



**BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM  
VEGYÉSZMÉRNÖKI ÉS BIOMÉRNÖKI KAR  
OLÁH GYÖRGY DOKTORI ISKOLA**

**Oxidatív stressz és programozott sejthalálútvonalak  
vizsgálata tumoros sejtvonalakban**

Tézisfüzet

**Szerző:** Varga Dóra

**Témavezető:** Dr. Szarka András

Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék  
Molekuláris Biológia és Biokémia Laboratórium

Budapest

2025



## Bevezetés

A sejthalál, mint biológiai folyamat elengedhetetlen része egy szervezet működésének. A sejthalál folyamatokat alapvetően két nagy csoportba sorolhatjuk. A nekrozis a sejthalál szabályozatlan, passzív formája, általában súlyos fizikai, mechanikai vagy kémiai károsító hatások váltják ki. Ezzel szemben a programozott sejthalálformák esetében a sejt pusztulása és eliminálása szigorúan meghatározott és szabályozott molekuláris folyamatok által kerül végrehajtásra. Ezen szabályozottság lehetőséget teremt számunkra a sejthalálba való beavatkozásra, legyen szó akár a sejthalál gátlásáról vagy indukálásáról. Ehhez azonban elengedhetetlen az adott sejthalál mechanizmusának pontos ismerete. Mára már számos különböző kiváltó ok és mechanizmus ismert, de folyamatosan kerülnek leírásra új sejthalálformák is, és az ismert sejthalál folyamatoknak is vannak még feltáratlan szerepű molekulái és szabályozási lehetőségei. Számos humán betegség is köthető abnormális sejtpusztulási folyamathoz, melyek esetén a szerepet játszó programozott sejthalálformák hátterének pontos ismerete hozzájárulhat az adott betegségek megértéséhez és kezeléséhez is.

A szervezetben a redox homeosztázist az oxidáns és antioxidáns rendszerek egymással egyensúlyban igyekeznek fenntartani. Ennek az egyensúlynak az oxidánsok irányába való felborulását hívjuk oxidatív stressznek, ami kialakulhat az oxidánsok, például a reaktív oxigénvegyületek (ROS) fokozott termelődése vagy az antioxidánsok mennyiségének csökkenése révén is. A szervezet fontos makromolekuláinak, például a DNS, fehérjék vagy lipidek oxidálódása azok funkcióvesztéshez vezet és akár sejthalált is kiválthat.

Nem meglepő, hogy az oxidatív stresszt és a programozott sejthalál folyamatokat kiemelt tudományos figyelem kíséri, számos kutatócsoport foglalkozik egyes sejthaláltípusok molekuláris hátterének és modulátor molekuláiknak azonosításán, ezen kívül egyre nagyobb hangsúlyt kap a potenciális terápiás ágensek molekuláris mechanizmusainak megértése is, ami szintén hozzájárulhat a hatékonyabb terápiás megközelítések kifejlesztéséhez.

Kutatásunk célja különböző potenciális tumorelles szerek működésének és sejthalál mechanizmusok hátterének megértése, különös tekintettel a ferroptózisra, ami egy nemrégiben (2012-ben) leírt vas-függő, oxidatív jellegű sejthalál (Dixon és mtsai., 2012).

## Irodalmi háttér

A nekrozissal szemben a programozott sejthalálformák esetében a sejt pusztulása és eliminálása szigorúan meghatározott és szabályozott molekuláris folyamatok által kerül végrehajtásra. Külső káros tényező nélkül is lejátszódhatnak vagy beindulhatnak káros intracelluláris vagy környezeti tényezők hatására is. Mára már számos különböző típusú és genetikai szabályozású programozott sejthalálformát ismerünk. Sokáig úgy gondolták, hogy ezek a sejthalál útvonalak párhuzamosan, egymástól függetlenül játszódhatnak le, de a közelmúltban felismerték, hogy jelentős átfedéseket mutatnak, a sejt sorsa végső soron ezen folyamatok kölcsönhatásának eredményeként alakul ki (S. Shen és mtsai., 2023).

A ferroptózist a közelmúltban, 2012-ben írta le a Brent Stockwell által vezetett kutatócsoport, miközben szelektíven RAS-mutáns tumorsejtek ellen ható szereket kerestek (Dixon és mtsai., 2012). A későbbiekben kiderült, hogy a ferroptózis nem csak RAS-mutáns tumorsejtekben váltható ki. Szerepét kimutatták például neurodegeneratív rendellenességekben, mint az Alzheimer- Huntington-, illetve Parkinson-kór, vagy vesekárosodás, hematológiai betegségek és ischaemia-reperfúzió esetén is, melyek során a ferroptózis gátlása előnyös lehet. Ezzel szemben a ferroptózis indukálása potenciális terápiás stratégiát jelenthet daganatos megbetegedések elleni küzdelemben (Han és mtsai., 2020). A ferroptózis mechanizmusa még nem teljesen tisztázott, szabályozásának és lefolyásának pontos ismerete hozzájárulhat az érintett betegségekben a ferroptózis terápiás kihasználásához. A ferroptózis különbözik a korábban leírt programozott sejthalálformáktól, morfológiailag főként, a mitokondrium méretének csökkenése, membrán sűrűségének növekedése és a belső kriszták eltűnése jellemzi, emellett a sejtmembrán ép marad. Oxidatív jellegű sejthalálforma, fő biokémiai jellemzői az intracelluláris glutation (GSH) depléció és a glutation-peroxidáz 4 (GPX4) aktivitásának csökkenése, az intracelluláris szabad vas szint megemelkedése, valamint a reaktív oxigén vegyületek (ROS) fokozott termelése és a lipidperoxidáció (Dixon és mtsai., 2012). Indukálható az antioxidáns védelmi rendszerek gátlásán keresztül vagy az intracelluláris szabad vas-szint megemelésén keresztül is, ami kulcsszerepet játszik a ROS képződésében a Fenton-reakción keresztül.

A redox-homeosztázis szabályozása elengedhetetlen a normál sejtfunkciók fenntartásához és a sejtek túlélésének biztosításához. A redox egyensúlyt az oxidáns és antioxidáns rendszerek egymással egyensúlyban igyekeznek fenntartani. Oxidatív stressz, akkor alakul ki, amikor az oxidáns anyagok mennyisége meghaladja a szervezet antioxidáns rendszerének kapacitását, ami a makromolekulák károsodásához és akár sejthalálhoz is vezethet. Reaktív oxigénvegyületek normál körülmények között az oxigén metabolizmus melléktermékeiként is keletkeznek, de számos környezeti stresszor, például UV-sugárzás, ionizáló sugárzás, nehézfémek és xenobiotikumok, gyógyszerek is jelentősen

hozzájárulhatnak a ROS termelés növekedéséhez. A ROS túl magas szintjét számos betegséggel kapcsolatba hozták, azonban szigorúan szabályozott szinten elengedhetetlen, számos élettani folyamatban, például jelátviteli útvonalakban is szerepet játszik (Pizzino és mtsai., 2017).

A tumorok kialakulása egy összetett folyamat az emberi szervezetben, amelyhez mind sejtes, mind molekuláris változásokra szükség van, melyeket endogén és/vagy exogén triggerek közvetítenek. Mára már jól ismert, hogy az oxidatív DNS-károsodás hozzájárulhat a tumorok kialakulásáért felelős változásokhoz. A tartós oxidatív stressz a tumorsejtek gyakori jellemzője, aminek számos oka lehet, többek között a fokozott metabolikus aktivitás, mitokondriális diszfunkció, fokozott peroxiszóma aktivitás, jelátviteli útvonalak megváltozása, egyes enzimek fokozott aktivitása, vagy az infiltrálódó immunsejtekkel való kölcsönhatás. Az oxidatív stressz megnövekedett oxidatív DNS-károsodáshoz vezethet, ami tovább segíti a tumorsejtek onkogén tulajdonságainak kialakulását (Szarka és mtsai., 2021). Daganatos megbetegedésekben az oxidatív stressznek kettős szerepe van. Míg az alacsony vagy közepes ROS szint a jelátviteli útvonalak módosításával aktiválhatja a sejtproliferációt, a migrációt, az inváziót és az angiogenezist, és segítheti a tumorok kialakulását és a tumorsejtek környezethez való adaptációját, addig a magas ROS szint sejthalált indíthat el (Nakamura & Takada, 2021). A prooxidáns ágenseket potenciális kemoterápiás szerként tartják számon, esetenként ténylegesen alkalmazzák daganatos megbetegedések elleni terápiás szerekként (pl. sorafenib) (An és mtsai., 2024).

Potenciális tumorelles prooxidáns ágens például az RSL3 és az erastin is, a ferroptózis első leírt specifikus induktorai. A kanonikus ferroptózis indukálási útvonal az antioxidáns védelemért felelős egyik fő enzim, a GPX4 gátlása. Az erastin az SLC7A11 könnyű lánchoz képes kötődni, így gátolni a transzportert, ami a sejtbe juttatja a GPX4 kofaktorának, a GSH-nak a prekursorát (Dixon és mtsai., 2012). Az RSL3 hatásmechanizmusának alapja, hogy klóracetamid részén keresztül képes kovalens kötést kialakítani a GPX4 szelenociszteín oldalláncával, így közvetlenül és irreverzibilis módon gátolja a peroxidáz katalitikus aktivitását (Wang és mtsai., 2022).

A C-vitamin (L-askorbinsav, askorbát) egy hat szénatomos, kis molekűgű antioxidáns, ami szükséges a szervezetünkben a normál sejtfunkciók fenntartásához. A redox homeosztázis fenntartásán kívül számos biokémiai útvonalban is fontos szerepet játszik. Antioxidáns funkciójával ellentétben nagy dózisban (1-20 mM) prooxidánsként is működhet (Szarka és mtsai., 2022), ebben a nagy koncentrációban nevezzük farmakológiai askorbátnak (Ph-Asc). Emberi szervezetben ez csak intravénás adagolással érhető el (Padayatty és mtsai., 2004). Prooxidánsként szelektíven képes elpusztítani a tumorsejteket, miközben az egészséges sejteket megkíméli, így egy ígéretes tumorelles terápiás lehetőségnek mutatkozik más kemoterapetikumok vagy sugárkezelés kiegészítésére (Zaher és mtsai., 2022). A szakirodalom jelenlegi állása szerint a Ph-Asc prooxidáns, antitumoros hatásának

alapja a Fenton-reakción keresztüli nagy mennyiségű H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> keletkezés (Buranasudja és mtsai., 2019; Szarka és mtsai., 2022).

A klorokin (CQ) egy ismert, már régóta alkalmazott maláriaellenes gyógyszer (Ciak & Hahn, 1966). A CQ nem antimaláriás szerként való alkalmazására számos példát találhatunk, habár a hatásmechanizmusa nem minden esetben ismert, a CQ-t számos tanulmányban alkalmazták tumorsejtekben, hogy érzékenyebbé tegye a sejteket a kemoterápiás kezelésre (Bryant és mtsai., 2019). Tumorelles hatásának hátterében az autofágia gátló képességét tartják. A CQ az autofagoszómák és a lizoszómák fúzióját gátolja, így csökkentve az autofágiás fluxust (Mauthe és mtsai., 2018).

A resveratrol (RES) egy természetes eredetű nem flavonoid típusú polifenol, amely számos növényben megtalálható. A RES az oxidatív stressz és számos jelátviteli útvonal, például sejthalál folyamatok, enzimexpressziók vagy gyulladási folyamatok szabályozásán keresztül fejtheti ki a hatását (Meng és mtsai., 2020). Tumorelles hatását is számos sejtjelátviteli útvonal befolyásolásával kapcsolatba hozták, mint a sejtciklus leállítása, a tumorsejtek proliferációjának gátlása, az apoptózis indukciója (Brockmueller és mtsai., 2023) vagy a gyulladási folyamatok csökkentése (De Sá Coutinho és mtsai., 2018).

A menadion (2-metil-1,4-naftokinon) a szintetikus K vitaminok csoportjába tartozik, hatása élő szervezetekben nem korlátozódik a K1- és K2-vitamin bioszintetikus prekursoraként való felhasználásra, számos tanulmány kimutatta biológiai aktivitásának széles skáláját, például tumorelles, antibakteriális, gombaellenes vagy maláriaellenes hatását is (Dasari és mtsai., 2017; de Souza és mtsai., 2022). Potenciális tumorelles hatását számos *in vitro* tanulmány vizsgálta, önmagában és kombinációban is, kemoszenzibilizátorként alkalmazva (Bajor és mtsai., 2020; Zoughaib és mtsai., 2024). Tumorelles hatását a menadion redox ciklusával képződő ROS-nak tulajdonítják (de Souza és mtsai., 2022).

## Célkitűzés

Kutatómunkám során a ferroptózis molekuláris mechanizmusának pontosabb megértése érdekében a JNK útvonal és a ferroptózis közötti feltételezett kapcsolatot vizsgáltam. Több hasonlóság is utalt a két útvonal közötti kapcsolatra: szabályozásukban szerepet játszanak a reaktív oxigénformák (ROS) (H.-M. Shen & Liu, 2006; Ueda és mtsai., 2002), felfüggeszthetőek lipidperoxidációt gátló anyagokkal (Shrivastava & Aggarwal, 1999; Ueda és mtsai., 2002) és a RAS mutációk szerepet játszhatnak az elindításukban (McCubrey és mtsai., 2006). Továbbá vizsgáltuk a Ph-Asc, a CQ és a RES korábban leírt szinergikus citotoxicitásának háttérében álló mechanizmust és több oxidatív mechanizmusú potenciális tumorelles ágens hatásmechanizmusát összehasonlítottuk.

Célkitűzéseink a következők voltak:

1. A ferroptózis és a JNK jelátviteli útvonal közötti feltételezett kapcsolat vizsgálata.
2. A farmakológiai aszkorbát (Ph-Asc), a klorokin (CQ) és a resveratrol (RES) kombinált kezelés szinergikus citotoxikus hatása mögött álló mechanizmus vizsgálata.
3. A Ph-Asc és a szerves Fenton reagens ( $H_2O_2 + FeSO_4$ ) hatásának összehasonlítása.
4. Potenciálisan oxidatív stressz által kiváltott sejthalál indukturok (Ph-Asc, CQ, RES, RSL3 menadion) hatásmechanizmusának vizsgálata.

## Alkalmazott kísérletes módszerek

- Életképesség mérés MTT assay-vel
- Áramlásos citometria:
  - ROS szint és lipidperoxidáció meghatározása
  - Apoptózis markerek meghatározása
  - Sejtciklus-eloszlás meghatározása
  - Lizoszóma-szám meghatározása
  - FSP1 mennyiségének meghatározása fluoreszcensen jelölt antitest segítségével
- FSP1 mennyiségének és sejten belüli eloszlásának mikroszkópos vizsgálata meghatározása fluoreszcensen jelölt antitest segítségével
- Kaszpáz-3/7 aktivitás meghatározása fluoreszcens enzimaktivitási assay-vel
- HPLC-UV/Vis:
  - Redukált glutation szint meghatározása
  - ATP és  $NAD^+$  szintek meghatározása
- Fehérjeizolálás és fehérjekoncentráció mérés
- Western-blot

## Eredmények és diszkusszió

### A JNK-útvonal és a ferroptózis lehetséges kapcsolatának vizsgálata

Több tényező is utalt a ferroptózis és a JNK jelátviteli útvonal közötti kapcsolatra, melyek alapján feltételeztük a két folyamat kapcsolatát:

- i. mindkét folyamat szabályozásában szerepet játszanak a reaktív oxigénvegyületek (ROS) (H.-M. Shen & Liu, 2006; Ueda és mtsai., 2002)
- ii. mindkettő felfüggeszthető lipidek peroxidációját gátló anyagokkal (Shrivastava & Aggarwal, 1999; Ueda és mtsai., 2002)
- iii. mindkét útvonal elindításában szerepet játszhatnak a RAS mutációk (McCubrey és mtsai., 2006)

Célunk a JNK jelátviteli útvonal és a ferroptózis szabályozása közötti kapcsolat vizsgálata volt. Mivel a ferroptózis első leírása a HT-1080 sejtek alkalmazásával történt (Dixon és mtsai., 2012), és a ferroptózissal kapcsolatos vizsgálatok többségét ezen a sejtvonalon végezték, mi is ezt a sejtvonalat választottuk vizsgálatainkhoz.

A JNK gátlószerkeik önmagukban nem okoztak sejthalált, de a ferroptózis induktorokkal történő együttes kezelés esetén tovább csökkentették a sejtek életképességét, az önmagában alkalmazott RSL3 vagy erastin kezeléshez képest. A ferroptózis RSL3-mal való kiváltása során a JNK fehérje egyik fő szubsztrátja, a c-Jun fehérje foszforilálódását tapasztaltuk. Ezek az eredmények megerősítették a feltételezett kapcsolatot a két útvonal között.

A továbbiakban ennek a kapcsolatnak és az RSL3 és a JNK gátlószerkeik szinergikus citotoxikus hatásának hátterét szeretnénk volna felderíteni. Vizsgáltuk, hogy az RSL3 és a JNK gátlószerkeik hatását milyen sejthalálttípus(ok) specifikus gátlószerével lehet felfüggeszteni. Az apoptózis gátlószer, Z-VAD-FMK nem védte ki az RSL3 és JNK gátlószerkeik kombinációjával kiváltott sejthalált, és az apoptózis markereiben (kaspáz-3/7 aktivitás és annexin V. jelölés) sem okozott változást a JNK gátlása. Ebből arra következtettünk, hogy az apoptózis nem játszik a szinergikus citotoxicitásban. Nem találtunk olyan sejthaláltformát, melynek gátlásával kizárólag a JNK gátlószerkeik okozta fokozott sejthalált tudjuk kivédeni, csak a ferroptózis teljes megakadályozásával tudtuk elérni a sejtek életképességének javulását az RSL3 és JNK-IN-8 vagy SP600125 kombinációjával kiváltott sejthaláltban. Ebből arra következtettünk, hogy a JNK gátlószerkeik önmagukban nem képesek sejthalált indukálni a HT-1080 sejtvonalban és nem indítanak el másodlagos sejthalált, például apoptózist, de felerősítik a ferroptózis induktorok sejtölő hatását. RSL3 kezelés hatására mind a ROS szint, mind lipidperoxidáció szignifikánsan megemelkedett, de ezt az emelkedést a lipidperoxidáció és ROS szintet a JNK gátlószerkeik nem befolyásolták, tehát nem a fokozott ROS termelés áll a szinergia hátterében.

Ezek alapján feltételeztük, hogy a JNK útvonalnak egy a ferroptózis elleni védelmi mechanizmusban lehet szerepe. A ferroptózis ellen két fő védelmi útvonalat ismerünk, melyek gátlására megnövekszik a sejtek érzékenysége a ferroptózisra. A ferroptózis kutatásának kezdetétől jól ismert, hogy a GSH kimerülés és a GPX4 enzim gátlása központi szerepet játszik a ferroptózis indukálásában (Dixon és mtsai., 2012). Ezen kívül a ferroptózis elleni védelemben szerepe van az FSP1-nek, ami valójában egy sejtmembránhoz kötött oxidoreduktáz enzim, ami az ubikinon, más éven Q10 koenzim (Q10, CoQ10) regenerálását katalizálja NAD(P)H felhasználásával. A Q10 egy lipofil antioxidáns, így a sejtmembránhoz kötött FSP1 segítségével lokálisan, a sejtmembránnál gátolja a lipidperoxidációt. (Doll és mtsai., 2019). Az FSP1 farmakológiai gátlása, az iFSP1 specifikus gátlószerekkel szinergikus citotoxicitást mutatott a ferroptózis induktorokkal (RSL3, FIN56, erastin) és a JNK gátlószerekhez hasonlóan az iFSP1 sem befolyásolta a ROS szintet és a lipidperoxidációt RSL3 kezelés mellett. A JNK és az FSP1 fehérjék gátlása bár több szempontból hasonlóan bizonyult, eredményeink alapján a JNK gátlása nem volt hatással az FSP1–CoQ10–NAD(P)H útvonalra. A JNK gátlószerek nem befolyásolták az FSP1 mennyiségét vagy a sejten belüli elhelyezkedését. Ezután vizsgáltuk a JNK útvonal és a ferroptózis elleni védelemben központi szerepű antioxidáns, a GSH kapcsolatát. A BSO (buthionine sulfoximine) kezelése GSH szintézisét gátolja, ennek megfelelően teljesen lecsökkentette a sejtek GSH tartalmát, de az életképességet önmagában nem befolyásolta. A JNK gátlószerek a BSO kezelés után alkalmazva jelentősen csökkentették a sejtek életképességét, annak ellenére, hogy a két szer külön-külön nem okoz sejthalált. Mindezek alapján a GSH központi szerepet játszhat a JNK gátlószerek ferroptózist fokozó hatásában, ennek megerősítéséhez azonban további kísérletek szükségesek.

### **Potenciális rákterápiás szerek hatásmechanizmusának vizsgálata**

A gyógyszerfejlesztés idő- és erőforrás-igényes folyamat, ezért különböző stratégiák alakultak ki a költségek csökkentésére. Egy ilyen stratégia már jóváhagyott gyógyszer új kezelés céljából való alkalmazása. Egy másik lehetőség gyógyszerek kombinálása, ami növelheti a hatékonyságot, több útvonalat is elindíthat a sejtekben és csökkentheti a gyógyszerrezisztencia kialakulása miatti túlélést, ezáltal lehetővé téve az alacsonyabb dózisokat.

Kutatócsoportunk korábban egy matematikai modellt épített a KRAS-mutáns tumorok metabolizmusát leíró és szabályozó hálózatról (Kapuy és mtsai., 2021). A modell alapján a Ph-Asc és a CQ kombinált kezelés KRAS-mutáns tumoros megbetegedések esetén egy potenciális terápiás megközelítés lehet, a Warburg-effektus, a KRAS útvonal és az autofágia együttes gátlásán keresztül. Irodalmi adatok alapján a Ph-Asc GLUT1 expresszió-csökkenést idéz elő (Aguilera és mtsai., 2016), a CQ pedig gátolja az autofágiát (Cai és mtsai., 2018).

A Ph-Asc és CQ kombinált kezelés valóban szinergikus citotoxikus hatást eredményezett, azonban további kísérletek alapján megállapítottuk, a Ph-Asc nem a KRAS útvonal vagy a GLUT1 expresszió befolyásolásán keresztül fejti ki hatását (Makk-Merczel és mtsai., 2024).

A továbbiakban vizsgáltuk a CQ hatásmechanizmusát. Kísérleteinkben megerősítettük a CQ autofágia gátló hatását, azonban a szinergikus citotoxikus hatását az autofágia-gátló hatásától függetlennek találtuk. A továbbiakban több potenciális tumorellenes ágens hatásmechanizmusát is összehasonlítottuk. A RES szignifikánsan csökkentette az életképességet a MIA PaCa-2 sejtekben, és CQ-nal, illetve a Ph-Asc-tal kombinálva is szinergikus citotoxikus hatást mutatott. Mind a Ph-Asc-ról (Szarka és mtsai., 2021), a CQ-ről (Besaratina és mtsai., 2021) és a RES-ről (Woods & Turchi, 2013) leírták, hogy DNS-károsodást okoznak. Ezeket az eredményeket mi is megerősítettük és vizsgáltuk még az RSL3, a menadion és a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hatásait is. A vizsgált potenciális tumorellenes szerek mind DNS-károsodást okoztak, ami egy közös pont a hatásmechanizmusukban, akár a Ph-Asc, CQ és RES szinergikus citotoxicitásának hátterében is állhat a DNS-károsító hatásuk.

A poly(ADP-ribóz) polimeráz 1 (PARP1) enyhe vagy mérsékelt szintű DNS-károsodásra aktiválódva elősegíti a DNS hibajavító mechanizmusok elindulását és a sejtek túlélését, de súlyos DNS-károsodás következtében a PARP1 működése közben felhasznált NAD<sup>+</sup> és ATP azok kimerüléséhez vezethet, és sejthalált idézhet elő (Buranasudja és mtsai., 2019; Luo & Kraus, 2012). Buranasudja és munkatársai MIA PaCa-2 sejtvonal estén azt találták, hogy a Ph-Asc DNS-károsodást okoz, ami a PARP1 aktiválódásához vezet és az intenzív NAD<sup>+</sup> és ATP felhasználás következtében azok kimerülését eredményezi. Azonban, úgy találták, hogy ez a bioenergetikai változás a Ph-Asc toxicitásának másodlagos tényezője, és a DNS-károsodás a sejthalál elsődleges oka (Buranasudja és mtsai., 2019). Megerősítettük Buranasudja és munkatársai eredményeit, valamint kimutattuk, hogy a Ph-Asc kezeléssel ellentétben CQ és RES kezelések hatására DNS-károsodás jelenléte ellenére nem találtunk a PARP túlzott aktivitására utaló NAD<sup>+</sup> vagy ATP csökkenést, ami a Ph-Asc-tól eltérő hatásmechanizmusra utal.

DNS-károsodást gyakran követ a sejtciklus leállása, így megvizsgáltuk a sejtciklus fázisai közötti eloszlásban bekövetkező változásokat Ph-Asc, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, RES, CQ, menadion és RSL3 kezelések hatására. Bár a Ph-Asc citotoxikus hatását elsősorban a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generáló képességének tulajdonítják, a két vegyületet sejtciklusra gyakorolt hatásuk tekintetében eltérőnek bizonyult. Míg a Ph-Asc kezelésnek alig vagy egyáltalán nem volt hatása a sejtciklusra, addig a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés koncentrációfüggő módon jelentős sejtciklus-leállást okozott. Ezen kívül a CQ, a RES, a menadion és az RSL3 is okozott sejtciklus-leállást, de eltérő fázisban ragadtak meg a sejtek, ami a kezelőszerek részben eltérő hatásmechanizmusára utal.

Az oxidatív stressz gyakran jelentős károkat okoz a makromolekulákban, beleértve a nukleinsavakat is, ezáltal gyakori oka a DNS-károsodásnak. A Ph-Asc, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, menadion és RSL3 esetén kifejezetten az oxidatív károsodásnak tulajdonítják a toxikus hatásukat, a CQ és a RES esetén is találunk az irodalomban oxidatív stresszre való utalást (Gregório és mtsai., 2021; Rodríguez-Enríquez és mtsai., 2019), azonban ezek estében nem egyértelmű, hogy az oxidatív stressz áll-e a citotoxicitásuk hátterében.

A kísérleteink során a CQ kezelés nem okozott oxidatív stresszt a Mia PaCa-2 sejtekben, a sejten belüli ROS szintet és a lipidperoxidációt sem befolyásolta, valamint a CQ citotoxikus hatása nem volt kivédhető az antioxidáns, N-acetil-ciszteinnel (NAC) történő együttes kezeléssel. Ezek alapján a ROS képződés nem játszik kulcsszerepet a CQ által indukált sejthalálban. A RES kezelés ugyan megnövelte a sejten belüli ROS szintet, de nem okozott lipidperoxidációt, és a citotoxikus hatása nem volt kivédhető NAC-nel történő együttes kezeléssel, ami arra utal, hogy a ROS képződés, bár jelen van, nem játszik kulcsszerepet a RES által indukált sejthalálban. A Ph-Asc, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és a menadion kezelések mind növelték a sejtekben a ROS szintet és a lipidperoxidációt is. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kezelés koncentrációtól függetlenül bizonyul és alacsonyabb fokú lipidperoxidációt indukált, mint a Ph-Asc. Ez egy újabb különbség a Ph-Asc és a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hatásmechanizmusában. A különbség magyarázata lehet, hogy a Ph-Asc a Fenton-reakció folyamatos fenntartásával egy kisebb, de egyenletesebb oxidatív stresszt okoz, mint a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ami hirtelen, nagy mennyiségű ROS képződést produkál. A megnövekedett ROS szint és a lipidperoxidáció a ferroptózis klasszikus jellemzői, kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy a ferroptózis nem játszik szerepet a Ph-Asc által indukált sejthalálban (Lőrincz és mtsai., 2019). Jelen kísérleteink alapján úgy találtuk, hogy a ferroptózis a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és a menadion okozta sejthalálban sem játszik szerepet. A Ph-Asc, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vagy menadion által indukált sejthalált nem függesztették fel a specifikus ferroptózist gátló szerek, mint a lipoxstatin-1 vagy ferrostatin-1, de a sejthalál kivédhető volt NAC együttes adagolásával. Ez megerősíti, hogy a ROS képződés kulcsszerepet játszik a Ph-Asc, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és menadion okozta sejthalál folyamatok mechanizmusában, de nem ferroptózisról van szó. Úgy találtuk, hogy a MIA PaCa-2 sejtvonal ferroptózis rezisztens, így az ismerten ferroptózis érzékeny HT-1080 sejtvonalon is megerősítettük, hogy a menadion nem indukál ferroptózist. A ferroptózisra jellemző megnövekedett ROS szint és a lipidperoxidáció jelen van, de a speciális ferroptózis gátlószerek nem védték ki a menadion által indukált sejthalált a HT-1080 sejtvonalon sem.

## Tézisek

1. Leírtuk, hogy a JNK fehérje farmakológiai gátlása felerősíti a ferroptózis induktorok citotoxikus hatását, ami a két útvonal kapcsolatára utal (Varga és mtsai., 2022).
2. Megfigyeltük, hogy a farmakológiai aszkorbát és a klorokin szinergikus citotoxicitást fejtenek ki, MIA PaCa-2 sejtvonalon, amely citotoxicitás háttérében nem a klorokin autofágia-gátló hatása áll (Makk-Merczel és mtsai., 2024).
3. Kimutattuk, hogy a farmakológiai aszkorbát, a klorokin, a resveratrol, a menadion és az RSL3 DNS-károsodást okoz, amely igen valószínűleg a szinergikus citotoxicitásuk alapja. RSL3 esetében korábbi irodalmi adat nem található a DNS-károsító hatásáról (Varga, Szentirmai és Szarka, 2025).
4. Leírtuk, a MIA PaCa-2 sejtvonal ferroptózis rezisztenciáját, amely háttérében - a ferroptózisra érzékeny HT-1080 sejtvonallal szemben tapasztalható - magasabb GPX4 és alacsonyabb ACSL4 expressziós szintje állhat. (Varga, Szentirmai és Szarka, 2025).

## Alkalmazási lehetőségek

A redox státusz nem megfelelő szabályozása és a programozott sejthalál-folyamatok, mint például a ferroptózis számos betegségben játszhatnak szerepet, valamint az oxidatív stressz felgyorsítja a szervezet öregedési folyamatait is (Han és mtsai., 2020; Pizzino és mtsai., 2017). A prooxidáns anyagok potenciálisan terápiás célokra is alkalmasak lehetnek, ezeket vizsgálják és esetenként ténylegesen alkalmazzák daganatos megbetegedések elleni terápiás szerekként. (Pizzino és mtsai., 2017). Az adott betegségtől függően a redox homeosztázis szabályozásának, az oxidatív stressz kialakulásának vagy a sejthalál-folyamat lefolyásának pontos ismerete hozzájárulhat a betegség részletesebb leírásához és potenciális terápiás megközelítések kialakításához is. Kutatásaink segítik az oxidatív stressz és az oxidatív alapú programozott sejthalálforma, a ferroptózis mechanizmusának és szabályozásának pontosabb megértését.

## Közlemények

### Közlemények az értekezés témájában:

1. Varga Dóra, Hajdinák Péter, Makk-Merczel Kinga, Szarka András. The Possible Connection of Two Dual Function Processes: The Relationship of Ferroptosis and the JNK Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 11004. doi: 10.3390/ijms231911004 (IF: 6,201; D1 (2022))
2. Makk-Merczel Kinga, Varga Dóra, Hajdinák Péter, Szarka András. The interlacing anticancer effect of pharmacologic ascorbate, chloroquine, and resveratrol. *Biofactors*. 2024 Mar 15. doi: 10.1002/biof.2050. (IF: 6,807; Q1 (2024))
3. Varga Dóra, Szentirmai Anna, Szarka András. Research for a Common Thread: Insights into the Mechanisms of Six Potential Anticancer Agents. *Molecules* 2025, *30*, 1031. doi: 10.3390/molecules30051031 (IF: 5,266; Q1 (2024))

### Előadások az értekezés témájában:

1. Varga Dóra, Szarka András. Programozott sejthalál-folyamatok vizsgálata: Ferroptózis és a JNK útvonal kapcsolata, ÚNKP konferencia, online, 2023. június 7.
2. Varga Dóra, Szarka András, Hajdinák Péter, Makk-Merczel Kinga. A ferroptózis és a JNK jelátviteli útvonal közötti lehetséges kapcsolat, A Magyar Szabadgyök-kutató Társaság XII. Kongresszusa, Martonvásár, 2023. augusztus 24-25.
3. Varga Dóra, Szarka András, Hajdinák Péter, Makk-Merczel Kinga. The Possible Connection of Ferroptosis and the JNK Pathway, V. George Olah Conference, XXI Conference of the George Olah Doctoral School, Budapest, 2023.09.12.
4. Varga Dóra, Szarka András. A ferroptózis és szerepe a diabéteszben és szövődményeiben, Fiata diabetológusok és diabetológiai témával foglalkozók tudományos találkozója, Budapest, 2024.05.17.

### Poszter az értekezés témájában:

1. Varga Dóra, Szarka András, Hajdinák Péter, Makk-Merczel Kinga. The Possible Connection of Ferroptosis and the JNK Pathway, The 2023 annual meeting of the Society for Free Radical Research – Europe (SFRR-E), Bécs, Ausztria, 2023. június 6-9.

### Egyéb közlemény:

4. Lőrincz Tamás, Deák Veronika, Makk-Merczel Kinga, Varga Dóra, Hajdinák Péter, Szarka András. The Performance of HepG2 and HepaRG Systems through the Glass of Acetaminophen-Induced Toxicity. *Life (Basel)*. 2021 Aug 21;11(8):856. doi: 10.3390/life11080856. (IF: 3,371; Q2 (2021))

## Irodalmi hivatkozások

- Aguilera, O., Muñoz-Sagastibelza, M., Torrejón, B., Borrero-Palacios, A., del Puerto-Nevaldo, L., Martínez-Useros, J., Rodríguez-Remirez, M., Zazo, S., García, E., Fraga, M., Rojo, F., & García-Foncillas, J. (2016). Vitamin C uncouples the Warburg metabolic switch in KRAS mutant colon cancer. *Oncotarget*, 7(30), 47954–47965. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10087>
- An, X., Yu, W., Liu, J., Tang, D., Yang, L., & Chen, X. (2024). Oxidative cell death in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities. *Cell Death & Disease*, 15(8), 556. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06939-5>
- Bajor, M., Graczyk-Jarzynka, A., Marhelava, K., Kurkowiak, M., Rahman, A., Aura, C., Russell, N., Zych, A. O., Firczuk, M., Winiarska, M., Gallagher, W. M., & Zagozdzon, R. (2020). Triple Combination of Ascorbate, Menadione and the Inhibition of Peroxiredoxin-1 Produces Synergistic Cytotoxic Effects in Triple-Negative Breast Cancer Cells. In *Antioxidants* (Köt. 9, Szám 4). <https://doi.org/10.3390/antiox9040320>
- Besaratinia, A., Caliri, A. W., & Tommasi, S. (2021). Hydroxychloroquine induces oxidative DNA damage and mutation in mammalian cells. *DNA Repair*, 106, 103180. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2021.103180>
- Brockmueller, A., Buhrmann, C., Shayan, P., & Shakibaei, M. (2023). Resveratrol induces apoptosis by modulating the reciprocal crosstalk between p53 and Sirt-1 in the CRC tumor microenvironment. *Frontiers in Immunology*, Volume 14. <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2023.1225530>
- Bryant, K. L., Stalneck, C. A., Zeitouni, D., Klomp, J. E., Peng, S., Tikunov, A. P., Gunda, V., Pierobon, M., Waters, A. M., George, S. D., Tomar, G., Papke, B., Hobbs, G. A., Yan, L., Hayes, T. K., Diehl, J. N., Goode, G. D., Chaika, N. V., Wang, Y., ... Der, C. J. (2019). Combination of ERK and autophagy inhibition as a treatment approach for pancreatic cancer. *Nature Medicine*, 25(4), 628–640. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0368-8>
- 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>
- Cai, Y., Cai, J., Ma, Q., Xu, Y., Zou, J., Xu, L., Wang, D., & Guo, X. (2018). Chloroquine affects autophagy to achieve an anticancer effect in EC109 esophageal carcinoma cells in vitro. *Oncology Letters*, 15(1), 1143–1148. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7415>
- Ciak, J., & Hahn, F. E. (1966). Chloroquine: mode of action. *Science (New York, N.Y.)*, 151(3708),

347–349. <https://doi.org/10.1126/science.151.3708.347>

- 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), 57782–57799. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17997>
- De Sá Coutinho, D., Pacheco, M. T., Frozza, R. L., & Bernardi, A. (2018). Anti-Inflammatory Effects of Resveratrol: Mechanistic Insights. In *International Journal of Molecular Sciences* (Köt. 19, Szám 6). <https://doi.org/10.3390/ijms19061812>
- de Souza, A. S., Ribeiro, R. C. B., Costa, D. C. S., Pauli, F. P., Pinho, D. R., de Moraes, M. G., da Silva, F. de C., Forezi, L. da S. M., & Ferreira, V. F. (2022). Menadione: a platform and a target to valuable compounds synthesis. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, *18*, 381–419. <https://doi.org/10.3762/bjoc.18.43>
- 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. 3rd, & 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>
- Doll, S., Freitas, F. P., Shah, R., Aldrovandi, M., da Silva, M. C., Ingold, I., Grocin, A. G., Xavier da Silva, T. N., Panzilius, E., Scheel, C. H., Mourão, A., Buday, K., Sato, M., Wanninger, J., Vignane, T., Mohana, V., Rehberg, M., Flatley, A., Schepers, A., ... Conrad, M. (2019). FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor. *Nature* *2019* *575*:7784, *575*(7784), 693–698. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1707-0>
- Gregório, P., da Cunha, R. S., Biagini, G., Bosquetti, B., Budag, J., Ortiz, A., Sánchez-Niño, M. D., Barreto, F. C., & Stinghen, A. E. M. (2021). Chloroquine may induce endothelial injury through lysosomal dysfunction and oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *414*, 115412. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.taap.2021.115412>
- Han, C., Liu, Y., Dai, R., Ismail, N., Su, W., & Li, B. (2020). Ferroptosis and Its Potential Role in Human Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, *11*, 239. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00239>
- Kapuy, O., Makk-Merczel, K., & Szarka, A. (2021). Therapeutic Approach of KRAS Mutant Tumours by the Combination of Pharmacologic Ascorbate and Chloroquine. *Biomolecules*, *11*(5). <https://doi.org/10.3390/biom11050652>
- Lőrincz, T., Holczer, 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>
- Luo, X., & Kraus, W. L. (2012). On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1. *Genes & Development*, *26*(5), 417–432.

<https://doi.org/10.1101/gad.183509.111>

- Makk-Merczel, K., Varga, D., Hajdinák, P., & Szarka, A. (2024). The interlacing anticancer effect of pharmacologic ascorbate, chloroquine, and resveratrol. *BioFactors (Oxford, England)*. <https://doi.org/10.1002/biof.2050>
- Mauthe, M., Orhon, I., Rocchi, C., Zhou, X., Luhr, M., Hijlkema, K. J., Coppes, R. P., Engedal, N., Mari, M., & Reggiori, F. (2018). Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, *14*(8), 1435–1455. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1474314>
- McCubrey, J. A., Lahair, M. M., & Franklin, R. A. (2006). Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxidants & Redox Signaling*, *8*(9–10), 1775–1789. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1775>
- Meng, X., Zhou, J., Zhao, C.-N., Gan, R.-Y., & Li, H.-B. (2020). Health Benefits and Molecular Mechanisms of Resveratrol: A Narrative Review. *Foods (Basel, Switzerland)*, *9*(3). <https://doi.org/10.3390/foods9030340>
- Nakamura, H., & Takada, K. (2021). Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions. *Cancer Science*, *112*(10), 3945–3952. <https://doi.org/10.1111/cas.15068>
- Padayatty, S. J., Sun, H., Wang, Y., Riordan, H. D., Hewitt, S. M., Katz, A., Wesley, R. A., & Levine, M. (2004). Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous use. *Annals of Internal Medicine*, *140*(7), 533–537. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-140-7-200404060-00010>
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*, 8416763. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Rodríguez-Enríquez, S., Pacheco-Velázquez, S. C., Marín-Hernández, Á., Gallardo-Pérez, J. C., Robledo-Cadena, D. X., Hernández-Reséndiz, I., García-García, J. D., Belmont-Díaz, J., López-Marure, R., Hernández-Esquível, L., Sánchez-Thomas, R., & Moreno-Sánchez, R. (2019). Resveratrol inhibits cancer cell proliferation by impairing oxidative phosphorylation and inducing oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *370*, 65–77. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.03.008>
- Shen, H.-M., & Liu, Z. (2006). JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radical Biology & Medicine*, *40*(6), 928–939. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.10.056>
- Shen, S., Shao, Y., & Li, C. (2023). Different types of cell death and their shift in shaping disease. *Cell Death Discovery*, *9*(1), 284. <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01581-0>

- Shrivastava, A., & Aggarwal, B. B. (1999). Antioxidants differentially regulate activation of nuclear factor-kappa B, activator protein-1, c-jun amino-terminal kinases, and apoptosis induced by tumor necrosis factor: evidence that JNK and NF-kappa B activation are not linked to apoptosis. *Antioxidants & Redox Signaling*, *1*(2), 181–191. <https://doi.org/10.1089/ars.1999.1.2-181>
- Szarka, A., Kapuy, O., Lőrincz, T., & Bánhegyi, G. (2021). Vitamin C and Cell Death. *Antioxidants & Redox Signaling*, *34*(11), 831–844. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7897>
- 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>
- Ueda, S., Masutani, H., Nakamura, H., Tanaka, T., Ueno, M., & Yodoi, J. (2002). Redox Control of Cell Death. *Antioxidants & Redox Signaling*, *4*(3), 405–414. <https://doi.org/10.1089/15230860260196209>
- Wang, L., Chen, X., & Yan, C. (2022). Ferroptosis: An emerging therapeutic opportunity for cancer. *Genes & Diseases*, *9*(2), 334–346. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.09.005>
- Woods, D., & Turchi, J. J. (2013). Chemotherapy induced DNA damage response Convergence of drugs and pathways. *Cancer Biology and Therapy*, *14*(5), 379–389. <https://doi.org/10.4161/CBT.23761>
- Zaher, A., Stephens, L. M., Miller, A. M., Hartwig, S. M., Stolwijk, J. M., Petronek, M. S., Zacharias, Z. R., Wadas, T. J., Monga, V., Cullen, J. J., Furqan, M., Houtman, J. C. D., Varga, S. M., Spitz, D. R., & Allen, B. G. (2022). Pharmacological ascorbate as a novel therapeutic strategy to enhance cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, *13*, 989000. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.989000>
- Zoughaib, M., Pashirova, T. N., Nikolaeva, V., Kamalov, M., Nakhmetova, F., Salakhieva, D. V., & Abdullin, T. I. (2024). Anticancer and Chemosensitizing Effects of Menadione-Containing Peptide-Targeted Solid Lipid Nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *113*(8), 2258–2267. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.xphs.2024.03.009>



