

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A másodlagos epesavak antikarcinogén hatásai
hasnyálmirigy adenokarcinómában**

Schwarcz Szandra

Témavezető: Kapitányné Dr. Mikó Edit



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2025

A másodlagos epesavak antikarcinogén hatásai hasnyálmirigy adenokarcinómában

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Schwarcz Szandra okleveles vegyész

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudományok doktori iskolája (Jelátviteli folyamatok sejt- és molekuláris biológiája programja) keretében

Témavezető: Kapitányné Dr. Mikó Edit

Az értekezés bírálói: Dr. Mihály Johanna, PhD

Dr. Bartók Ádám, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László az MTA doktora

tagok: Dr. Mihály Johanna, PhD

Dr. Bartók Ádám, PhD

Dr. Péntes-Daku Krisztina, PhD

Dr. Szüts Dávid, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme,
2025. november 28., 13:00 óra

Bevezetés

Hasnyálmirigy daganatos megbetegedések

A hasnyálmirigy adenokarcinóma (PDAC) az egyik legagresszívebb daganattípus. A 12. leggyakoribb ráktípus és a halálozási ráta 6. helyén áll világszerte, 2022-ben 510,566 új esetet és 467,005 halálesetet találtak. A betegeket általában előrehaladott stádiumban diagnosztizálják, mivel hiányoznak a korai diagnózishoz szükséges markerek, és a betegek tünetmentesek a betegség korai szakaszában. A hasnyálmirigy daganatban szenvedő betegek 5 éves túlélési aránya mindössze 10% körül mozog. A betegség magas metasztatikus potenciálja és a kemoterápiával szembeni rezisztenciája rossz prognózist eredményez, ezért elengedhetetlen a hasnyálmirigy adenokarcinóma patogenezisének jobb megértése.

Pankreász adenokarcinóma

A hasnyálmirigy adenokarcinóma nem invazív prekarinogén neopláziákból alakul ki, amelyet az őket borító hám diszplázia morfológiai foka alapján alacsony vagy magas fokozatúként osztályoznak. Ezek az elváltozások gyógyíthatók, ha elég korán felismerik és kezelik őket. Az invazív PDAC leggyakoribb előfutára a hasnyálmirigy intraepiteliális neopláziája (PanIN), amely mikroszkópikus elváltozásként a kis hasnyálmirigy-vezetékben jelenik meg. A betegség kialakulásának rizikófaktorai a dohányzás, az elhízás, rossz táplálkozási szokások, cukorbetegség, valamint a krónikus hasnyálmirigy-gyulladás.

A PDAC gyakran krónikus hasnyálmirigy-gyulladás hátterében alakul ki, és gyulladással kapcsolatos mikrokozmoszhoz kapcsolódik. Számos bizonyíték alátámasztja, hogy a gyulladás indukálása az onkogén KRAS-t (Kirsten-Rat szarkóma vírus onkogén homológ) expresszáló hasnyálmirigy-szövetben felgyorsítja a tumor progresszióját és neoplasztikus prekursor léziók, például acinaris-ductalis metaplasia (ADM) és pankreász intraepiteliális neoplazia (PanIN) megjelenését idézi elő. A KRAS aktív formáját eredményező mutációk a PDAC-k több mint 95%-ában előfordulnak, és sokan úgy vélik, hogy ezek a mutációk hozzájárulnak a daganat kialakulásához.

A műtéti reszekció és a szisztematikus kemoterápia kombinációja jelenti az egyetlen reményt a hosszú távú túlélésre vagy gyógyulásra a nem metasztatizáló hasnyálmirigy

daganatos betegek számára. A PDAC-ban szenvedő betegek kezelésére 1997-ben egy nukleozid-analógot, a gemcitabine-t, vezették be. A későbbiekben számos kemoterápiás gyógyszert hagytak jóvá a PDAC kezelésére, mint a topoizomeráz gátlók (irinotecan), nukleozid-analógok (capecitabine), platinavegyületeket (oxaliplatin), antimetabolitok (5-fluorouracil), azonban ezek a terápiás lehetőségek nem mutattak jelentős túlélési előnyt a gemcitabine monoterápiájához képest. Azonban 2011-ben a folinsav, 5-fluorouracil, irinotecan és oxaliplatin kombinációjaként alkalmazott FOLFIRINOX jelentős javulást mutatott a betegek túlélésében a gemcitabine monoterápiájához képest. Ez a kezelési eljárás azonban jelentős mellékhatásokat okoz, mint például a hasmenés, hányinger, fáradtság, mieloszuppresszió és neuropátia, amelyeket csak részben lehet kontrollálni gyógyszerekkel.

A kombinált kezelés hatására megnövekedett túlélési előny, az egy ágensű gemcitabine kezeléshez képest, azt mutatja, hogy ezen kombinált kemoterápiás gyógyszerek alkalmazása egy lehetséges kezelési opció a hasnyálmirigyrákban szenvedő betegek számára, de a mellékhatások miatt kizárólag jó általános állapotú betegek esetén alkalmazhatóak.

Diszbiózis

A humán mikrobióta az emberi test felszínén, illetve az emberi szervezetben élő kommenzalista, szimbionta és patogén mikroorganizmusok, vírusok, gombák, baktériumok közössége. A humán mikrobiom, pedig ezen mikroorganizmusokat és kollektív genomját foglalja magába. A mikrobiom vizsgálata napjainkban nagy mértékben növelte a mikrobióta egészségre gyakorolt jelentőségének megértését az élet minden szakaszában. A Földön található körülbelül $\sim 10^{12}$ mikrobiális faj közül 11-et sorolt az International Association for Cancer Registries (IACR) „humán karcinogénnek” vagy „onkomikróbának”. Egyes onkomikróbák, olyan virulenciafaktorokkal rendelkeznek, amelyek az E-cadherin–Wnt– β -catenin jelátviteli útvonalon keresztül fokozzák a tumorképződést, mint például a *Fusobacterium nucleatum* és több *Salmonella* törzs, melyek évente körülbelül 2,2 millió rákos esetet okoznak.

A bél mikrobióta több mint 1500 fajból áll, amelyek több mint 50 különböző törzsbe sorolhatók. A bélben a *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Tenericutes*, *Actinobacteria* és *Verrucomicrobia* törzsek a legdominánsabbak, és ezek együtt az emberi mikrobiális populáció 90%-át alkotják.

A mikrobióta szimbiózisban él a gazdaszervezettel, és már az élet korai szakaszában befolyásolja a gazdaszervezet fiziológiai fejlődését. Fontos szerepet játszik az emésztésben, a

mikrotápanyagok felszívódásában, a vitaminok és az epesavak szintézisében. A mikrobióta számos élettani folyamatot befolyásol, mint az immunhomeosztázis fenntartását, a bélbarrier funkciójának megőrzését, az adipóz szövetek mennyiségét, az anyagcserét, a vérnyomás szabályozását, a glükóz-homeosztázist, a véralvadási kockázatokat.

A bél mikrobiomjának összetételét befolyásolja az életkor, higiénia, étrend, pre- és probiotikumok vagy antibiotikumok szedése, az alkoholfogyasztás és a dohányzás, továbbá egyes patogének inváziója is hatással lehet a mikrobiom összetételére. A mikrobiom összetételében bekövetkező változást diszbiózissnak nevezzük. Az emésztőrendszeri diszbiózis kialakulása patológiás folyamatokat (tartós gyulladás, és az ebből eredő oxidatív stressz okozta DNS-károsodás és genominstabilitás) indukál. A daganatos megbetegedésekre jellemző diszbiózist onkobiózissnak, a megváltozott összetételű mikrobiomot onkobiomnak nevezzük.

A mikrobiális diszbiózist, vagyis a bélflóra egyensúlyának felborulását leggyakrabban olyan daganatos megbetegedésekkel hozzák összefüggésbe, amelyek közvetlen kapcsolatban állnak a baktériumokkal kolonizált szervekkel, például a gyomorral, bélrendszerrel vagy a szájüreggel. Ugyanakkor a mikrobiom hatása nem korlátozódik kizárólag ezekre a területekre, mivel a baktériumok által termelt metabolitok a véráram útján távoli szervekhez is eljuthatnak, és ott elősegíthetik vagy gátolhatják a daganatképződést. A bakteriális metabolitok egy része a baktériumok természetes anyagcseréjének közti-termékei, például a fenolok, indolok, hidrogén-szulfid vagy más aromás aminok, amelyek hosszú távon krónikus gyulladást, DNS-károsodást vagy epigenetikai módosulásokat válthatnak ki a gazdaszervezet sejtjeiben. Emellett olyan metabolitokat is azonosítottak, amelyek a gazdaszervezet enzimatis rendszerei által tovább módosított formában válnak biológiailag aktívvá és ezek gyakran még erőteljesebb biológiai hatást fejtenek ki.

A másodlagos epesavak

A bélmikrobiom jelentős bioszintetikus kapacitással rendelkezik, számos metabolitot termel, melyek lokálisan hatnak vagy a vérkeringéssel eljutnak a távoli szerveket érintő daganatsejtekhez és befolyásolják azok viselkedését. Ilyen metabolitok a bélbaktériumok által elsődleges epesavkból képződő másodlagos epesavak, mint a litokólsav (LCA), dezoxikólsav (DCA) és ursodezoxikólsav (UDCA).

A szintetizált epesav mennyiségét transzkripciós szintű kontroll mechanizmusok szabályozzák, mely során az epesavak a farnezoid X receptorhoz (FXR) történő kötődésével, végül gátolják a további epesav szintézist.

Az epesav termelés naponta körülbelül 500 mg koleszterint használ fel, így ez az egyik fő mechanizmus a koleszterinszint szabályozására az emberi szervezetben. Étkezés után a kolecisztokinin (CCK) hormon felszabadulásának hatására az epesavak az epével az epeutakon keresztül a vékonybélbe jutnak, ahol a zsírok emésztésében, továbbá micellák képzésével a zsírban oldódó tápanyagok, vitaminok (A, D, E, K₁) oldásában, emulgálásában és a normál koleszterinszint fenntartásában játszanak fontos szerepet. Az epesavak ezután az ileumban az enterociták által felszívódnak, és a portális keringésen keresztül a májba jutnak, ahol újra felhasználódnak, ezt a körforgást nevezik enterohepatikus körforgásnak.

Naponta nagyjából 500 mg epesav lép ki az enterohepatikus körforgásból, mely epesavak különböző reakciók révén szekunder epesavakká alakulnak.

Az epesavak nemcsak az emésztésben játszanak szerepet, hanem jelátvivő molekulaként is funkcionálnak. Képesek aktiválni membránreceptorokat, például a G-fehérje-kapcsolt epesavreceptort (GPBAR1, más néven TGR5), a szfingozin-1-foszfát receptor 2-t (S1PR2), valamint muszkarin receptorokat is (CHRM2 és CHRM3). Az epesavak nukleáris receptorokhoz is kötődhetnek, mint például: Farnezoid X receptor (FXR, NR1H4), Pregnán X receptor (PXR, NR1H2), D-vitamin receptor (VDR, NR1H1), Konstitutív androsztán receptor (CAR, NR1H3) és a Máj X receptor (LXR, NR1H2-3). Ezek a receptorok keresztül az epesavak hatást gyakorolnak az immunválaszokra, a gyomor-bélrendszeri nyálkahártya-barrierre működésére, a terhességre, a karcinogenezisre, valamint az anyagcsere-betegségekre. Az epesav receptorok aktiválása számos jelátviteli útvonalat indíthat el, amelyek a glükóz-, lipid- és energiaháztartás szabályozásában, valamint a daganatos megbetegedésekben is fontos szerepet játszanak.

Sejtproliferáció PDAC-ban

Az egészséges, normál működésű sejtek növekedését irányító fehérjék kifejeződése és jelátviteli folyamataik szigorúan szabályozottak, biztosítva a szövetek normális szerkezetének és működésének fenntartását.

A malignus sejtek kivédik a normál sejtekben működő szabályozó mechanizmusokat és fenntartják a konstitutív növekedési szignálokat. A folytonos proliferációs szignál fenntartása, a szomatikus mutációk kialakulásával lehetséges, amelyek jellemzően a MAPK, PI3K, AKT, jelátviteli útvonalak állandó aktiváltságát eredményezik. PDAC-ban a KRAS gén szomatikus mutációja az esetek 90%-ában előfordul. Számos tanulmány igazolja, hogy a MAPK jelátviteli útvonalakban szerepet játszó gének mutációi befolyásolják a sejtnövekedés, differenciáció,

migráció és apoptózis folyamatait és fontos szerepet játszanak a daganatok kialakulásában és progressziójában, pankreász adenokarcinómában is. A tumorok nagy százalékában, így PDAC-ban is, a tumorszuppresszor gének mutációt szenvednek. A p53 fehérje mutációja fokozza a PDAC sejtek kemoterápiás szerekkel (gemcitabinnal) szembeni ellenálló képességét is. A legújabb kutatási eredmények azt mutatják, hogy a megemelkedett PTEN expresszió, valamint a PI3K/Akt jelátviteli útvonal gátlása összefüggést mutat a rosszabb klinikai kimenetellel és a rosszabb prognózissal PDAC-ban.

Epiteliális-mezenchimális tranzíció PDAC-ban

A legtöbb felnőtt szövet és szerv az epitheliális és mezenchimális sejtek közötti átalakulás, az epitheliális–mezenchimális átmenet (EMT) és annak fordított folyamata, a mezenchimális–epitheliális átmenet (MET), többszöri egymás után ismétlődő ciklusa révén alakul ki. Ennek megfelelően az egymást követő ciklusokat primer, szekunder és terciér EMT-nek nevezzük. A primer EMT már az embrionális fejlődés korai szakaszában lezajlik a beágyazódás során. A szekunder EMT szerepe a sebgyógyulásban, szöveti regenerációban és fibrózisban nyilvánul meg, míg a terciér EMT a daganatokra jellemző, hozzájárul az összejtszerűség fenntartásához, a gyógyszerrezisztenciához, az immunrendszer elkerüléséhez és a metasztázisok kialakulásához.

Az epitheliális sejtek szoros kapcsolatokat alakítanak ki a szomszédos sejtekkel, és apiko-bazális polaritási tengelyt hoznak létre az adhéziós kapcsolatok (adherens junctions), a dezmoszómák és a szoros kapcsolatok (tight junctions) szekvenciális elrendeződése révén. Ezzel szemben a mezenchimális sejtek lazán szerveződnek egy háromdimenziós extracelluláris mátrixban és a kötőszöveteket alkotják. Az EMT folyamatának meghatározó lépései a következők: 1) az epitheliális sejtek elveszítik a sejtek közötti, illetve a bazális membránnal való szoros kapcsolatukat, 2) megváltozik az apiko-bazális polaritásuk, 3) aktiválódnak a mezenchimális fenotípust meghatározó gének.

Az EMT indukciójában kulcsszerepet játszó gének közé tartoznak a SNAIL transzkripciós represszor fehérje család tagjai (SNAIL1 és SNAIL2, más néven Snail, Slug), a zink-ujj motívummal rendelkező E-box-kötő ZEB család tagjai, valamint a TWIST fehérjecsalád is. A WNT fehérjecsalád tagjai gátolják az epitheliális markergének expresszióját (E-cadherin, claudin 1-7 (CLDN1-7) és zonula occludens 1 (ZO-1, más néven TJP1)) és az epitheliális sejtek közötti szoros sejtkapcsolatok felbomlanak. Az EMT indukciójához kapcsolódó receptor

tirozin kinázok közé tartoznak a transzformáló növekedési faktor β (TGF- β), a fibroblaszt növekedési faktor (FGF), az epidermális növekedési faktor (EGF) és a hepacita növekedési faktor (HGF) család tagjai.

A terciér, vagyis a daganatokra jellemző EMT folyamatát PDAC-ban is megfigyelték. A PDAC progressziójának egyik kulcsfontosságú lépése az EMT aktivációja, mely lehetővé teszi a daganatos sejtek fokozott mozgékonyágát és az invazív tulajdonságok megszerzését.

Az EMT folyamatában megszerzett mezenchimális fenotípusos jegyek, mint az elnyúlt morfológia és az irányított mozgás általi migrációs képesség, a daganat nagyon korai terjedését teszi lehetővé, PDAC-ban is. Az EMT neoplasztikus folyamatában a primer daganatsejtek intravazáció révén a véráramba jutva képesek metasztázisok kialakítására.

Oxidatív/nitrozatív stressz PDAC-ban

Az elmúlt évtizedben az oxidatív stresszről alkotott képünk és tudásunk jelentősen kiszélesedett, és ma már nemcsak a pro- és antioxidáns molekulák közötti egyensúly felborulásának tekintjük, hanem egy olyan komplex folyamatnak, amelynek gyökerei a génjeinkben és a génexpresszió szabályozásának mechanizmusaiban rejlenek. Ennek az új megközelítésnek a középpontjában a nukleáris faktor, eritroid 2-kapcsolt faktor 2, vagyis az NRF2 transzkripciós faktor áll. Az NRF2 központi szabályozó molekulája a humán antioxidáns válaszoknak. A daganatos sejtekben felborul a redox homeosztázis, ami szoros összefüggést mutat az NRF2 működésével. Nyugalmi állapotban az NRF2 egy másik fehérjével, a Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP)-el alkot komplexet a citoplazmában. Az NRF2/KEAP1 komplexe megakadályozza az NRF2 sejtmagba való transzlokációját és a target génjeinek (NAD(P)H kinon oxidoreduktáz 1 (NQO1), a hem-oxigenáz 1 (HO-1), a glutation-peroxidáz (GPX) és a kataláz (CAT)) transzkripcióját.

A reaktív oxigén- és nitrogén származékok normál élettani folyamatokban is termelődnek, és fontos feladatokat látnak el többek között a jelátvitelben. Ugyanakkor a pro- és antioxidáns homeosztázis felborulásával neoplasztikus folyamatok indukálódhatnak. A szabadgyökök termelődésének növekedésével, illetve az antioxidáns válasz csökkenésével, a redox-homeosztázis felborulása oxidatív stresszt vált ki a sejtben, mely létfontosságú molekulák károsításához, végül pedig nekrozishoz vagy apoptózishoz vezet. A túlzott ROS termelés okozhat genomiális és/vagy mitokondriális DNS károsodást, a sejtek szomatikus mutációit, onkogének aktiválását, tumorszuppresszor gének gátlását, valamint a metabolikus és jelátviteli útvonalak módosulását, melyek mind hozzájárulnak a sejtkárosodáshoz, különböző betegségek

kialakulásához és a karcinogenezishez. A hasnyálmirigyre specifikus K-RAS expresszió az NRF2 aktivációján keresztül fokozza a daganatos sejtek proliferációját. A KRAS mutációval rendelkező PDAC esetében gyakran megfigyelhető az NRF2 útvonal rendellenes aktivációja, amely hozzájárul a daganat progressziójához. Emiatt az NRF2 potenciális célpont lehet új terápiás stratégiák kidolgozására PDAC-ban.

Őssejtszerűség PDAC-ban

A normál őssejtek embrionális szövetekben, felnőtt és magzati szövetekben is megtalálhatók. Az őssejtek egy olyan osztályát képezik a differenciálatlan sejteknek, amelyek nagyfokú önmegújulási és proliferációs képességgel rendelkeznek, valamint egy vagy több irányban képesek differenciálódni.

A legújabb kutatások alátámasztják a daganat őssejtek (cancer stem cell CSC), más néven tumorindukáló sejtek, szerepét a daganatok fejlődésében, az áttétek kialakulásában, a kemorezisztenciában és a daganat kiújulásában.

Számos daganattípusban meghatároztak már CSC-markereket, hogy azonosítsák és izolálják a daganat őssejt populációkat. A kutatásokban membránglikoproteineket alkalmaznak (CD44, CD24, CD133) többek között a hasnyálmirigy daganat őssejtek azonosítására. További tanulmányok bizonyítják, hogy az aldehid-dehidrogenáz 1 enzim (ALDH1) alkalmazható a hasnyálmirigy daganat őssejtek azonosítására.

A daganat őssejtek a hasnyálmirigyekben központi szerepet játszanak a gyógyszerrezisztencia kialakulásában, az agresszivitásban és a metasztázosok kialakulásában is. PDAC-ban megállapították, hogy több őssejtmarkergén (CD24, CD44) expressziója emelkedett a magasabb fokozatú diszpláziákban. A jelenleg elérhető gyógyszerek hatékonyak a daganattömeg nagy részének elpusztításában, de a CSC-ket érintetlenül hagyják, ami a tumor kiújulásához és áttétek kialakulásához vezet. Ezért nagy szükség van új módszerek kidolgozására az őssejt jelleg molekuláris mechanizmusának részletesebb megértésére a célzott terápia kidolgozásához.

Sejtmetabolizmus PDAC-ban

A malignus sejtek korlátlan osztódási és metasztatikus képességéhez elegendő energiára van szükség. A PDAC egy rendkívül agresszív daganattípus, amelyet hipovaszkularizáció és

desmoplasztikus reakció jellemez, így a daganat mikrokönyezete tápanyaghiányos és erősen hipoxiás. A tumorsejtek metabolikus újraprogramozáson mennek keresztül, amely során az aerob glikolízis, más néven Warburg-effektus dominál, melyet a fokozott glükózfelvétel és a megnövekedett laktáttermelés jellemez. A metabolikus újraprogramozás kiemelkedően fontos a daganatsejtek túlélése és növekedése szempontjából. A fokozott aerob glikolízis, a csökkent oxidatív foszforiláció és a fokozott tejsavszintézis folyamata valójában a rosszindulatú daganatok egyik jellemvonása.

A glikolízis a PDAC esetében elősegíti a daganatsejtek erőteljes növekedését, továbbá a glikolízis enzimjei és közti termékei részt vesznek a PDAC áttétképződésének szabályozásában is. Az OXPHOS csökkent működése is hozzájárul a glikolízis dominanciájához. A mitokondriális diszfunkciót okozhatják mitokondriális DNS-mutációk, a légzési láncban bekövetkezett hibák és a fokozott ROS-termelés is, melyek onkogén útvonalakat aktiválhatnak, elősegítve a glikolízis enzimjeinek expresszióját. A PDAC sejtekben jelentősen megnövekszik a mitokondriális DNS-mutációk száma, ami összefügg a csökkent oxigénfelhasználással és a fokozott glikolízissel. Az anyagsere átprogramozása hozzájárul a malignus daganatok, így a hasnyálmirigy daganat esetében is a gyógyszerrezisztencia kialakulásához. A PDAC sejtek metabolikus sajátosságainak és energiaháztartásának megértése segíthet új kezelési stratégiák kidolgozásában a gyógyszerrezisztencia leküzdésére.

Célkitűzések

A mikrobiom-daganat kapcsolatban a mikrobiom a bakteriális metabolitok szekréciója révén befolyásolhatja a daganatok működését.

A bakteriális metabolitok a keringésbe kerülve eljuthatnak a távoli daganatsejtekhez és befolyásolhatják azok működését, tulajdonképpen hormonszerű hatásokat fejtenek ki.

Ilyen bakteriális metabolitok a másodlagos epesavak, mint a litokólsav (LCA) és az ursodezoxikólsav (UDCA). Kutatásaimban a daganatok klasszikus jellemvonásainak a vizsgálatán keresztül azt tanulmányoztam, hogyan hatnak a másodlagos epesavak hasnyálmirigy daganatsejtek működésére.

Vizsgálataim fő célja az volt, hogy azonosítsuk azokat a folyamatokat, melyeken keresztül az epesavak daganatellenes hatást fejtenek ki a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben.

A következő kérdésekre kerestük a választ:

- Hogyan hatnak az epesavak a daganatsejtek növekedésére és az EMT folyamatára,
- Befolyásolják-e az epesavak a daganatsejtek redox homeosztázisát,
- Összefüggéseket keresni a pankreász adenokarcinómában szenvedő betegek túlélése és az antioxidánsok expressziója között in silico elemzések segítségével,
- Milyen hatással vannak az epesavak az őssejtszerűségre,
- Hatással vannak-e az epesavak a daganatsejtek energiaháztartására,
- Azonosítani azokat a receptorokat, melyeken keresztül az epesavak kifejtik hatásukat a pankreász adenokarcinóma sejtekben,
- Képesek-e az epesavak a PDAC terápiában is alkalmazott gyógyszerek hatékonyságát befolyásolni

Anyagok és módszerek

Reagensek

A kísérleteinkben használt epesavakat, a litokólsavat (LCA, cat # L6250; Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) és az ursodezoxikólsavat (UDCA, cat # U5127; Sigma-Aldrich) dimetilszulfoxidba (DMSO, cat # D8418; Sigma-Aldrich) oldottuk be és 100 mM-os törzsoldatokat készítettünk. Az LCA-t 0,03 μ M koncentrációban, az UDCA-t 0,3 μ M koncentrációban alkalmaztuk, ami megfelel az epesavak humán szérumban mért koncentrációjának. A kontroll sejtek 0,001% DMSO-t tartalmazó médiumot kaptak a kezelés alatt.

A redukált glutationt (GSH; cat # G4251; Sigma-Aldrich) 5 mM végkoncentrációban használtuk. A pegilált katalázt (pegCAT; cat # C4963; Sigma-Aldrich) 500 U/ml koncentrációban alkalmaztuk.

Az epesav receptor antagonistákat, NF449 (cat # 1391) G_{sr} -szelektív antagonistá, CINPA1 (cat # 5605) konstitutív androsztán receptor (CAR) antagonistá, DY268 (cat # 5656) farnezoid X receptor (FXR) antagonistá és GSK2033 (cat # 5694) máj X receptor (LXR) antagonistá, a Tocris Bioscience-től (Bristol, Egyesült Királyság) szereztük be és a kísérletekben 5 μ M végkoncentrációban alkalmaztuk. A ketokonazol (cat # K0600000, pregnane X receptor (PXR) jelátvitel gátlása, a Sigma-Aldrich-től vásároltuk és 5 μ M végkoncentrációban alkalmaztuk.

A TGR5 G-fehérje kapcsolt epesav membrán receptort célzó siRNS-t (GPBAR1-siRNS azonosító: s195791), a D-vitamin receptor specifikus siRNS-t (VDR/NR1H1- siRNS azonosító: s14777) és az FXR receptor specifikus siRNS-t (NR1H4-siRNS azonosító: s19371), valamint a negatív kontroll siRNS-t (cat # 4390843) a Thermo Fisher Scientific-től (Waltham, MA, USA) vásároltuk, és 30 nM végkoncentrációban használtuk.

A kemoterápiás gyógyszereket, az 5-fluorouracilt (5FU, cat # F6627) és az oxaliplatint (OXA, cat # O9512) a Sigma-Aldrich-től szereztük be, és DMSO-ban oldottuk 100 mM törzskoncentrációra. Az 5FU esetén alkalmazott legmagasabb koncentráció 300 μ M, míg az oxaliplatin esetén 19,2 μ M volt.

Sejtvonalak és sejtenyésztés

A Capan-2, BxPC-3 és PancTu-1 humán hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtvonalakat az American Type Culture Collection-től (ATCC) vásároltuk.

A Capan-2 sejteket MEM (cat # M8042; Sigma-Aldrich) táptalajban tenyésztettük, 10% hőinaktivált főtális marha szérum (FBS, cat # F2442; Sigma-Aldrich), 1% penicillin/streptomycin (cat # P4333; Sigma-Aldrich) és 2 mM glutamin (cat # G7513; Sigma-Aldrich) jelenlétében 37°C-on, 5% szén-dioxid tartalmú inkubátorban.

A BxPC-3 és PancTu-1 sejteket 10% FBS, 2 mM glutamin és 1% penicillin/streptomycin tartalmú RPMI 1640 (cat # R5886; Sigma-Aldrich) médiumban tenyésztettük 5% szén-dioxid jelenlétében 37°C-on.

A humán primer fibroblaszt sejteket DMEM (cat # D5546; Sigma-Aldrich) médiumban tenyésztettük, 20% FBS, 1% penicillin/streptomycin és 2 mM L-glutamin jelenlétében 5% szén-dioxid tartalmú inkubátorban 37 °C-on.

A sejtvonalak esetleges mycoplasma szennyeződését rendszeresen ellenőriztük.

Sejtéletképességi vizsgálat (MTT)

A Capan-2 sejteket 96 lyukú lemezen (3000 sejt/lyuk) tenyésztettük 200 µl sejtenyésztő médiumban, majd a letapadást követő napon LCA-val (0,03 µM-66 µM), UDCA-val (0,3 µM) vagy a kontrollként alkalmazott DMSO-val kezeltük a sejteket. A 48 órás kezelés után a sejtek életképességét 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromiddal (MTT; cat # A2231.000; VWR) vizsgáltuk. A sejtekhez MTT-oldatot (20 µl 5 mg/ml) adtunk és 37°C-on 1,5 órán át inkubáltunk. A felülúszó eltávolítása után a formazán kristályokat lyukanként 100 µl DMSO-ban oldottuk, majd az abszorbanciát 540 nm-en mértük spektrofotométerrel (Thermo Labsystems Multiskan MS, Waltham, MA, USA).

Szulfuródamin B teszt

A sejtek proliferációjának tanulmányozására szulfuródamin B (SRB, cat # 230162; Sigma-Aldrich) festést alkalmaztunk. A vizsgálathoz a Capan-2 sejteket 96 lyukú lemezen (3000 sejt/lyuk) tenyésztettük 200 µl sejtenyésző médiumban. A letapadást követő napon a sejteket LCA-val (0,03 µM) vagy UDCA-val (0,01-1 µM) kezeltük, kontrollként DMSO-t (0.001%) alkalmaztunk. A 48 órás kezelés eltelte után a sejteket triklór-ecetsavval (TCA, cat # T6399; Sigma-Aldrich) fixáltuk 10% végkoncentrációban 1 órán keresztül 4°C-on. Ezt követően a sejteket desztillált vízzel mostuk 5 alkalommal, majd 0,4% (1% ecetsavban készítve) SRB oldattal festettük őket 10 percen keresztül. A nem kötött festéket 1%-os ecetsav oldattal távolítottuk el. A kötött festéket lyukanként 100 µl Tris bázisban (10 mM) oldottuk, majd az abszorbanciát 540 nm-en detektáltuk.

A sejthalál kimutatása

A nekrotikus és apoptotikus sejthalál változásainak értékeléséhez Annexin V/PI kettős festést alkalmaztunk (cat #V13242; Thermo Fisher Scientific). A Capan-2 sejteket 6 lyukú lemezre raktuk (150,000 sejt/lyuk) és 48 órán keresztül kezeltük UDCA-val (0,3 µM). Ezután a sejteket 100 µg/ml PI oldattal és 5 µl FITC Annexin V-el festettük 15 percen keresztül szobahőmérsékleten. Az apoptotikus és nekrotikus sejtek számát FACS Calibur áramlási citométerrel határoztuk meg (Beckton Dickinson Franklin Lakes, NJ, Egyesült Államok).

Sejtinváziós kísérlet

A sejtinváziós vizsgálatokat Corning BioCoat Matrigel inváziós kamrában (cat # 354480; Corning, NY, USA) végeztük 8,0 µm-es PET membránokkal 24 lyukú lemezen. A felső kamrában a Capan-2 sejteket (20,000 sejt/lyuk) szérummentes médiumban egy éjszakán át tenyésztettük. Másnap a sejteket LCA-val (0,03 µM) vagy UDCA-val (0,3 µM) kezeltük 0,5 ml szérummentes médiumban, az alsó kamrában lévő 0,75 ml médium szérumot, LCA-t/vagy UDCA-t és 100 ng/ml SDF1-alfa (cat # SRP4388; Sigma-Aldrich) kemoattraktánst tartalmazott. A 48 órás kezelést követően a nem migráló sejteket a membrán felszínéről PBS-oldattal lemostuk, a membrán alsó felületéhez kötődött, vagyis a membránon átmigrált sejteket 100% metanollal fxáltuk, és 4',6-diamidino-2-fenilindollal (DAPI) festettük. A migrált sejteket

Opera Phoenix High Content Screening System segítségével megszámoltuk, a képeket a Harmony 4.6 Software segítségével elemeztük. Az inváziós indexet a Matrigel membránon keresztül átjutó sejtek és a kontroll membránon átjutó sejtek arányából számítottuk ki a következőképpen:

$$\% \text{ invázió} = (\text{a Matrigel membránon átjutó sejtek átlaga} / \text{a kontroll membránon átjutó sejtek átlaga}) * 100$$
$$\text{inváziós index} = \text{a kezelt sejt \% invázió} / \text{a kontroll (nem kezelt) sejt \% invázió}$$

Western blot

A sejtlyízishez RIPA puffert (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% TritonX 100, 0,5% nátrium-deoxikolát, 1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 1 mM PMSF és proteázgátló koktél) használtunk. A fehérje koncentrációkat BCA reagenssel (cat # A65453; Pierce Biotechnologies, Rockford, IL, USA) spektrofotometriásan mértük. A fehérjéket (20 µg fehérje/zseb) 10%-os SDS poliakrilamid gél elektroforézissel elválasztottuk, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk. Ezt követően a nitrocellulóz membrán még szabad fehérjekötő helyeit 5%-os BSA oldattal (1x TBS-Tween pufferben) blokkoltuk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. Ezt követően a membránokat a primer antitestekkel inkubáltuk egy éjszakán át 4 °C-on állandó billegtetés mellett. A membránokat 3-szor 10 percig mostuk 1x TBS-Tween pufferrel, majd ezt követően IgG HRP-vel konjugált másodlagos antitesttel 1 órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten állandó billegtetés mellett. Végül a membránokat 3-szor 10 percig 1x TBS-Tween pufferrel mostuk. Az antitestkötődést kemilumineszcenciával, ChemiDoc Touch Imaging készülékkel (Bio Rad, Hercules, CA, USA) detektáltuk. A sávok intenzitását denzitometrálassal az Image Lab 6.1 szoftver segítségével határoztuk meg. A β-aktin használtuk normalizálásra.

Aldefluor assay

Az aldehid-dehidrogenáz (ALDH1) tumor őssejt marker gén aktivitását az epesavakkal kezelt sejtekben Aldefluor festéssel (cat # 01700; StemCell Technologies, Vancouver, Kanada) határoztuk meg [113]. A sejteket 6 lyukú lemezen tenyésztettük (100,000 sejt/lyuk), majd a letapadást követő napon LCA-val (0,03 μ M) vagy UDCA-val (0,3 μ M) kezeltük 48 órán keresztül. Ezután a sejteket ALDH szubsztrátot (5 μ l/ml) tartalmazó (0,5 ml) aldefluor assay pufferben inkubáltuk 45 percig 37°C-on. Negatív kontrollként a sejteket 5 μ l dietilaminobenzaldehiddel (DEAB; 50 mmol/l), egy specifikus ALDH-gátlóval kezeltük. Az ALDH-pozitív sejtek százalékos arányát áramlási citometriával határoztuk meg, az elemzést a Flowing Software 2.5.1 segítségével végeztük el.

RNS izolálás, reverz transzkripció és kvantitatív RT-PCR

A Capan-2 sejteket 6 lyukú lemezre raktuk (100,000 sejt/lyuk), majd a letapadást követő napon LCA-val (0,03 μ M) kezeltük őket. A 48 órás inkubálást követően a sejtekből RNS-t izoláltunk TRIzol reagenssel (Invitrogen, Waltham, MA, USA) a gyártói ajánlás alapján. A minták tisztaságát és koncentrációját NanoDrop1000 készülékkel (Thermo LabSystems Multiskan MS, Waltham, MA, USA) határoztuk meg. A RNS mintákat DNáz I enzimmal (cat #10104159001; Merck) kezeltük, a cDNS szintézis High Capacity Reverz Transzkripció Kit (cat # 4368814; Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) segítségével történt a gyártó ajánlása szerint. A qPCR reakció 10 μ l végtérfogatban történt, a reakcióelegy 20 ng cDNS mintát, 500-500 nM primert és qPCRBIO SyGreen Lo-ROX Supermixet (PCR Biosystems Ltd., London, UK) tartalmazott. A qPCR reakciót Light-Cycler 480 detektáló rendszeren (Roche, Basel, Switzerland) végeztük. Az mRNS expressziós szintek normalizálására a 36B4 és a cyclophilin (CYCLO) gének expressziójának mértani középértékét használtuk.

Mitokondriális oxidáció és glikolízis

Az oxigénfogyasztás és az extracelluláris savasodás mértékének valós idejű monitorozásához Seahorse XF96 oximétert (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) alkalmaztunk. Az oxigénfogyasztási rátát (oxygen consumption rate = OCR, a mitokondriális oxigénfogyasztásra jellemző érték) és az extracelluláris savasodási rátát (extracellular acidification rate = ECAR, a pH változások, illetve a glikolízis mérésére szolgáló érték) az LCA és UDCA kezelt Capan-2 sejtekben Seahorse készüléken mértük. A sejteket egy éjszakán át 96 lyukú Seahorse lemezen (5000 sejt/lyuk) tenyésztettük, majd epesavakkal kezeltük őket (LCA (0,03 μ M); UDCA (0,3 μ M)) 48 órán keresztül. A kezelés után a sejteket előmelegített XF Seahorse médiumban (cat # 103334-100) inkubáltuk 1 órán keresztül 37 °C-on, szén-dioxid mentes inkubátorban. Az alap oxigénfogyasztási OCR (baseline OCR) értéket 5 alkalommal, 5 percen keresztül rögzítettük. A kísérletek során a következő inhibitorokat használtuk: Etomoxir (50 μ M), a CPT-1 gátlás révén a zsírsav-oxidáció inhibitora; Oligomycin (10 μ M), az ATP-szintáz inhibitora; Antimycin (10 μ M), a mitokondriális légzési lánc III. komplexének inhibitora). Minden OCR értéket 5-ször 5 percen keresztül rögzítettünk. Az OCR és ECAR értékeket fehérje tartalomra normalizáltuk (SRB teszt 5.4 pontban leírtak szerint) és a normalizált értékeket használtuk fel a számításokhoz.

A bazális légzés meghatározásánál, az alap oxigénfogyasztásból kivontuk az antimycin-rezisztens légzést (baseline-antimycin). Az etomoxir-rezisztens OCR értéket (etomoxir-antimycin) a glükóz és aminosav oxidációval kapcsolatos oxigénfogyasztásként definiáltuk. A zsírsavoxidációt az etomoxir-érzékeny OCR- értékekből (baseline-etomoxir) határoztuk meg. Az oligomycin-rezisztens légzés (oligomycin-antimycin) nem kapcsolt légzésnek felel meg, míg az oligomycin-érzékeny frakciót ATP-hez kötött légzésként (baseline-oligomycin) definiáltuk.

Géncsendesítés

A tranziens transzfekcióhoz a Capan-2 sejteket 30 nM TGR5, VDR, FXR specifikus siRNS és negatív kontroll siRNS-el kezeltük. A transzfekciót Lipofectamine RNAiMAX (cat # 13778150; Thermo Fisher Scientific) transzfekciós reagens segítségével végeztük 48 óráig, LCA kezelés mellett és anélkül.

Mitokondriális membránpotenciál mérése

A mitokondriális membránpotenciál mérésére DioC6 (3,3'-Dihexyloxacarboyanine iodide) (cat # HY-D0084; MedChemExpress) festést alkalmaztunk. A Capan-2 sejteket 6 lyukú lemezre raktuk (150,000 sejt/lyuk) és a 48 órás UDCA (0.3 μ M) kezelést követően 40 nM DioC6-al festettük 30 percen keresztül. Ezután a sejteket PBS-el mostuk, majd tripszinnel gyűjtöttük be őket az áramlási citometriás elemzéshez (FACS Calibur, BD Biosciences). A kontroll sejteket 10 μ M karbonil-cianid-4-(trifluor-metoxi) fenilhidrazonnal (FCCP) kezeltük a mitokondriális membránpotenciál szétkapcsolása érdekében. Az FCCP-vel kezelt sejtekben mért értéket minden csoportból kivontuk.

Statisztikai elemzések

A statisztikai elemzéshez GraphPad Prism 8.0.1 szoftvert használtunk. Az eredményeket átlag \pm SEM formában tüntettük fel. A normál eloszlást a D'Agostino–Pearson normalitás teszt segítségével ellenőriztük. Az epesavval és a vehikulummal kezelt minták összehasonlítására párosított t-próbát alkalmaztunk. Több csoport összehasonlításához egy- vagy kétutas varianciaanalízist (ANOVA) végeztünk, Dunnett vagy Tukey post-hoc teszt alkalmazásával. A nemlineáris regresszió és az IC₅₀ értékek meghatározása a GraphPad szoftver "[Inhibitor] vs. response-variable slope (four parameters)" segédprogramjával lett elvégezve.

Eredmények

A litokólsav hatásainak vizsgálata hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben

Az LCA gátolja a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtek proliferációját

Elsőként azt vizsgáltuk meg, hogy az LCA befolyásolja-e a Capan-2 sejtek proliferációját. A sejteket LCA-val kezeltük különböző koncentrációban (0,003 μM –66 μM) és a sejtszámot MTT módszer segítségével határoztuk meg. Az LCA a vizsgált koncentrációkban, mely magába foglalta az LCA humán szérumban mért koncentrációját (0,01–0,03 μM , szignifikánsan csökkentette a Capan-2 sejtek életképességét. Hasonlóan az MTT vizsgálathoz, szulforodamin B festést alkalmazva azt találtuk, hogy az LCA 0,03 μM koncentrációban lassította a Capan-2 sejtek proliferációját. Fontos kiemelni, hogy az LCA ebben a vizsgált koncentrációtartományban (0,01 μM –10 μM) nem befolyásolta a nem transzformált, humán primer fibroblasztok proliferációját, amiből arra következtettünk, hogy az LCA hatásai PDAC tumorsejt specifikusak.

Az LCA csökkenti az epiteliális-mezenchimális tranzícióban résztvevő markergének expresszióját és a sejtinváziót a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben

A továbbiakban arra voltunk kíváncsiak, hogy az LCA képes-e befolyásolni az EMT folyamatát. Eredményeink azt mutatták, hogy LCA szignifikánsan csökkentette az EMT folyamatában résztvevő mezenchimális markergének kifejeződését, a Snail fehérje szintjét a Capan-2 sejtekben és a β -catenin fehérje kifejeződését a Capan-2 és BxPC-3 sejtekben. Az epiteliális ZO1 markergén fehérje szintje emelkedett a Capan-2 sejtekben az LCA kezelés hatására. Meglepően módon az LCA csökkentette a Claudin-1, tight junction fehérje szintjét mindkét vizsgált sejtvonalban. Mindezen eredményekkel összhangban a sejtinváziós kísérletek azt mutatták, hogy az LCA-val kezelt sejtek inváziós képessége szignifikánsan csökkent a DMSO-val kezelt sejtekhez képest. Összességében elmondható, hogy az LCA gátolhatja az EMT folyamatát azáltal, hogy csökkenti az EMT folyamatában kulcsfontosságú fehérjék kifejeződését és a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtek inváziós kapacitását.

Az antioxidánsok magas expressziós szintje a pankreász adenokarcinómában szenvedő betegeknél rosszabb prognózist eredményez

Megvizsgáltuk néhány antioxidáns (NRF2, GPX2, SOD1,2) és NRF2 célgén (NQO1, HMOX1, TXN) expressziós szintjét a TCGA/GTEX hasnyálmirigy adenokarcinóma (PAAD) adatbázisból származó 179 tumor és 171 normál szövetmintában. Érdekes módon az antioxidánsok és az NRF2 célgének expressziója emelkedett a pankreász adenokarcinómában a normál szövethez képest. Továbbá azt találtuk, hogy a magas antioxidáns expresszió a betegek rosszabb túlélésével társult. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a magas antioxidáns kifejeződés a hasnyálmirigy adenokarcinóma egyik fontos jellemzője, mely ronthatja a betegség kimenetelét.

Az LCA okozta oxidatív/nitrozatív stressz hozzájárul az EMT folyamatában szerepet játszó gének csökkent expressziójához a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben

Az előzőekben azt találtuk, hogy a hasnyálmirigy adenokarcinóma szövetekben az antioxidánsok overexpresszálódnak a normál szövethez képest, és az antioxidánsok fokozott expressziója a betegek rosszabb túlélésével társul. Egy korábbi tanulmányunkban kimutattuk, hogy emlődaganatban az LCA oxidatív stressz indukción keresztül citosztázist okoz. Kíváncsiak voltunk arra, hogy az LCA hogyan hat az oxidatív stressz folyamatára a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben. Az LCA kezelés a Capan-2 hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben csökkentette az NRF2 fehérje expresszióját, ami a celluláris antioxidáns védelem egyik központi szabályozó molekulája, hasonlóan az emlődaganatos sejtekhez. A 4HNE fehérje adduktok szintje emelkedett az LCA kezelést követően, ami fokozott lipidperoxidációt jelez. Továbbá az LCA kezelés fokozta az iNOS fehérje expresszióját, ami magas nitrogén-monoxid (NO) szintet feltételez. Az NO és szuperoxid reakciójában keletkező peroxinitrit egy rendkívül káros, reakcióképes anyag, ami képes módosítani az aromás aminosavakat. LCA kezelés hatására emelkedett a nitrotirozin szintje a sejtekben, ami peroxinitrit képződésre utalhat. További eredményeink azt mutatják, hogy az antioxidánsok, mint például a redukált glutation (GSH) és a pegilált kataláz (pegCAT) alkalmazása megakadályozta a β -catenin és a Snail LCA által indukált expressziójának csökkenését. Összességében elmondható, hogy az LCA okozta oxidatív/nitrozatív stressz fontos szerepet játszhat az EMT gátlásában a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben.

Az LCA csökkenti a daganatos őssejt markerek expresszióját a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben

A továbbiakban vizsgáltuk az LCA hatását az őssejtszerűségre, néhány őssejtmarker kifejeződésén keresztül. Az LCA szignifikánsan csökkentette az aldehid-dehidrogenáz 1 (ALDH1) fehérje szintjét és az ALDH-pozitív Capan-2 sejtek számát. Ezzel összhangban a CD133 fehérje expressziója is csökkent az LCA kezelést követően. Ezek az eredmények összességében azt mutatják, hogy az LCA csökkentheti a daganatos őssejt arányát a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtek között.

Az LCA mitokondriális oxidatív foszforilációt indukál a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben

Az LCA-val kezelt Capan-2 sejtek metabolikus változásainak a meghatározásához Seahorse XF96 analizátort alkalmaztunk. A műszer egyidejűleg méri az oxigén fogyasztásának mértékét (OCR- oxygen consumption rate), ami a mitokondriális respirációt jelenti és az extracelluláris savasodás mértékét (ECAR- extracellular acidification rate), ami a glikolízist jelenti. Kísérleteinkben azt találtuk, hogy az LCA kezelés szignifikánsan növelte a bazális légzést, az etomoxir-érzékeny légzést (zsírsav-oxidáció), az etomoxir-rezisztens légzést (glükóz- és aminosav-oxidáció) és az oligomycin-érzékeny, ATP-hez kötött légzést. Az LCA kezelés nem befolyásolta szignifikánsan a mitokondriális oxidáció oligomycin-rezisztens frakcióját, amely az ATP-hez nem kapcsolt légzésnek felel meg. Továbbá az LCA nem befolyásolta a glikolízis folyamatát (ECAR) a Capan-2 sejtekben. Ezen eredményekből arra következtethetünk, hogy az LCA kulcsfontosságú szerepet játszhat a mitokondriális oxidációban.

Az LCA által indukált hatások az FXR, CAR és VDR magreceptorokon keresztül valósulnak meg

Az epesavak aktiválhatnak magreceptorokat, mint az FXR, CAR, PXR, LXR, VDR, és membránreceptorokat is, például a TGR5. Az LCA által indukált hatásokért felelős receptorok meghatározásához először receptor antagonistákat és/vagy inhibitorok alkalmaztunk, beleértve a CINPA1-et a CAR receptor gátlására, a DY268-at az FXR receptor gátlására, az NF449-et a TGR5 receptor downstream jelátviteli útvonalának gátlására, GSK2033-at az LXR receptor

gátlására és a ketokonazol a PXR receptor gátlására. Az LCA-kezelésre eredetileg adott csökkent sejtinváziós választ a CINPA1 (CAR receptor antagonist) és a DY268 (FXR receptor antagonist) kezelés blokkolta, más receptor antagonisták hatástalanok voltak. A DY268 és a CINPA1 gátolta az LCA által indukált β -catenin és NRF2 expresszió csökkenését. Annak érdekében, hogy egy átfogóbb képet kapjunk a receptorokat a Capan-2 sejtekben siRNS transzfekcióval csendesítettük. Egy másik LCA receptort a VDR-t is vizsgáltunk ebben a kísérletsorozatban. Az FXR és VDR nukleáris receptorok csendesítése megakadályozta az LCA által indukált β -catenin fehérje szint csökkenést. A TGR5 receptor csendesítése nem befolyásolta az LCA által kiváltott hatásokat. Ezen eredményekből arra következtethetünk, hogy az LCA által kiváltott hatások a CAR, FXR és VDR receptorokon keresztül közvetíthetnek a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben.

Az ursodezoxikólsav hatásainak tanulmányozása hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben

Az ursodezoxikólsav csökkenti a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtek proliferációját

A Capan-2 sejteket UDCA-val kezeltük különböző koncentrációban (0,01 μ M, 0,03 μ M, 0,1 μ M, 0,3 μ M és 1 μ M), majd SRB festést végeztünk. Az UDCA koncentráció- és időfüggő módon csökkentette a Capan-2 sejtek proliferációját. Az UDCA sejtproliferációt csökkentő hatása a 0,3 μ M koncentrációban volt szignifikáns, ami megfelel az UDCA normál humán szérumban mért koncentrációjának. Ezen eredmények alapján a további kísérletekben az UDCA kezelést 0,3 μ M-ban alkalmaztuk. Megvizsgáltuk, hogy a proliferációban bekövetkező csökkenés az UDCA hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekre gyakorolt toxicitásának tudható-e be. Eredményeink azt mutatták, hogy az UDCA a vizsgált koncentrációban nem növelte sem a propidium-jodid pozitív, sem az Annexin-FITC-propidium-jodid kettős pozitív (nekrotikus), sem az Annexin-FITC pozitív (apoptotikus) sejtek arányát.

Az ursodezoxikólsav gátolja az EMT folyamatát a Capan-2 sejtekben

Miután megállapítottuk, hogy az UDCA citosztatikus hatással bír a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekre, megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja a daganatok egyéb klasszikus tulajdonságait (cancer hallmarks). Kimutattuk, hogy az UDCA csökkenti az EMT folyamatában

kulcsfontosságú mezenchimális gének, β -catenin, Snail, Slug és Vimentin fehérje szintjét, míg az epiteliális ZO1 és E-cadherin fehérje kifejeződése emelkedett az UDCA kezelés hatására. Érdekes módon az UDCA csökkentette a Claudin-1, tight junction fehérje szintjét az LCA hatásához hasonlóan. A Claudin-1 alacsony kifejeződése a hasnyálmirigy-adenokarcinómás betegek esetében a jobb túléléssel korrelál. Az EMT-hez kapcsolódó gének csökkent kifejeződésével összhangban azt is megállapítottuk, hogy az UDCA csökkenti a Capan-2 sejtek invazivitását.

Az UDCA hatásai más humán PDAC sejtvonalakban is előidézhetők, ugyanakkor nem figyelhetők meg normál humán fibroblasztokban

Az UDCA hatásait további két hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtvonalon, a BxPC-3 és PancTu-1 sejteken is tanulmányoztuk. Az UDCA kezelés csökkentette a mezenchimális Snail fehérje szintjét mindkét vizsgált sejtvonalban, ugyanakkor szignifikánsan emelte az epiteliális E-cadherin fehérje kifejeződését a PancTu-1 sejtekben, hasonlóan a Capan-2 sejteknél megfigyelt eredményeinkhez. Kísérleteinkben igazoltuk, hogy az UDCA-nak nincs hatása a mezenchimális Slug fehérje expressziójára humán fibroblaszt sejtekben. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy az UDCA nem befolyásolja az EMT folyamatát a nem transzformált, normál humán sejtekben, ami arra utal, hogy az UDCA hatásai szelektívek a PDAC sejtekre.

Az ursodezoxikólsav mitokondriális aktivitást indukál

A sejtek anyagcseréjében bekövetkező változások a daganatok egyik jellegzetessége, egy úgynevezett „cancer hallmark”. Kíváncsiak voltunk arra is, hogy az UDCA befolyásolja-e a mitokondriális respirációt. Seahorse analízis segítségével vizsgáltuk az UDCA hatását a mitokondriális oxidációra. Eredményeink azt mutatták, hogy az UDCA fokozta a mitokondriális respiráció összes vizsgált frakcióját, a bazális légzést, az etomoxir-érzékeny légzést (zsírsav oxidáció), az etomoxir-rezisztens légzést (glükóz és aminosav oxidáció), az oligomycin-érzékeny, ATP-hez kapcsolt légzést és az oligomycin-rezisztens légzést is. Az UDCA DioC6 fluoreszcenciát indukál, ami a mitokondriális membránpotenciál növekedésére utal. Ez a megfigyelés a sejthalál indukációjának hiányával együtt egy jobban összekapcsolt mitokondriális rendszerre utal.

Az ursodezoxikólsav nem befolyásolja a PDAC kezelésében is alkalmazott kemoterápiás szerek kinetikai tulajdonságait

Egyre több tanulmány bizonyítja azt, hogy a bakteriális metabolitok befolyásolják a terápiás szerek hatékonyságát. Kísérleteinkben vizsgáltuk az UDCA és a hasnyálmirigy adenokarcinóma kezelésében alkalmazott néhány kemoterápiás szer kombinált hatását. Az 5-fluorouracilt (5FU) és az oxaliplatint (OXA) különböző koncentrációkban teszteltük önmagukban és UDCA-val (0,3 μ M) kombinálva és vizsgáltuk, hogyan hatnak a kezelések a PDAC sejtek számára. Eredményeink azt mutatják, hogy az UDCA nem befolyásolta ezen terápiás szerek kinetikai tulajdonságait, az IC_{50} értéket és a Hill koefficiens (kollaboratív kötődés vagy hatás) a Capan-2 sejtek proliferációjának modulálásában.

Megbeszélés

A litokólsav hatásai a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben

A daganatos megbetegedéseket gyakran kíséri a mikrobiom átalakulása, az onkobiózis, mely elősegítheti a daganat progresszióját. A mikrobiom bakteriális metabolitok szekréciója révén képes befolyásolni a daganat működését. Értekezésemben a litokólsavat egy daganatellenes aktivitással rendelkező bakteriális metabolitként azonosítottuk. Érdekes módon az epesavakat korábbi tanulmányokban rákkeltő anyagoknak tekintették. A legújabb vizsgálatok azonban kimutatták, hogy az epesavak daganatellenes hatásúak is lehetnek, és az epesavak pro- vagy antikarcinogén aktivitása a tényleges epesavfajtától függ hasnyálmirigy adenokarcinómában is (például a CDCA prokarcinogén tulajdonságokkal rendelkezik, a CA és az UDCA daganatellenes tulajdonságokkal bír, míg a DCA vegyes hatással rendelkezik. Az LCA daganatellenes tulajdonságai megmutatkoznak a hasnyálmirigy adenokarcinómától eltérő neopláziákban is, beleértve az emlőrákot, neuroblasztómát, prosztatarákot, májrákot, epehólyagrákot és a nephroblasztómát. Ezek a hatások szelektívek a neopláziákra, mivel az LCA nem befolyásolja a nem transzformált sejteket. Megjegyzendő, hogy az általunk végzett vizsgálatokban az LCA-t a humán szérumban mért koncentrációban alkalmaztuk, ami alacsonyabb a korábbi tanulmányokban alkalmazott LCA koncentrációknál.

Az LCA antineoplasztikus hatása sokrétű, mely magába foglalja a citosztázist, az EMT gátlását, a daganatos őssejtek tulajdonságainak csökkentését és a mitokondriális oxidáció indukcióját. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy az LCA gátolta az EMT folyamatát, azáltal, hogy csökkentette a mezenchimális markergének (β -catenin és Snail) expresszióját, és emelte az epiteliális ZO1 marker kifejeződését. Vizsgálatunkban az LCA kezelés csökkentette a Claudin-1 fehérje szintjét, hasonlóan a mezenchimális markerekhez. Hasnyálmirigy daganatban a Claudin-1 fokozott expressziója a betegség progressziójával jár együtt. Az EMT gátlásával összhangban az LCA csökkentette a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtek inváziós kapacitását és elősegítette az őssejt-szerű tulajdonságok elvesztését. Fontos megjegyezni, hogy ezek az őssejt-szerű tulajdonságok számos daganattípushoz kapcsolódnak, beleértve a hasnyálmirigy adenokarcinómát.

A sejtek anyagcseréjének átrendeződése a daganatos sejtek egyik jellemzője és kiterjedt metabolikus átprogramozás figyelhető meg a hasnyálmirigy adenokarcinómában, beleértve a glikolízis változásait, a mitokondriális oxidatív foszforilációt, a Szentgyörgyi-Krebs-ciklust, a lipid anyagcserét és a glutaminolízist. Bár a mögöttes biokémiai változások sokfélék, az egyik

közös vonás a mitokondriális OXPHOS elnyomása. Az LCA kezelés mitokondriális oxigénfogyasztást indukált a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben, beleértve a zsírsav-oxidációt, a glükóz vagy aminosav oxidációt és az ATP-termeléshez kötött légzést. A magasabb mitokondriális légzési szintek korlátozhatják a bioszintézishez szükséges szubsztrátok elérhetőségét, és hozzájárulhatnak a metabolikus inflexibilitáshoz, ami a sejteket kevésbé ellenállóvá teszi a tápanyag elérhetőség változásaival szemben.

A sejtek redox-homeosztázisának befolyásolása az LCA daganatellenes hatásainak egyik fő oka. Kimutattuk, hogy az LCA oxidatív-nitrozatív stresszt indukál a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben az NRF2 transzkripciós faktor expressziójának csökkentésével és az iNOS expressziójának indukálásával, amely kulcsszerepet játszik az EMT folyamatának gátlásában és más neopláziák sejtmodelljeiben a proliferáció csökkentésében is. Az NRF2 karcinogén hatását hasnyálmirigy daganatokban számos tanulmány bizonyítja. Ezzel összhangban a ROS túltermelés a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtjeit fogékonyá teszi a sejthalálra. A hasnyálmirigy adenokarcinóma progressziója gyakran egybeesik a Keap-1 fehérjét inaktiváló mutációkkal, melyek konstitutívan aktívvá teszik az NRF2-t. A magas nukleáris NRF2 expresszió korrelál a hasnyálmirigy daganatos betegek csökkent túlélési arányával. Igazoltuk, hogy az antioxidánsok overexpresszálódnak a hasnyálmirigy adenokarcinómában, és a túlzott antioxidáns expresszió a betegség rosszabb klinikai kimenetelével jár.

Kísérleteinkben kimutattuk, hogy az LCA daganatellenes hatásait a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtmodellekben a CAR, FXR és VDR nukleáris receptorok közvetítik. A VDR magas expresszióját mutatták ki a hasnyálmirigy daganatos sejtekben és a hasnyálmirigy-tumor sztrómában. A VDR jelátvitel aktiválása javítja a hasnyálmirigyterápia hatékonyságát és klinikai kimenetelét. A VDR receptor szerepet játszik a hasnyálmirigy daganat őssejt-szerű tulajdonságainak gátlásában is. Az FXR hatásainak megértése nehezebb, mivel a magas FXR expresszió a sejtek túlélésére gyakorolt hatásai ellentmondásosak. A CAR receptor hatása hasnyálmirigy adenokarcinómában nem ismert. Az epesavak számos receptort aktiválhatnak, és hasonló útvonalak játszhatnak szerepet az LCA által közvetített daganatellenes folyamatok indukálásában más daganattípusokban is (pl. vastagbélrák), de más receptorok is aktiválódhatnak a különböző neopláziákban a citosztázis kiváltására (pl. TGR5 és CAR receptorok emlőrákban).

Míg a kísérleti eredmények egyértelműen azt mutatják, hogy az LCA több daganatra jellemző tulajdonságot is gátol a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtmodellekben, addig nem világos, hogy ezek a hatások hogyan ültethetőek át humán hasnyálmirigy adenokarcinómára.

Az epesavak kapcsolatba hozhatóak a hasnyálmirigy adenokarcinóma rizikó faktoraival, mint az elhízás, a cukorbetegség, a hasnyálmirigy-gyulladás és a hipertrigliceridémia. Például a DCA másodlagos epesav koncentrációja emelkedett a 2-es típusú cukorbetegségben, az *ob/ob* egerekben emelkedett a plazma epesavszintje, valamint hasnyálmirigy-gyulladásban az összes keringő epesavszint megemelkedett.

A konjugált epesavszintek (a legtöbb esetben glikokólsav) a pankreász adenokarcinómában szenvedő betegek plazma- és szérummintáiban emelkednek a kontrollokhhoz képest. A PDAC betegek plazmájában a nem konjugált epesavak szintje csökken. Azonban a nem konjugált epesavak koncentrációja az epében (közös epevezetékben (CBD) származó) emelkedett a PDAC-ban szenvedő betegeknél, a jóindulatú betegségben szenvedő betegekhez képest. A megnövekedett konjugálatlan epesavkoncentráció oka lehet az epevezetékben lévő hidroxiláz-termelő baktériumok és a CBD kövek jelenléte, melyek blokkolják az epe megfelelő áramlását, ami epepangáshoz és a baktériumok elszaporodásához vezet. Az epesav koncentrációk az emberi szérumban segíthetnek megkülönböztetni a hasnyálmirigy adenokarcinómában szenvedő betegeket a jóindulatú betegségekben szenvedő betegektől és az egészséges egyénektől.

Legjobb tudomásunk szerint nincs tanulmány hasnyálmirigydaganatban a bakteriális LCA-termelés és a daganat progressziója közötti összefüggésről. Megjegyzendő, hogy a másodlagos epesavak közül az LCA szintje a legalacsonyabb az egészséges egyének szérumban, így az LCA koncentrációjának kimutathatósága nehézkes. Más daganattípusban, például az emlő adenokarcinómában kimutattuk, hogy a bakteriális LCA-szintézis korai stádiumban csökken (0–1 stádium), ami arra utal, hogy az alacsony LCA-koncentráció hozzájárul az emlőrák patogenéziséhez.

Az ursodezoxikólsav hatásai hasnyálmirigy adenokarcinómában

Kísérleteinkben kimutattuk, hogy az UDCA bakteriális metabolit citosztatikus hatást fejt ki PDAC sejtmódellenekben. Az UDCA jótékony hatását számos daganatban leírták, mint például a glioblasztóma, neuroblasztóma, PDAC, prosztaták, melanoma, hepatocelluláris karcinóma, orális laphámkarcinóma, leukémia, gyomorrák, nyelőcsőrák vastagbélrák hasonlóan az fentiekben bemutatott eredményeinkhez. Fontos kiemelni, hogy a vizsgálatok nagy többségénél az UDCA-t szuprafiziológiás koncentrációban alkalmazták, amely 2-4 nagytípusúval magasabb, mint az UDCA humán szérum referenciakonzentrációja. Más daganatos

megbetegedések modelljeiben kutatócsoportunk és más tanulmányok is kimutatták, hogy az epesavak (az UDCA-n kívül) alacsony, fiziológiához közeli koncentrációi képesek biológiai hatásokat kiváltani. A másodlagos epesavak nagy része képes befolyásolni a PDAC sejtek viselkedését (UDCA (jelen tanulmányban leírtak szerint), DCA és LCA) ellentétben más rosszindulatú daganatokkal, mint a petefészek- vagy emlőkarcinóma ahol csak egy-egy másodlagos epesav hatásos.

Vizsgálatainkban kimutattuk, hogy az UDCA kezelés csökkentette az EMT-ben kulcsfontosságú mezenchimális markergének expresszióját, mint a β -catenin, Snail, Slug és a Vimentin, ugyanakkor az UDCA kezelés hatására nőtt az epiteliális markerek, mint a ZO1 és az E-cadherin kifejeződése. Az UDCA csökkentette a Claudin-1 tight junction fehérje szintjét, mely fehérje esetében a csökkent tumorális expresszió a hasnyálmirigy daganatos betegek jobb túlélésével korrelál. Ezenkívül azt találtuk, hogy az UDCA kezelés csökkenti a Capan-2 sejtek inváziós képességét is.

Kimutattuk, hogy az UDCA-kezelés indukálja a mitokondriális oxidatív foszforilációt. Az OXPHOS aktivitás növekedése jelentheti a sejtek metabolikus átprogramozását a mitokondriális energiahasznosítás irányába. Ez a metabolikus változás nemcsak az UDCA, hanem más epesavak esetében is kimutatható volt, és összefüggésbe hozható a citosztázis (sejtnövekedés gátlása) és az apoptózis (programozott sejthalál) indukciójával.

A mitokondriális metabolikus változások kulcsszerepet játszanak a daganatos őssejtek átprogramozásában is. Úgy tűnik, hogy az UDCA kezelés sokrétű hatásai részt vehetnek a hasnyálmirigy adenokarcinóma (PDAC) sejtek jóindulatú átprogramozásában, és a metabolikus átprogramozás a jövőben új lehetőségeket kínálhat a PDAC terápiájában.

Vizsgáltuk azt is, hogy az UDCA befolyásolhatja-e a hasnyálmirigy adenokarcinóma kezelésében alkalmazott kemoterápiás szerek hatékonyságát. Az epesavak előnyösen kombinálhatók a daganatellenes szerekkel. A kemoterápiával kezelt gyermekgyógyászati betegeknél a keringő epesavak szintjének emelkedése a gyorsabb gyógyulással jár együtt. A tauroursodezoxikólsav (TUDCA) étrendkiegészítőként való alkalmazása jobb gyógyulást eredményezett az 5-FU kezelés után az ER stresszválaszok gátlásával egerekben. A mikrobiális metabolitok szintén fontos szerepet játszanak a hasnyálmirigy adenokarcinóma terápiára adott válaszában. A mikrobiom és a kemoterápiás szerek közötti sokrétű kapcsolat az alábbi módon valósulhat meg 1) a baktériumok metabolizálhatják a kemoterápiás szereket, ez pedig befolyásolhatja a szerek farmakokinetikáját, és ezáltal a hatékonyságukat 2) a kemoterápiás szerek modulálják a mikrobiom összetételét, például a kemoterápia hatására bizonyos baktériumok aránya növekedhet vagy csökkenhet, ami további hatással lehet a kezelés

eredményességére és 3) a bakteriális metabolitok befolyásolhatják a kemoterápiás szerek aktivitását, más daganat típusokban és PDAC-ban.

Egyes bakteriális metabolitok, mint például az indol-származékok javítják a kemoterápia eredményességét és befolyásolják bizonyos kemoterápiás szerek, például az 5-fluorouracil, a doxorubicin és a paclitaxel aktivitását.

Az UDCA fokozta a DNS topozomeráz I inhibitor által indukált apoptózist több daganatos sejtvonalban. Az UDCA és a COX-2 inhibitor, celecoxib kombinációja csökkentette a vastagbélrákos sejtek növekedését. Érdekes módon az UDCA szinergikus hatással van a szorafenib tumorelleses aktivitására hepatocelluláris karcinóma sejtekben.

Összességében kimutattuk, hogy az UDCA a szérumban mért referencia koncentrációban kedvező hatást gyakorol a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekre anélkül, hogy potenciálisan befolyásolná a kemoterápiát, így elkerülhető a szuprafiziológus koncentráció mellékhatásokkal vagy toxicitással járó magas rizikója. Az UDCA alkalmazható önálló szerként is, nemcsak kemoterápiás gyógyszerekkel kombinálva. Az UDCA még farmakológiai releváns koncentrációkban is alacsony toxicitású. Ezek az eredmények az UDCA alkalmazhatóságára utalnak a PDAC kezelésében. Az alacsony toxicitás és a kedvező hatásprofil különösen ígéretes, mivel a PDAC kezelése korlátozott hatékonyságú, és az új terápiás megközelítésekre napjainkban igen nagy szükség van.

Összefoglalás

Az emberi test felszínén és a testüregekben számos baktériumfaj él a gazdaszervezettel szimbiózisban, melyek különböző bakteriális metabolitok bioszintézisének keresztül befolyásolhatják a gazdaszervezet élettani folyamatait és bizonyos patológiás kórképek kialakulását is. Külső és belső tényezők egyaránt (életkor, étrend, higiénia, genetikai faktorok, immunrendszer, antibiotikumok szedése) befolyásolhatják a mikrobiális összetételt. Az emésztőrendszeri mikrobiom diszbiózisa számos betegséggel kapcsolatba hozható, beleértve a hasnyálmirigy daganatot is. A bél mikrobiom olyan kismolekulájú metabolitokat állít elő, amelyek hormonszerű hatásokon keresztül képesek gátolni a távoli daganatok progresszióját.

Jelen dolgozatban bemutattuk, hogy az bélbaktériumok által termelt másodlagos epesav, az LCA daganatellenes tulajdonságokkal bír a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben. Az LCA gátolja a daganatsejtek proliferációját, az EMT folyamatát, a daganatössejt markerek kifejeződését és serkenti a mitokondriális oxidatív foszforilációt. Az LCA oxidatív/nitrozatív stresszt idéz elő, amely az LCA daganatellenes hatásainak alapja. Az LCA által indukált hatások a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben a CAR, FXR és VDR nukleáris receptorokon keresztül valósulnak meg. Eredményeink azt mutatják, hogy az LCA egy nem toxikus antineoplasztikus tulajdonságokkal bíró vegyület, és rávilágítanak az LCA-ra aktiválódó nukleáris receptorok farmakológiai hasznosíthatóságára.

Továbbá jelen dolgozatban bemutattuk azt is, hogy a bélbaktériumok által termelt másodlagos epesav, az UDCA szintén citosztatikus tulajdonságokkal rendelkezik hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtmodellekben. Az UDCA a humán szérumban referencia koncentrációjának megfelelő koncentrációban csökkentette a PDAC sejtek proliferációját, gátolta az EMT folyamatát és indukálta a mitokondriális oxidációt. Az UDCA nem befolyásolta a hasnyálmirigy adenokarcinóma kezelésében alkalmazott kemoterápiás szerek hatékonyságát.

Eredményeink alátámasztják azt a tényt, hogy a bakteriális metabolitok fontos szerepet játszanak a daganat progresszióban. Vizsgálataink igazolták, hogy a különböző daganatokban nem ugyanazok az epesavak hatásosak, és ugyanannak az epesavnak a hatása is eltérő lehet, ami valószínűleg a daganatok eltérő receptor repertoárjára vezethető vissza.

A bakteriális metabolitok pontos szerepének megértése felveti ezen vegyületek felhasználását a daganatok elleni küzdelemben. Az azonosított metabolit receptorok akár új gyógyszer célpontok is lehetnek. A metabolitokat termelő bakteriális mintázat azonosítása új biomarkerek ígéretét kínálja a korai felismeréshez és prognózishoz.

Tárgyszavak

Litokólsav, Ursodezoxikólsav, Hasnyálmirigy adenokarcinóma, PDAC, Mikrobiom, Epiteliális-mezenchimális tranzíció, Oxidatív-nitrozatív stressz, Óssejtszerűség, Sejtmetabolizmus, Sejtproliferáció



Nyilvántartási szám: DEENK/225/2025.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Schwarcz Szandra
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10076111

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Kovács, P.*, **Schwarcz, S.***, Nyerges, P., Bíró, T. I., Ujlaki, G., Bai, P., Mikó, E.: Anticarcinogenic effects of ursodeoxycholic acid in pancreatic adenocarcinoma cell models.
Front. Cell. Dev. Biol. 12, 1-14, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2024.1487685>
* Megosztott első szerzős közlemény.
IF: 4.6 (2023)
2. **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)

További közlemények

3. Sipos, A., Kerekes, É., Szeőcs, D., Szarvas, F., **Schwarcz, S.**, Tóth, E., Ujlaki, G., Mikó, E., Bai, P.: Ursodeoxycholic acid prompts glycolytic dominance, reductive stress and epithelial-to-mesenchymal transition in ovarian cancer cells through NRF2 activation.
Cell Death Discov. 11 (1), 1-10, 2025.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41420-025-02398-9>
IF: 6.1 (2023)
4. **Schwarcz, S.**, Nyerges, P., Bíró, T. I., Janka, E. A., Bai, P., Mikó, E.: Cytostatic Bacterial Metabolites Interfere with 5-Fluorouracil, Doxorubicin and Paclitaxel Efficiency in 4T1 Breast Cancer Cells.
Molecules. 29 (13), 1-16, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules29133073>
IF: 4.2 (2023)





5. Ujlaki, G., Kovács, T., Vida, A., Kókai, E., Rauch, B., **Schwarcz, S.**, Mikó, E., Janka, E. A., Sipos, A., Hegedűs, C., Uray, K., Nagy, P., Bai, P.: Identification of bacterial metabolites modulating breast cancer cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition.
Molecules. 28 (15), 1-18, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules28155898>
IF: 4.2
6. **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>
IF: 2.6

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 27,8

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
10,7**

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

Debrecen, 2025.05.14.



