

# Mitokondriális mechanizmusok szerepe a dezetil-amiodaron daganatellenes hatásában

**Ramadan H. J. Fadi**

témavezető:

Dr. Bognár Zita MD. Ph.D.



**Ph.D. Értekezés**

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Programvezető:

Prof. Dr. Gallyas Ferenc PhD, DSc.

Doktori Iskola vezetője:

Prof. Dr. Gallyas Ferenc, PhD, DSc.

**Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet**

**Általános Orvostudományi Kar**

**Pécsi Tudományegyetem**

2023



## Tartalomjegyzék

1	Bevezetés .....	5
1.1	Daganatos megbetegedések .....	5
1.1.1	Bőrrák.....	5
1.1.2	Breast Cancer .....	6
1.2	Tumor terápia.....	6
1.2.1	Kemoterápia.....	6
1.2.2	Célzott és Immunterápiák.....	7
1.2.3	Kemoterápia rezisztencia.....	7
1.2.4	A gyulladással összefüggő Kemoterápia Rezisztencia .....	7
1.3	Mitokondriumok .....	7
1.3.1	Mitokondriális apoptotikus utak.....	8
1.4	Kis molekulák terápiás szerepe .....	8
1.5	Desethylamiodarone (DEA).....	9
2	Célkitűzések .....	10
3	Eredmények és Diskusszió 1.0 .....	11
3.1	Eredmények 1.0.....	11
3.1.1	A DEA hatása a B16F10 melanomasejtek életképességére .....	11
3.1.2	DEA kolónia képződésre gyakorolt hatása.....	11
3.1.3	A DEA apoptózis indukáló mhatásának vizsgálata B16F10 sejteken .....	11
3.1.4	A DEA hatása a sejtciklusra B16F10 sejtekben .....	11
3.1.5	A DEA hatása a mitokondriális membrán (MM) permeabilizációjára B16F10 sejtekben.....	12
3.1.6	A DEA membránpotenciálra gyakorolt hatása $\Delta\Psi_m$ .....	12
3.1.7	A DEA mitokondriális fragmentációra gyakorolt hatása B16F10 melanoma sejtvonalon.....	12

3.1.8	A DEA mitokondriális energiametabolizmusra gyakorolt hatása B16F10 melanoma sejtvonalon.....	12
3.1.9	A DEA hatása az mPT-re ép B16F10 melanoma sejtekben.....	13
3.1.10	A DEA hatása a tüdőmetasztázis kialakulására in vivo modellben .....	13
3.2	Diszkusszió 1.0.....	14
3.3	Eredmények 2.0.....	17
3.3.1	DEA által indukált apoptotikus sejthalál emlőrák sejtvonalakban .....	17
3.3.2	A DEA mérsékelte a mellrák sejtvonalak invazív növekedését.....	17
3.3.3	A DEA sejthalál folyamatára gyakorolt hatásának vizsgálata emlőrák sejtvonalakban .....	18
3.3.4	DEA indukálta mitokondriális membránelolarizáció ( $\Delta\Psi_m$ ) .....	18
3.3.5	DEA által indukált mitokondriális fragmentáció a emlő tumor sejtvonalakban.....	18
3.3.6	A COX-2 gátlás fokozta a DEA daganatellenes hatását a TN emlő tumor sejtvonalon.....	19
3.3.7	A DEA hatása a kolóniaképződésre MCF-7 és 4T1 sejtvonalakon .....	19
3.4	Diszkusszió 2.0.....	19
4	Következtetések.....	23
5	Publikációk .....	24
6	Köszönetnyilvánítás .....	24

# 1 Bevezetés

## 1.1 Daganatos megbetegedések

A daganatos megbetegedés világszerte a második vezető halálok, a szív- és érrendszeri megbetegedések után. 2022-ig körülbelül 1,9 millió új esetet és 600 000 halálesetet regisztráltak az Egyesült Államokban, 2040-re pedig 27,5 millió új esetet jósolnak világszerte. Ezért-e betegségtípus komoly egészségügyi veszélyt jelent az emberek számára. A tumorok olyan betegségek, ahol a sejtek szöveti szinten kontrollálatlanul növekednek, változnak és szaporodnak, ami miatt a specifikus diagnózis és kezelés a mai napig nagy kihívást jelent.

Eddig már több mint százféle rákfajtát azonosítottak. A férfiaknál a tumorok leggyakoribb típusai a prosztatata-, tüdő-, vastagbél-, húgyhólyagrák és a melanoma. A nőknél ezzel szemben a tumorok prevalenciája a legmagasabb az emlő-, tüdő-, vastagbél-, méhtrákból és melanomából. Különböző tényezők játszanak szerepet a rák kialakulásában, beleértve a belső tényezőket, például a hormonokat, a genetikát és az immunrendszer állapotát. Vagy / és a főként rákkeltő anyagokként ismert külső tényezők, például vegyszerek, azbeszt, arzén, sugárzás, dohány és mások.

Általában a rák több genetikai rendellenességgel jellemezhető asztatikus betegség, amely idővel újabb és újabb mutációkat szenved el. Ezek a mutációk magukban foglalják a sejtosztódásért és -növekedésért felelős onkogének állandó aktiválását, vagy pedig a tumorszuppresszor gének inaktiválását, ami kontrollálatlan sejtosztódáshoz vezet. Ezen kívül a rákos sejtek megkerülik a negatív sejtproliferációs útvonalakat, főleg az apoptózist.

A daganatterápia általában kemoterápiával vagy műtéttel, célzott besugárzással és/vagy immunterápiával kezdődik. Ma úgy látjuk, hogy az új terápiás lehetőségek, mint a célzott és immunológiai terápiák hatékonyabbak, mint a korábban alkalmazott kezelések, mivel ezek már célzottan az adott daganat ellen szólnak. Ezzel együtt a tumor ellenes gyógyszerekkel szembeni rezisztencia továbbra is növekszik.

### 1.1.1 Bőrrák

Az emberi bőr 3 fő rétegből áll: az epidermiszből, a dermiszből és a hypodermisből. Az epidermisz, a legkülső réteg különböző sejtípusokból áll, beleértve a melanocitákat és a keratinocitákat, ezeknek a sejtípusoknak bármilyen hibája bőrrákhoz vezethet. Az Egyesült Államokban a rákos betegek közel felénél bőrrákot diagnosztizáltak, ami az egyik leggyakoribb rákfajta. A bőrrák egyik fő típusa: a melanoma, amely a melanociták bőrdaganata, évente közel 132 000 új esetet regisztrálnak, és ez az összes bőrrák 4%-át teszi ki. A bőrrákos halálozások 75%-át szintén a melanoma okozza, ami a bőrrák leghalálosabb formájává teszi, és a világ hat leggyakoribb rákkal összefüggő halálozásának egyik oka. Másik fő típus pedig a nem melanóma bőrrák (NMSC), amely a keratinocita sejtekből származó bőrrák. Évente csaknem 2-3 millió új

megbetegedést jelentenek világszerte, ami az egyik legtöbbször diagnosztizált rosszindulatú daganatos megbetegedések közé sorolja, az összes bőrrákos eset 95%-át ez a daganattípus adja.

### 1.1.2 Breast Cancer

Az emlőrák általában emlőszövetből, a lebenyekből vagy a tejesatornák belső falából indul ki. Jelenleg az emlőrák a leggyakrabban diagnosztizált ráktípus az összes rákos megbetegedés között, különösen a nők körében. Az Egyesült Államok 2022-es statisztikái szerint a Kr. e. a 4. rákos halál oka világszerte mindkét nemből, és a 2. rákhalál oka a nők körében. A BC több mint 2,2 millió új esetet és körülbelül 685 000 új halálesetet jelent. A korai stádiumú BC, amely a mellre korlátozódik vagy a hónalj nyirokcsomóira terjed, gyógyítható. Míg az előrehaladott BC, amelyet metasztázisok és a környező szervek behatolása jellemez, nem gyógyítható, de a tünetek szabályozása és az élet meghosszabbítása szempontjából kezelhető. Számos kockázati tényező vezethet a BC-hez, többek között a nem, a dohányzás, a sugárzás, a genetikai történelem, a genetikai mutációk, az életkor, a vegyszerek, a gyógyszerek. A BC két fő típusa, a hormonreceptor-pozitív (progeszteronreceptor (PR) vagy ösztrogénreceptor (ER)-pozitív) és hármass negatív emlőrák (ER, PR és humán epidermális növekedési faktor receptor-2 (HER2)-negatív).

## 1.2 Tumor terápia

A közelmúltban a rákkutatás és az orvosi kutatások fő célja új módszerek kidolgozása a rák kezelésére. Így a kiválasztott kezelés a rák típusától, elhelyezkedésétől, a daganat méretétől, a progresszió stádiumától függ, figyelembe véve a nem tumoros sejtekre gyakorolt hatásukat is.

### 1.2.1 Kemoterápia

A kemoterápia a diagnózis után a leggyakrabban alkalmazott terápia a tumorok kezelésére műtét előtt vagy után. A kemoterápia bármely tumorellenes (citotoxikus) gyógyszer (nem specifikus) alkalmazása. A kemoterápiás szerek általában a sejt DNS-ét/vagy a sejtosztódásban szerepet játszó folyamatokat veszik célba, hogy elpusztítsák a gyorsan osztódó rákos sejteket, beleértve sajnos, a daganatot körülvevő normál sejteket is. A kemoterápiás szerek különböző csoportjait a hatásmechanizmustól függően osztályozták, beleértve az alkilező ágenseket, topoizomerázokat, mikrotubulus célzó ágenseket, antimetabolitokat és antibiotikumokat.

Sajnos ezeknek a gyógyszereknek súlyos mellékhatásai vannak, beleértve a hajhullást, az étvágytalanságot, a fertőzések megnövekedett esélyét, a vérzést, az idegi szövődeményeket és a fáradtságot. A célzott, kizárólag a daganatos sejtek ellen feljlesztett szerek, antitestek vagy specifikus sejtfelszíni inhibitorok fejlesztése és alkalmazása hatékonyabb kezelési lehetőségeket nyithat.

### 1.2.2 Célzott és Immunterápiák

A célzott terápia olyan antitestek, kis molekulájú inhibitorok vagy orális gyógyszerek alkalmazása, amelyek valamilyen módon módosíthatják a rákos sejteket, és korlátozott hatással vannak a normál sejtekre. Az immunterápia ezzel szemben a páciens saját természetes védekező rendszerének – az immunrendszernek – a rák elleni küzdelemben való felhasználásán alapul. Ennek ellenére egyetlen célzott terápia vagy kemoterápia sem 100%-ban hatékony, mivel a rákos sejtek változnak és rezisztenciát szereznek a rendelkezésre álló gyógyszerekkel szemben.

### 1.2.3 Kemoterápia rezisztencia

A rákos sejtek különböző mechanizmusok révén menekülnek el és állnak ellen a terápiás szereknek, ezt gyógyszerrezisztenciának nevezzük. Az rezisztenciának két fő típusa ismert: a primer/intrinsik és a szerzett rezisztencia. Az intrinsik rezisztencia egyrészt az, amely már a terápia megkezdése előtt megvolt a rákos sejtekben, például bizonyos gének mutációja. A szerzett, másodlagos rezisztencia az a folyamat, amelyben a rákos sejtek a rákellenes szerekkel végzett hosszan tartó kezelés következtében szerzett rezisztenciát alakítanak ki. Ez az eset áll fenn, ha a rákos sejtek pozitív választ mutatnak a terápiákra a kezelés első szakaszában, de később rezisztensé válnak.

### 1.2.4 A gyulladással összefüggő Kemoterápia Rezisztencia

Az immunrendszer fontos szerepet játszik a rák kezelésében; azonban a gyulladás rák progressziójának és a gyógyszerrezisztencia kialakulásnak is indikátora lehet. Egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy a kemoterápia által kiváltott gyulladás felelős lehet a kemorezisztencia és az áttétek emlőrákban. A gyulladást a tumorok kulcsjellemezőjének tekintik, különösen a krónikus gyulladást, ahol a rosszindulatú daganatok kockázata tipikusan emelkedik. Valójában a ciklooxygenáz-2 (COX-2) enzim egyike azon enzimeknek, amelyek a kezelése során kialakuló akut gyulladásból krónikus gyulladássá alakítják a folyamatokat.

Figyelembe véve azonban a rákos gyógyszerrezisztencia összes mechanizmusát és tényezőjét; Az apoptózis hiánya kulcsszerepet játszik a rákterápiával szembeni rezisztenciában, mivel az apoptózis hiánya a daganatok egyik legfőbb jellemzője.

## 1.3 **Mitokondriumok**

A mitokondriumokat, amelyeket évszázadok óta a sejtek dinamikus erőműveiként ismertek, a sejt egyik legfontosabb intercelluláris anyai öröklött organellumának tartják. A mitokondriumok két fő membránt tartalmaznak, a külső és a belső membránt, amelyeket intermembrán tér választ el egymástól a mitokondriumok belsejében a matrix található. A külső mitokondriális membrán (OMM) fehérje alapú pórusokat tartalmaz az ionok és a nagy molekulák áthaladásához. Míg a belső membrán szűkebb, főleg az elektrontranszport lánc található benne, ahol adenosin-trifoszfát

(ATP) keletkezik. A mitokondriális mátrix citromsavciklust és egyéb anyagcsereútvonalakat tartalmaz, melyek redukált kofaktorok termelnek a légzési lánc számára. Összefoglalva, a mitokondriumok elengedhetetlenek az ATP-termeléshez, a metabolikus jelátvitelhez, a redox homeosztázishoz, valamint a proliferációhoz és az apoptotikus útvonal szabályozásához. A mitokondriumok metabolikus változásai azonban számos betegséggel, köztük a rákkal is összefüggésbe hozhatók. Megjegyzendő, hogy a mitokondriumok szabályozzák az intrinsic apoptózist, amely az egyik legfontosabb útvonal a sejtek homeosztázisának fenntartásában, hiánya gyakran daganatos megbetegedéskehez vezet. A mitokondriumok, mint terápiás célpontok a rákellenes gyógyszerek fejlesztőinek új stratégiai célpontjaivá váltak.

### 1.3.1 Mitokondriális apoptotikus utak

Az apoptózis (programozott sejthalál) a sejthalál egy erősen szabályozott formája a normál sejtpopuláció fenntartása érdekében. Az apoptotikus útvonalak egyik szabályozási zavara a karcinogenezis. Az apoptózis két fő útja: intrinsic út, más néven mitokondriális apoptózis, amely különböző fehérjecsaldokat foglal magában, beleértve a BCL-2-t, a csak BH3-fehérjék családját, a kaspáz-9-et, az Akt-t, az apoptotikus indukáló faktort (AIF) és másokat. Ezt a fajta apoptózist számos szignál indukálja, mint például DNS-károsodás, mitogének elvesztése, reaktív oxigénfajta (ROS) szintjének növekedése, kemoterápiás szerek, citokróM C (Cyt c) és kalcium ( $Ca^{2+}$ ) túlterhelés a mitokondriumokban. Az extrinsic útvonal viszont magában foglalja a sejtfelszíni halál receptor FAS-asszociált death domain protein (FADD) vagy tumor nekrozis faktor (TNF) receptor tagjait külső szignálok, például gyógyszerek, hormonok és/vagy patogén effektorok által. A downstream kaspáz-8 és a Bid fehérje aktiválása, amely szerepet játszhat a két apoptotikus út közötti áthallásban. Ennek megfelelően mindkét út apoptózist indukáló hatását az effector kaspáz-3 downstream aktivációja indítja el.

## 1.4 Kis molekulák terápiás szerepe

2001-ben a tirozin-kináz inhibitor (TKI) volt az első kis molekula, amelyet az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hatósága (FDA) hagyott jóvá. Jelenleg már 42 kis rákellenes FDA általi jóváhagyása történt meg. A kis molekulák iránt nagy az érdeklődés és az igény a rák kezelésben, annak ellenére, hogy a makromolekulák, különösen a monoklonális antitestek felhasználása is jelentős. A kismolekulák előnyei az alacsony költségek, farmakokinetikai tulajdonságok, gyógyszer tárolás és -szállítás, kedvező betegcompliance, felszívódási mód, és ami még fontosabb hatásmechanizmusuk, a jelátvitel gátlása. Ezen kívül a kis molekulák sejtmembránján és vér-agy gátján is könnyebben áthatolnak, mint a makromolekuláké, ami az antitestek felhasználásának pl. egyik korlátja.



## 1.5 Desethylamiodarone (DEA)

Napjainkban nagy érdeklődés övezi a kis molekulájú célzott gyógyszereket hatékonyságuk, költségük, tárolásuk, szállításuk és farmakokinetikai tulajdonságaik miatt. Így a mono-N-dezetilamiodaron (Desethylamiodarone-DEA), egy kis farmakológiailag aktív vegyület, a széles körben használt antiarrhythmias gyógyszer, az Amiodaron (AM) fő metabolitja. Az AM (2-butyl-3-benzofuranil-4-[2-(diethylamino)-etoxy]-3,5-dijód-fenil-ke-ton-hidroklorid) az FDA által jóváhagyott III. osztályú antiaritmias gyógyszer különféle szívbetegségek kezelésére, beleértve a kamrai és szupraventrikuláris aritmiákat. Általában az AM 5,7  $\mu\text{M}$ -nál kisebb ajánlott szérumszintet terápia dózis, szájon át adva, felezési ideje 14-59 nap. Az AM metabolizmusa a májban és a bélfalban oxidáz-függő oxidatív deetilációval megy végbe citokróm p450 (CYP3A) által, mely reakció terméke a DEA.

A DEA hasonló elektrofiziológiai hatással bír, mint az AM, ahol mindkettő az akcióspotenciál időtartamának meghosszabbításán dolgozik azáltal, hogy blokkolja a  $\beta$ -adrenerg receptorokat, a nátrium- és az L-típusú kalciumcsatornákat. Mind az AM, mind a DEA erősen kötődik a plazmafehérjékhez, azonban a DEA szérumszintje magasabb, mint az AM szérumszintje a hosszú távú AM kezelés során 1,7-4,5  $\mu\text{M}$ , illetve 1,6-5,3  $\mu\text{M}$  eliminációja felezési ideje miatt körülbelül 40 nap. Az AM aktivitása nekrotikus sejthalált, míg a DEA apoptotikus útvonalakat aktivál. A DEA lipofil szerkezetének köszönhetően; nagymértékben felhalmozódik (magasabb, mint az AM) a bőrben, a májban, a tüdőben, a szívizomban, a pajzsmirigyben, a hasnyálmirigyben, de nem a zsírszövetben. Különböző toxikus mellékhatások korlátozzák a hosszú távú AM-terápiát, ideértve a máj-, bőr-, szív-, tüdő-, pajzsmirigy-, szem- stb. kezelést. Annak a ténynek köszönhetően, hogy a DEA és az AM nagymértékben halmozódik a szövetekben az AM-kezelés után, ami száz vagy több lehet. ezerszer magasabb, mint a plazmakoncentráció. Ezáltal a DEA toxikus hatásaira és szöveti felhalmozódási tulajdonságaira alapozva javasolták a rákterápiában való potenciálját.

## 2 Célkitűzések

A történelem során a rák elsősorban a kisebbségek betegsége volt, azonban az utóbbi időben az emberi populáció többségében a morbiditás és halálozás vezető okává vált. Következésképpen a rákkutatási és -kezelési kísérletek folyamatosan bővülnek, hogy megtervezzék, azonosítsák és leírják a kezelést célzó különböző ráktípusok célpontjait, mechanizmusait és útvonalait. Valójában a rengeteg rákkutatásból származó információk fényében arra törekszünk, hogy a DEA-t többféle ráktípusra vizsgáljuk. A dolgozat két részre tagolódik, amelyek szorosan összefüggenek, mivel a bőr- és mellrák kezelésének kísérleti adataival foglalkoznak.

- A DEA tumor ellenes hatásának vizsgálata B16F10 metasztatikus melanoma sejtekben, és in vivo tüdőmetasztázis modellen. In vitro sejt életképességet, a sejtciklus szabályozását, az apoptózist, a reaktív oxigénfajták (ROS) képződését, a kolónia formációt, és a mitokondriális folyamatokat, beleértve a mitokondriális légzésiláncot, a mitokondriális permeabilitási átmenetet (mPT) és a mitokondriális membránpotenciált ( $\Delta\Psi_m$ ) vizsgáltuk.
- A DEA in vitro celluláris és mitokondriális hatásának tanulmányozása és összehasonlítása különböző emlő tumor sejteken. Beleértve a sejthalált, a sejtmigrációt, a mitokondriális légzőláncot, a mitokondriális dinamikát és fragmentációt, a mitokondriális membránpotenciált ( $\Delta\Psi_m$ ). vizsgáltuk a TNBC sejtek DEA kezelés során aktiválódó rezisztencia mechanizmusait.

### **3 *Eredmények és Diskussió 1.0***

#### **3.1 *Eredmények 1.0***

##### 3.1.1 *A DEA hatása a B16F10 melanomasejtek életképességére*

A DEA B16F10 sejtekre gyakorolt hatásának áttekintése érdekében egy rövid távú vizsgálatot végeztünk. A sejteket 3-12 órán keresztül 5 vagy 10  $\mu\text{M}$  DEA-val kezeltük, mielőtt az SRB vizsgálattal meghatároztuk életképességüket. A DEA statisztikailag szignifikáns antiproliferatív és sejthalált indukáló hatást fejtett ki a sejteken idő- és koncentrációfüggő módon. Ezért tovább elemeztük a DEA által kiváltott sejthalálhoz hozzájáruló lehetséges útvonalakat. Bár 5  $\mu\text{M}$ -nál és legfeljebb 6 órás inkubálásnál ez a hatás nem érte el a statisztikai szignifikanciát.

##### 3.1.2 *DEA kolónia képződésre gyakorolt hatása*

A kolónia képződés vizsgálata során alacsonyabb gyógyszerkoncentrációt és hosszabb expozíciós időt használtunk. Ennek megfelelően arra törekedtünk, hogy felmérjük a DEA hatását a B16F10 sejtek kolóniaképző képességére. A sejteket 0-3  $\mu\text{M}$  DEA-val kezeltük 7 napig, majd a > 0,5 mm-es telepeket megszámloltuk. Mint azt tapasztaltuk, a DEA szignifikánsan csökkentette a telepek számát és méretét még a legalacsonyabb alkalmazott koncentráció mellett is. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a DEA sejthalált indukálhat, és alacsony mikromoláris koncentrációknál gátolja a kolóniaképződést.

##### 3.1.3 *A DEA apoptózis indukáló mhatásának vizsgálata B16F10 sejteken*

A sejthalál különböző mechanizmusú lehet, elsősorban nekrozis vagy apoptózis. Érdekel bennünket a DEA által kiváltott sejthalál módozatának vizsgálata. Ehhez áramlási citometriát használtunk a Muse™ Annexin V & Dead Cell Assay segítségével. Megfigyeltük, hogy a DEA dózisfüggő módon növelte a teljes apoptózis arányát. A teljes apoptózis aránya  $34,61 \pm 2,17\%$  5 és  $73,71 \pm 3,12\%$  10  $\mu\text{M}$  DEA esetében, szemben a kontroll  $10,11 \pm 1,97\%$ -kal. Alacsonyabb DEA-koncentrációnál a korai apoptózis aránya meghaladta a későiét, magasabb koncentrációnál azonban a késői apoptózis dominált

##### 3.1.4 *A DEA hatása a sejtciklusra B16F10 sejtekben*

A DEA korlátozza a B16F10 sejtek proliferációját azáltal, hogy túlnyomórészt apoptotikus sejthalált indukál. A sejthalál és sejtosztódás nettó eredménye azonban a sejtburjánzás. Így sejtciklus-analízist végeztünk a proliferáció másik aspektusának tanulmányozására. Azt találtuk, hogy a G0/G1 fázisban lévő sejtek százalékos aránya  $56,75 \pm 1,73\%$ -ról (0  $\mu\text{M}$ ) fokozatosan  $63,9 \pm 1,94\%$ -ra (5  $\mu\text{M}$ ) és  $75,91 \pm 2,67\%$ -ra (10  $\mu\text{M}$ ) nőtt. Ugyanakkor az S és G2/M fázisú sejtek százalékos aránya csökkent. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a DEA mindkét koncentrációban sejtciklus leállást indukált a G0/G1 fázisban, ami hozzájárulhat a B16-F10 sejtproliferációra gyakorolt általános gátló hatásához.

### 3.1.5 A DEA hatása a mitokondriális membrán (MM) permeabilizációjára B16F10 sejtekben

Felmértük a DEA hatását az MM integritására a Cyt c, Opa1, AIF, Bad, hasított kaszpáz-3 és Akt expressziójára, lokalizációjára és aktivációjára gyakorolt hatásának meghatározásával. Ennek érdekében 6 órán át tartó, különböző koncentrációjú DEA-val kezelt B16F10 melanoma sejtekből teljes sejthomogenizátumot, illetve ezzel párhuzamosan mag- és citoplazmatikus frakciókat készítettünk, majd immunblot analízisnek vetettük alá. 10  $\mu\text{M}$  koncentrációban a DEA koncentrációfüggő módon növelte a Bad egyensúlyi szintjét és csökkentette a Bad foszforilációját. Mindkét hatás pro-apoptotikus irányba tolja el az egyensúlyt. Ennek megfelelően a DEA indukálja a kaszpáz-3 hasítását, valamint a Cyt c és az Opa1 felszabadulását az AIF citoszoljába és nukleáris transzlokációját. Ezenkívül 10  $\mu\text{M}$  DEA csökkentette az Akt foszforilációt anélkül, hogy befolyásolta volna az enzim egyensúlyi szintjét. Ezek az adatok azt mutatták, hogy a DEA MM permeabilizációt okozott.

### 3.1.6 A DEA membránpotenciálra gyakorolt hatása $\Delta\Psi_m$

Membránpotenciál-függő fluoreszcens festéket, a JC-1-et használtuk, amely pozitív töltése miatt a mitokondriumokban halmozódik fel. A sejteket 3 órás DEA kezelést követően vizsgáltuk. A > 5  $\mu\text{M}$  DEA-val végzett kezelés jelentősen depolarizálta az intakt B16F10 melanomasejtek mitokondriumait.

### 3.1.7 A DEA mitokondriális fragmentációra gyakorolt hatása B16F10 melanoma sejtvonalon

A  $\Delta\Psi_m$  változása mitokondriális fragmentációt eredményez, ami felveti annak lehetőségét, hogy a DEA-kezelés is ilyen hatást vált ki. Ennek a lehetőségnek a tesztelésére konfokális fluoreszcens mikroszkópiát végeztünk DEA-val kezelt B16F10 melanomasejteken, amelyeket átmenetileg transzfektáltunk mitokondrium-céltott vörös fluoreszcens fehérjét (mtRFP) expresszáló vektorral. A 3 órás kezelés 10  $\mu\text{M}$  DEA-val a 25  $\mu\text{M}$  ciszplatin által okozott mitokondriális fragmentációt eredményezett. Bár az 5  $\mu\text{M}$  DEA-val végzett kezelés általában növelte a mitokondriális fragmentációt, a kontrolltól való eltérés nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét.

### 3.1.8 A DEA mitokondriális energiametabolizmusra gyakorolt hatása B16F10 melanoma sejtvonalon

Tekintettel arra, hogy a DEA-kezelés depolarizálta a  $\Delta\Psi_m$ -t, amely az ATP szintézis egyik fő meghatározója, a következő lépésben megvizsgáljuk a DEA-kezelés hatását a B16F10 sejtek energiaanyagcseréjére. A Seahorse XF Cell Mito Stress Test segítségével monitoroztuk a sejt oxigénfogyasztási arányát (OCR), amely a mitokondriális légzés indikátora, és az extracelluláris savasodási rátát (ECAR), amely az aerob glikolízis mutatója élő B16F10 melanomasejtekben. A sejteket 5 vagy 10  $\mu\text{M}$  DEA-val kezeltük 3 órán keresztül, majd 75 percig monitoroztuk az OCR-t és az ECAR-t. A DEA-kezelés nem befolyásolta szignifikánsan a bazális légzést vagy a protonszivárgást, bár 10  $\mu\text{M}$  DEA az előbbit csökkentette, az utóbbit pedig növelte. Ezzel szemben 10  $\mu\text{M}$  DEA elnyomta a maximális légzést, az ATP-termelést és a kapcsolódási hatékonyságot; ezek közül az utolsó azt jelzi, hogy a légzés milyen szorosan kapcsolódik az ATP szintézishez. A

DEA koncentráció függő módon csökkentette a nem-mitokondriális oxigénfogyasztást és a tartalék légzési kapacitást, akár a maximális és a bazális légzés különbségében, akár arányában kifejezve. Bár nem befolyásolta az alap fermentatív ATP szintézist, a DEA koncentráció függő módon csökkentette a laktát felhalmozódást oligomicin beadása után, jelezve, hogy a gyógyszer befolyásolta a glikolitikus gépezetet, valamint a mitokondriális légzőláncot.

### 3.1.9 A DEA hatása az mPT-re ép B16F10 melanoma sejtekben

Ép élő sejtekben mértük az mPT-t egy 96 lyukú automatizált, nagy tartalmú fluoreszcens képalkotó rendszer segítségével. Ennek megfelelően 5 vagy 10  $\mu\text{M}$  DEA-val vagy 1,5 mM  $\text{CaCl}_2$ -vel (pozitív kontroll) kezelt melanomasejtek kalcein fluoreszcenciáját követtük acetoxi-metil-kalcein,  $\text{CoCl}_2$  és A23187 jelenlétében CsA-val vagy anélkül 3 órán keresztül. Ahogy az várható volt, 10  $\mu\text{M}$  DEA indukálta az mPT-t, amely CsA-független volt. Ezenkívül a megemelkedett  $\text{Ca}^{2+}$ , amelynek sejt felvételét az A23187 elősegíti, hatalmas mPT-t okozott, amely teljesen CsA-függő volt.

### 3.1.10 A DEA hatása a tüdőmetasztázis kialakulására in vivo modellben

A DEA metasztázisképződésre gyakorolt hatásának értékelésére in vivo tüdőmetasztázis modellt alkalmaztunk. Az egér melanoma B16F10 sejteket 6 hetes hím C57BL/6 egerek laterális farokvénájába fecskendeztük, majd két csoportra osztottuk őket (6 egér/csoport). A 25 mg/kg DEA vagy a vivőanyag-kontroll intraperitoneális beadását 24 órával a tumorsejtek beadása után kezdtük, és minden harmadik napon megismételtük. Ennek megfelelően a DEA-kezelés csökkentette a tüdő tömegindexét és a daganatos csomók számát. Ezenkívül kórszövettani elemzést végzett egy szakértő, aki vak volt a hematoxilín és eozin festés utáni tüdőszövet metszeteken végzett kísérletre. Voltak poliedrikus morfológiájú melanoma sejtek, amelyek nagy mennyiségű melanint tartalmaztak citoplazma granulátumként vagy perinukleáris eloszlásban. Emellett minden metszetben megfigyelhető volt az epithelialis melanomára jellemző aberráns noduláris proliferáció a broncho-alveoláris régiókban. A kezeletlen és a DEA-val kezelt állatok között azonban jelentős különbség volt a tumor csomómintázat-eloszlásában és koncentrációjában. A vivőanyaggal kezelt csoportban a csomók jelentős méretűek voltak, és a tüdő parenchyma minden részében eloszlottak. Ezzel szemben a DEA csoportban a tumor csomók sokkal kisebb méretűek voltak, és túlnyomórészt perifériás eloszlásban szerveződtek. A morfológiai megfigyelések számszerűsítésére a Panoramic Viewer Imaging System rendszerrel képanalízist végeztünk véletlenszerűen kiválasztott metszeteken (tüdőnként 6), és kiszámítottuk a daganat területét a tüdőmetszet területének százalékában. Amint azt tapasztaltuk, a tumor területe szignifikánsan csökkent a DEA-val kezelt állatok tüdőszövetében a hordozóval kezelt állatokhoz képest. Ezek az eredmények teljes mértékben összhangban vannak a makroszkópos megfigyelések eredményeivel, és azt jelzik, hogy a DEA in vivo gátolja a melanoma tumor metasztázisát.

## 3.2 Diszkusszió 1.0

A melanoma (metasztatikus) még mindig a bőrrák leghalálosabb formája, és a világ hat leggyakoribb rákkal összefüggő halálozási arányának egyike. Sajnos a melanoma nagyon ellenálló a kemoterápiával szemben, a legtöbb kemoterápiás szer kudarcot vallott a betegek alacsony válaszaránya miatt. Következésképpen ennek a rezisztenciának a fő oka a melanomában az apoptotikus jelátviteli útvonal, a BCL-2 hibájával kapcsolatos. Az irodalom szerint azonban a citosztatikus szerek a G1 leállását és a BCL-2 leszabályozását indukálják. Ez utóbbi hatás a p53 tipikus funkciója, amelyről kiderült, hogy a B16F10 melanomasejtek által expresszált, nem mutált vad típusú P53. Ezzel a véleménnyel egyetértésben a DEA alacsony  $\mu\text{M}$  koncentrációban csökkentette a B16F10 sejtek életképességét és proliferációját azáltal, hogy apoptózist stimuláló faktorként működött. Először a foszfatidil-szerin kimutatásával annexin V pozitív festődésen keresztül, felpörgetti a P53-at, ami sejtciklus leálláshoz vezet a G0/G1 fázisban és a Bad-ban, ami szintén csökkenti a p-Bad-ot. Koncentráció- és időfüggő módon; A DEA jelentős antiproliferatív és pro-apoptotikus hatást fejt ki a B16F10 sejtekre in vitro, ami arra utal, hogy rákellenes szerként is használható a melanoma kezelésében. Ezenkívül az így létrejövő apoptózis valószínűleg mitokondriális mechanizmusokat is magában foglal, amelyek az Opa1, Cyt c és AIF felszabadulásához vezettek a mitokondriumokból.

Melanómák esetén a sejtciklus G1 fázisszabályozói, a D és E típusú ciklinek, a CDK4/6 és a CDK inhibitorok terápiás célpontként működnek. Emiatt meghatároztuk a DEA hatását a sejtciklusra, valamint a metasztázis indukáló markerekre, a ciklin D1-re és CDK2-re, a p53 tumorszuppresszorra, valamint a p21 és p27 sejtciklus inhibitorokra. Amint azt megfigyeltük, koncentrációfüggő módon a DEA csökkentette a sejtproliferációt a G0/G1 fázisban lévő sejtek számának növekedésével, amit a ciklin D1 és CDK2 csökkent steady state szintje, valamint a p21, p27 és p53 szint növekedése kísért. Tekintettel arra, hogy a p53 gén nem mutált a B16F10 sejtekben, a DEA által megfigyelt G1 fázis leállás valószínűleg a p21-en keresztül történt, p53-függő módon.

A melanoma proliferációs rátája és tüdőmetasztázis képződése viszonylag magas. Ebben az esetben telepépzési és invazív növekedési kísérleteket végeztünk, hogy teszteljük a DEA hatását a melanoma migrációs és kolóniaképző képességére. Eredményeink azt mutatták, hogy a DEA a kontrollhoz képest 50% alá csökkentette a kolóniaképződést 2  $\mu\text{M}$  DEA koncentráció mellett hétnapos expozíció alatt. Ezenkívül az 5  $\mu\text{M}$  koncentrációjú DEA 24 órás kezelésen belül megszüntette a melanoma invazív növekedését.

A sejtproliferáció és az apoptózis közötti egyensúly meghatározza a tumor progressziójának sebességét. Ezért kimutatták, hogy az intracelluláris túlélést elősegítő jelátviteli kaszkádok, például a foszfatidil-inozitol-3-kináz/Akt útvonal állandó aktiválása jelentősen fokozza a rák progresszióját. Az Akt, amely konstitutívan aktív melanomában, serkenti a sejtproliferációt és a túlélést azáltal, hogy elnyomja a belső apoptózist és fokozza a sejtciklus előrehaladását. A

különböző daganatok progressziója és rosszindulatú daganata gyakran összefüggésbe hozható az Akt konstitutív aktiválásával, amely számos proapoptotikus fehérjét inaktív foszforilációval, mint például a Bad és a kaszpáz 9 a Ser196-nál. A melanomasejtek invazivitása és áttétképző képessége összefügghet az Akt gyakran megfigyelt magas bazális aktivitásával ezekben a sejtekben. Eredményeink azt mutatták, hogy a B16F10 sejtekben, a B16 egér melanoma erősen invazív variánsában az aktív, foszforilált Akt magas alapszintje dóziszfüggően csökkent a DEA-kezelés hatására. Az Akt aktiválásának ez a csökkenése hozzájárulhat a DEA sejtciklusra és apoptózisra gyakorolt hatásaihoz.

A mitokondriumok aktívan részt vesznek a rák kialakulásának minden szakaszában, beleértve a karcinogenezist, a metasztázisokat, a túlélést, valamint a terápiás rezisztenciát. Fontos, hogy az OMMP jelentős tényező a mitokondriumokhoz kapcsolódó apoptózisban, amelyet a pro- és anti-apoptotikus BCL-2 fehérjecsaldó szabályoz. Az apoptózissal szembeni rákrezisztenciának jellemzően az e fehérjék közötti egyensúly felborulása, a pro-apoptotikus hatás leszabályozása és az anti-apoptotikus BCL-2 felfokozása. Eredményeink szerint a 6 órás DEA-kezelés képes volt OMMP-t indukálni a pro-apoptotikus BCL-2 családtag Bad steady-state aktivációjának fokozásával és foszforilációjának gátlásával. Az OMM permeabilizációja ezután a Cyt c felszabadulását eredményezi a citoszolban, aktiválva a kaszpáz-függő apoptózist a kaszpáz-3 aktiválásával, valamint az AIF felszabadulását a mitokondriumokból a sejtmagba, ahol a kaszpáz-független apoptózisban játszik szerepet. kromatin kondenzációt és DNS fragmentációt indukál. Az AIF felszabadulása azonban az mPT pórusok megnyitásának eredménye lehet, mivel az AIF egy IMS fehérje.

Az mPT pórus az OMM és az IMM között helyezkedik el, kinyitáskor a vízhez és az oldott anyagokhoz legfeljebb 1,5 kDa méretű átjutást képez, ami végül IMS fehérjék, például EndoG, Cyt c és AIF felszabadulásához vezet. Eredményeinkkel teljes összhangban az AIF felszabadulása az mPT pórusok felnyílásának köszönhető, 10  $\mu$ M DEA CsA-független mPT-t eredményez. Ezen túlmenően, a  $Ca^{2+}$ , amely az mPT pórusnyílásának fő oka, CsA-dependens mPT-t indukált, ami több volt, mint amit 10  $\mu$ M DEA indukált. Megjegyzendő, hogy az mPT pórusainak folyamatos megnyitása különböző mitokondriális folyamatok megzavarásához vezet, beleértve a  $\Delta\Psi_m$  elvesztését.

A  $\Delta\Psi_m$  nélkülözhetetlen a sejtek túléléséhez, mivel döntő szerepe van az ATP-termelésben, a ROS-termelésben, a mitokondriális fehérjék szállításában és a hálózati dinamikában, valamint az apoptózis szabályozásában az IMS pro-apoptotikus fehérjék felszabadulásával. Következésképpen az OMMP és mPT pórusnyílások a  $\Delta\Psi_m$  depolarizáció indikátorai. Ebben az esetben kimutattuk, hogy a 3 órás DEA-kezelés depolarizációt és a  $\Delta\Psi_m$  részleges elvesztését váltotta ki. Ennek ellenére az ép  $\Delta\Psi_m$  közvetlenül befolyásolja a mitokondriális dinamikát, főleg a mitokondriális fúziót. A mitokondriális fúzióknak és a hasadásnak egyensúlyban kell lennie, mivel egy bizonyos  $\Delta\Psi_m$  küszöb alatt a fúziós folyamat megszakad. Ennek megfelelően az IMM fúzióját az L-OPA1 fehérje szabályozza, amikor hasított; felszabadul a citoszolba, eredményeink teljes

összhangban, a 6 órás DEA kezelés képes volt OPA1 hasítást és a citoszolba való felszabadulást indukálni, jelezve a fúzió elvesztését, ami szintén hozzájárul a Cyt c felszabadulásához a mitokondriálisból, mivel hatalmas A Cyt c mennyisége a cristae junctionban tárolódik, amelyet szintén az L-OPA1 szabályoz. Ezenkívül a fúzió elvesztése mitokondriális fragmentációhoz vezet, ami a mitokondriális apoptózis és a minőség-ellenőrzés egyik jellemzője, mivel a fragmentált mitokondriumokat a mitofágia eliminálja. A terápia keretében a ciszplatin, a különböző típusú rosszindulatú daganatok kezelésére használt kemoterápiás gyógyszer, mitokondriális fragmentációt vált ki, azonban alkalmazása a nefrotoxicitási mellékhatás miatt még korlátozott. A folyamatról alkotott képünk teljessé tétele érdekében mitokondriális fragmentációs kísérletet végeztünk, és így 3 órán belül a DEA-kezelés mitokondriális fragmentációt váltott ki, amely majdnem megegyezik a pozitív kontroll ciszplatin koncentrációjának kétszeres különbségével. Figyelembe véve, hogy a fúzióhoz sértetlen  $\Delta\Psi_m$  szükséges, és a DEA kompromittált  $\Delta\Psi_m$ -et, úgy tűnik, hogy a DEA elősegíti a mitokondriális fragmentációt azáltal, hogy gátolja a fúziót, ami további vizsgálatokat igényel annak megállapításához, hogy hasadásfüggő vagy független. A későbbi hatás hozzájárulhat a DEA citotoxikus tulajdonságaihoz, hogy korlátozza az in vivo melanoma metasztázisokat

Mint fentebb említettük, az ép  $\Delta\Psi_m$  kritikus szerepet játszik az ATP termelésben. Mivel a rákos sejtek követik a Warburg-effektust, ami megmagyarázza az OXPHOS helyett glikolízis alkalmazását rákos sejtekben ATP-termelésre, a metasztatikus sejtek megnövekedett mitokondriális ATP szintézissel rendelkeznek. Valójában 10  $\mu\text{M}$  DEA-koncentráció gátolta mind a mitokondriális, mind a glikolitikus ATP szintézis utakat, miközben csökkentette a fermentatív glikolízist és a nem mitokondriális oxigénfogyasztást, valamint csökkentette a maximális légzési és kapcsolódási hatékonyságot. A B16F10 sejt energiaanyagcseréjére gyakorolt hatások alapján a DEA ígéretes rákterápiás jelöltként.

Ezzel együtt az in vitro sejtenyésztési kísérletek nagyon rosszul tükrözik a humán tanulmányokat; ezért a terápiás dózist in vivo kell meghatározni. Mivel a metasztázis a rosszindulatú rákos sejtek alapvető tulajdonsága, amellyel egy bizonyos rák a daganat első megjelenési helyéről a test távoli helyeire terjed. A rák áttét általi kiújulása a rákos betegek halálának körülbelül 90%-áért felelős, ami a rákellenes terápia fő célpontjává teszi. A metasztázis egy sor egymást követő lépésben megy végbe, beleértve az inváziót, az intravazációt, a túlélést és a keringési rendszerben történő transzlokációt, az extravazációt és a túlélést egy új szervben. Korlátai között a B16F10 tüdőmetasztázis modell e folyamat lépéseinek többségét utánozza. A 16 napos periódus során több nagy daganatlókus alakult ki a tüdőben, amikor B16F10-et adtak az állatok farokvénájába. Ezek a lókusok a szövetterület közel 30%-át képviselik a tüdőszakaszokban. A DEA mind a tumor lókusok számát, mind méretét csökkentette, és arra a következtetésre jutott, hogy a gyógyszer képes csökkenteni az in vivo metasztázis képződést. Megjegyzendő, hogy a B16F10-et metasztatizáló tulajdonságuk alapján szelektálták, ezért alacsony immunogenitású. A sejtek azonban egér szövettenyésztésből származnak, és nem humán primer tumor eredetűek. Emiatt további vizsgálatokra van szükség, lehetőleg primer humán



melanomák felhasználásával a DEA potenciáljának megállapítására a metasztatikus melanómák terápiájában.

Az ebben a tanulmányban bemutatott adatok *in vitro* és *in vivo* kísérleti bizonyítékot szolgáltatnak a DEA potenciáljára a metasztatikus melanómák terápiájában. A DEA hatásai alapján, amely valóban csökkent a  $\Delta\Psi$ -t; mitokondriális fragmentációt vált ki; csökkent a maximális légzést, az ATP-termelést, a kapcsolódási hatékonyságot, a glikolízist és a nem mitokondriális oxigénfogyasztást; és CsA-független mPT és OMM permeabilizációt indukál. Mindezek a hatások a gyógyszer gyors (3–12 óras) citotoxicitását, valamint a DEA hosszú távú (24–72 óras) citotoxicitását és az *in vivo* metasztázis elnyomó képességét okozhatják.

### 3.3 Eredmények 2.0

#### 3.3.1 DEA által indukált apoptotikus sejthalál emlőrák sejtvonalakban

A DEA antineoplasztikus potenciál jeleit mutatta a B16F10 terápiás rezisztens ráksejtvonalban. Ennek megfelelően értékeltük a TN 4T1 BC vonal sejthalál folyamatára gyakorolt hatását a HR+ MCF-7 vonalhoz képest. Áramlási citometriát használtunk a Muse™ Annexin V & Dead Cell Assay kittel a DEA által kiváltott sejthalál módjának vizsgálatára. A sejteket 5 és 10  $\mu\text{M}$  DEA-val kezeltük 24 órán keresztül az áramlási citometriás analízis előtt. Koncentrációfüggő módon a DEA korai, majd késői apoptózist indukált. Alacsonyabb DEA-koncentrációnál a korai apoptózis aránya meghaladta a későiét; magasabb gyógyszerkoncentráció mellett azonban mindkét BC sejtvonalban a késői apoptózis dominált. A teljes apoptózis aránya azonban  $28,18 \pm 6,34\%$  5 és  $56,05 \pm 5,12\%$  10  $\mu\text{M}$  DEA esetében a 4T1 sejtvonalban, szemben az 5 és  $78,47\%$  10  $\mu\text{M}$  DEA 71,14  $\pm 6,39\%$ -os apoptózisi arányával. Az MCF-7 sejtvonalban megfigyelt DEA, ami azt jelzi, hogy az MCF-7 sejtek érzékenyebbek voltak a DEA-kezelésre, mint a 4T1 sejtek.

#### 3.3.2 A DEA mérsékelte a mellrák sejtvonalak invazív növekedését

A sejtmigrációt, a rák invazivitásának egyik fontos aspektusát gyakran a sebgyógyulási teszt segítségével értékelik, melynek során MCF-7 és 4T1 sejtek félig konfluens monorétegeibe ejtettük a sebet, és kezeltük őket 0, 5 vagy 10  $\mu\text{M}$  DEA-val. 12 óra. A TNBC sejtek sejtmigrációja intenzívebb volt, ami a seb szinte teljes lezárását eredményezte 12 órán belül, míg a HR+ BC sejtvonal körülbelül 40%-os gyógyulást ért el ugyanezen idő alatt. A 10  $\mu\text{M}$  DEA kezelés teljesen megakadályozta a sebgyógyulást a 4T1 sejtvonalban, míg az MCF-7 sejtvonalban a seb szélén elpusztuló sejtek miatt seb súlyosbodását okozta. 5  $\mu\text{M}$  koncentrációnál a DEA-kezelés kevésbé kifejezett hatást váltott ki a sebgyógyulásban, mint 10  $\mu\text{M}$ -nál. A sebgyógyulási vizsgálat kiegészítéseként xCelligence Real-Time Cell Analysis (RTCA) rendszerrel értékeltük az MCF-7 és 4T1 sejtek invazív növekedését. A sejteket 0, 5 vagy 10  $\mu\text{M}$  DEA jelenlétében tenyésztettük 24 órán át, és a sejtek invazív növekedésével arányos sejtindexet valós időben követtük. A DEA koncentrációfüggő módon csökkentette az invazív növekedést mind az MCF-7, mind a 4T1

sejtekben. A sebgyógyulási kísérlet eredményeihez hasonlóan az MCF-7 érzékenyebb volt a gyógyszerre, mint a 4T1.

### 3.3.3 A DEA sejthalál folyamatára gyakorolt hatásának vizsgálata emlőrák sejtvonalakban

Annak érdekében, hogy nagyobb betekintést nyerjünk a DEA által BC sejtvonalakban indukált apoptotikus útvonalakba, elemeztük az Akt aktivációt, a BCL-2 családtagok fehérjeszintjét, beleértve a pro-apoptotikus Bad és Baxot és az antiapoptotikus BCL-2-t, valamint a kaszpáz-3 hasítást és kaszpázt. A PARP -3 által közvetített hasítása, amelyek mind a mitokondriális apoptotikus útvonal riporterei. Az Akt foszforilációja a Ser473-nál koncentrációfüggő módon csökkent, míg a teljes Akt állandó maradt. Ezt a Bad foszforilációs szintjének jelentős csökkenése kísérte a Ser136-nál, miközben a Bad fehérje általános szintje mindkét sejtvonalban állandó maradt. Azt is megállapítottuk, hogy a DEA valóban dóziszfüggő növekedést eredményezett a p53 fehérje mennyiségében a 4T1 sejtekben. A Bax szintek szignifikáns növekedését is mértük, míg a BCL-2 szint csökkent. Továbbá azt találtuk, hogy a DEA-kezelés egy 19 kDa-os kaszpáz-3 hasítási intermedier, valamint a hasított poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) mennyiségének növekedéséhez vezetett. Összességében ezek az adatok azt mutatják, hogy a DEA MCF-7 és 4T1 sejtekre gyakorolt citotoxikus hatása két apoptotikus útvonal, a PI3K/Akt útvonal és a mitokondriális útvonal legalább részleges aktiválásának köszönhető.

Tanulmányoztuk a DEA hatását a COX-2 fehérjeszintre a 4T1 és MCF-7 sejtvonalakban. A TN BC sejtvonalban jelentős steady-state COX-2 szintet detektáltunk, míg a HR+ sejtvonalban alig haladta meg a kimutatási határt. Ezenkívül a DEA koncentrációfüggő módon növelte a COX-2 szintet csak a TN 4T1 sejtvonalban.

### 3.3.4 DEA indukálta mitokondriális membránelolarizáció ( $\Delta\Psi_m$ )

A DEA hatását a BC sejtek  $\Delta\Psi_m$ -ére a pozitív töltésű fluoreszcens mitokondriális festék, a JC-1 segítségével határoztuk meg. Az MCF-7 és 4T1 BC sejtvonalakat 3 órán át 0, 5 vagy 10  $\mu\text{M}$  DEA-val kezeltük, majd JC-1-gyel feltöltöttük és fluoreszcens mikroszkópos felvételeket készítettünk. 10  $\mu\text{M}$  koncentrációnál a gyógyszer mindkét BC sejtvonalban szignifikánsan depolarizálta a mitokondriumokat, míg az 5  $\mu\text{M}$  DEA nem gyakorolt számottevő hatást a  $\Delta\Psi_m$ -re a 3 órás kezelés alatt.

### 3.3.5 DEA által indukált mitokondriális fragmentáció a emlő tumor sejtvonalakban

Fluoreszcens mikroszkóppal tanulmányoztuk a DEA hatását a mitokondriális hálózat dinamikájára, miután a sejteket MitoTracker Red-el töltöttük, hogy megjelenítsük a mitokondriumokat. Az MCF-7 és 4T1 sejteket 0, 5 vagy 10  $\mu\text{M}$  DEA-val kezeltük 3 órán át a mitokondriális fragmentáció értékelése előtt. A DEA-kezelés koncentrációfüggő módon mindkét BC-sejtvonalban mitokondriális fragmentációt okozott. A közelmúltban összefüggést állapítottak

meg a rákos sejtek proliferációja és a mitokondriális fragmentáció között. Ennek megfelelően a fragmentációs kísérlettel azonosan kezelt BC sejtek homogenizátumaiból külön lemezekon végeztük el a mitokondriális fúzió és hasadás szabályozásában részt vevő fehérjék immunoblot analízisét. Mindkét BC-sejtvonalban a DEA-kezelés növelte a fúzióhoz kapcsolódó OPA1 fehérje steady-state szintjét, de csökkentette az MFN 1-et és 2-t a 4T1 sejtekben. Ugyanakkor növelte a hasadáshoz kapcsolódó fehérjék, például a DRP1 és a Fis1 egyensúlyi szintjét.

### 3.3.6 A COX-2 gátlás fokozta a DEA daganatellenes hatását a TN emlő tumor sejtvonalon

Mindkét sejtvonalat 0-15  $\mu\text{M}$  DEA-val kezeltük 24 órán keresztül 20  $\mu\text{M}$  COX-2 inhibitor celecoxib jelenlétében és hiányában, mielőtt az SRB assay segítségével megmértük a sejtek életképességét. A DEA mindkét BC-vonal életképességét idő- és koncentrációfüggő módon csökkentette. Azonban, ahogy az várható volt, a DEA-kezelés okozta életképesség-veszteség magasabb volt az MCF-7-nél, mint a 4T1-sejtvonalnál, ami magasabb kezelési érzékenységet jelez az előbbi sejtvonal esetében. Ha azonban a COX-2-t celecoxib gátolta, a DEA hatása a 4T1 sejtek életképességére szignifikánsan kifejezettebb volt, ellentétben az MCF-7 sejtekkel, ami arra utal, hogy a COX-2 aktiváció hozzájárulhatott a 4T1 sejtek DEA-kezeléssel szembeni rezisztenciájához.

### 3.3.7 A DEA hatása a kolóniaképződésre MCF-7 és 4T1 sejtvonalakon

A COX-2 gátlásának a DEA daganatellenes hatására gyakorolt hatását telepkepzési vizsgálattal tesztelték. Az MCF-7 és 4T1 sejteket 0-2  $\mu\text{M}$  DEA-val kezeltük 5  $\mu\text{M}$  celecoxib jelenlétében vagy hiányában 7 napig, mielőtt számszerűsítettük a telepkepződést. A DEA még 1  $\mu\text{M}$  koncentrációnál is szignifikánsan elnyomta a kolóniaképződést mindkét sejtvonalban. A 4T1 TNBC vonal nagyobb rezisztenciát mutatott a kezeléssel szemben, mivel a 2  $\mu\text{M}$  DEA majdnem kiirtotta az MCF-7 kolóniaképződést, míg a 4T1 telepek képződésében mintegy 50%-os csökkenést indukált. Az életképességi vizsgálathoz hasonlóan azonban 5  $\mu\text{M}$  celecoxib fokozta a DEA 4T1 sejtekre gyakorolt hatását, és a kombinált kezelés az MCF-7 sejtvonalban megfigyelhető közeli mértékben csökkentette a kolóniaképződést ebben a sejtvonalban. Ezzel szemben a celecoxib nem befolyásolta a DEA hatását az MCF-7 kolóniaképzésre.

## 3.4 **Diszkusszió 2.0**

A műtétet követő rendszeres kemoterápia ellenére a daganatsejtek gyakran fennmaradnak, és metasztázisok alakulhatnak ki. Új terápiás stratégiákra van szükség az agresszív daganatokban, köztük a mellrákban, különösen a TNBC-ben szenvedő betegek prognózisának javítására, mivel ezt a ráktípust metasztatikus mintázatokat, agresszivitás és rossz prognózis jellemzi (az összes rákkal kapcsolatos haláleset 5%-a). Az agresszív daganatok ezen kategóriája kiegyensúlyozott anyagcserével rendelkezik, amelyben a mitokondriumok aktívan részt vesznek. A

mitokondriumok részt vesznek a rák kialakulásában, kezdve a karcinogenezistől kezdve a tumor túlélésén és a terápiás rezisztencián keresztül az áttétképződéssel szemben, és a legtöbb ráktípus mitokondriális ATP szintézisére támaszkodik az energiatermeléshez. Ezért a mitokondriális energiatermelést és folyamatokat jelentősen befolyásoló gyógyszerek terápiás értékkel bírhatnak ezekben a daganatokban. A DEA az I. részben bemutatott B16F10 melanomasejtekben kifejtett mitokondriális hatásai alapján teljesíti ezt az elvet. Jelen tanulmányunkban beszámoltunk arról, hogy a DEA alacsony koncentrációja hogyan csökkenti az MCF-7 és 4T1 BC sejtvonalak életképességét koncentrációban és időben. dependens módon, a mitokondriális folyamatok megzavarásával, amit apoptotikus sejthalál követ. Megjegyzendő, hogy az egér 4T1-et használták a humán MDA-MB-231 TNBC sejtvonal helyett, mivel a DEA terápiás dózist a jövőbeni állatkísérletek során meg kell határozni, mivel az in vitro sejttenyésztési kísérletek nagyon rosszul tükrözik az emberi vizsgálatokat.

A mitokondriumok számos mechanizmuson keresztül jelentős szerepet játszanak a sejtek túlélésében, amelyek közül a legfontosabbak az ATP-termelés és a belső apoptózis. Ez utóbbi az ATP-től, mint energiaforrástól függ, míg az energiahány  $\Delta\Psi_m$  veszteséget indukál, ami fokozza a pro-apoptotikus IMS fehérjék felszabadulását a citoszolba, ami apoptózist eredményez [33, 34]. Ezért a DEA mindkét BC-sejtvonalban apoptotikus sejthalált okozott, amit a sejtmembrán külső felületén lévő foszfatidil-szerin-maradékok annexin V-festése, a BCL-2/Bax arány csökkenése, a kaszpáz 3 aktiválása és a sejtek hasítása határoz meg. PARP-1; mindegyik az apoptózis ismertetőjele. TN fenotípusával összhangban a 4T1 sejtvonal kevésbé érzékeny a DEA-kezelésre, mint a HR+ MCF-7 sejtvonal ezekben a kísérletekben.

A TNBC proliferációja és metasztázisok képződése a májban, az agyban és a tüdőben sokkal magasabb, mint más BC típusoknál. Ennek megfelelően azt találtuk, hogy a 4T1 sejtek kevésbé voltak érzékenyek a DEA-kezelésre, mint az MCF-7 sejtek kolóniaképző és invazív növekedési kísérletekben is. Ezen túlmenően az eredmények azt mutatták, hogy a DEA a kontrollhoz képest 50% alá csökkentette a kolóniaképződést 2  $\mu\text{M}$  koncentrációnál hétnapos expozíció alatt, 10  $\mu\text{M}$ -nál pedig megszüntette az invazív növekedést 12 órás kezelés alatt, ami arra utal, hogy a DEA terápiás koncentrációja nem haladhatja meg a humán AM terápia során korábban megfigyelt DEA-koncentrációt.

A sejtek túlélésében az egyik kulcsszerep a mitokondriális hálózat dinamikájának szabályozása, amely egészséges  $\Delta\Psi_m$ -t igényel. Mivel a DEA mindkét BC sejtvonalban csökkentette a  $\Delta\Psi_m$ -et; megzavarná a mitokondriális dinamikát, és így a mitokondriális biogenezist és a minőség-ellenőrzést, amelyek elengedhetetlenek a sejtek energia- és anyagcsere-szükségleteinek kielégítéséhez. A mitokondriális biogenezist a nagy GTPázok által közvetített mitokondriális fúziós és hasadási folyamatok képviselik; MFN 1, 2 és OPA1 a fúzióhoz és Drp1 a hasadáshoz. Ez utóbbit foszforiláció szabályozza, és a Fis1 toborozza a mitokondriumokba. A fúziós és hasadási folyamatok egyensúlyát az intracelluláris jelátvitel tartja fenn, de a fúziót megakadályozzák, ha a  $\Delta\Psi_m$  alacsony. Ezért a mitokondriális fragmentáció gyakori jellemző

számos ráktípusban, például emlő-, vastagbél- és hepatocelluláris karcinómákban. A töredezett mitokondriumok nagyobb valószínűséggel károsodnak és eliminálódnak a mitofág miatt, ami a mitokondriális kópiaszám csökkenéséhez vezet. Ennek megfelelően a DEA mitokondriális fragmentációt okozott mindkét BC-sejtvonalban, ami hozzájárulhat annak rákellenes tulajdonságaihoz. Mivel a DEA depolarizálta a  $\Delta\Psi_m$ -et, a DEA-kezelés által okozott mitokondriális fragmentációt a BC sejtvonalakban a hasadás elősegítése okozta, mivel a Drp1 expressziója megnőtt, és csökkent gátló foszforilációja. A B16F10 melanoma sejtvonalhoz képest; úgy tűnik, hogy a mitokondriális fragmentációt a fúzió gátlása okozta, amit az OPA1 mitokondriumból a citoszolba való felszabadulása támogat. Úgy tűnik, hogy a DEA kölcsönhatásba lép a mitokondriumokhoz kapcsolódó, még azonosítatlan szabályozó elemmel, amely a fúzió és a hasadás egyensúlyának eltolásával mitokondriális fragmentációt indukált. Így a DEA célpontját a mitokondriumban kell lokalizálni, mivel a DEA mitokondriális hasadást indukált izolált, Percoll gradiens-tisztított mitokondriumokban. Previously, we have established the effect of DEA on AKT pathway in B16F10 cells. It is well known that constant activation of AKT signaling pathway is important for cancer progression through promoting cell survival and inhibiting apoptosis. In TNBC, dysregulation of AKT signaling pathways is one of the most frequent oncogenic anomalies. We showed that AKT activation was decreased by DEA in both BC cell lines. Furthermore, phosphorylated AKT level, which is the baseline activation of AKT, in HR+ MCF-7 cell line was significantly lower than in TN 4T1 cells. Since AKT had strong mitochondria-protecting potential; the decreased activation of AKT together with the abovementioned compromised mitochondrial functions may account for the differential apoptosis-promoting effect of DEA among the BC cell lines investigated.

A gyulladáshoz vezető sejtek és faktorok a tumor mikroenvironmentének fő összetevői. A COX-2 a daganatokban található egyik legjelentősebb immunmoduláló faktor, és a legtöbbet vizsgált gyulladásgátló célpont a rákterápiában, mivel nagy daganatmérettel, nyirokcsomó-áttétekkel és gyenge differenciálódással jár együtt. A COX-2 gátló celecoxib alkalmazása a metasztatikus BC terápiájában monoterápiaként és aromatázgátlókkal kombinálva hatékonyan bizonyult a daganat méretének és területének csökkentésével. Jelenleg a COX-2 túlzott expressziója összefüggésbe hozható a BC rákellenes gyógyszerrezisztenciájával. Megjegyzendő, hogy a COX-2 nagymértékben indukálható, és gyorsan felszabályozható a gyulladást elősegítő ágensekre, például a citokinekre válaszul, annak ellenére, hogy az egészséges szövetekben alig expresszálódik. Meglepő módon a COX-2 alig volt kimutatható az MCF-7 sejtvonalban, és a DEA-kezelés sem befolyásolta. A 4T1 TNBC sejtvonalban azonban a COX-2 expresszálódott, sőt meg is emelkedett, ha különböző DEA-koncentrációkkal kezelték. Míg a COX-2 felszabályozása a rákterápiás rezisztenciával kapcsolatos, ez utóbbi eredmény felvetette annak lehetőségét, hogy a DEA csökkentette saját rákellenes hatását a 4T1 sejtvonalban, így létrejött a különbség a két BC sejtvonal között a DEA-ra adott válaszként. Valójában a celecoxib csak a 4T1 sejtek életképességére és telepképzésére fokozta a DEA hatását. A közelmúltban végzett vizsgálatok kimutatták, hogy a sugárterápia által kiváltott apoptózis során a kaszpáz-3 aktiválódik, ami prosztaglandin E2-termelést eredményezett a COX-2 által, ami összefüggésben áll a

kezelésrezisztenciával. Ennek megfelelően a DEA-kezelés mindkét BC sejtvonalban kaspáz-3 aktivációt indukált, de csak a 4T1 sejtvonalban a COX-2 expressziójának fokozását. Úgy tűnik, hogy a DEA által kiváltott kaspáz 3 által asszisztált mitokondriális apoptózis COX-2 által közvetített rezisztenciát eredményezett a 4T1 sejtekben, amelyek ezt kifejezték. Következésképpen a COX-2 expressziójának különbsége, legalábbis részben, felelős a DEA eltérő daganatellenes hatásáért több sejtvonalban. Ezek az eredmények azt is sugallják, hogy a COX-2 gátlókkal történő együttes kezelés növelheti a DEA hatékonyságát és jelentősen csökkentheti a terápiás rezisztenciát.

Eredményeink azt mutatják, hogy a DEA-kezelés képes túlnyomórészt apoptotikus sejthalált indukálni a BC-sejtek mitokondriális funkcióinak modulálásával. A HR+ BC sejtekhez képest alacsony hatékonyság ellenére a DEA a 4T1 TNBC sejtekben is fejtett daganatellenes hatást. Emellett a DEA-val kezelt 4T1 sejtekben a COX-2 fokozódását, mint DEA-rezisztens mechanizmust, a COX-2 enzimaktivitás gátlása ellensúlyozta.

## 4 Következtetések

A rák a második vezető halálok világszerte, ami komoly fenyegetést jelent az emberek számára. Több mint százféle rákfajtát azonosítottak, köztük a bőr- és mellrákot. Ennek megfelelően a kezelési lehetőségeket az észlelt ráktípus és stádium alapján mérlegelik. A megtervezett rákellenes kezelések, a rákos megbetegedések többségénél, különösen az áttéteseknél, az elhúzódó kezelési periódus után nem elegendőek az utána kialakult rezisztencia miatt. Más kezelések korlátozottak voltak mérgező mellékhatásaik miatt. Itt a Desethylamidarone (DEA) bemutatásra kerül. A DEA a jól ismert antiaritmiás FDA által jóváhagyott gyógyszer, az Amiodaron (AM) fő metabolitja.

A tanulmány első részében a DEA munkafolyamatát *in vitro* és *in vivo* metasztatikus melanoma modell segítségével határozták meg. Mivel a metasztatikus melanomát a bőrrák leghalálosabb formájának tartják, és a hat leggyakoribb rákkal kapcsolatos halálozás egyikének tartják világszerte. Következésképpen a DEA fő célpontját *in vitro* azonosították, a belső apoptózist eredményező mitokondriális mechanizmusokat, valamint a melanoma növekedését és metasztázisát gátolta a DEA *in vivo* kezelés. Figyelembe véve a rákellenes gyógyszerek terápiás koncentrációit; A DEA-kezelés sokkal alacsonyabb mind *in vitro*, mind *in vivo*, ami növeli annak esélyét, hogy ígéretes jelölt legyen a metasztatikus daganatok kezelésében.

Ami a rákellenes gyógyszerrezisztenciát illeti, egy nagyon ellenálló ráktípust, a TNBC-t, a kezelhető típussal, a HB+ BC-vel együtt alkalmazták a DEA alacsony kezelési koncentrációi mellett. A két típus összehasonlításával a TNBC kisebb érzékenységet mutatott, mivel a DEA-kezelés fokozódik a gyulladásos COX-2 fehérje expressziójának növelésével. Így a DEA és a COX-2 gátló celecoxib kombinációját alkalmazták, ami szinergikus hatást eredményez, ami közel azonos DEA hatást eredményezett mindkét BC típusban. Összefoglalva, a DEA kombinálható specifikus inhibitorokkal a rezisztens rák kezelésére.

Mivel a DEA az AM fő metabolitja, figyelembe véve, hogy a javasolt biztonsági határokon belül a gyógyszernek nincsenek terápiát korlátozó mellékhatásai, a biztonsági aggályok nem akadályozhatják a DEA klinikai vizsgálatokba történő bevezetését.

## 5 *Publikációk*

- A tézisekben szereplő publikációk:

**Ramadan, Fadi H.J,** et al. “Involvement of Mitochondrial Mechanisms in the Cytostatic Effect of Desethylamiodarone in B16F10 Melanoma Cells.” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 19, 2020, p. 7346., doi:10.3390/ijms21197346. Q1/D1. IF: 5,923

Bognar, Zita, et al. “Amiodarone’s Major Metabolite, Desethylamiodarone Inhibits Proliferation of B16-F10 Melanoma Cells and Limits Lung Metastasis Formation in an in Vivo Experimental Model.” *PLOS ONE*, vol. 15, no. 9, 2020, doi:10.1371/journal.pone.0239088. Q1. IF: 3.24

Gallyas, Ferenc, et al. “Involvement of Mitochondrial Mechanisms and Cyclooxygenase-2 Activation in the Effect of Desethylamiodarone on 4t1 Triple-Negative Breast Cancer Line.” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, no. 3, 2022, p. 1544., doi:10.3390/ijms23031544. Q1/D1. IF: 6.208

- Egyéb publikációk:

Szekeres, Zsolt, et al. “Clinical Study of Metabolic Parameters, Leptin and the SGLT2 Inhibitor Empagliflozin among Patients with Obesity and Type 2 Diabetes.” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 24, no. 5, 2023, p. 4405., doi:10.3390/ijms24054405. Q1/D1. IF: 6.208

## 6 *Köszönetnyilvánítás*

Mindenekelőtt rendkívül hálás vagyok témavezetőmnek, Dr. Bognár Zitának, hogy megosztotta velem tudását és szakmai tapasztalatát, valamint a Ph.D. eléréséhez nyújtott értékelést. Köszönetemet fejezem ki a Biokémia és Orvosi Kémia Tanszék és az Interdiszciplináris Orvostudományi Doktori Iskola vezetőjének Prof. Gallyas Ferencnek a doktori fokozatszerzés előtt és alatt nyújtott segítségért, tudásért és támogatásért. Mindemellett nagyra értékelem a kutatásomban részt vevő és segítő kollégáim segítségét, különösen dr. Bognár Ritának és Giran Lászlónak a technikai támogatásukért, valamint Tanszékünk munkatársainak, PhD munkatársaimnak és mindenkinek, aki zökkenőmentessé és kényelmessé tette a munkámat. Ezúton is köszönöm a Tempus Közalapítványnak a Stipendium Hungaricum ösztöndíját. Végül a szavak nem lesznek elegek ahhoz, hogy kifejezzem hálámat a családomnak és a barátaimnak; támogatásuk nélkül nem lehetnék itt.

Kutatási támogatások: TKP2021-EGA-17, GINOP-2.3.3-15-2016-00025, GINOP-2.3.2-15-2016-00049 és EFOP-3.6.1-16-2016-00004 magyar támogatások. Az MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíja, valamint az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-21-5, ÚNKP-22-5 Új Nemzeti Kiválósági Programja a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési ill. Innovációs Alap és a Pécsi Orvostudományi Egyetem ÁOK KA támogatásával.