

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Dr. Tósaki Ágnes

Témavezető: Dr. Szabó Erzsébet



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2026

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke:	4
I. Bevezetés.....	9
II. Célkitűzések	12
II.1. A CBG-származék LE-127/2 daganatellenes hatásainak vizsgálata melanóma sejtvonalakon.....	12
II.2. Az endotelin-1 által kiváltott kardiális hipertrófia és a HO-1 expresszió kapcsolatának vizsgálata	13
III. Irodalmi áttekintés.....	14
III.1. A melanóma incidenciája, epidemiológiája	14
III.2. A melanóma szövettani típusai	14
III.2.1. Felszínesen terjedő melanóma (Superficial Spreading Melanoma – SSM).....	15
III.2.2. Noduláris melanóma (Nodular Melanoma – NM)	15
III.2.3. Lentigo maligna melanóma (Lentigo Maligna Melanoma – LMM).....	16
III.2.4. Akralis lentiginózus melanóma (Acral Lentiginous Melanoma – ALM)	16
III.2.5. Dezmoplasztikus melanóma (Desmoplastic Melanoma – DM).....	17
III.3. A melanóma diagnosztikája	18
III.3.1. Noninvazív diagnosztikai eljárások	18
III.3.2. Szövettani értékelés.....	19
III.3.3. Immunhisztokémiai és molekuláris biomarkerek szerepe a melanóma diagnosztikájában	20
III.3.4. A melanóma kialakulásának mechanizmusa és ehhez kapcsolódó terápiás lehetőségek	20
III.3.5. UV-sugárzás és a karcinogenezis kezdeti lépései	20
III.3.6. A kután melanómát érintő onkogén mutációk	21
III.3.7. Immunrendszer elkerülése és mikrokörnyezet	22
III.3.8. A melanóma kezelési lehetőségei	24
III.3.9. Célzott terápia	24
III.3.10. Immunterápia	25
III.4. Egyéb terápiás lehetőségek	28
III.4.1. Kemoterápia	28
III.4.2. Sugárterápia.....	28
III.4.3. Legfrissebb fejlemények a melanóma terápiájában az ASCO 2025 alapján....	28
III.4.4. A melanóma kezelésére irányuló további kutatások és növényi hatóanyagon alapuló lehetőségek	29
III.5. Az autofágia és szerepe különböző kórfolyamatokban.....	32
III.5.1. Az autofágia fogalma	32
III.5.2. Autofágia detektálására szolgáló legfontosabb marker molekulák.....	35
III.5.3. Az autofágia jelentősége a bőrbetegségek patomechanizmusában	35
III.6. A hemoxigenáz-1 szerepe szív-és érrendszeri betegségekben, daganatokban, valamint kapcsolódása az autofágiához	40
IV. Anyagok és módszerek I.	42

IV.1.	Vegyületek	42
IV.2.	Kísérleteinkhez alkalmazott sejt kultúrák	42
IV.3.	LDH citotoxicitási assay nem malignus eredetű sejteken	43
IV.4.	Sejtproliferációs aktivitás meghatározása WM35, A2058 és WM3000 sejteken LE-127/2, CBG és vemurafenib kezelés hatására	43
IV.5.	A sejtek kolóniaképző képességének vizsgálata	44
IV.6.	Fehérje expresszió analízis	44
IV.6.1.	Fehérje izolálás és BCA assay	44
IV.6.2.	Az autofágia array kivitelezése	45
IV.6.3.	A fehérje expresszió vizsgálata Western blot módszerrel	45
IV.6.4.	LC-3 expresszió detektálása melanóma sejtekben immunfluoreszcens jelöléssel	46
IV.7.	Statisztikai analízis	46
V.	Anyagok és módszerek II.	47
V.1.	Sejt kultúra	47
V.2.	In vitro hipertrófia indukálása	47
V.3.	Sejtek morfológiájának vizsgálata	48
V.4.	Sejtek életképességének meghatározása MTT segítségével	48
V.5.	HO-1 fehérjeexpresszió meghatározása H9c2 sejtekben	48
V.6.	Western blot vizsgálatok (in vitro és in vivo)	49
V.7.	A HO-1 expresszió stimulációja in vivo körülmények között	49
V.8.	Statisztikai elemzés	50
VI.	Eredmények I.	51
VI.1.	Az LE-127/2 és a CBG anyavegyület citotoxicitásának vizsgálata LDH mérésen alapuló assayvel.....	51
VI.2.	Az LE-127/2, CBG és a Vemurafenib citotoxikus hatásának összehasonlítása és vizsgálata melanóma sejt vonalakon	53
VI.3.	A sejtek kolónia képző képességének gátlása	55
VI.4.	Fehérje expresszió analízise	56
VI.4.1.	A humán autofágia array eredményeinek értékelése.....	57
VI.4.2.	Az LC3, p62, a Beclin-1 és az Atg12 expressziójának megerősítése Western blottal	60
VI.4.3.	Egyéb autofágia fehérjék detektálása LE-127/2 kezelés hatására.....	61
VI.4.4.	Az LE-127/2 kezelés hatása a HO-1 expresszió szintjére.....	64
VI.4.5.	Az apoptotikus fehérjék expressziója.....	64
VII.	Eredmények II.	68
VII.1.	Sejtfelszín változása kezelések hatására.....	68
VII.2.	Sejttúlélés (%) vizsgálata H9c2 kardiomioblaszt sejteken.....	69

VII.3.	Hemoxigenáz-1 (HO-1) fehérje és Western blot in vitro H9c2 patkány kardiomioblaszt sejteken	70
VII.4.	Hemoxigenáz-1 (HO-1) szint a plazmában és Western blot analízis in vivo kísérletekben, patkány kardiomioblaszt sejtípuson szívszövetből	72
VIII.	Megbeszélés	74
IX.	Új megállapítások.....	83
X.	Összegzés	84
XI.	Summary	86
XII.	Mellékletek.....	88
XIII.	Tárgyszavak	90
XIV.	A kutatást támogató pályázatok	91
XV.	Köszönetnyilvánítás	92
XVI.	Irodalom	93
Függelék	105

Rövidítések jegyzéke:

ACT	Adoptív sejtherápia (adoptive cell therapy)
AD	Atópiás dermatitisz
AJCC	Nemzetközi Rákkutató Szövetség (American Joint Comitee on Cancer)
AKT	Protein kináz B
ALM	Akrális Lentiginózus Melanóma
AMBRA1	Beclin-1 által szabályozott autofágiát aktiváló molekula 1 (Activating Molecule in Beclin-1-Regulated Autophagy 1)
AMI	Akut miokardiális infarktus / akut szívinfarktus
AMPK	AMP aktivált fehérje kináz (AMP activated protein kinase)
ATCC	American Type Culture Collection
ATG	Autofágiához kapcsolódó gén/fehérje (Autophagy-related gene/protein)
β -E	β -ösztadiol
BAP1	BRCA1-asszociált protein-1
Bcl-2	B sejtes limfóma 2 (B cell limfoma 2)
BLA	Biológiai engedélykérelem (Biologics License Application)
BSA	Borjú szérum albumin
BRAF	V-Raf egér szarkóma vírus onkogén homológ B (V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B)
CB1	Cannabinoid receptor 1-es típus
CB2	Cannabinoid receptor 2-es típus
CBC	Cannabichromene
CBD	Kannabidiol
CBG	Kannabigerol
CBN	Kannabinol
CD8 ⁺	T-sejtes immunválaszt segítő receptor (Cluster of Differentiation 8)
CDK4	Ciklin-függő kináz 4 (Cyclin-Dependent Kinase 4)
CDKN2A	Ciklin-függő Kináz Gátló 2A (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A)
CO	Szén-monoxid

CPD	Ciklobután pirimidin dimer
CR	Teljes remisszió (complete remission)
CSC	Rákos őssejt (cancer stem cell)
CSF-1	Kolónia stimuláló faktor-1 (Colony Stimulating Factor 1)
CTLA-4	Citotoxikus T-limfocitákhoz társuló protein 4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
DNS	Dezoxi-ribonukleinsav
DM	Dezmoplasztikus melanóma
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil-szulfoxid
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav (Ethylenediaminetetraacetic acid)
EFS	Eseménymentességi arány (Event Free Survival)
EGCG	Epigallokatechin-gallát
EMT	Epiteliális-mezenchimális transzformáció
ERK	Extracelluláris szignál-reguláló kináz (extracellular signal-regulated kinases)
ESMO	Európai Klinikai Onkológiai Társaság (European Society for Medical Oncology)
ET-1	Endotelin-1
FBS	Szarvasmarha magzati szérum (Fetal Bovine Serum)
FDA	Élelmiszer- és Gyógyszerengedélyeztetési Hivatal (Food and Drug Administration)
FITC	Fluoreszcein izotiocianát
GAPDH	Glicerinaldehid-foszfát dehidrogenáz (glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase)
GPCR	G-fehérje kapcsolt receptor (G-protein-coupled receptor)
GTP	Guanozin-trifoszfát
H9c2	BD1X patkányszívből származó ventrikuláris mioblaszt sejtek
HaCaT	Humán eredetű epidermális keratinocita sejt vonal
HER-2	Humán epidermális növekedési faktor receptor 2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2)
HMB-45	Human Melanoma Black-45, a premelanoszómákban található fehérjékhez kötődő monoklonális antitest

HO-1	Hemoxigenáz-1
HPRT	Hipoxantin-foszforibozil-transzferáz
HSP	Hősokk fehérje (Heath Shock Protein)
HSV-1 (RP1)	Genetikailag módosított HSV-1 vírus
ICI	Immun checkpoint inhibitorok
IL-12	Interleukin-12
I/R	Iszkémia-reperfúzió
Ki-67	Kiel-67 antigén, sejtproliferációs marker
LAG-3	Limfocita aktiváló gén 3 (Lymphocyte activation gene 3)
LAMP-2A	Lizoszómához kötődő membránfehérje 2A izoforma (Lysosome-Associated Membrane Protein type 2A)
LC3-I/II	Microtubule-associated protein 1 light chain 3
LDH	Laktát-dehidrogenáz
LE-127/2	CBG bisz-N-butyl-dihidro-1,3-oxazin származék
LMM	Lentigo Maligna Melanóma
MAPK	Mitogén-aktivált protein kináz
MC1R	Melanocortin 1 Receptor
M-CSF	Makrofág kolónia stimuláló faktor (Macrophage Colony-Stimulating Factor)
MDM2	Mouse double minute 2 homológ
MDSC	Myeloid eredetű szupresszor sejtek (myeloid-derived suppressor cells)
MEK	MAPK/ERK kináz
Melan-A (MART-1)	T-sejtek által felismert 1-es melanóma antigén (Melanoma Antigen Recognized by T-cell 1)
MITF	Mikroftalmia-asszociált transzkripció faktor (Microphthalmia-Associated Transcription Factor)
MMP	Mátrix metalloproteináz
MSH	Melanocita stimuláló hormon
MRSA	Meticillin-rezisztens <i>Staphylococcus aureus</i>
mTOR	Emlős rapamicin célpont (mammalian Target of Rapamycin)
mTORC1	mTOR komplex 1 (mammalian target of rapamycin complex 1)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NF1	Neurofibromin 1
NF- $\kappa\beta$	Nukleáris Faktor- $\kappa\beta$
NIH-3T3	Egér eredetű fibroblaszt sejtvonal
NM	Noduláris melanóma (Nodular Melanoma)
NRAS	Neuroblasztóma RAS vírus onkogén homológ (Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog)
OS	Teljes túlélés (overall survival)
ORR	Objektív válaszarány (objective response ratio)
„p”	A statisztikai szignifikancia szintje
p53	p53-as tumorszuppresszor gén
p62/SQSTM1	Sequestosome 1
PARP	Poli (ADP-ribóz) polimeráz
PBS	Foszfát pufferes sóoldat (Phosphate Buffer Saline)
PD-1	Programozott sejthalál 1 (programmed cell death 1)
PD-L1	Programozott sejthalál ligand 1 (programmed cell death ligand 1)
PDCD4	Programozott sejthalál fehérje 4 (Programmed Cell Death Protein 4)
PEG-IL2	Pegilált-Interleukin-2
PEG-IL-10	Pegilált-Interleukin-10
PFS	Progressziómentes túlélés (progressive free survival)
PI3K	Foszfatidil-inozitol-3-kináz (Phosphatidyl-inositol-3-Kinase)
PI3KC3	Foszfatidil-inozitol-3-kináz komplex 3
PTEN	Foszfatáz és tenzin homológ (Phosphatase and tensin homologue)
PVDF	Polivinilidén-fluorid
RAF	Szerin/treonin specifikus protein kináz
RAS	Kis GTP-kötő fehérje
R-D	Regisztráció irányított (Registration-Directed)
ROS	Reaktív oxigén szintetáz (reactive oxygen synthetase)
RT	Sugárterápia (radiotherapy)
S100	Kalcium kötő fehérje
SBRT	Sztereotaxiás testbesugárzás (Stereotactic Body Radiotherapy)
S.D.	Standard deviancia

SDS	Nátrium-dodecil-szulfát (Sodium-dodecyl-sulfate)
SDS-PAGE	Nátrium-dodecyl-szulfát - Poliakrilamid gélelektroforézis (Sodium-dodecyl-sulfate-Poliacrilamide Gel Electrophoresis)
SEM	A mintaátlag standard hibája (standard error of the mean)
SLE	Szisztémás lupus erythematosus
SRS	Sztereotaxiás sugársebészet (Stereotactic Radiosurgery)
SSM	Felzínesen terjedő melanóma (Superficial Spreading Melanoma)
STAT3	Jelátviteli és transzkripciós aktivátor (Signal Transducer and Activator of Transcription 3)
TAM	Tumor asszociált makrofágok
TBST	Tween-20-t tartalmazó Tris-pufferes sóoldat
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TERT	Telomeráz reverz transzkriptáz
THC	$\Delta 9$ -tetrahidrokannabinol
TIL	Tumorinfiltráló limfociták (tumor-infiltrating lymphocytes)
TNF- α	Tumornekrózist előidéző faktor alfa (Tumor Necrosis Factor alpha)
TP53	Tumor protein 53, tumorszuppresszor gén
Treg	Regulátor T-sejtek
TRP	Átmeneti receptorpotenciál (Transient Receptor Potential)
TNM	Standardizált rendszer a daganatos betegségek stádiumának meghatározására, T: tumor, N: nyirokcsomó, M: metasztázis
ULK-1	Unc-51-like kinase 1
UV	Ultraibolya sugárzás
UVRAG	UV sugárzás elleni rezisztenciával kapcsolatos gén (UV radiation resistance-associated gene)
VPS34	Vakuólumfehérje-szortírozó 34 (Vacuolar Protein Sorting 34)
WNT	Wingless/Integrated fehérjecsald
WHO	Egészségügyi világszervezet (World Health Organization)
ZnPP	Cink-protoporfirin IX (Zinc Protoporphyrin IX)

I. Bevezetés

Daganatok és szívbetegségek: újabb terápiás megközelítések

A civilizációs betegségek közé tartozó szív- és érrendszeri, valamint daganatos megbetegedések napjaink vezető halálokaiknak számítanak világszerte, így Európában, Amerikában, valamint hazánkban is. Az átlagéletkor folyamatos növekedését figyelembe véve különösen nagy kihívást jelent e betegségekhez társuló patológiás elváltozások megelőzése, felismerése és kezelése [1-4].

Bár a szívbetegségek és a daganatos kórképek klinikai megnyilvánulásai eltérnek, számos közös patomechanizmus jellemzi őket: mindkét betegségtípus kialakulásában szerepet játszanak a krónikus gyulladás, az oxidatív stressz, az elhízás, az egészségtelen életmód és genetikai predispozíciók is.

A sejtszintű mechanizmusok közül különösen az autofágia (sejttakarítás) és az apoptózis (programozott sejthalál) szerepe jelentős mind a szív- és érrendszeri betegségekben, mind a daganatokban. Az autofágia fenntartja a sejtek homeosztázisát, degradálja a sérült organelleket és fehérjéket, segítve a szív működését, ugyanakkor szabályozatlan aktivációja hozzájárulhat különféle patológiákhoz is [5, 6]. A daganatsejtekben az autofágia kettős szerepet játszhat: egyrészt tumorszuppresszorként működhet, másrészt elősegítheti a tumorsejtek túlélését stresszhatás alatt, növelve a terápiás rezisztenciát [7].

Az elmúlt évtizedekben jelentős előrelépés történt a kardiovaszkuláris és daganatos betegségek korai diagnózisában, megelőzésében és kezelésében, ennek ellenére továbbra is ezek a betegségek tartoznak világszerte a vezető halálokok közé. Magyarországon az utóbbi években ezekhez a kórokhoz társuló halálozási arány kifejezetten növekvő tendenciát mutat [3]. Az egészségügyi ellátás elsődleges célkitűzése a betegségek kialakulásának megelőzése, amennyiben azonban a betegség már manifesztálódott, a lehető leghatékonyabb, ugyanakkor minimális mellékhatással járó gyógyszeres vagy sebészeti terápia alkalmazása a kívánatos.

Az egészségnevelés és az egészségügyi rendszerek fejlődése világszerte eltérő módon alakult, kontinensek és társadalmi berendezkedések szerint, következetesen még egy adott országon – így Magyarországon – belül is jelentős különbségek figyelhetők meg (WHO, 2021). Orvosként és kutatóként vallom, hogy a hatékony terápia mellett alapvető társadalmi érdek a prevenció hangsúlyozása, mivel a megelőzés költséghatékonysága kiemelkedő: a becslések szerint 20–100-szor alacsonyabb költségráfordítást igényel, mint egy előrehaladott krónikus betegség hosszútávú gyógyszeres kezelése [8].

Külön kiemelendő, hogy a kardiovaszkuláris és daganatos betegségek számos ponton összefonódnak, mitöbb egymást erősítő kóros tényezőkön keresztül is megjelenhetnek. Ennek következtében a terápiás megközelítéshez egyre inkább komplex, multidiszciplináris szemlélet szükséges, amelynek egyik legdinamikusabban fejlődő területe az onkokardiológia. Az onkológiai terápiák kardiotoxikus mellékhatásainak kezelése és megelőzése csak szoros klinikus–kutató együttműködéssel valósítható meg [9, 10].

Bőrgyógyászként mindennapi klinikai gyakorlatomban gyakran találkozom a kután melanóma diagnózisával járó bizonytalansággal és a betegek kilátástalanságérzésével, leginkább a betegség előrehaladott stádiumában. Ezek a közvetlen betegélmények jelentős mértékben hozzájárultak érdeklődési területem alakulásához, amely elsősorban a melanóma patofiziológiájának és terápiás lehetőségeinek mélyebb megismerésére irányul.

A kután melanóma az egyik legagresszívabb bőrdaganat, amely kiemelkedően magas metasztatikus potenciálja révén nehezen kezelhető, és jelentősen rontja a hosszú távú túlélési arányokat [11]. A prognózis szoros összefüggésben áll a korai felismeréssel és az időben alkalmazott, megfelelő terápiás stratégiák bevezetésével [12].

A hagyományos terápiás lehetőségek – mint a sebészi eltávolítás, a sugárkezelés és a kemoterápia – mellett az elmúlt években jelentős fejlődés történt a szisztémás és lokális kezelések területén, különösen a célzott terápiák bevezetésével [13, 14]. Mindazonáltal az előrehaladott, metasztatikus melanóma túlélési aránya továbbra is kedvezőtlen maradt [15]. Ezért egyre nagyobb figyelem irányul a természetes eredetű bioaktív vegyületekre, például a flavonoidokra, szaponinokra és kannabinoidokra, amelyek ígéretes alternatívát kínálhatnak a melanóma terápiájában [16]. Az utóbbi évek kutatásai rámutattak a kannabigerol (CBG) – egy nem pszichotróp *Cannabis sativa* származék – daganatellenes hatásaira, többek között melanóma sejtekben is [17]. Ebben a munkában ezért kiemelt szerepet kapnak a melanóma sejtvonalakon végzett in vitro vizsgálatok, különös tekintettel egy újonnan előállított szintetikus CBG-származékra, amelynek jövőbeli klinikai alkalmazása hozzájárulhat a jelenleg elérhető terápiák korlátainak áthidalásához [18].

A bevezetőben említett másik, jelentős civilizációs betegségtípus a kardiovaszkuláris megbetegedések csoportja. Míg a daganatos betegségek kialakulásában a sejtek kontrollálatlan proliferációja dominál, addig a szívbetegségekben egy ehhez részben hasonló folyamat, az ún. méretnövekedés figyelhető meg, amely a szívizomsejtek kóros hipertrófiáját jelenti. Ez a szív méretének megnövekedésével, akut szívinfarktussal (AMI), iszkémia-reperfúziós (I/R) károsodással és az infarktust követő szívfunkció-romlással jár együtt [19]. Ennek kapcsán a tézis második részében egy korábbi vizsgálat eredményei kerültek

feldolgozásra, amely az endotelin-1 (ET-1) által kiváltott hipertrófiás elváltozásokat, valamint a hemoxigenáz-1 (HO-1) expressziójának változásait elemezte szívsejtekben, béta-ösztadiol (β -E) hatására, in vitro és in vivo kísérletes modellekben. Figyelmem középpontjában kutatásaim során az a megközelítés állt, hogy a daganatos és kardiovaszkuláris betegségek prevenciójában és terápiájában nem csupán gyógyszeres beavatkozások, hanem életmódbeli és egyéb nem farmakológiai módszerek is szerepet játszhatnak. Ennek fényében kerültek bemutatásra a kutatási eredmények ebben a munkában.

II. Célkitűzések

A civilizációs betegségek közé tartozó daganatos és kardiovaszkuláris megbetegedések mögött összetett, sokrétű molekuláris mechanizmusok állnak. Jelen munkában két, látszólag különböző, mégis több ponton egymással összefüggő patológiai elváltozást vizsgáltunk in vitro, illetve in vivo. A kutatás első része egy újonnan szintetizált kannabigerol (CBG) származék, az LE-127/2 tumorelles hatásainak jellemzésére irányult humán melanóma sejtvonalakon, míg a második részben az endotelin-1 (ET-1) által kiváltott kardiális hipertrófia és a hemoxigenáz-1 (HO-1) expresszió közötti kapcsolatot tanulmányoztuk.

II.1. A CBG-származék LE-127/2 daganatellenes hatásainak vizsgálata melanóma sejtvonalakon

A természetes eredetű CBG nem pszichotróp fitokannabinoid, amelyről több tanulmány is beszámolt, hogy antitumor hatással bír különféle sejtvonalakon, beleértve a melanómát is [18, 20, 21]. Terápiás alkalmazását ugyanakkor jelentősen korlátozzák kedvezőtlen farmakokinetikai tulajdonságai, például gyenge vízoldékonysága és alacsony biológiai hasznosulása. E problémák leküzdésére a közelmúltban félszintetikus származékokat állítottak elő Mannich-típusú reakciókkal, amelyek in vitro körülmények között jobban vizsgálhatók, és potenciálisan jobb hatásokkal alkalmazhatók [22].

Kutatásunk célja az LE-127/2 (CBG bisz-N-butyl-dihydro-1,3-oxazin származék) daganatellenes hatásának komplex jellemzése volt három humán melanóma sejtvonalon. A következő kérdésekre kerestük a választ:

- Hogyan befolyásolja az LE-127/2 a melanóma sejtek proliferációját és életképességét?
- Kivált-e sejthalálhoz vezető folyamatokat, különös tekintettel az apoptózisra és az autofágiára?
- Változik-e a klasszikus autofágia-markerek (LC3-I/II, Beclin-1, p62/SQSTM1) expressziója a kezelés hatására?

Mivel az apoptózis és az autofágia szoros kölcsönhatásban állnak egymással, célunk volt ezen sejthalálformák közötti molekuláris egyensúly és kapcsolódási pontok feltérképezése az LE-127/2 kezelést követően. Ezen markerek és útvonalak vizsgálata hozzájárulhat a CBG-származékok pontosabb biológiai hatásprofiljának megértéséhez, valamint új prognosztikai vagy terápiás célpontok azonosításához.

II.2. Az endotelin-1 által kiváltott kardiális hipertrófia és a HO-1 expresszió kapcsolatának vizsgálata

A kutatás második része a kardiovaszkuláris betegségek molekuláris hátterének megértésére irányult, azon belül is a szívizomsejtek kóros méretnövekedésének (hipertrófia) vizsgálatára. Az endotelin-1 egy erős vazokonstriktor és proinflammatorikus peptid, amely közismerten hipertrófiás változásokat idéz elő a szívizomban, és hozzájárul az akut szívinfarktus, az iszkémia-reperfüziós károsodás és a krónikus szívelégtelenség kialakulásához [23, 24].

Kiemelt figyelmet fordítottunk a hemoxigenáz-1 enzim szerepére, amely jól ismert citoprotektív, gyulladáscsökkentő és antioxidáns hatásairól, és amelynek expressziója kardiális stresszállapotokban nagymértékben csökken.

A vizsgálat során az alábbi célokat tűztük ki:

- Meghatározni, hogy az ET-1 hogyan befolyásolja a sejtméretet, életképességet és a HO-1 fehérjeszintet in vitro és in vivo szívizommodellekben;
- Megvizsgálni, hogy a β -ösztadiol (β -E) képes-e ellensúlyozni az ET-1 által kiváltott kóros, hipertrófiás sejtváltozásokat H9c2 patkány szívizomsejtekben, különös tekintettel a HO-1 enzim szerepére;
- Feltérképezni, hogy a HO-1 célzott indukciója milyen terápiás potenciállal bírhat a szívizom-hipertrófia megelőzésében;
- Feltárni egy új lehetséges terápiás irányt, amelyben a β -E hatása HO-1 indukcióval kombinálva potenciálisan alkalmazható lehet különböző krónikus betegségek kezelésére.

A HO-1 indukció jelentősége nemcsak a kardiovaszkuláris betegségek esetében bír relevanciával, hanem szélesebb értelemben véve is kulcsfontosságú lehet krónikus gyulladásozó folyamatok modulálásában.

A dolgozat célkitűzései mentén arra törekedtünk, hogy jobban megértsük azokat a sejtszintű mechanizmusokat, amelyek alapját képezik a daganatos és kardiovaszkuláris betegségek patogenezisének. Az LE-127/2, egy új CBG-származék hatása és a HO-1 szabályozása olyan ígéretes irányvonalakat képvisel, amelyek a jövőben hozzájárulhatnak új terápiás célpontok azonosításához és a civilizációs betegségek hatékonyabb kezeléséhez.

III. Irodalmi áttekintés

III.1. A melanóma incidenciája, epidemiológiája

A malignus melanóma előfordulási gyakorisága világszerte folyamatos növekedést mutat az elmúlt évtizedek során. Az éves incidencia növekedési üteme egyes, világos bőrtípusú populációk körében – különösen Észak-Amerikában, Észak-Európában, Ausztráliában és Új-Zélandon – elérheti a 4–6%-ot is [25]. Ez a tendencia jól dokumentált a különböző epidemiológiai tanulmányokban, és egyértelműen jelzi, hogy a melanóma egyre komolyabb közegészségügyi kihívást jelent a magas rizikójú népekségeksben. Mindenképpen meg kell említeni, noha a bőr melanómás megbetegedése nem tartozik a legmagasabb mortalitású rosszindulatú daganatok közé, a Nemzeti Rákregiszter adatbázisa szerint például, 2001 és 2019 között az új betegség szám hazánkban is a nemzetközi változást követi, amely az elmúlt években mintegy a melanómás esetek megduplázódását jelenti [26]. Az incidencia növekedése azonban nem egyenletes a különböző etnikai csoportok, földrajzi régiók, életkor és nemek szerint. Például a világos bőrtípusú populációkban a betegség jelentősen gyakoribb, míg a sötétebb bőrtípusú csoportokban – az afrikai vagy ázsiai származású népekségek körében – a melanóma ritkább, ugyanakkor gyakran későbbi stádiumban kerül felismerésre, ami rontja a prognózist [27].

A földrajzi különbségek mellett az életkor és a biológiai nem is jelentős befolyásoló tényezők. Fiatalabb korosztályokban – különösen a 25–45 év közötti nők esetében – az incidencia emelkedése gyorsabb lehet, míg idősebb korcsoportokban, főként férfiaknál, nemcsak az incidencia, de a halálozás is magasabb [28]. Az ilyen különbségek figyelembevételre elengedhetetlen, mivel azok a melanóma valódi tendenciáinak torzított értelmezéséhez vezethetnek, ha nem vizsgáljuk őket elkülönítve.

Az incidencia emelkedésének hátterében több tényező állhat: a fokozott UV-expozíció, a megváltozott napozási szokások, a mesterséges UV-források (szolárium) használata, valamint az, hogy a bőrrák elleni szűrések és a diagnosztikai technikák fejlődése révén egyre több, korábban esetleg nem észlelt eset kerül felismerésre.

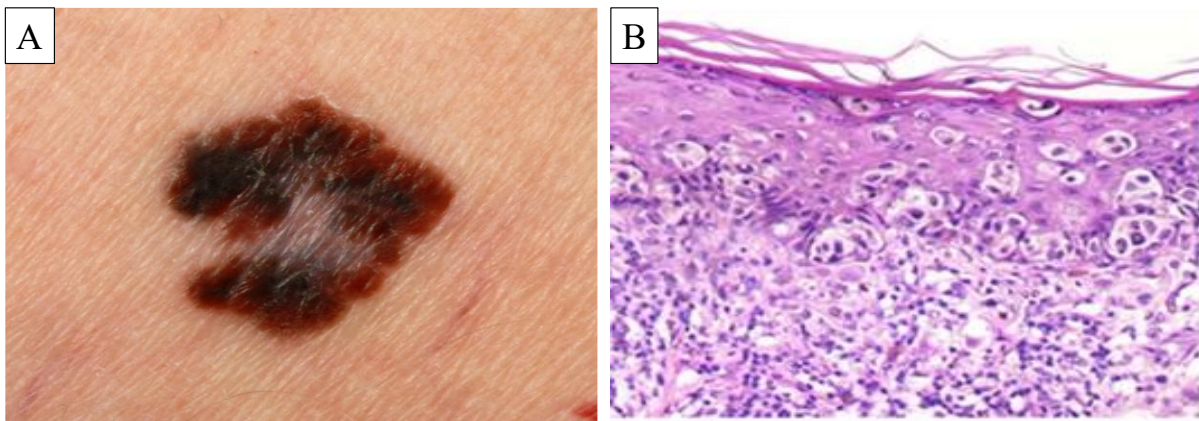
III.2. A melanóma szövettani típusai

A melanóma szövettani típusainak áttekintése elengedhetetlen a pontos diagnózis és a megfelelő kezelési stratégia kialakítása érdekében. A következőkben bemutatásra kerülnek a

legfontosabb szövettani altípusok, mind klinikai, mind molekuláris jellemzőikkel, valamint azok prognosztikai jelentősége.

III.2.1. Felszínesen terjedő melanóma (Superficial Spreading Melanoma – SSM)

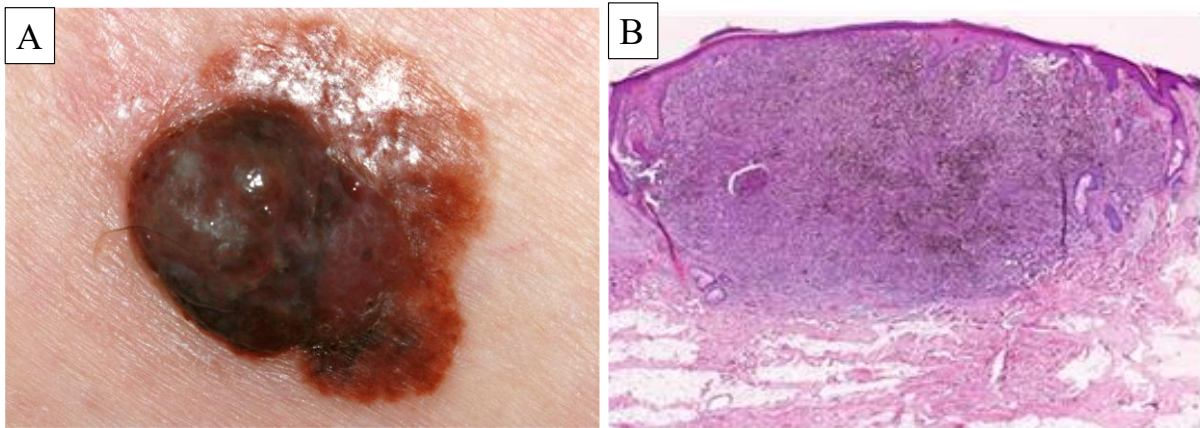
A felszínesen terjedő melanóma a leggyakoribb melanóma típus, amely a bőr felszíni rétegeiben, vízszintesen terjed először, majd vertikálisan is invadálhatja a dermizst (1. Ábra, A). Szövettanilag az epidermiszben egyenetlen eloszlású, atípusos melanociták találhatók, gyakran "pagetoid" elrendeződésben, azaz egyesével vagy kis csoportokban felfelé migráló sejtek formájában (1. Ábra, B). A tumorsejtek gyakran nagy citoplazmával, pleomorf magokkal és prominens nukleóluszokkal rendelkeznek [29, 30].



1. Ábra. Szuperficiálisan terjedő melanóma morfológiai megjelenése (A). A szuperficiális melanóma szövettani jellemzői, melyen látható, hogy ez a melanóma-típus a bőrfelszínen vízszintesen – az epidermiszben – terjed (B).

III.2.2. Noduláris melanóma (Nodular Melanoma – NM)

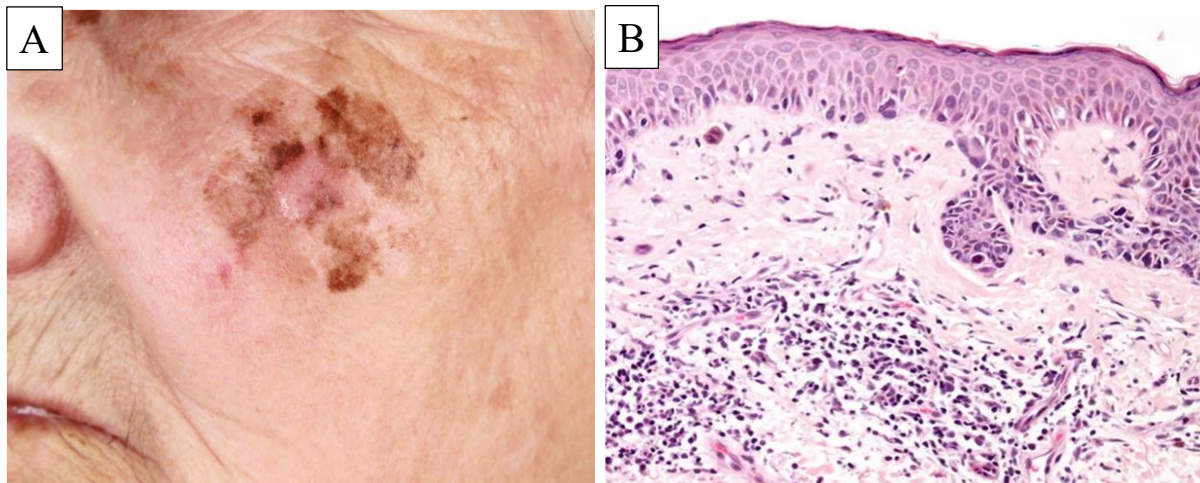
A noduláris melanóma egy agresszív, gyorsan növekvő malignus bőrdaganat, amely morfológiailag leggyakrabban polipoid vagy domború, fekete vagy sötétbarna elváltozásként jelenik meg. Szövettanilag jellemző rá a vertikális növekedési fázis, miközben a radiális (epidermális) terjedés minimális vagy hiányzik [31]. A tumor főként a dermiszben helyezkedik el, ahol szövettanilag nagy, epithelioid jellegű, poligonális sejtek alkotják, prominens nukleóluszokkal. A sejtek nem mutatnak érési (maturációs) jeleket a mélyebb rétegek felé, és fokozott mitotikus aktivitás, valamint gyakran ulceráció figyelhető meg. A daganat általában jól körülhatárolt, tömött, exofitikus növedék, amely gyakran már a diagnózis pillanatában mélyen infiltrálja a dermizst vagy a szubkutiszst (2. Ábra) [32].



2. Ábra. A noduláris típusú melanóma morfológiai és szövettani reprezentatív megjelenése (A), melyen látható a bőrből kiugró tumorcsomó, valamint a szövettani képen a daganatot alkotó epithelioid melanociták kiugró magokkal (B).

III.2.3. Lentigo maligna melanóma (Lentigo Maligna Melanoma – LMM)

A lentigo maligna melanóma (LMM) a bőrön kialakuló rosszindulatú festékes daganat egyik altípusa, amely leggyakrabban az idősebb korosztályban, napfénynek kitett területeken (pl. arc, orr, fül, halánték) alakul ki. Kiindulása a *lentigo maligna* nevű, in situ melanocitás elváltozás, amely évekig stabil maradhat, mielőtt invazív formába megy át (3. Ábra) [33, 34].

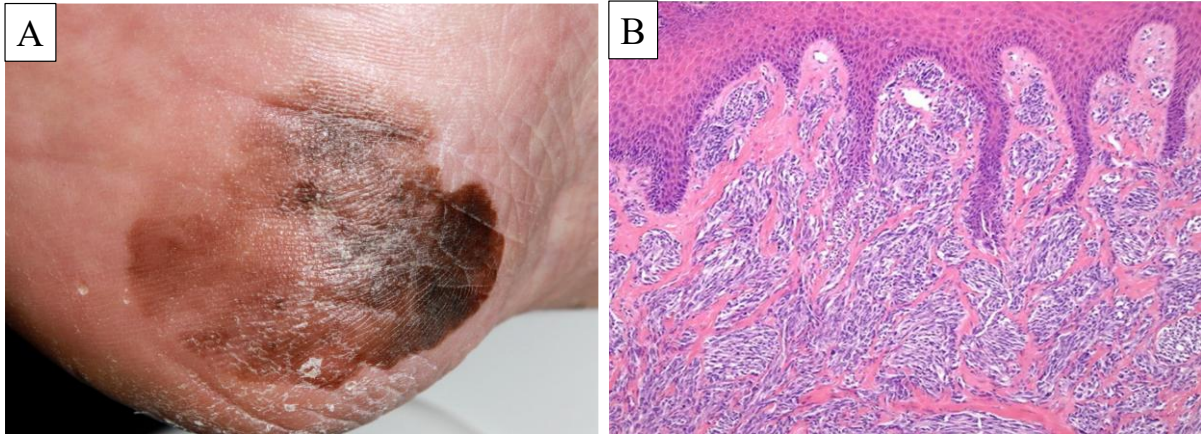


3. Ábra. A lentigo maligna melanóma morfológiai (A) és szövettani képe (B).

III.2.4. Akralis lentiginózus melanóma (Acral Lentiginous Melanoma – ALM)

Az akralis lentiginózus melanóma a bőr melanómáinak ritkább altípusa, amely főként a kéz és láb tenyéri-talpi felszínén, valamint a körömágyon (szubungvális) alakul ki. Noha a világos bőrtípusú populációban ritka, az ázsiai, afrikai és latin-amerikai származású személyeknél ez a leggyakoribb melanómatípus. Hisztológiailag az epidermiszben

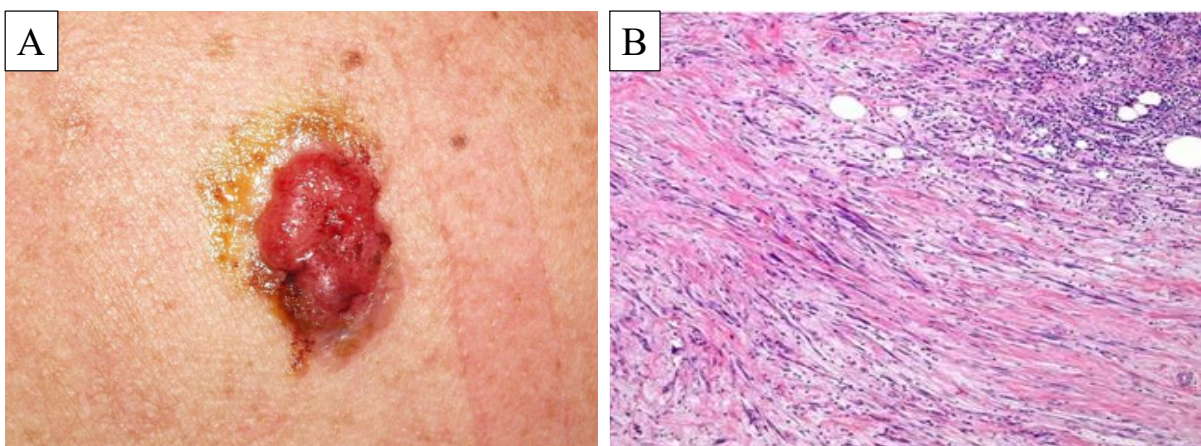
lentiginózus elrendeződésű atípusos melanociták találhatóak, gyakran pagetoid elrendeződésben. A sejtek jellemzően hyperkróm magokkal rendelkeznek és változó alakúak [35] (4. Ábra).



4. Ábra. Akrális lentiginózus melanóma morfológiai (A) és szöveti (B) reprezentatív képe.

III.2.5. Dezmoplasztikus melanóma (Desmoplastic Melanoma – DM)

A dezmoplasztikus melanóma (DM) egy ritka, de klinikailag jelentős altípusa a rosszindulatú melanómának, amely jellemzően napfénynek kitett területeken (különösen fej-nyak régióban) alakul ki, elsősorban idősebb egyéneknél. A daganat gyakran heghöz vagy kötőszövetes elváltozáshoz hasonló, kevésbé pigmentált vagy teljesen amelanotikus megjelenésű, ami diagnosztikai kihívást jelenthet. Hisztológiailag a dermiszben szálás kötőszöveti stróma és atípusos melanociták találhatóak. A tumorsejtek gyakran hosszúkásak és szórványosan elhelyezkedők (5. Ábra). [36].



5. Ábra. Dezmoplasztikus melanóma hegszerű megjelenéssel (A). Az invazív dermiszben nagy mennyiségű kollagénes stróma, melyben atípusos, orsó alakú melanociták vannak (B).

Szövetteni megjelenésük alapján egyéb melanóma típusok is előfordulnak, amelyeket itt csak felsorolás szintjén említek meg. Ezek pedig a következők: *epithelioid sejtes melanóma*, *orsósejtes melanóma*, *ballonsejtes melanóma*, *rosszindulatú kék naevus melanóma*.

A melanóma szövetteni típusainak pontos meghatározása alapvető fontosságú a prognózis és a kezelési stratégia kialakítása szempontjából. A fenti típusok mindegyike különböző klinikai és molekuláris jellemzőkkel rendelkezik, amelyek befolyásolják a betegség lefolyását és a kezelés hatékonyságát. Ennek ismeretében a következő fejezetekben részletesebben tárgyalom a melanóma diagnózisának alapjait, a kialakulásának hátterében álló molekuláris mechanizmusokat, illetve az ezen alapuló terápiás lehetőségeket.

III.3. A melanóma diagnosztikája

III.3.1. Noninvazív diagnosztikai eljárások

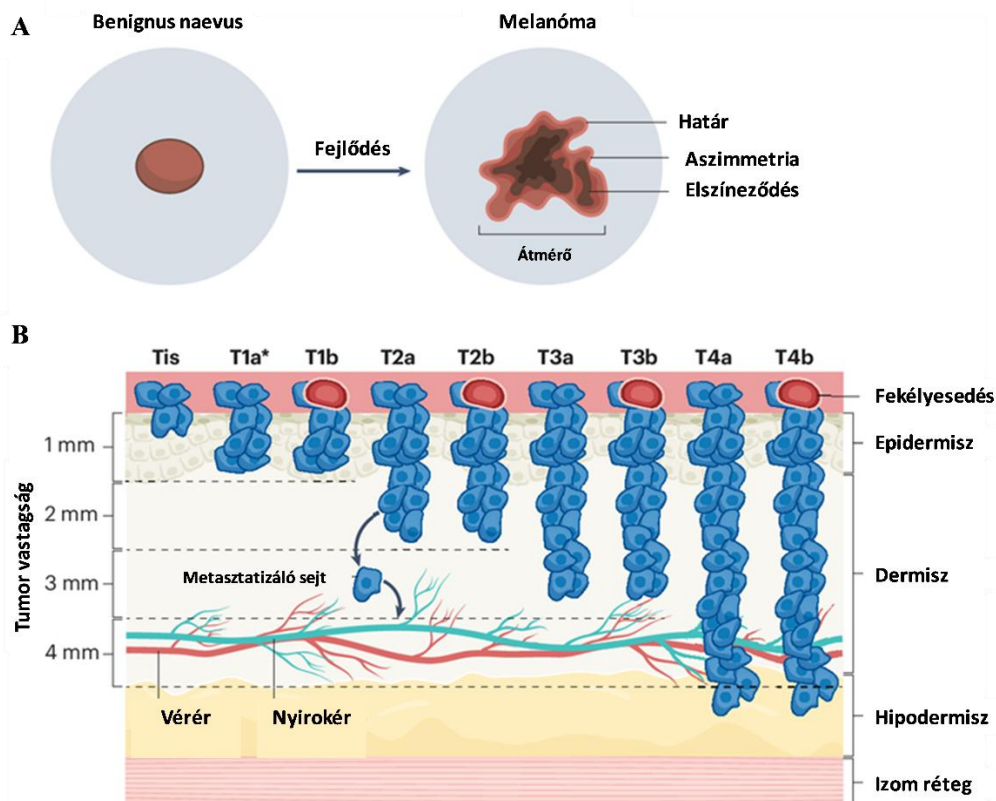
A melanóma felismerésének első lépése a fizikális vizsgálat, amely során a bőr elváltozásainak vizuális és tapintásos értékelése történik. A vizsgálat nemcsak az érintett lézióra, hanem a környező ép bőrterületre is ki kell, hogy terjedjen. A klinikai gyakorlatban két jól bevált módszer terjedt el: az ABCDE szabály és a hétpontos dermatoszkópos értékelési rendszer. Az ABCDE rendszer a melanóma jellegzetes morfológiai jegyeit foglalja össze, amelyek a következők: aszimmetria (A), szabálytalan szegély (B), színeltérések (C), 6 mm-nél nagyobb átmérő (D), valamint a növedék időbeli változása (E) [37].

A hétpontos dermatoszkópos rendszer elsődleges (2 pontot érő) és másodlagos (1 pontot érő) kritériumokat különböztet meg. Az összesített pontszám alapján, ha az elváltozás eléri vagy meghaladja a 3 pontot, további diagnosztikus vizsgálatok elvégzése következik, melyek között elsőként a biopszia elvégzése javasolt szövetteni vizsgálat céljából [38].

Az elmúlt években előrehaladás történt a melanóma korai felismerését támogató noninvazív diagnosztikai módszerekben. Példaként említve, számos mobilalkalmazás, mint a SkinVision, UMSkinCheck és a MoleScope segíti az önellenőrzést, azonban ezek pontossága eltérő, ezért önmagukban nem helyettesítik a klinikai vizsgálatot [39]. Klinikailag alkalmazott eszközök, mint a *MelaFind* és a *SIAScope* a látható és közeli infravörös tartományban működnek, segítve az orvosi döntést a biopszia szükségességéről [40].

III.3.2. Szövettani értékelés

A kután melanóma diagnosztikájának és prognosztikai megítélésének egyik lényeges alapja a szövettani vizsgálat. A daganat morfológiai és inváziós jellemzőinek pontos meghatározása elengedhetetlen a stádium meghatározásához és a terápiás stratégia eldöntéséhez. Két fontos tényezőt kell megemlíteni a szövettani besoroláshoz szükséges paraméterek közül: kiemelkedően fontos a daganat vastagságának (*Breslow-index* vagy *vastagság*) és anatómiai inváziós mélységének (*Clark-szintek*) meghatározása (melyeket a Nemzetközi Rákkutató Szövetség (American Joint Committee on Cancer, AJCC) 8. kiadása is figyelembe vesz a TNM-stádium meghatározás során [41]). A *Breslow-vastagság* a legfontosabb önálló prognosztikai marker, amely a tumor invazivitását tükrözi, és meghatározza a sentinel nyirokcsomó-biopszia és további onkológiai beavatkozások szükségességét. A primer melanóma szövettani diagnózisa során több morfológiai és sejtszintű jellemző is értékelésre kerül. Ezek többsége független prognosztikai tényezőként szolgál, és közvetlenül befolyásolják a terápiás döntéshozatalt. A diagnózis felállításához szükséges morfológiai paramétereket a 6. Ábra szemlélteti.



6. Ábra. A kután melanóma diagnózisát szolgáló értékelő rendszer a tumor morfológiai megjelenése és méretei alapján. Az ABCDE rendszer: A: aszimmetria, B: szabálytalan szél, C: színbeli elváltozás, D: átmérő >6 mm, E:

kiemelkedés vagy evolúció (A). A progresszió és stádiumbeosztás az AJCC 8. kiadása szerint: T: az elsődleges daganat vastagsága (Breslow), valamint fekélyezettség (a = nincs, b = van) (B) [42].

III.3.3. Immunhisztokémiai és molekuláris biomarkerek szerepe a melanóma diagnosztikájában

Az immunhisztokémiai vizsgálatok lehetővé teszik a melanóma sejttípusának és proliferációs aktivitásának gyors, reprodukálható meghatározását, amely alapvető a pontos diagnózis és prognózis megállapításában. Az olyan melanocita markerek, mint az *S100*, *HMB-45*, *Melan-A* és a *Ki-67* proliferációs marker egyaránt fontosak a daganat agresszivitásának felméréséhez, valamint a személyre szabott terápiás stratégiák kialakításához [43]. Ezen túlmenően egyéb specifikus immunhisztokémiai markerek használata is szóba jöhet (CD10, p63) melyeket itt most nem részleteznék [44].

III.3.4. A melanóma kialakulásának mechanizmusa és ehhez kapcsolódó terápiás lehetőségek

A kután melanóma olyan agresszív bőrdaganat, amely a pigmenttermelő melanocitákból alakul ki egy igen komplex, többlépcsős folyamat révén, amelyben a környezeti hatások (elsősorban UV-sugárzás hatása) mellett a genetikai predispozíció és az immunológiai folyamatok együttesen vesznek részt (7. Ábra) [45]. A következő fejezetekben a cutan melanóma molekuláris mechanizmusainak legfontosabb összetevőit ismertetem, különös tekintettel azokra a kulcsfontosságú mutációkra és jelátviteli útvonalakra, amelyeknek terápiás kapcsolódása is van.

III.3.5. UV-sugárzás és a karcinogenezis kezdeti lépései

A melanómagenezis első lépcsőjében mindenképp az UVB-sugárzás által okozott DNS-károsodás váltja ki a sejtek genetikai instabilitását. Amennyiben az UV-fény indukálta ciklobután pirimidin dimer (CPD) és 6-4 fototermék formájában jelentkező károsodások nem kerülnek kijavításra, az mutációkhoz vezet, amely onkogének aktivációját vagy tumorszuppresszor gének inaktivációját eredményezi [45].

III.3.6. A kután melanómát érintő onkogén mutációk

A Daganatok Genomiális Atlasza (Cancer Genome Atlas, TCGA) alapján a melanómák genetikai profiljuk szerint négy fő alcsoportba sorolhatók: BRAF-, NRAS-, NF1-mutációt hordozó és tripla vad típus, amely egyik ismert mutációt sem tartalmazza [46].

Kiemelkedő fontossággal bír a BRAF gén mutációja, amely a melanóma esetek ~50-60%-ában fordul elő, mégpedig leggyakrabban a V600E pontmutáció formájában. Ez a mutáció konstitutív módon aktiválja a mitogén-aktivált protein kináz/extracelluláris szignál-reguláló kináz (MAPK/ERK) jelátviteli útvonalat (RAS → RAF → MEK → ERK), amely fokozott sejtosztódást és sejtproliferációt eredményez. Azokban az esetekben, ahol a BRAF mutáció nem jelenik meg, általában az NRAS mutáció van jelen (~15-20%), amely mind a MAPK, mind foszfatidil-inozitol-3-kináz/protein kináz B (PI3K/AKT) útvonalat képes aktiválni. A harmadik gyakori genetikai eltérés a melanómában a neurofibromin 1 (NF1) tumor szuppresszor gén inaktivációja (~10-15%), amely a RAS-jel leállításáért felelős GTPáz-aktiváló fehérjét kódolja [46]. Ezzel párhuzamosan gyakoriak még a telomeráz reverz transzkriptáz (TERT) promóter mutációk, amelyek a telomeráz reverz transzkriptáz expressziójának fokozása révén lehetővé teszik a sejtek számára a replikatív halhatatlanságot [45].

Összefoglalva, az említett mutációk eredményeként az alábbi fő jelátviteli útvonalak aktiválódnak:

- MAPK/ERK útvonal: A sejtnövekedés és proliferáció egyik kulcsfontosságú szabályozója. A BRAF V600E mutáció következtében MEK és ERK folyamatos aktiváció alatt áll, így a sejt osztódása kontrollálatlanná válik.
- PI3K/AKT útvonal: Az NRAS mutáció aktiválhatja a PI3K-t, amely az AKT-on keresztül túlélési jeleket közvetít.

A NF1 gén mutációja szintén a RAS jelátviteli út szabályozását érinti, és jellemzően idősebb betegek esetén jelenik meg. A mutáció gyakran társul BRAF- vagy NRAS-mutációhoz, és a tripla vad típusú melanómák egyik molekuláris hátterét adja [47].

Ezenkívül fontos genetikai eltérés a foszfatáz és tenzin homológ (PTEN) tumor szuppresszor gén deléciója vagy inaktiváló mutációja, amely normál körülmények között negatív szabályozója az AKT-jelátvitelnek. A PTEN a PI3K/AKT útvonal negatív szabályozója és elvesztése megnövekedett sejttúlélést, proliferációt, valamint célzott terápiákkal szembeni rezisztenciát eredményez. A PTEN inaktiváció gyakran társul BRAF-mutációval, különösen a BRAF-gátló kezelésre rezisztens esetekben, metasztatikus melanómákban [48, 49].

Bár a BRCA1-asszociált protein-1 (BAP1) gén elsősorban az uveális melanómában játszik központi szerepet, egyes tanulmányok szerint a BAP1 mutáció ritkán, de előfordulhat agresszív kután melanómákban is. A BAP1 a DNS-javításban és kromatin-remodellációban vesz részt, és mutációja összefüggésbe hozható gyorsabb tumorprogresszióval és rosszabb prognózissal [50].

Továbbá a sejtciklus szabályozásában kulcsfontosságú a ciklinfüggő kináz gátló 2A (CDKN2A) gén, amely jelentős genetikai hajlamosító tényező, mivel a familiáris melanómák mintegy 5–10%-ában öröklött csírasejtes mutációk azonosíthatók. A leggyakoribb ilyen eltérés a CDKN2A gén mutációja, amely a sejtciklus-gátló p16INK4a és p14ARF fehérjéket kódolja. Ezek elvesztése deregulált sejtosztódást eredményez. Ritkábban előforduló, de szintén jelentős genetikai eltérés a ciklin-függő kináz 4 (CDK4) mutáció, amely szintén a sejtciklus G1/S átmenetét szabályozó rendszerben működik. Az előbbi a G1 fázis szabályozásáért felel a CDK4/6 gátlásán keresztül, míg utóbbi a p53 stabilitását biztosítja az MDM2 gátlásán keresztül. A CDKN2A deléciója vagy metilációs inaktivációja a sejtciklus deregulációjához és az apoptózis elkerüléséhez vezet [51, 52].

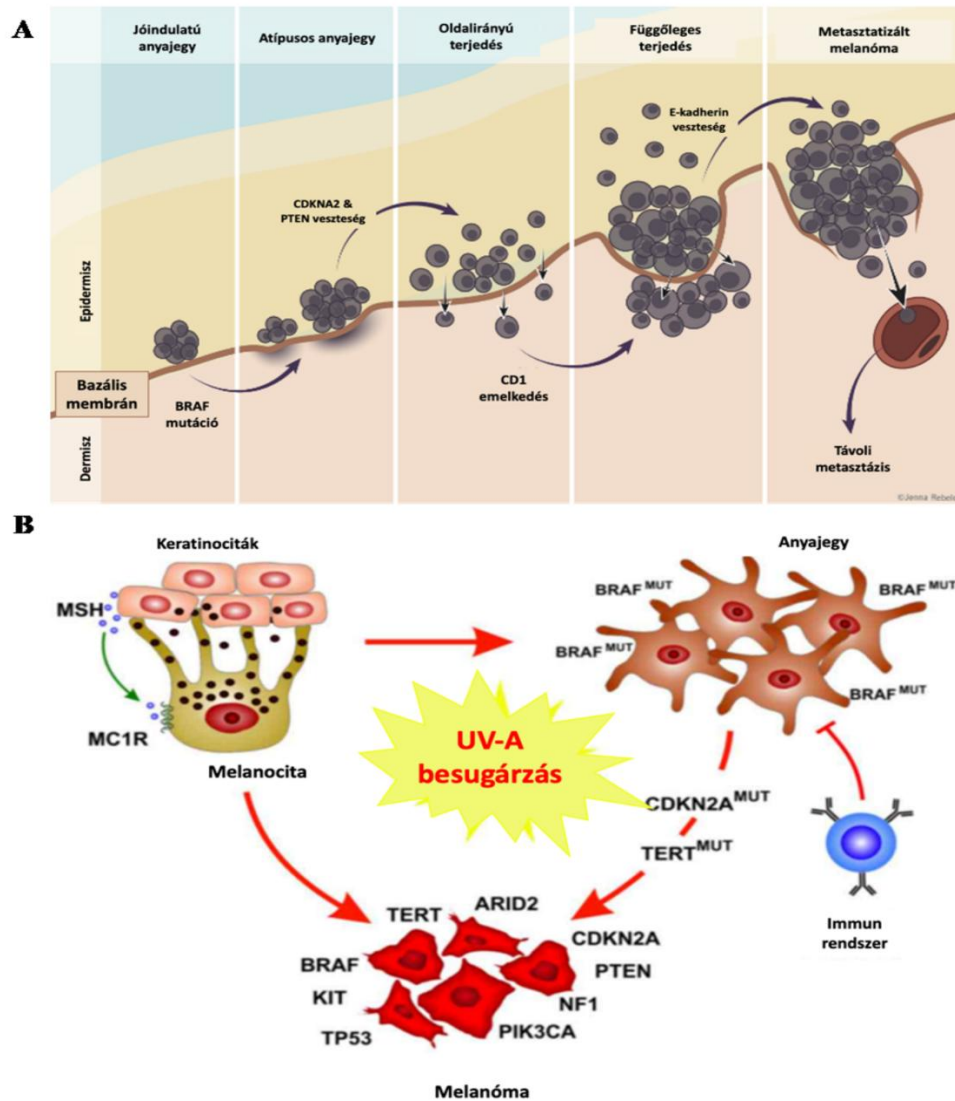
A mikroftalmia-asszociált transzkripció faktor (MITF) a melanociták „mester regulátora”, amely részt vesz a pigmentációs folyamatokban, sejt differenciációban és túlélésben. A MITF amplifikációja és fokozott aktivitása elősegíti a tumorsejtek alkalmazkodását és rezisztenciáját [53-55].

A melanóma progressziójának késői szakaszaiban – amikor eldől a daganat invazív potenciálja és áttétképző képessége – kiemelt szerepet tulajdonítanak az epiteliális–mezenchimális transzformációhoz (EMT-szerű programokhoz) kapcsolódó jelátviteli folyamatoknak, valamint a mátrix metalloproteinázok (MMP-k) fokozott aktivitásának. E mechanizmusok elősegítik a sejtek extracelluláris mátrixon való átjutását és a szöveti struktúrák lebontását. Emellett a WNT/ β -katenin jelátviteli útvonal aktivációja is jelentős mértékben hozzájárul a melanóma sejtek migrációjához, túléléséhez és a távoli metasztázisok kialakulásához [56].

III.3.7. Immunrendszer elkerülése és mikrokörnyezet

A melanóma sejtek több, egymással párhuzamos immunelkerülési mechanizmust alkalmaznak. Ezek közül kiemelkedő jelentőségű a programozott sejthalál ligand 1 (PD-L1) felszíni fehérje fokozott expressziója, amely a T-sejtek felszínén található PD-1 receptorhoz kötődik, gátolva ezzel azok aktivációját és citotoxikus funkcióját. A PD-L1 expresszió erősen

heterogén lehet melanómában (betegenként és tumorhelyenként is változik), ami befolyásolja a PD-1/PD-L1 irányú terápiák prediktív értékét [57, 58]. Ennek következtében immunszuppresszív tumor mikroökönyezet alakul ki, amelyet tovább erősítenek a regulátor T-sejtek (Treg), a tumor-asszociált makrofágok (TAM) és a mieloid eredetű szuppresszor sejtek (MDSC) aktivitása. MDSC-k és TAM-ok célzott kezelése ígéretes stratégia lehet az immun checkpoint inhibitor (ICI)-rezisztencia csökkentésére és az immunválasz fokozására melanómában [59].



7. Ábra. A melanóma fejlődésének lépcsőzetes mechanizmusa. Normál bőrben a melanociták egyenletesen oszlanak el az epidermiszben, a jóindulatú anyajegy a melanociták helyi felszaporodása figyelhető meg, de még nincs rendellenes sejtosztódás. Atípusos anyajegyek akkor alakulnak ki, amikor a sejteken genetikai instabilitás jelei jelennek meg és már mutatnak morfológiai eltéréseket is [45]. Végül pedig kialakul a melanóma, a melanociták kontrollálatlanul osztódnak, beszűrnek a dermiszt, és áttétképző potenciált mutatnak (A). Melanocita malignus transzformáció: A keratinociták a melanocita stimuláló hormonon (MSH) keresztül serkentik a melanocita proliferációt az MC1R receptoron keresztül. Az UV-A sugárzás közvetlenül mutációkat indukál

proto-onkogéneknél és tumorszuppresszor géneknél (pl. BRAF, TP53, PTEN), valamint elősegíti a jóindulatú névuszok kialakulását BRAF V600E mutációval. További mutációk (pl. TERT, CDKN2A) a névuszok malignus átalakulását eredményezhetik (B) [56].

III.3.8. A melanóma kezelési lehetőségei

Az előző fejezetben összefoglalt mutációkhoz és molekuláris mechanizmusokhoz szorosan kapcsolódnak a kután melanóma eltérő típusainak jelenleg elérhető terápiás lehetőségei, amelyet csak átfogóan mutatok be ebben a fejezetben, ezen túlmenően foglalkozom a kutatás középpontjában álló jövőbeli terápiás lehetőségekkel is.

Az elmúlt évtizedben a melanóma terápiája jelentős fejlődésen ment keresztül. Korai esetekben a fő kezelés a daganat és környezetének sebészi eltávolítása, előrehaladott stádiumban pedig jelenleg elsősorban stádiumfüggő célzott terápiás stratégiák jönnek szóba. Az agresszív viselkedés, a magas metasztatikus rizikó és a betegség molekuláris-immunológiai összetettsége egyre inkább indokoltá teszik a célzott, személyre szabottabb kezelést [57, 58].

III.3.9. Célzott terápia

A korábban már bemutatott molekuláris mutációk képezik az alapját a célzott terápiáknak. A melanómák molekuláris altípusai: BRAF (gyakran V600E vagy V600K mutáció), NRAS, NF1, illetve tripla vad típus között az egyik legjelentősebb a BRAF V600E mutáció a nem-rezekábilis vagy metasztatikus melanómák körülbelül 40–60%-ában. A vemurafenib egy kis molekulatömegű BRAF-inhibitor, amely szelektíven gátolja a mutáns BRAF V600E fehérjét, ezáltal blokkolja a patológiás MAPK jelátvitelt és indukálja a tumorsejtek apoptózisát. Az elsőként közölt III. fázisú BRIM-3 klinikai vizsgálat eredményei alapján a vemurafenib szignifikánsan javította a teljes - (overall survival, OS) és a progressziómentes túlélést (progressive free survival, PFS) a hagyományosan alkalmazott dacarbazin kezeléssel szemben [60]. Hátránya a vemurafenib alkalmazásának, hogy a BRAF mutáció gátlása önmagában rezisztenciához vezethet. A vemurafenib monoterápiája során szerzett rezisztencia általában a kezelés megkezdését követő 6–8 hónapon belül jelentkezik, melynek hátterében a MAPK útvonal újraaktiválódása (pl. MEK vagy NRAS mutáció révén), alternatív túlélési útvonalak aktiválódása (pl. PI3K/AKT), valamint másodlagos mutációk megjelenése állhat. Ezen problémák leküzdése érdekében a terápiás protokollokat továbbfejlesztették kombinált célzott kezelésekkel, például a BRAF-inhibitor vemurafenib és a MEK-inhibitor cobimetinib együttes alkalmazásával.

zásával, amely szignifikánsan meghosszabbította a PFS-t és OS-t a vemurafenib monoterápiához képest [60, 61]), ezért manapság célzottan alkalmazzák a BRAF- és MEK-inhibitorokat együttesen. Ezek között több sikeres kombináció alkalmazás van klinikai kísérleti fázisban, ezek közül a dabrafenib és trametinib kombináció javítja betegek túlélését [62]. Az NRAS-mutációkkal járó esetekben a binimetinib alkalmazása javította a progressziómentes túlélést, de az össztúlélés nem növekedett szignifikánsan. Egy másik kulcsfontosságú III. fázisú vizsgálatban a kombinált BRAF/MEK-gátlás (dabrafenib + trametinib) szintén jobb klinikai eredményeket mutatott a monoterápiával szemben, ami alátámasztja a MAPK útvonal kettős blokkolásának terápiás jelentőségét [63, 64].

A korán kialakuló rezisztencia mellett a vemurafenib kezelés másik hátránya a gyakori mellékhatások, amelyek közé tartoznak a dermatológiai toxicitások – bőrkiütések, fényérzékenység, keratózisos és laphámsejtes karcinóma–, valamint ízületi fájdalom, fáradtság és QT-intervallum megnyúlás. Ezen nemkívánatos események szoros monitorozást és adott esetben dózismódosítást igényelnek, mindez beszűkíti a vemurafenib alkalmazásának lehetőségeit [65]. Az 1. Táblázat a melanóma kialakulásának molekuláris mechanizmusaihoz és a leggyakrabban előforduló mutációkhoz kapcsolódó terápiás lehetőségeket foglalja össze az alkalmazott terápiás szereket és terápiás célpontokat is belefoglalva.

III.3.10. Immunterápia

Az immunrendszer képes megakadályozni, hogy megtámadja a test normális sejtjeit. Ehhez „ellenőrző pontokat” használ, amelyek az immunsejteken található fehérjék, amelyeket be kell kapcsolni (vagy ki kell kapcsolni) az immunválasz megkezdéséhez. A melanóma sejtek a test saját ép immunválaszának a hiányában ezeket az ellenőrző pontokat használják ki, hogy elkerüljék az immunrendszer támadását. Ezekre fejlesztették ki az immunterápiában alkalmazott ún. immun checkpoint gátlókat. Ezek a gyógyszerek az ellenőrző pont fehérjéit célozzák meg, elősegítve a melanóma sejtekkel szembeni immunválasz helyreállítását. Az immuncheckpoint-gátlók, anti-CTLA-4 és anti-PD-1 alkalmazása forradalmi áttörésnek bizonyult. 2011-ben engedélyezték az Ipilimumabot (CTLA4 blokkoló), majd 2014-ben a Nivolumabot és Pembrolizumabot- (PD1 gátlók). Az Ipilimumab + Nivolumab kombinációt 2015-ben hagyták jóvá a metasztatikus melanóma elsővonalbeli kezelésére [66]. Újabb fejlesztés a LAG-3 (Lymphocyte-activation gene 3) célzását lehetővé tevő Relatlimab + Nivolumab kombináció, melyet szintén előrehaladott melanóma kezelésére hagytak jóvá [67].

A terápiás citokinek melanóma növekedését gátló hatását is igazolták. Ezek közé tartozik a PEG-IL-2 (bempegaldesleukin), a PEG-IL-10, az IL-12, valamint az IFN- α különböző kombinációinak alkalmazása, amelyek az adoptív sejtherápia (adoptive cell therapy, ACT) kialakításában játszhatnak szerepet, különösen tumorinfiltráló limfociták (TIL) felhasználásával. Jelenleg több klinikai vizsgálat is folyamatban van a célzott és immunterápiák kombinációjának értékelésére. Ezek közül kiemelhető a COMBI-i tanulmány, amely a PD-1-gátlók vagy a CDK4/6-inhibitorok egyikével kombinált célzott kezelési protokollokat vizsgál [68-70].

1.Táblázat. A melanóma kialakulásának molekuláris mechanizmusa és progressziójában szerepet játszó folyamatok és azok terápiás kapcsolódási pontjai.

Gén	Mutáció típusa	Érintett jelátviteli útvonal	Funkció	Terápiás célpont?	Terápia/gyógyszer
BRAF	Aktiváló mutáció (V600E)	MAPK/ERK útvonal	Proliferáció, sejtnövekedés	igen	Vemurafenib, Dabrafenib + Trametinib (MEK-gátló kombináció)
NRAS	Aktiváló mutáció (Q61R, Q61K)	MAPK + PI3K/AKT útvonal	Proliferáció, túlélés	nem	Klinikai vizsgálatok alatt (MEK-gátlók, immunterápia)
NF1	Inaktiváció	MAPK útvonal (RAS-szabályozás)	Tumorszuppresszor, RAS deaktiváció	Indirekt módon	MEK-gátlók (változó hatékonyság)
CDKN2A	Deléció, inaktiváció	Sejtciklus (RB, p53 szabályozás)	Tumorszuppresszor (p16, p14 fehérjék)	nem	Nem célzott, de prognosztikai értékű
TP53	Mutáció	Apoptózis, sejtciklus kontroll	Tumorszuppresszor	nem	Immunterápia lehetőség szerint
PTEN	Deléció, mutáció	PI3K/AKT útvonal	Apoptózis gátlása	nem	Kombinációs terápiaak alatt kutatás
TERT promóter	Aktiváló mutációk	Telomeráz aktiváció	Sejthalhatatlanság	nem	Kísérleti stádiumban
MITF	Amplifikáció	Differenciáció, túlélés	"Melanocita mester regulátor"	nem	Potenciális célpont (folyamatban)
PD-L1	Túltermelés (indukált)	Immunelkerülés	T-sejt gátlás	igen	Immunterápia: anti-PD-1 (nivolumab, pembrolizumab)
CTLA-4	T-sejt regulációs pont	Immunelkerülés	T-sejt aktiváció gátlása	igen	Ipilimumab (anti-CTLA-4)

III.4. Egyéb terápiás lehetőségek

III.4.1. Kemoterápia

A kután melanóma esetében a kemoterápia ma legfőképp olyan esetekben jön szóba, ahol nincs kimutatható BRAF/NRAS/KIT mutáció vagy más terápiák hatástalanok. A dacarbazin, temozolomid, valamint karboplatin–paklitaxel kombináció alkalmazás hatására terápiás válasz lehetséges, de nem javítja lényegesen a túlélést, a legújabb terápiás elveket és irányadókat az Európai Klinikai Onkológiai Társaság (ESMO) útmutatójában találhatjuk meg [71].

III.4.2. Sugárterápia

Bár a melanóma gyakran sugárrezisztens, a sugárterápia (radiation therapy, RT) használata adjuváns, definitív vagy palliatív céllal továbbra is indokolt lehet. A sugárterápia immunstimuláló hatásai immuncheckpoint-gátlókkal kombinálva erősíthetők. Fontos szerepe lehet uveális melanóma, lentigo maligna és nem reszekálható mukózális melanóma esetén; valamint regionális nyirokcsomó-pozitív esetekben adjuvánsként, illetve sztereotaxiás technikákkal (SRS/SBRT) metasztatikus esetekben [72, 73].

III.4.3. Legfrissebb fejlemények a melanóma terápiájában az ASCO 2025 alapján

III.4.3.1. Onkolitikus HSV-1 vírus (RP1) és nivolumab kombinációja immun-rezisztens melanóma esetén – IGNYTE fázis 1/2 vizsgálat

Az IGNYTE klinikai vizsgálatban (fázis 1/2, NCT03767348) RP1, az onkolitikus HSV-1 alapú immunterápia, amely humán GM-CSF-t és fuzogén GALV-GP-R– fehérjét kódol, intratumorális adagolás után nivolumabbal kombinálva olyan melanómás pácienseknél került alkalmazásra, akik PD-1-gátló kezelésre progrediáltak. A 156 főt magában foglaló regisztráció-irányított (R-D) kohorszban az objektív válaszarány (ORR) 31,4%, a teljes remisszió (CR) aránya 12,2% volt [74]. Más beszámolók szerint az ORR kb. 33%, CR kb. 15% körül mozog. A válaszok tartóssága kiemelkedően hosszú volt: a medián válaszüzide meghaladta a 24 hónapot, sőt más elemzésekben 35–36 hónapig tartó válaszokat is jeleztek. Az FDA számára be-
küldték a biológiai engedélykérelemet is, és a kombináció már áttörést jelentő terápia státuszt is kapott [74].

III.4.3.2. Lifileucel (Amtagvi) – TIL-alapú terápia

A lifileucel (kereskedelmi nevén Amtagvi), az első tumorból származó T-limfocita (TIL) terápián alapuló, személyre szabott immunterápia, amelyet előzetesen tumorból izolált T-sejtek felhasználásával készítenek. Az FDA 2024. február 16-án gyorsított eljárással engedélyezte nem-rezekálható vagy metasztatikus melanómában szenvedő felnőtt betegek számára, akik előzőleg PD-1 gátló kezelést kaptak. Ez volt az első sejtes immunterápia, amelyet szolid tumorban alkalmaztak. Egyik vizsgálat során az ORR 48,8% volt, korábbi kezelésektől függően akár 60,9%-os ORR is regisztrálható volt korábban kevésbé kezelt esetekben, öt éves követés alapján is tartós válaszokról számoltak be [75].

III.4.3.3. NADINA vizsgálat

A 2024-es Amerikai Klinikai Onkológiai Társaság (ASCO) éves kongresszusán bemutatott, III. fázisú NADINA vizsgálat eredményei szerint egy mindössze hathetes, neoadjuváns immunterápiás kezelés hatékonyabbnak bizonyult, mint a két éven át tartó adjuváns immunterápia a makroszkóposan kimutatható, rezekálható III. stádiumú melanóma kezelésében.

Ez az eredmény jelentős előrelépést jelent a melanóma terápiájában, mivel a hagyományos megközelítés eddig főként a műtétet követő, hosszú távú adjuváns immunterápiára épült. A NADINA vizsgálat azonban rávilágít arra, hogy a műtét előtti rövid ideig tartó immunterápia nemcsak jobb betegségmentes túlélést (EFS – event-free survival), hanem erőteljesebb patológiai választ is biztosíthat, összehasonlítva a standard, posztoperatív megközelítéssel. A NADINA vizsgálat eredményei megerősítik, hogy a neoadjuváns immunterápia új standarddá válhat a rezekálható, előrehaladott stádiumú melanóma kezelésében, és alapvetően megváltoztathatja a terápiás algoritmusokat a jövőben.

III.4.4. A melanóma kezelésére irányuló további kutatások és növényi hatóanyagon alapuló lehetőségek

A fitokemikáliák – növényi eredetű vegyületek – daganatmegelőző (kemopreventív) potenciálját régóta vizsgálják, többek között melanómában is. A teljesség igénye nélkül néhány növényi hatóanyagot említve, ilyen vegyületek közé tartozik például a rezveratrol, a kurkumin, a kvercetin, az apigenin és a genisztein, amelyek preklinikai és néhány esetben klinikai bizonyítékokkal is alátámasztották daganatellenes hatásukat [76]. Továbbá, egy másik növé-

nyi hatóanyag a luteolin, egy természetes flavonoid, áttétképződést gátló hatást fejt ki, így alternatív terápiát jelenthet a rosszindulatú melanóma kezelésére is. A flavonoidok antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatásuk révén gátolják a gyulladáshoz szükséges citokinek termelődését, valamint közvetlen citotoxikus hatást fejtenek ki a melanóma sejtekre [77]. Az epigallokatechin-gallát (EGCG), a zöld teában található polifenol, sejtciklus-gátlással, apoptózis indukcióval és immunmodulációval támogatja a daganatellenes választ [78]. A *Paris polyphylla* nevű növényből kinyert polyphyllin I apoptózist indukált melanóma sejtekben, sejtpusztulást eredményezve [79].

Biológiai mechanizmusát tekintve leginkább a rezveratrol (3,4,5'-trihidroxi-transz-szilbén) szőlőből, kékáfonyából, vörösáfonyából és földimogyoróból kinyerhető hatóanyag, és a *Curcuma longa* növényből származó kurkumin (diferoil-metán) hatóanyagok hatásmechanizmusa vizsgált. A kurkumin több olyan molekuláris célpontot is érint, amelyek a melanóma patogenezisében szerepet játszanak, mint például a MEK/ERK és PI3K/AKT, ERK/AKT, a p53, Bcl-2 és NF- κ B fehérjéket. A rezveratrol antioxidáns polifenolként immunmoduláló és daganatellenes hatással bír. Melanómában csökkenti az IL-17 termelést, miközben fokozza az antitumorális T-sejt választ [80, 81], továbbá gátolja a kulcsfontosságú jelátviteli utakat, többek között az AKT, mTOR, MEK/ERK, STAT3 és NF- κ B aktivitását. Alacsony biohasznosulása miatt analógja, a pterostilbén, ígéretesebb alternatívának tekinthető [82, 83]. Legújabb kutatásokban a kurkumin–rezveratrol kombinációt tartalmazó szilárd lipid nanorészecskék (*Cur-Res SLNs*) fejlesztésével foglalkoznak, amelyek előállításával fokozzák a két hatóanyag bőrbe jutását és a helyi hatékonyságot [81, 84].

Egy másik növényi hatóanyag, a szulforafán - amely a brokkoliban található, daganatellenes hatása részben a kromatin-módosító enzimek aktivitásának szabályozásán keresztül érvényesül a melanóma sejtek apoptózisát indukálva [85].

A legújabb kutatások középpontjában a *Cannabis sativa* pszichoaktív és nem pszichoaktív származékai kerültek, elsősorban a kannabinoidok tumorellenes hatása miatt. A kannabisznövény több mint 120 aktív komponenset – ún. fitokannabinoidot – tartalmaz. A daganatellenes hatás vizsgálata elsősorban a Δ^9 -tetrahidrokannabinol (THC) és a kannabidiol (CBD) vonatkozásában történt meg. A THC képes kötődni az endokannabinoid rendszer receptoraihoz, így szerepet játszhat a sejtosztódás szabályozásában. A CBD és szintetikus származékai preklinikai tanulmányokban igazoltan gátolják a különböző daganatok – köztük a glioblastóma, a vastagbél-, prosztata-, a tüdő- és az emlőrák – előrehaladását állatmodellekben és sejtvonalakon [86, 87]. A CBD-t és származékait melanóma sejtvonalakon vizsgálva annak citotoxikus hatását igazolták: in vitro és in vivo tanulmányokban is csökkentette a melanóma

sejtek életképességét, és gátolta a daganatnövekedést. Kimutatták, hogy a CBD hatás kaszpáz-függően apoptózist indukált és nem interferált a célzott kezelésekkel (pl. trametinib). Egy tanulmány alapján a CBD kezelés jelentősen csökkentette különböző bőrdaganatok esetében a tumorsejtek proliferációját, így növelte az állatok túlélését a kontrollcsoportéhoz képest [88, 89].

A CBD-vel szemben az egyéb nem pszichoaktív fitokannabinoidok mint például a kannabigerol (CBG), kannabinol (CBN) és kannabikromén (CBC) hatása kevésbé ismert, de ezek melanóma proliferációját gátló in vitro hatásaikról is beszámolnak, melyek szerint a CBG csökkentette a melanóma sejtek által termelt CSF-1 (M-CSF) szintjét, ami csökkenti a mieloid eredetű szupresszor sejtek (MDSC) és a tumor asszociált makrofágok (TAM) arányát, ezáltal javítja a CD8⁺ T-sejtes citotoxikus választ. A CBG egérmelanóma modellben lassította a daganat progresszióját, és kombinálva anti-PD-L1 immunterápiával fokozta az antitumor hatást és a túlélést. Speciális, nagy CBD-tartalmú *Cannabis sativa* kivonat, az úgynevezett PHEC-66 is bizonyítottan apoptózist indukált melanóma sejtekben [90].

Eddigi ismereteink alapján hatásukat a kannabinoidok elsősorban a G-fehérjéhez kapcsolt CB1 és CB2 receptorokon, valamint más célpontokon keresztül fejtik ki, mint például a TRP-csatornák, GPR18, GPR55, GPR119 és az 5-HT1A receptorokat beleértve. A CB1 receptorok főként a központi idegrendszerben és más szövetekben expresszálódnak, és neurológiai hatásokkal bírnak. A CB2 receptorok az immunrendszer sejtjein találhatóak, és gyulladáscsökkentő, immunmoduláló és daganatellenes hatásokban játszanak szerepet. Mindkét receptor a GPCR (G-protein-coupled receptor) családba tartozik, és a Gi/Go fehérjéken keresztül olyan jelátviteli útvonalakat aktiválnak, mint az adenilil-cikláz, MAPK és PI3K/AKT útvonalak. A CB1 receptorok ioncsatornákat is modulálhatnak [91, 92].

Fontos kiemelni, hogy összesen hat preklinikai in vivo tanulmányt végeztek el eddig, amelyekben különböző kannabinoidok (egyedileg vagy kombinációban) csökkentették a tumor növekedését, elősegítették az apoptózist és az autofágiát melanómás modellekben. A kannabinoidok csökkentik a melanóma metasztázisát, apoptózist indukálnak, autofágiát és sejtciklus stop-ot, valamint modulálják a tumorkörnyezetet, mindemelett palliatív terápiás hatásuk is jelentős [93].

Végezetül, átfogó irodalmi áttekintések rámutatnak, hogy nem csak a kannabinoidok, de a kannabisz terpenoidjai és flavonoidjai is hordoznak antitumorális tulajdonságokat: több modellben gátolták a sejtek proliferációját, invázióját, angiogenezist, illetve tumornövekedést különböző rákmodellekben [94, 95].

Mindenképpen fontos hangsúlyozni a kannabisz és származékainak azon tulajdonságait, hogy az eddigi tanulmányok alapján sokkal szelektívebben képesek célba venni a tumoros sejteket anélkül, hogy az egészséges sejteket károsítanák, szemben a hagyományos kemoterápiás szerekkel. Ugyanakkor hátrányos tulajdonságaik között az eddig előállított és különböző sejteken tesztelt *Cannabis sativa* származékoknak legnagyobb hátránya a gyenge biohasznosulás, amely korlátozza a klinikai vizsgálatokba történő bevonhatóságukat [22].

Összefoglalva, az utóbbi évek preklinikai eredményei szerint a kannabinoidok ígéretesek lehetnek a melanóma és a bőrlaphámrák kezelésében. Klinikai kérdés, mely vegyület vagy kombináció a leghatékonyabb, milyen dózis mellett őrizhető meg a betegek életminősége, illetve milyen terápiás kombinációkban érhetőek el szinergikus hatások és a kemorezisztencia csökkentése. A további preklinikai és randomizált klinikai vizsgálatok elengedhetetlenek.

III.5. Az autofágia és szerepe különböző kórfolyamatokban

III.5.1. Az autofágia fogalma

Az „autofágia” kifejezés a görög *autophagos* szóból származik, melynek jelentése: „önmagát faló”. Az autofágia egy olyan, az eukarióta sejtekben lezajló folyamat, amelynek során a citoplazmatikus komponensek és sejttermelékek lebontása a lizoszómák közreműködésével történik meg. Ez a mechanizmus alapvető szerepet játszik a sejtek fiziológiás homeosztázisának fenntartásában. A bazális autofágia különösen fontos az immunrendszer toleranciájának és az általános sejtműködés egyensúlyának biztosításában. Ezzel szemben az indukált autofágia – amely különböző külső ingerek hatására aktiválódik – jelentős szerepet tölt be a sejthalál, gyulladásos folyamatok, antigénprezentáció, valamint a kórokozók eltávolításának szabályozásában. Az autofágia konkrét funkciója azonban nagymértékben függ az adott sejtípustól, betegségtől, illetve a kiváltó külső hatások jellegétől.

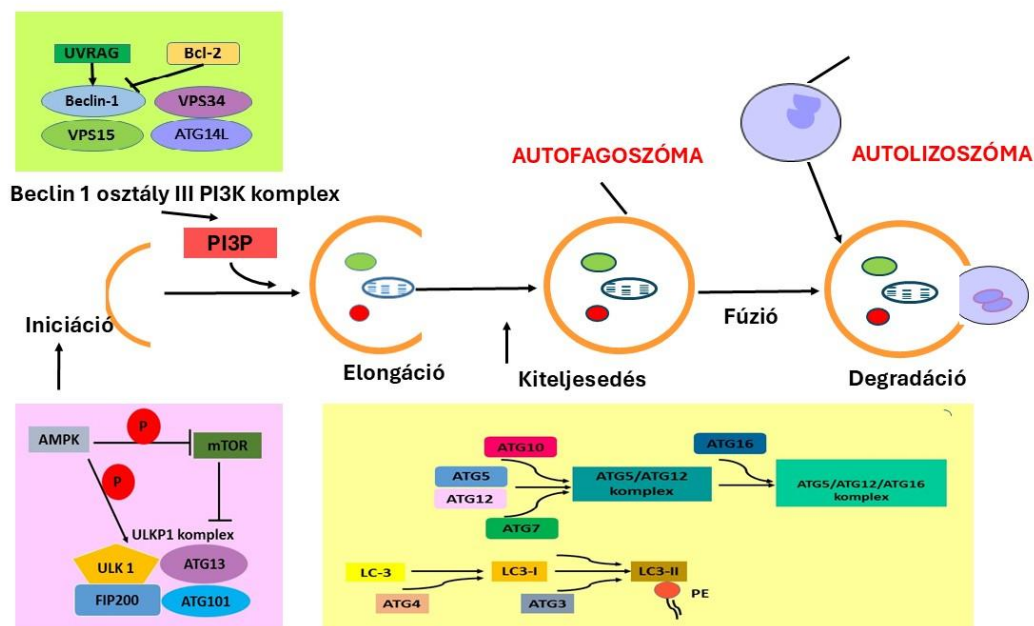
Az autofágia folyamata során a sejt saját alkotóelemeit bontja le, melynek alapján több típusát különböztetjük meg. Az autofág folyamatok során a lebontásra vagy újrahasznosításra váró sejtservecskék háromféle útvonalon juthatnak el a lizoszómába, amelyek alapján az autofágia három fő típusát különböztetjük meg: makroautofágia, mikroautofágia és chaperon-mediált autofágia [96]. Az autofágia egy erősen szabályozott, evolúciósan konzervált katabolikus folyamat, amely sejten belüli stresszhelyzetek – mint például tápanyagmegvonás, hipoxia vagy oxidatív stressz – hatására aktiválódik. A folyamat elsődleges célja, hogy alternatív tápanyagforrást biztosítson, valamint az intracelluláris homeosztázis fenntartása érdekében

eltávolítsa a diszfunkcionális organellumokat és az aggregálódott fehérjéket, melynek révén hozzájárul a sejtek túléléséhez és integritásának megőrzéséhez [97-99].

Makroautofágia esetében a sejtplazma bizonyos részei – például károsodott organellumok vagy felesleges fehérjék – egy kettős membránnal határolt struktúrába, az úgynevezett autofagoszómába záródnak, s a lebontandó anyagot a lizoszómába szállítják, majd később összeolvadva a lizoszómával autolizoszómát képeznek, az abban bezárt anyagok lebontása végett.

Mikroautofágia során a lizoszóma saját membránja invaginálódik, vagyis betűródik, és közvetlenül kebelezi be a citoplazmában található komponenseket. Ez a típusú autofágia nem igényel különálló vezikulát, mint a makroautofágia [96, 100].

A chaperon-mediált autofágia esetén a lebontandó fehérjékhez specifikus chaperonfehérjék (például a HSC-70, amely a hősokk fehérjék családjába tartozik) kapcsolódnak, a chaperonfehérjék segítségével a célfehérjék egy meghatározott szekvencia alapján jutnak át a lizoszóma membránján. Ez a forma elsősorban az éhezésre adott válaszként aktiválódik, szemben a másik két típusal. A chaperonfehérjékkel alkotott komplexet a LAMP-2A nevű, lizoszómához kötődő membránfehérje ismeri fel, majd elősegíti a célzott fehérje bejuttatását a lizoszóma belsejébe, ahol az lebomlik [100, 101].



8. Ábra. Az autofágia folyamatának lépései. Készült Liu C. és mtsai., 2021, [96] és Tósaki Á. és mtsai, 2023 [102] alapján.

A makroautofágia iniciációja során az ULK1 kináz komplex aktiválódik, amely ezt követően foszforilálja a foszfatidilinozitol 3-kináz (PI3K) komplexet (PI3KC3). Ez a folyamat elengedhetetlen a fagofór (phagophore) nevű pre-autofagoszomális struktúra nukleációjához. A PI3KC3 komplex több kulcsfontosságú autofágia-regulátor fehérjét tartalmaz, többek közt a Beclin-1, VPS34 és AMBRA1 molekulákat (8. Ábra). A PI3KC3 által mediált jelátviteli események következtében aktiválódik az ATG12– ATG5–ATG16L1 komplex, amely az autofagoszomális membrán elongációját szabályozza. E folyamat során az LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3) fehérje a citoszolban LC3-I formában jelenik meg, majd foszfatidiletanolaminhoz történő konjugáció révén LC3-II-vé alakul. Az LC3-II beépül az autofagoszómák membránjába, ahol a lizoszómával történő fúzió után vagy lebomlik, vagy dekonjugálódik vissza LC3-I-gyé [97, 102].

Az ubiquitinnel megjelölt, lebontásra ítélt fehérjék szubsztrátja a SQSTM1/p62 ún. adapterfehérje, amely közvetítésével jutnak be a lebontandó fehérjék az autofagoszómába. Ennek alapján a p62 fehérje, ahogyan azt majd a későbbiekben látni fogjuk, az autofágia aktivitást jelző fontos biomarkerként szolgál. Fontos kiemelni szerepét az autofágia kvantitatív értékelésében, mivel expressziója összefüggést mutat az autofágiát jelző aktivitás mértékével.

III.5.2. Autofágia detektálására szolgáló legfontosabb marker molekulák

A fentebb már említett autofágiát jelző fehérjék kimutatása lehetőséget nyújt bizonyos betegségek progressziójának nyomon követésére, valamint a terápiás beavatkozások hatékonyságának monitorozására is. Mivel az autofágiát szabályozó fehérjék expressziója önmagukban nem minden esetben autofágia-specifikus, ezért a megbízható analízis érdekében több marker együttes és szimultán vizsgálata javasolt [97].

- Az LC3 a leggyakrabban alkalmazott autofágia marker, különösen az LC3-II formája, amely Western blot technikával kvantifikálható, illetve immunfluoreszcenciával vizualizálható. Az LC3-pozitív „pontok” száma és eloszlása az autofág fluxus mértékére utal. Az LC3 expresszió in vitro és in vivo környezetben való követésére fluoreszcensen jelölt riporterrendszerek – például mCherry–LC3 vagy GFP–LC3 fúziós fehérjék – is alkalmazhatók, amelyek lehetővé teszik az autofágia dinamikájának real-time monitorozását különböző kísérleti modellrendszerekben [103].
- Alternatív autofágia marker a p62 autofágia receptor, mely klinikai és preklinikai vizsgálatokban egyaránt alkalmazható, abban az esetben, ha a p62 a hozzákapcsolódó szubsztráttal együtt degradálódik, az autofagoszómák lebomlanak, a p62 mennyisége pedig csökken. Tehát a csökkent p62 szint a sejt emelkedett autofágiás aktivitására utal [104].

Egyéb, az autofágia vizsgálatát szolgáló módszer a transzmissziós elektronmikroszkópia, mely egy nagyon munkaigényes eljárás, így nagyon ritkán, leginkább csak kutatás céljából alkalmazzák [105].

III.5.3. Az autofágia jelentősége a bőrbetegségek patomechanizmusában

Az autofágia számos betegség mellett a bőr patogenezisében is fontos szerepet játszik. A bőr tápanyagellátása korlátozott, ezért a sejteknek és szöveteknek a homeosztázis fenntartásához elengedhetetlen a tápanyagok újrahasznosítása. Ezt a sejtek elsősorban az autofágia mechanizmusán keresztül valósítják meg, ezért szabályozásának zavara összefüggésbe hozható különböző bőrbetegségek kialakulásával, ennek összefoglalását a 9. Ábrán mutatjuk be.

III.5.3.1. Az autofágia gyulladásos bőrbetegségekben: pszoriázisban és atópiás dermatitiszben

A diszfunkcionális autofágia szerepe kiemelt az olyan gyulladásos bőrbetegségekben, mint a pikkelysömör és az atópiás dermatitisz (AD). A gyulladásos citokinek befolyásolják a keratinociták autofág folyamatait, mindkét kórképben a bőr csökkent lizoszomális katepszin expressziója figyelhető meg. Az autofágia zavara gyulladásához és fokozott keratinocita proliferációhoz vezethet – ezek a pikkelysömör alapvető patofiziológiai jellemzői. Egy közelmúltbeli tanulmány összefüggést mutatott ki az ATG16L1 gén több egynukleotidos polimorfizmusa és a pikkelysömörre való hajlam között. Az ATG16L1 génterméke továbbá fontos szerepet játszik a bakteriális fertőzések elleni védekezésben és az antigénprezentációban is, autofágia-mediált mechanizmusokon keresztül. Ez kapcsolatba hozható azzal a klinikai megfigyeléssel, hogy a pikkelysömör gyakran bakteriális infekciókat követően alakul ki vagy súlyosbodik. Számos in vitro vizsgálat erősíti meg az autofágia potenciális terápiás szerepét pikkelysömörben és egyéb gyulladásos bőrbetegségekben. Egy hagyományos kínai növény, a *Datura metel L.* (métel maszlag) egyik aktív komponense például, a daturaturin A, autofágiát indukál a PI3K-AKT-mTOR jelátviteli útvonalon keresztül keratinocita sejt kultúrákban és gyulladáscsökkentő hatást fejt ki [102].

A TNF- α , amely mind pikkelysömörben, mind atópiás dermatitiszben kulcsfontosságú gyulladásos citokin, az autofágia korai fázisában serkentő, de hosszan tartó expozíció során gátló hatást fejt ki humán keratinocita tenyészetekben. Ezen túlmenően az autofágiához kapcsolódó fehérjék – mint ATG7, ATG5, LC3B és p62 – expressziója megnő AD-s betegek hámsejtjeiben, ami valószínűleg egy kompenzációs válasz a gyulladás korlátozására [102, 106].

Egyes vizsgálatok szerint az autofágia aktivitásának fokozása javíthatja a bőrbarrier-funkciót, ami új terápiás stratégiát kínálhat AD-ben. Az IL-37 mint gyulladáscsökkentő citokin az AMPK/mTOR útvonalon keresztül serkentette az autofágiát, enyhítve az allergiás gyulladást AD-ben. Egy randomizált, kontrollált klinikai vizsgálatban kimutatták, hogy egy újonnan kifejlesztett autofágiát fokozó peptidet tartalmazó hidratáló krém javította az enyhe-középsúlyos AD-ben szenvedő betegek tüneteit. AD-ben gyakoriak a krónikus vagy visszatérő *Staphylococcus aureus* fertőzések, különösen a meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) törzsek. Egy vizsgálat kimutatta, hogy az MRSA a keratinocitákban módosítja az autofágiát, elősegítve az inflammaszómák lebontását és így elkerülve az immunválaszt. Ez rávilágít az autofágia célzott modulációjának lehetőségére súlyos AD-ben [102, 106].

III.5.3.2. Az autofágia szerepe a bőr pigmentációs betegségeiben

A hiperpigmentáció és hipopigmentáció a bőr pigmentációs rendellenességeinek két alapvető megnyilvánulási formája. A legújabb kutatások szerint az autofágia kulcsszerepet játszhat e betegségek patogenezisében. A melanin szintézise és tárolása a lizoszómához kapcsolódó organellekben, ún. melanoszómaiban történik. A melanocitákban működő autofágia felelős lehet a melanoszóma lebontásáért is, ami a pigmentáció dinamikájára közvetlen hatással van. Murase és munkatársai igazolták, hogy az autofágia a keratinocitákban a melanoszóma degradációját modulálja, ezáltal szerepet játszik valószínűleg a vitiligo kialakulásában [107]. Egyes tanulmányok szerint fokozott autofágiás aktivitás mutatható ki a vitiligos betegek nem léziós bőrében, különösen a melanocitákban és fibroblasztokban, ami a sejtek metabolikus stresszel szembeni védelmi válaszként értelmezhető. Egy koreai kohorszvizsgálat összefüggést talált az UVRAG gén két polimorfizmusa (rs1458836, rs7933235) és a nem szegmentális vitiligo között, megerősítve az autofágia genetikai hátterének szerepét [102, 107].

III.5.3.3. Autofágia és szisztémás lupusz eritematózus (SLE)

Számos tanulmány igazolta az autofágia szerepét a szisztémás lupusz eritematózus (SLE) patomechanizmusában; az autofágia fokozott aktivitását igazolták SLE-s betegek B- és T-limfocitáiban, valamint genetikai eltéréseket detektáltak az ATG5 génben, amely szerepet játszik az autofágiában. Számos autofágiát aktiváló gyógyszer – mint például az amiodaron, karbamazepin, klórpromazin, klonidin, lítium, minociklin, valproinsav és verapamil – összefüggésbe hozható gyógyszerindukált lupusszal, ami a terápiás beavatkozások nem kívánt következménye lehet. Ezzel szemben a klorokvin és hidroxiklorokvin, amelyek széles körben alkalmazott szerek az SLE és más lupuszos megbetegedések kezelésében, autofágia-gátló hatással rendelkeznek. Ez a mechanizmus hozzájárulhat gyulladáscsökkentő hatásukhoz és az immunválasz modulálásához az autoimmun állapotokban [108].

III.5.3.4. Autofágia fertőző bőrbetegségeiben

Az autofágia kulcsfontosságú az immunvédekezésben mikobakteriális bőrfertőzésekben. Az *M. tuberculosis* gátolja a fagolizozóma érését, így tartósan fennmarad a makrofágokban.

Az autofágia indukciója képes megszüntetni ezt a blokádot és elpusztítani a kórokozót, ami új terápiás lehetőségeket kínál, különösen rezisztens törzsek vagy hagyományos kezelésre nem reagáló esetekben [109].

III.5.3.5. Az autofágia szerepe bőrdaganatokban, különösképpen melanómában

Az autofágia kettős szerepet tölt be a daganatok fejlődésében: tumorszuppresszorként gátolja a daganatképződést és a sejtek rosszindulatú elfajulását, azonban a karcinogenezis megindulása után citoprotektív mechanizmusként szolgál a tumorsejtek védelmében, elősegítve a sejtek túlélését stresszhelyzetekben, például hipoxia vagy kemoterápia okozta károsodás során elősegítheti a tumorsejtek túlélését és növekedését, így „kétélű” hatást fejt ki. Mindezek alapján jelentős szerepe van abban, hogyan reagál egy daganat a terápiára, mivel hozzájárulhat a kemoterápia- és sugárkezelés-ellenállás, valamint a gyógyszerrezisztencia kialakulásához. Kimutatták, hogy laphámsejtes karcinómák és melanómák fokozott autofágiás aktivitást mutatnak, amely összefüggést mutat a daganatok agresszivitásával. Egy új tanulmány szerint az autofágia klorokvin általi gátlása növelte a luteolin flavonoid által kiváltott sejthalált metasztatikus laphámsejtes karcinóma sejtekben, megerősítve, hogy az autofágia fokozott aktivitása citoprotektív funkciót tölt be ezekben a daganatokban [110].

A melanóma patogenezisében is hangsúlyos szerepet kap az autofágia „kétélűsége”:

- Csökkent autofágia elősegítheti a tumorképződést az onkogén stressz, DNS-károsodás és genominstabilitás révén.
- Fokozott autofágia ugyanakkor elősegíti a már kialakult melanóma sejtek túlélését, hozzájárulva a gyógyszerrezisztenciához.

Ez a komplex szerep arra utal, hogy az autofágia pontos szabályozásának megértése kulcsfontosságú lehet új terápiás megközelítések kifejlesztésében. Az autofágiát célzó kezelések – elsősorban gátló stratégiák – ígéretesek lehetnek, különösen, ha jelenlegi terápiákkal (pl. BRAF gátlás, immunterápia) kombinálva alkalmazzák. Az oxidatív stressz a szabadgyökök és antioxidánsok egyensúlyának felborulásával jár, ami sejtkárosodáshoz vezet. Melanómában kulcsszerepe van a betegség kialakulásától az áttétképzésig. Bár mérséklése csökkentheti a sejtek agresszivitását vagy apoptózist válthat ki, az antioxidánsok fokozhatják a sejtek túlélését, áttétképzést és gyógyszerrezisztenciát. Hosszú távú BRAF-gátló kezelés (pl. vemurafenib) rezisztens sejtek szelekcióját idézheti elő, amelyek fokozott reaktív oxigén szintetáz (ROS) termeléssel és redox-válással rendelkeznek.

Az autofágia hasonlóan befolyásolja a melanóma túlélését: korai stádiumban tumorszuppresszív, előrehaladott állapotban azonban támogatja a sejtek fennmaradását. Kezdeti stádiumban csökken a proautofágiás fehérjék (ATG5, Beclin-1, LC3A/B) expressziója, míg az LC3B szint korrelál az áttétképzéssel. BRAF- és MEK-gátlók fokozhatják az autofágiát. Bár ez gyakran a tumor túlélését segíti, bizonyos esetekben – például apoptózis-rezisztens melanómákban – az autofágia által kiváltott sejthalál terápiásan kedvező lehet. Az autofágia az oxidált molekulák lebontásával közvetlenül is hat az oxidatív stresszre [111].

Összefoglalva elmondható, hogy az autofágia betegségtől és kontextustól függően lehet védő vagy káros: bőrdaganatokban elősegítheti a túlélést és rezisztenciát, fertőzésekben viszont támogatja a kórokozók eltávolítását. Célzott szabályozása ígéretes terápiai irány a bőrgyógyászatban.



9. Ábra. Az autofágia fontos szerepei az egyes bőrbetegségekben. Tósaki Á és mtsai., 2023 [102].

III.6. A hemoxigenáz-1 szerepe szív-és érrendszeri betegségekben, daganatokban, valamint kapcsolódása az autofágiához

A hemoxigenáz-1 (HO-1) egy stressz-indukálható enzim, amely a hem lebontásában játszik kulcsszerepet, és a folyamat során biliverdint, szén-monoxidot (CO) és szabad vasat termel. Ezek a molekulák antioxidáns, gyulladáscsökkentő és sejtvédő tulajdonságokkal rendelkeznek [112, 113]. A HO-1 expressziója oxidatív stressz, gyulladásos citokinek, hipoxia vagy bizonyos gyógyszerek hatására fokozódik, és szabályozásában az Nrf2–ARE jelátviteli útvonal meghatározó szerepet játszik [114]. A HO-1 autofágiával való kapcsolata egyre inkább a figyelem középpontjába kerül, mivel mind daganatokban, mind szívbetegségekben jelentős hatással van a sejtek túlélésére és működésére [115].

Szív- és érrendszeri betegségekben a HO-1 túlnyomórészt védő hatású: javítja az endotél funkciót, mérsékli az oxidatív stresszt, csökkenti az iszkémia-reperfúziós károsodásokat, valamint gátolja az apoptózist, ezáltal hozzájárul a szívizomsejtek túléléséhez és a szív funkciójának megőrzéséhez. A HO-1 által termelt bilirubin és szén-monoxid gyulladáscsökkentő, anti-apoptotikus és immunmoduláló hatású. A HO-1 indukciója csökkenti az oxidatív stresszt, amely kulcsszerepet játszik az ateroszklerózis, szívinfarktus és más kardiovaszkuláris betegségek kialakulásában. A HO-1 emelkedett expressziója védelmet nyújthat iszkémiás-reperfúziós károsodás ellen, például szívműtétek vagy transzplantáció során. Klinikai és preklinikai vizsgálatok szerint a HO-1 indukciója csökkenti az infarktus méretét, javítja a bal kamrai funkciót, és mérsékli az I/R által kiváltott gyulladásos választ. Ezen hatások révén a HO-1 nemcsak biomarkerként, hanem terápiás célpontként is jelentős lehet a szívbetegségek kezelésében, különösen iszkémiás-reperfúziós károsodás és szívizom elhalás esetén, a HO-1 autofágiát serkentő hatása védelmet nyújt a sejtkárosodás ellen. Kísérleti modellekben kimutatták, hogy a HO-1 indukciója csökkenti a sejt-szenescenciát (a HO-1 aktiválása (pl. heminnel) csökkenti a szenescencia markerek (p53, p16) szintjét, miközben növeli a lamin B expresszióját, ami a sejtek fiatalabb fenotípusát jelzi, javítja a szívizom funkcióját, egyben mérsékli a gyulladásos válaszokat is [116, 117].

Daganatos sejtekben a HO-1 kettős szerepet tölt be: egyrészt citoprotektív, másrészt tumorprogressziót elősegítő hatású [118]. Az autofágia aktiválása révén a HO-1 segíti a tumoros sejtek túlélését stresszes környezetben, például kemoterápia vagy hipoxia esetén, ugyanakkor bizonyos körülmények között a HO-1 túlzott aktivációja ferroptózist válthat ki – egy vasfüggő sejthalálformát, amely terápiás célpontként is alkalmazható lehet. A HO-1 által

indukált autofágia tehát lehet tumorvédő mechanizmus, de megfelelő farmakológiai beavatkozással tumorelles hatás is kiváltható [119].

A HO-1-gyel foglalkozó kutatások több irányúak, a meglévő tudás alapján tehát kiemelendő, hogy míg a szívbetegekben a fokozott HO-1 expressziója terápiás előnyt jelent, addig a melanómában, a HO-1 hatása ellentétes irányú: magas expressziója elősegíti a tumorsejtek túlélését az apoptózis gátlása révén, szabályozza az autofágiát oly módon, hogy az stresszhelyzetben a sejt fennmaradását támogassa, és serkenti az angiogenezist, ami fokozza a daganat növekedését és áttétképző képességét. Ez a kettős természet magyarázza, hogy míg szív-érrendszeri betegségekben a HO-1 indukciója terápiásan kedvező lehet, addig melanómában inkább a HO-1 gátlása jelenthet előnyt [120].

Uveális melanómában a HO-1 expressziója összefüggésben áll az immunsejtek (pl. CD8⁺ T-sejtek) tumorba való infiltrációjával, valamint a tumor növekedésével és inváziójával [121]. A HO-1 gátlása (pl. ZnPP alkalmazásával) csökkentette a melanóma sejtek proliferációját, elősegíti az apoptózist, és blokkolja a sejtciklust a G0/G1 fázisban.

A HO-1 immunmoduláló hatása révén új immunterápiás célpontként szolgálhat, különösen olyan esetekben, ahol a klasszikus immunellenőrzőpont-gátlók (anti-CTLA-4, anti-PD-1) nem hatékonyak.

Összegzésként elmondható tehát, hogy a HO-1 és az autofágia közötti kapcsolat komplex és kontextusfüggő. Daganatokban a HO-1 által indukált autofágia elősegítheti a sejtek túlélését, de megfelelő beavatkozással sejthalált is kiválthat. Szívbetegekben viszont az autofágia aktiválása a HO-1 révén védő hatású, csökkenti az oxidatív stresszt és a sejtszenescenciát. Ez a kettős szerep teszi a HO-1-et ígéretes célponttá mind onkológiai, mind kardiológiai terápiákban [122].

Itt szeretném hangsúlyozni, hogy mivel munkám két különálló témára épül, mely időben is egymástól külön készült, így a módszerek leírásának és követésének könnyebbsége végett mindkét munka módszertani részét külön fejezetekben tárgyalom, ezzel segítve az olvasó számára a megértést. A később megjelent publikációhoz kapcsolódó módszereket és technikákat tárgyalom elsőként, azt követően pedig a korábban megjelent publikációhoz tartozó módszertant és eredményeket.

IV. Anyagok és módszerek I.

IV.1. Vegyületek

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

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

IV.2. Kísérleteinkhez alkalmazott sejt kultúrák

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

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

Minden sejt vonalat az American Type Culture Collection-től (ATCC, Rockville, MD, USA) szereztük be. A sejtek tenyésztése DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Biosera, Cholet, Franciaország) sejtenyésztő médiumban történt, amelyet 10% magzati szarvasmarha szérummal (FBS; Biosera, Cholet, Franciaország), valamint antibiotikumokkal (100 U/mL penicillin és 100 µg/mL streptomycin) egészítettük ki. A sejteket 37 °C-on, 5% CO₂ / 95% levegő arányú, párasított inkubátorban tartottuk fenn a következő passzázsáig és a kísérletek során.

Megemlítendő, hogy az A2058 és WM35 melanóma sejt vonalak BRAF mutációt hordoznak, míg a WM3000 egy metasztatikus melanóma sejt vonal, 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.

IV.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 6×10^3 sejt/lyuk sűrűségben növesztettük 96 lyukú plate-en, 10% FBS-sel kiegészített médiumban, 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 ezeket új 96-lyukú plate-re helyeztük, majd pedig minden egyes lyukhoz hozzáadtuk a kizárólagos 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).

IV.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 teszttel (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 [123].

A WM35, A2058 és WM3000 melanóma sejtvonalakat 6×10^3 sejt/lyuk sűrűségben tenyésztettük 96 lyukú plate-en, saját médiumukban (DMEM), 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-vel, illetve vemurafenibbel kezeltük. Mivel minden vegyületet DMSO-ban oldottunk, így 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% CO₂ / 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 ajánlás 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.

IV.5. A sejtek kolóniaképző képességének vizsgálata

A tumorsejtek kolóniaképzésére alkalmazott vizsgálat a sejtek korlátlan proliferációs képességét méri, vagyis azt, hogy a sejtek képesek-e nagyméretű kolóniát vagy klónt alkotni (Munshi et al., 2005). Egysejtes szuszpenzió előállítását követően a sejteket 6×10^3 sejt/lyuk sűrűségben tenyésztettük 6 lyukú plate-en. A sejteket a kitapadást követően növekvő koncentrációjú LE-127/2-vel (5–80 μ 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 lemostuk, 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).

IV.6. Fehérje expresszió analízis

IV.6.1. Fehérje izolálás és BCA 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 foszfatáz-inhibitorokat adtunk. A sejtlízist 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 autofágias array analízishez használtuk fel.

IV.6.2. Az autofágias array kivitelezése

A sejtes folyamatok bármely típusú szabályozása olyan összetett mechanizmus, amely gyakran több fehérje együttes részvételét igényli. Az utóbbi időben, a technológiai fejlődés eredményeként, egyre elterjedtebbé vált a multiplex fehérjéket érintő mechanizmusok vizsgálata array technológia alkalmazásával. Ennek legfőbb előnye, hogy egyszerre több fehérje detektálása válik lehetővé, majd az eredmények alapján a kívánt fehérjék expressziója megerősíthető a klasszikus Western blot módszerrel.

Tanulmányunkban az autofágiával kapcsolatos fehérjék elemzésére Humán Autofágias Array-t használtunk (Assaygene, SARB0023, Dublin, Írország). A sejtproliferációs tesztek eredményei alapján valamennyi humán kután melanóma sejtet egy kitüntetett koncentrációval, a 20 μ 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.

IV.6.3. 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 μ 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).

Ezt követően a membránokat 4 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk az alábbi fehérjék elleni specifikus elsődleges antitestekkel: LC-3I/II, p62, Beclin-1, Atg12, kaszpáz-3, Tom20, hemoxigenáz-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 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.

IV.6.4. LC-3 expresszió detektálása melanóma sejtekben immunfluoreszcens jelöléssel

Az LC-3 expressziójának kimutatását WM35, A2058 és WM3000 sejt vonalakon, 48 órán keresztül $20\ \mu\text{M}$ LE-127/2 kezelést követően immunfluoreszcens jelöléssel végeztük. A sejteket fedőlemezen tenyésztettük, amelyeket 6 lyukú sejtenyészítő 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 $4\ ^\circ\text{C}$ -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 $0,5\ \mu\text{g/ml}$ koncentrációjú DAPI-t alkalmaztunk a sejtmagok fluoreszcens festésére. A mintákat invert fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltuk (Carl Zeiss AG, Jena, Németország).

IV.7. Statisztikai analízis

Az eredményeket három egymástól független kísérlet alapján számítottuk ki. A sejtproliferációs és citotoxicitási vizsgálatokból, valamint a Western blot analízisekből származó ada-

tokat 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.

V. Anyagok és módszerek II.

V.1. Sejtkultúra

Patkány H9c2 sejteket tenyésztettünk Dulbecco's modified Eagle's médiumban (DMEM), amely tartalmazott 10% magzati szarvasmarha szérumot (FBS), és 1%-os Penicillin-Streptomycin antibiotikumot. Inkubáltuk a sejteket 37 °C-on 5%-os széndioxid jelenlétében. A sejt számot pedig 75 cm²-es sejtenyésztő üvegben tovább növesztettük. Passzálásokat alkalmaztunk, amikor elérték a 60-70%-os konfluenciát. Ezt követően a kitapadt sejtekről eltávolítottuk a még megmaradt médiumot, majd PBS-sel (Phosphate buffered saline, pH=7,4) átmostuk, és tripszin-EDTA oldattal 15 perc inkubálást követően vittük a sejteket szuszpenzióba. Ezután centrifugálás következett 6 percig 1100 rpm fordulatszámon 26 °C-on. A tripszin tartalmú médiumot eltávolítottuk a leülepedett sejtekről, és a leülepedett sejteket új szérumot tartalmazó médiumba vittük. A sejteket tovább kezeltük és sejtenyésztő üvegekbe vittük körülbelül 100.000 darab sejt/ml-es mennyiségben.

V.2. In vitro hipertrófia indukálása

A H9c2 sejteken történő hipertrófia kialakítása céljából a sejteket endothelin-1-gyel (ET-1, E7764, Sigma) kezeltük [124] és azt tanulmányoztuk, hogy ösztrogénnel (β -estradiol, E2, E2758, Sigma) történő előkezelést követően miként következik be a sejtek hipertrófiás válaszreakciója. Ezért a szérumot tartalmazó médiumról átváltottunk szérummentes, 1% antibiotikumot tartalmazó DMEM médiumra, amellyel 24 órán keresztül 37 °C hőmérsékleten, 5% széndioxid tartalom jelenlétében inkubáltuk a sejteket. 24 óra elteltével az ET-1-et különböző koncentrációkban (100 nM, 1000 nM és 10.000 nM) hozzáadtuk a sejtekhez. Az 1000 nM ET-1-gyel kezelt sejtcsoportot 6 órával korábban 200 nM E2-vel előkezeljük. A kezelést egymást követő két napon át megismételtük, majd a sejtekből újabb felhasználás céljából RNS-t és fehérjét izoláltunk.

V.3. Sejtek morfológiájának vizsgálata

A H9c2 sejteket morfológiai vizsgálatok céljából 24 lyukú TPP plate-re helyeztük azért, hogy azok a tárgylemezre tapadjanak le, nagyjából 8000 darab sejtszámmal [125]. A sejteket tovább kezeltük a fentebb ismertetett módon, majd fluoreszcens mikroszkóppal tanulmányoztuk azokat, a sejteket pedig fluoreszcens festékekkel láthatóvá tettük. 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 'citoszkeletont' fluoreszcein izotiocianát (FITC)-konjugált phalloidin festékekkel, a sejtmagot pedig 4',6-diamidino-2-fenylindol (DAPI) festékekkel láthatóvá tettük. 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^2 -ben adtuk meg.

V.4. Sejtek életképességének meghatározása MTT segítségével

A H9c2 sejtek életképességét vizsgáltuk úgy, hogy az ET-1-gyel, valamint ösztrogénnel történő kezelést követően milyen mértékű a sejtek életbenmaradási képessége. Ehhez a kardiomioblasztokat 96 lyukú TPP mikroplate-en életben tartottuk, növesztettük, wellen-ként (mikroplate) ~2500 darab sejtszámmal. A szérummentes médiummal a lecsendesített sejteket kezeltük ET-1-gyel, majd néhány csoportot ösztrogénnel is. 48 óra elteltével a sejteket tartalmazó médiumhoz adtuk a sárga MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide) oldatot 5 mg/ml koncentrációban PBS oldatban. Ezt a képződött vegyületet az élő sejtek a mitokondriumokban lila színű formazán kristályokká alakítják át. Az oldat hozzáadása után kétórás inkubálás következett 37 °C-on. Az idő letele után a festéket tartalmazó médiumot eltávolítottuk, és a képződött lila kristályokat izopropil-alkoholban szuszpendáltuk. Harminc percre termosztátba helyeztük a mikroplate-et 37 °C-os hőmérsékletre, majd FLUOSTAR Optima spektrofotométerrel meghatároztuk az abszorbanciát 570 nm és 690 nm hullámhosszon.

V.5. HO-1 fehérjeexpresszió meghatározása H9c2 sejtekben

A H9c2 kardiomioblasztokat (kb. 100 000 sejt/csoport) 1000 nM ET-1-gyel, 200 nM β -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 kitehez 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.

V.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 µg 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), β -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 és ECL-módszerrel detektáltuk.

V.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 β -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.

V.8. Statisztikai elemzés

A sejtfelszín területét, a sejtek életképességét és a HO-1 expressziót egyutas varianciaanalízissel (ANOVA), majd Dunnett-teszttel értékeltük [126]. 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.

VI. Eredmények I.

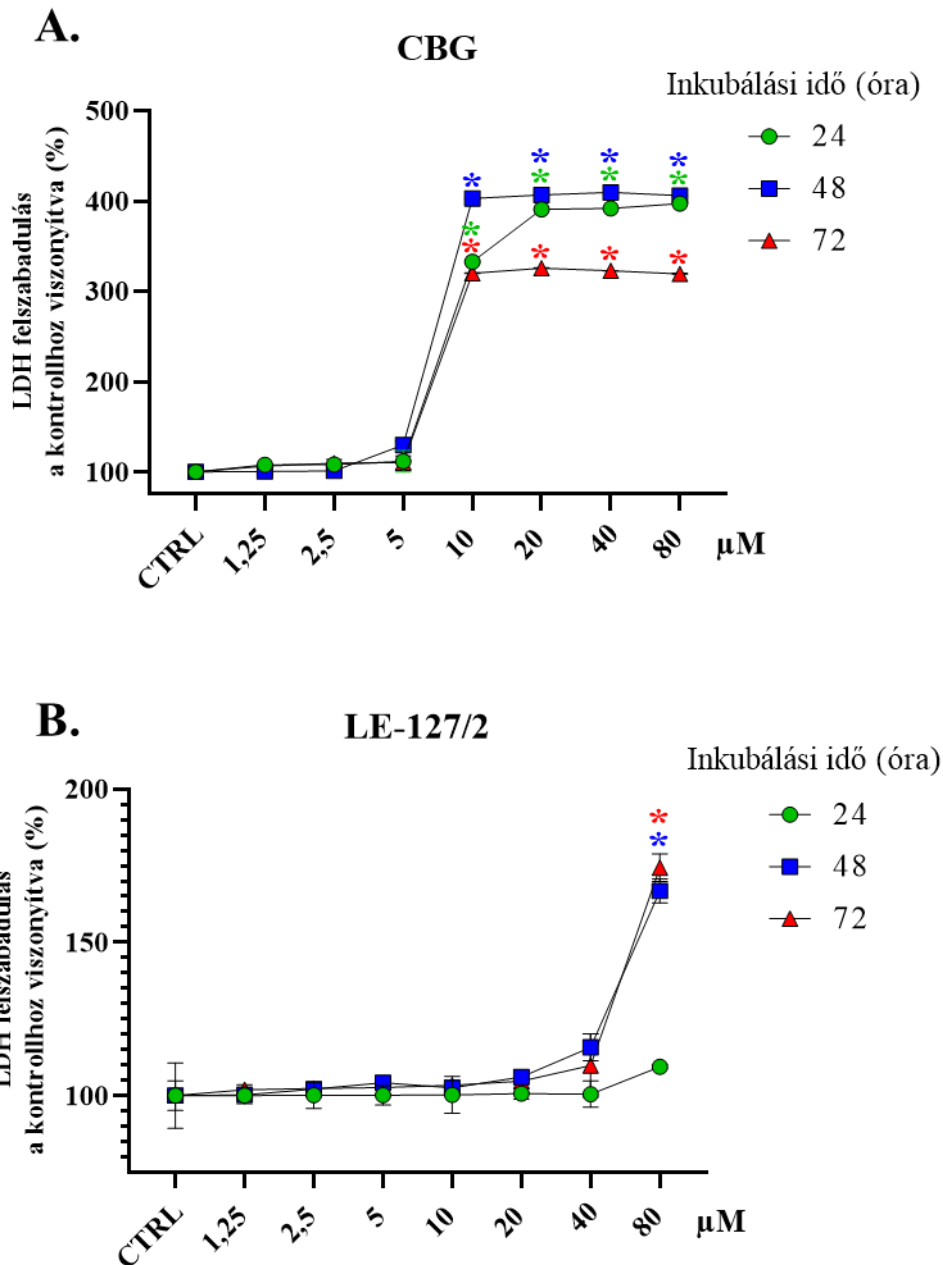
VI.1. Az LE-127/2 és a CBG anyavegyület citotoxicitásának vizsgálata LDH mérésen alapuló assayvel

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

Az eredményeink értékelése során az LDH felszabadulását a minták 490 nm-en mért abszorbanciájának százalékos arányában számoltuk a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. Három egymástól független kísérletet végeztünk, minden LE-127/2 és CBG koncentrációhoz három ismétlés (triplikátum) tartozott. Figyelemreméltó, hogy maga a CBG már 10 μM -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 sejtnövekedés drasztikus csökkenését a CBG-kezelést követő 72 órában figyeltük meg (10. Ábra, A).

Kiemelendő, hogy a CBG-vel ellentétben még 80 μM -os LE-127/2-vel történő kezelést követően sem mértünk a HaCaT sejteken szignifikáns sejtkárosodást (10. Ábra, B). Az inverz mikroszkópos morfológiai megfigyelés (Nikon Eclipse TS 100, Minoto City, Tokió, Japán) 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 sejtípusokon is vizsgáltuk (H9c2 és NIH-3T3 fibroblaszt sejtek), amelyeket a 2. Melléklet szemléltet. A H9c2 sejtek esetében szignifikáns sejtpusztulás csak 40 μM LE-127/2 kezelést követően, 48–72 órával a kezelés megkezdése után volt megfigyelhető, míg a CBG 20 μM -os koncentrációnál mutatott toxicitást ezeknél a sejteknél (1. Melléklet, A és B).



10. Ábra. A CBG és az LE-127/2 citotoxikus hatásának detektálása az LDH felszabadulásának mérésével HaCaT sejteken (A, B). 6×10^3 sejtet 96 lyukú plate-en növesztettünk, majd a sejteket emelkedő dózisú CBG-vel vagy LE-127/2-vel kezeltük (1,25 μ M-tól 80 μ M-ig, 24–72 órán keresztül). Vivőanyagként DMSO-t (CTRL) használtunk. Az LDH aktivitását 490 nm-en mértük a kezelt sejtek tápfolyadékából vett mintákból. * $p < 0,05$ – az LE-127/2 vagy a CBG kezelés szignifikancia szintjét jelzi. Az adatok az átlag ($n=3$) \pm szórás (S.D.) formájában kerültek ábrázolásra, a vegyületekkel kezelt sejtek kezeletlen sejtekhez viszonyított normalizált abszorbancia értékeként.

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 μM LE-127/2 kezelést követően mutattak érzékenységet, és 48 óráig nem volt kimutatható szignifikáns citotoxikus hatás. Ezzel szemben a CBG már 20 μM -os koncentrációban is toxikus volt a fibroblaszt sejtekre (1. Melléklet, C és D).

Ezt követően a felezési gátlási koncentrációt (IC_{50}) is meghatároztuk a GraphPad Prism szoftver nemlineáris regressziós analízisének segítségével (2. Melléklet).

VI.2. Az LE-127/2, CBG és a Vemurafenib citotoxikus hatásának összehasonlítása és vizsgálata melanóma sejtvonalakon

Az LE-127/2 vegyület citotoxikus hatásának vizsgálata végett három különböző humán kután melanóma sejtvonalat (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 μM -tól 80 μM -ig) adagoltuk a melanóma sejteknek. A sejtek proliferációs aktivitását 24, 48 és 72 órán keresztül követtük nyomon a CellTiter-Blue assay segítségével (11. Ábra).

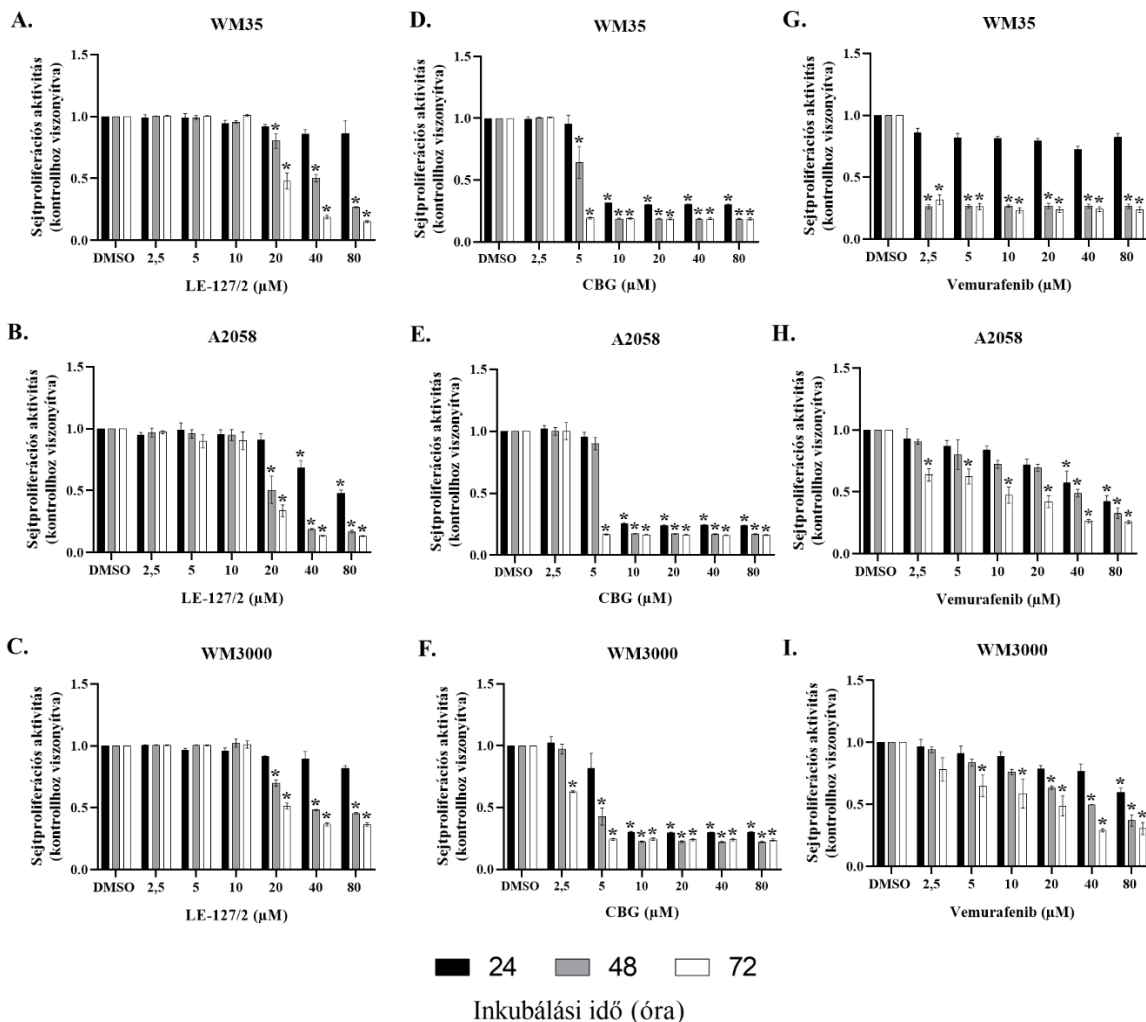
A proliferációs aktivitást fluoreszcencia értékek alapján határoztuk meg, majd az eredményeket a kezeletlen kontrollhoz (DMSO) normalizáltuk (11. Ábra, A-I). Az eredmények alapján a vemurafenib minden vizsgált melanóma sejtvonala esetében hatékonyabban gátolta a sejtek proliferációját mint az LE-127/2 vagy a CBG, mely hatás már 2,5 μM koncentráció esetén is szignifikáns csökkenést eredményezett (11. Ábra, G, H, I). Leghatékonyabbnak a WM35 sejtek esetében bizonyult: a vemurafenib már a kezelést követő 24 órában jelentősen gátolta a sejtproliferációt a sejtek közel 90%-ának puszulását eredményezve (11. Ábra, G).

A CBG vegyület szintén hatékonyabbnak bizonyult, mint az újonnan előállított szintetikus származéka, az LE-127/2. Minden egyes sejtvonala proliferációjára hasonló hatást fejtett ki. 5 μM -os koncentrációnál már szignifikánsan csökkentette a sejtproliferációt, míg a WM3000 sejtvonala esetében már 2,5 μM koncentráció is szignifikáns gátló hatást mutatott (11. Ábra, D, E, F).

A vemurafenibhez és a CBG-hez képest az LE-127/2 minden vizsgált sejtvonalba gyengébb sejtproliferáció-gátló aktivitást mutatott. Az LE-127/2 szignifikáns gátló hatása csak 20 μM koncentrációnál volt mérhető mindhárom sejtvonalba, 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 sejtvonala, 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 (11. ábra, A, B, C).

A vemurafenib, a CBG és az LE-127/2 hatékonyságának összehasonlítása során (11. Ábra) megállapítottuk, hogy 20 μM 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 μM koncentrációban fejtett ki, vagyis az ép, nem daganatos sejtek lényegesen kevésbé érzékenyek az LE-127/2 vegyület alacsonyabb koncentrációira.



11. Ábra. Az A2058, WM35 és WM3000 sejtek proliferációs aktivitása LE-127/2-vel (A–C), CBG-vel (D–F) vagy vemurafenibbel (G–I) történő kezelést követően. A melanóma sejteket emelkedő koncentrációjú LE-127/2-vel, CBG-vel vagy vemurafenibbel kezeltük (2,5 μM -tól 80 μM -ig) 72 órán keresztül, majd a sejtek proliferációs aktivitását határoztuk meg. A kezelések hatására a szignifikáns különbségeket kétutas ANOVA elemzés

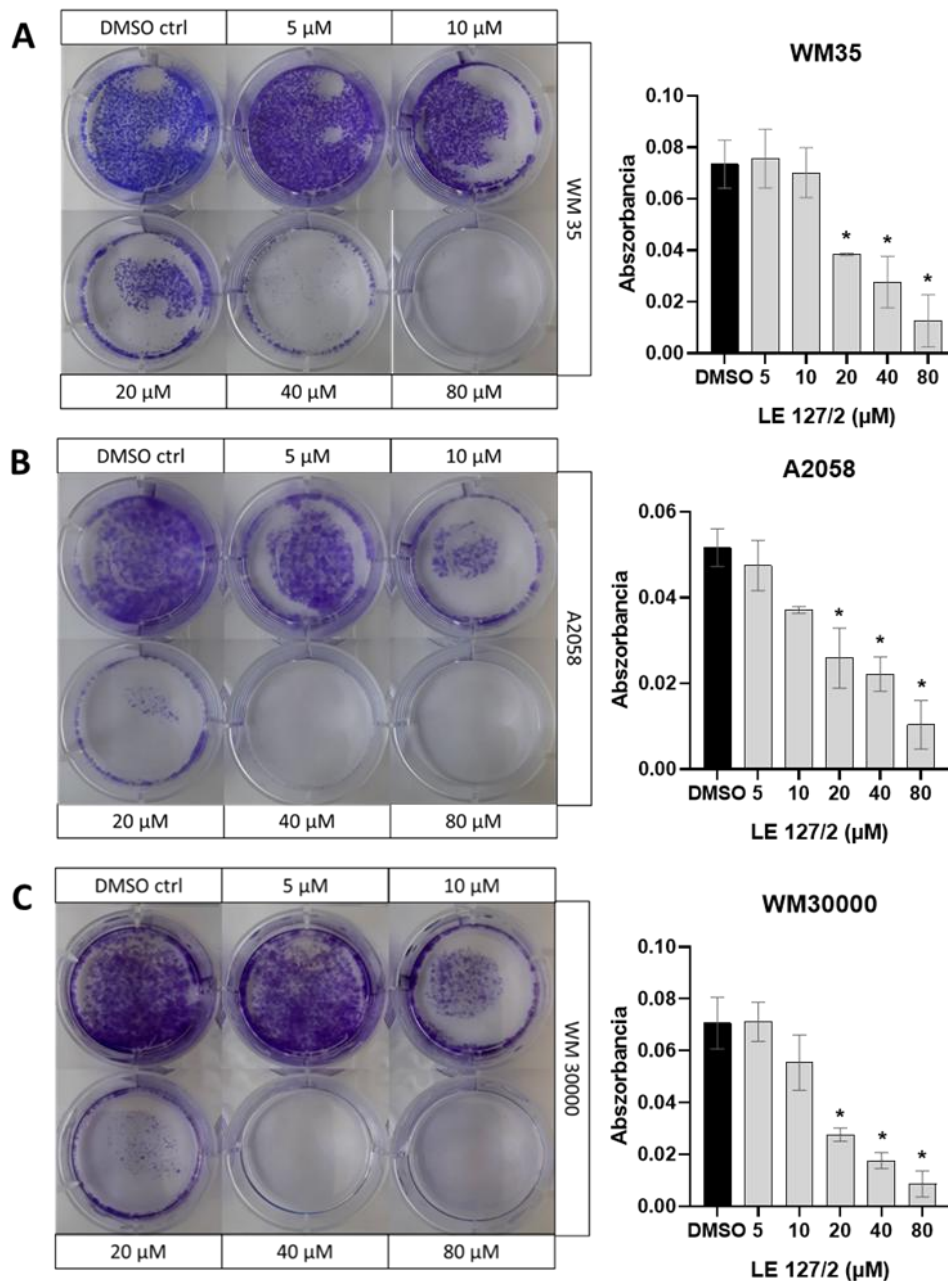
segítségével határoztuk meg, * $p < 0,05$. Az adatok az átlag ($n=3$) \pm szórás (S.D.) formájában kerültek ábrázolásra.

VI.3. A sejtek kolóniaképző képességének vizsgálata

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 μM) két héten keresztül, 37 °C-on, 5%-os 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 μM koncentrációban is jelentősen csökkentette a sejtek kolóniaképződését. Azonban az LE-127/2 hatékonyabban gátolta a kolóniaképződést az A2058 és WM3000 sejtekben 10 μM koncentrációnál, mint a WM35 sejtekben (12. Ábra). A vizsgált sejtvonalakban a kolóniák száma körülbelül 2–3-szoros csökkenést mutatott 20 μM 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 μM koncentrációnál, és a humán kután melanóma sejtekre gyakorolt hatása dózis- és időfüggő módon érvényesült (12. Ábra).



12. Ábra. Az LE-127/2 kezelés hatása az A2058 (A), WM35 (B) és WM3000 (C) sejtek kolónia képződésére. A sejteket LE-127/2-vel kezeltük, majd 37 °C-on, 5% CO₂-t és 95% levegőt tartalmazó inkubátorban tenyésztettük. A kísérlet végén a túlélő sejtek kolóniáit fixáltuk, majd 0,1%-os kristályibolya-festéssel láthatóvá tettük. Ezt követően a kolóniákat 2%-os SDS-oldatban szuszpendáltuk, és az abszorbanciát 570 nm-en mértük a mennyiségi meghatározáshoz. Az adatok az átlag (n=3) \pm szórás (S.D.) formájában kerültek ábrázolásra. A szignifikáns különbségeket (*p < 0,05) kétutas ANOVA elemzéssel határoztuk meg.

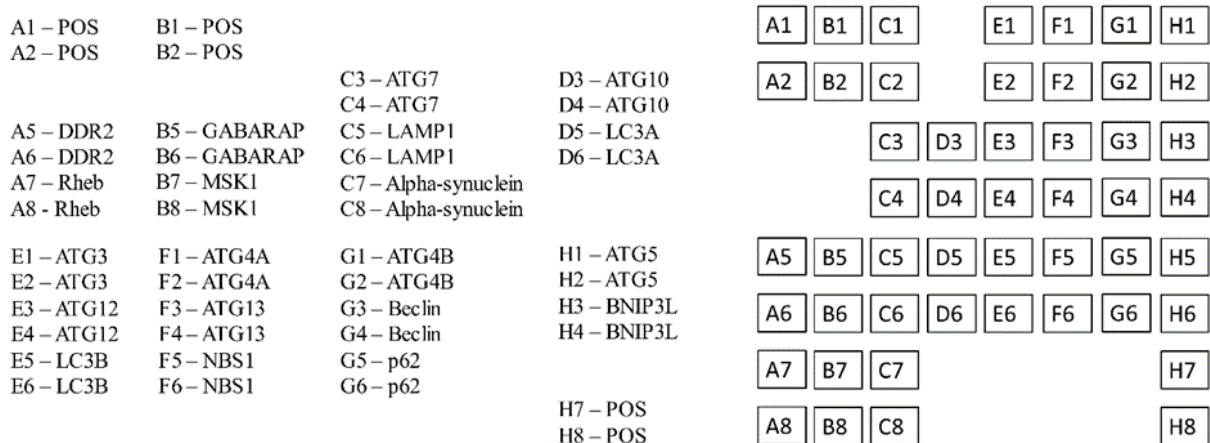
VI.4. Fehérje expresszió analízise

A programozott sejthalál (PCD) három fő típusa közé tartozik az apoptózis, az autofágia és a nekrozis [127]. 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.

VI.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 μ M LE-127/2-vel 48 órán keresztül kezelt sejtekből izolált fehérjemintákat használtuk fel (részletes leírás a „Anyagok és módszerek” fejezetben található). A fehérje array-n található specifikus antigéneket (13. Ábra) a sejtekből izolált fehérjékkel inkubáltuk, majd minden további lépést a gyártó protokollja szerint végeztünk el.



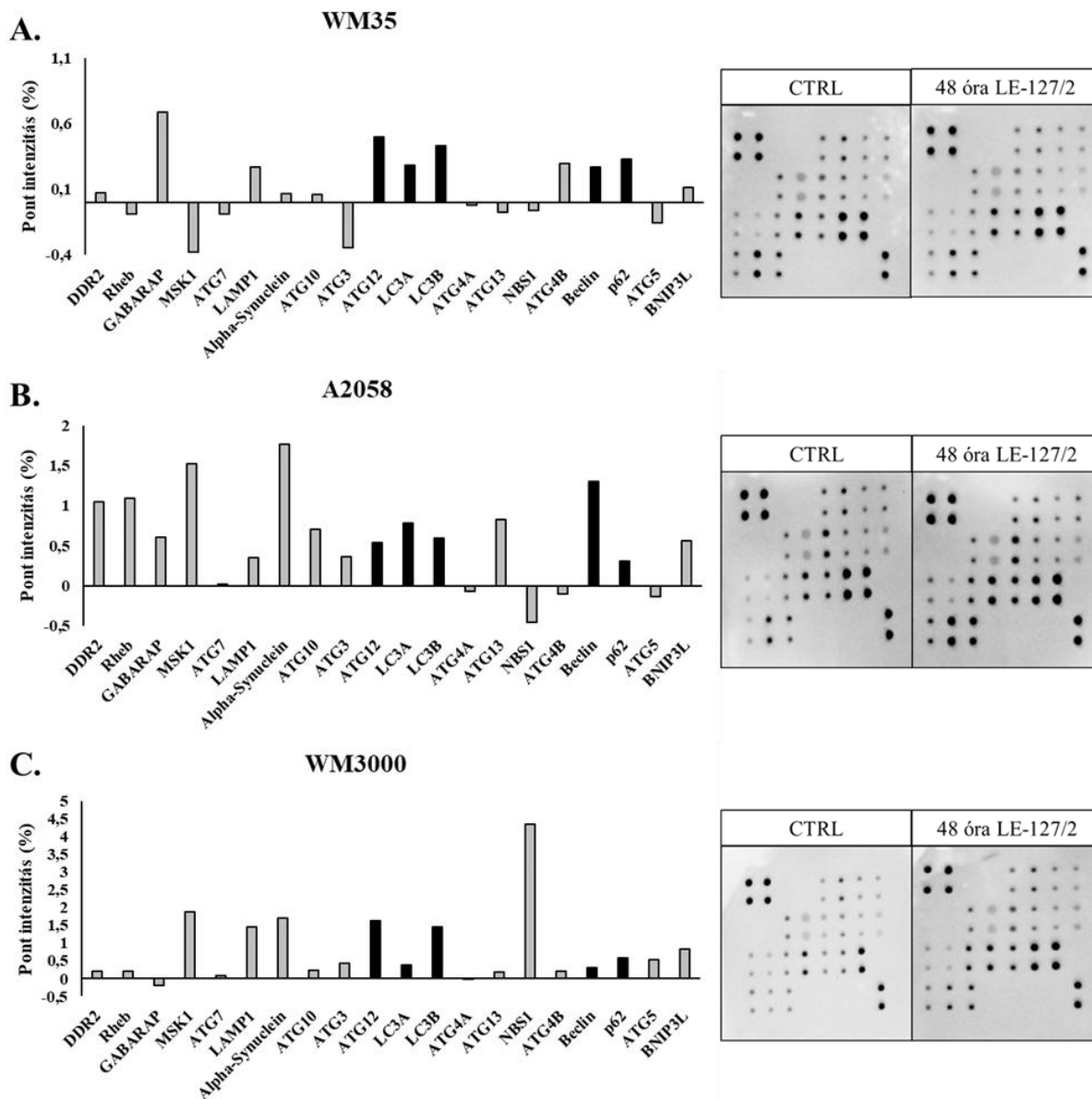
13. Ábra. Az autofágia array-n detektálható fehérjék elhelyezkedése (a kit-hez mellékelt használati utasításból).

Az array-n található pontok intenzitása a kontroll- és kezelt sejtekben az adott fehérjék expressziós szintjét tükrözi (14. Ábra). A pontintenzitásokat az Image Lab szoftverrel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) elemeztük, és minden mért jel értékét az array-re nyomtatott duplikált pozitív kontrollpontokhoz viszonyítva normalizáltunk, amelyek az array bal felső és jobb alsó sarkaiban helyezkednek el (14. Ábra, A, B, C job oldal paneljei).

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.

A 14. Ábrán fekete oszlopok mutatják az alapvető autofágiás markerek – például Atg12, LC-3 (LC3A / LC-3I és LC3B /LC-3II) – expresszióját. 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 [128].

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 (14. Ábra, B).



14. Ábra. Humán autofágia array (Assay Genie) eredményei. Az array-ben található membránokat LE-127/2-vel kezelt (20 μ M) és kezeletlen kontroll WM35, A2058 és WM3000 sejtvonalakból származó fehérjelizátumokkal inkubáltuk. Az egyes antigénspecifikus antitestekhez tartozó pontok jelintenzitása (jobb oldalon) arányos a vizsgált mintákban (bal oldalon) detektált célfehérjék relatív expressziójával. Az array-k korlátozott száma miatt minden panelen egy-egy reprezentatív minta került vizsgálatra.

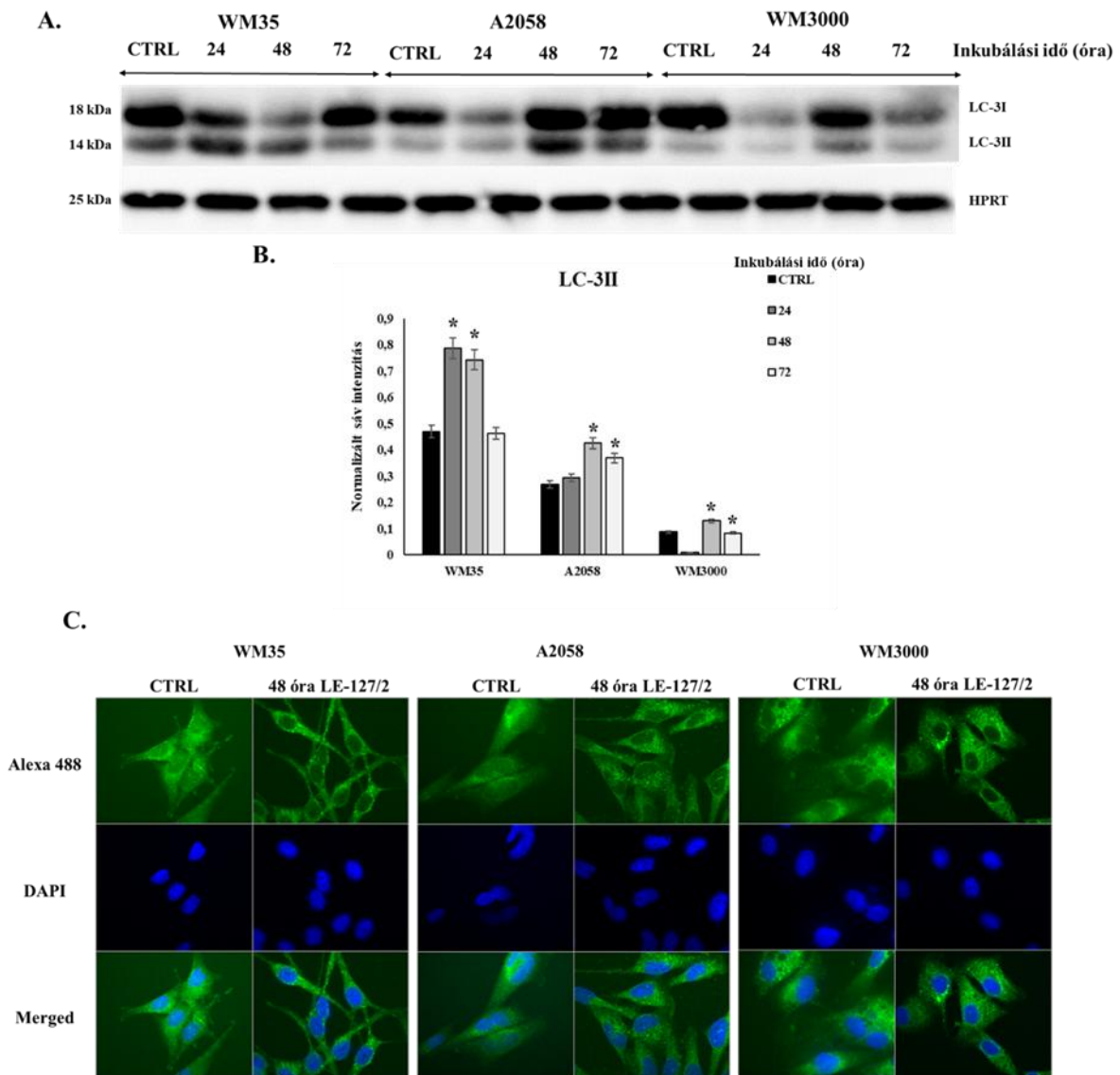
VI.4.2. Az LC3, p62, a Beclin-1 és az Atg12 expressziójának megerősítése Western blottal

Napjainkban az LC-3 fehérjét az egyik új prognosztikai biomarkerként azonosították a korai stádiumú melanómák esetében. A bőr fiziológiai körülményei között az LC-3 citoplazmatikus lokalizációjú, és alacsony szinten expresszálódik, míg malignus melanómákban fokozott expresszió figyelhető meg, és kialakul a membránhoz kötött forma, az LC3-II, amely az autofágia indukciójának jelzőjeként szolgál [129].

A 15. Ábra az LC-3 fehérje expressziójának változását mutatja az LE-127/2-vel történt kezelést követően egy-egy adott időpontban. Az eredmények egyértelműen igazolják, hogy az LC-3 fehérje expressziós szintje módosult a kezelések hatására (15. Ábra, A-C). A 15. Ábra, B paneljén láthatóan 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.

Ezek alapján 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 (15. Ábra, A, B) – összhangban van az array analízis eredményeivel, amelyek szintén az LC-3II szint emelkedését mutatták a kezelt sejtekben (14. Ábra).

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) megjelenésének tudható be, amely az autofágia aktiválásának következménye (15. Ábra, C).



15. Ábra. Az LC-3 fehérje expressziója LE-127/2-vel kezelt melanóma sejtekben. A fehérjelizátumokat LC-3 fehérje kimutatására Western blot módszerrel elemeztük (A és B). Az LC-3 immunfluoreszcens detektálása (C) során a sejteket tárgylemezeken tenyésztettük, majd 48 órán keresztül LE-127/2-vel kezeltük. Ezt követően a sejteket 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk, majd 4 °C-on, egy éjszakán át inkubáltuk az elsődleges anti-LC-3 antitesttel, amelyet 1:100 arányban hígítottunk 1% BSA-t és 0,1% Triton X-100-at tartalmazó oldatban. Az LC-3 pontszerű jelöléseinek (zöld) detektálásához Alexa-488-jelölt anti-nyúl szekunder antitestet használtunk, míg a sejtmagokat DAPI-val (kék) festettük meg (C panel). A képeket Zeiss AxioScope fluoreszcens mikroszkóppal készítettük, 200-szoros nagyítással.

VI.4.3. Egyéb autofágia fehérjék detektálása LE-127/2 kezelés hatására

Az autofágia cargo-receptora, a p62, melynek fokozott expresszióját számos rossz prognózisú metasztatikus melanómában kimutatták, és mint multifunkcionális fehérjét, a melanóma tumorprogresszió egyik lehetséges hajtóerejeként tartják számon [130]. A p62

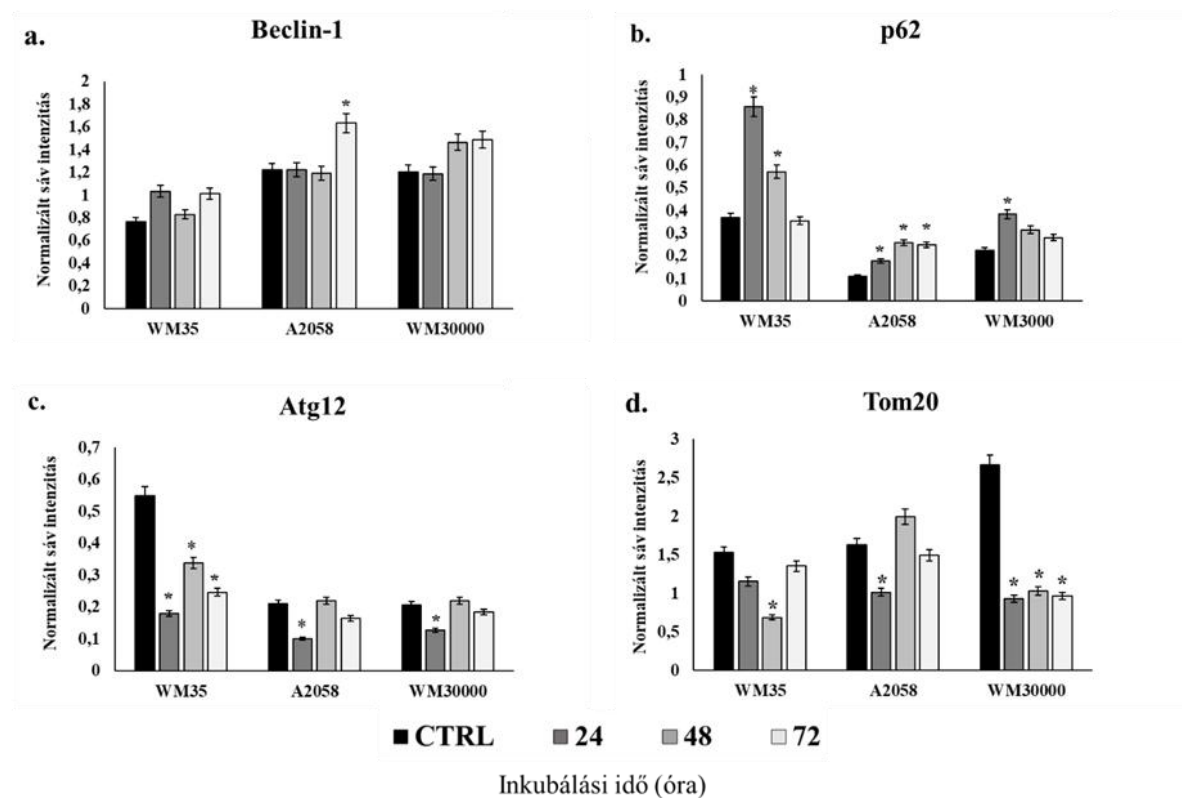
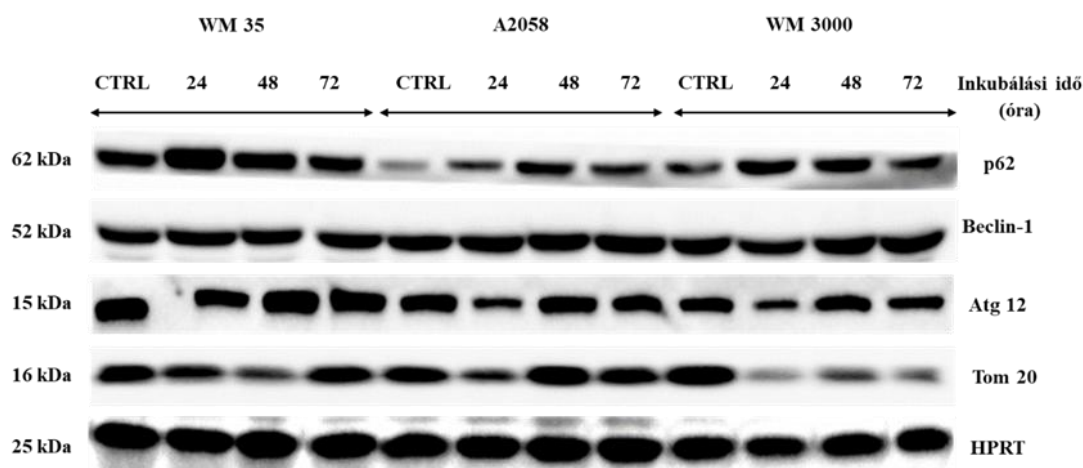
fehérje expressziója az LE-127/2-kezelést követően minden vizsgált melanóma sejtvonalban markánsan megnövekedett 24 órán belül, majd a WM35 és WM3000 sejtekben fokozatos csökkenést mutatott 48, illetve 72 óra elteltével. Ezzel szemben az A2058 sejtvonalban a p62 szintje folyamatosan növekedett a 72 órás időtartam alatt (16. Ábra felső panel és 16. Ábra, b).

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 (16. Ábra felső panel és 16. Ábra, a). Ez az eredmény teljes mértékben összhangban áll az array analízis során kapott adatokkal (14. Ábra).

Az Atg12 fehérje expressziója 24 órával az LE-127/2-kezelés után csökkenést mutatott, amelyet 48–72 órás időintervallumban fokozatos emelkedés követett (16. Ábra felső panel és 16. Ábra, c). Ezek az eredmények szintén megfelelnek az array alapú vizsgálatban észlelteknél (14. Ábra).

Vizsgáltuk a Tom20 fehérje expresszióját is, amelyről ismert, hogy kulcsszerepet játszik a melanóma sejtek halálában [131]. A Tom20 a reaktív oxigéngyökök (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 tendenciát figyeltünk meg, a Tom20 expressziója időfüggő módon, szignifikánsan csökkent a kontrollhoz viszonyítva (16. Ábra felső panel és 16. Ábra, d).

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.

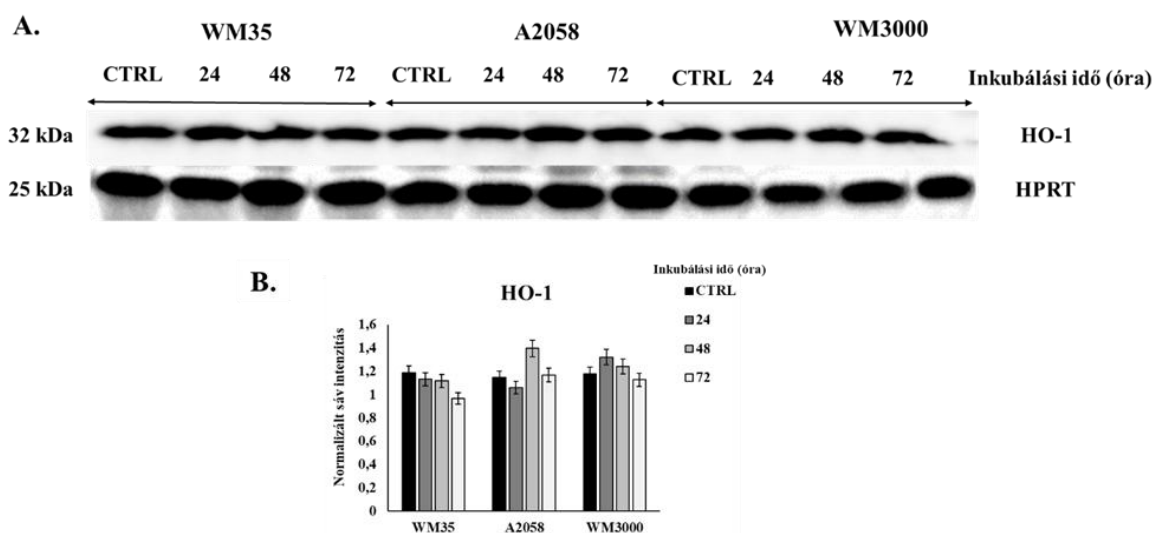


16. Ábra. A kezelt melanóma sejtekben kimutatott autofágiához köthető fehérjék expressziója Western blot analízis alapján a 20 μ M LE-127/2 kezelés hatására. Az oszlopdiaagrammok (a-d) a HPRT-re normalizált fehérjék expresszióját (p62, Beclin-1, Atg12 és Tom20) szemléltetik. Az adatok három független mérés eredményeiből, az átlag (n=3) \pm szórás (S.D.) formájában kerültek ábrázolásra. A szignifikáns különbségeket (*p < 0,05) kétutas ANOVA elemzéssel határoztuk meg. A CTRL minden minta esetében a kontroll, DMSO-t kapott sejteket jelenti.

VI.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. Érdekes, hogy bár a HO-1 fokozott expressziója melanóma sejtekben elősegíti a tumorprogressziót, ugyanakkor csökkentheti a daganat növekedését és metasztatikus képességét is [132]. A HO-1 ezen kettős szerepe miatt célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy a 20 μ M koncentrációjú LE-127/2-kezelés miként befolyásolja a HO-1 expresszióját WM35, A2058 és WM3000 humán melanóma sejtvonalakban.

A 17. Ábra a HO-1 fehérje expresszióját mutatja be a vizsgált melanóma sejtekben. A Western blot analízissel kimutatott HO-1 expresszió (17. Ábra, A) 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 kezelés után (17. Ábra, B).



17. Ábra. A HO-1 fehérje expresszió szintje WM35, A2058 és WM3000 sejtekben. Kezeletlen kontroll és LE-127/2 kezelt melanóma sejtek HO-1 expressziója (A). Az oszlopdigrammok a fehérjék HPRT-hez normalizált értékeit szemléltetik (B). Az adatok három független mérés eredményeiből ($n=3$) \pm szórás (S.D.) formájában kerültek ábrázolásra. A szignifikáns különbségeket ($*p < 0,05$) kétutas ANOVA elemzéssel határoztuk meg.

VI.4.5. Az apoptotikus fehérjék expressziója

Az apoptózishoz kapcsolódó fehérjék detektálásával célunk annak tisztázása volt, hogy a melanóma sejtekben a kezelésekre hatására bekövetkezett sejtpusztulás folyamatához hozzájárul-e az apoptózis. Ennek érdekében olyan sejtültimokon végeztünk Western blot

analízist, amelyeket 20 μ M koncentrációjú LE-127/2-vel kezeltünk 24 és 72 óra közötti időtartamban. A vizsgálatok során több, apoptózissal összefüggésbe hozható fehérje expresszióját elemeztük.

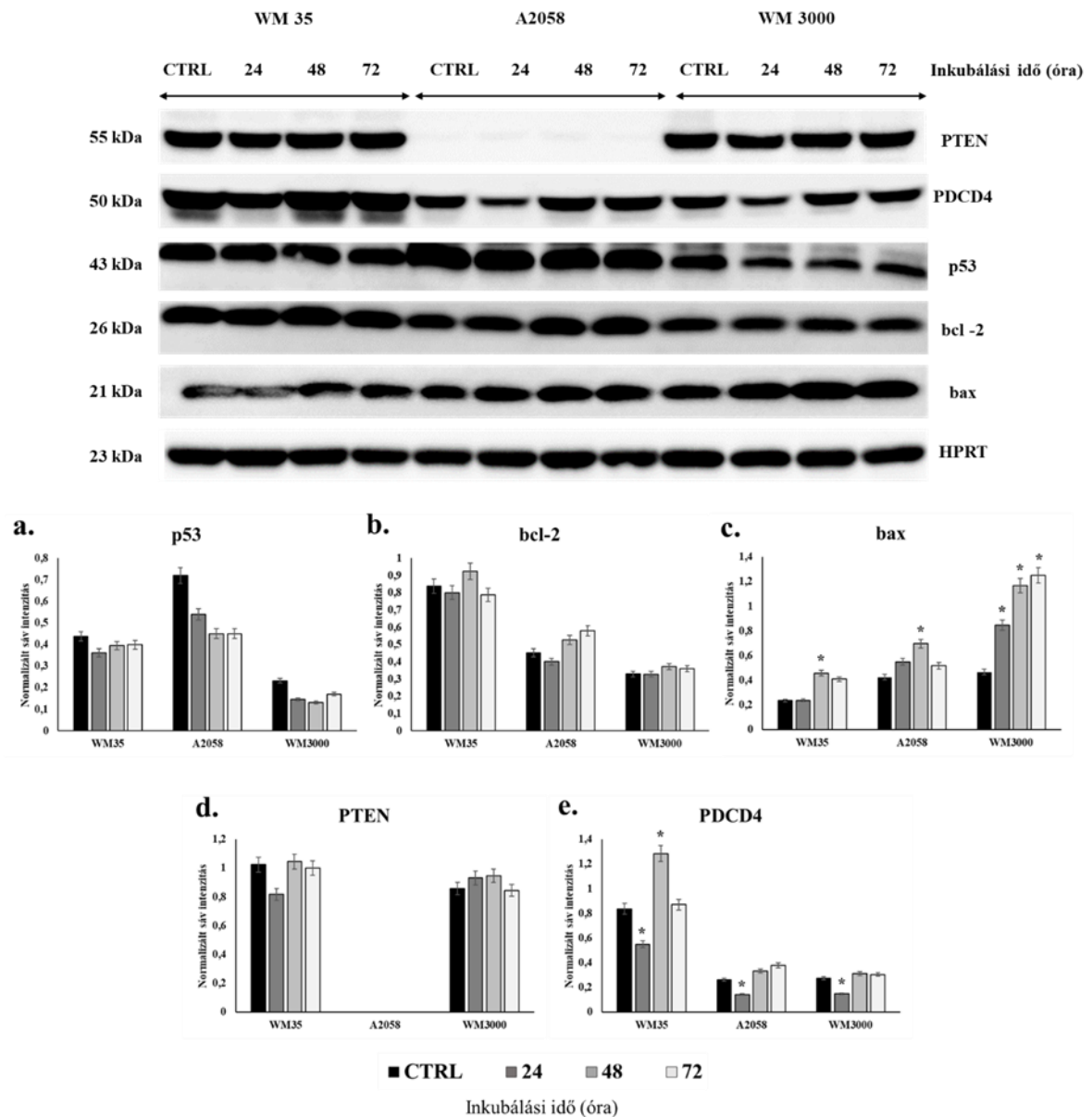
VI.4.5.1. A p53, bax, bcl-2, PDCD4 és PTEN expressziója

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 [133]. A Western blot technikával meghatározott p53 fehérjeszint kvantifikálását követően (18. Ábra felső panel és 18. Ábra, a) megállapítható volt, hogy a p53 expressziója eltérő mértékű a három vizsgált sejtvonalban. Az LE-127/2 kezelést követően a p53 fehérjeszint csökkenést mutatott, azonban ez a csökkenés 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 (18. Ábra felső panel, 18. Ábra, b, c).

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 (18. Ábra felső panel és 18. Ábra, d).

A PDCD4, mint azonosított tumorszuppresszor, bizonyítottan befolyásolja a metasztatikus melanómás betegek túlélését [134], 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. Érdekeség, hogy a WM35 sejtvonalban a 48 órás kezelés után a PDCD4 expresszió közel 1,5-szeresére nőtt a kontrollhoz képest (18. Ábra felső panel és 18. Ábra, e).



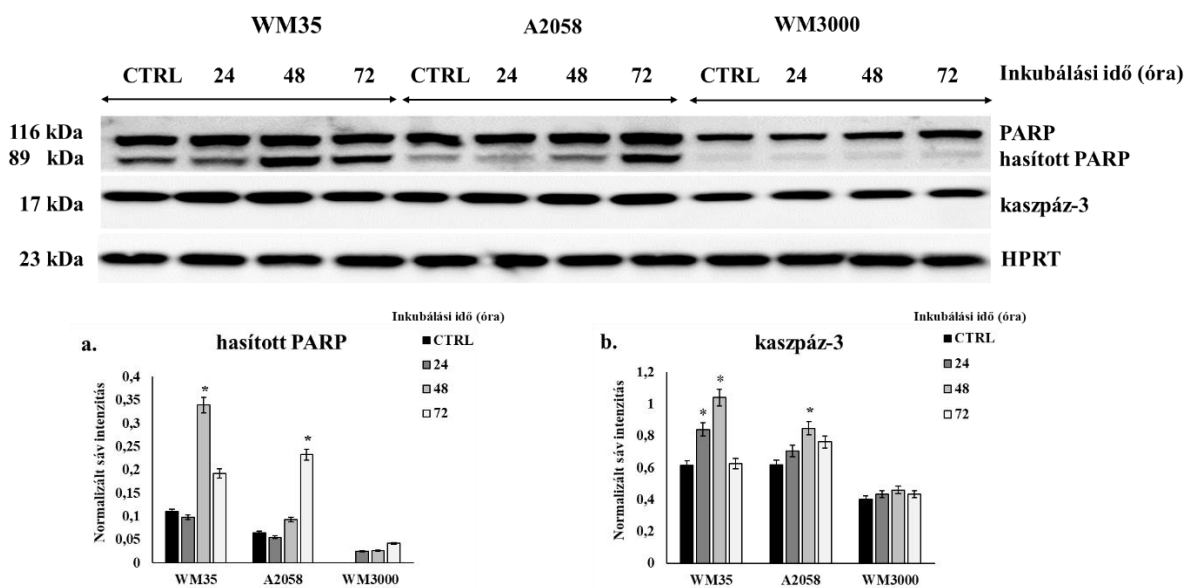
18. Ábra. Az apoptotikus útvonalakhoz köthető fehérjék detektálása melanóma sejtekben LE-127/2 kezelés hatására. A PTEN, PDCD4, p53 és bax fehérjék molekulatömegük szerint lettek detektálva (felső panel). Az oszlopdiagrammok a fehérjék HPRT-re normalizált expresszióját szemléltetik (a-e). Az adatok három független mérés eredményeiből, az átlag (n=3) ± szórás (S.D.) formájában kerültek ábrázolásra. A szignifikáns különbségeket (* $p < 0,05$) kétutas ANOVA elemzéssel határoztuk meg (* $p < 0,05$).

VI.4.5.2. 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 (19. Ábra). 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.

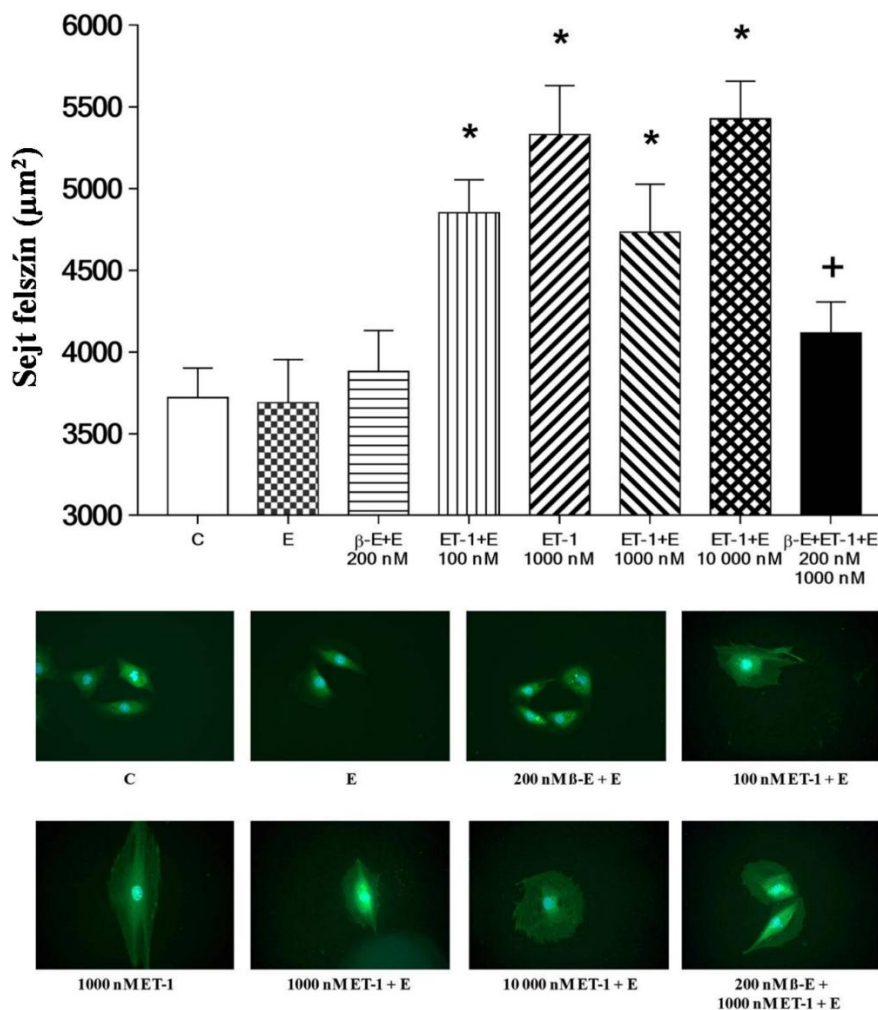


19. Ábra. A PARP expresszió detektálása melanóma sejtekben LE-127/3 kezelés hatására Western blot-tal. A PARP/hasított PARP és kaszpáz-3 expresszió szintje LE-127/2 kezelés hatására a vizsgált melanóma sejtekben (felső panel (a) és (b)). Az oszlopdiagrammok a fehérjék HPRT-hez normalizált értékeit szemléltetik. Az adatok három független mérés eredményeiből ($n=3$) \pm szórás (S.D.) formájában kerültek ábrázolásra. A szignifikáns különbségeket ($*p < 0,05$) kétutas ANOVA elemzéssel határoztuk meg.

VII. EREDMÉNYEK II.

VII.1. Sejt felszín változása kezelések hatására

Az eredményeink azt szemléltetik (20. Ábra), hogy az 100 nM és 10.000 nM endothelin (ET-1) dózistartomány alkalmazása során (20. Ábra, 4. 5. 6. 7. oszlopok), szignifikáns növekedés volt megfigyelhető a sejt felszínben (Cell surface), amely az ödéma kialakulására utal ebben a sejtcsoportban (20. Ábra). Amennyiben 200 nM koncentrációban alkalmaztuk előkezelés formájában a β -ösztradiolt (β -E), az az ET-1 (1000 nM) sejt felszín növelő hatását megakadályozta (20. Ábra, 8. oszlop). Az etanol (E) oldószerként valamennyi kísérletes csoportban jelen volt, kivétel a kontroll (C, 1. oszlop) csoportot.



20. Ábra. A grafikon (felső rész) mutatja a kezelések hatását a sejt felszín változására. C: kontroll sejt felszín (1. oszlop), E: etanol (0,01%, oldószer a hatóanyagoknak, (2. oszlop), β -ösztradiol (β -E) (3. oszlop). Az etanol (E) és β -ösztradiol önmagukban alkalmazva nem okoztak változást a sejt felszín növekedésben (2. és 3. oszlop). Az endothelin-1 (ET-1) emelkedő koncentrációi esetén (4., 5., 6., 7. oszlopok) szignifikáns növekedés volt megfigyelhető a sejt felszín mértékében. A β -ösztradiol (β -E) 200 nM koncentrációját együtt alkalmazva 1000 nanomol endothelin-1-gyel (8. oszlop), a sejt felszín mérete szignifikáns mértékben csökkent, az ödéma

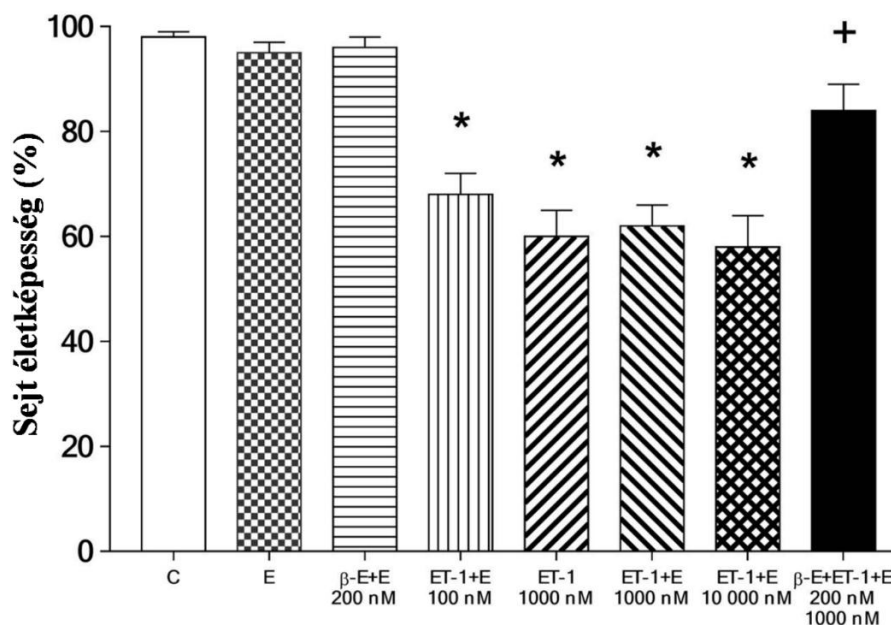
kialakulása kisebb mértékű volt. A sejtfelszín változása (mikronégyszetméter) átlag \pm SEM. $n = 200$ sejt tartozott minden egyes csoportba. $*p < 0,05$ összehasonlítva a kontroll (C) csoporttal. $^+p < 0,05$ összehasonlítva a 7. és 8. csoportban (oszlop) kapott eredményeket. A sejtfelszín növekedés meghatározása fluoreszcens mikroszkóppal történt.

VII.2. Sejttúlélés (%) vizsgálata H9c2 kardiomioblaszt sejteken

Sejtszámsökkenés nem volt a sejtek túlélésében (cell viability, %) megfigyelhető H9c2 sejtvonalon (21. Ábra) a kontroll (C) csoporthoz viszonyítva (1. oszlop) akkor, amikor etanol (E) 0,01%-ban, mint oldószere a hatóanyagoknak (2. oszlop) és β -ösztadiol (β -E) (3. oszlop) kezelésnek vetettük alá a sejteket. Az etanol (E) a hatóanyagok oldószere valamennyi kísérletes csoportban jelen volt, kivétel a (C, Kontroll, 1. oszlop) csoportot. Tehát, az etanol (E) és beta-ösztadiol (β -E) önmagukban az alkalmazott koncentrációban, nem okoztak változást a sejttúlélés terén (2. és 3. oszlop).

Az endothelin-1 (ET-1) fokozatosan emelkedő koncentrációi 100 nM és 10,000 nM koncentrációi (21. Ábra, 4., 5., 6., 7. oszlopok) viszont szignifikáns csökkenést eredményeztek a sejtek túlélésében.

Abban a kísérletsorozatban viszont, amikor a β -ösztadiol (β -E) 200 nM koncentrációját együtt alkalmaztuk 1000 nanomol endothelin-1-gyel (21. Ábra, 8. oszlop), a sejtek túlélése szignifikáns mértékben megnövekedett. Tehát, a β -E kivédte az endothelin-1 1000 nM-ban okozott sejtkárosító (sejtlő) tulajdonságát.



21. Ábra. Sejtek életképességének vizsgálata H9c2 patkány kardiomioblaszt sejteken. C: kontroll (1. oszlop), E: etanol (0.01%, oldószere a hatóanyagoknak, (2. oszlop), β -ösztadiol (β -E) (3. oszlop). Az etanol (E)

oldószerként valamennyi kísérletes csoportban jelen volt, kivétel a C (Kontroll) (1. oszlop). Az etanol (E) és β -ösztadiol önmagukban nem okoztak változást a sejtek túlélésében (2. és 3. oszlop). Az endothelin-1 (ET-1) növekvő koncentrációi (4., 5., 6., 7. oszlopok) szignifikáns mértékben csökkentették a sejtek túlélési esélyeit. Amikor a β -ösztadiol (β -E) 200 nM-os koncentrációját alkalmaztuk együtt 1,000 nM-os endothelin-1-gyel (8. oszlop), a sejtek túlélése szignifikáns mértékben megnövekedett. Az eredmények %-ban kifejezve \pm SEM. $n = 200$ sejt tartozott minden egyes csoportba. $*p < 0,05$ összehasonlítva a hatóanyagmentes kontroll (C) csoporttal. $^+p < 0,05$ összehasonlítva a 7. és 8. csoportban (oszlop) kapott eredményeket.

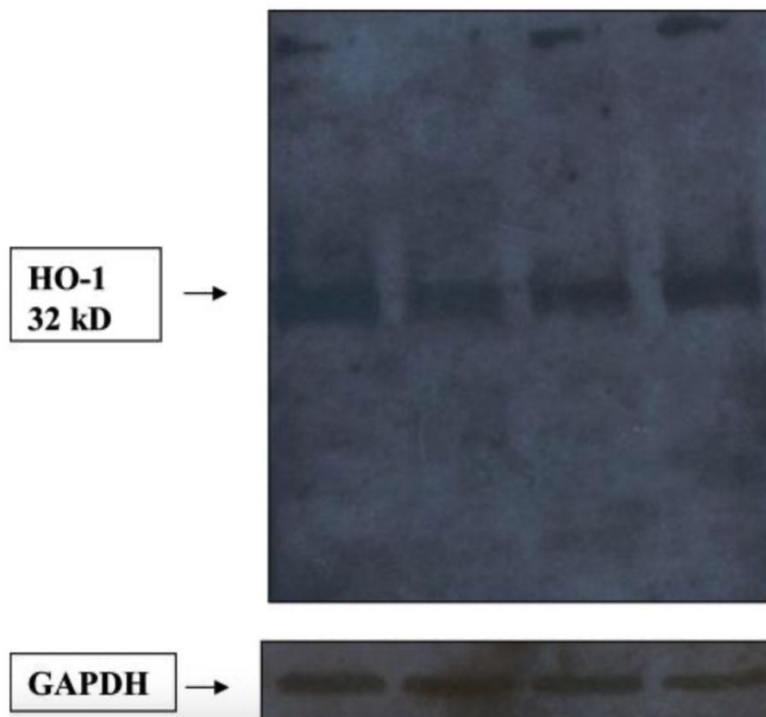
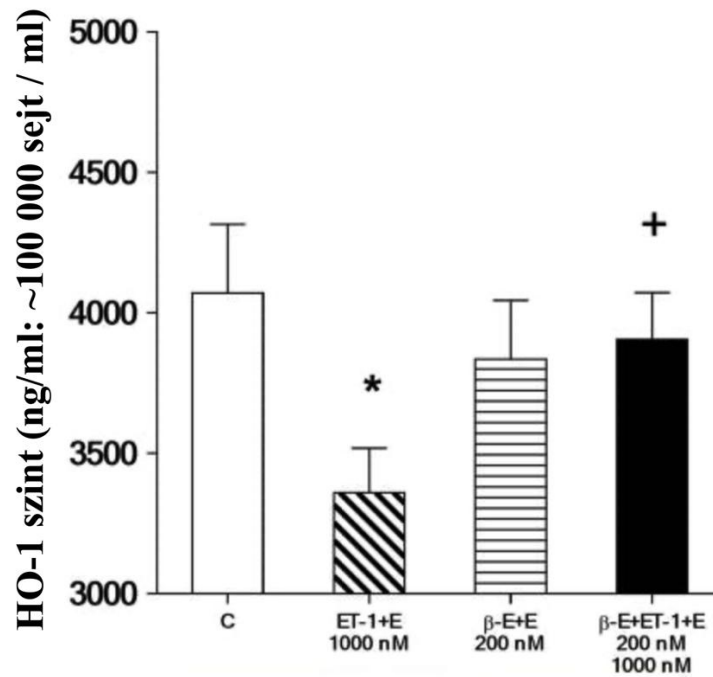
VII.3. Hemoxigenáz-1 (HO-1) fehérje és Western blot *in vitro* H9c2 patkány kardiomioblaszt sejteken

A HO-1 szinteket ng/ml koncentrációban mutatja a 22. Ábra összehasonlítva a kezeletlen kontroll (C) értékkel (1. oszlop) a sejt kultúra médiumban. A kapott eredményekből látható, hogy az 1000 nM ET-1 és 0,01% etanol (E) együtt történő alkalmazása (2. oszlop) szignifikáns mértékben csökkentette a HO-1 szintet ($*p < 0,05$). Ugyanekkor a béta-ösztadiol (β -E) 200 nM-os koncentrációja és az etanol (E, 0,01%) együttládása (3. oszlop) nem okozott szignifikáns csökkenést a HO-1 szintben.

Abban a kísérletsorozatban (4. oszlop), amikor 200 nM béta-ösztadiol (β -E, 200 nM), endothelin-1-et (ET-1, 1000 nM) valamint 0,01% etanolt (E) együtt alkalmaztunk a sejt kultúra médiumban (4. oszlop), szignifikáns emelkedés volt megfigyelhető a HO-1 szintben ($^+p < 0,05$) összehasonlítva a 2-ik oszlop eredményével, amikor a béta-ösztadiol (β -E, 200 nM) nem volt jelen a sejtenyésztés médiumában. Tehát, az eredmények azt mutatják, hogy a 200 nM-os béta-ösztadiolos (β -E) kezelés kivédte az ET-1 okozta HO-1 koncentráció csökkenését, amely hozzájárult a sejtek túléléséhez egyaránt, ahogyan azt a 22-ik Ábra is szemlélteti.

A 22. Ábra (középső panel) egy reprezentatív eredményét mutatja a Western blotnak, amelyet a citoszol extraktumok (H9c2 kardiomioblaszt) lizátumából kaptunk.

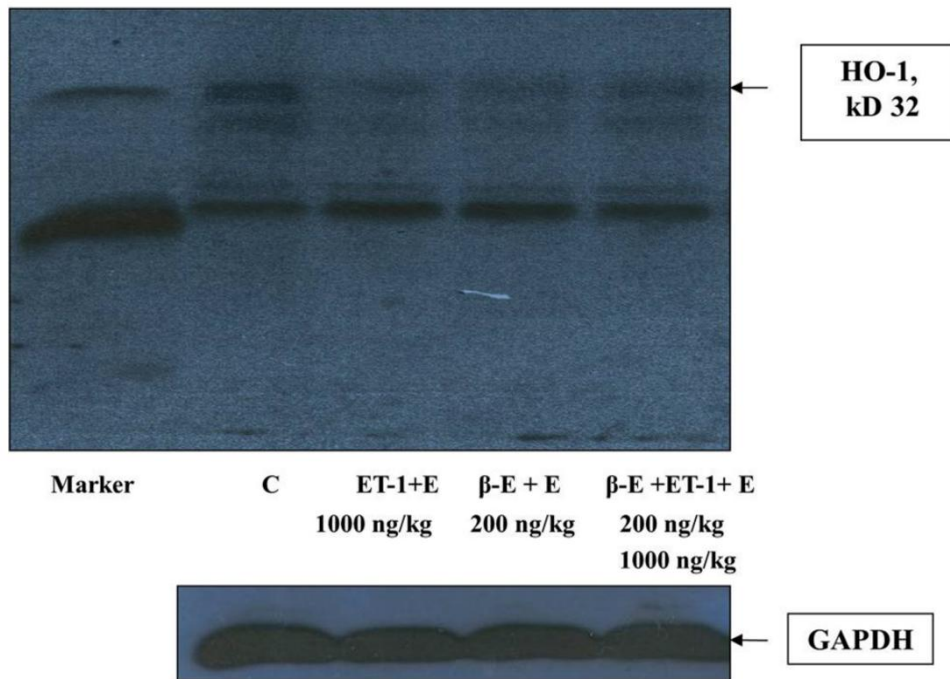
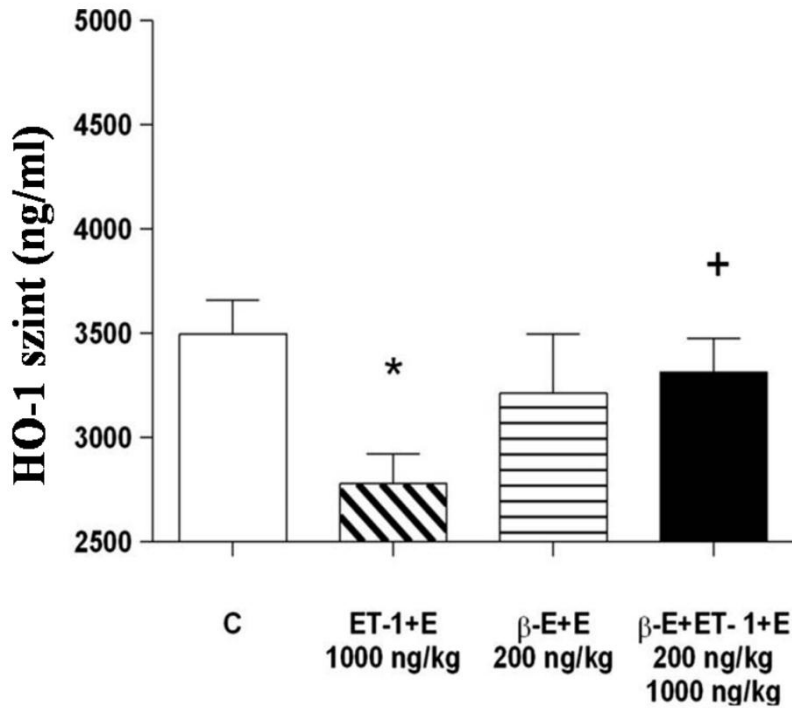
A 22. Ábra (legalsó rész) a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) expresszióját szemlélteti, mint „háztartási gén”, amely nem mutatott változást, állandó maradt, jelezve a futtatott minták azonos mennyiségét.



22. Ábra. A hemoxigenáz-1 (HO-1) fehérje és Western blot in vitro H9c2 patkány kardiomioblasztokban. Sejtkultúra médium (kontroll, C (1. oszlop). 1000 nM ET-1 és 0,01% etanol (1000 nM ET-1 + E) a médiumban (2. oszlop). 200 nM β-ösztadiol és 0,01% etanol (200 nM β-E + E) (3. oszlop). 200 nM β-E, 1,000 nM ET-1 és 0,01% etanol (200 nM β -E + 1000 nM ET-1 + E) a sejtkultúra médiumban (4. oszlop). *p <0,05: összehasonlítás a gyógyszermentes csoporttal (C, kontroll). +p <0,05: összehasonlítás az ET-1 + E (1000 nM) csoporttal. HO-1 fehérje szintek (HO-1 levels) (felső panel). n=8 minden csoportban. Western blot (középső panel), reprezentatív eredmény a citoszol extraktumok (H9c2 kardiomioblaszt) lizátumból. Legalsó rész (alsó panel) a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) reprezentatív expressziója, „háztartási gén”.

VII.4. Hemoxigenáz-1 (HO-1) szint a plazmában és Western blot analízis in vivo kísérletekben, patkány kardiomioblaszt sejttípuson szívszövetből

A fentebb kapott sejtkísérletek eredményei alapján (22. Ábra) 1000 nanogramm/kg endothelin-1 (ET-1) és 200 nanogramm/kg β -ösztadiol (β -E) hatásvizsgálatát végeztük in vivo patkányszív kísérletekben (23. Ábra). Az eredményekből jól látható az, hogy 1000 nanogramm/kg endothelin-1 (ET-1) szignifikáns mértékben csökkentette a HO-1 protein plazma szintjét (23. Ábra, felső panel, 2. oszlop) összehasonlítva a kontroll csoport (23. Ábra, C, 1. oszlop) eredményével, míg a β -E kezelt csoportban (felső panel, 3. oszlop) szignifikáns változás nem volt megfigyelhető. Ugyanekkor, a β -E 200 nanogramm/kg koncentrációban alkalmazva kivédte az 1000 nanogramm/kg ET-1 okozta plazma HO-1 csökkenést (23. Ábra, felső panel, 4. oszlop). Hasonló irányú eredmények voltak megfigyelhetőek, amikor Western blot alkalmazásával meghatároztuk a HO-1 protein expresszióját szívszövetből, ahogyan azt a reprezentatív ábra is mutatja (23. Ábra, középső panel). Az (23. Ábra) alsó része pedig a GAPDH értékek reprezentációs eredményeit mutatja, mint háztartási gén (housekeeping gene), amely nem mutatott szignifikáns változást a kezelt csoportokban összehasonlítva a kontroll (C) csoport expressziójával. Tehát, az emelkedett HO-1 szint védelmet nyújt a mioblasztokban, ahogyan azt az in vitro sejtkísérletek is mutatták a H9c2 sejtek esetén. Mindez, az eredmények szerint, feltehetően a HO-1 szignálmechanizmus befolyásolhatóságán keresztül valósulhatott meg.



23. Ábra. A hemoxigenáz-1 (HO-1) szint a plazmában és Western blot analízis in vivo kísérletekben patkány szívszövetben. C: kontroll, kezeletlen csoport (1. oszlop). ET-1: endothelin-1 kezelt csoport (2. oszlop). B-E: β -ösztadiol kezelt csoport (3. oszlop). B-E és ET-1 (β ösztadiol és endothelin-1, 4. oszlop) kezelt csoport. E: etanol mint alkalmazott oldószer (injekció végső koncentrációja 0,01%). Gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH). Marker: mólsúly marker, HO-1, 32 kDa. $n=8$ minden csoportban (felső panel). * $p < 0,05$ összehasonlítás kontroll (C, kezeletlen) értékkel. + $p < 0,05$: összehasonlítás ET-1 (1000 ng/kg) kezelt csoporttal (2.oszlop).

VIII. Megbeszélés

A rosszindulatú sejtek eradikációjára szolgáló humán kután melanóma terápiás lehetőségei elsősorban a sebészeti beavatkozást foglalják magukban, az elmúlt tíz évben pedig egyre nagyobb szerepet kaptak az adjuváns kezelések, az immunterápia és a célzott terápiák is [135]. A klinikai válasz és a betegek teljes túlélésének növelése érdekében, ahogyan azt a bevezetésben már említettem különféle terápiás kombinációkat alkalmaznak [135-140]. A melanóma négy genomialis alcsoportja közül – BRAF, NRAS, NF1 és tripla vad-típus, amelyet a BRAF onkogén 15. exon/600-as kodonjának (BRAFFV600E) mutációja okoz, a betegek kb. 50%-ában fordul elő, így a melanóma kezelésében ez az egyik legfontosabb terápiás célpontnak számít [141]. Nem véletlen tehát, hogy a vemurafenibet – a klinikumban az első engedélyezett BRAF-inhibítort – találták legalkalmasabbnak a BRAF-mutáns metasztatikus melanóma betegek kezelésére. A vemurafenib a V600E kináz gátlásával oly módon indukál apoptózist, hogy blokkolja a BRAF mutáció által vezérelt, konstitutív MAPK jelátviteli útvonalat, melynek eredményeként jelentősen javítva a betegek hosszú távú túlélését [142], mindemelett a hosszabb távú kezeléseknél a BRAF-gátlás MEK-inhibitorokkal való kombinációja a melanóma kezelésében rendkívül sikeresnek bizonyult. A BRAF-gátláson alapuló célzott terápia hátránya sajnálatos módon a betegek többségében a terápiával szemben viszonylag gyorsan kialakuló szerzett rezisztencia. Továbbá, a melanóma erősen metasztatikus jellege miatt a betegek hosszabb távú kezelést igényelnek, viszont a kialakuló rezisztencia végett a BRAF-gátlás a metasztázisos betegek esetében nem jár hosszabb távon sikerrel [143]. Tehát, metasztatikus betegek hosszú távú kezelése során kialakuló gyógyszerrezisztencia a vemurafenib egyik hátránya, míg a másik az ép, nem tumoros sejtekre gyakorolt toxicitása. A vemurafenib toxikus mellékhatása például bőrreakciókban, fényérzékenységekben, fejfájásban és ízületi fájdalmakban (arthralgia) nyilvánul meg [144, 145]. Ezen hátrányos tulajdonságai a vemurafenibet, de más BRAF-gátlók alkalmazását is korlátozzák, melynek leküzdésével több olyan kutatócsoport is foglalkozik, amelyek kutatása elsősorban olyan természetes eredetű vegyületek feltárására irányul, amelyek potenciálisan alkalmazhatók lennének a melanóma kezelésében.

A *Cannabis sativa* (*Cannabis sativa* L., *Cannabaceae*) több mint 500 bioaktív vegyületet termel. Ezek közül a kannabinoidok, például a Δ^9 -tetrahidrokannabinol (THC) és a kannabidiol (CBD) erősen kutatottak daganatellenes hatásaik miatt. Kevésbé ismert azonban a *C. sativa* másik összetevője, a kannabigerol (CBG) hatása, noha már egyes daganattípusokban, így melanómában is igazolták daganatellenes tulajdonságait [18]. A CBG

jelentős antiproliferatív hatását írták le más agresszív tumorokban is [146], így például továbbá képes a mieloid daganatok és a glioblasztóma differenciációjának módosítására [90, 147], amely kedvező irányban befolyásolhatja a betegség kimenetelét. Eddigi ismereteink alapján azonban a CBG kedvező biológiai tulajdonságai [148] ellenére alacsony vízoldhatósága és mérsékelt biohasznosulása korlátozza annak klinikai felhasználását, azonban ezek a tulajdonságok kémiai módosítással javíthatók. Nemrégiben Lőrincz Eszter és munkatársai szintetizáltak új, nitrogéntartalmú CBG-származékokat, és leírták ezen vegyületek különböző biológiai tulajdonságait [22]. Az újonnan szintetizált CBG-származék a nitrogén tartalom miatt fokozhatja a kötődést különböző receptorokhoz, enzimekhez vagy egyéb fehérjékhez, továbbá lehetőséget biztosít sóképzésre is, amely a vízoldékonyságát is fokozza az előállított vegyületnek. E tulajdonságok hozzájárulhatnak a biohasznosulás növeléséhez, amelynek következtében feltehetően kisebb mennyiség is elegendő lehet a származékból a kiindulási (CBG) vegyülethez képest. Emellett Lőrincz és kollégái kimutatták, hogy a sóképzés nem befolyásolja az új CBG származékok által kifejtett előnyös biológiai hatásokat [22]. Munkánk során az újonnan szintetizált CBG-származékok közül, az LE-127/2 antiproliferatív hatását vizsgáltuk három különböző melanóma sejtvonalon, és annak hatását vetettük össze a vemurafenib-ével. A vizsgálatok során alkalmazott A2058 és WM35 sejtvonalak BRAF-mutációt hordoznak, míg a WM3000 N-RAS génmutációt, így nem meglepő, hogy a vemurafenib – mint BRAF-mutáns szelektív inhibitor – már alacsony koncentrációban (2,5 μM) is gátolta az A2058 és WM35 sejtek proliferációját, azaz hatékonyabban fejtette ki hatását, mint a WM3000 (N-RAS mutáns) esetében. Érdekes módon az LE-127/2 kevésbé kifejezett gátlást mutatott a vizsgált melanóma sejtvonalak proliferációjára, mint a vemurafenib, ugyanakkor figyelemreméltó, hogy 20 μM koncentrációban kb. 50%-kal csökkentette mindhárom sejtvonal növekedését, függetlenül a mutáció típusától. E tulajdonsága azért jelent előnyt a vemurafenibbel szemben, mert azt jelenti, hogy az LE-127/2 nem mutáció-specifikus, és hasonló antiproliferatív hatást képes kifejteni különböző molekuláris háttérű melanómákban egyaránt. Ennek alapján feltehetőleg, a vemurafenibbel ellenben, az új CBG-származék potenciálisan alkalmazható lehet különféle genetikai háttérű melanómák kezelésében is.

A kísérleteink során azt is kimutattuk, hogy a kiindulási CBG (anyavegyület) hatása erősebbnek bizonyult a melanóma sejtvonalakra, mint az LE-127/2-é, amely csak 20 μM koncentrációban mutatott kb. 50%-os sejtproliferációs gátlást. Ugyanakkor, hangsúlyozni kell az anyavegyülettel szemben a vizsgált LE-127/2 egyik igen pozitív tulajdonságát: alacsony citotoxikus hatást fejtett ki a normál, nem tumoros keratinocita (HaCaT) sejteken, az LDH

citotoxikus assayt alkalmazva, az effektív 20 μM koncentrációhoz viszonyítva az LE-127/2 csak 80 μM koncentrációban bizonyult toxikusnak. Az LE-127/2-vel történt kezelés tehát sem szignifikánsan nem gátolta a nem tumoros, ép sejtek növekedését, de morfológiai változásokat sem okozott HaCaT sejteken. Ezzel szemben a kiindulási CBG a HaCaT sejteken is toxikusnak bizonyult, annak ellenére, hogy kifejezett gátló hatást mutatott a melanóma sejtek proliferációjára. Korábbi vizsgálatok is alátámasztották, hogy az eredeti CBG citotoxikus fibroblaszt és keratinocita sejtekre (HaCaT) [147]. Fontos tehát ismételt hangsúlyozni, hogy bár az új CBG-származék, az LE-127/2, bár magasabb koncentrációban hatékonyabb, mint a kiindulási CBG, az alacsonyabb hatékonyság nem csökkenti előnyeit sem a vemurafenibbel, sem a CBG-vel szemben. Az általunk igazolt alacsony toxicitás arra utal, hogy ez a gyógyszerjelölt potenciálisan alkalmazható melanóma kezelésében önmagában vagy már engedélyezett gyógyszerekkel kombinációban, anélkül, hogy károsítaná a környező nem malignus sejteket. További citotoxicitási vizsgálataink H9c2 sejteken és fibroblasztokon szintén megerősítették, hogy az LE-127/2 kevésbé toxikus, mint a kiindulási CBG vegyület, ami tovább hangsúlyozza klinikai alkalmazásának előnyeit, mivel ennek köszönhetően várhatóan kevesebb mellékhatást okozhat. Mindezek alapján indokolt lenne az LE-127/2-vel folytatott kutatások további elmélyítése annak tisztázására, hogy eredményeink klinikai környezetben is alkalmazhatók-e, illetve abból a célból, hogy az LE-127/2 önmagában vagy más terápiákkal kombinálva használható-e egy új terápiás megközelítésként a melanóma kezelésében. Annak bizonyítására azonban, hogy az LE-127/2 valóban egy potenciális gyógyszerjelöltként jöhet szóba a melanóma terápiájában preklinikai vizsgálatok szükségesek [149, 150].

A sejtek kemoterápiával vagy besugárzással történő kezelését követő túlélést vizsgáló klonogén tesztek (kolóniaképző assay) jelentős kolóniaképződés gátlást mutattak 20 μM -os koncentrációban alkalmazott LE-127/2 kezelés hatására, ami arra utal, hogy ez a vegyület hasznos lehet a metasztázisok elleni küzdelemben vagy a metasztatikus melanómák kezelésében.

Eddigi tudásunk szerint kemoterápiával szembeni melanómákban kialakult rezisztencia gyakran összefügg a melanóma sejtekben bekövetkezett autofágia indukciójával vagy gátlásával, ezért vizsgáltuk az LE-127/2 hatását autofágiával kapcsolatos fehérjékre. A kezelés hatására emelkedett az LC-3, a p62 és az Atg12 szintje is, ezek a fehérjék mind az autofágia alapvető markerei. Érdekes módon az autofágia fő markere, az LC-3II szintje szignifikánsan nőtt a kezelés első 24–48 órájában, majd 72 óránál a szintje visszaesett a kezeletlen kontroll szintjére. A Beclin-1 és az LC-3 a nukleációs fázisban vesznek részt, míg a

p62 fehérje, mint kargoreceptor, az aggregált molekulák és organellek eltávolításában játszik szerepet az LC-3II-vel való kölcsönhatás révén. Ez lehet az oka annak, hogy a p62 szintje csak 72 óránál emelkedett minden LE-127/2-vel kezelt sejtben [151].

Feltételezésünk szerint az LE-127/2 hatásmechanizmusa kapcsán az LE-127/2 hatására indukálódó autofágia elsősorban egy sejtben belüli lebontó folyamatként kap szerepet, amely az apoptózis előtt zajlik le, és sejthalálhoz vezethet még az apoptózis bekövetkezése előtt [152]. Az LC-3II szintjének időbeli emelkedése alapján feltételezzük, hogy az autofágia indukciója 24–48 óra között történik, később pedig a sejthalál, vagyis a melanóma sejtek „elpusztításának” végrehajtásában részben az apoptózis és a nekrozis veszi át a szerepet a kezdetben kiváltott autofágiától.

Irodalmi adatok alapján az LE-127/2 feltehetőleg a daganatsejtek életképességét többféle kannabinoid receptoron keresztül gátolhatja. Ezek aktiválása elősegítheti a ceramidok szintézisét és felhalmozódását, majd p8 és p38 indukcióját, amit az Akt–mTORC1 tengely gátlása követ, így beindul az apoptotikus sejthalált megelőző autofágia [153]. A melanóma sejtekben expresszálandó különböző kannabinoid receptorok vizsgálata (amely jelen tanulmányban nem történt meg) szükséges a pontos mechanizmus tisztázásához. A publikált adatok alapján azonban feltételezhető, hogy az Akt gátlása más molekulák közvetítésével az intrinsek mitokondriális apoptotikus útvonalat aktiválja [153].

Egy további érdekesség, hogy az LE-127/2 kezelés hatására a Tom20 fehérje – amelynek szerepe a melanómában csak nemrégiben került előtérbe – kezdetben csökkent, azonban 48–72 óránál visszatért a kontroll szintjére. Ez a változás BRAF-mutáns sejtvonalakban (WM35 és A2058) volt megfigyelhető, míg az N-RAS mutációt hordozó WM3000 sejtvonalban a Tom 20 fehérje szintje a kezelések hatására végig csökkent maradt a kezeletlen kontrollhoz képest. Feltételezhetően az LE-127/2 a Tom20–Bax–kaspáz-3 útvonalat indukálja, amely a citokróm-c felszabadulásához, majd a kaspáz-3 aktivációjához vezet. A kaspáz-3 aktivációja további kaspázok (6 és 7) aktiválását váltja ki, amelyek apoptózist idéznek elő melanóma sejtekben [154]. Ennek következtében a kaspáz-3/7 által hasított szubsztrát, a PARP fehérje is hasítódik. Az LE-127/2 kezelés szignifikánsan fokozta a hasított PARP expresszióját a vizsgált sejtekben, amely nagy valószínűséggel az autofágia által közvetített sejthalállal együtt végül a daganatsejtek pusztulásához vezet.

Egyéb, apoptózishoz kapcsolódó fehérjék változását is megvizsgáltuk az LE-127/2-vel történt kezeléseket követően. A vizsgált fehérjék közül – p53, Bcl-2, Bax és PDCD4 – csak a Bax mutatott szignifikáns expresszióbeli emelkedést 48 óránál az LE-127/2 kezelést követően a kezeletlen kontrollhoz képest. A p53 fehérje expressziója nem változott szignifikánsan

egyik sejtvonalban sem, ami arra utal, hogy az LE-127/2 által indukált apoptózisban a p53-függő út vonal nem játszik jelentős szerepet, feltehetően azért, mert a PI3K/Akt út vonal gátlása dominál a BRAF- vagy N-RAS-mutáns melanómákban.

A közelmúltban egy másik fontos fehérje, a PDCD4, amely tumorszuppresszor funkcióval rendelkezik, egyre gyakrabban kerül vizsgálatra. Kimutatták kapcsolatát a p53-mal, amelynek mRNS-éhez kötődve gátolja annak translációját, és így hozzájárulhat a tumorprogresszióhoz melanómában is [155]. Az LE-127/2 kezelés hatására a PDCD4 szintje 24 óránál csökkent, azonban 48–72 óránál ismét emelkedett, különösen a WM35 sejtekben. Ezért feltételezhető, hogy az LE-127/2 által kiváltott PDCD4-aktiváció gátolja a p53-függő apoptózist a melanóma sejtekben. Továbbá az emelkedett PDCD4-szint hozzájárulhat a PI3K/AKT apoptotikus jelátviteli út vonal blokkolásához, ami még inkább teret ad az LE-127/2 autofágiát indukáló hatásának [156].

Korábbi irodalmi adatok alapján a HO-1 aktivitása citoprotekciót vált ki, amely a daganatsejtek pusztulását, de azok proliferációját is előidézheti, a HO-1 szintjének emelkedésére adott válasz tehát változó lehet az egyes daganatsejtekben. Az is ismert, hogy bizonyos *C. sativa* származékok indukálják a HO-1 szintézisét, elősegítve az autofágiát és a sejthalált [157]. Saját eredményeinknek megfelelően az LE-127/2-vel történt kezelés nem befolyásolta a HO-1-et a vizsgált melanóma sejtvonalakban, következésképpen a vizsgált melanóma sejtek halálának valószínűleg nincs köze HO-1 indukációjához, vagyis nem ezen keresztül valósult meg.

Ismételten hangsúlyozandó az autofágia fontos szerepe a célzott terápiákkal szembeni rezisztencia leküzdésében melanómában. Például Verykiou és munkatársai kimutatták, hogy az autofágia tumorszuppresszor funkciót tölthet be, és kannabinoidok által indukálva citotoxicitást idézhet elő melanómában, ami potenciálisan képes lehet a BRAF/MEK gátlással szembeni rezisztencia leküzdésére [158].

Összességében, irodalmi adatok és saját eredményeink alapján feltételezhető, hogy a CBG és szintetikus származékai – köztük az LE-127/2 – autofágia-moduláló gyógyszerként működhetnek, hozzájárulva a gyógyszerrezisztencia leküzdéséhez melanómában [158]. Emellett a kannabisz egyéb származékaival együtt a CBG és származékai hozzájárulnak a tumoros őssejtek (CSC) önmegújító képességének gátlásához is, ezáltal szintén a rezisztencia leküzdéséhez, így feltételezhető, hogy az LE-127/2 hasonló hatással bírhat [159].

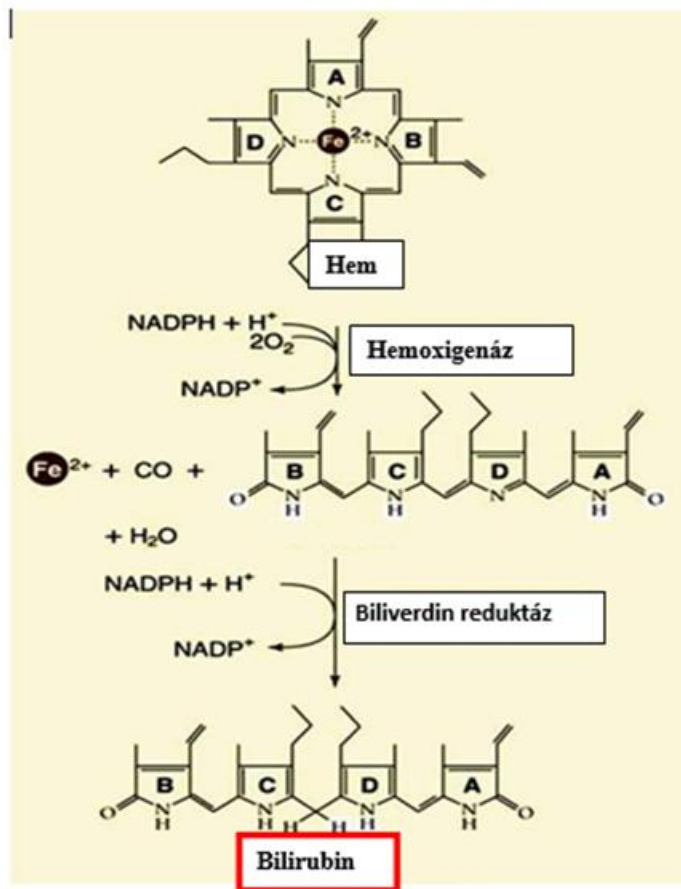
Az LE-127/2 pontos hatásmechanizmusa valószínűleg csak specifikus mikro környezetben tárható fel. A vegyület több receptort is aktiválhat egyszerre, ennek

tisztázásához agonistákkal és antagonistákkal végzett további vizsgálatok szükségesek, amelyeket a közeljövőben kívánunk elvégezni.

Összességében elmondható, hogy a melanóma sejteken elvégzett kísérleteink alapján az új vegyület, az LE-127/2, 20 μM koncentrációban hatékonyan csökkentette mindhárom vizsgált melanóma sejtvonal proliferációját. Az LE-127/2 alacsony citotoxicitása HaCaT és más nem malignus sejteken arra utal, hogy olyan potenciális gyógyszerjelölt molekula lehet, amely kevesebb mellékhatással és toxicitással rendelkezik, mint a kiindulási CBG, vagy a klasszikusan alkalmazott vemurafenib. Tehát az LE-127/2 alkalmazása új megközelítést kínálhat a melanóma sejtek gyógyszerrezisztenciájának leküzdésére, ugyanakkor további in vitro és in vivo vizsgálatok szükségesek a vegyület tulajdonságainak és hatásmechanizmusának részletes feltárása érdekében.

Korábbi, a kardiovaszkuláris területhez kapcsolódó kutatási tevékenységem témája és eredményei visszavisznek a hemoxigenáz (HO) enzimekhez, elsősorban a HO-1-hez, amely egyben egy közös kapcsolódási pontja is lehet a két eltérő kutatási témának.

A bevezető részben már szó esett a HO-1 jelentőségéről az élő szervezetek fiziológiai és patofiziológiai folyamataiban betöltött kulcsszerepéről, így fontossága alapján az enzim működésének pontosabb ismerete a farmakoterápiában új irányvonalakat és megközelítéseket jelenthet olyan betegségek gyógyszeres kezeléseiben, ahol az apoptózis, a nekrozis és az autofágiás folyamatok szerepet játszanak. A gyógyszeres kezelések irányvonala a szívbetegségekben elsősorban a fiziológiás működéstől eltérő patológiás folyamatok során megváltozott sejtek/szövetek/szervek citoprotektív (túlélési) kezelésére irányul. Mind a HO-1 enzim mind pedig a hősokk fehérjék az oxidatív stressz és más stresszfolyamatok pl., gyulladási folyamatok, sztrók, szívinfarktus, kezelésében igen fontos szerepet játszik. A H9c2 sejtvonalon és patkány szívszövetből nyert izolátumon elvégzett kísérleteink során a HO-1 szerepének vizsgálatát, annak lehetséges hatásmechanizmusát tűztük ki célul. A kérdés az, hogy miért a hemoxigenáz-1? Azért, mert a HO-1 szerepet játszik a bilirubin anyagcserében (24. Ábra), miközben endogén szénmonoxid (CO) és vas (Fe^{2+}) válik szabaddá, amelyek egyaránt alapvető élettani és kórélettani szerepet játszanak az élő sejtekben, legyenek azok ép vagy károsodott sejtek és szövetek a szívben, erekben, vérben, központi idegrendszerben vagy a vesében [160-167].



24. Ábra. A hemoxygenáz szerepe a bilirubin metabolizmusában [168].

Az endothelin-1 (ET-1) számos patológiás állapot kialakulásáért felelős, így a szívműködés megváltozásában vagy a daganatok kialakulásában is szerepet játszik [169-171]. Eredményeink alapján a H9c2 sejtekben és a szívszövetből nyert sejtekben, az ET-1 okozta sejtkárosodás, hipertrófiához és sejthalálhoz vezető mechanizmus β -ösztradiol (β -E) alkalmazásával megelőzhető lehet, amelyben alapvető fontosságú szerepet játszik a HO-1 enzimrendszer. A hormonrendszer alapvető fontosságú szerepet tölt be a szervek működésében, így jelentős hatással rendelkeznek a kóros szívműködés kezelésében is, ezért választottuk tanulmányaink során a β -E kezelés hatásának vizsgálatát [172-174]. Kísérleteinkben a β -E előkezelés szignifikáns mértékben meggátolta a sejtfelszín növekedést az ET-1- gyel kezelt sejtcsoportokban, utalva ezzel a sejtek duzzadásának a meggátolására, valamint szignifikáns mértékben javította a sejtek túlélési arányát is. A β -ösztradiol által kiváltott védő hatás kapcsolatba hozható a kísérletek eredményeivel, amikor az enzim aktivitása (HO-1 szint) és a HO-1 fehérje expresszió, valamint a sejtek túlélése nagymértékben csökkent akkor, amikor az endothelin önmagá-

ban került alkalmazásra. Azokban a kísérletsorozatokban viszont, amikor β -ösztadiolt az ET-1-gyel alkalmaztuk együtt, akkor a HO-1 enzimszint nagymértékű csökkenése akadályozottá vált, azaz blokkolva lett. A kapott eredmények azt sugallják tehát, hogy azokban a patológiás folyamatokban, amikor valamely típusú gyógyszeres kezelés a HO-1 enzim aktivitását (szintjét) növeli és így a HO-1 protein expressziójának a csökkenését meggátolja, a HO-1 szintjének növelése alapvető fontosságú lehet a különféle megbetegedések gyógyszeres terápiájában, ebben az esetben elsősorban a kardiovaszkuláris betegségekről van szó.

Fontosnak tartjuk megemlíteni azt, hogy az etanol (E) önmagában abban az alkalmazott koncentrációban, amelyet a hatóanyagok oldószereként használtunk, semmiféle szignifikáns változást nem okozott a mért paraméterekben. Ugyancsak, hasonlóképpen az etanollal nyert eredményekhez, az önmagában alkalmazott β -E sem hozott létre szignifikáns változásokat a sejtek méretében, a sejtek túlélésében, a HO-1 szintek változásában és a fehérje expressziójában, összehasonlítva a kezeletlen (hatóanyagmentes) csoport eredményével H9c2 sejtekben (21. Ábra).

A kapott H9c2 sejtkísérletek eredményeit alapul véve, egy további része a tervezett kísérletsorozatnak az volt, hogy a kezeléseket in vivo szíven elvégzett kísérletek céljára is alkalmazzuk patkányokban. Az ET-1, egy 21 aminosavból álló peptid, amely szerepet játszik számos fiziológiás és patológiás folyamatban a sejtek, szövetek és szervek működése szempontjából a termodinamikai egyensúly fenntartása végett, beleértve az erekre gyakorolt vazokonstriktor hatását [175, 176], amely előbb-utóbb sejt és szövetkárosodáshoz majd sejthalálhoz vezet. Továbbá, tanulmányok igazolják azt a tényt, hogy az ET-1 egy kritikus érszűkítő faktor [177], s alapvető szerepet játszik a pulmonális eredetű artériás magasvérnyomás létrejöttében [178], amely további szív működési zavarok [179, 180] kialakulását eredményezi.

Publikációk eredményei azt mutatják, hogy az ET-1 stimuláció hipertrófiát okoz H9c2 kardiomioblasztokban. A hipertrófia jelei pedig megmutatkoznak a növekvő sejt méretekben [181] és a sejtek életképességében [182], amelyek összefüggenek a HO-1 csökkent fehérje expressziójával [183]. Mindezek a hatások megjelennek az ET-1 0 és 10.000 nM dózistartományában.

Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy az ET-1 kezelés szignifikáns mértékben hozzájárulhat a hipertrófia kialakulásához és a szövetek elhalásához. Mindez, feltehetően azon mechanizmuson keresztül következik be, hogy az ET-1 okozta patológiás folyamatokat a β -E kezelés meggátolta, hozzájárulva így a HO-1 szint emelkedéséhez (23. Ábra). Természetesen, az ET-1 és β -E együttes alkalmazása más hatásmechanizmusokat is magában foglalhat, de az bizonyossá tehető, hogy ha gyógyszeres úton beavatkozunk egy

szignáltranszdukciós folyamatba, akkor számos más patológiás folyamat, pl., apoptotikus és autofágiás sejtelhalások, is előnyös irányba (javulhat) mozdulhat el az adott szövetekben. Kísérleteinkben a H9c2 sejteken és az in vivo körülmények között kapott eredmények alapján a tendencia a HO-1 mechanizmus jelentőségére vonatkozóan kimutatható volt.

Ámbár, az ET-1-indukálta patológiás molekuláris mechanizmusok nem magyarázzák közvetlenül a szívizomsejtek megnövekedését, más kutatók már igazolták azt a megállapítást, hogy a 'heat shock' fehérjék stimulálják az mTOR szintjét emlősökben, amely egy szerin/threonin protein kináz és egy központi szabályozója a sejtmetabolizmusnak, a növekedési faktoroknak, számos hormon-szabályozott mechanizmusnak, valamint a sejt/szövet túlélésnek a stressz faktorokkal szemben. Így tehát, az ET-1 növeli az mTOR aktivitást szívizomsejtekben, stimulálva a foszforilációs szignáltranszmissziót, amely felelős a hipertrófiás hatásokért [184]. Az mTOR-hoz kapcsolódó mechanizmusok hozzájárulnak a gyulladással járó folyamatok kialakulásához, az oxidatív stressz okozta következményekhez és az ezekhez kapcsolódó autofágiához, amelyek fontos szerepet töltenek be az öregedési folyamatokban és a sejtkárosodásokban [185-187]. E szignáltranszdukciós folyamat eredménye lesz a növekedett sejt méret és a fiziológiai funkciók megváltozása, amelyek végül eredményezik a gyulladási folyamatok kialakulását és a szöveti homeosztázis felborulását, amely autofágia okozta vagy más típusú sejtelhalásokhoz vezet [180, 188, 189].

Eredményeinkből megállapítható, hogy a kardiomioblaszt sejtekben és a vizsgált melanóma sejtvonalak apoptózisában eltérő szerepet tölthet be a HO-1 enzim. Vizsgálataink alapján arra a következtetésre juthatunk, hogy a HO-1 enzim alapvető fontosságú szerepet játszik számos sejt-és szövet, így a kardiomioblasztokban és a daganatsejtekben egyaránt. Ahogyan azt már mások is igazolták, a szívbetegségekben az emelkedett HO-1 szint védőhatású, tehát a HO-1 expresszióját növelő gyógyszeres terápiával a betegség kimenetelét pozitív irányba terelhetjük, ezzel szemben daganatokban a HO-1 indukciója abból a szempontból hátrányos, hogy a melanóma sejtek túlélését segítené elő a daganat javára, ami azt jelenti, hogy a beteg kezelése szempontjából nem járna pozitív előnnyel, ha emelnénk a HO-1 szintet. Eredményeink azt jelzik, hogy a kután melanóma sejtvonalakon alkalmazott új szintetikus LE-127/2-vel történt kezelés nem indukált jelentős mértékű HO-1 szintemelkedést, vagyis az alkalmazott szer a HO-1 enzim indukciójában nem játszik jelentős szerepet, így a HO-1 nem köthető ebben az esetben az apoptotikus és autofágiás sejtelhaláshoz, vagy feltehetőleg csak kis mértékben befolyásolja azt.

IX. 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 kaszpáz-3/7–PARP aktiválást érintve, a PI3K/AKT-útvonalon 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
- Kardiiovaszkuláris kutatásokból származó megállapítások:
 - ET-1 csökkenti a HO-1 aktivitást, melynek eredménye a sejtkárosodás, hipertrófia
 - β -ösztadiol előkezelés hozzájárul a HO-1 emelkedéséhez, védi a sejteket, mérsékli az ET-1 káros hatásait
 - β -E előkezelés szignifikáns mértékben megátolta a sejtfelszín növekedést az ET-1- gyel kezelt sejtcsoportokban
 - ET-1 által kiváltott hipertrófia mérséklődése β -ösztadiol hatására in vivo is igazolódott
 - ET-1 okozta sejtkárosodás, hipertrófiához és sejthalálhoz vezető mechanizmus β -ösztadiol (β -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

X. Összegzés

A civilizációs betegségek közé tartozó szív- és érrendszeri, valamint daganatos megbetegedések napjaink vezető halálokainak számítanak világszerte. A két nagy és legelterjedtebb betegségcsoport kialakulásában számos közös kapcsolódási mechanizmus van jelen, amelyek figyelembevétele mindenképpen hozzájárulhat a hatékonyabb terápiás lehetőségek feltáráshoz 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 hatású melanóma sejtvonalonokon. 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 feltárása.

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 β -ösztradiol (β -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 β -E együttes kezelése akadályozza a HO-1 csökkenését, ezáltal mérsékli a patológiás folyamatokat. In vivo kísérleteinkben a β -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.

XI. Summary

Cardiovascular and oncological diseases, classified among civilization-related disorders, represent the leading causes of mortality worldwide. The development of these two major and prevalent disease groups involves several overlapping molecular mechanisms, the recognition of which may facilitate the identification of more effective therapeutic strategies and thereby improve clinical outcomes.

In the management of cutaneous melanoma, surgical excision remains the primary approach; however, immunotherapies and targeted therapies have emerged as dominant treatment modalities. The BRAF V600E mutation, detected in more than half of melanoma patients, led to the introduction of vemurafenib, a selective BRAF inhibitor, as a first-line targeted therapy. Vemurafenib effectively suppresses the MAPK signaling pathway and prolongs survival; nevertheless, its clinical utility is limited by the rapid onset of resistance and severe toxic side effects. These limitations underscore the importance of exploring alternative agents, including naturally derived compounds such as phytocannabinoids and their synthetic analogues. Cannabigerol (CBG), although less well studied than other cannabinoids, has demonstrated antineoplastic properties; however, its poor aqueous solubility and limited bioavailability restrict therapeutic application. To overcome these barriers, we investigated the effects of a synthetic nitrogen-containing CBG derivative, LE-127/2, in human cutaneous melanoma cells. Owing to its improved solubility and bioavailability, LE-127/2 may represent a promising candidate for therapeutic development.

Unlike the mutation-specific action of vemurafenib, LE-127/2 exerted moderate but mutation-independent antiproliferative effects across melanoma cell lines, while displaying minimal toxicity toward non-malignant cells. Mechanistically, LE-127/2 induced autophagy, as evidenced by the upregulation of LC-3II, p62, and Atg12, followed by the activation of apoptotic pathways, including caspase-3/7 activation, PARP cleavage, and Bax upregulation. Notably, p53 expression remained unchanged, suggesting that the PI3K/AKT pathway may serve as a central mediator of LE-127/2 activity.

Clonogenic survival assays revealed that LE-127/2 significantly impaired colony formation, indicating potential efficacy against metastatic progression. Furthermore, LE-127/2 treatment did not alter HO-1 expression, implying that its mechanism of action is independent of this enzyme. Collectively, these findings identify LE-127/2 as a potential therapeutic candidate for overcoming drug resistance and for application in combination therapies,

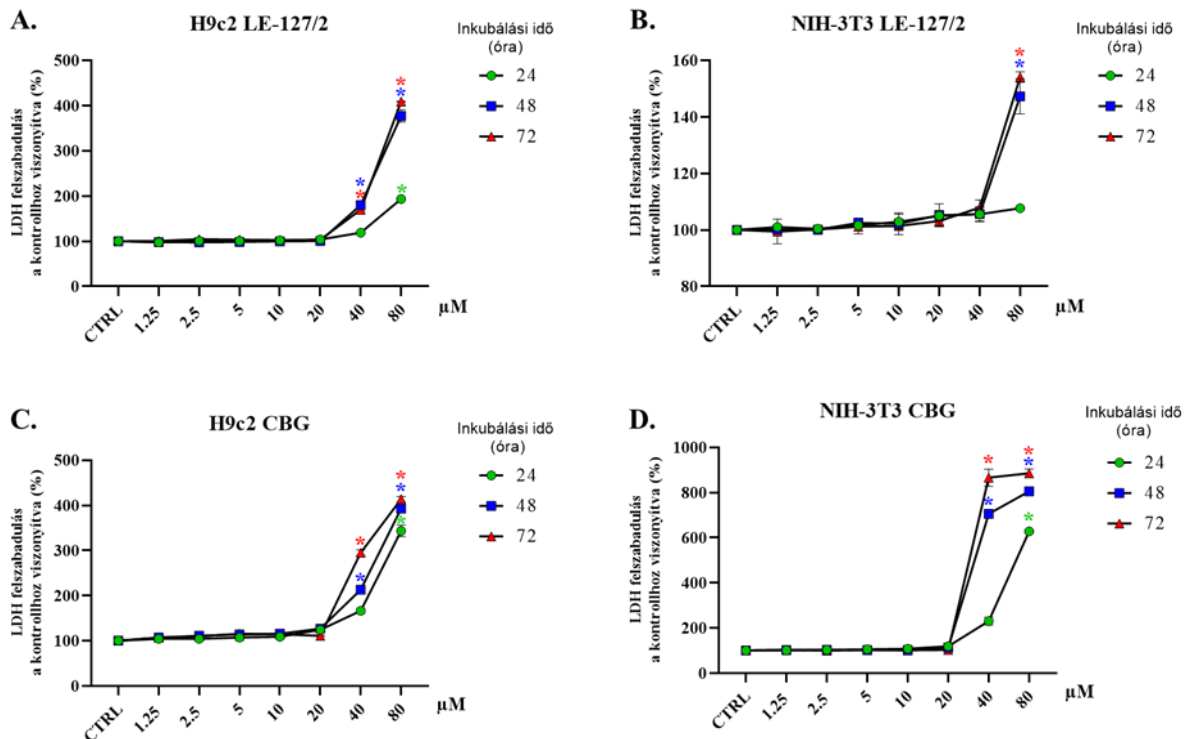
although further *in vitro* and *in vivo* investigations are required to fully elucidate its mechanism of action.

Our previous studies addressed the cytoprotective role of the heme oxygenase-1 (HO-1) enzyme. HO-1 possesses antioxidant, anti-inflammatory, and cytoprotective properties, which are of particular importance within the cardiovascular system. Endothelin-1 (ET-1), a 21-amino acid potent vasoconstrictor peptide, contributes to the development of hypertrophy, oxidative stress, and cell death. Experimental data demonstrated that ET-1 downregulates HO-1 activity and expression, thereby exacerbating cellular damage.

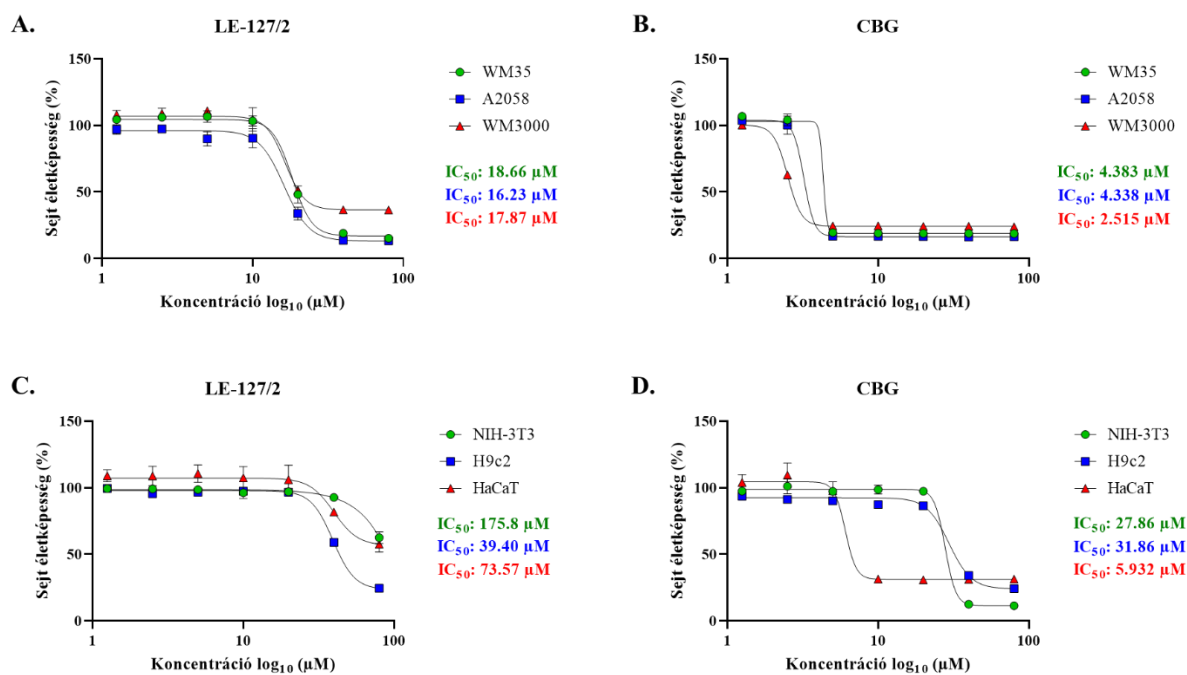
Pretreatment with β -estradiol (β -E) was shown to attenuate ET-1-induced cytotoxic effects, preventing cellular swelling, improving survival, and maintaining HO-1 levels. This hormone-mediated protective effect is, at least in part, attributable to the activation of HO-1-dependent defense mechanisms. Combined treatment with ET-1 and β -E prevented the decline of HO-1 expression, thereby alleviating pathological alterations. *In vivo*, β -E administration reduced ET-1-induced cardiac hypertrophy, an effect likely related to modulation of mTOR activity as well as regulation of oxidative stress and autophagy.

Cumulative evidence indicates that both autophagy and apoptosis play critical roles in the pathophysiology of cardiovascular diseases and cancer. HO-1 demonstrates a dual function: while its upregulation exerts protective effects in the cardiovascular system, in malignancies it may enhance tumor cell survival. A deeper understanding of these context-dependent mechanisms is essential for the rational design and selection of therapeutic strategies, ultimately determining the success of clinical interventions.

XII. Mellékletek



1. Melléklet. Az LE-127/2 (A, B) és a CBG (C, D) citotoxikus hatása az LDH felszabadulásra patkány H9c2 szívizomsejtekben és egér NIH-3T3 fibroblaszt sejtekben. 6×10^3 sejtet tenyésztettünk 96 lyukú plate-en, majd növekvő dózisu CBG-vel vagy LE-127/2-vel kezeltük őket (1,25 μ M-tól 80 μ M-ig, 24–72 órán keresztül). Oldószerként DMSO-t használtunk. Az LDH aktivitást 490 nm-en mértük a vegyületekkel kezelt sejtek médiumából vett mintákban. * $p < 0,05$ – az LE-127/2 vagy a CBG szignifikáns hatását jelzi. Az adatok az átlag ($n=3$) \pm szórás (S.D.) formájában kerültek ábrázolásra, a vegyületekkel kezelt sejtek kezeletlen sejtekhez viszonyított normalizált abszorbancia értékeként.



2. Melléklet. Az LE-127/2 és a CBG IC₅₀ értékei különböző melanóma (A, B) és nem rosszindulatú sejtvonalakon (C, D) végzett citotoxicitási vizsgálatokban. A sejteket 0–80 μM koncentráció tartományban kezeltük LE-127/2-vel vagy CBG-vel 72 órán keresztül. A sejtek életképességét a Cell Titer Blue teszttel (Promega) mértük, az értékeket pedig a kezeltlen sejtek 100%-ra normalizált életképességi értékeihez viszonyítva adtuk meg. A citotoxicitási görbék 3 különálló kísérlet alapján készültek, minden koncentrációhoz 3 ismétléssel. A relatív IC₅₀ értékeket nemlineáris regresszióval határoztuk meg a GraphPad Prism szoftver segítségével.

XIII. Tárgyszavak

kután melanóma	cutaneous melanoma
autofágiát érintő jelátviteli útvonalak	signaling pathways involved in autophagy
természetes hatóanyag	natural compound / natural product
kannabisz származék	cannabis derivative
kardiális hipertrófia	cardiac hypertrophy
hem-oxigenáz-1(HO-1)	heme oxygenase-1 (HO-1)
endotelin-1(ET-1)	endothelin-1 (ET-1)

XIV. A kutatást támogató pályázatok

Köszönettel tartozunk pályázati támogatóinknak a munka anyagi támogatásáért:

- GINOP-2.3.2-15-2016-00043 (H.G.), Szív és érkeletési kiválóságközpont (IRON-HEART)
- EFOP-3.6.1-16-2016-00022 (H.G.)
- NKFIH-1150-6/219 (H.G.) Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program, Debreceni Egyetem Biotechnológia tématerületi programja
- TKP2020-IKA-04 (H.G.), Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program, Debreceni Egyetem Biotechnológia tématerületi programja
- A Kulturális és Innovációs Minisztérium ÚNKP-23-4-I-DE-157 számú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a nemzeti kutatási, fejlesztési és innovációs alapból finanszírozott szakmai támogatása
- HUN-REN-DE Pharmamodul Kutatócsoport

A projektek az Európai Unió támogatásával, a Magyar Állam és az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósultak meg.

XV. 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 klinikavezetőknek azért, hogy a klinikai rutin feladatok ellátása mellett, lehetőséget nyújtottak számomra további kutatási eredmények megvalósításához, amelyek kiemelkedő mértékben hozzájárultak a jelenlegi Ph.D. tézisek elkészítéséhez. Végül, de nem utolsósorban köszönet jár szüleimnek azért a szeretetteljes családi támogatásért, biztatásért, amelyet mindvégig nyújtottak.

XVI. Irodalom

1. Murray, C.J., et al., *The state of US health, 1990-2010: burden of diseases, injuries, and risk factors*. *Jama*, 2013. **310**(6): p. 591-608.
2. National Research, C. and M. Institute of, *The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health*, in *U.S. Health in International Perspective: Shorter Lives, Poorer Health*, S.H. Woolf and L. Aron, Editors. 2013, National Academies Press (US) Copyright © 2013, National Academy of Sciences.: Washington (DC).
3. Sacks, D., et al., *Multisociety Consensus Quality Improvement Revised Consensus Statement for Endovascular Therapy of Acute Ischemic Stroke*. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2018. **39**(6): p. E61-e76.
4. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. *CA Cancer J Clin*, 2024. **74**(3): p. 229-263.
5. Amaravadi, R., A.C. Kimmelman, and E. White, *Recent insights into the function of autophagy in cancer*. *Genes Dev*, 2016. **30**(17): p. 1913-30.
6. Shirakabe, A., et al., *Aging and Autophagy in the Heart*. *Circ Res*, 2016. **118**(10): p. 1563-76.
7. Levy, J.M.M., C.G. Towers, and A. Thorburn, *Targeting autophagy in cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2017. **17**(9): p. 528-542.
8. Woolf, S.H. and L.Y. Aron, *The US health disadvantage relative to other high-income countries: findings from a National Research Council/Institute of Medicine report*. *Jama*, 2013. **309**(8): p. 771-2.
9. Lyon, A.R., et al., *2022 ESC Guidelines on cardio-oncology developed in collaboration with the European Hematology Association (EHA), the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ESTRO) and the International Cardio-Oncology Society (IC-OS)*. *Eur Heart J*, 2022. **43**(41): p. 4229-4361.
10. Zamorano, J.L., et al., *2016 ESC Position Paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines: The Task Force for cancer treatments and cardiovascular toxicity of the European Society of Cardiology (ESC)*. *Eur Heart J*, 2016. **37**(36): p. 2768-2801.
11. Patel, J.K., et al., *Metastatic pattern of malignant melanoma. A study of 216 autopsy cases*. *Am J Surg*, 1978. **135**(6): p. 807-10.
12. Siegel, R.L., et al., *Cancer statistics, 2023*. *CA Cancer J Clin*, 2023. **73**(1): p. 17-48.
13. Knight, A., L. Karapetyan, and J.M. Kirkwood, *Immunotherapy in Melanoma: Recent Advances and Future Directions*. *Cancers (Basel)*, 2023. **15**(4).
14. Zhang, S., et al., *Targeted therapeutic strategies for melanoma*. *Chin Med J (Engl)*, 2023. **136**(24): p. 2923-2930.
15. Motofei, I.G., *Malignant Melanoma: Autoimmunity and Supracellular Messaging as New Therapeutic Approaches*. *Curr Treat Options Oncol*, 2019. **20**(6): p. 45.
16. An, S., et al., *Natural Products for Melanoma Therapy: From Traditional Medicine to Modern Drug Discovery*. *Plants (Basel)*, 2025. **14**(6).
17. Schanknecht, E., et al., *Phytochemical Constituents and Derivatives of Cannabis sativa; Bridging the Gap in Melanoma Treatment*. *Int J Mol Sci*, 2023. **24**(1).

18. Ligresti, A., et al., *Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. **318**(3): p. 1375-87.
19. Nichols, M., et al., *Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update*. Eur Heart J, 2013. **34**(39): p. 3028-34.
20. Kadriya, A., S. Forbes-Robertson, and M. Falah, *The Anticancer Activity of Cannabinol (CBN) and Cannabigerol (CBG) on Acute Myeloid Leukemia Cells*. Molecules, 2024. **29**(24).
21. Sooda, K., S.J. Allison, and F.A. Javid, *Investigation of the cytotoxicity induced by cannabinoids on human ovarian carcinoma cells*. Pharmacol Res Perspect, 2023. **11**(6): p. e01152.
22. Lőrincz, E.B., et al., *Mannich-type modifications of (-)-cannabidiol and (-)-cannabigerol leading to new, bioactive derivatives*. Sci Rep, 2023. **13**(1): p. 19618.
23. Tamareille, S., et al., *Endothelin-1 release during the early phase of reperfusion is a mediator of myocardial reperfusion injury*. Cardiology, 2013. **125**(4): p. 242-9.
24. Banecki, K. and K.A. Dora, *Endothelin-1 in Health and Disease*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(14).
25. Garbe, C. and U. Leiter, *Melanoma epidemiology and trends*. Clin Dermatol, 2009. **27**(1): p. 3-9.
26. Parrag, P., et al., *[Hungarian situation of melanoma incidence and mortality in the first two decades of 21st century]*. Magy Onkol, 2022. **66**(2): p. 94-99.
27. Gloster, H.M., Jr. and K. Neal, *Skin cancer in skin of color*. J Am Acad Dermatol, 2006. **55**(5): p. 741-60; quiz 761-4.
28. Whiteman, D.C., A.C. Green, and C.M. Olsen, *The Growing Burden of Invasive Melanoma: Projections of Incidence Rates and Numbers of New Cases in Six Susceptible Populations through 2031*. J Invest Dermatol, 2016. **136**(6): p. 1161-1171.
29. Greenwald, H.S., E.B. Friedman, and I. Osman, *Superficial spreading and nodular melanoma are distinct biological entities: a challenge to the linear progression model*. Melanoma Res, 2012. **22**(1): p. 1-8.
30. Obieta, M.P., et al., *Dermoscopy of superficial spreading melanoma*. G Ital Dermatol Venereol, 2009. **144**(1): p. 51-60.
31. Longo, C. and G. Pellacani, *Melanomas*. Dermatol Clin, 2016. **34**(4): p. 411-419.
32. Gronbeck, C. and P.E. Kerr, *Nodular melanoma*. Clin Dermatol, 2025. **43**(1): p. 64-70.
33. Karponis, D., et al., *Lentigo maligna: a review*. Clin Exp Dermatol, 2024. **49**(3): p. 218-225.
34. Moreno, A., et al., *Histologic Features Associated With an Invasive Component in Lentigo Maligna Lesions*. JAMA Dermatol, 2019. **155**(7): p. 782-788.
35. Fernandez-Flores, A. and D.S. Cassarino, *Histopathological diagnosis of acral lentiginous melanoma in early stages*. Ann Diagn Pathol, 2017. **26**: p. 64-69.
36. Busam, K.J., *Desmoplastic melanoma*. Clin Dermatol, 2025. **43**(3): p. 341-347.
37. Xavier-Junior, J.C.C., et al., *The 'AEIOU' system to identify primary oral melanoma*. Oral Oncol, 2022. **124**: p. 105670.
38. Jojoa Acosta, M.F., et al., *Melanoma diagnosis using deep learning techniques on dermoscopic images*. BMC Med Imaging, 2021. **21**(1): p. 6.
39. Stratigos, A.J., et al., *Detection of malignant melanoma and other skin cancers during the Euromelanoma Screening Day, 2003*. Melanoma Research, 2004. **14**: p. A16.
40. Patel, J.K., et al., *Newer technologies/techniques and tools in the diagnosis of melanoma*. Eur J Dermatol, 2008. **18**(6): p. 617-31.

41. Keung, E.Z. and J.E. Gershenwald, *The eighth edition American Joint Committee on Cancer (AJCC) melanoma staging system: implications for melanoma treatment and care*. Expert Rev Anticancer Ther, 2018. **18**(8): p. 775-784.
42. Blum, A., et al., *Digital image analysis for diagnosis of cutaneous melanoma. Development of a highly effective computer algorithm based on analysis of 837 melanocytic lesions*. Br J Dermatol, 2004. **151**(5): p. 1029-38.
43. Slominski, A., et al., *Malignant melanoma*. Arch Pathol Lab Med, 2001. **125**(10): p. 1295-306.
44. Lefferts, J.A., et al., *CD10 and p63 expression in a sarcomatoid undifferentiated melanoma: A cautionary (and molecularly annotated) tale*. J Cutan Pathol, 2020. **47**(6): p. 541-547.
45. Shain, A.H. and B.C. Bastian, *From melanocytes to melanomas*. Nat Rev Cancer, 2016. **16**(6): p. 345-58.
46. *Genomic Classification of Cutaneous Melanoma*. Cell, 2015. **161**(7): p. 1681-96.
47. Wahdan-Alaswad, R.S., et al., *Retraction: Insulin-Like Growth Factor I Suppresses Bone Morphogenetic Protein Signaling in Prostate Cancer Cells by Activating mTOR Signaling*. Cancer Res, 2020. **80**(9): p. 1902.
48. Catalanotti, F., et al., *PTEN Loss-of-Function Alterations Are Associated With Intrinsic Resistance to BRAF Inhibitors in Metastatic Melanoma*. JCO Precis Oncol, 2017. **1**.
49. Dankort, D., et al., *Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma*. Nat Genet, 2009. **41**(5): p. 544-52.
50. Miller, E.M., et al., *Histopathologic and molecular characterization of BAP-1-inactivated melanoma*. J Cutan Pathol, 2023. **50**(4): p. 349-357.
51. Jitian Mihulecea, C.R., et al., *The Many Roles of Dermoscopy in Melanoma Detection*. Life (Basel), 2023. **13**(2).
52. Freedberg, D.E., et al., *Frequent p16-independent inactivation of p14ARF in human melanoma*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(11): p. 784-95.
53. Liguoro, D., et al., *The MITF/mir-579-3p regulatory axis dictates BRAF-mutated melanoma cell fate in response to MAPK inhibitors*. Cell Death Dis, 2024. **15**(3): p. 208.
54. Dilshat, R., et al., *MITF reprograms the extracellular matrix and focal adhesion in melanoma*. Elife, 2021. **10**.
55. Sánchez-Del-Campo, L., et al., *MITF induces escape from innate immunity in melanoma*. J Exp Clin Cancer Res, 2021. **40**(1): p. 117.
56. Leonardi, G.C., et al., *Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review)*. Int J Oncol, 2018. **52**(4): p. 1071-1080.
57. Mooradian, M.J. and R.J. Sullivan, *Immunotherapy in Melanoma: Recent Advancements and Future Directions*. Cancers (Basel), 2023. **15**(16).
58. Wang, X., et al., *Advances in Immunotherapy and Targeted Therapy of Malignant Melanoma*. Biomedicines, 2025. **13**(1).
59. Habib, S., et al., *Tumor associated macrophages as key contributors and targets in current and future therapies for melanoma*. Expert Review of Clinical Immunology, 2024. **20**(8): p. 895-911.
60. Chapman, P.B., et al., *Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation*. N Engl J Med, 2011. **364**(26): p. 2507-16.
61. Larkin, J., et al., *Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma*. N Engl J Med, 2014. **371**(20): p. 1867-76.
62. Long, G.V., et al., *Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III BRAF-Mutated Melanoma*. N Engl J Med, 2017. **377**(19): p. 1813-1823.

63. Long, G.V., et al., *Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial*. *Lancet*, 2015. **386**(9992): p. 444-51.
64. Long, G.V., et al., *Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma*. *N Engl J Med*, 2014. **371**(20): p. 1877-88.
65. Dréno, B., et al., *Incidence, course, and management of toxicities associated with cobimetinib in combination with vemurafenib in the coBRIM study*. *Ann Oncol*, 2017. **28**(5): p. 1137-1144.
66. Larkin, J., et al., *Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(1): p. 23-34.
67. Larkin, J., et al., *Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma*. *N Engl J Med*, 2019. **381**(16): p. 1535-1546.
68. Sharma, M., et al., *Bempegaldesleukin selectively depletes intratumoral Tregs and potentiates T cell-mediated cancer therapy*. *Nat Commun*, 2020. **11**(1): p. 661.
69. Dummer, R., et al., *Randomized Phase III Trial Evaluating Spartalizumab Plus Dabrafenib and Trametinib for BRAF V600-Mutant Unresectable or Metastatic Melanoma*. *J Clin Oncol*, 2022. **40**(13): p. 1428-1438.
70. Wolchok, J.D., et al., *Long-Term Outcomes With Nivolumab Plus Ipilimumab or Nivolumab Alone Versus Ipilimumab in Patients With Advanced Melanoma*. *J Clin Oncol*, 2022. **40**(2): p. 127-137.
71. Amaral, T., et al., *Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up*. *Ann Oncol*, 2025. **36**(1): p. 10-30.
72. Hendrickx, A., et al., *Radiotherapy for lentigo maligna and lentigo maligna melanoma - a systematic review*. *Radiat Oncol*, 2020. **15**(1): p. 174.
73. Hollander, S., et al., *Adjuvant Therapy for Melanoma*. *Surg Clin North Am*, 2025. **105**(3): p. 555-568.
74. Wong, M.K.K., et al., *Efficacy and safety of RPI combined with nivolumab in patients with anti-PD-1-failed melanoma from the IGRYTE clinical trial*. *Journal of Clinical Oncology*, 2024. **42**(16_suppl): p. 9517-9517.
75. Hu, L., et al., *FDA approval summary: Lifileucel for unresectable or metastatic melanoma previously treated with an anti-PD-1 based immunotherapy*. *Clin Cancer Res*, 2025.
76. Pal, H.C., et al., *Phytochemicals for the Management of Melanoma*. *Mini Rev Med Chem*, 2016. **16**(12): p. 953-79.
77. Zheng, Y., et al., *Prenylated Flavonoids from Roots of *Glycyrrhiza uralensis* Induce Differentiation of B16-F10 Melanoma Cells*. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(8).
78. Sudha, T., et al., *Antitumor/anti-angiogenesis efficacy of epigallocatechin gallate nanoformulated with antioxidant in melanoma*. *Nanomedicine (Lond)*, 2022. **17**(15): p. 1039-1053.
79. Li, H., et al., *Dysfunctional CD8 T Cells Form a Proliferative, Dynamically Regulated Compartment within Human Melanoma*. *Cell*, 2019. **176**(4): p. 775-789.e18.
80. Pourhanifeh, M.H., et al., *Resveratrol: A New Potential Therapeutic Agent for Melanoma?* *Curr Med Chem*, 2021. **28**(4): p. 687-711.
81. Palliyage, G.H., et al., *Novel Curcumin-Resveratrol Solid Nanoparticles Synergistically Inhibit Proliferation of Melanoma Cells*. *Pharm Res*, 2021. **38**(5): p. 851-871.
82. Kapetanovic, I.M., et al., *Pharmacokinetics, oral bioavailability, and metabolic profile of resveratrol and its dimethylether analog, pterostilbene, in rats*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2011. **68**(3): p. 593-601.

83. Ali, M.A., et al., *Pterostilbene as a Multifaceted Anticancer Agent: Molecular Mechanisms, Therapeutic Potential and Future Directions*. *Med Oncol*, 2025. **42**(7): p. 220.
84. Palliyage, G.H., et al., *Novel Curcumin-Resveratrol Solid Nanoparticles Synergistically Inhibit Proliferation of Melanoma Cells*. *Pharmaceutical research*, 2021. **38**(5): p. 851-871.
85. AlQathama, A. and J.M. Prieto, *Natural products with therapeutic potential in melanoma metastasis*. *Nat Prod Rep*, 2015. **32**(8): p. 1170-82.
86. Magro, C.M., A.N. Crowson, and M.C. Mihm, *Unusual variants of malignant melanoma*. *Mod Pathol*, 2006. **19 Suppl 2**: p. S41-70.
87. Mashabela, M.D. and A.P. Kappo, *Anti-Cancer and Anti-Proliferative Potential of Cannabidiol: A Cellular and Molecular Perspective*. *Int J Mol Sci*, 2024. **25**(11).
88. Ramer, R., et al., *Impact of Cannabinoid Compounds on Skin Cancer*. *Cancers (Basel)*, 2022. **14**(7).
89. Richtig, G., et al., *Cannabinoids Reduce Melanoma Cell Viability and Do Not Interfere with Commonly Used Targeted Therapy in Metastatic Melanoma In Vivo and In Vitro*. *Biology (Basel)*, 2023. **12**(5).
90. Wyrobnik, I., et al., *Decreased melanoma CSF-1 secretion by Cannabigerol treatment reprograms regulatory myeloid cells and reduces tumor progression*. *Oncoimmunology*, 2023. **12**(1): p. 2219164.
91. Lucas, C.J., P. Galettis, and J. Schneider, *The pharmacokinetics and the pharmacodynamics of cannabinoids*. *Br J Clin Pharmacol*, 2018. **84**(11): p. 2477-2482.
92. Mangal, N., et al., *Cannabinoids in the landscape of cancer*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2021. **147**(9): p. 2507-2534.
93. Bachari, A., et al., *Roles of Cannabinoids in Melanoma: Evidence from In Vivo Studies*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(17).
94. Häuser, W., et al., *Cannabis-based medicines and medical cannabis for adults with cancer pain*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2023. **6**(6): p. Cd014915.
95. Legare, C.A., W.M. Raup-Konsavage, and K.E. Vrana, *Therapeutic Potential of Cannabis, Cannabidiol, and Cannabinoid-Based Pharmaceuticals*. *Pharmacology*, 2022. **107**(3-4): p. 131-149.
96. Liu, C., et al., *Autophagy in skin barrier and immune-related skin diseases*. *J Dermatol*, 2021. **48**(12): p. 1827-1837.
97. Mizushima, N. and M. Komatsu, *Autophagy: renovation of cells and tissues*. *Cell*, 2011. **147**(4): p. 728-41.
98. Galluzzi, L., et al., *Molecular definitions of autophagy and related processes*. *Embo j*, 2017. **36**(13): p. 1811-1836.
99. Galluzzi, L., et al., *Molecular definitions of autophagy and related processes*. *The EMBO Journal*, 2017. **36**(13): p. 1811-1836-1836.
100. Mizushima, N., *Autophagy: process and function*. *Genes Dev*, 2007. **21**(22): p. 2861-73.
101. Meyer, G., et al., *The cellular autophagy markers Beclin-1 and LC3B-II are increased during reperfusion in fibrillated mouse hearts*. *Curr Pharm Des*, 2013. **19**(39): p. 6912-8.
102. Tósaki Ágnes, Szabó, Erzsébet ; Szabó, Imre Lőrinc ; Remenyik, Éva. Az autofágia jelentősége a bőrbetegségek patomechanizmusában. *BŐRGYÓGYÁSZATI ÉS VENEROLÓGIAI SZEMLE*, 2023. 99 : 4 pp. 314-321.
103. Mizushima, N., T. Yoshimori, and B. Levine, *Methods in mammalian autophagy research*. *Cell*, 2010. **140**(3): p. 313-26.

104. Bjørkøy, G., et al., *p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death*. J Cell Biol, 2005. **171**(4): p. 603-14.
105. Eskelinen, E.L., *Fine structure of the autophagosome*. Methods Mol Biol, 2008. **445**: p. 11-28.
106. Wei, Z., et al., *Daturataturin A, a withanolide in Datura metel L., induces HaCaT autophagy through the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway*. Phytother Res, 2021. **35**(3): p. 1546-1558.
107. Murase, D., et al., *Autophagy has a significant role in determining skin color by regulating melanosome degradation in keratinocytes*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(10): p. 2416-2424.
108. Nagar, R., *Autophagy: A brief overview in perspective of dermatology*. Indian J Dermatol Venereol Leprol, 2017. **83**(3): p. 290-297.
109. Bittencourt, T.L., et al., *Autophagy as a Target for Drug Development Of Skin Infection Caused by Mycobacteria*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 674241.
110. Verschooten, L., et al., *Autophagy inhibitor chloroquine enhanced the cell death inducing effect of the flavonoid luteolin in metastatic squamous cell carcinoma cells*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e48264.
111. Hartman, M.L., *Non-Apoptotic Cell Death Signaling Pathways in Melanoma*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(8).
112. Tenhunen, R., H.S. Marver, and R. Schmid, *The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1968. **61**(2): p. 748-55.
113. Ryter, S.W., J. Alam, and A.M. Choi, *Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications*. Physiol Rev, 2006. **86**(2): p. 583-650.
114. Kansanen, E., et al., *The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer*. Redox Biol, 2013. **1**(1): p. 45-9.
115. Paine, A., et al., *Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential*. Biochem Pharmacol, 2010. **80**(12): p. 1895-903.
116. Shan, H., et al., *Heme oxygenase-1 prevents heart against myocardial infarction by attenuating ischemic injury-induced cardiomyocytes senescence*. EBioMedicine, 2019. **39**: p. 59-68.
117. Wu, M.L., Y.C. Ho, and S.F. Yet, *A central role of heme oxygenase-1 in cardiovascular protection*. Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(7): p. 1835-46.
118. Wang, H., et al., *Cytoprotective Role of Heme Oxygenase-1 in Cancer Chemoresistance: Focus on Antioxidant, Antiapoptotic, and Pro-Autophagy Properties*. Antioxidants (Basel), 2023. **12**(6).
119. Chiang, S.K., S.E. Chen, and L.C. Chang, *The Role of HO-1 and Its Crosstalk with Oxidative Stress in Cancer Cell Survival*. Cells, 2021. **10**(9).
120. Ryter, S.W., *Heme Oxygenase-1: An Anti-Inflammatory Effector in Cardiovascular, Lung, and Related Metabolic Disorders*. Antioxidants (Basel), 2022. **11**(3).
121. Hou, C., et al., *Inhibition of Heme Oxygenase 1 Suppresses Growth, Migration, and Invasion, and Regulates Tumor-Infiltrating CD8+ T Cells and in Uveal Melanoma*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2024. **65**(10): p. 37.
122. Tracey, N., et al., *HO-1 drives autophagy as a mechanism of resistance against HER2-targeted therapies*. Breast Cancer Res Treat, 2020. **179**(3): p. 543-555.
123. Bigl, K., et al., *Comparison of results of the CellTiter Blue, the tetrazolium (3-[4,5-dimethylthioazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), and the lactate dehydrogenase assay applied in brain cells after exposure to advanced glycation endproducts*. Toxicol In Vitro, 2007. **21**(5): p. 962-71.

124. Schoenfeld, B.J., *The mechanisms of muscle hypertrophy and their application to resistance training*. J Strength Cond Res, 2010. **24**(10): p. 2857-72.
125. Pedram, A., et al., *Estrogen inhibits cardiomyocyte hypertrophy in vitro. Antagonism of calcineurin-related hypertrophy through induction of MCIP1*. J Biol Chem, 2005. **280**(28): p. 26339-48.
126. Wallenstein, S., C.L. Zucker, and J.L. Fleiss, *Some statistical methods useful in circulation research*. Circ Res, 1980. **47**(1): p. 1-9.
127. Shen, S., Y. Shao, and C. Li, *Different types of cell death and their shift in shaping disease*. Cell Death Discov, 2023. **9**(1): p. 284.
128. Koukourakis, M.I., et al., *Autophagosome Proteins LC3A, LC3B and LC3C Have Distinct Subcellular Distribution Kinetics and Expression in Cancer Cell Lines*. PLoS One, 2015. **10**(9): p. e0137675.
129. Tang, D.Y., R.A. Ellis, and P.E. Lovat, *Prognostic Impact of Autophagy Biomarkers for Cutaneous Melanoma*. Front Oncol, 2016. **6**: p. 236.
130. Lai, S.L., M.R. Mustafa, and P.F. Wong, *Panduratin A induces protective autophagy in melanoma via the AMPK and mTOR pathway*. Phytomedicine, 2018. **42**: p. 144-151.
131. Zhou, B., et al., *Tom20 senses iron-activated ROS signaling to promote melanoma cell pyroptosis*. Cell Res, 2018. **28**(12): p. 1171-1185.
132. Was, H., et al., *Effect of Heme Oxygenase-1 on Melanoma Development in Mice-Role of Tumor-Infiltrating Immune Cells*. Antioxidants (Basel), 2020. **9**(12).
133. Loureiro, J.B., et al., *Targeting p53 for Melanoma Treatment: Counteracting Tumour Proliferation, Dissemination and Therapeutic Resistance*. Cancers (Basel), 2021. **13**(7).
134. Tran, T.T., et al., *Clinical Significance of PDCD4 in Melanoma by Subcellular Expression and in Tumor-Associated Immune Cells*. Cancers (Basel), 2021. **13**(5).
135. van Zeijl, M.C.T., et al., *Survival outcomes of patients with advanced melanoma from 2013 to 2017: Results of a nationwide population-based registry*. Eur J Cancer, 2021. **144**: p. 242-251.
136. Soengas, M.S. and S.W. Lowe, *Apoptosis and melanoma chemoresistance*. Oncogene, 2003. **22**(20): p. 3138-51.
137. Flaherty, K.T., et al., *Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma*. N Engl J Med, 2012. **367**(2): p. 107-14.
138. Luke, J.J. and G.K. Schwartz, *Chemotherapy in the management of advanced cutaneous malignant melanoma*. Clin Dermatol, 2013. **31**(3): p. 290-7.
139. Austin, E., et al., *Laser and light-based therapy for cutaneous and soft-tissue metastases of malignant melanoma: a systematic review*. Arch Dermatol Res, 2017. **309**(4): p. 229-242.
140. Mattia, G., et al., *Cell death-based treatments of melanoma: conventional treatments and new therapeutic strategies*. Cell Death Dis, 2018. **9**(2): p. 112.
141. Wilson, M.A. and L.M. Schuchter, *Chemotherapy for Melanoma*. Cancer Treat Res, 2016. **167**: p. 209-29.
142. Mandel, V.D., et al., *Long-term vemurafenib therapy in advanced melanoma patients: cutaneous toxicity and prognostic implications*. J Dermatolog Treat, 2022. **33**(3): p. 1368-1375.
143. Tóvári, J., et al., *Evolving Acquired Vemurafenib Resistance in a BRAF V600E Mutant Melanoma PDTX Model to Reveal New Potential Targets*. Cells, 2023. **12**(14).
144. Gouravan, S., et al., *Preclinical Evaluation of Vemurafenib as Therapy for BRAF(V600E) Mutated Sarcomas*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(4).

145. Shahriari, M., et al., *Enzyme responsive drug delivery systems in cancer treatment*. J Control Release, 2019. **308**: p. 172-189.
146. Lah, T.T., et al., *Cannabigerol Is a Potential Therapeutic Agent in a Novel Combined Therapy for Glioblastoma*. Cells, 2021. **10**(2).
147. Lah, T.T., et al., *The Cytotoxic Effects of Cannabidiol and Cannabigerol on Glioblastoma Stem Cells May Mostly Involve GPR55 and TRPV1 Signalling*. Cancers (Basel), 2022. **14**(23).
148. Vacek, J., et al., *Antioxidant function of phytocannabinoids: Molecular basis of their stability and cytoprotective properties under UV-irradiation*. Free Radic Biol Med, 2021. **164**: p. 258-270.
149. Wang, X.F., et al., *Different receptor mechanisms underlying phytocannabinoid-versus synthetic cannabinoid-induced tetrad effects: Opposite roles of CB(1) /CB(2) versus GPR55 receptors*. Br J Pharmacol, 2020. **177**(8): p. 1865-1880.
150. Riera, R., et al., *Efficacy and safety of therapeutic use of cannabis derivatives and their synthetic analogs: Overview of systematic reviews*. Phytother Res, 2022. **36**(1): p. 5-21.
151. Lee, X.C., E. Werner, and M. Falasca, *Molecular Mechanism of Autophagy and Its Regulation by Cannabinoids in Cancer*. Cancers (Basel), 2021. **13**(6).
152. Viereckl, M.J., et al., *Cannabidiol and Cannabigerol Inhibit Cholangiocarcinoma Growth In Vitro via Divergent Cell Death Pathways*. Biomolecules, 2022. **12**(6).
153. Peeri, H. and H. Koltai, *Cannabis Biomolecule Effects on Cancer Cells and Cancer Stem Cells: Cytotoxic, Anti-Proliferative, and Anti-Migratory Activities*. Biomolecules, 2022. **12**(4).
154. Zhou, M., et al., *Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells*. Int J Cancer, 2018. **143**(4): p. 921-930.
155. Yang, W.H., et al., *Tumor Suppressor p53 Down-Regulates Programmed Cell Death Protein 4 (PDCD4) Expression*. Curr Oncol, 2023. **30**(2): p. 1614-1625.
156. Ferris, W.F., *The Role and Interactions of Programmed Cell Death 4 and its Regulation by microRNA in Transformed Cells of the Gastrointestinal Tract*. Front Oncol, 2022. **12**: p. 903374.
157. Cardile, A., et al., *Hyperforin Enhances Heme Oxygenase-1 Expression Triggering Lipid Peroxidation in BRAF-Mutated Melanoma Cells and Hampers the Expression of Pro-Metastatic Markers*. Antioxidants (Basel), 2023. **12**(7).
158. Verykiou, S., et al., *Harnessing autophagy to overcome mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor-induced resistance in metastatic melanoma*. Br J Dermatol, 2019. **180**(2): p. 346-356.
159. Al Hmada, Y., et al., *Mechanisms of Melanoma Progression and Treatment Resistance: Role of Cancer Stem-like Cells*. Cancers (Basel), 2024. **16**(2).
160. Csonka, C., et al., *Classic preconditioning decreases the harmful accumulation of nitric oxide during ischemia and reperfusion in rat hearts*. Circulation, 1999. **100**(22): p. 2260-6.
161. Balla, J., et al., *Heme, heme oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury*. Mol Nutr Food Res, 2005. **49**(11): p. 1030-43.
162. Juhasz, B., et al., *Resveratrol: a multifunctional cytoprotective molecule*. Curr Pharm Biotechnol, 2010. **11**(8): p. 810-8.
163. Czeglédi, A., et al., *Electrically-Induced Ventricular Fibrillation Alters Cardiovascular Function and Expression of Apoptotic and Autophagic Proteins in Rat Hearts*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(7).
164. Feng, X., et al., *Ferroptosis Enhanced Diabetic Renal Tubular Injury via HIF-1 α /HO-1 Pathway in db/db Mice*. Front Endocrinol (Lausanne), 2021. **12**: p. 626390.

165. Wang, N., et al., *Tricuspid regurgitation is associated with increased mortality independent of pulmonary pressures and right heart failure: a systematic review and meta-analysis*. Eur Heart J, 2019. **40**(5): p. 476-484.
166. Pethő, D., et al., *Ferryl Hemoglobin and Heme Induce A(1)-Microglobulin in Hemorrhaged Atherosclerotic Lesions with Inhibitory Function against Hemoglobin and Lipid Oxidation*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(13).
167. Peng, J., et al., *GPR30 alleviated subarachnoid hemorrhage-induced blood-brain barrier dysfunction by activating the PI3K/Akt and Nrf2/HO-1 pathways*. Am J Physiol Cell Physiol, 2024. **327**(1): p. C65-c73.
168. Mancuso, C., *The Heme Oxygenase/Biliverdin Reductase System and Its Genetic Variants in Physiology and Diseases*. Antioxidants (Basel), 2025. **14**(2).
169. Ryabov, V.V., et al., *The Role of Microvascular Obstruction and Intra-Myocardial Hemorrhage in Reperfusion Cardiac Injury. Analysis of Clinical Data*. Rev Cardiovasc Med, 2024. **25**(3): p. 105.
170. Mazaki, Y., et al., *Phosphorylation of annexin A2 at serine 25 is required for endothelin-1 stimulated cell proliferation and AKT activation in melanoma cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2025. **743**: p. 151168.
171. Si, F., et al., *Reviewing the path to balance: mechanisms and management of hypertension associated with targeting vascular endothelium in cancer therapy*. Hypertens Res, 2025. **48**(3): p. 1034-1047.
172. Vecsernyes, M., et al., *Alpha-Melanocyte-stimulating Hormone Induces Vasodilation and Exerts Cardioprotection Through the Heme-Oxygenase Pathway in Rat Hearts*. J Cardiovasc Pharmacol, 2017. **69**(5): p. 286-297.
173. Patten, R.D., et al., *17 Beta-estradiol differentially affects left ventricular and cardiomyocyte hypertrophy following myocardial infarction and pressure overload*. J Card Fail, 2008. **14**(3): p. 245-53.
174. Szczepanska-Sadowska, E., et al., *The Interaction of Vasopressin with Hormones of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis: The Significance for Therapeutic Strategies in Cardiovascular and Metabolic Diseases*. Int J Mol Sci, 2024. **25**(13).
175. Schiffrin, E.L., *Role of endothelin-1 in hypertension and vascular disease*. Am J Hypertens, 2001. **14**(6 Pt 2): p. 83s-89s.
176. Agapitov, A.V. and W.G. Haynes, *Role of endothelin in cardiovascular disease*. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2002. **3**(1): p. 1-15.
177. Niforou, A., et al., *On account of trans fatty acids and cardiovascular disease risk - There is still need to upgrade the knowledge and educate consumers*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2022. **32**(8): p. 1811-1818.
178. Kylhammar, D. and G. Rådegran, *The principal pathways involved in the in vivo modulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction, pulmonary arterial remodelling and pulmonary hypertension*. Acta Physiol (Oxf), 2017. **219**(4): p. 728-756.
179. Pan, Z., et al., *Targeting hypertension with a new adenosine triphosphate-sensitive potassium channel opener iptakalim*. J Cardiovasc Pharmacol, 2010. **56**(3): p. 215-28.
180. Luo, Y., Y. Zou, and Y. Gao, *Gene polymorphisms and high-altitude pulmonary edema susceptibility: a 2011 update*. Respiration, 2012. **84**(2): p. 155-62.
181. Porchia, F., et al., *Endothelin-1 up-regulates p115RhoGEF in embryonic rat cardiomyocytes during the hypertrophic response*. J Recept Signal Transduct Res, 2008. **28**(3): p. 265-83.
182. Xu, E.Z., et al., *Rescue treatment with a Rho-kinase inhibitor normalizes right ventricular function and reverses remodeling in juvenile rats with chronic pulmonary hypertension*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **299**(6): p. H1854-64.

183. Liou, S.F., et al., *KMUP-1 Attenuates Endothelin-1-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy through Activation of Heme Oxygenase-1 and Suppression of the Akt/GSK-3 β , Calcineurin/NFATc4 and RhoA/ROCK Pathways*. *Molecules*, 2015. **20**(6): p. 10435-49.
184. Wu, J.R., et al., *Activation of endothelial NO synthase by a xanthine derivative ameliorates hypoxia-induced apoptosis in endothelial progenitor cells*. *J Pharm Pharmacol*, 2016. **68**(6): p. 810-8.
185. Haines, D.D., B. Juhasz, and A. Tosaki, *Management of multicellular senescence and oxidative stress*. *J Cell Mol Med*, 2013. **17**(8): p. 936-57.
186. Pandey, S., et al., *High Glucose-Induced Cardiomyocyte Damage Involves Interplay between Endothelin ET-1/ET(A)/ET(B) Receptor and mTOR Pathway*. *Int J Mol Sci*, 2022. **23**(22).
187. Liu, Y., et al., *Deficiency of diacylglycerol Kinase ζ promotes Beclin1-mediated autophagy via the mTOR/TFEB signaling pathway: Relevance to maladaptive cardiac hypertrophy*. *Int J Med Sci*, 2024. **21**(3): p. 439-453.
188. Funayama, A., et al., *Cardiac nuclear high mobility group box 1 prevents the development of cardiac hypertrophy and heart failure*. *Cardiovasc Res*, 2013. **99**(4): p. 657-64.
189. Shi, J.Y., et al., *miR-29a promotes pathological cardiac hypertrophy by targeting the PTEN/AKT/mTOR signalling pathway and suppressing autophagy*. *Acta Physiol (Oxf)*, 2019. **227**(2): p. e13323.



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., Várvolgyi, 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 genodermatózisosok, 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 vírusinfekciószemelvények.
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 értekezés alapján szolgáló közleményekre): 6,758

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

Debrecen, 2025.10.06.



Függelék