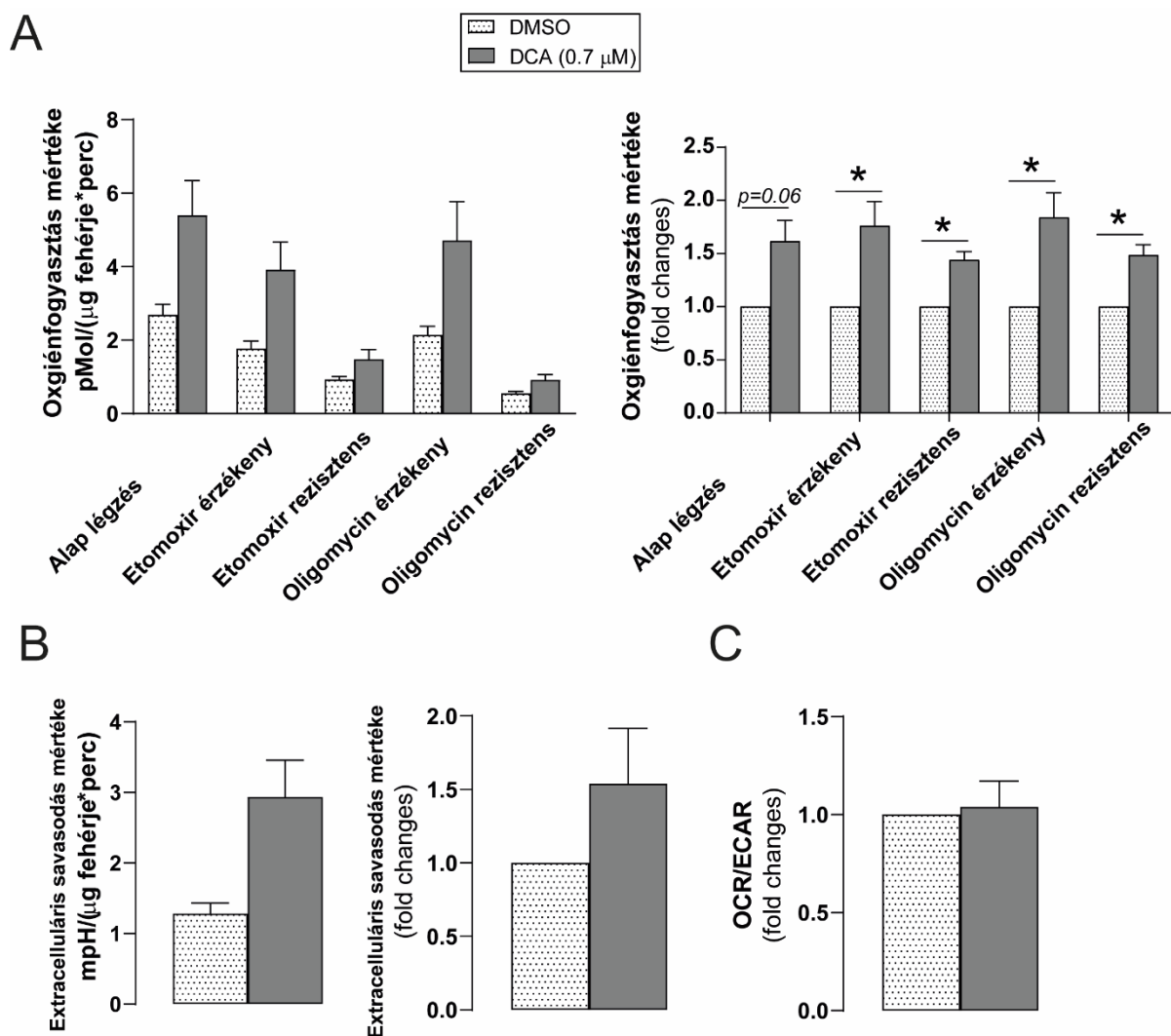
23. ábra A DCA emeli az oxidatív/ nitrozatív stressz markerek szintjét a CAPAN-2 hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben

A CAPAN-2 és BxPC-3 sejteket 48 órán keresztül DCA-val (0,7 μ M) kezeltük. (A) Az iNOS fehérje szintjét (n=4, felső panelek: reprezentatív Western blot ábra, alsó panelek: független kísérletek Western blot eredményeinek denzitometriai elemzése), valamint a (B) Nitrotirozin és (C) 4HNE mennyiségét Western blot módszerrel vizsgáltuk. Az adatokat átlag \pm SEM formában adtuk meg. A * statisztikai szignifikanciát mutat a kontroll és a DCA-val kezelt csoportok között, ahol $p < 0,05$. A Nitrotirozin és 4HNE esetében a három független kísérletben hasonló eredményeket kaptunk.

Rövidítések: DCA (dezoxikólsav), DMSO (dimetil-szulfoxid), 4HNE (4-hidroxinonenál), iNOS (indukálható nitrogén-monoxid szintáz)

6.2.3. A dezoxikólsav emeli a mitokondriális aktivitást a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben

Kíváncsiak voltunk arra is, hogy a DCA kezelés befolyásolja-e a sejtek anyagcseréjét. Seahorse analízissel egyidejűleg megtudtuk határozni a mitokondriális oxidáció és glikolízis mértékét a sejtekben. Kimutattuk, hogy a DCA kezelés fokozza a bazális légzést (baseline OCR) a CAPAN-2 sejtekben. A zsírsav oxidáció (etomoxir- érzékeny légzés) és a glükóznak vagy aminosavnak tulajdonított oxidáció (etomoxir- rezisztens légzés) szintén fokozódott a DCA kezelés hatására. A DCA jelentősen növelte az oligomycin-érzékeny, ATP-hez kötött légzést és az oligomycin-rezisztens légzést is, ami a mitokondriumok belső membránján keresztül történő protoncsorgást jelzi (24.A ábra). Ezenkívül a DCA indukálta a glikolízist (ECAR) is a CAPAN-2 sejtekben (24.B ábra). Az OCR/ECAR arány nem változott (24.C ábra), ami arra utal, hogy a sejtek a DCA kezelést követően hipermetabolikusakká válnak.



24. ábra A DCA fokozza a mitokondriális aktivitást a CAPAN-2 hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben

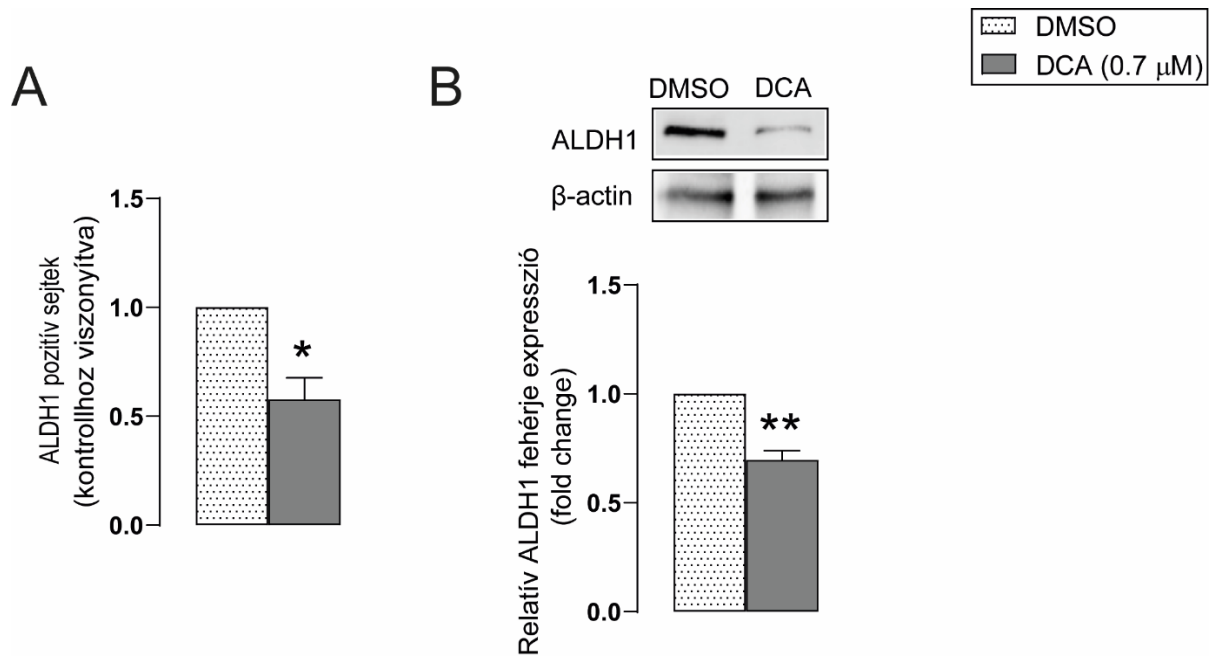
A CAPAN-2 sejteket DCA-val (0,7 μM) kezeltük 48 órán keresztül, majd a **(A)** mitokondriális oxigénfogyasztás és a **(B)** glikolízis mértékét Seahorse XF96 oximéter segítségével határoztuk meg (n=3). Az **A** és **B** panelek első része egy reprezentatív kísérlet eredményét mutatja, a második panel három független kísérlet fold change értékeit mutatja. **(C)** A mitokondriális oxidáció és a glikolitikus fluxus arányát az OCR/ECAR arány tükrözi. Az adatokat átlag ± SEM formában adtuk meg. A * statisztikai szignifikanciát mutat a kontroll és a DCA-val kezelt csoportok között, ahol $p < 0,05$.

Rövidítések: DCA (dezoxikólsav), DMSO (dimetil-szulfoxid), OCR (oxigénfogyasztási ráta); ECAR (extracelluláris savasodási ráta)

6.2.4. A dezoxikólsav csökkenti az összejtszerűséget

Az ALDH1 egy őssejt marker számos daganatban [198], beleértve a hasnyálmirigy adenokarcinómát is [199]. DCA kezelést követően Aldefluor assay segítségével megmértük az ALDH1 aktivitását a CAPAN-2 sejtekben. A DCA szignifikánsan csökkentette az ALDH1 pozitív CAPAN-2 sejtek számát (25.A ábra). Továbbá, Western blot vizsgálatok során

kimutattuk, hogy a DCA csökkenti az ALDH1 fehérje szintjét is a sejtekben (25.B ábra). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a DCA csökkentheti a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtek őssejtszerűségét.



25. ábra A DCA csökkenti az ALDH1 aktivitását és expresszióját a CAPAN-2 hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben

A CAPAN-2 sejteket DCA-val (0,7 μM) kezeltük 48 órán keresztül. **(A)** A DCA kezelést követően az ALDH1 aktivitásának a mérésére a sejtekben Aldefluor assay-t használtunk és az ALDH1 pozitív sejteket áramlási citométer segítségével detektáltuk. A kísérletek során három technikai párhuzamossal dolgoztunk (n=3). **(B)** Az ALDH1 fehérje expresszióját Western blot módszerrel vizsgáltuk (n=3, felső panel: reprezentatív ábra, alsó panel: független kísérletekből származó Western blottok denzitometriai elemzése). Az adatokat átlag ± SEM formában adtuk meg. A * statisztikai szignifikanciát mutat a kontroll és a DCA-val kezelt csoportok között, ahol $p < 0,05$. Rövidítések: DMSO (dimetil-szulfoxid), DCA (dezoxikólsav), ALDH1 (aldehid-dehidrogenáz 1)

7. MEGBESZÉLÉS

Ma már nagy mennyiségű adattal rendelkezünk arról, hogy a mikrobiom diszbiózisa során jelentkező kóros folyamatok kapcsolatban állnak a tumoros kórképek kialakulásával és a tumorprogresszióval. Humán székletminták vizsgálata során megállapították, hogy az egészséges egyének mintáihoz képest az emlőtumoros betegek mintáiban nagymértékben megváltozott a mikrobiom összetétele és csökkent a baktériumok fajgazdagsága [93]. A mikrobiom összetételében nemcsak az egészséges és a daganatos betegek között vannak változások, hanem az emlődaganat különböző stádiumai között is találtak eltéréseket a mikrobiom összetételében. [200,201]. Emellett az emlő saját mikrobiomja is képes onkobiótikus átalakulásra [202]. Hasnyálmirigy daganatokkal kapcsolt mikrobiom vizsgálatok során a gasztrointesztinális régió [107], a szájüreg [108], a hasnyálmirigy [109], valamint a széklet [110] esetében is megfigyeltek változásokat a diverzitásban, de egyelőre nem tudjuk, hogy pontosan hogyan változik meg a mikrobiom összetétele hasnyálmirigy adenokarcinómában. Az emlődaganatok esetében megfigyelték, hogy a tartós antibiotikum kezelésnek való kitétel emelte a daganatos betegségek megjelenésének, illetve a kiújulásának az esélyét. A probiotikumok alkalmazása csökkentette az emlődaganatok kialakulásának kockázatát [65,203]. Ezzel ellentétben hasnyálmirigy adenokarcinóma esetében kimutatták, hogy a széles spektrumú antibiotikum alkalmazása állatmodellekben csökkentheti a daganat kialakulásának a rizikóját [204]. Ezen megfigyelések alapján a mikrobiom normális diverzitásának a megváltozása kapcsolatban állhat az emlő- és hasnyálmirigy daganatok kialakulásával és progressziójával.

A mikrobiom közvetlen immunogén hatása mellett számos daganatos megbetegedés esetében, köztük az emlő- és hasnyálmirigy adenokarcinómában is leírták a mikrobiom endokrinszerű funkciójának a jelentőségét. Számos, a mikrobiom által előállított metabolitot azonosítottak, amelyek képesek pro- vagy antikarcinogén hatások kifejtésével befolyásolni a tumorsejtek viselkedését. Emlődaganatok esetében több tanulmány igazolja, hogy a bakteriális metabolitok, a litokólsav, a kadaverin, az indoxil szulfát és az indolpropánsav antineoplasztikus hatások indukálására képesek [16,18–21]. A mikrobiális diverzitás csökkenése mellett ezeknek az antiproliferatív metabolitoknak a termelése is csökken az emlődaganatos betegekben [16,18]. Emellett a hasnyálmirigy adenokarcinóma és a mikrobiális metabolitok kapcsolatát célzó vizsgálatok bebizonyították, hogy a mikrobiom anyagcseréje során képződő másodlagos

epesavak, mint az LCA és az UDCA citosztikus hatásúak a hasnyálmirigy adenokarcinómában [17,101,118].

7.1. A litokólsav szerepe emlődaganatokban

A mikrobiom diverzitásának a csökkenésével összefüggően az antineoplasztikus hatású metabolitok termelése is csökken az emlőrákos betegeknél [16,18]. Vizsgálataink során kimutattuk, hogy az LCA által indukált oxidatív stressz az NRF2 expressziójának a csökkenésén, valamint különböző prooxidáns fehérjék expressziójának a fokozódásán keresztül valósul meg. Más szóval, az LCA által kiváltott oxidatív és nitrozatív stressz növekedése a prooxidáns és antioxidáns rendszerek közötti egyensúly eltolódásából fakad.

A ROS és RNI fokozott termelődésének elsődleges szerepe van az emlődaganatsejtek proliferációjának lassításában. Az emlődaganatokban már leírták, hogy az oxidatív stressz által mediált útvonalakon keresztül képes az LCA gátolni az EMT folyamatát, valamint befolyásolni a daganatsejtek metabolizmusát [201]. Saját kísérleteinkben igazoltuk, hogy az LCA-okozta emelkedett oxidatív stressz vezet az emlődaganatsejtek növekedésének gátlásához, viszont nem tudtuk igazolni azt, hogy az emelkedett oxidatív stressz EMT gátlásához és a metabolikus folyamatok átrendeződéséhez vezet. Ennek egyik lehetséges oka, hogy az általunk használt modellben a szabadgyökök mennyiségének a növekedése elmaradt az említett tanulmányban leírtakhoz képest [201]. Kimutattuk, hogy az LCA által kiváltott oxidatív stressz válaszokat a TGR5 és a CAR receptorok közvetítik az emlődaganatban. Az oxidatív stressz szerepe az emlőrákban összetett, mivel a tartós fokozott oxidatív stressz prokarcinogén, míg a mérsékelt oxidatív stressz citosztikus hatást fejt ki [202,203,204].

Vizsgálatunkban az oxidatív stressz markerek és a prooxidáns gének magasabb expressziója alacsony stádiumú, alacsony grádusú, valamint a nem TNBC esetekkel voltak társíthatóak. Ugyanakkor a későbbi stádiumba, magasabb grádusba sorolt, illetve a TNBC esetekben a prooxidáns gének és az oxidatív stressz markerek kifejeződése csökkenést mutatott. Ezen eredmények alapján elmondható, hogy az LCA-TGR5-oxidatív stressz útvonal protektív funkcióval bír az emlődaganatban, ezen útvonal génjeinek elvesztése rossz klinikai prognózissal társul. Ezzel a megfigyeléssel megegyezően a fokozott CAR expresszió jobb túléléssel párosult, ami a TNBC esetekben nem jelentkezett. Eredményeink alátámasztják az oxidatív stressz jótékony, citosztikus hatását. Saját eredményeink jól korrelálnak egy másik vizsgálat eredményével, ami megállapította, hogy a DNS-károsodás és az ennek eredményeként

felhalmozódó mutációk miatt fokozódó oxidatív stressz az emlőrák kialakulásának kockázati tényezőjét jelenti, addig a fokozott lipidperoxidáció hosszabb túléléssel korrelál [205].

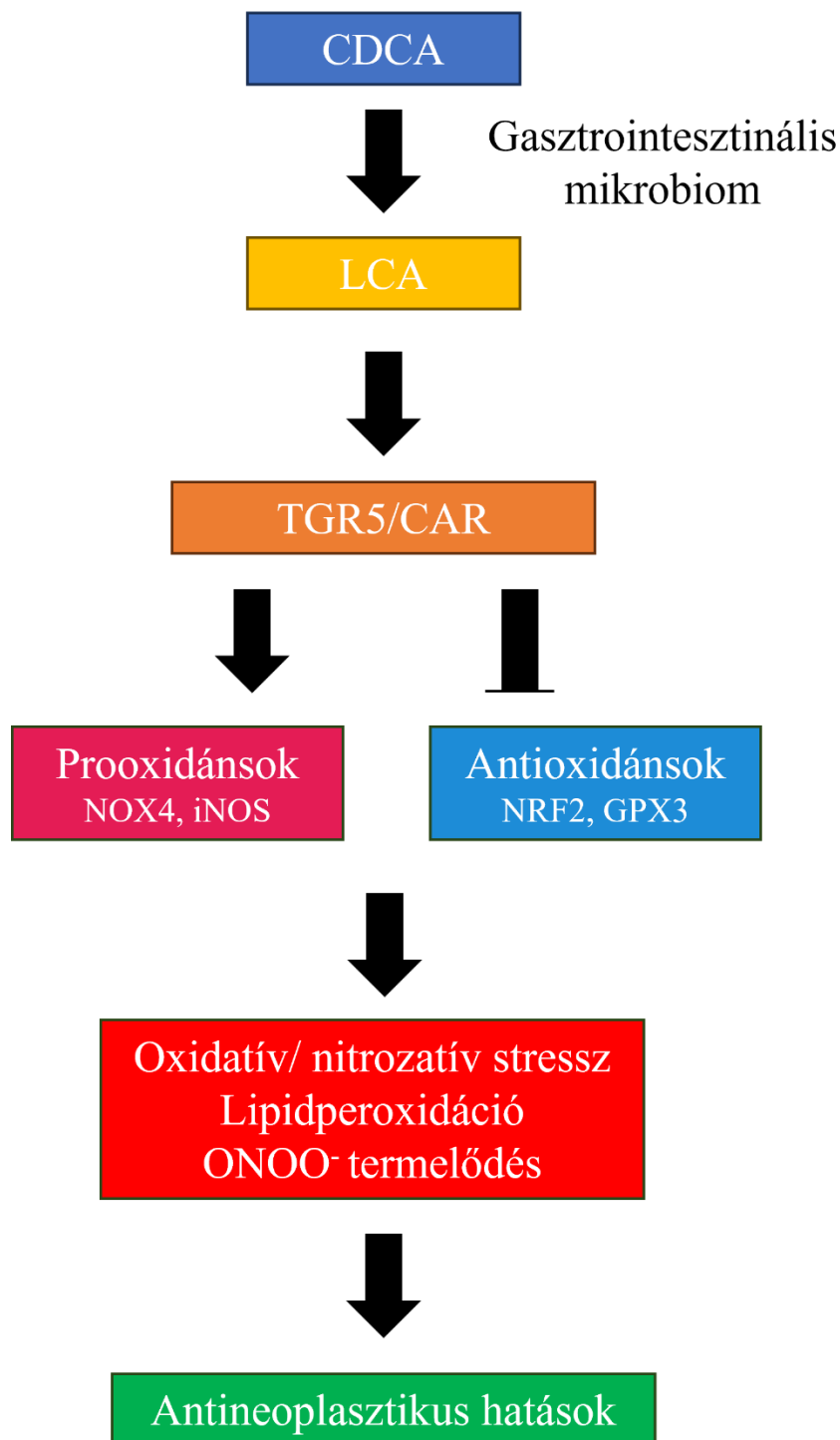
Emlődaganatos betegek esetében az NRF2 magas expressziója kedvezőtlen prognosztikai tényező a daganat kiújulásának és a betegségmentes túlélésnek a tekintetében [206]. Az NRF2 és a KEAP1 génekben vannak olyan nukleotid polimorfizmusok, amelyek befolyásolhatják a fehérje expresszióját. A magasabb NRF2 vagy alacsonyabb KEAP1 expresszióval járó polimorfizmusok rosszabb klinikai kimenetellel járnak együtt [207,208], továbbá az alacsony NRF2 expressziós szint bizonyítottan erősíti a kemoterápiás szerek hatékonyságát [209,210].

Az általunk elemzett adatokból kiderül, hogy az ösztrogén és HER2 általi jelátvitel befolyásolja az LCA által indukált útvonalak aktivitását. Az ER+/HER2, valamint HER2 esetekben magasabb TGR5, iNOS és 4HNE expressziós szintet figyeltünk meg a TNBC esetekhez képest. Ez a tendencia hasonló a kadaverin receptoraként azonosított trace-amin kapcsolt receptorok (TAAR) során tett megállapításokhoz [16]. Bár az ER+/HER2 típusú daganatokban nem sikerült tisztázni az LCA fokozott hatékonyságának molekuláris mechanizmusát, más tanulmányok alátámasztották a HER2 jelátviteli útvonal fontosságát, például annak a ténynek a megállapításával, hogy a HER2 jelátvitel indukálja az iNOS expressziót és csökkenti a sejtproliferációt [211].

A gasztrointesztinális mikrobiom diverzitása és ezzel párhuzamosan a citosztatikus hatású LCA szérumban mért szintje is csökkenést mutat emlődaganatos megbetegedések esetében [18,93]. Az LCA alacsony szérum koncentrációja jól korrelál a daganatos sejtek magasabb proliferációs rátájával [212]. A mikrobiom diszbiózisa, valamint az emlődaganatok közötti összefüggést számos tanulmány bizonyítja, amelyek szerint az antibiotikum kezelés növeli az emlőrák kialakulásának esélyét [211,213,214]. Emellett kimutattuk, hogy az elsődleges epesavak, mint a CA és CDCA kevésbé hatékonyan indukáltak citosztatist emlődaganatban, mint az LCA. A fenti adatok alapján elmondható, hogy a mikrobiom biomasszájának a csökkenése az LCA mennyiségének a csökkenését vonja maga után, így csökkentve az LCA által kifejtett citosztatikus folyamatok hatékonyságát.

Korábban tanulmányunkban kimutattuk, hogy az LCA a TGR5 receptoron csökkenti az emlődaganatsejtek agresszivitását [18]. Jelen vizsgálataink során megállapítottuk, hogy az LCA egészséges egyénekben a TGR5 fiziológias ligandja, valamint azt, hogy emlődaganatos betegek esetében a TGR5 expressziója és aktivációja protektív tényező lehet. Emellett az LCA hatásait közvetítő alternatív receptorként azonosítottuk a CAR receptort. A TGR5 magas expressziós szintjéhez hasonlóan a CAR emelkedett expressziója is kedvezőbb túlélési esélyekkel társult.

Jelen eredményeink alapján sikerült kimutatunk, hogy a mikrobiom metabolitja, az LCA másodlagos epesav oxidatív és nitrozatív stresszt indukál a pro- és antioxidáns rendszerek közötti egyensúly megbomlásával az emlődaganatos betegekben. Az LCA hormonszerű hatások kifejtésére képes, mivel a termelőési helyétől távol eső emlődaganatok tulajdonságait képes befolyásolni. Megállapítottuk, hogy az LCA-TGR5 jelátviteli útvonal résztvevőinek alacsonyabb expressziója és aktivitása az emlőrák rosszabb klinikai kimenetelével társul. Ezen eredmények alapján a TGR5/CAR jelátviteli út, valamint oxidatív stressz célzott kezelése új lehetőséget teremthet az emlődaganatok gyógyításában.



26. ábra A litokólsav által indukált hatások összefoglalása

A gasztrointesztinális mikrobiom metabolizmusa során szintetizálódó LCA a szisztémás keringésbe jutva képes befolyásolni a termelődési helyétől távol eső emlődaganatsejtek tulajdonságait. Az LCA a TGR5 és CAR receptorokon keresztül az anti- és prooxidánsok közötti egyensúly modulálása révén képes fokozni az oxidatív és nitrozatív stressz szintjét a daganatsejtekben. Ezen folyamatnak köszönhetően az LCA antineoplasztikus hatást fejt ki az emlőtumorsejtekben.

Rövidítések: CDCA (kenodezoxikólsav), LCA (litokólsav), TGR5 (Takeda G-fehérje kapcsolt receptor), CAR (konstitutív androsztán receptor), NOX4 (NADPH oxidáz 4), iNOS (indukálható nitrogén-monoxid szintáz), NRF2 (nuclear factor, erythroid 2-like 2), GPX3 (glutation-peroxidáz 3), ONOO (peroxinitrit)

7.2. A dezoxikólsav szerepe hasnyálmirigy daganatokban

Kutatásunk második felében a DCA másodlagos epesav hatásait vizsgáltuk hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekre. Hasnyálmirigy daganatok vizsgálata során az epesavak szintje emelkedett volt az epében egészséges egyénekéhez képest [129], ami befolyásolja a hasnyálmirigy adenokarcinóma kockázati tényezőit. Tekintettel a humán emésztőrendszerben a hasnyálmirigy adenokarcinómában széles körben elterjedt onkobiózisra, a bakteriális metabolitok jelátvitelének értéke megnő, mivel ezen metabolitok szintjének változásai akár távolról is befolyásolják a tumorok viselkedését.

A DCA tumorsejtekre gyakorolt hatása nagyfokú eltérést mutat az egyes daganat típusokban. A DCA a TGR5 receptoron keresztül képes az EGFR, a MAPK és a STAT3 jelátviteli utak aktiválására és így támogatja a tumorprogressziót a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben [129]. Egy másik tanulmányban kimutatták, hogy a DCA malignus átalakulást indukál a nyelőcső adenokarcinóma őssejtjeiben [205], továbbá a DCA alacsony koncentrációban elősegítette a tumorsejtek invázióját vastagbél- és nyelőcső adenokarcinómákban [206–208]. Ezzel ellentétben a DCA sejtmigrációt gátló hatását is leírták gyomorrákban [209], továbbá a DCA gátolta a sejtproliferációt epehólyag- [210] és gyomordaganatokban [211]. Emellett a DCA apoptózist indukált vastagbél- [212], petefészek- [213], gyomordaganatokban [214].

Disszertációm második részében arra kerestük a választ, hogy a DCA szérum referencia koncentrációban alkalmazva (0,7 μ M), hogyan képes befolyásolni a tumorsejtekre jellemző tulajdonságokat humán hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben.

Kísérleteink során kimutattuk, hogy a DCA kezelés gátolja az EMT folyamatait, csökkenti a daganatsejtek őssejtszerűségét, fokozza az oxidatív és nitrozatív stressz szintjét, valamint a daganatsejteket hipermetabolikussá teszi a humán hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben. Ezek a hatások egyaránt magukba foglalnak pro- és antikarcinogén hatásokat is. A daganatsejtekre jellemző Warburg-típusú metabolikus átrendeződés során a daganatsejtek hipermetabolikussá válnak és még megfelelő mennyiségű oxigén jelenlétében is a glikolízis alapú energiatermelést részesítik előnyben. A DCA indukálta a mitokondriális oxidációt, beleértve a sejtlegzés valamennyi elemét, mint például az oligomycin-érzékeny és rezisztens légzést, az etomoxir-érzékeny és rezisztens légzést, valamint a glikolitikus fluxust. Ennek ellenére mitokondriális oxidáció és a glikolízis egymáshoz viszonyított aránya nem változott a DCA kezelés hatására, ami arra utal, hogy a sejtek hipermetabolikussá váltak, de sem a mitokondriális oxidáció, sem pedig a glikolízis folyamata nem domináns. A hasnyálmirigy

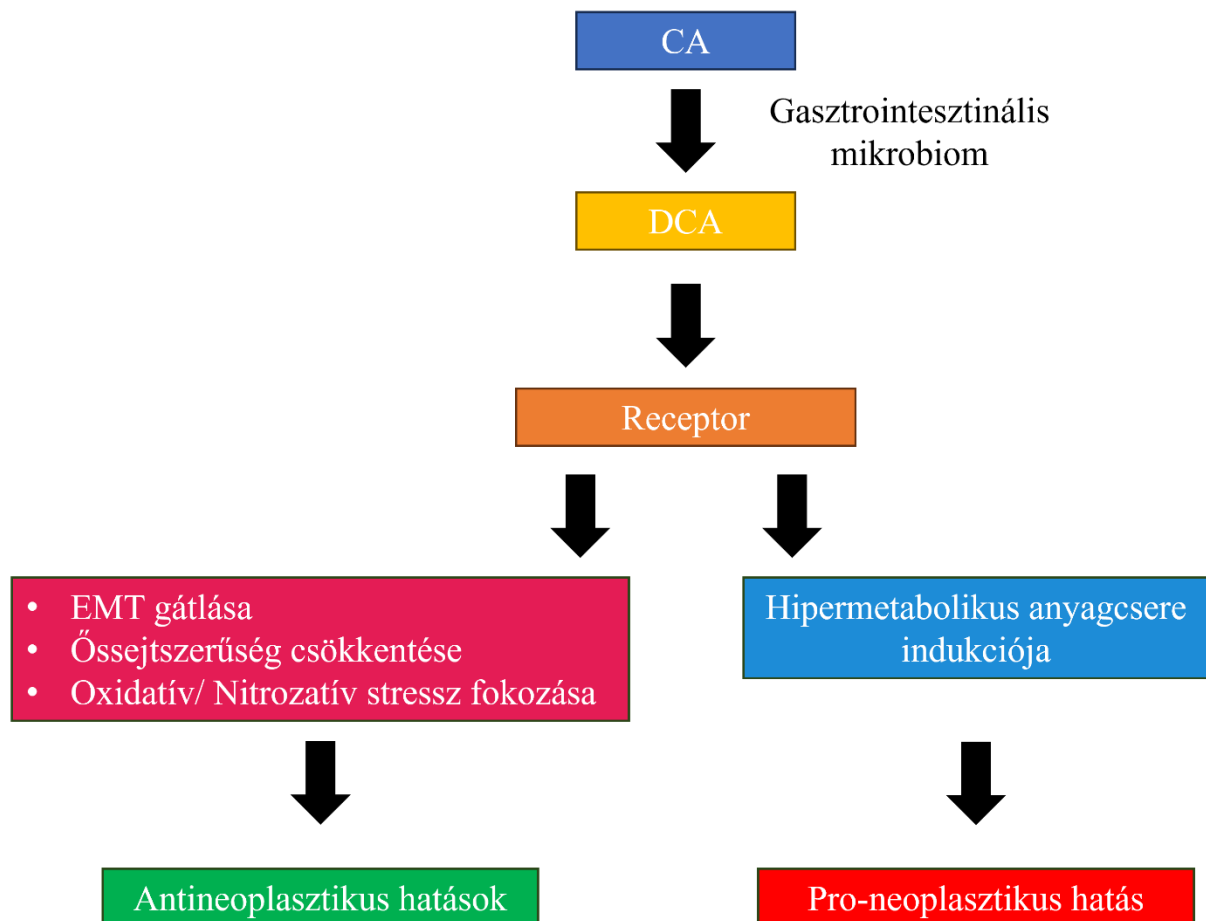
adenokarcinómában a megnövekedett mitokondriális oxidáció és a fokozott glikolitikus aktivitás összefüggésbe hozható a kemorezisztencia kialakulásával, valamint a daganatos sejtek túlélésével [215,216].

További vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a DCA csökkentette a mezenchimális morfológiára jellemző markerek kifejeződését és ezzel párhuzamosan fokozta az epitheliális morfológiára jellemző markerek expressziós szintjét. Ezzel összefüggésben megállapítottuk, hogy az ALDH1 daganatössejt marker csökkent expressziót mutat DCA kezelést követően. Ezen eredményekből arra következettünk, hogy a DCA képes lehet gátolni az EMT folyamatait, valamint csökkenteni az össejtszerűséget a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben.

Több mikrobiális metabolitról bizonyosodott be, hogy az oxidatív és nitroztatív stressz indukcióján keresztül antineoplasztikus hatást fejthetnek ki [16,18,19]. Kísérleteink során megfigyeltük, hogy a DCA fokozta a 4HNE termelődését, valamint emelte a nitrotirozin mennyiségét, amelyekből arra következtetünk, hogy a sejtekben emelkedett az oxidatív és nitroztatív stressz szintje.

Kísérleteink eredményei azt mutatják, hogy a DCA pro- és antineoplasztikus hatások kiváltására egyaránt képes. Továbbá megállapítottuk, hogy a DCA szubmikromoláris koncentrációban is megőrzi biológiai aktivitását, bár a hatások kisebbek a korábbi vizsgálatok által kimutatott magas mikromoláris koncentrációk hatásaihoz képest.

Az előzőekben leírtak alapján úgy gondoljuk, hogy a mikrobiom metabolitja a DCA képes modulálni a daganatos sejtekre jellemző tulajdonságokat és ezáltal befolyásolhatja a hasnyálmirigy adenokarcinóma progresszióját, így teremtve lehetőséget új terápiás eljárások kialakításában.



27. ábra A dezoxikólsav által indukált hatások összefoglalása

A gasztrointesztinális mikrobiom metabolizmusa során szintetizálódó DCA a szisztémás keringésbe jutva képes befolyásolni a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtek tulajdonságait. Az DCA a TGR5 receptorok keresztül az képes volt gátolni az EMT folyamatait, fokozni az oxidatív és nitrozatív stressz szintjét, illetve csökkenteni az össejtszerűséget a daganatsejtekben. Emellett a DCA a sejtek anyagcserefolyamatainak a modulálásával hipermetabolikus anyagcsere indukcióját okozta. Ezen folyamatnak köszönhetően az DCA egyaránt anti- és proneoplasztikus hatásokat fejt ki a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben.

Rövidítések: CA (kólsav), DCA (dezoxikólsav), TGR5 (Takeda G-fehérje kapcsolt receptor)

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Az emberi testben nagy mennyiségű mikroorganizmus található, melynek genomkészletét humán mikrobiomnak nevezünk. A mikrobiom diverzitását nagy mértékben befolyásolják különböző külső (táplálkozás, higiénia, stressz) és belső (életkor, genetika) tényezők. Ugyanakkor mikrobiom az anyagcsereje során számos metabolitot szintetizál, amelyek hatással lehetnek a gazdaszervezet energiaháztartására, valamint az immunrendszerének a működésére. A mikrobiom összetételében bekövetkező változások összefüggést mutatnak számos patológiás folyamattal, köztük a neoplasztikus betegségek kialakulásával.

A gasztrointesztinális mikrobiom hatására kialakuló másodlagos epesavak, mint mikrobiális metabolitok a szisztémás keringésen keresztül képesek eljutni a szervezet távoli pontjaira és hormonszerű hatásokkal modulálni a tumoros sejtek tulajdonságait. Ezáltal a másodlagos epesavak képesek megteremteni a kapcsolatot a mikrobiom és a daganatok között.

A litokólsav (LCA) másodlagos epesav hatásait vizsgálva emlőtumor sejtekben megállapítottuk, hogy az LCA a hatásait a TGR5 illetve CAR által közvetített szignalizációs útvonalakon keresztül képes tumorsejteket moduláló hatásainak a közvetítésére. Kimutattuk, hogy az LCA az NRF2 gátlásán keresztül fokozta az oxidatív nitrozatív stressz szintjét az emlőtumor sejtekben. TMA vizsgálatok során megfigyeltük, hogy az emlődaganat korai szakaszában lévő betegekben fokozottabb volt az LCA indukált TGR5-NRF2-oxidatív/nitrozatív stressz útvonal résztvevőinek a kifejeződése a késői fázisokhoz képest, amely esetek rosszabb prognózissal társulnak.

A dezoxikólsav (DCA) másodlagos epesav hatásait vizsgálva hasnyálmirigy-daganatsejtekben megállapítottuk, hogy a DCA a mezenchimális markergének expressziójának a csökkentésével, valamint az epiteliális markergének expressziójának a fokozásával gátolta az EMT folyamatát, valamint a DCA hatására csökkent a daganatsejtek migrációs képessége. A DCA emellett csökkentette az ALDH1 őssejtmarker kifejeződését, valamint a DCA hatására a hasnyálmirigy-daganatsejtek hipermetabolikussá váltak.

Eddigi megfigyeléseink során megállapítottuk, hogy a különböző másodlagos epesavak másképpen hatnak az egyes daganatokban. Az LCA antineoplasztikus hatást fejt ki az emlő- és hasnyálmirigy daganatban, de a hatás különböző receptorokon keresztül valósul meg. A DCA nem hat az emlődaganatokban, míg a hasnyálmirigy daganatban kevert hatását tudtunk kimutatni.

9. SUMMARY

The human body contains many microorganisms, the genome of which is called the human microbiome. The diversity of the microbiome is strongly influenced by various external (nutrition, hygiene, stress) and internal (age, genetics) factors. At the same time, the microbiome synthesizes several metabolites during its metabolism, which can affect the energy balance of the host and the functioning of its immune system. Changes in the composition of the microbiome are associated with several pathological processes, including the development of neoplastic diseases.

Secondary bile acids formed by the gastrointestinal microbiome, as microbial metabolites, can reach distant sites in the body via the systemic circulation and modulate the properties of tumor cells through hormonal effects. In this way, secondary bile acids can establish a link between the microbiome and tumors.

By investigating the effects of lithocholic acid (LCA) secondary bile acid in breast tumor cells, we found that LCA can mediate its effects through TGR5 or CAR-mediated signaling pathways to modulate tumor cell effects. We showed that LCA enhanced oxidative nitrosative stress levels in breast tumor cells through inhibition of NRF2. In TMA assays, we observed that patients with early-stage breast tumors had increased expression of LCA-induced TGR5-NRF2 oxidative/nitrosative stress pathway participants compared to late-stage patients, which are associated with a worse prognosis.

Examining the secondary bile acid effects of deoxycholic acid (DCA) in pancreatic tumor cells, we found that DCA inhibited the EMT process by decreasing mesenchymal marker gene expression and increasing epithelial marker gene expression, and that DCA reduced the migratory ability of tumor cells. DCA also reduced the expression of the stem cell marker ALDH1 and induced hypermetabolism of pancreatic tumor cells.

Our observations so far have shown that different secondary bile acids act differently in different tumors. LCA exerts antineoplastic effects in mammary and pancreatic tumors, but the effect is mediated through different receptors. DCA has no effect in breast tumors, whereas a mixed effect in pancreatic tumors was detected.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Manos J. The human microbiome in disease and pathology. *Apmis* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2024 Sep 16];130(12):690. Available from: /pmc/articles/PMC9790345/
2. Ursell LK, Metcalf JL, Parfrey LW, Knight R. Defining the Human Microbiome. *Nutr Rev* [Internet]. 2012 Aug [cited 2024 Sep 16];70(Suppl 1):S38. Available from: /pmc/articles/PMC3426293/
3. Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The healthy human microbiome. *Genome Med* [Internet]. 2016 Apr 27 [cited 2024 Sep 16];8(1). Available from: /pmc/articles/PMC4848870/
4. Lynch S V., Pedersen O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2016 Dec 15 [cited 2024 Sep 5];375(24):2369–79. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27974040/>
5. Macfabe D. Autism: Metabolism, Mitochondria, and the Microbiome. *Glob Adv Health Med*. 2013 Nov 1;2(6):52–66.
6. Maruvada P, Leone V, Kaplan LM, Chang EB. The Human Microbiome and Obesity: Moving beyond Associations. *Cell Host Microbe*. 2017 Nov;22(5):589–99.
7. Fulbright LE, Ellermann M, Arthur JC. The microbiome and the hallmarks of cancer. 2017; Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006480>
8. Garrett WS. Cancer and the microbiota. *Science* (1979). 2015 Apr 3;348(6230):80–6.
9. Yu H, Meng H, Zhou F, Ni X, Shen S, Das UN. Urinary microbiota in patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Archives of Medical Science*. 2015;2:385–94.
10. Gui QF, Lu HF, Zhang CX, Xu ZR, Yang YH. Well-balanced commensal microbiota contributes to anti-cancer response in a lung cancer mouse model. *Genetics and Molecular Research*. 2015;14(2):5642–51.
11. Picardo SL, Coburn B, Hansen AR. The microbiome and cancer for clinicians. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2019 Sep;141:1–12.
12. Gong HL, Shi Y, Zhou L, Wu CP, Cao PY, Tao L, et al. The Composition of Microbiome in Larynx and the Throat Biodiversity between Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Patients and Control Population. *PLoS One*. 2013 Jun 18;8(6):e66476.
13. Yu Y, Champer J, Beynet D, Kim J, Friedman AJ. The role of the cutaneous microbiome in skin cancer: lessons learned from the gut. *J Drugs Dermatol*. 2015 May;14(5):461–5.
14. Chase D, Goulder A, Zenhausern F, Monk B, Herbst-Kralovetz M. The vaginal and gastrointestinal microbiomes in gynecologic cancers: A review of applications in etiology, symptoms and treatment. *Gynecol Oncol*. 2015 Jul;138(1):190–200.
15. Kovács T, Mikó E, Ujlaki G, Sári Z, Bai P. The Microbiome as a Component of the Tumor Microenvironment. In 2020. p. 137–53.
16. Kovács T, Mikó E, Vida A, Sebő É, Toth J, Csonka T, et al. Cadaverine, a metabolite of the microbiome, reduces breast cancer

- aggressiveness through trace amino acid receptors. *Sci Rep* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2024 Sep 5];9(1). Available from: [/pmc/articles/PMC6361949/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32854297/)
17. Schwarcz S, Kovács P, Kovács T, Ujlaki G, Nyerges P, Uray K, et al. The pro- and antineoplastic effects of deoxycholic acid in pancreatic adenocarcinoma cell models. *Mol Biol Rep*. 2023 Jun 5;50(6):5273–82.
 18. Mikó E, Vida A, Kovács T, Ujlaki G, Trencsényi G, Márton J, et al. Lithocholic acid, a bacterial metabolite reduces breast cancer cell proliferation and aggressiveness. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2018 Sep;1859(9):958–74.
 19. Kovács P, Csonka T, Kovács T, Sári Z, Ujlaki G, Sipos A, et al. Lithocholic Acid, a Metabolite of the Microbiome, Increases Oxidative Stress in Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2019 Aug 27;11(9):1255.
 20. Sári Z, Mikó E, Kovács T, Jankó L, Csonka T, Lente G, et al. Indolepropionic Acid, a Metabolite of the Microbiome, Has Cytostatic Properties in Breast Cancer by Activating AHR and PXR Receptors and Inducing Oxidative Stress. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2024 Sep 16];12(9):1–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32854297/>
 21. Sári Z, Mikó E, Kovács T, Boratkó A, Ujlaki G, Jankó L, et al. Indoxylsulfate, a Metabolite of the Microbiome, Has Cytostatic Effects in Breast Cancer via Activation of AHR and PXR Receptors and Induction of Oxidative Stress. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2020 Oct 2 [cited 2024 Sep 16];12(10):1–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33050543/>
 22. Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *The Lancet*. 2014 Mar;383(9922):1068–83.
 23. Xuan C, Shamonki JM, Chung A, DiNome ML, Chung M, Sieling PA, et al. Microbial dysbiosis is associated with human breast cancer. *PLoS One* [Internet]. 2014 Jan 8 [cited 2024 Jul 15];9(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24421902/>
 24. Sundaram S, Johnson A, Makowski L. Obesity, metabolism and the microenvironment: Links to cancer. *J Carcinog* [Internet]. 2013 Jan 1 [cited 2024 Jul 15];12. Available from: [/pmc/articles/PMC3816318/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24421902/)
 25. Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K, Kanda H, Sato S, Oyadomari S, et al. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature*. 2013 Jul 4;499(7456):97–101.
 26. Bindels LB, Porporato P, Dewulf EM, Verrax J, Neyrinck AM, Martin JC, et al. Gut microbiota-derived propionate reduces cancer cell proliferation in the liver. *Br J Cancer*. 2012 Oct 13;107(8):1337–44.
 27. Flores R, Shi J, Fuhrman B, Xu X, Veenstra TD, Gail MH, et al. Fecal microbial determinants of fecal and systemic estrogens and estrogen metabolites: a cross-sectional study. *J Transl Med*. 2012 Dec 21;10(1):253.

28. Barko PC, McMichael MA, Swanson KS, Williams DA. The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *J Vet Intern Med* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2024 Sep 15];32(1):9. Available from: [/pmc/articles/PMC5787212/](#)
29. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature* [Internet]. 2007 Oct 18 [cited 2024 Sep 15];449(7164):804–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17943116/>
30. Shreiner AB, Kao JY, Young VB. The gut microbiome in health and in disease. *Curr Opin Gastroenterol* [Internet]. 2015 Jan 12 [cited 2024 Sep 15];31(1):69. Available from: [/pmc/articles/PMC4290017/](#)
31. Thomas S, Izard J, Walsh E, Batich K, Chongsathidkiet P, Clarke G, et al. The Host Microbiome Regulates and Maintains Human Health: A Primer and Perspective for Non-Microbiologists. *Cancer Res*. 2017 Apr 15;77(8):1783–812.
32. Cho I, Blaser MJ. The Human Microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2012 Apr [cited 2024 Sep 15];13(4):260. Available from: [/pmc/articles/PMC3418802/](#)
33. Quigley EMM, Eamonn D, Quigley MM. Gut Bacteria in Health and Disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* [Internet]. 2013 Sep [cited 2024 Sep 15];9(9):560. Available from: [/pmc/articles/PMC3983973/](#)
34. Passos M do CF, Moraes-Filho JP. INTESTINAL MICROBIOTA IN DIGESTIVE DISEASES. *Arq Gastroenterol* [Internet]. 2017 Jul 6 [cited 2024 Sep 15];54(3):255–62. Available from: <https://www.scielo.br/j/ag/a/PWWPRDNJMBf74f4YPbrjj5g/?lang=en>
35. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012 Jun 13;486(7402):207–14.
36. Li J, Jia H, Cai X, Zhong H, Feng Q, Sunagawa S, et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol*. 2014 Aug 6;32(8):834–41.
37. Robles-Alonso V, Guarner F. [Progress in the knowledge of the intestinal human microbiota]. *Nutr Hosp* [Internet]. 2013 [cited 2024 Sep 15];28(3):553–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23848071/>
38. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano G, Gasbarrini A, et al. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*. 2019 Jan 10;7(1):14.
39. Rea D, Coppola G, Palma G, Barbieri A, Luciano A, Del Prete P, et al. Microbiota effects on cancer: from risks to therapies. *Oncotarget*. 2018 Apr 3;9(25):17915–27.
40. Gomaa EZ. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie van Leeuwenhoek* 2020 113:12 [Internet]. 2020 Nov 2 [cited 2024 Sep 15];113(12):2019–40. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10482-020-01474-7>

41. O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* [Internet]. 2006 Jul [cited 2024 Sep 15];7(7):688. Available from: [/pmc/articles/PMC1500832/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1500832/)
42. Rothschild D, Weissbrod O, Barkan E, Kurilshikov A, Korem T, Zeevi D, et al. Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature* 2018 555:7695 [Internet]. 2018 Feb 28 [cited 2024 Sep 15];555(7695):210–5. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature25973>
43. Wiertsema SP, van Bergenhenegouwen J, Garssen J, Knippels LMJ. The Interplay between the Gut Microbiome and the Immune System in the Context of Infectious Diseases throughout Life and the Role of Nutrition in Optimizing Treatment Strategies. *Nutrients* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2024 Sep 15];13(3):1–14. Available from: [/pmc/articles/PMC8001875/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3501875/)
44. Mills S, Stanton C, Lane JA, Smith GJ, Ross RP. Precision Nutrition and the Microbiome, Part I: Current State of the Science. *Nutrients* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2024 Sep 15];11(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31022973/>
45. Pham VT, Dold S, Rehman A, Bird JK, Steinert RE. Vitamins, the gut microbiome and gastrointestinal health in humans. *Nutrition Research*. 2021 Nov 1;95:35–53.
46. Zheng P, Zeng B, Liu M, Chen J, Pan J, Han Y, et al. The gut microbiome from patients with schizophrenia modulates the glutamate-glutamine-GABA cycle and schizophrenia-relevant behaviors in mice. *Sci Adv* [Internet]. 2019 Feb 6 [cited 2024 Sep 15];5(2). Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.aau8317>
47. Collins SL, Stine JG, Bisanz JE, Okafor CD, Patterson AD. Bile acids and the gut microbiota: metabolic interactions and impacts on disease. *Nature Reviews Microbiology* 2022 21:4 [Internet]. 2022 Oct 17 [cited 2024 Sep 15];21(4):236–47. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41579-022-00805-x>
48. Nishino K, Nishida A, Inoue R, Kawada Y, Ohno M, Sakai S, et al. Analysis of endoscopic brush samples identified mucosa-associated dysbiosis in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2024 Sep 15];53(1):95–106. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00535-017-1384-4>
49. Karlsson F, Tremaroli V, Nielsen J, Bäckhed F. Assessing the Human Gut Microbiota in Metabolic Diseases. *Diabetes* [Internet]. 2013 Oct 1 [cited 2024 Sep 15];62(10):3341–9. Available from: <https://dx.doi.org/10.2337/db13-0844>
50. Bunyavanich S, Shen N, Grishin A, Wood R, Burks W, Dawson P, et al. Early-life gut microbiome composition and milk allergy resolution. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2024 Sep 15];138(4):1122–30. Available from: <http://www.jacionline.org/article/S0091674916302688/fulltext>
51. Chu DM, Ma J, Prince AL, Antony KM, Seferovic MD, Aagaard KM. Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery. *Nature Medicine* 2017 23:3 [Internet]. 2017 Jan 23 [cited

- 2024 Sep 15];23(3):314–26. Available from: <https://www.nature.com/articles/nm.4272>
52. Jie Z, Xia H, Zhong SL, Feng Q, Li S, Liang S, et al. The gut microbiome in atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature Communications* 2017 8:1 [Internet]. 2017 Oct 10 [cited 2024 Sep 15];8(1):1–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-017-00900-1>
 53. Sepich-Poore GD, Zitvogel L, Straussman R, Hasty J, Wargo JA, Knight R. The microbiome and human cancer. *Science* [Internet]. 2021 Mar 26 [cited 2024 Sep 15];371(6536). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33766858/>
 54. Mikó E, Kovács T, Sebő É, Tóth J, Csonka T, Ujlaki G, et al. Microbiome—Microbial Metabolome—Cancer Cell Interactions in Breast Cancer—Familiar, but Unexplored. *Cells* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2024 Sep 16];8(4). Available from: </pmc/articles/PMC6523810/>
 55. Baade P. Geographical Variation in Breast Cancer Outcomes. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2017 May 12 [cited 2024 Sep 16];14(5):523. Available from: </pmc/articles/PMC5451974/>
 56. Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rutgers E, et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology* [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2024 Sep 16];26:v8–30. Available from: <http://www.annalsofoncology.org/article/S0923753419471810/fulltext>
 57. Breast Cancer Facts and Statistics 2024 [Internet]. [cited 2024 Sep 16]. Available from: <https://www.breastcancer.org/facts-statistics>
 58. Giaquinto AN, Sung H, Miller KD, Kramer JL, Newman LA, Minihan A, et al. Breast Cancer Statistics, 2022. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2022 Nov 1 [cited 2024 Sep 16];72(6):524–41. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21754>
 59. Címlap | www.stat.nrr.hu [Internet]. [cited 2024 Sep 16]. Available from: <https://stat.nrr.hu/>
 60. Bleyer A, Welch HG. Effect of Three Decades of Screening Mammography on Breast-Cancer Incidence. *New England Journal of Medicine*. 2012 Nov 22;367(21):1998–2005.
 61. Breast cancer statistics | Cancer Research UK [Internet]. [cited 2024 Sep 16]. Available from: <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/breast-cancer#heading-Zero>
 62. Breast cancer risk | Cancer Research UK [Internet]. [cited 2024 Sep 16]. Available from: <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/breast-cancer/risk-factors>
 63. Minicozzi P, Van Eycken L, Molinie F, Innos K, Guevara M, Marcos-Gragera R, et al. Comorbidities, age and period of diagnosis influence treatment and outcomes in early breast cancer. *Int J Cancer* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2024 Sep 16];144(9):2118–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30411340/>

64. Valencia OM, Samuel SE, Viscusi RK, Riall TS, Neumayer LA, Aziz H. The Role of Genetic Testing in Patients With Breast Cancer: A Review. *JAMA Surg* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2024 Sep 16];152(6):589–94. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamasurgery/fullarticle/2619246>
65. Oh H, Eliassen AH, Beck AH, Rosner B, Schnitt SJ, Collins LC, et al. Breast cancer risk factors in relation to estrogen receptor, progesterone receptor, insulin-like growth factor-1 receptor, and Ki67 expression in normal breast tissue. *NPJ Breast Cancer* [Internet]. 2017 [cited 2024 Sep 16];3(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28979927/>
66. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* [Internet]. 2011 Mar 4 [cited 2024 Sep 15];144(5):646–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21376230/>
67. Gomes Do Nascimento R, Otoni KM. Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know? *Mastology*. 2020;30:20200024.
68. Schatten H. Cell and molecular biology of breast cancer. *Cell and Molecular Biology of Breast Cancer*. 2013 Jun 1;1–383.
69. O’Sullivan B, Brierley J, Byrd D, Bosman F, Kehoe S, Kossary C, et al. The TNM classification of malignant tumours-towards common understanding and reasonable expectations. *Lancet Oncol* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2024 Sep 16];18(7):849–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28677562/>
70. Cserni G, Chmielik E, Cserni B, Tot T. The new TNM-based staging of breast cancer. *Virchows Arch* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2024 Sep 16];472(5):697–703. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29380126/>
71. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2009 Feb 19 [cited 2024 Sep 16];360(8):790–800. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19228622/>
72. Sinn HP, Kreipe H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast Care (Basel)* [Internet]. 2013 [cited 2024 Sep 16];8(2):149–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24415964/>
73. Ducreux M, Cuhna AS, Caramella C, Hollebecque A, Burtin P, Goéré D, et al. Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2015 Sep 1;26:v56–68.
74. Rawla P, Sunkara T, Gaduputi V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World J Oncol* [Internet]. 2019 [cited 2024 Aug 28];10(1):10. Available from: </pmc/articles/PMC6396775/>
75. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018 Jan 4;68(1):7–30.
76. Yeo TP. Demographics, epidemiology, and inheritance of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Semin Oncol* [Internet]. 2015 Feb 1 [cited

- 2024 May 15];42(1):8–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25726048/>
77. Oberstein PE, Olive KP. Pancreatic cancer: why is it so hard to treat? *Therap Adv Gastroenterol* [Internet]. 2013 [cited 2024 Aug 28];6(4):321. Available from: [/pmc/articles/PMC3667471/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25726048/)
 78. Kiss B, Mikó E, Sebő E, Toth J, Ujlaki G, Szabó J, et al. Oncobiosis and Microbial Metabolite Signaling in Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2024 May 15];12(5). Available from: [/pmc/articles/PMC7281526/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25726048/)
 79. Chun YS, Pawlik TM, Vauthey JN. 8th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Pancreas and Hepatobiliary Cancers. *Ann Surg Oncol* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2024 Sep 16];25(4):845–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28752469/>
 80. Samuel N, Hudson TJ. The molecular and cellular heterogeneity of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2011 Feb [cited 2024 Aug 28];9(2):77–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22183185/>
 81. Schwabe RF, Jobin C. The microbiome and cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2013 [cited 2024 Sep 15];13(11):800–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24132111/>
 82. Thomas RM, Jobin C. The Microbiome and Cancer: Is the ‘Oncobiome’ Mirage Real? *Trends Cancer* [Internet]. 2015 Sep 9 [cited 2024 Sep 15];1(1):24. Available from: [/pmc/articles/PMC4642279/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24132111/)
 83. Jezierska-Drutel A, Rosenzweig SA, Neumann CA. Role of Oxidative Stress and the Microenvironment in Breast Cancer Development and Progression. *Adv Cancer Res* [Internet]. 2013 [cited 2024 Sep 15];119:107. Available from: [/pmc/articles/PMC3950899/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24132111/)
 84. Pagliari D, Saviano A, Newton EE, Serricchio ML, Dal Lago AA, Gasbarrini A, et al. Gut Microbiota-Immune System Crosstalk and Pancreatic Disorders. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2018 [cited 2024 Sep 15];2018. Available from: [/pmc/articles/PMC5833470/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24132111/)
 85. Hill MJ, Goddard P, Williams REO. Gut bacteria and aetiology of cancer of the breast. *Lancet* [Internet]. 1971 Aug 28 [cited 2024 Sep 19];2(7722):472–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4105334/>
 86. Rao Malla R, Marni R, Kumari S, Chakraborty A, Lalitha P. Microbiome Assisted Tumor Microenvironment: Emerging Target of Breast Cancer. *Clin Breast Cancer* [Internet]. 2022 Apr 1 [cited 2024 Sep 19];22(3):200–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34625387/>
 87. Urbaniak C, Gloor GB, Brackstone M, Scott L, Tangney M, Reida G. The Microbiota of Breast Tissue and Its Association with Breast Cancer. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2016 Aug 8 [cited 2024 Sep 19];82(16):5039. Available from: [/pmc/articles/PMC4968547/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34625387/)
 88. Chan AA, Bashir M, Rivas MN, Duvall K, Sieling PA, Pieber TR, et al. Characterization of the microbiome of nipple aspirate fluid of breast cancer survivors. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Jun 21 [cited 2024 Sep 19];6. Available from: [/pmc/articles/PMC4914981/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34625387/)

89. Meng S, Chen B, Yang J, Wang J, Zhu D, Meng Q, et al. Study of microbiomes in aseptically collected samples of human breast tissue using needle biopsy and the potential role of in situ tissue microbiomes for promoting malignancy. *Front Oncol* [Internet]. 2018 Aug 17 [cited 2024 Sep 19];8(AUG):318. Available from: [/pmc/articles/PMC6107834/](#)
90. Wu AH, Tseng C, Vigen C, Yu Y, Cozen W, Garcia AA, et al. Gut microbiome associations with breast cancer risk factors and tumor characteristics: a pilot study. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2024 Sep 19];182(2):451. Available from: [/pmc/articles/PMC7297869/](#)
91. Zhu J, Liao M, Yao Z, Liang W, Li Q, Liu J, et al. Breast cancer in postmenopausal women is associated with an altered gut metagenome. *Microbiome* [Internet]. 2018 Aug 6 [cited 2024 Sep 19];6(1). Available from: [/pmc/articles/PMC6080540/](#)
92. Byrd DA, Vogtmann E, Wu Z, Han Y, Wan Y, Clegg-Lampsey JN, et al. Associations of fecal microbial profiles with breast cancer and non-malignant breast disease in the Ghana Breast Health Study. *Int J Cancer* [Internet]. 2021 Jun 6 [cited 2024 Sep 19];148(11):2712. Available from: [/pmc/articles/PMC8386185/](#)
93. Goedert JJ, Jones G, Hua X, Xu X, Yu G, Flores R, et al. Investigation of the Association Between the Fecal Microbiota and Breast Cancer in Postmenopausal Women: a Population-Based Case-Control Pilot Study. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* [Internet]. 2015 Aug 1 [cited 2024 Sep 19];107(8):147. Available from: [/pmc/articles/PMC4554191/](#)
94. Wang H, Altemus J, Niazi F, Green H, Calhoun BC, Sturgis C, et al. Breast tissue, oral and urinary microbiomes in breast cancer. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Oct 10 [cited 2024 Sep 19];8(50):88122. Available from: [/pmc/articles/PMC5675698/](#)
95. McKee AM, Kirkup BM, Madgwick M, Fowler WJ, Price CA, Dreger SA, et al. Antibiotic-induced disturbances of the gut microbiota result in accelerated breast tumor growth. *iScience* [Internet]. 2021 Sep 9 [cited 2024 Sep 19];24(9). Available from: [/pmc/articles/PMC8426205/](#)
96. Goubet AG, Wheeler R, Fluckiger A, Qu B, Lemaître F, Iribarren K, et al. Multifaceted modes of action of the anticancer probiotic *Enterococcus hirae*. *Cell Death Differ* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2024 Sep 19];28(7):2276. Available from: [/pmc/articles/PMC8257780/](#)
97. Yang P, Wang Z, Peng Q, Lian W, Chen D. Comparison of the Gut Microbiota in Patients with Benign and Malignant Breast Tumors: A Pilot Study. *Evol Bioinform Online* [Internet]. 2021 [cited 2024 Sep 20];17. Available from: [/pmc/articles/PMC8593289/](#)
98. Wu AH, Tseng C, Vigen C, Yu Y, Cozen W, Garcia AA, et al. Gut microbiome associations with breast cancer risk factors and tumor characteristics: a pilot study. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2024 Sep 20];182(2):451. Available from: [/pmc/articles/PMC7297869/](#)

99. Sharon G, Garg N, Debelius J, Knight R, Dorrestein PC, Mazmanian SK. Specialized metabolites from the microbiome in health and disease. *Cell Metab* [Internet]. 2014 Nov 11 [cited 2024 Sep 19];20(5):719. Available from: [/pmc/articles/PMC4337795/](#)
100. Sipos A, Ujlaki G, Mikó E, Maka E, Szabó J, Uray K, et al. The role of the microbiome in ovarian cancer: mechanistic insights into oncogenesis and to bacterial metabolite signaling. *Molecular Medicine* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2024 Sep 19];27(1):33. Available from: [/pmc/articles/PMC8017782/](#)
101. Schwarcz S, Kovács P, Nyerges P, Ujlaki G, Sipos A, Uray K, et al. The bacterial metabolite, lithocholic acid, has antineoplastic effects in pancreatic adenocarcinoma. *Cell Death Discov* [Internet]. 2024 Dec 1 [cited 2024 Sep 16];10(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38782891/>
102. Wilmanski T, Rappaport N, Earls JC, Magis AT, Manor O, Lovejoy J, et al. Blood metabolome predicts gut microbiome α -diversity in humans. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2024 Sep 19];37(10):1217–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31477923/>
103. Vergara D, Simeone P, Damato M, Maffia M, Lanuti P, Trerotola M. The Cancer Microbiota: EMT and Inflammation as Shared Molecular Mechanisms Associated with Plasticity and Progression. *J Oncol* [Internet]. 2019 [cited 2024 Sep 19];2019. Available from: [/pmc/articles/PMC6854237/](#)
104. Rosean CB, Bostic RR, Ferey JCM, Feng TY, Azar FN, Tung KS, et al. Pre-existing commensal dysbiosis is a host-intrinsic regulator of tissue inflammation and tumor cell dissemination in hormone receptor-positive breast cancer. *Cancer Res* [Internet]. 2019 Jul 7 [cited 2024 Sep 19];79(14):3662. Available from: [/pmc/articles/PMC6983951/](#)
105. Wirtz HS, Buist DSM, Gralow JR, Barlow WE, Gray S, Chubak J, et al. Frequent Antibiotic Use and Second Breast Cancer Events. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2013 Sep [cited 2024 Sep 19];22(9):1588. Available from: [/pmc/articles/PMC3769442/](#)
106. Lindkvist B, Johansen D, Borgström A, Manjer J. A prospective study of *Helicobacter pylori* in relation to the risk for pancreatic cancer. *BMC Cancer* [Internet]. 2008 Nov 5 [cited 2024 Sep 20];8:321. Available from: [/pmc/articles/PMC2613155/](#)
107. Mei QX, Huang CL, Luo SZ, Zhang XM, Zeng Y, Lu YY. Characterization of the duodenal bacterial microbiota in patients with pancreatic head cancer vs. healthy controls. *Pancreatology* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2024 Sep 20];18(4):438–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29653723/>
108. Farrell JJ, Zhang L, Zhou H, Chia D, Elashoff D, Akin D, et al. Variations of oral microbiota are associated with pancreatic diseases including pancreatic cancer. *Gut* [Internet]. 2012 Apr [cited 2024 Sep 20];61(4):582. Available from: [/pmc/articles/PMC3705763/](#)
109. Pushalkar S, Hundeyin M, Daley D, Zambirinis CP, Kurz E, Mishra A, et al. The Pancreatic Cancer Microbiome Promotes Oncogenesis by Induction of Innate and Adaptive Immune Suppression. *Cancer*

- Discov [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2024 Sep 20];8(4):403. Available from: /pmc/articles/PMC6225783/
110. Ren Z, Jiang J, Xie H, Li A, Lu H, Xu S, et al. Gut microbial profile analysis by MiSeq sequencing of pancreatic carcinoma patients in China. *Oncotarget* [Internet]. 2017 [cited 2024 Sep 20];8(56):95176–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29221120/>
 111. Zambirinis CP, Pushalkar S, Saxena D, Miller G. Pancreatic cancer, inflammation, and microbiome. *Cancer Journal (United States)* [Internet]. 2014 [cited 2024 Sep 22];20(3):195–202. Available from: https://journals.lww.com/journalppo/fulltext/2014/05000/pancreatic_cancer,_inflammation,_and_microbiome.6.aspx
 112. Wei MY, Shi S, Liang C, Meng QC, Hua J, Zhang YY, et al. The microbiota and microbiome in pancreatic cancer: more influential than expected. *Molecular Cancer* 2019 18:1 [Internet]. 2019 May 20 [cited 2024 Sep 22];18(1):1–15. Available from: <https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-019-1008-0>
 113. Pagliari D, Saviano A, Newton EE, Serricchio ML, Dal Lago AA, Gasbarrini A, et al. Gut Microbiota-Immune System Crosstalk and Pancreatic Disorders. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2024 Sep 22];2018(1):7946431. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1155/2018/7946431>
 114. Adachi T, Tajima Y, Kuroki T, Mishima T, Kitasato A, Fukuda K, et al. Bile-reflux into the pancreatic ducts is associated with the development of intraductal papillary carcinoma in hamsters. *J Surg Res* [Internet]. 2006 Nov [cited 2024 Sep 26];136(1):106–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16863651/>
 115. Tucker ON, Dannenberg AJ, Yang EK, Fahey TJ. Bile acids induce cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic cancer cell lines. *Carcinogenesis* [Internet]. 2004 Mar [cited 2024 Sep 26];25(3):419–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14656949/>
 116. Feng HY, Chen YC. Role of bile acids in carcinogenesis of pancreatic cancer: An old topic with new perspective. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2016 Sep 9 [cited 2024 Sep 20];22(33):7463. Available from: /pmc/articles/PMC5011662/
 117. Nagathihalli NS, Beesetty Y, Lee W, Washington MK, Chen X, Lockhart AC, et al. Novel Mechanistic Insights into Ectodomain Shedding of EGFR Ligands Amphiregulin and TGF- α : Impact on Gastrointestinal Cancers Driven by Secondary Bile Acids. *Cancer Res* [Internet]. 2014 Apr 4 [cited 2024 Sep 20];74(7):2062. Available from: /pmc/articles/PMC3975694/
 118. Kim YJ, Jeong SH, Kim EK, Kim EJ, Cho JH. Ursodeoxycholic acid suppresses epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell formation by reducing the levels of peroxiredoxin II and reactive oxygen species in pancreatic cancer cells. *Oncol Rep* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2024 Sep 20];38(6):3632–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29130098/>
 119. Kovács T, Mikó E, Ujlaki G, Yousef H, Csontos V, Uray K, et al. The involvement of oncobiosis and bacterial metabolite signaling in metastasis formation in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev*

- [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2024 Sep 19];40(4):1223. Available from: /pmc/articles/PMC8825384/
120. Norlin M, Wikvall K. Enzymes in the conversion of cholesterol into bile acids. *Curr Mol Med* [Internet]. 2007 Mar 1 [cited 2024 Sep 20];7(2):199–218. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17346171/>
 121. Matern S, Gerok W. Pathophysiology of the enterohepatic circulation of bile acids. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* [Internet]. 1979 [cited 2024 Sep 20];85:125–204. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/373057/>
 122. Daruich A, Picard E, Boatright JH, Behar-Cohen F. Review: The bile acids urso- and tauroursodeoxycholic acid as neuroprotective therapies in retinal disease. *Mol Vis* [Internet]. 2019 [cited 2024 Sep 20];25:610. Available from: /pmc/articles/PMC6817734/
 123. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res*. 2006 Feb 1;47(2):241–59.
 124. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res* [Internet]. 2006 Feb [cited 2024 Aug 21];47(2):241–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16299351/>
 125. Gérard P. Metabolism of Cholesterol and Bile Acids by the Gut Microbiota. *Pathogens*. 2013 Dec 30;3(1):14–24.
 126. Režen T, Rozman D, Kovács T, Kovács P, Sipos A, Bai P, et al. The role of bile acids in carcinogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2022 May 16;79(5):243.
 127. Di Ciaula A, Garruti G, Baccetto RL, Molina-Molina E, Bonfrate L, Wang DQH, et al. Bile Acid Physiology. *Ann Hepatol*. 2017 Nov 1;16:S4–14.
 128. Raju U, Levitz M, Javitt NB. Bile acids in human breast cyst fluid: the identification of lithocholic acid. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 1990 [cited 2024 May 17];70(4):1030–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2318933/>
 129. Rees DO, Crick PJ, Jenkins GJ, Wang Y, Griffiths WJ, Brown TH, et al. Comparison of the composition of bile acids in bile of patients with adenocarcinoma of the pancreas and benign disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2024 Sep 20];174:290. Available from: /pmc/articles/PMC5668629/
 130. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000 Jan;100(1):57–70.
 131. Davies MA, Samuels Y. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene*. 2010 Oct 14;29(41):5545–55.
 132. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*. 2008 Sep 15;27(41):5497–510.
 133. Jiang B, Liu L. Chapter 2 PI3K/PTEN Signaling in Angiogenesis and Tumorigenesis. In 2009. p. 19–65.
 134. Pópulo H, Lopes JM, Soares P. The mTOR Signalling Pathway in Human Cancer. *Int J Mol Sci*. 2012 Feb 10;13(2):1886–918.
 135. Burkhart DL, Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer*. 2008 Sep 24;8(9):671–82.

136. Fernald K, Kurokawa M. Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol.* 2013 Dec;23(12):620–33.
137. Jafri MA, Ansari SA, Alqahtani MH, Shay JW. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Med.* 2016 Dec 20;8(1):69.
138. Hanahan D, Folkman J. Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell.* 1996 Aug;86(3):353–64.
139. Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004 Feb 1;4(2):118–32.
140. Berx G, van Roy F. Involvement of Members of the Cadherin Superfamily in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009 Dec 1;1(6):a003129–a003129.
141. Warburg O, Wind F, Negelein E. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *Journal of General Physiology.* 1927 Mar 7;8(6):519–30.
142. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Mar;11(3):220–8.
143. Suarez-Carmona M, Lesage J, Cataldo D, Gilles C. EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. *Mol Oncol.* 2017 Jul 26;11(7):805–23.
144. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med [Internet].* 1991 Sep 30 [cited 2024 May 22];91(3C). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1928205/>
145. Squadrito GL, Pryor WA. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radic Biol Med [Internet].* 1998 [cited 2024 May 22];25(4–5):392–403. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9741578/>
146. Brieger K, Schiavone S, Miller FJ, Krause KH. Reactive oxygen species: From health to disease. *Swiss Med Wkly.* 2012;142.
147. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging [Internet].* 2018 Jan 1 [cited 2024 Sep 16];13:757. Available from: </pmc/articles/PMC5927356/>
148. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J [Internet].* 2012 [cited 2024 May 22];5(1):9–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23268465/>
149. Peng C, Wang X, Chen J, Jiao R, Wang L, Li YM, et al. Biology of ageing and role of dietary antioxidants. *Biomed Res Int [Internet].* 2014 [cited 2024 Sep 10];2014. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24804252/>
150. Lykkesfeldt J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clinica Chimica Acta.* 2007 May 1;380(1–2):50–8.

151. Barrera G. Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy. *ISRN Oncol*. 2012 Oct 17;2012:1–21.
152. Ahsan H. 3-Nitrotyrosine: A biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmunogenic conditions. *Hum Immunol* [Internet]. 2013 Oct [cited 2024 Sep 16];74(10):1392–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23777924/>
153. Martinez-Useros J, Li W, Cabeza-Morales M, Garcia-Foncillas J. Oxidative Stress: A New Target for Pancreatic Cancer Prognosis and Treatment. *J Clin Med* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2024 May 22];6(3). Available from: </pmc/articles/PMC5372998/>
154. Gill JG, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer, Oxidative Stress, and Metastasis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* [Internet]. 2016 [cited 2024 May 22];81(1):163–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28082378/>
155. Das J, Sarkar A, Sil PC. Hexavalent chromium induces apoptosis in human liver (HepG2) cells via redox imbalance. *Toxicol Rep* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2024 Sep 5];2:600. Available from: </pmc/articles/PMC5598256/>
156. Suzuki T, Motohashi H, Yamamoto M. Toward clinical application of the Keap1-Nrf2 pathway. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 2013 Jun [cited 2024 May 22];34(6):340–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23664668/>
157. Fuse Y, Kobayashi M. Conservation of the Keap1-Nrf2 System: An Evolutionary Journey through Stressful Space and Time. *Molecules* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2024 May 22];22(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28282941/>
158. Jain AK, Jaiswal AK. Phosphorylation of tyrosine 568 controls nuclear export of Nrf2. *J Biol Chem* [Internet]. 2017 Feb 2 [cited 2024 Sep 5];292(5):2051. Available from: </pmc/articles/PMC5290978/>
159. Malhotra D, Portales-Casamar E, Singh A, Srivastava S, Arenillas D, Happel C, et al. Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through ChIP-Seq profiling and network analysis. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2010 May 11 [cited 2024 Sep 5];38(17):5718. Available from: </pmc/articles/PMC2943601/>
160. Bao L, Wu J, Dodson M, Rojo de la Vega EM, Ning Y, Zhang Z, et al. ABCF2, an Nrf2 target gene, contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Mol Carcinog* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2024 May 22];56(6):1543. Available from: </pmc/articles/PMC5509336/>
161. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* [Internet]. 2009 Jun 6 [cited 2024 Aug 29];119(6):1420. Available from: </pmc/articles/PMC2689101/>
162. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* [Internet]. 2009 Jun 1 [cited 2024 Jul 17];119(6):1420–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19487818/>

163. E-Cadherin Expression Is Silenced by DNA Hypermethylation in Human Breast and Prostate Carcinomas¹ | Cancer Research | American Association for Cancer Research [Internet]. [cited 2024 Sep 22]. Available from: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/55/22/5195/501726/E-Cadherin-Expression-Is-Silenced-by-DNA>
164. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2007 Nov 15 [cited 2024 Sep 22];1(5):555–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18371393/>
165. Wang S, Huang S, Sun YL. Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer: A Review. *Biomed Res Int* [Internet]. 2017 [cited 2024 Sep 22];2017. Available from: </pmc/articles/PMC5742883/>
166. Wu Y, Sarkissyan M, Vadgama J V. Epithelial-Mesenchymal Transition and Breast Cancer. *J Clin Med* [Internet]. 2016 Jan 26 [cited 2024 Sep 26];5(2). Available from: </pmc/articles/PMC4773769/>
167. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* [Internet]. 2009 Jan 23 [cited 2024 Sep 22];136(2):215–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19167326/>
168. Park SM, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev* [Internet]. 2008 Apr 4 [cited 2024 Sep 22];22(7):894. Available from: </pmc/articles/PMC2279201/>
169. Korpál M, Ell BJ, Buffa FM, Ibrahim T, Blanco MA, Celià-Terrassa T, et al. Direct targeting of Sec23a by miR-200s influences cancer cell secretome and promotes metastatic colonization. *Nat Med* [Internet]. 2011 Sep [cited 2024 Sep 22];17(9):1101. Available from: </pmc/articles/PMC3169707/>
170. Díaz-López A, Moreno-Bueno G, Cano A. Role of microRNA in epithelial to mesenchymal transition and metastasis and clinical perspectives. *Cancer Manag Res* [Internet]. 2014 Apr 25 [cited 2024 Sep 22];6(1):205. Available from: </pmc/articles/PMC4008290/>
171. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* [Internet]. 2008 May 16 [cited 2024 Jul 17];133(4):704–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18485877/>
172. Xue W, Yang L, Chen C, Ashrafizadeh M, Tian Y, Sun R. Wnt/ β -catenin-driven EMT regulation in human cancers. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2024 Dec 1 [cited 2024 Aug 29];81(1). Available from: </pmc/articles/PMC10857981/>
173. Drasin DJ, Robin TP, Ford HL. Breast cancer epithelial-to-mesenchymal transition: examining the functional consequences of plasticity. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2011 Nov 1 [cited 2024 Jul 17];13(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22078097/>

174. Huang Y, Hong W, Wei X. The molecular mechanisms and therapeutic strategies of EMT in tumor progression and metastasis. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2024 Aug 29];15(1). Available from: [/pmc/articles/PMC9461252/](#)
175. Satoh K, Hamada S, Shimosegawa T. Involvement of epithelial to mesenchymal transition in the development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Gastroenterol* [Internet]. 2015 Feb 1 [cited 2024 Sep 20];50(2):140–6. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00535-014-0997-0>
176. Peiris-Pagès M, Martinez-Outschoorn UE, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP. Cancer stem cell metabolism. *Breast Cancer Research* [Internet]. 2016 May 24 [cited 2024 Jul 18];18(1):1–10. Available from: <https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-016-0712-6>
177. Duan JJ, Qiu W, Xu SL, Wang B, Ye XZ, Ping YF, et al. Strategies for Isolating and Enriching Cancer Stem Cells: Well Begun Is Half Done. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2013 Aug 8 [cited 2024 Sep 20];22(16):2221. Available from: [/pmc/articles/PMC3730373/](#)
178. Ercan G, Karlitepe A, Ozpolat B. Pancreatic Cancer Stem Cells and Therapeutic Approaches. *Anticancer Res* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2024 Sep 20];37(6):2761–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28551612/>
179. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2007 Nov 15 [cited 2024 Sep 20];1(5):555–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18371393/>
180. Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH, et al. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell*. 2005;7(5):469–83.
181. Bubin R, Uljanovs R, Strumfa I. Cancer Stem Cells in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023 Apr 1 [cited 2024 Sep 20];24(8):7030. Available from: [/pmc/articles/PMC10138709/](#)
182. Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2013 Dec [cited 2024 Sep 20];12(12):931–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24287781/>
183. Bhakkiyalakshmi E, Sireesh D, Rajaguru P, Paulmurugan R, Ramkumar KM. The emerging role of redox-sensitive Nrf2–Keap1 pathway in diabetes. *Pharmacol Res*. 2015 Jan 1;91:104–14.
184. Winkel AF, Engel CK, Margerie D, Kannt A, Szillat H, Glombik H, et al. Characterization of RA839, a Noncovalent Small Molecule Binder to Keap1 and Selective Activator of Nrf2 Signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 2015 Nov 20;290(47):28446–55.
185. Uchida K, Szweda LI, Chae HZ, Stadtman ER. Immunochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in oxidized hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993 Sep 15;90(18):8742–6.

186. Mabley JG, Pacher P, Bai P, Wallace R, Goonesekera S, Virag L, et al. Suppression of intestinal polyposis in *Apcmin/+* mice by targeting the nitric oxide or poly(ADP-ribose) pathways. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2004 Apr;548(1–2):107–16.
187. Hegedűs C, Lakatos P, Kiss-Szikszai A, Patonay T, Gergely S, Gregus A, et al. Cytoprotective dibenzoylmethane derivatives protect cells from oxidative stress-induced necrotic cell death. *Pharmacol Res*. 2013 Jun;72:25–34.
188. Anatomical Pathology Equipment & Workflow Solutions: Leica Biosystems [Internet]. [cited 2024 Sep 22]. Available from: <https://www.leicabiosystems.com/>
189. Csonka T, Murnyák B, Szepesi R, Bencze J, Bognár L, Klekner Á, et al. Assessment of candidate immunohistochemical prognostic markers of meningioma recurrence. *Folia Neuropathol*. 2016;54(2):114–26.
190. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* [Internet]. 2007 Jan [cited 2024 May 17];87(1):315–424. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17237348/>
191. Jankó L, Kovács T, Laczik M, Sári Z, Ujlaki G, Kis G, et al. Silencing of poly(Adp-ribose) polymerase-2 induces mitochondrial reactive species production and mitochondrial fragmentation. *Cells* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2024 Nov 25];10(6):1387. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8227884/>
192. Giustarini D, Galvagni F, Dalle Donne I, Milzani A, Severi FM, Santucci A, et al. N-acetylcysteine ethyl ester as GSH enhancer in human primary endothelial cells: A comparative study with other drugs. *Free Radic Biol Med*. 2018 Oct 1;126:202–9.
193. Cherian MT, Lin W, Wu J, Chen T. CINPA1 is an inhibitor of constitutive androstane receptor that does not activate pregnane X receptors. *Mol Pharmacol* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2024 Nov 25];87(5):878–89. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4407736/>
194. Norona LM, Fullerton A, Lawson C, Leung L, Brumm J, Kiyota T, et al. In vitro assessment of farnesoid X receptor antagonism to predict drug-induced liver injury risk. *Arch Toxicol* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2024 Nov 25];94(9):3185–200. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00204-020-02804-4>
195. Solt LA, Kamenecka TM, Burris TP. LXR-Mediated Inhibition of CD4+ T Helper Cells. *PLoS One* [Internet]. 2012 Sep 28 [cited 2024 Nov 25];7(9):e46615. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3460920/>
196. Ruepp MD, Brozik JA, De Esch IJP, Farndale RW, Murrell-Lagnado RD, Thompson AJ. A fluorescent approach for identifying P2X1 ligands. *Neuropharmacology* [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2024 Nov 25];98:13. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4728187/>
197. TNM Classification of Malignant Tumours - Google Könyvek [Internet]. [cited 2024 Aug 12]. Available from:

- https://books.google.hu/books?hl=hu&lr=&id=72sC1Zk6OgQC&oi=fnd&pg=PT13&ots=1XSWWYqdc_&sig=HegfJwvvmCD45omQZcHrSF64sIk&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
198. Takebe N, Warren RQ, Ivy SP. Breast cancer growth and metastasis: interplay between cancer stem cells, embryonic signaling pathways and epithelial-to-mesenchymal transition. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2011 Jun 10 [cited 2024 Jul 18];13(3):211. Available from: [/pmc/articles/PMC3218933/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18371365/)
 199. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2007 Sep 13 [cited 2024 Jul 18];1(3):313–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18371365/>
 200. Bard JM, Luu HT, Dravet F, Michel C, Moyon T, Pagniez A, et al. Relationship Between Intestinal Microbiota and Clinical Characteristics of Patients with Early Stage Breast Cancer. *The FASEB Journal* [Internet]. 2015 Apr [cited 2024 Sep 21];29(S1):914.2. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1096/fasebj.29.1_supplement.914.2
 201. Luu TH, Michel C, Bard JM, Dravet F, Nazih H, Bobin-Dubigeon C. Intestinal Proportion of *Blautia* sp. is Associated with Clinical Stage and Histoprognostic Grade in Patients with Early-Stage Breast Cancer. *Nutr Cancer* [Internet]. 2017 Feb 17 [cited 2024 Sep 21];69(2):267–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28094541/>
 202. Hieken TJ, Chen J, Hoskin TL, Walther-Antonio M, Johnson S, Ramaker S, et al. The Microbiome of Aseptically Collected Human Breast Tissue in Benign and Malignant Disease. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Aug 3 [cited 2024 Sep 21];6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27485780/>
 203. Kirkup BM, McKee A, Makin KA, Paveley J, Caim S, Alcon-Giner C, et al. Perturbation of the gut microbiota by antibiotics results in accelerated breast tumour growth and metabolic dysregulation. *bioRxiv* [Internet]. 2019 Feb 19 [cited 2024 Sep 19];553602. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/553602v1>
 204. Leal-Lopes C, Velloso FJ, Campopiano JC, Sogayar MC, Correa RG. Roles of Commensal Microbiota in Pancreas Homeostasis and Pancreatic Pathologies. *J Diabetes Res* [Internet]. 2015 [cited 2024 Sep 21];2015. Available from: [/pmc/articles/PMC4544440/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25444440/)
 205. Chen M, Ye Ax, Wei J, Wang R, Poon K. Deoxycholic Acid Upregulates the Reprogramming Factors KLF4 and OCT4 Through the IL-6/STAT3 Pathway in Esophageal Adenocarcinoma Cells. *Technol Cancer Res Treat* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2024 Sep 21];19. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1533033820945302>
 206. Milovic V, Teller IC, Murphy GM, Caspary WF, Stein J. Deoxycholic acid stimulates migration in colon cancer cells. *Eur J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2001 [cited 2024 Sep

- 21];13(8):945–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11507360/>
207. Pai R, Tarnawski AS, Tran T. Deoxycholic Acid Activates β -Catenin Signaling Pathway and Increases Colon Cell Cancer Growth and Invasiveness. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2004 May 5 [cited 2024 Sep 21];15(5):2156–63. Available from: <https://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.e03-12-0894>
208. Quilty F, Byrne AM, Aird J, Mashad S El, Parra-Blanco A, Long A, et al. Impact of Deoxycholic Acid on Oesophageal Adenocarcinoma Invasion: Effect on Matrix Metalloproteinases. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol 21, Page 8042 [Internet]. 2020 Oct 28 [cited 2024 Sep 21];21(21):8042. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/21/8042/htm>
209. Pyo JS, Ko YS, Kang G, Kim DH, Kim WH, Lee BL, et al. Bile acid induces MUC2 expression and inhibits tumor invasion in gastric carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2015 Jul 22 [cited 2024 Sep 21];141(7):1181–8. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00432-014-1890-1>
210. Lin R, Zhan M, Yang L, Wang H, Shen H, Huang S, et al. Deoxycholic acid modulates the progression of gallbladder cancer through N6-methyladenosine-dependent microRNA maturation. *Oncogene* 2020 39:26 [Internet]. 2020 Jun 8 [cited 2024 Sep 21];39(26):4983–5000. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41388-020-1349-6>
211. Yang HB, Song W, Cheng MD, Fan HF, Gu X, Qiao Y, et al. Deoxycholic acid inhibits the growth of BGC-823 gastric carcinoma cells via a p53-mediated pathway. *Mol Med Rep* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2024 Sep 21];11(4):2749–54. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2014.3004/abstract>
212. POWELL AA, LaRUE JM, BATTA AK, MARTINEZ JD. Bile acid hydrophobicity is correlated with induction of apoptosis and/or growth arrest in HCT116 cells. *Biochemical Journal* [Internet]. 2001 Jun 1 [cited 2024 Sep 26];356(2):481–6. Available from: </biochemj/article/356/2/481/39256/Bile-acid-hydrophobicity-is-correlated-with>
213. Horowitz NS, Hua J, Powell MA, Gibb RK, Mutch DG, Herzog TJ. Novel cytotoxic agents from an unexpected source: Bile acids and ovarian tumor apoptosis. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2007 Nov 1 [cited 2024 Sep 21];107(2):344–9. Available from: <http://www.gynecologiconcology-online.net/article/S0090825807005355/fulltext>
214. Song W, Yang HB, Chen P, Wang SM, Zhao LP, Xu WH, et al. Apoptosis of human gastric carcinoma SGC-7901 induced by deoxycholic acid via the mitochondrial-dependent pathway. *Appl Biochem Biotechnol* [Internet]. 2013 Oct 13 [cited 2024 Sep 21];171(4):1061–71. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12010-013-0417-6>
215. Viale A, Pettazoni P, Lyssiotis CA, Ying H, Sánchez N, Marchesini M, et al. Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend

- on mitochondrial function. *Nature* [Internet]. 2014 Oct 10 [cited 2024 Sep 21];514(7524):628. Available from: [/pmc/articles/PMC4376130/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25000000/)
216. Yang J, Ren B, Yang G, Wang H, Chen G, You L, et al. The enhancement of glycolysis regulates pancreatic cancer metastasis. *Cellular and Molecular Life Sciences* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2024 Sep 21];77(2):305–21. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-019-03278-z>

11. TÁRGYSZAVAK

Daganatőssejt	cancer stem cell
Dezoxikólsav	deoxycholic acid
Emlődaganat	breast cancer
Epiteliális-mezenchimális tranzíció	epithelial-mesenchymal transition
Hasnyálmirigy daganat	pancreatic cancer
Litokólsav	lithocholic acid
Mikrobiom	microbiome
Nitrozatív stressz	nitrosative stress
Oxidatív stressz	oxidative stress

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Kapitányné Dr. Mikó Editnek, a mérhetetlen mennyiségű segítségért, támogatásért és türelemért, amit az elmúlt években tanúsított. A szakmai hozzáértése és mentori tanácsai nélkülözhetetlenek voltak a szakmai fejlődésemhez, valamint a disszertációm elkészítéséhez.

Hálás vagyok Prof. Dr. Bay Péternek, hogy helyet biztosított a munkacsoportjában és tanácsaival mindig segítette a fejlődésemet, valamint bátorított az előrehaladásban.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Virág László intézetigazgatónak, hogy lehetővé tette számomra a kutatómunkát az Orvosi Vegytani intézetben. Továbbá köszönetem fejezném ki az Intézet minden munkatársának a segítségükért.

Hálás vagyok Schwarz Szendrának, Nyerges Petrának, Dr. Ujlaki Gyulának, Dr. Sipos Adrienn-nek és Dr. Kovács Tündének a munkám során nyújtott segítségükért. Továbbá a Bay-munkacsoport minden tagjának a jó hangulatban eltöltött mindennapokért.

Szeretném megköszönni Dr. Csonka Tamásnak és Prof. Dr. Méhes Gábornak a szövettani vizsgálatok elvégzését.

Köszönetem fejezném ki Dr. Karen Uraynak közleményeink nyelvi lektorálásáért.

Végül, de nem utolsó sorban mérhetetlen hálával és szeretettel tartozom, feleségemnek, kislányomnak, szüleimnek és az egész családomnak, hogy erőt adtak és támogattak a mindennapok nehézségei során. Továbbá köszönöm a második családomnak, hogy jókedvükkel és szeretetükkel segítettek abban, hogy „ilyen mikrobiológus doktor vagy mi” lehessenek.

13. PUBLIKÁCIÓS LISTA



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/487/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kovács Patrik
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Schwarcz, S.*, **Kovács, P.***, Kovács, T., Ujlaki, G., Nyerges, P., Uray, K., Bai, P., Mikó, E.: The pro- and antineoplastic effects of deoxycholic acid in pancreatic adenocarcinoma cell models. *Mol. Biol. Rep.* 50 (6), 5273-5282, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-023-08453-x>
* Megosztott első szerzős közlemény.
IF: 2.6
2. **Kovács, P.**, Csonka, T., Kovács, T., Sári, Z., Ujlaki, G., Sipos, A., Karányi, Z., Szeőcs, D., Hegedűs, C., Uray, K., Jankó, L., Kiss, M., Kiss, B. K., Laoui, D., Virág, L., Méhes, G., Bai, P., Mikó, E.: Lithocholic acid, a metabolite of the microbiome, increases oxidative stress in breast cancer. *Cancers (Basel)*. 11, 1-31, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers11091255>
IF: 6.126

További közlemények

3. Schwarcz, S., **Kovács, P.**, Nyerges, P., Ujlaki, G., Sipos, A., Uray, K., Bai, P., Mikó, E.: The bacterial metabolite, lithocholic acid, has antineoplastic effects in pancreatic adenocarcinoma. *Cell Death Discov.* 10 (1), 1-12, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41420-024-02023-1>
IF: 6.1 (2023)
4. Režen, T., Rozman, D., Kovács, T., **Kovács, P.**, Sipos, A., Bai, P., Mikó, E.: The role of bile acids in carcinogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 79 (5), 1-39, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-022-04278-2>
IF: 8





5. Kovács, T., Mikó, E., Vida, A., Sebő, É., Tóth, J., Csonka, T., Boratkó, A., Ujlaki, G., Lente, G., **Kovács, P.**, Tóth, D., Árkosy, P., Kiss, B. K., Méhes, G., Goedert, J. J., Bai, P.: Cadaverine, a metabolite of the microbiome, reduces breast cancer aggressiveness through trace amino acid receptors.
Sci Rep. 9 (1), 1-14, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-37664-7>
IF: 3.998
6. Mikó, E., Vida, A., Kovács, T., Ujlaki, G., Trencsényi, G., Márton, J., Sári, Z., **Kovács, P.**, Boratkó, A., Hujber, Z., Csonka, T., Antal-Szalmás, P., Watanabe, M., Gombos, I., Csóka, B., Kiss, B. K., Vígh, L., Szabó, J., Méhes, G., Sebestyén, A., Goedert, J. J., Bai, P.: Lithocholic acid, a bacterial metabolite reduces breast cancer cell proliferation and aggressiveness.
Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. 1859 (9), 958-974, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.04.002>
IF: 4.441

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 31,265

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
8,726**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2024.09.24.



14. FÜGGELÉK

Az értekezés a következő publikációk alapján készült: