

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**  
**Autofágiás mechanizmusok tanulmányozása**  
**patológias elváltozásokban és azok terápiás**  
**lehetőségei**

Dr. Tósaki Ágnes

Témavezető: Dr. Szabó Erzsébet, PhD



DEBRECENI EGYETEM  
Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2026

# **Autofágiás mechanizmusok tanulmányozása patológiás elváltozásokban és azok terápiás lehetőségei**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta: Dr. Tósaki Ágnes, bőrgyógyász szakorvos

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok doktori iskolája,  
(Farmakológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Szabó Erzsébet, PhD

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Juhász Béla, MTA doktora

Dr. Dér Péter, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Vecsernyés Miklós, PhD

tagok: Prof. Dr. Juhász Béla, MTA doktora

Dr. Dér Péter, PhD

Dr. Szendrei Levente, PhD

Dr. Kertész Attila, PhD

Az értekezés védésének helye és időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet  
„A” épület tanterme, 2026. március 2., 13 óra

## Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés.....	4
2.	Célkitűzés .....	5
3.	Anyagok és módszerek I.....	6
3.1.	Vegyületek.....	6
3.2.	Kísérleteinkhez alkalmazott sejt kultúrák .....	6
3.3.	LDH citotoxicitási assay nem malignus eredetű sejteken.....	7
3.4.	Sejtproliferációs aktivitás meghatározása WM35, A2058 és WM3000 sejteken LE-127/2, CBG és vemurafenib kezelés hatására .....	7
3.5.	A sejtek kolóniaképző képességének vizsgálata .....	8
3.6.	Fehérje izolálás és BCA protein assay .....	8
3.6.1.	Az autofágia array kivitelezése .....	9
3.6.2.	A fehérje expresszió vizsgálata Western blot módszerrel.....	9
3.6.3.	LC-3 expresszió detektálása melanóma sejtekben immunfluoreszcens jelöléssel....	10
3.7.	Statisztikai analízis .....	10
4.	Anyagok és módszerek II. ....	10
4.1.	Sejt kultúrán végzett vizsgálatok .....	10
4.2.	Hipertrófia indukálása H9c2 kardiomioblaszt sejtekben.....	11
4.3.	Sejtfelszín (sejt méret) meghatározása .....	11
4.4.	Sejtéletképesség vizsgálata.....	12
4.5.	HO-1 fehérje expresszió meghatározása H9c2 sejtekben.....	12
4.6.	Western blot vizsgálatok (in vitro és in vivo) .....	12
4.7.	A HO-1 expresszió stimulációja in vivo körülmények között .....	13
4.8.	Statisztikai elemzés .....	13
5.	Eredmények I.....	13
5.1.	Az LE-127/2 és a CBG anyavegyület citotoxicitásának vizsgálata LDH mérésen alapuló assay-vel .....	13
5.2.	Az LE-127/2, CBG és a Vemurafenib citotoxikus hatásának összehasonlítása és vizsgálata melanóma sejtvonalakon .....	14
5.4.	Fehérje expresszió analízise.....	16
5.4.1.	A humán autofágia array eredményeinek értékelése.....	16
5.4.2.	Az LC3, p62, a Beclin-1 és az Atg12 expressziójának megerősítése Western blottal	

5.4.3.	Egyéb autofágia fehérjék detektálása LE-127/2 kezelés hatására.....	17
5.4.4.	Az LE-127/2 kezelés hatása a HO-1 expresszió szintjére.....	18
5.4.5.	Apoptotikus fehérjék vizsgálata.....	18
6.	Eredmények II. ....	19
6.1.	Sejtfelszín változása kezelések hatására.....	19
6.2.	Sejttúlélés (%) vizsgálata H9c2 kardiomioblaszt sejteken .....	19
6.4.	Hemoxigenáz-1 (HO-1) szint a plazmában és Western blot analízis in vivo kísérletekben, patkány kardiomioblaszt sejt típuson szívszövetből.....	20
7.	Új megállapítások .....	22
8.	Összegzés .....	23
9.	Köszönetnyilvánítás .....	25

## 1. Bevezetés

A szív- és érrendszeri, valamint daganatos megbetegedések a vezető halálokok közé tartoznak világszerte, beleértve Magyarországot is. Az átlagéletkor növekedésével ezek megelőzése, korai felismerése és kezelése kiemelt kihívást jelent. Bár klinikai megjelenésük eltérő, számos közös pathomechanizmus jellemzi őket, mint a krónikus gyulladás, oxidatív stressz, elhízás, egészségtelen életmód és genetikai hajlam. A sejt szintű mechanizmusok közül kiemelkedő az autofágia és az apoptózis szerepe. Az autofágia fenntartja a sejthomeosztázist, eltávolítja a sérült organelleket és fehérjéket, támogatva a szív működését, ugyanakkor szabályozatlan aktivációja patológias folyamatokhoz vezethet. A daganatsejtekben az autofágia kettős szerepet játszik: egyrészt tumorszuppresszorként, másrészt a túlélés és terápiás rezisztencia elősegítőjeként működik.

Bár az elmúlt évtizedekben előrelépés történt a diagnózis, a megelőzés és a kezelés terén, ezek a betegségek továbbra is jelentős halálozást okoznak. Az egészségügyi ellátás célja a megelőzés, de manifestált betegség esetén a lehető leghatékonyabb, minimális mellékhatással járó terápia alkalmazása kívánatos. A prevenció költséghatékonysága jelentős, mivel hosszú távon sokkal kevesebb ráfordítást igényel, mint az előrehaladott krónikus betegségek kezelése.

A kardiovaszkuláris és daganatos betegségek számos ponton összefonódnak, ezért komplex, multidiszciplináris szemlélet szükséges a terápiák meghatározása során.

A kután melanóma az egyik legagresszívebb bőrdaganat, magas metasztatikus potenciállal és kedvezőtlen túléléssel. A prognózis nagymértékben függ a korai felismeréstől és a megfelelő terápiás stratégiák alkalmazásától. A hagyományos kezelések – sebészet, sugárkezelés, kemoterápia – mellett a célzott terápiák jelentős előrelépést hoztak, de az előrehaladott melanóma túlélése továbbra is kedvezőtlen. Egyre nagyobb figyelmet kapnak a természetes bioaktív vegyületek, például flavonoidok, szaponinok és kannabinoidok, köztük a nem pszichotróp kannabigerol (CBG), amely melanóma sejtekben is daganatellenes hatásokat mutat, alkalmazása viszont alacsony biohasznosulása és rossz vízoldékonysága miatt háttérbe szorul. A jelen munka kiemelten a melanóma sejtvonalakon végzett in vitro vizsgálatokat foglalja össze, különös tekintettel egy új szintetikus CBG-származékra, amely potenciálisan áthidalhatja a jelenlegi terápiás korlátokat.

A kardiovaszkuláris betegségek esetében a patológias kardiomiocita hipertrófia központi jelentőségű, és összefügg a szívinfarktussal, az iszkémia–reperfúziós károsodással és az infarktust követő szívfunkció romlással. A dolgozat második részében az endotelin-1 által

kiváltott hipertrófiás elváltozások és a hemoxigenáz-1 expressziójának változásai kerülnek bemutatásra béta-ösztadiol hatására, in vitro és in vivo modellekben.

Kutatásaim során a hangsúly elsősorban azon a megközelítésen van, hogy a daganatos és kardiovaszkuláris betegségek prevenciójában és terápiájában a gyógyszeres kezelések mellett az életmódbeli és egyéb nem farmakológiai módszerek is kulcsszerepet játszanak.

## 2. Célkitűzés

A daganatos és kardiovaszkuláris betegségek jelentős civilizációs kórképek, melyeket komplex molekuláris mechanizmusok irányítanak. Jelen dolgozat célja két látszólag különálló, ugyanakkor összekapcsolódó patológiai folyamat vizsgálata in vitro és in vivo modellek segítségével.

Az LE-127/2 kannabigerol származék daganatellenes hatásának vizsgálata

Az értekezés első része a humán melanóma sejtvonalakban egy új, szintetikus kannabigerol (CBG) származék, az LE-127/2 antitumor aktivitását mutatja be. A természetes CBG, amely nem pszichotróp fitokannabinoid daganatellenes hatással rendelkezik, de alacsony oldhatósága és biológiai hozzáférhetősége korlátozza annak terápiás alkalmazhatóságát. A szintetikus származékok, köztük az LE-127/2, ezeket a korlátokat leküzdik a fokozott terápiás hatékonyságot.

A vizsgálat fő céljai:

- A melanóma sejtek proliferációjának és életképességének értékelése LE-127/2 hatására
- Az apoptózis és autofágia indukciójának vizsgálata
- Klasszikus autofágia-markerek (LC3-I/II, Beclin-1, p62/SQSTM1) modulációjának feltérképezése.
- Az apoptózis és autofágia kölcsönhatásának vizsgálata segít megérteni a CBG-származékok molekuláris mechanizmusát, így új prognosztikai vagy terápiás célpontok azonosítását teheti lehetővé.
- ET-1 által indukált szívizom hipertrófia és HO-1 kapcsolatának vizsgálata

A második rész az endotelin-1 (ET-1) által kiváltott szívizom hipertrófiát vizsgálja.

A vizsgálatok során a hemoxigenáz-1 (HO-1) enzimre fókuszáltunk, amely sejtvédő szerepet tölt be, és kardiális stressz hatására kifejeződése csökken.

Célok:

- Az ET-1 hatásának vizsgálata a sejtméretre, életképességre és a HO-1 szintjére.
- Annak felmérése, hogy a  $\beta$ -ösztadiol ( $\beta$ -E) képes-e ellensúlyozni a hipertróf változásokat HO-1 modulációján keresztül.
- A célzott HO-1-indukció terápiás potenciáljának feltárása.

A dolgozat célja a daganatos és kardiovaszkuláris betegségek sejtszintű mechanizmusainak feltárása. Az LE-127/2 daganatellenes hatásainak és a HO-1 szabályozás vizsgálata ígéretes lehetőségeket jelez új terápiás célpontok azonosítására, valamint a civilizációs betegségek hatékonyabb kezelésének jövőbeni fejlesztésére.

### **3. Anyagok és módszerek I.**

#### **3.1. Vegyületek**

Kísérleteinkhez összehasonlítási célból, mint referenciát a kannabigerolt (CBG; CBDepot s.r.o., Teplice, Csehország) alkalmaztunk, mint kiindulási anyavegyületet, amelyből az LE-127/2 vegyületet – a CBG bisz-N-butyl-dihydro-1,3-oxazin származékát – a CBG, n-butylamin és formaldehid reakciójával, Mannich-típusú reakció útján szintetizáltuk, Lőrincz és munkatársai által közölt (2023) módszer alapján.

A Vemurafenib-et (PLX4032, kereskedelmi néven Zelboraf; a B-Raf enzim szelektív inhibitora, > 98%-os tisztaság) a Mercktől (Merck, Darmstadt, Németország) szereztük be. A vizsgált vegyületek törzsoldatait dimetil-szulfoxidban (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MS, USA) készítettük el, majd -20 °C-on tároltuk alkalmazásig. A sejtenyészési kísérletek során a törzsoldatokat sejtenyészítő médiummal hígítottuk és 1,25  $\mu$ M és 80  $\mu$ M közötti tartományban alkalmaztuk a sejteken történő vizsgálatokhoz.

#### **3.2. Kísérleteinkhez alkalmazott sejtkultúrák**

A kísérletek során WM35, A2058 (CRL-3601) és WM3000 (WM3000–01–0001) humán kután melanóma sejtvonalakat használtunk. Az LE-127/2 vegyület citotoxikus hatásának vizsgálatához laktát-dehidrogenáz (LDH) alapú citotoxicitási tesztet végeztünk nem malignus, humán eredetű epidermális keratinocita sejtvonalon (HaCaT).

Annak érdekében, hogy feltérképezzük az LE-127/2 esetleges citotoxikus hatását egyéb, nem hámeredetű nem malignus sejtvonalakon is, patkány eredetű H9c2 kardiomioblaszt, valamint egér eredetű NIH-3T3 fibroblaszt sejtvonalakat is használtunk, amelyeken úgyszintén elvégeztük az LDH citotoxicitási vizsgálatot.

A sejtek tenyésztése DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Biosera, Cholet, Franciaország) sejttenyésztő médiumban történt, amelyet 10% magzati szarvasmarha szérummal (FBS; Biosera, Cholet, Franciaország), valamint antibiotikumokkal (100 U/mL penicillin és 100 µg/mL streptomycin) egészítettünk ki. A sejteket 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> / 95% levegő arányú, párasított inkubátorban tartottuk fenn a következő passzálásig és a kísérletek során.

Megemlítendő, hogy az A2058 és WM35 melanóma sejtvonalak BRAF mutációt hordoznak, míg a WM3000 egy metasztatikus melanóma sejtvonal, amely az N-RAS gén 61. pozíciójában Q61R mutációt tartalmaz. Mindhárom sejtvonal erőteljes invazív növekedést mutat, azonban mindhármat összevetve a WM35 proliferációs rátája a legalacsonyabb.

### **3.3. LDH citotoxicitási assay nem malignus eredetű sejteken**

Az LE-127/2 és annak anyavegyülete, a CBG citotoxikus hatásának vizsgálatához humán HaCaT, patkány eredetű H9c2 kardiomioblaszt, valamint egér eredetű NIH-3T3 fibroblaszt nem malignus sejtvonalakat használtunk. A sejteket  $6 \times 10^3$  sejt/lyuk számban növesztettük 96 lyukú plate-en, majd növekvő koncentrációjú LE-127/2-t vagy CBG-t tartalmazó oldattal inkubáltuk őket (1,25 µM – 80 µM) 24–72 órán keresztül.

A CyQUANT™ LDH Citotoxicitási Assay-t (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) alkalmaztuk a sejthalál detektálására, amely színreakción alapuló eljárással méri a sejtekből a médiumba felszabaduló laktát-dehidrogenáz (LDH) mennyiségét. A vizsgálat során a kezeletlen kontroll- és kezelt sejtek médiumából mintákat vettünk 24, 48 és 72 óra elteltével, majd pedig minden egyes lyukhoz hozzáadtuk a kithoz mellékelt reakciókeveréket. A reakciót 30 perces inkubáció után leállítottuk, majd az abszorbanciát 490 nm-es hullámhosszon mértük mikroplate alapú spektrofotométeren (Fluostar OPTIMA - BMG Labtech, Offenburg, Németország).

### **3.4. Sejtproliferációs aktivitás meghatározása WM35, A2058 és WM3000 sejteken LE-127/2, CBG és vemurafenib kezelés hatására**

A sejtek proliferációs aktivitását a CellTiter-Blue® sejtproliferációs módszerrel (Promega, Madison, WI, USA) határoztuk meg, amely az élő sejtek azon képességén alapul, hogy egy redoxfestéket (rezazurin) fluoreszcens terméké (rezorufin) alakítanak. Az életképtelen sejtek, amelyek elveszítik metabolikus aktivitásukat, nem képesek fluoreszcens jelet generálni.

A WM35, A2058 és WM3000 melanóma sejtvonalakat  $6 \times 10^3$  sejt/lyuk sűrűségben raktuk ki, majd 24 órán keresztül inkubáltuk őket a kezelések megkezdése előtt. Ezt követően a sejteket növekvő koncentrációjú (2,5 µM – 80 µM) LE-127/2 - el, CBG-el, illetve vemurafenib-el kezeltük. A kontrollcsoportok olyan médiumot kaptak, amely csak DMSO-t tartalmazott a

vegyületek helyett (abban a legmagasabb koncentrációban, amely az adott vegyület esetében is a legmagasabb koncentráció volt, így tudjuk mérni, hogy az általunk észlelt hatás nem a DMSO-ra adott válasza a sejteknek).

A kezeléseket 24–72 órán keresztül végeztük 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> / 95% levegő arányú, párasított inkubátorban, majd a sejtproliferáció mértékét 24 óránként detektáltuk. Minden mérés előtt a médiumot eltávolítottuk a lyukakból, és friss, vegyületmentes médiummal helyettesítettük, majd a gyártó leírása alapján CellTiter-Blue reagenst adtunk a sejtekhez, ezt követően a sejteket még további 2 órán át inkubáltuk 37 °C-on.

A fluoreszcencia intenzitását 560 nm gerjesztési és 590 nm emissziós hullámhosszon detektáltuk a Fluostar OPTIMA (BMG Labtech, Offenburg, Németország) készülékkel.

### **3.5. A sejtek kolóniaképző képességének vizsgálata**

Egysejtes szuszpenzió előállítását követően a sejteket  $6 \times 10^3$  sejt/lyuk sűrűségben tenyésztettük 6 lyukú plate-en. A sejteket a kitapadást követően növekvő koncentrációjú LE-127/2-vel (5–80  $\mu$ M) kezeltük. A kontroll csoportot teljes sejtenyészítő médiumban inkubáltuk, amely 0,01% DMSO-t tartalmazott. Az LE-127/2-t tartalmazó médiumot minden harmadik napon friss, azonos koncentrációjú oldatra cseréltük le. A kezelést 14 nap után megszakítottuk, majd a sejteket jéghideg foszfátpufferes sóoldattal (PBS) mostuk át. Ezt követően a sejteket metanol-ecetsav (3:1 arányú) keverékében fixáltuk, majd a lemezeket 0,1%-os kristályibolya oldattal (Crystal Violet, Sigma-Aldrich, St. Louis, MS, USA) festettük 10-15 percen keresztül, 25 °C-on. A felesleges festéket desztillált vízzel lemossuk, majd a lemezeket szobahőmérsékleten kiszárítottuk. A festett kolóniákat fotókkal dokumentáltuk, majd a sejtkolóniákat 2%-os nátrium-dodecil-szulfát (SDS) oldatban reszuszpendáltuk a kvantifikációhoz. Az abszorbancia mérését 570 nm-en végeztük a BioTek mikroplate olvasó rendszerrel (BioTek, Winooski, VT, USA).

### **3.6. Fehérje izolálás és BCA protein assay**

A fehérje izoláláshoz a sejteket sejtkaparóval gyűjtöttük össze jéghideg lízis pufferben (M-PER szöveti lízis kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), amelyhez proteáz- és foszfátáz-inhibitorokat adtunk. A sejlízist jégen, 30 percen keresztül végeztük, majd a mintákat 20 000 rpm fordulatszámon, 4 °C-on további 20 percig centrifugáltuk. A felülúszók összegyűjtését követően a fehérje koncentrációkat BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) alkalmazásával határoztuk meg, ahol standardként

szarvasmarha szérumalbumint (BSA) használtunk. A fehérjemintákból előkészített alikvotokat Western blot és autofágiás array analízishez használtuk fel.

### **3.6.1. Az autofágiás array kivitelezése**

Tanulmányunkban az autofágiával kapcsolatos fehérjék elemzésére Humán Autofágiás Array-t használtunk (Assaygene, SARB0023, Dublin, Írország). A sejtproliferációs tesztek eredményei alapján valamennyi humán kután melanóma sejtet egy kitüntetett koncentrációval, a 20  $\mu\text{M}$  LE-127/2 vegyülettel kezeltünk 48 órán keresztül, majd az izolált fehérjéket az array analízishez használtuk fel, a gyártó által biztosított protokoll szerint. Az egyes pontok intenzitását ChemiDoc Imaging System készülékkel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) detektáltuk.

### **3.6.2. A fehérje expresszió vizsgálata Western blot módszerrel**

A fehérjekoncentráció meghatározását követően a mintákat 4x Laemmli pufferrel hígítottuk, majd 95 °C-on 8 percig forraltuk. Ezt követően összesen 40  $\mu\text{g}$  fehérjét futattunk 12%-os nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid gélen SDS-PAGE technikával. Molekulatömegmarkerként a Precision Plus Protein Dual Color Standards-t alkalmaztuk (Bio-Rad Laboratories #1,610,374, Hercules, CA, USA). A gélelektroforézist követően a fehérjéket PVDF membránokra transzferáltuk (Immuno-Blot® PVDF Membrane, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), amelyeket ezt követően 1 órán keresztül szobahőmérsékleten 5%-os zsírszegény tejjel blokkoltunk 0,1% Tween-20-t tartalmazó Tris-pufferes sóoldatban (TBST).

A membránokat 4 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk az alábbi fehérjék elleni specifikus elsődleges antitestekkel: LC-3I/II, p62, Beclin-1, Atg12, kaspáz-3, Tom20, hem-oxigenáz-1 (HO-1), p53, PDCD-4 (Programozott sejthalál fehérje 4), Bax (bcl-2-asszociált x-fehérje), Bcl-2 (B-sejtes limfóma 2), valamint PARP (poli(ADP-ribóz) polimeráz) (1:1000 hígításban). Annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy minden minta egyforma koncentrációban lett vizsgálva, anti-HPRT antitestet használtunk a háztartási HPRT fehérje detektálása végett.

Másnap a membránokat háromszor mostuk TBST oldattal, majd tormaperoxidáz-konjugált, kecskéből származó nyúlelles (anti-nyúl) szekunder antitesttel inkubáltuk (Thermo Fisher Scientific, San Diego, CA, USA). A jel detektálását kemilumineszcenciás módszerrel végeztük Clarity Western ECL Substrate alkalmazásával (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), a jelet a ChemiDoc Touch Imaging System segítségével jelenítettük meg (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). A vizsgált fehérjék mennyiségét kvantifikáltuk,

majd HPRT-re normalizáltuk a Bio-Rad Image Lab 5.2.1 szoftver (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) használatával. Minden Western blot analízist három ismétlésben végeztünk el. A kiértékelés során a kezelt mintákhoz tartozó sávintenzitás értékeit a kezeletlen kontrollmintákhoz viszonyítva normalizáltuk.

### **3.6.3. LC-3 expresszió detektálása melanóma sejtekben immunfluoreszcens jelöléssel**

Az LC-3 expressziójának kimutatását WM35, A2058 és WM3000 sejtvonalakon, 48 órán keresztül 20  $\mu$ M LE-127/2 kezelést követően immunfluoreszcens jelöléssel végeztük. A sejteket fedőlemezen tenyésztettük, amelyeket 6 lyukú sejtenyésztő plate-be helyeztünk. Ezt követően a sejteket metanollal fixáltuk, foszfátpufferes sóoldattal (PBS) mostuk, majd 0,1%-os TRITON-X oldattal permeabilizáltuk, majd egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk az LC-3 elleni elsődleges ellenanyaggal (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), amelyet 1:100 arányban hígítottunk 1%-os BSA-t és 0,1% Triton-X-et tartalmazó oldatban. Másnap a tárgylemezeket 1x PBS-ben, 0,05%-os Triton-X oldatban mostuk, majd 1 órán át inkubáltuk fluoreszcensen jelölt, nyúl eredetű fehérjéket felismerő szekunder antitesttel (Alexa-488 konjugált; Thermo Fisher Scientific, San Diego, CA, USA), amelyet 2%-os BSA-t és 0,1% Triton-X-et tartalmazó oldatban 1:1000 arányban hígítottunk ki. Az inkubálást követően a tárgylemezeket ismét háromszor mostuk, majd 1%-os paraformaldehid oldatban fixáltuk. Ezt követően 0,5  $\mu$ g/ml koncentrációjú DAPI-t alkalmaztunk a sejtmagok fluoreszcens festésére. A mintákat invert fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltuk (Carl Zeiss AG, Jena, Németország).

## **3.7. Statisztikai analízis**

Az eredményeket három egymástól független kísérlet alapján számítottuk ki. A sejtproliferációs és citotoxicitási vizsgálatokból, valamint a Western blot analízisekből származó adatokat párosítatlan Student *t*-próbával elemeztük. A statisztikai kiértékelést a GraphPad Prism szoftverrel végeztük (5.01-es verzió; San Diego, CA). A statisztikai szignifikancia határértékét  $p = 0,05$ -ben határoztuk meg.

## **4. Anyagok és módszerek II.**

### **4.1. Sejtkultúrán végzett vizsgálatok**

A H9c2 patkány szívizom-eredetű sejtvonalat (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) Dulbecco-féle módosított Eagle-táptalajban (DMEM) tenyésztették, amelyet 10% magzati szarvasmarha szérummal (FBS) és antibiotikumokkal (1% penicillin–streptomycin) egészítettünk ki. A sejteket 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> jelenlétében inkubáltuk.

A kardiomioblaszt sejteket 75 cm<sup>2</sup>-es TPP tenyésztőedényekben növesztettük passzálsig, majd a passzálást körülbelül 60-70%-os konfluenciánál végeztük el. Az elhasznált tápfolyadékot leöntötték az adherens kardiomioblaszt sejtekről, majd PBS-el mostuk és 15 percig tripszin-EDTA oldatban inkubáltuk. Ezután semlegesítettük médiummal a tripszin hatását, majd 6 percig centrifugáltuk 1100 rpm sebességgel, 26 °C-on. A centrifugálás után a felülúszót eltávolítottuk, a sejtlevelet pedig friss, FBS-t tartalmazó fenntartó tápfolyadékban reszuszpendálták. A sejteket ezt követően 75 cm<sup>2</sup>-es TPP tenyésztőflaskában tartottuk körülbelül 100 000 sejt/ml koncentrációban.

#### **4.2. Hipertrófia indukálása H9c2 kardiomioblaszt sejtekben**

A H9c2 kardiomioblaszt sejtvonalon alkalmazott *in vitro* hipertrófiaindukciós protokollt Watkins és munkatársai (2010) módszere alapján végeztük, az endotelin-1 (ET-1; E7764, Sigma, Németország) hipertrófiás agonista felhasználásával. A sejteket olyan körülmények között tenyésztettük, amelyek lehetővé tették az ET-1 által kiváltott hipertrófiás válasz optimális kontrollját. Az etanol (E) szolgált oldószerként minden kísérleti csoportban.

A kardiomioblasztokat szérumentes, 1% antibiotikumot tartalmazó DMEM-ben tartottuk fenn a kísérlet teljes időtartama alatt. A sejteket 24 órán át inkubáltuk 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub>-atmoszférában. Ezt követően a sejteket 100, 1000 és 10 000 nM ET-1 koncentrációkkal kezeltük. Bizonyos kísérleti csoportokat 200 nM β-ösztadiollal (β-E; E2758, Sigma, Schnelldorf, Németország) előkezeltünk 6 órán keresztül, majd ezt követően 1000 nM ET-1-nek tettük ki őket.

#### **4.3. Sejt felszín (sejt méret) meghatározása**

A H9c2 sejteket morfológiai vizsgálatok céljából 24 lyukú TPP plate-re helyeztük 8000 darab sejtszámmal. Letapadást követően a sejteket tovább kezeltük a fentebb ismertetett módon, majd a sejteket pedig fluoreszcens festékekkel tettük láthatóvá és fluoreszcens mikroszkóppal tanulmányoztuk azokat. A hipertrófiás stimulust követően 4% formalinnal fixáltuk a sejteket 15 percen át, majd 0,1% Triton-X hozzáadásával feltárást végeztünk ugyancsak 15 perces időtartamban. A létrejött 'citoszkeleton' fluoreszcein izotiocianát (FITC)-konjugált phalloidin festékkel, a sejtmagot pedig 4',6-diamidino-2-fenylindol (DAPI) festékkel tettük láthatóvá. Fluoreszcens mikroszkóppal (Zeiss Axio Scope.A1) fotóztuk a sejteket, majd a ZEN 2012 program alkalmazásával meghatároztuk a méretüket, csoportonként 200 darab sejtet vizsgáltunk meg és az eredményeket μm<sup>2</sup>-ben adtuk meg.

#### 4.4. Sejtéletképesség vizsgálata

A sejtek életképességét az ET-1 és  $\beta$ -E kezeléseket követően MTT-assay segítségével határoztuk meg. A H9c2 sejteket TPP 96-lyukú lemezekre vetettük, kb. 2500 sejtet lyukanként. A sejtek  $\beta$ -E-vel történő előkezelését követően 48 órán át inkubáltuk őket ET-1-gyel.

Ezt követően 20  $\mu$ l MTT-oldatot (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid, 5 mg/ml) adtunk a sejtekhez. A mitokondriumokban aktív MTT redukciója során keletkező formazán kristályokat 210 perces, 37 °C-on történő inkubáció után izopropil-alkoholban oldottuk fel, majd további 30 perces inkubálás után mértük az abszorbanciát 570 és 690 nm hullámhosszokon FLUOSTAR Optima spektrofotométerrel.

#### 4.5. HO-1 fehérjeexpresszió meghatározása H9c2 sejtekben

A H9c2 kardiomioblasztokat (kb. 100 000 sejt/csoport) 1000 nM ET-1-gyel, 200 nM  $\beta$ -E-vel, illetve a két vegyület kombinációjával kezeltük. Az etanol (0,01%) oldószerként szerepelt. A 48 órás inkubációt követően a HO-1 fehérjeszintet a kontroll és kezelt sejtcsoportokban a Debreceni Egyetem Élelmiszeranalitikai Laboratóriumában határoztuk meg a StressXpress™ Human HO-1 ELISA Kit (Enzo Life Sciences International, USA) segítségével.

A sejteket 96-lyukú lemezben inkubáltuk antihumán HO-1 antitesttel bevont kutakban, majd másodlagos antitesttel és a kitéhez tartozó reagensekkel kezeltük. Az abszorbanciát 450 nm-en mértük (Biotek ELX 808 mikrolemezes olvasóval). Az eredményeket nanogramm HO-1 fehérjében, négy párhuzamos mérés medián értékeként adtuk meg.

#### 4.6. Western blot vizsgálatok (in vitro és in vivo)

A H9c2 sejtekből (~ 100 000 sejt) nyert mintákat 25 mM Tris-HCl-t, 25 mM NaCl-t, 1 mM ortovanadátot, 10 mM NaF-ot, 10 mM pirofoszfátot, 10 mM okadainsavat, 0,5 mM EDTA-t, 1 mM PMSF-et és proteázgátló keveréket tartalmazó pufferben homogenizáltuk. A centrifugálási lépéseket követően a fehérjekoncentrációt BCA módszerrel határoztuk meg. Mintánként ~ 100  $\mu$ g fehérjét futtattunk 12%-os poliakrilamid gélen, majd a fehérjéket PVDF membránra transzferáltuk.

A membránokat 5%-os sovány tejjel blokkoltuk, majd egy éjszakán át HO-1 (1:1000, Abcam, UK) és GAPDH (Cell Signaling Technology, USA) elleni antitesttel inkubáltuk. Ezt követően HRP-konjugált másodlagos antitesttel (1:3000) kezeltük, majd Clarity ECL Substrate segítségével tettük láthatóvá a sávokat (Biorad). A filmre exponált blottokat digitalizáltuk, és az ImageJ szoftverrel értékeltük.

Az *in vivo* vizsgálatok során Sprague-Dawley patkányokat (230-290 g) kezeltünk 48 órán át ET-1-gyel (1000 ng/kg),  $\beta$ -E-vel (200 ng/kg) vagy ezek kombinációjával. Az állatokat ketaminnal altattuk, majd a szíveket eltávolítottuk, és a vért Krebs–Henseleit pufferrel kimostuk. A bal kamra szövetéből (~10 mg) készített homogenizátumokat SDS-PAGE és Western blot vizsgálatra használtuk, majd a fehérjéket ECL-módszerrel detektáltuk.

#### **4.7. A HO-1 expresszió stimulációja *in vivo* körülmények között**

A Sprague-Dawley hím patkányokat (230-290 gramm) a Charles River Laboratories (Sulzfeld, Németország) biztosította. Az állatok tartása és kezelése az NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 85-23, 1996) előírásainak megfelelően történt, a Debreceni Egyetem Állatkísérletes Etikai Bizottságának engedélyével (engedélyszám: 3/2012/DE MÁB).

Az állatokat standard takarmánnyal és vízzel *ad libitum* tápláltuk, majd intravénásan kezeltük 1000 ng/kg ET-1-gyel, 200 ng/kg  $\beta$ -E-vel, illetve a két vegyület kombinációjával. Az etanol (0,01%) oldószerként szolgált. A kezelést követő 48 óra elteltével 1 ml vénás vérmintát vettünk, a plazmát centrifugáltuk, majd a HO-1 szintet a StressXpress™ Human HO-1 ELISA Kit segítségével határoztuk meg. Az abszorbanciát 450 nm-en mértük, az eredményeket nanogramm/milliliter formában, négy párhuzamos mérés medián értékeként fejeztük ki.

#### **4.8. Statisztikai elemzés**

A sejtfelszín területét, a sejtek életképességét és a HO-1 expressziót egyutas varianciaanalízissel (ANOVA), majd Dunnett-tesztel értékeltük (Wallenstein et al., 1980). A kezelt csoportokat a kezeletlen kontrollhoz (C) vagy az ET-1-gyel (1000 nM) kezelt csoporthoz hasonlítottuk. Az adatokat átlag $\pm$ standard hiba (SEM) formájában tüntettük fel, és a különbségeket \* $p < 0,05$  esetén tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

### **5. Eredmények I.**

#### **5.1. Az LE-127/2 és a CBG anyavegyület citotoxicitásának vizsgálata LDH mérésen alapuló assay-vel**

Az LDH a leggyakrabban alkalmazott marker új, potenciális gyógyszerjelöltek citotoxikus hatásának vizsgálatára. A plazmamembrán károsodása az LDH sejtenyésztió médiumba történő kiáramlásához vezet. Ennek megfelelően az extracelluláris LDH tartalom egy kapcsolt enzimreakcióval kvantifikálható, amely során az LDH a laktátot piruváttá alakítja, miközben a  $\text{NAD}^+$  NADH-vá redukálódik.

Három egymástól független kísérletet végeztünk, minden LE-127/2 és CBG koncentrációhoz három ismétlés (triplikátum) tartozott. Figyelemreméltó, hogy maga a CBG már 10  $\mu\text{M}$ -os alkalmazott koncentráció esetén is szignifikánsan csökkentette a HaCaT sejtek növekedését, vagyis a CBG már viszonylag alacsony koncentrációban toxikus hatással bír az ép sejtekre, a keratinocitákra. A sejt növekedés drasztikus csökkenését a CBG-kezelést követő 72 órában figyeltük meg.

Kiemelendő, hogy a CBG-vel ellentétben még 80  $\mu\text{M}$ -os LE-127/2-vel történő kezelést követően sem mértünk a HaCaT sejteken szignifikáns sejtkárosodást, mikroszkópos morfológiai megfigyelés során sem láttunk jelentős elváltozást a LE-127/2-vel kezelt nem tumoros eredetű HaCaT sejtek esetében.

A LE-127/2 citotoxikus hatását más nem-malignus sejt típusokon is vizsgáltuk (H9c2 és NIH-3T3 fibroblaszt sejtek). A H9c2 sejtek esetében szignifikáns sejtpusztulás csak 40  $\mu\text{M}$  LE-127/2 kezelést követően, 48-72 órával a kezelés megkezdése után volt megfigyelhető, míg a CBG 20  $\mu\text{M}$ -os koncentrációnál mutatott toxicitást ezeknél a sejteknél. Figyelemre méltó, hogy a fibroblaszt sejtek mutatták a legkisebb érzékenységet a LE-127/2-vel történt kezelésre. Hasonlóan a HaCaT sejtekhez, ezek is csak 80  $\mu\text{M}$  LE-127/2 kezelést követően mutattak érzékenységet, és 48 óráig nem volt kimutatható szignifikáns citotoxikus hatás. Ezzel szemben a CBG már 20  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban is toxikus volt a fibroblaszt sejtekre.

## **5.2. Az LE-127/2, CBG és a Vemurafenib citotoxikus hatásának összehasonlítása és vizsgálata melanóma sejt vonalakon**

Az LE-127/2 vegyület citotoxikus hatásának vizsgálata végett három különböző humán kután melanóma sejt vonalat (WM35, A2058 és WM3000) használtunk. Az LE-127/2 hatását a CBG anyavegyület, valamint a vemurafenib, mint terápiás hatással bíró szer, citotoxicitásával vetettük össze. A kísérleteinkhez a hatóanyagokat növekvő koncentrációkban (2,5  $\mu\text{M}$ -tól 80  $\mu\text{M}$ -ig) adagoltuk a melanóma sejteknek. A sejtek proliferációs aktivitását 24, 48 és 72 órán keresztül követtük nyomon a CellTiter-Blue assay segítségével.

A proliferációs aktivitást fluoreszcencia értékek alapján határoztuk meg, majd az eredményeket a kezeletlen kontrollhoz (DMSO) normalizáltuk. Az eredmények alapján a vemurafenib minden vizsgált melanóma sejt vonal esetében hatékonyabban gátolta a sejtek proliferációját mint az LE-127/2 vagy a CBG, mely hatás már 2,5  $\mu\text{M}$  koncentráció esetén is szignifikáns csökkenést eredményezett. Leghatékonyabbnak a WM35 sejtek esetében bizonyult: a vemurafenib már a kezelést követő 24 órában jelentősen gátolta a sejt proliferációt a sejtek közel 90%-ának pusztulását eredményezve.

A CBG vegyület szintén hatékonyabbnak bizonyult, mint az újonnan előállított szintetikus származéka, az LE-127/2. Minden egyes sejtvonal proliferációjára hasonló hatást fejtett ki. 5  $\mu\text{M}$ -os koncentrációnál már szignifikánsan csökkentette a sejtproliferációt, míg a WM3000 sejtvonal esetében már 2,5  $\mu\text{M}$  koncentráció is szignifikáns gátló hatást mutatott.

A vemurafenibhez és a CBG-hez képest az LE-127/2 minden vizsgált sejtvonalban gyengébb sejtproliferáció gátló aktivitást mutatott. Az LE-127/2 szignifikáns gátló hatása csak 20  $\mu\text{M}$  koncentrációnál volt mérhető mindhárom sejtvonalban, ugyanakkor már 24 és 48 óra után is kimutatható volt némi hatás. Statisztikailag szignifikáns különbséget ( $p < 0,05$ ) azonban csak 72 óra elteltével figyeltünk meg. Kivételt jelentett az A2058 sejtvonal, amely érzékenyebbnek bizonyult az LE-127/2 vegyületre, mint a másik két melanóma sejtvonal. Ennek megfelelően a LE-127/2 dózis- és időfüggő hatását figyeltük meg valamennyi vizsgált melanóma sejtvonalra vonatkozóan.

A vemurafenib, a CBG és az LE-127/2 hatékonyságának összehasonlítása során megállapítottuk, hogy 20  $\mu\text{M}$  alkalmazott koncentráció esetén mindhárom vegyület szignifikánsan gátolja a sejtproliferációt az összes vizsgált humán melanóma sejtvonal esetében. Fontos kiemelni, hogy bár az LE-127/2 hatása csak magasabb koncentrációk esetén volt kimutatható a vemurafenibhez és a CBG-hez képest, toxikus hatást a nem-malignus HaCaT sejtekre csak 80  $\mu\text{M}$  koncentrációban fejtett ki, vagyis az ép, nem daganatos sejtek lényegesen kevésbé érzékenyek az LE-127/2 vegyületre.

### **5.3. A sejtek kolónia képző képességének gátlása**

Klonogén sejt-túlélési vizsgálatokat alkalmaztunk annak érdekében, hogy megfigyeljük az LE-127/2 vegyület hatását humán kután melanóma sejtvonalak (WM35, A2058 és WM3000) kolóniaképző képességére. A sejtproliferációs aktivitás vizsgálatának eredményei alapján a sejteket az LE-127/2 vegyülettel növekvő koncentrációban kezeltük (5–80  $\mu\text{M}$ ) két héten keresztül, 37 °C-on, 5%-os  $\text{CO}_2$ , 95% levegő jelenlétében történő inkubálással, majd kolóniaképződési vizsgálatnak vetettük alá őket.

A 12. Ábra szemlélteti, hogy az LE-127/2 hatékonyan gátolta a sejtek kolónia képződését mindhárom sejtvonal esetében. A WM3000 és A2058 sejtek hasonló kolóniaképző képességet mutattak, és mindkét sejtvonalban az LE-127/2 már alacsony, 10–20  $\mu\text{M}$  koncentrációban is jelentősen csökkentette a sejtek klónképződését. Azonban az LE-127/2 hatékonyabban gátolta a kolóniaképződést az A2058 és WM3000 sejtekben 10  $\mu\text{M}$  koncentrációnál, mint a WM35 sejtekben. A vizsgált sejtvonalakban a kolóniák száma körülbelül 2-3-szoros csökkenést mutatott 20  $\mu\text{M}$  LE-127/2 alkalmazása esetén a kezeletlen kontrollcsoporthoz képest.

A klonogén képződési vizsgálat során kapott eredmények összhangban vannak a sejtproliferációs vizsgálatok adataival, az LE-127/2 vegyület hasonló mértékű, intenzív sejtnövekedés- és kolóniaképződés-gátlást mutatott 20  $\mu\text{M}$  koncentrációnál, és a humán kután melanóma sejtekre gyakorolt hatása dózis- és időfüggő módon érvényesült.

#### **5.4.Fehérje expresszió analízise**

A programozott sejthalál három fő típusa közé tartozik az apoptózis, az autofágia és a nekrozis. A különböző sejthalál-formák közötti kapcsolat és átmenet szorosan összefügg számos humán betegség patomechanizmusával. Az autofágia és az apoptózis egyaránt alapvető szerepet játszanak a melanóma kialakulásában és a metasztázisok képződésében. Ezért kutatásunk célja volt, hogy feltárjuk az LE-127/2 vegyület hatását az autofágiához és apoptózishoz kapcsolódó kulcsfontosságú fehérjék expressziójára.

##### **5.4.1. A humán autofágia array eredményeinek értékelése**

Az LE-127/2-kezelés hatására bekövetkező fehérjeexpresszió változásának nyomon követésére humán autofágia array-t (Human Autophagy Array) alkalmaztunk, amelyhez a 20  $\mu\text{M}$  LE-127/2-vel 48 órán keresztül kezelt sejtekből izolált fehérjemintákat használtuk fel.

Az egyes antigénspecifikus antitestekhez tartozó pontintenzitás arányos az adott antigén vizsgált mintában mérhető relatív expressziós szintjével. Ennek köszönhetően az LE-127/2-vel kezelt és kezeletlen minták array képeinek összehasonlításával meghatározhatóvá vált az egyes fehérjék expressziójában bekövetkező relatív expresszióbeli változás. Az LC3A elsősorban perinukleáris és nukleáris lokalizációt mutat, míg az LC3B a citoplazma egészében eloszlik, és a sejtmagvacskák területén is megjelenik. Mindkettőt széles körben használják az autofágia biomarkereiként.

Az array-analízis alapján az LC-3 (LC3A és LC3B), a Beclin-1, valamint a Sequestosome 1/SQSTM1/p62 (p62) fehérjék expressziója az összes vizsgált sejtvonalban emelkedett az LE-127/2-kezelést követően a kezeletlen sejtekben mért expresszióhoz képest. Kiemelendő, hogy a Beclin-1 expressziója különösen magas volt az LE-127/2-vel kezelt A2058 sejtekben, meghaladva a másik két sejtvonalban mért szinteket.

##### **5.4.2. Az LC3, p62, a Beclin-1 és az Atg12 expressziójának megerősítése Western blottal**

Az eredmények egyértelműen igazolják, hogy az LC-3 fehérje expressziós szintje módosult a kezelésekre hatására. Az LC-3II expressziója emelkedett a WM35 és A2058 melanóma sejtekben 24 órás kezelés után, míg a WM3000 sejtvonalban ez a változás 48 órával a kezelés megkezdése után jelentkezett. Ez arra utal, hogy az LC-3 citoszolikus formája (LC-3I)

konjugálódik a foszfatidiletanolaminhoz, kialakítva az LC-3II formát, amelynek szintje megemelkedik, ez pedig az autofágia aktiválásának egyik meghatározó jele.

Feltételezhető, hogy az LE-127/2 képes autofágiát indukálni a vizsgált melanóma sejtvonalakban, amely hatás 24-48 órán belül jelentkezik. Elmondható, hogy az LC-3 fehérje expressziójának növekedése – amelyet Western blot analízissel detektáltunk 48 órával az LE-127/2-kezelés után – összhangban van az array analízis eredményeivel, amelyek szintén az LC-3II szint emelkedését mutatták a kezelt sejtekben.

A fentebb kapott eredményünket tovább erősítette az immunfluoreszcens jelölés, amely az LE-127/2-vel kezelt sejtek citoplazmájában intenzívebb zöld fluoreszcenciát mutatott, mint a kezeletlen sejtekben. Ez valószínűleg az ún. „LC-3 puncta” (pontoszerű struktúrák).

### **5.4.3. Egyéb autofágia fehérjék detektálása LE-127/2 kezelés hatására**

Az autofágia cargo-receptora, a p62 fokozott expresszióját számos rossz prognózisú metasztatikus melanómában kimutatták, és mint multifunkcionális fehérjét, a melanóma tumorprogresszió egyik lehetséges hajtóerejeként tartják számon. A p62 fehérje expressziója az LE-127/2-kezelést követően minden vizsgált melanóma sejtvonalban markánsan megnövekedett 24 órán belül, majd a WM35 és WM3000 sejtekben fokozatos csökkenést mutatott 48, illetve 72 óra elteltével. Ezzel szemben az A2058 sejtvonalban a p62 szintje folyamatosan növekedett a 72 órás időtartam alatt.

A Beclin-1 expressziója a kezelése során csak enyhe, statisztikailag nem szignifikáns növekedést mutatott, kivétel ez alól az A2058 sejtvonal, ahol 72 órával a kezelés után a fehérje expressziója szignifikánsan emelkedett. Ez az eredmény teljes mértékben összhangban áll az array analízis során kapott adatokkal.

Az Atg12 fehérje expressziója 24 órával az LE-127/2-kezelés után csökkent, amelyet 48–72 órás időintervallumban fokozatos emelkedés követett. Ezek az eredmények szintén megfelelnek az array alapú vizsgálatban észlelteknél.

Vizsgáltuk a Tom20 fehérje expresszióját is, amelyről ismert, hogy kulcsszerepet játszik a melanóma sejtek halálában. A Tom20 a reaktív oxigénradikálok (ROS) mitokondriumokhoz irányuló jelátvitelét közvetíti, így alapvető szerepet tölt be a mitofágiában. Az LE-127/2-kezelés 24 óra elteltével jelentős mértékű csökkenést eredményezett a Tom20 expresszióban, majd 48 és 72 óra után a fehérjeszint visszatért a kontroll (0 óra) szinthez tartozó hasonló értékre a WM35 és A2058 sejtekben. A WM3000 sejtvonal esetében azonban eltérő trendet figyeltünk meg, a Tom20 expressziója időfüggő módon, szignifikánsan csökkent a kontrollhoz viszonyítva.

Megjegyzendő, hogy a 72 órás kezelési idő alatt az autofágiás fehérjék expressziója nem mutatott egyértelmű növekedést vagy csökkenést, ezzel szemben inkább egy fluktuáló mintázat volt megfigyelhető a kísérlet során, amelyet a két különböző vizsgálati módszer is tükrözött. Az array analízis alapján a Western blottal vizsgált fehérjéken túl további autofágiához kapcsolódó fehérjék expressziójában is változásokat tapasztaltunk, ezek részletes elemzése azonban túlmutat a jelen tanulmány terjedelmén.

#### **5.4.4. Az LE-127/2 kezelés hatása a HO-1 expresszió szintjére**

A HO-1 fokozott expressziója elősegíti a kemorezisztencia kialakulását és aktiválja a védekező autofágia mechanizmusokat. Érdekeség, hogy bár a HO-1 fokozott expressziója melanóma sejtekben elősegíti a tumorprogressziót, ugyanakkor csökkentheti a daganat növekedését és metasztatikus képességét is. A HO-1 ezen kettős szerepe miatt célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy a 20  $\mu$ M koncentrációjú LE-127/2-kezelés miként befolyásolja a HO-1 expresszióját WM35, A2058 és WM3000 humán melanóma sejtvonalakban.

A Western blot analízissel kimutatott HO-1 expresszió alapján nem volt szignifikáns eltérés a LE-127/2-vel kezelt sejtek és a kezeletlen kontrollcsoportok között, valamint a HO-1 expresszió szintje csupán enyhe emelkedést mutatott 72 órával a kezelést követően.

#### **5.4.5. Apoptotikus fehérjék vizsgálata**

A p53, Bax, Bcl-2, PDCD4 és PTEN expressziója

A p53 tumorszuppresszor fehérje kulcsfontosságú szerepet tölt be a sejthalált szabályozó molekuláris hálózatban, aktiválódása a tumorsejtek növekedésének megállítását eredményezi, akár p53-függő, akár p53-független apoptotikus útvonalakon keresztül. A Western blot technikával meghatározott p53 fehérjeszint kvantifikálását követően megállapítható volt, hogy a p53 expressziója eltérő mértékű a három vizsgált sejtvonalban. Az LE-127/2 kezelést követően a p53 fehérjeszint csökkent, azonban ez statisztikailag nem mondható szignifikáns eltérésnek.

A Bax és Bcl-2 fehérjék expressziója emelkedett a kezelés során a kezeletlen kontrollhoz képest, de szignifikáns növekedést csak a Bax esetében figyeltünk meg, különösen 48 órás kezelést követően.

Vizsgáltuk a PTEN tumorszuppresszor fehérje expresszióját is, amely során megfigyeltük, hogy az A2058 sejtvonal nem expresszálja a PTEN-t, ami összefüggésbe hozható ezen sejtek fokozott proliferációs képességével és agresszívebb fenotípusával a WM35 és WM3000 sejtvonalakhoz képest.

A PDCD4, mint azonosított tumorsuppresszor, bizonyítottan befolyásolja a metasztatikus melanóma betegek túlélését, ezért megvizsgáltuk az LE-127/2 kezelés hatását a PDCD4 expressziójára. A kezelést követő 24 óra elteltével a PDCD4 szintje szignifikánsan csökkent, azonban 48–72 óra elteltével visszatért a kezeletlen kontroll szintjére. Érdekesség, hogy a WM35 sejtvonalban a 48 órás kezelés után a PDCD4 expresszió közel 1,5-szeresére nőtt a kontrollhoz képest.

Az LE-127/2 kezelés általi PARP aktiváció

Az LE-127/2-vel kezelt melanóma sejtvonalak mindhárom típusában, a kontroll csoporthoz képest a hasított PARP expressziójának növekedését figyeltük meg. A kezelés hatására aktiválódott a PARP (116 kDa) fehérje hasítása, melynek eredményeként a hasított PARP (89 kDa) szintje megemelkedett. Az LE-127/2 kezeléssel indukált hasított PARP szintje szignifikánsan megnőtt, mely emelkedés időfüggő módon jelentkezett, továbbá a teljes PARP és a hasított PARP expressziójában sejtvonal-függő eltérések is megfigyelhetők voltak. A legkorábban és legerőteljesebben a PARP aktivációját a WM35 sejtvonalban észleltük.

A kaszpáz-3 fehérje expressziója szignifikáns változást mutatott a kezelés utáni 24-48 órában a WM35 és A2058 sejtvonalakban, azonban a WM3000 sejtekben nem volt kimutatható szignifikáns változás az expresszióban.

## **6. Eredmények II.**

### **6.1. Sejtfelszín változása kezelése hatására**

Az eredményeink azt szemléltetik, hogy az 100 nM és 10.000 nM endothelin (ET-1) dózistartomány alkalmazása során szignifikáns növekedés volt megfigyelhető a sejtméret felületben (Cell surface), amely az ödéma kialakulására utal ebben a sejtcsoportban. Amennyiben 200 nM koncentrációban alkalmaztuk előkezelés formájában a  $\beta$ -ösztradiolt ( $\beta$ -E), az ET-1 (1000 nM) sejtfelszín növelő hatását megakadályozta. Az etanol (E) oldószerként valamennyi kísérletes csoportban jelen volt, kivétel a kontroll csoportot.

### **6.2. Sejttúlélés (%) vizsgálata H9c2 kardiomioblaszt sejteken**

Sejtszámcsökkenés nem volt a sejtek túlélésében (cell viability, %) megfigyelhető H9c2 sejtvonalon a kontroll csoporthoz viszonyítva akkor, amikor etanol (E) 0,01%-ban, mint oldószere a hatóanyagoknak, és  $\beta$ -ösztradiol ( $\beta$ -E) kezelésnek vetettük alá a sejteket. Az etanol a hatóanyagok oldószere valamennyi kísérletes csoportban jelen volt, kivétel a kontroll

csoportot. Tehát, az etanol és béta-ösztadiol önmagukban az alkalmazott koncentrációban, nem okoztak változást a sejttúlélésben.

Az endothelin-1 (ET-1) fokozatosan emelkedő 100 nM és 10,000 nM koncentrációi viszont szignifikáns csökkenést eredményeztek a sejtek túlélésében.

Abban a kísérletsorozatban viszont, amikor a béta-ösztadiol ( $\beta$ -E) 200 nM koncentrációját együtt alkalmaztuk 1000 nM endothelin-1-gyel, a sejtek túlélése szignifikáns mértékben megnövekedett. Tehát, a  $\beta$ -E kivédte az endothelin-1 1000 nM-ban okozott sejtkárosító (sejtölő) tulajdonságát.

### **6.3.Hemoxigenáz-1 (HO-1) fehérje ELISA-val és Western blottal *in vitro* H9c2 patkány kardiomioblaszt sejtekben**

A 1000 nM ET-1 és 0,01% etanol (E) együtt történő alkalmazása szignifikáns mértékben csökkentette a HO-1 szintet (\*p <0,05). Ugyanekkor a béta-ösztadiol ( $\beta$ -E) 200 nM-os koncentrációja és az etanol (E, 0,01%) együttládása nem okozott szignifikáns csökkenést a HO-1 szintben.

Abban a kísérletsorozatban, amikor 200 nM béta-ösztadiolt ( $\beta$ -E, 200 nM), endothelin-1-et (ET-1, 1000 nM) valamint 0,01% etanolt (E) együtt alkalmaztunk a sejt kultúra médiumban, szignifikáns emelkedés volt megfigyelhető a HO-1 szintben (<sup>+</sup>p <0,05) összehasonlítva azzal a csoporttal, amikor a béta-ösztadiol ( $\beta$ -E, 200 nM) nem volt jelen a sejttenyésztés médiumában. Tehát, az eredmények azt mutatják, hogy a 200 nM-os béta-ösztadiolos ( $\beta$ -E) kezelés kivédte az ET-1 okozta HO-1 koncentráció csökkenését, amely hozzájárult a sejtek túléléséhez.

### **6.4.Hemoxigenáz-1 (HO-1) szint a plazmában és Western blot analízis *in vivo* kísérletekben, patkány kardiomioblaszt sejt típuson szív szövettől**

A fentebb kapott sejt kísérletek eredményei alapján 1000 nanogramm/kg endothelin-1 (ET-1) és 200 nanogramm/kg  $\beta$ -ösztadiol ( $\beta$ -E) hatásvizsgálatát végeztük *in vivo* patkányszív kísérletekben. Az eredményekből jól látható az, hogy 1000 nanogramm/kg endothelin-1 (ET-1) szignifikáns mértékben csökkentette a HO-1 szintjét a plazmában összehasonlítva a kontroll csoport eredményével, míg a  $\beta$ -E kezelt csoportban szignifikáns változás nem volt megfigyelhető. Ugyanekkor, a  $\beta$ -E 200 nanogrammm/kg koncentrációban alkalmazva kivédte az 1000 nanogramm/kg ET-1 okozta plazma HO-1 csökkenést. Hasonló irányú eredmények voltak megfigyelhetőek, amikor Western blot alkalmazásával meghatároztuk a HO-1 protein expresszióját szív szövettől.

Tehát, az emelkedett HO-1 szint védelmet nyújt a mioblasztokban, ahogyan azt az in vitro sejt kísérletek is mutatták a H9c2 sejtek esetén. Mindez, az eredmények szerint feltehetően a HO-1 szignálmechanizmus befolyásolhatóságán keresztül valósulhatott meg.

## 7. Új megállapítások

- LE-127/2 CBG-származék humán kután melanóma sejtvonalakra kifejtett hatása:
  - Mutációtól függetlenül proliferációgátló hatást fejtett ki melanóma sejtvonalakon.
  - Normál keratinocitákon és kardiomioblasztokon alacsony citotoxicitást detektáltunk, amely kedvező mellékhatásprofil jelez a klinikai alkalmazás során
  - A kolóniaképzés hatékony gátlását idézi elő, metasztázis elleni potenciált jelez.
- Az LE-127/2 feltételezett hatásmechanizmusra vonatkozó új eredmények:
  - Autofágia indukciója (LC-3II, p62, Atg12 szint emelkedése)
  - Apoptózis aktiválása kaspáz-3/7–PARP aktiválást érintve, a PI3K/AKT-út vonal domináns szerepet kap.
  - PDCD4 expresszió fokozódása figyelhető meg az LE-127/2 hatására időfüggő módon
  - HO-1 szint nem változik szignifikánsan, szinte változatlan maradt, következésképpen nem kapcsolódik be a sejtválaszba, nem indukálódik az LE-127/2 hatására
- Kardiovaszkuláris kutatásokból származó megállapítások:
  - ET-1 csökkenti a HO-1 aktivitást, melynek eredménye a sejtkárosodás, hipertrófia
  - $\beta$ -ösztadiol előkezelés hozzájárul a HO-1 emelkedéséhez, védi a sejteket, mérsékli az ET-1 káros hatásait
  - $\beta$ -E előkezelés szignifikáns mértékben meggátolta a sejt felszín növekedést az ET-1- gyel kezelt sejtcsoportokban
  - ET-1 által kiváltott hipertrófia mérséklődése  $\beta$ -ösztadiol hatására in vivo is igazolódott
  - ET-1 okozta sejtkárosodás, hipertrófiához és sejthalálhoz vezető mechanizmus  $\beta$ -ösztadiol ( $\beta$ -E) alkalmazásával megelőzhető lehet, amelyben alapvető fontosságú szerepet játszik a HO-1 enzimrendszer
  - HO-1 kettős szerepe van: szív- és érrendszerben protektív, daganatokban tumorsejtek túlélését segítheti
  - igazolódott, a HO-1 expressziós szintjének változása függ az alkalmazott hatóanyagtól

## 8. Összegzés

A civilizációs betegségek közé tartozó szív- és érrendszeri, valamint daganatos megbetegedések napjaink vezető halállokaiknak számítanak világszerte. A két nagy és legelterjedtebb betegségcsoport kialakulásában számos közös kapcsolódási mechanizmus van jelen, amelyek figyelembevétele mindenképpen hozzájárulhat a hatékonyabb terápiás lehetőségek feltárásához és így a betegségek előnyösebb kimeneteléhez is.

A kután melanóma kezelésében a sebészi eltávolítás mellett az immun- és célzott terápiák váltak meghatározóvá. A betegek több mint felében kimutatható BRAFV600E mutáció miatt a vemurafenib (BRAF-inhibitor) hosszú ideig elsővonalbeli célzott terápiás szerként jött számításba, amely hatékonyan gátolta a MAPK-jelátviteli útvonalat és javította a túlélést. A gyorsan kialakuló rezisztencia és komoly toxikus mellékhatások korlátozzák a vemurafenib alkalmazását. Ez indokolja a természetes eredetű vegyületek vizsgálatát, például a *Cannabis sativa* természetes-és szintetikus származékait. A kevésbé ismert kannabigerol (CBG) daganatellenes hatásokat mutat, azonban alacsony vízoldhatósága és biohasznosulása korlátozza alkalmazását. E problémák kiküszöbölésére olyan szintetikus nitrogéntartalmú CBG-származék, az LE-127/2 hatását vizsgáltuk humán kután melanóma sejteken, amely jobb biohasznosulása és vízoldékonysága miatt kiválóan alkalmazható lehet terápiás célra.

Az LE-127/2 a vemurafenib szelektív hatásával szemben mérsékelt, de mutációfüggetlen proliferációgátló hatást fejt ki melanóma sejtvonalokon. Előnye, hogy normál, nem tumoros sejtekre minimális toxicitással bír. Mechanizmusában fontos szerepet játszik az autofágia indukciója (LC-3II, p62, Atg12 növekedés), majd az apoptózis (kaspáz-3/7 aktiváció, PARP hasítás, Bax szintemelkedés). A p53 nem változott, ami arra utal, hogy a PI3K/Akt-útvonal központi szerepet játszik az LE-127/2 hatásmechanizmusában.

A sejtek hosszabb távú túlélését vizsgáló klonogén assay-k azt mutatták, hogy az LE-127/2 gátolja a kolóniaképzést, ami a metasztázisképzés elleni hatékonyságra utal. Az LE-127/2-vel történő kezelések a HO-1 enzim szintjét nem befolyásolták, így hatásmechanizmusa ettől az enzimtől független lehet. Az eddigi eredmények alapján az LE-127/2 ígéretes gyógyszerjelölt lehet a rezisztencia leküzdésében és kombinációs terápiákban, de további in vitro és in vivo vizsgálatok szükségesek ennek pontos feltárására.

A korábbi kutatásaink a hemoxigenáz-1 (HO-1) enzim védő szerepére irányultak. A HO-1 antioxidáns, citoprotektív és gyulladáscsökkentő hatású, ami a szív- és érrendszerben létfontosságú. Az endothelin-1 (ET-1) egy 21 aminosavból álló erős vazokonstriktor peptid,

amely hozzájárul hipertrófiához, oxidatív stresszhez és sejthalálhoz. Kísérletekben kimutattuk, hogy az ET-1 csökkenti a HO-1 aktivitást és expressziót, ezáltal fokozza a sejtkárosodást.

A vizsgálatok szerint a  $\beta$ -ösztadiol ( $\beta$ -E) előkezelés mérsékli az ET-1 károsító hatásait, gátolja a sejtek duzzadását, javítja a sejtek túlélését, fenntartja a HO-1 szintet. Ez a hormonprotektív hatás részben a HO-1 védő mechanizmusának aktiválásán alapul. Az ET-1 és  $\beta$ -E együttes kezelése akadályozza a HO-1 csökkenését, ezáltal mérsékli a patológias folyamatokat. In vivo kísérleteinkben a  $\beta$ -E az ET-1 által kiváltott szívizom-hipertrófiát is mérsékelte, ami összefügghet azzal, hogy befolyásolja az mTOR-aktivitást, valamint az oxidatív stressz és autofágia szabályozását.

Kísérleteink igazolták, hogy mind a szívbetegségekben, mind pedig a daganatokban jelentős szerepet kapnak az autofágiás és apoptotikus folyamatok. A HO-1 enzimnek kettős szerepe van: míg szív- és érrendszerben protektív az enzim szintjének emelkedése, daganatokban ez a tumorsejtek túlélését segítheti. Ezen mechanizmusok megismerése lényeges a gyógyszeres terápiák megválasztása szempontjából a kezelés sikeres kimenetele végett figyelembe véve az „onkokardiológia” lehetőségeit.

## **9. Köszönetnyilvánítás**

Hálás köszönetem fejezem ki a Debreceni Egyetem Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszerhatástani Tanszék munkatársainak, valamint a témavezetőmnek, Dr. Szabó Erzsébetnek, továbbá mindazon munkatársaknak, akik lehetővé tették számomra azt, hogy a Tanszéken egyetemi tanulmányaim során TDK munkát folytathattam. Továbbá, köszönettel tartozom Dr. Szabó Zsuzsannának és Dr. Király Józsefnek az általuk elvégzett kísérletes munkáért, szakmai tanácsaikért és támogatásukért. Külön köszönettel és hálával tartozom a Bőrgyógyászati Klinikán Professzor Dr. Szegedi Andrea és Professzor Dr. Remenyik Éva jelenlegi és korábbi klinikavezetőknek azért, hogy a klinikai rutin feladatok ellátása mellett, lehetőséget nyújtottak számomra további kutatási eredmények megvalósításához, amelyek kiemelkedő mértékben hozzájárultak a jelenlegi PhD tézisek elkészítéséhez. Végül, de nem utolsósorban köszönet jár szüleimnek azért a szeretetteljes családi támogatásért, biztatásért, amelyet mindvégig nyújtottak eddigi pályafutásom folyamán.



Nyilvántartási szám: DEENK/540/2025.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Tósaki Ágnes

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Tósaki, Á.**, Szabó, Z., Király, J., Lőrincz, E. B., Vass, V., Tánczos, B., Bereczki, I., Herczegh, P., Remenyik, É., Tósaki, Á., Szabó, E.: A new cannabigerol derivative, LE-127/2, induces autophagy mediated cell death in human cutaneous melanoma cells.  
*Eur. J. Pharm. Sci.* 203, 1-15, 2024.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2024.106920>  
IF: 4.7
2. Barta, T., **Tósaki, Á.**, Haines, D. D., Balla, G., Lekli, I., Tósaki, Á.: Endothelin-1-induced hypertrophic alterations and heme oxygenase-1 expression in cardiomyoblasts are counteracted by beta estradiol: in vitro and in vivo studies.  
*Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 391 (4), 371-383, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-018-1462-z>  
IF: 2.058

### További közlemények

3. Steuer-Hajdu, K., **Tósaki, Á.**, Hagymásy, L., Ökrös, F., Szegedi, A.: JAK gátlás immunológiai és farmakológiai jellemzői.  
*Bőrgyógyász. venerol. szle.* 101 (2), 58-63, 2025.
4. **Tósaki, Á.**, Remenyik, É., Veres, I., Szegedi, A., Várvölgyi, T.: Mucin a dermisben.  
*Bőrgyógyász. venerol. szle.* 100 (6), 293-298, 2024.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.7188/bvsz.2024.100.6.2>
5. **Tósaki, Á.**, Szabó, E. K., Szabó, I. L., Remenyik, É.: Az autofágia jelentősége a bőrbetegségek patomechanizmusában.  
*Bőrgyógyász. venerol. szle.* 99 (4), 314-321, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.7188/bvsz.2023.99.4.10>





6. Scheili, A., **Tótsaki, Á.**, Horkay, I., Remenyik, É.: Fényérzékenységgel járó genodermatózisok, porphyriák.  
*Bőrgyógyász. venerol. szle.* 98 (4), 198-210, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.7188/bvsz.2022.98.4.1>
7. **Tótsaki, Á.**, Remenyik, É.: Bőrgyógyászati tüneteket okozó felnőttkori szisztémás vírusinfekciószemélyek.  
*Bőrgyógy. Venerol. Szle.* 97 (2), 108-114, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.7188/bvsz.2021.97.2.6>
8. **Tótsaki, Á.**, Remenyik, É.: Újdonságok a Mycosis fungoides és a Sézary szindróma patogenezisében.  
*Bőrgyógyász. venerol. szle.* 96 (5), 236-246, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.7188/bvsz.2020.96.5.5>
9. Czeglédi, A., **Tótsaki, Á.**, Gyöngyösi, A., Zilinyi, R., Tótsaki, Á., Lekli, I.: Electrically-Induced Ventricular Fibrillation Alters Cardiovascular Function and Expression of Apoptotic and Autophagic Proteins in Rat Hearts.  
*Int. J. Mol. Sci.* 20 (7), 1-12, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20071628>  
IF: 4.556
10. Gyöngyösi, A., Zilinyi, R., Czeglédi, A., **Tótsaki, Á.**, Tótsaki, Á., Lekli, I.: The role of autophagy and death pathways in dose-dependent isoproterenol-induced cardiotoxicity.  
*Curr. Pharm. Design.* 25 (19), 2192-2198, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1381612825666190619145025>  
IF: 2.208
11. Emri, G., Paragh, G. J., **Tótsaki, Á.**, Janka, E. A., Kollár, S., Hegedűs, C., Gellén, E., Horkay, I., Koncz, G., Remenyik, É.: Ultraviolet radiation-mediated development of cutaneous melanoma: an update.  
*J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* 185, 169-175, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.06.005>  
IF: 4.067

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 17,589**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az érkekezés alapján szolgáló közleményekre): 6,758**

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, 2025.10.06.

