

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Schwarcz Szandra

**A másodlagos epesavak antikarcinogén hatásai
hasnyálmirigy adenokarcinómában**

DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁSRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2025

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A másodlagos epesavak antikarcinogén hatásai
hasnyálmirigy adenokarcinómában**

Schwarcz Szandra

Témavezető: Kapitányné Dr. Mikó Edit



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁSRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2025

Tartalomjegyzék

Tartalom

1. Rövidítések.....	5
2. Bevezetés.....	10
2.1. Hasnyálmirigy-daganatos megbetegedések	10
2.2. Az emberi mikrobiom és a hasnyálmirigy-daganat közötti kapcsolat.....	10
3. Irodalmi áttekintés	12
3.1. Pankreász adenokarcinóma	12
3.2. A humán mikrobiom	13
3.3. Diszbiózis-onkobiózis, onkobiom.....	14
3.4. Onkobiózis PDAC-ban.....	17
3.5. A másodlagos epesavak, mint bakteriális metabolitok szintézise	19
3.6. Az epesavak szerepe PDAC-ban.....	23
3.6.1. Az LCA és az UDCA szerepe a daganatokban.....	24
3.7. Tumor mikrokörnyezet.....	25
3.8. A neoplasztikus transzformációval összefüggő tulajdonságok.....	26
3.9. „Hallmarks of cancer” - a tumoros sejtekre jellemző tulajdonságok PDAC-ban	
30	
3.9.1. Sejtproliferáció	30
3.9.2. Eiteliális-mezenchimális tranzíció.....	30
3.9.3. Oxidatív/nitrozatív stressz.....	33
3.9.4. Össejtszerűség	37
3.9.5. Sejtmetabolizmus	38
4. Célkitűzések.....	40
5. Anyagok és módszerek	41
5.1. Reagensek	41
5.2. Sejtvonalak és sejtenyésztés	42
5.3. Sejtéletképességi vizsgálat (MTT)	42
5.4. Szulforodamin B teszt	43
5.5. A sejthalál kimutatása	43
5.6. Sejtinváziós kísérlet	44
5.7. Western blot	44

5.8.	Aldefluor assay.....	45
5.9.	RNS izolálás, reverz transzkripció és kvantitatív RT-PCR	46
5.10.	Mitokondriális oxidáció és glikolízis	47
5.11.	Géncsendesítés.....	48
5.12.	Mitokondriális membránpotenciál mérése	48
5.13.	Statisztikai elemzések	48
6.	Eredmények	49
6.1.	A litokólsav hatásainak vizsgálata hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben	49
6.1.1.	Az LCA gátolja a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtek proliferációját	49
6.1.2.	Az LCA csökkenti az epiteliális-mezenchimális tranzícióban résztvevő marker- fehérjék expresszióját és a sejtinváziót a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben	50
6.1.3.	Az antioxidánsok magas expressziós szintje a pankreász adenokarcinómában szenvendő betegeknél rosszabb prognózist eredményez	52
6.1.4.	Az LCA okozta oxidatív/nitrozatív stressz hozzájárul az EMT folyamatában szerepet játszó gének csökkent expressziójához a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben	54
6.1.5.	Az LCA csökkenti a daganatos őssejt markerek expresszióját a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben	56
6.1.6.	Az LCA mitokondriális oxidatív foszforilációt indukál a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben	57
6.1.7.	Az LCA által indukált hatások az FXR, CAR és VDR magreceptorokon keresztül valósulnak meg.....	59
6.2.	Az ursodezoxikólsav hatásainak tanulmányozása hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben	61
6.2.1.	Az ursodezoxikólsav csökkenti a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtek proliferációját	61
6.2.2.	Az ursodezoxikólsav gátolja az EMT folyamatát a Capan-2 sejtekben.....	62
6.2.3.	Az UDCA hatásai más humán PDAC sejtvonalakban is előidézhetőek, ugyanakkor nem figyelhetőek meg normál humán fibroblasztokban	64
6.2.4.	Az ursodezoxikólsav mitokondriális aktivitást indukál	65
6.2.5.	Az ursodezoxikólsav nem befolyásolja a PDAC kezelésében is alkalmazott kemoterápiás szerek kinetikai tulajdonságait	67
7.	Megbeszélés.....	69
7.1.	A litokólsav hatásai a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben	69
7.2.	Az ursodezoxikólsav hatásai hasnyálmirigy adenokarcinómában	73
8.	Összefoglalás	76
9.	Summary	77

10.	Irodalmojegyzék.....	78
11.	Tágyszavak	98
12.	Köszönetnyilvánítás	99
13.	Publikációs lista.....	100
14.	Függelék.....	102

1. Rövidítések

•NO ₂	nitrogén-dioxid gyök
[•] O ₂ ⁻	szuperoxid-anion
[•] OH	hidroxil-gyök
4HNE	4-hidroxinonenál
AKT	szerin-treonin kináz
ALDH1	aldehid-dehidrogenáz 1
AMPK	AMP-aktivált protein-kináz
ARE	antioxidáns válaszelem
BA	epesav (bile acid)
Bai	epesav indukálható operon
BAAT	epesav-CoA-aminosav N-aciltranszferáz
BACS	epesav-CoA szintetáz
BMSC	csontvelői őssejt
BSH	epesav-hidroláz
CA	kólsav
CAEC	karcinómához társult endotélsejtek
CAF	karcinómához társult fibroblasztok
CAR	konstitutív androsztán receptor
CAT	kataláz
CCK	kolecisztokinin
CDCA	kenodezoxikólsav
CDH1	E-cadherin fehérjét kódoló gén
c-Myc	sejtes myelocytomatózis onkogén
CYP27	szterol 27-hidroxiláz enzim
CYP7A1	koleszterol 7 α -hidroxiláz enzim
CYP8B1	szterol 12 α -hidroxiláz enzim
CSC	rákőssejtek (cancer stem cells)

DCA	dezoxikólsav
DEAB	dimetilamino-benzaldehid
DMSO	dimetil-szulfoxid
ECAR	extracelluláris savasodási ráta
ECM	extracelluláris mátrix
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EGF	epidermális növekedési faktor
EMT	epiteliális-mezenchimális tranzíció
FBS	hőinaktivált főtális marhaszérum
FGF	fibroblaszt növekedési faktor
FSP1	fibroblaszt szekréciós fehérje-1
FXR	farnezoid X receptor
GBA	bél-agy tengely (Gut-Brain Axis)
GCA	glikólsav
GCDCA	glikokenodezoxikólsav
GLUT1	glükóztranszporter 1
GPX2	glutation-peroxidáz 2
GR	glutation reduktáz
GSH	glutation
H ₂ O ₂	hidrogén-peroxid
HCC	hepatocelluláris karcinóma
HGF	hepacita növekedési faktor
HIF-1	hipoxia-indukálható faktor-1
HMOX1	hemoxigenáz 1
IBD	gyulladásos bélbetegség
IC	immunsejtek
IFN-I	I-es típusú interferonok (IFN α és β)
IL-15	interleukin-15
iNOS	indukálható nitrogén-monoxid szintáz

KEAP1	Kelch-like ECH-associated protein 1
K-RAS	Kristen Rat szarkóma vírus onkogén homológ
LCA	litokólsav
LDHA	laktát-dehidrogenáz A
LOX	lizin-oxidáz enzim
LPS	lipopoliszaharid
LXR	máj X receptor
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
MDA	malondialdehid
mTOR	mammalian target of rapamycin
NAC	N-acetil-cisztein
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NF- κ B	nukleáris faktor- κ B
NO	nitrogén-monoxid
NOX4	NADPH oxidáz 4
NQO1	NAD(P)H kinon-dehidrogenáz 1
NRF2	nukleáris faktor, eritroid2-kapcsolt faktor 2
OCR	oxigén fogyasztási ráta
ONOO ⁻	peroxinitrit
OXPHOS	oxidatív foszforiláció
P53	tumor protein 53
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PanIN	intraepitheliális neoplázia
PBS	foszfát-puffer oldat
PDAC	hasnyálmirigy duktális adenokarcinóma
PDGF-B/C	trombocita eredetű növekedési faktor B/C
PDK1	piruvát-dehidrogenáz kináz
PegCAT	pegilált kataláz

pHi/pHe	intra/extracelluláris pH
PI3K	foszfatidil-inozitol-3-kináz
PKC	protein-kináz C
PTEN	foszfatáz és tenzin homológ
PUFA	többszörösen telítetlen zsírsav(ak)
PXR	pregnán X receptor
qPCR	kvantitatív polimeráz láncreakció
RNI	reaktív nitrogén intermedier
RNS	ribonukleinsav
ROS	reaktív oxigénformák
S1PR2	szfingozin-1-foszfát receptor 2
SFB	szegmentált filamentózus baktériumok
Slug	snail család transzkripciós represszor-2
Snail	snail család transzkripciós represszor-1
SOD1-3	szuperoxid-dizmutáz 1-3
SRB	szulforodamin B
TACC3	transzformáló savas spirálmotívumot tartalmazó fehérje 3
TBA	tiobarbitursav
TBARS	tiobarbitursav-reaktív termékek
TBS	tris puffereelt sóoldat
TCA	taurokólsav
TCA	triklór-ecetsav
TCDCA	taurokenodezoxikólsav
TEC	tumor-asszociált endotél sejtek
TGR5/GPBAR1	Takeda G-fehérje kapcsolt receptor 5
Th1/17	helper T-sejtek (T-helper cells)
TLR	toll-like receptor
TME	tumor mikrokörnyezetet

TRXPT	tioredoxin-peroxidáz
UDCA	ursodezoxikólsav
VDR	vitamin D receptor
VEGF	vaszkuláris endotél növekedési faktor
WNT	WNT (Wingless) jelátviteli útvonal
ZEB1/2	cinkujj E-box-kötő fehérje 1/2

2. Bevezetés

2.1. 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 írtak le [1]. 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 [2] és a kemoterápiával szembeni rezisztenciája [3] rossz prognózist eredményez, ezért elengedhetetlen a hasnyálmirigy adenokarcinóma patogenezisének jobb megértése.

2050-re a várható rákos megbetegedések előfordulási valószínűsége a népességnövekedés és az öregedés előrejelzett változásai alapján, feltételezve, hogy az összesített rákkockázati arányok nem változnak, azt jósolják, hogy több mint 35 millió új rákos esetet fognak diagnosztizálni. Ez 77%-os növekedést jelent világszerte a 2022-ben becsült 20 millió esethez képest [1].

2.2. Az emberi mikrobiom és a hasnyálmirigy-daganat közötti kapcsolat

Napjainkban egyre nagyobb figyelmet kap a mikrobiom, mint az immunrendszerünk, s ezáltal az egészségünk egyik kulcs szereplője. Számos tanulmány bizonyítja, hogy az emberi mikrobiom és a gazdaszervezet koevolúciója rendkívül nagy hatással bír az általános egészségi állapotunkra [4], [5]. Az emberi test különböző területein – mind a külső felszíneken, mind a belső üregekben – nagy számú baktériumfaj él, melyek együtt alkotják a mikrobiótát, amely tartalmazhat szimbióta, kommenzális és patogén mikroorganizmusokat is. A mikrobióta összességét a mikrobiom kifejezéssel illetjük. Az emberi testben élő mikroorganizmusok többsége a bélrendszerben található, egy tipikus bélmikrobiom több száz különböző fajból származó, több billió mikrobiális sejtet tartalmazhat, amelyek genomjai globálisan több mint hárommillió gént foglalhatnak magukba [6]. A mikrobiom összetételét számos tényező befolyásolhatja, ilyenek a születési mód, csecsemőkori táplálás, életkor, étrend, higiénia,

életmód, genetikai adottságok és az immunrendszer, valamint az antibiotikumok és egyéb vegyi anyagok (xenobiotikumok) alkalmazása [7].

A mikrobiom összetétele megváltozik a neoplasztikus betegségekben. Ezeket a változásokat onkobiózissnak nevezzük, és az így kialakult baktériumközösség az onkobiom [8]. Maga az onkobiózis nem idéz elő daganatot, de elősegítheti a tumor növekedését és az áttétek kialakulását [9]. Az onkobiom támogatja a daganatokra jellemző folyamatokat, például az áttétképződést, az angiogenezist, a gyulladást, a sejt anyagcsere szabályozásának zavarára való hajlamot, valamint az immunvédelem elkerülését [10], [11], [12].

A hasnyálmirigy anatómiai elhelyezkedése a gyomor-bél traktus közelében lehetővé teszi a bél és a hasnyálmirigy közötti kétirányú kommunikációt, amelyet gyakran bél-hasnyálmirigy vagy bél-hasnyálmirigy-máj tengelynek neveznek. A szájüregi [13] és a nyombélben található [14] mikrobiom összetétele megváltozik hasnyálmirigy adenokarcinóma esetén. A szájüregi és bélbaktériumok képesek áthelyeződni, és megtelepedhetnek a hasnyálmirigy-vezetékben és magában a hasnyálmirigyben is [15], [16]. Érdekes módon a gombák kolonizációja szintén összefüggésbe hozható a hasnyálmirigy adenokarcinómával [17]. A hasnyálmirigyben megtelepedő baktériumok gyulladást idéznek elő, elősegítve ezzel a tumor kialakulását és előrehaladását [15], [18]. Az invazív baktériumok a vérkeringésbe is bejuthatnak, és gyakran erősen immunogének a lipopoliszacharid (LPS) termelésük miatt. Az LPS aktiválhatja a Toll-like receptorokat (TLR-eket), amelyek az NF- κ B útvonalon keresztül proinflammatorikus citokinek (pl. CXCL-ek, IL-6) termelését indukálják [19].

A mikrobiom közvetlen immunstimuláló hatása mellett számos daganattípusban, köztük a hasnyálmirigy adenokarcinómában is, leírták a mikrobiom endokrin-szerű működését [20], [21]. Az intesztinális mikrobiom mérete miatt jelentős bioszintetikus kapacitással rendelkezik, és képes bioaktív metabolitokat termelni, amelyek a keringésbe jutva hormon-szerű hatásokat fejthetnek ki a távoli célpontokon, például a tumorsejteken.

Értekezésemben a humán mikrobiom által szintetizált metabolitok, két másodlagos epesav, a litokólsav és az ursodezoxikólsav hatásait vizsgáltam pankreász adenokarcinómában.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Pankreász adenokarcinóma

A hasnyálmirigy adenokarcinóma az egyik legagresszívebb ráktípus. A PDAC nem invazív prekarcinogén 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 kivezetőcső hámsejtjeiből alakul ki [22]. A betegség kialakulásának rizikófaktora a dohányzás, az elhízás, rossz táplálkozási szokások, cukorbetegség, valamint a krónikus hasnyálmirigy-gyulladás [23].

A PDAC gyakran krónikus hasnyálmirigy-gyulladás hátterében alakul ki, és gyulladással mikrokörnyezethez kapcsolódik. Számos bizonyíték alátámasztja, hogy a gyulladás indukálása az onkogén K-RAS-t (Kirsten-Rat szarkóma vírus onkogén homológ) [24] expresszáló hasnyálmirigyszövetben felgyorsítja a tumor progresszióját és neoplasztikus prekursor léziók, például acinaris-ductalis metaplasia (ADM) és pankreász intraepiteliális neoplazia (PanIN) megjelenését idézi elő [25]. A K-RAS aktív formáját eredményező mutációk a PDAC-k több mint 95%-ában előfordulnak, és sokan úgy vélik, hogy ezek a mutációk hozzájárulnak a daganat kialakulásához [26], [27].

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 [3], [28]. A PDAC-ban szenvedő betegek kezelésére 1997-ben egy nukleozid-analógot, a gemcitabine-t, vezették be [29]. 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 [30]. Azonban 2011-ben a folinsav, 5-fluorouracil, irinotecan és oxaliplatin kombinációjaként alkalmazott FOLFIRINOX jelentős javulást mutatott a betegek túlélésében a gemcitabine monoterápiájához képest [30]. Ez a kezelési eljárás azonban jelentős mellékhatásokat okoz, mint például a hasmenés, hányinger, fáradtság, mieloszuppresszió és neuropátia, amelyeket csak részben lehet kontrollálni gyógyszerekkel. A hasnyálmirigy adenokarcinóma elleni kemoterápiás protokoll továbbá alkalmazza egy másik

kombinációját a folinsav, 5-fluorouracil, és az oxaliplatin hármának, az úgy nevezett FOLFOX-ot. 2012-ben a gemcitabine és az albuminhoz kötött paclitaxel együttes alkalmazása javulást mutatott a betegek túlélésében, de ezen kombináció alkalmazása is súlyos mellékhatásokkal jár, mint a hajhullás, mieloszuppresszió, hányinger, fáradtság és neuropátia [31].

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 [30].

3.2. A humán mikrobiom

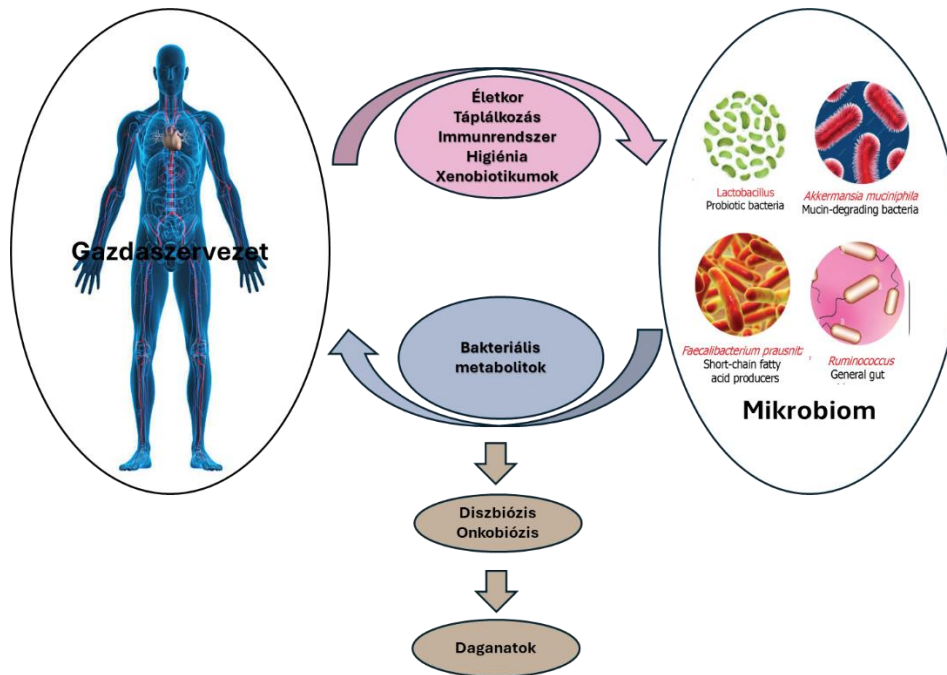
A humán mikrobióta az emberi test felszínén, illetve az emberi szervezetben élő kommenzalista, szimbionta és patogén mikroorganizmusok, vírusok, gombák, baktériumok közössége. A humán mikrobiom, pedig ezen mikroorganizmusokat és kollektív genomját foglalja magába. A mikrobiom vizsgálata napjainkban nagy mértékben növelte a mikrobióta egészségre gyakorolt jelentőségének megértését az élet minden szakaszában [32]. Az emberi mikrobiális kolonizáció a bőrön és a külső környezettel érintkező testüregek nyálkahártyáin történik, mint például a gyomor-bélrendszerben, a légzőrendszerben és az urogenitális traktusban, valamint a szekréciós mirigyekben, mint a faggyú- és emlőmirigyek. Az egyének mikrobiótájának taxonómiai összetétele rendkívül változatos. A funkcionális redundancia rendkívül bonyolulttá teszi az egészséges mikrobiom jellemzését, mivel különböző taxonómiai profilok hasonlóan működő ökoszisztémákhoz vezethetnek. Ebből következően nem lehet kijelenteni, hogy melyek az egészséges mikrobiom kulcsfontosságú jellemzői azon túl, hogy milyen leíró összetétel jellemzi az egyes területeket. Az egészséges szájüreget jellemző mikrobiomot, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas* vagy *Treponema* fajok alkotják, amelyek jelenlétét életmódbeli, környezeti és genetikai tényezők is befolyásolják [33]. A bőr felületén élő mikroorganizmusok főként *Actinobacteria* (*Corynebacteriaceae* és *Propionibacteriaceae*) és *Firmicutes* (főként *Staphylococcaceae*) fajokból állnak [34]. Az emésztőrendszer nyálkahártyáin *Firmicutes* és *Bacteroidetes* törzsek (például *Bacteroides*, *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*), továbbá *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Verrucomicrobia* *Akkermansia* és *archaeal Methanobrevibacter smithii* fajok fordulnak elő [35].

3.3. Diszbiózis-onkobiózis, onkobiom

A bél mikrobióta több mint 1500 fajból áll, amelyek több mint 50 különböző törzsbe sorolhatók [36]. A bélben a *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Tenericutes*, *Actinobacteria* és *Verrucomicrobia* törzsek a legdominánsabbak, és ezek együtt az emberi mikrobiális populáció 90%-át alkotják [37].

A mikrobióta szimbiózisban él a gazdaszervezettel, és már az élet korai szakaszában befolyásolja a gazdaszervezet fiziológiai fejlődését [38]. Fontos szerepet játszik az emésztésben, a mikrotápanyagok felszívódásában, a vitaminok és az epesavak szintézisében [39]. A mikrobióta számos élettani folyamatot befolyásol, mint az immunhomeosztázis fenntartását [40], a bélbarrier funkciójának megőrzését [41], a zsírszövetek mennyiségét [42], az anyagcserét, a vérnyomás szabályozását, a glükóz-homeosztázist, a véralvadási kockázatokat [7]. Továbbá a mikrobiom a bél-agy tengelyen (GBA) keresztül hatással van a központi idegrendszer és a bélidegrendszer közötti kétirányú kommunikációra [43] illetve, a neurotranszmitterek, mint például a szerotonin bélben történő szintézise révén még viselkedésünkre is képes hatással lenni [44] [45].

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 [7]. A mikrobiom összetételében bekövetkező változást diszbiózisnak nevezzük. Az emésztőrendszeri diszbiózis kialakulása patológias folyamatokat (tartós gyulladás, és az ebből eredő oxidatív stressz okozta DNS-károsodás és genominstabilitás) indukál (1. ábra). A daganatos megbetegedésekre jellemző diszbiózist onkobiózisnak, a megváltozott összetételű mikrobiomot onkobiomnak nevezzük [8], [46].



1. ábra A humán mikrobiom és a gazdaszervezet közötti kapcsolat. A humán mikrobiom szoros és dinamikus kapcsolatban áll a gazdaszervezettel. A bélmikrobiom összetételét számos tényező befolyásolja, köztük a táplálkozási szokásaink, az anyagcsere-folyamataink, valamint az immunrendszer működése. Ugyanakkor ez a kapcsolat kétirányú: a mikrobiom által termelt jelentős mennyiségű anyagcseretermék (metabolit), például rövid szénláncú zsírsavak, epesav-metabolitok vagy indolszármazékok, a véráramba jutva közvetlen hatást gyakorolhatnak a gazdaszervezet metabolizmusára, immunválaszaira, sőt, akár idegrendszeri működésére is. Így a mikrobiom és a gazdaszervezet közötti interakciók kulcsfontosságúak az egészségi állapot fenntartásában [7].

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, [47], [48], melyek évente körülbelül 2,2 millió rákos esetet okoznak (ami a globális daganatos megbetegedések $\sim 13\%$ -át teszi ki) [9].

Az onkobiom általában eltérő immunogén jelleget mutat a normál mikrobiomhoz (eubiomhoz) képest, mivel az onkobiótikus változások módosítják az immunrendszert [49]. Egy immunogénebb mikrobiom támogathatja az immunterápiát vagy a célzott terápiát, míg a tartós, magas szintű gyulladás elősegítheti a karcinogenezist [50]. Az emberi daganatok körülbelül 20%-a összefüggésbe hozható vírusos, bakteriális vagy parazitás fertőzésekkel [51], ilyen összefüggést írtak le a *Helicobacter pylori* fertőzés esetén, mely kezdetben gyomorfekélyt okoz, majd gyomorrák kialakulásához vezet, illetve növeli a nyelvcső rák kialakulásának

kockázatát [52]. További kutatásokban azt találták, hogy a *Salmonella* fertőzés megnövelte a kolorektális tumorok előfordulását egérmodellben [53].

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 [20]. 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 enzimatikus rendszerei által tovább módosított formában válnak biológiailag aktívvá és ezek gyakran még erőteljesebb biológiai hatást fejtenek ki [54].

Miközben a diszbiotikus bélflóra számos gyulladással járó betegség jellemzője, maga a diszbiózis is képes olyan mechanizmusokat aktiválni, amelyek felborítják a bél homeosztázisát és gyulladást idéznek elő. Az intesztinális barrier és permeabilitás kulcsszerepet játszik abban, hogy megakadályozza a bélben élő baktériumok és kórokozók bejutását a szervezetbe, ezért szigorúan szabályozott. Azonban a bélmikrobióta diszbiózisa következtében megnövekedett bélpermeabilitás figyelhető meg, ami a baktérium endotoxinok, elsősorban a lipopoliszacharid transzlokációjának fokozódásához vezet [55]. A nagy mennyiségben bejutó baktériumok és lipopoliszacharidok folyamatosan aktiválják a Toll-like receptorokat (TLR), és fokozzák a gyulladással járó citokinek termelését, ami károsítja a bélhámot és krónikus bélgyulladásokhoz vezethet [56]. A krónikus gyulladás számos anyagcserezavarral, például autoimmun diabéteszhez hozható összefüggésbe. Egérvizsgálatokban megfigyelték, hogy a nagyobb mennyiségű szegmentált fonalas baktériumok (SFB) megvédik a diabéteszes genotípusú egereket a betegség kialakulásától, ami arra utal, hogy a bélmikrobióta egyaránt képes gátló és védő hatásokat kifejteni [57], [58].

Egyes tanulmányokban a bél mikrobiomjának diszbiózisát kapcsolatba hozták az autizmus-spektrumzavarral (ASD). Leírták, hogy a vastagbélben lévő *Clostridium* baktériumok magasabb ASD kockázatot és súlyosabb tüneteket jelezhetnek, mivel ez a baktériumfajta egy neurotoxin termelésével képes blokkolni egyes neurotranszmitterek működését a bél-agy tengelyen keresztül. Ez idegi folyamatok károsodásához és számos viselkedési zavar kialakulásához vezethet [59]. Más tanulmányokban a bél mikrobiomot összefüggésbe hozták

az Alzheimer-kór patológiájának szabályozásával azáltal, hogy a bélmikrobióta befolyásolja a többszörösen telítetlen zsírsavak metabolizmusát, és neuroinflammációt okozhat, amely összefüggésben állhat a kognitív hanyatlással [60].

A kóros bélmikrobióta a veleszületett immunrendszer érésére is hatással van. Mikrobióta nélkül a neutrofilek és a dendritikus sejtek működése károsodik, ami csökkent kórokozóölő képességben, valamint az I-es típusú interferonok (IFN-I) és az IL-15 csökkent szekréciójában nyilvánul meg [61], [62]. A bélflóra egyensúlyának felborulása csökkentheti az immunválaszt és növelheti a fertőzések vagy daganatok, illetve az immunrendszerhez kapcsolódó betegségek kialakulásának kockázatát [63].

3.4. Onkobiózis PDAC-ban

A mikrobiom és a hasnyálmirigy adenokarcinóma közötti kapcsolatot először az a megfigyelés vetette fel, hogy a *Helicobacter pylori* kolonizációja összefüggésbe hozható a hasnyálmirigy-gyulladással [64]. Azóta jelentősen megnövekedett az onkobiommal foglalkozó tanulmányok száma, amelyek kifejezetten a hasnyálmirigy adenokarcinómára fókuszálnak. A jelenlegi ismereteink szerint a szájüregi, gyomor- és bélflóra képes kolonizálni az epevezeték, a hasnyálmirigy vezeték, végül pedig magát a hasnyálmirigyet is [14], [19]. Jellemző változások következnek be a szájüreg mikrobiális összetételében [13] és a bélflórában [14] hasnyálmirigy adenokarcinóma esetén.

Egy összefoglaló tanulmányban szisztematikusan értékelték a humán gasztrointesztinális traktus mikrobiomjában bekövetkezett változások és PDAC közötti összefüggéseket, ahol azt találták, hogy egyes nemzetségekbe tartozó fajok aránya megnövekedett PDAC betegekben, míg más nemzetségekbe tartozó fajok aránya lecsökkent, az egészséges kontrollhoz képest (1 . táblázat) [8].

1. táblázat A mikrobiom összetételében bekövetkező változások PDAC-ban.

	Megnövekedett baktérium nemzetségek	Lecsökkent baktérium nemzetségek	Ref.
Bél	<i>Actinomyces</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Veillonella</i> <i>Escherichia/Shigella</i>	<i>Faecalibacterium</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Coprococcus</i> <i>Subdoligranulum</i> <i>Fusicatenibacter</i> <i>Roseburia</i> <i>Parasutterella</i> <i>Paraprevotella</i>	[65]
Hasnyálmirigy	<i>E. coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Alcaligenes</i> <i>Serratia</i> <i>Enterococcus</i>	[66]
Szájüreg	<i>Streptococci</i> <i>Campylobacter</i> <i>Prevotella</i> <i>Veilonella</i> <i>Actinobacteria</i>		[13]
Nyombél	<i>Acinetobacter</i> <i>Aquabacterium</i> <i>Oceanobacillus</i> <i>Rahnella</i> <i>Massilia</i> <i>Delftia</i> <i>Deinococcus</i> <i>Sphingobium</i>	<i>Porphyromonas</i> <i>Paenibacillus</i> <i>Enhydrobacter</i> <i>Escherichia</i> <i>Shigella</i> <i>Pseudomonas</i>	[14]
Széklet	<i>Phylum Bacteroidetes</i>	<i>Firmicutes</i> <i>Proteobacteria</i>	[67]

A diszbiózis kialakulása PDAC-ban a jótékony baktérium fajok diverzitásának csökkenését okozza, míg más patogén baktériumok megjelenése és számuknak növekedése figyelhető meg az egészséges kontroll mintákhoz képest. A bakteriális invázió patogén szerepét hasnyálmirigyben, antibiotikumokkal kezelt egerekben, állatkísérletekkel bizonyították [68]. Az antibiotikumok specifikus hatást mutatnak a PDAC kialakulásának kockázatára, a penicillin növelte [69], míg a széles spektrumú antibiotikum keverékek (streptomycin, gentamicin, bacitracin és ciprofloxacín [68] vagy ampicillin, vancomycin, neomycin és metronidazol [70]) védelmet mutattak egérmodellekben [71].

3.5. A másodlagos epesavak, mint bakteriális metabolitok szintézise

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 epesavakból képződő másodlagos epesavak, mint a litokólsav (LCA), dezoxikólsav (DCA) és ursodezoxikólsav (UDCA).

Az epesavakat az emberi szervezetben szintézisük sorrendjétől függően, elsődleges vagy másodlagos epesavaknak nevezzük. A kólsav (CA) és a kenodezoxikólsav (CDCA), amelyek 3, illetve 2 hidroxilcsoportot tartalmazó vegyületek, először a májsejtekben koleszterinből szintetizálódnak, ezért elsődleges epesavaknak nevezzük őket. Ezt követően a CA és a CDCA a májban konjugálódik, a karboxil csoportjaik glicinnel vagy taurinnal történő kovalens kötése révén, aminek eredményeként glikokólsav (GCA), taurokólsav (TCA), glikokenodezoxikólsav (GCDCA) és taurokenodezoxikólsav (TCDCA) képződik [72].

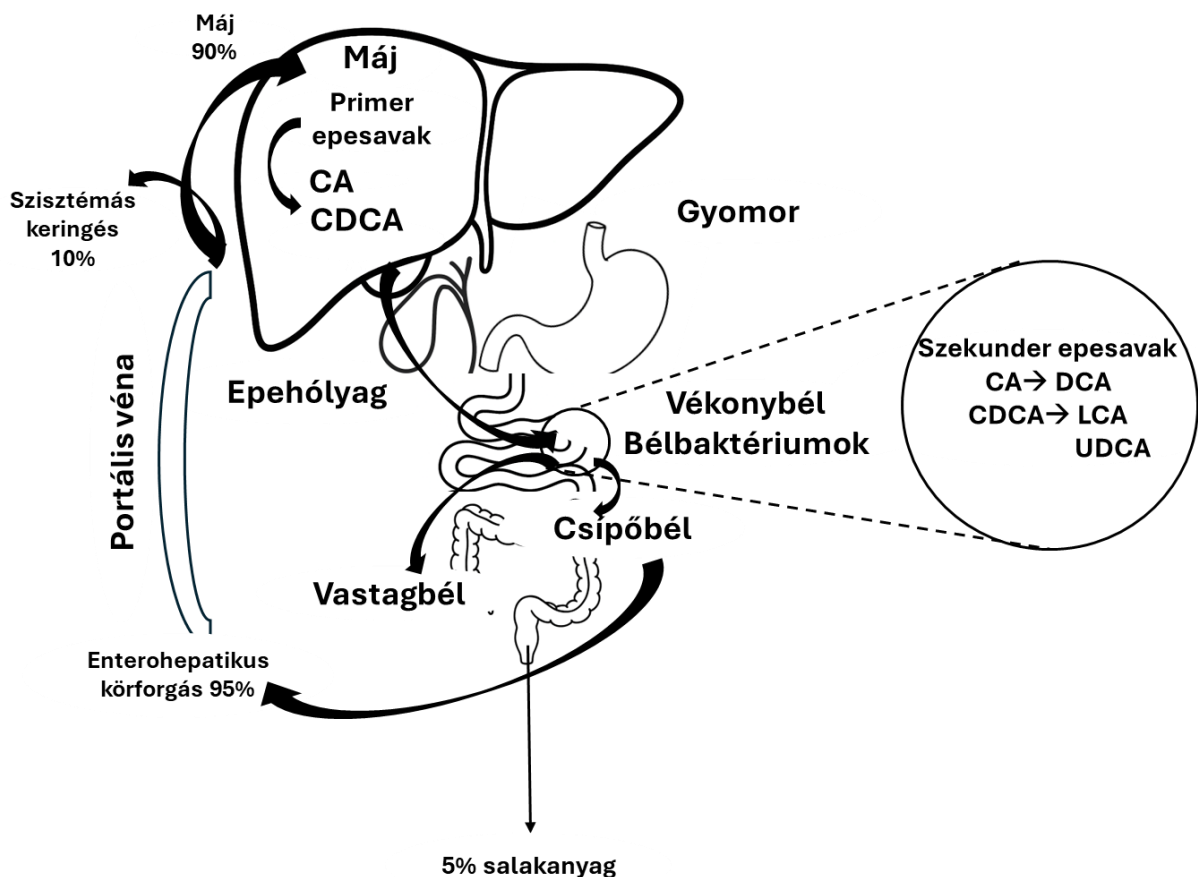
Az élő szervezetek két különböző útvonalat használhatnak az epesavak szintéziséhez [73]. Az „alternatív” útvonalon keresztül csak CDCA elenyésző mennyiségű szintézisére van lehetőség, ugyanakkor a „klasszikus” útvonal biztosítja az epesav szükséglet több mint 90%-ának szintézisét. Ez a klasszikus útvonal a szterán gyűrű C7-es pozíciójának hidroxilációjával kezdődik, amelyet a koleszterin 7 α -hidroxiláz enzim (CYP7A1) katalizál. Ezt követően az intermedier azonnal módosul az oldalláncon a szterol 27-hidroxiláz enzim (CYP27) által a CDCA szintéziséhez, vagy CA szintézis esetén tovább hidroxilálódik a C12-es pozíción a 12 α -hidroxiláz (CYP8B1) segítségével, mielőtt a CYP27 katalizálta lépés bekövetkezne.

Ezen az útvonalon egyrészt a CYP7A1 aktivitása a sebességmeghatározó lépés, másrészt, a CYP8B1 aktivitása, amely a szteroidváz hidrofil összetételét szabályozza, így irányítva a CA és CDCA termelési arányát [74].

Szintézisük után a kólsav és kenodezoxikólsav taurinnal és glicinnel konjugálódik, két enzim aktiválása révén, ezek az epesav-CoA szintetáz (BACS) és az epesav-CoA-aminosav N-aciltranszferáz (BAAT). A konjugáció révén az előállított epesav hidrofilebbé és savasabbá válik az oldalláncon: a pKa érték körülbelül 5-ről 3,9-re csökken a glicin konjugátumok esetén, és 2 alá a taurin konjugátumok esetén. A szintetizált epesav mennyiségét transzkripciós szintű kontroll mechanizmusok szabályozzák, mely során az epesavak a farnezoid X receptorhoz (FXR) történő kötődésével, végül gátolják a CYP7A1 és CYP8B1 gének kifejeződését, amelyek az epesav bioszintézisében részt vevő enzimek kódolásáért felelősek.

Az epesav termelés naponta körülbelül 500 mg koleszterint használ fel, így ez az egyik fő mechanizmus a koleszterinszint szabályozására az emberi szervezetben [75].

Étkezés után a kolecisztokinin (CCK) hormon felszabadulásának hatására az epesavak az epével az epeutakon keresztül a vékonybélbe jutnak. Mivel a konjugált epesavak teljesen ionizált állapotban vannak az epeutak és a vékonybél pH-ján, nem képesek átjutni a sejthártyákon, ezáltal biztosítják a megfelelően magas epesav koncentrációt a bél lumenében a zsírok emésztéséhez, továbbá micellák képzésével hozzájárulnak a zsírban oldódó tápanyagok, vitaminok (A, D, E, K₁) oldásához, emulgálásához és a normál koleszterinszint fenntartásához [76]. 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 (2. ábra) [77].



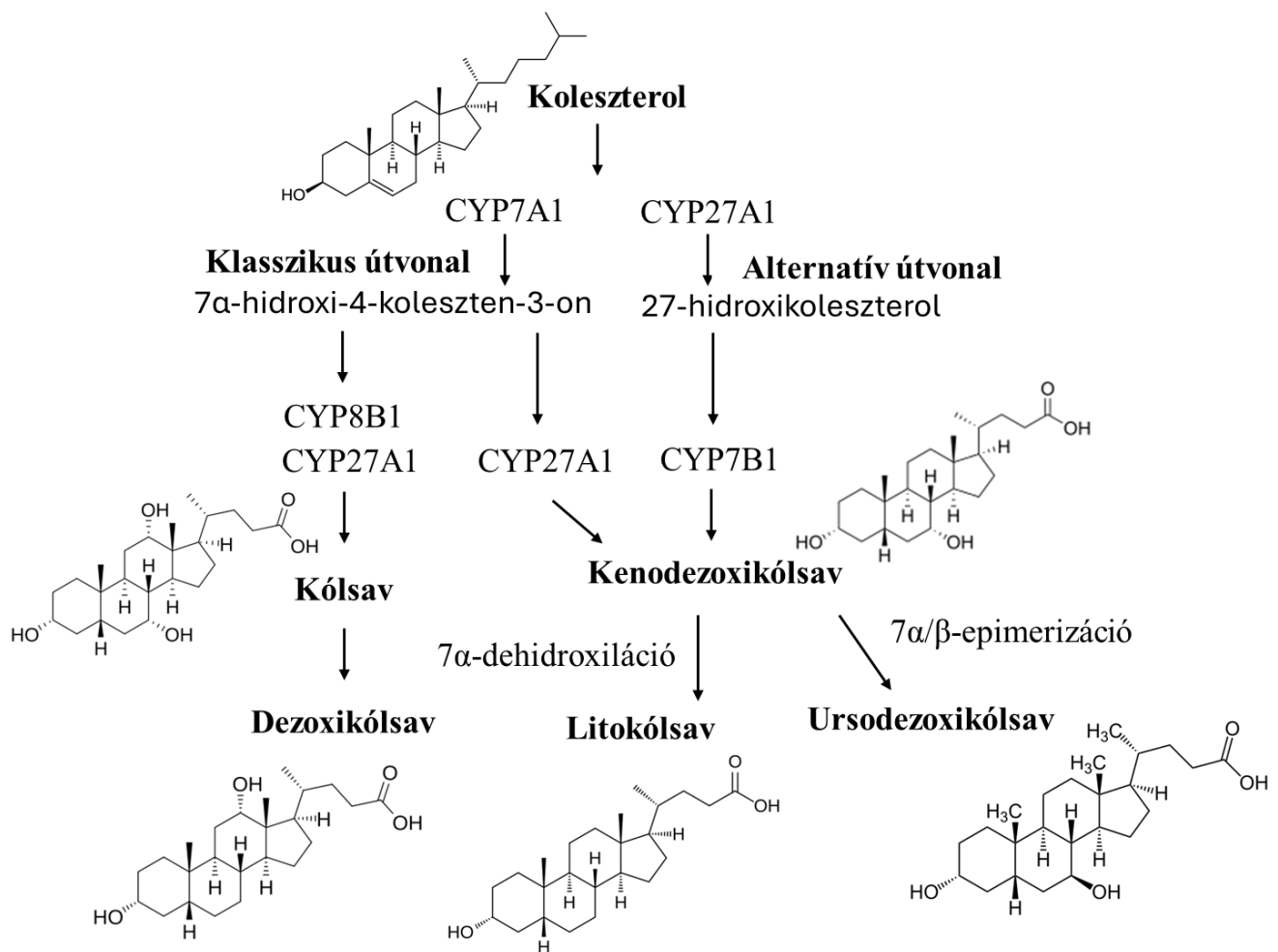
2. ábra Az epesavak enterohepatikus körforgása. Az epesavak enterohepatikus körforgása a máj, az epehólyag, a bélrendszer és a máj közötti zárt anyagcsere körfolyamat. A májban képződő elsődleges epesavak az epehólyagban tárolódnak, majd étkezés során az epével együtt a vékonybélbe jutnak, ahol elősegítik a zsírok emésztését és felszívódását. A bélben a bélbaktériumok részben módosítják az elsődleges epesavakat: 7α -dehidroxiláció és $7\alpha/\beta$ -epimerizáció révén másodlagos epesavak, dezoxikólsav, litokólsav és ursodezoxikólsav, keletkeznek. Az epesavak többsége, így a módosított

másodlagos epesavak is visszaszívódnak a vékonybél alsó szakaszában, majd a portális vénán keresztül visszajutnak a májba, ahol újra kiválasztódnak, fenntartva ezzel a zárt körforgást [77].

Naponta nagyjából 500 mg epesav lép ki az enterohepatikus körforgásból, mely epesavak különböző reakciók révén szekunder epesavakká alakulnak. Az átalakulás első lépése a dekonjugáció, majd ezt követi az oxidáció, a dehidroxilálás és az epimerizáció. A bakteriális epesav dekonjugáció a taurin és glicin konjugátumok hidrolízisével történik, amelyet az epesav-hidroláz (BSH) vagy 7α -dehidroxiláz enzim katalizál. Ezeket az enzimeket a *Firmicutes* törzsbe tartozó *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides vulgatus* [78], *Listeria monocytogenes*, *Clostridium* [79], *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* [54] [89] fajok, illetve az *Eubacterium* nemzetségbe [82] tartozó fajok termelik. A dekonjugált epesavak ezt követően elérhetők a különböző baktériumok által közvetített biotranszformációs útvonalak számára. Az oxidációs és epimerizációs aktivitás az intesztinális *Firmicutes* törzsekhez (*Clostridium*, *Eubacterium* és *Ruminococcus*), a *Bacteroides* és *Escherichia* fajokhoz kapcsolódik, míg a dehidroxilálás a *Clostridia* és *Eubacteria* fajokhoz köthető [83].

Az epesavak dehidroxilálásában résztvevő enzimek egy operonba szerveződnek, ez az úgynevezett epesav-indukálható (bile acid-inducible - *bai*) operon, mely 8 gént tartalmaz: *baiB*, *baiCD*, *baiE*, *baiA2*, *baiF*, *baiG*, *baiH*, és *baiI* [84].

A CA 7α - dehidroxilációja DCA, a CDCA 7α - dehidroxilációja LCA, és a CDCA 7 epimerizációja UDCA másodlagos epesavak szintézisét eredményezi (3. ábra) [85].



3. ábra A másodlagos epesavak szintézisének útvonalai. Az epesavsintézis a koleszterin átalakulásával indul a májban, ahol két fő enzim, a CYP7A1 és a CYP27A1 játszik kulcsszerepet. A CYP7A1 enzim katalizálja a koleszterin 7α-pozíciójának hidroxilálását, így keletkezik a 7α-hidroxi-4-koleszten-3-on. Ezzel párhuzamosan a CYP27A1 enzim a koleszterin 27-es szénatomján vezet be hidroxilcsoportot, amelynek eredményeként 27-hidroxi-koleszterol képződik. Ezek a közös termékek tovább módosulnak további enzimek hatására. A 7α-hidroxi-4-koleszten-3-onból, a CYP8B1 és a CYP27A1 enzimek együttes működése révén, kólsav keletkezik. Ezzel szemben a 27-hidroxi-koleszterolból, CYP27A1 és CYP7B1 enzimek hatására, kenodezoxikólsav képződik. A béltraktusban a baktériumok által a kólsav 7α-dehidroxiláció révén dezoxikólsavvá alakul át, míg a kenodezoxikólsav szintén 7α-dehidroxilációval litokólsavat eredményez. Emellett a kenodezoxikólsav egy alternatív módosuláson, 7α/7β-epimerizáción is keresztülemelhet, melynek következményeként ursodezoxikólsav keletkezik. Ezek a másodlagos epesavak fontos szerepet játszanak az epesavak körforgásában és a koleszterin-anyagcsere szabályozásában. Az epesavsintézis egy bonyolult, szigorúan szabályozott folyamat, amelyben a koleszterin módosulása során elsődleges és másodlagos epesavak jönnek létre, létfontosságú funkciókat betöltve az emberi szervezet lipidanyagcseréjében és az enterohepatikus keringés fenntartásában [74].

A dekonjugáció és a dehidroxiláció növeli az epesavak hidrofób jellegét (pKa-értékét), ami fokozza a passzív felszívódást a vastagbél hámsejtjeiben, és elősegíti az epesavak visszanyerését, befolyásolja az epesavak kémiai-fizikai és élettani tulajdonságait, így azok eltérően hatnak az enterohepatikus körforgás különböző részein [74]. A másodlagos epesavak egy része a vastagbélben visszavételre kerül és a portális vénán keresztül visszakerül a májba, ahol glicinnel és taurinnal újból konjugációs reakcióban vesz részt, másrészt pedig véráramba kerülve a szervezet különböző pontjain jelátviteli folyamatokat indukálhat.

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: Farnesoid 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) [86]. Ezeken a receptorokon keresztül az epesavak hatást gyakorolnak az immunválaszokra, a gyomor-bélrendszeri nyálkahártya-barrier működésére, a terhességre [87], a karcinogenezisre [10], valamint az anyagcsere-betegségekre [88]. Minden epesav több különböző receptorhoz is kapcsolódhat. A receptorok eltérő mértékben aktiválódnak a különböző epesavak hatására, például: az FXR aktiválásának sorrendje: CDCA > DCA > LCA > CA [89], a TGR5 aktiválásának sorrendje: LCA > DCA > CDCA > CA [90], [91], illetve a VDR és PXR főként LCA által aktiválódik. Az epesav receptorok aktiválása számos jelátviteli útvonalat indíthat el, amelyek a glükóz-, lipid- és energiaháztartás szabályozásában, valamint a daganatos megbetegedésekben is fontos szerepet játszanak.

3.6. Az epesavak szerepe PDAC-ban

A bélmikrobiom és az epesavak közötti kölcsönhatás kétirányú. A bélmikrobiom szabályozza az epesav- szintézist, a konjugációt és az elsődleges epesavak másodlagos epesavakká történő átalakulását [92]. Ezzel szemben az epesavak megváltoztathatják a mikrobiom összetételét [93] és elősegíthetik a baktériumok transzlokációját a szövetekbe [94], ami a hasnyálmirigy-daganat karcinogenezisének egyik kulcsfontosságú lépése.

Az epesavak, mint bakteriális metabolitok szerepe a hasnyálmirigyrákban nem tisztázott. Néhány tanulmányban pro- [95] és antikarcinogén [96] hatásokat is kimutattak. Az epesavak csökkentik az apoptózisra való érzékenységet, serkentik a sejtciklus előrehaladását, fokozzák a gyulladással kapcsolatos mediátorok kifejeződését és a PDAC sejtek migrációját [97]. Ugyanakkor a hasnyálmirigy-daganatsejtekben a ROS-szint csökkentésén keresztül az epesavak gátolják az epitheliális-mezenchimális átmenetet (EMT) és a daganatos őssejtek kialakulását [86], [96].

Az epesavak daganatsejtekre gyakorolt hatása nagymértékben függ az alkalmazott epesav koncentrációtól. Számos tanulmányban az epesavakat szuprafiziológiás koncentrációban alkalmazzák, melyek specifikus hatások kialakulásához vezetnek [86]. Az epesavak magas koncentrációban való alkalmazása olyan „off-target” jelátviteli útvonalakat is aktiválhat, amelyek normál élettani körülmények között nem lépnek működésbe [86].

Az epesavak szerepet játszanak a PDAC kialakulásában. Az epekő képződése elzárhatja az epeáramlást, ami hasnyálmirigy gyulladást idézhet elő [98], a hosszútávon fennálló gyulladás az egyik rizikófaktora a hasnyálmirigy adenokarcinómának [86]. A premalignus hasnyálmirigy-vezetéksejtek epesavval történő kezelése daganatkeltő hatást mutat [99], [100]. Továbbá több epesav magas koncentrációja mutatható ki PDAC-betegekben [101].

3.6.1. Az LCA és az UDCA szerepe a daganatokban

Az epesavak hatása a daganatokban nagymértékben függ attól, hogy milyen típusú daganatról van szó, illetve milyen koncentrációban alkalmazzák az adott epesavat [10], [12], [102]. Kimutatták, hogy az LCA különböző daganattípusban, többek között neuroblasztómában [103], prosztatákban [104], [105], nephroblastomában [106], epehólyagrákban [107], májrákban [108] és emlőrákban [10], [12], [109] antineoplasztikus hatásokkal bír. A hasnyálmirigy-daganat és az LCA kapcsolatát eddig nem tanulmányozták.

Az ursodezoxikólsav egy klinikai jelentőséggel bíró, hidrofil tulajdonságú epesav. Az UDCA nagyjából 40 éve engedélyezett gyógyszer, elsőként a primer biliaris cholangitis (PBC) kezelésére alkalmazták, azóta az újabb kutatások eredményeként kiterjesztették az alkalmazhatóságának körét, például a koleszterin epekő oldására [86], [110] is használják. Az UDCA-t leginkább jótékony hatású vegyületként [86] azonosították a daganatos megbetegedések kapcsán. Az UDCA gátolja a hepatocelluláris karcinóma sejtek (HCC) növekedését és apoptózist indukál [111], illetve a kolorektális karcinómasejtek (CRC) proliferációját [112], valamint gátolja az onkogén jelátviteli útvonalakat vastagbél daganatban

[113]. Hasnyálmirigy-daganatban egy tanulmány számolt be arról, hogy az UDCA gátolja az epiteliális-mezenchimális tranzíció folyamatát és a rákos őssejtek kialakulását azáltal, hogy csökkenti az oxidatív stresszt a PDAC sejtekben [96]. Ezekben a tanulmányokban az epesavakat nagy koncentrációban (nem szérumban referenciaközpontú) alkalmazták, ami sok esetben aspecifikus vagy toxikus hatásokat eredményezhet.

3.7. Tumor mikrokönyezet

A tumor mikrokönyezetet (TME – tumor microenvironment) széles körben összefüggésbe hozták a tumorigenézissel, mivel olyan daganatsejteket tartalmaz, amelyek a keringésen és a nyirokrendszeren keresztül kölcsönhatásba lépnek a környező nem malignus sejtekkel, és képesek befolyásolni azok működését, proliferációját, túlélését, ezáltal befolyásolva a daganat kialakulását és fejlődését. A malignus és nem malignus sejtek közötti szoros és többirányú kommunikáció hozza létre a TME-t. Tehát a tumor mikrokönyezet nagyfokú heterogenitást mutat, a malignus sejtek mellett az egészséges, nem transzformált sejteknek is nagy szerepük van a daganatok progressziójában [114].

A malignus tumorok két egymástól elkülönült részből, parenchimából és sztrómából épülnek fel. A parenchimát magas proliferációs képességgel rendelkező, invazív daganatsejtek, míg a tumoros sztrómát legnagyobb arányban olyan sejtípusok alkotják, mint a karcinómához társult fibroblasztok (CAF), periciták, karcinómához társult endotélsejtek (CAEC), immunsejtek (IC), valamint különböző sztrómális őse- és progenitor sejtek [115]. A TME-t jellemző komplex interakció gyakran extracelluláris metabolitokat is magába foglal, amelyek nemcsak energiát szolgáltatnak, hanem jelátvivő molekulaként is működnek a különböző sejtípusok között [114]. A normál fibroblasztok szintetizálják és építik fel az extracelluláris mátrixot (ECM), forrásai különféle parakrin és autokrin növekedési faktoroknak, amelyek nemcsak a környező sejtek, hanem saját maguk növekedését is szabályozzák, továbbá fontos szerepük van a sebgyógyulásban [116], [117]. A karcinómához társult fibroblasztok hozzájárulnak a daganatsejtek proliferációjához, mivel fenntartják a sejtek folyamatos osztódását és növekedését [117]. Ezenkívül citokineket és növekedési faktorokat választanak ki, például a fibroblaszt szekréciós fehérje-1 (FSP1), amely növeli a vastagbél- és emlőrák metasztatikus potenciálját [118]. A CAF-ok olyan energiatartalmú metabolitokat választanak ki, mint a laktát és a piruvát, melyeket a daganatsejtek képesek felvenni és hasznosítani, ezzel

támogatva a malignus sejtek túlélését és növekedését. Ezt a jelenséget Lisanti és munkatársai nevezték el „fordított Warburg-effektusnak” [119].

Az angiogenezis központi szerepet játszik a daganatsejtek növekedésében és túlélésében, és egyben a tumorsejtek metasztázisának fő útvonala is [120]. A tumorokban futó érhálózat belső rétegét a CAEC, vagy más néven tumor-asszociált endotél sejtek (TEC) alkotják. A CAEC vagy TEC sejtek a normál endotél sejtek növekedési faktor (TGF- β) jelenlétében bekövetkezett endoteliális-mezenchimális tranzícióján (EndMT) keresztül keletkeznek [121].

A daganatszövetek érképződése egy többlépcsős, komplex folyamat, amelyet különféle molekuláris és sejtes tényezők hangolnak össze [122]. A normál sztrómával összehasonlítva a daganatos sztróma érhálózata jóval gazdagabb. A PDAC az egyik legsűrűbb sztrómával borított daganattípus, amelyben a daganathoz társult érrendszer a sztróma szerves részét képezi [123]. Klinikai szempontból az intratumorális mikroérsűrűség (MVD) kedvezőtlen prognózissal társul, és önálló prognosztikai tényezőként is szolgálhat [124].

A tumor mikrokörnyezetre jellemző a nagy mennyiségben jelen lévő immunsejt (IC) is. Az immunsejtek a TME-ben különböző gyulladást iniciáló szignálmolekulákat szabadítanak fel, mint például növekedési faktorokat (VEGF, TGF- β), gyulladáscitokineket (IL-6), mátrix metalloproteinázokat (MMP9), melyek a neoplasztikus folyamatoknak kedveznek, támogatják a tumorsejtek túlélését, proliferációját, segítik az angiogenezist, fokozzák az inváziót, elősegítve a tumor progresszióját [125]. Ugyanakkor az IC-ek növelhetik az oxidatív stresszt, és a reaktív oxigén formák felszabadításával előidézhetik a T-sejtek, a B-limfociták és a természetes ölósejtek aktiválódását [126].

Egy friss tanulmányban leírták, hogy regressziót sikerült kiváltani előrehaladott PDAC-ban, egy K-RAS inhibitor alkalmazásával, mely növelte az intratumorális CD8⁺ effektor T-sejtek számát és átprogramozta a daganathoz társult fibroblasztokat (CAF) [127].

3.8. A neoplasztikus transzformációval összefüggő tulajdonságok

A daganatos sejtek egyik legalapvetőbb jellemzője, hogy képesek a rendellenes önálló sejtosztódás fenntartására, *folyamatos proliferációs szignálok* biztosításával. A normál szövetekben a növekedési faktorok termelése és felszabadulása szigorúan szabályozott. Azonban a neoplasztikus sejtek olyan szomatikus mutációkat hordoznak, melyek jelátviteli útvonalak konstitutív aktiválását eredményezik, mint a MAPK [128], a PI3K [129] és az Akt

[130] útvonalak. Például a PTEN funkcióvesztő mutációja, mely felerősíti a PI3K-jelátvitelt, több daganatmodellben is tumorigenezist indukál [129].

Az mTOR-t (mammalian target of rapamycin) érintő mutációk **korlátlan sejtosztódást** biztosítanak a tumorsejteknek [131]. A legtöbb normál sejt csak korlátozott számú növekedési és osztódási cikluson képes keresztülmenni, ami a kromoszómák végeit védő telomerek rövidülésének és későbbi védő funkciójuk elvesztésének köszönhető. Ez funkcióvesztés **kromoszóma instabilitást** eredményez, amely krízist, majd sejthalált okoz. Szinte minden humán daganatos sejtre jellemző a telomeráz nagyfokú aktivációja, amely feltehetően azért történik, hogy lehetővé tegye a tumorsejtek korlátlan sejtosztódását [132]. A telomeráz hozzájárulhat a tumor progressziójához azáltal, hogy fenntartja a telomerek hosszát, megakadályozva a sejt szintű szenescencia vagy apoptózis kiváltását. Több mechanizmust, illetve különböző onkogéneket azonosítottak, melyek kiváltják a telomeráz aktivációját a malignus sejtekben, ilyenek például a transzkripciós szabályozóként működő Myc [133] és a Wnt [134] gének.

Amellett, hogy a daganatos sejtek képesek növekedést serkentő jelek kiváltására és konstitutív fenntartására, **meg kell kerülniük a tumorszupresszor gének** működésétől függő mechanizmusokat, amelyek negatívan szabályozzák a sejtszaporodást. A két legismertebb tumorszupresszor gén, a retinoblasztóma (RB) [135] és a p53 fehérje (TP53) [136]. Ezek olyan szabályozó mechanizmusok központi molekulái, amelyek meghatározzák, hogy a sejtek osztódjanak-e, vagy inkább szenescencia- és apoptózisprogramokat aktiváljanak. A legtöbb neoplasztikus sejtben megfigyelték a tumorszupresszor gének funkcióvesztő mutációit [135].

A daganatsejtek számos stratégiát fejlesztenek ki, hogy korlátozzák vagy teljesen **elkerüljék az apoptózist**. A leggyakoribb a TP53 tumorszupresszor gén működésének elvesztése, az antiapoptotikus szabályozók túltermelése (Bcl-2, Bcl-xL), túlélési jelek fokozása (Igf1/2 növekedési faktorok) és az extrinzik vagy intrinzik apoptózis útvonal megkerülése [137].

A normál szövetekhez hasonlóan a daganatoknak is szükségük van tápanyagokra és oxigénre. Az anyagcsere folyamatokhoz szükséges érhálózatot az **angiogenezis fokozásával** képesek kialakítani, mely elősegíti a daganatos szövetek életben maradását és táplálását [138]. Az angiogenezis a nem malignus szövetekben egy szigorúan szabályozott folyamat, mely fontos szerepet tölt be az embriogenezisben és a sebgyógyulásban. Az angiogenezisben fontos szerepet játszó molekulák közé tartozik a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF-A)[139] és a trombocita eredetű növekedési faktorok (PDGF-B/C) [140]. Korábban az angiogenezist csupán a gyorsan növekvő daganatok esetén tartották jelentősnek, azonban

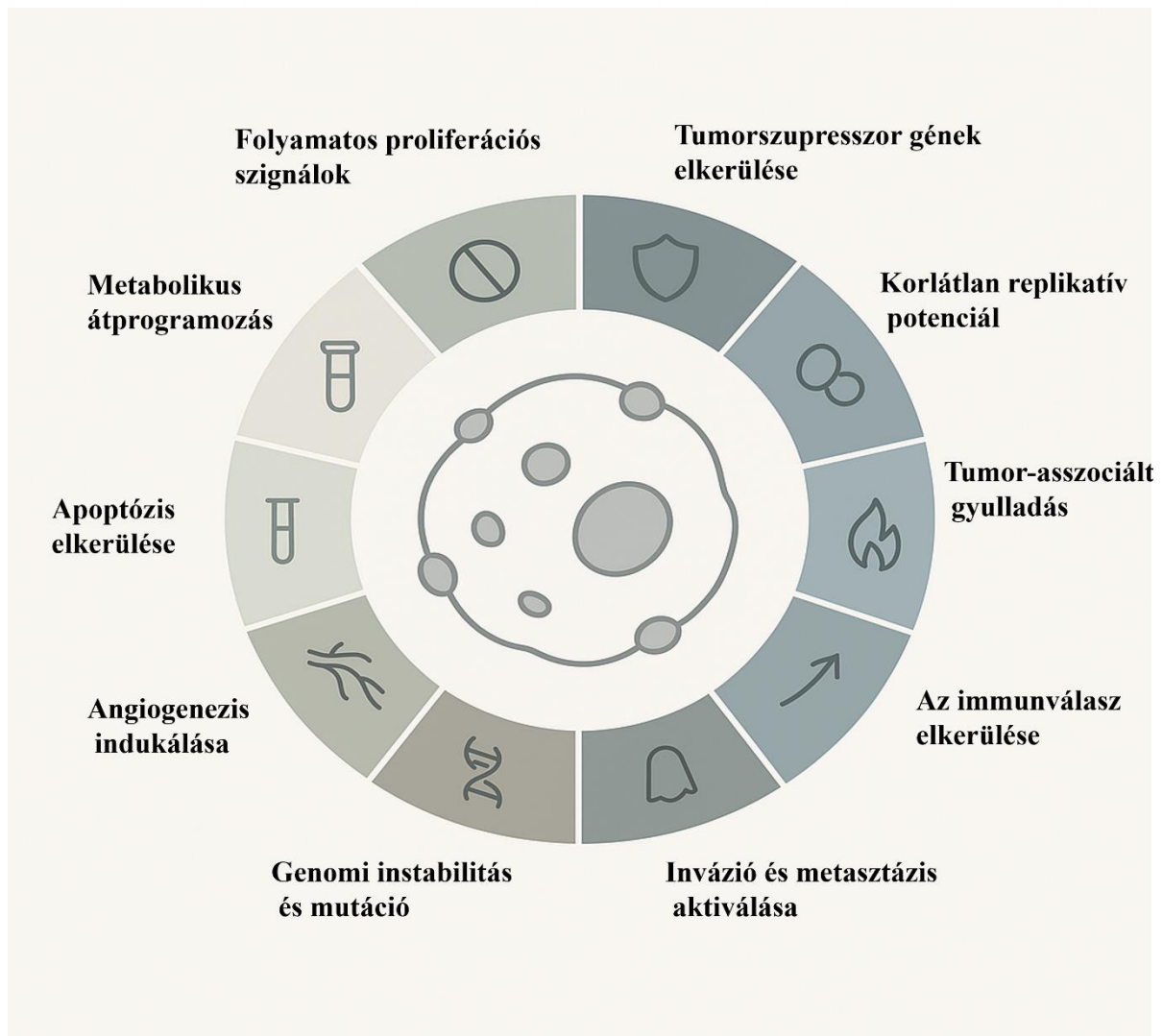
később kimutatták, hogy az angiogenezis már a premalignus stádiumban is szerepet játszik a daganatos progresszióban [141]. Ez tovább erősíti az angiogenezis szerepét, mint a rák egyik alapvető jellemzőjét.

A malignus sejtek alakjukban, valamint más sejtekhez és az extracelluláris mátrixhoz való kapcsolódásukban is eltérnek az egészséges, normál sejtektől. Az egyik legnagyobb különbség az E-cadherin adhézis fehérje molekula elvesztése. Az E-cadherin fokozott expresszióját egyértelműen az *invázió és a metasztázis* ellensúlyozójaként azonosították, míg csökkent expressziója e folyamatok elősegítője volt. Több tanulmányban is leírták az E-cadherin kulcsszerepét a daganatok gátlásában [142].

A tumor mikro környezetében jelenlévő *folyamatosan fennálló gyulladós* állapotok elősegítik a daganatos sejtek proliferációját, az angiogenezist és a daganat progresszióját [143].

A daganatos sejtekre jellemző krónikus és gyakran kontrollálatlan sejtszaporodás nemcsak a sejtciklus szabályozásának felborulásával jár, hanem az *anyagcsere újraprogramozásával* is. Normál körülmények között, aerob (oxigéndús) állapotban a sejtek a glükózt először glikolízis révén piruváttá alakítják a citoplazmában, majd a piroszőlősav a mitokondriumokban széndioxiddá bomlik. Anaerob körülmények között viszont a glikolízis kerül előtérbe, és csak kevés piroszőlősav kerül a mitokondriumokba. Azonban a malignus sejtek anyagcseréjében változás figyelhető meg, még oxigén jelenlétében is hajlamosak az energiatermelést nagyrészt a glikolízisre korlátozni, a mitokondriális oxidatív foszforiláció helyett. Ezt az állapotot nevezzük „aerob glikolízisnek” vagy közismerten, „Warburg effektus”-nak. Ez a metabolikus újraprogramozás lehetővé teszi a daganatsejtek számára, hogy gyorsan hozzájussanak az építőelemekhez (nukleotidokhoz, aminosavakhoz, lipidekhez), amelyekre szükségük van a gyors osztódáshoz, még akkor is, ha az energiatermelés hatékonysága csökken [144].

Az onkogenezist irányító biológiai folyamatokat együttesen „hallmarks of cancer” -nek nevezzük, mely összefoglalója azoknak a folyamatoknak, melyeken keresztül a sejtek olyan tulajdonságokra tesznek szert, amelyek tumorigenitásukat és végső soron malignussá válásukat lehetővé teszik [137] (4. ábra).



4. ábra A tumorsejtekre jellemző tulajdonságok „hallmarks of cancer” A daganatos sejtek működését több, jól meghatározható biológiai jellemző határozza meg, amelyeket összefoglalóan „hallmarks of cancer”-nek nevezünk. Ezt a koncepciót Hanahan és Weinberg vezette be, és azóta a daganatbiológia egyik alapvető elméletévé vált. Ide tartoznak például a kontrollálatlan sejtosztódás, a sejthalál elkerülése, az angiogenezis elősegítése, az immunszabályozás kijátszása, a metabolikus átprogramozás, valamint a metasztatizáló képesség megszerzése. Ezek a jellemzők segítik a tumorsejteket abban, hogy túléljenek, szaporodjanak, és elkerüljék a szervezet védekező mechanizmusait [137].

3.9. „Hallmarks of cancer” - a tumoros sejtekre jellemző tulajdonságok PDAC-ban

3.9.1. Sejtproliferáció

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 kivéden 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 K-RAS gén szomatikus mutációja az esetek 90%-ában előfordul [145]. 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 [145], [146], [147], pankréász adenokarcinómában is [148]. A tumorok nagy százalékában, így PDAC-ban is [149], a tumorszuppresszor gének mutációt szenvednek [150]. A p53 fehérje mutációja fokozza a PDAC sejtek kemoterápiás szerekekkel (gemcitabinnal) szembeni ellenálló képességét is [151]. 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 [152].

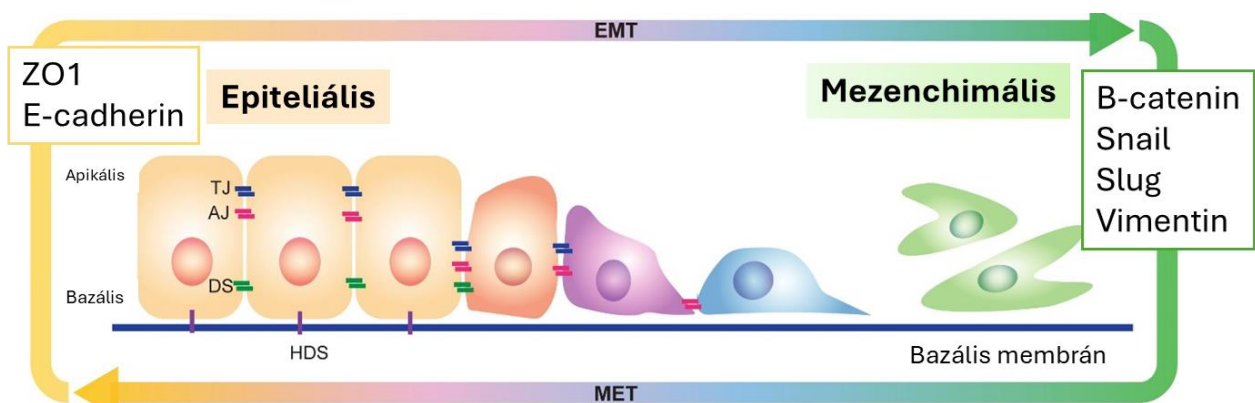
3.9.2. Epiteliális-mezenchimális tranzíció

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 [153].

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 össejtszerűség fenntartásához, a

gyógyszerrezisztenciához, az immunrendszer elkerüléséhez és a metasztázisok kialakulásához [154].

Az epiteliális sejtek szoros kapcsolatokat alakítanak ki a szomszédos sejtekkel, és apiko-bazális polaritási tengelyt hoznak létre az adhézions 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 (5.ábra): 1) az epiteliális 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.



5. ábra Epiteliális-mezenchimális tranzíció folyamata. Az EMT során az epiteliális sejtek elveszítik sejtkapcsolataikat és apiko-bazális polaritásukat, átformálják citoskeletonjukat és megváltoztatják jelátviteli programjaikat. Mindezek hatására megnő a sejtek mobilitása, elősegítve az invazív fenotípus kialakulását [155]. Rövidítések: TJ= Tight Junction, AJ= Adherens Junction, DS= Dezmoszóma, HDS= Hemidezmoszóma

Az EMT indukciójában kulcsszerepet játszó gének közé tartoznak a Snail transzkripció represszor fehérje család tagjai (Snai1 és Snai2, 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 epiteliális markergének expresszióját (E-cadherin, claudin 1-7 (CLDN1-7) és zonula occludens 1 (ZO-1, más néven TJP1)) és az epitél sejtek közötti szoros sejt-kapcsolatok 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 [156] (2. táblázat).

Normál epiteliális sejtekben a β -catenin a citoplazmában található, és az E-cadherinhez, illetve rajta keresztül az aktin-citoszkeletonhoz kötődik. Az EMT-indukáló transzkripciós faktorok aktiválódásával (Snail, Slug, ZEB1) gátlódik a CDH1 gén (E-cadherin) transzkripciója. A csökkent E-cadherin fehérje expresszió, és az adhézios kapcsolatok instabilitása során a β -catenin nem lokalizálódik a membránhoz, a szabad β -catenin a WNT jelátviteli út aktivációjától függően vagy degradálódik (WNT nem aktív), vagy a sejtmagba jutva felhalmozódik, és számos invazív viselkedéshez kapcsolódó gén, többek közt a vimentin, vagy a fibronectin transzkripcióját szabályozza [157].

Az EMT során a sejtek átszervezik kortikális aktin citoszkeletonjukat egy olyan struktúrává, amely lehetővé teszi a dinamikus sejtmegnyúlást és az irányított mozgást. Az újonnan képződő, aktinban gazdag membránnyúlványok elősegítik a sejtek mozgását [158].

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 mozgékonytását és az invazív tulajdonságok megszerzését [159], [160]. Kimutatták, hogy a ZEB1 transzkripciós faktor genetikai kiütése jelentősen csökkentette a PDAC tumorok metasztatikus képességét [161].

Szöveti mikroarray vizsgálatok kimutatták az E-cadherin expressziójának részleges vagy teljes hiányát PDAC-ban, az E-cadherin csökkent expressziója a betegség rosszabb kimenetelével volt összefüggésben [162].

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.

2. Táblázat Az epitheliális-mezenchimális tranzíció folyamatában kulcsfontosságú szerepet játszó markerek, transzkripciós faktorok és jelátviteli útvonalak [163], [164], [165]

Kategória	Gén / Fehérje	Funkció / Változás EMT során
Epitheliális markerek (↓)	CDH1 (E-cadherin)	Sejt-sejt adhézió; expressziója csökken
	OCLN (Occludin)	Tight junction komponens; expresszió csökken
	CLDN1–CLDN7 (Claudinok)	Tight junction komponensek; expresszió csökken
	TJP1 (ZO-1)	Tight junction adapter fehérje; diszlokáció, csökkenés
	MUC1	Sejtfelszíni glikoprotein; csökken
Mezenchimális markerek (↑)	CDH2 (N-cadherin)	Sejtmozgás elősegítése; fokozódik
	VIM (Vimentin)	Intermediér filamentum; fokozódik
	FN1 (Fibronectin)	ECM fehérje; nő az expressziója
	ACTA2 (α -SMA)	Kontraktilis fehérje; gyakori miofibroblasztokban
Transzkripciós faktorok (↑)	SNAI1 (Snail)	E-cadherin represszió, EMT indukció
	SNAI2 (Slug)	Hasonló mint a Snail, EMT-promóter
	ZEB1, ZEB2	Epitheliális gén represszió; mezenchimális gének aktiválása
	TWIST1, TWIST2	EMT szabályozása, invazivitás fokozása
Jelátviteli útvonalak (↑)	TGF- β (TGFB1, TGFB2)	EMT fő indukálója; SMAD-mediált transzkripció
	WNT/ β -catenin	β -catenin nukleáris akkumuláció; EMT támogatása
	NOTCH	EMT elősegítése differenciálás közben
	PI3K/AKT	Sejttúlélés, EMT aktiválása
	MAPK/ERK	Migráció, túlélés, EMT-promóció
ECM lebontó enzimek (↑)	MMP2, MMP9	Mátrix metalloproteinázok – ECM bontás, invázió támogatása
	LOX	ECM átalakítása, stabilitás növelése

3.9.3. Oxidatív/nitrozatív stressz

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 transzkripció faktor áll [166]. Az NRF2 központi szabályozó molekulája a humán antioxidáns válaszoknak [167]. 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 mitokondriumban az elektrontranszportláncához kötötten termelődnek reaktív intermedierek (ROS, reaktív oxigén formák). A ROS termelődést az oxidatív foszforiláció során az elektrontranszportláncból egy elektron szivárgása okozza, melynek következtében egy elsődleges szabadgyök, a szuperoxid-anion ($O_2 + e^- \rightarrow \cdot O_2^-$) keletkezik [168]. További ROS molekulák a hidroxil-gyök ($\cdot OH$), a peroxil-gyök ($ROO\cdot$), továbbá a párosítatlan elektronnal nem rendelkező, de rendkívül erős oxidáló tulajdonságú hidrogén-peroxid (H_2O_2). A reaktív nitrogén intermedierek (RNI) magukba foglalják a nitrogén-monoxid (NO), valamint a nitrogén-monoxid és szuperoxid-anion reakciójában keletkező, nagy reakciókészséggel bíró peroxinitritet ($ONOO^-$) [169], [170].

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 [171]. Számos betegséget összefüggésbe hoztak már az oxidatív stresszel, többek között a hipertenziót, asztmát, cukorbetegséget, de a neoplasztikus betegségeket is [172], [173], [174].

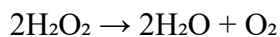
Számos védekező mechanizmus működik antioxidánsok formájában, melyek védik a mitokondriumokat a prooxidáns molekulák káros hatásaitól, a szabadgyökös folyamatok terminálásával. A fontosabb antioxidáns enzimek: szuperoxid-dizmutázok (SOD), kataláz (CAT), glutation-peroxidáz (GPX), tioredoxin-peroxidáz (TRXP). További fontos nem enzimikus antioxidáns molekula a glutation (GSH), N-acetil-cisztein (NAC), nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH) és a koenzim Q (ubikinon), valamint az exogén vitaminok: A, C és E vitamin [175], [176].

A szuperoxid gyökök biológiai rendszerekben betöltött szerepéhez Fridovich 1968-ban a Cu,Zn-SOD enzimről tett kulcsfontosságú tudományos felfedezése szolgált alapul [177]. Az

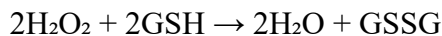
SOD enzim két szuperoxidgyök diszmutációját katalizálja hidrogén-peroxiddá (H₂O₂) és molekuláris oxigénné. [178].



A kataláz elsősorban a H₂O₂ diszmutációjának folyamatában játszik fontos szerepet, mely során az enzim hem porfirin vázának vassal alkotott komplexe oxidálódik vas (III)-ról vas (IV)-re, majd egy újabb hidrogén-peroxid molekulával történő reakcióban redukálódik vissza. A két lépéses reakcióban végül két mól hidrogén-peroxidból két mól víz és molekuláris oxigén keletkezik [179], [180].



A keletkezett hidrogén-peroxidot a katalázon kívül egy másik antioxidáns enzim, a glutation-peroxidáz (GPX) is képes vízzé redukálni a glutation (GSH) segítségével, melyet a glutation reduktáz enzim (GR) regenerál.



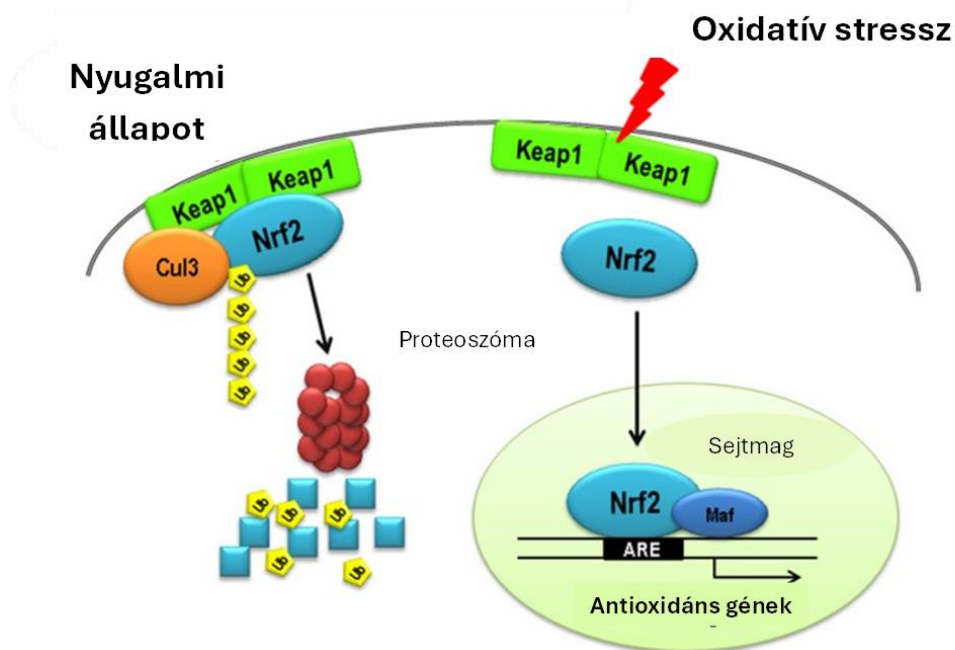
Az oxidatív vagy nitrozatív stressz olyan állapot, amely során egyensúlyzavar lép fel a ROS/RNI és az antioxidánsok termelésében. Ez akkor fordul elő, amikor a káros szabadgyökök szintje meghaladja a sejt védekező mechanizmusainak képességét, hogy semlegesítse őket, mindez sejtkárosodást, gyulladást és egyéb kóros állapotokat eredményezhet [181].

Az oxidatív vagy nitrozatív stressz folyamatában megemelkedett koncentrációjú szabadgyökökkel szemben a sejt különböző lipidkomponensei közül a többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA) mutatják a legnagyobb érzékenységet. A PUFA oxidációja hidroperoxidok és endoperoxidok képződéséhez vezet, amelyek további bomlási folyamatokban reaktív intermedierek keletkezését eredményezhetik, ilyenek a malondialdehid (MDA) és a 4-hidroxinonenál (4HNE) [182]. Az MDA és 4HNE jó biomarkerkei a lipidperoxidációs folyamatoknak, ezáltal az oxidatív stressznek is [183], [184] Az oxidatív stressz egy másik jól követhető markere az NO termeléséért felelős indukálható nitrogén-oxid-szintáz (iNOS) enzim kifejeződése. PDAC-ban az iNOS emelkedett expressziója a betegek rosszabb túlélésével korrelál [185].

Számos tanulmány bizonyítja az oxidatív stressz és az NRF2 rendkívül fontos szerepét a daganatok kialakulásában és progressziójában, így a hasnyálmirigy-daganatban is [186].

A daganatos sejtekben felborul a redox homeosztázis [137], ami szoros összefüggést mutat az NRF2 működésével (6. ábra). 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 a transzkripcióját. A KEAP1 egy Kelch-domént tartalmazó fehérje, amely a CUL3 ubiquitin-ligáz komplex részeként felelős az NRF2 proteosómában történő lebontásáért. A KEAP1 cink-ujj doménekkel rendelkezik, amelyek érzékenyek az oxidatív és elektrofil stresszre. A szabadgyökök általi oxidációs reakciók hatására a KEAP1 fehérjében konformációs változások következnek be, melyek hatására az NRF2 és KEAP1 közötti kölcsönhatás felbomlik, ezáltal aktiválódik az NRF2. Az NRF2 a sejtmagba transzlokálódik a nukleáris lokalizációs szignálok segítségével, ahol az ARE (antioxidáns válaszselem) szekvenciához kötődik a targetgének promóter régiójában, elindítva azok transzkripcióját. Ilyen antioxidáns target gén például a NAD(P)H kinon oxidoreduktáz 1 (NQO1), a hem-oxigenáz 1 (HO-1), a glutation-peroxidáz (GPX) és a kataláz (CAT) [187].



6. ábra Az NRF2 és a KEAP1 kapcsolata. Nyugalmi állapotban az NRF2 sejtmagba való transzlokációja gátolt a KEAP1 fehérje által. Oxidatív stressz hatására az NRF2 felszabadul a KEAP1 gátlása alól és elkezdődik a sejtmagban a NRF2 targetgénjeinek a transzkripciója [187].

Rövidítések: Nrf2 (nukleáris faktor, eritroid 2-kapcsolt faktor2) Keap1 (Kelch-like ECH-kapcsolt protein 1), Cul3 (Cullin 3), Ub (Ubiquitin), Maf (Musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog), ARE (Antioxidáns válasz szabályozó elem)

A PDAC és az oxidatív stressz kapcsolatát vizsgáló tanulmányokban kimutatták, hogy a sebészileg eltávolított humán hasnyálmirigy szövetben megemelkedett a nukleáris NRF2 expressziója és csökkent az E-cadherin expresszió a normál hasnyálmirigy ductus hámsejtekhez képest [188]. A hasnyálmirigyre specifikus K-RAS expresszió az NRF2 aktivációján keresztül fokozza a daganatos sejtek proliferációját [189] [190]. A K-RAS mutációval rendelkező PDAC esetében gyakran megfigyelhető az NRF2 útvonal rendellenes aktivációja, amely hozzájárul a daganat progressziójához [191]. Emiatt az NRF2 potenciális célpont lehet új terápiás stratégiák kidolgozására PDAC-ban.

3.9.4. Óssejtszerűség

A normál őssejtek embrionális szövetekben, felnőtt és magzati szövetekben is megtalálhatók, például a csontvelőben (csontvelői őssejtek BMSC), zsírban (zsírszövetből származó őssejtek ADSC), vérben (hematopoetikus őssejtek HSC), magzatvízben (magzatvízből származó őssejtek AFSC), köldökzsinórban (köldökzsinór őssejtek UCSC). Az őssejtek egy olyan osztályát képezik a differenciálatlan sejteknek, amelyek nagyfokú önmegújulási és proliferációs képességgel rendelkeznek, valamint egy vagy több irányban képesek differenciálódni. A totipotens őssejtek (például egyetlen megtermékenyített petesejt) több mint 250 sejttypussá képesek fejlődni az emberi vagy állati élet során [192].

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 [193].

A daganat őssejtek önmegújulásra képesek, szimmetrikus vagy aszimmetrikus sejtosztódáson mennek keresztül [194]. Számos daganattípusban meghatároztak már CSC-markereket, hogy azonosítsák és izolálják a daganat őssejt populációkat [195]. A kutatásokban membránglikoproteineket alkalmaznak (CD44, CD24, CD133) többek között a hasnyálmirigy-daganat őssejtek [196], vagy a máj daganat őssejtek [197] azonosítására. További tanulmányok bizonyítják, hogy az aldehid-dehidrogenáz 1 enzim (ALDH1) alkalmazható a hasnyálmirigy-daganat őssejtek [198], de más CSC populációk azonosítására is, mivel a retinol retinsavvá történő oxidációjában betöltött szerepe révén hozzájárul az őssejtek korai differenciálódásához.

A daganat őssejtek a hasnyálmirigyrákban [196] központi szerepet játszanak a gyógyszerrezisztencia kialakulásában, az agresszivitásban és a metasztázisok kialakulásában is [199], [200].

A PDAC több lépésben alakul ki, amelyek magukba foglalják a hasnyálmirigy intraepiteliális neopláziákat (PanIN 1-3, alacsony-, közepes-, magas-fokozatú diszplázia), és végül invazív daganattá fejlődnek. Ilyen premalignus hasnyálmirigy elváltozásokban megállapították, hogy több CSC marker, mint például a CD24, CD44, expressziója emelkedett a magasabb fokozatú diszpláziákban [201].

A jelenleg elérhető gyógyszerek hatékonyak a daganattömeg nagy részének elpusztításában, de a CSC-eket érintetlenül hagyják, ami a tumor kiújulásához és áttétek kialakulásához vezet [193], [202]. Ezért nagy szükség van új módszerek kidolgozására az őssejt jelleg molekuláris mechanizmusának részletesebb megértésére a célzott terápia kidolgozásához.

3.9.5. Sejtmetabolizmus

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 [203]. 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 [204]. A metabolikus újraprogramozás kiemelkedően fontos a daganatsejtek túlélése és növekedése szempontjából [205]. A fokozott aerob glikolízis, a csökkent oxidatív foszforiláció és a fokozott tejsavszintézis folyamata valójában a rosszindulatú daganatok egyik jellemvonása [137].

A glikolízis a PDAC esetében elősegíti a daganatsejtek erőteljes növekedését, továbbá a glikolízis enzimjei és közti termékei részt vesznek a PDAC áttétképződésének szabályozásában is [206]. 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 [207], melyek onkogén útvonalakat aktiválhatnak, elősegítve a glikolízis enzimjeinek expresszióját [208]. A PDAC sejtekben jelentősen megnövekszik a mitokondriális DNS-mutációk száma, ami összefügg a csökkent oxigénfelhasználással és a fokozott glikolízissel [209]. PDAC sejtekben a ROS-termelést szabályozó NADPH oxidáz enzim (NOX) nélkülözhetetlen a glikolízis aktivitásának fenntartásához. A NOX enzim expressziójának gátlása PDAC sejtekben csökkentette a glükózfelvételt és a laktáttermelést, ami gátolta a daganat növekedését [210]. A K-RAS

mutációja szerepet játszik a PDAC sejtek glükózhasznosításában és az anabolikus anyagcsere szabályozásában is [211]. A K-RAS onkogén fokozza a glükóz felvételét a daganatsejtekben azáltal, hogy fokozza a glükóztranszporter 1 (GLUT1) expresszióját [191]. A c-Myc (cellular Myelocytomatosis oncogene) onkogén kulcsfontosságú szerepet játszik a PDAC sejtek glikolitikus fenotípusának kialakulásában [212]. A hipoxia és a HIF-1 α (hipoxia-indukált faktor 1 α) fokozzák a glikolitikus enzimek expresszióját [191]. PDAC sejtekben a hipoxia elősegíti a piruvát-dehidrogenáz kináz (PDK1), a laktát-dehidrogenáz A (LDHA), a piruvát-kináz izoenzim M2 (PKM2), glükóz-6-foszfát-izomeráz/autokrin motilitási faktor (PGI/AMF) és a hexokináz 2 (HK2) expresszióját [213]. A fokozott PDK1 expresszió elősegíti a sejtosztódást is az ERK1/2 és az EGFR jelátviteli utak felerősítésével [214], továbbá a megnövekedett PDK1 expresszió aktiválja az NF- κ B jelátvitelt is [215]. A glikolízis folyamatában fontos szerepet játszó enzim, a fruktóz-2,6-biszfoszfátáz 3-4 (PFKFB3-4), hipoxia vagy HIF-1 α hatására magas szinten expresszálódik különböző daganattípusokban, így a hasnyálmirigyekben is [216].

Az anyagcsere átprogramozása hozzájárul a malignus daganatok, így a hasnyálmirigy-daganat [217] esetében is a gyógyszerrezisztencia kialakulásához. A PDAC sejtek metabolikus sajátosságainak és energiaháztartásának megértése segíthet új kezelési stratégiák kidolgozásában a gyógyszerrezisztencia leküzdésére.

4. 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 a 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.

5. Anyagok és módszerek

5.1. 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 [10]. 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) $G_{\text{S}\alpha}$ -szelektív antagonistá [218], CINPA1 (cat # 5605) konstitutív androsztán receptor (CAR) antagonistá [219], DY268 (cat # 5656) farnezoid X receptor (FXR) antagonistá [220] és GSK2033 (cat # 5694) máj X receptor (LXR) antagonistá [221] 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 [222] 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.

5.2. Sejtvonalak és sejtenyésztés

A Capan-2 és PancTu-1 K-RAS mutáns, illetve a BxPC-3 K-RAS vad típusú humán hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtvonalakat az American Type Culture Collection-től (ATCC) vásároltuk.

A Capan-2 sejteket MEM (cat # M8042; Sigma-Aldrich) médiumban 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, az Innoprotól (Derio, Edificio 502, Primera Planta, Spain) rendeltük. A 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.

5.3. Sejtéletképességi vizsgálat (MTT)

Az MTT assay egy színreakción alapuló in vitro módszer, amely a metabolikusan aktív sejtek mitokondriális enzimeinek működése révén méri a sejtek életképességét. 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, Walthman, MA, USA).

5.4. Szulforodamin B teszt

Az SRB módszer egy színelapú kvantitatív sejtvizsgálat, amely a sejtekhez kötődő festék révén méri a sejtek teljes fehérjetartalmát, így tükrözve azok számát és proliferációját, így a sejtek proliferációjának tanulmányozására szulforodamin B (SRB, cat # 230162; Sigma-Aldrich) festést alkalmaztunk. A vizsgálathoz a Capan-2 sejteket 96 lyukú lemezen (3000 sejt/lyuk) tenyésztettük 200 µl sejtenyészítő 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.

5.5. A sejthalál kimutatása

Az Annexin V és propidium-jodid (PI) alapú sejthalálvizsgálat lényege, hogy az Annexin V a korai apoptózis során a sejtfelületre került foszfatidilszerinhez kötődik, míg a PI csak a membránkárosodott, késő apoptotikus vagy nekrotikus sejtekbe jut be, így lehetővé téve a sejthalál különböző fázisainak megkülönböztetését, így 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).

5.6. Sejtinváziós kísérlet

A Corning Matrigel inváziós kamrában végzett sejtinváziós kísérlet, a sejtek képességét vizsgálja a mesterséges extracelluláris mátrixon (Matrigel) való áthatolásra, modellezve a sejtek invazív potenciálját például daganatmetasztázis során. 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) szérumentes médiumban egy éjszakán át tenyésztettük. Másnap a sejteket LCA-val (0,03 µM) vagy UDCA-val (0,3 µM) kezeltük 0,5 ml szérumentes 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 fixáltuk, 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:

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

5.7. Western blot

A Western blot egy fehérjedetektáló módszer, amely során a gélelektroforézissel elválasztott fehérjéket membránra visszük át, majd specifikus antitestek segítségével azonosítjuk a célfehérjét. A sejtlízishez 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) spektrofotométerrel mértük. A fehérjéket (20 µg fehérje/zseb) 10%-os SDS poliakrilamid gélelektroforézissel elválasztottuk, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk. 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 (3. táblázat)

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 -aktint használtuk normalizálásra.

3. táblázat A kísérletek során alkalmazott antitestek és azok hígítási aránya

Antitest	Forgalmazó	Katalógusszám	Klonalitás	Hígítás
β -Catenin	Cell Signaling Technology	8480	Monoklonális	1:1000
Snail	Cell Signaling Technology	3879	Monoklonális	1:1000
Claudin-1	Cell Signaling Technology	13255	Monoklonális	1:1000
ZO-1	Cell Signaling Technology	8193	Monoklonális	1:1000
NRF2	Abcam	ab31163	Poliklonális	1:1000
iNOS	Novus Biologicals	NB300-605	Poliklonális	1:1000
4-HNE	Abcam	ab46545	Poliklonális	1:1000
Nitrotirozin	Thermo Fisher Scientific	A21285	Poliklonális	1:1000
ALDH1	Abcam	ab227948	Poliklonális	1:1000
CD133	Novus Biologicals	NB120-16518SS	Poliklonális	1:1000
β -aktin	Sigma-Aldrich	A3854	Monoklonális	1:20000
Slug	Cell Signaling Technology	C19G7	Monoklonális	1:1000
Vimentin	Cell Signaling Technology	5741	Monoklonális	1:1000
E-cadherin	Cell Signaling Technology	3195	Monoklonális	1:1000

5.8. Aldefluor assay

Az Aldefluor assay egy in vitro fluoreszcenciaalapú sejtvizsgálati módszer, amelyet elsősorban az őssejtek és daganatőssejtek azonosítására használnak, mivel ezekben a sejtekben gyakran magas az aldehid-dehidrogenáz (ALDH) enzim aktivitása. Az ALDH1, az enzim család

egy specifikus izoformája, gyakran használják őket őssejtmarkerként, mivel ezek expressziója jellemző daganatőssejtekben és normál őssejtekben is. Az ALDH1 3tumor őssejt marker gén aktivitását az epesavakkal kezelt sejtekben Aldefluor festéssel (cat # 01700; StemCell Technologies, Vancouver, Kanada) határoztuk meg [102]. 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 dietilamino-benzaldehiddel (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.

5.9. RNS izolálás, reverz transzkripció és kvantitatív RT-PCR

A génexpresszió pontos quantifikálására 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 enzimmel (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 (4. táblázat) 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.

4. táblázat Az RT-qPCR kísérletekben alkalmazott humán primer párok

Gén neve	Forward primer (5'–3')	Reverz primer (5'–3')
<i>TGR5</i>	CACTGTTGTCCTCCTCTCC	ACACTGCTTTGGCTGCTTG
<i>FXR</i>	TGCTTACAGCAATTGTTATCCTG	ACATCAAGAAGTGGCTCCTGA
<i>VDR</i>	GGACTGCCGCATCACCAA	TCATCTCCCGCTTCCTCT
<i>36B4</i>	CCATTGAAATCCTGAGTGATGTG	GTCGAACACCTGCTGGATGAC
<i>CYCLO</i>	GTCTCCTTTGAGCTGTTTGCAGAC	CTTGCCACCAGTGCCATTATG

5.10. 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.

5.11. Géncsendesítés

A tranziens transzfekcióhoz mely során egy lipid alapú reagenssel juttatjuk az siRNS-t a sejtekbe, amely célzottan gátolja a kívánt gén expresszióját, 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.

5.12. Mitokondriális membránpotenciál mérése

A DiOC6 (3,3'-Dihexyloxacarbocyanine iodide) festéssel végzett mitokondriális membránpotenciál mérés során a lipofil, potenciálfüggő festék felhalmozódik az ép mitokondriumokban, így fluoreszcenciaintenzitása arányos a membránpotenciállal. Munkám során a mitokondriális membránpotenciál mérésére DioC6 (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.

5.13. Statisztikai elemzések

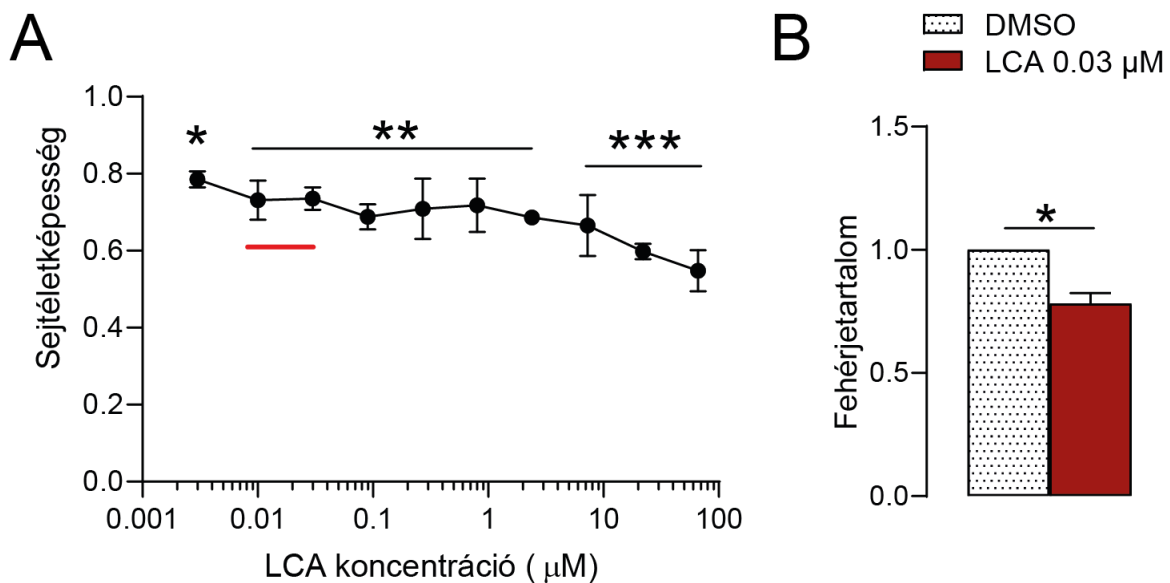
A statisztikai elemzéshez GraphPad Prism 8.0.1 szoftvert használtunk. Az eredményeket átlag \pm SEM formában tüntettük fel. A normál eloszlást a D'Agostino–Pearson normalitás teszt segítségével ellenőriztük. Az epesavval és a vehikulummal kezelt minták összehasonlítására párosított t-próbát alkalmaztunk. 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.

6. Eredmények

6.1. A litokólsav hatásainak vizsgálata hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben

6.1.1. 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 , [223], [224]) szignifikánsan csökkentette a Capan-2 sejtek életképességét (7. A ábra). Hasonlóan az MTT vizsgálathoz, szulfurodamin B festést alkalmazva azt találtuk, hogy az LCA 0,03 μM koncentrációban lassította a Capan-2 sejtek proliferációját (7. B ábra). Fontos kiemelni, hogy az LCA ebben a vizsgált koncentrációtartományban (0,01 μM –10 μM) nem befolyásolta a nem transzformált, humán primer fibroblasztok proliferációját [223], amiből arra következtettünk, hogy az LCA hatásai PDAC tumorsejt specifikusak.



7. ábra Az LCA kezelés csökkenti a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtek proliferációját.

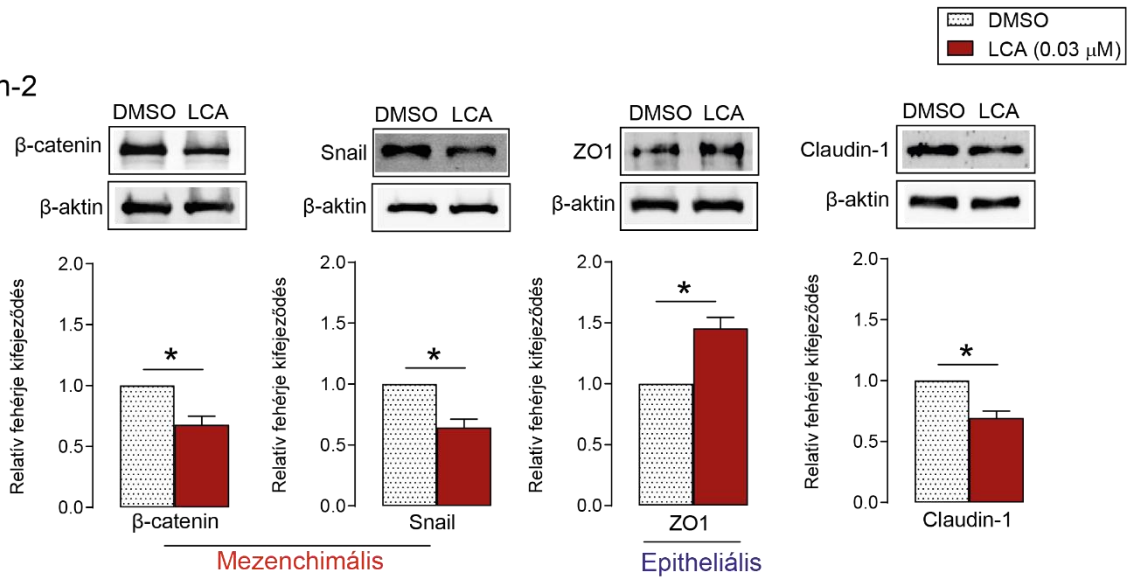
A Capan-2 sejteket LCA-val kezeltük a feltüntetett koncentrációkban 48 órán keresztül. (A) A sejtek életképességét MTT- teszttel (n = 3), és (B) az összfehérje tartalmat SRB festéssel határoztuk meg (n = 3). Az adatok átlag ± SEM formában vannak feltüntetve. A statisztikai analízist a sejtvitalitás vizsgálatnál egyutas ANOVA és Dunnett post-hoc teszt alkalmazásával végeztük el, ahol az LCA-val kezelt mintákat hasonlítottuk össze a DMSO kontroll mintával. A fehérje tartalmat az LCA-val kezelt és DMSO kontroll minták között párosított t-próbával hasonlítottuk össze. A *, ** és *** statisztikai szignifikanciát mutat a LCA kezelt és a kontroll minták között, ahol $p < 0,05$, $p < 0,01$ és $p < 0,001$. Az ábrán a piros vonal az LCA humán szérum referencia koncentráció tartományát jelzi (0,01–0,03 μM). Rövidítések: DMSO- dimetil- szulfoxid; LCA- litokólsav

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

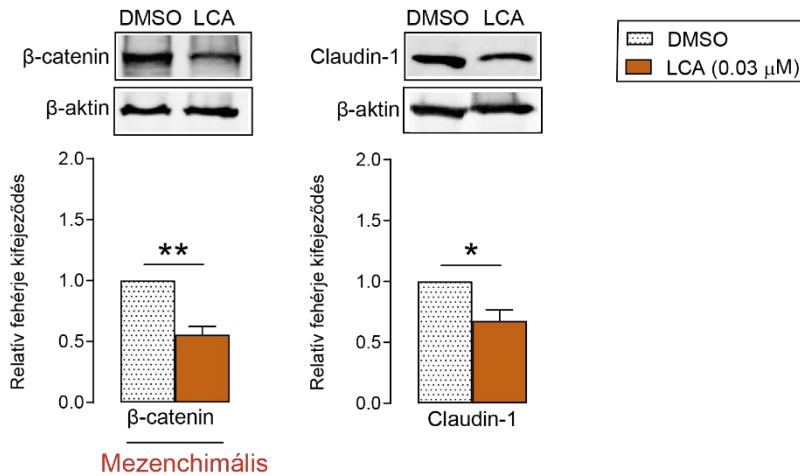
A továbbiakban arra voltunk kíváncsiak, hogy az LCA képes-e befolyásolni az EMT folyamatát. Eredményeink azt mutatták, hogy LCA szignifikánsan csökkentette az EMT folyamatában résztvevő mezenchimális markerek kifejeződését, a Snail fehérje szintjét a Capan-2 sejtekben és a β -catenin fehérje kifejeződését a Capan-2 és BxPC-3 sejtekben. Az epiteliális ZO1 tight junction markerfehérje szintje emelkedett a Capan-2 sejtekben az LCA kezelés hatására (8. A ábra). 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 (8.B ábra). 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.

A

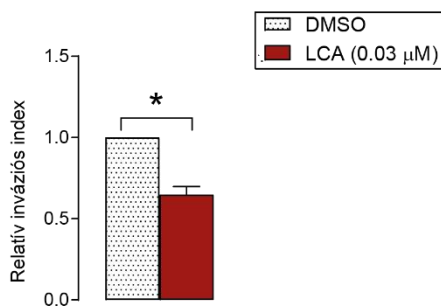
Capan-2



BxPC-3



B



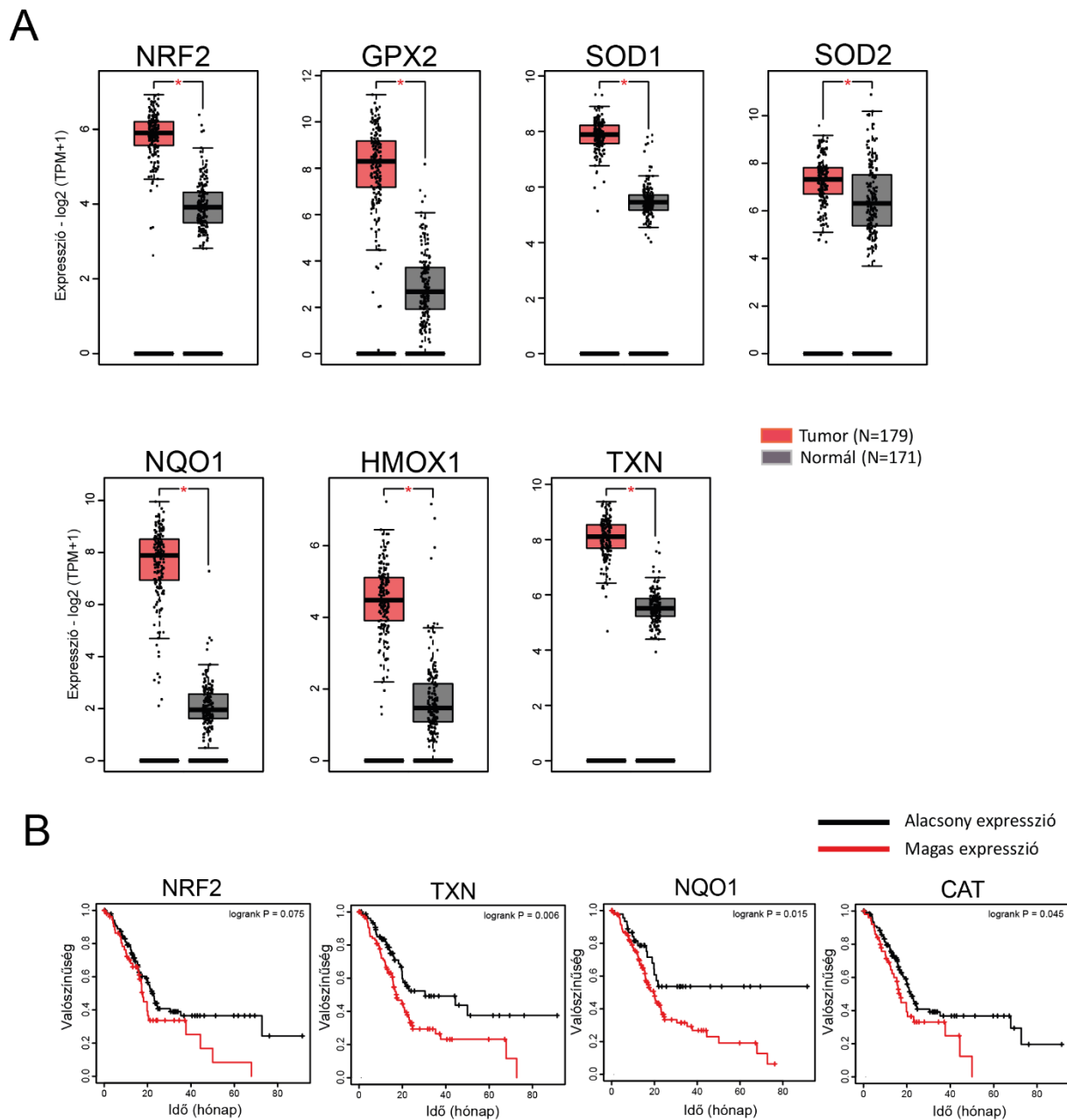
8. ábra Az LCA csökkenti az EMT markerek expresszióját és a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtek inváziós képességét. A Capan-2 és BxPC-3 sejteket LCA-val (0,03 μM) és DMSO-val (0,001%) kezeltük 48 órán keresztül. (A) Az EMT folyamatában szerepet játszó markerek (mezenchimális: β-catenin, Snail; epitheliális: ZO1, Claudin-1) fehérje szintjét Western blot technika segítségével határoztunk meg. Az ábrákon egy reprezentatív eredmény és három független kísérlet (n=3) denzitometriás értékelése van feltüntetve. (B) A Capan-2 sejtek inváziós kapacitását Matrigel

inváziós kamrában vizsgáltuk és inváziós indexet számoltunk ($n = 3$). Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve. A * és ** szimbólumok a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik az LCA kezelt és kontroll minták között, ahol $p < 0,05$ és $p < 0,01$.

Rövidítések: DMSO- dimetil-szulfoxid; LCA- litokólsav; ZO1- zonula occludens 1

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

Megvizsgáltuk néhány antioxidáns enzim és detoxifikáló hatású gén (NRF2, GPX2, SOD1/2, NQO1, HMOX1, TXN) expressziós szintjét a TCGA/GTEX hasnyálmirigy adenokarcinóma (PAAD) adatbázisból származó 179 tumor és 171 normál szövetmintában. Érdekes módon az antioxidáns, detoxifikáló hatású gének expressziója emelkedett a pankreász adenokarcinómában a normál szövethez képest (9. A ábra). Továbbá azt találtuk, hogy a magas antioxidáns expresszió a betegek rosszabb túlélésével társult (9. B ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a magas antioxidáns kifejeződés a hasnyálmirigy adenokarcinóma egyik fontos jellemzője, mely ronthatja a betegség kimenetelét.



9. ábra A hasnyálmirigy adenokarcinóma daganatok overexpresszálják az antioxidáns géneket, a csökkent antioxidáns szint a hasnyálmirigy adenokarcinómás betegek jobb túlélésével korrelál. (A) A boxplot ábrázolás az antioxidáns és NRF2 célgének expresszióját mutatja hasnyálmirigy adenokarcinómában és normál szövetben. Az expressziós szintek \log_2 (TPM+1) skálán vannak bemutatva. A képek a Gene Expression Profiling Interactive Analysis online adatbázisból (<http://gepia.cancer-pku.cn>) 2023. május 11-én lekért adatokból származnak. Pirossal a tumorminták, szürkével pedig a normál szövetek vannak jelölve. (B) A Kaplan–Meier (KM) görbék a teljes túlélésre vonatkozóan a Kaplan–Meier plotter adatbázisból (www.kmplot.com) származnak. Az eredmények az

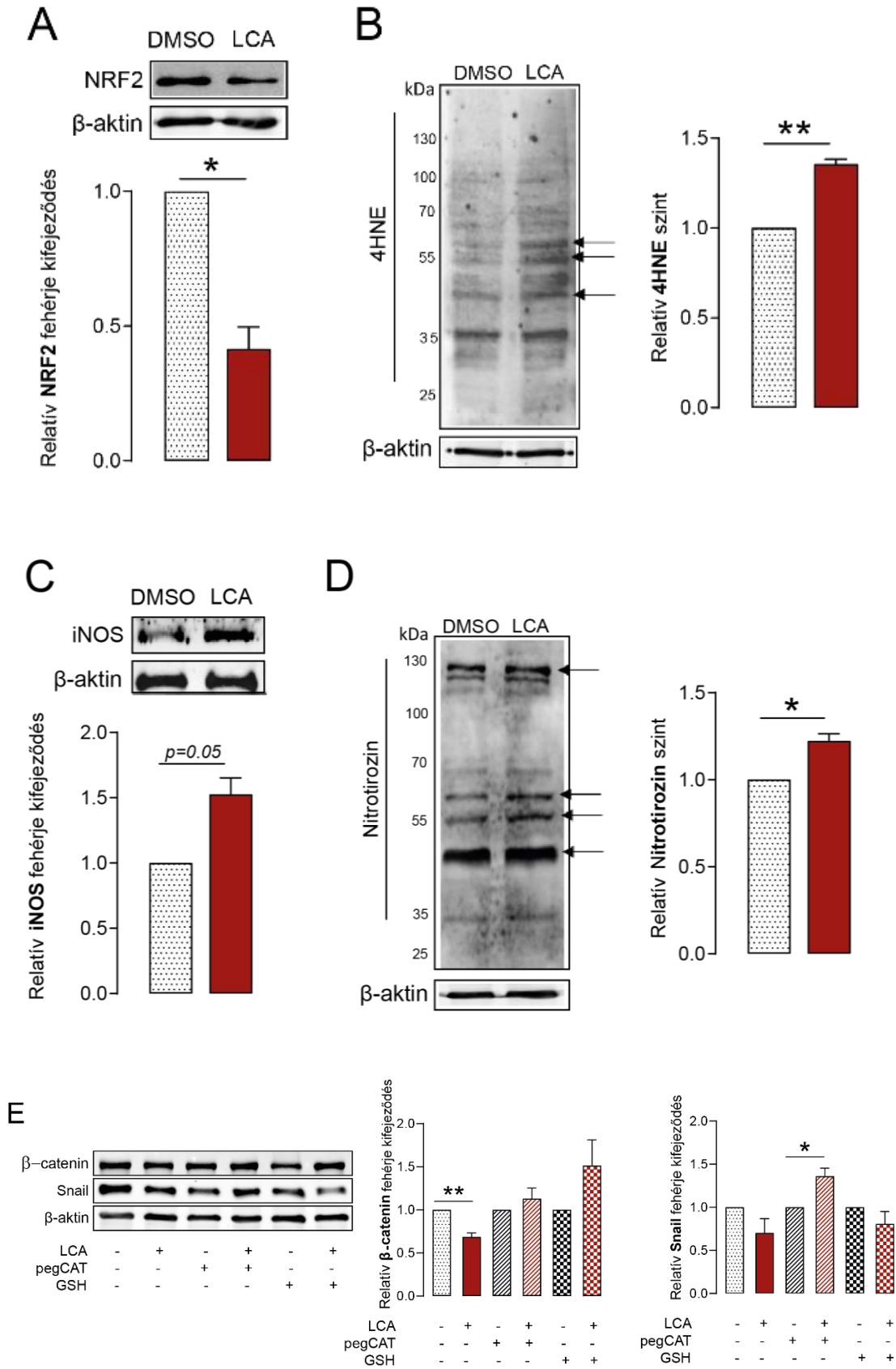
adatbázisból 2023. január 30-án lettek lekérve. Az ábrán a piros vonal a magas, a fekete vonal az alacsony expressziós szintet mutatja.

A * szimbólum statisztikailag szignifikáns különbséget jelent a tumor és a normál minták között, ahol $p < 0,05$.

Rövidítések: CAT- kataláz; GPX2- glutation-peroxidáz 2; HMOX1- hem oxigenáz 1; NQO1- NAD(P)H kinon-oxidoreduktáz 1; NRF2- nukleáris faktor, eritroid 2-kapcsolt faktor 2; SOD1,2- szuperoxid-diszmutáz 1,2; TXN- tioredoxin

6.1.4. 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 [12]. 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 (10. A ábra), hasonlóan az emlődaganatos sejtekhez. A 4HNE fehérje adduktok szintje emelkedett az LCA kezelést követően, ami fokozott lipidperoxidációt jelez (10. B ábra). Továbbá az LCA kezelés fokozta az iNOS fehérje expresszióját (10. C ábra), 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 (10. D ábra). 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 (10. E ábra).



10. ábra. Az LCA által indukált oxidatív/nitrozatív stressz hozzájárul az EMT marker gének csökkent expressziójához a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben. A Capan-2

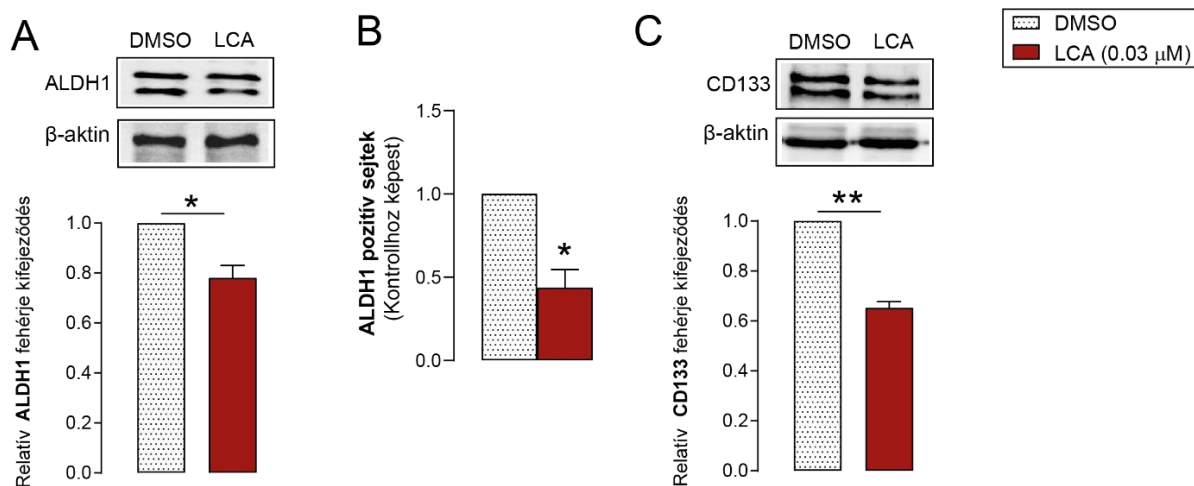
sejteket LCA-val (0,03 μ M) kezeltük 48 órán keresztül, és az (A) NRF2, (B) 4HNE, (C) iNOS és (D) nitro-tirozin fehérje szintjét vizsgáltuk meg a kezelés hatására Western blot technikával. Az ábrákon reprezentatív Western blot eredmények és három független (n=3) kísérlet denzitometriás elemzése látható. (E) A Capan-2 sejtekben LCA (0,03 μ M) és/vagy GSH és pegCAT kezelést követően a β -catenin és Snail fehérje kifejeződését vizsgáltuk (n = 3, a bal oldali panel reprezentatív Western blot eredmény, a jobb oldali panelek független kísérletek denzitometriás analízisét mutatják).

A nyilak a denzitometriás elemzésnél figyelembe vett sávokat jelzik. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve. A * és ** szimbólumok a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a kontroll (DMSO-val kezelt) és LCA- kezelt csoportok között, ahol $p < 0,05$ és $p < 0,01$.

Rövidítések: 4HNE- 4-hidroxinonenal; DMSO- dimetil-szulfoxid; GSH- glutation; iNOS- indukálható nitrogén-oxid szintáz; LCA- litokólsav; NRF2- nukleáris faktor, eritroid2-kapcsolt faktor 2; pegCAT- pegilált kataláz

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

A továbbiakban vizsgáltuk az LCA hatását az őssejtszerűsége, néhány őssejtmarker kifejeződésén keresztül. Az LCA szignifikánsan csökkentette az aldehid-dehidrogenáz 1 (ALDH1) fehérje szintjét (11. A ábra) és az ALDH-pozitív Capan-2 sejtek számát (11. B ábra). Ezzel összhangban a CD133 fehérje expressziója is csökkent az LCA kezelést követően (11. C ábra). Ezek az eredmények összességében azt mutatják, hogy az LCA csökkentheti a daganatos őssejtek arányát a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtek között.



11. ábra Az LCA csökkenti az ALDH1 és CD133 fehérje kifejeződését a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben. A Capan-2 sejteket LCA-val (0,03 μM) és DMSO-val kezeltük 48 órán keresztül. (A) Az ALDH1 fehérje expresszióját Western blot módszerrel mértük (n = 3). (B) Az ALDH-pozitív sejtek arányát Aldefluor festést követően áramlási citometriával határoztuk meg (n = 3, triplikátumokban). (C) A CD133 fehérje szintjét Western blot módszerrel detektáltuk (n = 3). Az adatok átlag ± SEM formában vannak feltüntetve. A * szimbólum statisztikailag szignifikáns különbséget jelez a kontroll (DMSO-val kezelt) és LCA-val kezelt csoportok között, ahol $p < 0,05$.

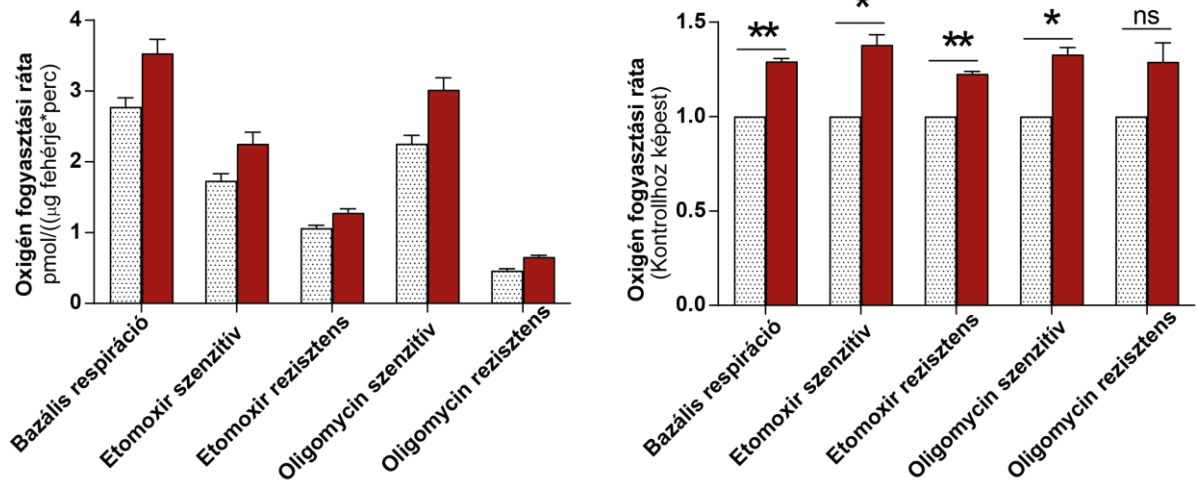
Rövidítések: ALDH1- aldehyd-dehidrogenáz 1; DMSO- dimetil-szulfoxid; LCA- litokólsav

6.1.6. Az LCA mitokondriális oxidatív foszforilációt indukál a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben

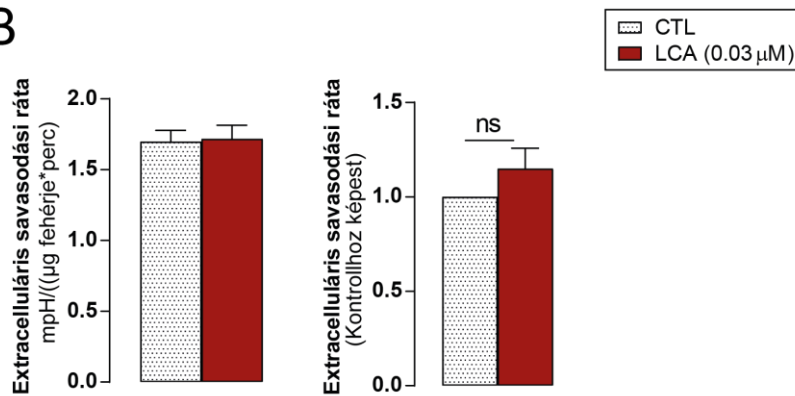
Az LCA-val kezelt Capan-2 sejtek metabolikus változásainak a meghatározásához Seahorse XF96 analízátort alkalmaztunk. A műszer egyidejűleg méri az oxigén fogyasztás mértékét (OCR- oxygen consumption rate), ami a mitokondriális respirációt jelenti és az extracelluláris savasodás mértékét (ECAR- extracellular 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 (12. A ábra). Az LCA kezelés nem befolyásolta szignifikánsan a mitokondriális oxidáció oligomycin-rezisztens frakcióját, amely az ATP-hez nem kapcsolt légzésnek felel meg (12. A ábra). Továbbá az LCA nem befolyásolta a glikolízis folyamatát (ECAR) a Capan-2 sejtekben. (12. B ábra).

Ezen eredményekből arra következtethetünk, hogy az LCA kulcsfontosságú szerepet játszhat a mitokondriális oxidációban.

A



B



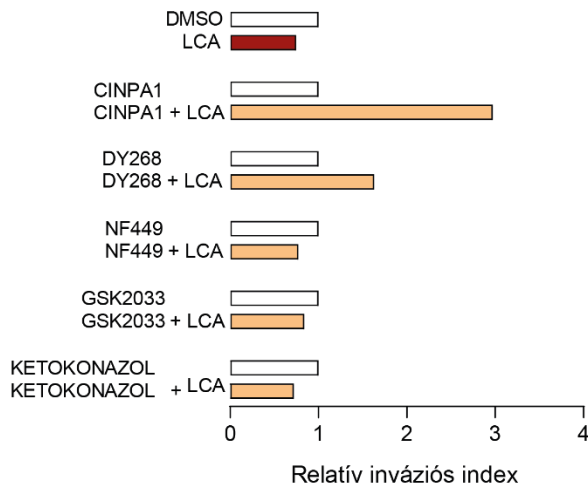
12. ábra Az LCA növeli a mitokondriális respirációt a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben. A mitokondriális oxigénfogyasztást és a glikolízist az LCA-val (0,03 μM) és DMSO-val kezelt Capan-2 sejtekben Seahorse XF96 készülékkel mértük. Az OCR (A) és ECAR (B) értékeket három független kísérlet eredményéből számoltuk (n = 3). Az A és B ábra első része reprezentatív eredményt mutat, az ábrák második fele független kísérletek (n = 3) fold change értékeit mutatja be. A * és ** szimbólum, statisztikailag szignifikáns különbséget jelent a kontroll (DMSO-val kezelt) és LCA-val kezelt csoportok között, ahol p < 0,05 és p < 0,01.

Rövidítések: DMSO- dimetil-szulfoxid; ECAR- extracelluláris savasodási ráta; LCA- litokólsav; ns- nem szignifikáns; OCR- oxigénfogyasztási ráta

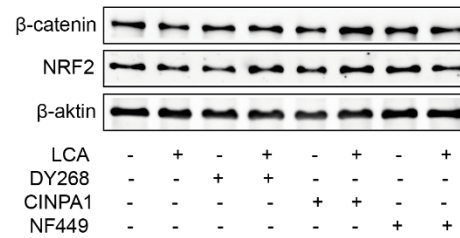
6.1.7. Az LCA által indukált hatások az FXR, CAR és VDR magreceptorokon keresztül valósulnak meg

Az epesavak aktiválhatnak magreceptorokat, mint az FXR [225], [226], CAR [12], PXR [227], LXR [228] és VDR [229], és membránreceptorokat is, például a TGR5 [10], [12], [230]. Az LCA által indukált hatásokért felelős receptorok meghatározásához először receptor antagonistákat és/vagy inhibitorokat 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 (13. A ábra). A DY268 és a CINPA1 gátolta az LCA által indukált β -catenin és NRF2 expresszió csökkenését (13. B ábra). Annak érdekében, hogy egy átfogóbb képet kapjunk, a receptorokat a Capan-2 sejtekben siRNS transzfekcióval csendesítettük (13. C ábra). 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 (13. D ábra). Ezen eredményekből arra következtethetünk, hogy az LCA által kiváltott hatások a CAR, FXR és VDR receptorokon keresztül közvetíthetnek a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben.

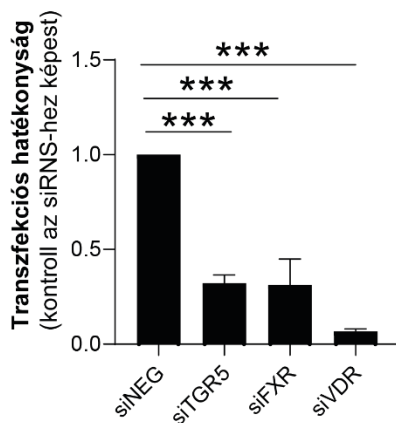
A



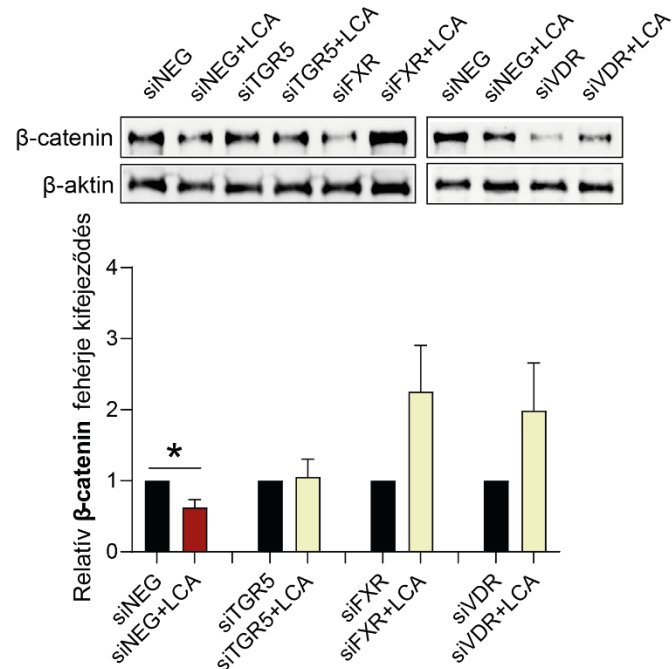
B



C



D



13. ábra Az LCA által indukált mezenchimális-epiteliális tranzíciót (MET) és az oxidatív stressz válaszokat a nukleáris receptorok, FXR, CAR és VDR közvetítik a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben. A Capan-2 sejteket DMSO-val, LCA-val (0,03 μ M) és/vagy 5 μ M CINPA1, DY268, NF449, GSK2033 és ketokonazollal kezeltük 48 órán keresztül. (A) A sejtinváziót Corning Matrigel inváziós kamrával tanulmányoztuk (n=1). (B) A β -catenin és NRF2 fehérje expresszióját Western blot módszerrel vizsgáltuk (representatív ábra). A TGR5, FXR és VDR epesav receptorokat a Capan-2 sejtekben siRNS technikával csendesítettük. A kontroll csoportot negatív kontroll siRNS-sel transzfektáltuk. (C) 48 óra elteltével a transzfekció hatékonyságát kvantitatív PCR-el, (D) a β -catenin expresszióját pedig Western blot technikával határoztuk meg (n = 3). Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve. A transzfekciós hatékonyság elemzésére egyutas ANOVA és

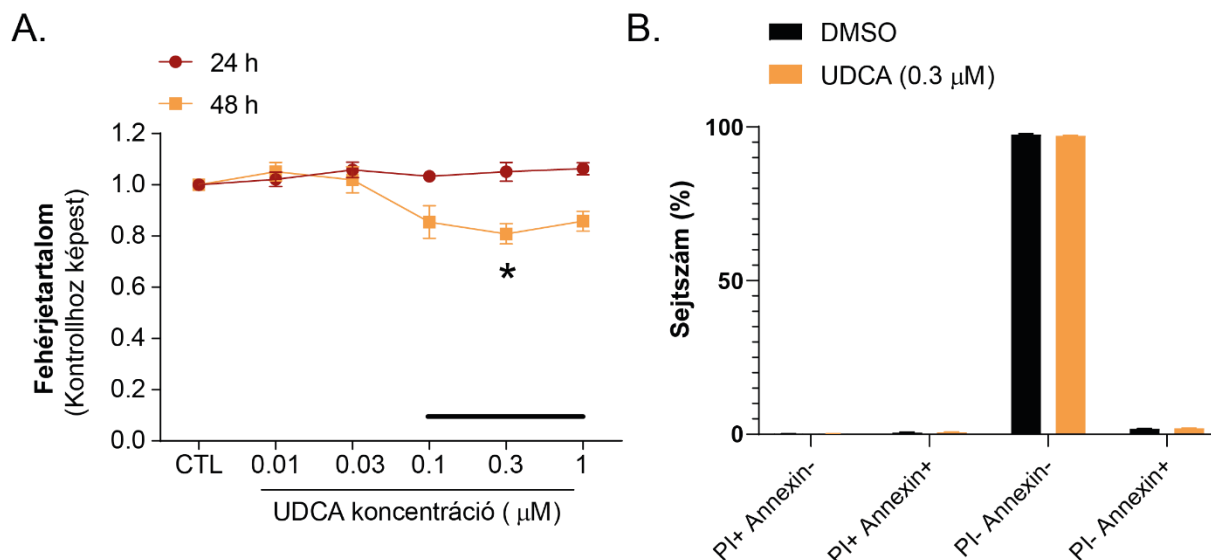
Dunnett post-hoc tesztet alkalmaztunk. A kontroll siRNS és LCA/siRNS kezelt csoportokat párosított t-próbával hasonlítottuk össze. A statisztikailag szignifikáns különbséget a *, ** és *** szimbólumok jelentik, ahol $p < 0,05$, $p < 0,01$ és $p < 0,001$.

Rövidítések: DMSO- dimetil-szulfoxid; FXR- farnezoid X receptor; LCA- litokólsav; NRF2- nukleáris faktor, eritroid 2-kapcsolt factor 2; TGR5- G-fehérje kapcsolt epesavreceptor; VDR–D-vitamin receptor

6.2. Az ursodezoxikólsav hatásainak tanulmányozása hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben

6.2.1. Az ursodezoxikólsav csökkenti a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtek proliferációját

A Capan-2 sejteket UDCA-val kezeltük különböző koncentrációban (0,01 μM , 0,03 μM , 0,1 μM , 0,3 μM és 1 μM), majd SRB festést végeztünk. Az UDCA koncentráció- és időfüggő módon csökkentette a Capan-2 sejtek proliferációját. Az UDCA sejtproliferációt csökkentő hatása a 0,3 μM koncentrációban volt szignifikáns, ami megfelel az UDCA normál humán szérumban mért koncentrációjának (14. A ábra). Ezen eredmények alapján a további kísérletekben az UDCA kezelést 0,3 μM -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 (14. B ábra).

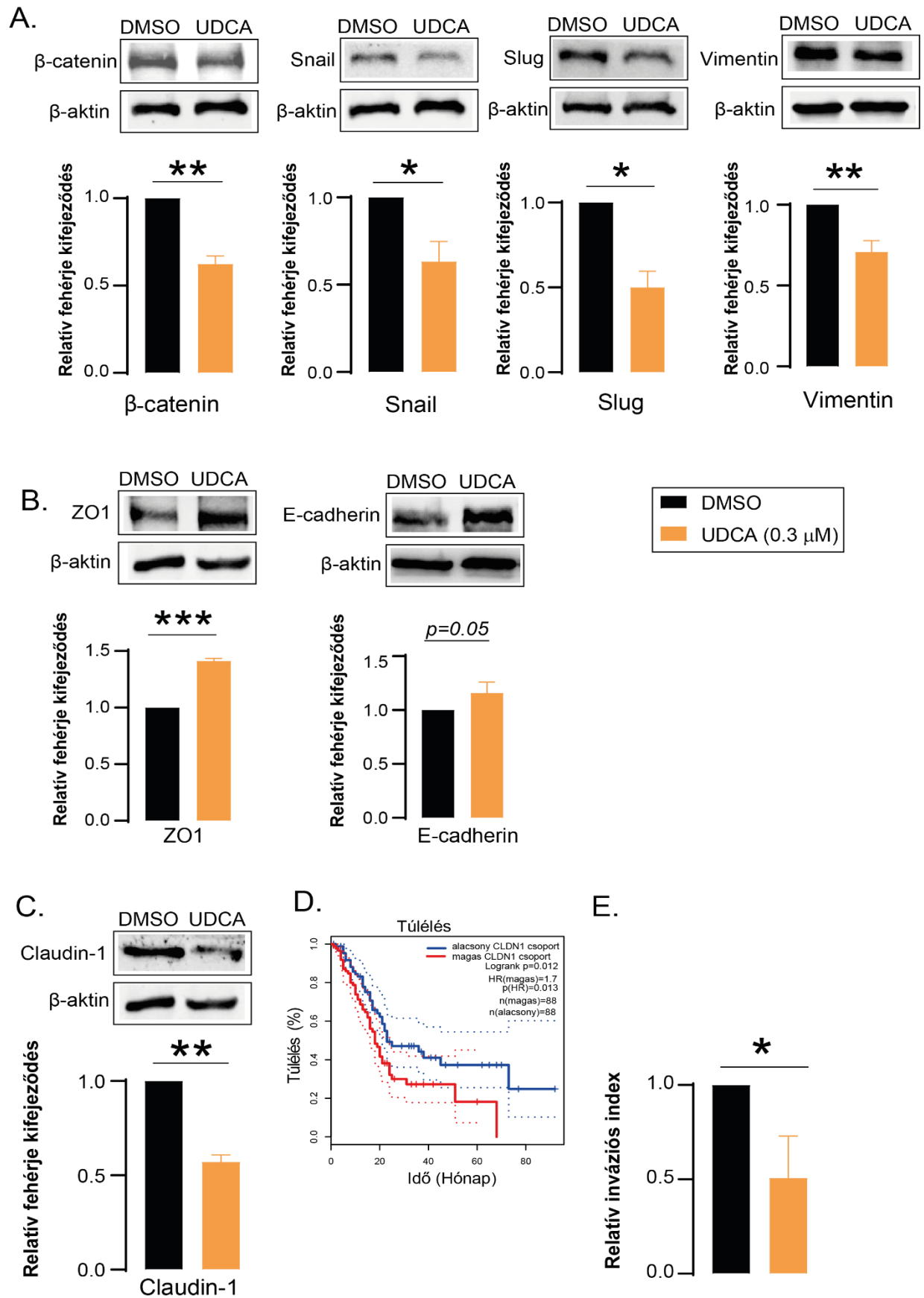


14. ábra. Az UDCA gátolja a Capan-2 sejtek proliferációját anélkül, hogy befolyásolná az apoptózist. (A) A Capan-2 sejteket (3000 sejt/lyuk) 96 lyukú lemezre raktuk és UDCA-val kezeltük az ábrán jelzett koncentrációkban és időintervallumban. Az összfehérje tartalmat SRB teszttel határoztuk meg (n=3), és a kísérleteket 3 technikai replikátum alkalmazásával végeztük. **(B)** A Capan-2 sejteket (150,000 sejt/lyuk) 6 lyukú lemezre raktuk és 48 órán keresztül UDCA-val (0,3 μM) kezeltük. A sejteket Annexin-FITC-PI Apoptózis kit segítségével festettük és áramlási citométerrel elemeztük (n = 3). Az SRB-vizsgálatban a statisztikai analízishez egyutas ANOVA, Dunnett post hoc tesztet alkalmaztunk, ahol az UDCA kezelt mintákat a DMSO - kontroll mintákhoz hasonlítottuk. Az ábrán a fekete vonal az UDCA humán szérumban mért referencia koncentrációtartományát jelzi. A * jelölés statisztikailag szignifikáns különbséget jelent a kontroll és UDCA-val kezelt csoport között, ahol $p < 0,05$.

Rövidítés: DMSO- dimetil-szulfoxid, PI- propidium-jodid, UDCA- ursodezoxikólsav.

6.2.2. Az ursodezoxikólsav gátolja az EMT folyamatát a Capan-2 sejtekben

Miután megállapítottuk, hogy az UDCA citosztaticus hatással bír a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekre, megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja a daganatok egyéb klasszikus tulajdonságait (cancer hallmarks) [231]. Kimutattuk, hogy az UDCA csökkenti az EMT folyamatában kulcsfontosságú mezenchimális fehérjék, β -catenin, Snail, Slug és Vimentin fehérje szintjét (15. A ábra), míg az epiteliális ZO1 és E-cadherin fehérje kifejeződése emelkedett (15. B ábra) az UDCA kezelés hatására. Érdekes módon az UDCA csökkentette a Claudin-1, tight junction fehérje szintjét (15. C ábra) az LCA hatásához hasonlóan. A Claudin-1 alacsony kifejeződése a hasnyálmirigy-adenokarcinómás betegek esetében a jobb túléléssel korrelál (15. D ábra). Az EMT-hez kapcsolódó gének csökkent kifejeződésével összhangban azt is megállapítottuk, hogy az UDCA csökkenti a Capan-2 sejtek invazivitását (15. E ábra).



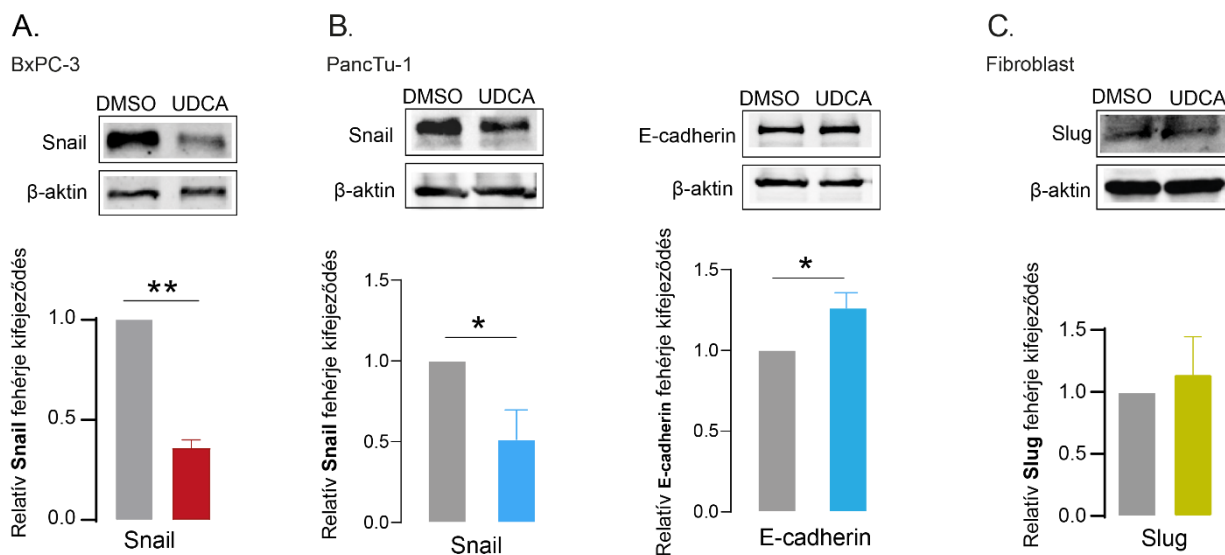
15. ábra Az UDCA gátolja az EMT folyamatát (A–C). A Capan-2 sejteket (150,000 sejt/lyuk) 6 lyukú lemezen tenyésztettük, majd 0,3 μM UDCA-val kezeltük 48 órán keresztül. A mezenchimális

markerek, (A) β -catenin, Snail, Slug és Vimentin, valamint (B) az epiteliális ZO1 és E-cadherin fehérje szintjét, és a (C) Claudin-1 expresszióját az UDCA kezelés hatására Western blot technikával vizsgáltuk meg (n = 3). Az ábrák felső részén reprezentatív Western blot eredmények, míg az ábra alsó részén a független kísérletek denzitometriás elemzése látható (n = 3) (D) A Claudin-1 expressziójának összefüggését a betegek túlélésével a GEPIA2 adatbázisból nyertük ki 2024. április 16-án. (E) A tumorsejtek invázióját Matrigel inváziós kamra segítségével tanulmányoztuk (n=3) az "Anyagok és módszerek" részben leírtak szerint. A statisztikai különbségeket t-tesztel értékeltük. A *, ** és *** szimbólumok a statisztikailag szignifikáns különbségeket jelzik a kontroll (DMSO-val kezelt) és UDCA-val kezelt csoportok között, a következők szerint: $p < 0,05$, $p < 0,01$ és $p < 0,001$.

Rövidítések: DMSO- dimetil-szulfoxid; UDCA- ursodezoxikólsav; ZO1- zona occludens 1; CLDN1-claudin-1

6.2.3. 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 (16. A és B ábra) fehérje szintjét mindkét vizsgált sejtvonalban, ugyanakkor szignifikánsan emelte az epiteliális E-cadherin fehérje kifejeződését a PancTu-1 sejtekben (16. B ábra), hasonlóan a Capan-2 sejteknél megfigyelt eredményeinkhez. Kísérleteinkben igazoltuk, hogy az UDCA-nak nincs hatása a mezenchimális Slug (16. C ábra) 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.



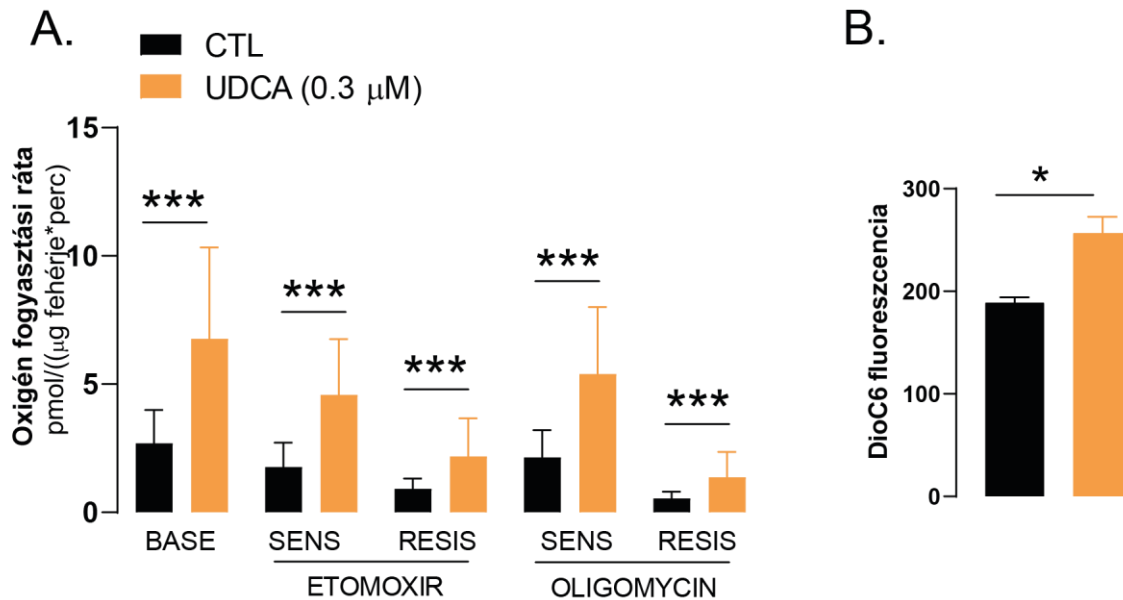
16. ábra Az UDCA hatásai más humán PDAC sejtvonalakban is megfigyelhetőek, ugyanakkor az UDCA nincs hatással a normál humán fibroblaszt sejtekre. A BxPC-3 (100,000 sejt/lyuk) és a PancTu-1 sejteket (150,000 sejt/lyuk), valamint a humán fibroblaszt sejteket (200,000 sejt/lyuk) 6 lyukú lemezre raktuk, majd a letapadásukat követően 0,3 μ M UDCA-val kezeltük 48 órán keresztül. A (A,B) Snail, (B) E-cadherin, (C) Slug fehérje szintjét Western blot módszerrel detektáltuk (n = 3). Az ábrák reprezentatív eredményeket és három független kísérletből származó eredmények denzitometriás értékelését tartalmazzák. Az adatok átlag \pm SEM formában vannak feltüntetve. A statisztikai különbségeket t-tesztel értékeltük. A * és ** szimbólumok statisztikailag szignifikáns különbséget jelölnek a kontroll és az UDCA-val kezelt csoportok között, ahol $p < 0,05$ és $p < 0,01$

Rövidítések: DMSO- dimetil-szulfoxid; UDCA- ursodezoxikólsav

6.2.4. Az ursodezoxikólsav mitokondriális aktivitást indukál

A sejtek anyagcseréjében bekövetkező változások a daganatok egyik jellegzetessége, egy úgynevezett „cancer hallmark” [232], [233]. Kíváncsiak voltunk arra is, hogy az UDCA befolyásolja-e a mitokondriális respirációt. Seahorse analízis segítségével vizsgáltuk az UDCA hatását a mitokondriális oxidációra Capan-2 sejteken. 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 (17. A ábra). Az UDCA DioC6 fluoreszcenciát indukál, ami a

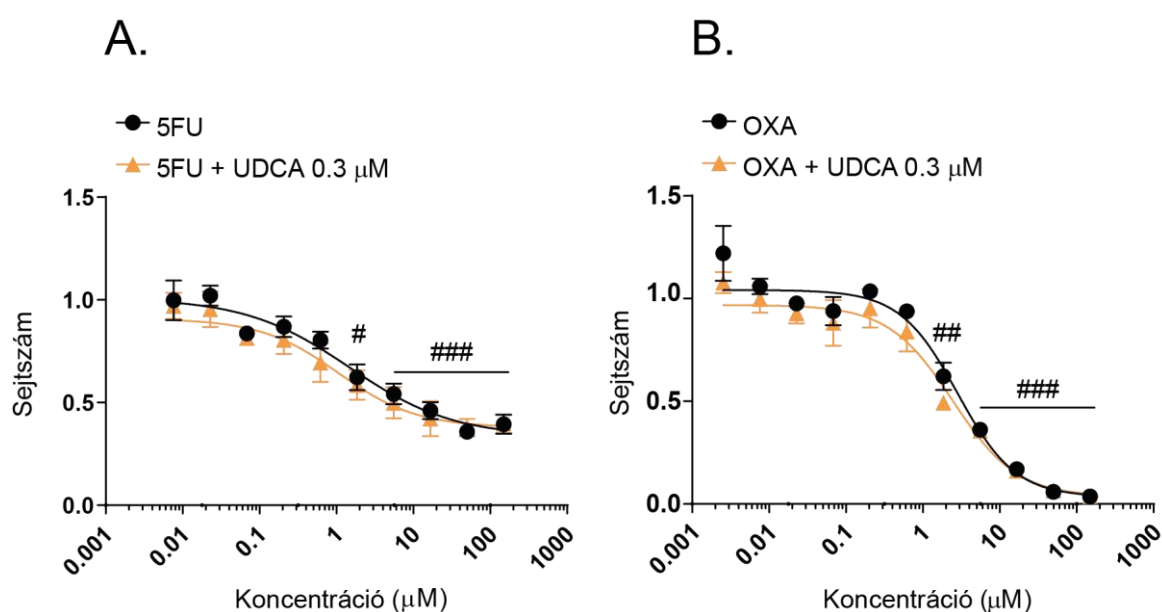
mitokondriális membránpotenciál növekedésére utal (17. B ábra). Ez a megfigyelés a sejthalál indukciójának hiányával együtt egy jobban összekapcsolt mitokondriális rendszerre utal.



17. ábra Az UDCA mitokondriális aktivitást indukál. (A) Capan-2 sejteket (5000 sejt/lyuk) Seahorse lemezre raktuk és 0,3 μM UDCA-val kezeltük 48 órán keresztül, majd Seahorse analízist végeztünk (n=3 és 8 technikai replikátum) az „Anyagok és módszerek” című részben leírtak szerint. Az adatokat log2 transzformáltuk a normál eloszlás elérése érdekében. (B) A mitokondriális membránpotenciál mérésére DioC6 festést alkalmaztunk. A Capan-2 sejteket 6 lyukú lemezre raktuk és 48 órán keresztül UDCA-val és DMSO-val kezeltük. Ezután a sejteket DioC6-al (40 nM) 30 percen keresztül festettük, a fluoreszcenciát áramlási citometriával elemeztük (n=3). A statisztikai különbségeket t-teszttel értékeltük. A * és *** szimbólumok statisztikailag szignifikáns különbséget jelölnek a kontroll csoport és az UDCA-val kezelt csoportok között, ahol $p < 0,05$ és $p < 0,001$. Rövidítések: BASE- bazális légzés, CTL- kontroll, OCR- oxigénfogyasztási ráta, RESIS- rezisztens, SENS- érzékeny, UDCA- ursodezoxikólsav.

6.2.5. 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 [234], [235], [236]. Kísérleteinkben vizsgáltuk az UDCA és a hasnyálmirigy adenokarcinoma kezelésében alkalmazott néhány kemoterápiás szer kombinált hatását [237], [238]. Az 5-fluorouracilt (5FU) és az oxaliplatint (OXA) különböző koncentrációkban teszteltük önmagukban és UDCA-val (0,3 μM) kombinálva és vizsgáltuk, hogyan hatnak a kezelések a PDAC sejtekre [236]. Eredményeink azt mutatják, hogy az UDCA nem befolyásolta ezen terápiás szerek kinetikai tulajdonságait, az IC_{50} értéket és a Hill koefficienszt (kollaboratív kötődés vagy hatás) a Capan-2 sejtek proliferációjának modulálásában (18. ábra; 5. táblázat).



18. ábra. Az UDCA nem befolyásolja az 5FU és az OXA kemoterápiás gyógyszerek hatását. A Capan-2 sejteket (5000 sejt/lyuk) 96 lyukú lemezen tenyésztettük, majd 5FU és OXA terápiás szerekkel kezeltük önmagukban vagy UDCA-val (0.3 μM) kombinálva 48 órán keresztül. A kontroll minta DMSO kezelést (0,001%) kapott. A kezelés elteltével MTT vizsgálatot végeztünk (n=3 és 3 technikai replikátum). Az eredményeket a kontroll csoporthoz viszonyítva fejeztük ki. A statisztikai különbséget kétutas ANOVA teszt alkalmazásával, majd Tukey post hoc teszttel értékeltük. A #, ## és ### szimbólumok statisztikailag szignifikáns különbségeket jelölnek a kontroll minta és kemoterápiás szer jelzett koncentrációja között, ahol $p < 0,05$, $p < 0,01$ vagy $p < 0,001$.

Rövidítések: 5FU- 5-fluorouracil, OXA- oxaliplatin, UDCA- ursodezoxikólsav

5. táblázat A kemoterápiás szerek és a kemoterápiás szer/ UDCA kombinációk kinetikai értékei.

Kemoterápiás gyógyszer	Metabolit	IC₅₀ (±SD)	Hill-együttható (±SD)
5-fluorouracil	—	1,478 (±0,789)	0,643 (±0,049)
	UDCA	1,067 (±0,576)	0,854 (±0,312)
Oxaliplatin	—	2,839 (±0,513)	1,158 (±0,037)
	UDCA	2,450 (±0,579)	1,036 (±0,475)

7. Megbeszélés

7.1. 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. Az értekezésem alapjául szolgáló tanulmányban elsőként azonosítottuk a litokólsavat, egy daganatellenes aktivitással rendelkező bakteriális metabolitként a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben.

Érdekes módon az epesavakat korábbi tanulmányokban rákkeltő anyagoknak tekintették [239], [240]. Az epesavak karcinogenitásával kapcsolatos vizsgálatok elsősorban az elsődleges és a konjugált epesavak sejtkárosító és gyulladáskeltő hatásaira fókuszáltak. A legújabb ezirányú vizsgálatok kimutatták, hogy az epesavak daganatellenes hatásúak is lehetnek, és az epesavak pro- vagy antikarcinogén aktivitása a tényleges epesavfajtától és a daganat típusától függ. Hasnyálmirigy adenokarcinómában például a CDCA prokarcinogén tulajdonságokkal rendelkezik [241], a CA és az UDCA daganatellenes tulajdonságokkal bír [242], [243], míg a DCA keverthatással rendelkezik [95], [102], [241]. Az LCA daganatellenes tulajdonságait kimutatták a hasnyálmirigy adenokarcinómától eltérő neopláziákban is, beleértve az emlőrákot [10], [12], [109], neuroblasztómát [103], prosztatarákot [105], májrákot [108], epehólyagrákot [107] és a nephroblasztómát [106]. Ezek a hatások szelektívek a neopláziákra, mivel az LCA nem befolyásolja a nem transzformált sejteket [10]. Fontos felismerés, hogy a bélbaktériumok által termelt epesav-metabolitok, mint az LCA, nem csupán lokálisan a béltraktusban, hanem távolabbi szervek, például a máj vagy a hasnyálmirigy daganatsejtjeit is képes befolyásolni. Az LCA szerepének feltérképezése különösen fontos a hasnyálmirigy adenokarcinóma esetében, mivel ez a daganattípus rendkívül agresszív, rossz prognózisú, és jelenleg kevés hatékony terápiás célponttal rendelkezik. Ebből kifolyólag a mikrobiom által termelt, endogén kis molekulák, mint az LCA, potenciális daganatellenes szerként való azonosítása új lehetőségeket nyithat a betegség kezelési stratégiáiban.

Megjegyzendő, hogy az általunk végzett vizsgálatokban az LCA-t a humán szérumban mért nanomoláris koncentrációban alkalmaztuk, ami alacsonyabb a korábbi tanulmányokban alkalmazott LCA koncentrációknál, ami aspecifikus hatások kialakulásához is vezethet.

Az LCA antineoplasztikus hatása sokrétű a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben, 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 markerek (β -catenin és Snail) expresszióját, és emelte az epiteliális ZO1 marker kifejeződését. Érdekes módon 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 [244], [245]. Az EMT gátlásával összhangban az LCA csökkentette a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtek inváziós kapacitását és elősegítette az összejt-szerű tulajdonságok elvesztését. Fontos megjegyezni, hogy ezek az összejt-szerű tulajdonságok számos daganattípushoz kapcsolódnak, beleértve a hasnyálmirigy adenokarcinómát [246]. Az összejt-jellegű sejtek jelenléte a tumor heterogenitás, a terápiás rezisztencia és a kiújulás lehetőségének egyik fő biológiai alapja. Ezért az LCA ezen sejtpopulációkra gyakorolt hatása különösen értékes terápiás szempontból, mivel csökkentheti a daganat kiújulási képességét, és a kemoterápiára való rezisztenciát. A sejtek anyagcseréjének átrendeződése a daganatos sejtek egyik jellemzője [232]. 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 [247]. 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. Ez a jelenség különösen jelentős a tumorsejtek adaptív túlélési stratégiái szempontjából, mivel a daganatok gyakran hipoxiás, tápanyaghiányos mikrokörnyezetben fejlődnek. Az LCA által kiváltott oxidatív anyagcsere irányváltás a glikolízisfüggő tumorsejtek számára hátrányos feltételeket teremthet, amely csökkentheti a proliferációs képességüket. Ezek a sejtszintű folyamatok hozzájárulhatnak ahhoz, hogy az LCA anyagcsere-folyamatokon keresztül is kifejtsen daganatellenes hatását.

A sejtek redox-homeosztázisának befolyásolása az LCA daganatellenes hatásainak egyik fő oka [12]. Kimutattuk, hogy az LCA oxidatív-nitrozatív stresszt indukál a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtekben, azáltal, hogy csökkenti az NRF2 antioxidáns transzkripció faktor expresszióját, emeli az iNOS és a nitrotirozin fehérje szintjét, valamint lipidperoxidációt indukál. Az LCA okozta oxidatív stressz kulcsszerepet játszik az EMT folyamatának gátlásában PDAC sejtekben és más neopláziák sejtmodelljeiben a proliferáció csökkentésében [12] is. Az NRF2 karcinogén hatását hasnyálmirigy-daganatokban számos tanulmány bizonyítja [189],

[248]. Ezzel összhangban a ROS túltermelés a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtjeit fogékonytá teszi a sejthalálra [249]. A hasnyálmirigy adenokarcinóma progressziója gyakran egybeesik a Keap-1 fehérjét inaktiváló mutációkkal, melyek konstitutívan aktívvá teszik az NRF2-t [250]. A magas nukleáris NRF2 expresszió korrelál a hasnyálmirigy-daganatos betegek csökkent túlélési arányával [251]. Igazoltuk, hogy az antioxidánsok, köztük az NRF2 is, overexpresszálódnak a hasnyálmirigy adenokarcinómában, és a túlzott antioxidáns expresszió a betegség rosszabb klinikai kimenetelével jár. Eredményeink arra utalnak, hogy az LCA képes megbontani a tumorsejtek által kialakított antioxidáns védőmechanizmusokat, ezáltal érzékenyebbé téve a sejteket az oxidatív stressz által közvetített apoptotikus ingerekkel szemben. Ez különösen jelentős olyan tumorok esetében, ahol az NRF2-konstitutív aktivációja és a ROS-detoxikáló enzimek túlzott jelenléte fontos szerepet játszik a terápiarezisztencia kialakulásában. Mindezek alapján az NRF2- jelátvitel célzott modulálása, például olyan természetes vegyületek révén, mint az LCA ígéretes stratégiát jelenthet a hasnyálmirigy adenokarcinóma kezelésében, különösen olyan esetekben, ahol más terápiák hatékonyságát korlátozza a fokozott antioxidáns védelem.

Kísérleteinkben kimutattuk, hogy az LCA daganatellenes hatásait a hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtmodellekben a CAR, FXR és VDR nukleáris receptorok közvetítik. A VDR magas expresszióját kimutatták hasnyálmirigy-daganatos sejtekben [252] és a hasnyálmirigy-tumor sztrómában [253]. A VDR jelátvitel aktiválása javítja a hasnyálmirigy daganat terápiájának hatékonyságát és a klinikai kimenetelt [253], [254]. A VDR receptor szerepet játszik a hasnyálmirigy-daganat őssejt-szerű tulajdonságainak gátlásában [255] is. Az FXR hatásainak megértése nehezebb, mivel a magas FXR expresszióknak a sejtek túlélésére gyakorolt hatásai ellentmondásosak [256], [257]. Mivel a VDR és FXR ligandfüggő transzkripciós faktorokként működnek, aktivációjuk egyedi génexpressziós programokat képes elindítani, amelyek akár sejtspecifikusak is lehetnek. Különösen érdekes, hogy az LCA viszonylag alacsony affinitással, de nagy specificitással aktiválja a VDR-t, ami arra utal, hogy a litokólsav hatásai jól szabályozott receptor-mediált folyamatok eredménye lehet. A CAR receptor hatása hasnyálmirigy adenokarcinómában nem ismert. A CAR, mint xenobiotikum-érzékelő receptor, szerepet játszhat a sejtek metabolikus adaptációjában, valamint a gyógyszer-metabolizáló enzimek expressziójának szabályozásában, ami felveti annak lehetőségét, hogy az LCA fokozhatja a kemoterápia hatékonyságát a CAR-mediált útvonalak révén. Az epesavak számos receptort aktiválhatnak (lásd [258]), és hasonló útvonalak játszhatnak szerepet az LCA által közvetített daganatellenes folyamatok indukálásában más daganattípusokban is (pl.

vastagbélrák [229]), de más receptorok is aktiválódhatnak a különböző neopláziákban a citosztázis kiváltására (pl. TGR5 és CAR receptorok emlőrákban [12]).

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 [259], valamint hasnyálmirigy-gyulladásban az összes keringő epesavszint megemelkedett [261].

A konjugált epesavszintek (a legtöbb esetben glikokólsav) a hasnyálmirigy adenokarcinómában szenvedő betegek plazma- és szérummintáiban emelkednek a kontroll egyénekhez képest [262], [263]. A PDAC betegek plazmájában a nem konjugált epesavak szintje csökken [264]. Azonban a nem konjugált epesavak koncentrációja az epében (közös epevezetékben) (CBD) származó) emelkedett a PDAC-ban szenvedő betegeknél, a jóindulatú betegségben szenvedő egyénekhez 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 [265]. Az epesav koncentrációk az emberi szérumban segíthetnek megkülönböztetni a hasnyálmirigy adenokarcinómában szenvedő betegeket a jóindulatú betegségekben szenvedő betegektől és az egészséges egyénektől.

Bár a laboratóriumi modellrendszerek, mint a sejtvonalak hasznosak az LCA hatásmechanizmusának vizsgálatára, de nem tükrözik teljes mértékben a humán daganat heterogenitását, immunológiai környezetét és mikrobiom-összetételét, amelyek mind befolyásolhatják az epesavak biológiai aktivitását.

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 [258], így az LCA koncentrációjának kimutatása 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 patogeneziséhez [10]. A betegség előrehaladtával az LCA-által aktivált jelátviteli pályák expressziója is drasztikusan lecsökken. Vagyis nemcsak a bél mikrobiomjának bioszintetikus kapacitása csökken, ami a citosztatikus bakteriális metabolitok, mint az LCA, termelésének csökkénéséhez vezet, hanem a metabolitok indukálta citosztatikus szignalizáció is eltűnik a

daganatból. Mivel az LCA lokálisan és szisztémásan is képes receptor-mediált jelátviteli útvonalakat befolyásolni, annak hiánya vagy csökkent jelenléte felboríthatja a sejtek homeosztatisz egyensúlyát, különösen a redox, proliferációs és gyulladáshoz való válaszok terén. Ez a jelenség a hasnyálmirigy daganatok esetében is releváns lehet. Felvetődik tehát annak lehetősége, hogy a bélmikrobiom LCA-termelésének zavarai hozzájárulhatnak a PDAC patogeneziséhez.

7.2. Az ursodezoxikólsav hatásai hasnyálmirigy adenokarcinómában

Kísérleteinkben kimutattuk, hogy az UDCA bakteriális metabolit citosztatikus hatást fejt ki PDAC sejtmodellekben. Az UDCA jótékony hatását számos daganatban leírták, mint például a glioblasztóma [266], neuroblasztóma [267], PDAC [112], prosztaták [268], melanoma [269], hepatocelluláris karcinóma [270], [271], orális laphámkarcinóma [272], leukémia [273], gyomorrák [274], nyelöcsőrak [297] és vastagbélrák [278]. Fontos kiemelni, hogy ezen vizsgálatok nagy többségénél az UDCA-t szuprafiziológiás koncentrációban alkalmazták, amely 2-4 nagyságrenddel magasabb, mint az UDCA humán szérumban 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 [102], [223], [236], [279], [280]. A másodlagos epesavak nagy része képes befolyásolni a PDAC sejtek viselkedését (UDCA (az értekezés alapját szolgáló tanulmányban leírtak szerint és [96], DCA [102] és LCA [280], [281]) ellentétben más rosszindulatú daganatokkal, mint a petefészek- vagy emlőkarcinóma [231], [282] ahol csak egy-egy másodlagos epesav hatásos. Ez arra utalhat, hogy a PDAC sajátos epesav érzékenységgel rendelkezik, ami a daganat biológiájának eltérő szabályozottságára, illetve az epesav-receptorok (pl. FXR, TGR5) differenciált expressziójára vezethető vissza. E megfigyelés további kutatások alapját képezheti, különös tekintettel az epesav-mediált jelátviteli utak szerepére a hasnyálmirigy daganatok patogenezisében és terápiás célpontként való alkalmazhatóságukban.

Vizsgálatainkban kimutattuk, hogy az UDCA kezelés csökkentette az EMT-ben kulcsfontosságú mezenchimális markerek 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 PDAC sejtek inváziós képességét is. Ez az EMT-t gátló hatás különösen jelentős a PDAC szempontjából; a mezenchimális átmenet nemcsak a sejtek invazivitását és metasztatikus potenciálját növeli, hanem hozzájárul a kemoterápiás rezisztencia és a daganatos őssejtek fenntartásához is. Az UDCA hatására megfigyelt markerváltozások egy kevésbé agresszív fenotípus kialakulását támogatják, amely a terápiás válaszkészség szempontjából előnyös lehet.

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 [88], [102], [223], [280]. A mitokondriális metabolikus változások kulcsszerepet játszanak a daganatos őssejtek átprogramozásában [283], [284] is. Az UDCA az energiametabolizmus újraprogramozása révén nemcsak a proliferációs képességet csökkenti, hanem érzékenyebbé is teheti a sejteket a különböző terápiás beavatkozásokkal, például kemoterápiával szemben. Az OXPHOS fokozódása ráadásul a reaktív oxigéngyökök (ROS) szintjének emelkedéséhez is vezethet, amely fokozhatja az apoptotikus válaszreakciókat, tovább erősítve az UDCA daganatellenes hatását.

Vizsgáltuk azt is, hogy az UDCA befolyásolhatja-e a hasnyálmirigy adenokarcinóma kezelésében alkalmazott kemoterápiás szerek hatékonyságát. Az epesavak előnyösen kombinálhatók a daganatellenes szerekkel. Gyermekgyógyászati daganatos betegek kemoterápiás kezelése során megfigyelték, hogy a keringő epesavak szintjének emelkedése pozitív korrelációt mutatott a gyorsabb klinikai felépüléssel. A tauroursodezoxikólsav (TUDCA) étrendkiegészítőként való alkalmazása jobb gyógyulást eredményezett az 5-FU kezelés után az ER stresszválaszok gátlásával egerekben [285]. 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 [287], [288] 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 [289], [290] és 3) a bakteriális metabolitok befolyásolhatják a kemoterápiás szerek aktivitását, más daganat típusokban [102], [280], [291], [292] és PDAC-ban [234], [293].

Egyes bakteriális metabolitok, mint például az indol-származékok javítják a kemoterápia

eredményességét [234] és befolyásolják bizonyos kemoterápiás szerek, például az 5-fluorouracil, a doxorubicin és a paclitaxel aktivitását [236].

Az UDCA fokozta a DNS topoizomeráz I inhibitor által indukált apoptózist több daganatos sejtvonalban [294]. Az UDCA és a COX-2 inhibitor, celecoxib kombinációja csökkentette a vastagbélrákos sejtek növekedését [295]. Érdekes módon az UDCA szinergikus hatással van a szorafenib tumorelles aktivitására hepatocelluláris karcinóma sejtekben [291].

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 szuprafiziológias 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. Jövőbeli preklinikai és klinikai vizsgálatok szükségesek annak tisztázására, hogy az UDCA hosszú távú alkalmazása milyen mértékben képes befolyásolni a túlélést, a terápiás válaszkészséget és a tumorrekurencia kockázatát hasnyálmirigyrákban.

8. 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 referenciakonzentrációjának 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.

9. Summary

Numerous bacterial species live on the surface of the human body and in body cavities in symbiosis with the host organism. These bacteria can influence physiological processes of the host and contribute to the development of certain pathological conditions through the biosynthesis of various bacterial metabolites. Both external and internal factors - such as age, diet, hygiene, genetic factors, the immune system, and antibiotic use - can affect microbial composition. Dysbiosis of the gastrointestinal microbiome has been associated with several diseases, including pancreatic cancer. The gut microbiome produces small-molecule metabolites that can inhibit the progression of distant tumors through hormone-like effects.

In this study, we demonstrated that the secondary bile acid LCA, produced by gut bacteria, possesses antitumor properties in pancreatic adenocarcinoma cells. LCA inhibits tumor cell proliferation, the epithelial-mesenchymal transition (EMT), the expression of cancer stem cell markers, and stimulates mitochondrial oxidative phosphorylation. LCA induces oxidative/nitrosative stress, which forms the basis of its antitumor effects. The effects induced by LCA in pancreatic adenocarcinoma cells are mediated through the CAR, FXR, and VDR nuclear receptors. Our results suggest that LCA is a non-toxic compound with antineoplastic properties and highlight the pharmacological potential of nuclear receptors activated by LCA. Furthermore, in this study, we also showed that another secondary bile acid produced by gut bacteria, UDCA, exhibits cytostatic properties in pancreatic adenocarcinoma cell models. UDCA, at concentrations corresponding to human serum reference levels, reduced the proliferation of PDAC cells, inhibited the EMT process, and induced mitochondrial oxidation. UDCA did not affect the efficacy of chemotherapeutic agents used in the treatment of pancreatic adenocarcinoma.

Our findings support the notion that bacterial metabolites play a significant role in tumor progression. Our investigations confirmed that not all bile acids are effective across different tumor types, and even the same bile acid can have different effects, likely due to differences in the receptor repertoires of the tumors.

Understanding the precise role of bacterial metabolites raises the possibility of using these compounds in the fight against cancer. The identified metabolite receptors may serve as new drug targets, and the identification of bacterial patterns that produce these metabolites offers promising new biomarkers for early detection and prognosis.

10. Irodalomjegyzék

- [1] F. Bray *et al.*, 'Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries', *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 74, no. 3, pp. 229–263, May 2024, doi: 10.3322/caac.21834.
- [2] X. Chen, F. Liu, Q. Xue, X. Weng, and F. Xu, 'Metastatic pancreatic cancer: Mechanisms and detection', *Oncol. Rep.*, vol. 46, no. 5, Nov. 2021, doi: 10.3892/OR.2021.8182.
- [3] C. Springfield *et al.*, 'Chemotherapy for pancreatic cancer', *Presse Médicale*, vol. 48, no. 3, pp. e159–e174, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.lpm.2019.02.025.
- [4] R. K. Singh *et al.*, 'Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health', *J. Transl. Med.*, vol. 15, no. 1, p. 73, Dec. 2017, doi: 10.1186/s12967-017-1175-y.
- [5] Y. Fan and O. Pedersen, 'Gut microbiota in human metabolic health and disease', *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 19, no. 1, pp. 55–71, Jan. 2021, doi: 10.1038/s41579-020-0433-9.
- [6] R. Sender, S. Fuchs, and R. Milo, 'Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body', *PLOS Biol.*, vol. 14, no. 8, p. e1002533, Aug. 2016, doi: 10.1371/journal.pbio.1002533.
- [7] S. V. Lynch and O. Pedersen, 'The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease', *N. Engl. J. Med.*, vol. 375, no. 24, pp. 2369–2379, Dec. 2016, doi: 10.1056/NEJMra1600266.
- [8] B. Kiss *et al.*, 'Oncobiosis and Microbial Metabolite Signaling in Pancreatic Adenocarcinoma', *Cancers*, vol. 12, no. 5, p. 1068, Apr. 2020, doi: 10.3390/cancers12051068.
- [9] G. D. Sepich-Poore, L. Zitvogel, R. Straussman, J. Hasty, J. A. Wargo, and R. Knight, 'The microbiome and human cancer', *Science*, vol. 371, no. 6536, p. eabc4552, Mar. 2021, doi: 10.1126/science.abc4552.
- [10] E. Mikó *et al.*, 'Lithocholic acid, a bacterial metabolite reduces breast cancer cell proliferation and aggressiveness', *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, vol. 1859, no. 9, pp. 958–974, 2018, doi: 10.1016/j.bbabbio.2018.04.002.
- [11] T. Kovács *et al.*, 'Cadaverine, a metabolite of the microbiome, reduces breast cancer aggressiveness through trace amino acid receptors', *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–14, 2019, doi: 10.1038/s41598-018-37664-7.
- [12] P. Kovács *et al.*, 'Lithocholic Acid, a Metabolite of the Microbiome, Increases Oxidative Stress in Breast Cancer', *Cancers*, vol. 11, no. 9, Sep. 2019, doi: 10.3390/CANCERS11091255.
- [13] J. J. Farrell *et al.*, 'Variations of oral microbiota are associated with pancreatic diseases including pancreatic cancer', *Gut*, vol. 61, no. 4, pp. 582–588, Apr. 2012, doi: 10.1136/gutjnl-2011-300784.
- [14] Q.-X. Mei, C.-L. Huang, S.-Z. Luo, X.-M. Zhang, Y. Zeng, and Y.-Y. Lu, 'Characterization of the duodenal bacterial microbiota in patients with pancreatic head cancer vs. healthy controls', *Pancreatology*, vol. 18, no. 4, pp. 438–445, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.pan.2018.03.005.

- [15] M.-Y. Wei *et al.*, 'The microbiota and microbiome in pancreatic cancer: more influential than expected', *Mol. Cancer*, vol. 18, no. 1, p. 97, Dec. 2019, doi: 10.1186/s12943-019-1008-0.
- [16] C. P. Zambirinis, S. Pushalkar, D. Saxena, and G. Miller, 'Pancreatic Cancer, Inflammation, and Microbiome', *Cancer J.*, vol. 20, no. 3, pp. 195–202, May 2014, doi: 10.1097/PPO.0000000000000045.
- [17] B. Aykut *et al.*, 'The fungal mycobiome promotes pancreatic oncogenesis via activation of MBL', *Nature*, vol. 574, no. 7777, pp. 264–267, Oct. 2019, doi: 10.1038/s41586-019-1608-2.
- [18] P. Li, Y. Shu, and Y. Gu, 'The potential role of bacteria in pancreatic cancer: a systematic review', *Carcinogenesis*, vol. 41, no. 4, pp. 397–404, Jun. 2020, doi: 10.1093/carcin/bgaa013.
- [19] D. Pagliari *et al.*, 'Gut Microbiota-Immune System Crosstalk and Pancreatic Disorders', *Mediators Inflamm.*, vol. 2018, pp. 1–13, 2018, doi: 10.1155/2018/7946431.
- [20] E. Mikó *et al.*, 'Microbiome—Microbial Metabolome—Cancer Cell Interactions in Breast Cancer—Familiar, but Unexplored', *Cells*, vol. 8, no. 4, p. 293, Mar. 2019, doi: 10.3390/cells8040293.
- [21] J. M. Ridlon and J. S. Bajaj, 'The human gut sterolbiome: bile acid-microbiome endocrine aspects and therapeutics', *Acta Pharm. Sin. B*, vol. 5, no. 2, pp. 99–105, Mar. 2015, doi: 10.1016/j.apsb.2015.01.006.
- [22] L. D. Wood, M. I. Canto, E. M. Jaffee, and D. M. Simeone, 'Pancreatic Cancer: Pathogenesis, Screening, Diagnosis, and Treatment', *Gastroenterology*, vol. 163, no. 2, pp. 386–402.e1, Aug. 2022, doi: 10.1053/j.gastro.2022.03.056.
- [23] T. P. Yeo, 'Demographics, Epidemiology, and Inheritance of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma', *Semin. Oncol.*, vol. 42, no. 1, pp. 8–18, Feb. 2015, doi: 10.1053/j.seminoncol.2014.12.002.
- [24] J. M. Shields, K. Pruitt, A. McFall, A. Shaub, and C. J. Der, 'Understanding Ras: "it ain't over 'til it's over"', *Trends Cell Biol.*, vol. 10, no. 4, pp. 147–154, Apr. 2000, doi: 10.1016/S0962-8924(00)01740-2.
- [25] E. Del Poggetto *et al.*, 'Epithelial memory of inflammation limits tissue damage while promoting pancreatic tumorigenesis', *Science*, vol. 373, no. 6561, p. eabj0486, Sep. 2021, doi: 10.1126/science.abj0486.
- [26] S. Jones *et al.*, 'Core Signaling Pathways in Human Pancreatic Cancers Revealed by Global Genomic Analyses', *Science*, vol. 321, no. 5897, pp. 1801–1806, Sep. 2008, doi: 10.1126/science.1164368.
- [27] S. Y. G. Friedlander *et al.*, 'Context-Dependent Transformation of Adult Pancreatic Cells by Oncogenic K-Ras', *Cancer Cell*, vol. 16, no. 5, pp. 379–389, Nov. 2009, doi: 10.1016/j.ccr.2009.09.027.
- [28] W. Hartwig, J. Werner, D. Jäger, J. Debus, and M. W. Büchler, 'Improvement of surgical results for pancreatic cancer', *Lancet Oncol.*, vol. 14, no. 11, pp. e476–e485, Oct. 2013, doi: 10.1016/S1470-2045(13)70172-4.
- [29] J. Kleeff *et al.*, 'Pancreatic cancer', *Nat. Rev. Dis. Primer*, vol. 2, no. 1, p. 16022, Apr. 2016, doi: 10.1038/nrdp.2016.22.
- [30] T. Conroy *et al.*, 'FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer', *N. Engl. J. Med.*, vol. 364, no. 19, pp. 1817–1825, May 2011, doi: 10.1056/NEJMoa1011923.

- [31] D. D. Von Hoff *et al.*, 'Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine', *N. Engl. J. Med.*, vol. 369, no. 18, pp. 1691–1703, Oct. 2013, doi: 10.1056/NEJMoa1304369.
- [32] F. Bäckhed *et al.*, 'Defining a Healthy Human Gut Microbiome: Current Concepts, Future Directions, and Clinical Applications', *Cell Host Microbe*, vol. 12, no. 5, pp. 611–622, Nov. 2012, doi: 10.1016/j.chom.2012.10.012.
- [33] H. F. Jenkinson and R. J. Lamont, 'Oral microbial communities in sickness and in health', *Trends Microbiol.*, vol. 13, no. 12, pp. 589–595, Dec. 2005, doi: 10.1016/j.tim.2005.09.006.
- [34] R. R. Roth and W. D. James, 'Microbial Ecology of the Skin', *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 42, no. 1, pp. 441–464, Oct. 1988, doi: 10.1146/annurev.mi.42.100188.002301.
- [35] F. Bäckhed, R. E. Ley, J. L. Sonnenburg, D. A. Peterson, and J. I. Gordon, 'Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine', *Science*, vol. 307, no. 5717, pp. 1915–1920, Mar. 2005, doi: 10.1126/science.1104816.
- [36] V. Robles Alonso and F. Guarner, 'Linking the gut microbiota to human health', *Br. J. Nutr.*, vol. 109, no. S2, pp. S21–S26, Jan. 2013, doi: 10.1017/S0007114512005235.
- [37] P. Jethwani and K. Grover, 'Gut Microbiota in Health and Diseases – A Review', *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, vol. 8, no. 08, pp. 1586–1599, Aug. 2019, doi: 10.20546/ijcmas.2019.808.187.
- [38] M. G. Dominguez-Bello, F. Godoy-Vitorino, R. Knight, and M. J. Blaser, 'Role of the microbiome in human development', *Gut*, vol. 68, no. 6, pp. 1108–1114, Jun. 2019, doi: 10.1136/gutjnl-2018-317503.
- [39] S. P. Wiertsema, J. Van Bergenhenegouwen, J. Garssen, and L. M. J. Knippels, 'The Interplay between the Gut Microbiome and the Immune System in the Context of Infectious Diseases throughout Life and the Role of Nutrition in Optimizing Treatment Strategies', *Nutrients*, vol. 13, no. 3, p. 886, Mar. 2021, doi: 10.3390/nu13030886.
- [40] H.-J. Wu and E. Wu, 'The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity', *Gut Microbes*, vol. 3, no. 1, pp. 4–14, Jan. 2012, doi: 10.4161/gmic.19320.
- [41] M. Camilleri, K. Madsen, R. Spiller, B. G. Van Meerveld, and G. N. Verne, 'Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease', *Neurogastroenterol. Motil.*, vol. 24, no. 6, pp. 503–512, Jun. 2012, doi: 10.1111/j.1365-2982.2012.01921.x.
- [42] L. M. Cox and M. J. Blaser, 'Pathways in Microbe-Induced Obesity', *Cell Metab.*, vol. 17, no. 6, pp. 883–894, Jun. 2013, doi: 10.1016/j.cmet.2013.05.004.
- [43] M. Carabotti, A. Scirocco, M. A. Maselli, and C. Severi, 'The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems', *Ann. Gastroenterol.*, vol. 28, no. 2, pp. 203–209, 2015.
- [44] B. B. Warner, 'The contribution of the gut microbiome to neurodevelopment and neuropsychiatric disorders', *Pediatr. Res.*, vol. 85, no. 2, pp. 216–224, Jan. 2019, doi: 10.1038/s41390-018-0191-9.
- [45] L. Liu, H. Wang, X. Chen, Y. Zhang, H. Zhang, and P. Xie, 'Gut microbiota and its metabolites in depression: from pathogenesis to treatment', *eBioMedicine*, vol. 90, p. 104527, Apr. 2023, doi: 10.1016/j.ebiom.2023.104527.

- [46] R. F. Schwabe and C. Jobin, 'The microbiome and cancer', *Nat. Rev. Cancer*, vol. 13, no. 11, pp. 800–812, Nov. 2013, doi: 10.1038/nrc3610.
- [47] O. Silva-García, J. J. Valdez-Alarcón, and V. M. Baizabal-Aguirre, 'Wnt/ β -Catenin Signaling as a Molecular Target by Pathogenic Bacteria', *Front. Immunol.*, vol. 10, p. 2135, Sep. 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.02135.
- [48] M. R. Rubinstein, X. Wang, W. Liu, Y. Hao, G. Cai, and Y. W. Han, 'Fusobacterium nucleatum Promotes Colorectal Carcinogenesis by Modulating E-Cadherin/ β -Catenin Signaling via its FadA Adhesin', *Cell Host Microbe*, vol. 14, no. 2, pp. 195–206, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.chom.2013.07.012.
- [49] L. Zitvogel, M. Ayyoub, B. Routy, and G. Kroemer, 'Microbiome and Anticancer Immunosurveillance', *Cell*, vol. 165, no. 2, pp. 276–287, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.03.001.
- [50] B. Routy *et al.*, 'Gut microbiome influences efficacy of PD-1–based immunotherapy against epithelial tumors', *Science*, vol. 359, no. 6371, pp. 91–97, Jan. 2018, doi: 10.1126/science.aan3706.
- [51] D. M. Parkin, 'The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002', *Int. J. Cancer*, vol. 118, no. 12, pp. 3030–3044, Jun. 2006, doi: 10.1002/ijc.21731.
- [52] W. Ye *et al.*, 'Helicobacter pylori Infection and Gastric Atrophy: Risk of Adenocarcinoma and Squamous-Cell Carcinoma of the Esophagus and Adenocarcinoma of the Gastric Cardia', *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 96, no. 5, pp. 388–396, Mar. 2004, doi: 10.1093/jnci/djh057.
- [53] R. Lu *et al.*, 'Enteric bacterial protein AvrA promotes colonic tumorigenesis and activates colonic beta-catenin signaling pathway', *Oncogenesis*, vol. 3, no. 6, pp. e105–e105, Jun. 2014, doi: 10.1038/oncsis.2014.20.
- [54] M. G. Rooks and W. S. Garrett, 'Gut microbiota, metabolites and host immunity', *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 16, no. 6, pp. 341–352, Jun. 2016, doi: 10.1038/nri.2016.42.
- [55] J. Sato *et al.*, 'Gut Dysbiosis and Detection of "Live Gut Bacteria" in Blood of Japanese Patients With Type 2 Diabetes', *Diabetes Care*, vol. 37, no. 8, pp. 2343–2350, Aug. 2014, doi: 10.2337/dc13-2817.
- [56] J. Karczewski, B. Poniedziałek, Z. Adamski, and P. Rzymiski, 'The effects of the microbiota on the host immune system', *Autoimmunity*, vol. 47, no. 8, pp. 494–504, Dec. 2014, doi: 10.3109/08916934.2014.938322.
- [57] L. Wen *et al.*, 'Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes', *Nature*, vol. 455, no. 7216, pp. 1109–1113, Oct. 2008, doi: 10.1038/nature07336.
- [58] M. A. Kriegel, E. Sefik, J. A. Hill, H.-J. Wu, C. Benoist, and D. Mathis, 'Naturally transmitted segmented filamentous bacteria segregate with diabetes protection in nonobese diabetic mice', *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, no. 28, pp. 11548–11553, Jul. 2011, doi: 10.1073/pnas.1108924108.
- [59] C. S. Rosenfeld, 'Microbiome Disturbances and Autism Spectrum Disorders', *Drug Metab. Dispos.*, vol. 43, no. 10, pp. 1557–1571, Oct. 2015, doi: 10.1124/dmd.115.063826.
- [60] C. Chen *et al.*, 'Gut microbiota regulate Alzheimer's disease pathologies and cognitive disorders via PUFA-associated neuroinflammation', *Gut*, vol. 71, no. 11, pp. 2233–2252, Nov. 2022, doi: 10.1136/gutjnl-2021-326269.

- [61] T. B. Clarke, K. M. Davis, E. S. Lysenko, A. Y. Zhou, Y. Yu, and J. N. Weiser, 'Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity', *Nat. Med.*, vol. 16, no. 2, pp. 228–231, Feb. 2010, doi: 10.1038/nm.2087.
- [62] S. C. Ganal *et al.*, 'Priming of Natural Killer Cells by Nonmucosal Mononuclear Phagocytes Requires Instructive Signals from Commensal Microbiota', *Immunity*, vol. 37, no. 1, pp. 171–186, Jul. 2012, doi: 10.1016/j.immuni.2012.05.020.
- [63] G. A. Weiss and T. Hennet, 'Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis', *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 74, no. 16, pp. 2959–2977, Aug. 2017, doi: 10.1007/s00018-017-2509-x.
- [64] B. Lindkvist, D. Johansen, A. Borgström, and J. Manjer, 'A prospective study of *Helicobacter pylori* in relation to the risk for pancreatic cancer', *BMC Cancer*, vol. 8, no. 1, p. 321, Dec. 2008, doi: 10.1186/1471-2407-8-321.
- [65] J. Hong *et al.*, 'Gut microbiome changes associated with chronic pancreatitis and pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis', *Int. J. Surg.*, vol. 110, no. 9, pp. 5781–5794, Sep. 2024, doi: 10.1097/JS9.0000000000001724.
- [66] E. Del Castillo *et al.*, 'The Microbiomes of Pancreatic and Duodenum Tissue Overlap and Are Highly Subject Specific but Differ between Pancreatic Cancer and Noncancer Subjects', *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 28, no. 2, pp. 370–383, Feb. 2019, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-18-0542.
- [67] V. Sethi *et al.*, 'Gut Microbiota Promotes Tumor Growth in Mice by Modulating Immune Response', *Gastroenterology*, vol. 155, no. 1, pp. 33–37.e6, Jul. 2018, doi: 10.1053/j.gastro.2018.04.001.
- [68] R. M. Thomas *et al.*, 'Intestinal microbiota enhances pancreatic carcinogenesis in preclinical models', *Carcinogenesis*, vol. 39, no. 8, pp. 1068–1078, Jul. 2018, doi: 10.1093/carcin/bgy073.
- [69] B. Boursi, R. Mamtani, K. Haynes, and Y.-X. Yang, 'Recurrent antibiotic exposure may promote cancer formation – Another step in understanding the role of the human microbiota?', *Eur. J. Cancer*, vol. 51, no. 17, pp. 2655–2664, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.ejca.2015.08.015.
- [70] Y. Tsuji, T. Watanabe, M. Kudo, H. Arai, W. Strober, and T. Chiba, 'Sensing of commensal organisms by the intracellular sensor NOD1 mediates experimental pancreatitis', *Immunity*, vol. 37, no. 2, pp. 326–338, 2012, doi: 10.1016/j.immuni.2012.05.024.
- [71] C. Leal-Lopes, F. J. Velloso, J. C. Campopiano, M. C. Sogayar, and R. G. Correa, 'Roles of Commensal Microbiota in Pancreas Homeostasis and Pancreatic Pathologies', *J. Diabetes Res.*, vol. 2015, p. 284680, 2015, doi: 10.1155/2015/284680.
- [72] J. M. Ridlon, D.-J. Kang, and P. B. Hylemon, 'Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria', *J. Lipid Res.*, vol. 47, no. 2, pp. 241–259, Feb. 2006, doi: 10.1194/jlr.R500013-JLR200.
- [73] D. W. Russell, 'Fifty years of advances in bile acid synthesis and metabolism', *J. Lipid Res.*, vol. 50, pp. S120–S125, Apr. 2009, doi: 10.1194/jlr.R800026-JLR200.
- [74] M. C. Di Gregorio, J. Cautela, and L. Galantini, 'Physiology and Physical Chemistry of Bile Acids', *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 4, p. 1780, Feb. 2021, doi: 10.3390/ijms22041780.

- [75] T. Li, J. M. Francl, S. Boehme, and J. Y. L. Chiang, 'Regulation of Cholesterol And Bile Acid Homeostasis by the Cholesterol 7 α -Hydroxylase/Steroid Response Element-Binding Protein 2/Microrna-33A Axis in Mice', *Hepatology*, vol. 58, no. 3, pp. 1111–1121, Sep. 2013, doi: 10.1002/hep.26427.
- [76] R. Durník, L. Šindlerová, P. Babica, and O. Jurček, 'Bile Acids Transporters of Enterohepatic Circulation for Targeted Drug Delivery', *Molecules*, vol. 27, no. 9, p. 2961, May 2022, doi: 10.3390/molecules27092961.
- [77] E. Sievänen, 'Exploitation of Bile Acid Transport Systems in Prodrug Design', *Molecules*, vol. 12, no. 8, pp. 1859–1889, Aug. 2007, doi: 10.3390/12081859.
- [78] B. V. Jones, M. Begley, C. Hill, C. G. M. Gahan, and J. R. Marchesi, 'Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome', *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, no. 36, pp. 13580–13585, Sep. 2008, doi: 10.1073/pnas.0804437105.
- [79] J. P. Coleman and L. L. Hudson, 'Cloning and characterization of a conjugated bile acid hydrolase gene from *Clostridium perfringens*', *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 61, no. 7, pp. 2514–2520, Jul. 1995, doi: 10.1128/aem.61.7.2514-2520.1995.
- [80] M. Kitahara, F. Takamine, T. Imamura, and Y. Benno, 'Clostridium hiranonis sp. nov., a human intestinal bacterium with bile acid 7 α -dehydroxylating activity', *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 51, no. 1, pp. 39–44, Jan. 2001, doi: 10.1099/00207713-51-1-39.
- [81] J. Grill, F. Schneider, J. Crociani, and J. Ballongue, 'Purification and Characterization of Conjugated Bile Salt Hydrolase from *Bifidobacterium longum* BB536', *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 61, no. 7, pp. 2577–2582, Jul. 1995, doi: 10.1128/aem.61.7.2577-2582.1995.
- [82] F. Takamine and T. Imamura, 'Isolation and Characterization of Bile Acid 7-Dehydroxylating Bacteria from Human Feces', *Microbiol. Immunol.*, vol. 39, no. 1, pp. 11–18, Jan. 1995, doi: 10.1111/j.1348-0421.1995.tb02162.x.
- [83] P. Gérard, 'Metabolism of Cholesterol and Bile Acids by the Gut Microbiota', *Pathogens*, vol. 3, no. 1, pp. 14–24, Dec. 2013, doi: 10.3390/pathogens3010014.
- [84] M. Funabashi *et al.*, 'A metabolic pathway for bile acid dehydroxylation by the gut microbiome', *Nature*, vol. 582, no. 7813, pp. 566–570, Jun. 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2396-4.
- [85] J. Y. L. Chiang, 'Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms', *J. Hepatol.*, vol. 40, no. 3, pp. 539–551, Mar. 2004, doi: 10.1016/j.jhep.2003.11.006.
- [86] T. Režen *et al.*, 'The role of bile acids in carcinogenesis', *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 79, no. 5, p. 243, May 2022, doi: 10.1007/s00018-022-04278-2.
- [87] S. McIlvride, P. H. Dixon, and C. Williamson, 'Bile acids and gestation', *Mol. Aspects Med.*, vol. 56, pp. 90–100, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.mam.2017.05.003.
- [88] M. Watanabe *et al.*, 'Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation', *Nature*, vol. 439, no. 7075, pp. 484–489, Jan. 2006, doi: 10.1038/nature04330.
- [89] M. Makishima *et al.*, 'Identification of a Nuclear Receptor for Bile Acids', *Science*, vol. 284, no. 5418, pp. 1362–1365, May 1999, doi: 10.1126/science.284.5418.1362.

- [90] Y. Kawamata *et al.*, 'A G Protein-coupled Receptor Responsive to Bile Acids', *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 11, pp. 9435–9440, Mar. 2003, doi: 10.1074/jbc.M209706200.
- [91] T. Maruyama *et al.*, 'Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR)', *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 298, no. 5, pp. 714–719, Nov. 2002, doi: 10.1016/S0006-291X(02)02550-0.
- [92] A. Wahlström, S. I. Sayin, H. U. Marschall, and F. Bäckhed, 'Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism', *Cell Metab.*, vol. 24, no. 1, pp. 41–50, Jul. 2016, doi: 10.1016/J.CMET.2016.05.005.
- [93] J. Tsuei, T. Chau, D. Mills, and Y. J. Y. Wan, 'Bile acid dysregulation, gut dysbiosis, and gastrointestinal cancer', *Exp. Biol. Med.*, 2014, doi: 10.1177/1535370214538743.
- [94] M. M. Slocum, K. M. Sittig, R. D. Specian, and E. A. Deitch, 'Absence of intestinal bile promotes bacterial translocation', *Am. Surg.*, 1992.
- [95] N. S. Nagathihalli *et al.*, 'Novel mechanistic insights into ectodomain shedding of egfr ligands amphiregulin and TGF- α : Impact on gastrointestinal cancers driven by secondary bile acids', *Cancer Res.*, vol. 74, no. 7, pp. 2062–2072, 2014, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2329.
- [96] Y. Kim, S. Jeong, E.-K. Kim, E. Kim, and J. Cho, 'Ursodeoxycholic acid suppresses epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell formation by reducing the levels of peroxiredoxin II and reactive oxygen species in pancreatic cancer cells', *Oncol. Rep.*, Oct. 2017, doi: 10.3892/or.2017.6045.
- [97] H.-Y. Feng and Y.-C. Chen, 'Role of bile acids in carcinogenesis of pancreatic cancer: An old topic with new perspective', *World J. Gastroenterol.*, vol. 22, no. 33, p. 7463, 2016, doi: 10.3748/wjg.v22.i33.7463.
- [98] D. Gandhi *et al.*, 'A pictorial review of gall stones and its associated complications', *Clin. Imaging*, vol. 60, no. 2, pp. 228–236, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.clinimag.2019.11.015.
- [99] T. Adachi *et al.*, 'Bile-Reflux into the Pancreatic Ducts is Associated with the Development of Intraductal Papillary Carcinoma in Hamsters', *J. Surg. Res.*, vol. 136, no. 1, pp. 106–111, Nov. 2006, doi: 10.1016/j.jss.2006.04.025.
- [100] O. N. Tucker, 'Bile acids induce cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic cancer cell lines', *Carcinogenesis*, vol. 25, no. 3, pp. 419–423, Dec. 2003, doi: 10.1093/carcin/bgh010.
- [101] D. O. Rees *et al.*, 'Comparison of the composition of bile acids in bile of patients with adenocarcinoma of the pancreas and benign disease', *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 174, pp. 290–295, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.jsbmb.2017.10.011.
- [102] S. Schwarcz *et al.*, 'The pro- and antineoplastic effects of deoxycholic acid in pancreatic adenocarcinoma cell models', *Mol. Biol. Rep.*, vol. 50, no. 6, May 2023, doi: 10.1007/S11033-023-08453-X.
- [103] A. A. Goldberg, A. Beach, G. F. Davies, T. A. A. Harkness, A. LeBlanc, and V. I. Titorenko, 'Lithocholic bile acid selectively kills neuroblastoma cells, while sparing normal neuronal cells', *Oncotarget*, vol. 2, no. 10, pp. 761–782, 2011, doi: 10.18632/oncotarget.338.
- [104] A. A. Goldberg, V. I. Titorenko, A. Beach, and J. Thomas Sanderson, 'Bile acids induce apoptosis selectively in androgen-dependent and -independent prostate cancer cells', *PeerJ*, vol. 2013, no. 1, pp. 1–17, 2013, doi: 10.7717/peerj.122.

- [105] A. A. Gafar *et al.*, 'Lithocholic acid induces endoplasmic reticulum stress, autophagy and mitochondrial dysfunction in human prostate cancer cells', *PeerJ*, vol. 2016, no. 11, pp. 1–24, 2016, doi: 10.7717/peerj.2445.
- [106] J. Trah *et al.*, 'Lithocholic bile acid induces apoptosis in human nephroblastoma cells: a non-selective treatment option', *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–8, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-77436-w.
- [107] W. Li *et al.*, 'Lithocholic acid inhibits gallbladder cancer proliferation through interfering glutaminase-mediated glutamine metabolism', *Biochem. Pharmacol.*, vol. 205, no. July, p. 115253, 2022, doi: 10.1016/j.bcp.2022.115253.
- [108] M. X. Zhao, Z. C. Cai, B. J. Zhu, and Z. Q. Zhang, 'The Apoptosis Effect on Liver Cancer Cells of Gold Nanoparticles Modified with Lithocholic Acid', *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 13, pp. 0–7, 2018, doi: 10.1186/s11671-018-2653-8.
- [109] T. H. Luu *et al.*, 'Lithocholic bile acid inhibits lipogenesis and induces apoptosis in breast cancer cells', *Cell. Oncol.*, vol. 41, no. 1, pp. 13–24, 2018, doi: 10.1007/s13402-017-0353-5.
- [110] D. Cabrera, J. P. Arab, and M. Arrese, 'UDCA, NorUDCA, and TUDCA in Liver Diseases: A Review of Their Mechanisms of Action and Clinical Applications', in *Bile Acids and Their Receptors*, vol. 256, S. Fiorucci and E. Distrutti, Eds., in Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 256, Cham: Springer International Publishing, 2019, pp. 237–264. doi: 10.1007/164_2019_241.
- [111] S. Lee *et al.*, 'Synergistic effect of ursodeoxycholic acid on the antitumor activity of sorafenib in hepatocellular carcinoma cells via modulation of STAT3 and ERK', *Int. J. Mol. Med.*, Aug. 2018, doi: 10.3892/ijmm.2018.3807.
- [112] E.-K. Kim, J. H. Cho, E. Kim, and Y. J. Kim, 'Ursodeoxycholic acid inhibits the proliferation of colon cancer cells by regulating oxidative stress and cancer stem-like cell growth', *PLOS ONE*, vol. 12, no. 7, p. e0181183, Jul. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0181183.
- [113] E. Im and J. D. Martinez, 'Ursodeoxycholic Acid (UDCA) Can Inhibit Deoxycholic Acid (DCA)-induced Apoptosis via Modulation of EGFR/Raf-1/ERK Signaling in Human Colon Cancer Cells', *J. Nutr.*, vol. 134, no. 2, pp. 483–486, Feb. 2004, doi: 10.1093/jn/134.2.483.
- [114] B. Arneith, 'Tumor Microenvironment', *Medicina (Mex.)*, vol. 56, no. 1, p. 15, Dec. 2019, doi: 10.3390/medicina56010015.
- [115] A. Elkhattouti, M. Hassan, and C. R. Gomez, 'Stromal Fibroblast in Age-Related Cancer: Role in Tumorigenesis and Potential as Novel Therapeutic Target', *Front. Oncol.*, vol. 5, Jul. 2015, doi: 10.3389/fonc.2015.00158.
- [116] T. Nakamura, K. Matsumoto, A. Kiritoshi, Y. Tano, and T. Nakamura, 'Induction of hepatocyte growth factor in fibroblasts by tumor-derived factors affects invasive growth of tumor cells: in vitro analysis of tumor-stromal interactions', *Cancer Res.*, vol. 57, no. 15, pp. 3305–3313, 1997.
- [117] F. Xing, J. Saidou, and K. Watabe, 'Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment', *Front. Biosci. Landmark Ed.*, vol. 15, no. 1, pp. 166–179, 2010, doi: 10.2741/3613.
- [118] K. Shiga, M. Hara, T. Nagasaki, T. Sato, H. Takahashi, and H. Takeyama, 'Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth', *Cancers*, vol. 7, no. 4, pp. 2443–2458, Dec. 2015, doi: 10.3390/cancers7040902.

- [119] S. Pavlides *et al.*, 'The reverse Warburg effect: Aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma', *Cell Cycle*, vol. 8, no. 23, pp. 3984–4001, Dec. 2009, doi: 10.4161/cc.8.23.10238.
- [120] R. Lugano, M. Ramachandran, and A. Dimberg, 'Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities', *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 77, no. 9, pp. 1745–1770, May 2020, doi: 10.1007/s00018-019-03351-7.
- [121] K. M. Bussard, L. Mutkus, K. Stumpf, C. Gomez-Manzano, and F. C. Marini, 'Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment', *Breast Cancer Res.*, vol. 18, no. 1, p. 84, Dec. 2016, doi: 10.1186/s13058-016-0740-2.
- [122] M. De Palma, D. Biziato, and T. V. Petrova, 'Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis', *Nat. Rev. Cancer*, vol. 17, no. 8, pp. 457–474, Aug. 2017, doi: 10.1038/nrc.2017.51.
- [123] C. Feig, A. Gopinathan, A. Neesse, D. S. Chan, N. Cook, and D. A. Tuveson, 'The Pancreas Cancer Microenvironment', *Clin. Cancer Res.*, vol. 18, no. 16, pp. 4266–4276, Aug. 2012, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3114.
- [124] N. Ikeda *et al.*, 'Prognostic significance of angiogenesis in human pancreatic cancer', *Br. J. Cancer*, vol. 79, no. 9–10, pp. 1553–1563, Mar. 1999, doi: 10.1038/sj.bjc.6690248.
- [125] M. Xu, T. Zhang, R. Xia, Y. Wei, and X. Wei, 'Targeting the tumor stroma for cancer therapy', *Mol. Cancer*, vol. 21, no. 1, p. 208, Nov. 2022, doi: 10.1186/s12943-022-01670-1.
- [126] E. Uribe-Querol and C. Rosales, 'Neutrophils in Cancer: Two Sides of the Same Coin', *J. Immunol. Res.*, vol. 2015, pp. 1–21, 2015, doi: 10.1155/2015/983698.
- [127] K. K. Mahadevan *et al.*, 'KRASG12D inhibition reprograms the microenvironment of early and advanced pancreatic cancer to promote FAS-mediated killing by CD8+ T cells', *Cancer Cell*, vol. 41, no. 9, pp. 1606–1620.e8, Sep. 2023, doi: 10.1016/j.ccell.2023.07.002.
- [128] Y. Guo, W. Pan, S. Liu, Z. Shen, Y. Xu, and L. Hu, 'ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review)', *Exp. Ther. Med.*, Jan. 2020, doi: 10.3892/etm.2020.8454.
- [129] B. Jiang and L. Liu, 'Chapter 2 PI3K/PTEN Signaling in Angiogenesis and Tumorigenesis', in *Advances in Cancer Research*, vol. 102, Elsevier, 2009, pp. 19–65. doi: 10.1016/S0065-230X(09)02002-8.
- [130] A. Glaviano *et al.*, 'PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer', *Mol. Cancer*, vol. 22, no. 1, p. 138, Aug. 2023, doi: 10.1186/s12943-023-01827-6.
- [131] K. E. O'Reilly *et al.*, 'mTOR Inhibition Induces Upstream Receptor Tyrosine Kinase Signaling and Activates Akt', *Cancer Res.*, vol. 66, no. 3, pp. 1500–1508, Feb. 2006, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2925.
- [132] J. W. Shay and S. Bacchetti, 'A survey of telomerase activity in human cancer', *Eur. J. Cancer*, vol. 33, no. 5, pp. 787–791, Apr. 1997, doi: 10.1016/S0959-8049(97)00062-2.
- [133] K.-J. Wu *et al.*, 'Direct activation of TERT transcription by c-MYC', *Nat. Genet.*, vol. 21, no. 2, pp. 220–224, Feb. 1999, doi: 10.1038/6010.
- [134] K. Hoffmeyer *et al.*, 'Wnt/ β -Catenin Signaling Regulates Telomerase in Stem Cells and Cancer Cells', *Science*, vol. 336, no. 6088, pp. 1549–1554, Jun. 2012, doi: 10.1126/science.1218370.

- [135] K. Macleod, 'Tumor suppressor genes', *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 10, no. 1, pp. 81–93, Feb. 2000, doi: 10.1016/S0959-437X(99)00041-6.
- [136] D. P. Lane, 'p53, guardian of the genome', *Nature*, vol. 358, no. 6381, pp. 15–16, Jul. 1992, doi: 10.1038/358015a0.
- [137] D. Hanahan and R. A. Weinberg, 'Hallmarks of Cancer: The Next Generation', *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [138] D. Hanahan and J. Folkman, 'Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis', *Cell*, vol. 86, no. 3, pp. 353–364, Aug. 1996, doi: 10.1016/S0092-8674(00)80108-7.
- [139] N. Ferrara, 'Vascular Endothelial Growth Factor', *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 29, no. 6, pp. 789–791, Jun. 2009, doi: 10.1161/ATVBAHA.108.179663.
- [140] S. Kazerounian, K. O. Yee, and J. Lawler, 'Thrombospondins: from structure to therapeutics: Thrombospondins in cancer', *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 65, no. 5, pp. 700–712, Mar. 2008, doi: 10.1007/s00018-007-7486-z.
- [141] M. Raica, A. M. Cimpean, and D. Ribatti, 'Angiogenesis in pre-malignant conditions', *Eur. J. Cancer*, vol. 45, no. 11, pp. 1924–1934, Jul. 2009, doi: 10.1016/j.ejca.2009.04.007.
- [142] G. Berx and F. Van Roy, 'Involvement of Members of the Cadherin Superfamily in Cancer', *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 1, no. 6, pp. a003129–a003129, Dec. 2009, doi: 10.1101/cshperspect.a003129.
- [143] S. I. Grivennikov, F. R. Greten, and M. Karin, 'Immunity, Inflammation, and Cancer', *Cell*, vol. 140, no. 6, pp. 883–899, Mar. 2010, doi: 10.1016/j.cell.2010.01.025.
- [144] O. Warburg, 'On Respiratory Impairment in Cancer Cells', *Science*, vol. 124, no. 3215, pp. 269–270, Aug. 1956, doi: 10.1126/science.124.3215.269.
- [145] J. Downward, 'Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy', *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, no. 1, pp. 11–22, Jan. 2003, doi: 10.1038/nrc969.
- [146] A. S. Dhillon, S. Hagan, O. Rath, and W. Kolch, 'MAP kinase signalling pathways in cancer', *Oncogene*, vol. 26, no. 22, pp. 3279–3290, May 2007, doi: 10.1038/sj.onc.1210421.
- [147] S. Torii, T. Yamamoto, Y. Tsuchiya, and E. Nishida, 'ERK MAP kinase in G₁ cell cycle progression and cancer', *Cancer Sci.*, vol. 97, no. 8, pp. 697–702, Aug. 2006, doi: 10.1111/j.1349-7006.2006.00244.x.
- [148] E. A. Collisson *et al.*, 'A Central Role for RAF→MEK→ERK Signaling in the Genesis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma', *Cancer Discov.*, vol. 2, no. 8, pp. 685–693, Aug. 2012, doi: 10.1158/2159-8290.CD-11-0347.
- [149] E. A. Collisson, P. Bailey, D. K. Chang, and A. V. Biankin, 'Molecular subtypes of pancreatic cancer', *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 16, no. 4, pp. 207–220, Apr. 2019, doi: 10.1038/s41575-019-0109-y.
- [150] E. N. Kontomanolis *et al.*, 'Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review', *Anticancer Res.*, vol. 40, no. 11, pp. 6009–6015, Nov. 2020, doi: 10.21873/anticancer.14622.
- [151] C. Fiorini, M. Cordani, C. Padroni, G. Blandino, S. Di Agostino, and M. Donadelli, 'Mutant p53 stimulates chemoresistance of pancreatic adenocarcinoma cells to gemcitabine', *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.*, vol. 1853, no. 1, pp. 89–100, Jan. 2015, doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.10.003.

- [152] J. Xiong *et al.*, 'Deregulated expression of miR-107 inhibits metastasis of PDAC through inhibition PI3K/Akt signaling via caveolin-1 and PTEN', *Exp. Cell Res.*, vol. 361, no. 2, pp. 316–323, Dec. 2017, doi: 10.1016/j.yexcr.2017.10.033.
- [153] J. P. Thiery, H. Acloque, R. Y. J. Huang, and M. A. Nieto, 'Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease', *Cell*, vol. 139, no. 5, pp. 871–890, Nov. 2009, doi: 10.1016/j.cell.2009.11.007.
- [154] G. Manfioletti and M. Fedele, 'Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT) 2021', *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 10, p. 5848, May 2022, doi: 10.3390/ijms23105848.
- [155] J. P. Thiery and J. P. Sleeman, 'Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions', *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 7, no. 2, pp. 131–142, Feb. 2006, doi: 10.1038/nrm1835.
- [156] S. M. Hansen, V. Berezin, and E. Bock, 'Signaling mechanisms of neurite outgrowth induced by the cell adhesion molecules NCAM and N-Cadherin', *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 65, no. 23, pp. 3809–3821, Dec. 2008, doi: 10.1007/s00018-008-8290-0.
- [157] C. Niehrs, 'The complex world of WNT receptor signalling', *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 13, no. 12, pp. 767–779, Dec. 2012, doi: 10.1038/nrm3470.
- [158] M. A. McNiven, 'Breaking away: matrix remodeling from the leading edge', *Trends Cell Biol.*, vol. 23, no. 1, pp. 16–21, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.tcb.2012.08.009.
- [159] W. Lu and Y. Kang, 'Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression and Metastasis', *Dev. Cell*, vol. 49, no. 3, pp. 361–374, May 2019, doi: 10.1016/j.devcel.2019.04.010.
- [160] M. A. Nieto, R. Y.-J. Huang, R. A. Jackson, and J. P. Thiery, 'EMT: 2016', *Cell*, vol. 166, no. 1, pp. 21–45, Jun. 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.06.028.
- [161] X. Zheng *et al.*, 'Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer', *Nature*, vol. 527, no. 7579, pp. 525–530, Nov. 2015, doi: 10.1038/nature16064.
- [162] S.-M. Hong *et al.*, 'Loss of E-cadherin expression and outcome among patients with resectable pancreatic adenocarcinomas', *Mod. Pathol.*, vol. 24, no. 9, pp. 1237–1247, Sep. 2011, doi: 10.1038/modpathol.2011.74.
- [163] J. Majidpoor and K. Mortezaee, 'Steps in metastasis: an updated review', *Med. Oncol.*, vol. 38, no. 1, Jan. 2021, doi: 10.1007/s12032-020-01447-w.
- [164] I. Kaszak, O. Witkowska-Pitaszewicz, Z. Niewiadomska, B. Dworecka-Kaszak, F. Ngosa Toka, and P. Jurka, 'Role of Cadherins in Cancer—A Review', *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 20, p. 7624, Oct. 2020, doi: 10.3390/ijms21207624.
- [165] M. S. Brown, K. E. Muller, and D. R. Pattabiraman, 'Quantifying the Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) from Bench to Bedside', *Cancers*, vol. 14, no. 5, p. 1138, Feb. 2022, doi: 10.3390/cancers14051138.
- [166] B. M. Hybertson, B. Gao, S. K. Bose, and J. M. McCord, 'Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation', *Mol. Aspects Med.*, vol. 32, no. 4–6, pp. 234–246, Aug. 2011, doi: 10.1016/j.mam.2011.10.006.
- [167] R. Venugopal and A. K. Jaiswal, 'Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase, gene', *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 93, no. 25, pp. 14960–14965, Dec. 1996, doi: 10.1073/pnas.93.25.14960.
- [168] A. Boveris, '[57] Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria', in *Methods in Enzymology*, vol. 105, Elsevier, 1984, pp. 429–435. doi: 10.1016/S0076-6879(84)05060-6.

- [169] Y. A. Hajam *et al.*, 'Oxidative Stress in Human Pathology and Aging: Molecular Mechanisms and Perspectives', *Cells*, vol. 11, no. 3, p. 552, Feb. 2022, doi: 10.3390/cells11030552.
- [170] K. Jomova, S. Y. Alomar, S. H. Alwasel, E. Nepovimova, K. Kuca, and M. Valko, 'Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants', *Arch. Toxicol.*, vol. 98, no. 5, pp. 1323–1367, May 2024, doi: 10.1007/s00204-024-03696-4.
- [171] A. V. Kudryavtseva *et al.*, 'Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer', *Oncotarget*, vol. 7, no. 29, pp. 44879–44905, Jul. 2016, doi: 10.18632/oncotarget.9821.
- [172] C. Franco, E. Sciatti, G. Favero, F. Bonomini, E. Vizzardì, and R. Rezzani, 'Essential Hypertension and Oxidative Stress: Novel Future Perspectives', *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 22, p. 14489, Nov. 2022, doi: 10.3390/ijms232214489.
- [173] B. S. Karam, A. Chavez-Moreno, W. Koh, J. G. Akar, and F. G. Akar, 'Oxidative stress and inflammation as central mediators of atrial fibrillation in obesity and diabetes', *Cardiovasc. Diabetol.*, vol. 16, no. 1, p. 120, Dec. 2017, doi: 10.1186/s12933-017-0604-9.
- [174] M. D. Jelic, A. D. Mandic, S. M. Maricic, and B. U. Srdjenovic, 'Oxidative stress and its role in cancer', *J. Cancer Res. Ther.*, vol. 17, no. 1, pp. 22–28, Jan. 2021, doi: 10.4103/jcrt.JCRT_862_16.
- [175] T. Rabilloud, M. Heller, M.-P. Rigobello, A. Bindoli, R. Aebersold, and J. Lunardi, 'The mitochondrial antioxidant defence system and its response to oxidative stress', *PROTEOMICS*, vol. 1, no. 8, pp. 1105–1110, Aug. 2001, doi: 10.1002/1615-9861(200109)1:9<1105::AID-PROT1105>3.0.CO;2-M.
- [176] I. Hanukoglu, 'Antioxidant Protective Mechanisms against Reactive Oxygen Species (ROS) Generated by Mitochondrial P450 Systems in Steroidogenic Cells', *Drug Metab. Rev.*, vol. 38, no. 1–2, pp. 171–196, Jan. 2006, doi: 10.1080/03602530600570040.
- [177] J. M. McCord and I. Fridovich, 'Superoxide Dismutase', *J. Biol. Chem.*, vol. 244, no. 22, pp. 6049–6055, Nov. 1969, doi: 10.1016/S0021-9258(18)63504-5.
- [178] H. Yasui, S. Hayashi, and H. Sakurai, 'Possible Involvement of Singlet Oxygen Species as Multiple Oxidants in P450 Catalytic Reactions', *Drug Metab. Pharmacokinet.*, vol. 20, no. 1, pp. 1–13, 2005, doi: 10.2133/dmpk.20.1.
- [179] C. Glorieux and P. Buc Calderon, 'Targeting catalase in cancer', *Redox Biol.*, vol. 77, p. 103404, Nov. 2024, doi: 10.1016/j.redox.2024.103404.
- [180] L. Gebicka and J. Didik, 'Catalytic scavenging of peroxynitrite by catalase', *J. Inorg. Biochem.*, vol. 103, no. 10, pp. 1375–1379, Oct. 2009, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2009.07.011.
- [181] R. Hu, C. L.-L. Saw, R. Yu, and A.-N. T. Kong, 'Regulation of NF-E2-Related Factor 2 Signaling for Cancer Chemoprevention: Antioxidant Coupled with Antiinflammatory', *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 13, no. 11, pp. 1679–1698, Dec. 2010, doi: 10.1089/ars.2010.3276.
- [182] D. Praticò, 'Lipid Peroxidation and the Aging Process', *Sci. Aging Knowl. Environ.*, vol. 2002, no. 50, Dec. 2002, doi: 10.1126/sageke.2002.50.re5.

- [183] M. Shoeb, N. Ansari, S. Srivastava, and K. Ramana, '4-Hydroxynonenal in the Pathogenesis and Progression of Human Diseases', *Curr. Med. Chem.*, vol. 21, no. 2, pp. 230–237, Dec. 2013, doi: 10.2174/09298673113209990181.
- [184] G. Barrera *et al.*, 'Role of 4-Hydroxynonenal-Protein Adducts in Human Diseases', *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 22, no. 18, pp. 1681–1702, Jun. 2015, doi: 10.1089/ars.2014.6166.
- [185] M. A. Ortega *et al.*, 'Oxidative Stress Markers Are Associated with a Poor Prognosis in Patients with Pancreatic Cancer', *Antioxidants*, vol. 11, no. 4, p. 759, Apr. 2022, doi: 10.3390/antiox11040759.
- [186] T. Al Saati *et al.*, 'Oxidative Stress Induced by Inactivation of TP53INP1 Cooperates with KrasG12D to Initiate and Promote Pancreatic Carcinogenesis in the Murine Pancreas', *Am. J. Pathol.*, vol. 182, no. 6, pp. 1996–2004, Jun. 2013, doi: 10.1016/j.ajpath.2013.02.034.
- [187] I. Bellezza, I. Giambanco, A. Minelli, and R. Donato, 'Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress', *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.*, vol. 1865, no. 5, pp. 721–733, May 2018, doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.02.010.
- [188] S. Arfmann-Knübel *et al.*, 'The Crosstalk between Nrf2 and TGF- β 1 in the Epithelial-Mesenchymal Transition of Pancreatic Duct Epithelial Cells', *PLOS ONE*, vol. 10, no. 7, p. e0132978, Jul. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0132978.
- [189] S. Hamada, K. Taguchi, A. Masamune, M. Yamamoto, and T. Shimosegawa, 'Nrf2 promotes mutant K-ras/p53-driven pancreatic carcinogenesis', *Carcinogenesis*, vol. 38, no. 6, pp. 661–670, 2017, doi: 10.1093/carcin/bgx043.
- [190] G. M. DeNicola *et al.*, 'Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis', *Nature*, vol. 475, no. 7354, pp. 106–109, Jul. 2011, doi: 10.1038/nature10189.
- [191] H. Ying *et al.*, 'Oncogenic Kras Maintains Pancreatic Tumors through Regulation of Anabolic Glucose Metabolism', *Cell*, vol. 149, no. 3, pp. 656–670, Apr. 2012, doi: 10.1016/j.cell.2012.01.058.
- [192] I. L. Weissman, 'Stem Cells', *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 157–168, Jan. 2000, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81692-X.
- [193] T. Reya, S. J. Morrison, M. F. Clarke, and I. L. Weissman, 'Stem cells, cancer, and cancer stem cells', *Nature*, vol. 414, no. 6859, pp. 105–111, Nov. 2001, doi: 10.1038/35102167.
- [194] N. A. Lobo, Y. Shimono, D. Qian, and M. F. Clarke, 'The Biology of Cancer Stem Cells', *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 23, no. 1, pp. 675–699, Nov. 2007, doi: 10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104154.
- [195] J. P. Medema, 'Cancer stem cells: The challenges ahead', *Nat. Cell Biol.*, vol. 15, no. 4, pp. 338–344, Apr. 2013, doi: 10.1038/ncb2717.
- [196] C. Li *et al.*, 'Identification of Pancreatic Cancer Stem Cells', *Cancer Res.*, vol. 67, no. 3, pp. 1030–1037, Feb. 2007, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2030.
- [197] S. Ma *et al.*, 'Identification and Characterization of Tumorigenic Liver Cancer Stem/Progenitor Cells', *Gastroenterology*, vol. 132, no. 7, pp. 2542–2556, Jun. 2007, doi: 10.1053/j.gastro.2007.04.025.
- [198] R. K. Nimmakayala *et al.*, 'Metabolic programming of distinct cancer stem cells promotes metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma', *Oncogene*, vol. 40, no. 1, pp. 215–231, Jan. 2021, doi: 10.1038/s41388-020-01518-2.

- [199] P. C. Hermann *et al.*, 'Distinct Populations of Cancer Stem Cells Determine Tumor Growth and Metastatic Activity in Human Pancreatic Cancer', *Cell Stem Cell*, vol. 1, no. 3, pp. 313–323, Sep. 2007, doi: 10.1016/j.stem.2007.06.002.
- [200] H. Niess *et al.*, 'Side population cells of pancreatic cancer show characteristics of cancer stem cells responsible for resistance and metastasis', *Target. Oncol.*, vol. 10, no. 2, pp. 215–227, Jun. 2015, doi: 10.1007/s11523-014-0323-z.
- [201] S. Kure, Y. Matsuda, M. Hagio, J. Ueda, Z. Naito, and T. Ishiwata, 'Expression of cancer stem cell markers in pancreatic intraepithelial neoplasias and pancreatic ductal adenocarcinomas', *Int. J. Oncol.*, vol. 41, no. 4, pp. 1314–1324, Oct. 2012, doi: 10.3892/ijo.2012.1565.
- [202] A. P. Vaz, M. P. Ponnusamy, and S. K. Batra, 'Cancer stem cells and therapeutic targets: an emerging field for cancer treatment', *Drug Deliv. Transl. Res.*, vol. 3, no. 2, pp. 113–120, Apr. 2013, doi: 10.1007/s13346-012-0095-x.
- [203] C. M. Sousa and A. C. Kimmelman, 'The complex landscape of pancreatic cancer metabolism', *Carcinogenesis*, vol. 35, no. 7, pp. 1441–1450, Jul. 2014, doi: 10.1093/carcin/bgu097.
- [204] P. P. Hsu and D. M. Sabatini, 'Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond', *Cell*, vol. 134, no. 5, pp. 703–707, Sep. 2008, doi: 10.1016/j.cell.2008.08.021.
- [205] R. J. DeBerardinis, J. J. Lum, G. Hatzivassiliou, and C. B. Thompson, 'The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation', *Cell Metab.*, vol. 7, no. 1, pp. 11–20, Jan. 2008, doi: 10.1016/j.cmet.2007.10.002.
- [206] S. Tsutsumi, T. Yanagawa, T. Shimura, H. Kuwano, and A. Raz, 'Autocrine Motility Factor Signaling Enhances Pancreatic Cancer Metastasis', *Clin. Cancer Res.*, vol. 10, no. 22, pp. 7775–7784, Nov. 2004, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1015.
- [207] D. Jia, J. Park, K. Jung, H. Levine, and B. Kaipparettu, 'Elucidating the Metabolic Plasticity of Cancer: Mitochondrial Reprogramming and Hybrid Metabolic States', *Cells*, vol. 7, no. 3, p. 21, Mar. 2018, doi: 10.3390/cells7030021.
- [208] M. Guha and N. G. Avadhani, 'Mitochondrial retrograde signaling at the crossroads of tumor bioenergetics, genetics and epigenetics', *Mitochondrion*, vol. 13, no. 6, pp. 577–591, Nov. 2013, doi: 10.1016/j.mito.2013.08.007.
- [209] J. B. Jones, J. J. Song, P. M. Hempen, G. Parmigiani, R. H. Hruban, and S. E. Kern, 'Detection of mitochondrial DNA mutations in pancreatic cancer offers a "mass"-ive advantage over detection of nuclear DNA mutations', *Cancer Res.*, vol. 61, no. 4, pp. 1299–1304, Feb. 2001.
- [210] W. Lu *et al.*, 'Novel Role of NOX in Supporting Aerobic Glycolysis in Cancer Cells with Mitochondrial Dysfunction and as a Potential Target for Cancer Therapy', *PLoS Biol.*, vol. 10, no. 5, p. e1001326, May 2012, doi: 10.1371/journal.pbio.1001326.
- [211] J. Yun *et al.*, 'Glucose Deprivation Contributes to the Development of KRAS Pathway Mutations in Tumor Cells', *Science*, vol. 325, no. 5947, pp. 1555–1559, Sep. 2009, doi: 10.1126/science.1174229.
- [212] H. Zubair *et al.*, 'Glucose Metabolism Reprogrammed by Overexpression of IKK ϵ Promotes Pancreatic Tumor Growth', *Cancer Res.*, vol. 76, no. 24, pp. 7254–7264, Dec. 2016, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1666.
- [213] Guo-Dong He, Yi Jiang, Bo Zhang, and Guo-Hao Wu, 'The Effect of HIF-1 α on Glucose Metabolism, Growth and Apoptosis of Pancreatic Cancerous Cells', *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, vol. 23, no. 1, Jan. 2014, doi: 10.6133/apjcn.2014.23.1.14.

- [214] C. M. Ardito *et al.*, 'EGF Receptor Is Required for KRAS-Induced Pancreatic Tumorigenesis', *Cancer Cell*, vol. 22, no. 3, pp. 304–317, Sep. 2012, doi: 10.1016/j.ccr.2012.07.024.
- [215] N. Abdel Hadi, G. Reyes-Castellanos, and A. Carrier, 'Targeting Redox Metabolism in Pancreatic Cancer', *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 4, p. 1534, Feb. 2021, doi: 10.3390/ijms22041534.
- [216] A. Y. Bobarykina *et al.*, 'Hypoxic regulation of PFKFB-3 and PFKFB-4 gene expression in gastric and pancreatic cancer cell lines and expression of PFKFB genes in gastric cancers', *Acta Biochim. Pol.*, vol. 53, no. 4, pp. 789–799, 2006.
- [217] T. Suzuki, M. Otsuka, T. Seimiya, T. Iwata, T. Kishikawa, and K. Koike, 'The biological role of metabolic reprogramming in pancreatic cancer', *MedComm*, vol. 1, no. 3, pp. 302–310, Dec. 2020, doi: 10.1002/mco2.37.
- [218] M. Hohenegger *et al.*, 'G_{sα}-selective G protein antagonists', *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 95, no. 1, pp. 346–351, Jan. 1998, doi: 10.1073/pnas.95.1.346.
- [219] M. T. Cherian, W. Lin, J. Wu, and T. Chen, 'CINPA1 is an inhibitor of constitutive androstane receptor that does not activate pregnane X receptor', *Mol. Pharmacol.*, vol. 87, no. 5, pp. 878–889, May 2015, doi: 10.1124/MOL.115.097782.
- [220] T. Wongwan, V. Chatsudthipong, and S. Soodvilai, 'Farnesoid X Receptor Activation Stimulates Organic Cations Transport in Human Renal Proximal Tubular Cells', *Int. J. Mol. Sci. Artic.*, doi: 10.3390/ijms21176078.
- [221] R. W. J. Helder, W. A. Boiten, R. van Dijk, G. S. Gooris, A. El Ghalbzouri, and J. A. Bouwstra, 'The effects of LXR agonist T0901317 and LXR antagonist GSK2033 on morphogenesis and lipid properties in full thickness skin models', *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1865, no. 2, p. 158546, Feb. 2020, doi: 10.1016/J.BBALIP.2019.158546.
- [222] H. Wang *et al.*, 'Activated pregnenolone X-receptor is a target for ketoconazole and its analogs', *Clin. Cancer Res.*, vol. 13, no. 8, pp. 2488–2495, 2007, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1592.
- [223] E. Mikó *et al.*, 'Lithocholic acid, a bacterial metabolite reduces breast cancer cell proliferation and aggressiveness', *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.*, vol. 1859, no. 9, pp. 958–974, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.bbabi.2018.04.002.
- [224] Z. Ma *et al.*, 'Serum metabolome and targeted bile acid profiling reveals potential novel biomarkers for drug-induced liver injury', *Medicine (Baltimore)*, vol. 98, no. 31, p. e16717, Aug. 2019, doi: 10.1097/MD.00000000000016717.
- [225] N. Liu, J. Zhao, J. Wang, H. Teng, Y. Fu, and H. Yuan, 'Farnesoid X receptor ligand CDCA suppresses human prostate cancer cells growth by inhibiting lipid metabolism via targeting sterol response element binding protein 1', *Am. J. Transl. Res.*, vol. 8, no. 11, pp. 5118–5124, 2016.
- [226] S. Joshi *et al.*, 'Bile acids-mediated overexpression of MUC4 via FAK-dependent c-Jun activation in pancreatic cancer', *Mol. Oncol.*, vol. 10, no. 7, pp. 1063–1077, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.molonc.2016.04.007.
- [227] J. L. Staudinger *et al.*, 'The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 6, pp. 3369–3374, Mar. 2001, doi: 10.1073/PNAS.051551698.
- [228] S. De Marino *et al.*, 'Hyodeoxycholic acid derivatives as liver X receptor α and G-protein-coupled bile acid receptor agonists', *Sci. Rep.*, vol. 7, no. October 2016, pp. 1–13, 2017, doi: 10.1038/srep43290.

- [229] J. Sun *et al.*, 'Lithocholic acid down-regulation of NF- κ B activity through vitamin D receptor in colonic cancer cells', *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 111, no. 1–2, pp. 37–40, 2008, doi: 10.1016/j.jsbmb.2008.01.003.
- [230] Z. Ni *et al.*, 'TGR5-HNF4 α axis contributes to bile acid-induced gastric intestinal metaplasia markers expression', *Cell Death Discov.*, vol. 6, no. 1, 2020, doi: 10.1038/s41420-020-0290-3.
- [231] T. Kovács *et al.*, 'The involvement of oncobiosis and bacterial metabolite signaling in metastasis formation in breast cancer', *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 40, no. 4, pp. 1223–1249, Dec. 2021, doi: 10.1007/s10555-021-10013-3.
- [232] D. Hanahan and R. A. Weinberg, 'Weinberg RA, Hanahan D. The hallmarks of cancer. Cell. 2000 Jan 7;100(1):57-70.', *Cell*, vol. 144, no. 5, 2011.
- [233] D. Hanahan, 'Hallmarks of Cancer: New Dimensions', *Cancer Discov.*, vol. 12, no. 1, pp. 31–46, Jan. 2022, doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
- [234] J. Tintelnot *et al.*, 'Microbiota-derived 3-IAA influences chemotherapy efficacy in pancreatic cancer', *Nature*, vol. 615, no. 7950, pp. 168–174, Mar. 2023, doi: 10.1038/S41586-023-05728-Y.
- [235] S. Ghosh *et al.*, 'Microbial metabolite restricts 5-fluorouracil-resistant colonic tumor progression by sensitizing drug transporters via regulation of FOXO3-FOXM1 axis', *Theranostics*, vol. 12, no. 12, pp. 5574–5595, 2022, doi: 10.7150/thno.70754.
- [236] S. Schwarcz, P. Nyerges, T. I. Bíró, E. Janka, P. Bai, and E. Mikó, 'Cytostatic Bacterial Metabolites Interfere with 5-Fluorouracil, Doxorubicin and Paclitaxel Efficiency in 4T1 Breast Cancer Cells', *Molecules*, vol. 29, no. 13, p. 3073, Jun. 2024, doi: 10.3390/molecules29133073.
- [237] M. Ducreux *et al.*, 'Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up', *Ann. Oncol.*, vol. 26, pp. v56–v68, Sep. 2015, doi: 10.1093/annonc/mdv295.
- [238] C. Springfield, P. Bailey, M. W. Büchler, and J. P. Neoptolemos, 'ESMO 2023 pancreatic cancer guidelines signal stepwise progress', *Hepatobiliary Surg. Nutr.*, vol. 13, no. 2, pp. 362–365, Apr. 2024, doi: 10.21037/hbsn-24-37.
- [239] J. W. Cook, E. L. Kennaway, and N. M. Kennaway, 'Production of tumours in mice by deoxycholic acid [10]', *Nature*, vol. 145, no. 3677, p. 627, 1940, doi: 10.1038/145627a0.
- [240] A. F. Hofmann, 'Detoxification of lithocholic acid, a toxic bile-acid: Relevance to drug hepatotoxicity', *Drug Metab. Rev.*, vol. 36, no. 3–4, pp. 703–722, 2004, doi: 10.1081/DMR-200033475.
- [241] S. Joshi *et al.*, 'Bile acids-mediated overexpression of MUC4 via FAK-dependent c-Jun activation in pancreatic cancer', *Mol. Oncol.*, vol. 10, no. 7, pp. 1063–1077, Aug. 2016, doi: 10.1016/J.MOLONC.2016.04.007.
- [242] S. Zhu *et al.*, 'A high bile acid environment promotes apoptosis and inhibits migration in pancreatic cancer', *Bioengineered*, vol. 13, no. 3, pp. 6719–6728, 2022, doi: 10.1080/21655979.2022.2045823.
- [243] Y. J. Kim, S. H. Jeong, E. K. Kim, E. J. Kim, and J. H. Cho, 'Ursodeoxycholic acid suppresses epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell formation by reducing the levels of peroxiredoxin II and reactive oxygen species in pancreatic cancer cells', *Oncol. Rep.*, vol. 38, no. 6, pp. 3632–3638, 2017, doi: 10.3892/or.2017.6045.

- [244] J. Kondo *et al.*, 'Claudin-1 expression is induced by tumor necrosis factor- α in human pancreatic cancer cells', *Int. J. Mol. Med.*, vol. 22, no. 5, pp. 645–649, Nov. 2008, doi: 10.3892/IJMM_00000067.
- [245] A. A. Bhat *et al.*, 'Claudin-1 , A Double-Edged Sword in Cancer', pp. 1–24, 2020.
- [246] P. Zhou *et al.*, 'The epithelial to mesenchymal transition (EMT) and cancer stem cells: Implication for treatment resistance in pancreatic cancer', *Mol. Cancer*, vol. 16, no. 1, pp. 1–11, 2017, doi: 10.1186/s12943-017-0624-9.
- [247] C. Qin *et al.*, 'Metabolism of pancreatic cancer: Paving the way to better anticancer strategies', *Mol. Cancer*, vol. 19, no. 1, pp. 1–19, 2020, doi: 10.1186/s12943-020-01169-7.
- [248] Y. S. Wu, C. Y. Looi, K. S. Subramaniam, A. Masamune, and I. Chung, 'Soluble factors from stellate cells induce pancreatic cancer cell proliferation via Nrf2-activated metabolic reprogramming and ROS detoxification', *Oncotarget*, vol. 7, no. 24, pp. 36719–36732, 2016, doi: 10.18632/oncotarget.9165.
- [249] L. Zhang *et al.*, 'Reactive Oxygen Species and Targeted Therapy for Pancreatic Cancer', *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2016, 2015, doi: 10.1155/2016/1616781.
- [250] J. J. Qin, X. D. Cheng, J. Zhang, and W. D. Zhang, 'Dual roles and therapeutic potential of Keap1-Nrf2 pathway in pancreatic cancer: A systematic review', *Cell Commun. Signal.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–15, 2019, doi: 10.1186/s12964-019-0435-2.
- [251] K. Smolková, E. Mikó, T. Kovács, A. Leguina-Ruzzi, A. Sipos, and P. Bai, 'Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in regulating cancer metabolism', *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 33, no. 13, pp. 966–997, 2020, doi: 10.1089/ars.2020.8024.
- [252] K. Wang *et al.*, 'Expression of vitamin D receptor as a potential prognostic factor and therapeutic target in pancreatic cancer', *Histopathology*, vol. 67, no. 3, pp. 386–397, Sep. 2015, doi: 10.1111/HIS.12663.
- [253] M. H. Sherman *et al.*, 'Vitamin D receptor-mediated stromal reprogramming suppresses pancreatitis and enhances pancreatic cancer therapy', *Cell*, vol. 159, no. 1, pp. 80–93, Sep. 2014, doi: 10.1016/J.CELL.2014.08.007.
- [254] D. Wei *et al.*, 'Activation of Vitamin D/VDR Signaling Reverses Gemcitabine Resistance of Pancreatic Cancer Cells Through Inhibition of MUC1 Expression', *Dig. Dis. Sci.*, 2023, doi: 10.1007/S10620-023-07931-3.
- [255] Z. Li *et al.*, 'Activation of vitamin D receptor signaling downregulates the expression of nuclear FOXM1 protein and suppresses pancreatic cancer cell stemness', *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 21, no. 4, pp. 844–853, Feb. 2015, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2437.
- [256] J. Y. Lee *et al.*, 'Farnesoid X receptor, overexpressed in pancreatic cancer with lymph node metastasis promotes cell migration and invasion', *Br. J. Cancer*, vol. 104, no. 6, p. 1027, Mar. 2011, doi: 10.1038/BJC.2011.37.
- [257] C. Giaginis *et al.*, 'Elevated Farnesoid X Receptor (FXR) and Retinoid X Receptors (RXRs) expression is associated with less tumor aggressiveness and favourable prognosis in patients with pancreatic adenocarcinoma', *Neoplasma*, vol. 62, no. 2, pp. 332–341, 2015, doi: 10.4149/NEO_2015_040.
- [258] T. Režen *et al.*, 'The role of bile acids in carcinogenesis', *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, vol. 79, no. 5, May 2022, doi: 10.1007/S00018-022-04278-2.
- [259] R. A. Haeusler, B. Astiarraga, S. Camastra, D. Accili, and E. Ferrannini, 'Human Insulin Resistance Is Associated With Increased Plasma Levels of 12 α -Hydroxylated Bile Acids', doi: 10.2337/db13-0639.

- [260] T. Li *et al.*, 'Glucose and insulin induction of bile acid synthesis: mechanisms and implication in diabetes and obesity', *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 3, pp. 1861–1873, Jan. 2012, doi: 10.1074/JBC.M111.305789.
- [261] X. Xie *et al.*, 'Increased circulating total bile acid levels were associated with organ failure in patients with acute pancreatitis', *BMC Gastroenterol.*, vol. 20, no. 1, pp. 1–10, Jul. 2020, doi: 10.1186/S12876-020-01243-W/FIGURES/2.
- [262] X. Luo, J. Liu, H. Wang, and H. Lu, 'Metabolomics identified new biomarkers for the precise diagnosis of pancreatic cancer and associated tissue metastasis', *Pharmacol. Res.*, vol. 156, Jun. 2020, doi: 10.1016/J.PHRS.2020.104805.
- [263] A. Martín-Blázquez *et al.*, 'Discovery of Pancreatic Adenocarcinoma Biomarkers by Untargeted Metabolomics', *Cancers*, vol. 12, no. 4, Apr. 2020, doi: 10.3390/CANCERS12041002.
- [264] I. M. Di Gangi *et al.*, 'Metabolomic profile in pancreatic cancer patients: a consensus-based approach to identify highly discriminating metabolites', *Oncotarget*, vol. 7, no. 5, pp. 5815–5829, 2016, doi: 10.18632/ONCOTARGET.6808.
- [265] D. O. Rees *et al.*, 'Comparison of the composition of bile acids in bile of patients with adenocarcinoma of the pancreas and benign disease', *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 174, pp. 290–295, 2017, doi: 10.1016/j.jsbmb.2017.10.011.
- [266] Z. Yao *et al.*, 'Ursodeoxycholic Acid Inhibits Glioblastoma Progression via Endoplasmic Reticulum Stress Related Apoptosis and Synergizes with the Proteasome Inhibitor Bortezomib', *ACS Chem. Neurosci.*, vol. 11, no. 9, pp. 1337–1346, May 2020, doi: 10.1021/acscchemneuro.0c00095.
- [267] I. Fonseca *et al.*, 'Tauroursodeoxycholic Acid Protects Against Mitochondrial Dysfunction and Cell Death via Mitophagy in Human Neuroblastoma Cells', *Mol. Neurobiol.*, vol. 54, no. 8, pp. 6107–6119, Oct. 2017, doi: 10.1007/s12035-016-0145-3.
- [268] W. S. Lee *et al.*, 'Ursodeoxycholic Acid Induces Death Receptor-mediated Apoptosis in Prostate Cancer Cells', *J. Cancer Prev.*, vol. 22, no. 1, pp. 16–21, Mar. 2017, doi: 10.15430/JCP.2017.22.1.16.
- [269] H. Yu *et al.*, 'Apoptosis induced by ursodeoxycholic acid in human melanoma cells through the mitochondrial pathway', *Oncol. Rep.*, Oct. 2018, doi: 10.3892/or.2018.6828.
- [270] H. Liu, 'Mechanism of apoptotic effects induced selectively by ursodeoxycholic acid on human hepatoma cell lines', *World J. Gastroenterol.*, vol. 13, no. 11, p. 1652, 2007, doi: 10.3748/wjg.v13.i11.1652.
- [271] H. Liu, 'Ursodeoxycholic acid induces apoptosis in hepatocellular carcinoma xenografts in mice', *World J. Gastroenterol.*, vol. 21, no. 36, p. 10367, 2015, doi: 10.3748/wjg.v21.i36.10367.
- [272] L. Pang, X. Zhao, W. Liu, J. Deng, X. Tan, and L. Qiu, 'Anticancer Effect of Ursodeoxycholic Acid in Human Oral Squamous Carcinoma HSC-3 Cells through the Caspases', *Nutrients*, vol. 7, no. 5, pp. 3200–3218, May 2015, doi: 10.3390/nu7053200.
- [273] C. Fimognari, M. Lenzi, G. Cantelli-Forti, and P. Hrelia, 'Apoptosis and Modulation of Cell Cycle Control by Bile Acids in Human Leukemia T Cells', *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1171, no. 1, pp. 264–269, Aug. 2009, doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04710.x.

- [274] Y.-C. Wu, C.-F. Chiu, C.-T. Hsueh, and C.-T. Hsueh, 'The role of bile acids in cellular invasiveness of gastric cancer', *Cancer Cell Int.*, vol. 18, no. 1, p. 75, Dec. 2018, doi: 10.1186/s12935-018-0569-0.
- [275] A. Goldman *et al.*, 'Protective effects of glycooursodeoxycholic acid in Barrett's esophagus cells', *Dis. Esophagus*, vol. 23, no. 2, pp. 83–93, Feb. 2010, doi: 10.1111/j.1442-2050.2009.00993.x.
- [276] S. Peng *et al.*, 'In Barrett's esophagus patients and Barrett's cell lines, ursodeoxycholic acid increases antioxidant expression and prevents DNA damage by bile acids', *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 307, no. 2, pp. G129–G139, Jul. 2014, doi: 10.1152/ajpgi.00085.2014.
- [277] M. M. Abdel-Latif, H. Inoue, and J. V. Reynolds, 'Opposing effects of bile acids deoxycholic acid and ursodeoxycholic acid on signal transduction pathways in oesophageal cancer cells', *Eur. J. Cancer Prev.*, vol. 25, no. 5, pp. 368–379, Sep. 2016, doi: 10.1097/CEJ.000000000000198.
- [278] E.-K. Kim, J. H. Cho, E. Kim, and Y. J. Kim, 'Ursodeoxycholic acid inhibits the proliferation of colon cancer cells by regulating oxidative stress and cancer stem-like cell growth', *PLOS ONE*, vol. 12, no. 7, p. e0181183, Jul. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0181183.
- [279] P. Kovács *et al.*, 'Lithocholic Acid, a Metabolite of the Microbiome, Increases Oxidative Stress in Breast Cancer', *Cancers*, vol. 11, no. 9, p. 1255, Aug. 2019, doi: 10.3390/cancers11091255.
- [280] S. Schwarcz *et al.*, 'The bacterial metabolite, lithocholic acid, has antineoplastic effects in pancreatic adenocarcinoma', *Cell Death Discov.*, vol. 10, no. 1, p. 248, May 2024, doi: 10.1038/s41420-024-02023-1.
- [281] D. M. Booth *et al.*, 'Reactive Oxygen Species Induced by Bile Acid Induce Apoptosis and Protect Against Necrosis in Pancreatic Acinar Cells', *Gastroenterology*, vol. 140, no. 7, pp. 2116–2125, Jun. 2011, doi: 10.1053/j.gastro.2011.02.054.
- [282] A. Sipos *et al.*, 'The role of the microbiome in ovarian cancer: mechanistic insights into oncobiogenesis and to bacterial metabolite signaling', *Mol. Med.*, vol. 27, no. 1, p. 33, Dec. 2021, doi: 10.1186/s10020-021-00295-2.
- [283] P. Sancho *et al.*, 'MYC/PGC-1 α Balance Determines the Metabolic Phenotype and Plasticity of Pancreatic Cancer Stem Cells', *Cell Metab.*, vol. 22, no. 4, pp. 590–605, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.cmet.2015.08.015.
- [284] E. M. De Francesco, F. Sotgia, and M. P. Lisanti, 'Cancer stem cells (CSCs): metabolic strategies for their identification and eradication', *Biochem. J.*, vol. 475, no. 9, pp. 1611–1634, May 2018, doi: 10.1042/BCJ20170164.
- [285] V. Sigurdsson *et al.*, 'Induction of blood-circulating bile acids supports recovery from myelosuppressive chemotherapy', *Blood Adv.*, vol. 4, no. 9, pp. 1833–1843, May 2020, doi: 10.1182/BLOODADVANCES.2019000133.
- [286] S. Iwahashi *et al.*, 'Effect of histone deacetylase inhibitor in combination with 5-fluorouracil on pancreas cancer and cholangiocarcinoma cell lines', *J. Med. Invest.*, vol. 58, no. 1–2, 2011, doi: 10.2152/jmi.58.106.
- [287] L. T. Geller *et al.*, 'Potential role of intratumor bacteria in mediating tumor resistance to the chemotherapeutic drug gemcitabine', *Science*, vol. 357, no. 6356, pp. 1156–1160, Sep. 2017, doi: 10.1126/science.aah5043.

- [288] L. T. Geller and R. Straussman, 'Intratumoral bacteria may elicit chemoresistance by metabolizing anticancer agents', *Mol. Cell. Oncol.*, vol. 5, no. 1, p. e1405139, Jan. 2018, doi: 10.1080/23723556.2017.1405139.
- [289] Y. Fan *et al.*, 'Changes in the gut microbiota structure and function in rats with doxorubicin-induced heart failure', *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 13, p. 1135428, Apr. 2023, doi: 10.3389/fcimb.2023.1135428.
- [290] Z. Tian *et al.*, 'Cisplatin and doxorubicin chemotherapy alters gut microbiota in a murine osteosarcoma model', *Aging*, vol. 16, no. 2, pp. 1336–1351, Jan. 2024, doi: 10.18632/aging.205428.
- [291] S. Lee *et al.*, 'Synergistic effect of ursodeoxycholic acid on the antitumor activity of sorafenib in hepatocellular carcinoma cells via modulation of STAT3 and ERK', *Int. J. Mol. Med.*, vol. 42, no. 5, pp. 2551–2559, Nov. 2018, doi: 10.3892/IJMM.2018.3807.
- [292] S. Ghosh *et al.*, 'Microbial metabolite restricts 5-fluorouracil-resistant colonic tumor progression by sensitizing drug transporters via regulation of FOXO3-FOXM1 axis', *Theranostics*, vol. 12, no. 12, pp. 5574–5595, 2022, doi: 10.7150/thno.70754.
- [293] W. Wei *et al.*, 'Microbiota-Derived Tryptophan Metabolite Indole-3-Acetic Acid Improves Chemoresistance in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma', *Pancreas*, vol. 52, no. 5, pp. e305–e306, May 2023, doi: 10.1097/MPA.0000000000002251.
- [294] T. Ikegami, Y. Matsuzaki, M. Al Rashid, S. Ceryak, Y. Zhang, and B. Bouscarel, 'Enhancement of DNA topoisomerase I inhibitor-induced apoptosis by ursodeoxycholic acid', *Mol. Cancer Ther.*, vol. 5, no. 1, pp. 68–79, Jan. 2006, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0107.
- [295] B. W. H. van Heumen, H. M. J. Roelofs, R. H. M. Te Morsche, B. Marian, F. M. Nagengast, and W. H. M. Peters, 'Celecoxib and tauro-ursodeoxycholic acid co-treatment inhibits cell growth in familial adenomatous polyposis derived LT97 colon adenoma cells', *Exp. Cell Res.*, vol. 318, no. 7, pp. 819–827, Apr. 2012, doi: 10.1016/J.YEXCR.2012.02.004.

11. Tágyszavak

Litokólsav

Lithocholic acid

Ursodezoxikólsav

Ursodeoxycholic acid

Hasnyálmirigy adenokarcinóma

Pancreatic adenocarcinoma

Mikrobiom

Microbiome

Onkobiom

Oncobiome

Epiteliális-mezenchimális tranzíció

Epithelial-Mesenchymal Transition

Oxidatív stressz

Oxidative stress

Őssejtszerűség

Stemness

Sejtmetabolizmus

Cell metabolism

12. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném kifejezni legmélyebb hálámat és őszinte köszönetemet témavezetőmnek, Kapitányné Dr. Mikó Editnek, aki szakmai útmutatásával, türelmével és inspiráló támogatásával meghatározó szerepet játszott doktori munkám elkészítésében. Kivételes szakmai tudása és mindig segítőkész hozzáállása, iránymutatása, embersége és biztató szavai is sokat jelentettek számomra e hosszú és kihívásokkal teli úton. Külön hálával tartozom amiért mindvégig szem előtt tartotta, nem csak a kutatás, de az én személyes érdekeimet is.

Hálával tartozom Prof. Dr. Bay Péternek amiért biztosította a kutatáshoz szükséges feltételeket és szakmai támogatásával végig kísérte a munkámat, továbbá Prof. Dr. Virág László intézetigazgatónak, hogy lehetőséget nyújtott a kutatásom megvalósításához az Orvosi Vegytani Intézetben.

Köszönöm Dr. Kovács Patriknak, Nyerges Petrának, Bíró Tímeának és a munkacsoportunk összes tagjának a szakmai segítséget, amit munkám során nyújtottak.

Külön szeretném megköszönni Rauch Boglárkának, Dr. Ujlaki Gyulának és Finta Lászlónak, hogy nem csak szakmailag, de barátként is végig támogatták és segítettek munkámat.

Végül szeretném megköszönni a családomnak, és barátaimnak, akiknek szeretete, türelme és kitartó támogatása nélkül ez az értekezés nem születhetett volna meg. Köszönöm **édesanyámnak** és **édesapámnak**, hogy mindig hittek bennem, példát mutattak kitartásból, és minden helyzetben mellettem álltak. Köszönöm **testvéreimnek**, hogy biztatásukkal segítettek átlendülni a nehezebb időszakokon.

Hálás vagyok a férjemnek, **Schwarz Tibornak**, aki türelemmel, megértéssel és szeretettel kísért végig ezen az úton. Végül, de nem utolsósorban, köszönöm kislányomnak, **Schwarz Izabellának**, aki szeretetével és pusztja jelenlétével nap mint nap emlékeztetett arra, miért érdemes kitartani és haladni előre. Ő a legnagyobb inspirációm.

13. Publikációs lista



**DEBRECENI
EGYETEM**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/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.



14. Függelék

A függelék az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatait tartalmazza: