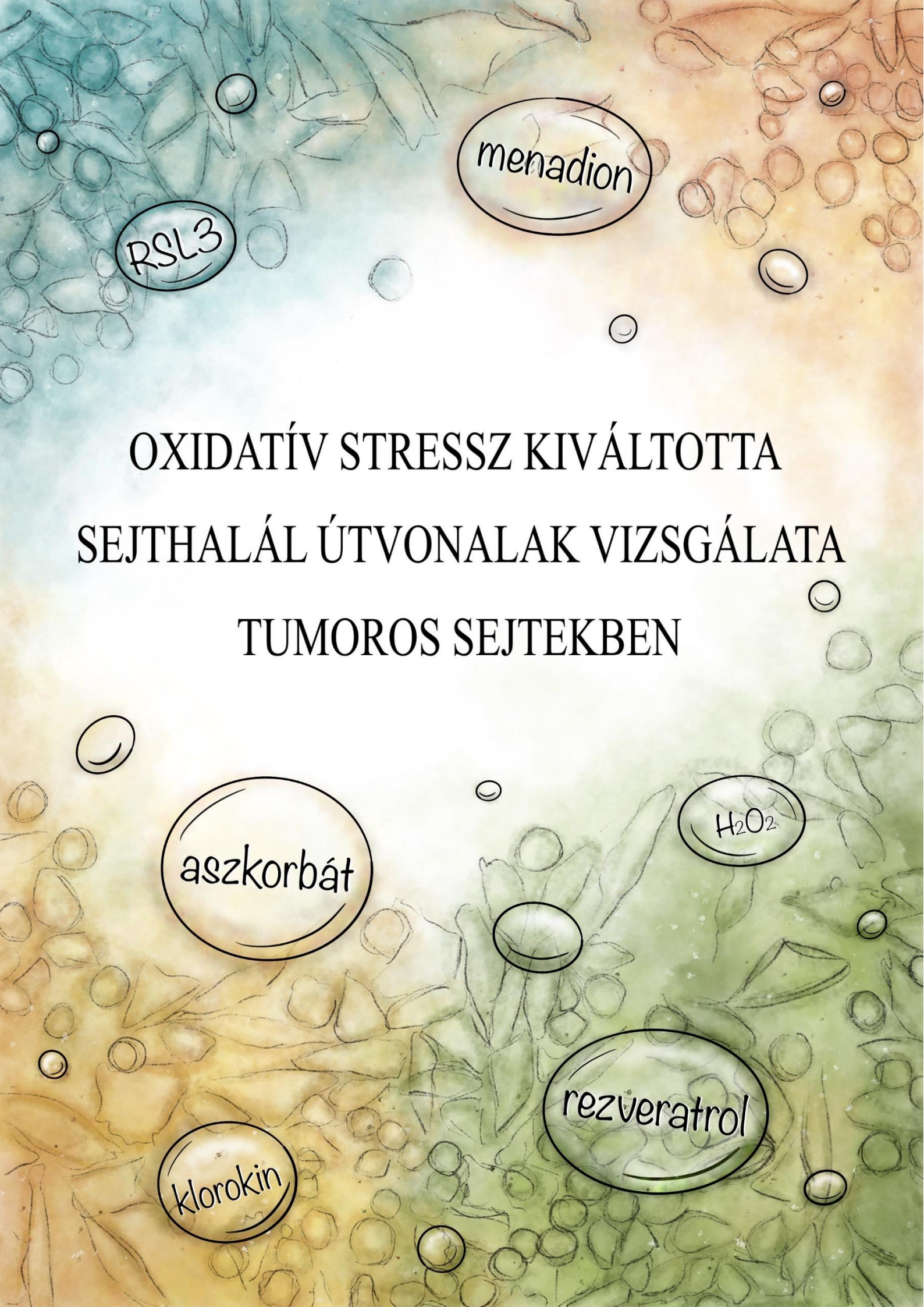




RSL3

menadion

OXIDATÍV STRESSZ KIVÁLTOTTA SEJTHALÁL ÚTVONALAK VIZSGÁLATA TUMOROS SEJTEKBEN

aszorbát

H_2O_2

klorokin

rezveratrol



M Ű E G Y E T E M 1 7 8 2

BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM
VEGYÉSZMÉRNÖKI ÉS BIOMÉRNÖKI KAR
ALKALMAZOTT BIOTECHNOLÓGIA ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI TANSZÉK

Oxidatív stressz kiváltotta sejthalál útvonalak vizsgálata tumoros sejtekben

TDK DOLGOZAT

Készítette:

Szentirmai Anna

biomérnök MSc hallgató

Témavezető:

Dr. Szarka András

egyetemi tanár

Konzulens:

Varga Dóra

PhD hallgató

2024.12.21.

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítésjegyzék	5
1. Bevezetés.....	8
2. Irodalmi áttekintés.....	9
2.1. Az oxidatív stressz.....	9
2.1.1. ROS	9
2.1.2. ROS keletkezése és szerepe	10
2.1.3. Antioxidáns védelmi rendszer	12
2.2. Az oxidatív stressz szerepe különböző betegségekben	13
2.2.1. Tumorigenezis/tumorsuppresszió	13
2.2.2. Diabetes mellitus	14
2.2.3. Vesebetegségek.....	16
2.2.4. Májkárosodás	16
2.3. Az oxidatív stressz kihasználása terápiában.....	17
2.3.1. Oxidatív stressz indukálása terápiás célból.....	17
2.3.2. Oxidatív stressz mérséklése terápiás célból	18
2.4. Sejthalál folyamatok jellemzése	19
2.4.1. Nekrózis	20
2.4.2. Programozott sejthalál folyamatok.....	20
2.5. Alkalmazott kezelőszerek jellemzői.....	25
2.5.1. Aszkorbát.....	25
2.5.2. Rezveratrol	27
2.5.3. Klorokin	28
2.5.4. Menadion.....	29
2.5.5. RSL3.....	31
2.6. Sejt vonalak jellemzői	32
2.6.1. MIA PaCa-2 sejtvonal	32

2.6.2. HT-1080 sejtvonala	32
3. Célkitűzés	33
4. Módszertan	34
4.1. Sejtfenntartás	34
4.2. Életképesség mérés MTT-assay alkalmazásával	34
4.3. Fehérjeizolálás és fehérjekoncentráció meghatározása	35
4.4. DNS károsodás vizsgálata Western Blot technikával	35
4.5. Sejtciklus meghatározás áramlásos citometriával	36
4.6. ROS és lipidperoxidáció szintjének meghatározása áramlásos citometriával	37
4.7. ATP és NAD ⁺ mennyiség meghatározása HPLC-UV/Vis technikával	38
4.8. Kaszpáz aktivitás meghatározása fluoreszcens szubsztráttal	39
4.9. Statisztika	39
5. Eredmények és értékelésük	40
5.1. A ROS lehetséges szerepének vizsgálata Ph-ASC, CQ, RES, menadion, RSL3 és H ₂ O ₂ kiváltotta citotoxicitásban	42
5.2. Ismert sejthalál folyamatok lehetséges szerepének vizsgálata Ph-ASC, CQ, RES, menadion, RSL3 kiváltotta citotoxicitásban MIA PaCa-2 és HT-1080 sejteken	45
5.3. A kaszpáz-3 lehetséges szerepének vizsgálata menadion kiváltotta citotoxicitásban	49
5.4. DNS károsodás szerepének vizsgálata CQ, menadion, H ₂ O ₂ , valamint RSL3 kiváltotta citotoxicitásban MIA PaCa-2 sejteken	50
5.5. Bioenergetikai változások lehetséges szerepének vizsgálata Ph-ASC, CQ, RES és menadion kiváltotta citotoxicitásban	53
5.6. Menadion, RSL3 és H ₂ O ₂ hatása a sejtciklusra	55
6. Összefoglalás	57
Köszönetnyilvánítás	60
Irodalomjegyzék	61

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

AGE	<i>advanced glycation end product</i>	késői glikációs végtermékek
AMC	<i>7-Amino-4-methylcoumarin</i>	7-amino-4-metil-kumarin
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>	AMP-aktivált protein kináz
Apaf1	<i>apoptotic protease activating factor 1</i>	apoptotikus proteáz aktiváló faktor 1
AP-1	<i>activator-protein-1</i>	aktivátor-protein-1
AR	<i>aldose-reductase</i>	aldóz-reduktáz
As₂O₃	<i>arsenic-trioxide</i>	arzén-trioxid
ATG	<i>autophagy-related</i>	autofágiához kapcsolódó
CAT	<i>catalase</i>	kataláz
Chk1	<i>checkpoint kin-1</i>	checkpoint kináz-1
CQ	<i>chloroquine</i>	klorokin
DAMP	<i>damage associated molecular patterns</i>	–
DISC	<i>death-inducing signaling complexes</i>	–
DM	<i>diabetes mellitus</i>	diabétesz mellitusz
Fas L	<i>Fas ligand</i>	Fas ligand
Fer-1	<i>ferrostatin-1</i>	ferrostatin-1
FIN	<i>ferroptosis inducing agent</i>	ferroptózis indukáló anyag
F6P	<i>fructose-6-phosphate</i>	fruktóz-6-foszfát
GA3PDG	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz
G6P	<i>glucose-6-phosphate</i>	glükóz-6-foszfát
GPX	<i>glutathione-peroxidase</i>	glutation-peroxidáz
GSH	<i>glutathione</i>	glutation

HIF-1-α	<i>hypoxia-inducible-factor-1</i>	hipoxia-indukálható-faktor-1
HSF1	<i>heat shock factor protein 1</i>	hőshock faktor 1
JNK	<i>c-Jun N terminal kinase</i>	c-Jun N terminális kináz
LC3	<i>microtubule-associated protein light chain 3</i>	—
Lipr-1	<i>liproxstatin-1</i>	liproxstatin-1
MLKL	<i>mixed lineage kinase domain-like protein</i>	—
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>	—
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) - -2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl) - -2,5-difeniltetrazolium bromid
NAC	<i>N-acetyl-cysteine</i>	N-acetil-cisztein
Nec-1	<i>necrostatin-1</i>	nekrosztatin-1
NF-κB	<i>nuclear factor kappa B</i>	nukleáris faktor κ B
NQO1	<i>NAP(P)H-quinone-dehidrogenase 1</i>	NAD(P)H-kinon-dehidrogenáz 1
NRF2	<i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>	—
PARP1	<i>poli-ADP-ribose polimerase 1</i>	poli-ADP-ribóz polimeráz 1
PCD	<i>programmed cell death</i>	programozott sejthalál
PDAC	<i>pancreatic ductal adenocarcinoma</i>	hasnyálmirigy duktális adenokarcinóma
Ph-ASC	<i>pharmacological ascorbate</i>	farmakológiai aszkorbát
PKC	<i>protein-kinase C</i>	protein-kináz C
PMSF	<i>phenyl-methyl-sulfonyl-fluoride</i>	fenil-metil-szulfonil-fluorid
RES	<i>resveratrol</i>	rezveratrol

RHIM	<i>RIP homotypic interaction motif</i>	RIP homotipikus interakciós motívum
RIPA	<i>Radio-Immunoprecipitation-Assay</i>	—
RIPK1	<i>receptor-interacting serine/threonine protein kinase 1</i>	receptor-interakciós szerin/treonin protein kináz 1
ROS	<i>reactive oxygen species</i>	reaktív oxigén származékok
SETD8	<i>set domain containing 8</i>	—
SOD	<i>superoxide-dismutase</i>	szuperoxid-diszmutáz
SSA	<i>sulfosalicylic acid</i>	szulfo-szalicilsav
TNF-α	<i>tumor necrosis factor-α</i>	tumor nekrosis faktor- α
TNFR1	<i>TNF receptor 1</i>	TNF receptor 1
TP53	<i>tumor protein p53</i>	tumor protein p53
TXN	<i>thioredoxin</i>	tioredoxin
ULK1	<i>unc-51-like-kinase</i>	—
UPR	<i>unfolded protein response</i>	—

1. BEVEZETÉS

A redox homeosztázis fenntartása elengedhetetlen a normál sejtfunkciók fenntartásához. Amennyiben ez az egyensúly felborul, és a reaktív oxigén származékok (ROS) termelődése meghaladja a sejtek antioxidáns kapacitását, a fellépő oxidatív stressz különböző működési zavarokhoz és végül sejthalálhoz vezethet. Ennek szerepét számos betegségben sikeresen bizonyították már, beleértve a diabéteszt, májkárosodást, neurodegeneratív rendellenességeket és a tumorigenezist.

A túlzott mennyiségben keletkezett ROS többféle módon is károsíthatja a sejtek makromolekuláit. A lipidekben található telítetlen zsírsavak támadása révén lipidperoxidációhoz, fehérjékben a peptidkötések felhasadásához és keresztkötések kialakulásához vezethet. Megtámadhatja a nukleinsavakat, így a DNS-t is, ezáltal elősegítve a bázisok és cukorrészek módosulását, súlyosabb esetben lánctörések kialakulását. Számos sejthalál típus (nekrózis, apoptózis, nekroptózis, ferroptózis, autofágia) aktiválódását hozták már összefüggésbe oxidatív stresszel, ezen útvonalak pontos mechanizmusa azonban még nem teljesen tisztázott. Ahhoz, hogy az egyes betegségek kezelésére megfelelő terápiás módszert lehessen kidolgozni, a különböző programozott sejthalál folyamatok szabályozásának, valamint az egyes rendellenességekben betöltött szerepének mélyreható ismerete elengedhetetlen. Mindezek miatt a potenciális terápiás célpontok megtalálása jelenleg is nagy kihívást jelent a kutatók számára. A kísérletileg kapott eredmények sokszor látszólag ellentmondásosak, emellett az adott kezelés hatásosságát a betegség típusa mellett számos egyéb tényező, például betegspecifikus jellemzők is jelentősen befolyásolhatják.

Az egyes sejthalál útvonalak vizsgálata rákos eredetű sejtvonalak alkalmazásával is megvalósítható. A farmakológiai aszkorbát, rezveratrol, klorokin, menadion és RSL3 tumorelles hatása mögött álló mechanizmusok megfejtésén számos kutatócsoport jelenleg is dolgozik. A külön-külön, illetve együttes alkalmazásuk során kiváltott citotoxikus hatásuk (molekuláris biológiai módszerekkel történő) pontosabb megismerése segítséget nyújthat az egészséges sejtek károsodásának mérséklésére, valamint a betegségek előrehaladásának lassítására alkalmas gyógyszerek kifejlesztésében.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Az oxidatív stressz

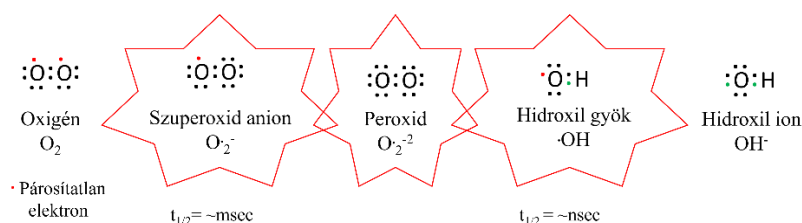
A redox-homeosztázis megfelelő szabályozása elengedhetetlen a normál sejtfunkciók fenntartásához és a sejtek túlélésének biztosításához (Gorrini et al., 2013). Amennyiben ez az egyensúly a *reaktív oxigén származékok* (ROS) termelődése és a sejt antioxidáns védelmi rendszere között felborul, oxidatív stresszről beszélünk (Saleh et al., 2023). Ha valamilyen okból kifolyólag a sejt ROS-termelése meghaladja annak antioxidáns kapacitását, az ezt követően fellépő oxidatív stressz sejtkárosodáshoz és különböző működési zavarokhoz vezethet. Számos betegségben bizonyították már szerepét, többek között daganatos elváltozásokban, neurodegeneratív rendellenességekben, illetve szív-és érrendszeri megbetegedésekben is (Saleh et al., 2023).

2.1.1. ROS

Magát a „reaktív oxigénszármazékok” kifejezést általában a molekuláris oxigénből származó, nagymértékben reaktív szabad gyökök és molekulák leírására használják. A molekuláris oxigén biradikális állapotából következően igen nagy reakciókészséggel rendelkezik, párosítatlan elektronja képes párosodni egy antiparallel spinű külső elektronnal, ami *szuperoxid gyök* (O_2^-) keletkezéséhez vezet. Ez gyengén bázikus tulajdonságából, valamint abból kifolyólag, hogy fiziológiás pH-n vízben jól oldódik a sejtmembránokon nem igazán képes áthaladni. *Szuperoxid-diszmutáz* (SOD) segítségével azonban membrán permeábilis H_2O_2 -dá, vagy protonálódva hidroperoxil gyökké ($HOO\cdot$) alakítható (**1. ábra**). Ezen túl a O_2^- képes vaskatalízis mellett reagálni a H_2O_2 -dal a Haber-Weiss-reakció szerint (**1. egyenlet**), melynek során nagyon reaktív és citotoxikus hidroxilgyökök keletkeznek.



Képződhetnek még további ROS-ok, nevezetesen *peroxil* ($ROO\cdot$) és *alkoxil* ($RO\cdot$) gyökök is például a telítetlen zsírsavak metabolizmusának köztitermékeként (Szarka et al., 2022).



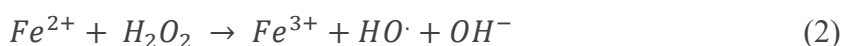
1. ábra: Reaktív oxigén származékok szerkezete.

2.1.2. ROS keletkezése és szerepe

Normál sejtekben az intracellulárisan képződő ROS-ok számos élettani funkció szabályozásáért felelősek, beleértve a gyulladásos folyamatokat, immunválaszt, melyek a kórokozók és rákkeltő anyagok eliminációjában fontosak (Dröge, 2002). Mindezek mellett a szív-és érrendszer megfelelő működésében (Wolin, 2009) és a pajzsmirigy hormonok bioszintézisének elősegítésében is szerepet játszhatnak (He et al., 2006). Ismert, hogy ezek a reaktív oxigénszármazékok számos kulcsfontosságú jelátviteli faktor kifejeződését és aktivitását szabályozzák, melyek részt vesznek a sejtek proliferációjában, apoptózisában és differenciálódásában. Valójában a szerepük kettős: elősegíthetik a sejtek túlélését és/vagy a sejthalált is (Sajadimajd & Khazaei, 2017).

Reaktív oxigéngyökök a sejtek számos kompartmentjében képződhetnek (2. ábra). Ezek közül a **mitokondriumokat** tekintjük a ROS-ok elsődleges forrásainak, tekintve, hogy fiziológias körülmények között a sejtben képződött reaktív oxigénszármazékok mintegy 90 %-a itt termelődik. Ez a magas arány az oxidatív foszforilációban való részvételüknek köszönhető, amely során a molekuláris oxigén vízzé redukálódik. Az itt található elektrontranszportlánc azonban előfordul, hogy elektronokat szivárogtat, ami az oxigén szuperoxid gyökké történő részleges redukcióját eredményezi (Szarka et al., 2022). Egyes beszámolók szerint a mitokondriumok által felhasznált oxigén 0,2-2,0%-a redukálódik ilyen módon O_2^- gyökké (Zhao et al., 2019). Összességében a képződő gyökök 70-80%-a III-as komplex Q-ciklusában keletkezik, de emellett az I-es komplexet is a mitokondriális ROS egyik fő forrásának tekintik (Szarka et al., 2022).

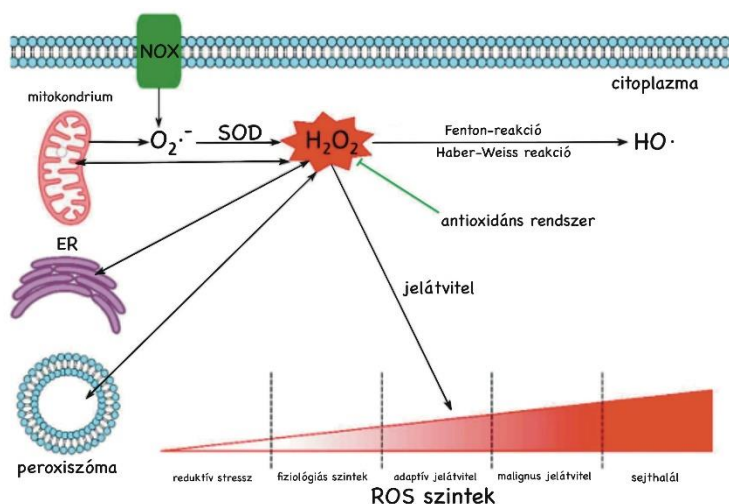
Egy másik sejtorganelum, ami fontos intracelluláris ROS termelő, a **peroxiszóma** (Klaunig, 2019). Ezt tekintjük a H_2O_2 egyik elsődleges forrásának, amely a nagyszámú peroxiszómális oxidáz (acil-CoA-oxidázok, xantin-oxidáz, D-aminosav-oxidáz) tevékenységének melléktermékeként keletkezik (Lismont et al., 2019). Átmeneti fémionok jelenlétében a H_2O_2 a Fenton-reakción (2. egyenlet) keresztül gyorsan átalakulhat a nagyon reaktív, citotoxikus hidroxil gyökké (Szarka et al., 2022).



Az **endoplazmás retikulum** (ER) szerepe számos sejtfunkcióban elengedhetetlen, fontos helyszíne többek között a fehérjeszintézisnek, fehérjék feltekeredésének, poszttranszlációs módosulásoknak, részt vesz a szekréciós útvonal szabályozásában és a kalcium tárolásban. A redox homeosztázis, vagy a feltekerésért felelős apparátus zavara a nem vagy rosszul

feltekeredett fehérjék felhalmozódásához vezethet, mely aktiválja az *unfolded protein response* (UPR) túlélési mechanizmust. Ennek célja, hogy segítse a sejteket a homeosztázis helyreállításában (például lecsökkenti a fehérjeszintézist, és fokozza a chaperonok és más feltekeredést ellenőrző mechanizmusok működését), azonban ROS termelést is indukál, ami tovább súlyosbítja az ER-stresszt, így még több reaktív szabadgyök képződéséhez vezethet. Ha az egyensúly nem áll helyre, az UPR elhúzódik, és apoptózist vált ki (Szarka et al., 2022).

A **gyulladásos reakciókban részt vevő immunsejtek**, beleértve a neutrofileket és a makrofágokat, szintén hozzájárulnak a szöveti ROS-képződéshez. Ezek a fagocita sejtek ugyanis NADPH-oxidázuk révén ROS-t termelnek aktiválódásuk esetén. A keletkezett szuperoxidot a SOD hidrogén-peroxiddá alakítja, mely a baktériumokkal szembeni szöveti védekező mechanizmus egyik fontos résztvevője (Klaunig, 2019). A neutrofilek a bennük található myeloperoxidáz segítségével képesek a H_2O_2 -ból további oxidánsok (hipoklórsav, hipotiocíánsav, hipobromsav) előállítására, melyek a bekebelezett mikróbák biomolekuláinak oxidálásával tudnak pusztítani (Szarka et al., 2022).



2. ábra: A ROS képződési helyei és tovább alakulási lehetőségei (Szarka et al., 2022).

A képződött szabadgyökök fehérjékkel való kölcsönhatása hátterében alapvetően egy olyan mechanizmus áll, melynek lényege az aktív helyen vagy annak közelében található cisztein- és/vagy tirozin oldalláncok oxidációja, ami fehérjén belüli és fehérjék közötti hidakat hoz létre, így befolyásolva az adott makromolekula működését. Ezek a módosítások reverzibilisek és a sejtválaszok széles skáláját képesek létrehozni. Míg a foszfatázokat általában gátolják ezek a reaktív származékok, addig a kinázokat gátolhatják vagy aktiválhatják is. Hasonlóképp képes a ROS a kalciumcsatornák működését is befolyásolni: segíti a kalcium sejtraktárokból való

felszabadulását kinázok, például a *protein-kináz C* (PKC) aktiválása által, ezáltal fontos szerepet játszik a sejtek osztódásában (Perillo et al., 2020).

2.1.3. Antioxidáns védelmi rendszer

Tekintve, hogy különböző ROS-szintek eltérő biológiai válaszokat indíthatnak, intracelluláris mennyiségük modulációja kulcsfontosságú a sejtek homeosztázisának fenntartásához (Gorrini et al., 2013). Az antioxidánsok olyan molekulák, melyek semlegesíteni tudják ezeket a reaktív származékokat, megvédve ezáltal a sejteket az oxidatív károsodástól. Hatásuk azon alapszik, hogy képesek elektronokat átadni, így stabilizálni a szabadon keringő gyököket, hogy megakadályozzák őket a különböző sejtkomponensek károsításában (Saleh et al., 2023).

Ezeket a védelmi szerepet betöltő molekulákat alapvetően két csoportba – enzimatis és nem-enzimatis antioxidánsok – szokták sorolni. Előbbiek közé például a SOD, *kataláz* (CAT), *glutathion-peroxidáz* (GPX), *thioredoxin* (TXN) rendszer tartozik, míg utóbbiak közül a *glutathion* (GSH), az aszkorbinsav, α -tokoferol, a szelén és egyes metabolitok (bilirubin, melatonin) a legjelentősebbek (An et al., 2024a).

A reaktív oxigénszármazékok antioxidáns kapacitáshoz viszonyított aránytalan növekedésekor létrejövő oxidatív stresszt a sejt különbözőféleképpen képes ellensúlyozni. Ebben a GSH és TXN játszik központi szerepet, azonban ezt a képességüket a NADPH segíti, mely mindkettőt redukált állapotban tartja.

Az akut oxidatív stresszel ellentétben, mely nagyrészt megoldható metabolikus átprogramozással, a **krónikus stresszhez** való alkalmazkodás genetikai útvonalak beindulásával jár. Megállapították, hogy számos transzkripció faktor, köztük az *aktivátor protein-1* (AP-1), a *hipoxia-indukálható-faktor-1 α* (HIF-1- α), a *hő sokk faktor 1* (HSF1), a *nukleáris faktor kB* (NF-kB), a *nukleáris faktor-erythroid 2 faktor 2* (NRF2) és a *tumor protein p53* (TP53) is aktiválódik ROS hatására. Az, hogy ezen antioxidáns transzkripció faktorok fenti hálózatának egyes tagjai milyen mértékben indukálódnak stressz hatására, bizonytalan, bár valószínűtlen, hogy mindegyikük egyszerre tenné. Feltehetően a különböző transzkripció faktorok inkább a ROS eltérő küszöbszintjeire reagálnak, koncentráció- és/vagy időfüggő módon, mely valószínűleg a metabolikus stressz, proteotoxikus stressz, hipoxia, gyulladás vagy a DNS károsodás együttes jelenlétéhez igazodik (Hayes et al., 2020). Tekintve, hogy az NRF2 az antioxidáns gének széles spektrumát szabályozza, ez biztosítja a fő indukálható védelmet az oxidatív stresszel szemben, bár az még nem tisztázott, hogy ROS hatására könnyebben aktiválódik-e, mint a többi transzkripció faktor (Hayes & Dinkova-Kostova, 2014).

2.2. Az oxidatív stressz szerepe különböző betegségekben

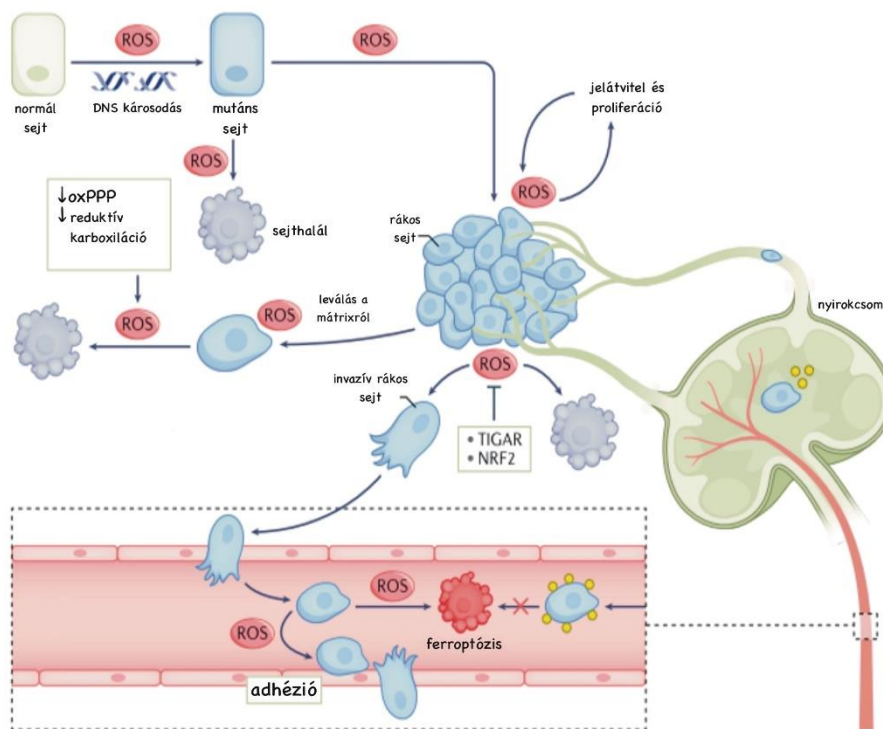
2.2.1. Tumorigenezis/tumorsuppresszió

A reaktív oxigénszármazékok és a sejtszintű átalakulás közötti kapcsolatot először 1981-ben azonosították, amikor megfigyelték, hogy az inzulin megemeli az intracelluláris H_2O_2 -szintet és fokozza a tumorsejtek proliferációját (Oberley, 1988). Több, mint három évtizeddel később a ROS rákban betöltött szerepe továbbra is ellentmondásos. A daganatos sejteknek nagy szükségük van ATP-re, mivel ez biztosítja az „üzemanyagot” az aberráns proliferációhoz. Ennek az ellenőrizetlen energiatermelésnek az árnyoldala azonban a ROS-ok felhalmozódása, melyet a sejtek túlélése érdekében különböző mechanizmusokkal hatástalanítani kell. (Gorrini et al., 2013). Sok olyan tumort elősegítő eseményt ismerünk – onkogének aktiválódása, tumorsuppresszor funkció elvesztése, mitokondriális aktivitás változásai, fokozott hipoxia – amik hozzájárulhatnak a ROS-termeléshez. Már bizonyították, hogy a rákos sejtekben több ROS-t keletkezik, ennek az emelkedésnek a következményei azonban nagyon különbözőek lehetnek, különösképp amiatt, hogy a fokozott ROS-képzés igazoltan támogathatja vagy gátolhatja a rosszindulatú viselkedést (Cheung & Vousden, 2022).

A szabadgyökök okozta DNS-károsodás és genomi instabilitás a rák kialakulását elősegítő onkogén elváltozások felhalmozódásához vezethet. Emellett a membrán/mitokondriális forrásokból származó hidrogén-peroxid reverzibilisen oxidálhatja a fehérjék cisztein oldalláncait, ezáltal más poszttranszlációs módosításokhoz hasonlóan szabályozva aktivitásukat. Több ezer fehérje ilyen jellegű oxidációját sikerült már azonosítani (Van Der Reest et al., 2018), köztük olyan jelátviteli utakban résztvevőket is, melyek a tumoros sejtek túlélésének, proliferációjának, metabolismusának és metasztázisának jól ismert közvetítői (Cheung & Vousden, 2022).

A ROS tumorsuppresszív funkciói a fentebb tárgyalt tumorfokozó hatásaival ellentétben fokozott oxidatív károsodás és ROS-függő haláljelzések esetén képesek arra is, hogy megakadályozzák a tumorigenezis egyes lépéseit (Cheung & Vousden, 2022). Így bár az alacsony és közepes mértékű ROS-szintek elősegíthetik a rosszindulatú sejtek kialakulását, jóval nagyobb mennyiségben felhalmozódva súlyos oxidatív károsodáson keresztül különféle sejthalál folyamatokat váltanak ki a sejtekben. Éppen emiatt a rákos sejtek – a tumor kialakulásának elején különösen – megpróbálják túlélni ezt a stresszhatást azáltal, hogy növelik az antioxidáns védelmüket. Ugyanígy magas ROS-szinteket vált ki a sejtmátrixról való leválás, aminek túlélése nagy kihívást jelent a metasztatikus rákos sejtek számára távoli szervekbe

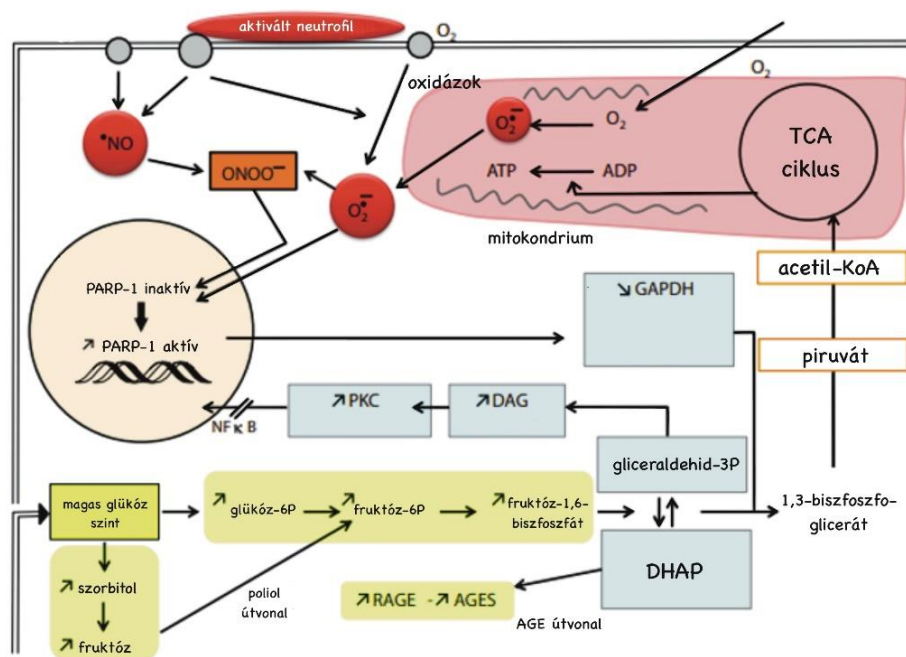
történő vándorlásuk során (**3. ábra**). A sejthalál ellen ezek a sejtek tehát olyan magas antioxidáns kapacitást alakítanak ki, ami a ROS-szintjüket a biológiai funkciók működéséhez megfelelő, de a normál sejteknél még mindig magasabb szintre szabályozza. Ezeknek a védelmi mechanizmusoknak a terápiás támadása így olyan stratégiát jelenthet, mely specifikusan képes pusztítani a tumoros sejteket (Gorrini et al., 2013).



3. ábra: ROS és rák kialakulásának folyamata (Cheung & Vousden, 2022).

2.2.2. Diabetes mellitus

Az anyagcsere-betegségek csoportjába tartozó *diabetes mellitus* (DM) egy krónikus hiperglikémiával együtt járó rendellenesség, mely az inzulinszekréció és/vagy működés zavara miatt alakul ki. A tartósan magas vércukorszint következtében kialakuló állapot az érintett szervek és szövetek károsodásával, diszfunkciójával, valamint mikro- (pl.: retinopátia) és makrovaszkuláris (kardiovaszkuláris rendellenességek) szövődmények kialakulásával jellemezhető. A WHO osztályozása szerint a DM két típusát különböztetjük meg: az 1-es típusú DM (DM1), ami a hasnyálmirigy β -sejtjeinek pusztulásából ered, és a 2-es típusú (DM2), amely elsősorban inzulinrezisztenciával vagy az inzulinszekréció sérülésével kapcsolatos (Darenskaya et al., 2021).



4. ábra: Oxidatív stressz hatására aktiválódó útvonalak diabéteszben (Rochette et al., 2014).

Meggyőző bizonyítékok állnak rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy a diabétesz érrendszeri szövődményeinek kialakulásában a hiperglikémia közvetlenül vesz részt, míg a fokozott ROS-termeléssel járó oxidatív stressz ezek patogenezisében játszik döntő szerepet. Tartósan magas vércukorszint esetén a glikolízis reakciói során keletkező ROS-ok termelése fokozódik, ami DNS károsodáshoz, és ezt követően a *poli-ADP-ribóz polimeráz 1* (PARP1) javító enzim aktiválódásához vezet. A PARP1 gátolja a *gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz* (GA3PDH) aktivitását, ennek következtében felhalmozódhatnak a különböző glikolitikus intermedierek (4. ábra). Ilyenek például a *fruktóz-6-foszfát* (F6P) és a *glükóz-6-foszfát* (G6P) –, melyek emelkedett szintje számos (a patogenezis szempontjából fontos) útvonalat beindíthat: (Darenskaya et al., 2021)

- **AGE-termékek képződése (karbonil stressz):** A hiperglikémia a glükóz autooxidációja révén glioxál, míg a nagy mennyiségű GA3P nem-enzimatis defoszforilációja során metilglioxál termelődését eredményezi, melyek azon *késői glikációs végtermékek* (AGE) prekursorai, amiket többek között a diabétesz szövődményeiért is felelősnek tartanak.
- **Protein-kináz C aktiválási útvonal:** A PARP1 aktiválódásakor a GA3P mellett annak izomerje, a *dihidroxi-aceton-3-foszfát* (DHA3P) is felhalmozódik. Ez szabad zsírsavak jelenlétében enzimatis úton diacil-glicerollá alakul, ami AGE-receptorokon kötődve

hozzájárul a mikrovaskuláris komplikációk kialakításáért, valamint az oxidatív stressz fokozásáért felelős PKC aktiválásához.

- **Poliol útvonal:** Hiperglikémia esetén az *aldóz-reduktáz* (AR) enzim is aktívabb állapotba kerül, és glükózból szorbitol köztterméken keresztül fruktózt állít elő. Ez az AGE termékek képződése mellett azért jelent problémát, mert az AR fokozott működése NADPH-csökkenéssel jár, ami a GSH-szint csökkenése révén hozzájárul az oxidatív stressz súlyosbításához.
- **Az inzulin jelátviteli útvonal inaktiválása:** Oxidatív stressz hatására számos – az inzulin hatására általában aktiválódó – fő jelátviteli útvonal működésképtelenné válik, ami nagymértékben szerepet játszik a csökkent inzulinhatás kialakulásához.

2.2.3. Vesebetegségek

Az oxidatív stressz hatását a vesebetegségek progressziójában, és következményes vesefunkció csökkenés folyamatában széles körben tanulmányozták. Különösen érzékenyvé teszi a vesét a redox egyensúly felborulására az a tény, hogy a ROS fontos szerepet játszik számos vesefunkció fiziológiai szabályozásában. Változások a ROS-termelésben bekövetkezhetnek a vesekéregben, valamint a medullában egyaránt, és hatásuk széles skálán mozoghat, a vese véráramlásának megváltozásától az olyan előrehaladott krónikus vesebetegségeknél jelentkező szövődményekig, mint a magas vérnyomás, érelmeszesedés, gyulladás, vérzékenység (Daenen et al., 2019).

2.2.4. Májkárosodás

A májunk a ROS-ok által megtámadott egyik talán legfontosabb szerv. Oxidatív stressz hatására a Kupffer-sejtekben számos citokin termelődhet, ami fokozza a gyulladást, valamint az apoptózist, a lipidek peroxidációja pedig a máj csillagsejtjeinek proliferációját és kollagén szintézisét válthatja ki. A túlzott ROS termelődés azonban nem csak a lipidek, fehérjék és DNS-tartalmak módosítása révén kiváltott májkárosodás miatt veszélyes, hanem a normális biológiai funkciókat szabályozó útvonalakat moduláló hatása miatt is súlyos szövődményekhez vezethet. Mivel ezek az érintett útvonalak többek között a gének átíródásában, a fehérjeexpresszióban, és a sejtek apoptózisában játszhatnak szerepet, az oxidatív stresszt tekintik az egyik olyan patológiai mechanizmusnak, ami a különböző májbetegségek progresszióját eredményezi (Li et al., 2015).

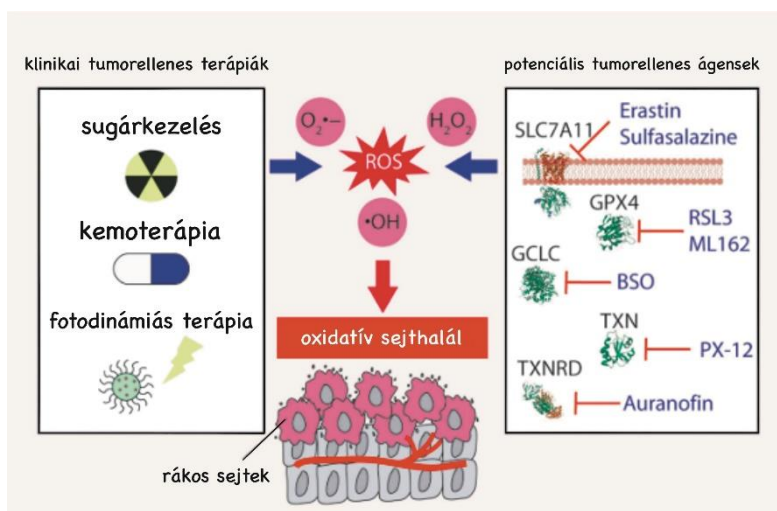
2.3. Az oxidatív stressz kihasználása terápiában

Az oxidatív stressz folyamatainak befolyásolása számos tanulmány szerint hatékony terápiás célpont, mind a diabétesz és a rák, valamint számos más betegség kezelésében is. A befolyásolás módja azonban különböző lehet a rák, és a többi rendellenesség kezelése során, hiszen míg az antitumor terápiák során az alapvető cél a daganatos sejtek szelektív pusztítása (különböző oxidatív sejthalál útvonalak indukálásával), addig más, fent részletesen említett betegség esetén az oxidatív stressz csökkentésére törekszünk, többek között az antioxidáns gének aktiválása révén.

2.3.1. Oxidatív stressz indukálása terápiás célból

Tekintve, hogy a reaktív oxigénszármazékok emelkedett szintje oxidatív sejthalált indukálhat rákos sejtekben, a ROS mennyiségének növelésére irányuló terápiás stratégiák nagyon ígéretesek lehetnek – különösen az előrehaladott állapotú – tumorok támadása szempontjából. (An et al., 2024a). Ezt használják ki a jelenleg alkalmazott daganatellenes terápiák – sugárkezelés, kemoterápia, fotodinamikus terápia – is (5. ábra). Az **ionizáló sugárzás** olyan szabadgyököket hoz létre, melyek nagy reakciókészséget mutatnak a sejtek makromolekuláival szemben, beleértve a DNS-t, lipideket és a fehérjéket. Az így kialakuló genetikai instabilitás végül a rákos sejtek apoptózisához vezet, bár a legújabb kutatások kiemelik, hogy az ionizáló sugárzás a lipidperoxidáció felerősítésével bizonyos típusú rákos sejtekben ferroptózist is képes kiváltani (Lei et al., 2020). A hagyományos **kemoterápiás gyógyszerek** rákellenes hatásához a sejteken belüli ROS-termelés növekedése járul hozzá jelentősen. Az *arzén-trioxid* (As_2O_3) egy hatékony terápiás szer leukémia kezelésére, mely a mitokondriális membránpotenciál károsításával és GSH-kimerülést okozva indukál számos sejthalál útvonalat (pl.: apoptózis, nekroptózis, ferroptózis) HeLa- és Calu-6 tumoros sejtvonalakban. Hasonlóképpen sok más kemoterápiás szer, például a *cisplatin* és a *sorafenib* is a mitokondriális ROS-termelést fokozzák, vagy az antioxidáns rendszer akadályozásával érnek el oxidatív stresszes állapotot. A **fotodinamikus terápia** egy fotokémiai alapú kezelési módszer. Lényege, hogy a beteg szervezetébe egy fényérzékenyítő anyagot juttatnak be, mely a tumoros szövetekben szelektíven feldúsul, miközben az ép struktúrák a felvett anyagot néhány órán belül kiürítik. Megfelelő hullámhosszon történő megvilágítás hatására a fényérzékenyítő anyagból reaktív oxigéngyökök képződnek, melyek pusztítják a daganatos szövetrészeket ER-stressz kiváltása vagy a mitokondriális ROS-termelés fokozása által. Ez a módszer nem csak különböző sejthalál útvonalak indukálására képes (pl.: apoptózis, nekroptózis), hanem specifikus immunsejtek aktiválása útján fokozza a tumorelles immunválaszt is. Bár ezek a terápiák oxidatív sejthalál

kiváltását célozzák meg a rákos sejtekben, hatékonyságukat számos tényező befolyásolja, többek között a tumor típusa, stádiuma és a betegspecifikus tulajdonságok. Ezen okokból kifolyólag a szelektív rákos sejtpusztítás és az egészséges sejtek minimális károsítása közötti optimális egyensúlyt megtartó megoldás megtalálása továbbra is kihívást jelent ezeknek a terápiáknak a fejlesztése során (An et al., 2024a).



5. ábra: Oxidatív sejthalál indukálásának lehetséges módjai (An et al., 2024a).

2.3.2. Oxidatív stressz mérséklése terápiás célból

Számos antioxidáns terápiát vizsgálnak, melyek közül néhány jelenleg is klinikai tesztelés alatt áll. Ezek egymástól eltérő módon fejthetik ki hatásukat, céljuk lehet többek között a képződő szuperoxid gyök, illetve H_2O_2 eltávolítása, megelőzve, hogy ezek további reakciók során még reaktívabb származékokat képezzenek. Prekursorok alkalmazásával a GSH-szint növelését lehet elősegíteni, de az antioxidáns enzimek expressziójának fokozását, és az étrendi antioxidánsok kiegészítését is alkalmas módszernek tartják a sejteket károsító fokozott stressz csökkentésére (Jay Forman & Zhang, 2021).

Bár számos kis molekula kipróbálása okozott csalódásokat az elmúlt években, előfordulhat, hogy a sikertelenséget az alkalmazásuk alapjául szolgáló téves elképzelések okozták, melyek a jövőben felismerhetők és javíthatók. Fontos mérlegelni és figyelembe venni például annak jelentőségét, hogy az adott patológiás körülményben az oxidatív stressz elsődleges vagy másodlagos szerepet tölt-e be. Abban az esetben ugyanis, amikor nem ez az adott rendellenesség primer tényezője, az antioxidáns terápia alkalmazása nem biztos, hogy jelentős hatással lesz a betegség progressziójára. További problémákat vet fel emellett a hatékony in vivo koncentrációk elérésének nehézsége, valamint az NRF2 aktiváció növelésének csökkenő

hatékonysága az öregedés következtében. Egyelőre a legígéretesebbnek azokat a szereket tartják, melyek az intracelluláris térben és a mitokondriális mátrixban jelen lévő szuperoxid gyök és H_2O_2 eliminálására képesek. Ilyenek például a SOD, valamint a GPX4 mimetikumok, melyek közül néhányat jelenleg is klinikai vizsgálatokban tesztelnek. A GSH-szint fenntartása olyan prekursorokkal valósítható meg, mint az *N-acetil-cisztein* (NAC) és a GSH-észterek, előbbit már sikeresen alkalmazzák is néhány humán betegség kezelésében (Jay Forman & Zhang, 2021).

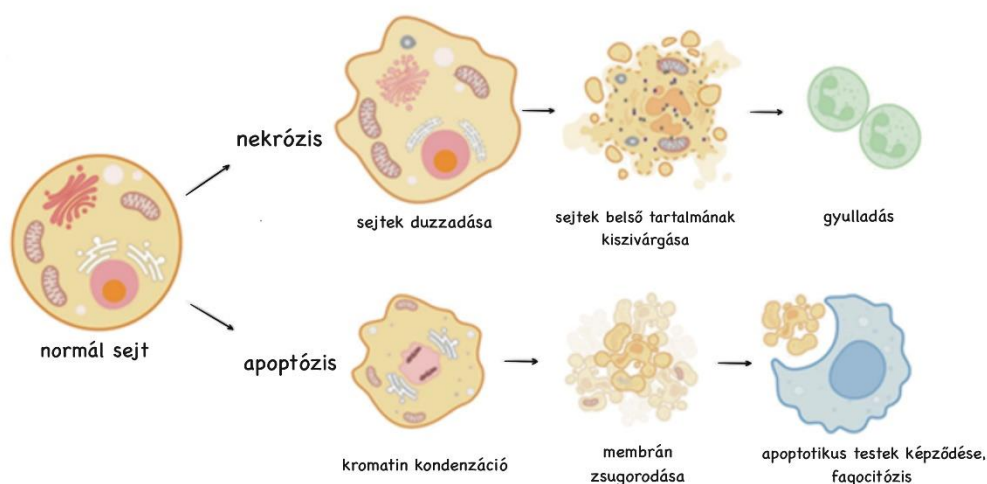
2.4. Sejthalál folyamatok jellemzése

A korábban említettek szerint tehát a túlzott ROS közvetlenül képes károsítani a sejtorganelumokat, valamint a sejtmembránt is, ami végső soron a sejtek halálához vezethet. Az általános membránjavító mechanizmusok mellett a már fentiekben bemutatott antioxidáns enzimek vagy fehérjék is szerepet játszhatnak a sejtek oxidatív sejthalálának szelektív gátlásában. Túlzott felszaporodásuk során azonban specifikus redox-érzékeny fehérjékre gyakorolt oxidatív hatásuk révén a sejthalál különböző típusainak elindítására képesek, ami sejttípustól és kontextustól függően változhat, tovább növelve a folyamat komplexitását (An et al., 2024b).

A sejtek alapvetően akkor pusztulnak el, amikor nem képesek fenntartani alapvető életfunkcióikat. Az ennek során végbemenő sejthalál folyamatokat két csoportra szokták osztani, nekrozisra és programozott sejthalál folyamatokra (*programmed cell death*, PCD). Míg előbbi teljesen ellenőrizetlen módon megy végbe, addig a PCD egy jelkaskádót foglal magában, melyben effektor molekulák vesznek részt. Ennek különböző módjait különíthetjük el a morfológiai megjelenés, az enzimatis funkciók vagy az immunológiai jellemzők függvényében. Az eddigi kutatások főként az apoptózissal, ferroptózissal, nekroptózissal és az autofágiával foglalkoznak, melyek mind a programozott sejthalál folyamatok közé tartoznak. Sokáig úgy gondolták, hogy ezek az útvonalak nem átfedőek, hanem párhuzamosan futnak egymástól függetlenül. A közelmúltban elért eredmények alapján azonban kezdik felismerni, hogy a különböző sejthalál folyamatok kölcsönhatásba léphetnek egymással összekapcsolt, vagy akár átfedő jelátviteli útvonalakon keresztül, és a sejt sorsa végső soron ezen folyamatok kölcsönhatásának eredményeként alakul ki (Shen et al., 2023).

2.4.1. Nekrózis

A programozott útvonalakkal ellentétben a nekrózis a sejthalál egy ellenőrizetlen formája, amelyet külső sérülés, például hipoxia vagy gyulladás indukál (6. ábra). Ez a folyamat gyakran különböző pro-inflammatorikus fehérjék és vegyületek (pl.: az NF- κ B) aktivációjával jár, ami a sejtmembrán megrepedéséhez, és a sejt tartalmának a környező területekre történő kiömlését okozza. A sejtek közötti térbe ilyen módon kiszabaduló belső sejtanyagok gyulladáshoz és szövetkárosodáshoz vezet. A PCD formáktól eltérően a nekrózis a sejthalálnak egy energiafüggetlen formája, mivel ilyenkor a sejtet akkora sokkhatás éri (sugárzás, hő, vegyi anyagok, hipoxia stb.), aminek következtében gyakorlatilag működésképtelenné válik a súlyos károsodások miatt (D’Arcy, 2019).



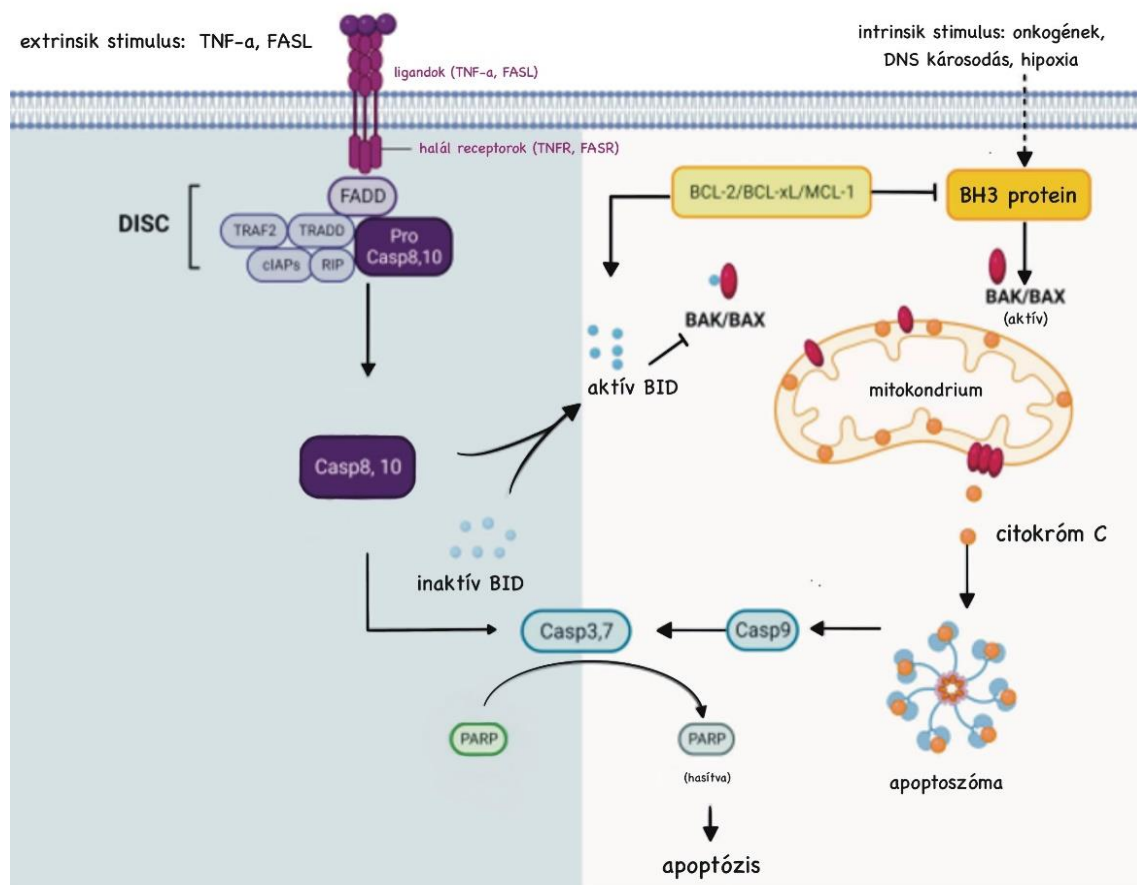
6. ábra: Nekrózis és PCD (apoptózis) összehasonlítása (Park et al., 2023).

2.4.2. Programozott sejthalálfolyamatok

2.4.2.1. Apoptózis

Az apoptózis lényege a sejtek szervezett lebomlása, valamilyen jel hatására. Maga a kifejezés a görög „apo” (levél) és „ptosis” (zuhanás) szavakból származik, melyek a sejtek ellenőrzött önpusztításának és a környező szövetekről való leválásának folyamatára utalnak. Morfológiai jellemzője a kromatin kondenzációja, sejtek zsugorodása, valamint apró, membránhoz kötött apoptotikus testekké való fragmentálódása, melyeket a szomszédos sejtek vagy makrofágok fagocitózissal fel tudnak venni. Az apoptózis aktiválódásához alapvetően két útvonal – az extrinsic és az intrinsic – vezethet (7. ábra). Előbbit extracelluláris ligandumok (*tumor nekrosis faktor*, TNF- α és a *Fas ligand*, FasL) aktiválják, melyek a halálreceptorokhoz, nevezetesen a TNF-, illetve a Fas-receptorokhoz kapcsolódnak. A kötődés megtörténte után halálindukáló

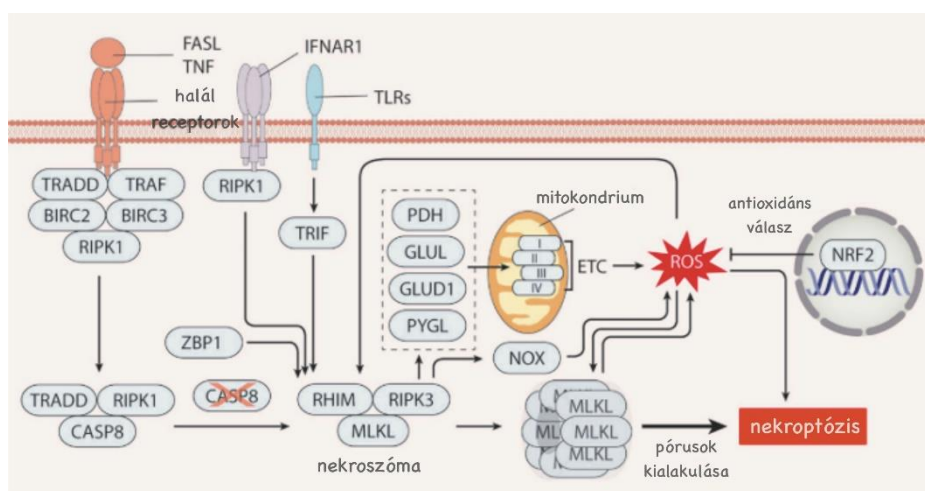
szignálkomplexek (*death-inducing signaling complexes*, DISC) alakulnak ki, melyek odavonzzák és aktiválják az iniciátor kaszpázokat (pl.: kaszpáz-8 és kaszpáz-10). Ezek képesek hasítani és ezáltal aktiválni az effektor kaszpázokat (pl.: kaszpáz-3, -6 és -7), amik beindítják az intracelluláris komponensek lebontását és az apoptózist. Ezzel szemben az intrinsik útvonalat intracelluláris stresszorok, például DNS-károsodás, oxidatív stressz aktiválják, melyek a mitokondrium külső membránjának permeabilizációjához vezetnek. Lépéseit a Bcl-2 családba tartozó antiapoptotikus fehérjék (Bcl-2 és Bcl-xL), a proapoptotikus fehérjék (BAX és BAK), valamint a BH3 fehérjék (BIM és BID) szabályozzák. Intracelluláris stressz hatására a proapoptotikus BH3 fehérjék aktiválódása gátolja az antiapoptotikus fehérjéket, lehetővé téve a Bax és Bak számára, hogy mitokondriális pórusokat képezzenek és így molekulákat, fehérjéket, köztük citokróm c-t juttassanak ki a citoplazmába. A felszabaduló citokróm c apoptoszómát képez az *apoptotikus proteáz aktiváló faktor 1*-gyel (Apaf1), és aktiválja a kaszpáz-9-et, ami elindítja a sejtthalál folyamatot (Park et al., 2023).



7. ábra: Az apoptózis extrinsik és intrinsik útvonalának lépései (Park et al., 2023).

2.4.2.2. Nekroptózis

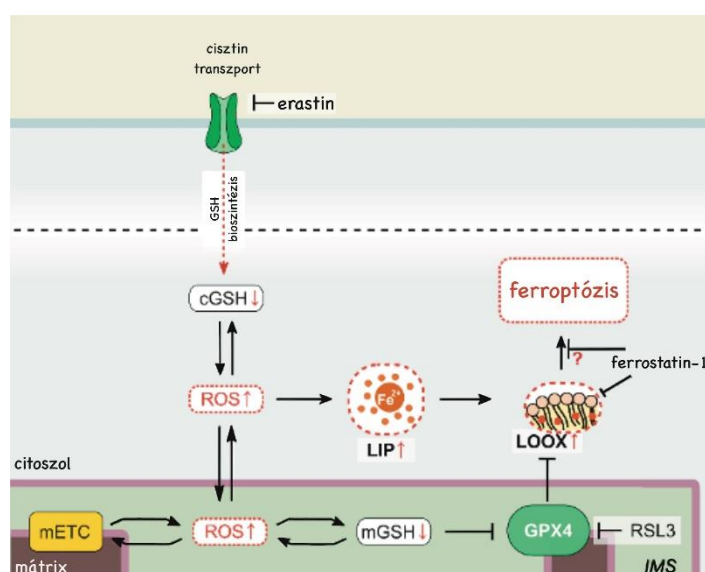
Régóta úgy tartják, hogy a kaspázok fehérjecsaládja szorosan kapcsolódik az apoptózis folyamatához. Bár sokáig csak az apoptózist ismerték, mint programozott sejthalált, a későbbi vizsgálatok azt mutatták, hogy a kaspázok gátlása nem akadályozza meg a sejtek pusztulását, és az ilyenkor végbemenő sejthalál folyamat nekrotikus jellemzőkkel bír. Végül 2005-ben tisztázták a kérdést egy új PCD-nak, a nekroptózisnak a bevezetésével. A nekrozis és a nekroptózis hasonló morfológiai jellemzőkkel rendelkezik, ez utóbbi azonban szabályozott módon, kaspázoktól függetlenül játszódik le. A TNF- α stimuláció hatására összekapcsolódik a *TNF receptor 1*-gyel (TNFR1), és egy sor fehérjét toboroz az I. komplex kialakításához. Ha a kaspáz-8 gátolva van, az I. komplexben lévő *receptor-interakciós szerin/treonine-protein kináz 1* (RIPK1) a megfelelő *RIP homotipikus interakciós motívum* (RHIM) doménen keresztül kötődik a RIPK3-mal, és ezek önfoszforilációval nekroszómát alkotnak (Shen et al., 2023). A nekroszómák elősegítik a *mixed lineage kinase domain-like fehérje* (MLKL) oligomerizációját és foszforilációját, mely ezt követően oligomer formájában képes transzlokálódni a citoszolból a plazmamembránba, ahol hozzájárul a membránpórusok kialakulásához és a plazmamembrán ezt követő felszakadásához (8. ábra). Ennek során különböző károsodással kapcsolatos molekulák (*damage associated molecular patterns, DAMP*) szabadulnak fel, melyekre az immunsejtek gyulladásos válaszok beindításával reagálnak. A legújabb kutatási eredmények arra utalnak, hogy a nekroptózis számos betegség, köztük a neurodegeneratív megbetegedések, vírusfertőzések és a rákos megbetegedések patogenezisében is szerepet játszik. Ennek következtében gátlása az egyes betegségek esetében jó terápiás potenciállal rendelkezik, ami vonzó célpontot jelent a gyógyszerfejlesztés számára (Park et al., 2023).



8. ábra: A nekroptózis folyamatának lépései (An et al., 2024b).

2.4.2.3. Ferroptózis

Jelenleg az egyetlen ismert kizárólag oxidatív programozott sejthalálforma a ferroptózis. Először 2012-ben írta le a Brent Stockwell által vezetett kutatócsoport (Dixon et al., 2012). Maga az elnevezés a latin „*ferrum*” (vas) és a görög „*ptosis*” (zuhanás) kifejezésekből származik, melyek együttesen a sejtek vasfüggő pusztulásának folyamatára utalnak. Morfológiailag is eltér a többi ismert sejthalálformától, a sejtmembrán sértetlen marad, a sejtmag normális méretű, nem figyeltek meg kromatin kondenzációt sem. Főként a mitokondrium változásai: méretének csökkenése, membrán sűrűségének növekedése és a belső kriszták eltűnése jellemző.



9. ábra: A ferroptózis aktiválódásának fő lépései.

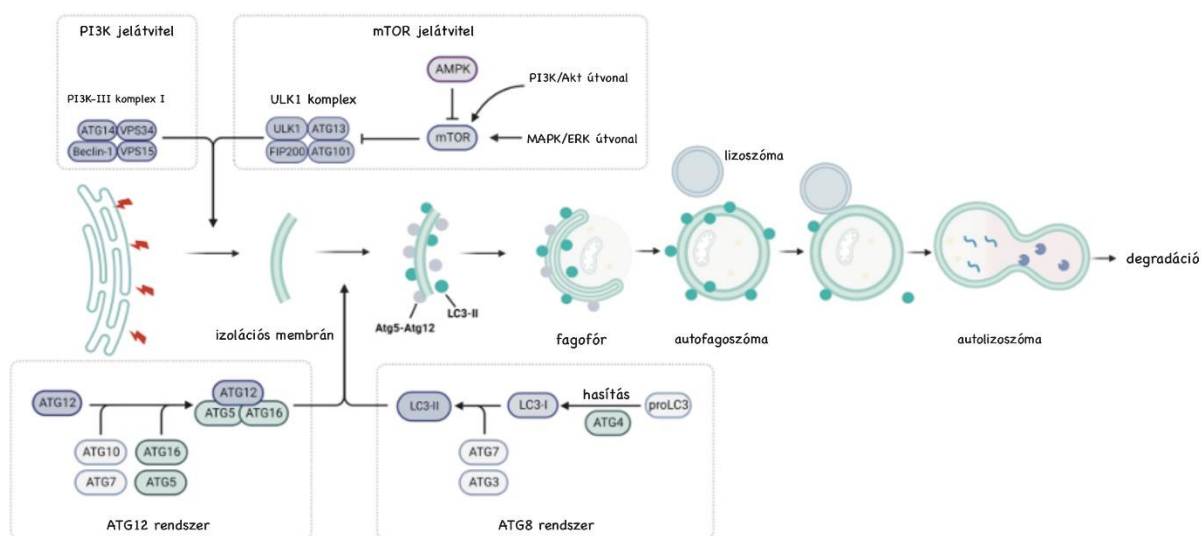
Útvonalai a lipidperoxidok felhalmozódása következtében aktiválódnak, melyek többszörösen telítetlen zsírsavak lipoxigenázok vagy más enzimekkel történő oxidációja során keletkeznek. Ez a folyamat a vas által katalizált Fenton-reakció (2. **egyenlet**) révén tovább erősödhet, mivel az ennek során keletkező hidroxilgyökök megtámadják és károsítják a sejtkomponenseket, különösen a sejtmembránt. A cisztin/glutamát antiporter rendszer felel a glutation prekursorának, a cisztinnek a sejtbe juttatásáért, így jelentős szerepet játszik a lipidperoxidok és a vas felhalmozódásának szabályozásában (9. ábra). Az intracelluláris glutation kimerülése és a GPX4 csökkent aktivitása a lipidperoxidoknak és egyéb szabadgyököknek a fokozott képződéséhez vezet. Bár a cisztin/glutamát antiporter rendszer vagy a GPX4 gátlása a ferroptózis indukálása révén egy jó támadáspont lehet a rák kezelésében, és a közelmúltban a ferroptózis szerepét több humán betegségben is kimutatták, – például neurodegeneratív rendellenességek, hematológiai betegségek, vesekárosodás (Lőrincz et al., 2015; Varga et al.,

2022; Zhang et al., 2022), – a háttérben álló mechanizmusok megértéséhez, és új lehetséges terápiás beavatkozások kifejlesztéséhez még további vizsgálatok szükségesek (Park et al., 2023).

2.4.2.4. Autofágia

Az autofágia egy olyan "újrahasznosító" rendszer a sejtek számára, ami kulcsfontosságú szereppel bír a sérült vagy felesleges fehérjék, sejtorganellek és törmelékek lebontásában. Ez a folyamat tartja fenn a sejtek homeosztázisát azáltal, hogy lehetővé teszi számukra, hogy megszabaduljanak a hulladéktól, és felépítő útvonalai során újra felhasználják a lebontásból származó molekulákat (An et al., 2024b). A kifejezést a 19. század közepe óta használják, és a görög „*auto*” (önmaga) és a „*phagy*” (evés) szavakból tevődik össze. Aktiválódásának első lépése egy izolációs membrán vagy fagofór kialakulása, ami elkülöníti a lebontandó citoplazmatikus komponenseket (**10. ábra**). A fagofór létrejöttét az *unc-51-like kináz* (ULK1) komplex segíti, aminek működését több jelátviteli útvonal, köztük a *mammalian target of rapamycin* (mTOR) szabályozza. Alapállapotban az mTOR aktivációja az ULK1 komplex kialakulásának gátlásával elnyomja az autofágiát, azonban stressz vagy tápanyaghiány esetén az mTOR gátlódása az ULK1 komplex összeszerelődéséhez és az autofágia beindításához vezet. Ilyenkor a fagofór kitágul és elkülöníti a lebontandó komponenseket, majd a lizoszómákkal összeolvadva autolizozómát alkot. Az ide bekerült citoplazmatikus tartalmakat a lizoszóma enzimei bontják el. Az autofágiát fehérjék összetett hálózata szabályozza, beleértve az *autophagy-related* (ATG) fehérjecsaládot, a Beclin-1-et és a *microtubule-associated protein light chain 3* (LC3) fehérjét. Az ATG proteinek az autofágia útvonalának különböző lépéseiben vesznek részt (fagofórok kialakulása, megnyúlása, záródása), a Beclin-1 szintén a fagofór képződését segíti, míg az LC3 a fagofór megnyúlása, záródása mellett az autofagoszóma éréséhez szükséges (Park et al., 2023). A ROS többféle mechanizmuson keresztül képes beindítani az autofágiát, például az *AMP-aktivált protein kináz* (AMPK) közvetlen aktiválásával, vagy az mTOR útvonal gátlása által. Emellett oxidálhatja vagy más módon módosíthatja az ATG család egyes tagjait, amivel az autofagoszóma kialakulását tudja indukálni (An et al., 2024b). Bár az autofágia célja alapvetően a sejtek túlélésének biztosítása, túlzott stressz vagy más súlyos károsodást okozó hatás esetén túlzott működése a sejtek létfontosságú komponenseinek lebontásához, és így teljes összeomláshoz, autofágiás sejthalálhoz vezethet. Amikor egy sejt már olyan mértékű sérülést szenvedett, aminek helyreállítása nem lehetséges, a környezet megóvása érdekében dönthet úgy, hogy lebontja

magát a sejthalál útvonalainak aktiválásával (Park et al., 2023). Kettős szerepét rákos sejtekben is megfigyelték: a tumor kialakulásának kezdeti fázisában enyhe tumorszuppresszív hatással bír a sejtkárosodások mérséklése által. Későbbi szakaszba érve azonban fokozza a tumorok növekedését, mivel a homeosztázis fenntartásában betöltött szerepe segítheti a rosszindulatú daganatsejtek túlélését a stresszes mikrokörnyezetben (Makk-Merczel et al., 2024a).



10. ábra: Az autofúgia szabályozásában és végrehajtásában szerepet játszó fehérje rendszerek.

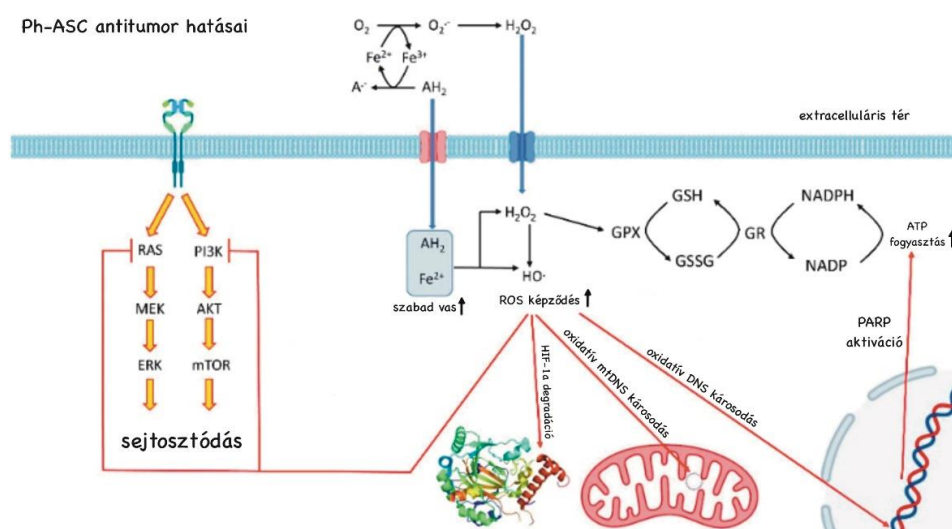
Oxidatív sejthalál a tumorsejtek típusától és az őket körülvevő környezettől függően tehát több különböző formában is jelentkezhet. Bár a hagyományos rákterápiás eljárások célja apoptózis kiváltása a daganatos sejtekben, mivel ezen sejtek egy része mára már ismertén képes rezisztenciát kifejleszteni a PCD ezen formájával szemben, a további, (nem apoptotikus) sejthalál útvonalak feltárása új lehetőséget jelent a terápiás beavatkozások jövőjét tekintve. (An et al., 2024b).

2.5. Alkalmazott kezelőszerek jellemzői

2.5.1. Aszkorbát

A C-vitamin (L-aszkorbinsav, aszkorbát) alapvető a normál sejtfunkciók fenntartásához, fontos szerepet játszik többek között a kollagén és noradrenalin szintézisében, valamint a sejtosztódásban is. Fiziológias koncentrációban (40-80 μM az emberi plazmában) antioxidáns molekulaként működik, mivel elektrondonorként eliminálja a szervezetben képződő reaktív oxigénszármazékokat. Jól ismert antioxidáns szerepe ellenére azonban nagy dózisban (1-20

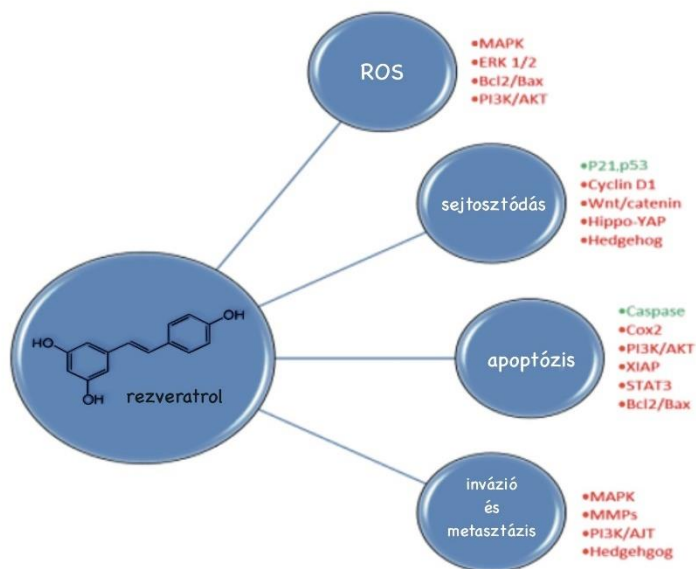
mM, farmakológiai aszkorbát) prooxidánsként képes oxidatív stresszt indukálni, ezáltal elnyomhatja a tumorok növekedését az egészséges szövetek komolyabb károsítása nélkül. Számos különböző preklinikai vizsgálat szerint a nagy dózisú aszkorbát rákellenes hatásában a képződő hidrogén-peroxid kulcsfontosságú tényező (**11. ábra**). Az aszkorbát átmeneti fémek ($\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$ és $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$) jelenlétében egy kételektronos oxidációs folyamaton keresztül könnyen oxidálódik dehidroaszkorbáttá, mely során katalizáló fémhíd segítségével ad át elektronokat egy oxigén molekulának. Az így keletkező H_2O_2 peroxiporinok segítségével képes áthatolni a sejtek plazmamembránján és utána – farmakológiai mennyiségű aszkorbát jelenlétében – a Fenton-reakción (**2. egyenlet**) keresztül hozzájárul a citotoxikus hatású hidroxil gyök képződéséhez. Ez reaktív természetéből adódóan megtámadja a sejtek fontos makromolekuláit, komoly károsodásokat okozva a DNS-ben, fontos fehérjékben és lipidekben. Azt, hogy pontosan milyen sejthalálformák aktiválásával képes pusztítani a daganatos sejteket, mind a mai napig széles körben kutatják. Korábbi vizsgálatok szerint apoptózist, nekroptózist és autofágiát is kiválthat, a pontos folyamat a kísérletben alkalmazott koncentrációtól és a sejtek típusától függ (Ma et al., 2017). Készültek olyan kutatási eredmények is, melyek szerint az aszkorbát kaspáz-függő apoptózison vagy nekroptózison keresztül váltja ki citotoxikus hatását, mivel az ezekben szerepet játszó kulcsfontosságú effektorok (kaspázok, BAX, BID, RIPK1) szintjének változását figyelték meg a kezelések hatására. Az újonnan megjelenő bizonyítékok azonban azt mutatták, hogy az apoptózis vagy a nekroptózis klasszikus gátlói, mint például a Z-vad-FMK és a *nekrostatin-1* (Nec-1) nem képesek megakadályozni a nagydózisú aszkorbát kiváltotta sejtpusztulást, ami arra utal, hogy egyéb sejthalál útvonalak is szerepet játszhatnak a citotoxikus hatás kialakításában (Baek et al., 2017).



11. ábra: A farmakológiai aszkorbát rákellenes hatása (Szarka et al., 2022).

2.5.2. Rezveratrol

A rezveratrol (RES) rákellenes hatásának felfedezése 1997-ben, Pezutto csoportjának munkájával kezdődött (Jang et al., 1997). A RES vagy *transz-3,4',5-trihidroxishtirol* egy természetes polifenol, mely nagy mennyiségben megtalálható a japán csomósvirágúak gyökerében, de emellett számos más növény is termeli, köztük a szőlő, komló, földimogyoró, szeder, áfonya és az eperfafélék. Antioxidáns tulajdonságának köszönhetően igen jótékony hatású az emberi szervezetre nézve, segít megelőzni számos betegség – rák, szív-és érrendszeri betegségek, neurodegeneráció, kisebb gyulladások – kialakulását (Vervandier-Fasseur & Latruffe, 2019). Számos humán rákos sejtvonalban kimutatták már a növekedés gátlásában, a sejtciklus leállításában (a P53 aktiválása által) és az apoptózisban betöltött szerepét. Ezek mellett a már korábban ismertetett HIF-1 α expressziójának modulálása által gátolja a rákos szövetekben az angiogenezist, ami hátráltatja a daganat terjeszkedését és rezisztenssé fejlődését (Berretta et al., 2020). Összességében a rezveratrol egy nagyon jótékony, alacsony toxicitású hatóanyag, amely minden olyan antiproliferatív és pro-apoptotikus tulajdonságot mutat, ami lehetővé teszi, hogy egy hatékony tumorellenes szer legyen belőle (12. ábra). Klinikai alkalmazásával viszont még mindig merülnek fel aggályok, mivel az in vitro kísérletekben alkalmazott koncentrációk túl magasak ahhoz, hogy összeegyeztethetők legyenek az emberi szervezetben tapasztalt alacsony biológiai hozzáférhetőségével (Fu et al., 2021).

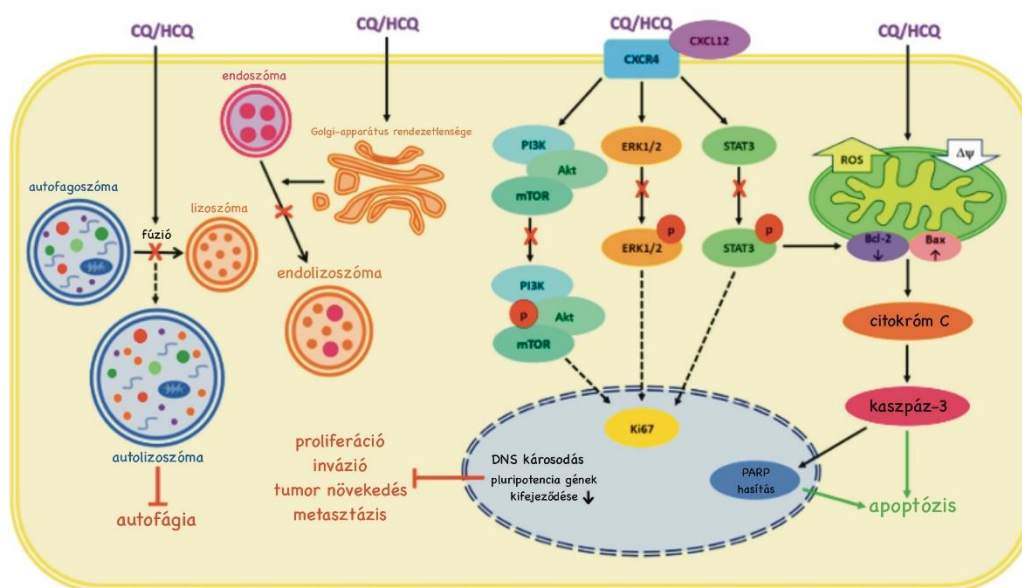


12. ábra: A rezveratrol antitumor hatásmechanizmusának útvonalai (Berretta et al., 2020).

2.5.3. Klorokin

A klorokin (CQ) és származéka, a hidroxiklorokin (HCQ) jól ismert gyógynövénykivonatok, amiket régóta használnak a klinikai gyakorlatban antimaláriás szerként. Ezek a gyógyszerek széles terápiás indexszel és jól megalapozott dóziszbiztonsági profillal rendelkeznek, továbbá olcsók és szájon át szedve is biológiailag hozzáférhetők, így felkeltették a kutatók és a klinikusok érdeklődését. A legfontosabb terület, ahol intenzíven kutatják a CQ/HCQ hatásait, a különböző eredetű tumoros megbetegedések kezelése. Rákellenes aktivitásukat egyedüli hatóanyagként és adjuváns terápiás szerként, széles körben használt citotoxikus vegyületekkel kombinálva malignitások hosszú listáján vizsgálták. Bár kísérleti körülmények között a CQ alkalmazása felülmúlta a HCQ-t, a klinikai vizsgálatok többségében mégis utóbbit használták, annak kisebb toxicitása miatt. Daganatellenes hatásuk hátterében álló fő molekuláris mechanizmusként az autofágia elnyomásának képességét tartják. A CQ és HCQ lizoszomatóp szerek, melyek a késői endoszómák és lizoszómák fúziójának gátlásával gátolják az autofágia utolsó lépését (**13. ábra**). Szerepük azonban bonyolult, mivel a rák stádiumától és típusától függően a sejthalál promótereként vagy szupresszoraként is működhetnek. A felhalmozódott metabolitok újrahazsnosításával az autofágia önvédelmi válaszként működhet a daganatellenes vegyületekkel szemben, így kritikus tényező a kemoterápiával szembeni rezisztencia kialakulásában. Úgy gondolják, hogy gátlása az autofagoszómák felhalmozódásához vezet, ami veszélyezteti a sejtek életképességét és apoptózist válthat ki. A CQ/HCQ azonban az autofágia megakadályozásán kívül más sejtfolyamatokat is befolyásolhatnak. A rákos sejtekre kifejtett terápiás hatásaik között szerepelnek még többek között a fokozott ROS-termelés, a mitokondriumok károsítása, a daganatok mikrokörnyezetének módosítása, a vaszkularizáció normalizálása, a tumorelles immunválasz aktiválása, valamint az intracelluláris kalciumegyensúly megváltoztatása. Összességében a kísérleti munkák többsége azt mutatta, hogy a CQ/HCQ hagyományos citotoxikus gyógyszerekhez történő hozzáadása jelentősen fokozza azok rákellenes hatását, különösen tenyésztett sejtekben, ezért adjuváns szerként javasolható a rákos sejtek kemoterápiára való érzékenyítése céljából. A klinikai vizsgálatok azonban nem voltak mindig sikeresek, egyes esetekben nem tapasztaltak jelentős növekedést a túlélési arányokban, feltehetően az előrehaladottabb stádiumban lévő betegek bevonása, vagy fel nem fedezett mutációk megléte miatt. Szintén problémákat vetnek fel a CQ/HCQ hosszú távú expozíciója során tapasztalt súlyos mellékhatok (allergiás reakció, irreverzibilis retinotoxicitás, gyomor-bélrendszeri panaszok, kardiomiopátiás tünetek ... stb.), melyeket valamennyi klinikai tesztben megfigyeltek. Mindazonáltal tovább kell vizsgálni őket kísérleti

és klinikai körülmények között egyaránt, hogy feltárhassák az ilyen típusú kezelésre legérzékenyebb tumorokat, valamint leghatékonyabb kemoterápiás kombinációkat (Agalakova, 2024).



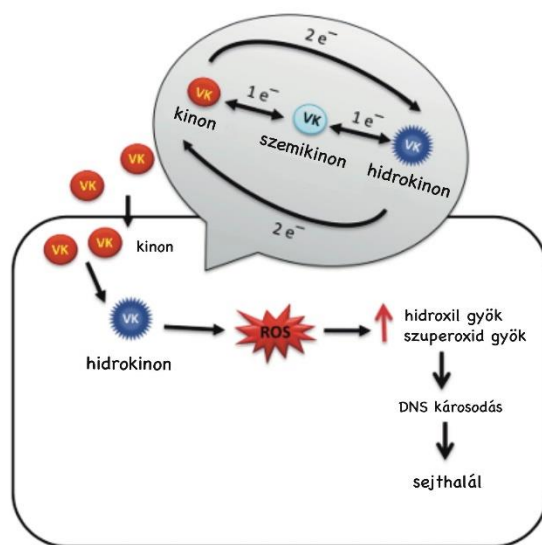
13. ábra: A CQ/HCQ rákos sejtekre kifejtett hatásainak egyszerűsített sémája (Agalakova, 2024).

2.5.4. Menadion

A menadion (2-metil-1,4-naftokinon) ígéretes rákellenes hatásait, illetve gyógyszerrezisztens daganatoknál kemoszenzibilizátorként való alkalmazásának lehetőségeit számos tanulmány kiemelte, többek között vastagbélrák, prosztatarák, méhnyakrák, emlőrák, orrgaratrák különböző sejtvonalait vizsgálva (Gul et al., 2022; Kassouf et al., 2006; Ren et al., 2019).

Maga a K vitamin esszenciális tápanyag a humán szervezet számára, mely elsősorban a véralvadási kaskád működésében és a csontanyagcsere szabályozásában játszik fontos szerepet. Az emberi táplálkozásban természetesen előforduló formái a K1 (filokinon), mely növényekben, legfőképpen a zöld leveles zöldségekben található, és elsősorban a fotoszintézis megfelelő működéséhez szükséges. Az emlősök bélbaktériumai a K1 vitamint a fiziológiailag aktív K2 (menakinon) formává alakítják. Három szintetikus K vitamin létezik, a K3 (menadion), a K4 és a K5, ezek közül a menadiont állateledelekben használják étrend-kiegészítőként. Bár a K1-t és a K2-t nagy dózisban sem találták mérgezőnek, a K3 túl magas szintjét hemolitikus vérszegénységgel, allergiás reakciókkal, májkárosodással hozták összefüggésbe. (Dasari et al., 2017).

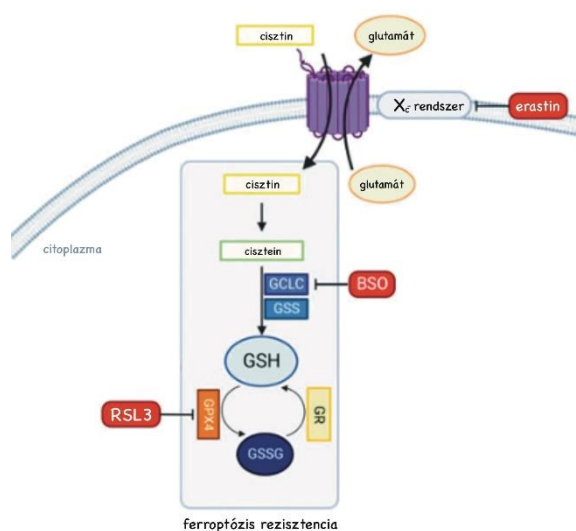
Az első beszámolók a K vitaminok, köztük a K3 potenciális tumorelles tulajdonságáról csaknem nyolc évtizeddel ezelőtt jelentek meg, amikor azt tapasztalták, hogy a menadion intravénás beadása növelte a vizsgált hörgőrákos betegek túlélését (Mitchell & Simon-Reuss, 1947). Hatásmechanizmusának alapját oxidatív stresszt kiváltó képessége adja, mivel a kinon részének redox-ciklusán keresztül számos reaktív oxigénszármazék (hidroxil és szuperoxid gyök, H_2O_2) keletkezhet. Redukciója során, melyet a *NADPH: citokróm p450 reduktáz*, valamint a *NAD(P)H kinon dehidrogenáz 1* (NQO1) katalizál, szemikín (egy elektron felvétele), majd hidrokín (két elektron felvétele) képződik. Oxigén jelenlétében a szemikín egy elektron leadásával visszaalakul menadionná, ami az O_2 szuperoxid gyökké való redukciójához vezet (14. ábra). A folyamat végén kialakuló magas ROS-szint a makromolekulák oxidatív módosításán és a DNS károsításán keresztül képes apoptózist indukálni (Dasari et al., 2017). Kísérleti eredmények megerősítették, hogy a menadion kiváltotta sejthalál során a FasL expresszióját, valamint a *c-Jun N terminal kináz* (JNK) kaszkád aktiválódását figyelték meg, melyek mind az apoptózis beindításában játszanak fontos szabályozó szerepet (Laux & Nel, 2001). Emellett a menadion szinergista hatását is vizsgálták: nagy dózisu C vitaminnal együttesen kezelve, az általuk kiváltott apoptózis során az NF- κ B, a ROS-termelés, a p53/c-Jun transzkripciós faktorok, a GPX inhibíció, a mitokondriális depolarizáció, valamint a kaszpáz-3 útvonal aktivációját figyelték meg (Dasari et al., 2017; Ren et al., 2019). Az említett eredményeket figyelembe véve a menadion egy hatékony rákellenes szer lehet a jövőben, akár önmagában, vagy standard gyógyszerekkel szinergikusan kombinálva. Hasznosságának igazolására, és hatásmechanizmusának teljeskörű feltárásához azonban további preklinikai/klinikai vizsgálatokra van szükség (Dasari et al., 2017).



14. ábra: A menadion ROS-termelő hatásáért felelős kinon rész redox ciklusa (Dasari et al., 2017).

2.5.5. RSL3

Mivel a ferroptózis egy olyan vasfüggő sejthalál forma, mely túlzott lipidperoxidációval jár, indukálása az elnyomó útvonalak fő szabályozóinak (pl.: GPX4) célzott befolyásával, vagy a sejtek vaskészletének növelésével lehetséges. Valóban számos olyan *ferroptózist indukáló anyagot* (FIN) találtak már, melyek vagy közvetlenül a GPX4 aktivitását akadályozzák meg kötődésük révén (RSL3, ML210), vagy közvetetten teszik ezt az Xc (cisztein/glutamát antiporter) rendszer gátlásával (pl.: erastin, sorafenib) (15. ábra). Az **RSL3-t** ((1S,3R)-RSL3) először egy olyan vegyületként azonosították, mely képes nem-apoptotikus, vasfüggő oxidatív sejthalált kiváltani aktivált HRAS mutációt hordozó sejtekben (Yang & Stockwell, 2008). Az erastinnal ellentétben azonban az RSL3 által kiváltott sejthalált függetlenek találták az Xc rendszertől, közvetlen célpontjaként a GPX4-t tartják számon. Hatásmechanizmusának lényegét az adja, hogy klóracetamid részén keresztül képes kovalens kötést kialakítani a GPX4 szelenocisztein oldalláncával, így közvetlenül és irreverzibilis módon gátolja a peroxidáz katalitikus aktivitását (Liyuan Wang, 2020). Számos tumoros sejtvonalat érzékenynek találtak az RSL3-ra (pl.: HOP-92, H522, CAKI-1, DU145), gyakran nM-os koncentrációja is elégnek bizonyult a sejtek életképességének csökkentéséhez (Yang & Stockwell, 2008). Kísérletek azt mutatták, hogy nem indukál lipidperoxidációt és ferroptózist GPX4-kiűtött sejtekben, ami bizonyítja a GPX4-en keresztül kiváltott hatását. Érdekes módon a legújabb vizsgálatok azt tárták fel, hogy gyógyszer-toleráns sejtek, melyek idővel teljesen rezisztenssé alakulhatnak, érzékenyek az RSL3-ra és más GPX4 gátlókra (Hangauer et al., 2017), így ezek az eredmények alátámasztják az ilyen gátlókban rejlő lehetőségeket a kiújuló daganatok kezelésében.



15. ábra: Ferroptózis indukálására alkalmas szerek beavatkozási pontjai (Consoli et al., 2024)

2.6. Sejtvonalak jellemzői

2.6.1. MIA PaCa-2 sejtvonal

A hasnyálmirigy rosszindulatú daganatos megbetegedése egyes előrejelzések szerint 2030-ra a tüdőrák után a rosszindulatú megbetegedések következtében bekövetkező halálozások második vezető oka lesz a nyugati országokban (Rahib et al., 2014). Ennek hátterében feltehetően a késői diagnózis áll, mivel kevés előzetes tünet jelentkezik, mielőtt a betegség előrehaladott stádiumba kerül. Bár az utóbbi években történtek előrelépések az elváltozások felismerésének és kezelésének technikájában, a hasnyálmirigyrák öt éves túlélési aránya még mindig csak 9% (Girolimetti et al., 2024).

A MIA PaCa-2 sejtvonalat Yunis és munkatársai hozták létre egy 65 éves kaukázusi férfi daganatszövetéből, aki 6 hónapja tartó, visszatérő hasi fájdalommal jelentkezett a kórházban. A feltárás során egy nagy tumoros tömeget találtak, melyből több biopsziát vettek szövettani vizsgálat, valamint szövettenyésztés céljából. Az érintett beteg a hasnyálmirigy egyik leggyakoribb formájában, PDAC (*pancreatic ductal adenocarcinoma*) adenokarcinómában szenvedett (Yunis et al., 1977).

2D tenyésztési körülmények között az adherens sejtek kerek és orsó alakú morfológiát egyaránt mutatnak, illetve a felülúszóban kerek lebegő sejtek is megtalálhatóak. A MIA PaCa-2 sejteket széles körben alkalmazzák a PDAC karcionogenezisének, metasztázisának és gyógyszerrezisztenciájának vizsgálatára (Sasaki et al., 2020).

2.6.2. HT-1080 sejtvonal

A HT-1080 egy humán epitheliális fibroszarkóma eredetű sejtvonal, melyet 1972-ben izoláltak egy 35 éves férfiből vett mintából (Rasheed et al., 1974). 2D tenyésztési körülmények között az adherens sejtek epitheliális morfológiát mutatnak, a sejtvonal aktivált NRAS mutációt hordoz.

Az NRAS a KRAS-sal és HRAS-sal együtt a humán *rat sarcoma* (ras) gének közé tartozik. Géntermékeik GTP-áz fehérjék, melyek általában a plazmamembrán belső oldalához asszociálva találhatóak meg és szerepet játszhatnak a sejtosztódás szabályozásában (Downward, 2003). Ezek a fehérjék Ras fehérjékkel kötődve képesek különböző enzimeket aktiválni és így kifejtetni jelátviteli hatásukat.

A ferroptózist először a HT-1080 sejtvonalon, 2012-ben írta le a Brent Stockwell által vezetett kutatócsoport (Dixon et al., 2012), miközben ras mutáns tumorellenes szereket kerestek, emiatt a sejtvonalat igen gyakran alkalmazzák ferroptózissal kapcsolatos kutatásokban.

3. CÉLKITŰZÉS

Régóta ismert, hogy az erős oxidatív stressz a sejt olyan mértékű károsodását okozza, amely végső soron programozott, vagy nem programozott sejthalálhoz vezet. Bár számos anyag egymáshoz igen hasonló reaktív oxigén származék képződést, oxidatív stresszt vált ki, ez mégis a sejthalál igen különböző formájának aktiválódásához vezet. Az stresszes állapot indukálta sejthalál kontrollálása kívánatos, mivel számos betegség patomechanizmusában szerepet játszik a túlzott mértékű oxidatív stressz kiváltotta sejthalál (neurodegeneratív betegségek, diabetes, veseelégtelenség, kardiomiopátia), ugyanakkor a tumorsejtek fokozott oxidatív stressz érzékenysége miatt az oxidatív stresszt kiváltó anyagok fontos terápiás szerepet is játszhatnak.

Kutatócsoportunk korábban vizsgálta a farmakológiai aszkorbát, a rezveratrol és a klorokin citotoxikus hatását különböző KRAS mutációt hordozó PDAC sejtvonalakon. Megállapítottuk, hogy a három kezelőszernak szinergikus citotoxikus hatása van a vizsgált sejtvonalakon. Mind a farmakológiai aszkorbát, mind a rezveratrol kettős szálú DNS-töréseket okozott, azonban a két kezelőszert által kiváltott sejthalál folyamata eltérőnek tűnik.

Jelen kutatás célja a szinergikus citotoxikus hatás hátterében álló mechanizmus további tanulmányozása volt, amelyhez a fent említett kezelőszerek okozta hatásokat és sejthalál mechanizmusokat vizsgáltuk és hasonlítottuk össze további ismert oxidatív stresszt kiváltó szerekkel, mint a menadion, az RSL3 és a H_2O_2 .

Mivel a H_2O_2 képződését, és az ezt követő Fenton-reakciót tartják leginkább felelősnek a nagy dózisú aszkorbát citotoxicitásáért, szerettük volna ennek a két ágensnek a hatását összehasonlítani, illetve az általuk kiváltott Fenton-reakciót részletesebben körüljárni.

4. MÓDSZERTAN

4.1. Sejtfenntartás

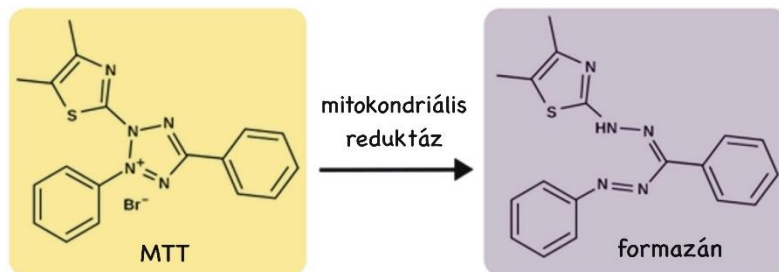
A kísérletekben használt MIA PaCa-2 és HT-1080 sejtvonalakat az ATCC (American Type Culture Collection) irányelveinek megfelelően tartottuk fenn. A sejteket termosztátban (Thermo Scientific Forma™ Series II 3111) inkubáltuk, 37 °C-on, 5% CO₂ tartalom és 100% relatív páratartalom mellett. A használt tápoldat MIA PaCa-2 sejtvonal esetén: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) – High Glucose (Sigma-Aldrich®, D0819), melyet 10% főtális marha szérummal (FBS, Sigma-Aldrich®), valamint 2,5% lószérummal (Gibco™, 16050130) egészítettünk ki. A használt tápoldat HT-1080 sejtvonal esetén: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) – High Glucose (Sigma-Aldrich®, D0819), melyet 10% főtális marha szérummal (FBS, Sigma-Aldrich®) egészítettünk ki. A sejteket a 100%-os konfluencia elérése előtt passzáltuk, általában 1:6 és 1:8 arányban.

4.2. Életképesség mérés MTT-assay alkalmazásával

A sejtek életképességének vizsgálatához MTT assay-t alkalmaztunk, ami egy kolorimetriás elven alapuló eljárás. Az ép sejtek mitokondriumai a sárga *3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolium-bromid* (MTT) festéket dehidrogenázaik segítségével lila színű, vízben oldhatatlan formazánná alakítják (**16. ábra**). A kristályok DMSO-ban történő feloldása után a színváltozás fotometriás méréssel számszerűsíthető, és az oldott formazán mennyisége arányos az életképes sejtek számával.

A sejteket a kezelés előtt 24 órával egy 96 well-t tartalmazó sejtenyésző plate-re ültettük ki a MIA PaCa-2 sejtvonal esetén 30 ezer sejt/well koncentrációban, míg a HT-1080 sejtvonal esetén 20 ezer sejt/well koncentrációban, komplett tápoldatban. A tápoldatot lecseréltük – a 24 órás inkubálást követően – a vizsgált, megfelelő koncentrációjú kezelőszerrel kiegészített komplett médiumra, majd meghatározott kezelési ideig, 24 óráig inkubáltuk a sejteket. A kezelési idő lejártá után kétszer mostuk PBS-sel a plate-t, majd a well-ekhez az 5 mg/ml MTT festékkel (Sigma-Aldrich®) kiegészített PBS és a médium 1:10 arányú elegyét adtuk hozzá, és 45 percig inkubáltuk, amíg a lila formazán szemmel láthatóan megjelent. Ezt követően 100 µl/well DMSO-ban feloldottuk a képződött kristályokat, melyek mennyiségét abszorbanciájuk mérésével (570 nm-en) egy Thermo Fisher Scientific™ Varioskan™ LUX multimode

microplate reader készüléssel határoztuk meg. A kapott abszorbancia értékeket a 680 nm-en mért háttérrel utólag korrigáltuk.



16. ábra: Az MTT, valamint a belőle képződő formazán szerkezete (<https://Theory.Labster.Com/Mtt-Assay/>)

4.3. Fehérjeizolálás és fehérjekoncentráció meghatározása

A sejtek feltáráshoz – 1 mM PMSF-t (Sigma-Aldrich®, 78830), proteáz- (Sigma-Aldrich®, P8340), valamint foszfatáz-gátlószer koktélt (Sigma-Aldrich®, P5726) tartalmazó – kiegészített RIPA puffert (150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris pH=8,0) használtunk. A mintákat a RIPA puffer hozzáadása után 30 percig jégen inkubáltuk, majd 14000 g-n, 4 °C-on, 15 percig centrifugáltuk, és a felülúszóban lévő fehérjemennyiséget a Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific™) segítségével határoztuk meg, a kit-ben megadott módon.

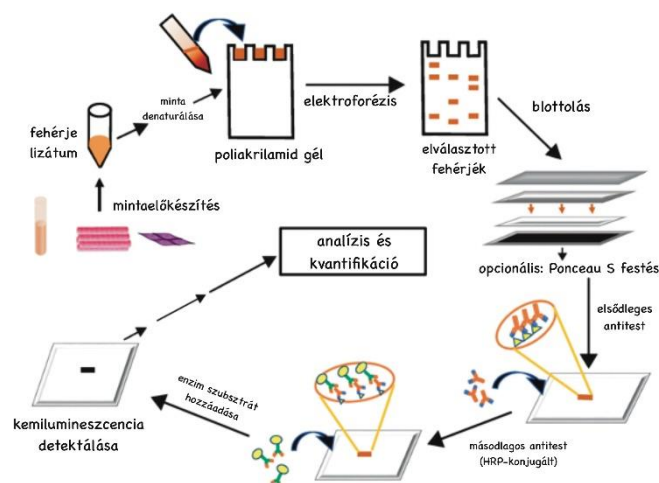
4.4. DNS károsodás vizsgálata Western Blot technikával

A gélelektroforézishez a fentebb leírt módszerrel izolált fehérje mintákhoz 10% merkaptóetanollal kiegészített loading puffert (NuPAGE™ LDS Sample Buffer - Thermo Fisher Scientific™, NP007) adtunk, megfelelő hígításban. Az elválasztást ezt követően SDS-PAGE módszerrel, Mini Gel Tank (Thermo Fisher Scientific™, A25977) segítségével, MOPS (NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer - Thermo Scientific™, NP001) futtató pufferben, Bis-Tris 4-12%-os gradiens akrilamid gélen (NuPAGE™ Bis-Tris Mini Protein Gels - Thermo Fisher Scientific™, NP0336) végeztük el. A szétválasztott fehérjéket a gélből egy nitrocellulóz membránra vittük át Power Blotter System (Thermo Fisher Scientific™, PB0013) és Power Blotter 1-Step™ Transfer Buffer (Thermo Fisher Scientific™, PB7100) használatával. Ponceau

S (Thermo Fisher Scientific™, BP103) festéket alkalmaztunk a transzfer hatékonyságának ellenőrzésére, majd kimostuk a membránból TBS-Tween (TBS puffer, 0.1% Tween® 20 detergens) segítségével, és 1 órán át 5% TBS-Tween pufferben oldott zsírintes tejben blokkoltuk az aspecifikus kötőhelyeket. Az elsődleges antitesteket a megadott mértékben hígítottuk 1% TBS-Tween pufferben oldott zsírintes tejben, majd a jelölt membránokat 4 °C hőmérsékleten, egy éjszakán át ráztattuk. A következő nap a membránt háromszor 15 percig mostuk TBS-Tween pufferrel, majd 1 óráig jelöltük a másodlagos antitesttel, szobahőmérsékleten rázatva (**17. ábra**). Ezután a membránt háromszor 15 percig mostuk TBS-Tween pufferrel. A láthatóvá tételhez a Clarity™ ECL- Western Blotting Substrate kemilumineszcencia detektáló kitet (Bio-Rad, Hercules, CA, USA, 170-5060), valamint a VWR™ Imager Chemi Premium gëldokumentációs rendszert, illetve VWR™ Image Capture Szoftvert (verzió: 1.6.1.0) alkalmaztunk. Belső kontrollként a GAPDH fehérje megjelenését néztük.

Az alkalmazott elsődleges antitestek: Phospho-Chk1 (Ser345) (CST®, #2348, 1:250), Phospho-Histone H2A.X (Ser139) (CST®, #9718, 1:500), GAPDH (CST®, #5174, 1:1000), PARPI Rabbit PolyAb (Proteintech®, 13371-1-AP, 1:500)

Az alkalmazott másodlagos antitest: Goat Anti-Rabbit IgG (Proteintech®, 00001-2, 1:2000)



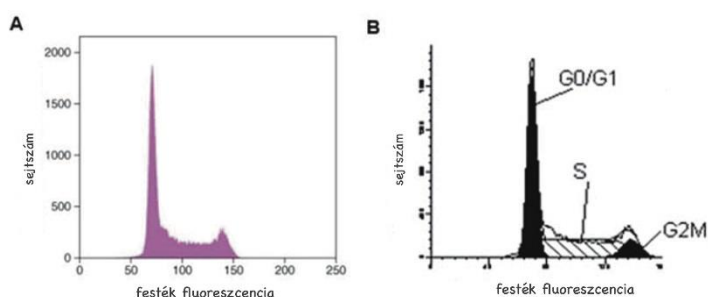
17. ábra: Western Blot technika (Mishra et al., 2017)

4.5. Sejtciklus meghatározás áramlások citometriával

A sejtciklus meghatározás mérésének elve azon alapszik, hogy az alkalmazott FxCycle™ PI/RNase Staining Solution (Thermo Fisher Scientific™, F10797) kit-ben található

fluoreszcens festék, a propídium-jodid (PI) képes kötődni a sejtekben található DNS-hez, így gerjesztés hatására a sejt DNS-tartalmával arányos jelet ad. Tekintve, hogy a különböző sejtciklusokban (G0/G1, S, G2, M) a sejtekben található DNS mennyisége eltérő, az emisszió mérésével meghatározható, hogy a sejtek melyik sejtciklusban vannak, így az is, hogy az adott kezelőszer hatására, melyik sejtciklusban ragadtak meg a kontrollhoz képest (**18. ábra**).

A sejteket egy 6 well-t tartalmazó plate-re ültettük ki 1 millió sejt/well mennyiségben, majd 24 óra eltelte után kezeltük a vizsgált ágenssel. A 24 órás kezelés lejárta után a médiumot eltávolítottuk, kétszer mostuk PBS-sel, majd tripszinnel leválasztottuk a sejtenyészto plate-ről a letapadó MIA PaCa-2 sejteket. Végül reszuszpendáltuk őket komplett tápoldatban, a szuszpenzió 100 µl-éből CytoFLEX™ (Beckman Coulter™, Brea, CA, USA) áramlási citométer segítségével meghatároztuk az életképes sejtek számát. Ezután 100 ezernyi sejtet tartalmazó szuszpenzióhoz 500 µl PBS-t adtunk, majd 3 percig 300 g-n centrifugáltuk. A felülúszó leszívása után a mintákat 70%-os hideg etanolban reszuszpendáltuk, és 30 percig jégen inkubáltuk, így fixálva a sejteket. A fixált sejteket ezt követően újra centrifugáltuk 3 percig 1000 g-n, majd a felülúszó eltávolítását követően FxCycle reagenst adtunk a mintákhoz, és 30 percig fénytől védve, szobahőmérsékleten inkubáltuk őket. A sejtciklusokat a DNS-tartalom alapján a sejtszám meghatározáshoz is használt CytoFLEX áramlási citométerrel, PI fluoreszcens festék PerCP-csatornán való (gerjesztés: kék lézerrel (488 nm) emisszió: 690/50 nm) emissziójának detektálásával határoztuk meg.



18. ábra: Sejtciklus vizsgálatok áramlásos citométer segítségével

4.6. ROS és lipidperoxidáció szintjének meghatározása áramlásos citometriával

A kezelések hatására a sejtekben termelődött ROS mennyiségét szintén CytoFLEX áramlásos citométerrel vizsgáltuk. Ehhez kétféle fluoreszcens festék állt rendelkezésünkre, a

diklórfluoreszcein (DCF, Thermo Fisher Scientific™) és a BODIPY™ 581/591 C11 (Thermo Fisher Scientific™). Előbbi működésének elve azon alapszik, hogy a prekursor formában a sejtekbe bejutó DCF csak a ROS-által (hidrogén-peroxidra érzékeny) oxidációjának hatására alakul át fluoreszcens formájává, így a detektált emisszió mértéke a képződött ROS mennyiségével arányos. Ezzel szemben a BODIPY™ 581/591 egy olyan festék, ami a lipid-peroxidáció során keletkező hidroxil- és peroxil-gyökök mérésére specifikus. Különlegessége, hogy az eredeti és a ROS-által oxidált formája eltérő hullámhosszon emittál, így ez az eltolódás lehetővé teszi a ROS által okozott oxidatív károsodás vizuális és kvantitatív követését.

A sejteket 24 órával a mérés előtt egy 24 well-t tartalmazó plate-re ültettük ki, 250 ezer sejt/well mennyiségben. A kezelés előtt a sejteket 30 percig, 37°C-on előinkubáltuk a festékekkel, ezeket hígítva, DCF esetén 5 μ M, a BODIPY esetén 2 μ M végkoncentrációban adtuk a médiumhoz. Ezt követően a festékes tápoldatot leöntöttük, és lecseréltük a megfelelő kezelőszerrel kiegészített tápoldatra. A kezelési idő lejártá után kétszer mostuk PBS-sel, majd feltripszinezttük a sejteket, és komplett médiumban reszuszpendáltuk őket. Végül a szuszpenziókból 100 μ l mennyiséget átraktunk egy U-plate-re, és CytoFLEX áramlási citométer segítségével, FITC-csatornán (gerjesztés: kék lézerrel (488 nm) emisszió: 525/40 nm) mértük a festékek emisszióját.

4.7. ATP és NAD⁺ mennyiség meghatározása HPLC-UV/Vis technikával

A sejteket 6 well-t tartalmazó plate-re ültettük ki a kezelés előtt 24 órával, 1 millió sejt/well mennyiségben. Ezt követően a megadott kezelési ideig inkubáltuk a vizsgált szerrel kiegészített médiumban a sejteket, majd kétszer mostuk PBS-sel, végül feltripszinezttük őket. Komplett tápoldat hozzáadásával leállítottuk a tripszint, majd 100 μ l szuszpenzióból áramlási citométerrel sejtszámot mértünk. Ezután a sejteket lecentrifugáltuk (3 percig, 500 g-n), majd 150 μ l 5%-os szulfo-szalicilsavban (SSA) reszuszpendáltuk a pelletet. 15 perc jégen inkubálást követően eppendorf centrifuga maximális fordulatszámán (13700 rpm, 21194 g), 4 °C-on, 5 percig centrifugáltuk a mintákat, és a felülúszót új eppendorf csövekbe helyeztük, 50 μ l 3 M koncentrációjú K₂CO₃ oldattal semlegesítettük. Az így előkészített mintákból az ATP/NAD⁺ mennyiség meghatározását HPLC technikával az egyik kollégám végezte el. Ennek során az eltett felülúszókból egy Waters 2690 HPLC készülék, ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 μ m átlagos szemcseátmérőjű, 2,1 x 50 mm-es oszlop és egy PDA detektor segítségével került

elválasztásra a minták NAD^+ tartalma, valamint egy OOB-4760-YO Luna Omega 3 μm átlagos szemcseátmérőjű Polar C18, 50 x 3,0 mm-es oszlop segítségével a minták ATP tartalma. Yoshino, J., & Imai, S. és Juarez-Facio, A.T. et al. által leírt protokollok alapján (Juarez-Facio et al., 2021; Yoshino & Imai, 2013).

4.8. Kaszpáz aktivitás meghatározása fluoreszcens szubsztráttal

A kaszpáz-3 enzim aktivitását egy fluoreszcens Kaszpáz-3 assay kit (Sigma-Aldrich®, CASP3F) segítségével vizsgáltuk. A mérés a kaszpáz-3 enzim szubsztrátjának, az acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methyl-kumarin (Ac-DEVD-AMC) peptidnek az alkalmazásán alapszik, melyből az enzim általi hidrolízis során egy fluoreszcens rész – 7-amino-4-methyl-kumarin (AMC) – szabadul fel. A reakciót fotometriásan követve, a mért fluoreszcencia növekedésének mértéke arányos lesz a kaszpáz-3 enzim aktivitásával.

A sejteket tripszinnel leválasztottuk, majd összeszuszpendáltuk, és 3 percig 500 g-n centrifugáltuk. Ezt követően a kit útmutatása szerint elkészített Assay pufferben újraszuszpendáltuk a leülepített sejteket, és az így kapott mintákat néhány napig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A mérés során a korábban előkészített minta egy részét előinkubáltuk $100\text{ }\mu\text{M}$ Kaszpáz-3 gátlószerezrel (Ac-DEVD-CHO), majd hozzáadtuk a szubsztrátos Assay puffert a gátlószerez és a gátlószert nem tartalmazó mintákhoz is úgy, hogy a szubsztrát végkoncentrációja a reakcióelegyben $16,67\text{ }\mu\text{M}$ legyen. Miután mindegyik mintába belekerült a szubsztrát, azonnal elindítottuk a fluoreszcencia mérést, 10 percenként, 1 órán keresztül. Ennek detektálásához 360 nm -en gerjesztettük az AMC molekulát, és 460 nm -en mértük az emissziót. Az eredmények kiértékelése során a kezdeti lineáris szakaszban kapott pontokra illesztett egyenesek meredekségeit hasonlítottuk össze a kontroll és a kezelt minták között.

4.9. Statisztika

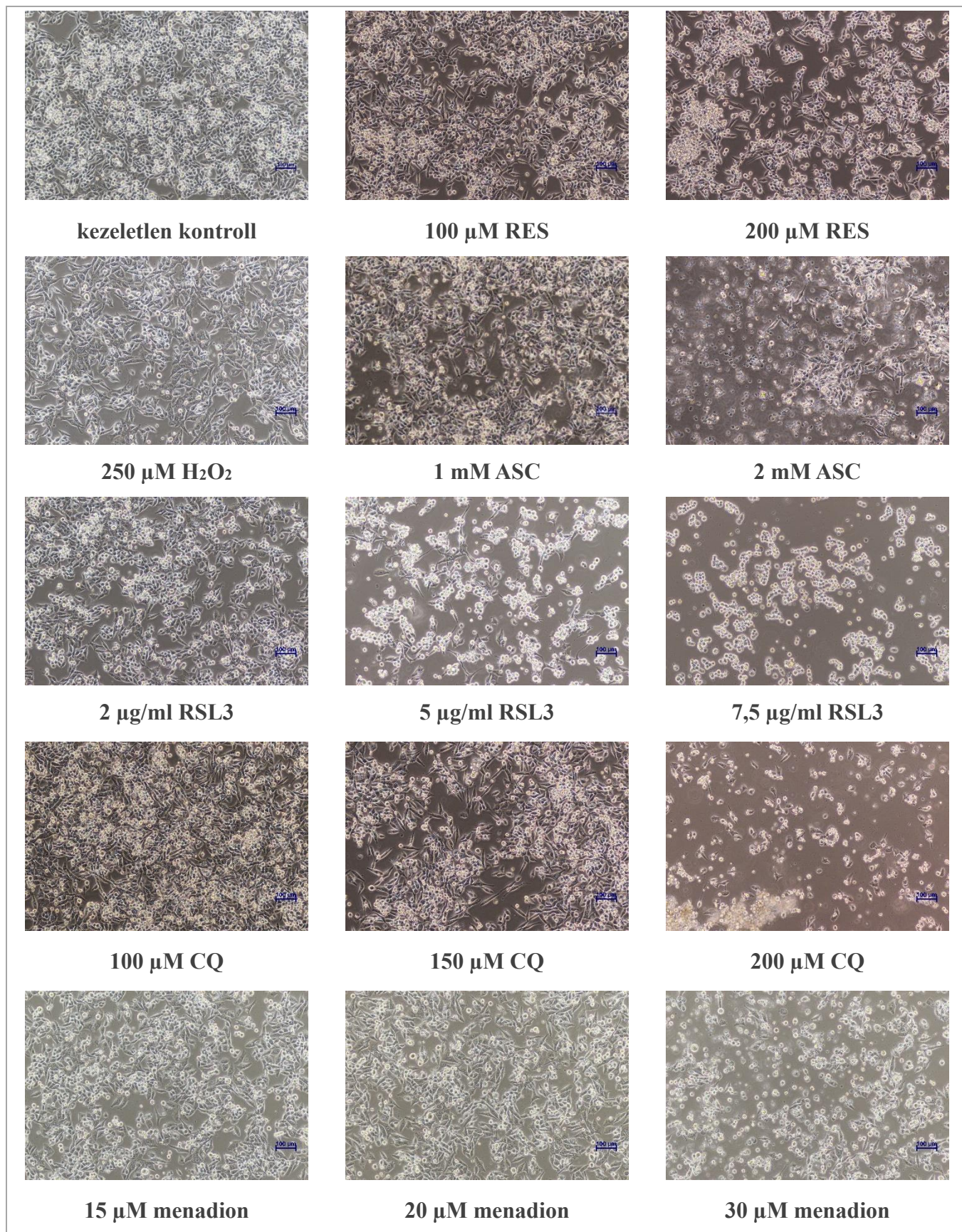
A statisztikai kiértékeléseket (kétmintás t-próba, kétfaktoros, többfaktoros ANOVA, post-hoc Dunnett-teszt vagy nem paraméteres Kruskal-Wallis-próba) Microsoft Excel vagy TIBCO® Statistica™ program segítségével végeztük.

5. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Kutatócsoportunk korábban vizsgálta a farmakológiai aszkorbát (Ph-ASC), rezveratrol (RES), klorokin (CQ) citotoxikus hatását különböző KRAS mutációt hordozó PDAC sejtvonalakon. Megállapítottuk, hogy a három kezelőszernak szinergikus citotoxikus hatása van a vizsgált sejtvonalakon és a CQ által kiváltott (szinergikus) citotoxicitás az autofágia gátló hatásától függetlennek bizonyult, továbbá úgy tűnik, hogy apoptózistól és nekroptózistól eltérő sejthalált vált ki. Mind a farmakológiai aszkorbát, mind a rezveratrol kettős szálú DNS-töréseket okozott, de a két kezelőszerszernak mechanizmusa eltérő lehet. Úgy tűnik, hogy a rezveratrol által kiváltott sejthalál független a reaktív oxigén származékok keletkezésétől, az antioxidáns *N-acetil-cisztein* (NAC) nem tudta kivédeni a citotoxikus hatást és jelentős kaszpáz-3/7 aktivitás növekedéssel járt. Ezzel szemben a farmakológiai aszkorbát által kiváltott sejthalál erős ROS-függést mutatott, a NAC kivédte a citotoxikus hatást, de kaszpáz-függetlennek bizonyult. Ezen kívül a RES igen jelentős mértékű sejtciklus-leállást okozott, míg a Ph-ASC nem, vagy csak kis mértékben (Makk-Merczel et al., 2024).

Kutatásaink célja a szinergikus citotoxikus hatás hátterében álló mechanizmus további tanulmányozása volt, amihez a fent említett kezelőszerek okozta hatásokat és sejthalál mechanizmusokat vizsgáltuk és hasonlítottuk össze további ismert oxidatív stresszt kiváltó szerekkel, mint a menadion, RSL3 és a H_2O_2 . Mivel a H_2O_2 képződését, és az ezt követő Fenton-reakciót tartják leginkább felelősnek a nagy dózisú aszkorbát citotoxicitásáért, szerettük volna ennek a két ágensnek a hatását összehasonlítani, illetve az általuk kiváltott Fenton-reakciót részletesebben körüljárni. Fenton-reagenssel ($H_2O_2 + FeSO_4$) kezeltünk 24 órán keresztül MIA PaCa-2 sejteket, és meghatároztuk MTT-assay segítségével az életképességeket. A mérések során nem tapasztaltunk különbséget önmagában H_2O_2 és H_2O_2 , valamint $FeSO_4$ együttes alkalmazása között, így feltételeztük, hogy az alkalmazott tápoldatban jelenlévő vas mennyiség ($0.25 \mu M$) elegendő a Fenton-reakció lejátszódásához, így módon a későbbiekben a H_2O_2 kezelést önmagában alkalmazzuk. Vizsgáltuk a kezelőszerek citotoxicitását, DCF és BODIPY festékekkel a ROS-termelést és a lipidperoxidációt, sejtciklusra való hatásukat, valamint összehasonlítottuk a DNS károsító és a sejtek bioenergetikájára gyakorolt hatásukat is.

Ezen kezelőszerek mindegyike szignifikáns csökkenést okozott a mért életképességekben. A különböző koncentrációjú Ph-ASC, CQ, RES, RSL3, H_2O_2 és menadion kezelések hatásáról készített mikroszkópos felvételek látványos morfológiai változásokat (sejtek méretének csökkenése, sejtenyésztfelületről való leválás) mutattak (19. ábra).



19. ábra: A Ph- ASC, CQ, RES, RSL3, H₂O₂ és menadion sejtek morfológiájára és életképességére gyakorolt hatása.

5.1. A ROS lehetséges szerepének vizsgálata Ph-ASC, CQ, RES, menadion, RSL3 és H₂O₂ kiváltotta citotoxicitásban

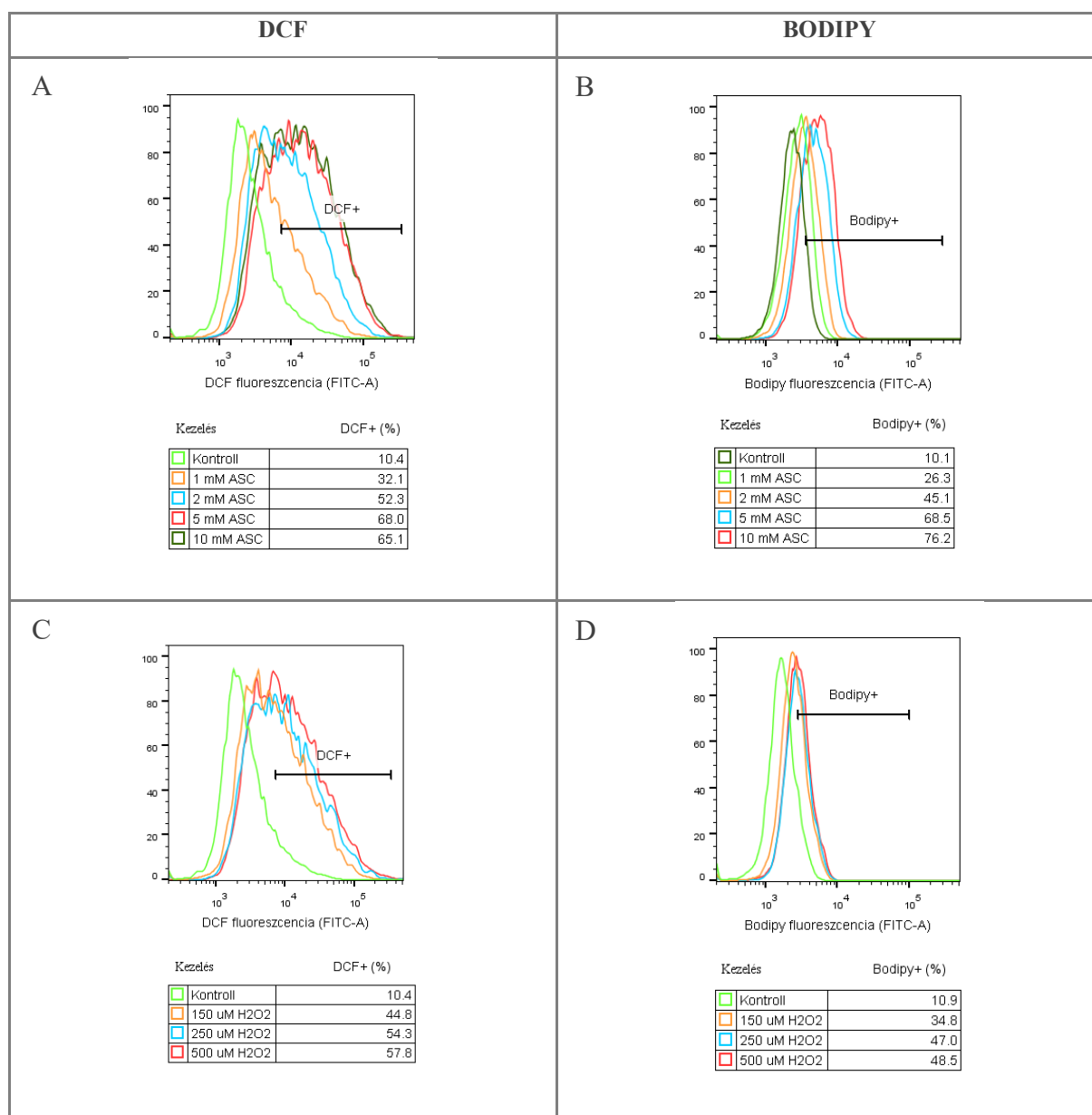
A Ph-ASC ROS-termelést fokozó hatása az irodalomban régóta bizonyított (Fukui et al., 2015; Letelier et al., 2010; Lőrincz et al., 2019; Makk-Merczel et al., 2024). Ezt alátámasztva, méréseink során a Ph-ASC kezelést követően mind a ROS-termelést, mind a lipidperoxidációt ki tudtuk mutatni MIA PaCa-2 sejteken (**20. ábra A, B**). A farmakológiai aszkorbáttal szinergikus toxikus hatást mutató rezveratrol kezelés esetében, korábbi N-acetil-ciszteinnel végzett életképességi méréseink során a RES toxikus hatása ROS-függetlennek bizonyult (Makk-Merczel et al., 2024). Bár jelen munkánk során kimutattuk a ROS-szint emelkedését RES kezelés hatására (**20. ábra E**), tekintve, hogy a sejtek életképességét az antioxidáns NAC nem befolyásolta, citotoxikus hatásának hátterében feltehetően más mechanizmus áll. Szerettük volna a harmadik, Ph-ASC-tal és RES-lal szinergiát mutató CQ kezelést is ROS-termelés szempontjából tanulmányozni. Eredményeink azt mutatják, hogy sem a fokozott ROS-képződés, sem a lipidperoxidáció nem játszik szerepet a CQ kezelés kiváltotta sejthalálban (**20. ábra G, H**), így vélhetően a Ph-ASC, RES és CQ citotoxicitása nem a fokozott ROS-képzés révén szinergikus.

Irodalmi adatok alapján a K vitamin származék menadion sejtpusztító hatásában a képződő ROS-ok fontos szerepet játszanak, tekintve, hogy kinon részének redox-ciklusán keresztül számos reaktív oxigénszármazék (hidroxil és szuperoxid gyök, H₂O₂) keletkezéséhez hozzájárulhat (Dasari et al., 2017; Gul et al., 2022; Woods et al., 1997). Xiaoyuan Ren és munkatársai a klinikai vizsgálat alatt álló kombinált aszkorbát-menadion kezelést is tanulmányozták munkájuk során. Azt tapasztalták, hogy az aszkorbát:menadion (500:5 µM) kezelés hatására a sejtekben mért ROS-szintek emelkedtek, és a lipidperoxidáció is szignifikánsan fokozódott (Ren et al., 2019). Kutatásunk során mi is meg tudtuk erősíteni MIA PaCa-2 sejteken Xiaoyuan Ren és társai eredményét, a menadion kezelés hatására bekövetkező ROS-termelődést, valamint lipidperoxidációt (**20. ábra K, L**).

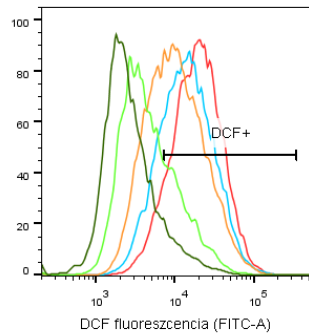
Az RSL3 kezelés esetében – az irodalmi adatok alapján várttal ellentétben (Consoli et al., 2024; Liyuan Wang, 2020) – a ferroptózisra jellemző lipidperoxidációt nem tudtuk szignifikánsan kimutatni MIA PaCa-2 sejteken (**20. ábra I, J**).

Érdekes módon, annak ellenére, hogy a Ph-ASC citotoxikus hatását a keletkező H₂O₂-nak tulajdonítják, H₂O₂ kezelés hatására nem mértünk fokozott lipidperoxidációt (**20. ábra C, D**). Úgy véljük, hogy ennek magyarázata a két molekula tulajdonságai közti különbségben

keresendő. Tekintve, hogy a H_2O_2 egy igen bomlékony anyag, mely számos antioxidáns enzimnek ki van téve, elképzelhetőnek tartjuk, hogy a farmakológiai aszkorbát képes lehet bár kisebb mértékű, de folyamatosabb oxidatív stresszes állapotot fenntartani a sejtekben.



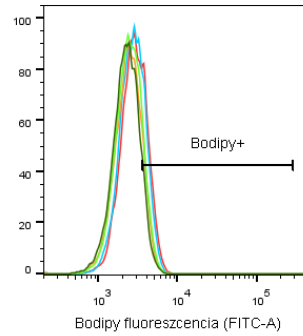
E



Kezelés DCF+ (%)

Kontroll	10.4
100 uM RES	27.3
200 uM RES	61.7
300 uM RES	77.7
400 uM RES	88.8

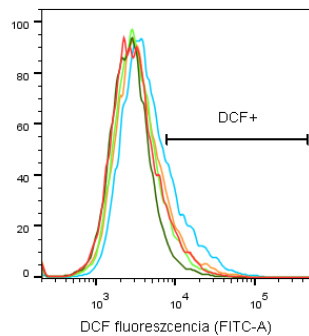
F



Kezelés Bodipy+ (%)

Kontroll	10.1
100 uM RES	14.3
200 uM RES	13.9
300 uM RES	22.6
400 uM RES	27.2

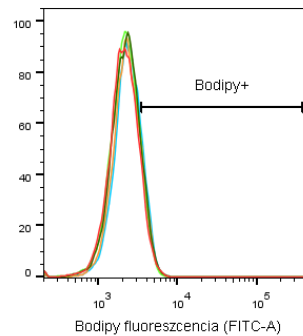
G



Kezelés DCF+ (%)

Kontroll	10.2
100 uM CQ	4.91
150 uM CQ	9.60
200 uM CQ	12.8
300 uM CQ	21.7

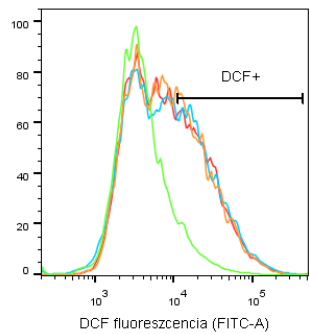
H



Kezelés Bodipy+ (%)

Kontroll	10.8
100 uM CQ	12.9
150 uM CQ	11.6
200 uM CQ	14.2
300 uM CQ	16.2

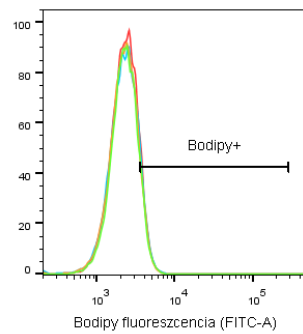
I



Kezelés DCF+ (%)

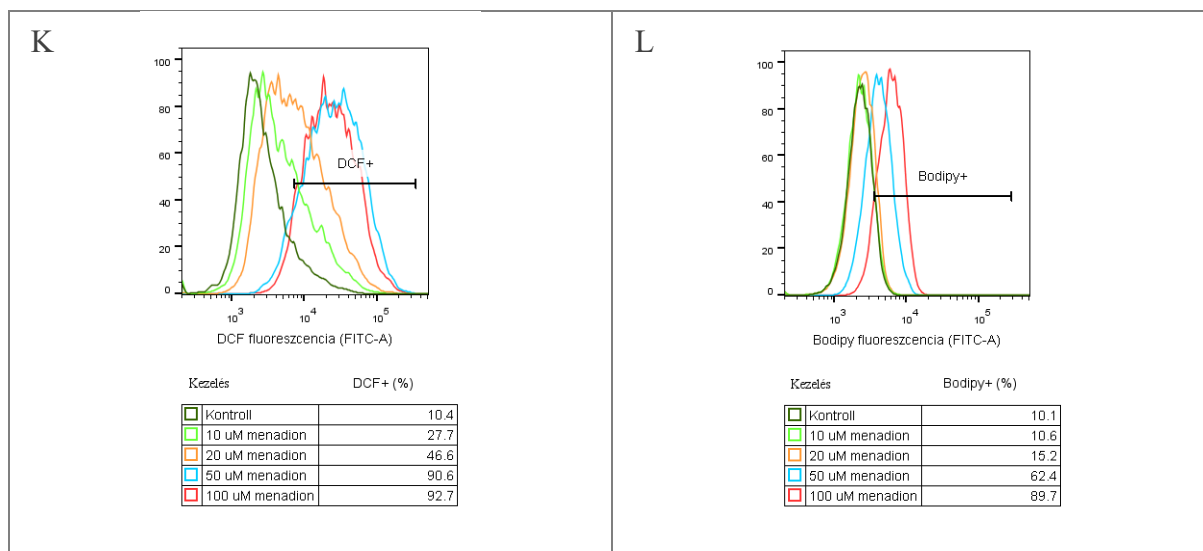
Kontroll	10.2
2 ug/ml RSL	36.8
5 ug/ml RSL	38.3
10 ug/ml RSL	37.1

J



Kezelés Bodipy+ (%)

Kontroll	10.1
2 ug/ml RSL	9.92
5 ug/ml RSL	10.7
10 ug/ml RSL	10.6



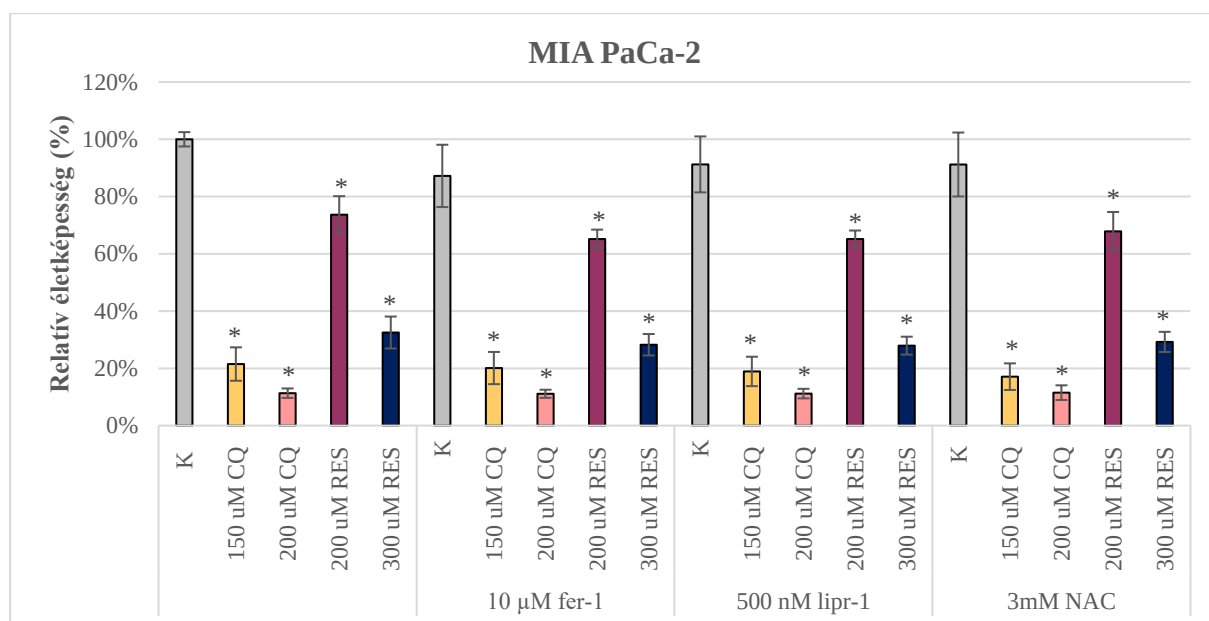
20. ábra: Oxidatív stressz mérésére alkalmazott DCF és BODIPY festékek mért fluoreszcenciája (A keletkező ROS mennyiségét a sejtek 1 órás kezelését követően fluoreszcens DCF és BODIPY festékek segítségével, áramlós citométerrel mértük. Az alábbi ábrák reprezentatívak, három párhuzamos mérés közül).

5.2. Ismert sejthalálfolyamatok lehetséges szerepének vizsgálata Ph-ASC, CQ, RES, menadion, RSL3 kiváltotta citotoxicitásban MIA PaCa-2 és HT-1080 sejteken

A kiváltott sejthalálfolyamatok vizsgálata érdekében a MIA PaCa-2 sejtvonalat a Ph-ASC, CQ, RES, menadion és RSL3 mellett ismert ferroptózis gátlószerekkel (ferrostatin-1, liproxstatin-1), valamint egy nem-enzimes antioxidánssal (*N-acetil-cisztein*, NAC) kombináltan is kezeltük. A CQ és a RES kezelések esetén a NAC nem volt képes kivédeni a citotoxikus hatást (**21. ábra**), míg Ph-ASc, H₂O₂ (**24. ábra**), menadion (**22. ábra**) és RSL3 (**22. ábra**) kezelések esetén képes volt teljes mértékben kivédeni a sejthalált, még az olyan nagy dózisú kezelések esetén is, amelyek minimálisra csökkentették a sejtek életképességét (**22. ábra**, **24. ábra**). Kutatócsoportunk korábbi munkáját, melynek során a rezveratrol citotoxikus hatása ROS-függetlennek bizonyult (Makk-Merczel et al., 2024), jelen mérésünk is alátámasztja. Ezek az eredményeink is megerősítik, hogy a CQ és a RES citotoxikus hatása háttérben feltehetően nem a fokozott ROS-termelés áll. Annak ellenére, hogy keletkezik ROS a RES kezelés hatására, a citotoxicitásának nem, vagy nem csak ez az oka, hiszen az antioxidáns kezelés nem védi meg a sejteket a sejthaláltól.

Ezzel szemben a CQ-nal és RES-lal bizonyítottan szinergikus citotoxikusságot mutató Ph-ASC sejthalált kiváltó hatásában a ROS-termelés (H₂O₂, OH⁻) fokozásának képessége is szerepet játszik, melyet számos kutatócsoport vizsgált (Letelier et al., 2010; Lőrincz et al., 2019; Makk-

Merczel et al., 2024). Masayuki Fukui és munkatársai is megerősítették kísérleteik során MIA PaCa-2 sejteken a Ph-ASC H_2O_2 képzés révén kiváltott antitumor hatását, mely kataláz adagolásával felfüggeszthetőnek bizonyult (Fukui et al., 2015). Eredményeink azt mutatják, hogy az antioxidáns tulajdonságokkal bíró NAC szignifikánsan kivédte a Ph-ASC okozta sejthalált (24. ábra), ez is bizonyítja citotoxicitásában a fokozott ROS-képzés központi szerepét. Figyelembe véve a három szinergikus hatású kezelőszer (Ph-ASC, CQ, RES) NAC hozzáadásra adott eltérő válaszát, szinergikus toxikus hatásukat feltehetően nem a reaktív oxigén származékok fokozott termelése révén fejtik ki.

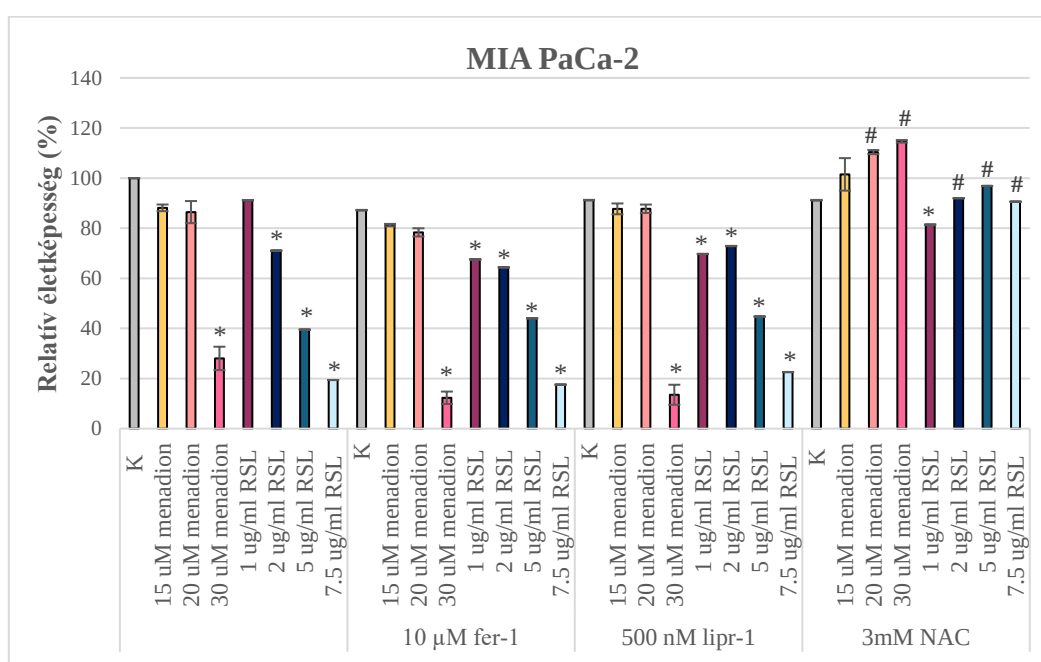


21. ábra: Eltérő koncentrációjú CQ, RES kezelések hatása MIA PaCa-2 sejtek életképességére: 24 órás, 150-200 μ M-os CQ, és 200-300 μ M-os RES kezelés, illetve 10 μ M Fer-1, 500 nM Lipr-1 és 3mM NAC hozzáadása után MTT-assay segítségével meghatároztuk az életképességet. Az ábrázolt értékek a kezeletlen kontrollhoz viszonyított százalékos életképességi értékek (átlag $\pm$ szórás, n=3) *: szignifikáns eltérés (életképesség csökkenés) ($0,05 > p$) a kezeletlen kontrolltól, #: szignifikáns eltérés (életképesség növekedés) adott kezeléshez képest ($0,05 > p$).

Sem a Fer-1, sem a Lipr-1 nem tudta kivédeni MIA PaCa-2 sejteken a Ph-ASC, CQ, RES, H_2O_2 , RSL3 és menadion kezelőszerek citotoxikus hatását (21. ábra, 22. ábra, 24. ábra), feltehetően ezek tehát nem a ferroptózis, hanem más sejthalál útvonalak aktiválásában játszanak szerepet. Az ismert ferroptózis induktor RSL3 esetén azonban ez a megfigyelés az irodalommal szemben (Consoli et al., 2024; Liu et al., 2020; Liyuan Wang, 2020) ellentmondásos eredményre vezetett, emiatt felmerült bennünk, hogy az alkalmazott MIA PaCa-2 sejtvonalon az RSL3 az irodalmi adatok alapján várttal ellentétben nem ferroptózist vált ki.

Zekun Lu és munkatársai foglalkoztak a hasnyálmirigy tumorokban, így MIA PaCa-2 sejtekben is gyakran fokozottan expresszált *set domain containing 8* (SETD8) hiszton-metiltranszferáz

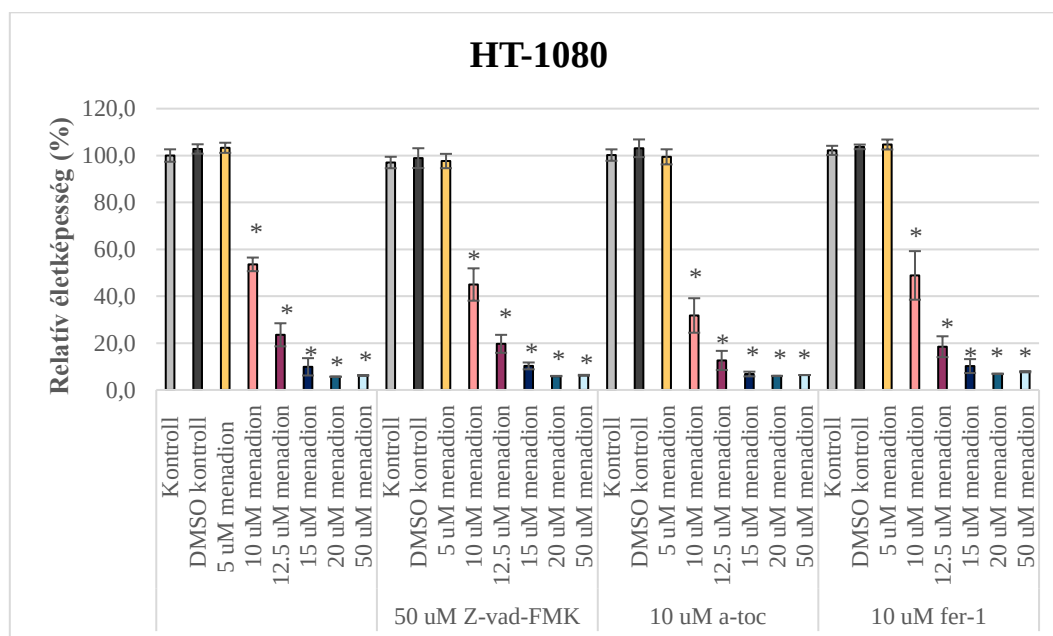
enzimmal, amelyről úgy tartják, hogy az oxidatív stressz útvonalak modulálásával gátolhatja a ferroptózist. Eredményeik azt mutatták, hogy a SETD8 hozzájárult a MIA PaCa-2 sejtek GSH-szintjének növeléséhez, emellett csökkentette az indukált lipidperoxidáció mértékét. Elcsendesített SETD8 sejtekben azonban RSL3-induktor hatására fokozódott a lipidperoxidáció, csökkent a GSH-szint, és a ferroptózis gátló Fer-1 is képes volt megnövelni a sejtek életképességét. Zekun Lu és társai úgy vélik, ez a mechanizmus is állhat a hasnyálmirigy rák rossz prognózisának hátterében, így a SETD8-at egy potenciális terápiás célpontnak tartják, hiszen funkciójának gátlása ferroptózist válthat ki, és elnyomhatja a tumor növekedését (Lu et al., 2023). Kutatásuk összhangban lehet az általunk kapott eredményekkel, miszerint a MIA PaCa-2 sejtvonalon RSL3-mal nem indukálható ferroptózis.



22. ábra: Eltérő koncentrációjú menadion és RSL3 kezelések hatása MIA PaCa-2 sejtek életképességére: 24 órás 15-30 μ M-os menadion, 1-7,5 μ g/ml RSL3 kezelés, illetve 10 μ M Fer-1, 500 nM Lipr-1 és 3mM NAC hozzáadása után MTT-assay segítségével meghatároztuk az életképességet. Az ábrázolt értékek a kezeletlen kontrollhoz viszonyított százalékos életképességi értékek (átlag $\pm$ szórás, n=3) *: szignifikáns eltérés (életképesség csökkenés) a kezeletlen kontrolltól (0,05 > p), #: szignifikáns eltérés (életképesség növekedés) adott kezeléshez képest (0,05 > p).

Ezen megfontolások alapján a későbbiekben a ferroptózissal foglalkozó vizsgálatainkhoz a fibroszarkóma eredetű HT-1080 sejtvonalat használtuk, amelyen a ferroptózis jelenségét először leírták. Menadion kezelés hatására növekedést tapasztaltunk mind a ROS, mind a lipidperoxidáció szintjében, ami felvettette a ferroptózis érintettségét a menadion kiváltotta sejthalálban. Azonban a ferroptózis érzékeny HT-1080 sejtvonal esetében sem voltak hatásosak menadion kezelés esetén az alkalmazott specifikus gátlószerek (23. ábra). Mindezen megfigyelések alapján a menadion citotoxicitásának hátterében feltehetően nem a ferroptózis

áll. Az antioxidáns NAC képes ellensúlyozni a menadion citotoxikus hatását, ami arra utal, hogy az oxidatív stressz kulcsszerepet játszik az általa kiváltott sejthalálban. A menadion által kiváltott sejthalál ebben a tekintetben jelentős mértékben hasonlít a Ph-ASC indukálta sejthalálra.

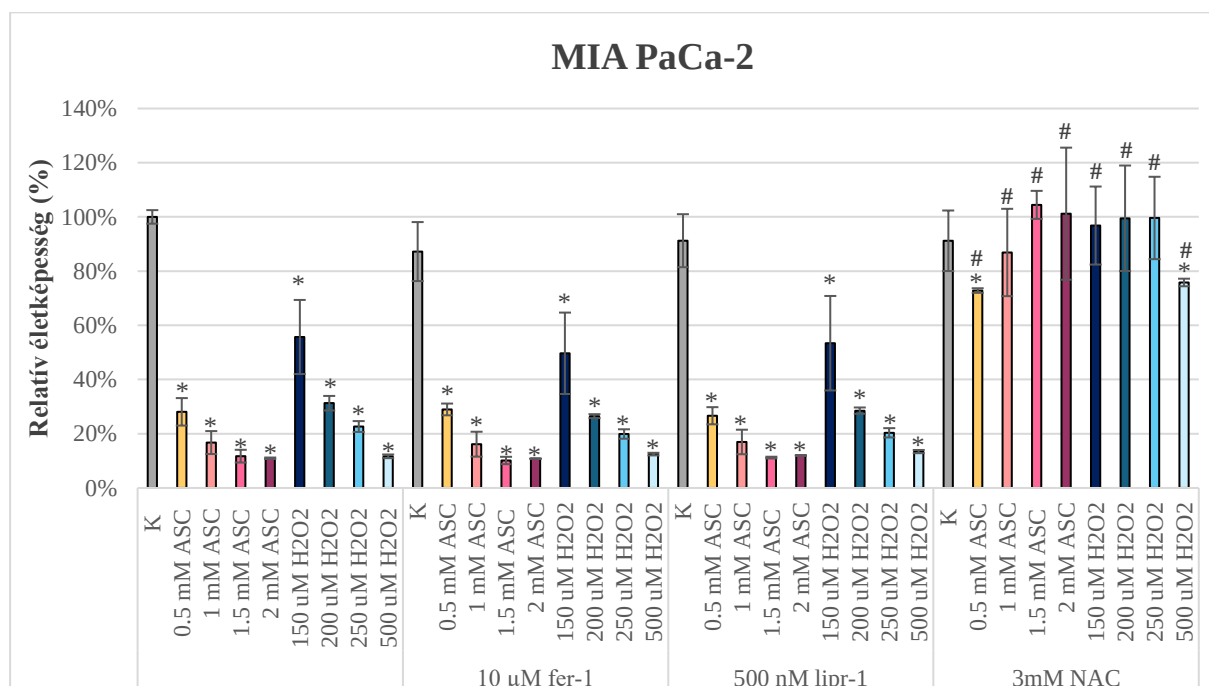


23. ábra: Eltérő koncentrációjú menadion kezelések hatása HT-1080 sejtek életképességére: 24 órás 5-50 μM -os menadion kezelés, illetve 10 μM Fer-1, 10 μM α -tokoferol és 50 μM Z-vad-FMK inhibitor hozzáadása után MTT-assay segítségével meghatároztuk az életképességet. Az ábrázolt értékek a kezeletlen kontrollhoz viszonyított százalékos életképességi értékek (átlag $\pm$ szórás, $n=3$): *: szignifikáns eltérés (életképesség csökkenés) ($0,05 > p$) a kezeletlen kontrolltól, #: szignifikáns eltérés (életképesség növekedés) adott kezeléshez képest ($0,05 > p$).

Tekintve, hogy az ASC és a H_2O_2 is ismerten az oxidatív stressz fokozása révén képesek sejthalált kiváltani, nem meglepő, hogy a NAC hozzáadása szignifikánsan kivédte mindkét ágens citotoxikus hatását. A Fenton-reakció alaposabb megértésére irányuló méréseink eredményei azt mutatták, hogy a FeSO_4 (100 μM -1 mM) hozzáadása nem erősítette a H_2O_2 citotoxikus hatását. Ezek tükrében arra jutottunk, hogy az MTT-assay eredményei mögött az állhat, hogy a Fenton-reakció végbemeneteléhez alapvetően elegendő a kísérleti sejtekben, tápoldatban jelen lévő vas, így a pluszban hozzáadott FeSO_4 nincs különösebb hatással a H_2O_2 kezelés során lejátszódó reakcióra, így a mérésekhez FeSO_4 nélküli H_2O_2 kezelést alkalmaztunk.

Kutatócsoportunk korábbi munkája során leírtuk, hogy az ASC, CQ toxikus hatását sem az apoptózis gátló Z-vad-FMK, sem a nekroptózis inhibitor *Necrostatin-1* (Nec-1) nem tudja kivédeni (Makk-Merczel et al., 2024). Újabb kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy menadion kezelés esetén, mely az irodalom alapján képes apoptózist kiváltani (Gul et al., 2022; Laux &

Nel, 2001), sem sikerült Z-vad-FMK segítségével megnövelni az MTT-assay során mért életképességet (MIA PaCa-2 és a HT-1080 sejtvonal esetében sem), amiből arra következtethetünk, hogy nem, vagy nem csak apoptózist képes kiváltani a menadion kezelés ezeken a sejtvonalakon.

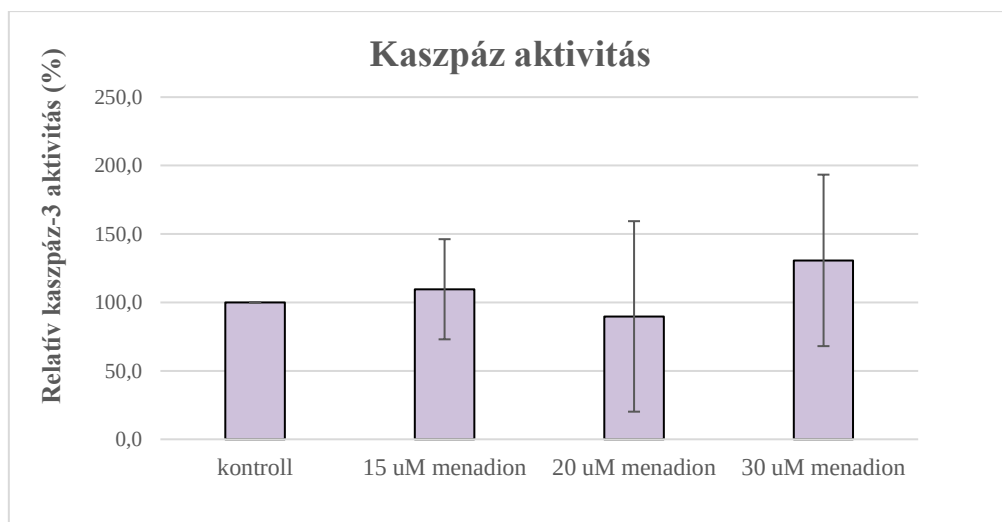


24. ábra: Eltérő koncentrációjú ASC, H₂O₂ kezelések hatása MIA PaCa-2 sejtek életképességére: 24 órás 0,5-2 mM-os ASC, illetve 150-500 μM-os H₂O₂ kezelés, illetve 10 μM Fer-1, 500 nM Lipr-1 és 3mM NAC inhibitor hozzáadása után MTT-assay segítségével meghatároztuk az életképességet. Az ábrázolt értékek a kezeletlen kontrollhoz viszonyított százalékos életképességi értékek (átlag +/- szórás, n=3) *: szignifikáns eltérés (0,05 > p) a kezeletlen kontrolltól, #: szignifikáns eltérés (életképesség növekedés) adott kezeléshez képest (0,05 > p).

5.3. A kaszpáz-3 lehetséges szerepének vizsgálata menadion kiváltotta citotoxicitásban

Az apoptózis útvonalának jellegzetessége a kaszpázok, köztük például a kaszpáz-3 aktiválódása (An et al., 2024; D'Arcy, 2019; Park et al., 2023). Kutatócsoportunk korábbi munkája során kimutattuk, hogy a rezveratrol kezelés hatására mért kaszpáz aktivitás a kontrollhoz képest közel tízszeresére emelkedett, míg ASC és CQ kezelés hatására nem aktiválódott a kaszpáz-3 enzim (Makk-Merczel et al., 2024). Méréseink során a MIA PaCa-2 sejtek 24 órás menadion kezelése hatására a kaszpáz aktivitás nem, vagy csak minimálisan emelkedett (**25. ábra**), annak ellenére, hogy a menadionról az irodalom úgy tartja, hogy apoptózist képes indukálni (Laux & Nel, 2001), azonban ez jelentősen függhet az alkalmazott sejtvonaltól (Gul et al., 2022). Eredményeink alapján a MIA PaCa-2 sejtvonalon a menadion nem indukál apoptózist,

legalabbis annak kaspáz függő formáját, hiszen nem tapasztaltunk kaspáz-3 aktivitás emelkedést, valamint a pán-kaspáz inhibitor Z-vad-FMK sem tudta kivédeni a menadion citotoxikus hatását (**23. ábra**).



25. ábra: Változások a kaspáz-3 aktivitásban 24 órás 15-30 μ M menadion kezelés hatására MIA PaCa-2 sejteken. Az ábrázolt értékek a kezeletlen kontrollhoz viszonyított százalékos értékek (átlag $\pm$ szórás, $n=3$), *: szignifikáns eltérés ($0,05 > p$) a kezeletlen kontrolltól.

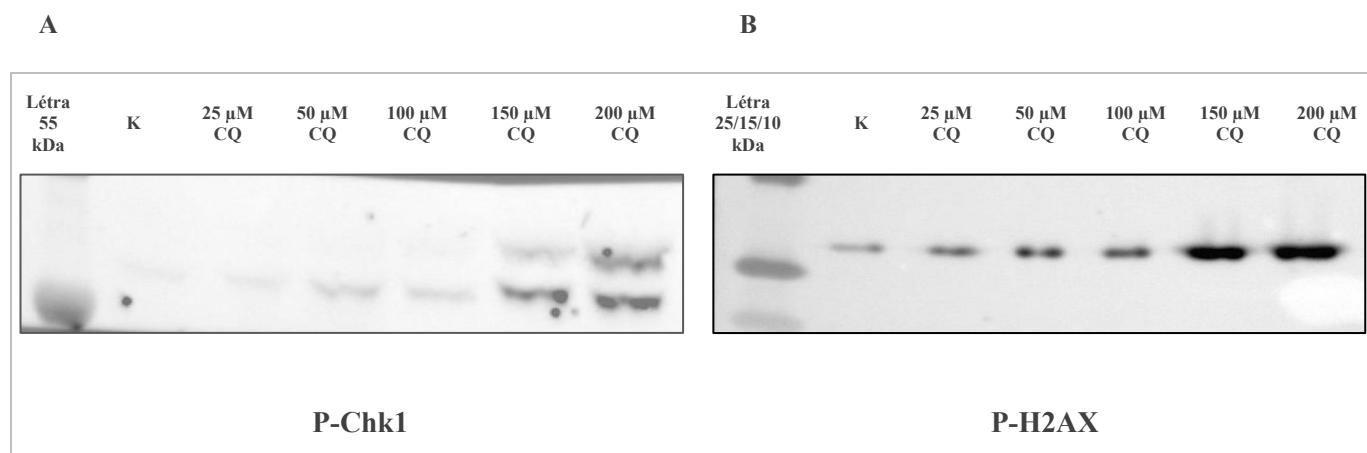
5.4. DNS károsodás szerepének vizsgálata CQ, menadion, H_2O_2 , valamint RSL3 kiváltotta citotoxicitásban MIA PaCa-2 sejteken

A H2A.X Ser139-en történő foszforilációja (γ H2A.X), valamint a Chk1 foszforilációja a DNS kettősszál törések (DSB-k) és a DNS-javítás inicializálásának alapvető lépései (Matthias B. Stope, 2021), így a foszforilált formájuk mennyiségének növekedése a DSB-k megjelenésének bizonyítékeként értékelhető.

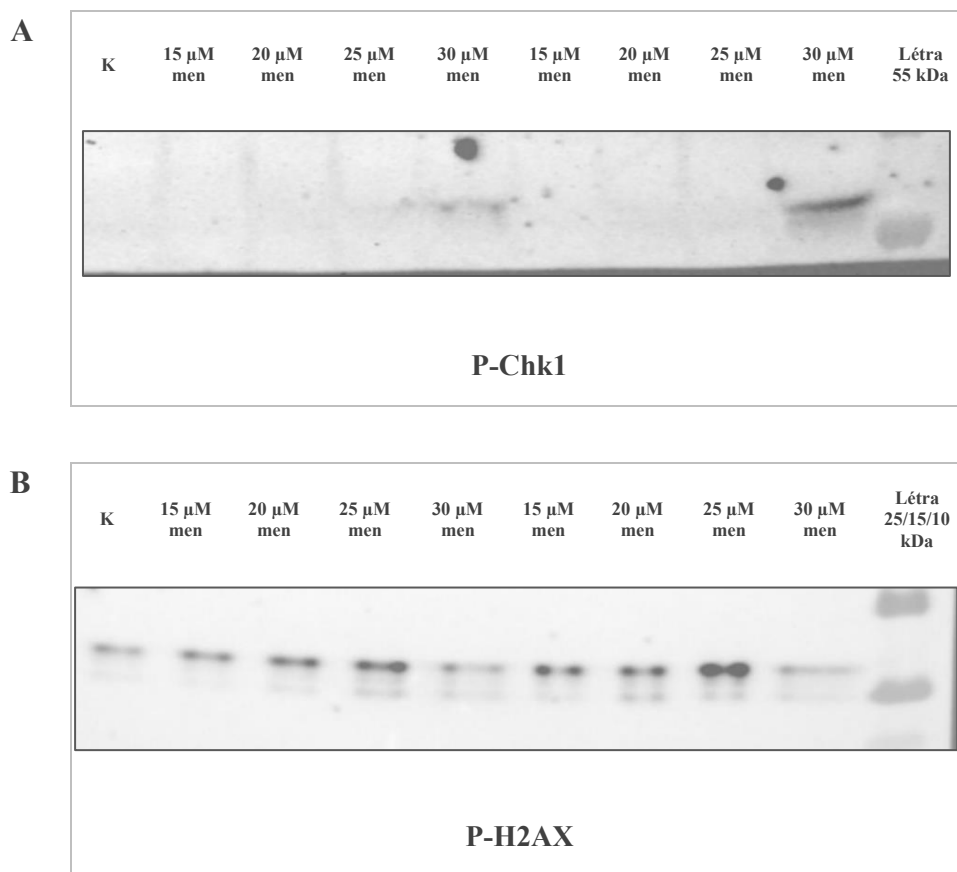
Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy a Ph-ASC és a RES kezelések DNS károsodást okoznak (Makk-Merczel et al., 2024). Kísérleteink során klorokin kezelés hatására is megfigyeltük a H2A.X hiszton és a Chk1 foszforilációját (**26. ábra**, **29. ábra** A, B), amiből arra következtethetünk, hogy a CQ kezelés is okoz DNS károsodást. Mindezek alapján könnyen elképzelhető, hogy a Ph-ASC, RES és CQ kezelések esetében megfigyelt szinergikus citotoxicitás hátterében ezen három anyag DNS károsodást kiváltó hatása állhat.

Menadion kezelés során szintén bekövetkezett DNS károsodás, melyet mind a P-H2A.X és a P-Chk1 mennyiségének növekedése jelzett (**27. ábra**, **29. ábra** C, D). A szintén oxidatív

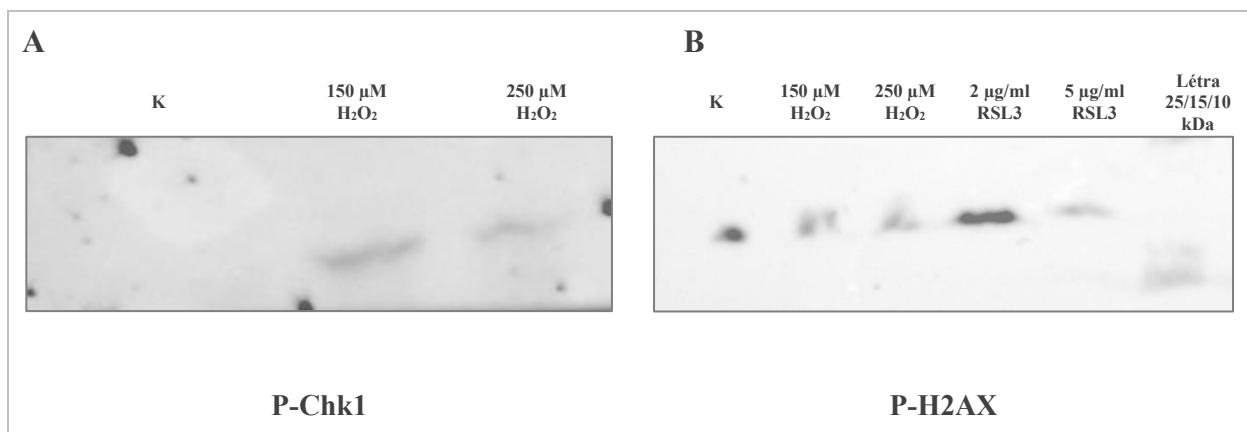
stresszt okozó H₂O₂ és RSL3 kezelések hatására is megfigyeltünk DNS károsodásra utaló változásokat (28. ábra és 29. ábra C, D).



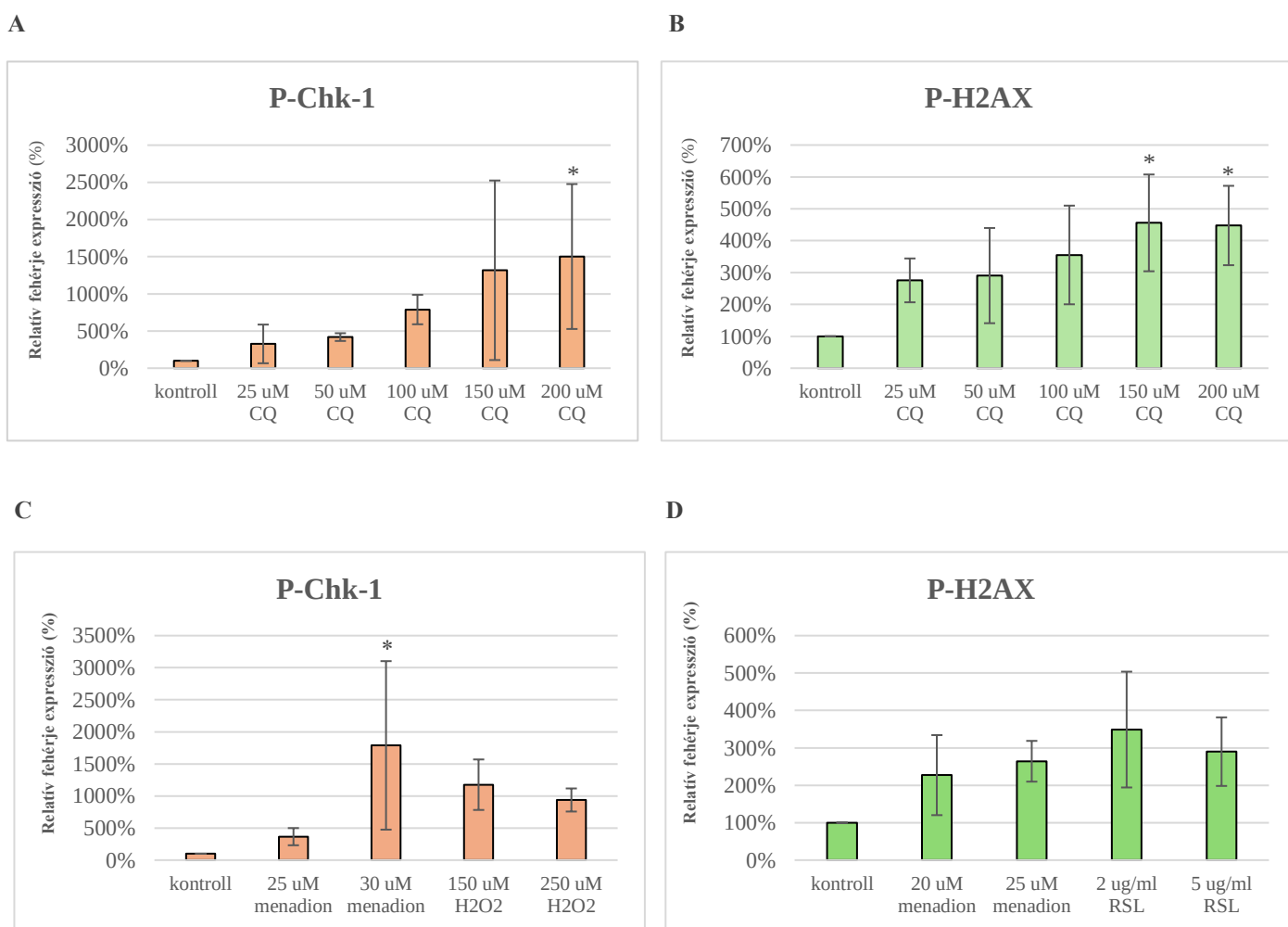
26. ábra: A P-Chk-1 (A) és P-H2AX (B) fehérjék expressziójának aktiválódása 25-200 μ M CQ kezelés hatására MIA PaCa-2 sejteken (Teljes fehérje minták Western Blot analízise 24 órás CQ kezelést követően. Az alábbi ábrák reprezentatívak, három párhuzamos mérés közül).



27. ábra: A P-Chk-1 (A) és P-H2AX (B) fehérjék expressziójának aktiválódása 15-30 μ M menadion kezelés hatására MIA PaCa-2 sejteken (Teljes fehérje minták Western Blot analízise 24 órás menadion kezelést követően. Az alábbi ábrák reprezentatívak, három párhuzamos mérés közül).



28. ábra: A P-Chk-1 (A) és P-H2AX (B) fehérjék expressziójának fokozódása 150-250 μ M H_2O_2 , valamint 2-5 μ g/ml RSL3 kezelés hatására MIA PaCa-2 sejteken (Teljes fehérje minták Western Blot analízise 24 órás H_2O_2 , RSL3 kezelést követően. Az alábbi ábrák reprezentatívak, három párhuzamos mérés közül).



29. ábra: Klorokin, menadion, RSL3 és H_2O_2 kezelés során kapott relatív fehérje expresszió (A denzitometriás adatok a P-Chk1 (A, C) és P-H2AX (B, D) fehérje kontrollra normált relatív expresszióját mutatják), (átlag $\pm$ szórás, $n=3$) *: szignifikáns eltérés ($0,05 > p$) a kezeletlen kontrolltól.

5.5. Bioenergetikai változások lehetséges szerepének vizsgálata Ph-ASC, CQ, RES és menadion kiváltotta citotoxicitásban

A DNS súlyos károsodása során aktiválódó celluláris mediátor *poli (ADP-ribóz) polimeráz 1* (PARP1) fokozott működése megnövekedett ATP felhasználáshoz vezet, így ez a folyamat az ATP szintjének gyors depléciója mellett az enzim működéséhez szükséges NAD^+ mennyiségének csökkenését is maga után vonja. Úgy tartják, hogy a sejtek bioenergetikájának ilyen módon történő megzavarása is szerepet játszhat egy-egy citotoxikus kezelőszer sejthalált kiváltó hatásában (Luo & Lee Kraus, 2012).

Buranasudja és munkatársai a farmakológiai aszkbát okozta sejthalált vizsgálva megállapították, hogy a Ph-ASC kezelés DNS károsodást okoz (Buranasudja et al., 2019) – ezeket az eredményeket korábban kutatócsoportunk is alátámasztotta (Makk-Merczel et al., 2024). Ezen kívül úgy találták, hogy Ph-ASC kezelés hatására a sejtek NAD^+ és ATP szintje leesik, aminek oka a PARP1 fehérje növekedett aktivitása révén fokozódó felhasználás. Ezt a megfigyelést alátámasztották azzal, hogy a PARP1 fehérjét gátló Olaparibbal a kezelés kiváltotta NAD^+ és ATP szint csökkenése elkerülhető volt, ez azonban nem akadályozta meg a sejthalált. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a bioenergetika megváltozása a Ph-ASC toxicitásának csupán másodlagos tényezője, sejthalált kiváltó hatását úgy tűnik, hogy elsősorban a DNS károsodás okozza (Buranasudja et al., 2019).

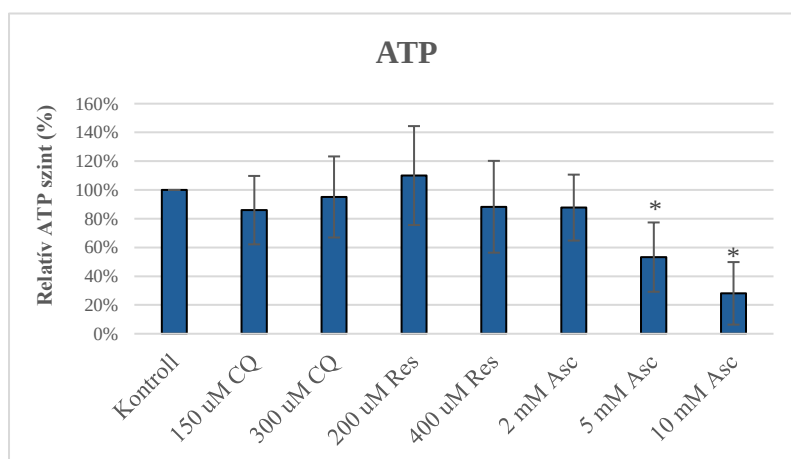
Mindezek alapján szeretnénk volna megvizsgálni, hogy a kutatócsoportunk által korábban vizsgált, a Ph-ASC-tal szinergikus citotoxicitást mutató másik két kezelőszer, a CQ és a RES milyen hatással van a sejtek NAD^+ és ATP szintjére, valamint, hogy ezek befolyásolhatóak-e a PARP1 fehérje gátlásával, hiszen azt kimutattuk, hogy mindhárom kezelőszer okoz DNS károsodást. A kezeletlen sejtekhez képest szignifikáns változást tapasztaltunk az ATP/ NAD^+ szintekben az 5 és 10 mM ASC kezelés során (**30. ábra**), a PARP gátló Olaparib nem befolyásolta a mért életképességeket, hasonlóan Buranasudja és munkatársai eredményeihez (Buranasudja et al., 2019). A korábbi MTT-assay-k eredményei alapján azonban ekkora koncentrációban a farmakológiai aszkbát 24 órás kezelés esetén teljesen megöli a sejteket, sőt kisebb, 2 mM-os koncentrációban is, ahol még nem jelentkezik az ATP/ NAD^+ szintek csökkenése, ami tovább erősíti azt a megállapítást, hogy a nagy dózisú aszkbát kezelés kiváltotta sejthalál folyamatában nem a bioenergetika felborulása játssza a központi szerepet.

A CQ és RES kezelések esetén az ATP/NAD⁺ szintekben nem tapasztaltunk szignifikáns változást, még a 24 órás kezelésnél alkalmazott koncentrációk többszörösénél sem (**30. ábra**), és a PARP gátlószer, Olaparib sem befolyásolta az életképességet.

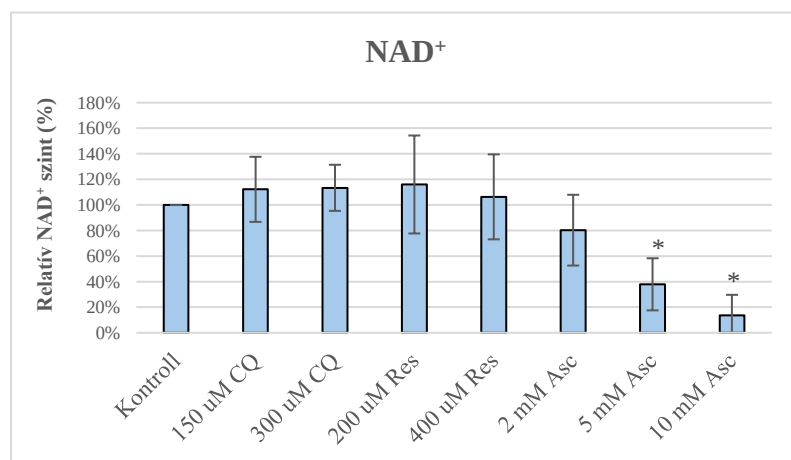
Menadion esetében az ATP és NAD⁺ szintet MIA PaCa-2 sejtek 2, 4, 6 és 24 órás, 10-30 µM koncentrációjú kezelése után mértük. Ezek egyike során sem tapasztaltunk szignifikáns csökkenést sem az ATP, sem a NAD⁺ kontrollhoz viszonyított szintjében, tehát a CQ-hoz és RES-hoz hasonlóan a menadion is okoz DNS károsodást, de ez nem vezet a sejtek bioenergetikájának felborulásához.

Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy annak ellenére, hogy mind a három kezelőszer DNS károsodást okoz, csak a Ph-ASC befolyásolja a sejtek bioenergetikai állapotát és ebben az esetben sem ez az oka a sejthalálnak, így megállapíthatjuk, hogy a szinergia háttérben a bioenergetikai változások nem játszanak szerepet.

A



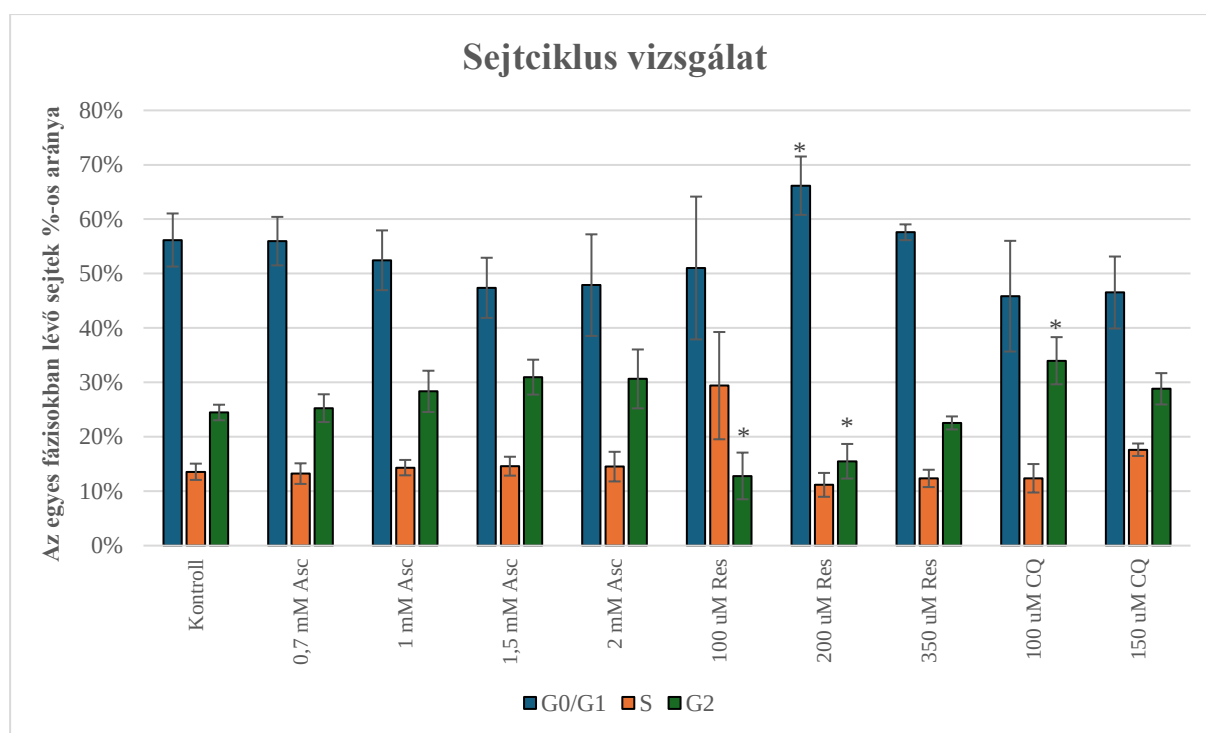
B



30. ábra: Sejtek ATP (A) és NAD⁺ (B) szintjének változása 2 órás kezelések hatására MIA PaCa-2 sejteken. Az ábrázolt értékek a kezeletlen kontrollhoz viszonyított százalékos értékek (átlag +/- szórás, n=3). *: szignifikáns eltérés (0,05 > p) a kezeletlen kontrolltól.

5.6. Menadion, RSL3 és H₂O₂ hatása a sejtciklusra

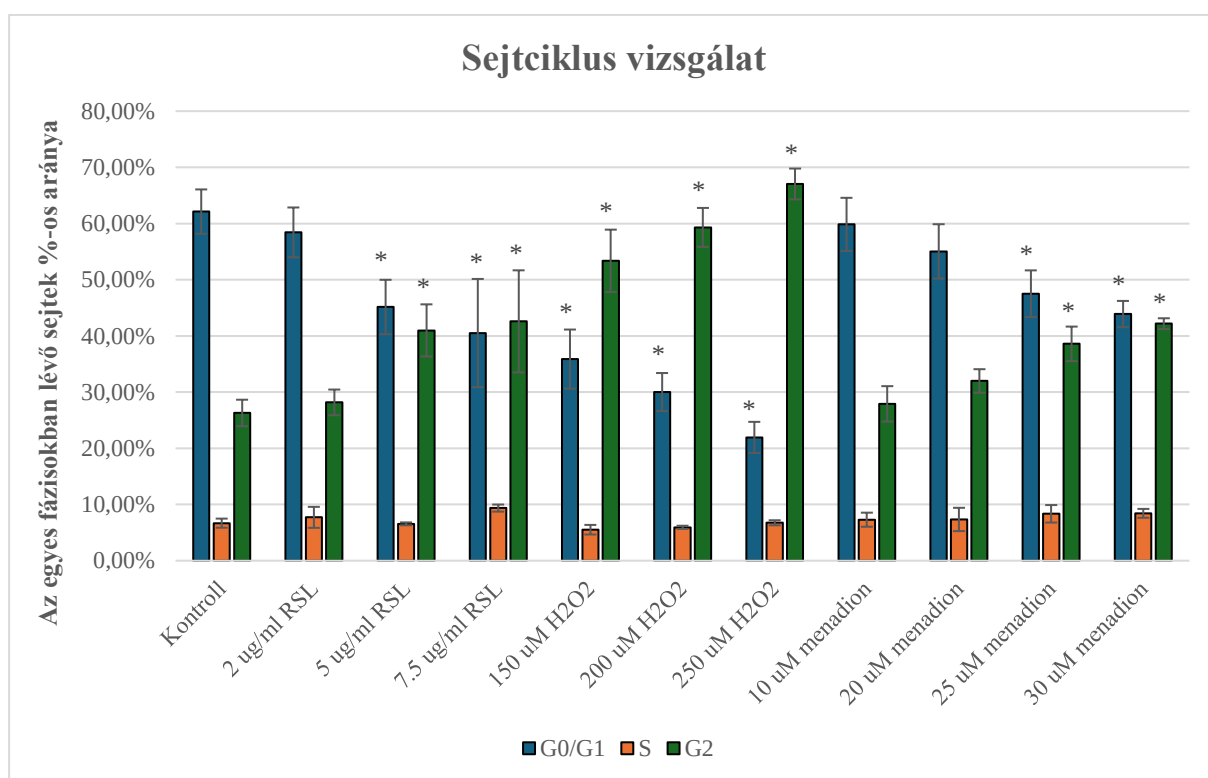
Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy a CQ és RES kezelések hatására leáll a sejtosztódás, míg Ph-ASC kezelés hatására nem. CQ kezelés esetén a G2 fázisú sejtpopuláció növekszik, míg a G0/G1 fázisú sejtpopuláció csökken, a RES kezelés hatása jelentősen függ a koncentrációtól, abban a koncentrációtartományban, ahol a RES sejthalált vált ki a G0/G1 fázisú sejtpopuláció növekedését és a G2 fázisú sejtpopuláció csökkenését okozza (Makk-Merczel et al., 2024) (31. ábra).



31. ábra: A sejtciklus eloszlásban bekövetkező változások MIA PaCa-2 sejtek 24 órás kezelését követően. A sejtek FxCycle reagenssel történő festése után a sejtciklus eloszlást áramlós citométer segítségével határoztuk meg. Az ábrázolt adatok a kontrollhoz viszonyított százalékos értékek (átlag +/- szórás, n=3). *: szignifikáns eltérés (0,05 > p) a kezeletlen kontroll adott fázisához képest (Makk-Merczel et al., 2024).

A sejtciklus leállítását tehát a Ph-ASC-on kívül mindegyik másik alkalmazott kezelőszer (RES, CQ, menadion, RSL3, H₂O₂) esetében sikerült kimutatnunk (32. ábra), különbséget közöttük abban találtunk, hogy a sejtek a ciklus melyik fázisában ragadtak meg a kezelés hatására. Míg a RES a G0/G1 fázisban lévő sejtek arányának megemelkedését és a G2-ben lévő sejtek arányának csökkenését váltotta ki, addig a CQ, RSL3, H₂O₂ és a menadion a G0/G1 fázisban lévő sejtek arányának csökkenését és a G2-ben lévő sejtek arányának növekedését váltotta ki. Érdekes módon a Ph-ASC és a H₂O₂ hatása - a ROS mérésnél tapasztalathoz hasonlóan - eltért, annak ellenére, hogy a Ph-ASC citotoxikus hatását a keletkező H₂O₂-nak tulajdonítják. A H₂O₂

jelentős sejtciklus leállást okozott, míg a Ph-ASC nem befolyásolta a sejtciklust. Ennek oka lehet, hogy az aszkorbát egyenletesebb ROS szintet tud fenntartani, mint a H_2O_2 , ami hirtelen, pillanatok alatt okoz egy nagy ROS képződést. Gondoljunk bele, hogy a H_2O_2 egy bomlékony anyag, amit számos enzim bont (kataláz, GPX-ek), egy kezdeti oxidatív stresszt követően gyorsan eliminálásra kerül, míg a Ph-ASC folyamatos, de kisebb mértékű oxidatív stresszt (H_2O_2 és $OH\cdot$ szintet) képes fenntartani azáltal, hogy folyamatosan redukálja az átmeneti fémionokat, így hosszú ideig fentartva a Fenton-reakciót. Más hatást váltanak ki a ROS-ok, ha néhány percig, illetve, ha több órán keresztül vannak jelen a sejtekben. Ezen kívül az aszkorbát más folyamatokat is befolyásolhat, jóval komplexebb hatása lehet, mint egy egyszerű H_2O_2 -nek. Erre jó példa, hogy kutatócsoportunk korábbi vizsgálataiban semlegesítette a ferroptózis induktorok hatását (Lőrincz et al., 2019).



32. ábra: A sejtciklus eloszlásban bekövetkező változások MIA PaCa-2 sejtek 24 órás RSL3, H_2O_2 , menadion kezelését követően. A sejtek FxCycle reagenssel történő festése után a sejtciklus eloszlást áramlásos citométer segítségével határoztuk meg. Az ábrázolt adatok a kontrollhoz viszonyított százalékos értékek (átlag $\pm$ szórás, $n=3$). *: szignifikáns eltérés ($0,05 > p$) a kezeletlen kontroll adott fázisához képest.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az oxidatív stressz kiváltotta sejthalál kontrollálása kívánatos, mivel számos betegség patomechanizmusában szerepet játszik a túlzott mértékű oxidatív stressz indukálta sejthalál (neurodegeneratív betegségek, diabetes, veseelégtelenség, kardiomiopátia), ugyanakkor a tumorsejtek fokozott oxidatív stressz érzékenysége miatt az oxidatív stresszt kiváltó anyagok fontos terápiás szerepet is játszhatnak.

Kutatócsoportunk korábban vizsgálta a farmakológiai aszkorbát, a rezveratrol és a klorokin citotoxikus hatását különböző KRAS mutációt hordozó PDAC sejtvonalakon. Megállapítottuk, hogy a három kezelőszernek szinergikus citotoxikus hatása van a vizsgált sejtvonalakon. Mind a farmakológiai aszkorbát, mind a rezveratrol kettős szálú DNS-töréseket okozott, de a két kezelőszer mechanizmusa eltérő lehet.

Jelen kutatás célja a szinergikus citotoxikus hatás hátterében álló mechanizmus további tanulmányozása volt, amelyhez a fent említett kezelőszerek okozta hatásokat és sejthalál mechanizmusokat vizsgáltuk és hasonlítottuk össze további ismert oxidatív stresszt kiváltó szerekkel, mint a menadion, RSL3 és a H_2O_2 .

A H_2O_2 képződését, és az ezt követő Fenton-reakciót tartják döntő részben felelősnek a nagy dózisú aszkorbát citotoxicitásáért, szeretnénk volna ennek a két ágensnek a hatását összehasonlítani, illetve az általuk kiváltott Fenton-reakciót részletesebben körüljárni.

A kezelőszerek kiváltotta oxidatív stressz nyomon követésére DCF és BODIPY fluoreszcens festékeket alkalmaztunk. Eredményeink szerint a CQ és a RES citotoxicitásában feltehetően nem a fokozott ROS-termelés játszik szerepet, míg CQ kezelés esetén a ROS szint nem növekedett és az antioxidáns NAC sem védte ki a sejthalált, addig RES kezelés után ugyan a ROS szint emelkedését tapasztaltuk, azonban a NAC ennek ellenére sem védte ki a sejthalált. Ph-ASC és menadion kezelést követően mind a ROS-szint, mind a lipidperoxidáció szintje növekedett, és mindkét esetben hatékonyan kivédhető a sejthalál NAC kezeléssel, azonban egyik esetben nem védik ki a sejthalált a ferroptózis specifikus gátlószerei vagy az apoptózis inhibitor Z-vad-FMK és egyik esetben sem aktiválódott a kaszpáz-3 enzim. Eredményeink alapján a Ph-ASC és a menadion okozta sejthalálban számos hasonló elem megtalálható és mindkettő oxidatív alapú, de nem ferroptózis vagy apoptózis.

A Ph-ASC-on kívül mindegyik kezelőszer (RES, CQ, RSL3, menadion, H_2O_2) sejtciklus-leállást okoz, abban azonban különböznek, hogy a sejtek a ciklus melyik fázisában ragadtak

meg a kezelés hatására. Míg a RES a G0/G1 fázisban lévő sejtek arányának megemelkedését és a G2 fázisban lévő sejtek arányának csökkenését okozta, addig a CQ, RSL3, H₂O₂ és menadion a G0/G1 fázisban lévő sejtek arányának csökkenését és a G2 fázisban lévő sejtek arányának növekedését váltotta ki.

Az egyes kezelőszerek okozta DNS károsodás vizsgálata során a Chk1 és a H2AX fehérjék foszforilációját néztük Western Blot módszerrel. Korábbi eredményeink mellett, melyek szerint a Ph-ASC és a RES DNS károsító hatással rendelkezik (Makk-Merczel et al., 2024), kimutattuk, hogy a CQ, menadion, H₂O₂ és RSL3 is okoz DNS károsodást. A Ph-ASC, RES és CQ szinergikus citotoxikus hatást mutat PDAC sejtvonalakon (Makk-Merczel et al., 2024), eredményeink alapján a vizsgált paraméterek (DNS károsítás, sejtciklus-leállás, bioenergetikai változások, ROS képződés és lipidperoxidáció) közül az egyetlen mindhárom esetben közös elem a DNS-károsodás, így a szinergikus citotoxikus hatásuk hátterében vélhetően ez áll. A jövőben szeretnénk a DNS-károsodást Tunel-assay segítségével is vizsgálni, annak reményében, hogy a szinergikus citotoxikus hatás kialakításában feltehetően szerepet játszó DNS károsodásról más módszerek révén is megbizonyosodhatunk.

Buranasudja és munkatársai a farmakológiai aszkbát okozta sejthalált vizsgálva megállapították, hogy a Ph-ASC kezelés DNS károsodást okoz, aminek során a sejtek NAD⁺ és ATP szintje leesik, ennek oka a PARP1 DNS-javító fehérje növekedett aktivitása révén fokozódó felhasználás, de ez a bioenergetikai változás a Ph-ASC toxicitásának csupán másodlagos tényezője, sejthalált kiváltó hatását úgy tűnik, hogy elsősorban a DNS károsodás okozza (Buranasudja et al., 2019). Ezeket az eredményeket alátámasztottuk, mind azzal, hogy a PARP gátlószer Olaparib nem tudja kivédeni a Ph-ASC okozta sejthalált, mind azzal, hogy az ASC-ot megfelelő koncentrációban alkalmazva a sejthalál kiváltható a NAD⁺ és ATP szintek csökkenése nélkül. CQ, RES és menadion kezelés hatására nem tapasztaltunk NAD⁺ vagy ATP szint csökkenést, annak ellenére, hogy szintén okoznak DNS-károsodást.

Kutatásunk során azt tapasztaltuk, hogy a MIA PACa-2 sejtvonalon a gyakran alkalmazott RSL3 ferroptózis induktor, nem vált ki ferroptózist, a kiváltott sejthalál során nem tapasztaltuk a ferroptózisra jellemző lipidperoxidációt, és a specifikus ferroptózis inhibitorok sem tudták kivédeni a sejthalált. Mindezen megfigyeléseink erősen megkérdőjelezzik a vizsgált sejtvonal ferroptózis érzékenységét, amely magyarázhatná a tumortípus kemoterápiás kezeléseknél esetében mutatott erős rezisztenciáját. Tekintve, hogy az RSL3 ferroptózis-indukáló szerepét a GPX4 enzimet gátló hatásának tulajdonítják, a jövőben szeretnénk vizsgálni a GPX4 enzim

expresszióját a MIA PaCa-2 sejtvonalon, hiszen ettől nagy mértékben függhet egy sejtvonal ferroptózisra való érzékenysége. Ezen kívül Zekun Lu és munkatársai úgy találták, hogy a hasnyálmirigy tumorokban, így MIA PaCa-2 sejtekben is gyakran fokozottan expresszált SETD8 hiszton-metiltranszferáz enzim, gátolhatja a ferroptózist (Lu et al., 2023), ami szintén magyarázat lehet arra, hogy a MIA PaCa-2 sejtvonal miért nem érzékeny a ferroptózis induktor RSL3-ra.

A Ph-ASC és a H_2O_2 okozta sejthalál több tulajdonságban is eltértek a méréseink során, annak ellenére, hogy a Ph-ASC citotoxikus hatását a keletkező H_2O_2 -nak tulajdonítják. A Ph-ASC kezelés okozott lipidperoxidációt, míg H_2O_2 kezelés után ezt nem tapasztaltuk, emellett a H_2O_2 jelentős sejtciklus leállást okozott, de a Ph-ASC nem befolyásolta a sejtciklust. Ennek oka lehet, hogy az aszkorbát egyenletesebb, de alacsonyabb ROS szintet tud fenntartani, mint a H_2O_2 , ami rövid idő alatt, de nagy ROS képződést okoz. A H_2O_2 egy bomlékony anyag, amit számos enzim bont (kataláz, GPX-ek), egy kezdeti oxidatív stresszt követően gyorsan eliminálásra kerül, míg a Ph-ASC folyamatos, de kisebb mértékű oxidatív stresszt (H_2O_2 és $OH\cdot$ szintet) képes fenntartani azáltal, hogy redukálja az átmeneti fémionokat, így hosszú ideig fentartva a Fenton-reakciót. Más hatást váltanak ki a ROS-ok, ha néhány percig percig, illetve, ha több órán keresztül vannak jelen a sejtekben. Ezen kívül az aszkorbát más folyamatokat is befolyásolhat, jóval komplexebb hatása lehet, mint egy egyszerű H_2O_2 -nek. Erre jó példa, hogy kutatócsoportunk korábbi vizsgálataiban semlegesítette a ferroptózis induktorok hatását (Lőrincz et al., 2019).

A dolgozatban bemutatott, eredmények rávilágítanak arra, hogy a különböző oxidatív sejthalál útvonalak pontos mechanizmusa még korántsem tisztázott, az irodalmi adatok alapján várttól eltérő eredmények tovább erősítik a meglátást, miszerint a sejthalál folyamatok igen komplexek, sok tényezőtől függhetnek, többek között a sejtípustól, így ezek további kutatása elengedhetetlen a lejátszódó biokémiai folyamatok, valamint az egyes betegségekben betöltött szerepük mélyrehatóbb megismeréséhez.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Szarka Andrásnak, valamint konzulensemnek, Varga Dórinak, hogy részt vehettem a kutatócsoport munkájában, és hogy szakmai iránymutatásukkal, türelmükkel és építő jellegű tanácsaikkal támogattak a TDK dolgozatom elkészítése során.

Köszönettel tartozom kollégáimnak Makk-Merczel Kingának, Hajdinák Péternek és Podhragyi Viktornak, hogy korábbi kutatási eredményeiket felhasználhattam a dolgozat írása során, valamint, hogy segítséget nyújtottak a laboratóriumi munkámhoz és mindvégig tapasztalati tanácsokkal segítették munkámat.

IRODALOMJEGYZÉK

- Agalakova, N. I. (2024). Chloroquine and Chemotherapeutic Compounds in Experimental Cancer Treatment. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 25, Issue 2). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms25020945>
- An, X., Yu, W., Liu, J., Tang, D., Yang, L., & Chen, X. (2024a). Oxidative cell death in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities. *Cell Death & Disease*, 15(8), 556. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06939-5>
- An, X., Yu, W., Liu, J., Tang, D., Yang, L., & Chen, X. (2024b). Oxidative cell death in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities. *Cell Death & Disease*, 15(8), 556. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06939-5>
- Baek, M. W., Cho, H. S., Kim, S. H., Kim, W. J., & Jung, J. Y. (2017). Ascorbic Acid Induces Necrosis in Human Laryngeal Squamous Cell Carcinoma via ROS, PKC, and Calcium Signaling. *Journal of Cellular Physiology*, 232(2), 417–425. <https://doi.org/10.1002/JCP.25438>
- Berretta, M., Bignucolo, A., Di Francia, R., Comello, F., Facchini, G., Ceccarelli, M., Iaffaioli, R. V., Quagliariello, V., & Maurea, N. (2020). Resveratrol in cancer patients: From bench to bedside. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21082945>
- Buranasudja, V., Doskey, C. M., Gibson, A. R., Wagner, B. A., Du, J., Gordon, D. J., Koppenhafer, S. L., Cullen, J. J., & Buettner, G. R. (2019). Pharmacologic Ascorbate Primes Pancreatic Cancer Cells for Death by Rewiring Cellular Energetics and Inducing DNA Damage. *Molecular Cancer Research: MCR*, 17(10), 2102–2114. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-19-0381>
- Cheung, E. C., & Vousden, K. H. (2022). *The role of ROS in tumour development and progression*. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00435-0>
- Consoli, V., Fallica, A. N., Sorrenti, V., Pittalà, V., & Vanella, L. (2024). Novel Insights on Ferroptosis Modulation as Potential Strategy for Cancer Treatment: When Nature Kills. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 40, Issue 1, pp. 40–85). Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/ars.2022.0179>

- Daenen, K., Andries, A., Mekahli, D., Schepdael, A. Van, Jouret, F., & Bammens, B. (2019). *Oxidative stress in chronic kidney disease*. <https://doi.org/10.1007/s00467-018-4005-4>
- D'Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43(6), 582–592. <https://doi.org/10.1002/CBIN.11137>
- Darenskaya, M. A., Kolesnikova, L. I., & Kolesnikov, S. I. (2021). Oxidative Stress: Pathogenetic Role in Diabetes Mellitus and Its Complications and Therapeutic Approaches to Correction. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 171(2), 179–189. <https://doi.org/10.1007/S10517-021-05191-7>
- Dasari, S., Ali, S. M., Zheng, G., Chen, A., Dontaraju, V. S., Bosland, M. C., Kajdacsy-Balla, A., & Munirathinam, G. (2017). Vitamin K and its analogs: Potential avenues for prostate cancer management. *Oncotarget*, 8(34), 57782. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.17997>
- Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., Patel, D. N., Bauer, A. J., Cantley, A. M., Yang, W. S., Morrison, B., & Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 149(5), 1060–1072. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.03.042/ATTACHMENT/E8897E57-DD16-46D4-9958-4E9DDF67519C/MMC2.PDF>
- Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 2003 3:1, 3(1), 11–22. <https://doi.org/10.1038/nrc969>
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. In *Physiological Reviews* (Vol. 82, Issue 1, pp. 47–95). American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
- Fu, X., Li, M., Tang, C., Huang, Z., & Najafi, M. (2021). Targeting of cancer cell death mechanisms by resveratrol: a review. In *Apoptosis* (Vol. 26, Issues 11–12, pp. 561–573). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10495-021-01689-7>
- Fukui, M., Yamabe, N., Choi, H. J., Polireddy, K., Chen, Q., & Zhu, B. T. (2015). Mechanism of Ascorbate-Induced Cell Death in Human Pancreatic Cancer Cells: Role of Bcl-2, Beclin 1 and Autophagy. *Planta Medica*, 81(10), 838–846. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1546132>

- Girolimetti, G., Balena, B., Cordella, P., Verri, T., Eusebi, L. H., Bozzetti, M. P., Bucci, C., & Guerra, F. (2024). Characterization of Chemoresistance in Pancreatic Cancer: A Look at MDR-1 Polymorphisms and Expression in Cancer Cells and Patients. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(15). <https://doi.org/10.3390/ijms25158515>
- Gorrini, C., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2013). Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 12, Issue 12, pp. 931–947). <https://doi.org/10.1038/nrd4002>
- Gul, S., Maqbool, M. F., Maryam, A., Khan, M., Shakir, H. A., Irfan, M., Ara, C., Li, Y., & Ma, T. (2022). Vitamin K: A novel cancer chemosensitizer. In *Biotechnology and Applied Biochemistry* (Vol. 69, Issue 6, pp. 2641–2657). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/bab.2312>
- Hangauer, M. J., Viswanathan, V. S., Ryan, M. J., Bole, D., Eaton, J. K., Matov, A., Galeas, J., Dhruv, H. D., Berens, M. E., Schreiber, S. L., McCormick, F., & McManus, M. T. (2017). Drug-tolerant persister cancer cells are vulnerable to GPX4 inhibition. *Nature*, 551(7679), 247–250. <https://doi.org/10.1038/NATURE24297>
- Hayes, J. D., & Dinkova-Kostova, A. T. (2014). The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(4), 199–218. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2014.02.002>
- Hayes, J. D., Dinkova-Kostova, A. T., & Tew, K. D. (2020). Oxidative Stress in Cancer. In *Cancer Cell* (Vol. 38, Issue 2, pp. 167–197). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.06.001>
- He, L., Dinger, B., Gonzalez, C., Obeso, A., & Fidone, S. (2006). Function of NADPH Oxidase and Signaling by Reactive Oxygen Species in Rat Carotid Body Type I Cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 580, 155–160. https://doi.org/10.1007/0-387-31311-7_23
- <https://theory.labster.com/mtt-assay/>. (n.d.).
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W. W., Fong, H. H. S., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G., Moon, R. C., & Pezzuto, J. M. (1997). Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes. *Science*, 275(5297), 218–220. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.275.5297.218>

- Jay Forman, H., & Zhang, H. (2021). Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00233-1>
- Juarez-Facio, A. T., de Lagarde, V. M., Monteil, C., Vaugeois, J. M., Corbiere, C., & Rogez-Florent, T. (2021). Validation of a Fast and Simple HPLC-UV Method for the Quantification of Adenosine Phosphates in Human Bronchial Epithelial Cells. *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 6324, 26(20), 6324. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26206324>
- Kassouf, W., Highshaw, R., Nelkin, G. M., Dinney, C. P., & Kamat, A. M. (2006). Vitamins C and K3 sensitize human urothelial tumors to gemcitabine. *The Journal of Urology*, 176(4 Pt 1), 1642–1647. <https://doi.org/10.1016/J.JURO.2006.06.042>
- Klaunig, J. E. (2019). Oxidative Stress and Cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 24(40), 4771–4778. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190215121712>
- Laux, I., & Nel, A. (2001). Evidence that oxidative stress-induced apoptosis by menadione involves Fas-dependent and Fas-independent pathways. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, 101(3), 335–344. <https://doi.org/10.1006/CLIM.2001.5129>
- Lei, G., Zhang, Y., Koppula, P., Liu, X., Zhang, J., Lin, S. H., Ajani, J. A., Xiao, Q., Liao, Z., Wang, H., & Gan, B. (2020). The role of ferroptosis in ionizing radiation-induced cell death and tumor suppression. *Cell Research*, 30(2), 146–162. <https://doi.org/10.1038/S41422-019-0263-3>
- Letelier, M. E., Sánchez-Jofré, S., Peredo-Silva, L., Cortés-Troncoso, J., & Aracena-Parks, P. (2010). Mechanisms underlying iron and copper ions toxicity in biological systems: Pro-oxidant activity and protein-binding effects. *Chemico-Biological Interactions*, 188(1), 220–227. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2010.06.013>
- Li, S., Tan, H.-Y., Wang, N., Zhang, Z.-J., Lao, L., Wong, C.-W., & Feng, Y. (2015). *The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases*. <https://doi.org/10.3390/ijms161125942>
- Lismont, C., Revenco, I., & Fransen, M. (2019). Peroxisomal Hydrogen Peroxide Metabolism and Signaling in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences* 2019, Vol. 20, Page 3673, 20(15), 3673. <https://doi.org/10.3390/IJMS20153673>

- Liu, Y., Wang, Y., Liu, J., Kang, R., & Tang, D. (2020). Interplay between MTOR and GPX4 signaling modulates autophagy-dependent ferroptotic cancer cell death. *Cancer Gene Therapy* 2020 28:1, 28(1), 55–63. <https://doi.org/10.1038/s41417-020-0182-y>
- Liyuan Wang, X. C. C. Y. (2020). Ferroptosis: An emerging therapeutic opportunity for cancer. *Genes & Diseases*.
- Lőrincz, T., Holczér, M., Kapuy, O., & Szarka, A. (2019). The Interrelationship of Pharmacologic Ascorbate Induced Cell Death and Ferroptosis. *Pathology and Oncology Research*, 25(2), 669–679. <https://doi.org/10.1007/s12253-018-0539-9>
- Lőrincz, T., Jemnitz, K., Kardon, T., Mandl, J., & Szarka, A. (2015). Ferroptosis is Involved in Acetaminophen Induced Cell Death. *Pathology and Oncology Research*, 21(4), 1115–1121. <https://doi.org/10.1007/s12253-015-9946-3>
- Lu, Z., Hu, Q., Qin, Y., Yang, H., Xiao, B., Chen, W., Ji, S., Zu, G., Wang, Z., Fan, G., Xu, X., & Chen, X. (2023). SETD8 inhibits ferroptosis in pancreatic cancer by inhibiting the expression of RRAD. *Cancer Cell International*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12935-023-02899-6>
- Luo, X., & Lee Kraus, W. (2012). On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1. *Genes & Development*, 26(5), 417. <https://doi.org/10.1101/GAD.183509.111>
- Ma, E., Chen, P., Wilkins, H. M., Wang, T., Swerdlow, R. H., & Chen, Q. (2017). Pharmacologic ascorbate induces neuroblastoma cell death by hydrogen peroxide mediated DNA damage and reduction in cancer cell glycolysis. *Free Radical Biology & Medicine*, 113, 36–47. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2017.09.008>
- Makk-Merczel, K., Varga, D., Hajdinák, P., & Szarka, A. (2024a). The interlacing anticancer effect of pharmacologic ascorbate, chloroquine, and resveratrol. *BioFactors*. <https://doi.org/10.1002/biof.2050>
- Makk-Merczel, K., Varga, D., Hajdinák, P., & Szarka, A. (2024b). The interlacing anticancer effect of pharmacologic ascorbate, chloroquine, and resveratrol. *BioFactors*. <https://doi.org/10.1002/biof.2050>
- Matthias B. Stope. (2021). *Phosphorylation of histone H2A.X as a DNA-associated biomarker*. <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/wasj.2021.102>

- Mishra, M., Tiwari, S., & Gomes, A. V. (2017). Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. *Expert Review of Proteomics*, 14(11), 1037–1053. <https://doi.org/10.1080/14789450.2017.1388167>
- Mitchell, J. S., & Simon-Reuss, I. (1947). Combination of some effects of x-radiation and a synthetic vitamin K substitute. *Nature*, 159(4055), 98–99. <https://doi.org/10.1038/160098A0>
- Oberley, L. W. (1988). Free radicals and diabetes. *Free Radical Biology & Medicine*, 5(2), 113–124. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(88\)90036-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(88)90036-6)
- Park, W., Wei, S., Kim, B. S., Kim, B., Bae, S. J., Chae, Y. C., Ryu, D., & Ha, K. T. (2023). Diversity and complexity of cell death: a historical review. In *Experimental and Molecular Medicine* (Vol. 55, Issue 8, pp. 1573–1594). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01078-x>
- Perillo, B., Di Donato, M., Pezone, A., Di Zazzo, E., Giovannelli, P., Galasso, G., Castoria, G., & Migliaccio, A. (2020). ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. In *Experimental and Molecular Medicine* (Vol. 52, Issue 2, pp. 192–203). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0384-2>
- Rahib, L., Smith, B. D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A. B., Fleshman, J. M., & Matrisian, L. M. (2014). Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Research*, 74(11), 2913–2921. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0155>
- Rasheed, S., Nelson-Rees, W. A., Toth, E. M., Arnstein, P., & Gardner, M. B. (1974). CHARACTERIZATION OF A NEWLY DERIVED HUMAN SARCOMA CELL LINE (HT-1080) PERMANENT CELL LINES FROM ANIMAL TISSUES. *Cancer*, 33, 1027–1033. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197404\)33:4](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197404)33:4)
- Ren, X., Santhosh, S. M., Coppo, L., Ogata, F. T., Lu, J., & Holmgren, A. (2019). The combination of ascorbate and menadione causes cancer cell death by oxidative stress and replicative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 134, 350–358. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.037>
- Rochette, L., Zeller, M., Cottin, Y., & Vergely, C. (2014). Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(9), 2709–2729. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2014.05.017>

- Sajadimajd, S., & Khazaei, M. (2017). Oxidative Stress and Cancer: The Role of Nrf2. *Current Cancer Drug Targets*, 18(6), 538–557. <https://doi.org/10.2174/1568009617666171002144228>
- Saleh, E. A. M., Al-dolaimy, F., Qasim almajidi, Y., Baymakov, S., kader M, M. A., Ullah, M. I., Abbas, A. hussien R., Khlewee, I. H., Bisht, Y. S., & Alsaalamy, A. H. (2023). Oxidative stress affects the beginning of the growth of cancer cells through a variety of routes. In *Pathology Research and Practice* (Vol. 249). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2023.154664>
- Sasaki, N., Gomi, F., Hasegawa, F., Hirano, K., Fujiwara, M., Toyoda, M., & Ishiwata, T. (2020). Characterization of the metastatic potential of the floating cell component of MIA PaCa-2, a human pancreatic cancer cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 522(4), 881–888. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2019.11.120>
- Shen, S., Shao, Y., & Li, C. (2023). Different types of cell death and their shift in shaping disease. In *Cell Death Discovery* (Vol. 9, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01581-0>
- Szarka, A., Lőrincz, T., & Hajdinák, P. (2022). Friend or Foe: The Relativity of (Anti)oxidative Agents and Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9). <https://doi.org/10.3390/IJMS23095188>
- Van Der Reest, J., Lilla, S., Zheng, L., Zanivan, S., & Gottlieb, E. (2018). Proteome-wide analysis of cysteine oxidation reveals metabolic sensitivity to redox stress. *Nature Communications* 2018 9:1, 9(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04003-3>
- Varga, D., Hajdinák, P., Makk-Merczel, K., & Szarka, A. (2022). The Possible Connection of Two Dual Function Processes: The Relationship of Ferroptosis and the JNK Pathway. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 11004, 23(19), 11004. <https://doi.org/10.3390/IJMS231911004>
- Vervandier-Fasseur, D., & Latruffe, N. (2019). The potential use of resveratrol for cancer prevention. In *Molecules* (Vol. 24, Issue 24). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules24244506>
- Wolin, M. S. (2009). The Robert M. Berne Distinguished Lecture: Reactive oxygen species and the control of vascular function. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 296(3), H539. <https://doi.org/10.1152/AJPHEART.01167.2008>

- Woods, J. A., Young, A. J., Gilmore, I. T., Morris, A., & Bilton, R. F. (1997). Measurement of Menadione-Mediated DNA Damage in Human Lymphocytes Using the Comet Assay. *Free Radical Research*, 26(2), 113–124. <https://doi.org/10.3109/10715769709097790>
- Yang, W. S., & Stockwell, B. R. (2008). Synthetic Lethal Screening Identifies Compounds Activating Iron-Dependent, Nonapoptotic Cell Death in Oncogenic-RAS-Harboring Cancer Cells. *Chemistry & Biology*, 15(3), 234–245. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMBIOL.2008.02.010>
- Yoshino, J., & Imai, S. I. (2013). Accurate measurement of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) with high-performance liquid chromatography. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1077, 203. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-637-5_14
- Yunis, A. A., Arimura, G. K., & Russin, D. J. (1977). HUMAN PANCREATIC CARCINOMA (MIA PaCa-2) IN CONTINUOUS CULTURE : SENSITIVITY TO ASPARAGINASE. In *Int. J. Cancer* (Vol. 19).
- Zhang, J., Wang, B., Yuan, S., He, Q., & Jin, J. (2022). The Role of Ferroptosis in Acute Kidney Injury. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9. <https://doi.org/10.3389/FMOLB.2022.951275>
- Zhao, R. Z., Jiang, S., Zhang, L., & Yu, Z. Bin. (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 44(1), 3–15. <https://doi.org/10.3892/IJMM.2019.4188>