

TERMÉSZETES ALAPANYAGÚ POTENCIÁLIS
KEMOPREVENTÍV KÉSZÍTMÉNYEK
HATÁSÁNAK MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI
VIZSGÁLATA

Ph.D. értekezés

Varjas Tímea

Témavezető: Dr. Ember István
Doktori Iskola vezetője: Dr. Komoly Sámuel

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar

2009

TARTALOM

1. Rövidítések jegyzéke	3
2. Bevezetés	6
3. Háttér, előzmények	16
3.1. A daganatok megelőzésének lehetőségei, a kemoprevenció	16
3.1.1. A telítetlen zsírsavak lebontása - eikozanoidok képződése	17
3.1.2. Az apoptózis és a sejtciklus szabályozás, mint kemoprevenciós célpont (<i>Bcl2</i> , <i>Bcl2l</i> , <i>Ccnd1</i>)	22
3.1.3. Onkogének, szuppresszorgének szerepe a daganatok kialakulásában	25
3.2. A kísérletekben alkalmazott környezeti eredetű karcinogén és antikarcinogén hatású vegyületek	28
3.2.1. Transz-2-hexenal	28
3.2.2. N-nitrozo-N-metil-karbamid	29
3.2.3. Kemopreventív hatású vegyületek a növényekben	30
3.3. Néhány az ősi keleti gyógyászatban használt antikarcinogén hatású gyógynövény	35
3.3.1. <i>Panax ginzeng</i> (ginzeng, embergyökér)	35
3.3.2. <i>Trigonella foenum graecum</i> (görögszéna, lepkeszeg)	37
4. Célkitűzések	39
5. Anyag és módszer	42
5.1. A kísérletek során felhasznált anyagok	42
5.1.1. Kísérleti állatok	42
5.1.2. Vegyszerek, tápok, oldatok, primerek	42
5.1.3. Készülékek	44
5.2. Módszerek	45
5.2.1. Kísérleti állatok kezelési sémája	45
5.2.2. RNS izolálás	47
5.2.3. Nukleinsavak blottolása, hibridizálás	48
5.2.4. Kvantitatív RT PCR protokoll <i>Gene Amp</i> [®] 5700 SDS rendszerrel	49
5.2.5. Antioxidáns kapacitás meghatározása	50
5.2.6. Statisztikai analízis	51
6. Eredmények, megbeszélés	53
6.1. A transz-2-hexenal <i>in vivo</i> vizsgálata	53
6.2. Az MNU kezelt CBA/Ca egerek génexpressziós profiljának vizsgálata	55

6.3. HBA (E,E-bis-(2-hidroxi-benziliden)-aceton) hatása DMBA indukálta <i>Hras1</i> expressziókra	59
6.4. Rezvaratrol és likopin és génexpressziós mintázata	62
6.5. Görögszéna hatása, az arachidonsav metabolizmus enzimjeire <i>in vivo</i> állatkísérletben (ALOX, COX)	66
6.6. Ginzeng tartalmú táplálék apoptotikus hatása <i>in vivo</i> állatkísérletben	71
7. Összefoglalás	78
8. Új eredmények összefoglalása	82
9. Köszönetnyilvánítás	85
10. Felhasznált irodalom	97
11. A disszertációhoz kapcsolódó és közvetlenül nem kapcsolódó publikációk és prezentációk listája	98
11.1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk jegyzéke	98
11.2. A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk jegyzéke	100

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

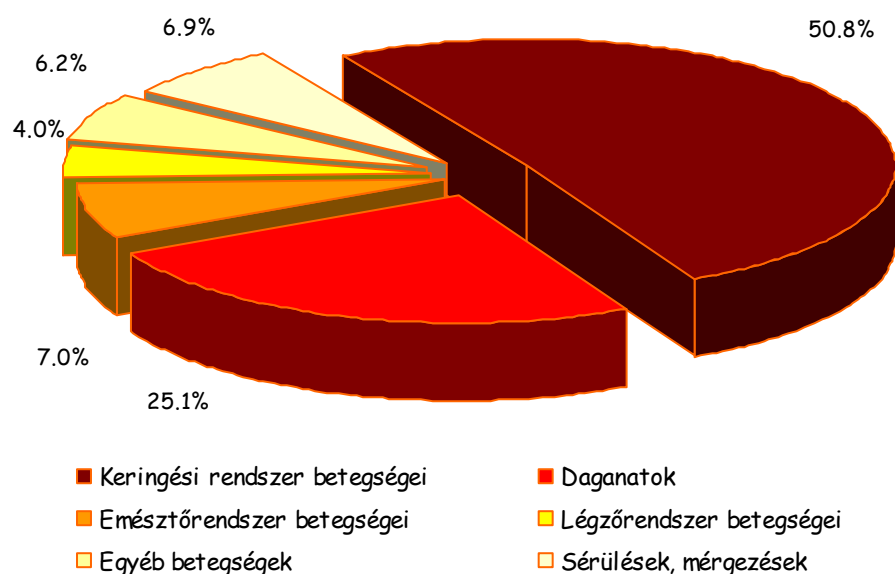
12(S)-HETE	12(S)-hidroxi-eikoza-tetraénsav
13(S)-HODE	13(S)-hidroxi-oktadeka-diénsav
14-ETE	14-eikoza-tetraenolsav
15(S)-HETE	15(S)-hidroxi-eikoza-tetraenolsav
5(S)-diHETE	5(S)-dihidroxi-eikoza-tetraenolsav
5(S)-HETE	5(S)-hidroxi-eikoza-tetraenolsav
5(S)-HpETE	5(S)-hidroperoxi-eikoza-tetraenolsav
ALOX12	Arachidonát-12-lipoxigenáz
ALOX15	Arachidonát-15-lipoxigenáz
ALOX5	Arachidonát-5-lipoxigenáz
APAF1	Apoptotic protease activating factor 1
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
BAX/Bax	BCL2-associated X protein
BCL2/Bcl2	B-cell CLL/lymphoma 2
BCL2A1/Bcl2a1a	BCL2-related protein A1/ Bcl2 related protein A1a
BCL2L1/Bcl2l1	BCL2-like 1 - Bcl-x
BID/Bid	BH3 interacting domain death agonist
CCND1/Ccnd1	ciklin D1 - Cyclin D1
CD	Cervikális diszlokáció
CDI	CDK inhibitor
CDK	Ciklin dependens kináz
Chk2	Checkpoints Factor-2
CIAP	TNFR2-TRAF signaling complex protein; apoptosis inhibitor 2
COX1	Ciklooxigenáz 1 - Prostaglandin-endoperoxidáz-szintáz 1
COX2	Ciklooxigenáz 2 - Prostaglandin-endoperoxidáz-szintáz 2
CT	Ciklus küszöb - Cycle threshold
CTD	Carboxyl-terminal repeat domain
DEPC	Dietil-pirokarbonát
DMBA	7,12-dimetil-benzantracén
DMSO	Dimetil-szulfoxid
FLAP	5-Lipoxygenase Activating Protein
GDP	Guanozin-difoszfát

GST	Glutation S-tranferáz
GTP	Guanozin-trifoszfát
HBA	E,E-bis-(2-hidroxi-benzilidén)-aceton
HETE	hidroxi-eikoza-tetraenolsav
HFA	Health For All
HGM-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzme A
HPTE	Hidroperoxi-eicosa-tetraenol sav
HRAS/Hras1	v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog - Ha-ras
INK	Cyclin-dependent kinase inhibitor
ip.	Intraperitoneális
LTB ₄	Leukotrién B ₄
LTC ₄	Leukotrién C ₄
LTD ₄	Leukotrién D ₄
LXA ₄	Lipoxin A ₄
LXB ₄	Lipoxin B ₄
MAX	MYC associated factor X
MBB	E-2-(4'-metoxi-benzilidén)-1-benzoszuberon
MDM2	Murine Double Minute 2
MNU	N-nitroso-N-metil-karbamid - N-Nitroso-N-methylurea)
MPP+	1-metil-4-fenilpiridinium
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
MYC/Myc	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian) - c-myc
NOS	nitric oxide synthase
NP	1-nitropirén
NQO1	NAD(P)H-dehidrogenáz kinon 1
O ⁶ mG	O ⁶ metil-guanin
OEP	Országos Egészségbiztosítási Pénztár
PFDN5/Pfdn5	prefoldin 5 - Myc binding protein Myc-Modulator 1 - MM-1
PGD ₂	Prostaglandin D ₂
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGF ₂	Prostaglandin F ₂
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PRAD1	parathyroid adenomatosis 1
PSA	Prosztata specifikus antigén
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog Deleted On Chromosome-10

PUMA	p53-Upregulated Modulator Apoptosis
Q-RT-PCR	Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció
RB/RB1	Retinoblasztóma tumor szuppresszor gén/fehérje
ROS	Reactive Oxygen Species
SCE	Testvér kromatida kicserélődés - Sister Chromatide Exchange
TBA	Tiobarbitursav
TNF	Tumor nekrosis faktor
TP53/Trp53	Tumor protein p53/ transformation related protein 53
TPA	12-O-tetradekanoil-forbol-13-acetát - forbol-12-miristát-13-acetát
TxA	Tromboxán
WHO	Egészségügyi Világszervezet - World Health Organization

2. BEVEZETÉS

A fejlett országokban a mortalitási statisztikákban a daganatos megbetegedések a második helyet foglalják el a keringési rendszer betegségei mögött. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) adatai szerint az 56 milliós évi halálozás 12%-áért felelősek a rosszindulatú daganatok. Több országban, így hazánkban is az összhálaózás közel egynegyedét okozzák (1. ábra) [1]. 2002-ben a világon megközelítően 11 millió új rákos beteget diagnosztizáltak, és 7 millió daganatos halálozásról számoltak be. Az újabb rákos esetek 45%-a Ázsiában, 26%-a Európában, 15%-a Észak-Amerikában, 7%-a Közép- és Dél-Amerikában, 6%-a Afrikában és 1%-a Óceániában fordult elő. A leggyakrabban előforduló daganatos megbetegedések tüdő-, emlő-, vastagbél- és gyomorrák volt, ezt követte a sorban a prosztatatarák és a májrák [2].

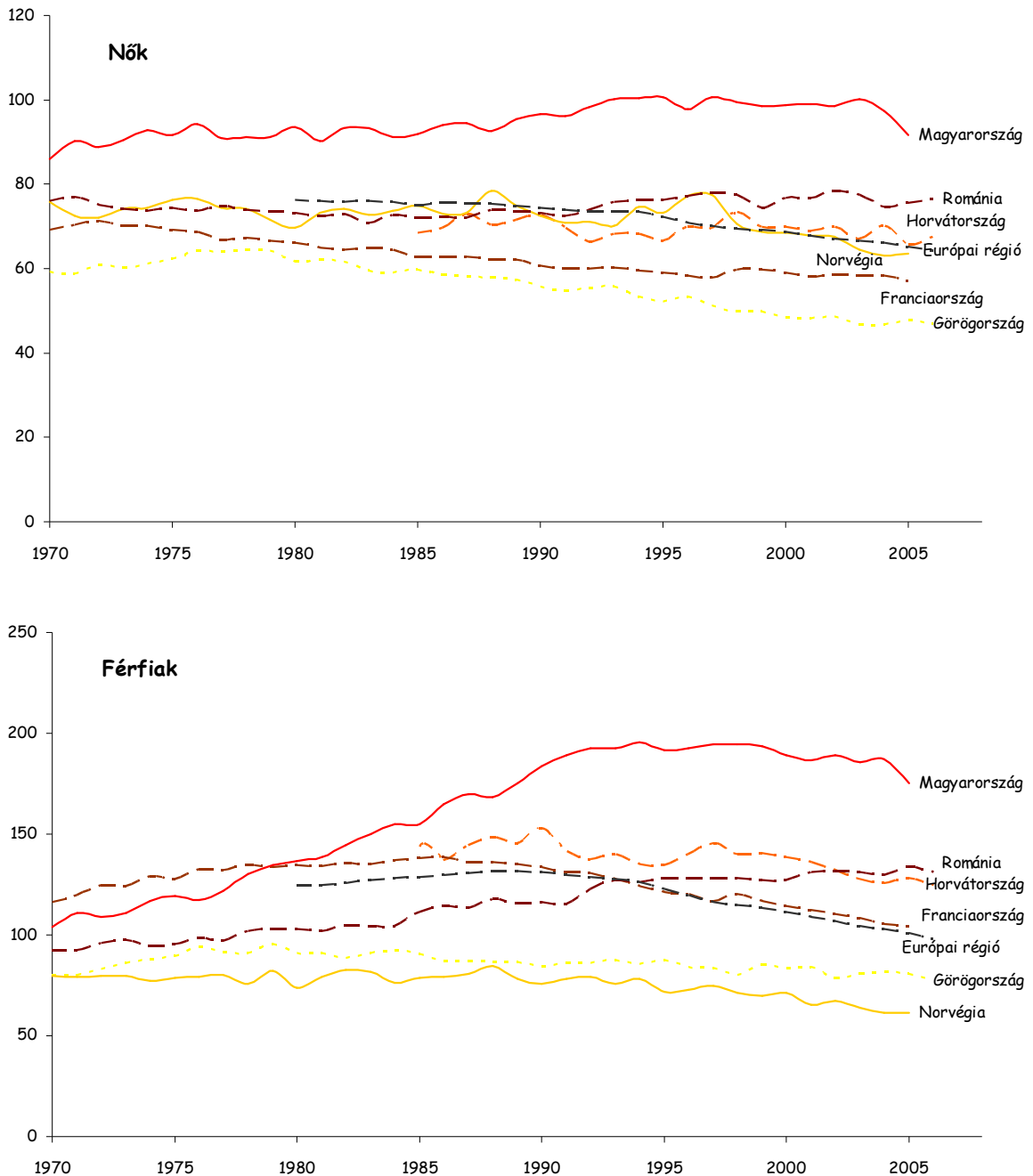


1. ábra: Mortalitási sorrend Magyarországon 2006-ban (Demográfiai Évkönyv)

A mortalitási sorrend ettől kissé eltér, a legmagasabb mortalitási arányt a tüdőrák, a gyomorrák és a vastagbélrák esetében regisztrálták [2].

A nemek közti eltérést vizsgálva megfigyelhető, hogy - eltekintve az emlő és nemi szervek daganataitól - az epehólyag, az epeutak és a pajzsmirigy rosszindulatú daganatai gyakoribbak nőkben, de ezen kívül minden daganattípusban a férfiak vezetnek. Ennek következtében mind az összincidenciában, mind az összhálaózásban a férfiak számaránya a nagyobb, bár a daganatos halálozás alakulása a hetvenes évektől napjainkig Európa különböző országaiban más-más képet mutat (2. ábra). Az ábrán látható néhány európai ország, valamint az Európai Régió átlag daganatos mortalitása 0-64 éves korú férfiak és nők esetében. A kor szerint standardizált mutatók szerint a nők esetén már a '70-es években is, a férfiak esetén a '80-

as évektől Magyarország vezet a halálozási statisztikákat. Míg Európában a kiemelt országokban (még Romániában is) folyamatos stagnálás illetve a halálozások enyhe csökkenése tapasztalható, hazánkban - különösen a férfiak esetén - csak a '90-es években mérséklődött a mortalitás emelkedésének üteme.



2. ábra: A daganatok okozta halálozási mutatók alakulása 1970-2006-ig Magyarországon, Romániában, Horvátországban, Franciaországban, Görögországban, Norvégiában és az Európai Régióban (0-64 éves korosztály mortalitása 100.000 lakosra vetített életkorral korrigált arány, HFA adatbázis)

A tumor lokalizáció szerinti halálozási sorrendet tekintve láthatjuk, hogy Magyarországon mindkét nemből a légcső-, hörgő-, tüdődaganatok állnak az első helyen, az első öt hely egyikén

szerepel a vastag- és végbél-, valamint a gyomordaganatok is a nőknél és a férfiaknál egyaránt (I. táblázat).

A WHO előrejelzése szerint a daganatos incidencia 2020-ra akár a 15 milliót is elérheti, ha életmódunk nem változik [1].

		Daganat típusa	Nyers halálozási szám	Aránya %-ban az össz rákos halálozáshoz viszonyítva	100 000 férfira ill. nőre vonatkoztatott mutató
Nők	1	Légcső, hörgő, tüdő	2 352	15.7	44.2
	2	Emlő	2 309	15.4	43.4
	3	Vastag- és végbél	2 311	15.4	43.5
	4	Vérképző szervek	939	6.3	17.7
	5	Gyomor	853	5.7	16.0
Férfiak	1	Légcső, hörgő, tüdő	5 849	30.1	121.6
	2	Vastag- és végbél	2 784	14.6	57.8
	3	Ajak, szájüreg, garat	1 456	7.6	30.3
	4	Prosztata	1 308	6.9	27.2
	5	Gyomor	1 182	6.2	24.6

I. táblázat: A daganatok okozta halálozási mutatók a daganatok lokalizációja szerinti bontásban férfiak és nők esetén (az első öt helyen szereplő daganatos mortalitás 2006-ban, Demográfiai Évkönyv)

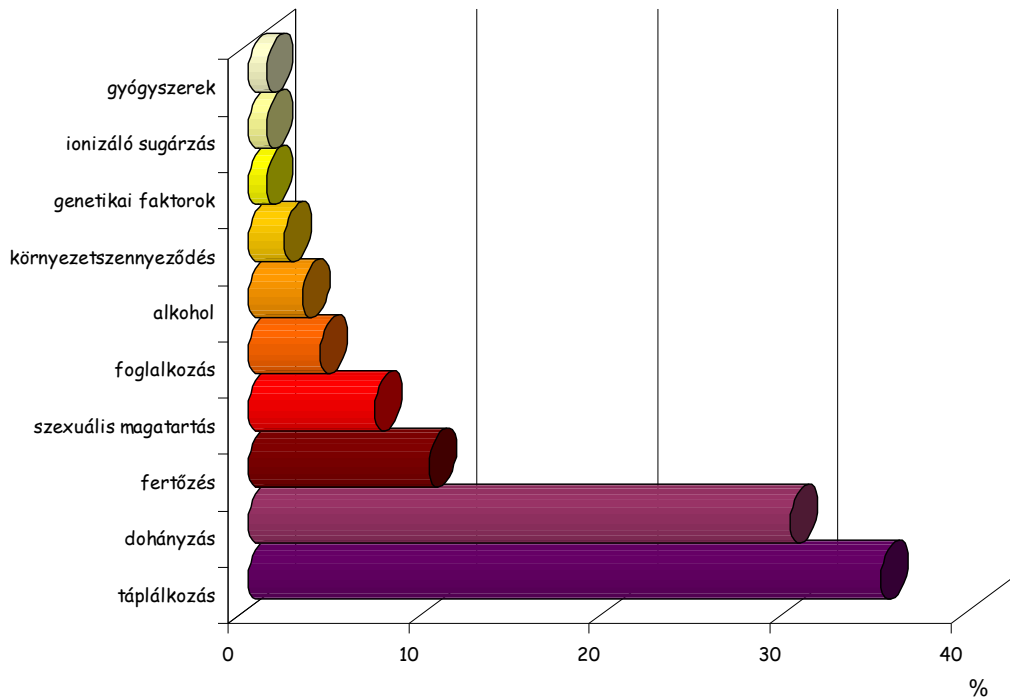
A táblázatokban, diagramokon látható adatok alapján kitűnik, hogy a daganatos betegségek okozta mortalitás/morbiditás Magyarországon súlyos társadalmi problémát okoz több évtizede. Az Európai Unióhoz való csatlakozásunkat követően különös hangsúlyt kap a daganatos betegségek gyakoriságának, illetve a daganatos betegségek következtében kialakult halálozási mutatóinak a többi uniós tagországgal való összehasonlítása, illetve annak javítása. 2008-ban látott napvilágot egy jelentés, melyet a stockholmi Karolinska Intézet kutatói publikáltak [2], a tanulmány részletesen foglalkozik az Európai Unió országain belül a rákos megbetegedés problémáival. Feltárja a betegség előfordulási gyakoriságát, tendenciáit, valamint a daganatos betegségek okozta szociális, társadalmi problémákat, a gyógyítás gazdasági mutatóit, a daganatellenes gyógyszerek kutatására fordított forrásokat. Megállapították, hogy a rákgyógyításra fordított költségek az egészségügyi kiadásokhoz viszonyítva (Magyarországon kb. 5%) szignifikánsan alacsonyabbak, mint az általa okozott a társadalmi teher mértéke. A rákgyógyítás társadalmi közvetlen költsége alatt a prevencióra, a

gyógyításra és egyebekre fordított összes anyagi forrást értjük; közvetett költségek pedig az elveszett anyagi forrásokat jelentik, mely a beteg munkaképességének elvesztéséből adódik, azaz a termelőkiesés költségeit fedi, amely a munkából való rövid idejű kimaradásnak, tartós rokkantságnak és a 65. életév előtti elhalálozásnak tulajdonítható. A rákos megbetegedések egészségügyi költségeiben domináns szerepet kap a kórházi ellátás, valamint a gyógyszerköltség, és egyre kevesebb a prevencióra fordított összeg. Az Országgyűlés ugyan elfogadta 2003. április 7-én a legújabb Népegészségügyi Programot, azonban Magyarországon a rendszerváltás óta nem volt még kormány, amely felvállalta volna a primer prevenció hosszú távú támogatását. A prevenció finanszírozása jelenleg legfeljebb 1-2%-a az OEP összköltségvetésének mely elsősorban a szekunder prevencióra vonatkozik, a primer prevenciónak lényegében nincs finanszírozása.

B. Jönsson és N. Wilking jelentése alapján ugyan gazdaságilag „megéri” a rákbetegek gyógyítása, azonban Magyarország gazdasági helyzetét, valamint az egészségügyi ellátórendszerünk folyamatos „reformját” figyelembe véve időszerű lenne egy átlagpolgár számára is elfogadható primer prevenció stratégia kialakítása.

Ha kellőképpen felismerésre kerülne az, hogy a primer prevenció támogatása mennyire hatásos és fontos az egészségügyi szektoron kívül is, akkor Magyarországon összefüggő, nagy, politikai, választási ciklusokon átívelő népegészségügyi programokkal hatékonyan lehetne fellépni bizonyos népbetegségek, pl. a daganatok ellen. Ha finanszírozási szinten vizsgáljuk ezt a kérdést, akkor is azt mondhatjuk, hogy a legolcsóbb a betegségek megelőzése, ugyanis ha nincsen kialakult betegség, nem kell azokat a társadalombiztosításnak finanszírozni, nem kell kezelni a szövődményeket sem.

A daganatos megbetegedések elsődleges megelőzését a kockázati tényezők elkerülése vagy legalábbis csökkentése, egyes esetekben védőoltások adása, a kemoprevenció és az egészségnevelés jelentik. A kockázati tényezők közül az egyik leghatékonyabb a dohányzás mellőzése. Az etiológiai tényezőket figyelembe véve jelentős szerepe van a táplálkozás preventív hatásának (3. ábra). A táplálkozási tényezőket összegezve elmondhatjuk, hogy a megelőzés érdekében célszerű kerülni a túlzott energia-bevitelt, a mindennapi zöldség-, gyümölcsfogyasztással biztosítható a kellő mennyiségű rostbevitel; emellett így bioaktív anyagokat juttathatunk be szervezetünkbe. Egyszerű cukrok helyett ajánlatos az összetett szénhidrátok fogyasztása. A fehérjebevitelben a szélsőségek kerülése célravezető, a húsok közül előnyösebbek a zsírszegény, fehér húsok fogyasztása. A zsírbevitelnél fontos az egyszeresen telítetlen és a többszörösen telítetlen, ω -3 zsírsavak minél nagyobb aránya. Kerülni kell az ételek odaégetését, a nyílt lángon való sütést, az ételek túlzott sózását, a forró italok-ételek és az alkohol fogyasztását.



3. ábra: A daganatok kialakulásában szerepet játszó etiológiai tényezők [4]

A daganatok megelőzésében legfontosabb feladat olyan biológiai markerek kutatása, fejlesztése, melyek segítséget nyújtanak a daganatos rizikó azonosításában, a rizikóbecslésben, valamint a kockázatok kezelésében populációs és egyéni szinten is (4. ábra).

BIOMARKEREK

kutatása, fejlesztése
validálása, szenzitivitása
kontrollja

Rizikóbecslés
Rizikóazonosítás
Rizikókezelése

Primer Prevenció

nem a korai betegségek felismerése,
hanem a rizikó azonosítása, becslése,
kezelése populációs és egyéni szinten

Monitoring (minden stádiumban)



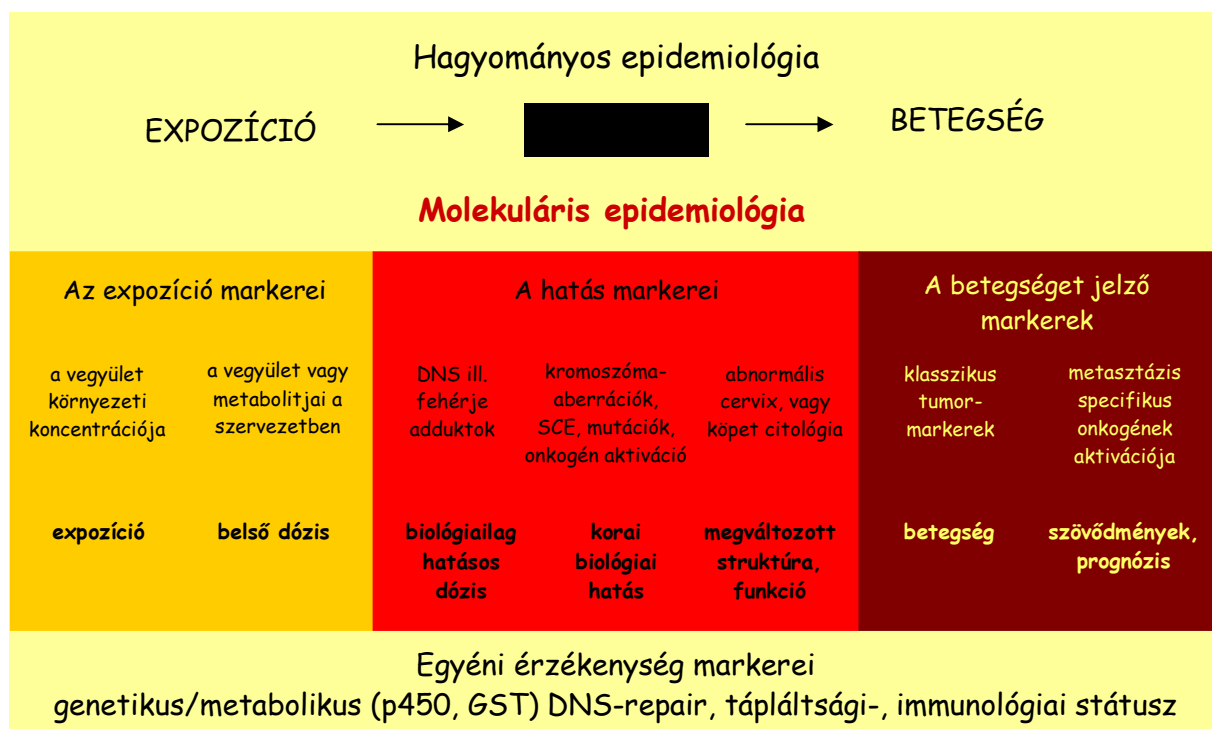
4. ábra: Az egészség-betegség folyamata közötti prevenciók lehetőségei és azok biomarkerekkel való monitorozása

A kuratív medicina feladata a diagnózis minél korábbi felállítása, speciális diagnosztikai markerek kutatása, valamint a célzott, hatásos terápia kialakítása. A genetikai változások korai szakaszában azonban, amikor még fenotípusosan nem detektálható az elváltozás, különösen nagy szerepet kap a preventív és prediktív medicina, primer prevenció eszközeivel, nem specifikus korai biomarkerek azonosításával, valamint a kemoprevenciós stratégiák kialakításával.

A kemoprevenció (a tudatos kemoprevenció) lényege, hogy természetes eredetű vagy szintetikus anyagokat hosszú időn keresztül fogyasztunk, annak érdekében, hogy a daganat kialakulását megelőzzük vagy a még reverzibilis folyamatokat visszafordítsuk. Állatkísérletes és humán epidemiológiai tanulmányok sora született számos potenciális kemopreventív vegyület, kivonat, gyógy- és fűszernövény jótékony hatásáról.

A kemoprevenciós eredmények értékelésére populációs szinten különböző epidemiológiai módszerek alkalmasak. Minél korszerűbb molekuláris epidemiológiai biomarkereket alkalmazunk, annál közelebb kerülünk a biztonságosabb daganatrizikó becsléshez.

Mivel az epidemiológia a betegségek kialakulásának, terjedésének törvényszerűségeit kutatja, természetes, hogy a molekuláris biológia újabb eredményei az epidemiológia fejlődésében is lényeges szerepet játszottak.



5. ábra: Molekuláris epidemiológia szintjei daganatos megbetegedések esetén [3]

E folyamat egyik eredménye a molekuláris epidemiológia kialakulása. A molekuláris epidemiológia tulajdonképpen a molekuláris biológiai módszerek felhasználását jelenti az epidemiológiában. A molekuláris epidemiológia különböző szintjein azonban nem a klasszikus értelemben vett markereket, nem diagnosztikai, hanem rizikóbecslő biomarkereket vizsgálhatunk, melyek olyan biológiai indikátorok, amelyek valamilyen környezeti, fizikai, kémiai, biológiai hatásra mutatnak elváltozást, s egyben prediktív jellegűek is (5. ábra). Biomarkerek az expozíciótól egészen a diagnosztikáig, valamint a szövődmények markerezéséig rendelkezésre állnak. A biomarkerek változásainak nyomon követésével lehetőség nyílik betekinteni az úgynevezett „fekete dobozba”, az expozíció és a betegség kialakulása közötti fázisok folyamatainak megismerésére [3].

Az expozíció markerei lehetővé teszik a veszélyeztetett személyek azonosítását, pl. foglalkozási expozíció esetén, érintett populáció kiszűrését, rizikóbecslést a környezet-egészségügyi gyakorlatban. A hatás markereihez tartoznak a kromoszómaszintű változást előrejelző markerek, pontmutációk, onkogén-, enzimaktivációk jelzése mRNS vagy fehérje szinten, valamint a morfológiai változások első jelei [3].

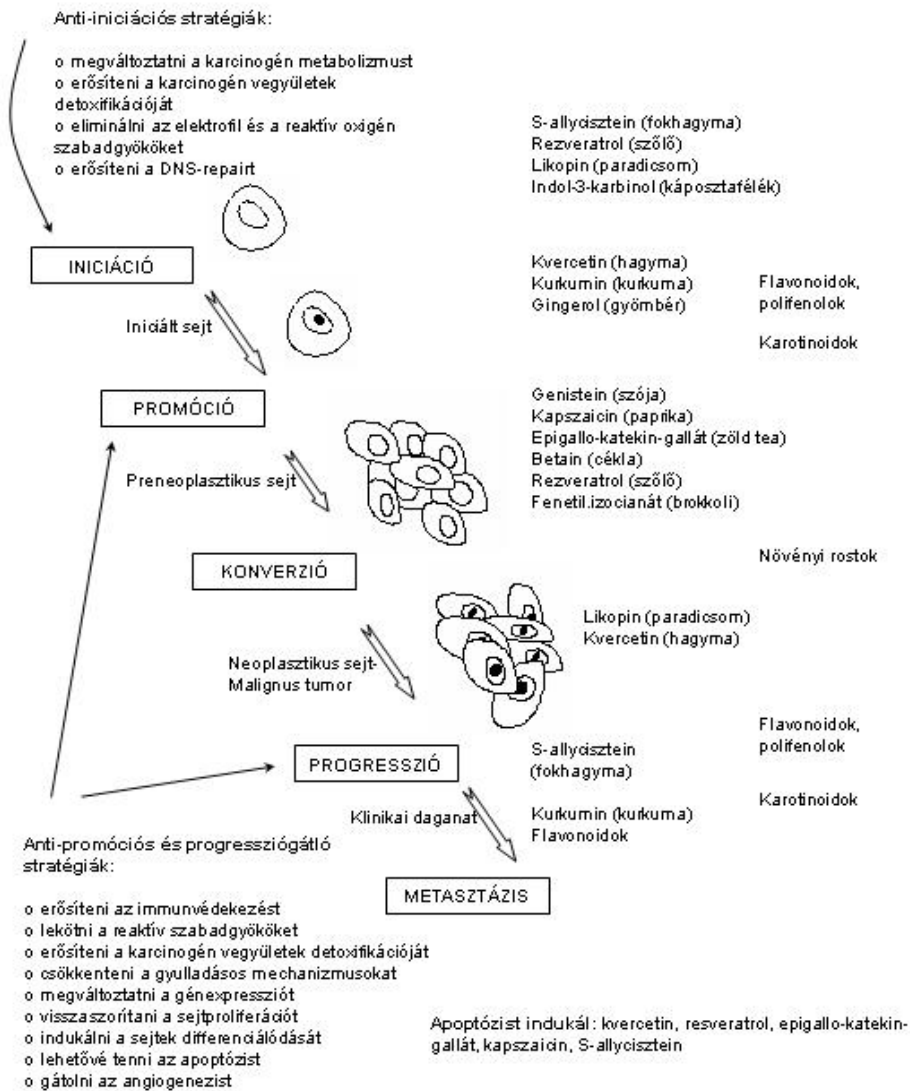
A molekuláris szintű, betegséget jelző, (diagnosztikus markerek) alkalmazása, manapság elsősorban a szűrést (szekunder prevenció) és a korai diagnózist segítik, így az egyre fejlettebb technikák lehetőséget nyújtanak a mortalitás csökkentésére is [3].

Az egyéni érzékenység markereinek vizsgálata fontos a kezdeti és a végpont közötti kockázati viszony leírása szempontjából. A tumorgenezis szempontjából jelentős gének polimorfizmusai, a tápláltsági, immunológiai státusz, stb. felelősek azért, hogy ugyanolyan környezeti expozíciónak kitett populációban csak bizonyos személyek lesznek betegek, mások pedig egészségesek maradnak. A molekuláris epidemiológiai biomarkerek vizsgálata nélkülözhetetlen a pontos kockázatbecsléshez, a karcinogén vegyületek humán hatásainak vizsgálatához, prevenciók stratégiák, egyénre szabott kockázatbecslés kidolgozásához [3].

Intézetünkben 1992 óta folynak molekuláris epidemiológiai kutatások, elsősorban a daganatokkal kapcsolatos prediktív molekuláris epidemiológiai biomarkerek terén. Kutatási tevékenységünk elsődlegesen a daganatok kialakulásának megelőzésére irányul. Ph.D. értekezésemhez kapcsolódó munkám során a hatás markereit, ezen belül is a korai biológiai hatás markereit tanulmányoztam. A korai biológiai hatás markerei a hosszú látenciaidő alatt bekövetkező változásokra derítenek fényt, s ezen változásokat az expozíciónak kitett egyéneknél a többlépcsős karcinogenezis (6. ábra) nagyon korai szakaszában lehet detektálni, amikor még a fenotípusban nincs változás, csak molekuláris (DNS, RNS, fehérje) szinten észlelhetünk a különbségeket (4. ábra).

Kutatásaimban olyan vegyületeket, kivonatokat vizsgáltam, melyek hatásukat a daganatok morfológiai detektálhatósága előtt fejtik ki - kémiai, fizikai biológiai tulajdonságaiknál fogva - , lehetnek rákkeltő, mutagén hatásúak, de fellelhetők köztük olyan kemopreventív szerek, mely a többlépcsős karcinogenezis valamely lépésénél fejtenek ki gátló hatásokat.

Eddig ezen hatások megfigyelésére vagy hosszú idejű és drága „long-term” állatkísérleteket vagy humán epidemiológiai vizsgálatokat alkalmaztak.

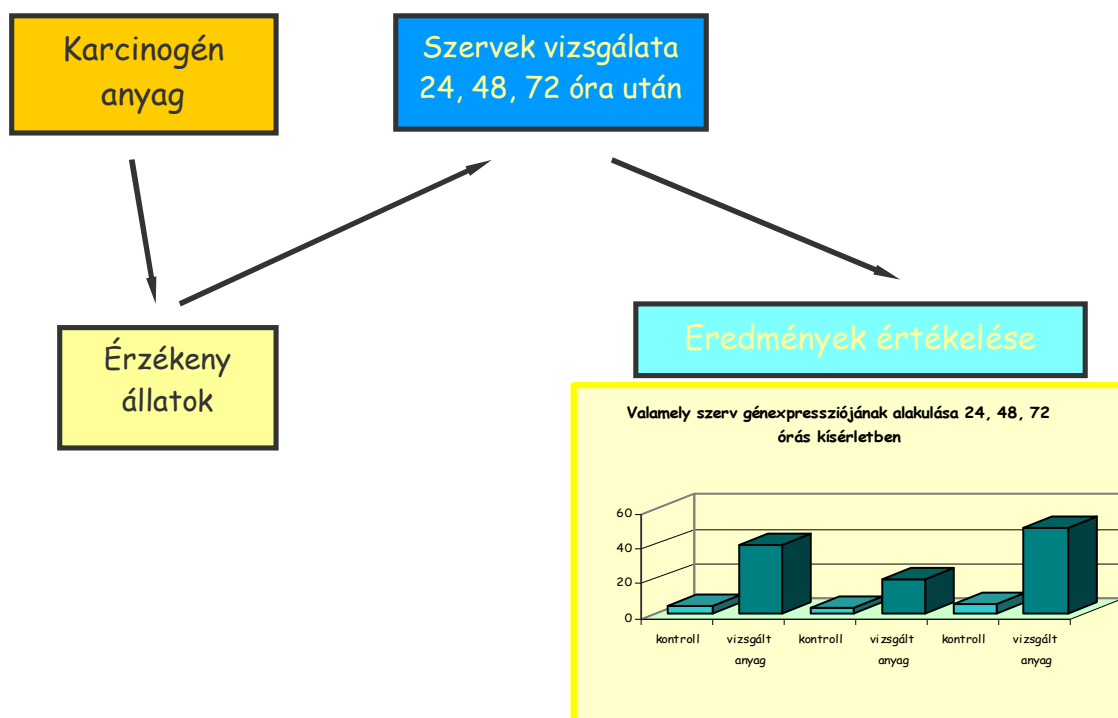


6. ábra Preventív stratégiák – beavatkozási lehetőségek a tumor kialakulás többlépcsős folyamatába [1]

Intézetünk az elmúlt években kidolgozott egy állatmodellt, mely gyors, olcsó módszer, - „short-term” állatmodell -, amely alkalmas a feltételezeten rákkeltő vegyületek vizsgálatára, valamint hipotézisünk szerint alkalmas potenciális kemopreventív tulajdonságokkal rendelkező vegyületek (keverékek) hatásainak vizsgálatára, valamint a kemoprofilaxis hatásait mérhetjük génszinten, így alkalmas lehet a beavatkozás hatékonyságának tesztelésre is [5,6,7].

A módszer alkalmas az expozíció és a korai biológiai hatás jelzésére a kémiai, fizikai, biológiai karcinogének esetében, valamint kvantitatív kockázatbecslésre ad lehetőséget humán populációban a daganatkeletkezésre nézve.

A tesztrendszer „short-term” rendszer, amely során a karcinogén vegyületeket kémiai karcinogenezis iránt érzékeny állattörzsre (pl. CBA-Ca/H-2^k egerek) gyakorolt hatását monitorizáljuk; a génextpressziót mRNS szinten határozzuk meg [6,8,9].



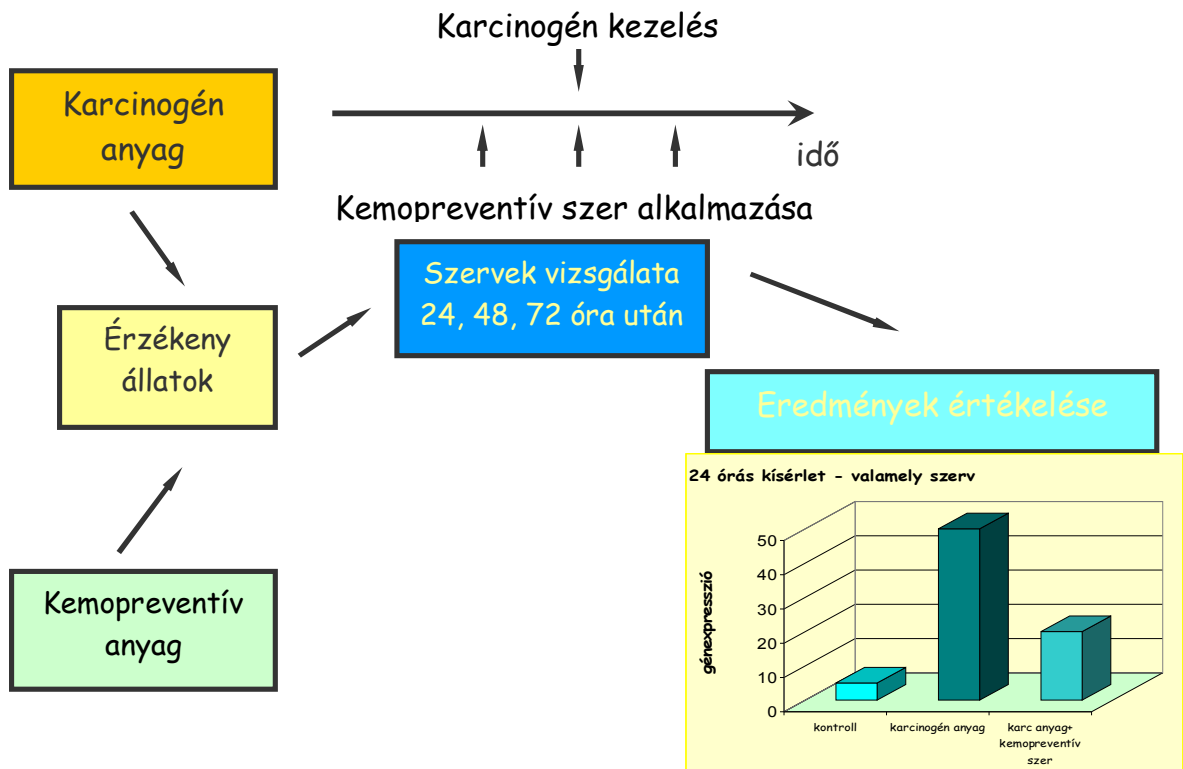
7. ábra: Karcinogén vegyületek „short-term” tesztrendszer algoritmus

A vizsgálati rendszer algoritmus a 7. ábrán látható. 24, 48 és 72 órával a karcinogén expozíció után az elölt állatok egyes szöveteiből - csecsemőmirigy (tímusz), lép, nyirokcsomó, csontvelő, máj, vese, tüdő, perifériás vér - való mintavétel után RNS-t izolálunk, majd hibridizációs technikával három kulcsgén, a *Hras1*, *Myc* és a *Trp53* gén expresszióját határozzuk meg. Az állatmodellben sikerült bizonyítani a korai, karcinogén hatásra létrejövő genetikai változásokat (génamplifikáció, génextpresszióváltozás és mutáció) és a később kialakuló tumor közötti összefüggéseket [10].

A kidolgozott állatmodell kis módosításokkal alkalmas lehet kemopreventív ágensek vizsgálatára is. A módosított modell sémája a 8. ábrán látható [11].

Kemopreventív anyagok esetében a vizsgált vegyület egy bizonyítottan karcinogén anyag (pl. DMBA - 7,12-dimetil-benz(a)antracén) által kiváltott génextpresszió-változásokra gyakorolt

hatását vizsgálhatjuk. A kezelések hatékonyságát a fent említett kulcsgének vizsgálatán felül kiterjeszthetjük azon gének (enzimek) génexpressziós sajtságainak vizsgálatára, melyek fontos szerepet játszanak a karcinogén expozíciót követő 24-72 órában lezajló korai molekuláris szintű folyamatokban, célzottan a vizsgált vegyület feltételezhető hatásmechanizmusának megfelelően.



8. ábra: Kemopreventív vegyületek „short-term” tesztrendszerünk algoritmus

A biomolekulák (DNS, RNS, fehérjék, enzimek) monitorozása az egészséges állapottól kezdve, az iniciáción keresztül egészen a daganatsejtek, majd a daganat megjelenéséig számos lehetőséget nyújt az esetleges beavatkozásra, prevencióra. Az onkogének, szuppresszorgének expressziójának vizsgálata, apoptotikus folyamatok, sejtciklus szabályozás és a metabolikus útvonalak karcinogén expozícióra való reagálásának detektálása lehetőséget nyújt hatékony kemopreventív stratégiák kidolgozására.

Munkám során elsősorban olyan vegyületek, (gyógy- és fűszernövények) korai biológiai hatását vizsgáltam állatkísérletes modellen, melyek alkalmazása táplálkozásunkban lehetőséget nyújthat a daganatok rizikójának csökkentésére.

3. HÁTTÉR, ELŐZMÉNYEK

3.1. A daganatok megelőzésének lehetőségei, a kemoprevenció [1]

A kémiai karcinogenezis folyamata során általában hosszú idő telik el az expozíció és a betegség kialakulása, valamint a klinikai tünetek és a metasztázisok megjelenése között. A rák kialakulásának megelőzése szempontjából fontos szerep juthat a különböző kemopreventív hatású vegyületeknek, melyek mindennapi ételmünkkel kerülhetnek be a szervezetünkbe. Az utóbbi években született epidemiológiai tanulmányok döntő bizonyítékot nyújtanak néhány étrendi összetevő kemopreventív, rákmegelőző hatására. Ezen vegyületek megszakíthatják a többlépcsős karcinogenezis folyamatát, detoxikáló, antioxidáns hatással is rendelkezhetnek, valamint szerepet játszhatnak a sejtszintű védelemben, pl. az apoptózis indukálásában.

A tumorok aktuális klinikai terápiája a rák korai felfedezésétől a metasztázis kialakulásának megakadályozásáig több lehetőséget is rejt magában. Többek között sebészeti eljárások, kemoterápia és sugárkezelés lehetősége merül fel, de korlátozottak a lehetőségek, különösen a metasztázis kialakulásának, valamint a kezelés okozta szekunder tumorok kialakulásának megakadályozása terén is. Több epidemiológiai tanulmány is készült azonban, melyek a tumor kialakulás megelőzési lehetőségeit tárják fel, a karcinogenezis korai szakaszában való beavatkozással, prevenció által. Több potenciális rákmegelőző ágenssel folytak kutatások, melyeket hatásmechanizmusuk alapján három fő csoportba oszthatunk. A kemopreventív szerek klasszifikációja azon elven alapul, hogy a karcinogenezis többlépcsős folyamatában melyik ponton fejtenek ki protektív hatást (6. ábra, 13. oldal).

A gátló szerek azon vegyületek, melyek a prekursor molekulákból keletkező karcinogének vagy a reaktív metabolitok létrejöttét gátolják.

A blokkoló szerek, melyek a végső elektrofil, karcinogén vegyületek célmolekulákhoz való kötődését blokkolják (DNS-, fehérje-adduktok kialakulásának gátlása), így akadályozva meg az iniciációt. Ezen csoportba tartozó kemopreventív ágensek biokémiai hatása lehet, hogy csökkentik a karcinogén vegyületek metabolikus aktiválását, modulálják az I. és II. típusú metabolizáló enzimek expresszióját, karcinogén vegyületekkel való kémiai reakció folytán „befogják”, inaktíválják a szabad gyököket, valamint erősítik a DNS-hibajavító mechanizmusokat. A szuppresszálo szerek az iniciált sejtek malignus transzformációját akadályozzák meg vagy a promóció, vagy a progresszió gátlásával.

Egyes vegyületek, melyek, kemopreventív hatásukat speciális útvonalon fejtik ki, a preneoplasztikus vagy neoplasztikus sejtekre apoptózist indukáló hatással vannak.

Hasonló szerkezetű vegyületek (pl. flavonoidok, szaponinok, fitoösztrogének) sejten belüli viselkedése, kemopreventív hatásuk mechanizmusa is hasonló, némelyikük blokkoló és szuppresszálo hatással egyaránt rendelkezik (6. ábra, 13. oldal).

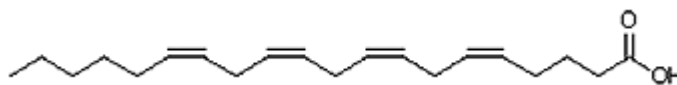
Sok természetes eredetű gátló, blokkoló vagy szuppresszálo szer kerül szervezetünkbe a napi étrendünkkel, pl. brokkoliból, szőlőből, szójababból, zöldteából, vagy gyömbérrel, görögszénával, kurkumával ízesített étteleinkből.

A blokkoló ágensek illetve szuppresszálo ágensek hatását molekuláris biológiai módszerekkel, többek között génexpressziós profil analízisével lehet jellemezni, mRNS vagy fehérje szinten.

3.1.1. A telítetlen zsírsavak lebontása - eikozanoidok képződése

"Eikozanoid" szó görög eredetű, az *eicosa* szó jelentése húsz, tehát a húsz szénatomos zsírsavszármazékok neve alkotható ebből a szóból. A prosztaglandinok, tromboxánok, és leukotriének az eikozanoidok csoportjába tartoznak. Ezen zsírsavszármazékokhoz számos fiziológiai és patológias folyamat köthető, a folyadéktranszportban, a gyulladáso folyamatokban és a mitogenezisben is feltárták szerepüket [12].

A prosztaglandinokat már az 1930-as években azonosították, mint simaizom serkentőt. Bergstrom és Samuelsson [13] 1964-ben feltárta a prosztaglandinok szerkezetét és rámutatott, hogy egy fontos zsírsavból, az arachidonsavból származnak. Az arachidonsav (9. ábra) biológiai fontossága azon tulajdonságán alapul, hogy számos enzim szubsztrátja, ezen enzimatis utvonalak mentén keletkező metabolitok, az eikozanoidok szerepet játszanak többek között gyulladáso folyamatokban, valamint a karcinogenezisben.

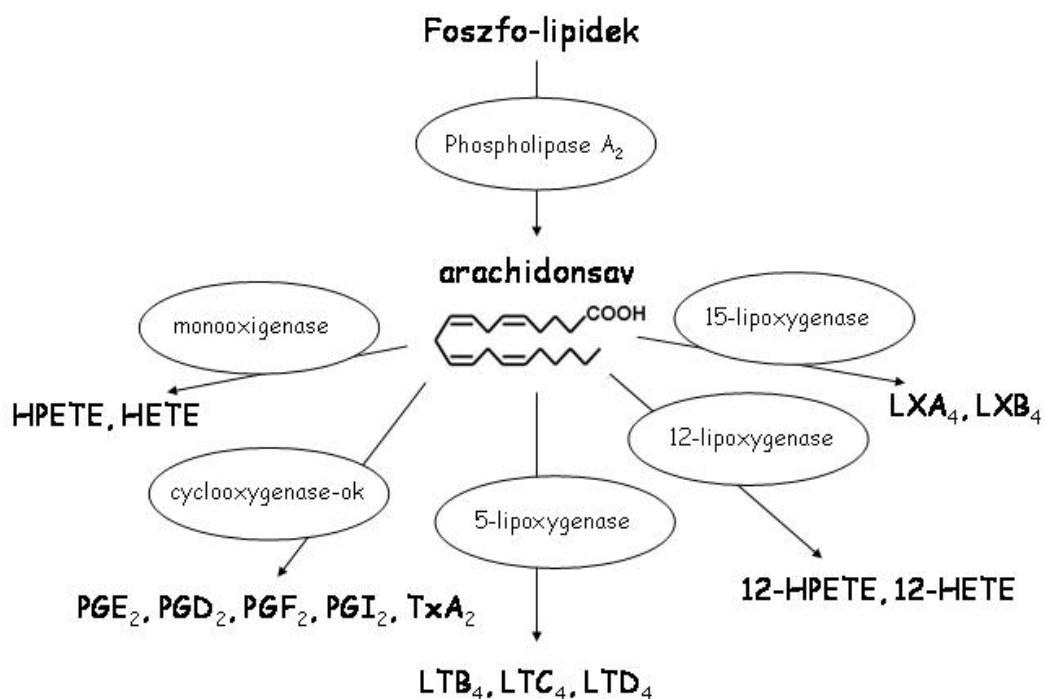


9. ábra: Az arachidonsav szerkezeteki képlete

A sejtmembrán foszfolipidjei arachidonsavvá konvertálódnak a foszfolipáz A₂ enzim hatására, mely alapvegyületként szolgál a két potenciális karcinogén hatású eikozanoid csoport, a prosztaglandinok és a leukotriének szintéziséhez [14]. A foszfolipáz A₂ enzim rutinszerűen jelen van, részt vesz a sejtmembrán karbantartásában, de ha valamely jel hatására indukálódik, részt vesz a gyulladáso folyamat elindításában, fenntartásában. Az arachidonsav felszabadulás, azaz a foszfolipáz A₂ gátolható többek között kortikoszteroidokkal [12].

A sejtjeink többsége termel prosztaglandinokat, melyek fontos szerepet játszanak a legtöbb szövetben [12]. Elsődleges szerepük, hogy befolyásolják a trombocita aggregációt,

összehúzzák vagy elernyesztik az ereket. A másik fő csoport, a tromboxánok a trombociták termékei, erősítik a trombocita aggregációt, fokozzák az erek és a tüdő mikrotubulusok szűkületét. A leukotriéneket az immunrendszer sejtjei termelik, fokozott termelődése jel az immunrendszer molekuláinak, az interleukineknek és az interferonoknak, így szerepet játszhatnak az autoimmun betegségek, az allergia és az anafilaxiás reakció kialakulásában [14]. A szervezetünkben az eikozanoidok képződésének kulcs enzime a ciklo-oxigenázok, melyek a prosztaglandinok és tromboxánok képződéséért felelősek, a lipoxigenáz útvonal mentén képződnek a leukotriének (10. ábra) [15]. Az arachidonsav szubsztrátja a 15-lipoxigenáz (ALOX15), 5-lipoxigenáz (ALOX5) vagy a 12-lipoxigenáz (ALOX12) enzimeknek is, különböző eikozanoidokat képeznek belőle (11. ábra) [15].

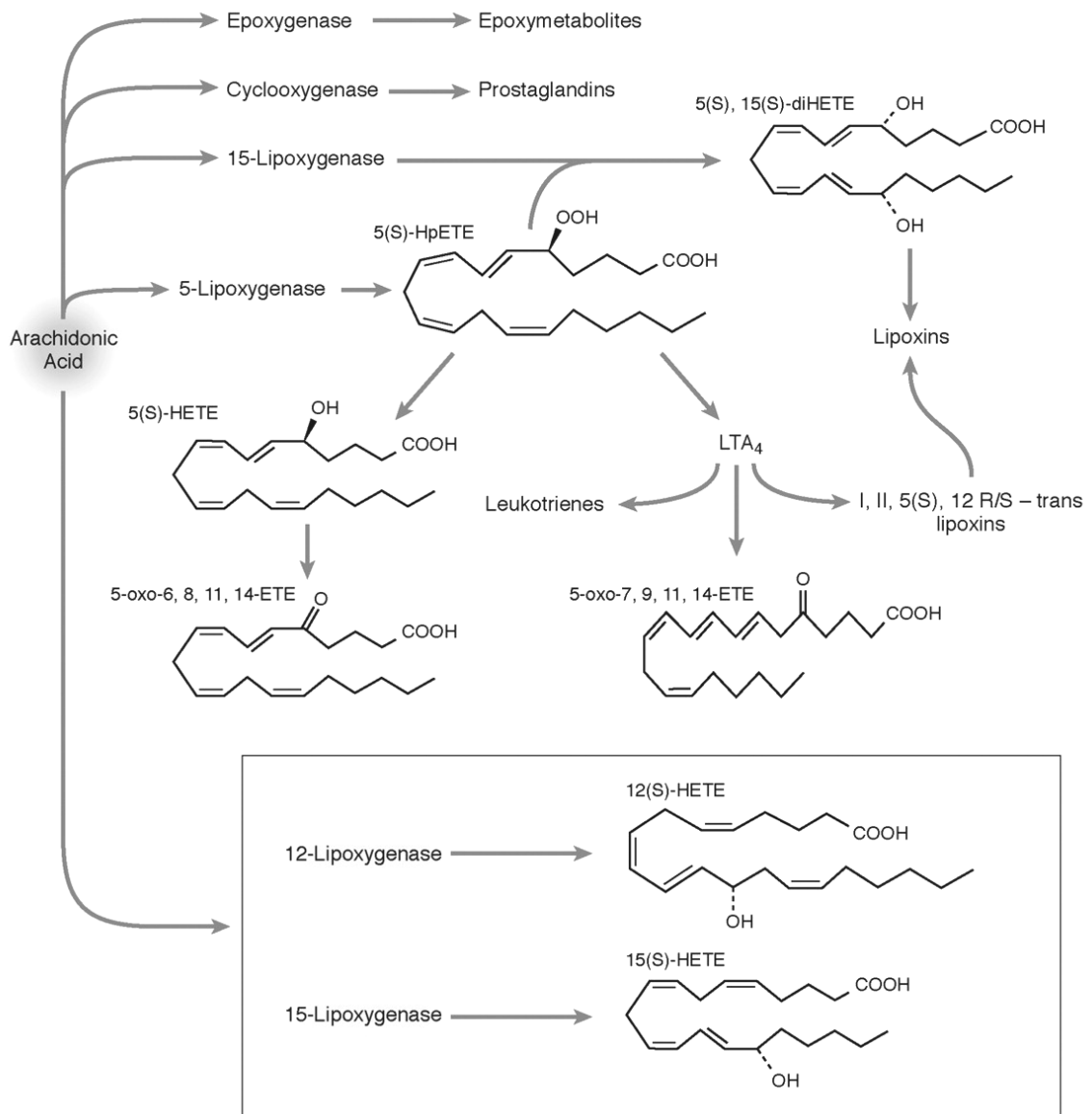


10. ábra: ALOX és COX útvonalak

Több tanulmány is született, melyekben rámutattak, hogy a gyulladáscsökkentő hatású vegyületek vastagbél daganat sejtvonalakon gátolják a sejtproliferációt, s ezután a sejtciklus az apoptózis irányába fordul [12,16]. Ezen kísérletek alapján gyulladáscsökkentő hatású vegyületek alkalmasak lehetnek, mint potenciális kemopreventív szerek többek között a kolorektális daganatok megelőzésében [12].

A ciklooxigenázoknak két izoformája van, COX1 és COX2 [14, 17]. A COX1 folyamatosan expresszálódik és alapszinten tartja azon prosztaglandinokat a sejtekben, melyek normál

fiziológiás működéshez elengedhetetlenek. A COX2 izoenzim normál sejtben nem csak gyulladások helyén expresszálódik, képződését szabályozza számos növekedési faktor, tumor promóterek, és citokinek [14,18].



11. ábra: Az arachidonsav metabolizmus útvonala és a termékek szerkezeti képlete [15]

A gyulladáscsökkentő hatású vegyületek különbözőképpen gátolják a COX1 és COX2 enzimeket [19]. Irodalom szerint a nem-szteroid gyulladáscsökkentő hatású vegyületek gátolják az angiogenezist két mechanizmus szerint; gátolják a COX2 aktivitás kolon karcinóma sejtvonalakon, alulszabályozzák angiogénikus faktorok termelését, és csökkentik a COX1 aktivitást az endotél sejtekben [20,21].

Mindkét izoforma felelős a prosztaglandin E₂ (PGE₂) megemelkedett szintjéért, mely eikozanoid magas szintje pozitív korrelációt mutat a tumorgenezissel [22].

E vegyület szerepet játszik a daganatok patogenezisében a mitogenezis és a celluláris adhézió folyamatában, az immunrendszer felügyeletében, és az apoptózisban, malignus szövetben a prosztaglandinok overexpresszióját találták, normál szövethez képest [14].

A ciklooxygenázok szerepét kolon tumorokban több kutatócsoport is vizsgálta. Azt találták, hogy a COX2 enzimnek kiemelkedő szerepe van a malignus folyamatokban, COX2 enzim szintet következetesen túlszabályozottnak detektálták kolon tumorokban [14,16,23].

Megemelkedett COX2 szintet találtak humán kolorektális adenokarcinómákban, valamint karcinogénnel indukált patkány vastagbél daganatokban is [23,24]. Humán epidemiológiai, valamint állatkísérletes modelleken bizonyították, hogy a prosztaglandin szintézis gátlása a COX2-n keresztül védő szerepet jelent emlő, vastagbél, nyelőcső, tüdő, bőr és fej-nyaki daganatokban is [23,24], valamint protektív hatását igazolták a nem-szteroid gyulladáscsökkentő szereknek (Nsaids) kolorektális daganatok esetén is *in vitro* és *in vivo*, így fontos szerep juthat ezen vegyületeknek a daganatok megelőzésében [25]. Epidemiológiai tanulmányok szerint a COX2-t expresszáló tumorok jelenléte, összefüggésbe hozható a rosszabb prognózissal, a rövidebb túléléssel [25].

Ezen tudományos bizonyítékok alapján feltételezhetjük, hogy a gyulladáscsökkentő hatású természetes eredetű vegyületek, hasonlóan a mesterséges nem-szteroid gyulladáscsökkentőkhöz, a különböző daganatok kemoprevenációjában fontos szerepet tölthetnek be.

Az utóbbi időben az érdeklődés középpontjában a lipoxigenázok, illetve a leukotriének képződésének blokkolása, azaz ezen enzimek gátlásának lehetőségei állnak.

A három legfontosabb enzim a leukotrién útvonalban az ALOX5, ALOX12, és LOX15. Legtöbb figyelem az ALOX5 enzimre összpontosul, mint kulcsenzimre a leukotriének felszabadulásában. Kutatások bizonyítják, hogy ennek a metabolikus útvonalnak ezen köztitermékei szerepet játszanak a gyulladások kialakulásában, valamint karcinogenezisben [14].

A lipoxinek bioszintézise (ALOX-okból származtatott eikozanoidok) különböző enzimatisz utvonalon történik. Az egyik lehetőség az ALOX15 útvonal, mely LXA₄, LXB₄ metabolitokat termel, illetve a 15(S)-HETE, mely lipoxinok ismert tulajdonsága, hogy elősegíti a gyulladással folyamatok elindulását, valamint daganat kialakulását (10. és 11. ábra) [26].

Tapasztalatok szerint a COX2 szelektív blokkolása során megemelkedhet a ALOX5 enzim szint, a felhalmozódott arachidonsav leukotriénekké alakul a lipoxigenáz útvonalon keresztül. Állatkísérletekből és *in vitro* tanulmányokból nyilvánvalóvá vált, hogy ALOX5 expresszió megemelkedik a neoplastikus átalakulás során [27,28,29].

Megemelkedett ALOX5 expressziót detektáltak korai kolon neoplazmákban és a gén túlszabályozását fedezték fel kolon polipokban, daganatokban [30,31,32].

Olyan hatóanyagokat, természetes eredetű vegyületeket kell kifejleszteni, melyek képesek blokkolni a lipoxigenáz útvonalat, pl. ALOX5 inhibitorok vagy leukotrién receptor antagonisták [33].

15-lipoxigenázokról ismert, hogy két izoformája expresszálódik, úgymint 15-LOX-1 (ALOX15) és 15-LOX-2. Ezen enzimek szerepet játszanak a szabályozás transzkripcionális, translációnális és poszt-transzlációnális szintjén [34,35]. ALOX15-t expresszálnak retikulociták, eozinofilek és epiteliális sejtek, valamint makrofágok és ateroszklerotikus léziók [16,34]. Az enzim szerepet játszik sejt differenciáció szabályozásában, gyulladásban, asztmatikus folyamatokban, karcinogenezisben [34,35]. Elsődleges szubsztrátja a linolénsav és az arachidonsav [36], terméke a 13(S)-HODE (13(S)-hidroxi-oktadekadienol sav) [37]. Irodalmi adatok szerint a 13(S)-HODE elősegíti a sejtproliferációt. Tapasztalták, hogy ha megemelkedik a 13(S)-HODE dehidrogenáz aktivitása, mely a 13(S)-HODE-t 13-oxo-oktadekadienol savvá bontja, csökken a kolon-epiteliális sejtek malignus átalakulása.

Több bizonyíték alapján feltételezhetjük, hogy a 12-lipoxigenáz (ALOX12) terméke, a 12(S)-HETE (12(S)-hidroxi-eicoza-tetraenol sav) is közreműködik a karcinogenezisben [38]. ALOX12 mRNS és fehérje overexpresszióját mérték prosztatata, melanoma, és más tumor sejtvonalakban [39,40]. Az enzim a daganat sejtekben termel 12(S)-HETE-t, mely elősegíti a tumorgenezis több lépését, mint pl. az inváziót és a metasztázis képződést [41].

Az arachidonsav metabolizmus útvonalait nem lehet egymástól függetlenül, elszigetelten tárgyalni, az azonos szubsztráttal rendelkező enzimikus útvonalak hatnak egymásra. Elsősorban ALOX5, ALOX12 és COX2 enzimeket találták együtt túlszabályozott állapotban tumor-sejtvonalakban, humán daganatokban, pl. tüdőkarinómában, vastagbél prosztatata és emlődaganatokban [34]. Irodalmi adatok szerint mindhárom enzim elősegíti az érképződést, daganat sejtvonalon végzett kísérletek során tapasztalták, hogy gátlásuk során a sejtek apoptotizáltak [29,42,43].

Természetesen a végső cél az lehet, hogy olyan gyógynövény kivonatokat, vegyületeket, találjunk, melyek képesek egyidejűleg blokkolni a mind a COX2 mind az ALOX5, ALOX12 és ALOX15 enzimeket, így a gyulladáscsökkentő, antikarcinogén hatás teljessé válhatna az arachidonsav metabolizmus útvonalon.

3.1.2. Az apoptózis és a sejtciklus szabályozás, mint kemoprevenziós célpont (Bcl2, Bcl2l, Ccnd1)

Az apoptózis, mely során a sejt működése bizonyos ingerek hatására az ún. „programozott sejthalál” felé indul el, az egyik legfontosabb homeosztázist fenntartó szabályozó folyamat az élőlényekben [44], ennek fényében az apoptózis egyike lehet a leghatásosabb preventív stratégiának a rákkal szemben, ugyanis a folyamat során eliminálódnak a potenciálisan ártalmas, mutált sejtek [45,46].

Sok betegségnek a patogenezise, beleértve a rákot is, szorosan összefügg a programozott sejthalál abnormális szabályozásával. Az utóbbi két évtized kutatásai rávilágítottak az apoptózis szabályozásának alapvető mechanizmusaira, lefektették az alapjait a megelőzésben alkalmazható tumor kemopreventív stratégiáknak [45]. Több újszerű tanulmány született, többek között génterápiai megközelítés, antiszensz stratégia, rekombináns biológia, klasszikus szerves és kombinatorikus kémia körében annak érdekében, hogy speciális apoptotikus szabályozókat találjanak [45].

Számos bizonyítékot találtak arra, hogy egyes étrendi eredetű bioaktív komponensek beindíthatják az apoptózist.

Az apoptózis molekuláris háttere

Két útvonalat ismerünk, mely az apoptózishoz vezet, az un: "Extrinsic" - külsőleges - sejthalál-receptor út és "Intrinsic" - belső - mitokondriális út". Mindkettőben szerepet játszanak a Cys (Cystein) család fehérje bontó enzimejei, az un. kaspázok-ok, melyeknek feladata katalizálni a haldokló sejtek lebontását egy „proteolitikus kaszkád”-on keresztül [44,45].

A sejthalál-receptor útvonal a sejten kívüli ingerre indul be, valamely apoptotikus jel hatására. Az apoptózist stimuláló jelet adó vegyületek különböző citotoxikus stressz-t okoznak, ezáltal aktiválják a receptor rendszeren keresztüli útvonalat. A sejtfelszíni receptorok közé tartozó sejthalál receptorok apoptotikus jellel indítják el a folyamatot, mely során másodperceken belül aktiválják a kaspázokat, így néhány óra alatt lejátszódik a sejt elpusztulása [45].

A receptorhoz kötött apoptózison felül leírtak egy másik útvonalat, mely a celluláris stressz különféle fajtáin alapul. A stressz-hatások, melyek előidézhetik az apoptózist, lehetnek pl. gamma sugárzás, UV sugárzás, citotoxikus gyógyszerekkel történő kezelés, kémiai karcinogének. A stressz-indukálta apoptózis egy olyan mechanizmuson keresztül játszódik le, amely során megváltozhat a mitokondrium áteresztő képessége, aktiválódik a cyt C kibocsátás és egy katalitikus multiprotein kaszkádon át aktiválódik a kaspáz 9.

Az aktivált kaszpáz 9 hasítja a kaszpáz 3-t, s olyan eseményeket indít be, melynek vége akár sejthalál is lehet. A citokrom C kibocsátást szabályozzák a BCL2 család fehérjéi, a BCL2 család anti-apoptotikus fehérjéi, melyek a mitokondriális membrán külső felén gátolják a citokrom C kiáramlást.

A BAX (BCL2 Associated X fehérje), a BID (BH3 Interacting Death Domain) és a BIM (BCL2-Interacting Protein) kezdetben inaktívak, és az apoptózis beindulásához a mitokondriumhoz kell transzlokálódniuk, közvetlenül a mitokondrium pórusain vagy a BH3 doménon kötött BCL2, BCL2L1 és BCL2A1, melyek az antiapoptotikus fehérjék antagonistái [47].

A második mechanizmus szerint BAX szabadul fel, a citoszólból a mitokondrium különböző jelekre adott válaszként. A fehérje oligomerje alakítja ki a pórust, a pórusképződés szintén BH3-n zajlik, a BCL2 család tagjaival konjugálódva, a BID proteolízisen keresztül. A BAK1 a mitokondriumban helyezkedik el és hasonlóan alakítja ki a pórust mint a BAX, oligomerizálódik és kapcsolódik a BID-hez. A BID-et aktiválja a sejthalál receptor kaszpáz 8-indukált hasítást, míg a BIM kiszabadul a mikrotubulusokkal való kapcsolatából [47, 48].

Az apoptózis belső - mitokondriális - útvonala akkor indul be, ha a sejten belül történik valamilyen károsodás. Ezen út aktiválódását okozhatja pl. hipoxia, onkogének, közvetlen DNS károsodás, túlélési faktor hiány. A TP53 fehérje az érzékelője a celluláris stressznek, mely a belső apoptotikus útvonal aktiválásának kulcs fehérjéje [49].

A TP53 fehérje közvetlenül foszforilálja és stabilizálja a DNS ellenőrzőpont fehérjéket, (ATM - Ataxia Telangiectasia Mutated - fehérje és Chk2 - Checkpoints Factor-2) és jelenléte gátolja MDM2-t (Mouse Double Minute-2 Homolog). Az MDM2 kapcsolódik a TP53 fehérjéhez, befolyásolja a magi exportot [50].

Amikor az MDM2 kötődik a TP53 fehérjéhez, a TP53 a transzkripció aktivátor funkcióját nem képes betölteni. A TP53 iniciálja az apoptózist úgy, hogy a BCL2 család proapoptotikus fehérjéit aktiválja, és elnyomja az antiapoptotikus fehérjéket és a CIAP-kat [50].

A TP53 más célpontjai, pl. a BAX, NOXA, PUMA (TP53-Upregulated Modulator Apoptosis) valamint a nemrég azonosított BID. A TP53 keresztaktivál olyan más apoptotikus géneket, mint PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted On Chromosome-10), APAF1, TP53-AIP1 (TP53-regulated Apoptosis-Inducing Protein-1), és olyan géneket is aktivál, melyek a ROS (Reactive Oxygen Species) növekedéséhez vezetnek. A ROS-ok generalizált oxidatív károsodásokat okoznak a mitokondrium biomolekuláiban. A mitokondriális DNS-ben keletkezett károsodás pl. megszakítja a foszforilációt, hozzájárul több betegség kialakulásához [45, 50].

A sejtciklus vázlatos modellje

A sejtciklus egy szekvenciális folyamat adott irányban játszódik le az emlős sejtekben, lépései G_1 , S, G_2 és M fázis. A sejtciklus ellenőrzött a CDK-k (Ciklin dependens kinázok) aktivitásának köszönhetően, a pozitív szabályozó aegységet alkotja a periodikusan váltakozó szintézis és bomlás, melyet a ciklinek ingadozó szintje befolyásol, a negatív szabályozás része a CDI-k (CDK inhibitorok) szintje, és a reverzibilis foszforiláció. A különböző ciklinek specifikusan a sejtciklus G_1 , S, vagy az M fázisában akkumulálódnak, és megfelelő ideig aktiválják a CDK-kat, majd lebomlásukkal inaktíválódnak a kinázok. A CKI szintje, mint specifikus inhibitorai a Ciklin/CDK komplexeknek, szintén emelkedik és esik a sejtciklus speciális időpontjában [46, 51].

A G_1/S és a G_2/M fázis közötti átmenetben van egy-egy ellenőrzőpont, ahol leállhat a sejtosztódás abban az esetben, ha szükséges. A ciklinek, kapcsolódva a CDK-kal ezen ellenőrző pontokon befolyásolják a sejtosztódást, a szabályozott folyamat megszakítása a sejtciklus blokkolásához vagy kontrollálatlan sejtproliferációhoz vezethet. Azon biomolekulák defektusai, melyek a sejtciklus szabályozásban részt vesznek, szintén karcinogenezishez vezethetnek, másrészt a sejtciklus megzavarása az ellenőrzési pontokon pl. étrendi eredetű kemopreventív ágenssel, specifikusan gátolható a tumorsejtek proliferációja [51, 52].

A kulcsfehérjék, melyek a sejtciklus progresszióját és a DNS hibajavító rendszert szabályozzák a TP53, a CKI-ok (p15 (INK4B), p16 (INK4A), p18 (INK4C), p19 (INK4D), p21, p27 (KIP1)), a sejtciklus átmeneteket szabályozó ciklin/CDK komplexek pedig a Ciklin-D-CDK4/6 (G_1 progresszió), Ciklin-E-CDK2 (G_1/S átmenet), Ciklin-A-CDK2 (S progresszió), Ciklin-A/B-CDK2 (M fázis), valamint szerepet játszanak egyéb ciklinek és CDK-ok is. A Ciklin D1 az ösztrogén receptorhoz kötődik, és aktiválja azt, egyéb komplexek kapcsolódnak az RNS polimeráz II-höz és a foszforilált CTD-hez (carboxyl-terminal repeat domain), Ciklin G célpontja a TP53-nak.

Ha a sejtfelszíni receptorok a Ras-t megcélzó mitogén jelet kapnak, a jel növekedési faktor receptorokon keresztül a magban a sejtciklus mechanizmusát befolyásolja, sejtosztódást indukál, amely jel a citoplazmikus jelátviteli kaszkádok számára, mint pl. PI3K, Raf és Rho kaszkád [52]. Ezek a fehérjék kapcsolódnak a magi sejtciklus-folyamathoz, a sejtet G_0 fázisból G_1 illetve S fázis felé vezetik. A Ras aktiválása indukálja a Ciklin D1 transzkripciót, korai G_1 fázisban a Ciklin D1 gén promóter régiójában lévő Ras-érzékeny pont által. Az expresszált Ciklin D1 kötődik a CDK4-hez, így létrehozva egy aktív formát, mely felelős az RB1 (retinoblasztóma tumor szuppresszor gén) foszforilációjáért. Ezután a Ciklin E szintetizálódik, mely egy határkoncentráció felett aktiválja a CDK2-t - vele komplexet

képezve -, és engedi tovább a sejtciklust G_1 fázisból S fázisba. Az aktivált Ciklin/CDK2 komplex fő célpontja a RB tumor szuppresszor fehérje [46].

Különböző kemopreventív vegyületekkel ezen folyamat lépései befolyásolhatóak. Néhány fenolos vegyület, mint pl. silymarin, genistein és epigallo-katekin-gallát CDI-ok (p21 és p27) indukcióján keresztül képesek megállítani a sejtciklust és gátolni a Ciklin D1-t CDK4-t Ciklin E és CDK2-t. Az izo-tiocianátok a p21 indukcióján keresztül blokkolják a sejtciklust a G_2 -M határán [51, 53, 54].

3.1.3. *Onkogének, szuppresszorgének szerepe a daganatok kialakulásában*

A proliferációt serkentő molekulák közül a daganatképződés szempontjából kiemelkedő jelentőségűek az onkogének. Az onkogéneket eredetileg, mint a retrovírusok tumorképző hatásáért felelős géneket írták le, majd a 70-es évek közepén a humán szomatikus sejtekben is azonosították őket, de felfedeztek olyan onkogéneket is melyeknek nincs virális megfelelője. Mai ismereteink szerint az onkogének száma 100 fölött van, gén családdal, rokon génekkel, melyek funkciója és lokalizációja igen különböző. [55]. Ezen gének nem aktivált formái, azaz a protoonkogének minden normál genomban megtalálhatóak. Biológiai szerepük rendkívüli fontosságát tükrözi, hogy legtöbbjük erősen konzervatív, filogenetikailag megőrzött szerkezetet mutat [55, 56].

A protoonkogének hibái között, melyek kialakulását nevezhetjük „ektópiás aktivációnak”, leggyakrabban mutációk, transzlokációk, amplifikációk vagy inzerciók fordulnak elő. Általánosságban elmondható, hogy ezen gének a sejtproliferációt serkentik, így a szerkezeti vagy funkcionális változás a sejtproliferáció és/vagy sejtpusztulás szabályozási zavarához vezet elősegítve a daganatképződést és a progressziót. Számos esetben megfigyelhető (pl. Myc) mindemellett, hogy az onkogének egyben erőteljes ingerei lehetnek az aktív sejtpusztulásnak is, ami a keletkezés és pusztulás szoros összefüggéseire enged következtetni. Onkogéneket az emberi rosszindulatú daganatok 100%-ában észleltek, és bár ritkán, de előfordultak jóindulatú, sőt nem daganatos betegségekben is. [55, 56].

A G-fehérjék a membránhoz kapcsolódó igen fontos jelátviteli molekulák [55], melyek közül onkogénként a több mint 20 tagból álló Ras család emelkedik ki. Legismertebbek a kísérleteinkben szereplő HRAS (Harvey); KRAS (Kirsten) és az NRAS, melyek mutációja, (jellemzően a 12, 13, 59, 61 kodonban, gyakori GC→AT tranzícióval) [57] illetve a fehérje felszaporodása igen sok tumorban (20-25%) megtalálható [56].

A Ras proteinek (p21^{ras}) GTP-hez való affinitása nagy, viszont alig képesek a GTP-t GDP-vé bontani, ehhez GTP-áz aktiváló fehérjékre (GAP) van szükség. A keletkezett GDP

eltávolítását a guanint cserélő fehérjék végzik, majd a GDP távoztával a p21^{ras} újra aktiválhatóvá válik. Az előbbieken említett mutációk következtében a p21^{ras} képes ugyan megkötni a GTP-t, azonban a GTP→GDP hidrolízis nem történik meg, így a fehérje állandóan bekapcsolt állapotban marad és folyamatosan proliferációt serkentő jeleket küld a sejtmagba [56].

A Ras célfehérjéi között találjuk a Raf-kinázt; MAP-kinázokat és az RSK-fehérjéket, mint a jelátviteli kaszkád köztes szereplőit. A proteinkinázok fontos csoportját, és az említett foszforillációs kaszkád „közvetlen effektorát” képezik a ciklinfüggő kinázok (CDK) melyek hatása lehet citoplazmatikus illetve magi, és a sejtet G₁-ből S-be vagy G₂-ből M-be „segítik”. A ciklinek közül elsősorban a D-típust hozzák kapcsolatba proliferatív betegségekkel. A humán ciklin D gént (11q13), amely megfelel a PRAD1-nek, eredetileg a CCND1 (ciklin D1) lókuszhhoz kötött, transzlokálódott (t:11, 14; q32) és túlexpresszált génként azonosították több tumorban [56].

A daganatos megbetegedésekben terápiás célpontként szolgálhat a Ras-fehérje C-terminálisán lévő foszfolipid farok, egy farnezilcsoport amely a membránhoz való kapcsolódást hivatott szolgálni [56].

A nukleáris onkogének szinte kivétel nélkül transzkripció faktorokat kódolnak, melyek a sejtproliferációhoz szükséges géneket aktiválják. A myc család tagjai - MYC (*c-myc*), MYCN (*N-myc*), MYCL1 (*L-myc*) - az evolúció során az egyik legkonzervatívabb protoonkogének, melyeknek amplifikációját sok tumorban megfigyelték. A MYC terméke egy magi foszoprotein - p62 - mely DNS-hez kötődő képességgel rendelkezik, ha a MAX transzkripció faktorral dimert képezve aktiválódik. A MYC gén terméke hatékony stimulálója a proliferációnak, mutáció, vagy a MYC fehérje túltermelése következtében, másrészt aktív résztvevője a proliferációval ellentétes folyamatnak, az apoptózisnak, azaz az aktív sejthalálnak [58, 59].

A proliferáció szabályozásának negatív ágát a szuppresszor gének jelentik, hiszen a legfontosabb funkciójuk megakadályozni, hogy a sejt az S fázisba lépjen, tehát DNS a fennálló génhiba kijavításáig megkettőződhesse. Másik alapvető feladatuk, hogy a sikertelen hibajavítás esetén apoptózist indukáljanak [56, 60].

TP53 mutációval nem csak rossz-, hanem jóindulatú tumorokban is találkozhatunk, sőt olyan állapotokban is melyeket nem tartunk daganatmegelőző formának. Ez is alátámasztja azt az elképzelést, miszerint a TP53 fehérje „csupán” valamiféle általános védőhatást biztosít a tumorképződéssel szemben (12. ábra) [61], és hibája elsősorban lehetőséget teremt a genetikai instabilitásra, génkárosodások megjelenésére.

A szuppresszor gének hibái, mint említettem recesszíven jelentkeznek, ez alól kivételt képez a TP53 domináns meghibásodása. A génhibák jellege itt is változó lehet, amplifikációról

azonban értelmetlen beszélni, hisz az ugyanúgy nem „szolgálja” a daganatok növekedését, mint az onkogének deléciója. A TP53 funkciózavarának/funkcióvesztésének egyik oka tehát a gén károsodása (mutáció, deléció), illetve a normál fehérje inaktiválódása [55,56].

A TP53 gén 20 kb. nagyságú, 11 exont tartalmaz és a 17-es kromoszóma rövid karján lokalizálódik (17p13). A mutációk többsége az 5-8 exonban a 130-290. kodon között fordul elő, ezek között is forró-pontokat jelentenek a 175., 248. és 273. kodonok.



12. ábra: A TP53 aktiváció és válasz

Fontos tudni, hogy a TP53 képes más fehérjékhez is kötődni (ez többek között szerepet játszott felfedezésében), ami befolyásolja a térszerkezetét és ezen keresztül a funkcióját is. A szerkezetet meghatározhatják a molekula szempontjából szintén igen fontos foszforilációk, defoszforilációk is. A térszerkezet változások a proliferáció szabályozásának fontos eszközei lehetnek (a TP53 aktív állapotát is tetramerizáció előzi meg), hiszen a megváltozott térszerkezet hatással van a DNS-hez való affinitásra, így a mutáns forma kötődése jelentősen csökkenhet. A virális onkoproteinekkal való kapcsolódás következményeként szintén elveszhet a TP53 proliferációt gátló hatása [55,56]. A fehérje normális működése során [55,61] az egyik legfontosabb célpont a WAF1/CIP1 gén, (wild-type TP53 activated fragment/CDK interacting protein 1) melynek promóteréhez kötődve stimulálja a WAF1 gén expresszióját, a p21^{waf1} fehérje, pedig a ciklinfüggő kinázokhoz, PCNA-hoz (proliferatin cell antigen, 37kDa; DNS-polimerázhoz kapcsolódó, sejtciklus-függően megjelenő fehérje) kötődve gátolja azok működését. Gátlódik így a CDK-függő foszforiláció,

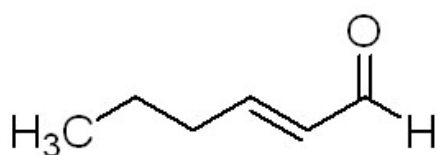
ami szükséges a sejtciklus továbbhaladásához. A WAF1 indukciója lehet TP53 általi, de attól független is. DNS-károsodáskor a TP53 dependens indukció hatására a p21^{waf1} küszöb megemelkedik, késleltetve a DNS-szintézist. Idősödő sejtekben a p21^{waf1} magas küszöbértéke proliferációt gátló tényező lehet. A korai G₁-ben a p21^{waf1} növekedés-gátló hatása valószínűleg más módon is létrejöhet, pl. úgy, hogy másik molekulához - esetleg p27-hez - kötődve inaktiválódik.

Az előbbieket mellett a TP53 protein aktiválólólag hat a ciklin G1 termelésére is, amely több ponton is szorosan kapcsolódik az ARF-MDM2-TP53 tumor szuppresszor útvonalba és a sejtciklus G₁ fázisát hivatott fenntartani [57,62].

3.2. A kísérletekben alkalmazott környezeti eredetű karcinogén és antikarcinogén hatású vegyületek

3.2.1. Transz-2-hexenál

A transz-2-hexenál (2-hexenál, levélaldehyd) egy növényi eredetű aldehyd, mely több, élelmezésre is használt növényben előfordul (gyümölcsök, hüvelyesek, káposztafélék). Jellegzetes illata miatt a kozmetikai ipar is előszeretettel alkalmazza. A vegyület a növények zöld levelében, gyümölcsökben van jelen, a frissen vágott fű illatát is ez adja. Kis mennyiségben szervezetünkben is képződik, valamint egyes szárítási, fermentációs élelmiszeripari technológiák folyamán, pl. a fekete tea készítésénél is létrejön [63,64,65].



14. ábra: Trans-2-hexenal szerkezeti képlete

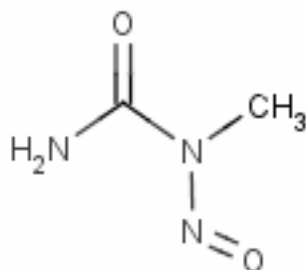
Fizikai tulajdonságát tekintve színtelen, viszkózus folyadék, kémiaiag α,β -telítetlen karbonil vegyület (14. ábra). Hasonlóan az analóg szerkezetű krotonaldehydekhez, *Salmonella typhimuriummal* végzett Ames tesztben és testvérkromatida-kicserélődés-tesztben (SCE) genotoxikusnak [66,67,68,69] bizonyult, mutagén hatását és citotoxicitását több tanulmányban is megemlíti [70,71,72]. DNS adduktképző hatását is kimutatták, karbonil csoportjának köszönhetően 1,N²-propano-dezoxi-guanozin exociklikus adduktot képez, így feltehetőleg a humán karcinogenezisben is szerepet játszik [73].

A transz-2-hexenál funkciója a növényekben természetes fungicid hatásából adódik, ha a növény megsérül, lipoxigenáz enzim hatására linolénsavból képződik a sérült felületen. Így a sérülés helyén az ép részekben található mennyiséghez viszonyítva megemelkedett levélaldehid koncentrációt mérhetünk. Több élelmiszerünknek magas a 2-hexenál tartalma (banánban 40 ppm, babfélékben 34 ppm, egyes fekete teákban 25 ppm). Egyes gyógynövények, pl. a *Gingko biloba* fő antifungicid mechanizmusa is a 2-hexenál koncentrációjának megemelkedése. Ezt fontos megemlítenünk, mert e növény levelei, magas flavonoid tartalmuk miatt napjainkban több étrend-kiegészítő szernek alapanyagai [74].

3.2.2. N-nitrozo-N-metil-karbamid

Az N-nitrozo-N-metil-karbamid (MNU - N-methyl-N-nitrosourea **15. ábra**) képződése különféle húsokból nitritek hatására *in vitro* savas körülmények között lehetséges. Ez a folyamat az emésztőtraktusban *in vivo* is megtörténhet pácolt húsok fogyasztása esetén. Az MNU mint pluripotens, direkt hatású karcinogén, különféle szervekben, főleg a gyomorban, és az idegrendszerben okozhat tumorokat [75].

Hosszú távú vizsgálatokból ismert, hogy az MNU indukálta tumorokban magas a *HRAS* mutációs rátája (65%), ezzel szemben a DMBA által indukált tumorok *HRAS* gén mutációs rátája alacsonyabb (21%). Ezen kívül az MNU-indukálta mutációkban a *HRAS* gén *GGA*→*GAA* tranzíciója a 12. kodonban gyakori, míg a DMBA indukálta tumorokban a *HRAS* gén *CAA*→*CTA* transzverziója található a 61. kodonban. A *HRAS* gén 61-es kodonjának a mutációja a DMBA indukálta egér bőr daganat iniciátor eseménye [76,77].



15. ábra: Az N-nitrozo-N-metil-karbamid szerkezeti képlete

Az intraperitoneálisan (ip.) injektált MNU kezelt egérben tímusz-limfómát, pulmonáris adenómát, limfoszarkómát, hepatómát és tüdő adenómát okoz [78].

Tehát az MNU indukálta tumorok *HRAS* mutációi jellemzőek a 12-es kodonra, de nem esnek a 61-es kodonra. A DMBA okozta tumorok *HRAS* mutációiban viszont nem volt fellelhető a 12-es kodon érintettsége [77]. Az MNU és a DMBA hatásmechanizmusa egyaránt a karbónium ion

konverzió és a DNS metilációján alapszik. Az MNU a DNS guanin bázisából O⁶-metil-guanin (O⁶mG) adduktot képez. A DMBA mutagén metabolitjai által okozott DNS károsodás szintén dezoxi-adenozin addukt képződés [77,79,80,81].

Reese és mtsai leírták: az O⁶mG képződés a csökkent TP53 fehérje szint mellett limfóma kialakulásához vezet TP53+/- egérben, míg az O⁶-alkilguanin DNS alkil-transzferáz (AGT) overexpressziója gyors O⁶mG addukt eliminációhoz vezet és védő hatású a limfóma kialakulásával szemben. Az AGT enzim működése a fő védő mechanizmus az MNU által indukált malignus transzformáció ellen az O⁶mG addukt eltávolításával [80].

Kang és mtsai leírták, hogy az MNU hosszú távon nőstény C57BL/6 egerekben limfómát okoz, ezen felül a tumorokban MYC génexpresszióját emeli. Mindazonáltal limfómákban kromoszóma aberrációt is megfigyeltek [8]. A limfómák kialakulási ideje alapján két csoportot különítettek el, egy korai (<150 nap) és egy késői (>150 nap) kialakulást. Megfigyelték a 14-es és a 15 -ös kromoszóma duplikációját és az X kromoszóma elvesztését. A 11-es, 16-os és a 19-es kromoszóma elvesztését a korai kialakulású csoportban, míg az 1-es, 4-es 5-ös és a 10-es kromoszóma kópiaszám növekedését csak a késői kialakulású csoportban figyelték meg [82].

Hovjik és mtsai leírták, hogy a TP53+/- KO egéren egyszeri orális adagolású, 90 mg/ttkg MNU kezelés 13 hétig jól tolerálhatónak bizonyult, a 30-ból 4 egér a 75. és a 92. nap között pusztult el daganatban. Az MNU-hoz köthető makroszkópos elváltozásként a csecsemőmirigy, a lép, a mandibuláris és a mezenterialis nyirokcsomók megnagyobbodása volt megfigyelhető [83].

3.2.3. Kemopreventív hatású vegyületek a növényekben

A flavonoidok az egyéb fenolos szerkezetű vegyületekhez hasonlóan a növényi metabolizmus másodlagos termékei, a növényi sejtekben alapvető védelmi funkciót töltenek be. Számos funkciójuk ismert a növényvilágban: pigmentálás, az UV-fény, a mikroorganizmusok és egyéb növényi kártevők - gombák, rovarok, csigák stb. - elleni védelem, enzimaktivitások regulációja, szignálfunkció a nitrogénmegkötő baktériumok számára.

A növényi élelmiszerek flavonoid-tartalma néhány tized mg/kg nagyságrendtől egészen a néhány g/kg-ig terjed. A legtöbb ital, mely természetes növényi alkotórészből készül (zöldség- és gyümölcslevek, gyógyteák, bor, sör) kisebb-nagyobb mennyiségben tartalmaz flavonoidokat, polifenolos vegyületeket [84]. A leveles zöldségek, mint a zeller és a petrezselyem, valamint a paprika flavonokat is tartalmaz és antocián vegyületek is előfordulnak bennük. Hüvelyesekben a legjelentősebb vegyületek az izoflavonoidok, de

esetenként flavonok, flavonolok és antociánok is kimutathatók. Gabonafélék magjában flavonok, flavonolok, antociánok és flavanok egyaránt megtalálhatók [84].

A flavonoidokra a $C_6-C_3-C_6$ (difenilpropán) alapszénváz jellemző, a két benzolgyűrű (A és B) egy oxigénatomot tartalmazó heterociklikus pirán-, vagy pirongyűrűn (C gyűrű) keresztül kapcsolódik. Ez az alapszerkezet rendkívüli változatosságot biztosít mind a szubsztituensek, mind a C gyűrű szerkezetének tekintetében.

Számos közlemény számolt be a flavonoidok antimutagén hatásával kapcsolatosan végzett vizsgálatokról. Többek között antipromóter és antiinvazív hatást tapasztaltak, valamint különböző, a daganatos megbetegedések kialakulása során működő enzimek gátlását, mint például a protein-tirozin-kináz, a TPA-dependens ornitin-dekarboxiláz és a DNS-topoizomeráz [85].

Az élelmi eredetű flavonoidok felszívódását és metabolizmusát alapvetően kémiai szerkezetük határozza meg, mely - többek között - a glikoziláció/aciláció mértékétől, egyéb fenolos vegyületekkel kialakított konjugációtól, a molekula méretétől, a polimerizáció fokától és az oldhatóságtól függ. A polifenolos vegyületek nagy száma, valamint az a tény, hogy az élelmiszerekben komplex formában vannak jelen, meglehetősen nehézkessé teszi a felszívódási, fiziológiai és táplálkozás-élettani hatások tanulmányozását.

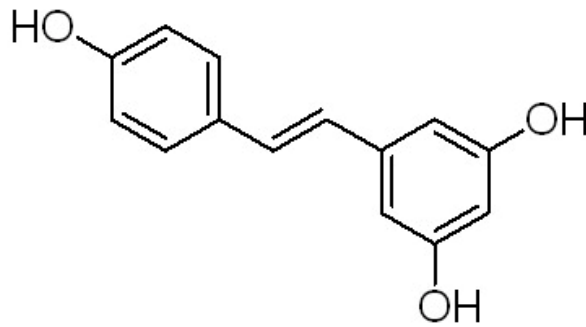
Kutatási eredmények azt mutatták, hogy a flavonoidok gátolták a I. fázisú enzimeket, melyek a karcinogéneket aktiválják, visszaszorították a daganat sejtek proliferációját, kivédtek a γ -sugárzás genotoxikus hatását és megakadályozták a DNS-adduktok képződését 3,4-benzopirén expozíció esetén [86].

A fentiekén kívül számos más feltételezett antimutagén és antikarcinogén folyamaton keresztül, az egyéb étrendi antioxidánsokkal szinergizálva a flavonoidok és egyéb polifenolos vegyületek képesek megakadályozni bizonyos daganattípusok kialakulását.

Laboratóriumi vizsgálatok sora bizonyítja, hogy a vörösbor polifenolos komponensei, köztük a flavonoidok, antioxidáns és gyökfogó tulajdonságokkal rendelkeznek, más étrendi antioxidánsok hatását felerősítik.

A rezveratrol (3,5,4' - trihidroxil - sztilbén, **16. ábra**) egy, a természetben is előforduló trifenolos fitoalexin [87], amely megtalálható szőlőkben, levelekben, diófélékben, szederfélékben és más sötét színű bogyók héjában. Antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatású, potenciális rákmegelőző szer.

A rezveratrolt 1963-ban azonosították, mint a japán szálkás keserűfű (*Polygonum cuspidatum*) szárított gyökerének aktív összetevőjét.



16. ábra: A rezveratrol szerkezeti képlete

E növény (japánul „Ko-jo-kon”) kivonatát az ókortól alkalmazzák a hagyományos kínai és japán orvoslásban gennyes bőrgyulladás, gonorrhoea, gombás bőrbetegségek és hiperlipémia ellen [88].

Európában a rezveratrolt elsőként borszőlőből izolálták 1976-ban, majd 1992-ben borból. Megállapították, hogy a rezveratrol sokkal magasabb koncentrációjú a vörösborokban, mint a fehérborokban, mely különbség a vörösbor és a fehérbor előállításának technológiai különbségéből adódik. A vegyület a levél epidermiszében és a bogyó héjában szintetizálódik, de a húzában nem, így a héjon erjesztett vörösborban magasabb a koncentrációja [89,90].

Különböző, a tumor iniciációval, promócióval és progresszióval összefüggő sejtfolyamatokra gyakorolt jelentős gátló hatásai miatt ezt a trifenolos vegyületet potenciális rákmegelőző szerként tartják számon [91].

A rezveratrol antiiniciációs hatása az antioxidáns és antimutagén hatásán alapul, sok polinukleáris aromás karcinogén vegyület oxidatív metabolizmusáért felelős citokróm p450-hez kötött alkoxi-rezorufin-O-dezalkiláz enzim hatásos gátlószere, indukálja továbbá a II fázisú detoxifikáló enzimeket, ilyen pl. NAD(PH)-kinon-oxido-reduktáz [92].

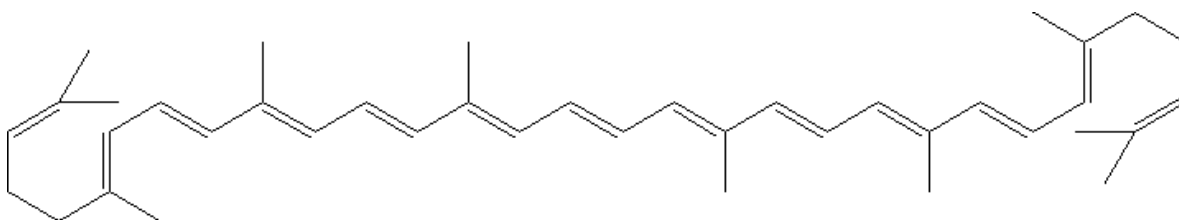
A rezveratrol antipromóter aktivitásáért - feltehetően - felelős mechanizmus a ciklooxygenáz 2 enzim (COX2) katalizálta prosztaglandin bioszintézis gátlása. Ismert, hogy a prosztaglandinok fontos szerepet játszanak a rosszindulatú betegségek, különösen a vastagbél és emlőkarcinoma patogenezisében és így a COX2 szelektív gátlásával létrehozott prosztaglandin bioszintézis csökkentést fontos kemopreventív módszernek tartják.

A rezveratrol gátolta a COX1 aktivitást mikroszómákban, valamint gátolta az indukálható COX2 izoenzim katalitikus aktivitását, tenyésztett humán emlő epithelialis sejtekben [92].

A COX2 katalitikus aktivitásának gátlása mellett a vegyület az AP1 függő transzaktiváció represszállásával szintén gátolta a COX2-mRNS TPA mediálta indukcióját tenyésztett humán emlő epithelialis sejtekben.

Antiprogrediós hatását vizsgálva megfigyelték, hogy rezveratrollal előkezelt egerek esetén csökkent a TPA (12-O-tetradekanoil-forbol-13-acetát; forbol-12-mirisztát-13-acetát) indukálta oxidatív stressz, melyet különböző biológiai paraméterekkel kísérték figyelemmel [92].

A likopin egy karotinoid típusú vegyület, amely a paradicsomban, paradicsomból gyártott termékekben, s más gyümölcsökben található. Természetes pigment, melyet növények és mikroorganizmusok képesek szintetizálni, de állatok nem. Karotinoid vegyület a béta-karotin aciklikus izomerje (17. ábra), többszörösen telítetlen szénhidrogén, 11 konjugált és két nem konjugált kettős kötéssel [93]. Mivel polién vegyület, cisz-transz izomerizáción megy át fény, hő és kémiai reakciók hatására [94,95].



17. ábra : Likopin szerkezeti képlete

A növényekből származó természetes likopin „all-transz” konfigurációban létezik, ez a termodinamikailag legstabilabb forma. A humán plazmában izomer keverékként van jelen, melynek 50%-a cisz izomer [96]. A likopin halmozódik még a mellékvesében, a herékben, a májban és a prosztatában. Az utóbbiban a leggyakoribb karotinoid [97,98].

A karotinoidok, pl. β -karotin biológiai aktivitása általában ahhoz kötődik, hogy a szervezetben A vitaminná képesek alakulni. Mivel a likopinnek nincs béta-jonon gyűrűje, nem tud A vitaminná alakulni. Épp ezért biológiai hatásai az A vitamintól eltérő mechanizmuson keresztül jönnek létre.

A likopin, Ψ, Ψ' -karotin az egyike a leghatékonyabb antioxidánsoknak, oxigén-gyökfogó kapacitása kétszerese a béta karotinénak és 10-szerese az alfa tokoferolénak. Lipofil természeténél fogva a likopin és más karotin a szérum LDL és VLDL frakciójában halmozódik.

A likopin antikarcinogén hatása két elmélettel is magyarázható. A nem oxidatív mechanizmusok elmélete szerint a likopin antikarcinogén hatását a sejt-sejt kommunikáció szabályozásán keresztül fejti ki. Feltételezhetően gátolja a szabályozó proteinek, mint pl. TP53 és RB1 fehérjék karcinogének által indukált foszforilációját, és a G_0-G_1 fázisban megállítja a sejtciklust. Astorg és munkatársai [99] szerint a máj metabolizáló enzimek, így a

citokróm P450 2E1 likopin indukálta modifikációja áll a patkánymáj karcinogén indukálta preneoplasztikus elváltozásaival szembeni védőhatás mögött. *In vitro* bizonyítékok arra utalnak, hogy a likopin csökkenti az inzulin-szerű növekedési faktorok (IGF) - amelyek potenciális mitogének - sejtosztódást indukáló hatását különböző daganat sejtvonalakban. A tímuszon (csecsemőmirigy) belüli T-sejt differenciálódás szabályozása lehet a likopin emlőtumor növekedést gátló hatásának mechanizmusa. A likopin koleszterin csökkentő hatása a HMG-CoA (3-hidroxi-3-metil-glutaril-koenzim A) reduktáz gátlásán alapul [100].

Más adatok szerint a likopin védi a sejt fontos biomolekuláit, lipideket, lipoproteineket, proteineket és a DNS-t [101].

Epidemiológiai tanulmányok szerint a paradicsom és termékei bevitelének szintje kapcsolatban áll néhány tumoros megbetegedés alacsonyabb kockázatával. Eset-kontroll tanulmányban a magas paradicsom bevitel védő hatásának bizonyult emésztőszervi daganatokkal szemben, és 50%-ban csökkentette a tumoros eredetű halálozást középkorú amerikai populációban [97].

Az US Health Professionals Follow-up Study [102] szerint különböző paradicsom termékekből származó likopin bevitelének mennyisége fordított kapcsolatban állt a prosztatara kockázatával. A hetente 10 vagy több alkalommal paradicsom tartalmú ételt fogyasztók között majdnem 35%-kal csökkent a tumor előfordulása. Újabb kutatások szerint a likopin szérumszintje fordítottan arányos az emlőtumor és a prosztatara kockázatával, míg más fontos karotinoidokkal nincs szignifikáns kapcsolat [97].

Más kutatók táplálék kiegészítőként adagolt paradicsom vagy paradicsom eredetű termékekben likopin hatásosságát vizsgálták a lipidek, proteinek és a DNS oxidatív károsodásával szemben. Előzetes eredmények szerint a paradicsom kivonat kapszulák formájában történő adagolása csökkenti prosztatara rákos betegekben a prosztatara specifikus antigén (PSA) szintjét [97].

Az ún. „piros” gyümölcsök és zöldségek mint pl. a paradicsom, a görögdinnye, a rózsaszín grapefruit, a sárgabarack, a guava sok likopint tartalmaz. A paradicsom eredetű termékek, pl. ivólé, kechup, püré, szósz és leves mind nagyon jó ételkészítmények eredetű likopin források [93], a likopin a flavonoidokkal ellentétben az ételkészítmény-feldolgozás során nem károsodik. Bár különböző paradicsom eredetű termékekből származó likopin biológiai hasznosságának összehasonlító tanulmány egyelőre nincs, a paradicsom eredetű termékekből származó likopin biológiailag értékesebbnek tűnik, a nyers paradicsomból származónál. A gyártás folyamán a nyersanyagból a likopin felszabadítása (ételkészítményből származó lipidek, hő indukálta izomerizáció, az „all-transz”-ból ciszbe) fokozzák a likopin biológiai hatásosságát [103].

A likopin biológiai értékét természetesen a dózis és egyéb karotinoidek (pl. β -karotin) jelenléte is befolyásolja. Johnson és mtsai kimutatták, hogy a béta karotinnal együtt bevitt likopin biológiai értéke szignifikánsan magasabb, mint az önmagában adagolt likopiné [97].

3.3. Néhány az ősi keleti gyógyászatban használt antikarcinogén hatású gyógynövény

3.3.1. *Panax ginzeng* C. A. Mayer (ginzeng, embergyökér)

A növénytaxonómiai besorolás szerint a ginzeng a *Panax* nemzetség tagja. Az ősi kínai gyógyászatban több, mint kétezer éve használják ennek a lassan növekvő növénynek a gyökerét. Két alfaját használják általában, az ázsiai ginzeng (*Panax ginzeng* C. A. Mayer) természetben ritkán fordul elő, főleg termesztés útján jutnak hozzá. A másik faj az amerikai ginzeng (*Panax quinquefolius* L.) amely vadon is terem, és monokultúrában is termesztik [104,105]. Mindkét *Panax* nemzetséghez tartozó növény gyökerének biológiailag aktív vegyületei a szaponinok, ginzenuzidok. [104,106].

A ginzenget afrodisiakumként tartják számon, e hatását a szaponinoknak tulajdonítják, ez a vegyületcsoport játszik szerepet a szív és érrendszeri betegségek megelőzésében, kezelésében. Gátolják a lipidperoxidok képződését (zsírsav oxidáció) a szívizomban és a májban, befolyásolják az enzimek működését, vérrelvadást csökkentő tulajdonságuk mellett a vér cukor- és koleszterinegyensúlyának kialakításában is szerepet játszanak. Immunrendszer erősítő tulajdonságát is leírták [107,108].

A másik vegyületcsoport a ginzenuzidok, melyeket három alcsoportba szoktak sorolni, az egyik alcsoport a panaxadiol csoport (e.g., Rb1, Rb2, Rb3, Rc, Rd, Rg3, Rh2, Rs1) a másik a panaxatriol csoport (Re, Rf, Rg1, Rg2, Rh1) a harmadik az oleanol sav csoport (pl. Ro) (II. táblázat) [104,109,110]. Ezen vegyületcsoportok antikarcinogén és immunrendszer szabályozó tulajdonságokkal rendelkeznek.

A ginzenuzidok egyedi vizsgálata során észlelték, daganatsejt növekedés gátló, sejtdifferenciálódás szabályozó hatásukat, és szerepet játszanak a programozott sejthalál regulációjában, valamint a metasztázis kialakulást gátolták [111].

Epidemiológiai tanulmányban bizonyították, hogy a ginzeng tartalmú élelmiszert fogyasztó személyeknek a kockázata rák kialakulására alacsonyabb, mint a ginzenget nem fogyasztó populációnak. A vizsgálat során felfigyeltek arra, hogy nem szervspecifikus a ginzeng antikarcinogén hatása [112].

A sejthalál mechanizmusa kaszpáz dependens vagy independens lehet, valamint a mitokondriumban zajló folyamatok is szerepet játszanak az apoptózisban. [113,109]. A ginzenezidok különböző jelátviteli kaszkádokon keresztül vesznek részt az apoptózis indukálásában. Megfigyelték, hogy az Rh2 és a "K" vegyület - amely az Rb1 metabolitja - apoptózist indukáltak prosztata rák sejtvonalon, neuroblasztóma sejtvonalon és A549 tüdő adenokarcinoma sejtvonalon a kaszpáz 3 és kaszpáz 8 aktiválásán keresztül [114,115,116,117].

Ginzenezidok	%
20(s) Protopanaxadiol-Ginzenezid Rb1	0,4-0,5
20(s) Protopanaxadiol-Ginzenezid Rb2	0,2-0,25
20(s) Protopanaxadiol-Ginzenezid Rc	0,1-0,15
20(s) Protopanaxadiol-Ginzenezid Rd	0,036-0,04
20(s) Protopanaxadiol-Ginzenezid Rg3	0,03
20(s) Protopanaxadiol-Ginzenezid Rh2	0,001
20(s) Protopanaxatriol-Ginzenezid Re	0,2-0,25
20(s) Protopanaxatriol-Ginzenezid Rf	0,07-0,075
20(s) Protopanaxatriol-Ginzenezid Rg1	0,3-0,35
20(s) Protopanaxatriol-Ginzenezid Rg2	0,03
20(s) Protopanaxatriol-Ginzenezid Rh1	0,012-0,015
Oleanane-Ginzenezid R0	0,045-0,05

II. táblázat: *Panax ginzeng* gyökér szaponin-összetétele

Kim és munkatársai több tanulmányban is leírták, hogy az apoptózis aktiválása esetleg BCL2, BCL2L1 (Bcl-xL) vagy BAX független lehet [118,119,120,121]. Kim és társai [122], valamint Chen és munkatársai [123] a ginzeng gyökér antiapoptotikus hatásáról számolnak be, a ginzeng gyökér kivonata csökkentette az MPP+ indukálta apoptózist PC12 sejtekben, valamint az Rg1 ginzenezid védő hatását tapasztalták MPTP-vel (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin) aktivált apoptózis esetén egér „substantia nigra”-ban. Az Rh2 panaxatriolról kimutatták, hogy SKHEP-1 hepatóma sejtvonalon a sejtciklust megállítja G_0 - G_1 fázisban, így meghosszabbítja a sejtciklus S fázisát [124,125]. A MCF-7 emlőkarcinóma sejtvonalon megfigyelték, hogy sejtciklus blokkolását idézi elő a cyclin/CDK komplex kináz aktivitás szabályozása, valamint prosztata karcinóma sejtvonalon a MAP kinázok modulációja [126,127].

A ginzeng anti-apoptotikus hatását a *BCL2* és a *BCL2L1* expresszió erősítésében és a *BAX* és a *NOS* expressziójának csökkentésében, a gátolt kaszpáz 3 aktiválásban látják [122,123].

Sejtvonalakat vizsgáló tanulmányokban kimutatták, hogy az Rh1 és az Rh2 szerepet játszik a sejtdifferenciálódás szabályozásában, a ginzeng gátolta a sejtproliferációt, az Rb2 panaxadiol gátolta az ér- és áttét-képződést. A „K” vegyületről kimutatták hogy gátolta a sejtproliferációt a p27 expressziójának növelésével, és a *MYC* és a ciklin D1 expressziójának csökkentésével [105].

3.2.2 *Trigonella foenum graecum* L. (görögszéna, lepkeszeg)

Trigonella foenum graecum (görögszéna) magja - a keleti országokban népszerű nevén "Methi"- többek között az indiai fűszerkeverékek egyik fontos alkotórésze [128].

A görögszéna magja és levelei is alkalmasak fogyasztásra, az indiai szubkontinensen ayurvedikus gyógyászatban használják, cukorbetegség, gyulladós megbetegedések, gasztrointesztinális betegségek kezelésére, koleszterin szint rendező hatását is leírták [129,130].

A görögszéna magja több enzimet modulál, többek között a glükóz- és lipid-metabolizmusban szerepet játszó enzimeket. A magból különböző bioaktív komponenseket izoláltak, fő vegyületei a protodioszcin, trigoneozid, dioszgenin [129]. Néhány irodalmi adat született ennek a gyógy/fűszernövénynek a daganatmegelőző hatásáról. A görögszéna mag kivonatáról valamint egyes szaponin szerkezetű alkotórészeiről antikarcinogén hatást feltételeznek [129,131,132]. Ezen alkotórészeknek, valamint a görögszéna mag kivonatokban korábban azonosított néhány flavonoidnak antioxidáns, immunerősítő hatását bizonyították [133,134,135,136,137]. Vizsgálták a görögszéna mag kivonat hatását Erlich ascites carcinoma modellen Balb/C egerekben, a daganatnövekedés 70%-os visszaszorulását tapasztalták a kontroll állatokhoz képest [132]. Görögszénamagból izolált protodioszcin apoptózis indukáló hatását bizonyította Hibasami munkacsoportja, HL-60 human leukémia sejtvonalon tapasztalta a sejtburjánzás visszaszorulását [131].

A görögszéna egy másik szteroid komponense a szapogeninek csoportjába tartozó dioszgenin, mely prekuzora az exogén szteroidhormonoknak (mint pl. progeszteron), valamint a gyulladáscsökkentő hatású szteroidoknak (kortizon) [138]. Moalic és társai ezen vegyület sejtproliferáció gátló hatását tapasztalták 1547 humán oszteoszarkóma sejtvonalon, megfigyelték, hogy a sejtciklust G_1 fázisban blokkolta, így terelve apoptózis felé a folyamatot [139]. Ezen sejtvonalon a TP53 tumor szuppresszor fehérje overexpresszióját mutatták ki dioszgenin hatására, ezen mechanizmuson keresztül indukált apoptózist [140]. Tanulmányok

jelentek meg melyben megállapították, hogy a dioszgenin visszaszorította a TNF által indukált *NFKB1* (*NFκB*) aktivációt, az Akt aktiváció gátlásán keresztül, mely meghatározza a DNS kötődését, az *IκBα* kináz aktiválását, *IκBα* foszforilációját, lebomlását. A vegyület a *NFKB1*-től függő riporter gén expressziót megszüntette. A dioszgenin szuppresszálja a sejtproliferációt, visszaszorítja az inváziót, gátolja az oszteoklaszt-képződést az *NFKB1*-szabályozta génexpresszió gátlásán keresztül, fokozva a citokinekkal vagy kemoterápiás kezeléssel segített apoptózist [141].

A fenti adatok alapján feltételezhetjük, hogy a dioszgenin és a görögszéna mag más vegyületei antikarcinogén hatással rendelkeznek, ezért ezen fitokemikáliáknak fontos szerepük lehet a daganatok megelőzésében [129]

Több növényi eredetű vegyületről, kivonatról is tudjuk, hogy képesek több ponton is befolyásolni a karcinogenezis folyamatát [1]. Közlemények jelentek meg a rezveratrol, a kurkumin, a kvercetin komplex hatásától, blokkoló és szuppresszáló ágensként, valamint apoptózist indukáló hatásairól [91,92]. Feltételezhető ezek alapján, hogy a görögszéna biológiailag aktív vegyületei az sejtproliferáció gátlásán és apoptózis indukáló hatásán felül más kemopreventív stratégiákban is a szervezetünk segítségére lehetnek. Ilyen metabolikus útvonal lehet a prosztaglandin bioszintézis gátlása, melynek enzimejei a lipoxigenázok (ALOX) és a ciklooxygenázok (COX).

A többszörösen telítetlen zsírsavak metabolizmusában fontos szerepet játszó COX-ok (ciklooxygenázok) és a ALOX-ok (lipoxigenázok) befolyásolják a karcinogenezist. A lipoxigenázok konvertálják az arachidonsavat a linolénsavat és más többszörösen telítetlen zsírsavat, biológiailag aktív metabolittá, melyek befolyásolják a jelátvitelt, a szerkezetet valamint a metabolizmust [142].

4. CÉLKITŰZÉSEK

PhD dolgozatommal csatlakozom az Intézetünkben folyó molekuláris epidemiológiai kutatásokhoz, melyekben a kifejlesztett állatkísérletes, korai karcinogén hatást kimutató tesztrendszer segítségével vegyületeket, kivonatokat vizsgálhatunk, meghatározhatjuk hatásukat a daganatok morfológiai detektálhatósága előtt, a korai génextpresszió-változásokból következtethetünk esetleges rákkeltő, mutagén hatásukra. A kidolgozott tesztrendszert, kis módosítással kemopreventívnek ígérkező vegyületek, készítmények korai vizsgálatára is adaptálhatjuk, vizsgálhatjuk hatásukat a többlépcsős karcinogenezis egyes lépéseire.

Táplálékunkkal potenciális rákkeltő ágensekkel, prokarcinogén vegyületekkel exponáljuk szervezetünket, azonban táplálkozással lehetőségünk nyílik a káros hatások kivédésére, kemopreventív molekulák szervezetünkbe juttatásával, így tudatos primer prevenciók illetve kemoprevenziós programot hajthatunk végre egyéni szinten is.

Ennek tükrében kutatásunkat táplálkozási aspektusból indítottuk, vizsgálatainkhoz a kidolgozott állatkísérletes modell jól adaptálható.

1. Kutatásaink első felében a **transz-2-hexenál** hatását kívántuk megvizsgálni. Irodalmi adatok szerint ez a növényi eredetű, gyümölcsökben, hüvelyesekben, káposztafélékben termelődő α,β -telítetlen karbonil vegyület Ames tesztben mutagének bizonyult, karbonil csoportjának köszönhetően 1,N²-propano-dezoxi-guanozin exociklikus adduktot képez, így feltehetőleg a humán karcinogenezisben is szerepet játszik.

Célunk volt, hogy hosszútávú („long-term”) állatkísérletben bizonyítsuk tumorképző sajátosságát, illetve „short-term” génextpressziós tesztrendszerünk segítségével meghatározzuk egyes onko/szuppresszor génekre, mint kulcsgénekre gyakorolt hatását, az expozíciót követő 24, 48 és 72 óra elteltével.

2. Kutatásaink második szakaszában hazánk táplálkozási szokásainak ismeretében egy potenciális veszélyforrásra szeretttük volna felhívni a figyelmet. Savas körülmények között - pl. a gyomrunkban - nitritek jelenlétében különböző fehérjeforrásokból (húsokból), nitrózaminok képződhetnek, melyeknek reprezentatív képviselője egy direkt karcinogén vegyület, az **N-nitrozo-N-metil-karbamid (MNU)**. E vegyület is adduktképző, a DNS guanin bázisából O⁶-metil-guanin (O⁶mG) addukt keletkezik, mutációt hozva létre többek között a *Hras1* gén 12-es kodonjában.

Célunk volt, hogy állatkísérletes modell segítségével megvizsgáljuk, hogy a vegyület befolyásolja-e az általunk vizsgált kulcsgének (onko/szuppresszor gének) expresszióját, s ezen hatás összefügg-e a vegyület karcinogén hatásával.

3. Flavonoidokról, kalkonokról kalkon-származékokról leírtak tumorelles, gyulladáscsökkentő, immunszuppresszív hatásokat, antioxidáns tulajdonságokat. Egy szintetikus kalkon-analógról, **E,E-bis-(2-hidroxi-benzilidén)-aceton-ról (HBA)** ígéretes kutatási eredmények születtek feltételezhető kemopreventív hatásáról.

Célunk volt, hogy meghatározzuk e vegyület antioxidáns kapacitását 2-dezoxi-D-ribóz teszt segítségével, valamint a bizonyítottan karcinogén vegyülettel, DMBA-val, kezelt kísérleti állatok egyes szerveiben meghatározzuk a *Hras1* expressziókat, gyakorlatilag mint a kemoprevenció biomarkerét.

4. Epidemiológiai tanulmányok rávilágítottak arra, hogy a Dél-Európa országaiban élő emberek dohányzási, alkoholfogyatási szokásai ellenére kedvezőbb daganatos halálozási mutatókkal rendelkeznek, mint az Unió átlag. Epidemiológiai tanulmányok bizonyítják, hogy a Földközi tenger partján élő emberek eltérő táplálkozási szokásaiban keresendő a válasz ezen ún. „mediterrán” (vagy francia) paradoxonra; a salátákkal, mártásokkal, és nem utolsó sorban különböző borokkal (vörösbor) bevitt kemopreventív hatású polifenoloknak, flavonoidoknak, karotinoidoknak tulajdonítható ez a hatás.

Az irodalmi adatok alapján az anti-karcinogén hatású vegyületek közül a vörösborban található **rezveratrol**, és a paradicsom egyik fő antioxidáns tulajdonságú vegyülete a **likopin**, (Ψ, Ψ' -karotin) onko- és szuppresszor-génekre gyakorolt hatását kívántuk meghatározni a karcinogén vegyületek tesztelésére kidolgozott „short-term” állatmodellen. Célunk az volt, hogy a humán epidemiológiai tanulmányokban kemopreventínek ítélt vegyületek rövid távú hatását is kimutassuk, bizonyítsuk a tesztrendszerünk alkalmazhatóságát.

5. Napjainkban egyre több figyelem irányul a távol-keleti gyógyászatban használt gyógynövényekre, és a belőlük készült kivonatokra, étrend-kiegészítőkre. A kínai gyógyászatban több ezer éve használt **Panax ginseng**ről több tanulmány is született, leírták antikarcinogén, kemopreventív hatását.

Célunk, hogy az Intézetünkben kidolgozott rövid távú állatkísérletes modellben vizsgáljuk meg a ginzeng tartalmú tápot fogyasztó egerek génexpressziós mintázatának változását. Vizsgálataink során feltérképezzük az apoptózis regulációban résztvevő gének közül a

Bcl2, *Bcl2l1* (Bcl-x) és *Ccnd1* (Ciklin D1) gének mRNS expresszióit a kísérleti állatok egyes szerveiben. Feltételeztük azt, hogy a ginzeng tartalmú táp az apoptózis indukcióján keresztül fejti ki kemoprevenációs hatását.

6. A *Trigonella foenum graecum* (görögszéna, lepkeszeg) magja - a keleti országokban népszerű nevén "Methi" - az indiai fűszerkeverékek kedvelt alkotórésze. Bioaktív komponensei enzimet modulálhatnak, többek között a glükóz- és lipid-metabolizmusban szerepet játszó enzimeket. Gyulladáscsökkentő hatása miatt az ősi keleti gyógyászatban évezredek óta használják.

Feltételezzük, hogy hasonlóan más gyulladáscsökkentő hatású készítményhez a görögszéna tartalmú élelmiszerek szerepet játszhatnak a karcinogenezis gátlásában. Célunk volt hogy, "short-term" tesztrendszerünk segítségével vizsgáljuk meg a görögszéna tartalmú tápot fogyasztó egerek génexpressziós mintázatának változását. Kísérleti összeállításunkban mRNS szinten, RT PCR segítségével határozzuk meg a görögszéna hatását a zsírsav metabolizáló enzimekre, (*ALOX*-ok és *COX*-ok) karcinogén expozíciónak (DMBA) kitett egereken.

5. ANYAG ÉS MÓDSZER

5.1. A kísérletek során felhasznált anyagok

5.1.1. Kísérleti állatok

4-6 hetes korú karcinogenezis iránt érzékeny beltenyésztett H-2^k haplotípusú nőstény CBA/Ca, C3HE-mg és AKR/J egereket és 6-12 hetes nőstény Fischer 344 Wistar és Long Evans patkányt használtunk, melyek tenyésztése Intézetünk állatházában folyik.

5.1.2. Vegyszerek, tápok, oldatok, primerek

Oltásra használt vegyületek:

- 7,12-dimetil-benzantracén (7,12-Dimethylbenz[a]anthracene DMBA - cat. No.: 39570-100MG Sigma-Aldrich)
- N-nitrozo-N-metil-karbamid (N-Nitroso-N-methylurea MNU - cat. No.: N1517 Sigma-Aldrich)
- Rezveratrol (3,4',5-Trihidroxi-transz-sztilbén - cat. No.: R5010 Sigma-Aldrich)
- Likopin (lycopene - cat. No.: L9879 Sigma-Aldrich)
- E,E-bis(2-hidroxi-benzilidén)aceton dinátrium sója (HBA-disodium salt - szintetizálta a PTE ÁOK Gyógyszerészi Kémia Intézet; Dr. Perjési Pál)
- Trans-2-Hexen-1-al (levélaldehyd - cat. No.: W256005 Sigma-Aldrich)
- Kukoricaolaj (Corn oil - cat. No.: C8267 Sigma-Aldrich)
- Fiziológias só oldat

Speciális táp:

- Ázsiai Ginseng gyökér por (*Panax ginseng* C. A. Mayer - Nyugat-magyarországi Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar, Növénytudományi Intézet, Gyógynövénytermesztési Tanszék; prof. Dr. Makai Sándor.)
- Görögszéna mag por (*Trigonella foenum graecum* L. - Nyugat-magyarországi Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar, Növénytudományi Intézet, Gyógynövénytermesztési Tanszék; prof. Dr. Makai Sándor.)
- Speciális táp keverési protokollja

50 % darált normál rágcsáló tápot és 50% görögszéna mag illetve ginseng gyökér port összekevertük. A porkeveréket csapvíz segítségével pépesítettük, hasábokba szabdaltuk, majd szárítószekrényben kiszárítottuk.

RNS izolálás reagentjei

- Trizol Reagent (cat. no.: 15596018; Invitrogen - Csertex Kft)
- Kloroform (cat. No.: C7559 Sigma-Aldrich)
- i-prolil-alkohol (cat. No.: I9516 Sigma-Aldrich)
- 75 %-os etil-alkohol (96%-os etanolból hígítva - Egyetemi Gyógyszertár)
- DEPC víz - Dietil-pirokarbamát - Cat. No.: D5758 Sigma Aldrich - oldatából 0,1%-osra hígítva
- MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit (Tissue) (Roche Applied Science - Roche Magyarország Kft)

Hibridizálás reagentjei

- ECL™ direct nucleic acid labelling and detection systems (cat. No.: RPN3001; Amersham Biosciences)
- "UltraPure™" 20X SSC (cat. No.: SKU# 15557-036; Invitrogen - Csertex Kft)
- 5xSSC - 20-szorosból hígítva
- 2xSSC - 20-szorosból hígítva
- Hybond N+ Nylon Transfer Membrane (cat. No.: RPN203B; Amersham Biosciences)
- DNS próbák (*Myc*, *Hras1* és *Trp53* - Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Biológiai Intézet, prof. Dr. Szeberényi József)

Q-RT-PCR reagentjei

- Power SYBR Green PCR Master Mix (cat no.: 4367659; Applied Biosystems Magyarország Kft)
- TaqMan Reverse Transcription Reagents (cat no.: N808-0234; Applied Biosystems Magyarország Kft)
- A primereket (**III. táblázat**) a Primer Express™ Software-rel (Applied Biosystems) terveztük, az Integrated DNA Technologies szintetizálta

A 2-dezoxi-D-ribóz degradációs teszt vegyszerigénye

- foszfátpuffer (pH=7,4);
- 2-dezoxi-D-ribóz; (cat. No.: D5899 Sigma-Aldrich)
- NaCl (Nátrium-klorid cat. No.: S3014 Sigma-Aldrich)
- vas(II)-szulfát; (FeSO₄·7H₂O cat. No.: F7002 Sigma-Aldrich)

- H₂O₂; (hidrogén-peroxid; cat. No.: H3410 Sigma-Aldrich)
- etilén-diamin-tetraecetsav nátrium sója (EDTA cat. No.: CNBI34103 Calbiochem - Merck)
- TBA (tiobarbitursav) cat. No.: 88481 Fluka)
- 5,6%-os triklór-ecetsav (TCA cat. No.: T6399 Sigma-Aldrich)

Gén neve	szimbólum	Forward Primer / Reverse Primer
B-cell leukemia/lymphoma 2	Bcl2	5' CATTATCAATGATGTACCATG 3' 5' GCAGTAAATAGCTGATTTCGAC 3'
Bcl2-like 1	Bcl2l1	5' ATGGCAGCAGTGAAGCAAGC 3' 5' ACGATGCGACCCCAGTTTACTC 3'
Cyclin D1	Ccnd1	5' ATGGAACACCAGCTCCTGTG 3' 5' ACCTCCAGCATCCAGGTGGC 3'
Prostaglandin-endoperoxidase syntase 1 (cyclooxygenase 1)	COX1	5' CCAGAACCAGGGTGTCTGTGT 3' 5' GTAGCCCGTGCAGTACAATC 3'
Prostaglandin-endoperoxidase syntase 2 (cyclooxygenase 2)	COX2	5' TGGTGCCTGGTCTGATGATG 3' 5' GTGGTAACCGCTCAGGTGTTG 3'
Arachidonate omega-6-lipoxygenase	ALOX15	5'-GACCGAGGGTTTCCTGTCTC-3' 5'-TGTCTCCAGCGTTGCATCC-3'
Arachidonate 12-lipoxygenase	ALOX12	5' TTTTATTTTTAAATGCCTAAACAAG 3' 5' ACACTCCACATTAGTATTCTAACTACA 3'
Arachidonate 5-lipoxygenase	ALOX5	5' GGACCTCAGCATGTGGTATG 3' 5' GCTGGGTGAGGGGTACTIONT 3'
Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1	Hprt1	5' CAGGACTGAAAGACTTGCTC 3' 5' TCATAGGAATGGACCTATCAC 3'

III. táblázat. Primer szekvenciák

5.1.3. Készülékek

MagNA Pure Compact (Roche Applied Science) nukleinsav izoláló rendszer

A MagNA Pure Compact (Roche Applied Science) nukleinsav izoláló rendszer teljesen automatizált, teljesítménye max. 8 tisztítás futtatásonként. Előnye, hogy Real Time PCR-hoz, microarray-hoz alkalmas DNS-t, RNS-t lehet nyerni vele, a kontamináció veszélye a minimálisra csökkenthető. Szöveti RNS izoláló protokollja 50-100 µl tisztított nukleinsav oldatot képez.

ABI Prism 5700 RT PCR

Kísérleteinket az *ABI Prism 5700* készülék segítségével végeztük, mely rendelkezik egy beépített normál PCR géppel (termal cycler 96 pozícióval) és egy CCD kamerával. Az emittált fluoreszcens jeleket 500-600 nm között detektálja. Az eredményként kapott fluoreszcens extinciót egy AD-konverteren keresztül számítógépes program segítségével értékeljük ki.

5.2. Módszerek

5.2.1. Kísérleti állatok kezelési sémája

CBA/Ca egerek „short-term” kezelése

A kísérlet során CBA/Ca H-2^k haplotípusú, 4-6 hetes beltenyésztett nőstény egereknek ip. meghatározott dóziszú (30 mg/ttkg dózisúban MNU; oldószer: izotóniás oldat), 50mg/ttkg transz-2-hexenal (oldószer kukoricaolaj). A kontroll csoport 0,1 cm³ oldószert kapott, táplálékot mindegyik csoport egyedei igény szerint (*ad libitum*) fogyaszthattak. A karcinogén expozíciót követő 12/24 óra (MNU kezelés esetén) illetve 24/48/72 óra (2-hexenal kezelés esetén) elteltével az állatokat cervicalis diszlokáció (CD) után felboncoltuk, szerveiket (csontvelő, máj, lép, vese, tüdő, hasi nyirokcsomó és csecsemőmirigy) kiemeltük és -80 °C-on tároltuk, majd mRNS-t izoláltunk TRIZOL protokoll szerint.

CBA/Ca, AKR/J, C3He-mg egerek Long-Evans, Fischer 344 és Wistar patkányok „long-term” kezelése

A krónikus kísérletek során CBA/Ca H-2^k, AKR/J H-2^k és C3He-mg H-2^k egér, valamint Long-Evans, Fischer 344 és Wistar patkány 50 mg/ttkg kukoricaolajban oldott transz-2-hexenált kapott ip. a kísérlet 1., 8. és 15. napján (összesen 150 mg/ttkg). A kontroll állatokat azonos mennyiségű kukoricaolajjal oltottuk.

18 hónap túlélési idő után az állatokat felboncoltuk, a bennük kialakult daganatokból szövetmintát vettünk és hagyományos szövettani feldolgozásnak vetettük alá. A paraffinba ágyazott blokkokból vágott 5 µm-es, hematoxin-eozinnal festett metszeteken fénymikroszkóppal, 50x és 100x nagyítással vizsgáltuk a tumorok szövettani képét.

CBA/Ca egerek kezelése „short-term” kemoprevenációs tesztrendszerben

A kísérlet során CBA/Ca H-2^k haplotípusú, 4-6 hetes beltenyésztett nőstény egereket az alábbi kezelés protokoll szerint ip. oltottunk (**IV. táblázat**). A negatív kontroll csoport 0,1 cm³ kukoricaolajat kapott, a pozitív kontroll 20 mg/ttkg DMBA-t, a vizsgált vegyületet

(dózis: 20 mg/ttkg rezveratrol illetve likopin és 4.36 mg/ttkg HBA) a karcinogén expozíció előtt 24 órával (III: csoport), a karcinogén expozícióval azonos időben (IV. csoport), valamint az azt követő 24. órában (V. csoport), oltottuk az állatokba, táplálékot mindegyik csoport egyedei igény szerint (*ad libitum*) fogyaszthattak. Karcinogén expozíciót valamint az utolsó kezelés után 24 órával cervikális diszlokáció (CD) után az egerek szerveit kiemeltük, majd Trizol protokoll szerint mRNS-t izoláltunk belőle.

	I. csoport kukoricaolaj	II. csoport DMBA	III. csoport vizsgált vegyület + DMBA	IV. csoport vizsgált vegyület = DMBA	V. csoport DMBA + vizsgált vegyület	VI. csoport vizsgált vegyület
1. nap					DMBA	
2. nap			Vizsgált vegyület	Vizsgált vegyület DMBA	Vizsgált vegyület	Vizsgált vegyület
3. nap	Kukorica- olaj	DMBA	DMBA	CD	CD	CD
4. nap	CD	CD	CD			

IV. táblázat: CBA/Ca egerek kezelési sémája kemoprevenációs tesztrendszerben

AKR/J egerek kezelése a görögszéna és ginseng tartalmú táp vizsgálata során

A kísérletben a 4-6 hetes nőstény AKR/J H-2^k egereket négy csoportba osztottuk. Az első és harmadik csoport egyedei normál tápot fogyasztottak igény szerint a kísérlet végéig (7. nap), a második és negyedik csoport speciális tápot fogyasztott. A harmadik és negyedik csoport a kísérlet hatodik napján DMBA kezelést kapott (20 mg/ttkg, ip.). (V. táblázat). Mind a négy csoport egyedeit a karcinogén expozíció után 24 órával cervicalis diszlokáció (CD) után felboncoltuk, szerveikből (vese, máj, lép, tüdő) mRNS-t izoláltunk MagNA Pure Compact Instrument készülékkel (Roche Applied Science).

	1-7 nap	6. nap	7. nap
I. csoport	normál táp	-	CD
II. csoport	specialis táp		
III. csoport	normál táp	20 mg/ttkg DMBA ip.	
IV. csoport	specialis táp		

V. táblázat: AKR/J egerek kezelési sémája görögszéna és ginseng kezelés esetén

5.2.2. RNS izolálás

RNS izolálás Trizol protokollal

- 50-100 mg szövetmintát homogenizáltunk 1 cm³ TRIZOL reagensben 4 cm³-es csőben 45-90 másodpercig. A minta mennyisége nem haladhatja meg a homogenizáláshoz használt TRIZOL reagens mennyiségének 10 %-át
 - a homogenizált mintát 5 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten
 - Hozzáadtunk 0,2 cm³ kloroformot. Összeráztuk erősen a csövet 15 mp-ig
 - 2-3 perc inkubálás után lecentrifugáltuk a mintát 12000 g-vel 15 percig 2-8 °C-on.
 - Átvittük a vizes fázist egy tiszta csőbe. Hozzáadtunk 0,5 cm³ izopropil-alkoholt.
 - 10 perc inkubálás után újra lecentrifugáltuk 12000 g-vel 10 percig 2-8 °C-on. Centrifugálás előtt az RNS precipitátum gyakran nem látható, centrifugálás után a cső alján gélyszerű csapadékot képez.
 - a felülúszó leöntése után az RNS-t mostuk 1 cm³ 75 %-os alkohollal.
 - vortexelés után lecentrifugáltuk 7500 g-vel 5 percig 2-8 °C-on.
 - a felülúszót leöntöttük, majd megszáritottuk a csapadékot. 300-500 µl RN-áz mentes vízben (DEPC víz) oldottuk.
- A szervekből izolált mRNS-t a hibridizációig -80 °C-on tároltuk.

RNS izolálás MagNA Pure Compact Instrument készülékkel (görögszéna és ginseng hatásának vizsgálata)

- Lizáltunk és homogenizáltunk 50-70 mg szövetet 1 cm³ Lysis Buffer-ben, 4 cm³-es csőben 45-90 másodpercig
- Inkubáltuk a mintát 30 percig szobahőmérsékleten
- Centrifugáltuk 17000 fordulaton 5 percig
- A felülúszóból 350 µl-t pipettáztunk át mintatartó csőbe (Sample Tube)
- A csövet a készülék mintatartó állványába tettük (Sample Rack) és elindítottuk az „RNA_Tissue protokoll”-t az alábbiak szerint:
- Kicsomagoltuk a reagens-kártyát, és inkubáltuk 30 percig szobahőmérsékleten
- Beolvastuk a kazetta vonalkódját, majd behelyeztük a kártyatartó fiókba (Cartridge Rack), ezt annyiszor ismételtük, ahány izolálást szeretnénk volna végezni (max. 8 mintát képes a gép egyszerre izolálni, így a mi 12 mintánkat 2 „fordulóval” tudtuk megoldani)
- A mintákat a mintatartó rekeszbe helyeztük (Sample Rack)
- Kiválasztottuk az izolációs protokollt a „Protocoll Menu”-ben, ezenkívül az elúciós térfogatot (50 vagy 100 µl)

- Megfelelő számú pipettahegy készletet tettünk a hegytartó rekeszbe (izolálásonként egy)
- Röviden lecentrifugáltuk a DN-áz-t és 20 µl-t (izolálásonként) tettünk a mintacső aljára. A DNase tartalmú nyitott mintacsöveket a mintatartó második sorába helyeztük.
- Leolvastuk a minta vonalkódot az elsődleges mintacsőből.
- Visszahelyeztük a gépbe való tubus tartó állványt.
- Beszkenneltük az "Elution Tube"-k vonalkódjait (ebben lesznek a végén az izolátumok); ezeket az elúciós csöveket behelyeztük az állványba (Elution Tube Rack), majd visszatettük a berendezésbe.
- Miután az izoláló kazetta visszakerült a készülékbe, véglegesítettük az adatokat, végül pedig beindítottuk a futást.

Az elúciós tubusba kerülő RNS oldatból Q-RT-PCR-t végeztünk az alábbi protokoll szerint, a fel nem használt oldatot -80 °C-on tároltuk.

5.2.3. Nukleinsavak blottolása, hibridizálás

- A próba jelölését és a detektálást az ECLTM direct nucleic acid labelling and detection systems protokollja szerint végeztük. A próba koncentrációjának a hibridizációs oldatban 10 ng/ml-nem kell lennie. (Minimális mennyisége 200 ng/20 µl.) A DNS próbát Eppendorf csőben 5 percre 100 °C-os vízfürdőben denaturáltuk, majd 5 percig jégen tartottuk, majd rövid ideig (kb. 5 mp-ig) centrifugáltuk.
- Azonos mennyiségű jelölő reagenst adtunk hozzá (Labelling reagent), összekevertük. A jelölő reagens mennyiségével azonos mennyiségű glutáraldehid oldatot adtunk hozzá, összekevertük Vortex-el (1 mp). Centrifugáltuk 5 mp-ig. Inkubáltuk 37 °C-on 10 percig.
- Az RNS végkoncentrációját 10 µg/50 µl-re állítottuk be DEPC vízzel
- A blottert RN-áz mentesítettük, a Hybond membránt 5xSSC-vel telítettük, majd a készülék összeszerelése után 50 µl 20 x SSC-t (DEPC-es) szívattunk át minden lyukon. Átszívattuk a vizsgálandó RNS mintákat, a pozitív és negatív kontrollokat (50-50 µl), majd 20xSSC-vel mostuk.
- Az RN-áz mentesített hibridizáló csövekbe helyeztük az RNS-t tartalmazó membránt, 8-10 cm³ hibridizációs pufferrel előkezeltük 15 percig a 42 °C-os hibridizáló kamrában.
- Hozzáadtuk a jelölt DNS próbát a hibridizációs pufferhez, majd 42 °C-on rázatva inkubáltuk egy éjszakán át.
- Másnap a membránokat átraktuk 42 °C-ra előmelegített „primary wash buffer”-t tartalmazó mosó tálba és 20 percig 42 °C-on rázattuk, a mosófolyadékot leöntöttük, frisset öntöttünk rá és ismét 20 percig rázattuk 42 °C-on.

- A membránokat átraktuk tiszta tálba és 2xSSC-t öntöttünk rá, szobahőmérsékleten rázattuk 5 percig.
- A mosófolyadékot leöntöttük, frisset öntöttünk rá és ismét rázattuk szobahőmérsékleten 5 percig.
- A detekciós oldathoz 1:1 arányban mértük össze az 1-es és a 2-es detekciós reagenst (ECL kit).
- A második mosóoldatból kivettük a membránt, óvatosan leitattuk. Tiszta edénybe tettük és a detekciós oldatot rámértük a mintákra. Pontosan 1 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd a felesleges detekciós oldatot leitattuk róla.
- A membránt fóliába becsomagoltuk, majd a kazettába helyeztük mintával felfelé.
- Sötét szobában behelyeztük a filmet a kazettába (piros fényben).
- 1 óra expozíció után röntgen laboratóriumban előhívattuk.
- Quantiscan szoftver segítségével meghatároztuk az optikai denzitást, mely arányos a keresett mRNS koncentrációjával.

5.2.4. Kvantitatív RT-PCR protokoll Gene Amp® 5700 SDS rendszerrel

A kvantitatív RT-PCR-t az Applied Biosystems Power SYBR Green PCR Master Mix protkolja alapján az alábbiak szerint végeztük. A használt kit a primereken kívül a reakcióelegy összes alkotó elemét tartalmazza.

- A „GeneAmp 5700 SDS ver1.3” szoftverben beállítottuk a hőprogramot (**VI. táblázat**), a megtervezett plate alapján a reakció paramétereit beállítottuk.
- A reakció tervezésétől függő reakcióelegyet jégen összemértük (a mix tartalmazza az 2X koncentrációjú Power SYBR Green PCR Master Mixet, a TaqMan Reverse Transcriptase-t, TaqMan RNase Inhibitor, primereket, steril bidesztvizet), majd 22,5 µl-t a cellákba pipettáztunk. Az egy cellába kerülő optimalizált reakcióelegy összetétele a **VII. táblázat**ban található.

Lépés	Reverz Traszkripció	AmpliTaq Gold aktiváció	40 db PCR ciklus	
			denaturáció	extenzió
Hőmérséklet/idő	48 °C 30 perc	95 °C 10 perc	95 °C 15 mp.	60 °C 1 perc
Végtérfogat cellánként:	25 µl			

VI. táblázat: A Q-RT-PCR során alkalmazott hőprogram

- 2,5 µl templát RNS-t pipettáztunk a reakcióelegyhez (minden cellába a megfelelőt), majd a platet lefedtük egy speciális fóliával.
- A plate-t a készülékbe helyeztük, a megfelelő pozícióba rögzítettük a CCD kamerát, majd a szoftver segítségével elindítottuk a reakciót.
- Az ABI Prism 5700 készüléket vezérlő „GeneAmp 5700 SDS 1.3” outputja egy riport, melyet Microsoft Excel táblázatkezelő szoftverrel beolvastunk, belőle a génexpressziós adatokat számoltuk az alábbi képlet alapján (comparative CT experiments)

$$\text{Génexpresszió \%} = 2^{-\Delta C_T} = 2^{-(C_{T-\text{vizsgált gén}} - C_{T-\text{HPRT1 gén}})}$$

Power SYBR Green PCR Master Mix	12,5 µl
TaqMan Reverse Transcriptase	0,125 µl
TaqMan RNase Inhibitor	0,5 µl
Primer	1-1 µl
RNS templát	2,5 µl
steril bidesztillált víz	7,375 µl
Végtérfogat:	25,0 µl

VII. táblázat: Egy cellában lévő reakcióelegy összetétele

5.2.5. Antioxidáns kapacitás meghatározása

A 2-dezoxi-D-ribóz degradációjának vizsgálatát EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav) jelenlétében és anélkül is elvégeztük.

A reakcióelegy összetétele EDTA alkalmazása nélkül: 30 mM foszfátpuffer (pH=7,4); 9 mM 2-dezoxi-D-ribóz; 40 mM NaCl, 30 µM vas(II)-szulfát; 50 µM H₂O₂; 200 µM HBA nátrium sója (a vegyület össztérfogatának megfelelő térfogatú 1% (v/v)-os DMSO-ban oldva)

Az EDTA jelenlétében végzett kísérlet során a reakcióelegy 36 µM EDTA-t tartalmazott. A reakcióelegyeket 37°C-on inkubáltuk, majd meghatározott időpontokban mintát vettünk belőle, amelyben meghatároztuk a tiobarbitursav (TBA) reaktív anyagok mennyiségét. A megfelelő referencia elegyek HBA Na-sója helyett 1 % (v/v)-os DMSO-t tartalmaztak. A vak összetétele hasonló volt a megfelelő elegyhez, de nem tartalmazott vas(II)-szulfátot.

A mintavételkor jelenlévő TBA reaktív anyagok meghatározását 1 cm³ mintából végeztük. A mintához 0,5 cm³ 1%-os tiobarbitursav oldatot és 0,5 cm³ 5,6%-os triklór-ecetsavat adtunk,

majd 8 percig 100°C-os glicerines fürdőben inkubáltuk. A szobahőmérsékletre hűtött oldat abszorbanciáját 532 nm-en mértük, a vakkal szemben.

5.2.6. Statisztikai analízis

A görögszéna és a ginseng hatásának meghatározása során elvégzett három párhuzamos vizsgálat eredményeit átlagoltuk, majd az így meghatározott relatív génexpressziókat ábráztuk, χ^2 próbával számoltuk a konfidencia intervallumokat.

6. EREDMÉNYEK, MEGBESZÉLÉS

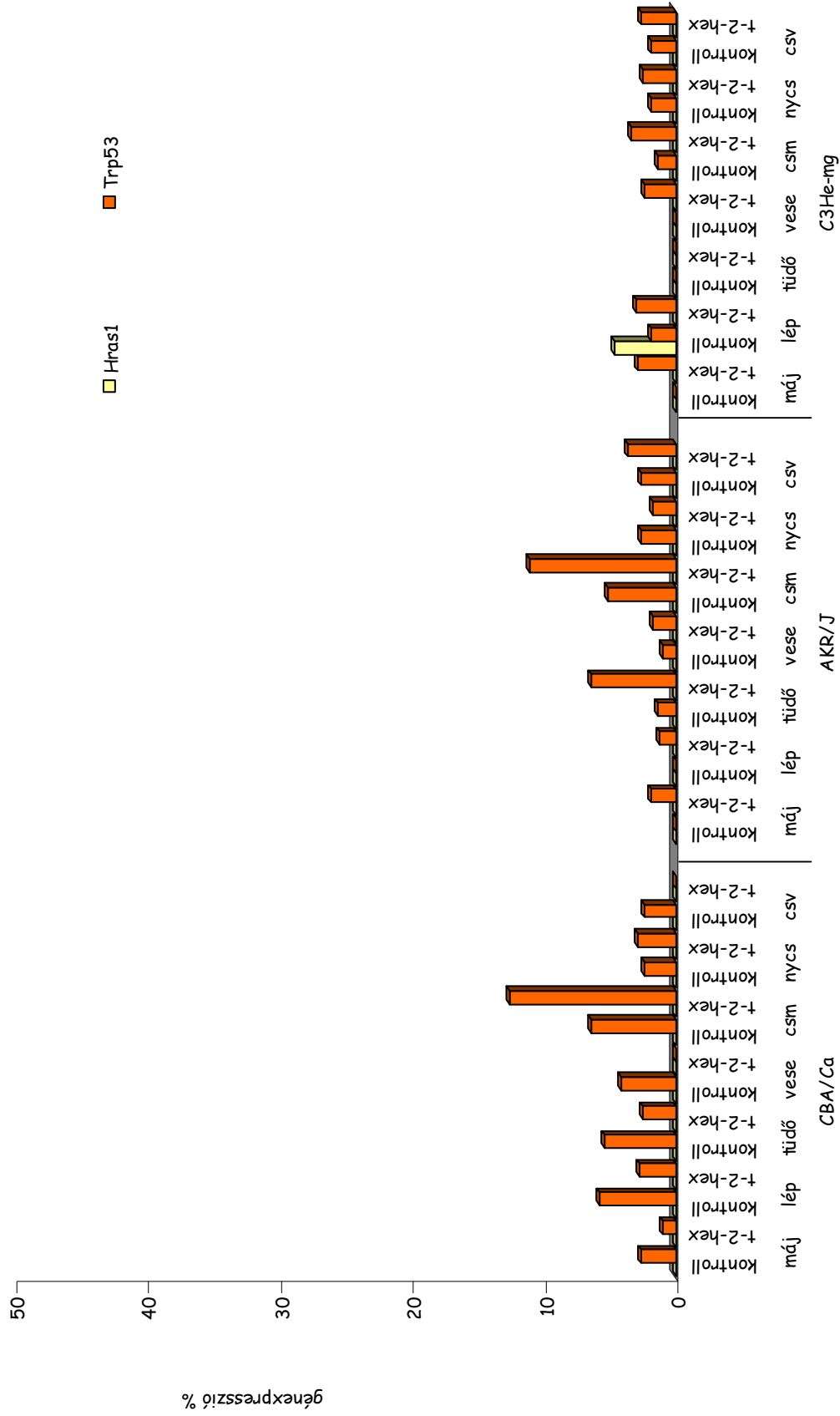
6.1. A transz-2-hexenal *in vivo* vizsgálata

Munkánk során állatkísérletes tesztrendszer segítségével vizsgáltuk a transz-2-hexenálnak két kulcsgén, a *Trp53* tumor szuppresszor gén és a *Hras1* gén expressziójának változására kifejtett hatását különböző szervekben (máj, csecsemőmirigy, tüdő, lép, csontvelő, nyirokcsomó, vese) a karcinogén expozíció után 24, 48 és 72 órával. Krónikus kísérletben a transz-2-hexenallal indukált tumorok kialakulását vizsgáltuk.

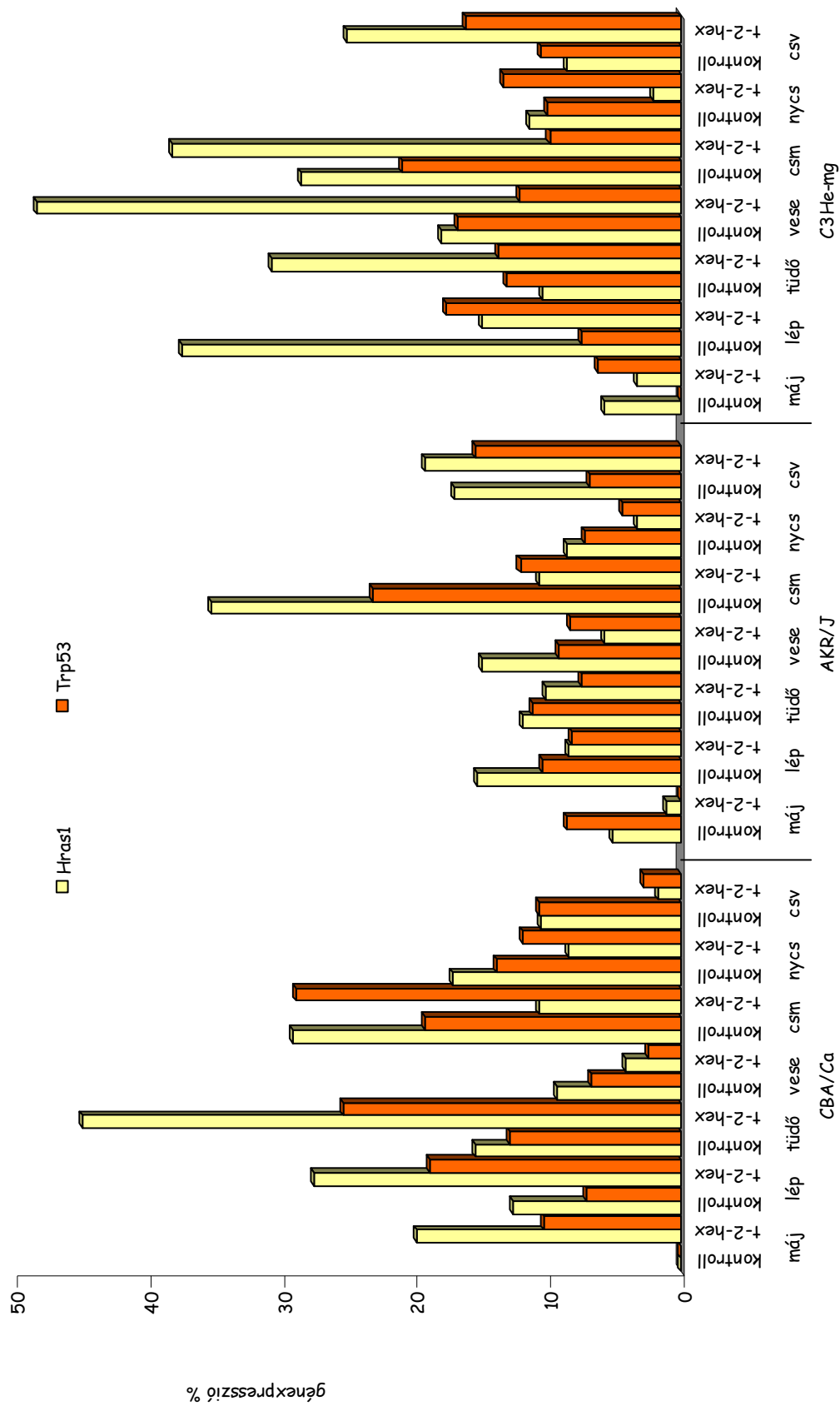
24 órával a transz-2-hexenal expozíció után a kezeletlen kontroll állatokkal összevetve nem tapasztaltunk overexpressziót a kísérleti állatok szerveiben *Hras1* gén esetén. A *Trp53* tumor szuppresszor gén esetén megfigyelhető, hogy CBA/Ca és AKR/J egerek esetén a csecsemőmirigyben a kontroll csoporthoz képest megemelkedett az expresszió, azonban a többi szerv (máj, tüdő, vese, lép, nyirokcsomó, csontvelő) nem mutatott jelentős különbséget (18. ábra).

A transz-2-hexenal expozíció után 48 órával felboncolt kísérleti egerek szerveiből izolált mRNS-ek koncentrációi alapján CBA/Ca egerek esetén a máj, lép és tüdőszövetben, AKR/J egereket vizsgálva csecsemőmirigyben, C3He-mg egerek esetén vesében, csecsemőmirigyben és csontvelőben detektáltunk *Hras1* onkogén expresszió emelkedést. *Trp53* tumor szuppresszor gén esetén CBA/Ca egereknél máj, lép, tüdő és csecsemőmirigy overexpressziót mértünk, AKR/J egereknél csak a csontvelőben, C3He-mg egereknél a májban, lépben, nyirokcsomóban és a csontvelőben tapasztaltunk génexpresszió emelkedést a transz-2-hexenál expozíció hatására (19. ábra).

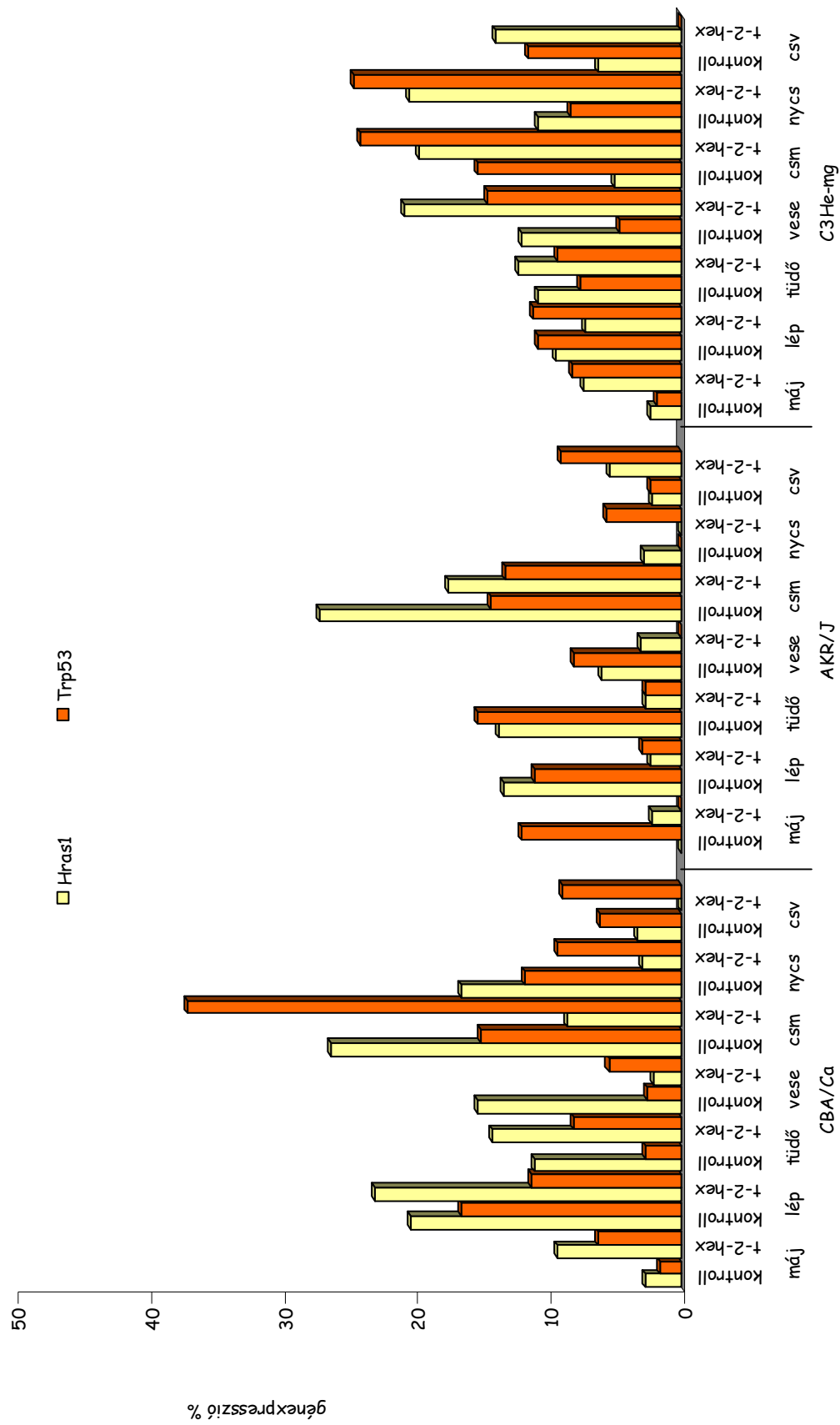
Az expozíció után 72 órával boncolt egerek szerveit vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy CBA/Ca egereknél a máj kivételével a *Hras1* relatív koncentrációja (a β -aktinhoz képest) nem magasabb jelentősen a szervekben. AKR/J egérben a májban és a csontvelőben volt észlelhető a transz-2-hexenál génexpresszió növelő hatása, C3He-mg egerek esetében azonban még 72 órával az expozíció után is mértünk magasabb *Hras1* expressziót a májban, vesében, csecsemőmirigyben és a csontvelőben. A *Trp53* gén expressziós spektruma, eltérő képet mutatott a különböző beltenyészett egértörzsek esetén. 72 órával az expozíció után a CBA/Ca egerek májában, tüdejében és veséjében volt magasabb a génexpresszió a kontrollhoz képest, AKR/J egereknél csak a csontvelőben találtunk overexpressziót, C3He-mg egerek szervei közül a máj, a vese a csecsemőmirigy és a nyirokcsomó expresszált nagyobb koncentrációban *Trp53*-mRNS-t (20. ábra).



18. ábra: *Hras1* és *Trp53* expresszió a transz-2-hexenál expozíció után 24 órával CBA/Ca, AKR/J és C3He-mg egerek egyes szerveiből izolált mRNS alapján

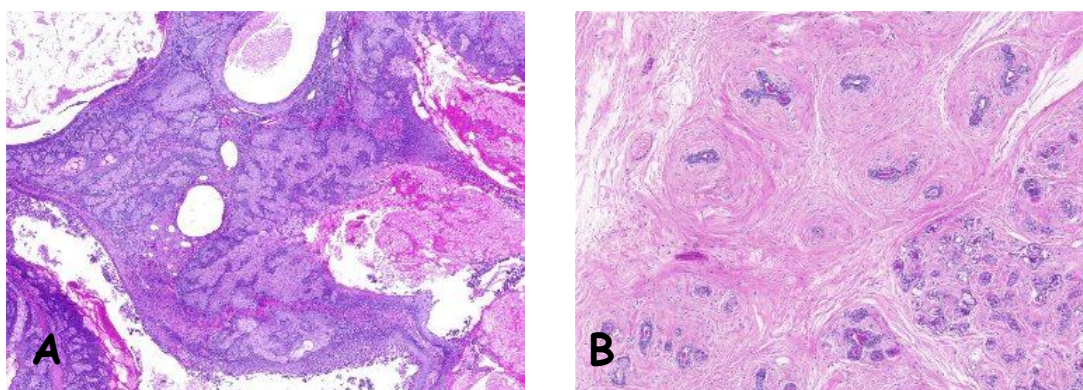


19. ábra: *Hras1* és *Trp53* expresszió a transz-2-hexenál expozíció után 48 órával CBA/Ca, AKR/J és C3He-mg egerek egyes szerveiből izolált mRNA alapján



20. ábra: *Hras1* és *Trp53* expresszió a transz-2-hexenál expozíció után 72 órával CBA/Ca, AKR/J és C3He-mg egerek egyes szerveiből izolált mRNA alapján

A krónikus kísérletekben a vizsgált 12 db nőstény CBA/Ca H-2^k egérben daganatot nem találtunk, míg a 12 db nőstény AKR/J H-2^k egér közül egyben leukémiás megbetegedés, a 12 db nőstény C3He-mg H-2^k egér közül egyben májkarcinóma, kettőben pedig vesetumor alakult ki. A 12 db nőstény Long-Evans patkányban egy fültőmirigy-karcinómát és egy adenokarcinómát, a 12 db nőstény Fischer 344 patkányból kettőben tüdődaganatot, a 12 Wistar patkány közül kettőben szintén tüdőtumort találtunk. Két daganat szövettani képe a **21. ábrán** látható (**21A és 21B ábra**). A kezeletlen kontroll csoportokban a kísérlet ideje alatt nem keletkezett daganat.



21. ábra. Krónikus kísérletben kialakult daganatok 2-hexenal expozíció után. Kiterjedt dukális proliferáció periduktális fibrózissal és glanduláris hiperplázia a fültőmirigy lobulusaiban, 50x nagyítás (A). Kiterjedt atípusos epithélsajt-proliferáció kétirányú differenciálódással, extenzív keratinizáció (1 ciszta), szebáceus differenciáció, 100x nagyítás (B).

A 2-hexenal természetes fungicidként viselkedő vegyület, sérülés esetén enzimatiszus folyamatokban képződik a növényben, gombák és egyéb mikroorganizmusok ellen védve azt. Ilyen esetekben a sérülés helyén a transz-2-hexenal koncentrációja jelentősen megnövekszik az ép részekben található mennyiséghez viszonyítva [64]. Genetikailag módosított vagy keresztezett növényekben azonban nemcsak a sérülés helyén emelkedik a transz-2-hexenal koncentráció, a növény folyamatosan termeli, sérüléstől függetlenül. Minden eddigi adat arra enged következtetni, hogy az emberek jelentős mértékben exponáltak transz-2-hexenállal, és így e vegyületnek, mutagén/karcinogén aktivitásának megfelelően, fontos szerepe lehet a humán karcinogenezisben [143,144,145,146].

Bár az Intézetünk által használt kísérleti tesztrendszer kiválóan alkalmas különböző karcinogén vegyületek hatásának kimutatására [147,148,149,150,151,152], az ismert genotoxikus karcinogén vegyületektől (DMBA, NP) eltérően a transz-2-hexenal nem indukált a vizsgált kulcsgénekben hasonló mértékű korai génexpresszió-emelkedést, ugyanakkor a

krónikus kísérletben karcinogén hatásának bizonyult, az állatokban daganatok kialakulását eredményezte.

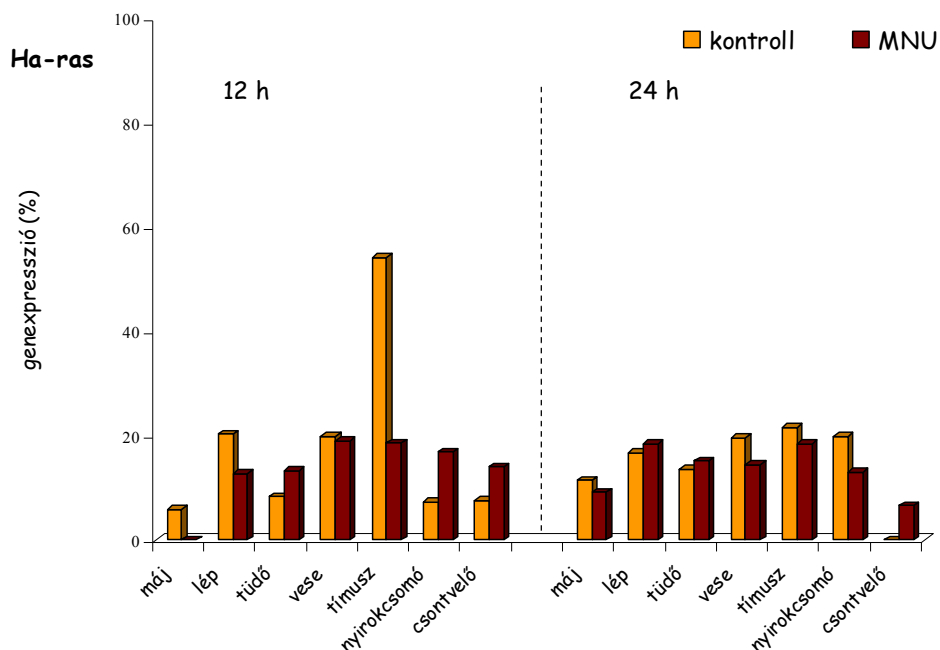
CBA/Ca egerek esetén a korai génexpresszió változásokat követően nem alakultak ki daganatok, noha az állatok kémiai karcinogének és/vagy sugárzás iránt érzékenyek. Ilyen típusú indukció után nagy %-ban alakulna ki daganatok. Az AKR/J és a C3He-mg egerek malignus folyamatai összefüggésbe hozhatók az expozíciót követő magasabb onko/szuppresszorgén expresszióval spontán („naturally occurring”) daganatfrekvenciájuk kapcsán is.. Kísérleti eredményeink alapján feltételezhető, hogy más, a tumorigenezisben szerepet játszó gének változásai, vagy epigenetikus hatás játszik szerepet a transz-2-hexenál által okozott daganatok kialakulásában. Ezen hatás bizonyítására, valamint a transz-2-hexenál más génekre kifejtett késői hatásának vizsgálatához további kísérletekre van szükség. Továbbá egyénileg tervezett DNS-chipekkel a karcinogén hatás hátterében álló új biomarker gének azonosíthatók. Terveink közt szerepel a transz-2-hexenállal kapcsolatos irodalomban nem közölt genotoxikus tesztek és comet assay elvégzése is.

6.2. Az N-nitrozo-N-metil-karbamiddal kezelt CBA/Ca egerek génexpressziós profiljának vizsgálata

Az intézetünkben kifejlesztett állatkísérletes modell segítségével a karcinogenezis korai molekuláris epidemiológiai biomarkereit vizsgáltuk a *Hras1* és *Myc* kulcs protoonkogének illetve *Trp53* tumor szuppresszorgén expressziót határoztuk meg. Kísérletünkben a genotoxikus, direkt karcinogén MNU hatásait hasonlítottuk össze az általunk korábban észlelt *in vivo* DMBA okozta génexpressziós emelkedéssel.

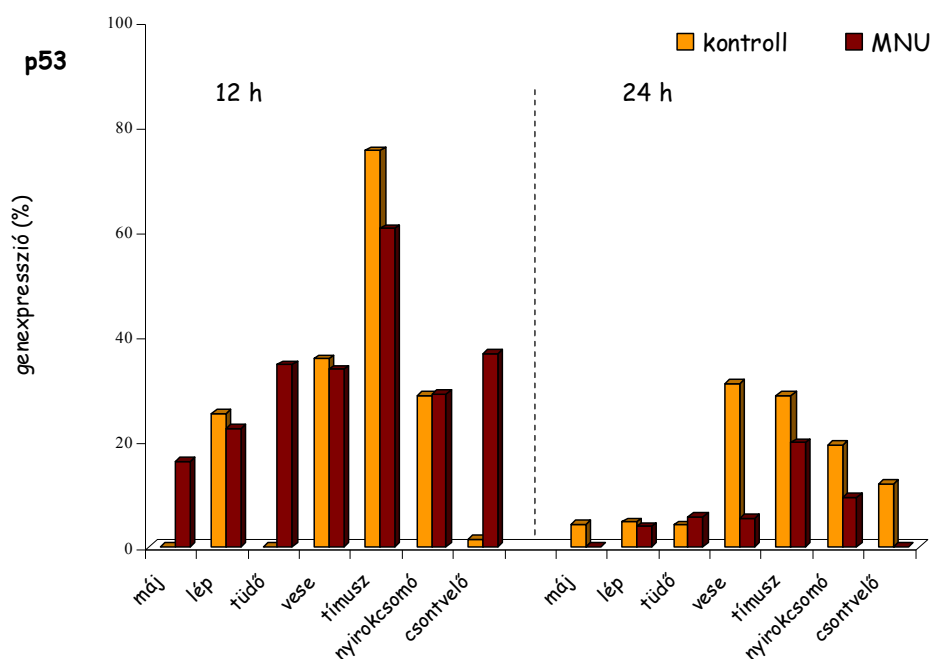
Az MNU kezelés után már 12 órával a tüdőben, nyirokcsomóban és csontvelőben magasabb *Hras1* génexpressziót tapasztaltunk, mint a kontroll csoport szövetmintáiban (22. ábra). Látható, hogy a kezelést követő 24. óra elteltével (csontvelőt kivéve) az MNU hatása lecsengett.

A *Trp53* tumor szuppresszorgén expressziója a májban, tüdőben és csontvelőben nőtt MNU hatására a kezelést követő 12. órában. Lép, vese, nyirokcsomó és csecsemőmirigy esetén nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a kezelt és a kontroll csoport között ebben az időpontban, 24 óra elteltével azonban a csecsemőmirigyben, a vesében és a nyirokcsomóban nagy arányú génexpresszió csökkenést tapasztaltunk valamint a csontvelőben nem volt mérhető a *Trp53* gén expressziója (23. ábra).



22. ábra: CBA/Ca egerek különböző szöveteiből meghatározott génexpressziós mintázat az MNU kezelést követő 12. és 24. órában *Hras1* gén esetén

A *Myc* esetén a tüdőben, a nyirokcsomóban és a csontvelőben szignifikáns génexpresszió emelkedést tapasztaltunk 12 óra elteltével; 24 órával a kezelés után mind a hét szervben az MNU-val kezelt csoport egereinek szövetmintáiban alacsonyabb *Myc* génexpressziót mértünk, mint a kontrollban (24. ábra)

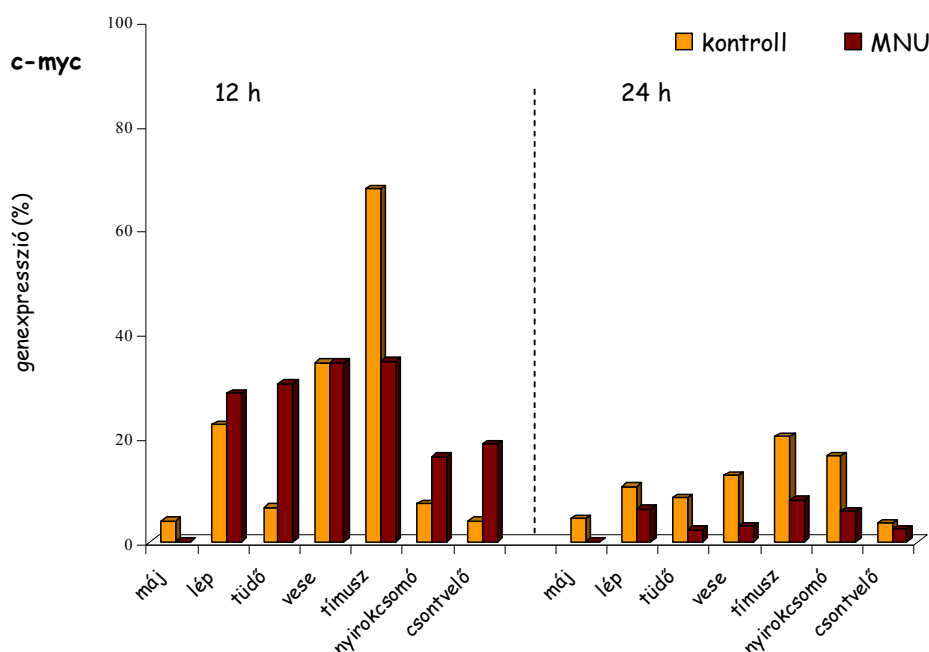


23. ábra: CBA/Ca egerek különböző szöveteiből meghatározott génexpressziós mintázat az MNU kezelést követő 12. és 24. órában *Trp53* gén esetén

In vivo az MNU kezelés hatása a célszervekben a vizsgált génexpressziókra (*Myc*, *Trp53*, *Hras1*) heterogén és nagyban függ a hatóanyag beadásának helyétől és módjától [78,80,82,83].

Hras1 gén expressziója a különböző szövetekben erősen eltérő és expressziójának a növekedése a csontvelőben és a nyirokcsomókban már a 12 órás kezelést követően és megfelel az észlelt rövid távú hatásnak. Talcott és mtsai. leírták: az MNU hatására már egy nap alatt a csecsemőmirigy nagysága szignifikánsan csökken. Ezt alátámasztja a csecsemőmirigyben tapasztalt *Hras1* és *Myc* expresszió csökkenés [153]. A *Hras1* gén expressziója 24 órával a kezelést követően visszaállt megközelítőleg a kontroll szintjére. *Hras1* mutációk hátterében tehát a specifikus DNS károsodás állhat.

Guo és mtsai. kutatási eredményei alapján a állandóan aktivált állapotban lévő *Hras1* gén overexpressziója általánosságában véve nem mieloid leukémiát, hanem a limfoid sejtek transzformációját okozta [154]. Ezt alátámasztja, hogy a csontvelőben és a nyirokcsomóban találtunk magas *Hras1* génexpressziót.



24. ábra: CBA/Ca egerek különböző szöveiteiből meghatározott génexpressziós mintázat a kezelést követő 12. és 24. órában *Myc* gén esetén

Radany és mtsai. tumorszupresszor gén(ek) jelenlétét fedezték fel az egér 4-es kromoszómáján, melyek mutáns *Hras1* génexpresszió esetén bizonyos tumorok kialakulásában vesznek részt [159]. Emelett „loss of heterozygosity” (LOH) jelenséget írták le a 4-es egér

kromoszóma tumorszuppresszor génjein néhány tüdődagában és csecsemőmirigy eredetű limfómában is [83,155,156,157]. Ez egybevágh a megfigyeléssel, hogy az 1-es, 4-es 5-ös és a 10-es kromoszóma kópiaszám növekedését figyelték meg Kang és mtsai [82].

Az MNU által okozott tímusz (csecsemőmirigy) eredetű limfóma kialakulásának a genetikai háttere még nem pontosan ismert, de a *Myc* onkogén overexpressziója jellemző erre. Ez megmagyarázhatja az MNU kezelés heterogén hatás-profilját a különféle szerveken, főleg ha a *Myc* gén transzlokációjával, mint lehetőséggel is számolunk. Kang és mtsai. rámutattak, hogy az MNU kezelést kapott egércsoport *Myc* overexpressziója pontosan megegyezik a 15. kromoszóma kópiaszám növekedésével [82].

A 15. kromoszóma duplikációja önmagában magyarázatul szolgálhat a limfogenezisre is, de a folyamat összetettebb. Az egér *Pfdn5* (*MM-1*) gén (*Myc* binding protein *Myc*-Modulator 1) a 15. kromoszóma F2-F3 régiójába található, amint az a FISH-val (fluoreszcens in situ hibridizáció) Xuecui munkacsoportja kimutatta [158]. A *Pfdn5* gén általánosan, de különböző mértékben fejeződik ki az egerek szöveteiben és feltehetően szerepet játszik a máj kifejlődésében és növekedésében, mivel mindegyik *Pfdn5* izoforma egymástól eltérően irányítja a *Myc* transzkripcióját és aktivitását a vizsgált szövetekben [158]. Eltérő elhelyezkedésű és repressziós aktivitású *Pfdn5* izoformák kapcsolódnak a *Myc*-hez [159].

Ezzel szemben Silva és mtsai. egér T-sejtes limfómában a 15. kromoszóma triszómiájának vizsgálatai alapján a limfómában a D 2/3 régió duplikálódik, ami a *Myc* gént tartalmazza, minden más előtt. Ez hozzájárul az egér T-sejtes leukemia kialakulásához, a 15. kromoszóma poliszómiája mellett [160].

Kísérleteinkben nem tapasztaltunk a tímuszban *Myc* indukált expresszió emelkedést, mivel a CBA/Ca egér ideális a molekuláris epidemiológiai biomarkerek expresszió változásainak a jelzésére, ám az MNU által a tímuszon okozott hatásokra kevésbé érzékeny. A jövőben érzékenyebb, pl. AKR/J egereken tervezzük az MNU csecsemőmirigyre gyakorolt hatásainak a felderítését [161].

Eltérő és szerv-specifikus, összetett, hosszú távú hatásokról számol be az irodalom, amiket a *Myc* és *Trp53* gén szerepeinek kölcsönhatása okozhat [78]. Kang és mtsai. által leírt késői limfómák kialakulását megmagyarázza a *Trp53* gén vad típusú alléljének az átalakulása pontmutációval, majd LOH-val mutáns típusúvá. Ha a mutáns típusú *Trp53* géntermék nem folytatja citoprotektív hatását az onkogenezis ellen, beindulhat a limfogén átalakulás [80,82,83].

A DMBA-val szemben, MNU hatására korábban emelkedik a *Hras1*, *Myc* és a *Trp53* expressziója a későbbiekben tumorkialakulást mutató szervekben. Ezen gének expresszió-emelkedése, mint kísérletünk is igazolta, jó, korai, behatároló molekuláris biomarkere a

karcinogén expozíciónak, így a primer prevencióban fontos szerepe lehet. **Eredményeink alátámasztják a tényt, hogy az MNU direkt karcinogén és ezért a hatása gyorsabban jelentkezik (12 órával a beadás után) és előbb le is cseng (24 órával a beadás után), mint a metabolikusan aktiválódó karcinogén DMBA esetében (ahol 24 és 48 óra közt jellemző a hatás) [162,163]**

El-Sohemy és mtsai. illetve Intézetünk korábbi eredményei alapján a MNU és a DMBA által okozott *Hras1* mutációk specifikusak és jellemzőek [77,78,164,165]. Az MNU és a DMBA folyamatos kezelése a *Hras1* gén specifikus elváltozása mindkét esetben megfigyelhető, a *Hras1* protoonkogén aktivációnak nagy szerep juthat, mivel a limfogenezisben a *Hras1* expressziója megemelkedik, de a tumorszupresszor *Trp53* és az onkogén *Myc* modulálja.

12 órával az MNU kezelést követően megnőtt a *Myc* gén expressziója a tüdőben, a nyirokcsomókban és a csontvelőben és ezekben a szervekben az iniciátor szerepük feltételezhető. A 12 órával a kezelést követően a tüdőben, a csontvelőben és a nyirokcsomóban mért génexpressziós vizsgálatok eredményei alapján feltételezhető összefüggés: a *Trp53* expresszió nőtt és a feltételezetten ehhez (is) kapcsolt szabályozású *Myc* expressziója csökkent. Továbbá csontvelőben és nyirokcsomókban 24 óránál a *Trp53* expressziója csökkent, ami az MNU hatásának lecsengésével és a *Myc* negatív visszacsatolású szabályozásával hozható összefüggésbe.

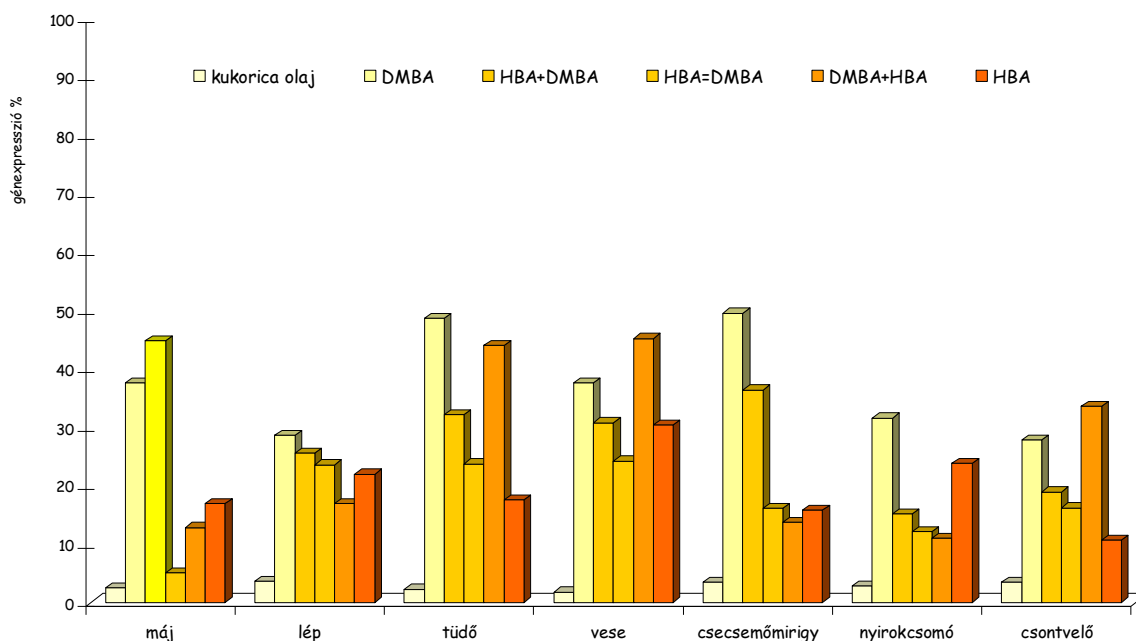
A vad típusú *Trp53* gén expressziós szintjének a meghatározása eldöntené, hogy a *Trp53* gén pontmutációja illetve a LOH jelensége lehet-e az oka karcinogenezisnek. Reese és mtsai. bizonyítékot szolgáltatottak a *Trp53* gén és az AGT enzim szerepére az MNU indukálta limfogenezisben, ezért AGT enzim génexpressziójának és enzim aktivitásának a mérése fontos lenne [80,82,160].

6.3. HBA (E,E-bis-(2-hidroxi-benziliden)-aceton) hatása DMBA indukálta *Hras1* expressziókra

Kísérleti összeállításunkban megvizsgáltuk a HBA hatását DMBA indukálta *Hras1* overexpresszióra CBA/Ca beltényesztett egerek különböző szerveiből (máj, lép, tüdő, vese, *csecsemőmirigy*, csontvelő, nyirokcsomó) izolált mRNS mintázat alapján. A génexpressziókat a karcinogén expozíció után 24 órával határoztuk meg.

A **25. ábra** mutatja az mRNS hibridizációs technikával meghatározott génexpressziókat szervenkénti bontásban.

Eredményeink szerint a DMBA kezelés hatására mindegyik szervben megemelkedett a *Hras1* expresszió, a kukorica olaj-kontrollhoz képest. A HBA kezelés erőteljesen csökkentette a DMBA indukálta *Hras1* expressziót tüdő-, csecsemőmirigy-, és májszövetben. DMBA és HBA együttes adagolása (HBA=DMBA) eredményeképp DMBA-indukálta *Hras1* overexpresszió csökkent a máj, tüdő, vese, csecsemőmirigy, csontvelő, és nyirokcsomó szövetekben, legerőteljesebb hatást a májszövetben tapasztaltunk.



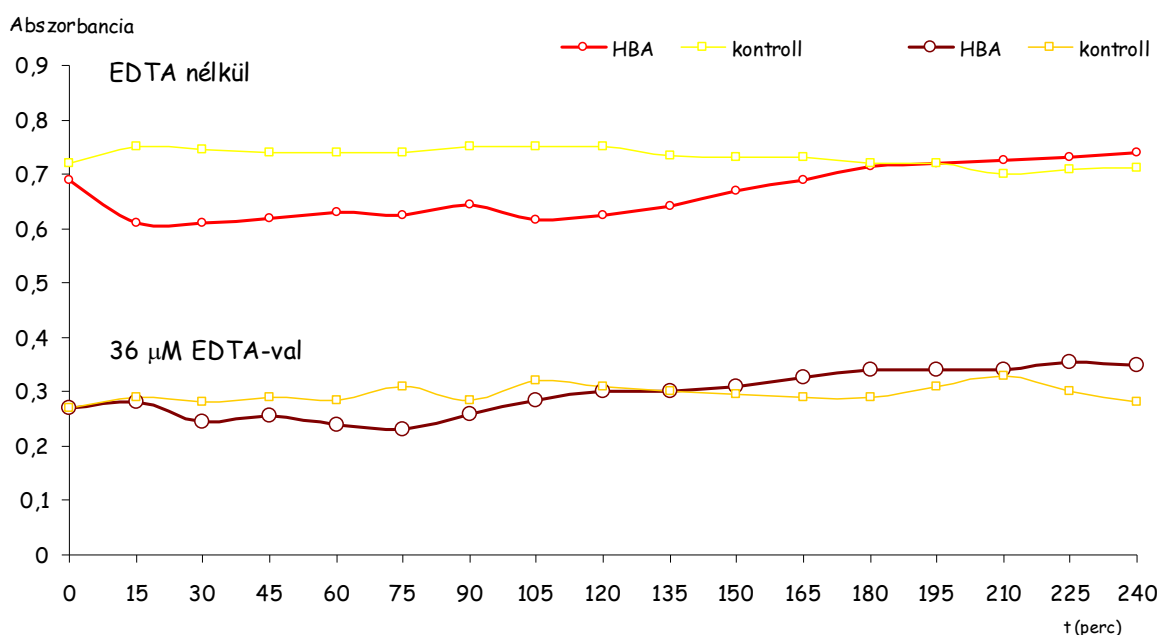
25. ábra: CBA/Ca egerek egyes szerveiben meghatározott *Hras1* génexpressziós mintázat a különböző kezelések hatására

Abban az esetben, mikor a HBA adagolás 24 órával megelőzte a karcinogén expozíciót, a *Hras1* gén alacsonyabb expresszióját mértük a tüdő, vese, csecsemőmirigy, nyirokcsomó és csontvelő szövetekben, a DMBA-val kezelt pozitív kontrollhoz képest. A DMBA expozíció után 24 órával adagolt HBA kezelés hatására is csökkenést tapasztaltunk a pozitív kontrollhoz képest egyes szervekben, ezek a máj, a lép, a csecsemőmirigy, a nyirokcsomó és a csontvelő.

Irodalmi adatok és a vegyület szerkezete alapján feltételeztük, hogy a HBA antioxidáns hatással rendelkezik, ezért elvégeztük a 2-dezoxi-D-ribóz degradációs tesztet, melynek eredményeit a **26. ábrán** ábrázoltuk. Az első 120 percben az antioxidáns kapacitás észlelhető volt, azonban hosszabb inkubációs idő esetén, függetlenül az EDTA adagolástól inkább pro-oxidáns jellegű képet mutatott a HBA.

A *Hras1* gén spontán és kémiai előidézett mutációját hepatocelluláris karcinómában figyelték B6C3F1 egerekben Toftgard és Pelling szintén ennek a génnek overexpresszióját találta a papillóma kialakulás korai szakaszában [166,167,168,169]. Intézetünkben

folytatott kísérletekben bizonyítást nyert, hogy DMBA kezelés hatására 24 óra után az egerek különböző szerveiben a *Hras1* gén overexpresszált [170,171].



26. ábra: A dezoxi-ribóz degradációs teszt eredménye

Ismert, hogy a DMBA karcinogén ágens (iniciátor), belőle szervezetünkben a citokrom p450-es enzimrendszer aktív metabolitokat szintetizál, így ezen korai változtatások a *Hras1* onkogén expresszióban a későbbi daganatképződéssel lehetnek kapcsolatosak [172,173]. A 25. ábrán látható, hogy a HBA befolyásolta a DMBA által okozott génexpresszió változásokat, a HBA adagolás idejétől függően. A szövetek többségében a HBA génexpresszió mérséklő hatását leginkább abban az esetben figyelhetjük meg, amikor a DMBA-t és a HBA-t azonos időpontban adagoltuk az állatoknak (DMBA+HBA).

Hasonló eredményeket tapasztalt egy kutatócsoport egy ciklikus kalkonanalóg vizsgálata során (MBB - E-2-(4'-metoxi-benzilidén)-1-benzoszuberon), ahol szintén a DMBA és a kalkonanalóg vegyület egyidejű alkalmazása során volt megfigyelhető a génexpresszió csökkentő hatás [170,171]. A jelenlegi felfedezés arra utal, hogy hasonlóan az MBB-hez, lehetséges, hogy a HBA is beleavatkozik DMBA metabolikus aktiválásába, amely előfeltétele a vegyület mutációt kiváltó hatásának [172,173].

A HBA karcinogén expozíciót 24 órával megelőző, illetve azt követő adagolása esetén változatos génexpressziós mintázatot kaptunk. 24 órával a DMBA expozíció után adagolt HBA (DMBA+HBA) jelentősen csökkentette a májban, a lépben, a csecsemőmirigyben, és a nyirokcsomóban a DMBA által indukált génexpresszió emelkedést. Ezzel ellentétes mintázatot

tapasztaltunk a vesében és a csontvelőben, a kezelés hatására kissé megemelkedett a génextpresszió.

A *Hras1* gén expresziója hasonló mintázatot mutatott abban az esetben, amikor a HBA kezelést a DMBA expozíciót követő 24. órával alkalmaztuk (HBA+DMBA), mint az egyidejű adagolásnál, azonban máj és a csecsemőmirigy esetén eredményesebbnek tűnik az egyidejű adagolás (HBA=DMBA).

A máj esetében, mindazonáltal a várt csökkenés helyett a *Hras1* expresszió csekély növekedése volt tapasztalható a kontrollhoz képest. Ez a megfigyelés lehetne HBA CYP1A enzim indukáló hatásának a következménye, amely DMBA-növelt metabolikus aktiválásával végződött. Az előző tanulmányok bemutatták több kalcin és egyéb flavonoidok a CYP1A-t gátló hatását [174,175,176].

Másfelől flavonoidok más csoportjáról leírták, hogy CYP1A indukáló hatással is rendelkezhet [177,178]. A jövőben szükség lesz olyan tanulmányokra, melyek igazolják, hogy a HBA melyik osztályba sorolható ezen tulajdonsága alapján.

Feltételezhető, az iniciátor molekulák a fehérjék nagy reakcióképességű SH-csoportjaival kémiai (nem enzimek által katalizált) reakcióba lépnek, így befolyásolva a transzkripció beindulását, mely az elsődleges sejtszintű szenzorok és a II. fázisú enzimekkel kölcsönhatásakor inicializálódik [179].

Ez a reakcióképesség csökkentheti a sejt GSH (glutathion) szintjét *in vivo*, amely hajlamossá teheti a sejteket oxidatív károsodásokra. Így a HBA által indukált GSH deplécióból következő oxidációs károsodás okozhatja a *Hras1* gén overexpresszióját, melyet megfigyelhettünk a májban, a vesében, a nyirokcsomókban és a csontvelőben.

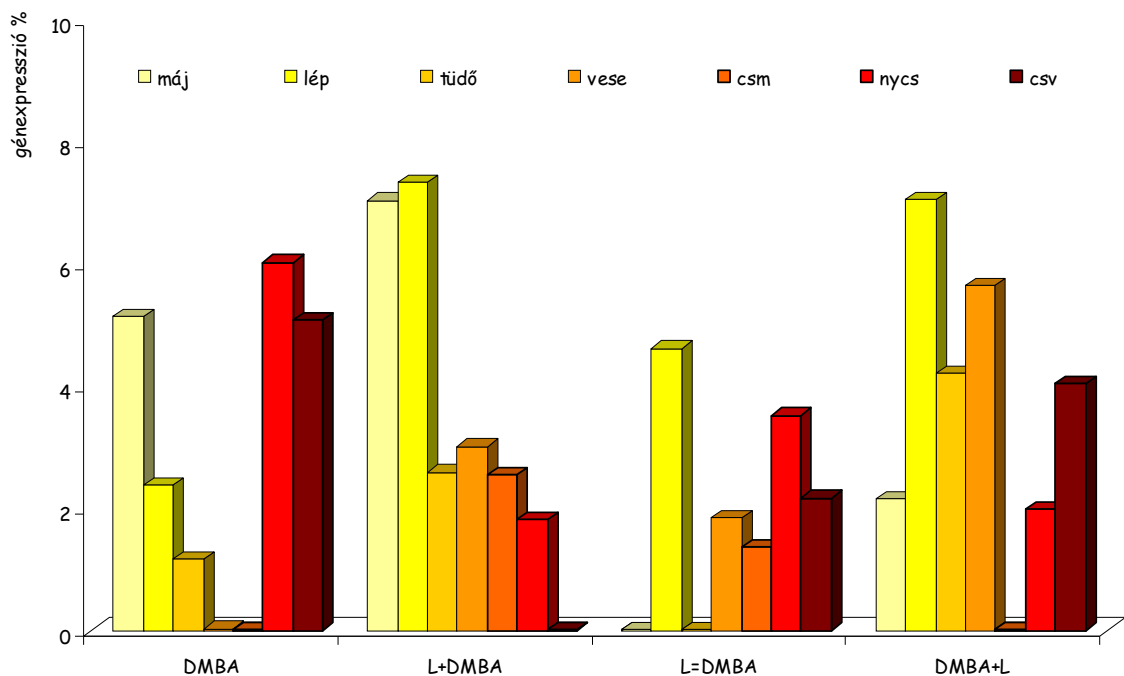
6.4. Rezveratrol és likopin és génextpressziós mintázata

Munkánk során állatkísérletes tesztrendszer segítségével vizsgáltuk két növényi eredetű potenciálisan kemopreventív vegyület, a rezveratrol és a likopin hatását két kulcsgén - *Trp53* tumor szuppresszorgén, és *Hras1* gén - karcinogén által indukált expresszió-változására. A kísérleti összeállításunkban használt genotoxikus vegyület, a 7,12-dimetilbenz(a)antracén (DMBA) kátrányban, dohányfüstben, többször melegített sütésre használt olajokban található meg. A DMBA kísérleti állatokban többek között szarkómát, emlő karcinómát és leukémiát okoz.

Kísérleteink során a DMBA, mint mutagén vegyület hatását ismerve génextpresszió-növekedést indukáltunk CBA/Ca H-2^k haplotípusú kísérleti egerekben, majd az antioxidáns vegyületek -

likopin, rezveratrol - feltételezett kemopreventív hatását tanulmányoztuk. Ezen vegyületeket a DMBA kezelés előtt 24 órával, a DMBA kezeléssel egyidőben, valamint a karcinogén expozíció után 24 órával oltottuk a kísérleti állatok hasüregébe. A kezelést követő 24. órában cervicalis dislocáció-t követően a kísérleti állatok szerveiből izolált összes mRNS-ből meghatároztuk a *Hras1* és *Trp53* gén expressziós profilját.

Az 27. és 28. ábrán a likopinnal, mint potenciális kemopreventív szerrel folytatott kísérleteink eredménye látható. Vizsgáltuk a génexpresszió mértékét DMBA adagolás hatására - pozitív kontroll -, abban az esetben, mikor a likopin oldattal 24 órával a DMBA kezelés előtt oltottuk a kísérleti állatokat (L+DMBA), a karcinogén kezeléssel egy időben (L=DMBA), valamint a 24 órával a DMBA-val való kezelés után adagolt likopin hatására (DMBA+L).

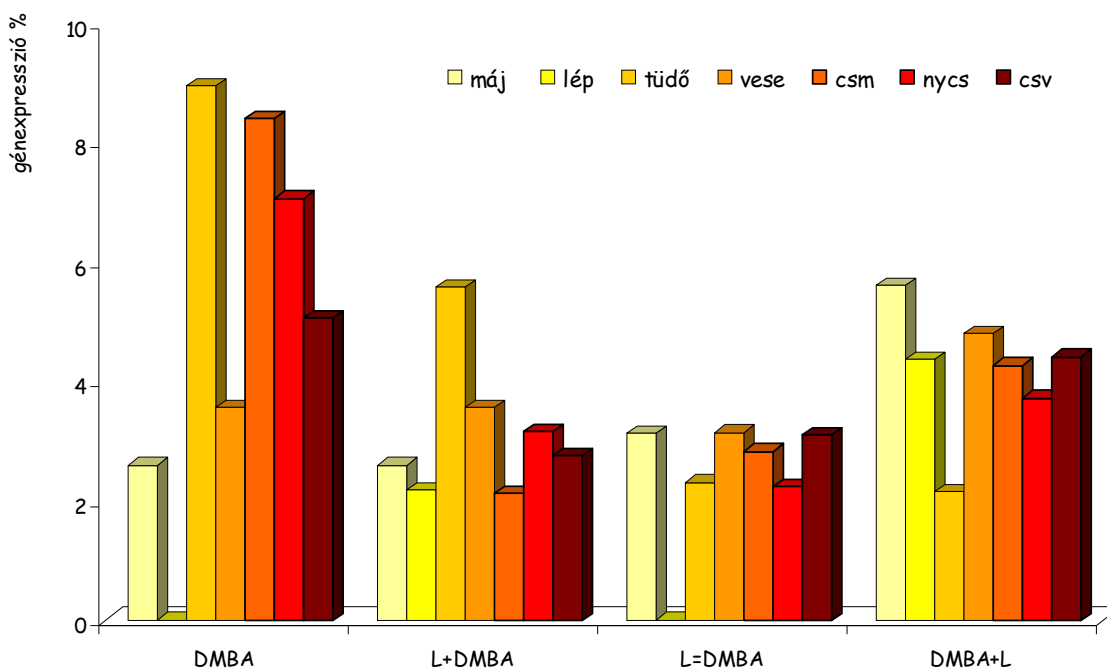


27. ábra: Likopin hatására kialakult génexpressziós mintázat CBA/Ca egerek egyes szerveiben (*Hras1* oncogén)

A *Hras1* gén elemzése során három szervet emelnék ki a nyirokcsomót, csontvelőt és tüdőt melyek esetén alacsonyabb szöveti génexpressziót mértünk mindhárom kísérleti csoportban (27. ábra). Kezelésünk abban az esetben volt a leghatásosabb, ha 24 órával a DMBA expozíció előtt adagoltuk a vizsgált vegyületet. Az ábrán látható, hogy a többi vizsgált szerv esetén is a likopint előkezelésként alkalmazva - 24 órával a karcinogén expozíció előtt - nagyobb expresszió-különbséget tapasztaltunk a DMBA-t kapott kontrollhoz képest. Ez alól a májszövet a kivétel, ahol akkor tapasztaltunk alacsonyabb génexpressziót, amikor a

genotoxikus anyag a likopinnel együtt került a szervezetbe, illetve a kemopreventív anyaggal történő kezelés után 24 órával.

Egyes szövetekben (csontvelő, nyirokcsomó, tüdő) a likopin a *Trp53* expressziót visszaszorította, mindhárom kísérleti csoportban (28. ábra; L+DMBA, L=DMBA, DMBA+L). Hasonlóan a *Hras1* expressziós profilhoz, a többi vizsgált szerv esetén a *Trp53* gén expressziójára is a karcinogén kezelés előtt 24 órával adagolás hatott legerőteljesebben.

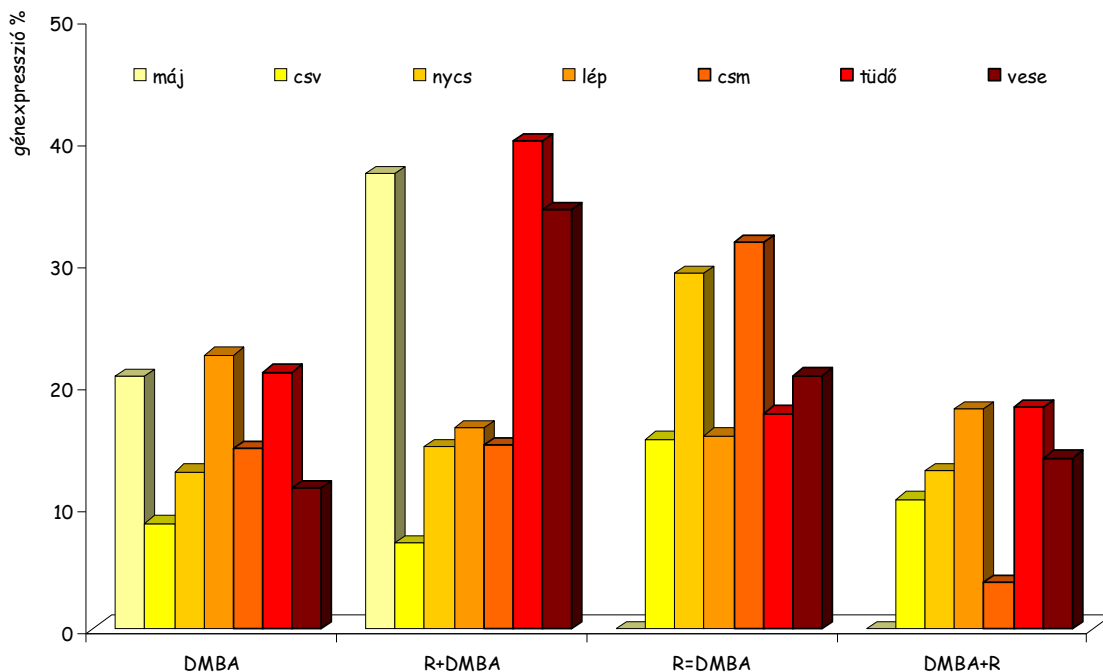


28. ábra: Likopin hatására kialakult génexpressziós mintázat CBA/Ca egerek egyes szerveiben (*Trp53* tumor szuppresszor gén)

A rezveratrollal folytatott kísérleteink eredményeit 29. és 30. ábra szemlélteti.

A *Hras1* onkogén vizsgálata során tapasztaltuk (29. ábra), hogy a DMBA hatására megemelkedett mRNA szint a májban még magasabb értéket mutatott abban az esetben, ha a rezveratrol adagolást 24 órával a karcinogén kezelés előtt végeztük, azonban ugyanezen szerv génexpressziós szintje a mérhetőség határát súrolta abban az esetben, mikor a karcinogén kezeléssel egyidőben, vagy 24 órával az expozíció után oltottuk a vizsgálati anyaggal az állatokat. Csontvelő és nyirokcsomó esetén a DMBA-hoz képest emelkedett szintet láttunk DMBA és rezveratrol egyidejű adagolása mellett, és az utólagos kezelés esetén, azonban csökkent génexpressziót tapasztaltunk 24 órával a karcinogén kezelés előtt rezveratrollal oltott egerek esetén. Az ábrán látható, hogy a rezveratrol hatása a karcinogén expozícióval egyidőben nem kifejezett, egyes szervekben a 24 órával korábbi kezelés, másokban az utókezelés volt génexpresszió csökkentő hatással.

A *Trp53* gén vizsgálata esetén a DMBA hatására megemelkedett mRNA szintek tovább emelkedtek a csontvelőben és nyirokcsomóban a rezveratrol előzetes (R+DMBA) és azonos idejű (R=DMBA) adagolása mellett (30. ábra).

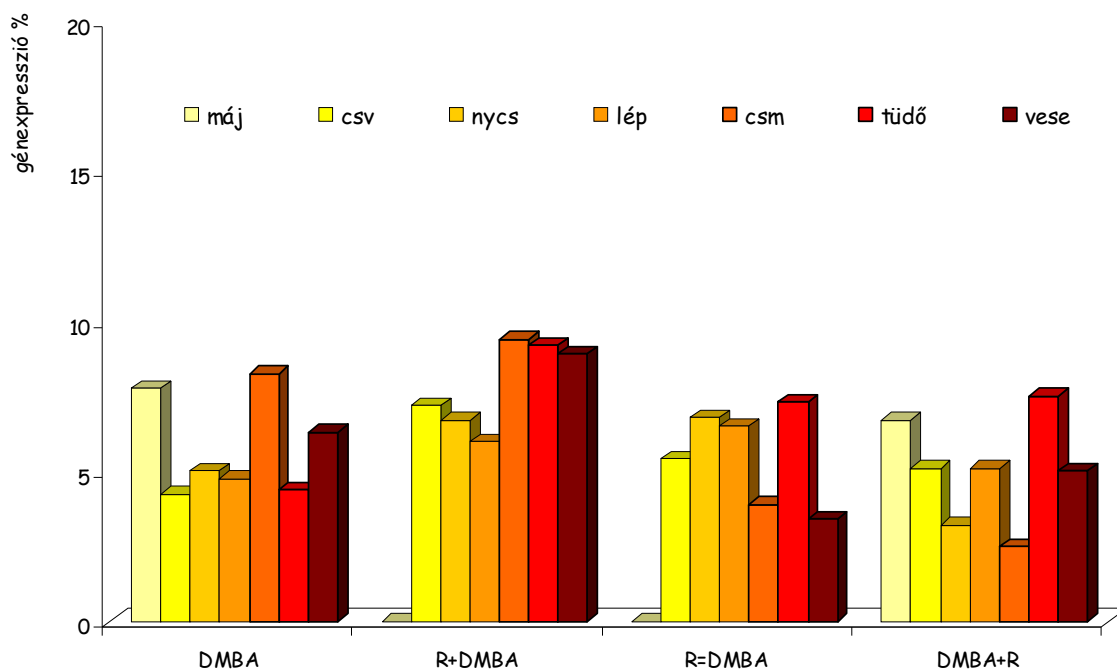


29. ábra: Rezveratrol hatására kialakult génexpressziós mintázat CBA/Ca egerek egyes szerveiben (*Hras1* onkogén)

A DMBA kezelés után 24 órával rezveratrollal kezelt egerek nyirokcsomójában alacsonyabb génexpressziót tapasztaltunk, mint csak karcinogén expozíció esetén, a csontvelőben pedig kissé megemelkedett mRNA koncentrációt mértünk.

A kísérleti állatok májszövetében a *Trp53* mRNA koncentráció a DMBA kezelés hatására mutatta a legmagasabb értéket. A rezveratrol expozíció előtti és azzal egyidőben történő adagolása esetén is csökkent *Trp53* mRNA szintet mértünk, az utókezelés hatására (DMBA+R) magasabb expressziót tapasztaltunk, amely azonban nem érte el a pozitív kontroll esetén mért értéket. További szövetekben a *Trp53* mRNA-e alacsonyabb koncentrációban volt jelen a DMBA és rezveratrol egyidejű adagolása mellett, valamint abban az esetben, ha a rezveratrolt 24 órával a karcinogén kezelés után alkalmaztuk a kísérleti állatoknál.

Likopinrel folytatott kísérleteink szerint a DMBA iniciálta génexpresszió növekedést a kísérleti vegyület előzetes adagolása szorította vissza, mindkét gén - *Hras1* és *Trp53* gén - esetén.



30. ábra: Rezveratrol hatására kialakult génexpressziós mintázat CBA/Ca egerek egyes szerveiben (*Trp53* tumor szuppresszor gén)

Rezveratrol vizsgálatokor egyes szervekben változó *Hras1* mRNA koncentráció mintázatot találtunk. Nem kaptunk minden egyes szervre általánosan jellemző expressziós profilt, így nem határozható meg egyértelműen a hatás. A *Trp53* gén esetén azonban a szervek többségében a *Trp53* mRNA mennyisége kisebb volt azokban az esetekben, amikor a rezveratrol adagolás a karcinogén kezelés előtt ill. után 24 órával történt.

Kísérleteink szerint tehát a *likopin* mindkét gén - *Hras1* onkogén és *Trp53* tumor szuppresszor gén - expresszióját csökkentette, a rezveratrol főleg a *Trp53* gén-re hatott. Ezen különbségek a vegyületek hatásmechanizmusának különbözőségéből adódhat.

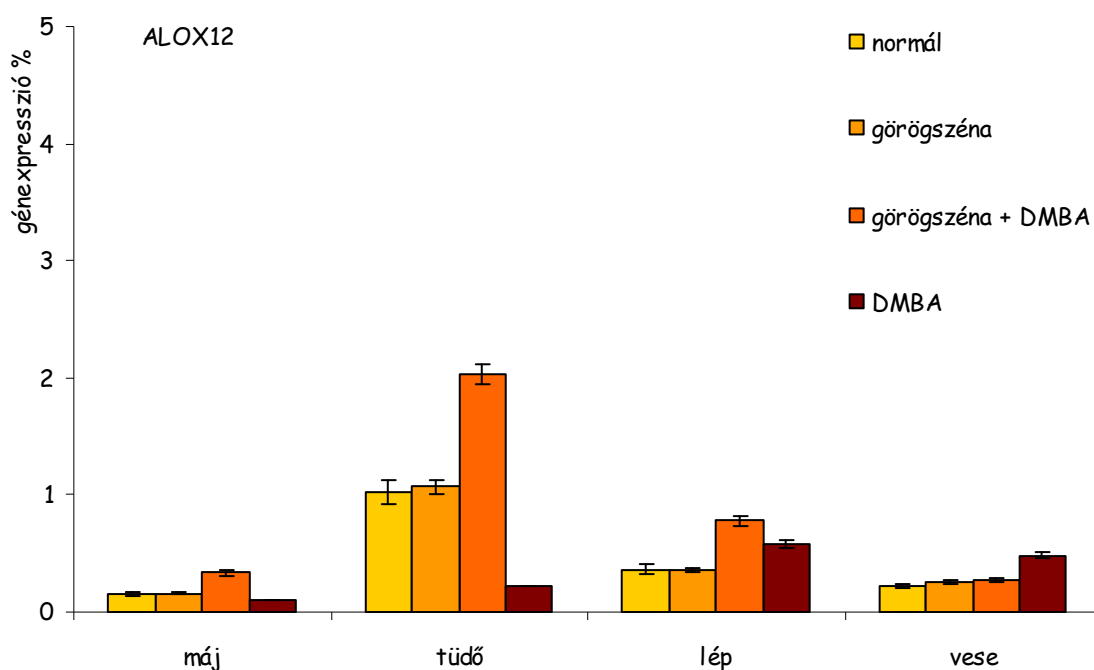
6.5. Görögszéna hatása, az arachidonsav metabolizmus enzimeire *in vivo* állatkísérletben (*ALOX*, *COX*)

Ezután munkacsoportunk a Közel-keleten és Indiában is közkedvelt fűszernövény, a görögszéna magjának hatását vizsgálta állatkísérletes modellen.

Az arachidonsav metabolizmus enzimeinek génexpressziós mintázatát speciális, görögszénamag őrlemény tartalmú tápot fogyasztó, karcinogén expozíciónak kitett AKR/J H-2^k egerek egyes szerveiben meghatározott mRNA expressziók alapján határoztuk meg. Vizsgálatunk célja volt, hogy a szaponin és szapogenin tartalmú görögszéna kemoprevenációs hatását bizonyítsuk, alátámasztva az irodalomban közölt adatokat.

Az arachidonsav metabolizmusban és a prosztaglandin bioszintézisben szerepet játszó enzimek mRNA szintű expressziós profilja a **31-35. ábrán** látható.

A **31. ábrán** az arachidonát-12-lipoxigenáz (*ALOX12*) génexpressziós mintázatát ábrázoltuk máj, tüdő, lép és vese szövet esetén. A diagramon látható, hogy a görögszénát fogyasztó egerek szöveiben nem módosult a génexpresszió a normál tápot fogyasztó kontroll csoporthoz képest, azonban a májban, a tüdőben és a lépben megemelkedett az *ALOX12*-mRNA szint a DMBA expozíciónak kitett görögszénás diétán tartott egerek esetén. A vese szövetben tapasztaltuk, hogy a DMBA hatására megemelkedett expressziót a görögszéna tartalmú táp visszاسzorította a normál szintre.



31. ábra: Arachidonát-12-lipoxigenáz (*ALOX12*) génexpressziós mintázata AKR/J egerek különböző szerveiben.

Az *ALOX15* (arachidonát-omega-6-lipoxigenáz) génexpresszióját mind a négy vizsgált szövetben a karcinogén expozíció megemelte, a görögszéna tartalmú diétán tartott és DMBA-val kezelt egerek máj, tüdő és vese szövetében a normál szinten lévő mRNA koncentrációt mértünk (**32. ábra**).

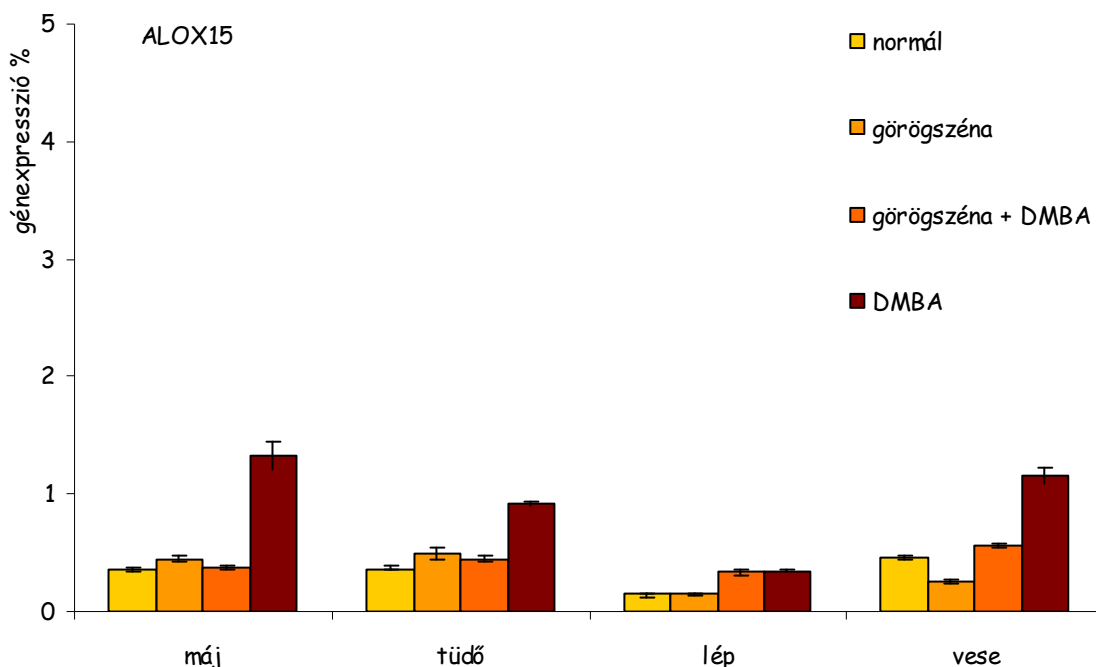
A **33. ábrán** az arachidonsav metabolizmus kulcs enzimjének (*ALOX5* arachidonát-5-lipoxigenáz) génexpressziós mintázatát láthatjuk. A kísérleti egerek szöveiből izolált mRNA alapján meghatározott génexpressziós profil szerint a karcinogén expozíció 2,5-4-szeresére emeli a génexpressziókat (a tüdő kivételével), azonban a görögszéna inhibíciós hatását csak a máj és a vese szövetben detektáltuk.

A prosztaglandin-bioszintézisben szerepet játszó *COX1* enzim (ciklooxygenáz 1 vagy prosztaglandin-endoperoxidáz-szintáz 1) mRNA szintű expressziója a **34. ábrán** látható.

A lép kivételével génextpresszió emelkedést tapasztaltunk DMBA kezelés hatására, a görögszéna tartalmú tápot fogyasztó egerek szöveteiben a karcinogén expozíciótól függetlenül visszaszorított génextpressziót mértünk.

A *COX2* (ciklooxygenáz 2 vagy prosztaglandin-endoperoxidáz-szintáz 2) génextpressziós profilja mutatja (**35. ábra**), hogy a DMBA hatására megemelkedett *COX2* expresszió görögszéna hatására visszaszorul mind a négy vizsgált szövetben.

A linolénsav és az arachidonsav lipoxigenázok általi metabolizmusa egy metabolikusan aktiválódott termékhez vezet, mely szerepet játszhat a karcinogenezisben.



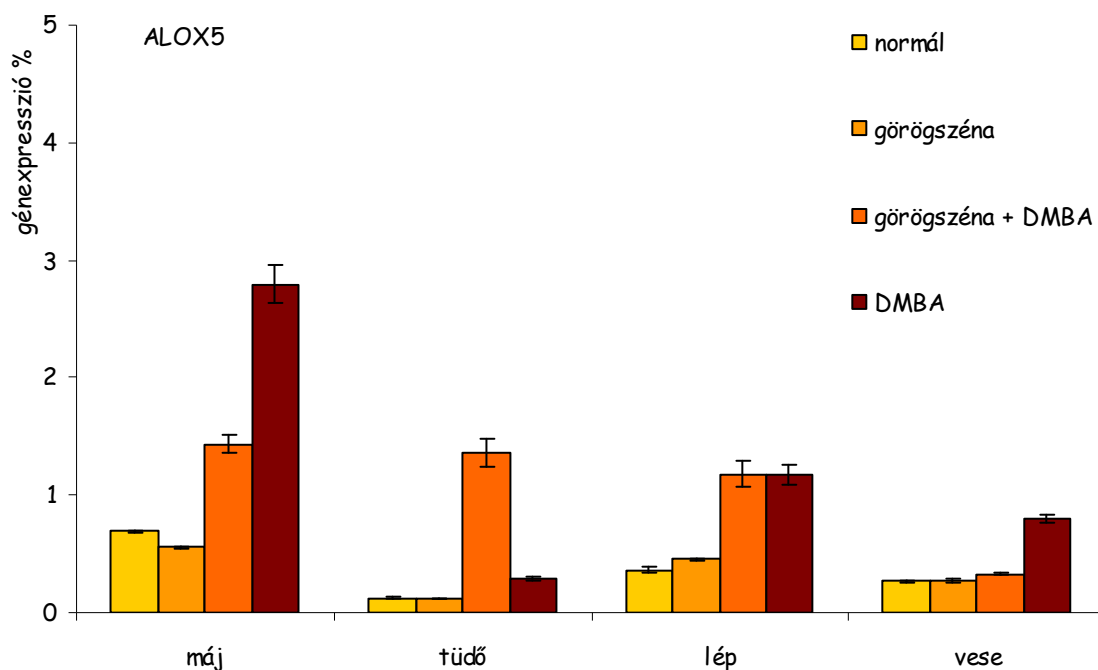
32. ábra: Arachidonát-omega-6-lipoxigenáz (*ALOX15*) génextpressziós mintázata AKR/J egerek különböző szerveiben.

ALOX5 (5-lipoxigenáz) az arachidonsavat 5(S)-HETE-vá alakítja (5(S)-hidrox-eikozatetraenolsav), mely tovább konvertálódik leukotrinekké. A karcinogenesisben játszott szerepét bizonyítja, hogy többek között prosztata és tüdőrák sejtvonalakban megemelkedett *ALOX5* és FLAP (5-lipoxigenase-activating protein) mRNA expressziót tapasztaltak, valamint az 5(S)-HETE képződés gátlása illetve aktiválása visszaszorította illetve növelte a prosztata daganat sejtek növekedését [180,181,182].

Több bizonyíték alapján feltételezhetjük, hogy az *ALOX12* terméke, a 12(S)-HETE (12(S)-hidrox-eikozatetraenolsav) is közreműködik karcinogenesisben [182]. *ALOX12* mRNA és

fehérje overexpressziót mértek prosztatata, melanoma, és más rák sejtvonalakban [183,184]. Az enzim a daganat sejtekben termel 12(S)-HETE-t, mely elősegíti a tumorgenezis több lépését, mint invázió és metasztázis [183].

ALOX15 jelentősége a többszörösen telítetten zsírsavak lebontásában van. Elsődleges szubsztrátja a linolénsav és az arachidonsav, terméke a 13(S)-HODE (13(S)-hidroxioktadecadienolsav) mely elősegíti a sejtproliferációt [183]. Tapasztalták, hogy ha megemelkedik a 13(S)-HODE dehidrogenáz aktivitása, mely a 13(S)-HODE-t 13-oxo-oktadecadienolsavvá bontja, csökken a kolon-epiteliális sejtek malignus átalakulása [183].

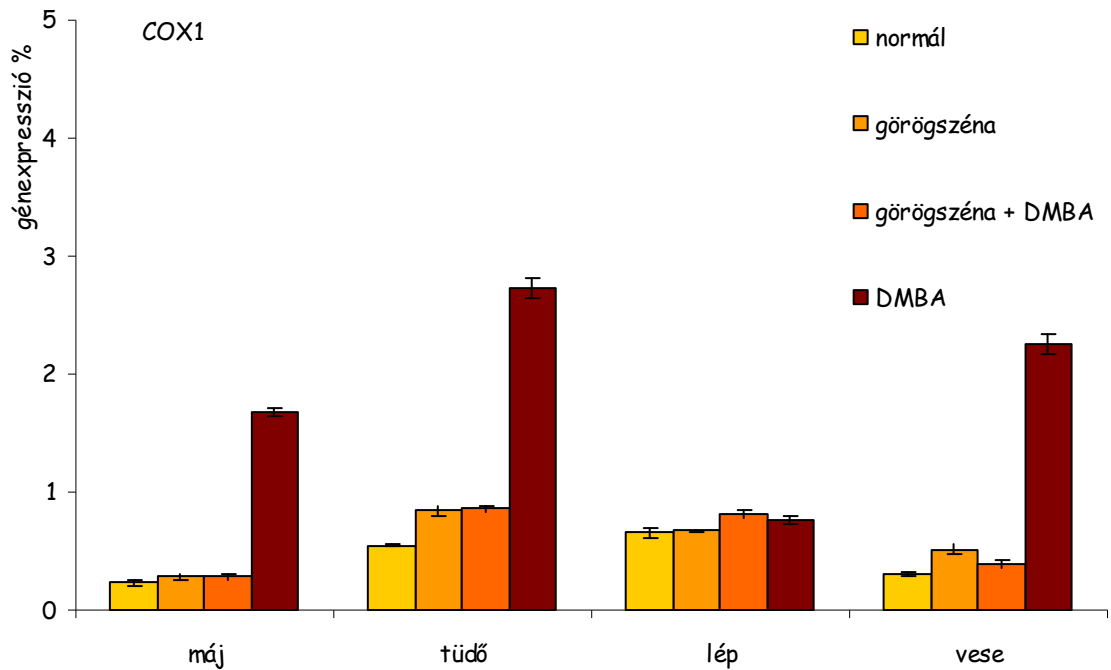


33. ábra: Arachidonát-5-lipoxigenáz (*ALOX5*) géneexpressziós mintázata AKR/J egerek különböző szerveiben.

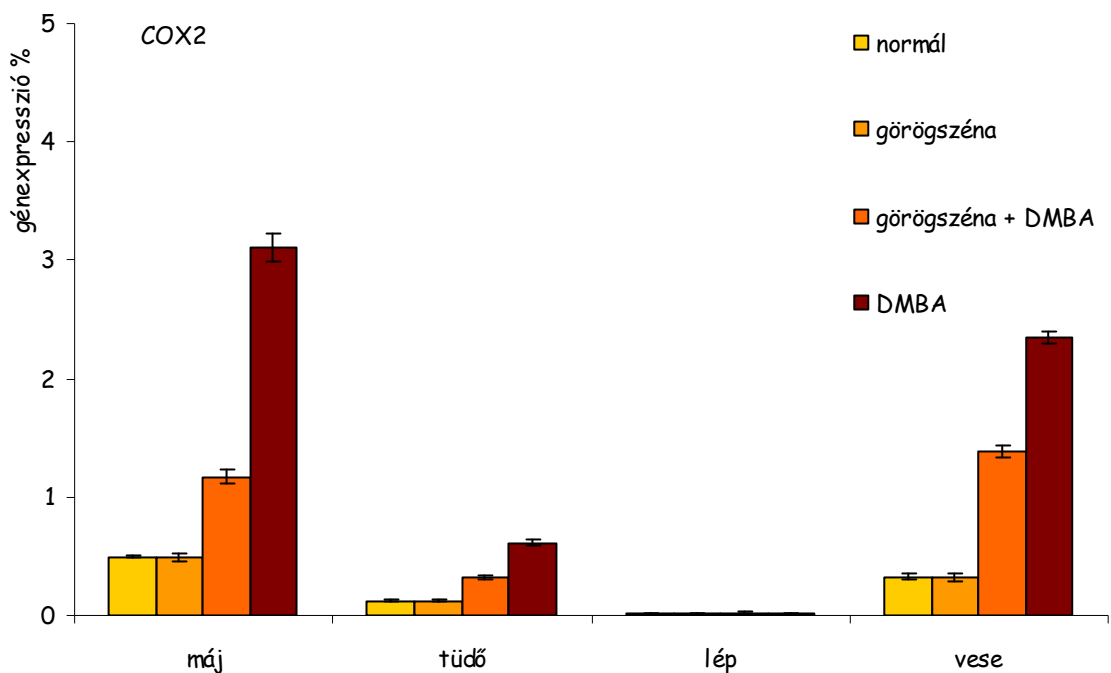
COX1 és COX2 a két izoformája a ciklooxygenázoknak [185,186]. E két enzim katalizálja az arachidonsav konverzióját eikozanoidokká, mely köztterméke a prosztaglandin, valamint a tromboxán képződésnek. A COX1 izoforma által szintetizált prosztaglandin szükséges a normál gyomor- bélrendszer sejtvédelem fiziológiás funkcióinak ellátásához. COX2 legtöbb normál szövetben nem mutatható ki, képződése gyulladásokra lokalizálható, citokinek, növekedési faktorok, tumor promóterek és egyéb ágensek hatására. Mindkét enzim katalizálja a prosztaglandin E₂ (PGE₂) képződését, melynek megemelkedett szintje pozitív korrelációt mutat a tumorgenezissel [14,185,187,188].

Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a vese szövetben a DMBA hatására megemelkedett *ALOX12*-mRNS szint expresszióját a görögszéna tartalmú táp (a tüdőt kivéve)

visszaszorította a normál szintre. Az *ALOX15* géneexpresszióját mind a négy vizsgált szövetben megemelte a karcinogén expozíció, a görögszéna tartalmú diétán tartott egerek máj, tüdő és vese szövetében a normál szinten lévő mRNA koncentrációt mértünk.



34. ábra: Prostaglandin-endoperoxidáz-szintáz 1 (ciklooxigenáz 1 - *COX1*) géneexpressziós mintázata AKR/J egerek különböző szerveiben.



35. ábra: Prostaglandin-endoperoxidáz-szintáz 2 (ciklooxigenáz 2 - *COX2*) géneexpressziós mintázata AKR/J egerek különböző szerveiben.

Hasonló eredményeket kaptunk az arachidonsav metabolizmus kulcs enzimjének (*ALOX5*) vizsgálata során is [129,131,132].

A prosztaglandin bioszintézisben szerepet játszó gének (*COX1, COX2*) expresszióját is csökkentette a görögszéna tartalmú táp fogyasztása.

Eredményeinket más kutatók sejtvonalakon végzett kísérleteivel összevetve megállapíthatjuk, hogy a görögszéna biológiailag aktív komponensei képesek az arachidonsav metabolizmus gátlásán keresztül kemopreventív hatást kifejteni.

A keleti gyógyászatban évszázadok óta alkalmazott gyógynövények hatásainak tudományos bizonyítása ma már a modern orvos-biológiai kutatások feladata. Munkacsoportunk által vizsgált gyógynövény, fűszernövény, a görögszéna leveleinek és magjának fogyasztását a tradicionális keleti gyógyászatban javasolják cukorbetegség, gyulladással járó megbetegedések, gastrointesztinális megbetegedések esetén [129,130]. Több irodalmi adat is született a különböző kivonatainak, egyes komponenseinek tumorelles hatásáról, melyet e tanulmány eredményei is alátámasztanak.

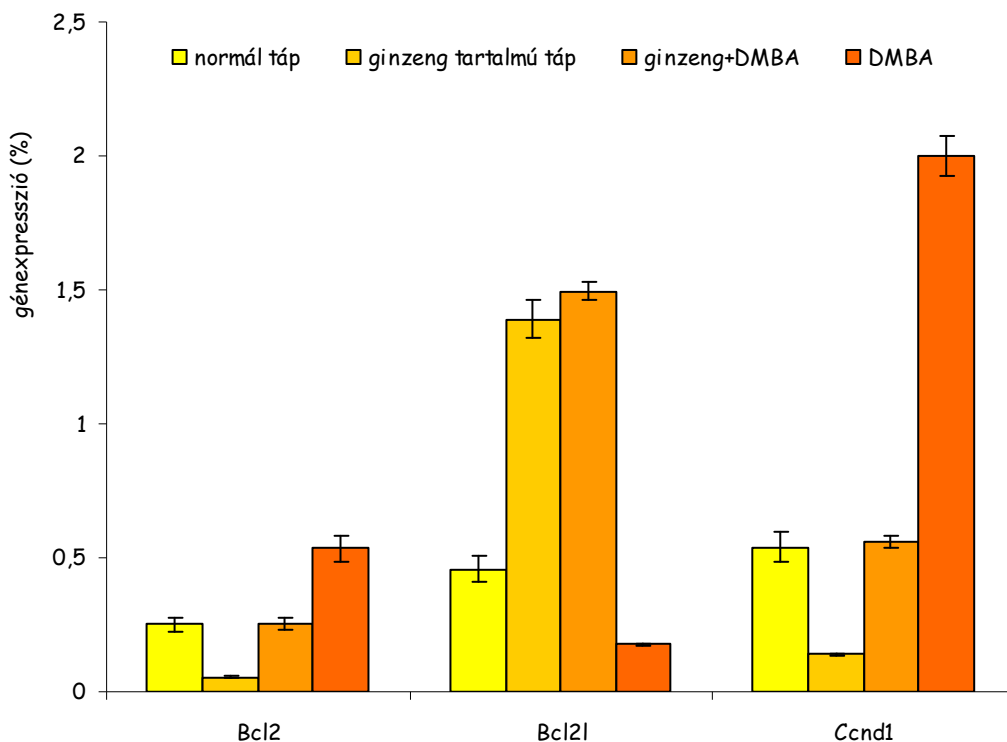
Az étrendünkbe bevezetett magas szaponin tartalmú görögszéna kellemes íze mellett a tumorkialakulás elleni védekezési stratégiánk kiegészítője is lehet.

6.6. Ginzeng tartalmú táplálék apoptotikus hatása *in vivo* állatkísérletben

Intézetünkben kidolgozott rövid távú (short-term) állatkísérletes modellben vizsgáltuk a ginzeng tartalmú tápot fogyasztó egerek génexpressziós mintázatát, DMBA, mint karcinogén expozíció mellett. Célunk volt meghatározni a ginzeng szerepét az apoptózis szabályozásában, egyes kulcsgének (*Bcl2, Bcl2l1, Ccnd1*) expressziós mintázatának feltérképezésén keresztül.

Eredményeinket szervenként négy oszlopdiagramban ábrázoltuk (36–41. ábra). Az 36. ábrán a kísérleti egerek májszövetéből meghatározott génexpressziós mintázat látható. A *Bcl2* gén expressziója a ginzeng tartalmú tápon tartott egerek esetén kb. 20%-a a normál tápon tartott egerek génexpressziójához képest. A ginzeng tartalmú tápot fogyasztott és DMBA kezeléssel átesett egerek májában hasonló génexpressziót mértünk mint, a normál tápon tartott egereknél, DMBA kezelés után 24 órával fokozott *Bcl2* génexpressziót mértünk.

Bcl2l1 gént vizsgálva látható, hogy a kontroll csoporthoz képest a ginzeng tartalmú tápon tartott, valamint DMBA kezeléssel átesett ginzeng-fogyasztó csoport mája háromszoros expressziót mutat, a DMBA kezelt egerek génexpressziója kb. 35 % a kontroll csoporthoz képest.



36. ábra: AKR/J egerek génexpressziós mintázata májszövetben

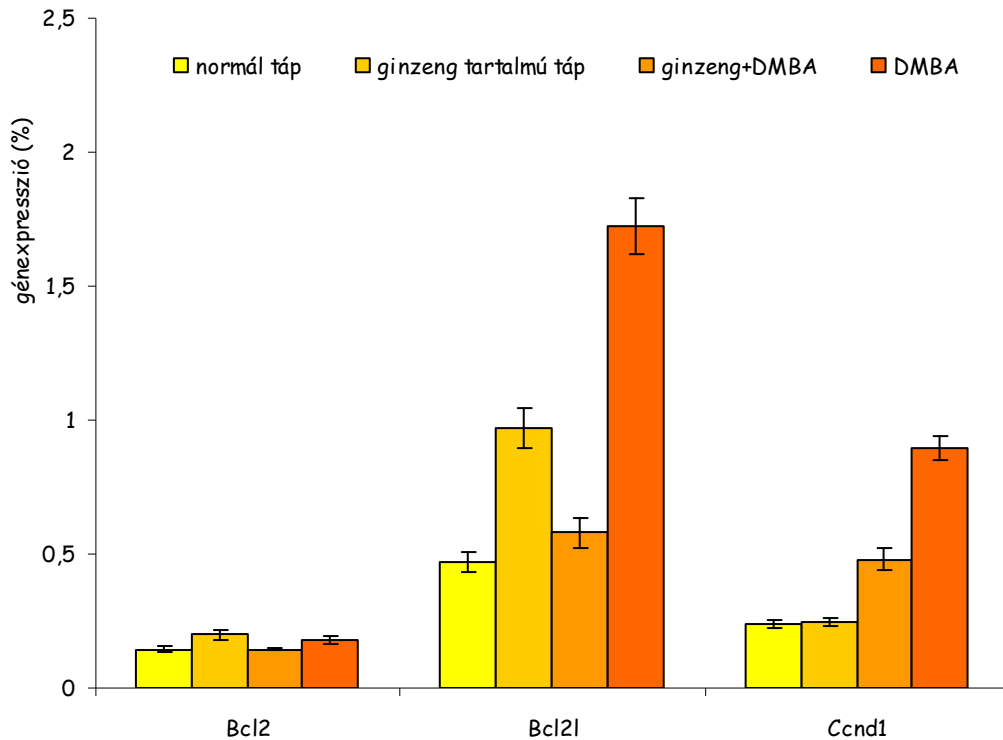
A *Ccnd1* gén expressziós mintázata *Bcl2* généhez képest hasonló képet mutat, **DMBA hatására kiugró génexpressziót mértünk, amelyet a ginzeng visszaszorított.**

A 37. ábrán a tüdőszövet génexpressziós mintázatát ábrázoltuk. A *Bcl2* gén mind a négy csoportban hasonló expressziót mutatott, a *Bcl2l1* gén expresszióját mind a ginzeng, mind a DMBA megemelte, együttes hatás esetén azonban a normál szint közeli értéket mutatott. *Ccnd1* gén a normál és a ginzeng tartalmú tápot fogyasztó egerek esetén hasonló génexpressziót mutatott, míg a karcinogén expozíciónak kitett egerek tüdőszövetében fokozott expressziót mértünk.

Lép esetén hasonló mintázatot találtunk mindhárom génre (38. ábra), mint a tüdő szövetben. A vese génexpressziós mintázatát mutató ábrán (39. ábra) láthatjuk, hogy az antiapoptotikus gének expresszióját a DMBA megemelte a normál körülmények között tartott egyedek expresszióihoz képest, azonban a ginzeng tartalmú táp visszaszorította az expressziót, ezzel elősegítheti az apoptózist.

A *Ccnd1* expresszió nem mutatott jelentős különbséget a veseszövetben a különböző kísérleti csoportba tartozó egerek esetén.

Az élelmiszereinkben előforduló bioaktív komponensek szabályozhatják az apoptózisban részvevő fehérjéknek (BCL2, BCL2L1, BAX, BAK) a sejten belüli lokalizációját, kezdeményezik a citokrom C kibocsátását a mitokondriumból.



37. ábra: AKR/J egerek géneexpressziós mintázata tüdőszövetben

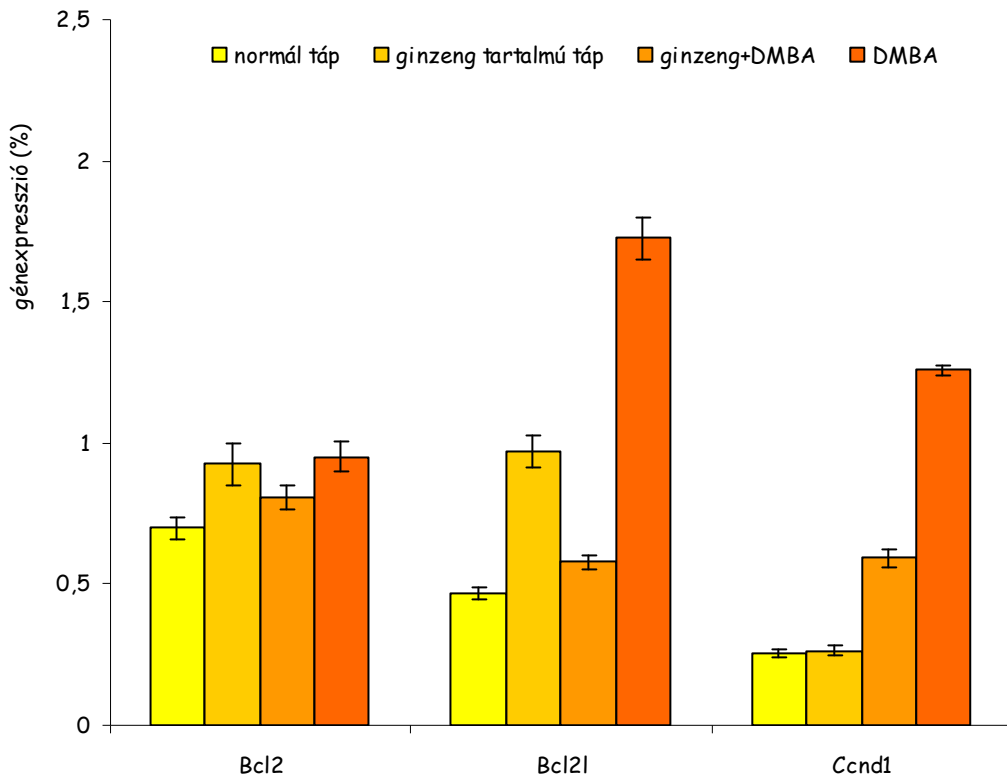
A kurkumin, mely egy fűszernövény, a kurkuma egyik alkotórésze, tumorsejtekben visszасzorította a Bcl2 és Bcl2l1 antiapoptotikus fehérjék képződését, ezáltal indukálva apoptózist. Egy másik vegyületről, a genisteinről (mely vegyületet a szója tartalmaz) kimutatták, hogy szabályozza a Bcl2/Bax proapoptotikus mechanizmust, a Bcl2 foszforilációja növekedik, így növekedik a Bax proapoptotikus gén expressziója, a csökkentett Bcl2 antiapoptotikus fehérje expresszió teszi lehetővé a programozott sejthalált [189].

A ginzeng tumor-kemoprevenziós hatását epidemiológiai tanulmányok bizonyították [190, 191]. Eset-kontroll vizsgálatok bizonyítják, hogy a ginzeng-fogyasztók körében szignifikánsan alacsonyabb a tumor kialakulás esélye, mint a ginzenget nem fogyasztók körében [190,191,192,193,194]. Készült követéses vizsgálat is a ginzeng tüdőrák megelőző hatásáról is dohányzók körében, és kedvező tapasztalatokról számoltak be [112].

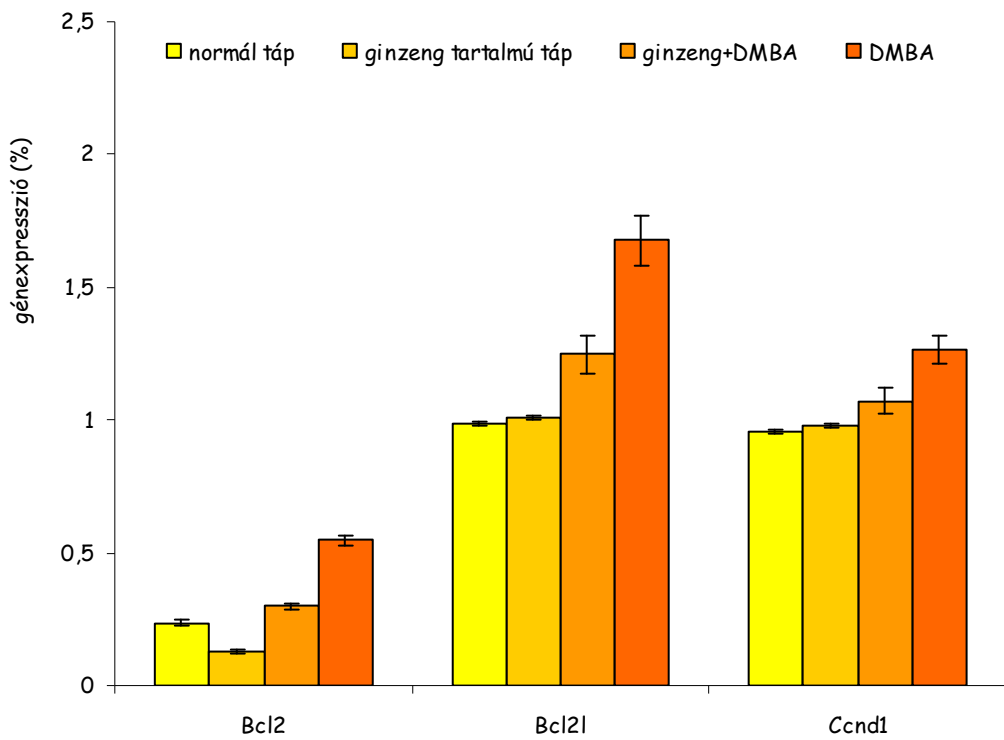
Az apoptózis-indukció lehet az alapja a ginzeng és vegyületei által tapasztalt kemoprevenziós hatásnak.

Kim és mtsai., valamint Chen és mtsai. a ginzeng gyökér antiapoptotikus hatásáról számolnak be. a ginzeng gyökér kivonata csökkentette a MPP+ indukálta apoptózist PC12 sejtekben, valamint az Rg1 ginzénózid védő hatását tapasztalták MPTP-vel aktivált apoptózis esetén egér „substantia nigra”-ban. A ginzeng antiapoptotikus hatását a Bcl2 és a Bcl2l1 expresszió

erősítésében és a *Bax* és a *Nos* expressziójának csökkentésében, a gátolt kaszpáz 3 aktiválásban látják [195, 196].



38. ábra: AKR/J egerek génextpressziós mintázata lépészövetben



39. ábra: AKR/J egerek génextpressziós mintázata veseszövetben

Sejtvonalakat vizsgáló tanulmányokban kimutatták, hogy az Rh1 és az Rh2 szerepet játszik a sejtdifferenciálódás szabályozásában, a ginzeng gátolta a sejtproliferációt, az Rb2 panaxadiol gátolta az angiogenezist és a metasztázis képződését. A „K” vegyületről kimutatták hogy gátolta a sejtproliferációt a p27 expressziójának növelésével, és a *Myc* és a *ciklin D1* expressziójának csökkentésével [196].

„Short-term” teszt-rendszerünkben végzett vizsgálataink szerint, az AKR/J-H2^k beltenyésztett egerek szerveiből izolált mRNS expressziós mintázata alapján a ginzeng tartalmú táp valószínűleg kemopreventív hatású. A máj, tüdő és lép szövetben a *Ccnd11* expresszió csökkent volt a DMBA-val kezelt csoportban mért értékekhez képest. Az apoptózis regulációjában szerepet játszó *Bcl2* gén a máj és vese szövetben alacsony expressziót mutatott a speciális tápot fogyasztó egerek esetén, és *Bcl2l1* gén a tüdőben és a lépben volt alulexpresszált. Irodalmi adatokkal ellentétben állatkísérletes modellünk a ginzeng gyökér tartalmú táp apoptózis indukáló hatását bizonyítja, mely egy lehetséges mechanizmusa a kemoprevenciónak.

A *Panax ginzeng* a ginzengek közül a leggyakrabban kutatott, és a tradicionális távol-keleti gyógyászatban leggyakrabban használt faj. A *Panax ginzeng*, mely Kínából származik, de használják Koreában, Oroszországban is, hagyományos kínai gyógyászatban fontos gyógynövény volt, számos betegségre használták több ezer éve, elsősorban gyengeségre és fáradtságra [31]. A modern táplálkozástudomány feladata, hogy felhívja az emberek figyelmét az egészséges táplálkozásra, a tápanyag összetevők helyes megválasztására. Eredményeink és az irodalmi adatok előrevetítik a ginzeng tartalmú élelmiszerek, étrend-kiegészítők, fogyasztásának hatékonyságát a daganatos betegségek megelőzésében.

Közeli cél a hosszú távú („long-term”) kísérletek elvégzése, melyekkel bizonyíthatjuk a ginzeng definitív kemopreventív hatását az alkalmazott molekuláris epidemiológiai biomarkerek segítségével, hasonlóan a korábbi kísérletekhez.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A fejlett országokban a mortalitási statisztikákban a daganatos megbetegedések a második helyet foglalják el a keringési rendszer betegségei mögött. A kor szerint standardizált mutatók szerint nők esetén már a '70-es években is, a férfiak esetében a '80-as évektől Magyarország vezet a halálzási statisztikákat. Míg Európában folyamatos stagnálás illetve a daganatos halálzások enyhe csökkenése tapasztalható, hazánkban - különösen a férfiak esetén - csak a '90-es években mérséklődött a mortalitás emelkedésének üteme. A daganatos betegségek okozta mortalitás/morbiditás Magyarországon súlyos társadalmi problémát okoz több évtizede. Az Országgyűlés ugyan elfogadta 2003. április 7-én a legújabb Népegészségügyi Programot, ennek ellenére Magyarországon a prevenció finanszírozása jelenleg legfeljebb 1-2%-a az OEP összköltségvetésének mely elsősorban a szekunder prevencióra vonatkozik, a primer prevenció anyagi támogatottsága lényegében nem megoldott. A disszertáció kapcsán szeretnék rámutatni a primer prevenció fontosságára, ezen belül a kemoprevenció lehetőségére. Kísérleteimben olyan vegyületeket, (keverékeket) vizsgáltam, melyek mindennapi életünkben karcinogén expozícióként és/vagy kemopreventívumként folyamatosan hatnak ránk. Intézetünkben kifejlesztett - munkám során kissé módosított - állatkísérletes modellben teszteltem a vegyületek, keverékek karcinogén illetve antikarcinogén hatását.

Elsőként a természetben illetve élelmiszereinkben is feldúsuló **transz-2-hexenál** vizsgálatát végeztem el. A vegyület irodalmi adatok szerint Ames tesztben és testvérkromatid-kicserélődés-tesztben (SCE) genotoxikusnak bizonyult, mutagén hatását és citotoxicitását több tanulmányban is megemlítik. DNS károsító hatását is kimutatták, 1,N²-propano-dezoxiguanozin exociklikus adduktot képez, ezen tulajdonsága szerepet játszhat a pozitív mutagenitási tesztek eredményében.

Majd vizsgáltam az **N-nitrozo-N-metil-karbamid** (MNU), mint pluripotens, direkt hatású karcinogén vegyület hatását, mely irodalmi adatok szerint különféle szervekben; főleg a gyomorban, és az idegrendszerben okozhat tumorokat. Karcinogén expozíciót pácolt húsok fogyasztása esetén szenvedünk, az emésztő traktusban lévő savas pH mellett képződhet *in vitro*. Az MNU erős metiláló ágens, a DNS guanin bázisával O⁶ metil-guanin adduktot képez.

Mindkét vegyületet állatkísérletes modell segítségével vizsgáltuk, a *Hras1* és *Myc* kulcs onkogének illetve *Trp53* tumor szuppresszor gén expressziót, mint a karcinogenezis korai molekuláris epidemiológiai biomarkereit detektáltuk. Intézetünkben folyt régebbi kísérleteink

alapján, melyet DMBA-val - egy metabolikusan aktiválódó karcinogénnel - végeztünk, feltételeztük, hogy ezen gének expressziós mintázatában változást tapasztalunk az expozíciót követően.

Az MNU hosszú távú hatását ugyan már leközlötték, azonban a transz-2-hexenállal ilyen kísérletek nem folytak, így tumorképző hatását „long-term” kísérletben is megvizsgáltuk.

Eredményeink szerint a transz-2-hexenál az expozíciót követő 24, 48, illetve 72. órában sem mutatott szignifikáns génexpresszió változást a vizsgált génekben egyik szervben sem mRNS szinten, azonban hosszú távú kísérleteinkben AKR/J egérben leukémiát, C3He-mg egérben májkarcinómát okozott, Long-Evans és Wistar patkány fültőmirigy-karcinómát Fischer 344 és Wistar patkányban tüdődaganatot találtunk.

Az MNU-val végzett kísérletek eredményei szerint a vegyület a transz-2-hexenállal ellentétben több szervben is megváltoztatta a génexpressziós mintázat, melyet még 12 illetve 24 órával az expozíció után is detektálhattunk.

Kísérleteink alapján a transz-2-hexenál a vizsgált génektől eltérő genetikai, vagy epigenetikai daganatkeltő hatását feltételezzük, mely hatás bizonyítására, valamint a transz-2-hexenál onko- és szuppresszor génekre kifejtett késői hatásának vizsgálatához további kísérletekre van szükség, egyénileg tervezett DNS-chipekkel a karcinogén hatás hátterében álló új biomarker gének azonosíthatók.

Az MNU-ról daganatképző hatása ismert, mely összefüggésben lehet kísérletünkben bizonyított *Hras1* és *Myc* onkogénekre gyakorolt génexpresszió növelő hatásával.

Állatkísérletes és humán epidemiológiai tanulmányok sora született számos potenciális kemopreventív vegyület, kivonat, gyógy- és fűszernövény jótékony hatásáról. A tudatos kemoprevenzió lényege, hogy természetes eredetű vagy szintetikus anyagokat hosszú időn keresztül fogyasztunk, annak érdekében, hogy a daganat kialakulását megelőzzük vagy a még reverzibilis folyamatokat visszafordítsuk.

Munkám következő szakaszában potenciális kemopreventív vegyületeket vizsgáltam, egy szintetikus kalkon-analógot, a **E,E-bis-(2-hidroxi-benzilidén)-acetont (HBA)**, egy természetes eredetű polifenolt, a **rezveratrolt**, valamint egy karotinoidot, a paradicsomban szintetizálódó **likopint**.

Karcinogén expozíciónak kitett (DMBA kezelt) egerek szerveiben feltérképezhető génexpressziós mintázatát hasonlítottam össze különböző időpontokban (feltételezett) kemopreventív hatásnak kitett és DMBA-val exponált CBA/Ca egerek mRNS-ében. Vizsgálataimban a karcinogén expozíció előtt 24 órával, a DMBA kezeléssel egy időben, illetve az azt követő 24. órában adagolt HBA, rezveratrol és likopin hatására bekövetkező *Hras1*

onkogén - illetve likopin és rezveratrol esetében kiegészítve *Trp53* tumor szuppresszor gén - expresszióját határoztam meg különböző szervekben.

Az általunk vizsgált kalkonanalóg (HBA) ismert kemopreventív szer, irodalomban közölt adatok szerint erős NAD(P)H-dehidrogenáz kinon 1 (NQO1) indukáló potenciállal rendelkezik Hepa 1c1c7 sejtvonalon. A HBA és a DMBA egyidejű kezelés hatására minden vizsgált szervben a *Hras1* expresszió visszaszorulását tapasztaltuk, mely a két vegyület metabolikus kölcsönhatására enged következtetni. A génexpresszió csökkenés azt jelzi, hogy tesztrendszerünk alkalmas a kemopreventív hatás detektálására.

Ezen tapasztalatok alapján a „short-term” tesztrendszerben megvizsgált likopin mindkét gén - *Hras1* onkogén és *Trp53* tumor szuppresszor gén - expresszióját csökkentette, a rezveratrol főleg a *Trp53* gén-re hatott. Ezen különbségek a vegyületek hatásmechanizmusának különbözőségéből adódhatnak. A génexpressziós profilok összehasonlítása során arra a következtetésre jutottunk, hogy a két vizsgált vegyület közül a likopin hatása a szembetűnőbb, mint potenciális kemopreventív szer.

Napjainkban újra előtérbe kerültek a tradicionális gyógyászatban használt gyógynövények. Már nemcsak az alternatív gyógyászati szaklapokban találunk utalásokat egészségügyi, biológiai hatásokról, neves orvosi, biológiai folyóiratokban is jelennek meg tanulmányok napjaink népbetegségei, többek között a szív- és érrendszeri betegségek, a cukorbetegség és a daganatok megelőzésével, terápiájával, összefüggésben. PhD dolgozatomban két ismert magas szaponin tartalmú gyógynövény, a **ginzeng** (*Panax ginseng* C. A. Meyer) és a **görögszéna** (*Trigonella foenum graecum* L.) kemopreventív hatását kutattam, különböző mechanizmusokat vizsgáltam.

Kísérleteim során görögszénamag illetve ginzenggyökér őrlemény tartalmú tápot fogyasztó, karcinogén expozíciónak (DMBA) kitett AKR/J H-2^k egerek egyes szerveiben meghatározott mRNS expressziók alapján következtettünk a hatásukra. Eredményeim azt mutatják, hogy a görögszéna fogyasztás rövidtávú kísérleteinkben hatással volt az arachidonsav metabolizmus enzimeinek expressziójára. **Ezen eredmény alátámasztja görögszéna kivonatairól, egyes komponenseiről megjelent közlemények adatait, melyek szerint gyulladáscsökkentő hatással rendelkezik. Több gyulladáscsökkentő hatású vegyületről tudjuk, hogy tumor kemopreventív hatással rendelkeznek a prosztaglandin bioszintézis gátlásán keresztül, valamint a lipoxigenáz enzimek génexpresszió csökkentő hatása miatt, ezért feltételezzük, hogy a görögszéna tartalmú táplálék is e mechanizmus alapján fejt ki kemopreventív hatását.**

A kemoprevenció egy másik lehetséges mechanizmusa a károsodott sejtek apoptózisának indukálása. Az élelmiszereinkben előforduló bioaktív komponensek szabályozhatják az apoptózisban részvevő fehérjéknek (*Bcl2*, *Bcl2l1*, *Bax*, *Bak*) a sejten belüli expresszióját, kezdeményezik a citokróm C kibocsátását a mitokondriumból. Kísérletünkben a ginzeng tartalmú tápot fogyasztó AKR/J H-2^k szerveiben expresszáladó *Bcl2*, *Bcl2l1* és *Ccnd1* gének expressziós mintázatát vizsgáltuk Q-RT-PCR segítségével. **Irodalmi adatokkal ellentétben állatkísérletes modellünk a ginzeng gyökér tartalmú táp apoptózis indukáló hatását bizonyítja, mely egy lehetséges mechanizmusa a kemoprevenciónak.**

A kemoprevenációs és ismert primer prevenációs eredmények értékelésére populációs szinten különböző epidemiológiai módszerek alkalmasak. Minél korszerűbb molekuláris epidemiológiai biomarkereket alkalmazunk, annál közelebb kerülünk a biztonságosabb daganatrizikó becsléshez.

Intézetünk az elmúlt években kidolgozott egy állatmodellt, mely gyors, olcsó módszer: „*short-term*” állatmodell, amely alkalmas a feltételezeten rákkeltő vegyületek vizsgálatára, valamint kísérleteink szerint alkalmas potenciális kemopreventív tulajdonságokkal rendelkező vegyületek (keverékek) hatásainak vizsgálatára, valamint a kemoprofilaxis hatásait mérhetjük génszinten.

A módszer alkalmas az expozíció és a korai biológiai hatás jelzésére a kémiai, fizikai, biológiai karcinogének esetében, valamint kvantitatív kockázatbecslésre ad lehetőséget humán populációban a daganatkeletkezésre nézve.

A modern táplálkozástudomány feladata, hogy felhívja az emberek figyelmét az egészséges táplálkozásra, a tápanyag összetevők helyes megválasztására. Táplálékunkkal potenciális rákkeltő ágensekkel, prokarcinogén vegyületekkel exponáljuk szervezetünket, azonban tudatos táplálkozással lehetőségünk nyílik a káros hatások kivédésére, kemopreventív molekulák szervezetünkbe juttatásával. **Eredményeink és az irodalmi adatok előrevetítik a magas kalcion, flavonoid, karotinoid, szaponin tartalmú élelmiszerek, étrend-kiegészítők, fogyasztásának hatékonyságát a daganatos betegségek elsődleges megelőzésében, és annak monitorozásában.**

8. ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

8.1. Transz-2-hexenál

Bár az Intézetünk által használt kísérleti tesztrendszer kiválóan alkalmas különböző karcinogén vegyületek hatásának kimutatására, az ismerten genotoxikus karcinogén vegyületektől (DMBA, NP) eltérően a **transz-2-hexenál nem indukált egyértelmű korai génexpresszió-emelkedést a vizsgált kulcsgénekből, ugyanakkor a krónikus kísérletben karcinogén hatásának bizonyult, az állatokban daganatok kialakulását eredményezte.** A kísérletekben használt állatok kis száma miatt eredményeink előzetesek, de a transz-2-hexenálnak az emberi táplálékokban való ubikviter jelenléte miatt fontosnak tartjuk a vizsgálati eredmények előzetes közlését is.

8.2. N-nitrozo-N-metil-karbamid (MNU)

A DMBA-val szemben az MNU hatására korábban emelkedik a *Hras1*, *Myc* és a *Trp53* expressziója a későbbiekben tumorkialakulást mutató szervekben. Ezen gének expresszió-emelkedése, mint kísérletünk is igazolta, jó korai behatároló molekuláris biomarkere a karcinogén expozíciónak, így a primer prevencióban fontos szerepe lehet. **Eredményeink alátámasztják a tényt, hogy az MNU direkt karcinogén és ezért a hatása gyorsabban jelentkezik (12 órával a beadás után) és előbb le is cseng (24 órával a beadás után), mint a metabolikusan aktiválódó karcinogén DMBA esetében (ahol 24 és 48 óra közt jellemző a hatás).**

8.3. HBA (E,E-bis-(2-hidroxi-benzilidén)-aceton)

Intézetünkben alkalmazott „short-term” tesztrendszert potenciális kemopreventív vegyületek vizsgálatára is alkalmazzuk. Az általunk vizsgált kalkonanalóg (HBA) ismert kemopreventív szer, irodalomban közölt adatok szerint erős NAD(P)H-dehidrogenáz kinon 1 (NQO1) indukáló potenciállal rendelkezik Hepa 1c1c7 sejtvonalon. **A HBA és a DMBA egyidejű kezelés hatására minden vizsgált szervben a *Hras1* expresszió visszaszorulását tapasztaltuk, mely a két vegyület metabolikus kölcsönhatására enged következtetni.**

A génexpresszió csökkenés azt jelzi, hogy tesztrendszerünk alkalmas a kemopreventív hatás detektálására.

A 2-dezoxi-D-ribóz degradációs teszt eredményei szerint az első 120 percben az antioxidáns kapacitás észlelhető volt, azonban hosszabb inkubációs idő esetén, függetlenül az EDTA adagolástól inkább a pro-oxidáns jellegű képet mutatott a HBA.

8.4. Likopin és rezveratrol

A likopin mindkét gén - *Hras1* onkogén és *Trp53* tumor szuppresszor gén - expresszióját csökkentette, a rezveratrol főleg a *Trp53* gén-re hatott. Ezen különbségek a vegyületek hatásmechanizmusának különbözőségéből adódhat. A génexpressziós profilok összehasonlítása során arra a következtetésre jutottunk, hogy a két vizsgált vegyület közül a likopin hatása a szembetűnőbb, mint potenciális kemopreventív ágens.

8.5. Görögszéna, hatása, az arachidonsav metabolizmus enzimjeire *in vivo* állatkísérletben (*ALOX*, *COX*)

Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a vesében a DMBA hatására megemelkedett *ALOX12*-mRNS szint expresszióját a görögszéna tartalmú táp visszaszorította a normál szintre. Az *ALOX15* génexpresszióját mind a négy vizsgált szövetben a karcinogén expozíció megemelte, a görögszéna tartalmú diétán tartott egerek máj, tüdő és vese szövetében a normál szinten lévő mRNS koncentrációt mértünk. Hasonló eredményeket kaptunk - a tüdő kivételével - az arachidonsav metabolizmus kulcs enzimeinek (*ALOX5*) vizsgálata során is.

A prosztaglandin bioszintézisben szerepet játszó enzimek (*COX1*, *COX2*) génexpressziója a lép kivételével visszaszorult a görögszéna tartalmú táp fogyasztásának eredményeképp.

Eredményeinket más kutatók sejtvonalakon végzett kísérleteivel összevetve megállapíthatjuk, hogy a görögszéna biológiailag aktív komponensei képesek az arachidonsav metabolizmus gátlásán keresztül potenciális kemopreventív hatást kifejteni.

8.6. Ginzeng tartalmú táplálék kemopreventív hatása *in vivo* állatkísérletben

„Short-term” teszt-rendszerünkben végzett vizsgálataink szerint, az AKR/J-H2^k beltenyésztett egerek szerveiből izolált mRNS expressziós mintázata alapján a ginzeng tartalmú táp valószínűleg kemopreventív hatású. A máj, tüdő és lép szövetben a *Ccnd1* expresszió csökkent volt a DMBA-val kezelt csoportban mért értékekhez képest. Az apoptózis regulációjában szerepet játszó *Bcl2* gén a máj és vese szövetben alacsony

expressziót mutatott a speciális tápot fogyasztó egerek esetén, és *Bcl2l1* gén a tüdőben és a lépben volt alulexpresszált. Irodalmi adatokkal ellentétben állatkísérletes modellünk a ginzeng gyökér tartalmú táp apoptózis indukáló hatását bizonyítja, mely egy lehetséges mechanizmusa a kemoprevenciónak.

A kidolgozott tesztrendszer alkalmas a kemopreventívnek ígérkező vegyületek, készítmények korai vizsgálatára is, kvantitatív reverz transzkripció polimeráz láncreakcióval kombinálva különböző génspecifikus primerekkel végzett amplifikációkkal választ kaphatunk a többlépcsős karcinogenezis egyes lépéseiben lezajló folyamatokra, valamint a beavatkozások (mint kemoprevenció) hatásosságára.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm az Orvosi Népegészségtani Intézet igazgatójának, témavezetőmnek, Dr. Ember István Professzor úrnak támogatását, és lelkesítését, hogy lehetővé tette számomra a folyamatos tanulást, és fejlődést az intézetben eddig eltöltött 10 év alatt.

Köszönetet mondok dr. Gyöngyi Zoltánnak, dr. Perjési Pálnak, dr. Kiss Istvánnak, és dr. Varga Csabának, akik értékes szakmai tanácsaikkal segítettek munkámat, valamint dr. Nowrasteh Ghodratollahnak, dr. Budán Ferencnek, dr. Nádasi Editnek és dr. Gombos Katalinnak, akik publikációim megírásában voltak nagy segítségemre.

Hálával tartozom az Intézet asszisztenseinek, Brunnerné Bayer Zsuzsának, Herczeg Mónikának, Harth Csabánének, Pest Károlynének, és minden jelenlegi és volt munkatársamnak, akik őszintén segítettek munkájukkal, hogy disszertációm elkészülhessen.

Köszönöm biztatását, segítségét és türelmét édesanyámnak, testvéremnek, gyermekeimnek, és mindazoknak, aki közel állnak hozzám, és végigélték velem ezeket az éveket.

10. FELHASZNÁLT IRODALOM

1. Népegészségügyi Orvostan. szerkesztő: Ember István, *Dialog-Campus Kiadó*, Budapest-Pecs, (2007)
2. A daganatos megbetegedés társadalmi terhei és költségei az Európai Unió országaiban. Részletek a B. Jönsson & N. Wilking szerzőpáros (Karolinska Institute Stockholm, Svédország) jelentéséből *MKOT*(2008)
3. Kiss István, Ember István: Molekuláris epidemiológia. *Medikom, Budapest* (1997)
4. Ádány Róza, Kásler Miklós, Ember István, Kopper László, Thurzó László: Az onkológia alapjai. *Medicina Kiadó Budapest* (1997)
5. Ember I, Kiss I, Gombkoto G, Muller E, Szeremi M.: Oncogene and suppressor gene expression as a biomarker for ethylene oxide exposure. *Cancer Detect Prev.* **22**(3): 241-5. (1998)
6. Ember I, Kiss I, Nowrasteh G, Raposa T.: Effect of ABVD therapeutic protocol on oncogene and tumor suppressor gene expression in CBA/Ca mice. *Anticancer Res.* **18**(2A): 1149-52. (1998)
7. Ember I, Kiss I, Raposa T, Nowrasteh G, Matolcsy A.: In vivo effects of CHOP protocol on onco and suppressor gene expression: follow-up study. *In Vivo.* **12**(5): 489-94. (1998)
8. Pusztai Z, Selypes A, Ember I.: Short-term effects of 1-nitropyrene on chromosomes and on oncogene/tumor suppressor gene expression in vivo. *Anticancer Res.* **18**(6A): 4489-92. (1998)
9. Gyöngyi Z, Ember I, Kiss I, Varga C.: Changes in expression of onco- and suppressor genes in peripheral leukocytes--as potential biomarkers of chemical carcinogenesis. *Anticancer Res.* **21**(5): 3377-80. (2001)
10. Ember István: Onko- és szuppresszorgének expressziójának vizsgálata in vivo állatmodellben és humán populációban. *Akadémiai Doktori Disszertáció* (1997)
11. Gyöngyi Z, Somlyai G.: Deuterium depletion can decrease the expression of C-myc Ha-ras and p53 gene in carcinogen-treated mice. *In Vivo.* **14**(3): 437-9. (2000)
12. Farshad Abir, M.D., Suraj Alva, M.D., Donald L. Kaminski, M.D.: The Role of Arachidonic Acid Regulatory Enzymes in Colorectal Disease. *Dis Colon Rectum.* **48**(7): 1471-83. (2005)
13. Bergstrom H, Samuelsson B.: The enzymatic formation of prostaglandin E2 from arachidonic acid prostaglandins and related factors 32. *Biochem Biophys Acta.* **90**: 207-10. (1964)
14. Naveena B Janakiram, Chinthalapally V Rao: Molecular markers and targets for colorectal cancer prevention. *Acta Pharmacologica Sinica.* **29**(1): 1-20. (2008)
15. Brink, Charles, Dahlen, Sven-Erik, Drazen, Jeffrey, Evans, Jilly F., Hay, Douglas W. P., Rovati, G. Enrico, Serhan, Charles N., Shimizu, Takao, Yokomizo, Takehiko International Union of Pharmacology XLIV. Nomenclature for the Oxoeicosanoid Receptor. *Pharmacol Rev.* **56**: 149-157. (2004)
16. Elder DJ, Halton DE, Hague A, Paraskeva C.: Induction of apoptotic cell death in human colorectal carcinoma cell lines by a cyclooxygenase-2 (COX-2)-selective nonsteroidal

- anti-inflammatory drug: independence from COX-2 protein expression. *Clin Cancer Res.* **3**: 1679-83. (1997)
17. Spencer AG, Thuresson E, Otto JC, Song I, Smith T, DeWitt DL, et al.: The membrane binding domains of prostaglandin endoperoxide H synthases 1 and 2. Peptide mapping and mutational analysis. *J Biol Chem.* **274**: 32936-42. (1999)
 18. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN.: Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology.* **107**: 1183-8. (1994)
 19. Hirschowitz BI, Lanas A.: Atypical and aggressive upper gastrointestinal ulceration associated with aspirin abuse. *J Clin Gastroenterol.* **34**: 523-8. (2002)
 20. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, Du-Bois RN.: Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell.* **93**: 705-16. (1998)
 21. Rayyan Y, Williams J, Rigas B.: The role of NSAIDs in the prevention of colon cancer. *Cancer Invest.* **20**: 1002-11. (2002)
 22. O'Neill GP, Ford-Hutchinson AW.: Expression of RNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS Lett.* **330**: 156-60. (1993)
 23. Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K, et al.: Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res.* **55**: 3785-9. (1995)
 24. Aurelie T, Christophe F, Nicole P, Jean-Pierre H.: Mechanisms leading to COX-2 expression and COX-2 induced tumorigenesis: topical therapeutic strategies targeting COX-2 expression and activity. *Anticancer Agents Med Chem.* **6**: 187-208. (2006)
 25. Sheng H, Shao J, Kirkland SC, Isakson P, Coffey RJ, Morrow J, et al.: Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest.* **99**: 2254-9. (1997)
 26. Öhd JF, Wikström K, Sjölander A.: Leukotrienes induce cell-survival signaling in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology.* **119**: 1007-18 (2000)
 27. Ye YN, Liu ESL, Shin VY, Cho CH.: Involvement of 5-lipoxygenase, matrix metalloproteinase-2 and vascular endothelial growth factor in the colonic tumorigenesis promoted by passive cigarette smoking. *Am Assoc Cancer Res Proc.* **44**: 95. (2003)
 28. Ye YN, Liu ES, Shin VY, Wu WK, Luo JC, Cho CH.: Nicotine promoted colon cancer growth via epidermal growth factor receptor, c-Src, and 5-lipoxygenase-mediated signal pathway. *J Pharmacol Exp Ther.* **308**: 66-72. (2004)
 29. Ye YN, Wu WKK, Shin VY, Cho CH.: A mechanistic study of colon cancer growth promoted by cigarette smoke extract. *Eur J Pharmacol.* **519**: 52-7. (2005)
 30. Öhd JF, Nielsen CK, Campbell J, Landberg G, Lofberg H, Sjölander A.: Expression of the leukotriene D4 receptor CysLT1, COX-2, and other cell survival factors in colorectal adenocarcinomas. *Gastroenterology.* **124**: 57-70. (2003)
 31. Kennedy TJ, Talamonti M, Ujiki M, Ding XZ, Ternent CA, Bell RH Jr, et al.: Lipoxygenase expression in colon polyps and inhibition of colon cancer growth by lipoxygenase blockade. *J Am Coll Surg.* **199**: 78. (2004)
 32. Soumaoro LT, Iida S, Uetake H, Ishiguro M, Takagi Y, Higuchi T, et al.: Expression of 5-Lipoxygenase in human colorectal cancer. *Gastroenterology.* **12**: 6355-60. (2006)
 33. Goossens L, Pommery N, Henichart JP.: COX-2/5-LOX dual acting anti-inflammatory drugs in cancer chemotherapy. *Curr Topics Med Chem.* **7**: 283-96. (2007)

34. Imad Shureiqi and Scott M.: Lippman2 Lipoxygenase Modulation to Reverse Carcinogenesis *Cancer Metastasis Rev* .**26**: 503-524. (2007)
35. Kuhn, H., Walther, M., & Kuban, R. J. : Mammalian arachidonate 15-lipoxygenases structure, function, and biological implications. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. **68-69**: 263-290. (2002)
36. Brash, A. R., Boeglin, W. E., and Chang, M. S.: Discovery of a second 15-lipoxygenase in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**: 6148-6152. (1997)
37. Daret, D., Blin, P., and Larrue, J.: Synthesis of hydroxy fatty acids from linoleic acid by human blood platelets. *Prostaglandins*. **38**: 203-214. (1989)
38. Tang, K., and Honn, K. V.: 12(S)-HETE in cancer metastasis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **447**: 181-191, (1999)
39. Gao, X., Grignon, D. J., Chbihi, T., Zacharek, A., Chen, Y. Q., Sakr, W., Porter, A. T., Crissman, J. D., Pontes, J. E., Powell, I. J., and Honn, K. V.: Elevated 12-lipoxygenase mRNA expression correlates with advanced stage and poor differentiation of human prostate cancer. *Urology*. **46**: 227-237. (1995)
40. Timar, J., Raso, E., Dome, B., Li, L., Grignon, D., Nie, D., Honn, K. V., and Hagmann, W.: Expression, subcellular localization and putative function of platelet-type 12-lipoxygenase in human prostate cancer cell lines of different metastatic potential. *Int. J. Cancer*. **87**: 37-43. (2000)
41. Liu, B., Khan, W. A., Hannun, Y. A., Timar, J. D., Taylor, J., Lundy, S., Butovich, I., and Honn, K. V.: 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid and 13(S)-hydroxyoctadecadienoic acid regulation of protein kinase C- α in melanoma cells: role of receptor-mediated hydrolysis of inositol phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**: 9323-9327. (1995)
42. Nie, D., Krishnamoorthy, S., Jin, R., et al. : Mechanisms regulating tumor angiogenesis by 12-lipoxygenase in prostate cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*. **281**(27): 18601-18609. (2006)
43. Gately, S.: The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer and Metastasis Reviews*. **19**(1-2): 19-27. (2000)
44. Czerski L, Nunez G.: Apoptosome formation and Caspase activation: is it different in the heart? *J Mol Cell Cardiol*. **37**(3): 643-52. (2004)
45. Keith R. Martin: Targeting Apoptosis with Dietary Bioactive Agents. *Exp Biol Med*. **231**: 117-129. (2006)
46. Coqueret O: Linking cyclins to transcriptional control. *Gene*. **299**(1-2): 35-55. (2002)
47. Hershko T, Ginsberg D.: Up-regulation of Bcl-2 homology (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. *J Biol Chem* **279**: 8627-8634. (2004)
48. Crow MT, Mani K, Nam YJ, Kitsis RN.: The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res*. **95**(10): 957-70. (2004)
49. Perik P, de Vries E, Gietema J, van der Graaf W, Sleijfer D, Suurmeijer A, Van Veldhuisen D.: The dilemma of the strive for apoptosis in oncology. *Crit Rev Oncol Hematol*. **53**: 101-113, (2005)
50. Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y.: Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci*. **116**(20): 4077-85. Review. (2003)

51. Chi Chen and Ah-Ng Tony Kong: Dietary cancer-chemopreventive compounds: from signaling and gene expression to pharmacological effects *TRENDS in Pharmacological Sciences*. **26**(6): 318-26. (2005)
52. Tenderenda M: A study on the prognostic value of cyclins D1 and E expression levels in resectable gastric cancer and on some correlations between cyclins expression, histoclinical parameters and selected protein products of cell-cycle regulatory genes. *J Exp Clin Cancer Res*. **24**(3): 405-14. (2005)
53. Li Y, Upadhyay S, Bhuiyan M, Sarkar F.: Induction of apoptosis in breast cancer cells MDA-MB-231 by genistein. *Oncogene*. **18**: 3166-3172.(1999)
54. Reed J.: Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. *Trends Mol Med*. **7**: 314-319. (2001)
55. Ember I., Kopper L. és mtsai: Az onkológia alapjai, *Medicina Könyvkiadó Rt.*, Budapest, (1997)
56. Kopper L., Marcsek Z., Kovalszky I.: Molekuláris medicina, *Medicina Könyvkiadó Rt.*, Budapest, (1997)
57. Lavanyal Lall, Richard L. Davidson: Sequence-Directed Mispairing in Human Oncogenes. *Mol Cell Biol*. **18**(8): 4659-69. (1998)
58. Geoffrey M. Cooper: *Oncogenes*. Jones and Bartlett Publishers (1995)
59. Szeberényi József: Molekuláris sejtbológia. *Dialóg Campus Budapest* (1999)
60. Nicolas M Luscombe, Susan E Austin, Helen M Berman and Janet M Thornton: An overview of the structure of protein-DNA complexes, *Genome Biology*. **1**(1): reviews 001.1-001.37 (2000)
61. Anneke C Blackburn and D Joseph Jerry: Knockout and transgenic mice of Trp53: what have we learned about p53 in breast cancer, *Breast Cancer Res*. **4**: 101-111. (2002)
62. Lili Zhao, Tina Samuels, Sarah Winckler, Chandrashekhar Korgaoukar, Van Tompkins, Mary C. Horne and Dawn E. Quelle: Cyclin G1 Has Growth Inhibitory Activity Linked to the ARF-Mdm2-p53 and pRb Tumor Suppressor Pathways, *Molecular Cancer Research*. **1**: 195-206. (2003)
63. Major R. T., Marchini P., Sproston T.: Isolation from *Gingko biloba* of an inhibitor of fungus growth. *J Biol Chem*. **235**: 3298-3299. (1960)
64. Ntirampemba G., Langlois B. E., Archbold D. D., Hamilton-Kemp T. R., Barth M. M.: Microbial populations of *Botrytis cinerea*-inoculated strawberry fruit exposed to four volatile compounds. *J Food Prot*. **61**(10): 1352-1357. (1998)
65. Eder E., Schuler D.: An approach to cancer risk assessment for the food constituent 2-hexenal on the basis of 1,N²-propanodeoxyguanosine adducts of 2-hexenál *in vivo*. *Arch Toxicol*. **74**: 642-648. (2000)
66. Griffin D. S., Segall H. J.: Genotoxicity and cytotoxicity of selected pyrrolizidine alkaloids, a possible alkenal metabolite of the alkaloids and related alkenals. *Toxicol Appl Pharmacol*. **86**: 227-234. (1986)
67. Eder E., Scheckenbach S., Deininger C., Hoffman C.: The possible role of α,β -unsaturated carbonyl compounds in mutagenesis and carcinogenesis. *Toxicol Lett*. **67**: 87-103. (1993)
68. Eisenbrand G., Schuhmacher J., Gölzer P.: The influence of glutathione and detoxifying enzymes on DNA damage induced by 2-alkenals in primary rat hepatocytes and human lymphoblastoid cells. *Chem Res Toxicol*. **8**: 40-46. (1995)

69. Dittberner U., Eisenbrand G., Zankl H.: Genotoxic effects of the α,β -unsaturated aldehydes 2-*trans*-butenal, 2-*trans*-hexenal and 2-*trans*,6-*cis*-nonadienal. *Mutat Res.* **335**: 259-265. (1995)
70. Marnett L. J., Hurd H. K., Hollstein M. C., Levin D. E., Esterbauer H., Ames B. N.: Naturally occurring carbonyl compounds are mutagens in *Salmonella*-tester-strain TA 104. *Mutat Res.* **148**: 25-34. (1985)
71. Eder E., Deininger C., Neudecker T., Deininger D.: Mutagenicity of β -alkyl substituted acrolein congeners in the *Salmonella typhimurium* strain TA 100 and genotoxicity testing in the SOS-chromotest. *Environ Mol Mutag.* **19**: 337-345. (1992)
72. Canonero R., Martelli A., Marinari U. M., Brambilla G.: Mutation induction in the Chinese hamster lung V79 cells by five alk-2-enals produced by lipid peroxidation. *Mutat Res.* **244**: 153-156. (1990)
73. Schuler D., Eder E.: Detection of 1,N²-propanodeoxyguanosine adducts of 2-hexenal in organs fisher rats by a 32p-pos labelling technique. *Carcinogenesis* (20)**7**: 1345-1350. (1999)
74. McKenna D. J., Jones K., Hughes K.: Efficacy, safety and use of ginkgo biloba in clinical and preclinical applications. *Altern Ther Health Med.* **7**(5): 70-90. (2001)
75. Alexander RJ, Buxbaum JN, Raicht RF.: Oncogene alterations in rat colon tumors induced by N-methyl-N-nitrosourea. *Am J Med Sci.* **303**(1): 16-24. (1992)
76. Kossoy G, Ben-Hur H, Miskin R, Zusman I.: Tumor target organs and rate of survival in long-living transgenic mice and their parental wild-type counterparts exposed to the carcinogen dimethylbenz(a)anthracene. *In Vivo.* **20**(4): 543-8. (2006)
77. Rossi SC, Conrad M, Voigt JM, Topal MD.: Excision repair of O6-methylguanine synthesized at the rat H-ras N-methyl-N-nitrosourea activation site and introduced into Escherichia coli. *Carcinogenesis.* **10**(2): 373-7. (1989)
78. N-Nitroso-N-Methylurea CAS No. 684-93-5 - Official Citation: Report on Carcinogens, Eleventh Edition; U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program
79. Quintanilla, M., Brown, K., Ramsden, M., and Balmain, A.: Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. *Nature.* **322**: 78-80. (1986)
80. Ahmed El-Sohemy and Michael C. Archer: Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea- and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced rat mammary tumorigenesis by dietary cholesterol is independent of Ha-ras mutations; *Carcinogenesis.* **21**(4): 827-831. (2000)
81. Kemp, C. J., Fee, F., and Balmain, A.: Allelotype analysis of mouse skin tumors using polymorphic microsatellites: sequential genetic alterations on chromosomes 6, 7, and 11. *Cancer Res.* **53**: 6022-6027. (1993)
82. Weinkam RJ and Dolan ME: Intracellular activation of cytotoxic agents: kinetic models for methylnitrosoureas and N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine in cell culture. *Chem Res Toxicol.* **2**: 157-161. (1989)
83. Hoivik DJ, Allen JS, Wall HG, Nold JB, Miller RT and Santostefano MJ: Studies evaluating the utility of N-methyl-N-nitrosoureas as a positive control in carcinogenicity studies in the p53 +/- mouse. *Int J Toxicol.* **24**: 349-356. (2005).
84. Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., Katan, M. B.: Content of potentially anticarcinogenic flavonoids in 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J. Agric. Food Chem.* **40**: 2379-2383. (1992)

85. Lugasi A. és mtsai.: Az élelmiszer eredetű flavonoidok potenciális egészségvédő hatása, *Orvosi Hetilap*, **141**. 32. (1999)
86. Hollman, P. C. H.: Bioavailability of flavonoids. *Eur. J. Clin. Nutr.* **51**: 66-69. (1997)
87. Siemann, E.H., Creasy, L.L.: Concentration of phytoalexin resveratrol in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **43**: 49-52. (1992)
88. Gusman J., Malonne H., Atassi G.: A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. *Carcinogenesis*. **22**(8): 1111-1117. (2001)
89. Creasy, L.L., Coffee, M.: Phytoalexin production potential of grape berries. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **1143**: 230-23. (1988)
90. Hangodi Olga: A rezveratrol szerepe a szőlőben. *PTE TTK Diplomamunka konzulens: Prof Dr. Szabó László Gy., Varjas Tímea* (2002)
91. Jang, M., Pezzuto, J.M.: Cancer chemopreventive activity of rezveratrol. *Drugs Expltl. Clin Res*, **25**(2-3): 65-77 (1999)
92. Jang M., Cai L., Udeani G.O., et al.: Cancer chemopreventive activity of resveratrol, natural product derived from grapes. *Science*. **275**: 218-220. (1997)
93. Nguyen M.L., Schwartz S.J.: Lycopene: chemical and biological properties. *Food Technol.* **53**: 38-45. (1999)
94. Clinton S.K.: Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutr. Res.* **56**: 35-51. (1998)
95. Zechmeister L., LeRosen A.L., Went F.W., Pauling L.: Prolycopene, a naturally occurring stereoisomer of lycopene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **21**: 468-74. (1941)
96. Clinton S.K., Emenhiser C., Schwartz S.J., et al.: Cis-trans lycopene isomers, carotenoids, and retinol in the human prostate. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **5**: 823-33. (1996)
97. Agarwal S., Rao A.V.: Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *CMAJ.* **163**(6): 739-744. (2000)
98. Stahl W., Sies H.: Lycopene: A biologically important carotenoid for humans? *Arch Biochem Biophys.* **336**: 1-9. (1996)
99. Astorg P., Gradelet S., Berges R., Suschetet M.: Dietary lycopene decreases the initiation of liver preneoplastic foci by diethylnitrosamine in the rat. *Nutr Cancer.* **29**(1): 60-68. (1997)
100. Fuhrman B, Elis A., Aviram M.: Hypocholesterolemic effect of lycopene and β - carotene is related to suppression of cholesterol synthesis and augmentation of LDL receptor activity in macrophage. *Biochem Biophys Res Commun.* **233**: 658-662. (1997)
101. Agarwal S., Rao A.V.: Tomato lycopene and low density lipoprotein oxidation: a human dietary intervention study. *Lipids.* **33**: 981-984. (1998)
102. Giovannucci E, Ascherio A., Rimm E.B., Stampfer M.J., Colditz GA, Willett W.C.: Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* **87**: 1767-76. (1995)
103. Rao A.V. , Agarwal S.: Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: review. *Nutr. Res.* **19**: 305-523. (1999)
112. Shoji Fukushima, Hideki Wanibuchi, Wei Li: Inhibition by Ginseng of Colon Carcinogenesis in Rats. *J Korean Med Sci.* **16**(Suppl): S75-80. (2001)

113. Patrick Ying Kit Yue, Nai Ki Mak, Yuen Kit Cheng, Kar Wah Leung, Tzi Bun Ng, David Tai Ping Fan, Hin Wing Yeung, Ricky Ngok Shun Wong: Pharmacogenomics and the Yin/Yang actions of ginseng: anti-tumor, angiomodulating and steroid-like activities of ginsenosides. *Chinese Medicine* **2**: 6. (2007)
114. Cheng CC, Yang SM, Huang CY, Chen JC, Chang WM, Hsu SL: Molecular mechanisms of ginsenoside Rh2-mediated G1 growth arrest and apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* **55**: 531-540. (2005)
115. Irma Meijerman, Jos H. Beijnen, Jan H.M. Schellens: Herb-Drug Interactions in Oncology: Focus on Mechanisms of Induction. *The Oncologist.* **11**: 742-752. (2006)
116. Kim HS, Lee EH, Ko SR, Choi KJ, Park JH, Im DS: Effects of ginsenosides Rg3 and Rh2 on the proliferation of prostate cancer cells. *Arch Pharm Res* **27**: 429-435. (2004)
117. Liu K, Xu SX, Che CT: Anti-proliferative effect of ginseng saponins on human prostate cancer cell line. *Life Sci.* **67**: 1297-1306. (2000)
118. Kim HE, Oh JH, Lee SK, Oh YJ: Ginsenoside RH-2 induces apoptotic cell death in rat C6 glioma via a reactive oxygen- and caspase-dependent but Bcl-X(L)-independent pathway. *Life Sci.* **65**: 33-40. (1999)
119. Kim ND, Kang SY, Kim MJ, Park JH, Schini-Kerth VB: The ginsenoside Rg3 evokes endothelium-independent relaxation in rat aortic rings: role of K⁺ channels. *Eur J Pharmacol.* **367**: 51-57. (1999)
120. Kim ND, Kang SY, Park JH, Schini-Kerth VB: Ginsenoside Rg3 mediates endothelium-dependent relaxation in response to ginsenosides in rat aorta: role of K⁺ channels. *Eur J Pharmacol* **367**: 41-49, (1999)
121. Kim YS, Jin SH, Lee YH, Kim SI, Park JD: Ginsenoside Rh2 induces apoptosis independently of Bcl-2, Bcl-xL, or Bax in C6Bu-1 cells. *Arch Pharm Res.* **22**: 448-453. (1999)
122. Kim EH, Jang MH, Shin MC, Shin MS, Kim CJ.: Protective effect of aqueous extract of Ginseng radix against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptosis in PC12 cells. *Biol Pharm Bull.* **26**: 1668-1673. (2003)
123. Chen XC, Chen Y, Zhu YG, Fang F, Chen LM.: Protective effect of ginsenoside Rg1 against MPTP-induced apoptosis in mouse substantia nigra neurons. *Acta Pharmacol Sin.* **23**: 829-834. (2002)
124. Nakata H, Kikuchi Y, Tode T, Hirata J, Kita T, Ishii K, Kudoh K, Nagata I, Shinomiya N: Inhibitory effects of ginsenoside Rh2 on tumor growth in nude mice bearing human ovarian cancer cells. *Jpn J Cancer Res.* **89**: 733-740. (1989)
125. Popovich DG, Kitts DD: Ginsenosides 20(S)-protopanaxadiol and Rh2 reduce cell proliferation and increase sub-G1 cells in two cultured intestinal cell lines, Int-407 and Caco-2. *Can J Physiol Pharmacol.* **82**: 183-190. (2004)
126. Meenakshi Panwar, Ravindra Samarth, Madhu Kumar, Won Joo Yoon and Ashok Kumar: Inhibition of Benzo(a)pyrene Induced Lung Adenoma by Panax ginseng Extract, EFLA400, in Swiss Albino Mice. *Biol. Pharm. Bull.* **28**(11): 2063-2067. (2005)
127. Oh M, Choi YH, Choi S, Chung H, Kim K, Kim SI, Kim DK, Kim ND: Anti-proliferating effects of ginsenoside Rh2 on MCF-7 human breast cancer cells. *Int J Oncol.* **14**: 869-875, (1999)

128. P. Sur, M. Das, A. Gomes, J. R. Vedasiromoni, N. P. Sahu, S. Banerjee, R. M. Sharma and D. K. Ganguly: Trigonella foenum graecum (Fenugreek) Seed Extract as an Antineoplastic Agent. *Phytotherapy Research*. **15**: 257-259. (2001)
129. Jayadev Raju, Jagan M.R. Patlolla, Malisetty V. Swamy, and Chinthalapally V. Rao: Diosgenin, a Steroid Saponin of Trigonella foenum graecum (Fenugreek), Inhibits Azoxymethane-Induced Aberrant Crypt Foci Formation in F344 Rats and Induces Apoptosis in HT-29 Human Colon Cancer Cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. **13**(8): 1392-1398. (2004)
130. Chevallier A.: Encyclopedia of herbal medicine. New York (NY): *Dorling Kindersley Publishing, Inc.* (2000).
131. Hibasami H, Moteki H, Ishikawa K, et al.: Protodioscin isolated from fenugreek (Trigonella foenum graecum L.) induces cell death and morphological change indicative of apoptosis in leukemic cell line H-60, but not in gastric cancer cell line KATO III. *Int J Mol Med*. **11**: 23-6. (2003)
132. Sur P, Das M, Gomes A, et al.: Trigonella foenum graecum (fenugreek) seed extract as an antineoplastic agent. *Phytother Res*. **15**: 257-9. (2001)
133. de La Fuente M, Victor VM.: Anti-oxidants as modulators of immune function. *Immunol Cell Biol*. **78**: 49-54. (2000)
134. Ruby AJ, Kuttan G, Babu KD, Rajasekharan KN, Kuttan R.: Antitumor and anti-oxidant activity of natural curcuminoids. *Cancer Lett*. **94**: 79-85. (1995)
135. Devasagayam TPA, Sainis KB.: Immune system and antioxidants, especially those derived from Indian medicinal plants. *Indian J Exp Biol*; **40**:639-55. (2002)
136. Ross JA, Kasum CM.: Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr*. **22**: 19-34. (2002)
137. Shen S-C, Ko CH, Tseng S-W, Tsai S-H, Chen Y-C.: Structurally related antitumor effects of flavanones in vitro and in vivo: involvement of caspase 3 activation, p21 gene expression, and reactive oxygen species production. *Toxicol Appl Pharmacol*. **197**: 84-95 (2004)
138. Norton SA.: Useful plants of dermatology. III. Corticosteroids, strophanthus, and dioscorea. *J Am Acad Dermatol.* **38**: 256-9. (1998)
139. Moalic S, Liagre B, Corbiere C, et al.: A plant steroid, diosgenin, induces apoptosis, cell cycle arrest and COX activity in osteosarcoma cells. *FEBS Lett*. **506**: 225-30. (2001)
140. Corbiere C, Liagre B, Bianchi A, et al.: Different contribution of apoptosis to the antiproliferative effects of diosgenin and other plant steroids, hecogenin and tigogenin, on human 1547 osteosarcoma cells. *Int J Oncol*. **22**: 899-905. (2003)
141. Shishodia S, Aggarwal BB.: Diosgenin inhibits osteoclastogenesis, invasion, and proliferation through the downregulation of Akt, IKB kinase activation and NF-KB-regulated gene expression. *Oncogene*. **25**(10): 1463-73. (2006)
142. Burnett BP, Jia Q, Zhao Y, Levy RM.: A medicinal extract of Scutellaria baicalensis and Acacia catechu acts as a dual inhibitor of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase to reduce inflammation. *J Med Food*. **10**(3): 442-51. (2007)
143. Major R. T., Collins O. D., Marchini P., Schnabel H. W.: Formation of 2-hexenál by leaves. *Phytochemistry*. **11**: 607-610 (1972)

144. de Lumen B. O., Stone E. J., Kazeniac S., and Forsythe R. H.: Formation of volatile flavor compounds in green beans from linoleic and linolenic acids. *J Food Sci.* **43**: 698-708. (1978)
145. Buttery R. G., Teranishi R., Ling L. C.: Fresh tomato aroma volatiles: a quantitative study. *J Agric Food Chem.* **35**:540-544. (1987)
146. Skobeleva N. I., Bezzubov A. A., Petrova T. A., Bokuchava M. A.: Aroma-forming substances in black tea. *Appl Biochem Microbiol.* **15**: 682-687. (1979)
147. Gyöngyi Z., Nádas E., Varga C., Kiss I., Ember I.: Long term effects of 1-nitropyrene on oncogene and tumor suppressor gene expression. *Anticancer Res.* **21**(6A): 3937-3940. (2001)
148. Gyöngyi Z., Grama L., Nádas E., Sándor J., Németh Á., Varga C., et al.: Flow cytometric analysis of DMBA-induced early *in vivo* ras expression. *In Vivo.* **16**(5): 323-326. (2002)
149. Németh Á., Nádas E., Gyöngyi Z., Olasz L., Nyárádi Z., Ember Á., et al: Early effects of different cytostatic protocols for head and neck cancer on oncogene activation in animal experiments. *Anticancer Res.* **23**: 4831-4836. (2003)
150. Ember I., Kiss I., Pusztai Z.: Effect of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene on onco/ suppressor gene activation *in vivo*: a short-term experiment. *Anticancer Res* **18**: 445-448 (1998)
151. Perjési P., Gyöngyi Z., Bayer Z.. Effect of E-2-(4-methoxy-benzylidene)-1-benzosuberone on the 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced onco/ suppressor gene activation *in vivo* II: A 48-hour experiment. *Anticancer Res.* **20**(3): 1839-1848. (2000)
152. Ember I., Kiss I., Vermes E.: Early effect of cyclophosphamide in oncogene activation *in vivo*. *In Vivo.* **12**: 201-208 (1998)
153. Reese JS, Allay E and Gerson SL: Overexpression of human O⁶-alkylguanine DNA alkyltransferase (AGT) prevents MNU induced lymphomas in heterozygous p53 deficient mice. *Oncogene.* **20**: 5258-5263. (2001)
154. S Sukumar and M Barbacid: Specific patterns of oncogene activation in transplacentally induced tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**(2): 718-22. (1990)
155. Kang HM, Jang JJ, Langford C, Shin SH, Park SY, Chung YJ: DNA copy number alterations and expression of relevant genes in mouse thymic lymphomas induced by gamma-irradiation and N-methyl-N-nitrosourea. *Cancer Genet Cytogenet.* **166**(1): 27-35. (2006)
156. Nrisinha P. Sen, Stephen W. Seaman, Christine Burgess, Philander A. Baddoo, and Dorcas Weber: Investigation on the Possible Formation of N-Nitroso-N-methylurea by Nitrosation of Creatinine in Model Systems and in Cured Meats at Gastric pH *J. Agric. Food Chem.* **48**(10): pp 5088-5096. (2000)
157. Newcomb EW, Corominas M, Bayona W, Pellicer A.: Multistage carcinogenesis in murine thymocytes: involvement of oncogenes, chromosomal imbalances and T cell growth factor receptor. *Anticancer Res.* **9**(5): 1407-15. (1989)
158. Xuecui Guo, Kasmintan A Schrader, Yaoxian Xu and John W Schrader: Expression of a constitutively active mutant of M-Ras in normal bone marrow is sufficient for induction of a malignant mastocytosis/mast cell leukemia, distinct from the histiocytosis/monocytic leukemia induced by expression of activated H-Ras. *Oncogene.* **24**(14): 2330-42. (2005)

159. Eric H. Radany, Karen Hong, Sima Kesharvarzi, Eric S. Lander, and J. Michael Bishop
Mouse mammary tumor virus/v-Ha-ras transgene-induced mammary tumors exhibit strain-specific allelic loss on mouse chromosome 4. *Cancer Research* **63**: 4849-4853. (2003)
160. Silva S, Babonits M, Wiener F, Klein G : Further studies on chromosome 15 trisomy in murine T-cell lymphomas: mapping of the relevant chromosome segment. *Int J Cancer*. **41**(5): 738-43. (1988)
161. Hegi M E, Devereux T R, Dietrich W F, Cochran C J, Lander E S, Foley J F, Maronpot R R, Anderson M W, Wiseman R W.: Allelotype analysis of mouse lung carcinomas reveals frequent allelic losses on chromosome 4 and an association between allelic imbalances on chromosome 6 and K-ras activation. *Cancer Res.*; **54**: 6257-6264. (1994)
162. Santos J, de Castro I P, Herranz M, Pellicer A, Fernandez-Piqueras J.: Allelic losses on chromosome 4 suggest the existence of a candidate tumor suppressor gene region of about 0.6 cM in gamma-radiation-induced mouse primary thymic lymphomas. *Oncogene.*; **12**: 669-676. 1996)
163. Inazu T, Myint Z, Kuroiwa A, Matsuda Y, Noguchi T.: Molecular cloning, expression and chromosomal localization of mouse MM-1. *Mol Biol Rep*. **32**(4): 273-9. (2005)
164. Hagio Y, Kimura Y, Taira T, Fujioka Y, Iguchi-Ariga SM, Ariga H.: Distinct localizations and repression activities of MM-1 isoforms toward c-Myc. *J Cell Biochem*. **97**(1): 145-55. (2006)
165. Silva S, Babonits M, Wiener F, Klein G: Further studies on chromosome 15 trisomy in murine T-cell lymphomas: mapping of the relevant chromosome segment. *Int J Cancer*. 1988 May 15;**41**(5):738-43.
166. Wiseman R.W., Stewart B.C., Grenier D., Miller E.C. Miller J.A.: Characterization of c-Ha-ras protooncogene mutations in chemically induced heptomas of the B6C3F1 mouse. *Proc Amer Assoc Cancer Res*. **28**: 147. (1987)
167. Stanley LA, Blackburn DR, Devereaux S, Foley J, Lord PG, Maronpot RR, Orton TC, Anderson MW.: Ras mutations in methylclofenapate-induced B6C3F1 and C57BL/10J mouse liver tumours. *Carcinogenesis*. **15**(6): 1125-31. (1994)
168. Pelling JC, Ernst SM, Strawhecker JM, Johnson JA, Nairn RS, Slaga TJ: Elevated expression of Ha-ras is an early event in two-stage skin carcinogenesis in SENCAR mice. *Carcinogenesis*. **7**(9): 1599-602. (1986)
169. Pelling JC, Fischer SM, Neades R, Strawhecker J, Schweickert L.: Elevated expression and point mutation of the Ha-ras proto-oncogene in mouse skin tumors promoted by benzoyl peroxide and other promoting agents. *Carcinogenesis*. **8**(10): 1481-4. (1987)
170. Perjési P, Bayer Z, Ember I. : Effect of E-2-(4'-methoxybenzylidene)-1-benzosuberone on the 7,12-dimethylbenz[alpha]anthracene-induced onco/suppressor gene action in vivo. I: A 24-hour experiment. *Anticancer Res*. **20**(1A): 475-81. (2000)
171. Perjési P, Gyöngyi Z, Bayer Z.: Effect of E-2-(4'-methoxybenzylidene)-1-benzosuberone on the 7,12-dimethylbenz[alpha]anthracene-induced onco/suppressor gene action in vivo II: A 48-hour experiment. *Anticancer Res*. **20**(3A): 1839-48. (2000)
172. Wilson NM, Christou M, Turner CR, Wrighton SA, Jefcoate CR : Binding and metabolism of benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene by seven purified forms of cytochrome P-450. *Carcinogenesis*. **5**(11):1475-83. (1984)

173. Osaka M, Matsuo S, Koh T, Sugiyama T.: Loss of heterozygosity at the N-ras locus in 7,12-dimethylbenz[a] anthracene-induced rat leukemia. *Mol Carcinog.* **18**(4): 206-12. (1997)
174. Monostory K, Tamási V, Vereczkey L, Perjési P.: A study on CYP1A inhibitory action of E-2-(4'-methoxybenzylidene)-1-benzosuberone and some related chalcones and cyclic chalcone analogues. *Toxicology.* **184**(2-3): 203-10. (2003)
175. Kuo I, Chen J, Chang TK.: Effect of Ginkgo biloba extract on rat hepatic microsomal CYP1A activity: role of ginkgolides, bilobalide, and flavonols. *Can J Physiol Pharmacol.* **82**(1): 57-64. (2004)
176. Forejtníková H, Lunerová K, Kubínová R, Jankovská D, Marek R, Kares R, Suchý V, Vondráček J, Machala M.: Chemoprotective and toxic potentials of synthetic and natural chalcones and dihydrochalcones in vitro. *Toxicology.* **208**(1): 81-93. (2005)
177. Canivenc-Lavier MC, Vernevaut MF, Totis M, Siess MH, Magdalou J, Suschetet M.: Comparative effects of flavonoids and model inducers on drug-metabolizing enzymes in rat liver. *Toxicology.* **114**(1): 19-27. (1996)
178. Allen SW, Mueller L, Williams SN, Quattrochi LC, Raucy J.: The use of a high-volume screening procedure to assess the effects of dietary flavonoids on human cyp1a1 expression. *Drug Metab Dispos.* **29**(8): 1074-9. (2001)
179. Dinkova-Kostova AT, Massiah MA, Bozak RE, Hicks RJ, Talalay P.: Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**(6): 3404-9. (2001)
180. Gupta, S., Srivastava, M., Ahmad, N., Sakamoto, K., Bostwick, D. G., and Mukhtar, H.: Lipoxygenase-5 is overexpressed in prostate adenocarcinoma. *Cancer (Phila.).* **91**: 737-743. (2001)
181. Ghosh, J., and Myers, C. E.: Arachidonic acid stimulates prostate cancer cell growth: critical role of 5-lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235**: 418-423. (1997)
182. Tang, K., and Honn, K. V.: 12(S)-HETE in cancer metastasis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **447**: 181-191, 1999.
183. Imad Shureiqi and Scott M. Lippman: Lipoxygenase Modulation to Reverse Carcinogenesis. *Cancer Research.* **61**: 6307-6312. (2001)
184. Timar, J., Raso, E., Dome, B., Li, L., Grignon, D., Nie, D., Honn, K. V., and Hagmann, W.: Expression, subcellular localization and putative function of platelettype 12-lipoxygenase in human prostate cancer cell lines of different metastatic potential. *Int. J. Cancer.* **87**: 37-43. (2000)
185. Garcea G, Sharma RA, Dennison A, Steward WP, Gescher A, Berry DP.: Molecular biomarkers of colorectal carcinogenesis and their role in surveillance and early intervention. *Eur J Cancer.* **39**(8): 1041-52. (2003)
186. Brink, Charles, Dahlen, Sven-Erik, Drazen, Jeffrey, Evans, Jilly F., Hay, Douglas W. P., Rovati, G. Enrico, Serhan, Charles N., Shimizu, Takao, Yokomizo, Takehiko International Union of Pharmacology XLIV. Nomenclature for the Oxoeicosanoid Receptor. *Pharmacol Rev.* **56**: 149-157. (2004)
187. O'Neill GP, Ford-Hutchinson AW.: Expression of RNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS Lett.* **330**: 156-60. (1993)

188. Bengmark S.: Curcumin, an atoxic antioxidant and natural NF κ B, cyclooxygenase-2, lipooxygenase, and inducible nitric oxide synthase inhibitor: a shield against acute and chronic diseases. *J Parenter Enteral Nutr.* **30**(1): 45-51. (2006)
189. Keith I. Block, and Mark N. Mead: Immune System Effects of Echinacea, Ginseng, and Astragalus: A Review. *Integrative Cancer Therapies.* **2**(3): 247-267. (2003)
190. Yun TK, Choi SY. Preventive effect of ginseng intake against various human cancers: a case-control study on 1987 pairs. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev.* **4**: 401-8. (1995)
191. Yun TK, Yun YS, Han IW. Anticarcinogenic effect of long-term oral administration of red ginseng on newborn mice exposed to various chemical carcinogens. *Cancer Detect Prev.* **6**: 515-25. (1983)
192. Sato K, Mochizuki M, Saiki I, Yoo YC, Samukawa K, Azuma I. Inhibition of tumor angiogenesis and metastasis by a saponin of panax ginseng, ginsenoside-Rb2. *Biol Pharm Bull.* **17**: 635-9. (1994)
193. Yun TK, Choi SY. A case-control study of ginseng intake and cancer. *Int J Epidemiol.* **19**: 871-6. (1990).
194. Yun TK, Choi SY. Non-organ specific cancer prevention of ginseng: a prospective study in Korea. *Int J Epidemiol.* **27**: 359-64. (1998)
195. Kim EH, Jang MH, Shin MC, Shin MS, Kim CJ. Protective effect of aqueous extract of Ginseng radix against 1-methyl-4- phenylpyridinium-induced apoptosis in PC12 cells. *Biol Pharm Bull.* **26**: 1668-1673. (2003)
196. Chen XC, Chen Y, Zhu YG, Fang F, Chen LM. Protective effect of ginsenoside Rg1 against MPTP-induced apoptosis in mouse substantia nigra neurons. *Acta Pharmacol Sin.* **23**: 829-834. (2002)
196. Steve Helms: Cancer Prevention and Therapeutics: Panax Ginseng. *Alternative Medicine Review.* **9**(3): 259-274 (2004)

11. A DISSZERTÁCIÓHOZ KAPCSOLÓDÓ ÉS KÖZVETLENÜL NEM KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK ÉS PREZENTÁCIÓK LISTÁJA

11.1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk jegyzéke

„In extenso” közlemények

1. E. Nádasi, T. **Varjas**, L. Pajor, I. Ember: Carcinogenic potential of trans-2-hexenal is based on epigenetic effect. *In Vivo* **19**: 559-562 (2005) **imp. f.: 1.037**
2. Amrein K., Papp G., **Varjas T.**, Nádasi E., Pajor L., Ember I.: A transz-2-hexenal in vivo vizsgálata. *Egészségtudomány*, **49**: 111-117 (2005)
3. P. Perjési, I. Ember, R.E. Bozak, E. Nádasi, Z. Rozmer, T. **Varjas**, R.J. Hicks: Effect of the Chalcone Analog E,E-bis(2-Hydroxybenzylidene) acetone on the 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene-induced Ha-ras gene action in vivo. *In Vivo* **20**: 141-146 (2006) **imp. f.: 1.273**
4. Budán F., **Varjas T.**, Varga Zs., Cseh J., Polyák É., Perjési P., Gyöngyi Z., Ember I.: Környezeti metil-nitrozo-urea expozíció lehetséges molekuláris biomarkereinek vizsgálata, *Magyar Epidemiológia*, **5(1)**: 55-62. (2008)
5. F. Budán, T. **Varjas**, G. Nowrasteh, Zs.Varga, I. Boncz, J. Cseh, I. Prantner, T. Antal, E. Pázsit, Gy. Göbel, M. Bauer, T. Gracza, P. Perjési, I. Ember Z. Gyöngyi: Early Modification of *c-myc*, *Ha-ras* and *p53* Expressions by *N*-Methyl-*N*-nitrosourea. *In vivo* **22(6)**: 793-797 (2008) **imp. f.: 1.273**
6. Budán F., **Varjas T.**, Nowrasteh G., De Blasio A., Prantner I., Gombos K., Varga Zs., Cseh J., Göbel Gy., Polyák É., Perjési P., Ember I., Kiss I.: Kémiai karcinogének korai hatása a *c-myc*, *Ha-ras* és *p53* gének expressziójára *Magyar Epidemiológia* **5(3-4)**: 201-212 (2008)
7. T. **Varjas**, G. Nowrasteh, E. Nádasi, G. Horváth, S. Makai, T. Gracza, J. Cseh, I. Ember: Chemopreventive effect of *Panax ginseng*. *Phytotherapy Research* **23(10)**: 1399-403 (2009) **impf: 1,772**
8. T. **Varjas**, G. Nowrasteh, G. Horváth, F. Budán, K., Molnár, J., Cseh, S Makai, I Ember: The Effect of Fenugreek on Metabolism of Arachidonic Acid an in-vivo Animal Model *Phytotherapy Research* (közlésre elfogadva) **impf: 1,772**

Könyvfejezetek

1. Ember István, Németh Árpád, Sándor János, **Varjas Tímea**, Sebestyén Andor, Boncz Imre, Bujdosó László, Kvarda Attila: *Fej-nyaki daganatok epidemiológiája és molekuláris epidemiológiája - Az onkológiai prevenció helyzete / Fej-nyaki daganatok prevenciója és ellátása*, könyvfejezet - Szerkesztő: Dózsa Csaba, Dr. Sebestyén Andor OEP, 2003
2. Németh K., Fehér K., Muszil Z., Kiss I., Nowrasteh G., **Varjas T.**, Nádasi E., Mészáros A., Gyöngyi Z., Varga Cs., Perjési P., Ember I: Molekuláris epidemiológiai biomarkerek: új koncepció a preventív és prediktív medicinában - *Daganatok és daganatmegelőző*

állapotok molekuláris epidemiológiája, könyvfejezet - Szerkesztő: Ember István, Kiss István, Medicina, 2005

3. Arany, I., Gombos, K., Nowrasteh, G., **Varjas, T.**: *Kemoprevenció - Népegészségügyi Orvostan, könyvfejezet - szerkesztő : Ember István Dialog-Campus Kiadó, Budapest-Pecs, 2007*

Magyar folyóiratokban megjelent absztraktok

1. Ember I., Pajor L., **Varjas T.**, Varga Cs.: Transz-hexenal, egy új, potenciális környezeti karcinogén vizsgálata. *Magyar Onkológia* **47**: 3 (2003)
2. Nowrasteh G., Wittmann Á., Budán F., **Varjas T.**, Szele E., Ember I.: Görögszéna kivonat hatása metabolizáló enzimek génexpressziójára in vivo állatmodellben. A PTE OEKK, Orvostudományi és Egészségtudományi Szakosztálya és az Orvosi Népegészségtani Intézet Rendkívüli Jubileumi Tudományos Ülése (Kertai Professor Úr 80 éves, Boján Professor Úr 10 éve nincs közöttünk) Pécs, 2007. június 9. *Magyar Epidemiológia, Supplementum, 4*: 30 (2007)
3. **Varjas T.**, Wittmann Á., Nowrasteh G., Budán F., Gombos K., Ember I.: Metabolizáló enzimek génexpressziójának változása Panax ginseng extraktum hatására állatkísérletes modellben. A PTE OEKK, Orvostudományi és Egészségtudományi Szakosztálya és az Orvosi Népegészségtani Intézet Rendkívüli Jubileumi Tudományos Ülése (Kertai Professor Úr 80 éves, Boján Professor Úr 10 éve nincs közöttünk) Pécs, 2007. június 9. *Magyar Epidemiológia, Supplementum, 4*: 36 (2007)

Nemzetközi folyóiratokban megjelent absztraktok

1. Nadas E., **Varjas T.**, Ember I.: Investigation of the anticarcinogenic effect of Resveratrol in a mouse gene expression model. *Anticancer Research*. **21**(3): 1606 (2001)
2. I. Ember, Cs. Varga, L. Pajor, E. Nádasi, **T. Varjas**, G. Nowrasteh, A. Csejtej, L. Bujdosó, I. Rodler, A. Kvarda: Trans-Hexenal, a new naturally occurring carcinogen. VII. International Conference of Anticancer Research, Corfu. *Anticancer Research* **24**(5D): 3479. (2004)
3. G. Nowrasteh, **T. Varjas**, I. Ember: Lycopene and cancer chemoprevention. VII. International Conference of Anticancer Research, Corfu. *Anticancer Research* **24**(5D): 3583. (2004)
4. G. Nowrasteh, **T. Varjas**, Á. Wittmann, K. Gombos, Z. Gyöngyi, I. Ember: Determination of gene expression pattern developing by the results of fenugreek extract applying quantitative PCR. Hersonissos, Crete, Greece, 12-14 October, 2006. *International Journal of Molecular Medicine, Supplement* **18**: 359 (2006)
5. **T. Varjas**, G. Nowrasteh, E. Nádasi, Á. Wittmann, K. Gombos, I. Ember: Investigation of the chemopreventive effect of panax ginseng extract in „in vivo” animal models. Hersonissos, Crete, Greece, 12-14 October, 2006. *International Journal of Molecular Medicine, Supplement* **18**: 360 (2006)
6. G. Nowrasteh, **T. Varjas**, F. Budán, K. Amrein, G. Horváth, I. Ember: The in vivo effect of fenugreek on metabolism of arachidonic acid in an animal experiment 8th

11.2. A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk jegyzéke

„In extenso” közlemények

1. Molnár J, Kis A, Melegh B, Nádasi E, **Varjas T**, Kovács E, Kosztolanyi G.: [Mutation analysis in the CTG-base multiplication in a family with myotonic dystrophy in three generations]. *Orv Hetil.* **139**(18): 1083-5. (1998)
2. **Varjas T**, Nádasi E, Kovács E, Molnár J, Melegh B, Kosztolányi G.: [Diagnosis of Prader-Willi syndrome by reverse transcriptase polymerase chain reaction]. *Orv Hetil.* **139**(28):1685-7. (1998)
3. Nádasi E., **Varjas T.**, Ember I.: Bioterrorizmus. *Lege Artis Medicinae*; 16(3): 281-284 (2006)
4. Gombos K., **Varjas T.**, Orsós Zs., Polyák É., Peredi J., Varga Zs., Nowrasteh G., Tettinger A., Mucsi Gy., Ember I.: The effect of Aspartame administration on oncogene and suppressor gene expression. *In vivo* **21**: 89-92. (2007) **imp. f.: 1,273**
5. Virág V., **Varjas T.**, Gyöngyi Z., Somlyai G., Ember I., Nádasi E.: The possible role of natural products in the dietotherapy of cancer-related weight loss: an animal model. *Acta Alimentaria*, 36(2): 249-256 (2007) **imp. f.: 0,253**
6. E. Nádasi, **T. Varjas**, I. Prantner, V. Virág, I. Ember: Bioterrorism: warfare of the 21st century. *Gene Therapy and Molecular Biology* **11**: 315-320, (2007)
7. K. Gombos, E. Szele, I. Kiss, **T. Varjas**, L. Puskás, L. Kozma, F. Juhász, E. Kovács, I. Szanyi, I. Ember: Characterization of microarray gene expression profiles of early stage thyroid tumours. *Cancer Genomics and Proteomics* **4**: 403-410. (2007)
8. Nowrasteh G., **Varjas T.**, Benkő Á., Szabó L., Gergely P., Papp A., Horváth Ö. P., Ember I.: Fruit Café[®], egy növényi eredetű kivonat hatása génexpressziókra - klinikai epidemiológiai előkísérletek, *Magyar Epidemiológia*, **5**(1): 41-54. (2008).
9. Ember Á., Budán F., Nowrasteh G., **Varjas T.**, Göbel Gy., Horváth Ö. P., Illényi L., Cseh J., Perjési P., Gergely P., Ember I., Kiss I.: Molekuláris biomarkerek alkalmazása kolorektális karcinómás betegeken, a műtéti hatás monitorozása követéses vizsgálattal. *Egészségtudomány* **53**(2): 50-59 (2009)
10. F. Budán, **T. Varjas**, G. Nowrasteh, I. Prantner, Z. Varga, Á. Ember, J. Cseh, K. Gombos, E. Pázsit, Gy. Göbel, Miklós Bauer, T. Gracza, I. Arany, P. Perjési, I. Ember, I. Kiss: Early Modification of *c-myc*, *Ha-ras* and *p53* Expressions by Chemical Carcinogens (DMBA, MNU) *In Vivo* **23**(4): 591-8 (2009) **imp. f.: 1.273**
11. E. Nádasi, J.S. Clark, I. Szanyi, **T. Varjas**, I. Ember, R. Baliga, I. Arany: Epigenetic modifiers exacerbate oxidative stress in renal proximal tubule cells. *Anticancer Research* **29**(6): 2295-9 (2009) **imp. f.: 1,414**

12. Fehér K., Prantner I., Kiss I., **Varjas T.**, Gyöngyi Z., Perjési P., Németh K., Nowrasteh G., Dombi Zs., Ember I.: Molekuláris epidemiológiai biomarkerek a preventive és prediktív medicinában, különös tekintettel a daganatprevencióra. *Orvostudományi értesítő* (közlésre elfogadva)
13. Ember, A., Clark, J. S., Varjas, T., Kiss, I., Ember, I., Bakiga, R., Arany, I.: The Plant-derived Natural Compound Flavin 7® Attenuates Oxidative Stress in Cultured Renal Proximal Tubule Cells. Inv vivo (közlésre elfogadva) **imp. f. : 1.273**
- G. Nowrasteh, T. **Varjas**, L. Szabó, Zs. Orsós, A. Á. Benkő, A. Papp, Ö. P. Horváth, I. Ember, I. Kiss Papp, I. Ember, I. Kiss: Effect of Fruit Café® extract on gene expression - a clinical epidemiological trial *Complementary Therapies in Medicine* (közlésre elküldve)
- F. Budán, Á. Ember, K. Amrein, Ö.P. Horváth, L. Illényi, Gy. Göbel, A. De Blasio, T. Dávid, T. **Varjas**, G. Montskó, L. Márk, P. Perjési, I. Ember: The effect of Uncaria extracts on molecular epidemiological biomarkers in the patients with colorectal cancer. *Complementary Therapies in Medicine* (közlésre elküldve)

Magyar folyóiratokban megjelent absztraktok

1. **Varjas T.**, Szabó L., Orsós Zs., Nádasi E., Dombi Zs., Nowrasteh G., Ember I.: Flavonoidok hatása transzplantált tumorok növekedésére állatkísérletekben. *Orvosi Hetilap*, **146**(17): 814. (2005)
2. **Varjas T.**, Nowrasteh G., Gunszt B, Simon A., Ember I.: Növényi extrakt kemopreventív hatásának vizsgálata tumor-transzplantációs kísérletben. Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság II. Nemzetközi Kongresszusa, Pécs, 2005. április 1-2. *Magyar Epidemiológia Supplementum*, **2**(1): 92. (2005)
3. Virág V., Nádasi E., **Varjas T.**, Gyöngyi Z., Somlyai G., Ember I.: Gyógyhatású készítmények lehetséges szerepe a tumoros megbetegedések okozta testsúlycsökkenés kezelésében: egy állatmodell. Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság II. Nemzetközi Kongresszusa, Pécs, 2005. április 1-2. *Magyar Epidemiológia Supplementum*, **2**(1): 93. (2005)
4. Németh Á., **Varjas T.**, Bero A., Olasz L., Nyárády Z., Ember Á., Csontos Zs., Arany I., Pázsit E., Czákó Gy., Ember I., Dombi Zs.: A Transplatin hatása onkogének korai aktivációjára. Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság II. Nemzetközi Kongresszusa, Pécs, 2005. április 1-2. *Magyar Epidemiológia Supplementum*, **2**(1): 66. (2005)
5. Németh Á., **Varjas T.**, Bero A., Olasz L., Nyárády Z., Ember Á., Csontos Zs., Arany I., Pázsit E., Czákó Gy., Ember I., Dombi Zs.: A génexpresszió vizsgálata fej-nyaki daganatos megbetegedések eseteiben. Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság II. Nemzetközi Kongresszusa, Pécs, 2005. április 1-2. *Magyar Epidemiológia Supplementum*, **2**(1): 67. (2005)
6. Orsós Zs., **Varjas T.**, Szabó L., Dombi Zs., Ember I. Kiss I.: Flavin-7 hatása onko/tumor szupresszor gének expressziójára egerekben. Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság II. Nemzetközi Kongresszusa, Pécs, 2005. április 1-2. *Magyar Epidemiológia Supplementum*, **2**(1): 70. (2005)

7. K. Gombos, E. Szele, **T. Varjas**, A. Tettinger, K. Molnár, Zs. Varga, A. Sebestyén, A. Tibold, I. Ember: A VitaCalen® nevű étrendkiegészítő hatása onko- és tumor szuppresszor gén expresszókra. IIIrd Congress of the Society of the Hungarian Molecular and predictive Epidemiology, 3-4 November 2006, Pécs *Magyar Epidemiológia Supplementum*, **3**: S42. (2006)
8. É. Polyák, K. Gombos, **T. Varjas**, J. Peredi, I. Ember: Az Aspartame fogyasztás hatása az onko- és tumorszuppresszor gén expressziókra. IIIrd Congress of the Society of the Hungarian Molecular and predictive Epidemiology, 3-4 November 2006, Pécs *Magyar Epidemiológia Supplementum*, **3**: S71. (2006)
9. Budán F., Benkó R., Barthó L., **Varjas T.**, Szabó L., Ember I.: Az Equisetum herba mocsári zsúrló szennyezettségének kimutatása fitokémiai módszerrel és hatásának néhány jellemzője. A PTE OEKK, Orvostudományi és Egészségtudományi Szakosztálya és az Orvosi Népegészségtani Intézet Rendkívüli Jubileumi Tudományos Ülése (Kertai Professor Úr 80 éves, Boján Professor Úr 10 éve nincs közöttünk) Pécs, 2007. június 9. *Magyar Epidemiológia, Supplementum*, **4**: 28. (2007)
10. Gombos K., Szele E., **Varjas T.**, Puskás L., Kozma L., Juhász F., Ember I.: Jelátviteli mechanizmusok összefüggéseinek vizsgálata pajzsmirigy daganatokban. A PTE OEKK, Orvostudományi és Egészségtudományi Szakosztálya és az Orvosi Népegészségtani Intézet Rendkívüli Jubileumi Tudományos Ülése (Kertai Professor Úr 80 éves, Boján Professor Úr 10 éve nincs közöttünk) Pécs, 2007. június 9. *Magyar Epidemiológia, Supplementum*, **4**: 31. (2007)
11. Szele E., Gombos K., **Varjas T.**, Puskás L., Kozma L., Juhász F., Ember I.: Microarray módszer alkalmazása a pajzsmirigy daganatok korai felismerésében. A PTE OEKK, Orvostudományi és Egészségtudományi Szakosztálya és az Orvosi Népegészségtani Intézet Rendkívüli Jubileumi Tudományos Ülése (Kertai Professor Úr 80 éves, Boján Professor Úr 10 éve nincs közöttünk) Pécs, 2007. június 9. *Magyar Epidemiológia, Supplementum*, **4**: 34. (2007)
12. **Varjas T.**, Wittmann Á., Nowrasteh G., Budán F., Gombos K., Ember I.: Metabolizáló enzimek génexpressziójának változása Panax ginseng extraktum hatására állatkísérletes modellben A PTE OEKK, Orvostudományi és Egészségtudományi Szakosztálya és az Orvosi Népegészségtani Intézet Rendkívüli Jubileumi Tudományos Ülése (Kertai Professor Úr 80 éves, Boján Professor Úr 10 éve nincs közöttünk) Pécs, 2007. június 9. *Magyar Epidemiológia, Supplementum*, **4**: 36. (2007)
13. Gombos K., Szele E., **Varjas T.**, Puskás L., Kozma L., Juhász F., Ember I.: Microarray módszer alkalmazása pajzsmirigydaganatok korai felismerésében. MOT XXVII. Jubileumi Kongresszusa, Budapest 2007. november 8-10. *Magyar Onkológia*, **51**(4)
14. Gyöngyi Z., Arany I., Nádasi E., **Varjas T.**, Ember I.: A MAP kinázok potenciális biomarker szerepének vizsgálata állatkísérletben. NETT XVI. Nagygyűlése Pécs, 2008. április 17-19. *Magyar Epidemiológia Supplementum*, **5**: 47. (2008)
15. Nádasi E., **Varjas T.**, Prantner I., Virág V., Ember I.: Bioterrorizmus: a XXI. század hadviselése. NETT XVI. Nagygyűlése Pécs, 2008. április 17-19. *Magyar Epidemiológia Supplementum* **5**: 73. (2008)
16. Gombos K, Szele E., **Varjas T.**, Puskás L., Kozma L., Juhász F., Ember I.: Jelátviteli mechanizmusok összefüggéseinek vizsgálata pajzsmirigy daganatokban. NETT XVI.

- Nagygyűlése Pécs, 2008. április 17-19. *Magyar Epidemiológia Supplementum*, **5**: 44. (2008)
17. Nowrasteh G., Wittman Á., **Varjas T.**, Ember I.: Görögszéna kivonat hatása metabolizáló enzimek génexpressziójára in vivo állatmodellben. NETT XVI. Nagygyűlése Pécs, 2008. április 17-19. *Magyar Epidemiológia Supplementum*, **5**: 74. (2008)
 18. Szele E., Gombos K., **Varjas T.**, Puskás L., Kozma L., Juhász F., Ember I.: Microarray módszer alkalmazása a pajzsmirigy daganatok korai felismerésében. NETT XVI. Nagygyűlése Pécs, 2008. április 17-19. *Magyar Epidemiológia Supplementum*, **5**: 96. (2008)
 19. **Varjas T.**, Nowrasteh G., Wittmann Á., Ember I.: Metabolizáló enzimek génexpressziójának változása Panax ginseng extraktum hatására állatkísérletes modellben. NETT XVI. Nagygyűlése, Pécs, 2008. április 17-19. *Magyar Epidemiológia Supplementum*, **5**: 104. (2008)
 20. Amrein Krisztina, Budán F., **Varjas T.**, Nowrasteh G., Pócz V., Raposa B., Ember I.: D-amygalin hatása az onko/szuppresszor gének expresszióira CBA/Ca H-2k egérben. IVth Congress of the Society of the Hungarian Molecular and predictive Epidemiology, Pécs, 28-29 November, 2008. *Magyar Epidemiológia Supplementum* **5**: S.131. (2008)
 21. Amrein K., Budán F., **Varjas T.**, Nowrasteh G., Pócz V., Raposa B., Ember I.: Doxycyclin hatása F344 patkányba transzplantált májtumorra. IVth Congress of the Society of the Hungarian Molecular and predictive Epidemiology, Pécs, 28-29 November, 2008. *Magyar Epidemiológia Supplementum* **5**: S.126. (2008).
 22. Budán F., **Varjas T.**, Nowrasteh G., Amrein K., Pócz V., Raposa B., Ember I.: Diklór-acetát hatása F344 patkányba transzplantált májtumorra. IVth Congress of the Society of the Hungarian Molecular and predictive Epidemiology, Pécs, 28-29 November, 2008. *Magyar Epidemiológia Supplementum* **5**: S.134. (2008)
 23. Budán F., **Varjas T.**, Nowrasteh G., Amrein K., Pócz V., Raposa B., Ember I.: Kémiai karcinogének hatása a c-myc, Ha-ras és p53 gének expressziójára. IVth Congress of the Society of the Hungarian Molecular and predictive Epidemiology, Pécs, 28-29 November, 2008. *Magyar Epidemiológia Supplementum* **5**: S.133. (2008)
 24. Horváth G., Nowrasteh G., **Varjas T.**, Paczona R., H. Westerink, Ember I.: A nyelvcsőrák epidemiológiája: Kelet és Nyugat összehasonlítása. IVth Congress of the Society of the Hungarian Molecular and predictive Epidemiology, Pécs, 28-29 November, 2008. *Magyar Epidemiológia Supplementum* **5**: S.148. (2008)
 25. Gyöngyi Z., Arany I., Nádas E., **Varjas T.**, Ember I.: Policiklusos aromás szénhidrogének képesek megváltoztatni a p38 MAP kináz expresszióját fehérvérsejtekben. IVth Congress of the Society of the Hungarian Molecular and predictive Epidemiology, Pécs, 28-29 November, 2008. *Magyar Epidemiológia Supplementum* **5**: S.147. (2008)
 26. Ember Ágoston, Illényi László, Horváth Örs Péter, Budán Ferenc, **Varjas Tímea**, Kiss István, Németh Árpád, Szanyi István, Göbel Gyula, Ember István: Colorectalis carcinoma miatt műtéten átesett betegek monitorizálása molekuláris biomarkerek felhasználásával Magyar Sebész Társaság Coloproctológiai Szekciójának 2009 évi Kongresszusára február 13-14.

27. Kozsuch Réka, Budán Ferenc, Amrein Krisztina, Nowrasteh Ghodratollah, Bencsik Tímea, **Varjas Tímea**, Ember István: Transz-2-hexenal hatására kialakuló génexpressziós változások citokróm P₄₅₀ géncsalád egyes tagjaiban. Népegészségügyi Tudományos Társaság XVII. Nemzetközi Kongresszusa *Magyar Epidemiológia Supplementum* **6**: S.59 (2009)
28. Pőcz Viktória, Budán Ferenc, Nowrasteh Ghodratollah, Bencsik Tímea, Lőrincz Tibor, **Varjas Tímea**, Ember István: *Aspalathus linearis* génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata Q-RT-PCR-ral, 7,12-Dimethylbenz[a]antracén exponált egerekben Népegészségügyi Tudományos Társaság XVII. Nemzetközi Kongresszusa *Magyar Epidemiológia Supplementum* **6**: S.80 (2009)
29. Pőcz Viktória, Budán Ferenc, Nowrasteh Ghodratollah, Lőrincz Tibor, Bencsik Tímea, **Varjas Tímea**, Ember István: Zöld tea kivonatok hatásának vizsgálata CYP enzimek génexpressziójára 7,12-Dimethylbenz[a]antracén exponált egereken Népegészségügyi Tudományos Társaság XVII. Nemzetközi Kongresszusa *Magyar Epidemiológia Supplementum* **6**: S.81 (2009)
30. Raposa Bence, Budán Ferenc, Lőrincz Tibor, Gyöngyi Zoltán, Kisbenedek Andrea, **Varjas Tímea**, Ember István: A tartrazin génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata DMBA expozíciónak kitett egerekben Népegészségügyi Tudományos Társaság XVII. Nemzetközi Kongresszusa *Magyar Epidemiológia Supplementum* **6**: S.83 (2009)
31. Raposa Bence, Budán Ferenc, Nowrasteh Ghodratollah, Kisbenedek Andrea, **Varjas Tímea**, Ember István: Az azorubin expozíciónak kitett egerekben kialakuló mRNS expressziós mintázat vizsgálata Q-RT-PCR-ral Népegészségügyi Tudományos Társaság XVII. Nemzetközi Kongresszusa *Magyar Epidemiológia Supplementum* **6**: S.84, (2009)
32. Bencsik Tímea, Budán Ferenc, Varjas Tímea, Papp Nóra: A növényi hatóanyagok gyógyászati felhasználásának és toxicitásának tudományos alapjai és irodalmi munkák összegzése Népegészségügyi Tudományos Társaság XVII. Nemzetközi Kongresszusa *Magyar Epidemiológia Supplementum* **6**: S.22 (2009)
33. Budán Ferenc, Gyöngyi Zoltán, Nowrasteh Ghodratollah, **Varjas Tímea**, Ember István: Az E-2-(4-metoxibenzilidén)-1-benzoszuberon hatása a génexpresszióra N-nitrozo-N-metil-karbamiddal exponált egerekben Népegészségügyi Tudományos Társaság XVII. Nemzetközi Kongresszusa *Magyar Epidemiológia Supplementum* **6**: S.27 (2009)
34. Budán Ferenc, Pőcz Viktória, Lőrincz Tibor, Bencsik Tímea, **Varjas Tímea**, Ember István: Zöld- és vörös tea kivonatok 7,12-Dimetilbenz[a]antracén indukálta CYP enzimek génexpressziójának gátlása, állatkísérletben. *Egészségtudomány* **53(2)**: 110 (2009)
35. Budán Ferenc, Dávid Tamás, Bencsik Tímea, Finta Hajnal, **Varjas Tímea**, Ember István: A CoD™ tea fogyasztása növeli a 7,12-Dimetilbenz[a]antracén (DMBA) exponált egerek túlélési idejét. *Egészségtudomány* **53(2)**: 111 (2009)
36. Budán Ferenc, Dávid Tamás, Bencsik Tímea, Finta Hajnal, **Varjas Tímea**, Ember István: A CoD™ tea fogyasztása csökkentette a 7,12-Dimetilbenz[a]antracén (DMBA) indukálta onko/szuppresszor gének expressziójának emelkedését, krónikus állatkísérletben *Egészségtudomány* **53(2)**: 112 (2009)

Nemzetközi folyóiratokban megjelent absztraktok

1. **Varjas T.**, Nadasi E., Pusztai Zs., Ember I., Gyöngyi Z., Durnev A., Kiss I.: Anticarcinogenic effect of bemitil (an antioxidant compound) in a gene expression model *Anticancer Research*. **21**(3A):1620 (2001)
2. I. Ember, I. Kiss, J. Sandor, Cs. Varga, **T. Varjas**, Z. Gyöngyi: The Biomarker conception. Renewal of the molecular and predictive epidemiology. 18th UICC International Cancer Congress. Norway, Oslo 2002 june30-july 5 *International Journal of Cancer*. Suppl. **13**: 148. (2002)
3. Ember I., Kiss I., Sandor J., Nadas E., **Varjas T.**, Gyongyi Z., Nowrasteh G., Varga Cs.: Present and future of the molecular epidemiology. *European Journal of Public Health Suppl.* Program and abstract of the 11th ANNUAL EUPHA Meeting, Rome, Italy 20-22 november (2003)
4. I. Ember, Zs. Faluhelyi, I. Kiss, A. Kvarda, L. Bújdosó, Á. Ember, Á. Németh, A. Csejtei, G. Nowrasteh, **T. Varjas**: Molecular epidemiological biomarkers of the primary prevention of cancer. VII. International Conference of Anticancer Research, Corfu, *Anticancer Research*. **24**(5D): 3479. (2004)
5. **T. Varjas**, G. Nowrasteh, E. Nádasi, V. Virág, A. Simon, B. Gunszt, I. Ember: The early effect of plants extracts on tumor growth due to carcinogen exposure. VII. International Conference of Anticancer Research, Corfu, *Anticancer Research* **24**(5D): 3664. (2004)
6. I. Ember, I. Kiss, Cs. Varga, **T. Varjas**, G. Nowrasteh, E. Nádasi, Á. Németh: Molecular epidemiological biomarkers in risk esesement of cance. The 10th World Congress on Advances in Oncology and 8th International Symposium on Molecular Medicine. 13-15 October, 2005, Hersonissos, Crete, Greece, *International Journal of Molecular Medicine*. **16**: suppl. 1. (2005)
7. I. Ember, L. Puskás, I. Kiss, G. Nowrasteh, I. Prantner, L. Kozma, F. Juhász, **T. Varjas**: Using of DNA-chip methods in early recognition of thyroid tumours (first hungarian study) Hersonissos, Crete, Greece, 12-14 October, 2006. *International Journal of Molecular Medicine*. Supplement **18**: 368. (2006)
8. K. Gombos, **T. Varjas**, É. Polyák, J. Peredi, I. Ember: The effect of aspartam consumption on gene expression „in vivo” biological system. Hersonissos, Crete, Greece, 12-14 October, 2006. *International Journal of Molecular Medicine*, Supplement **18**: 369. (2006)
9. Nowrasteh G., **Varjas T.**, Á. Benkő, Ember I.: The impact of plant extract on gene expression - clinical epidemiological trials. Int. Conf. Recent Advances in Clinical Oncology, 2007. 19-22 February, Al Ain - United Arab Emirates, *Emirates Medical Journal*. **25**(1). suppl. (2007)
10. Ember I., Gombos K., **Varjas T.**, Kiss I., Szele E., Varga Cs., Puskás L., Kozma L., Juhász F., Varga Z., Ember Á.: Characterization of microarray gene expression profiles of thyroid tumors. Int. Conf. Recent Advances in Clinical Oncology, 2007. 19-22 February, Al Ain - United Arab Emirates *Emirates Medical Journal*. **25**(1). suppl. (2007).

11. I. Ember, L. Szabó, I. Kiss, **T. Varjas**, Z. Gyöngyi: Can we increase CD34+ stem cell numbers in circulating peripheral blood using natural compounds in animals? 8th International Conference of Anticancer Research, Greece, Kos 17-22 October, 2008. *Anticancer Research* **28**: 3157-3556, A187, (2008)
12. I. Ember, I. Arany, E. Nádasi, **T. Varjas**, Z. Gyöngyi: P38 MAP kinase as a possible biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. 8th International Conference of Anticancer Research, Greece, Kos 17-22 October, 2008. *Anticancer Research* **28**: 3157-3556, A188, (2008)
13. **T. Varjas**, F. Budán, Á. Ember, K. Amrein, Ó. P. Horváth, L. Illényi, D. B. Antonio, T. Dávid, P. Perjési, E. Pázsit, I. Ember: The Effect of unicaria extract on molecular biomarkers in patients with colorectal cancer. 8th International Conference of Anticancer Research, Greece, Kos 17-22 October, 2008. *Anticancer Research* **28**: 3157-3556, A695, (2008)