

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Másodlagos epesavak szerepének vizsgálata emlő- és hasnyálmirigy daganatokban

Kovács Patrik Bence

Témavezető: Kapitányné Dr. Mikó Edit



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2024

Másodlagos epesavak szerepének vizsgálata emlő- és hasnyálmirigy daganatokban

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

Írta: Kovács Patrik Bence okleveles molekuláris biológus

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

Témavezető: Kapitányné Dr. Mikó Edit

Az értekezés bírálói:

Dr. Gönczi Mónika, PhD
Dr. Pankotai Tibor, PhD

A bíráló bizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Dr. Horváth Eszter Mária, PhD
Dr. Lányi Árpád, PhD
Dr. Gönczi Mónika, PhD
Dr. Pankotai Tibor, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2025. február 21., 12:30 óra

Bevezetés

Az emlődaganatok

Az emlődaganat a világon a harmadik leggyakoribb daganatos megbetegedés és a nők körében az első helyen áll. Az emlődaganatok előfordulási aránya jelentősen eltér a különböző földrajzi és gazdasági régiókban, ahol megfigyelhető, hogy a fejlett országokban magasabb a betegség incidenciája. Európában 2012-ben az emlőrák életkorral korrigált éves incidenciája 100.000 lakosra vetítve 94,2 volt, amelyhez 23,1/100.000 fő halálozási arány társult. Magyarországon a Nemzeti Rákregiszter szerint 2019-ben 8250 új emlődaganatos esetet jelentettek. Annak ellenére, hogy az emlőrákos esetek száma folyamatosan emelkedik, a halálozási arány csökkenést mutat, elsősorban a fejlett országokban bevezetett modern szűrőprogramok, a fejlettebb orvosi, sebészeti és radiológiai eljárások, valamint az újabb molekuláris biológiai technikák révén. Az emlőrákos betegek ötéves túlélési aránya ezeknek a fejlesztéseknek köszönhetően már meghaladja a 80%-ot. Számos kockázati tényező növelheti a az emlődaganat kialakulását, ilyen például az életkor, a hormonpótló kezelések, a hormonális fogamzásgátlók használata, a korai menarche és a késői menopauza, valamint a sűrű emlőállomány is. Az emlőrák familiáris eseteiben gyakran jelen van a BRCA1 és BRCA2 gének mutációja, valamint az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) és a humán epidermális növekedési faktor receptor (HER2) túlzott kifejeződése. Az emlőrák kialakulásának kockázata csökkenthető az általános egészségi állapot javításával, rendszeres testmozgással, kiegyensúlyozott táplálkozással, valamint a dohányzás és az alkoholfogyasztás kerülésével.

A hasnyálmirigy adenokarcinóma

A hasnyálmirigy rosszindulatú daganatai az emésztőrendszeri daganatok több mint 10%-át teszik ki. Közülük a leggyakoribb típus a hasnyálmirigy duktális adenokarcinómája (PDAC). Ez a típus a hasnyálmirigy daganatok több mint 90%-át adja. Világszerte 2018-ban 458.918 új PDAC esetet regisztráltak és 432.242 haláleset volt köthető ehhez a betegséghez. A PDAC túlélési esélye meglehetősen alacsony, az ötéves túlélési arány kevesebb mint 5%. Számos rizikófaktor növeli a PDAC előfordulásának esélyét, például az életkor, a dohányzás, az alkoholizmus, az elhízás és a krónikus hasnyálmirigy-gyulladás. A korai felismerést akadályozza, hogy a betegség tünetei csak késői stádiumban jelentkeznek, így a diagnózis csak akkor történik meg, amikor a betegség már előrehaladott és gyakran távoli áttéket is képzett. A PDAC kezelési nehézségei mind genetikai, mind sejtszinten megmutatkoznak. A tumorokban jelen lévő mutációk fokozott génin stabilitáshoz vezetnek, amely jelentős szerepet játszik a daganat növekedésében és a kezelésekkal szembeni rezisztencia kialakulásában. A jelátviteli útvonalak többszörös változásai hozzájárulhatnak a rezisztencia

mechanizmusainak kialakulásához. Annak ellenére, hogy a PDAC biológiai háttere még nem teljesen feltárt, bizonyos gének, például a KRAS, a CDKN2A/p16, a TP53 és a SMAD4 mutációi, valamint a kapcsolódó jelátviteli útvonalak aktivációja alapvető szerepet játszanak a kezelési rezisztencia kialakulásában.

A mikrobiom és a daganatok kapcsolata

Az emberi szervezetben számos mikroorganizmus található, amelyek nélkülözhetetlenek a gazdaszervezet homeosztázisához. A baktériumok, gombák, protozoák, vírusok és azok kollektív genomja alkotják a humán mikrobiomot. A test különböző területein jelen lévő mikrobiom mennyisége és összetétele rendkívül változatos. A gasztrointesztinális rendszer mikrobiotája a teljes mikrobiom 90%-át teszi ki, a benne található baktériumok száma akár 10^{14} is lehet. A bélflóra számos alapvető funkcióval rendelkezik az emberi szervezetben, és jelentős szerepe van a gazdaszervezet homeosztázisának fenntartásában. Aktívan részt vesz a tápanyagok emésztésében és felszívódásában, valamint befolyásolja az energiefelhasználást és tárolást. Ezen mikrobiális ökoszisztéma fontos szabályozó szerepet tölt be az immunrendszer működésében, antimikrobiális anyagokat termelve véd a kórokozó mikroorganizmusok ellen, illetve gátolja az allergiás reakciók kialakulását. A bélmikrobióta metabolikus aktivitása révén elősegíti különböző vitaminok és enzimek termelését. Ezen túlmenően olyan ingerület átvivő anyagokat is termel, amelyek hozzájárulnak a bél-agy kommunikációhoz, és ezzel befolyásolják a gazdaszervezet mentális és neurológiai funkcióit.

A diszbiózis a mikrobiom rendellenes megváltozását jelenti, amelyet a mikroorganizmusok abnormális összetétele és működése jellemez. A daganatos betegségekhez kapcsolódó megváltozott mikrobiomot onkobiomnak nevezzük. Hanahan és Weinberg vezették be a „Hallmarks of cancer” fogalmát, amely azokat a biológiai folyamatokat írja le, amelyek az onkogenezist vezérlik, és a daganatos sejtek kontrollálatlan szaporodását támogatják. Az onkobiom közvetlenül vagy közvetetten részt vesz ezen biológiai folyamatok kialakításában és szabályozásában. Az onkobiomnak kiemelt szerepe van az immunválasz elkerülésében, a tumort támogató gyulladás fokozásában, az invázió és metasztázis kialakulásában, az angiogenezis stimulálásában, a genom instabilitásának és mutációinak előidézésében, valamint a sejtek energetikai szabályozásának deregulációjában is közreműködik. Számos tanulmány igazolta, hogy az onkobiotikus transzformáció elősegíti a daganatsejtek proliferációját, az invazivitás növekedését, a metasztázisok kialakulását, valamint a tumor vaszkularizációját a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) expressziójának fokozásával.

Oxidatív/ Nitroztatív stressz

A fiziológiásan termelődő reaktív oxigén és nitrogén formák (ROS/RNI) számos élettani folyamat nélkülözhetetlen résztvevői. Fontos feladatokat látnak el különböző jelátviteli folyamatokban, valamint a patogén ágensek eliminációjában. Normál körülmények között a prooxidáns és az antioxidáns rendszerek működése egyensúlyban van, ami védi a szervezetet a szabad gyökök károsító hatásaitól. Azonban az emelkedett szabad gyöktermelés és csökkent antioxidáns aktivitás miatt ez az egyensúly megbomlik, ami oxidatív és nitroztatív stressz kialakulásához vezet. A felhalmozódó szabad gyökök károsíthatják a sejtekben található fehérje-, lipid-, illetve DNS molekulákat és ezáltal apoptotikus vagy nekrotikus folyamatokat idézhetnek elő, amelyek szerepet játszhatnak számos betegség patomechanizmusában, mint például arteriosclerosis, ischaemia/reperfúziós károsodások, szívelégtelenség, gyulladásos és neurodegeneratív betegségek, autoimmun betegségek és cukorbetegség. Emellett kutatások igazolták, hogy a redox egyensúly felborulása többféle daganatos megbetegedésben is kimutatható.

A sejtek redox egyensúlya egy finoman szabályozott folyamat, melyben az NRF2 (nuclear factor, erythroid 2-like 2) fontos szerepet játszik. Az NRF2 egy transzkripciós faktor, amely az antioxidáns gének expressziójának szabályozásában játszik szerepet, ezáltal kulcsfontosságú a sejtek redox egyensúlyának fenntartásában. Az NRF2 fő feladata, hogy megvédje a sejteket az oxidatív stressz okozta külső és belső károsodásoktól, amelyek érinthetik a sejten belüli lipideket, fehérjéket, nukleinsavakat és szénhidrátokat. Az NRF2 aktivitását a KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), egy citoplazmában található represszor fehérje szabályozza. Az NRF2 több mint 1000 gén expresszióját szabályozza, köztük a SOD, CAT és GPX géneket is. Az NRF2 daganatellenes és citoprotektív hatása révén elősegítheti a tumorsejtek növekedését, metasztázisok kialakulását, valamint hozzájárulhat a terápiás rezisztencia kialakulásához.

Epiteliális-mezenchimális tranzíció

Az epitheliális mezenchimális tranzíció (EMT) olyan sejtfajlódási folyamat, amelynek során az epitheliális sejtek elvesztik jellemvonásaikat és mezenchimális sejtekké alakulnak át. Ennek során a sejtek elvesztik sejt-sejt kapcsolataikat, apikális-bazális polaritásukat és a bazális membránnal való kapcsolatukat, és orsószzerű morfológia lesz rájuk jellemző, miközben invazív tulajdonságokra tesznek szert. Bár az EMT-t indukáló jelátviteli útvonalak teljes spektruma még nem teljesen ismert, emlő- és hasnyálmirigyrákban több transzkripciós faktort azonosítottak, amelyek az EMT-t támogatják, és hozzájárulnak az őssejtszerű állapot kialakulásához. Ezek közé tartoznak a SNAIL (snail család transzkripciós represszor-1), SLUG (snail család transzkripciós represszor-2), ZEB1 (cink-ujj E-box

kötő homeobox-1) és TWIST (twist család BHLH transzkripció faktor 1) fehérjék. Ezek a transzkripció faktorok különböző jelátviteli útvonalakon keresztül képesek hatást gyakorolni a β -CATENIN, a ZO-1 (zona occludens 1), a CLAUDIN-1 és az E-CADHERIN markerfehérjékre és ezáltal szabályozni az EMT folyamatait.

Daganatössejtek

A daganatos szövetek heterogén sejtpopulációkból épülnek fel. A daganatban két fő sejtpopuláció különböztethető meg: egy nagyobb csoportot képeznek a differenciált sejtek, amelyek korlátozott proliferációs képességgel rendelkeznek, míg egy kisebb populáció, a daganatössejtek, folyamatos osztódásra képesek. A daganatössejteket tartják felelősnek a daganatok kialakulásáért, a metasztázisok megjelenéséért, a terápiás kezelésekkel szembeni rezisztenciáért, valamint a tumorok kiújulásáért. A daganatössejtek anyagcseréjére a fokozott mitokondriális foszforiláció és metabolikus rugalmasság jellemző, ami segíti a tumorprogressziót, valamint ez is a tulajdonság is támogatja a gyógyszerrezisztencia kialakulását. A daganatössejtek azonosítása gyakran specifikus markerek alapján történik. Emlő- és hasnyálmirigy-rák esetében az egyik leggyakrabban használt marker az aldehid-dehidrogenáz-1 (ALDH1) enzim. A daganatössejtekben az antioxidáns gének emelkedett expressziója miatt, jóval alacsonyabb a szabadgyökök mennyisége Ennek oka, hogy 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. Ebből fakadóan az oxidatív stressz folyamatainak a fokozása a tumorsejtekben alkalmas lehet a daganatos sejtek szelektív elpusztítására.

Másodlagos epesavak

Az elsődleges epesavak főként a máj hepatocita sejteiben koleszterinből szintetizálódnak. Ezeket az epesavakat a máj glicinnel vagy taurinnal konjugálja, majd az epével az epehólyagba szekretálódnak. Étkezés után a nyombélbe áramlanak, ahol fontos szerepet játszanak a lipidek és a lipidben oldódó tápanyagok emulgeálásában és felszívódásában, valamint a koleszterinszint szabályozásában. Az epesavak ezután a disztális ileum enterocitáin keresztül visszaszívódnak és a portális keringésen keresztül a májba jutnak újra felhasználásra. Ezt nevezzük enterohepatikus körforgásnak. 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 szubsztátjává válnak és másodlagos epesavakká alakulnak. Az epesavak átalakításáért a bakteriális epesav hidroláz (BSH) és hidroxiszteroid dehidrogenáz (HSDH) enzimek felelősek. Az emberi szervezetben a legfontosabb másodlagos epesavak a litokólsav (LCA), a dezoxikólsav (DCA) és az urzodezoxikólsav

(UDCA). A CA 7α -dehidroxilációját követően DCA, míg a CDCA 7α -dehidroxilációja LCA képződését eredményezi. Az epesavak átalakításáért felelős enzimek a nagyfokú konzerváltságot mutató epesav-indukált (bai) operon összetett gén organizációs rendszerbe tömörülnek.

Az epesavak több receptoron keresztül fejtik ki hatásukat, ideértve a magreceptorok közül a vitamin-D-receptort (VDR), farnezoid-X-receptort (FXR), konstitutív androsztán receptort (CAR), pregnán-X-receptort (PXR), máj-X-receptort (LXR), illetve a Takeda G-fehérje kapcsolt receptor (TGR5) membránreceptort. A perifériásan megjelenő másodlagos epesavak ezeken a receptorokon keresztül hormonszerű hatások kifejtésére képesek. Többek közt befolyásolhatják a sejtek redox állapotát, az immunválaszokat, a gasztrointesztinális nyálkahártya barrier funkcióját, valamint a daganatok kialakulását és progresszióját.

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 epitheliális-mezenchimális tranzíció folyamatára.
- Milyen hatással van a DCA az őssejtszerűségre.
- Befolyásolja-e a DCA a sejtek energiaháztartását.

Anyagok és módszerek

Alkalmazott sejtvonalak

A sejtkultúrákat 5% szén-dioxid tartalmú, 37°C hőmérsékletű termosztátban tenyésztettük. Munkánk során 4T1 egér emlőkarcinóma, MCF7 humán emlőkarcinóma, SKBR humán emlőkarcinóma, CAPAN-2 humán hasnyálmirigy adenokarcinóma, BxPC-3 humán hasnyálmirigy adenokarcinóma és humán primer fibroblaszt alkalmaztunk. A tenyésztőmédiumok összetételét a 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat A sejtenyésztő médiumok összetétele.

Sejtvonal	Médium	Forgalmazó	FBS	Penicillin/ Streptomycin	L- glutamin	Piruvát	HEPES
4T1	RPMI- 1640	Sigma- Aldrich, R5886	10%	1%	2 mM	1%	-
BxPC-3	RPMI- 1640	Sigma- Aldrich, R5886	10%	1%	2 mM	-	-
MCF7	MEM	Sigma- Aldrich, R8042	10%	1%	2 mM	-	-
CAPAN-2	MEM	Sigma- Aldrich, R8042	10%	1%	2 mM	-	-
Primer fibroblaszt	DMEM low glucose	Sigma- Aldrich, D5523	10%	1%	2 mM	-	-
SKBR	DMEM low glucose	Sigma- Aldrich, D5523	20%	1%	2 mM	-	10 mM

Alkalmazott anyagok

A kísérleteinkhez használt anyagokat és azok kezelésekhöz alkalmazott koncentrációit a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat A kezelésekhez használt anyagok listája

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	Sigma-Aldrich	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

Sejtproliferáció vizsgálat

A sejtek proliferációjának vizsgálatához szulfurodamin B (SRB; Sigma-Aldrich, 230162) festést alkalmaztunk. A sejteket 96-lyukú tenyésztőedénybe (4T1-1500 sejt/lyuk) raktuk egy éjszakán keresztül. Ezután a sejteket 48 órán át kezeltük, majd triklór-ecetsavval (TCA; Sigma-Aldrich, T6399) fixáltuk 10% végkoncentrációban 1 órán keresztül 4°C-on. Ezután a lyukakat ötször mostuk desztillált vízzel és 1%-os ecetsavban oldott 0,4%-os (m/V) SRB festékekkel 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.

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 Pierce™ 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 2,5%-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 2,5%-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 fehérje sávokat kemilumineszcens reakció segítségével (SuperSignal West Pico Solutions, Thermo Fisher Scientific, 35060) tettük láthatóvá. A detektálás ChemiDoc Touch Imaging gëldokumentációs rendszer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) segítségével történt. A sávok denzitometrálására Image Lab 6.1 szoftvert (Bio-Rad) használtunk. A vizsgálatokhoz alkalmazott antitesteket a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat A Western blot módszerhez alkalmazott antitestek

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)

Géncsendesítés

Az MCF7 sejteket 24 lyukú tenyésztőedényben (50.000 sejt/lyuk) tenyésztettük egy éjszakán keresztül. Ezután a sejteket siRNS-el transzfektáltuk 30 nM végkoncentrációban, Lipofectamine RNAiMAX transzfekciós reagens (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA, 13778150) segítségével 48 órán keresztül LCA (0,3 μ M) jelenlétében. Kontrollként DMSO kezelést és negatív siRNS-t is alkalmaztunk.

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 kezelések 48 órán keresztül tartottak, 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 µg RNS mintát cDNS-sé írtunk át. A qPCR reakciót 10 µl végtérfogatban végeztük el. A reakcióelegy 0,5 µM 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 $2^{-\Delta\Delta C_p}$ módszer segítségével határoztuk meg. A valós idejű kvantitatív PCR-hoz alkalmazott primerek szekvenciáit a 4. táblázat tartalmazza.

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

Egér primerek		
Gén neve	Forward primer (5'-3')	Reverz primer (5'-3')
36B4	AGATTCGGGATATGCTGTTGG	AAAGCCTGGAAGAAGGAGGTC
CAT	CCTTCAAGTTGGTTAATGCAGA	CAAGTTTTTGTATGCCCTGGT
GCLC	GATTCGGGATGGGCAACT	AAAGGTATCTTGCCTCAGATATGC
GPX2	GTTCTCGGCTTCCCTTGC	TTCAGGATCTCCTCGTTCTGA
GPX3	GGCTTCCCTTCCAACCAA	CCCACCTGGTTCGAACATACT
HMOX1	AGGCTAAGACCGCCTTCT	TGTGTTCTCTGTTCAGCATCA
iNOS	GAAGTGCAAAGTCTCAGACATGG	GATTCTGGAACATTCTGTGCTGTC
NOX4	GCAGATTTACTCTGTGTGTTGCAT	TCCCATCTGTTTGACTGAGGT
NQO1	AGCGTTCGGTATTACGATCC	AGTACAATCAGGGCTCTTCTCG
NRF2	CATCAGGCCAGTCCCTCAAT	CAGCGGTAGTATACAGCCAGCT
SOD1	CCATCAGTATGGGGACAATACA	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
CYCLOPH ILIN	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 TACGACA	CCA CCA CTA GCC AGT ATG ATGA

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. A felső kamrában a CAPAN-2 sejteket (20.000 sejt/lyuk) egy éjszakán keresztül szérumentes médiumban tenyésztettük. Másnap a sejteket a felső kamrában DCA-val (0,7 μ M) kezeltük szérumentes 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

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). Ezek a reaktív molekulák stabil kovalens kötések kialakítására képesek a fehérjék lizin, cisztein és hisztidin oldalláncaival 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. Az MDA tiobarbitursavval (TBA) reagálva színes reakcióterméket eredményez, mellyel jól vizsgálható a lipidperoxidáció mértéke. A TBARS vizsgálathoz a 4T1 sejteket T150-es tenyésztőflaskában növesztettük egy éjszakán keresztül. A 48 órás kezeléseket letelte után a sejteket 1x PBS-el mostuk és Eppendorf csövekbe gyűjtöttük. Centrifugálás után a sejtperlethez 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.

Aldehyd-dehidrogenáz pozitivitás vizsgálat

Az aldehyd-dehidrogenáz-1 (ALDH1) pozitív sejtek mennyiségének a mérését a kezeléseket hatására Aldefluor össejt 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 letelte után a sejteket 0,5 ml ALDH1 szubsztrát tartalmú (5 µl/ml) Aldefluor assay pufferben 45 percig 37 °C-on inkubáltuk. A negatív kontrollként alkalmazott sejteket az ALDH1 inhibitoraként ismert dietil-amino benzaldehiddel (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.

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 letelte 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 előzőekben leírtak szerint.

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 emlőtumorsejteket nőstény Balb/c egerekbe oltottunk és vizsgáltuk az LCA hatását a kialakult tumor növekedésére és viselkedésére. 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 ketreccben 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 sejtuszpenzióból 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 valamint az esetleges áttéteket.

Teljes antioxidáns képesség meghatározása

A teljes antioxidáns képesség meghatározásának egyik módszere a 2,2'-azinobis-3-etilbenzothiazolin-6-szulfonát (ABTS) vegyület oxidációján alapul. Az ABTS-ből kálium-perszulfáttal 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-perszulfát 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. 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.

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 Max™ protokollját használtuk. Az immunhisztokémiához alkalmazott antitesteket és körülményeket az 5. táblázat foglalja össze. A metszetek immunhisztokémiai festés után „H-score” pontrendszer alkalmazásával lettek pontozva, amely figyelembe veszi a festődés intenzitását és százalékos arányát.

5. táblázat Az immunhisztokémiához alkalmazott antitestek

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 (Avoir) 1m citrát puffer, pH=6	1:1000	EnVision Flex (K8000, Dako, Santa Clara, CA, USA)

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.

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 poszthoc 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 tesztel és lineáris regresszió segítségével végeztük. Analízis előtt a mitotikus indexet log₂ transzformáltuk. A számítások R projekt (3.5.2 verzió) segítségével történtek.

Eredmények

A litokólsav hatása emlődaganatban

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 kísérleteinkben alkalmazott LCA koncentrációk megfeleltek az emberi emlőszövetben mért normál humán LCA koncentrációnak (0,1–1 μ M). Kimutattuk, hogy a 4T1 egér emlődaganat sejtekben az LCA kezelés csökkentette az NRF2 fehérje szintjét, ezzel párhuzamosan pedig emelte az NRF2-t gátló KEAP1 fehérje kifejeződését. Korábbi tanulmányunkban kimutattuk, hogy az LCA csökkenti az emlőtumor sejtek proliferációját. Ezzel párhuzamosan megállapítottuk, hogy a CA és CDCA elsődleges epesavak nem befolyásolják az emlődaganat sejtek proliferációját.

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. Az RA839 hatékonyságát az NRF2 célgénnek 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.

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

Az antioxidánsok és a prooxidánsok vizsgálata során megfigyeltük, hogy egy másik antioxidáns, a glutation peroxidáz 3 (GPX3) fehérje szintje is csökkent, míg a prooxidáns NADPH oxidáz 4 (NOX4) mRNS expressziója, valamint az indukálható nitrogén-monoxid szintáz (iNOS) fehérje szintje emelkedett az LCA kezelés hatására. Ezenkívül az LCA fokozta a lipidperoxidációt a 4T1 sejtekben, amit a tiobarbitursav reaktív anyagok (TBARS) és 4HNE-adduktumok emelkedett szintje jelzett. Továbbá kimutattuk, hogy az LCA-val kezelt 4T1 sejtekben megemelkedik a nitrotirozin szintje, ami fokozott nitrozatív stresszre utal.

Kíváncsiak voltunk arra, hogy az LCA okozta oxidatív-nitrozatív stressz NRF2 függő módon valósul-e meg. Kimutattuk, hogy az NRF2 farmakológiai aktivációja megakadályozta mind a TBARS, a 4HNE, valamint az iNOS fehérje szintjének növekedését LCA-val kombinált kezelésben.

A 4T1 sejteket LCA jelenlétében tiol-antioxidánsokkal kezeltük, hogy megtudjuk, az LCA-indukálta oxidatív stressz szerepet játszik-e az LCA antiproliferatív hatásának kialakításában. Azt tapasztaltuk, hogy mind a glutation (GSH) és az N-acetil-cisztein (NAC) gátolták az LCA által kiváltott

antiproliferatív hatást. Továbbá 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. Eredményeinket MCF7 és SKBR-3 humán emlőkarcinóma sejtekben is igazoltuk. Megfigyeltük, hogy a nem transzformált, humán fibroblaszt sejtekben az LCA nem fejt ki hatást, ami azt mutatja, hogy az LCA hatásai emlődaganatra specifikusak. Ezen eredményekből arra következtettünk, hogy az LCA az NRF2 gátlásán keresztül képes fokozni az oxidatív-nitrozatív stressz folyamatokat, amely citosztázist idéz elő az emlőtumor sejtekben.

A litokólsav okozta oxidatív stresszt a TGR5 és CAR receptorok közvetítik

A következőkben azonosítani szeretnénk volna azokat a receptorokat, melyeken keresztül az LCA képes kifejteni hatásait. A receptorok gátlására farmakológiai szereket, valamint siRNS-depléciós kísérleteket alkalmaztuk LCA-val kombinált kezelésekben. 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.

Annak érdekében, hogy egy átfogóbb képet kapjunk a TGR5, CAR, VDR és PXR receptorokat siRNS technikával csendesítettük MCF7 humán emlőtumor sejtvonalban. A farmakológiai szerekekhez hasonlóan a TGR5 és CAR receptorok csendesítése hatékonyan blokkolta az LCA által indukált NRF2 fehérje szint csökkenését, valamint mind a TGR5, mind a CAR receptor csendesítése tompította az LCA- okozta emelkedett iNOS fehérje kifejeződést. Ezen eredmények az mutatják, hogy az LCA a TGR5 és a CAR receptorokon keresztül fejt ki az oxidatív stresszre gyakorolt hatásait az emlődaganat sejtekben.

Az LCA gátolta az antioxidáns védelmet az emlődaganat egérmodelljében

A következőkben azt vizsgáltuk meg, hogy az LCA befolyásolja-e a tumorok redox állapotát *in vivo* környezetben. 4T1 egér emlőtumor sejtekkel oltott Balb/c nőtény egereket orálisan kezeltünk naponta 15 nmol LCA-val, majd a vizsgálat végén az egereket feláldoztuk és a tumorokat begyűjtöttük. 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. Továbbá, az LCA-val kezelt egerekben a prooxidáns iNOS és NOX4 expressziója emelkedett, viszont ez az emelkedés nem volt szignifikáns. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az LCA képes befolyásolni a daganatsejtek redox egyensúlyát *in vivo* is, ami kedvező hatással lehet a betegség kimenetelére.

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

Szöveti mikroarray (TMA) segítségével vizsgáltuk az LCA-indukált oxidatív/nitrozatív stressz markereinek expresszióját 88 emlőrákos beteg tumormintájában, valamint *in silico* vizsgáltuk az LCA-TGR5 útvonalban szereplő gének expressziójának a hatását a betegek túlélési idejére. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy az iNOS és a 4HNE szintje csökkent a II. és III. stádiumú betegekben az I. stádiumú betegekhez képest, és tovább csökkent a IV. stádiumú betegekénél.

Ezután a betegeket a betegség patológiai grádusa alapján való osztályozása során megfigyeltük, hogy a 4HNE expressziója szignifikánsan csökkent az 2-es és 3-as grádusú betegekben az 1-es grádusú betegekhez képest. 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.

A betegek immunhisztokémiai besorolása alapján azt találtuk, hogy a TGR5, iNOS és a 4HNE expressziója csökkent a TNBC esetekben az ER+ esetekhez képest. Ezzel összhangban *in silico* vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a CAR, KEAP1, iNOS, nNOS, NOX4 magas expressziója és az NRF2 alacsony expressziója a betegek jobb túléléssel járt együtt, abban az esetben amikor az összes beteget vagy az ER+ pozitív eseteket vettük figyelembe. A TNBC esetekre ez nem volt igaz.

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

A dezoxikólsav hatása hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekre

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

A DCA hatásainak a vizsgálata során először az EMT folyamatban szerepet játszó epiteliális és mezenchimális markergének mRNS és fehérje szintű kifejeződését vizsgáltuk meg a DCA kezelés hatására. A DCA kezelés csökkentette a mezenchimális gének, TCF7L2, WNT5B, B-CATENIN, TWIST1 és SNAIL mRNS expresszióját. A DCA hatására szignifikánsan csökkent a SLUG fehérje szintje a BxPC-3 humán hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtvonalban. Az epiteliális markerek

vizsgálata során az találtuk, hogy a DCA kezelés szignifikánsan emelte a ZO1 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.

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. 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.

A dezoxikólsav oxidatív-nitrozatív stresszt indukál a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben

A sejtek redox állapotának tanulmányozásához az oxidatív-nitrozatív stressz markereinek kifejeződését követtük nyomon. A nitrogén-monoxid termelésért felelős iNOS fehérje szintje emelkedett a CAPAN-2 és BxPC-3 sejtekben a DCA kezelést követően. Emellett a DCA kezelés hatására emelkedett nitrotirozin, valamint 4HNE szintet figyeltünk meg. Ezen eredmények alapján úgy gondoljuk, hogy a DCA fokozza az oxidatív és nitrozatív stressz szintjét a hasnyálmirigy daganatokban, amelyet emelkedett lipidperoxidáció jelez.

A dezoxikólsav emeli a mitokondriális aktivitást a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben

Seahorse analízis során egyidejűleg megtudtuk határozni a mitokondriális oxidáció és glikolízis mértékét a CAPAN-2 sejtekben. Kimutattuk, hogy a DCA kezelés egyidejűleg fokozta a mitokondriális oxidáció (OCR) és a glikolízis (ECAR) mértékét. Ezzel egyidejűleg az OCR/ECAR arány nem változott, ami arra utal, hogy a sejtek a DCA kezelést követően hipermetabolikussá válnak.

A dezoxikólsav csökkenti az őssejtszerűséget

Az ALDH1 egy őssejt marker számos daganatban, beleértve a hasnyálmirigy adenokarcinómát is. DCA kezelést követően Aldefluor assay segítségével megmértük az ALDH1 aktivitását és azt találtuk, hogy a DCA szignifikánsan csökkentette az ALDH1 pozitív CAPAN-2 sejtek számát. Továbbá, kimutattuk, hogy a DCA csökkenti az ALDH1 fehérje szintjét is a sejtekben. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a DCA csökkentheti a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtek őssejtszerűségét.

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. A mikrobiom közvetlen immunogén hatása mellett számos daganatos megbetegedés esetében, köztük az emlő- és hasnyálmirigy adenokarcinómában is leírták a mikrobiom endokrinszerű funkciójának a jelentőségét. A gasztrointesztinális régióban elhelyezkedő mikrobiom az anyagcsereje során mikrobiális metabolitokat állít elő, amelyek képesek befolyásolni az emlő- és hasnyálmirigy daganatsejtekre jellemző tulajdonságokat. Számos metabolitot azonosítottak, amelyek képesek pro- vagy antikarcinogén hatások kifejtésével befolyásolni a tumorsejtek tulajdonságait. Emlődaganatok esetében több tanulmány kimutatta, hogy az LCA, a kadaverin, az indoxil szulfát, és az indolpropánsav, mint bakteriális metabolitok képesek voltak antineoplasztikus hatások indukálására. Emellett a hasnyálmirigy adenokarcinóma és a mikrobiális metabolitok kapcsolatát célzó vizsgálatok bebizonyították, hogy a mikrobiom anyagcsereje során képződő másodlagos epesavak, mint az LCA, DCA, valamint az UDCA citosztatikus hatásúak voltak a hasnyálmirigy adenokarcinómában. Ezen megfigyelések alapján a mikrobiom diverzitásának a megváltozása kapcsolatban állhat az emlő- és hasnyálmirigy daganatok kialakulásával és progressziójával.

A litokólsav szerepe emlődaganatokban

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.

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. 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 citosztatikus hatást fejt ki. 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, citosztatikus 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. Emlődaganatos betegek esetében az NRF2 magas expressziója kedvezőtlen prognosztikai tényező a daganat kiújulásának és a betegségmentes túlélésnek a tekintetében. 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, továbbá az alacsony NRF2 expressziós szint bizonyítottan erősíti a kemoterápiás szerek hatékonyságát.

Az általunk elemzett adatokból kiderül, hogy az ösztrogén és HER2 általi jelátvitel befolyásolja az LCA által indukált útvonalak aktivitását. Az ER+/HER2, valamint HER 2 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. 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.

A gasztrointesztinális mikrobiom diverzitása és ezzel párhuzamosan a citosztatikus hatású LCA szérumban mért szintje is csökkenést mutat emlődaganatos megbetegedések esetében. Az LCA alacsony szérumban mért koncentrációja jól korrelál a daganatos sejtek magasabb proliferációs rátájával. Emellett kimutattuk, hogy az elsődleges epesavak, mint a CA és CDCA kevésbé hatékonyan indukáltak citosztatizist emlődaganatban, mint az LCA. A fenti adatok alapján elmondható, hogy a mikrobiom biomaszájának a csökkenése az LCA mennyiségének a csökkenését vonja maga után, így csökkentve az LCA által kifejtett citosztatikus folyamatok hatékonyságát.

Korábbi tanulmányunkban kimutattuk, hogy az LCA a TGR5 receptoron keresztül csökkenti az emlődaganatsejtek agresszivitását. Jelen vizsgálataink során megállapítottuk, hogy az LCA egészséges egyénekben a TGR5 fiziológiás 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 termelődési 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.

A dezoxikólsav szerepe hasnyálmirigy daganatokban

Disszertációm második részében arra kerestük a választ, hogy a DCA szérumban 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 össejtszerűségét, 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.

További vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a DCA csökkentette a mezenchimális morfológiára jellemző markerek kifejeződését és ezzel párhuzamosan fokozta az epiteliális 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 gátolni az EMT folyamatait, valamint csökkenteni az össejtszerűséget a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben.

Több mikrobiális metabolitról bizonyosodott be, hogy az oxidatív és nitrozatív stressz indukcióján keresztül antineoplasztikus hatást fejthetnek ki. 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 nitrozatív 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 metabolítja a DCA képes modulálni a daganatos sejtekre jellemző tulajdonságokat és ezáltal befolyásolhatja a hasnyálmirigy adenokarcinóma progresszióját, így teremtve lehetőséget új terápiás eljárások kialakításában.

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 anyagcseréje 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.

Tárgyszavak

Daganatóssejt, Dezoxikólsav, Emlődaganat, Epiteliális-mezenchimális tranzíció, Hasnyálmirigy daganat, Litokólsav, Mikrobiom, Oxidatív/Nitrozatív stressz



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., Vigh, 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.

