

**Olívaolaj, kávé kivonat, japán viaszbogyó kivonat, zöld tea kivonat, polifenol kivonat  
és transzsírsavak hatása a miR-134, miR-132, miR-124-1, miR-9-3 és az mTORC1 gén  
expresszióra in vivo DMBA-kezelt egerekben**

**Doktori (Ph.D.) értekezés**

**Molnár Richárd**



**Pécsi Tudományegyetem Egészségtudományi Kar**

**Egészségtudományi Doktori Iskola**

**Pécs, 2022.**

**PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM**

**EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI KAR**

**EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA**

**Doktori Iskolavezető: Prof. Dr. Bódis József**

**Programvezető: Prof. Dr. Kiss István**

**Témavezető: Prof. Dr. Kiss István**

**Olívaolaj, kávé, japán viaszbogó kivonat, zöld tea, polifenol-kivonat és  
transzzsírsavak hatása a miR-134, miR-132, miR-124-1, miR-9-3 és az mTORC1 gén  
expresszióra in vivo DMBA-kezelt egérmodellben**

**Doktori (Ph.D.) értekezés**

**Molnár Richárd**

**Pécs, 2022.**

# Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék.....	4
1 Bevezetés .....	6
1.1 Környezeti ártalmak .....	7
1.2 Transzsírsavak.....	8
1.2.1 Transzsírsavak ártalmi .....	9
1.3 Kemoprevenció .....	10
1.3.1.1 Gyógyszerek .....	10
1.3.1.2 Étrenddel kapcsolatos anyagok.....	11
1.3.1.3 Védőoltások .....	12
1.3.2 Kemoprevenációs mechanizmusok.....	13
1.3.2.1 Angiogenezis gátlás .....	13
1.3.2.2 Sejtproliferáció gátlás.....	13
1.3.2.3 Tumorszuppresszor gének .....	14
1.3.2.4 Proapoptotikus mechanizmusok.....	15
1.3.2.5 Sejtadhézió fenntartása .....	16
1.4 Kemopreventív élelmiszerek.....	16
1.4.1 Kemopreventív anyagokkal végzett klinikai vizsgálatok .....	18
1.4.1.1 Zöld tea.....	18
1.4.1.2 Japán viaszbogó kivonat.....	18
1.4.1.3 Olívaolaj.....	18
1.4.1.4 Polifenol-kivonat összetevők .....	19
1.4.2 Egyéb anyagok.....	20
1.4.2.1 Kávé .....	20
1.5 MikroRNS-ek és mTORC1 mint biomarkerek .....	21
1.5.1 miR-134 .....	21
1.5.2 miR-132 .....	22
1.5.3 miR-124-1 .....	22
1.5.4 miR-9 .....	23
1.5.5 mTOR.....	24
2 Célkitűzés .....	25
3 Anyag és módszer .....	26
3.1 Használt anyagok: .....	26
3.2 Állatok tartása és kezelése.....	27
3.3 RNS-izolálása .....	27

3.4	Reverz transzkripció polimeráz-lánreakció (RT-PCR) .....	27
3.5	Számítás és statisztikai elemzés .....	28
4	Eredmények .....	29
4.1	Olívaolaj és DMBA kezelés hatása a vizsgált szervekben .....	29
4.2	TFA és DMBA kezelés hatása a vizsgált szervekben .....	31
4.3	Polifenol kivonat és DMBA-kezelés hatása a vizsgált szervekben .....	33
4.4	Zöld tea kivonat és DMBA-kezelés hatása a vizsgált szervekben .....	35
4.5	Kávé kivonat és DMBA-kezelés hatása a vizsgált .....	37
4.6	Japán viaszbogyó kivonat és DMBA-kezelés hatása a vizsgált .....	39
5	Megbeszélés .....	41
5.1	A DMBA ártalmas hatása .....	41
5.2	A TFA ártalmas hatása .....	42
5.3	A vizsgált kemopreventív anyagok hatása .....	42
5.4	Az olívaolaj védő hatása .....	42
5.4.1	Az olívaolaj vízdékony anyagai .....	43
5.4.2	Az olívaolaj zsírdékony anyagai .....	43
5.5	A polifenolok védő hatása .....	44
5.5.1	A myricetin prooxidáns hatása .....	46
5.5.2	A kávé klorogénsav tartalma .....	46
5.5.3	A koffein hatása .....	46
5.5.4	A kávé potenciálisan káros vegyületei .....	46
6	Következtetés és összefoglalás .....	48
6.1	DMBA és kemopreventív anyagok .....	48
6.2	DMBA és a TFA .....	49
7	Új eredmények .....	51
	Irodalomjegyzék .....	53
	Közlemények listája .....	68
	Köszönetnyilvánítás .....	70
	Függelék .....	71

## Rövidítésjegyzék

·OH	Hydroxil free radical
AAPH	2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride
AKT	Protein kinase B
APAF-1	Apoptotic protease activating factor 1
APC	Adenomatous polyposis coli
BCC	Basal cell carcinoma
BCE	Black currant ( <i>Ribes nigrum L.</i> ) extract
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-XL	B-cell lymphoma-extra large
BIRC3	Baculoviral IAP repeat-containing protein3
CAT	Catalase
COX1	Cyclooxygenase-1
COX2	Cyclooxygenase-2
CRD-BP	Coding Region Determinant-Binding Protein
CREB	cAMP response element-binding protein
DMBA	7,12-dimethylbenz [a] anthracene
EGCG	Epigallocatechin-3-gallate
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERK	Extracellular signal-regulated kinas
FAS	Fatty Acid Synthase
FOXA1	Forkhead Box A1
GOT1	Glutamic-oxaloacetic transaminase
GSE	Grape seed extract
GSH	Glutation
GST	Glutathione S-transferase
HBV	Hepatitis B virus
HCC	Hepatocellular carcinoma
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinomas
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IGF2BP1	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 beta
IL-6	Interleukin 6
ITGB1	Integrin beta 1
LNCaP	Lymph Node Carcinoma of the Prostate
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
miRNS	MikroRNS
MMP-2	Matrix metalloproteinase-2
MMP-7	Matrix metalloproteinase-7
MMP-9	Matrix metalloproteinase-9
mRNS	Messenger RNS

mTOR	Mammalian target of rapamycin
mTORC1	Mammalian target of rapamycin complex 1
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NMBA	N-nitroso-metil-benzil-aminnal
NSAID	NonSteroidal Anti-Inflammatory Drug
NSCLC	Non-small-cell lung carcinoma
p57 (KIP2)	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C
PAH	Polycyclic aromatic hydrocarbons
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
pRb	Retinoblastoma protein
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PUFA	Polyunsaturated fatty acids
RB	Retinoblastoma protein
RCC	Renal cell carcinoma
ROS	Reactive oxygen species
RR	Relative risk
Saos-2	Sarcoma osteogenic
SCLC	Small-cell carcinoma
SIRT1	NAD-dependent deacetylase sirtuin-1
SOD	Superoxide dismutase
TFA	Trans fatty acid
TFA	Trifluoroacetic acid
TNF	Tumor necrosis factor
TNF	Transforming growth factor
UBC	Urinary bladder cance
VCAM	Vascular cell adhesion protein
VEGF	Vascular endothelial growth factor

## 1 Bevezetés

A rosszindulatú daganatos betegségek előfordulása és/vagy mortalitása a magas jövedelmű országokban általában csökken [Torre, 2016; Hashim, 2016], de az alacsony és közepes jövedelmű országokban a trendvonal továbbra is enyhe emelkedést mutat [Torre, 2016]. A WHO értékelése szerint a rákos esetek 30-50%-át meg lehetett volna előzni [Danaei, 2005]. A javuló tendencia alapvetően a sikeres primer prevenció, a korai felismerés és a fejlett terápiák eredménye [Torre, 2016]. A rák azonban világszerte továbbra is a második vezető halálok (2018-ban megközelítőleg 9,6 millió halálessettel és 18,1 millió új diagnosztizált esettel) [Bray, 2018], és ezeknek a betegségeknek a legnagyobb a pénzügyi terhe is. A tanulmányból kiderül, hogy hiába az új terápiák, a betegek fele meghal. Az említett felmérésben 185 ország adatait vetették össze 36 különféle ráktípus esetén a Nemzetközi Rákkutató Ügynökség (IARC) által készített, a daganatok előfordulására és halálozására vonatkozó GLOBOCAN 2018 becslések felhasználásával. Az összesített adatok alapján a tüdőrák került a diagnosztizált ráktípusok gyakorisági listájának első helyére (11,6%) és a halálozásért felelős daganatok esetén is elsőként ugyancsak ez a betegség olvasható ki az adatokból a maga 18,4%-ával. Előfordulását tekintve második helyen a női emlőrák (11,6%), majd a prosztatarák (7,1%) és a vastagbélrák (6,1%) szerepel. Mortalitás szempontjából a második a vastagbélrák (9,2%), azt követi a májrák és a gyomorrák egyaránt 8,2%-kal.

A sorrend a két nemnél eltérő. Férfiaknál legnagyobb incidenciát szempontjából a tüdőrákot a prosztatarák, majd a vastagbélrák követi. Nőknél a leggyakrabban diagnosztizált (és haláloknak is tekinthető) ráktípus az emlőrák majd a vastagbél és a tüdőrák következik. Mortalitás szempontjából a második helyen a tüdőrák, majd ezt követi a vastagbélrák. A méhnyakrák mindkét tekintetben a negyedik helyre került. [Bray, 2018], Természetesen az adatok nem teljesen egzaktak, hiszen egyes országokban nem elég korszerű a daganatos (és egyéb más) betegségek nyilvántartási rendszere. Továbbá az is előfordulhat, hogy halálként egyéb más tényező szerepel, de közben a patológiai vizsgálat során manifeszt malignus tumort találnak. Ezért

indokolt, hogy új kemopreventív stratégiák álljanak rendelkezésre a daganatellenes mechanizmusok fokozása érdekében [Hanahan, 2011].

*In vitro* és *in vivo* vizsgálatok alapján bizonyítást nyert, hogy a flavonoidok a daganatképződés esélyét csökkentik [Aggarwal, 2004; Narayanan, 2006]. Epidemiológiai tanulmányok rámutatnak, a zöldségekben és gyümölcsökben gazdag étrend korrelál a szervezet gyulladáscsökkentő, antioxidáns, antiproliferatív, szabadgyökfogó, antiangiogenetikus képességével. [Wallström, 2000; Arts and Hollman 2005; Xiao, 2011].

A daganatos betegségek kialakulásának egyik fő oka a környezeti ártalmak, [Gelboin, 1980; Bosetti, 2002], melyek közül érdemes kiemelni az alkoholfogyasztást, a dohányzást és a nem megfelelő mértékű és összetételű zsírbevitelt [Bosetti, 2002].

Számos epidemiológiai vizsgálat adatai alapján Ázsiában, Európában, Észak-Amerikában is pozitív összefüggéseket mutattak ki a tüdőrák előfordulása és a légszennyezés mértéke között. A túlzott rákkockázat és a genetikai sérülések, mutációk incidenciájának emelkedése a szennyezett kültéri levegőnek kitett kísérleti állatoknál is megfigyelhető volt [Loomis, 2014].

### 1.1 Környezeti ártalmak

Két nagyobb epidemiológiai vizsgálat adatait (Amerikai Egyesült Államok, Spanyolország) elemezve bizonyítást nyert, hogy a dízel kipufogógáz hosszú távú expozíciója urothelsejtes karcinóma (UBC) kialakulásához vezethet ( $p=0,0019$ ) [Koutros, 2019]. A policiklusos aromás szénhidrogének (PAH) elsősorban szerves anyagok tökéletlen égése (pirolízise) során keletkeznek, melyek a levegőből, élelmiszerekből (főként füstölt élelmiszerekből) és többek között dohányfüst belégzése során kerülhetnek az emberi szervezetbe. Az IARC a benzo(a)pirént humán karcinogén, míg a benz(a)antracént (kutatásaink során használt anyag) a lehetséges humán karcinogén csoportba sorolta [NÉBIH, 2021]. A 7,12-dimetilbenz(a)antracént (DMBA) kémiai karcinogént évtizedek óta használják kísérleti állatokon daganatos elváltozások (többek között bőr-, emlő- és petefészek-daganatok) indukálására [Shi, 2019].

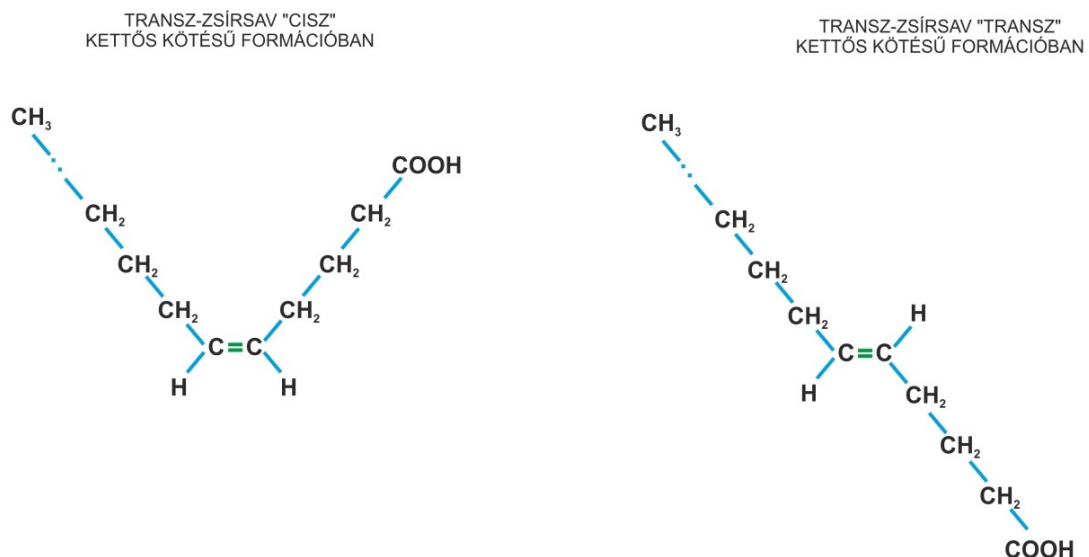


A PAH-ok a széles körben elterjedt környezeti karcinogének egyik osztályát képezik, humán rákkeltő besorolásuk többek között a belőlük keletkező reaktív metabolitok által létrehozott káros DNS-adduktoknak köszönhető [Baird, 2005]. Mindemellett, korábban bebizonyosodott, hogy a dohányosok körében jóval magasabb a DNS-adduktok jelenléte, mint a már nemdohányzók, vagy sohasem dohányzók körében, ami összefüggésbe hozható a tüdőrák kialakulásának kockázatával [Anna, 2009].

A PAH-okon kívül más karcinogén, vagy prokarcinogén anyagok és mechanizmusok is jelen vannak a környezetünkben, táplálékainkban. A kutatásom során alkalmazott transz-3-hexadecénsav – ami egy transzzsírsav (TFA) – is ide sorolható, melynek az állati szervezetekre gyakorolt káros hatását számos tanulmány igazolta [Mozaffarian, 2009; Pelucchi; 2011; Zhuang, 2019].

## 1.2 Transzzsírsavak

A zsírok fogyasztása szükséges a megfelelő energiaellátottsághoz, a sejtalkotók szintetizálásához és többek között a hormonháztartás működéséhez. A telítetlen zsírsavaknak egyik csoportja a transzzsírsavak (TFA), nevüket a szénatomokhoz kapcsolódó hidrogénatomok transz konformációjáról kapták (1. ábra.)



1. ábra: A zsírsavak CISZ és TRANSZ konformációi

Alapvető élelmiszereinkben fellelhetők a TFA-k, mivel jelenlétük a termék fizikai és kémiai tulajdonságait a gyártás szempontjából pozitívan befolyásolják (olvadáspont, állag, feldolgozhatóság stb.). Sajnos az ipari előnyök mellett az egészségre gyakorolt negatív hatásuk is jelentős.

Hazánk egy 2012-es Országos Élelmezés- és Táplálkozástudományi Intézet által készített megelőző jelentés alapján 2015. április 29-én rendeletben [EMMI rendelet, 2015] szabályozta a forgalomba helyezhető termékek transzzsír-sav tartalmát. Ez kimondja, hogy tilos olyan élelmiszert forgalomba hozni, amelyben a végső fogyasztó számára átadott vagy értékesített élelmiszer összes zsírtartalmának 100 grammjában a transz-zsír-savak mennyisége meghaladja a 2 grammot. Továbbá ha több összetevőből álló élelmiszerek esetében:

- a) az élelmiszer összes zsírtartalma kevesebb mint 20%, az élelmiszer összes zsírtartalmának 100 grammjában a transz-zsír-savak mennyisége nem haladhatja meg a 4 grammot, vagy
- b) az élelmiszer összes zsírtartalma kevesebb mint 3%, az élelmiszer összes zsírtartalmának 100 grammjában a transz-zsír-savak mennyisége nem haladhatja meg a 10 grammot.

### **1.2.1 Transzzsír-savak ártalmi**

Egy amerikai 16 éven keresztül folytatott prospektív kohorsz vizsgálat során több mint félmillió ember zsírbevitelét elemezték. A napi TFA-bevitel mennyiségek kvintiliseinek határai 1,41; 1,81; 2,20; és 2,73 energiaszázalék voltak. A felső ( $\geq 2,73$  energiaszázalék) és az alsó kvintilis ( $\leq 1,41$  energiaszázalék) adatainak az összehasonlítása alapján a TFA fogyasztása pozitív összefüggést mutat a mortalitással, a nemre és életkorra normált veszélyarány (HR) alapján (1,03; CI 1,00 – 1,05;  $p=0,0062$ ) [Zhuang, 2019].

Egy másik kutatásban a teljes étrendi TFA bevitelre vonatkozó 7 prospektív tanulmányt, valamint a szérumban TFA-ra vonatkozó 5 tanulmányt elemezték, amelyekben a résztvevők magukat egészségesnek valló 26 évesek vagy ennél idősebbek voltak. Bár a TFA-bevitel nem korrelál az összesített daganatos halálozással, viszont posztmenopauzális nőbetegekben az étkezéssel napi rendszerességgel bevitt TFA és az

emlőrák relatív rizikója (RR) (1,37; 95% CI 1,04-1,81;  $p=0,02$ ) közt pozitív összefüggést találtak [Anjom-Shoae, 2019; Zhuang, 2019]. Három retrospektív eset-kontroll vizsgálatban értékelték a zsírszövetben lévő TFA-szintek és a nem fatális miokardiális infarktus kockázata közötti összefüggést. A metaanalízis rámutat, hogy a TFA étkezéssel bevitt 2 energiaszázalékos növelése a szív-ér rendszeri betegségek rizikóját (RR 1,23 95% CI 1,11-1,37;  $p<0,001$ ) szignifikánsan emelte [Mozaffarian, 2006].

### **1.3 Kemoprevenció**

A kemopreventív anyagok fő daganatellenes hatásmechanizmusai közé tartozik, hogy a sejtekben megakadályozhatják a mutációk megjelentését, a preneopláziás, neopláziás elváltozások kialakulását, a kontrollálatlan proliferációt, apoptotikus mechanizmusok zavarát, míg manifeszt tumorok esetén a progressziót, neovaszularizációt képesek lassítani, gátolni [Steward, 2013]. Jelen áttekintés során ezeket az anyagokat három fő kategóriába soroltuk– gyógyszerek, étrenddel kapcsolatos anyagok, védőoltások–, és bemutatjuk az egyes kategóriák ismertebb képviselőit. Az aszpirin szerepét a vérrögképződés gátlásával [Schrör, 1997] és a vastagbélrák megelőzésével [Jiang, 2020] kapcsolatban kell megemlíteni. Úgy tűnik, a zöldségekben és gyümölcsökben gazdag étrend nagyobb védelmet nyújt, mint az egyedi mikronutriensek [Benetou, 2015].

#### **1.3.1.1 Gyógyszerek**

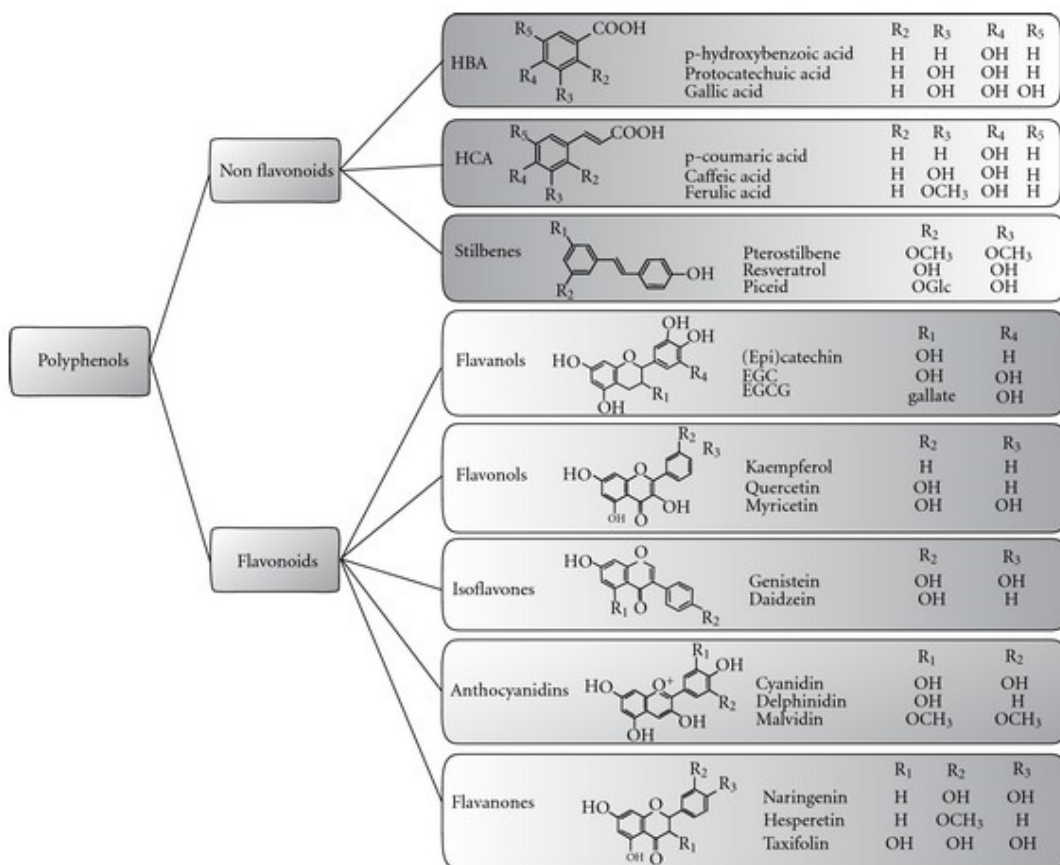
Számos ismert gyógyszer pozitív eredményeket mutat daganatprevenció területén. Mint például az aszpirin és más NSAID-ek (NSAID: NonSteroidal Anti-Inflammatory Drug, nem szteroid gyulladásgátlók) a vastagbélrák esetén [Gray, 2017; Drew, 2017], a tamoxifen és raloxifen emlőrák esetén [Viedma-Rodríguez, 2014; Kim DE, 2015] esetén).

Az aszpirin a leggyakrabban alkalmazott nem szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszer (NSAID), és visszafordíthatatlanul gátolja a ciklooxygenáz-1 és -2 (COX1, COX2) hatását. Az aszpirin fő metabolitja, a szalicilsav, amely egyes gyümölcsökben és zöldségekben is megtalálható. Az aszpirin és a fitokemikáliák kombinációja vonzó, olcsó és alacsony

toxicitású lehetőséget jelent a vastagbélrák megelőzésében, amelynek alkalmazása indokolt lehet, különösen a nagy kockázatú egyéneknél [Pan, 2018].

### 1.3.1.2 Étrenddel kapcsolatos anyagok

Az irodalmi adatok alapján kijelenthető, hogy a nagy flavonoid-bevitel összefüggésben állhat a daganatok kockázatának csökkenésével. Például, egy több mint 10 000 eset és 17 000 kontroll személyt vizsgáló tizennégy különböző daganatra fókuszáló olasz és svájci tanulmány adatai arra utalnak, hogy a nagy gyümölcs- és zöldségfogyasztás kedvező szerepet játszik számos gyakori daganat (különösen az emésztőrendszeri daganattípusok) kockázatának csökkentésében [Turati, 2015]. Tehát, a természetben előforduló fitokemikáliák kemoprevenziós alkalmazásának vizsgálata értékes eredményeket hozhat. Mivel ezen anyagok palettája nagyon széles, ezért a hatóanyagok szerkezet és hatás szerinti megfelelő csoportosítása rendkívül fontos. A legismertebb kemopreventív vegyületcsoportok egyike a fenolos vegyületek, ezen belül a polifenolok csoportja (2. ábra).



2 ábra: A polifenolok csoportosítása [Vauzour, 2012].

Ezen vegyületek kemopreventív hatásukat számos különböző mechanizmuson keresztül fejtik ki, például antioxidánsként és a másodlagos jelátvivők modulálásán keresztül. Jó példa erre a kurkuma (*Curcuma longa*) fűszer- és gyógynövény hatóanyaga a kemopreventív tulajdonságú kurkumin, ami *in vitro* modellek alapján számos esetben azt mutatta, hogy képes gátolni a különféle rosszindulatú daganat sejtvonalak növekedését [Duvoix, 2004; Johnson, 2007]. *In vitro* modellben a kurkumin apoptózist és protektív autofágiát indukált kasztráció-rezisztens prosztatarák sejtvonalon [Yang C, 2017], valamint gyulladáscsökkentő hatást eredményezett az IL-1 $\beta$  gátlása által a nukleáris faktor kappa B (NF- $\kappa$ B) hatásának a csökkentésén keresztül [Shakibaei, 2007]. Ugyanakkor Ara és mtsai. metaanalízise alapján további klinikai vizsgálatok szükségesek a kurkumin potenciálisan malignus szövetekre gyakorolt hatásainak a feltérképezése érdekében [Ara, 2016].

A rezveratrol egy fitoalexin, amely számos növényben (főleg gyümölcsökben, termésekben, például a szőlőben) és a vörösborsban is megtalálható. A rezveratrol kemopreventív hatását alátámasztja, hogy vastagbélrák CaCo-2 sejtvonalon vizsgálva gátolja a proliferációt [Schneider Y, 2000]. Más tanulmányokból az derül ki, hogy a rezveratrol képes leállítani a sejtciklust és apoptózist indukál a rosszindulatú NK sejtekben a JAK2/STAT3 út gátlása révén [Quoc, 2013].

### **1.3.1.3 Védőoltások**

A védőoltások alkalmazása az egyik legsikeresebb módszer az emberi betegségek megelőzésében. A COVID-19 pandémiát megelőzően becslések szerint az oltások évente közel 6 millió halálesetet akadályoztak meg világszerte. Az Egyesült Államokban a fertőző betegségek elleni gyermekkori oltások 99%-kal csökkentették a betegségek előfordulását [Andre, 2008]. Tanulmányok azt mutatják, hogy a hepatitis B (HBV) eredetű hepatocelluláris karcinóma (HCC) kialakulása oltással megelőzhető lehet. A prevenció hatékonyságát egy 6-19 éves gyermekek bevonásával történt tajvani kohorsz vizsgálat is jól bizonyítja. A hepatitis B vírus ellen beoltottak és nem beoltottak vizsgálata azt mutatta, hogy a HCC előfordulása szignifikánsan alacsonyabb volt a hepatitis B ellen beoltottak esetében (64 HCC 37 709 304 oltott személyben, míg 444 HCC a 78 496 406 be nem oltottnál; életkor és nem szerint korrigált relatív kockázat

0,31,  $p < 0,001$ , a születéskor oltott személyek esetében). A beoltott kohorszok esetében statisztikailag szignifikánsan összefügg a hiányosan beadott HBV-oltással (azoknál, akik háromnál kevesebb HBV-vakcinát kaptak (OR=4,32, 95%-os, CI=2,34-7,91), prenatális anyai HBsAg szeropozitivitással (OR=29,50, 95% CI=13,98-62,60); [Chang, 2009]. Egy másik tanulmányban három randomizált klinikai vizsgálat kombinált elemzését végezték átlagosan 3 éves utánkövetéssel, melyben 18 174 16-26 éves nő vett részt. Az eredmények azt mutatják, hogy a humán papillomavírus (HPV) elleni vakcinák a fertőzés megelőzésével összefüggésben hatékonyak lehetnek a társuló méhnyak, vulva és hüvely intraepithelialis neoplaziák megelőzésében [Joura, 2007].

### **1.3.2 Kemoprevenációs mechanizmusok**

#### **1.3.2.1 Angiogenezis gátlás**

Az angiogenezis, az új erek képződését jelenti, ami elengedhetetlen a tumor növekedéséhez [Tozer, 2005], inváziójához és áttétek képződéséhez. Bebizonyosodott, hogy egyszerű étrendi flavonoidok mint például a luteolin, amely gyümölcsökben és zöldségekben található meg, képes gátolni az angiogenezist, például Sprague–Dawley patkány aorta gyűrűs modellben ( $p < 0,05$ ) és leghorn tojás modellben ( $p < 0,05$ ) [Pratheeshkumar, 2012]. Az eredmények azt mutatják, hogy a luteolin jelentősen gátolja a Vascular endothelial growth factor (VEGF)-stimulált endothelsejtek proliferációját, migrációját, és egyes esetekben apoptózist indukálhat [Pratheeshkumar, 2012]. A luteolin gátló hatással volt a mátrix metalloproteinázok (MMP-2 és MMP-9) aktivációjára. Western-blot-analízis azt mutatta, hogy a luteolin elnyomta a VEGF-receptor 2-t és az AKT, ERK, mTOR, P70S6K, MMP-2 és MMP-9 fehérje kinázainak VEGF-indukálta foszforilációját emberi köldökzsinór eredetű endothelsejtekben [Pratheeshkumar, 2012]. Az IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 és a TNF-a gyulladáscsökkentő citokinek szintje ugyancsak jelentősen csökkent a luteolin hatására PC-3 humán prosztatarák-sejtekben [Pratheeshkumar, 2012].

#### **1.3.2.2 Sejtproliferáció gátlás**

A proliferációs egyensúly megtartásában számos finoman szabályozott mechanizmus vesz részt [Cooper, 2012]. Amennyiben ez a szabályozás a sejtosztódás irányába

tolódik, nő az esélye a neoplázia kialakulásának. Fontos kemopreventív célterület lehet a tumorsejtek proliferációjának gátlása, hiszen ez egyben a daganat növekedésének is a gátját jelenti [Evan, 2001]. A flavonoidok többféle tumorelles hatással bírnak: gátolják a reaktív oxigén gyökök (ROS) sejtkárosító hatását, serkentik a ROS elimináló enzimek aktivitását, részt vesznek a sejtciklus leállításában, apoptózist, autofágiát váltanak ki, és elnyomják a rákos sejtek proliferációját, valamint csökkentik az invázió esélyét [Kopustinskiene, 2020]. PC-3 és LNCaP humán prosztatarák-sejtvonalakban a naringenin gátolta a proliferációt és a migrációt, valamint ROS-t indukált a daganatsejtekben, ami proapoptotikus szignálként aktivált apoptotikus mechanizmusokat [Lim, 2017; Redza-Dutordoir, 2016]. Egy izoflavonoid, a genistein koncentrációfüggő módon gátolta az ER $\alpha$  útvonalat és apoptózist indukált. A folyamat eredményeként szignifikánsan csökkent az MCF-7 humán emlődaganatsejtek osztódása [Choi, 2014]. Egy másik kutatásban a kvercetin a p53-expressziótól függetlenül is csökkentette HepG2 HCC sejtek proliferációját, az intracelluláris ROS-koncentráció csökkentésével [Jeon, 2019]. Egy másik prosztatarákkal kapcsolatos tanulmányban a metformin és a kvercetin szinergikus hatását bizonyították ugyancsak PC-3 és LNCaP-sejtek esetén. Az eredmények azt mutatták, hogy a malignusan transzformált sejtek szaporodása szignifikánsan csökkent a VEGF/PI3K útvonal gátlása révén, továbbá a két anyag kombinációja apoptózist indukált Mcl-1, Bcl-2 és Bcl-XL anti-apoptotikus Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) fehérjék elnyomásán keresztül [Sun S, 2018].

### **1.3.2.3 Tumorsuppresszor gének**

A genom őrzőjeként is nevezett p53 gén egy nukleáris transzkripciós faktor és egyben pro-apoptotikus funkcióval is bír. A legismertebb tumorsuppresszorok közé tartozik, mivel az emberi daganatos betegségek több, mint 50%-ánál funkcióvesztő mutációk következnek be ezen génben [Ozaki, 2011].

A p53 fehérje főbb funkciói közé tartozik többek között a DNS-repair enzimek aktiválása [Smith, 1995], G<sub>1</sub>/S-átmenet és G<sub>2</sub>/M-átmenet blokkolása a sejtciklus során [Gottlieb, 1998] és a programozott sejthalál kiváltása [Pietsch, 2008]. A p53-mal kapcsolatban álló p21, mely egy erős ciklinfüggő kináz inhibitor gén [Harper, 1993; Vogelstein, 2000], kulcsszerepet játszik a sejtciklus leállításában így a proliferáció

gátlásában, tumorszuppresszálo hatását már számos daganattípus esetén bizonyították [Sun X, 2018; Parveen, 2016, Gartenhaus, 1996]. Megfigyelt, hogy a p21 (a p53-mal komplexet alkotva) szabályozza a malignusan transzformált sejtek invázióját és apoptózist olyan fehérjék upstream regulátoraként, mint a Bcl-2 [Kim, 2017]. A P21 fokozott expressziója gátolja mind az emberi májdaganatsejtek, mind a kémiai indukált egér májdaganatsejtek szaporodását [Hui, 2008], apoptózist vált ki prosztata daganat esetén [Eastham, 1995]. Továbbá a p21 gén célzott inaktiválása fokozza a mutálódott APC (Adenomatous polyposis coli) által iniciált vastagbél daganat képződését és fokozza a nyugati stílusú, nagy kockázatú étrend onkogén mechanizmusait azáltal, hogy megváltoztatja a sejtek érését a bélnyálkahártyában [Yang, 2001].

A vastagbélrák a gyakori daganattípusok közé tartozik, kialakulása sok esetben az APC-gén mutációjával (és egyben inaktiválódásával) áll szoros kapcsolatban. Az APC fehérje több funkció mellett fontos szerepet tölt be a sejtadhéziós kapcsolatok fenntartásában, így gátolva a proliferációt és megtartva a normál sejtstruktúrát az extracelluláris mátrixban [Lesko, 2015; Markowitz, 2009; Bienz, 2004]. A kolorektális tumorok esetén a legtöbbször a mutálódott APC-génben a béta-katenin-kötő régiók hiányoznak, továbbá sérül a Wnt-szignalizáció szuppressziója, ami a tumorsejtek burjánzásához vezet [Senda, 2005]. A funkcionális APC fehérje elvesztése a béta-katenin felhalmozódását eredményezi és a Tcf/Lef transzkripció faktor komplex expressziója által számos célgén, köztük a cyclin D1, c-myc és CRD-BP transzkripcióját aktiválja [Kwong, 2009, Kámory, 2008]. A béta-katenin mutáns formáit azonosították vastagbélrákban, melanómában, medulloblasztómában, prosztatarákban, valamint gyomor- és hepatocelluláris karcinómában is [Tetsu, 1999]. Egy másik ismert, több funkcióval bíró gén a Retinoblastoma (RB), szerepét a DNS helyreállításában, a telomer régió karbantartásában, a kromoszóma kondenzációjában és kohéziójában, valamint az ismétlődő régiók elnémításában mind megtalálhatjuk. Karcinogenezist gátló hatását elsősorban az E2F transzkripció faktor inaktiválása által fejti ki [Vélez-Cruz, 2017].

#### **1.3.2.4 Proapoptotikus mechanizmusok**

A többsejtű élőlények legtöbb sejtje képes elpusztulni szigorúan szabályozott mechanizmuson keresztül, melyet apoptózisnak nevezünk. A daganat progressziója a



kontrollálatlan sejtszaporulat következménye, mely folyamat egyik kulcstényezője az apoptotikus funkció elvesztése. Az apoptózisért felelős proapoptotikus gének (Bad, Bak, Bax) és az apoptózist gátló antiapoptotikus gének (Bcl-2, Bcl-XL) fehérjéi különféle heterodimerek képzésével módosítják egymás hatását, és ezen molekulák egyensúlyának eltolódása indítja el az apoptózist [Martin, 1998]. Az apoptózisra való képesség elvesztése minden esetben valamely mutáció eredményeként jön létre. Amennyiben a mutáció –vagy halmazott mutációk– eredményeként hibás géntermékek szintetizálódnak, az a neoplasztikus sejtek populációjának nagyarányú osztódásához vezethet [Igney, 2002]. Sőt sok esetben a sejt rezisztenssé válhat az alkalmazott kemoterápiával szemben [Igney, 2002].

#### **1.3.2.5 Sejtadhézió fenntartása**

A normál sejt-sejt és sejt-extracelluláris mátrix adhéziós kapcsolatok megléte fontos alapját képezi a szervek egészséges homeosztázisának. Ezeket a kapcsolati kölcsönhatásokat biztosító molekulák (kadherineket, integrineket, szelektineket és immunglobulinokat) mutációi a tumorok kialakulásában jelentősek [Canel, 2013]. Például a bőr rosszindulatú daganatainak kialakulása során a sejtek elveszítik az integrinek által közvetített kapcsolatukat az extracelluláris mátrixszal. Ez a folyamat a daganatok 4%-ánál fordul elő [Janiszewska, 2020]. Más okok is előidézhetik az adhézió megváltozását, például az E-kadherin expressziójának csökkenése a promóter-metiláció miatt, vagy más transzkripciót represszáló hatás következményeként [Janiszewska, 2020]. Az EGCG A375 humán rosszindulatú melanomasejtvonalra gyakorolt hatását vizsgálták 1, 5, 10 és 20 µg/ml koncentrációban 24, 48 és 72 órán át. Az eredmények azt mutatták, hogy az EGCG jelentősen képes növelni az E-kadherin expresszióját idő- és koncentrációfüggően ( $p < 0,05$ ) így csökkentve a malignusan transzformált sejtek migrációját [Wu, 2008].

#### **1.4 Kemopreventív élelmiszerek**

A kemoprevenció legegyszerűbb módja, olyan bioaktív vegyületeket tartalmazó élelmiszerek fogyasztása, melyek potenciálisan előnyösek lehetnek az egészségre nézve. Ilyenek például flavonoidok, karotinoidok, stilbének, lignánok és fenolsavak [Xu, 2017; Shashirekha, 2015]. Kimutatták, hogy a táplálkozás kulcsfontosságú szerepet

játszik egyes krónikus betegségek, többek között a rák megelőzésében, így az egészséges étrend egyik fő jellemzője a flavonoidokban gazdag zöldség- és gyümölcsfogyasztás lehet [Abotaleb, 2018; Rodríguez-García, 2019]. Egy tanulmányban a kvercetin és a luteolin mint étrendi flavonoidok hatását vizsgálták vastagbél-tumor sejtvonalon (CO115, HCT15) timidilát-szintáz inhibitorként funkcionáló 5-fluorouracillal együtt. A kezelés hatására megnövekedett p53 expresszió és apoptózis volt megfigyelhető [Xavier, 2011]. Ez jó példa arra, hogy bizonyos esetekben érdemes a fitomedicinát a modern kemoterápiával együtt alkalmazni.

A flavonoidok ígéretes kemopreventív anyagoknak tekinthetők az apoptózis aktiválásának a szempontjából is, hiszen könnyen hozzáférhetőek és több mechanizmust indukálva/gátolva képesek a daganat fejlődésének esélyét csökkenteni. Több étrendi flavonoidról (luteolin, kvercetin, kaempferol) bebizonyosodott, hogy a sejtnövekedéshez elengedhetetlenül szükséges zsírsav-szintetáz (FAS - Fatty Acid Synthase) kódoló gén gátlásával már 24 óra alatt képesek programozott sejthalált indukálni prosztaták és emlőtumor sejtekben [Brusselmans, 2005]. Széles körben fogyasztott, jótékony hatású, antioxidáns az olívaolaj. Ez az alapvető ételiszor daganatellenes, olajsavban gazdag és kb. 10% linolsavat is tartalmaz [Lipworth, 1997; Owen, 2000]. Gyakran fogyasztott kemopreventív hatású ételek, italok még: a feketekávé, a zöld tea és a gyümölcsök. A flavonoidok közül a zöldtea (*Camellia sinensis*) legpotensebb katekinje az EGCG [Huang, 2016; Landis-Piwowar, 2007; Iso, 2007]. Ismert polifenolok mint a myricetin (3, 5, 7, 3', 4', 5'-hexahidroxiflavon) [Knekt, 2002] és a rezveratrol (3, 5, 4'-trihidroxistilbén), valamint annak prekursora, a piceid (3,5,4'-trihidroxistilbén-3-O-D-glükopiranozid) [Aggarwal, 2004] ugyancsak ígéretes vegyületeknek tűnnek a kemoprevenció területén. Bogyós gyümölcsökben és többek között a szőlőben található fenolos antioxidáns rezveratrol gátolja a prosztaták képződését azáltal, hogy egyes sejtciklust szabályozó génekre, például a p53-ra van hatással. Ezen mechanizmus eredményeként aktiválódnak a sejtciklusban és az apoptózisban részt vevő gének kaskádjai, beleértve a p300, APAF-1, cdk inhibitor p21, p57 (KIP2), p53 indukálta Pig 7, Pig 8, Pig 10, ciklin D, DNS fragmentációs faktor 45 [Narayanan, 2006]. Bár a rezveratrol polifenol és a flavonoidok közül a katekin és a kvercetin felszívódása is alacsony [Goldberg, 2003], de ennek ellenére ígéretes

antikarcinogén eredményeket mutattak *in vitro* és *in vivo* kísérletekben egyaránt [Smoliga, 2011].

#### **1.4.1 Kemopreventív anyagokkal végzett klinikai vizsgálatok**

##### **1.4.1.1 Zöld tea**

A zöld tea Ázsiában kedvelt és gyakran fogyasztott ital, mely világviszonylatban az összes tea fogyasztás 20%-át teszi ki [Siddiqui, 2004]. A zöld tea rendszeres és nagy mennyiségű fogyasztása számos tanulmány szerint csökkenti a tumorképződés esélyét. Az eredmények szerint a májtumor kialakulásának kockázata szignifikánsan alacsonyabb volt a zöld teát rendszeresen fogyasztó ázsiai nők körében, akik napi legalább 5 csészével fogyasztottak [Huang, 2016], míg egy másik, 103 097 személy adatait felhasználó tanulmányban a prosztatatarákkal szembeni protektív hatását bizonyították, ugyancsak ázsiai populációkban [Zheng, 2011].

##### **1.4.1.2 Japán viaszbogó kivonat**

Táplálkozási felmérések alapján a magas myricetin tartalmú ételek (például japán viaszbogó) fogyasztása csökkentette a prosztatatarák relatív kockázatát. A myricetint fogyasztó férfiak legnagyobb (0,20 mg/nap fölött) és legkisebb (0,03 mg/nap alatt) kvartilisei között az RR=0.43 (95% CI: 0,22, 0,86;  $p=0,002$ ) volt, 5 218 veszélyeztetettel és 95 esettel [Knekt, 2002].

##### **1.4.1.3 Olívaolaj**

Az olívaolaj védő hatását tanulmányozva, Pelucchi és munkatársainak metaanalízise szerint a vizsgált legkisebb és a legnagyobb mennyiségű olívaolajat tartalmazó ételt fogyasztó kvartilisbe tartozó populációk közt az összesített relatív rizikó az emlőrákra nézve 0,62 (95% CI 0,44-0,88) volt [Pelucchi, 2011]. Egy másik tanulmány szerint az olívaolaj-fogyasztás szignifikánsan csökkentette a tüdőrák kialakulásának az esélyét (OR: 0,65; 95% CI: 0,42–0,99;  $p<0,05$ ) [Fortes, 2003]. Bosetti és mtsai. eset-kontroll vizsgálata szerint a napi 42,9 gramm olívaolajat fogyasztó felső kvartilis és a napi 3,2 gramm alatt fogyasztó alsó kvartilis közt szignifikáns különbség volt a gégeráktól védő hatásra nézve (OR: 0,4 95% CI: 0,3–0,7;  $p=0,01$ ) [Bosetti, 2002]. Szintén eset-kontroll vizsgálatban statisztikailag szignifikáns inverz dózis-hatás összefüggést találtak a

hólyagrák kialakulásának az esélye és az olívaolaj-fogyasztás mértéke közt, az olívaolajat napi 1,6 gramm alatt fogyasztó alsó tercilis és a középső tercilis (OR: 0,62; 95% CI: 0,39-0,99) valamint az alsó és a napi 3,9 gramm felett fogyasztó felső tercilis (OR: 0,47; 95% CI: 0,28-0,78; p-trend=0,002) közti adatok összehasonlítása alapján [Brinkman, 2011].

#### 1.4.1.4 Polifenol-kivonat összetevők

Az elmúlt évtizedek kutatásai során igazolódni látszott, hogy az egészségi állapot összefüggésbe hozható a polifenolokban és egyéb, a növényvilágban található bioaktív vegyületekben gazdag ételek fogyasztásával. Kutatásunkban egy több komponensű keveréket alkalmaztunk, mely alkotóiról egyenként feltételezhető, hogy pozitív módon hatnak az emberi egészségre.

- a) Egy Mohansrinivasan és mtsai. által végzett kísérletben, melyben a szőlőmagokból kivont hatóanyagokat (GSE) vizsgáltak, sikerült bizonyítani a kivonat citotoxikus hatását az A431 bőrrákos sejtvonalakra vonatkoztatva 500 µg/ml koncentrációban [Mohansrinivasan, 2015]. Ez a koncentráció a vizsgált bőrrák-sejtvonalak 50%-át volt képes elpusztítani. Több tanulmányban kimutatták a GSE antioxidáns, daganatellenes és gyulladáscsökkentő aktivitását [Li, 2008; Chen, 2012]. Egy másik tanulmányban a szőlőtörköly (szőlő szára, magja és héja) vastagbél tumor sejtvonalra (Caco-2, HT-29) gyakorolt kemopreventív hatását tapasztalták, mely antiproliferációs mechanizmus a MYC gén HT-29 sejtekben történő downregulációján és a Caco-2 sejtekben történő Ptg2 upregulációján keresztül valósult meg [Pérez-Ortiz, 2019].
- b) Egy I. fázis vizsgálat során a rezveratrol és liofilizált szőlőőrlemény szignifikánsan gátolta (n=8,  $p<0,03$ ) a *WNT* onkogén expresszióját a vastagbél nyálkahártyájában. A legnagyobb hatást a *WNT* expressziójára 80 g szőlőőrlemény napi bevitele után tapasztalták ( $p<0,001$ ) [Nguyen, 2009].
- c) A szeder (*Rubus fruticosus L.*) gyümölcse nagy mennyiségben tartalmaz többféle növényi anyagot, például vitaminokat, ásványi anyagokat, antioxidánsokat és élelmi rostokat [Muhammad, 2014], melyek nélkülözhetetlenek az emberi egészség általános fenntartásához. *In vivo* vizsgálatok azt mutatják, hogy a szeder fogyasztása N-nitrozo-metil-benzil-

aminnal (NMBA) kezelt Fischer 344 patkányokban csökkentette a premalignus nyelőcsőhámsejtek növekedését [Stoner, 2006]. Más vizsgálatok szerint a gyümölcs extraktumát alkalmazva koncentrációfüggően csökkent a 2,2'-azobis(2-amidinopropán) dihidroklorid (AAPH) által indukált intracelluláris peroxil szabad gyökök képződése, emberi INT-407 humán bélsejtekben [Zia-UI-Haq, 2014].

- d) A fekete ribiszke (*Ribes nigrum* L.) kivonat (BCE) hatását vizsgálták egy kísérletben, melynek célja a kivonat antiproliferatív aktivitásának bizonyítása a gyomorrák SGC-7901 sejtjeivel szemben. A BCE dózis- és időfüggő módon gátolta az SGC-7901 sejtek szaporodását, továbbá inverz fluoreszcens mikroszkópokkal végzett morfológiai megfigyelések igazolták a BCE hatását a sejtekre: a citoplazmatikus szálak képződésére, a nukleáris kromatin kondenzációjára és az apoptózisra. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a fekete ribiszke hozzájárulhat a gyomorrák kockázatának csökkentéséhez [Najia, 2012].

A felnőttkori súlygyarapodás megelőzése napjainkban közegészségügyi kihívás. Az eritrit egy cukorpótló energiamentes édesítőszer, melynek a korábbi vizsgálatok szerint nincs endogén szintézise. 2020-ban elsőként bizonyították, hogy az orálisan fogyasztott magas ozmolaritású eritrit fogyasztása képes kiváltani a jóllakottság érzetet és csökkenteni a ghrelinszintet [Sorrentino, 2020].

## **1.4.2 Egyéb anyagok**

### **1.4.2.1 Kávé**

Annak ellenére, hogy a kávéfogyasztás egészségre gyakorolt hatásaival kapcsolatban mai napig ellentmondásos adatok vannak, a világon az egyik leggyakrabban fogyasztott ital a víz után, és kereskedelme meghaladja az évi 10 milliárd USD-t világszerte [Butt, 2011]. Többek között e tények miatt került bele a kávé vizsgálati anyagok közé. A kávé (*Coffea arabica*) tumorgenezis szempontjából legfontosabb alkotóelemei a koffein, a klorogénsav, a hidroxifahéjsav, a melanoidok, melyek bizonyítottan tumorszuppresszor hatást fejtenek ki [Gaascht, 2015]. A kávé pörkölésénél tapasztalt Maillard-reakciók révén azonban (a melanoidinok mellett) [Hu, 2019] nyomokban

akrilamid is képződik, amit az IARC emberben valószínűleg karcinogén hatású anyagnak (2A kategória) minősített [IARC, 2011]. Továbbá szintén potenciálisan ártalmas hatású furán is keletkezik a pörkölés során [Gruczyńska, 2018; Hu, 2019]. Azonban az előbbieknek részben ellentmondó irodalmi adatok alapján, a kávé- és teafogyasztás gyenge mértékben védő hatású lehet a korán megjelenő bazális sejtes karcinóma (BCC) esetén, részben a koffeinnek köszönhetően [Ferrucci, 2014].

## **1.5 MikroRNS-ek és mTORC1 mint biomarkerek**

A mikroRNS-ek (miRNS) a messenger RNS-ek (mRNS) 3' UTR-jéhez (*untranslated region* – azaz nem transzlálódó régió, ami a transzláció szabályozásában vesz részt) kötődnek és így csökkentik a mRNS-ek transzlációját – és ezen keresztül géneket lecsendesítve befolyásolják a fehérjeszintézist, a sejtciklust [Du, 2010], az apoptózist, vagy akár a sejt differenciálódást [Vannini, 2013]. Mivel számos betegség kialakulásában szerepet játszhatnak, a miRNS-ek korai molekuláris epidemiológiai biomarkerekként szolgálhatnak a rosszindulatú daganatok kimutatására [Luk, 2011].

### **1.5.1 miR-134**

A TFA-k oxidatív stresszt és lipid-peroxidációt is okoznak [Bartsch, 2000], ami bizonyos miRNA-k (például a miR-134) expressziós mintázatára is kihat. A miR-134 részt vesz a tumorsejtek proliferációjának, az apoptózisnak, az invázióknak és a metasztázis képződésének is a szabályozásában [Pan, 2017]. A miR-134 tumorszuppresszorként ismert, mivel direkt módon lecsendesíti a KRAS onkogént, valamint az integrin beta 1 (ITGB1) onkogént is [Yin, 2013; Zha, 2014], mely gének működése a malignus transzformációt és a malignizált sejtek proliferációját is elősegíti [Schooley, 2012] és ez többek között vesesejtes karcinómához (RCC) vezethet [Liu Y, 2015]. A miR-134 expressziója gátolja a gliomasejtek proliferációját, invázióját és apoptózist indukált a PI3K jelátviteli út elnyomásán keresztül [Qi, 2019]. A miR-134 overexpressziója a kolorektális tumorsejtek szaporodásának és növekedésének visszaszorítását eredményezte. Továbbá a miR-134 növelte a kissejtes tüdő daganat (SCLC) sejtekben az apoptózist, míg az ezt követő anti-miR-134 kezelés inverz eredményeket mutatott [Sun, 2016]. Ez utóbbi összefüggés azzal magyarázható, hogy a miR-134 nem érvényesült a BCL-2 downregulációjában, így a BCL-2 antiapoptotikus hatása

érvényesülni tudott. Tehát e tanulmány alapján a miR-134 tumorszuppresszorként funkcionál [Pan, 2017]. Valóban a miR-134 overexpressziója gátolja a proliferációt, migrációt és inváziót, valamint apoptózist indukál az MG63 és a Saos-2 osteosarcoma sejtvonalakban, a VEGFA és a MYCN-en keresztül [Ma, 2020].

### **1.5.2 miR-132**

A miR-132 gátolja a HCC proliferációját az AKT/mTOR jelátviteli út inaktiválásával [Liu K, 2015], valamint az IL1 $\beta$  és IL6 expresszió gátlásával a P300 transzkripció koaktivátor gátlásán keresztül [Lagos D, 2010]. Egy vizsgálatban 30 betegől vett emlőtumor mintákban a miR-132 legalább részben elnyomta az emlőrák sejtjeinek proliferációját a FOXA1 gén gátlása által. Egy másik tanulmányban a miR-132 részleges antiproliferatív hatást mutatott a FOXA1 gén gátlása által emlőtumor sejteken. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a miR-132 és a FOXA1 potenciális biomarkerek vagy terápiás célpontok lehetnek emlődaganat esetén [Wang, 2018].

Park és mtsai. eredményei arra mutattak rá, hogy humán hasnyálmirigy-adenokarcinómában (PDAC) a miR-132 és a miR-212 expressziója szignifikánsan megemelkedett és a tumorszuppresszor hatású retinoblasztoma fehérjét (pRb) gátolva fokozott sejtproliferációt eredményezett [Park, 2011].

Továbbá Formosa és mtsai. vizsgálata alapján a miR-132 CpG szigetei metilálódtak a prosztatadaganatokban, ami a miR-132 expresszió lecsendesítéséhez vezetett. A miR-132 így bekövetkező szuppressziója pozitív korrelációt mutat a daganatok kedvezőtlen klinikai kimenetelével [Formosa, 2013].

### **1.5.3 miR-124-1**

Az irodalmi adatok alapján a miR-124-1 az anti-apoptotikus BIRC3 (Baculoviral IAP Repeat Containing 3) protein, a C-MYC onkogén és az NF- $\kappa$ B jelátviteli út szabályozásával gátolja a HCC proliferációját és migrációját [Cao, 2018]. Emellett a CASC3 (Cancer susceptibility candidate 3) fehérje a miR-124-1 közvetlen célpontja, így a miR-124-1 elnyomja a tumorgenezist HCC esetén azáltal, hogy gátolja a CASC3 gén expresszióját [Xu, 2016]. A miR-124 biomarkerként ígéretes vizsgálati terület, ugyanis

bebizonyosodott, hogy expressziója jelentősen alacsonyabb a rosszindulatú prosztatasejtekben a jóindulatú sejtekhez képest, és ezzel egyidejűleg a miR-124 expresszió emelkedése gátolta a prosztaták sejtek növekedését *in vitro* és *in vivo* [Shi, 2013]. Zhao és mtsai. fej- és nyaki laphámsejtes karcinómákban (HNSCC, Head and neck squamous cell carcinomas) lévő mikroRNS-ek expressziós profiljának elemzésével azt találták, hogy a miR-124 expressziós szintje daganatokban 4,59-szer alacsonyabb volt, mint normál szövetekben. A miR-124 expressziójának növelése azonban jelentősen gátolta a sejtproliferációt és csökkent tumor növekedéshez vezetett, ami a miR-124 tumorszuppresszor hatását jelzi [Zhao, 2017].

#### **1.5.4 miR-9**

Korábbi kutatások rávilágítanak, a miR-9 és számos rosszindulatú daganat kapcsolatára, beleértve a humán HCC-t és a gyomorrákot (GC). Vizsgálatok során bebizonyosodott, hogy a miR-9 a HCC progressziójában tumorszuppresszorként működik, olyan jelátviteli útvonalakat gátolva, mint a miR-9/IGF2BP1/AKT és ERK útvonal, ezáltal potenciális terápiás célpont és új prognosztikai biomarker lehet a HCC betegek számára [Zhang, 2015]. Kiderült, hogy a miR-9 az NF- $\kappa$ B gátlásán keresztül szabályozza a gyomorrák sejtjeinek proliferációját, ami arra utal, hogy a miR-9 tumorszuppresszor aktivitást mutat az emberi gyomorrák patogenezisében [Wan, 2010]. A ferroptosis a szabályozott sejthalálnak egy vasfüggő oxidatív formája, aminek a szabályozásában részt vesz a miR-9 a melanomasejtekben azáltal, hogy az overexpressziója elnyomja a glutamin-oxálecetsav-transzamináz-1 (GOT1) kifejeződését. A GOT1 említett gátlása csökkentette az erasztin- és RSL3-indukálta ferroptosist. A miR-9 szuppressziója viszont növelte a melanomasejtek érzékenységét az erasztin és RSL3 iránt, így növelve a ferroptosist [Zhang, 2018]. Gliomákban a mikroerek sűrűsödését és a miR-9 túlzott expresszióját figyelték meg. A miR-9 közvetlen célpontjai a COL18A1, THBS2, PTCH1 és PHD3 voltak. A miR-9 tehát a glioma patogenezisében fontos szerepet játszik, a közvetlen célpontok meghatározásával azonosíthatók a rosszindulatú fenotípusok [Chen, 2019]. NSCLC-ben a miR-9 mennyisége körülbelül 10-szer magasabb szintre emelkedik a normál szövetekhez képest, és a növekedése összefüggést mutatott a daganat progressziójával. Emlőrákban ugyancsak növekszik a miR-9 expressziója és ez szintén a betegség



progressziójához kapcsolódik. Ezeknél a daganattípusoknál a miR-9 expressziója felhasználható a betegség prognózisának előrejelzésére [Khafaei, 2019].

### **1.5.5 mTOR**

Az mTOR (mammalian target of rapamycin) fehérje pontosan 289 kDa-os szerin-treonin kináz, amely a foszfo-inozitol-3-kináz (PI3K) rokon kináz családjába tartozik és két különálló multi-protein komplexből, az mTOR 1 komplexből (mTORC1) és az mTOR 2 komplexből (mTORC2) áll. Ez a fehérje fontos ellenőrző szerepet tölt be, mivel olyan alapvető mechanizmusokra van hatással, mint a transzkripció, a transláció, a fehérjék degradációja, a sejtszignálok, az anyagcsere és a citoszkeleton dinamikája. Az mTOR működési rendellenességei összefüggésbe hozhatók olyan idegrendszeri betegségekkel, mint az Alzheimer-kór, Parkinson-kór, epilepszia [Switon, 2016]. Továbbá az mTOR jelátviteli utat aktiváló mutációkat már az emberi rosszindulatú daganatos betegségek széles körében azonosították [Sato, 2010; Karar, 2011] többek között RCC-ben is [Battelli, 2011]. A sejtek proliferációjához a tápanyagokra reagáló jelek aktiválása szükséges és ennek a folyamatnak az egyik fő koordinátora az mTOR. Noha számos gyógyszerfejlesztés történt az mTOR gátlására, a lehetőségek korlátozottnak tűnnek, egyrészt mivel az mTOR számos visszacsatolási szignálban játszik szerepet, másrészt mert például a leukémia őssejtjei túlélhetik az mTOR inhibíciót [Hirao, 2015].

Tehát a miR-9, miR-124, miR-132 és a miR-134 is közvetetten az NF- $\kappa$ B és az AKT/mTOR jelátvivő utak gátlásán keresztül daganatellenes hatásúak [Liu, 2015; Zha, 2014; Cao, 2018; Zhang, 2015]. Az mTOR jelátvivő fehérje a proliferációs ciklus szempontjából kulcsfontosságú, és számos hatás befolyásolja a kifejeződését. Így felmerül a kérdés, hogy vajon a vizsgált miR-ek mellett az mTOR expressziója használható lehet-e karcinogén és kemopreventív hatások biomarkereként, vagy nem?

## 2 Célkitűzés

Jelen állatkísérletben négy miRNS (miR-134, miR-132, miR-124-1, miR-9-3) és az mTORC1 gének expresszióját vizsgáltuk intraperitoneálisan (i.p.) adott DMBA-val kezelt állatok szerveiben (máj, lép, vese), különböző humán táplálkozásban előforduló anyagok ezekre gyakorolt hatását kutatva. Ezt a génexpressziós panelt egy korábbi vizsgálat a karcinogén hatás megbízható korai biomarkerének találta. A kísérlet során igyekeztünk modellezni az emberi táplálkozás egyes aspektusait, fókuszálva a kemoprevencióra, annak karcinogenezist gátló hatására. Arra kerestem a választ, hogy a vizsgált anyagok képesek-e a karcinogén hatású DMBA által okozott génexpresszió-változásokat kivédeni, tehát vajon érdemes lenne-e azokat prevenció céljával a normál hétköznapi étrendbe beiktatni? A TFA esetén a vizsgálat célja a potenciálisan karcinogén/kokarcinogén hatás megerősítése volt, a fenti korai molekuláris biomarkerekkel.

### 3 Anyag és módszer

#### 3.1 Használt anyagok:

1. olívaolaj (*Olea europaea*) bogyóterméséből hidegen sajtolt extraszűz olaj
2. zöld tea (*Camellia sinensis*)
3. japán viaszbogó (*Myrica rubra*)
4. polifenol-kivonat (bortermő szőlő (*Vitis vinifera* „Cabernet Sauvignon”), túskenéküli fekete szeder (*Rubus fruticosus* „Thornfree”), fekete ribiszke (*Ribes nigrum*) mag és héj, hozzáadott rezveratrol tartalom: 4 gramm/100 ml forrázat),
5. kávé (*Coffea arabica*) kivonat
6. TFA (transz-3-hexadecénsav)

	ip. DMBA		kísérleti anyag			
csoport neve		napi dózis / állat	gyártó / termék	lényeges összetevők	latin / tudományos nevek	Mennyiség
negatív kontroll	-					
pozitív kontroll	+		Sigma Aldrich Ltd.		dimetil-benz[ <i>a</i> ]antracén	20 mg / ttkg
polifenol-kivonat	+	30 mg	SC Vita Crystal Research SRL FruitCafe™	bortermő szőlő mag, héj	<i>Vitis vinifera</i> „Cabernet Sauvignon”	20000 mg / 100 ml forrázat
				eritrit	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )-bután-1,2,3,4-tetraol	12000 mg / 100 ml forrázat
				rezveratrol	transz-3,5,4'-trihidroxisztilbén	4000 mg / 100 ml forrázat
				fekete szeder mag, héj	<i>Rubus fruticosus</i> „Thornfree”	2000 mg / 100 ml forrázat
				fekete ribiszke mag, héj	<i>Ribes nigrum</i>	2000 mg / 100 ml forrázat
				összes polifenol		4000-5000 mg / 100 ml forrázat
kávékivonat	+	30 mg	Xi'an Longze Biotechnology Co. Ltd.		<i>Coffea arabica</i>	
				klorogénsav	3-kaffeoil sav	5,03%
				koffein	1,3,7-trimetilxantin	1,21%
zöldtea-kivonat	+	4 mg	Xi'an Longze Biotechnology Co. Ltd.	zöld tea	<i>Camellia sinensis</i>	
				összes polifenol		98,53%
				összes katekin		80,42%
				EGCG	epigallokatekin-3-gallát	50,45%
				koffein	1,3,7-trimetilxantin	0,28%
japán viaszbogó kivonat	+	2,5 mg	Xi'an Longze Biotechnology Co. Ltd.	japán viaszbogó	<i>Myrica rubra</i>	
				myricetin	3,5,7,3',4',5'-hexahidroxiflavon	80,42%
extra szűz olívaolaj	+	300 mg	Agraria Riva Del Garda SCA		<i>Olea europaea</i>	
transzsírsav	+	300 mg	Sigma Aldrich Ltd.		transz-3-hexadecénsav	

1. táblázat: A vizsgált csoportok kezelése és a fogyasztott anyagok összetevői

### **3.2 Állatok tartása és kezelése**

A vizsgálatunkban 6-8 hetes nőstény CBA/Ca egereket használtunk, melyeket csoportonként külön ketrecekben tartottunk. Az állatok csoportjait (n=6) 14 napon keresztül olívaolajjal naponta 300 mg/állat dózisban, transzsírsavval szintén napi 300 mg/állat dózisban, zöld tea kivonattal napi 4 mg/állat dózisban, japán viaszbogyó kivonattal napi 2,5 mg/állat dózisban, polifenol-kivonattal napi 30 mg/állat dózisban, illetve kávékivonattal napi 30 mg/ állat (150 ml) dózisban a tápjukhoz keverve etettünk. Az említett csoportokat intraperitoneálisan (i.p.) testtömegkilogrammonként 20 mg DMBA-val kezeltük, melyet 0,1 ml kukoricaolajban oldottunk fel. Ezen felül egy pozitív kontrollcsoportnak (n=6) csakis DMBA-t adtunk az említett módon. 24 órával a DMBA-expozíciót követően nyaki diszlokációval elpusztítottuk az állatokat, majd eltávolítottuk a májukat, a veséjüket és lépüket. Az egerek az állatkísérletes protokollok előírásainak megfelelő bánásmódot kaptak. A kísérlet etikai engedélyének száma: BA02/200-79/2017.

### **3.3 RNS-izolálása**

TRIZOL reagens (MRTR118-20 Nucleotest Bio Kft.) felhasználásával a gyártó előírásai alapján végeztük a teljes celluláris RNS-izolálást. Az RNS-minőséget nano-drop abszorpciós fotometriával ellenőriztük, és az RT-PCR eljáráshoz azokat az RNS-frakciókat használtunk, ahol  $A_{260/280} > 2,0$  volt esetén.

### **3.4 Reverz transzkripció polimeráz-láncreakció (RT-PCR)**

A One-step PCR-t (reverz transzkripció, cél amplifikáció), LightCycler 480 qPCR platformon, 96 lyukú plate-en a Kapa SYBR FAST One-step RTQPCR kit (Kapa Biosystems) használatával végeztük.

A hőmérsékleti program az alábbi protokoll szerint történt:

- a) 5 percig inkubáltunk 42°C-on,
- b) 3 percig inkubáltunk 95°C-on,
- c) 45 cikluson keresztül (95°C – 5 s, 56°C – 15 s, 72°C – 5 s), minden ciklus végén fluoreszcens leolvasás történt.

A futtatásokat olvadási görbe analízissel végeztük (95°C – 5 s, 65°C – 60 s, 97°C ∞) hogy megerősítsük az amplifikáció specifitását. A reakcióelegy összetétele: 10 µl KAPA SYBR FASTqPCR Master Mix, 0,4 µl KAPA RT Mix, 0,4 µl dUTP, 0,4 µl primerek, 5 µl templát miRNS, 20 µl ösztérfogatra kiegészítve steril bidesztillált vízzel.

A vizsgált miRNS-ek (miR-134, miR-132a, miR-124-1, mir-9-3), valamint az mTORC1 és a belső kontroll gén (mouse U6) primer szekvenciáit a 2. táblázat tartalmazza. A primerek szintetizálását az Integrated DNA Technologies (Bio-Sciences) végezte. A szekvenciák korábbi tanulmányok alapján lettek meghatározva [Shor, 2009; Uchida, 2010].

	FORWARD	REVERSE
miR-134	TGTGACTGGTTGACCAGAGG	GTGACTAGGTGGCCACAG
miR-132	ACCGTGGCTTTCGATTGTTA	CGACCATGGCTGTAGACTGTT
miR-124-1	TCTCTCTCCGTGTTACAGC	ACCGCGTGCCTTAATTGTAT
miR-9-3	GCCCGTTTCTCTTTGGTT	TCTAGCTTTATGACGGCTCTGTG G
mTORC1	AAGGCTGATGGGATTTGG	TGTCAAGTACACGGGGCAAG
mouse U6	CGCTTCGGCAGCACATATAC	TTCACGAATTTGCGTGCAT

2. táblázat: Az mTORC1 gén, a vizsgált miRNS-ek (miR-134, miR-132, miR-124-1, mir-9-3), valamint a belső kontroll gén (mouse U6), primer szekvenciái (5'-3').

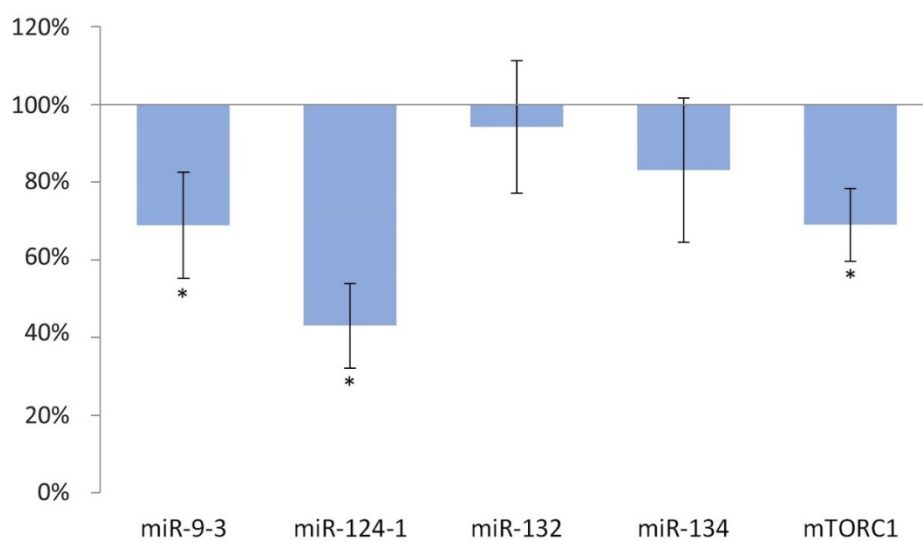
### 3.5 Számítás és statisztikai elemzés

A miRNS expressziók relatív szintjeit a  $2^{-\Delta\Delta CT}$  módszer segítségével számoltuk ki és Kolmogorov–Smirnov-teszt segítségével határoztuk meg az eredményeloszlást. Levene-típusú F-próbát és T-próbát használtunk az átlagok összehasonlítására, a kiértékelés az IBM SPSS 21 statisztikai szoftvert felhasználásával történt. A szignifikanciaszintet  $p < 0,05$  értéknél határoztuk meg.

## 4 Eredmények

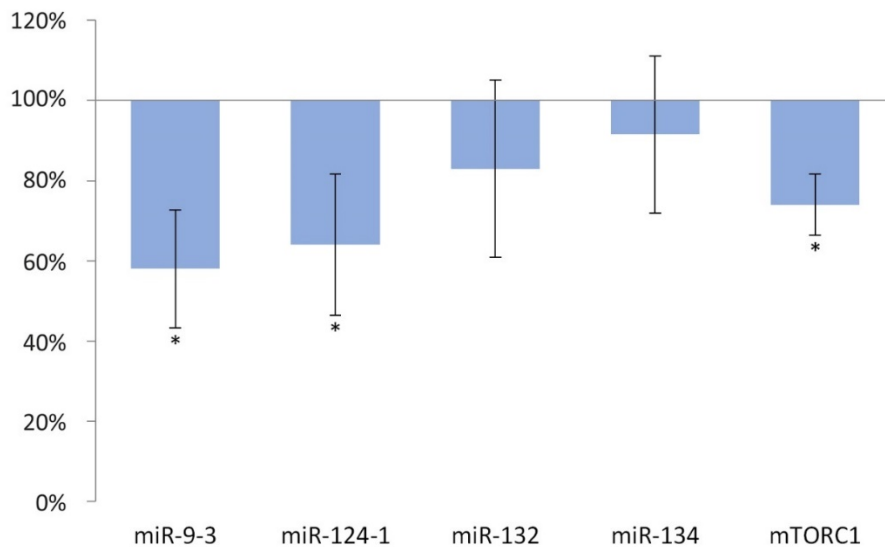
### 4.1 Olívaolaj és DMBA kezelés hatása a vizsgált szervekben

Az olívaolajjal kiegészített táplálékot fogyasztó csoport májában szignifikánsan csökkent a miR-9-3 (-31,1%;  $p < 0,05$ ; SD=13,6%), a miR-124-1 (-57%;  $p < 0,05$ ; SD=10,9%), és az mTORC1 (-31%;  $p < 0,05$ ; SD=9,4%) expressziója a DMBA pozitív kontrollhoz képest (3. ábra), míg a miR-132 (-5,8%;  $p = 0,66$ ; SD=17,1%) és a miR-134 (-16,9%;  $p = 0,21$ ; SD=18,6%) esetén tapasztalt csökkenések nem voltak szignifikánsak.



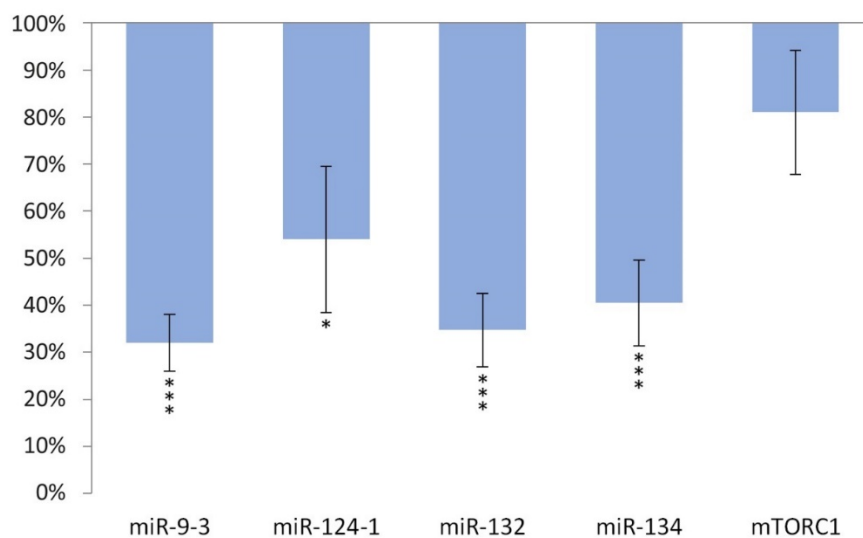
3. ábra: A miR-9-3, a miR-124-1, a miR-132, a miR-134 és az mTORC1 expressziós mintázata a DMBA által indukált expresszióhoz (100%) viszonyítva a DMBA-val és olívaolajjal kezelt egerek ( $n=6$ ) májában (\* $p < 0,05$ ).

Az olívaolaj hatására a lépben is csökkenést tapasztaltunk a vizsgált miR-ek és az mTORC1 gén expressziójában, a miR-9-3 (-42%;  $p < 0,05$ ; SD=14,7%), a miR-124-1 (-36%;  $p < 0,05$ ; SD=17,6%) és az mTORC1 (-26%;  $p < 0,05$ ; SD=7,7%) expressziója esetén szignifikánsan, míg a miR-132 (-17%;  $p = 0,27$ ; SD=22,1%) és a miR-134 (-8,5%;  $p = 0,51$ ; SD=19,6%) értékei nem voltak szignifikánsak (4. ábra).



4. ábra: A miR-9-3, a miR-124-1, a miR-132, a miR-134 és az mTORC1 expressziós mintázata a DMBA által indukált expresszióhoz viszonyítva a DMBA-val és olívaolajjal kezelt egerek (n=6) lépében (\* $p < 0,05$ ).

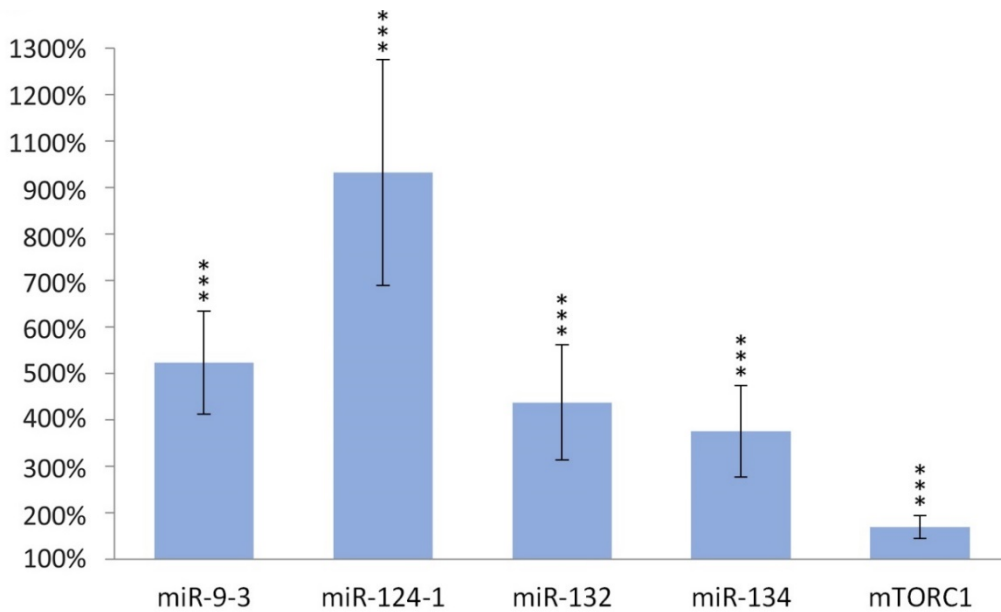
A vesék esetén a miR-9-3 (-68%;  $p < 0,001$ ; SD=6,1%), a miR-124-1 (-46%;  $p < 0,05$ ; SD=15,5%), a miR-132 (-65,3%;  $p < 0,001$ ; SD=7,8%) és a miR-134 (-59,5%;  $p < 0,001$ ; SD=9,1%) expressziói egyaránt szignifikánsan csökkentek a DMBA pozitív kontrollhoz képest, míg a mTORC1 (-19%;  $p = 0,051$ ; SD=13,2%) gén csökkenése nem volt szignifikáns az olívaolaj-kezelést követően (5. ábra).



5. ábra: A miR-9-3, a miR-124-1, a miR-132, a miR-134 és az mTORC1 expressziós mintázata a DMBA által indukált expresszióhoz viszonyítva a DMBA-val és olívaolajjal kezelt egerek (n=6) veséiben (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

#### 4.2 TFA és DMBA kezelés hatása a vizsgált szervekben

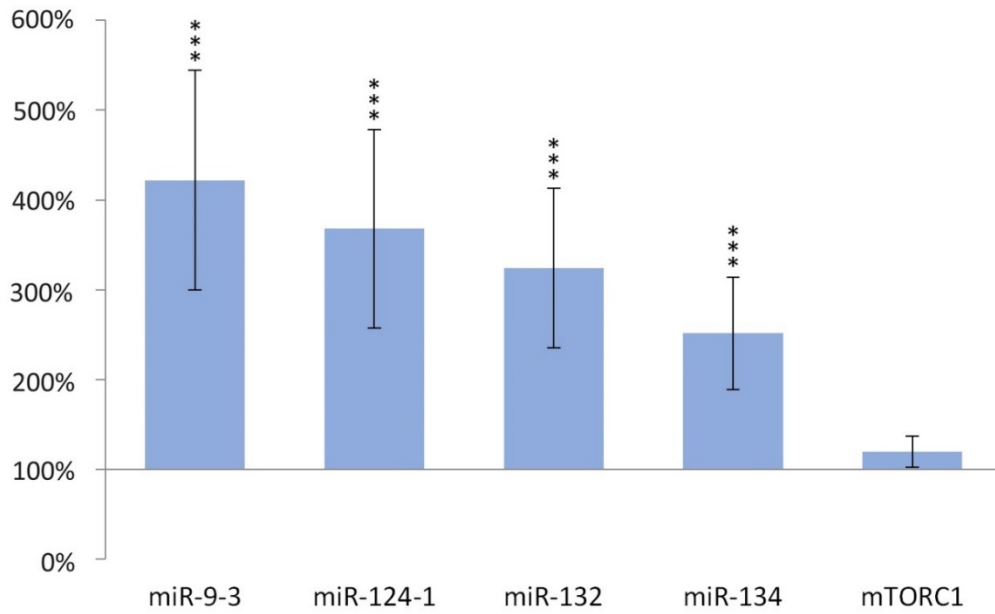
Az állatok májában a TFA fogyasztása a miR-9-3 (423%;  $p < 0,001$ ; SD=110%), a miR-124-1 (832%;  $p < 0,001$ ; SD=243%), a miR-132 (337%;  $p < 0,001$ ; SD=124%), a miR-134 (275%;  $p < 0,001$ ; SD=98%) és az mTORC1 (69%;  $p < 0,001$ ; SD=24,2%) expresszióját is szignifikánsan emelte a pozitív DMBA-kontrollhoz képest (6. ábra).



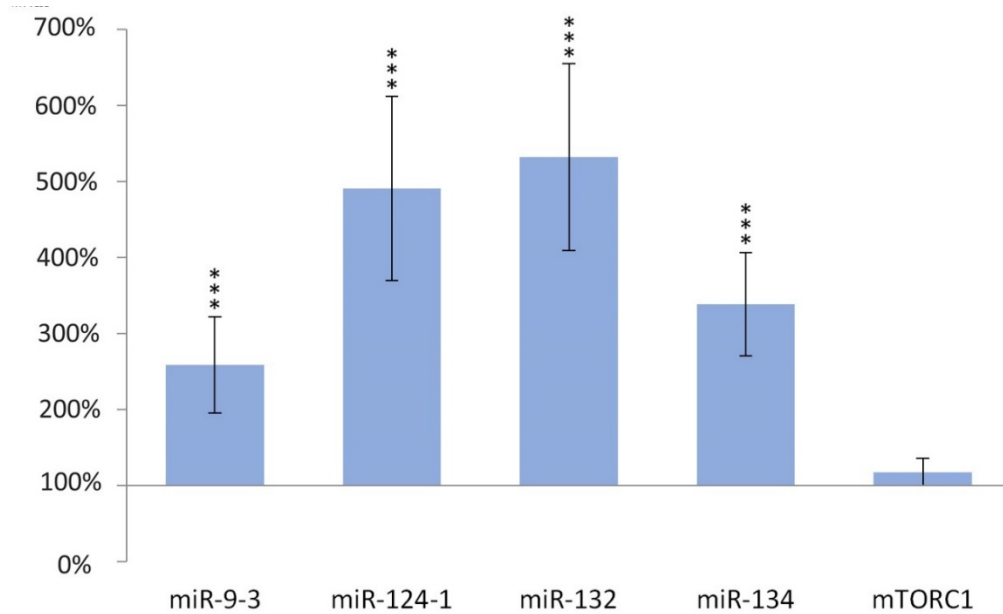
6. ábra: A miR-9-3, a miR-124-1, a miR-132, a miR-134 és az mTORC1 expressziós mintázata a DMBA által indukált expresszióhoz viszonyítva a DMBA-val és TFA-val kezelt egerek ( $n=6$ ) májában ( $***p < 0,001$ ).

A lépben a TFA a miR-9-3 (322%;  $p < 0,001$ ; SD=122,3%), a miR-124-1 (268%;  $p < 0,001$ ; SD=110,7%), a miR-132 (224,3%;  $p < 0,001$ ; SD=89,1%) és a miR-134 (151,8%;  $p < 0,001$ ; SD=62,5%) expresszióját szignifikánsan emelte a DMBA-kontrollhoz képest. Ehhez hasonlóan a vesék esetén is növekvő eredményeket mutatott a miR-9-3 (159%;  $p < 0,001$ ; SD=63,5%), a miR-124-1 (391%;  $p < 0,001$ ; SD=121,1%), a miR-132 (432,2%;  $p < 0,001$ ; SD=122,8%) és a miR-134 (238,4%;  $p < 0,001$ ; SD=67,9%), azonban a mTORC1 génexpressziója nem emelkedett szignifikánsan ezekben a szervekben, a lépben 19,5% ( $p=0,07$ ; SD=17,2%), míg a vesében 18% ( $p=0,10$ ; SD=18%). (7. és 8. ábra).





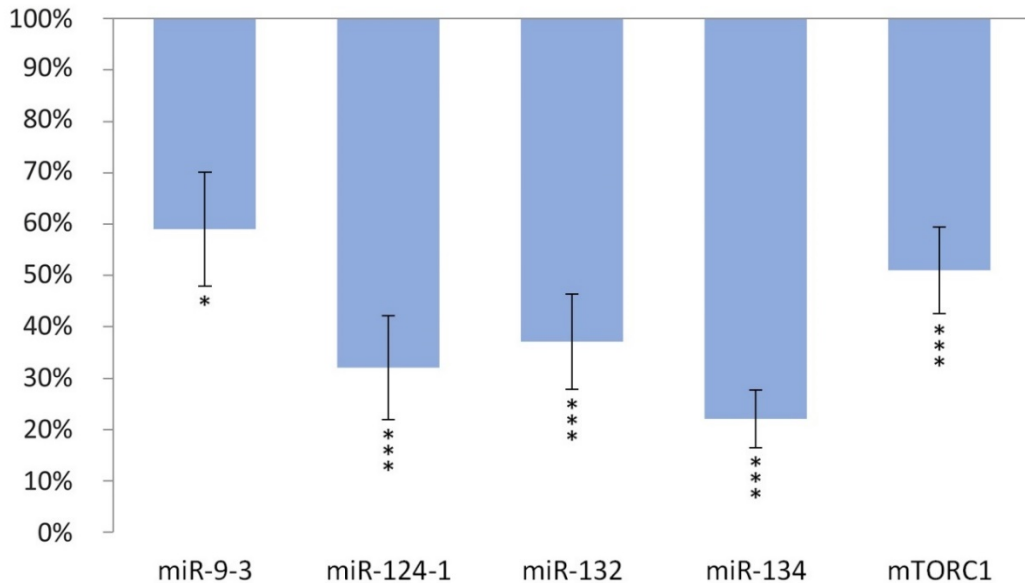
7. ábra: A miR-9-3, a miR-124-1, a miR-132, a miR-134 és az mTORC1 expressziós mintázata a DMBA által indukált expresszióhoz viszonyítva a DMBA-val és TFA-val kezelt egerek (n=6) lépében (\*\*\*) $p < 0,001$ ).



8. ábra: A miR-9-3, a miR-124-1, a miR-132, a miR-134 és az mTORC1 expressziós mintázata a DMBA által indukált expresszióhoz viszonyítva a DMBA-val és TFA-val kezelt egerek (n=6) veséiben (\*\*\*) $p < 0,001$ ).

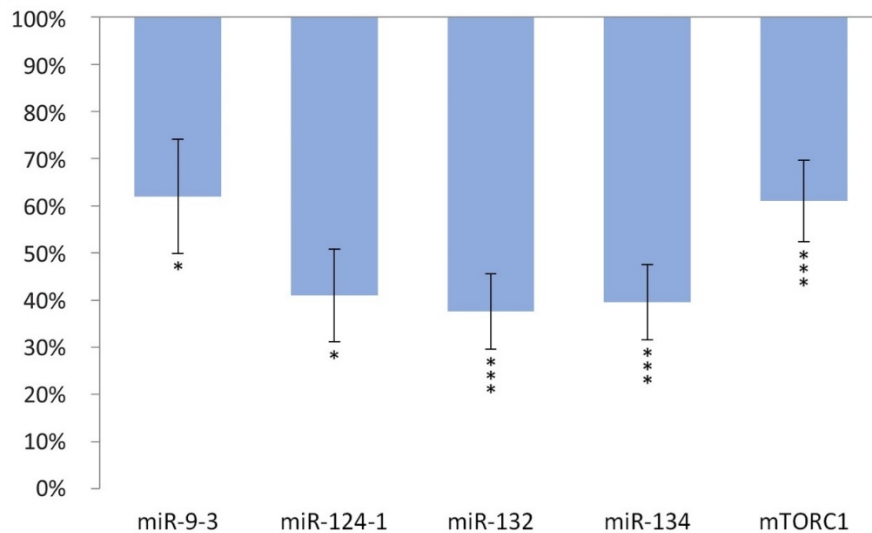
### 4.3 Polifenol kivonat és DMBA-kezelés hatása a vizsgált szervekben

Az állatok májában a polifenol-kivonat fogyasztása a miR-9-3 (-41%;  $p < 0,05$ ; SD=11,1%), a miR-124-1 (-68%;  $p < 0,001$ ; SD=10,1%), a miR-132 (-62,9%;  $p < 0,001$ ; SD=9,2%), a miR-134 (-77,9%;  $p < 0,001$ ; SD=5,6%) és az mTORC1 (-49%;  $p < 0,001$ ; SD=8,4%) expresszióját szignifikánsan csökkentette a pozitív DMBA-kontrollhoz képest (9. ábra).



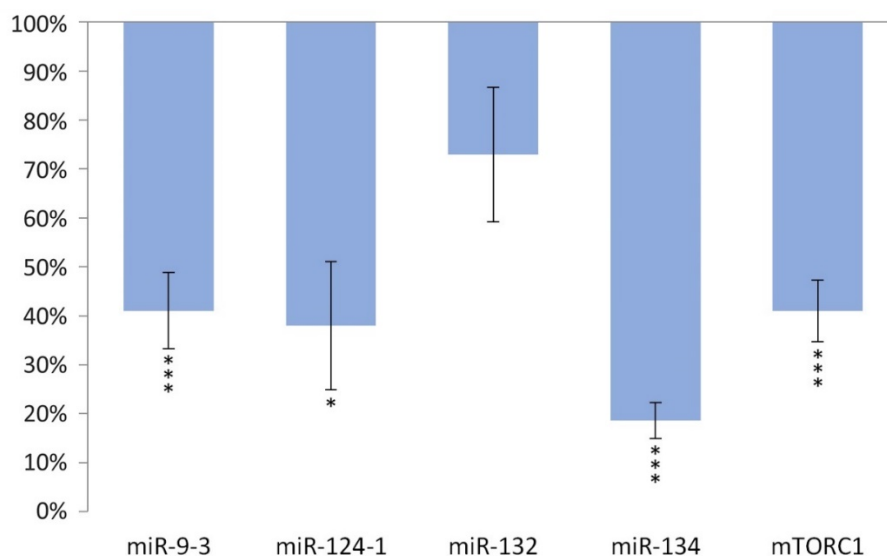
9. ábra: A miR-9-3, a miR-124-1, a miR-132, a miR-134 és az mTORC1 expressziós mintázata a DMBA által indukált expresszióhoz viszonyítva a DMBA-val és polifenol-kivonattal kezelt egerek ( $n=6$ ) májában (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

Az állatok lépében szintén szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a polifenol-kivonat hatására a miR-9-3 (-38%;  $p < 0,05$ ; SD=12,1%), a miR-124-1 (-59%;  $p < 0,05$ ; SD=9,8%), a miR-132 (-62,4%;  $p < 0,001$ ; SD=8%), a miR-134 (-60,4%;  $p < 0,001$ ; SD=8%) és az mTORC1 (-39%;  $p < 0,001$ ; SD=8,6%) expressziók esetén a pozitív DMBA-kontrollhoz képest (10. ábra).



10. ábra: A miR-9-3, a miR-124-1, a miR-132, a miR-134 és az mTORC1 expressziós mintázata a DMBA által indukált expresszióhoz viszonyítva a DMBA-val és polifenol-kivonattal kezelt egerek (n=6) lépében (\*p<0,05; \*\*\*p<0,001).

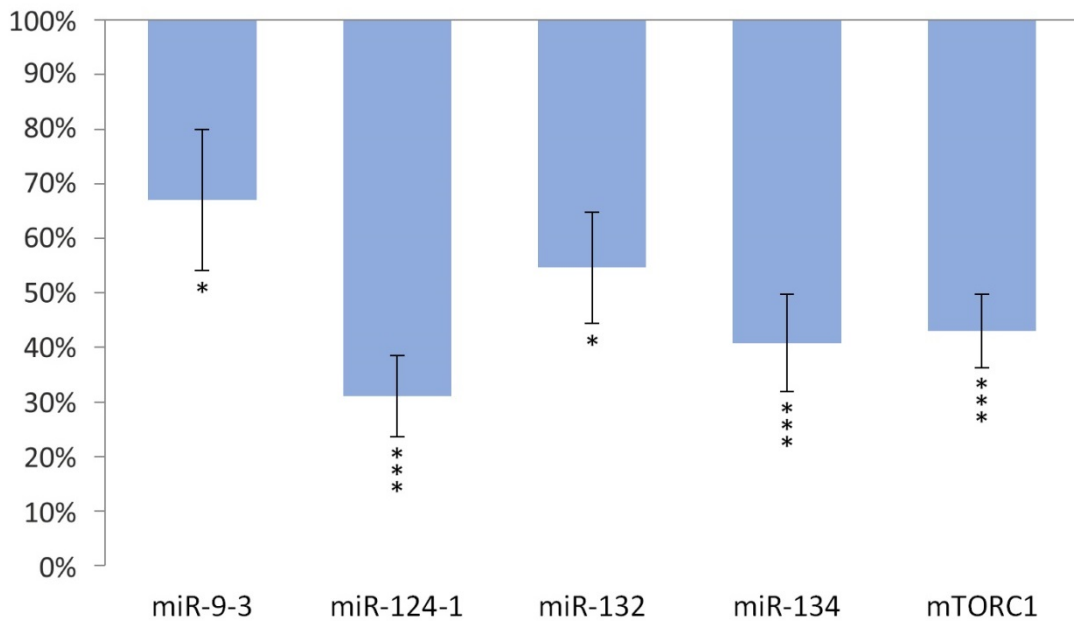
Az állatok veséiben a polifenol-kivonat hatására szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a miR-9-3 (-59%;  $p<0,001$ ; SD=7,8%), a miR-124-1 (-62%;  $p<0,05$ ; SD=13,1%), a miR-134 (-81,4%;  $p<0,001$ ; SD=3,7%) és az mTORC1 (-59%;  $p<0,001$ ; SD=6,3%) expressziók esetén a pozitív DMBA-kontrollhoz képest (11. ábra), míg a miR-132 (-27,1%;  $p=0,051$ ; SD=13,7%) értékei nem voltak statisztikailag szignifikánsak.



11. ábra: A miR-9-3, a miR-124-1, a miR-132, a miR-134 és az mTORC1 expressziós mintázata a DMBA által indukált expresszióhoz viszonyítva a DMBA-val és polifenol-kivonattal kezelt egerek (n=6) veséiben (\*p<0,05; \*\*\*p<0,001).

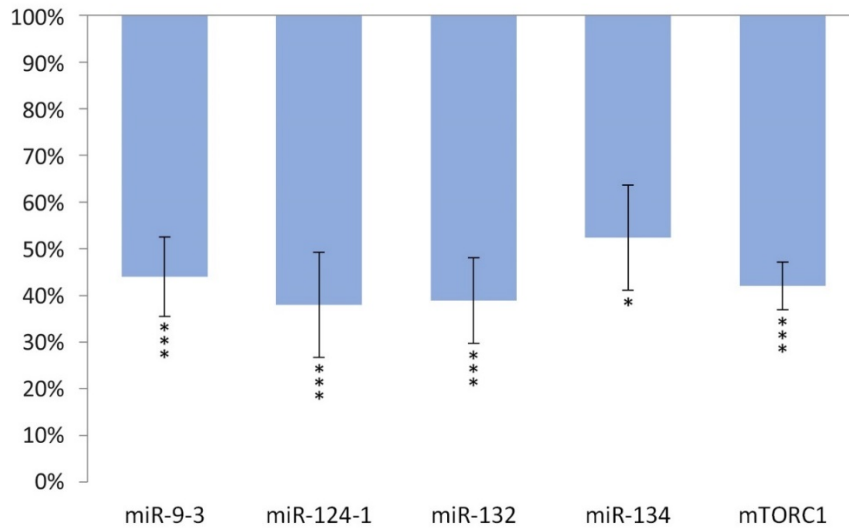
#### 4.4 Zöld tea kivonat és DMBA-kezelés hatása a vizsgált szervekben

A zöldtea-kivonat fogyasztása az állatok májában a miR-9-3 (-33%;  $p < 0,05$ ; SD=12,9%), a miR-124-1 (-69%;  $p < 0,001$ ; SD=7,4%), a miR-132 (-45,4%;  $p < 0,05$ ; SD=10,2%), a miR-134 (-59,2%;  $p < 0,001$ ; SD=8,9%) és az mTORC1 (-57%;  $p < 0,001$ ; SD=6,7%) expresszióját szignifikánsan csökkentette a pozitív DMBA-kontrollhoz képest (12. ábra).



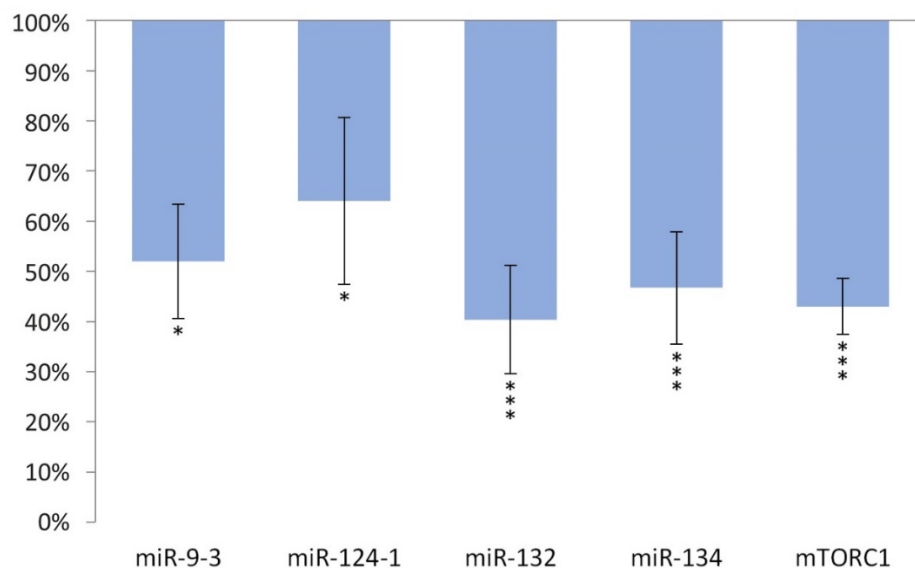
12. ábra: A miR-9-3, a miR-124-1, a miR-132, a miR-134 és az mTORC1 expressziós mintázata a DMBA által indukált expresszióhoz viszonyítva a DMBA-val és zöldtea-kivonattal kezelt egerek ( $n=6$ ) májában (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

A zöldtea-kivonat expresszió csökkenést okozott a lépben mind a miR-9-3 (-56%;  $p < 0,001$ ; SD=8,5%), a miR-124-1 (-62%;  $p < 0,001$ ; SD=11,3%), a miR-132 (-61,1%;  $p < 0,001$ ; SD=9,1%), a miR-134 (-47,6%;  $p < 0,05$ ; SD=11,2%) és az mTORC1 (-58%;  $p < 0,001$ ; SD=5,1%) esetén a pozitív DMBA-kontrollhoz képest (13. ábra).



13. ábra: A miR-9-3, a miR-124-1, a miR-132, a miR-134 és az mTORC1 expressziós mintázata a DMBA által indukált expresszióhoz viszonyítva a DMBA-val és zöldtea-kivonattal kezelt egerek (n=6) lépben (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

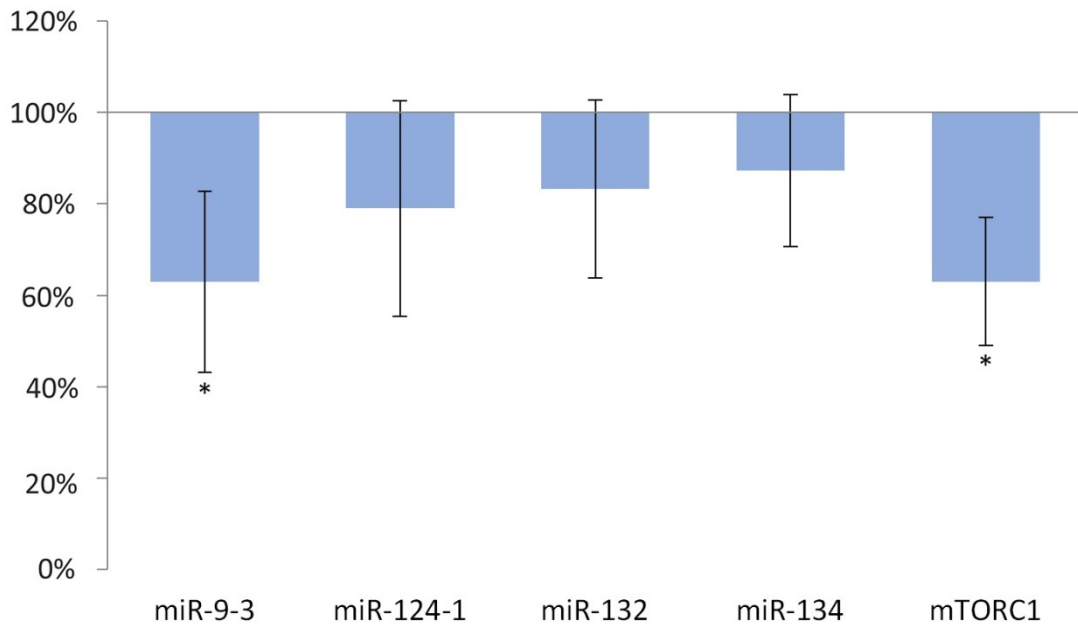
A vesékben szintén szignifikáns expresszió csökkenést tapasztaltunk a miR-9-3 (-48%;  $p < 0,05$ ; SD=11,4%), a miR-124-1 (-36%;  $p < 0,05$ ; SD=16,6%), a miR-132 (-59,6%;  $p < 0,001$ ; SD=10,8%), a miR-134 (-53,3%;  $p < 0,001$ ; SD=11,1%) és az mTORC1 (-57%;  $p < 0,001$ ; SD=5,6%) esetén a pozitív DMBA-kontrollhoz képest a zöldtea-kivonatot fogyasztó csoportban (14. ábra).



14. ábra: A miR-9-3, a miR-124-1, a miR-132, a miR-134 és az mTORC1 expressziós mintázata a DMBA által indukált expresszióhoz viszonyítva a DMBA-val és zöldtea-kivonattal kezelt egerek (n=6) veséiben (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

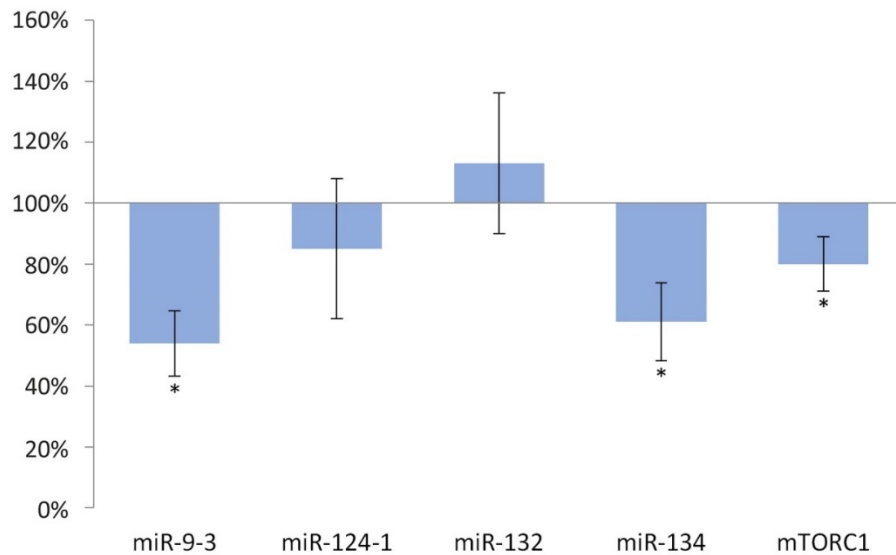
#### 4.5 Kávé kivonat és DMBA-kezelés hatása a vizsgált

A májban a miR-9-3 (-37%;  $p < 0,05$ ; SD=19,8%) és az mTORC1 (-37%;  $p < 0,05$ ; SD=14%) szignifikáns expresszió csökkenését tapasztaltunk a kávékivonatot fogyasztó csoportban a pozitív DMBA-kontrollhoz képest, míg a miR-124-1 (-21%;  $p = 0,21$ ; SD=23,6%), a miR-132 (-16,7%;  $p = 0,24$ ; SD=19,4%) és a miR-134 (-12,7%;  $p = 0,32$ ; SD=16,7%) eredményei statisztikailag nem voltak szignifikánsak (15. ábra).



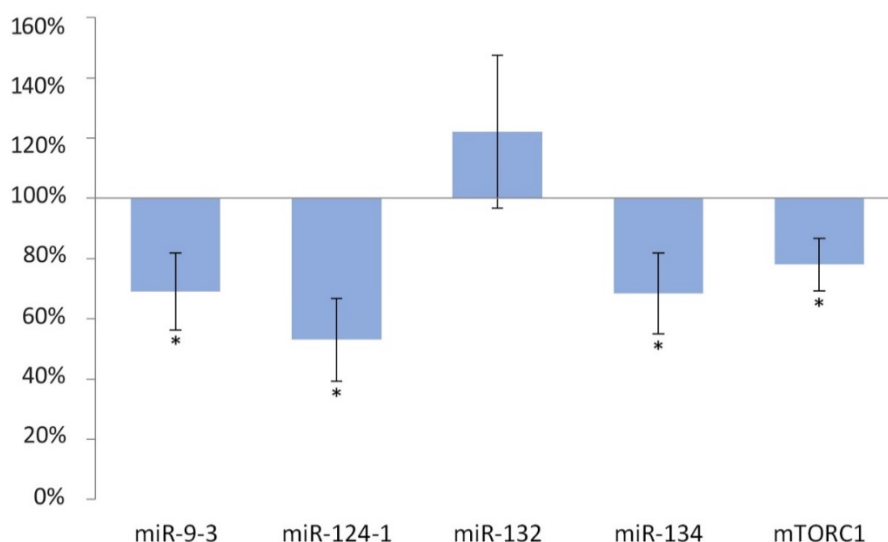
15. ábra: A miR-9-3, a miR-124-1, a miR-132, a miR-134 és az mTORC1 expressziós mintázata a DMBA által indukált expresszióhoz viszonyítva a DMBA-val és kávékivonattal kezelt egerek ( $n=6$ ) májában (\* $p < 0,05$ ).

A lépben a miR-9-3 (-46%;  $p < 0,05$ ; SD=10,7%), a miR-134 (-38,9%;  $p < 0,05$ ; SD=12,7%) és az mTORC1 (-20%;  $p < 0,05$ ; SD=8,9%) kifejeződése statisztikailag szignifikánsan csökkent a kávékivonatot fogyasztó csoportban a pozitív DMBA-kontrollhoz képest, míg a miR-124-1 (-15%;  $p = 0,37$ ; SD=22,9%) csökkenése és a miR-132 (13,1%;  $p = 0,40$ ; SD=23%) enyhe növekedése statisztikailag nem volt szignifikáns (16. ábra).



16. ábra: A miR-9-3, a miR-124-1, a miR-132, a miR-134 és az mTORC1 expressziós mintázata a DMBA által indukált expresszióhoz viszonyítva a DMBA-val és kávékivonattal kezelt egerek (n=6) lépében (\*p<0,05).

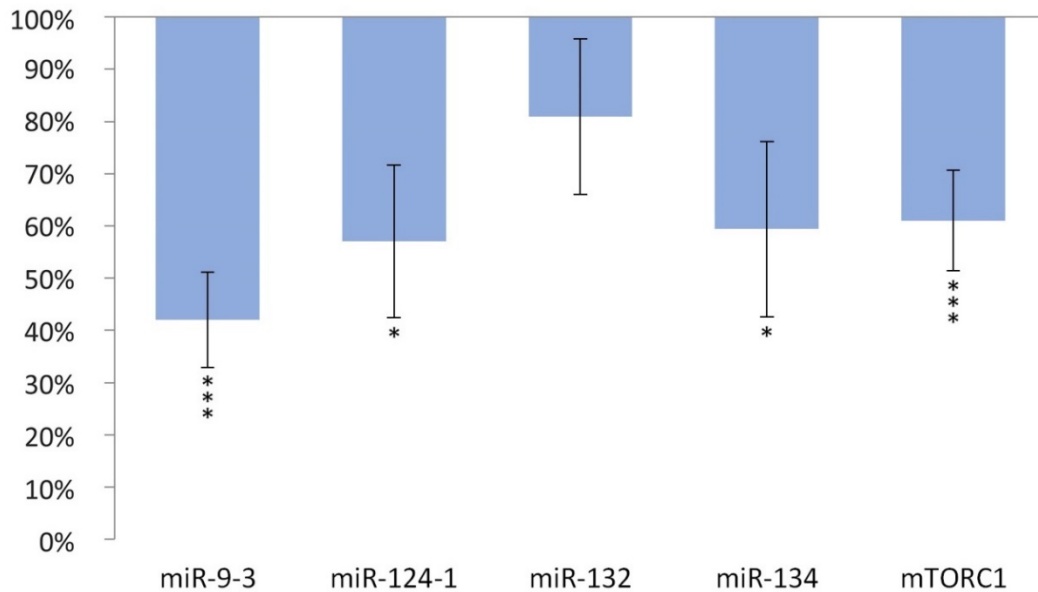
A vesékben statisztikailag szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a miR-9-3 (-31%;  $p<0,05$ ; SD=12,8%), a miR-124-1 (-47%;  $p<0,05$ ; SD=13,6%), a miR-134 (-31,6%;  $p<0,05$ ; SD=13,5%) és az mTORC1 (-22%;  $p<0,05$ ; SD=8,7%) esetén a pozitív DMBA-kontrollhoz képest a kávékivonatot fogyasztó csoportban, míg a miR-132 (22,1%;  $p=0,18$ ; SD=25,4%) enyhe növekedése statisztikailag nem volt szignifikáns (17. ábra).



17. ábra: A miR-9-3, a miR-124-1, a miR-132, a miR-134 és az mTORC1 expressziós mintázata a DMBA által indukált expresszióhoz viszonyítva a DMBA-val és kávékivonattal kezelt egerek (n=6) veséiben (\*p<0,05).

#### 4.6 Japán viaszbogyó kivonat és DMBA-kezelés hatása a vizsgált

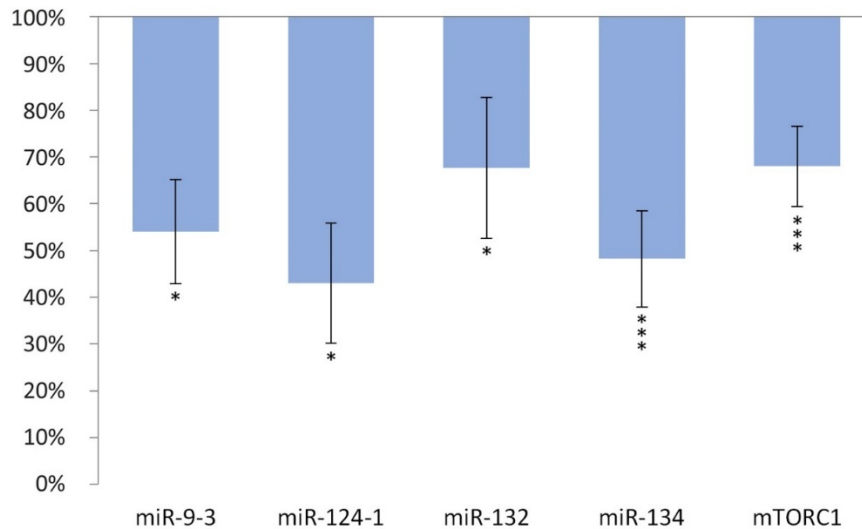
A májban statisztikailag szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a miR-9-3 (-58%;  $p < 0,001$ ; SD=9,1%), a miR-124-1 (-43%;  $p < 0,05$ ; SD=14,6%), a miR-134 (-40,6%;  $p < 0,05$ ; SD=16,8%) és az mTORC1 (-39%;  $p < 0,001$ ; SD=9,6%) esetén a pozitív DMBA-kontrollhoz képest a japán viaszbogyó kivonatot fogyasztó csoportban, míg a miR-132 (-19,1%;  $p = 0,14$ ; SD=14,9%) csökkenése statisztikailag nem volt szignifikáns (18. ábra).



18. ábra: A miR-9-3, a miR-124-1, a miR-132, a miR-134 és az mTORC1 expressziós mintázata a DMBA által indukált expresszióhoz viszonyítva a DMBA-val és japán viaszbogyó kivonattal kezelt egerek ( $n=6$ ) májában (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

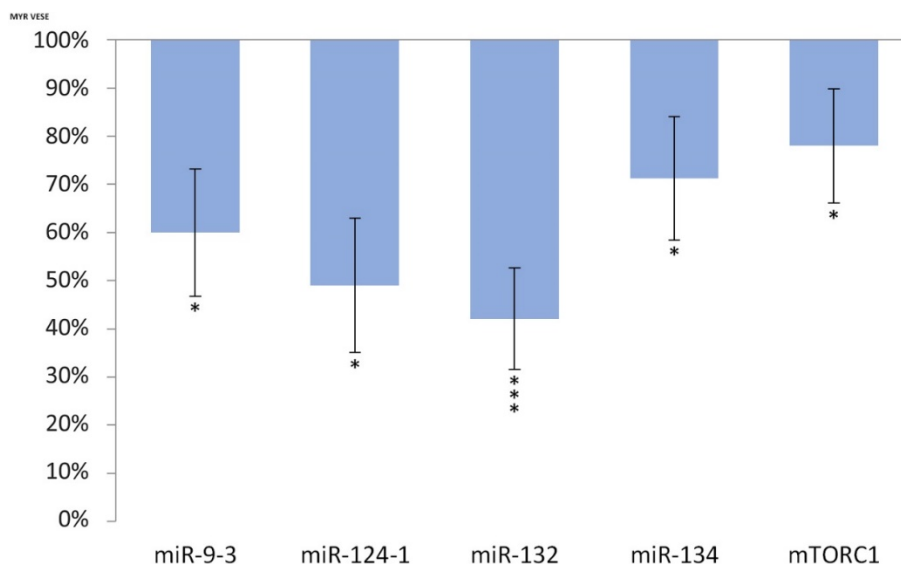
Csökkenő irányú statisztikailag szignifikáns változásokat tapasztaltunk a lépben a miR-9-3 (-46%;  $p < 0,05$ ; SD=11,1%), a miR-124-1 (-57%;  $p < 0,05$ ; SD=12,9%), a miR-132 (-32,3%;  $p < 0,05$ ; SD=15,1%), a miR-134 (-51,8%;  $p < 0,001$ ; SD=10,3%) és az mTORC1 (-32%;  $p < 0,001$ ; SD=8,6%) esetén egyaránt a pozitív DMBA-kontrollhoz képest a japán viaszbogyó kivonatot fogyasztó csoportban (19. ábra).





19. ábra: A miR-9-3, a miR-124-1, a miR-132, a miR-134 és az mTORC1 expressziós mintázata a DMBA által indukált expresszióhoz viszonyítva a DMBA-val és japán viaszbogyó kivonattal kezelt egerek (n=6) lépében (\*p<0,05; \*\*\*p<0,001).

A vesékben a pozitív DMBA-kontrollhoz képest a japán viaszbogyó kivonatot fogyasztó csoportban a miR-9-3 (-40%; p<0,05; SD=13,2%), a miR-124-1 (-51%; p<0,05; SD=14%), a miR-132 (-57,9%; p<0,001; SD=10,5%), a miR-134 (-28,8%; p<0,05; SD=12,8%) és az mTORC1 (-22%; p<0,05; SD=11,9%) esetén egyaránt statisztikailag szignifikáns csökkenéseket tapasztaltunk (20. ábra).



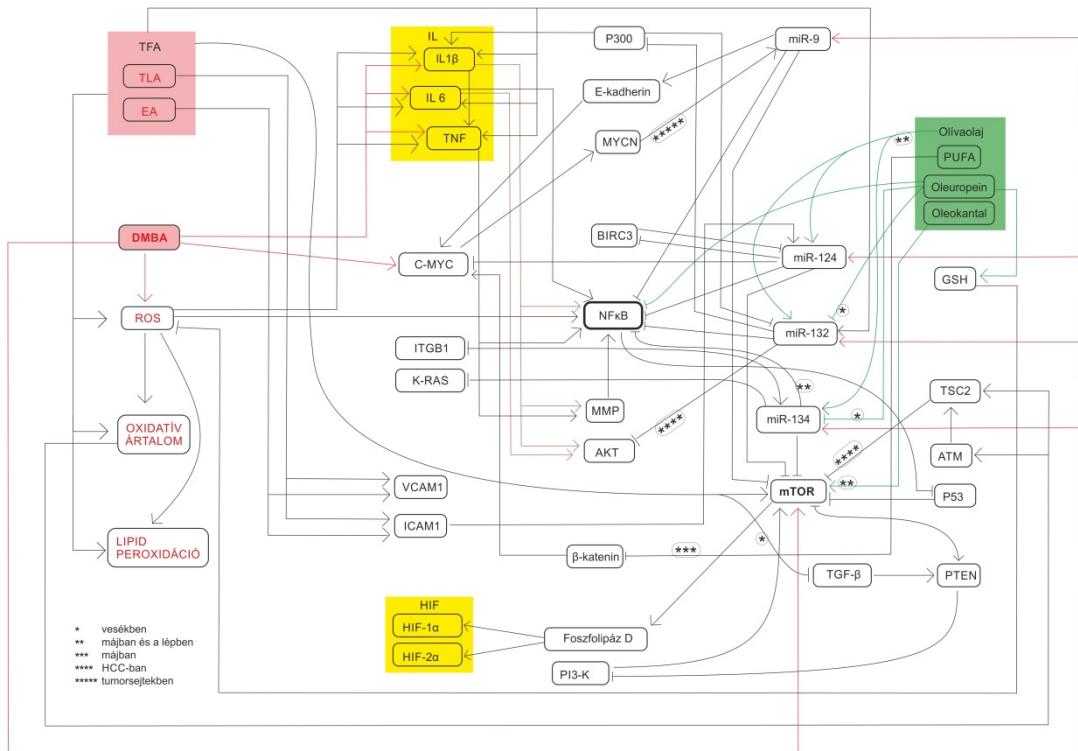
20. ábra: A miR-9-3, a miR-124-1, a miR-132, a miR-134 és az mTORC1 expressziós mintázata a DMBA által indukált expresszióhoz viszonyítva a DMBA-val és japán viaszbogyó kivonattal kezelt egerek (n=6) veséiben (\*p<0,05; \*\*\*p<0,001).

## 5 Megbeszélés

### 5.1 A DMBA ártalmas hatása

A DMBA bomlása reaktív oxigén gyökök (ROS) képződésével jár és ezt a CYP enzimek katalizálják [Budán, 2009]. Ez transzkripció faktorokat (például NF- $\kappa$ B-t) aktivál és ez végső soron különböző citokineket (például IL1 $\beta$ , IL6, TNF) indukál továbbá a védő hatású glutationt (GSH) depletálja [De Souza, 2009; Lu, 2009; Storz, 2005; Reuter, 2010].

Az IL1 $\beta$  nagy mennyiségben történő jelenléte gyulladós növekedési faktorok (TNF, MMP-k) keletkezését vonja maga után, amik a sejtek rosszindulatú burjánzásának az esélyét is növeli [Apte, 2006; Stetler-Stevenson, 2001] az NF- $\kappa$ B indukálásával [Yeh 2012; Wajant, 2009], mert ez a tumorszuppresszor hatású miR-134 és a P53 gén expresszióját csökkenti [Webster, 1999; Shuang, 2017]. Tehát az proinflammatorikus és sejt proliferációt fokozó tényezők egymást erősítve érvényesülnek (21. ábra).



21. ábra: A miR-9-3, a miR-124-1, a miR-132, a miR-134 és az mTORC1 expressziós mintázatát befolyásoló hatások és másodlagos jelátvivők összefüggései (az ábra nagyobb méretben megtalálható a függelékben)

## 5.2 A TFA ártalmas hatása

A TFA-fogyasztás ártalmas hatásait alátámasztja, hogy a transzlinolsav (transz, transz-9-12-oktadekadiénsav) (LA) és az elaidinsav (transz-9-oktadekánsav) (EA) aktiválják a vaszkuláris sejtadhéziós molekula-1 (VCAM-1)-et, valamint az intercelluláris adhéziós molekula-1 (ICAM-1)-et, melyek a ROS generáláson keresztül aktiválják a gyulladást és proliferációt is elősegítő NF- $\kappa$ B-t [Bryk, 2011; Pikarsky, 2004]. Tehát ebből következhet, hogy a TFA- és DMBA-kezelt csoportban szignifikánsan overexpresszálódtak a vizsgált miR-ek és az *mTOR* gén is [Bryk, 2011] (21. ábra).

## 5.3 A vizsgált kemopreventív anyagok hatása

A ROS által indukált sejtkárosodást képesek csökkenteni a flavonoidok [Ross, 2002] és az olívaolaj is a molekuláris szerkezetüknek köszönhetően [Kandaswami, 1994; Rice-Evans, 1996; Middleton 2000; Fiander, 2000]. Ugyanez igaz a kávé klorogénsav-, hidroxifahéjsav- és koffein tartalmára [Capek, 2014] s a melanoidintartalmára is [Hu, 2019]. Továbbá a polifenolok képesek gátolni az indirekt karcinogén aktivátor mikroszomális enzimeket, amin keresztül szignifikánsan csökkentik a DNS adduktok kialakulását [Bhattacharya, 1988].

Az antioxidáns hatások jelentősége is figyelemre méltó és nemcsak az említett közvetlen hatások, hanem védő hatású enzimek támogatásán keresztül is. A rezveratrol [Gerszon, 2014], a myricetin [Ross, 2002; Fiander, 2000], a GTC [Pastore, 2006] és a klorogénsav [Liang, 2016] is indukálja a protektív szuperoxid-diszmutáz (SOD) és a glutation-S-transzferáz (GST) enzimeket is. Továbbá a PUFA közvetetten képes a GSH-szintjét is növelni. (21. ábra).

## 5.4 Az olívaolaj védő hatása

Az olívaolaj legfontosabb antioxidáns és gyulladáscsökkentő anyagai a telítetlen zsírsavak: MUFA és a PUFA. Ezenfelül az olívaolaj védő hatású vízzoldékony anyagokat is tartalmaz, melyek közül a legismertebb az oleuropein és az oleokantal.

#### **5.4.1 Az olívaolaj vízdékony anyagai**

Az oleuropein és az oleokantal antioxidáns és membránvédő hatású vízdékony szekoiridoid [Bermúdez, 2004; Ferreri, 2017; Nakabi, 2010; Seiquer, 2015]. Az oleuropein blokkolja az NF- $\kappa$ B-t [Hornedo-Ortega, 2018; Park, 2017], és az oleokantal védi az intracelluláris GSH-t [Giusti, 2018; Kouka, 2019; Lopez-Miranda, 2008]. Ez a miR-134, miR-132 és a miR124-1 expresszió csökkenéséhez vezethet (az említett negatív visszacsatolási mechanizmusokon keresztül), illetve a DMBA-kezelés hatására overexpresszált miR-9-3 mennyiségét szignifikánsan csökkenti [Tomesz, 2020] (21. ábra).

Bizonyára a védő hatású és vízdékony oleuropein okozta a vesében a miR-134 és miR-132-nek az erőteljes és szignifikáns csökkenését, az említett negatív visszacsatolásai szabályozáson keresztül [Gu, 2017]. A májban és a lépben is tapasztalt szignifikánsan csökkent mTOR génexpressziót is az oleokantal potens mTOR gátló hatása okozta [Khanfar, 2015] (21. ábra).

#### **5.4.2 Az olívaolaj zsírdékony anyagai**

A PUFA közvetlen  $\beta$ -katenin gátló hatású, ami a C-MYC expresszió szignifikáns csökkenéséhez vezet [Notarnicola, 2017]. A fokozott onkogén C-MYC jelentősége a daganatképződésben és a malignizációban jelentős [Budán, 2009].

Továbbá a PUFA növelte a P300 mennyiségét, aminek a növekedése szintén a miR-132 expressziójának a csökkenéséhez vezet, mivel ezek keresztbe-szabályozzák egymást [Lagos, 2010]. A BIRC3 és a miR-124 expresszió negatív összefüggést mutatott [Cao, 2018], ami negatív visszacsatolós hurokra utal, mivel az ICAM-1 pozitívan modulálja a miR-124 expressziót [Gu, 2017]. Ezen adatok megmagyarázzák az összes vizsgált szervben kapott miR-124 szignifikáns csökkenést az olívaolajat fogyasztó csoportban.

A gyengébb (nem szignifikáns) miR-134 és miR-132, valamint a szignifikáns miR-124 csökkenés a májban és a lépben, az olívaolaj fogyasztó csoportban látszólag ellentmond az olívaolaj daganatellenes hatásának, mivel szintén a miR-134, miR-132 és a miR-124 expressziójának a csökkenését figyelték meg a manifeszt HCC-ben [Zha,

2014; Zhang, 2015; Cao, 2018], valamint a miR-134 esetén a RCC-ben is [Zha, 2014]. Továbbá a miR-9 szintén gátolja a HCC progresszióját [Zhang, 2015], illetve igazolták, hogy a miR-9-3 csökkenés korai biomarkerként jelzi a rosszindulatú daganatok kialakulását [Hildebrandt, 2010].

Azonban a DMBA hatására növelt expressziójú MYC [Budán, 2009] és MYCN onkoproteinek a tumorsejtekben a miR-9 expresszió növekedését okozzák, ami (ezúttal onkogéneket támogató, pozitív visszacsatolási mechanizmussal) – az E-cadherin amplifikációján keresztül – a C-MYC expressziójának további növekedését okozza [Morin, 1999; Ma, 2010]. Ez – a fent leírtakkal szemben – elősegíti a HCC képződését, amit alátámasztanak korábbi eredményeink, ahol a CBA/CA nőstény egerek miR-9-3 expressziója a DMBA-expozíció hatására különösen nagy szignifikáns emelkedést eredményezett [Tomesz, 2020]. Tehát az olívaolajat fogyasztó csoportban tapasztalt eredményeinket megmagyarázzák a negatív visszacsatolási mechanizmusok, amik a miR-ek expressziós szabályozásában gyakoriak [Szpehcinski, 2019] (21. ábra).

## **5.5 A polifenolok védő hatása**

A polifenolok a klasszikus gyulladási interleukinokat (IL1, TNF- $\alpha$ , stb.) és például NF- $\kappa$ B transzkripciós faktort gátló hatásuk okán védhették ki a DMBA indukálta overexpresszióit – a vizsgált biomarkerekre nézve. Például a rezveratrol csökkenti többek közt az IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  expresszióját [Yeung, 2004; Zhang, 2019]. A polifenolok képesek regulálni a karcinogén és a gyulladási folyamatok által aktivált jelátviteli utakat [Middleton, 2000]. A rezveratrol [Yeung, 2004] és a myricetin [Jung, 2017] az aktivált „silent information” Regulator T1 (SIRT1) függő jelátviteli útvonalon keresztül serkenti a cAMP-response element binding (CREB) fehérjét [Zhao, 2013; Shen, 2018] és ez a miR-134, miR-124 és mTOR expresszió csökkenéséhez vezet [Ghosh, 2010].

Ezzel szemben az EGCG gátolta a SIRT1-et, azonban mind az EGCG, mind a rezveratrol szintén gátolta a NF- $\kappa$ B-t is [Chung, 2010; Yeung, 2004; Zhang, 2019] és ezen keresztül csökkentette a miR-132 [de la Rica, 2015], miR-124 [Sun, 2015] és a miR-9 expresszióját [Aires, 2017]. Ugyanakkor Shuang és mtsai. szerint a csökkent NF- $\kappa$ B1

aktivitás (egy látszólag egymást kölcsönösen kizáró mechanizmuson keresztül) növelte az antikarcinogén miR-134 expresszióját [Shuang, 2017].

Továbbá a rezveratrol [Shankar, 2007], az EGCG [Liu S, 2013] foszfatáz- és tenzinhomológ (PTEN) gént aktivál, ami csökkenti a ciklin D1 sejtosztódási protein mennyiségét [Radu, 2003]. Erőteljes negatív visszacsatolási mechanizmus érvényesült jelen esetben [Szpechcinski, 2019; Tomesz, 2020; Cao, 2018; Gu, 2017], ami végső soron csökkentette a miR-134 expresszióját [Szpechcinski, 2019; Tomesz, 2020].

A rezveratrol [Narayanan, 2006; Zhang, 2019] és az EGCG [Bhardwaj, 2019] gátolja az antiapoptotikus kaszkádokat a MAPK-útvonal szuppresszáálásával [Bhardwaj, 2019]. Ez sejtciklus gátlást (cell cycle arrest) indukál a G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fázisban, ami csökkenti miR-132 és növeli a miR-9 expresszióját [Bhardwaj, 2019]. Az összes vizsgált csoportban az említett módokon csökkentett ciklin D1-szint vezethetett az mTOR expresszió csökkenéséhez [Hall, 2008]. Továbbá a myricetin gátolta a foszfoinozitol-3 kinázt (phosphoinositide 3-kinase) (PI3K) [Walker, 2000], aminek szintén van mTOR expressziót csökkentő hatása [Chappell, 2011].

A miR-132 gátolja a RAS p21 protein activator GTPase activating protein 1 (RASA1)-et, ami az NRAS expresszióját és a HRAS aktiválódását gátolja [Masliah-Planchon, 2016]. Így ebben a kontextusban a miR-132 végső soron a MAPK-kaszkádot támogatja. Ezért a miR-132 expresszió lecsendesítése a rezveratrol és az EGCG kemopreventív hatásait közvetítheti. Ugyanakkor a miR-9 gátolja a neurofibromint, ami gátolja a NRAS aktivációját [Masliah-Planchon, 2016]. Így a miR-9 indukciója látszólag ellentmond a rezveratrol és az EGCG kemopreventív hatásának. Ugyanez igaz a proinflammatorikus citokinek által növelt ICAM1 expressziójára [Gu, 2017], amit a rezveratrol gátol [Liu, 2017] – annak ellenére, hogy az ICAM1 pozitívan modulálja a gyulladáscsökkentő miR-124 expresszióját [Gu, 2017]. Ennek a jelentősége azért nagy, mert a miR-124 gátolja a MAPK jelátviteli utat [Masliah-Planchon, 2016]. A CREB továbbá egy negatív visszacsatolósos körfolyamatban erőteljesen downregulálja a miR-9-et [Tan, 2012]. Viszont ez a korábban említett NF- $\kappa$ B1 aktivitással kohézióban kapcsolódik az általunk tapasztalt miR-9 [Aires, 2017] és miR-124 [Sun, 2015] expresszióhoz.

### 5.5.1 A myricetin prooxidáns hatása

Ugyanakkor a myricetin a májsejtekben mint prooxidáns képes hidroxil szabad gyököket ( $\cdot\text{OH}$ ) generálni, amennyiben a kataláz (CAT) és a SOD enzimek gátlást szenvednek [Laughton, 1989]. Az aromás szénhidrogének szinglet molekuláris oxigént termelhetnek [Stevens, 1968], amik képesek reagálni a CAT és a SOD enzimek hisztidin csoportjaival és ezáltal károsítják azokat [Xianyong, 2017]. Ez a folyamat végső soron még több szabad  $\cdot\text{OH}$  megjelenéséhez vezet, ami viszont képes a védő hatású miR-132 expresszióját indukálni [Liu, 2018], mely expressziót az eredményeink is alátámasztják.

### 5.5.2 A kávé klorogénsav tartalma

A klorogénsav szintén csökkenti az IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  génexpresszióját [Yeung, 2004; Zhang, 2019]. Mérésünk eredményének ellentmondanak az irodalmi adatok, melyek szerint a kávé klorogénsav-tartalma vesevédő hatást fejtett ki a miR-134 indukálásával [Sun, 2016], ami a mátrix metalloproteináz-9 (MMP-9) és MMP-7 szuppressziójához vezet [Merchant, 2017]. Ez végső soron csökkentette a – CCND1 által kódolt – ciklin D1-et [Domitrović, 2014] és inverz korrelációban van az expressziója a miR-134-gyel [Sun, 2016] – ez szintén ellentmond eredményeinknek, melynek így a közvetlen alátámasztása helyett negatív visszacsatolási mechanizmusra utal.

### 5.5.3 A koffein hatása

A koffein [Miwa, 2011] PTEN-gént aktivál, ami csökkenti a ciklin D1 sejtosztódási protein mennyiségét [Radu, 2003] ami a PI3-K/AKT/mTOR jelátviteli út gátlásához vezetett [Miwa, 2011]. Emellett *in vitro* a koffein P53 dependens apoptózist is indukál [He, 2003].

### 5.5.4 A kávé potenciálisan káros vegyületei

A kávé igen kis mennyiségben akrilamidot és furánt tartalmaz ( $\leq 100$   $\mu\text{mol/L}$ ), melyek rákkeltő hatásúak. Valóban a kemopreventív anyagok hatásaival ellentétes az általuk indukált másodlagos jelátviteli út, nevezetesen *in vitro* szignifikánsan növelték a human HCC HepG2 sejtek proliferációját, mert például indukálták a p-AKT, EGFR és a ciklin D1-útvonalat is, ami a PTEN szintjének csökkenéséhez vezetett [Xu, 2019]. A

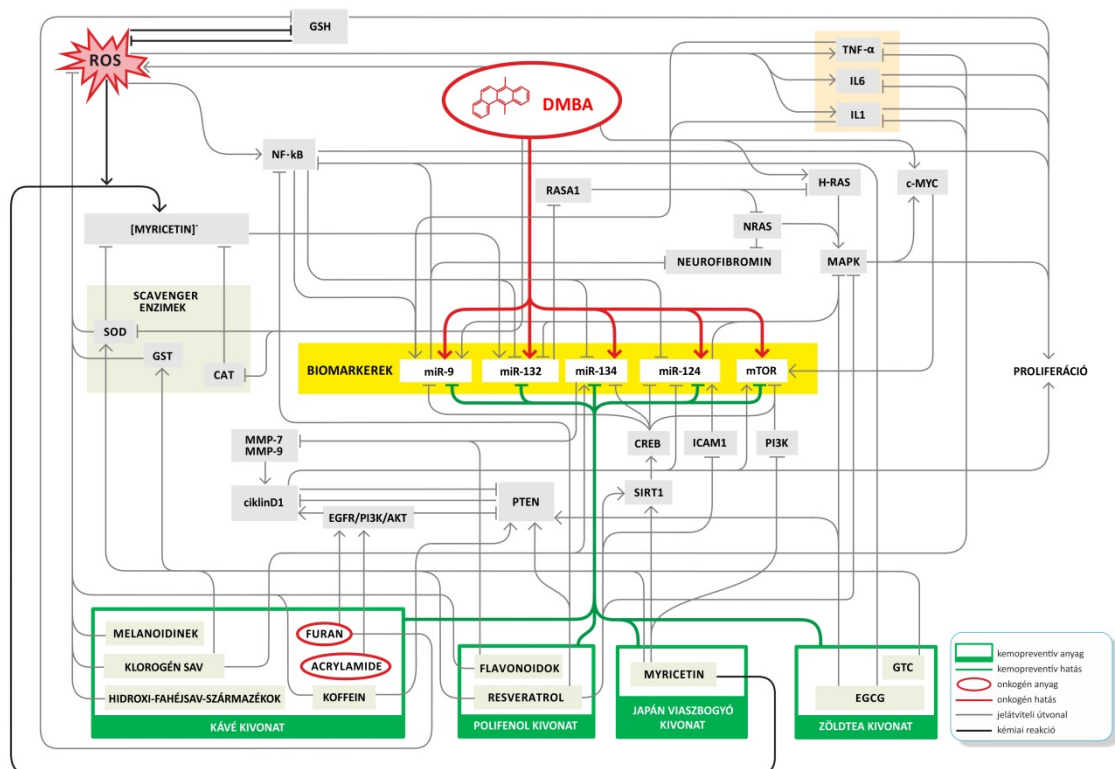
furán, mint epigenetikus karcinogén releváns sejtosztódási ciklust befolyásoló és apoptózist szabályzó gének expresszióját befolyásolta patkányok májában [Chen, 2010]. Ezen felül a metabolitjai kémiai reakciókon keresztül csökkentik a GSH-szintjét [Peterson, 2013], amin keresztül a DMBA okozta ártalommal szinergizálhat.



## 6 Következtetés és összefoglalás

### 6.1 DMBA és kemopreventív anyagok

A DMBA növelte a vizsgált miR-ek és a mTOR expresszióját, de ezt szignifikáns mértékben csökkentette a zöld tea, a japán viaszbogyó és a polifenol-kivonat fogyasztása is. Ezen eredmények részben korrelálnak a kávékivonat fogyasztásának eredményeivel (22. ábra).



22. ábra: Összefoglalás a miR-9-3, a miR-124-1, a miR-132, a miR-134 és az mTORC1 expressziós mintázatát befolyásoló hatások és másodlagos jelátvitel összefüggéseiről (az ábra nagyobb méretben megtalálható a függelékben)

Továbbá az olívaolaj-tartalmú táp etetése a májban és a lépben szignifikánsan csökkentette a miR-124-1, miR-9-3 és az mTORC1 expresszióját. Ezen kemopreventív anyagok hasonló módon fejtenek ki védő hatásokat, például ROS gátló hatásokkal és (részben hasonló) másodlagos jelátvitellel [Pikarsky, 2004]. Tehát mind a DMBA indukálta gyulladással, mind proliferációt fokozó jelátviteli utak gátlására kerültek a

vizsgált anyagok által, főleg a TNF, IL1, IL6 és a NF- $\kappa$ B (legalább részleges) blokkolásával [Storz, 2005; Reuter, 2010].

Ugyanakkor bizonyos esetekben a modell a DMBA okozta károsodások és a védő anyagok kölcsönhatásának egyes specifikus tulajdonságait is detektálta a miR expressziókon keresztül. Nevezetesen a májban specifikusan a myricetin a DMBA-kezelés hatására prooxidáns hatást fejtett ki és ez által a ROS szenzitív miR-132 expresszióját növelte a többi szervben mért expressziókhöz képest [Liu X, 2018]. Emellett a kávé szintén okozhatott sejtákorosodásokat is a karcinogén akrilamid és a furántartalmán keresztül (Xu, 2019; Chen, 2010), de méréseink eredménye alapján, feltételezhetően az olyan jótékony komponensei, mint a flavonoidok, a klorogénsav, vagy a melanoidok [Hu, 2019] kivédtek azokat.

Irodalmi adatok alapján a vizsgált kemopreventív anyagok indukálják a CREB és gátolják a NF- $\kappa$ B aktivitását [Chung, 2010; Yeung, 2004; Jung, 2017; Zhang, 2019]. Ezen két másodlagos jelátviteli út vezet a vizsgált miR-ek és az mTOR csökkent expresszióhoz is [Ghosh, 2010; Sun 2015, de la Rica, 2015; Aires, 2017]. Ez alól kivétel a miR-134, melynek az NF- $\kappa$ B csökkenés hatására nőnie kellett volna [Shuang, 2017; Sun, 2016] és a gyulladáscsökkentő mir-124, melyet az ICAM1 pozitívan kellett volna, hogy moduláljon [Gu, 2017] – ellentmondva az eredményeinknek.

Továbbá félrevezető lehet, hogy manifeszt malignus daganatokban szintén downregulált tumorszuppresszor miR-eket találni, például a miR-124 és a miR-134 glioblasztómákban és a pikkelysejtes karcinómában a miR-124 [Masliah-Planchon, 2016], vagy a miR-134 az invazív és metasztatikus HCC-ben és RCC-ben [Pan, 2017], míg a miR-9 gliómában upregulálódott [Masliah-Planchon, 2016].

## **6.2 DMBA és a TFA**

Eredményeink megerősítik, hogy DMBA mellett TFA-val kezelt csoportban az említett expressziók erőteljes és szignifikáns emelkedése a csak DMBA-val kezelt pozitív kontrollhoz képest a vizsgált miR expresszió biomarker szerepére utal [Tomesz, 2020; Park, 2015].

A TFA tartalmú táp etetése szignifikánsan emelte az összes tanulmányozott miR és mTORC1 expresszióját az összes vizsgált szervben, kivéve az mTORC1-et a lépben és a vesében. Azonban, a várakozásainkkal ellentétben a jelen vizsgálati elrendezésben használt állatmodellben a vesében a mTORC1 gén expressziója nem bizonyult megfelelő biomarkernek a TFA-fogyasztás potenciális karcinogén hatásának jelzésére. Nagyon valószínű, hogy ennek az oka az mTOR gyulladásbiológiát és sejtciklust is központi szerepben befolyásoló – és ennek megfelelően összetett – szabályozása [Liu, 2015], aminek a mechanizmusai egymás génexpressziós hatásait kioltani is képesek.

Az eredményeink negatív visszacsatolós szabályozó mechanizmusokra utalnak (melyek felderítése további vizsgálatok célpontja lehet) és háttérükben főleg a TFA sejtmembránt károsító, gyulladáskeltő és karcinogén hatásokat támogató tulajdonsága áll.

## 7 Új eredmények

Vizsgálataink alapján megállapíthatjuk, hogy:

1. A polifenol kivonat szupplementáció gátolja a DMBA hatására növekvő gén és mikroRNS expressziós változásokat a májban a miR-9-3 \*, a miR-124-1 \*\*\*, a miR-132\*\*\*, a miR-134\*\*\* az mTORC1\*\*\*; a lépben a miR-9-3 \*, a miR-124-1 \*, a miR-132\*\*\*, a miR-134\*\*\* az mTORC1\*\*\*; a vesében a miR-9-3 \*\*\*, a miR-124-1 \*, a miR-134\*\*\* az mTORC1\*\*\* esetén (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).
2. A kávé kivonat szupplementáció gátolja a DMBA hatására növekvő gén és mikroRNS expressziós változásokat a májban a miR-9-3 \*, az mTORC1\*; a lépben a miR-9-3\*, miR-134\*, az mTORC1\*; a vesében miR-9-3 \*, a miR-124-1 \*, a miR-134\* az mTORC1\* esetén (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).
3. A zöld tea kivonat szupplementáció gátolja a DMBA hatására növekvő gén és mikroRNS expressziós változásokat a májban miR-9-3 \*, a miR-124-1 \*\*\*, a miR-132\*, a miR-134\*\*\* az mTORC1\*\*\*; a lépben miR-9-3 \*\*\*, a miR-124-1 \*\*\*, a miR-132\*\*\*, a miR-134\*, az mTORC1\*\*\*; a vesében a miR-9-3 \*, a miR-124-1 \*, a miR-132\*\*\*, a miR-134\*\*\* az mTORC1\*\*\* esetén (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).
4. A japán viaszbogyó kivonat szupplementáció gátolja a DMBA hatására növekvő gén és mikroRNS expressziós változásokat a májban miR-9-3 \*\*\*, a miR-124-1 \*, a miR-134\* az mTORC1\*\*\*; a lépben a miR-9-3 \*, a miR-124-1 \*, a miR-132\*, a miR-134\*\*\* az mTORC1\*\*\*; a vesében a miR-9-3 \*, a miR-124-1 \*, a miR-132\*\*\*, a miR-134\* az mTORC1\* esetén (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).
5. Az extra szűz olívaolaj szupplementáció gátolja a DMBA hatására növekvő gén és mikroRNS expressziós változásokat a májban a miR-9-3 \*, a miR-124-1 \* és az mTORC1\*, a lépben a miR-9-3 \*, a miR-124-1 \* és az mTORC1 \*, valamint a vesékben a miR-134 \*\*\*, a miR-132 \*\*\*, a miR-124-1 \* és a miR-9-3 \*\*\* esetén (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

6. A transzsírsav szupplementáció gátolja a DMBA hatására növekvő gén és mikroRNS expressziós változásokat a májban a miR-9-3 \*\*\*, a miR-124-1 \*\*\*, a miR-132\*\*\*, a miR-134\*\*\* az mTORC1\*\*\*; a lépben a miR-9-3 \*, a miR-124-1 \*\*\*, a miR-132\*\*\*, a miR-134\*\*\*; a vesében a miR-9-3 \*, a miR-124-1 \*\*\*, a miR-132\*\*\*, a miR-134\*\*\* esetén ( \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## Irodalomjegyzék

- Abotaleb M, Samuel SM, Varghese E, Varghese S, Kubatka P, Liskova A, Büsselberg D. Flavonoids in Cancer and Apoptosis. *Cancers (Basel)*. 2018 Dec 28;11(1):28.
- Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res*. 2004. 24(5A):2783-840.
- Aires V, Delmas D, Djouadi F, Bastin J, Cherkaoui-Malki M, Latruffe N. Resveratrol-Induced Changes in MicroRNA Expression in Primary Human Fibroblasts Harboring Carnitine-Palmitoyl Transferase-2 Gene Mutation, Leading to Fatty Acid Oxidation Deficiency. *Molecules*. 2017 Dec 22;23(1):7.
- Andre FE, Booy R, Bock HL, Clemens J, Datta SK, John TJ, Lee BW, Lolekha S, Peltola H, Ruff TA, Santosham M, Schmitt HJ. Vaccination greatly reduces disease, disability, death and inequity worldwide. *Bull World Health Organ*. 2008 Feb;86(2):140-6.
- Anjom-Shoae J, Sadeghi O, Larijani B, Esmailzadeh A. Dietary intake and serum levels of trans fatty acids and risk of breast cancer: A systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *Clin Nutr*. 2020. March;39(3):755–764.
- Anna L, Holmila R, Kovács K, Gyorffy E, Gyori Z, Segesdi J, Minárovits J, Soltész I, Kostic S, Csekeo A, Husgafvel-Pursiainen K, Schoket B. Relationship between TP53 tumour suppressor gene mutations and smoking-related bulky DNA adducts in a lung cancer study population from Hungary. *Mutagenesis*. 2009 Nov;24(6):475-80.
- Apte RN, Dotan S, Elkabets M, White MR, Reich E, Carmi Y, Song X, Dvozkin T, Krelin Y, Voronov E. The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. *Cancer Metastasis Rev*. 2006 Sep;25(3):387-408.
- Ara SA, Mudda JA, Lingappa A, Rao P. Research on curcumin: A meta-analysis of potentially malignant disorders. *J Cancer Res Ther*. 2016 Jan-Mar;12(1):175-81.
- Arts IC, Hollman PC. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr*. 2005 Jan;81(1 Suppl):317S-325S.
- Baird WM, Hooven LA, Mahadevan B. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ Mol Mutagen*. 2005 Mar-Apr;45(2-3):106-14.
- Battelli C, Cho DC. mTOR inhibitors in renal cell carcinoma. *Therapy*. 2011. July;8(4):359–367.
- Benetou V, Lagiou A, Lagiou P. Chemoprevention of cancer: current evidence and future prospects. *F1000Res*. 2015 Sep 28;4(F1000 Faculty Rev):916.
- Bermúdez B, Pacheco YM, Sergio Lopez S, Abia R, Muriana FJG. Digestion and absorption of olive oil. *Grasas y Aceites*. 2004. 55(1) 1–10.
- Bhardwaj V, Mandal AKA. Next-Generation Sequencing Reveals the Role of Epigallocatechin-3-Gallate in Regulating Putative Novel and Known microRNAs Which Target the MAPK Pathway in Non-Small-Cell Lung Cancer A549 Cells. *Molecules*. 2019. 24(2).
- Bhattacharya RK, Firozi PF. Effect of plant flavonoids on microsome catalyzed reactions of aflatoxin B1 leading to activation and DNA adduct formation. 1988. *Cancer Lett* 39:85–91.

- Bienz M, Hamada F. Adenomatous polyposis coli proteins and cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol.* 2004 Oct;16(5):528-35.
- Bosetti C, La Vecchia C, Talamini R, Negri E, Levi F, Dal Maso L, et al. Food groups and laryngeal cancer risk: a case-control study from Italy and Switzerland. *Int J Cancer.* 2002;100(3):355–60.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov; 68(6):394-424.
- Brinkman MT, Buntinx F, Kellen E, Van Dongen MC, Dagnelie PC, Muls E, Zeegers MP. Consumption of animal products, olive oil and dietary fat and results from the Belgian case-control study on bladder cancer risk. *Eur J Cancer.* 2011 Feb;47(3):436-42.
- Brusselmans K, Vrolix R, Verhoeven G, Swinnen JV. Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *J Biol Chem.* 2005 Feb 18;280(7):5636-45.
- Bryk D, Zapolska-Downar D, Malecki M, Hajdukiewicz K, Sitkiewicz D. Trans fatty acids induce a proinflammatory response in endothelial cells through ROS-dependent nuclear factor- $\kappa$ B activation. *J Physiol Pharmacol.* 2011. 62(2) 229-38.
- Budán F, Varjas T, Nowrasteh G, Prantner I, Varga Z, Ember A, et al. Early modification of c-myc, Ha-ras and p53 expressions by chemical carcinogens (DMBA, MNU). *In Vivo.* 2009. Jul-Aug;23(4):591–8.
- Butt MS, Sultan MT. Coffee and its consumption: benefits and risks. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2011 Apr;51(4):363-73.
- Canel M, Serrels A, Frame MC, Brunton VG. E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. *J Cell Sci.* 2013 Jan 15;126(Pt 2):393-401.
- Cao J, Qiu J, Wang X, Lu Z, Wang D, Feng H, et al. Identification of microRNA-124 in regulation of Hepatocellular carcinoma through BIRC3 and the NF- $\kappa$ B pathway. *J Cancer.* 2018 Jul 30;9(17):3006–3015.
- Capek P, Paulovičová E, Matulová M, Mislovičová D, Navarini L, Suggi-Liverani F. Coffea arabica instant coffee--chemical view and immunomodulating properties. *Carbohydr Polym.* 2014 Mar 15; 103:418-26.
- Chang MH, You SL, Chen CJ, Liu CJ, Lee CM, Lin SM, Chu HC, Wu TC, Yang SS, Kuo HS, Chen DS; Taiwan Hepatoma Study Group. Decreased incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B vaccinees: a 20-year follow-up study. *J Natl Cancer Inst.* 2009 Oct 7;101(19):1348-55.
- Chappell WH, Steelman LS, Long JM, Kempf RC, Abrams SL, Franklin RA, Bäsecke J, Stivala F, Donia M, Fagone P, Malaponte G, Mazzarino MC, Nicoletti F, Libra M, Maksimovic-Ivanic D, Mijatovic S, Montalto G, Cervello M, Laidler P, Milella M, Tafuri A, Bonati A, Evangelisti C, Cocco L, Martelli AM, McCubrey JA. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget.* 2011 Mar;2(3):135-64.
- Chen BH, Hung MH, Chen JFF, Chang HW, Yu ML, Wan L és mtsai. A szőlőmagkivonat (GSE) antiallergén hatása az RBL-2H3 hízósejtekre. *Food Chem.* 2012; 132: 968-974

- Chen T, Mally A, Ozden S, Chipman JK. Low Doses of the Carcinogen Furan Alter Cell Cycle and Apoptosis Gene Expression in Rat Liver Independent of DNA Methylation. *Environ Health Perspect.* 2010. 118:1597–1602.
- Chen X, Yang F, Zhang T, Wang W, Xi W, Li Y, Zhang D, Huo Y, Zhang J, Yang A, Wang T. MiR-9 promotes tumorigenesis and angiogenesis and is activated by MYC and OCT4 in human glioma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019 Feb 22;38(1):99.
- Choi EJ, Jung JY, Kim GH. Genistein inhibits the proliferation and differentiation of MCF-7 and 3T3-L1 cells via the regulation of ER $\alpha$  expression and induction of apoptosis. *Exp Ther Med.* 2014 Aug; 8(2):454-458.
- Chung S, Yao H, Caito S, Hwang J, Arunachalam G, Rahman I. Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols. *Arch Biochem Biophys.* 2010. 501(1): 79–90.
- Cooper JP, Youle RJ. Balancing cell growth and death. *Curr Opin Cell Biol.* 2012 Dec;24(6):802-3.
- Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJ, Ezzati M; Comparative Risk Assessment collaborating group (Cancers). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet.* 2005 Nov 19;366(9499):1784-93.
- de la Rica L, García-Gómez A, Comet NR, Rodríguez-Ubreva J, CiudadL, Vento-Tormo R, Company C, Álvarez-Errico D, García M, Gómez-Vaquero C, Ballestar E. NF- $\kappa$ B-direct activation of microRNAs with repressive effects on monocyte-specific genes is critical for osteoclast differentiation. *Genome Biol.* 2015. 16(1):2.
- De Souza VR, Cabrera WK, Galvan A, Ribeiro OG, De Franco M, Vorraro F, Starobinas N, Massa S, Dragani TA, bañez OM. Aryl hydrocarbon receptor polymorphism modulates DMBA-induced inflammation and carcinogenesis in phenotypically selected mice. *Int J Cancer.* 2009. 124(6):1478-82.
- Domitrović R, Cvijanović O, Šušnić V, Katalinić N. Renoprotective mechanisms of chlorogenic acid in cisplatin-induced kidney injury. *Toxicology.* 2014. 324:98-107.
- Drew DA, Chin SM, Gilpin KK, Parziale M, Pond E, Schuck MM, Stewart K, Flagg M, Rawlings CA, Backman V, Carolan PJ, Chung DC, Colizzo FP 3rd, Freedman M, Gala M, Garber JJ, Huttenhower C, Kedrin D, Khalili H, Kwon DS, Markowitz SD, Milne GL, Nishioka NS, Richter JM, Roy HK, Staller K, Wang M, Chan AT. Aspirin Intervention for the REDuction of colorectal cancer risk (ASPIRED): a study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* 2017 Feb 1;18(1):50.
- Du L, Pertsemlidis A. microRNAs and lung cancer: tumors and 22-mers [published correction appears in *Cancer Metastasis Rev.* 2010; 29(4):801–2]. *Cancer Metastasis Rev.* 2010;29(1):109–122.
- Duvoix A, Blasius R, Delhalle S, Schnekenburger M, Morceau F, Henry E, Dicato M, Diederich M. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. *Cancer Lett.* 2005 Jun 8;223(2):181-90.
- Eastham JA, Hall SJ, Sehgal I, Wang J, Timme TL, Yang G, Connell-Crowley L, Elledge SJ, Zhang WW, Harper JW, et al. In vivo gene therapy with p53 or p21 adenovirus for prostate cancer. *Cancer Res.* 1995 Nov 15;55(22):5151-5.



EMMI rendelet, 2015: 71/2013. (XI. 20.) EMMI rendelet az élelmiszerekben lévő transz-zsírsavak megengedhető legnagyobb mennyiségéről, a transz-zsírsav tartalmú élelmiszerek forgalmazásának feltételeiről és hatósági ellenőrzéséről, valamint a lakosság transz-zsírsav bevitelének nyomon követésére vonatkozó szabályokról. <https://njt.hu/jogszabaly/2013-71-20-5H>

Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*. 2001 May 17;411(6835):342-8.

Ferreri C, Masi A, Sansone A, Giacometti G, Larocca AV, Menounou G, Scanferlato R, Tortorella S, Rota D, Conti M, Deplano S, Louka M, Maranini AR, Salati A, Sunda V, Chatgililoglu C. Fatty Acids in Membranes as Homeostatic, Metabolic and Nutritional Biomarkers: Recent Advancements in Analytics and Diagnostics. *Diagnostics (Basel)*. 2016 Dec 22;7(1):1.

Ferrucci LM, Cartmel B, Molinaro AM, Leffell DJ, Bale AE, Mayne ST. Tea, coffee, and caffeine and early-onset basal cell carcinoma in a case-control study. *Eur J Cancer Prev*. 2014. 23(4):296-302.

Fiander H, Schneider H. Dietary ortho phenols that induce glutathione S-transferase and increase the resistance of cells to hydrogen peroxide are potential cancer chemopreventives that act by two mechanisms: the alleviation of oxidative stress and the detoxification of mutagenic xenobiotics. *Cancer Lett*. 2000. 156:17–24.

Formosa A, Lena AM, Markert EK, Cortelli S, Miano R, Mauriello A, Croce N, Vandesompele J, Mestdagh P, Finazzi-Agrò E, Levine AJ, Melino G, Bernardini S, Candi E. DNA methylation silences miR-132 in prostate cancer. *Oncogene*. 2013 Jan 3;32(1):127-34.

Fortes C, Forastiere F, Farchi S, Mallone S, Trequattrinni T, Anatra F, et al. The protective effect of the Mediterranean diet on lung cancer. *Nutr Cancer*. 2003;46(1):30–7.

Gaascht F, Dicato M, Diederich M. Coffee provides a natural multitarget pharmacopeia against the hallmarks of cancer. 2015. *Genes Nutr*. 10(6). 51.

Gartenhaus RB, Wang P, Hoffmann P. Induction of the WAF1/CIP1 protein and apoptosis in human T-cell leukemia virus type I-transformed lymphocytes after treatment with adriamycin by using a p53-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jan 9;93(1):265-8.

Gelboin HV. Benzo[alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol Rev*. 1980 Oct;60(4):1107-66.

Gerszon J, Rodacka A, Puchała M. Antioxidant Properties of Resveratrol and its Protective Effects in Neurodegenerative Diseases 2014. (4)2. 97–117.

Ghosh HS, McBurney M, Robbins PD. SIRT1 negatively regulates the mammalian target of rapamycin. *PLoS One*. 2010. 5(2):e9199.

Giusti L, Angeloni C, Barbalace MC, Lacerenza S, Ciregia F, Ronci M, et al. A Proteomic Approach to Uncover Neuroprotective Mechanisms of Oleocanthal against Oxidative Stress. *Int J Mol Sci*. 2018. August 8;19(8):2329.

Goldberg DM, Yan J, Soleas GJ. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin Biochem*. 2003 Feb;36(1):79-87.

Gottlieb TM, Oren M. p53 and apoptosis. *Semin Cancer Biol*. 1998;8(5):359-68.

- Gray RT, Cantwell MM, Coleman HG, Loughrey MB, Bankhead P, McQuaid S, O'Neill RF, Arthur K, Bingham V, McGready C, Gavin AT, Cardwell CR, Johnston BT, James JA, Hamilton PW, Salto-Tellez M, Murray LJ. Evaluation of PTGS2 Expression, PIK3CA Mutation, Aspirin Use and Colon Cancer Survival in a Population-Based Cohort Study. *Clin Transl Gastroenterol*. 2017 Apr 27;8(4):e91.
- Gruczyńska E, Kowalska D, Kozłowska M, Majewska E, Tarnowska K. Furan in roasted, ground and brewed coffee. *Rocz Panstw Zakl Hig*. 2018;69(2):111-118.
- Gu W, Yao L, Li L, Zhang J, Place AT, Minshall RD, Liu G. ICAM-1 regulates macrophage polarization by suppressing MCP-1 expression via miR-124 upregulation. *Oncotarget*. 2017 Dec 5;8(67):111882-111901.
- Hall MN. mTOR-what does it do? *Transplant Proc*. 2008 Dec;40(10 Suppl):S5-8.
- Hanahan D and Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, March 4, 2011. 646-674.
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*. 1993 Nov 19;75(4):805-16.
- Hashim D, Boffetta P, La Vecchia C, Rota M, Bertuccio P, Malvezzi M, Negri E. The global decrease in cancer mortality: trends and disparities. *Annals of Oncology*. 2016. (27)5. 926–933.
- He Z, Ma WY, Hashimoto T, Bode AM, Yang CS, Dong Z. Induction of apoptosis by caffeine is mediated by the p53, Bax, and caspase 3 pathways. *Cancer Res*. 2003 Aug 1;63(15):4396-401.
- Hildebrandt MA, Gu J, Lin J, Ye Y, Tan W, Tamboli P, Wood CG, Wu X. Hsa-miR-9 methylation status is associated with cancer development and metastatic recurrence in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2010 Oct 21;29(42):5724-8.
- Hirao A. [Regulation of cancer behavior mediated by mTOR signal]. *Nihon Rinsho*. 2015 May;73(5):773-8. Japanese.
- Hornedo-Ortega R, Cerezo AB, de Pablos RM, Krisa S, Richard T, García-Parrilla MC, Troncoso AM. Phenolic Compounds Characteristic of the Mediterranean Diet in Mitigating Microglia-Mediated Neuroinflammation. *Front Cell Neurosci*. 2018 Oct 23;12:373.
- Hu GL, Wang X, Zhang L, Qiu MH. The sources and mechanisms of bioactive ingredients in coffee. *Food Funct*. 2019. 10(6) 3113-3126.
- Huang YQ, Lu X, Min H, Wu QQ, Shi XT, Bian KQ, Zou XP. Green tea and liver cancer risk: A meta-analysis of prospective cohort studies in Asian populations. *Nutrition*. 2016. 32(1):3-8.
- Hui L, Zatloukal K, Scheuch H, Stepniak E, Wagner EF. Proliferation of human HCC cells and chemically induced mouse liver cancers requires JNK1-dependent p21 downregulation. *J Clin Invest*. 2008 Dec;118(12):3943-53.
- IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol 100, A Review of Human Carcinogens. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2011. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/PDFs/index.php>. Accessed November 2,
- Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*. 2002 Apr;2(4):277-88.

- Iso H, Kubota Y. Nutrition and disease in the Japan Collaborative Cohort study for evaluation of cancer (JACC). *Asian Pac J Cancer Prev* 2007; 8: 35-80.
- Janiszewska M, Primi MC, Izzard T. Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. *J Biol Chem*. 2020 Feb 21;295(8):2495-2505.
- Jeon JS, Kwon S, Ban K, Kwon Hong Y, Ahn C, Sung JS, Choi I. Regulation of the Intracellular ROS Level Is Critical for the Antiproliferative Effect of Quercetin in the Hepatocellular Carcinoma Cell Line HepG2. *Nutr Cancer*. 2019;71(5):861-869.
- Jiang W, Yan Y, Chen M, Luo G, Hao J, Pan J, Hu S, Guo P, Li W, Wang R, Zuo Y, Sun Y, Sui S, Yu W, Pan Z, Zou K, Zheng Z, Deng W, Wu X, Guo W. Aspirin enhances the sensitivity of colon cancer cells to cisplatin by abrogating the binding of NF- $\kappa$ B to the COX-2 promoter. *Aging (Albany NY)*. 2020 Jan 6;12(1):611-627.
- Johnson JJ, Mukhtar H. Curcumin for chemoprevention of colon cancer. *Cancer Lett*. 2007 Oct 8;255(2):170-81.
- Joura EA, Leodolter S, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Koutsky LA, Garland SM, Harper DM, Tang GW, Ferris DG, Steben M, Jones RW, Bryan J, Taddeo FJ, Bautista OM, Esser MT, Sings HL, Nelson M, Boslego JW, Sattler C, Barr E, Paavonen J. Efficacy of a quadrivalent prophylactic human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like-particle vaccine against high-grade vulval and vaginal lesions: a combined analysis of three randomised clinical trials. *Lancet*. 2007 May 19;369(9574):1693-702.
- Jung HY, Lee D, Ryu HG, et al. Myricetin improves endurance capacity and mitochondrial density by activating SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ . *Sci Rep*. 2017;7(1):6237. Published 2017 Jul 24.
- Kámory E, Olasz J, Csuka O. Somatic APC inactivation mechanisms in sporadic colorectal cancer cases in Hungary. *Pathol Oncol Res*. 2008 Mar;14(1):51-6.
- Kandaswami C, Middleton E Jr. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. *Adv Exp Med Biol*. 1994;366:351-76.
- Karar J, Maity A. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Front Mol Neurosci*. 2011 Dec 2;4:51.
- Khafaei M, Rezaie E, Mohammadi A, Shahnazi Gerdehsang P, Ghavidel S, Kadkhoda S, Zorrieh Zahra A, Forouzanfar N, Arabameri H, Tavallaie M. miR-9: From function to therapeutic potential in cancer. *J Cell Physiol*. 2019 Jan 28.
- Khanfar MA, Bardaweel SK, Akl MR, El Sayed KA. Olive Oil-derived Oleocanthal as Potent Inhibitor of Mammalian Target of Rapamycin: Biological Evaluation and Molecular Modeling Studies. *Phytother Res*. 2015. November;29(11):1776–82.
- Kim DE, Kim Y, Cho DH, Jeong SY, Kim SB, Suh N, Lee JS, Choi EK, Koh JY, Hwang JJ, Kim CS. Raloxifene induces autophagy-dependent cell death in breast cancer cells via the activation of AMP-activated protein kinase. *Mol Cells*. 2015;38(2):138-44.
- Kim EM, Jung CH, Kim J, Hwang SG, Park JK, Um HD. The p53/p21 Complex Regulates Cancer Cell Invasion and Apoptosis by Targeting Bcl-2 Family Proteins. *Cancer Res*. 2017 Jun 1;77(11):3092-3100.

- Kim J, Peters CE, Arrandale VH, Labrèche F, Ge CB, McLeod CB, Song C, Lavoué J, Davies HW, Nicol AM, Pahwa M, Demers PA. Burden of lung cancer attributable to occupational diesel engine exhaust exposure in Canada. *Occup Environ Med*. 2018 Sep;75(9):617-622.
- Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr*. 2002. 76(3):560-8.
- Kopustinskiene, 2020: Kopustinskiene DM, Jakstas V, Savickas A, Bernatoniene J. Flavonoids as Anticancer Agents. *Nutrients*. 2020 Feb 12;12(2):457.
- Kouka P, Tsakiri G, Tzortzi D, Dimopoulou S, Sarikaki G, Stathopoulos P, et al. The Polyphenolic Composition of Extracts Derived from Different Greek Extra Virgin Olive Oils Is Correlated with Their Antioxidant Potency. *Oxid Med Cell Longev*. 2019. March 20;2019:1870965.
- Koutros S, Kogevinas M, Friesen MC, Stewart PA, Baris D, Karagas MR, Schwenn M, Johnson A, Monawar Hosain GM, Serra C, Tardon A, Carrato A, Garcia-Closas R, Moore LE, Nickerson ML, Hewitt SM, Lenz P, Schned AR, Lloreta J, Allory Y, Zhang H, Chatterjee N, Garcia-Closas M, Rothman N, Malats N, Silverman DT. Diesel exhaust and bladder cancer risk by pathologic stage and grade subtypes. *Environ Int*. 2020 Feb;135:105346.
- Kwong LN, Dove WF. APC and its modifiers in colon cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2009;656:85-106.
- Lagos D, Pollara G, Henderson S, Gratrix F, Fabani M, Milne RS, et al. miR-132 regulates antiviral innate immunity through suppression of the p300 transcriptional co-activator. *Nat Cell Biol*. 2010. May;12(5):513–9.
- Landis-Piwowar KR, Huo C, Chen D, Milacic V, Shi G, Chan TH et al. A novel prodrug of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate as a potential anticancer agent. *Cancer Res* 2007; 67: 4303-4310 .
- Laplanche M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 2012. April 13;149(2):274–93.
- Laughton MJ, Halliwell B, Evans PJ, Hoult JR. Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. Effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochem Pharmacol*. 1989. 38(17):2859-65.
- Lesko AC, Goss KH, Yang FF, Schwertner A, Hular I, Onel K, Prospero JR. The APC tumor suppressor is required for epithelial cell polarization and three-dimensional morphogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Mar;1853(3):711-23.
- Li H, Wang X, Li P, Lid Y, Wang H. A szőlő (*Vitis vinifera*) magpor antioxidáns aktivitásának összehasonlító vizsgálata különböző módszerekkel. *J Food Drug Anal*. 2008; 16 (6), 67-73.
- Liang N, Kitts DD. Role of Chlorogenic Acids in Controlling Oxidative and Inflammatory Stress Conditions. *Nutrients*. 2015 Dec 25;8(1):16.
- Lim W, Park S, Bazer FW, Song G. Naringenin-Induced Apoptotic Cell Death in Prostate Cancer Cells Is Mediated via the PI3K/AKT and MAPK Signaling Pathways. *J Cell Biochem*. 2017 May;118(5):1118-1131.
- Lipworth L, Martínez ME, Angell J, Hsieh CC, Trichopoulos D. Olive oil and human cancer: an assessment of the evidence. *Prev Med*. 1997. Mar-Apr;26(2):181–90.

Liu CW, Sung HC, Lin SR, Wu CW, Lee CW, Lee IT, Yang YF, Yu IS, Lin SW, Chiang MH, Liang CJ, Chen YL. Resveratrol attenuates ICAM-1 expression and monocyte adhesiveness to TNF- $\alpha$ -treated endothelial cells: evidence for an anti-inflammatory cascade mediated by the miR-221/222/AMPK/p38/NF- $\kappa$ B pathway. *Sci Rep*. 2017. 7:44689.

Liu K, Li X, Cao Y, Ge Y, Wang J, Shi B. MiR-132 inhibits cell proliferation, invasion and migration of hepatocellular carcinoma by targeting PIK3R3. *Int J Oncol*. 2015. October;47(4):1585–93.

Liu S, Wang XJ, Liu Y, Cui YF. PI3K/AKT/mTOR signaling is involved in (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced apoptosis of human pancreatic carcinoma cells. *Am J Chin Med*. 2013. 41(3) 629-42.

Liu X, Tong Z, Chen K, Hu X, Jin H, Hou M. The Role of miRNA-132 against Apoptosis and Oxidative Stress in Heart Failure. *Biomed Res Int*. 2018 Feb 25;2018:3452748.

Loomis D, Huang W, Chen G. The International Agency for Research on Cancer (IARC) evaluation of the carcinogenicity of outdoor air pollution: focus on China. *Chin J Cancer*. 2014 Apr;33(4):189-96.

López-Miranda J, Pérez-Jiménez F, Ros E, De Caterina R, Badimón L, Covas MI, et al. Olive oil and health: summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaén and Córdoba (Spain) 2008. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2010. May;20(4):284–94.

Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med*. 2009 Feb-Apr;30(1-2):42-59.

Luk JM, Burchard J, Zhang C, Liu AM, Wong KF, Shek FH, et al. DLK1-DIO3 genomic imprinted microRNA cluster at 14q32.2 defines a stemlike subtype of hepatocellular carcinoma associated with poor survival. *J Biol Chem*. 2011. September 2;286(35):30706–13.

Ma L, Young J, Prabhala H, Pan E, Mestdagh P, Muth D, et al. miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat Cell Biol*. 2010. March;12(3):247–56.

Ma Z, Li K, Chen P, Pan Q, Li X, Zhao G. MiR-134, Mediated by IRF1, Suppresses Tumorigenesis and Progression by Targeting VEGFA and MYCN in Osteosarcoma. *Anticancer Agents Med Chem*. 2020;20(10):1197-1208.

Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009 Dec 17;361(25):2449-60.

Martin LJ, 1998 Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE, Portera-Cailliau C. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull*. 1998 Jul 1;46(4):281-309.

Masliah-Planchon J, Garinet S, Pasmant E. RAS-MAPK pathway epigenetic activation in cancer: miRNAs in action. *Oncotarget*. 2016. 7(25):38892-38907.

Merchant N, Nagaraju GP, Rajitha B, Lammata S, Jella KK, Buchwald ZS, Lakka SS, Ali AN. Matrix metalloproteinases: their functional role in lung cancer. *Carcinogenesis*. 2017. 38(8)766-780.

Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 2000;52:673–751.

- Miwa S, Sugimoto N, Shirai T, Hayashi K, Nishida H, Ohnari I, Takeuchi A, Yachie A, Tsuchiya H. Caffeine activates tumor suppressor PTEN in sarcoma cells. *Int J Oncol.* 2011. 39(2):465-72.
- Mohansrinivasan V. et al. Exploring the Anticancer Activity of Grape Seed Extract on Skin Cancer Cell Lines A431. *Brazilian Archives of Biology and Technology* [online]. 2015, v. 58, n. 4, Accessed 26 July 2022, pp. 540-546.
- Morin PJ. beta-catenin signaling and cancer. *Bioessays.* 1999. December;21(12):1021–30.
- Mozaffarian D, Katan MB, Ascherio A, Stampfer MJ, Willett WC. Trans fatty acids and cardiovascular disease. *N Engl J Med.* 2006. April 13;354(15):1601–13.
- Mozaffarian D, Aro A, Willett WC. Health effects of trans-fatty acids: experimental and observational evidence. *Eur J Clin Nutr.* 2009 May;63 Suppl 2:S5-21.
- Muhammad Zia-Ul-Haq, Muhammad Riaz, Vincenzo De Feo, Hawa Z. E. Jaafar, Marius Moga [Rubus Fruticosus L.: Constituents, Biological Activities and Health Related Uses; *Molecules.* 2014 Aug; 19(8): 10998–11029.]
- Najia, Youling L.Xiong, Baohu Kong, Qian Liu, Xiufang Xia, [Radical scavenging activity of black currant (*Ribes nigrum* L.) extract and its inhibitory effect on gastric cancer cell proliferation via induction of apoptosis; *Journal of Functional Foods*, Volume 4, Issue 1, January 2012, Pages 382-390]
- Nakbi A, Tayeb W, Dabbou S, Issaoui M, Grissa AK, Attia N, Hammami M. Dietary olive oil effect on antioxidant status and fatty acid profile in the erythrocyte of 2,4-D- exposed rats. *Lipids Health Dis.* 2010 Aug 25;9:89.
- Narayanan, BA. Chemopreventive agents alters global gene expression pattern: predicting their mode of action and targets. *Curr Cancer Drug Targets.* 2006. 6(8), 711-727.
- Tájékoztató a transzsírsavakról (71/2013. (XI.20.) EMMI rendelet) - Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Élelmiszer- és Takarmánybiztonsági Igazgatóság, 2014.03.03. Keresés: 2021.03.08.
- A policiklusos aromás szénhidrogénekről - Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Élelmiszer: <https://portal.nebih.gov.hu/-/a-policiklusos-aromas-szenhidrogenekrol> Keresés: 2021.03.08.
- Nguyen AV, Martinez M, Stamos MJ, Moyer MP, Planutis K, Hope C, Holcombe RF. Results of a phase I pilot clinical trial examining the effect of plant-derived resveratrol and grape powder on Wnt pathway target gene expression in colonic mucosa and colon cancer. *Cancer Manag Res.* 2009 Apr 3;1:25-37.
- Notarnicola M, Tutino V, De Nunzio V, Dituri F, Caruso MG, Giannelli G. Dietary  $\omega$ -3 Polyunsaturated Fatty Acids Inhibit Tumor Growth in Transgenic ApcMin/+ Mice, Correlating with CB1 Receptor Up-Regulation. *Int J Mol Sci.* 2017. February 24;18(3):485.
- Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Spiegelhalter B, Bartsch H. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *Eur J Cancer.* 2000. June;36(10):1235–47.
- Ozaki T, Nakagawara A. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers (Basel).* 2011 Mar 3;3(1):994-1013.

- Pan JY, Zhang F, Sun CC, Li SJ, Li G, Gong FY, et al. miR-134: A Human Cancer Suppressor? *Mol Ther Nucleic Acids*. 2017. March 17;6:140–149.
- Pan P, Huang YW, Oshima K, Yearsley M, Zhang J, Yu J, Arnold M, Wang LS. Could Aspirin and Diets High in Fiber Act Synergistically to Reduce the Risk of Colon Cancer in Humans? *Int J Mol Sci*. 2018 Jan 6;19(1):166.
- Park EJ, Pezzuto JM. The pharmacology of resveratrol in animals and humans. *Biochim Biophys Acta*. 2015. 1852(6):1071-113.
- Park J, Min JS, Chae U, Lee JY, Song KS, Lee HS, et al. Anti-inflammatory effect of oleuropein on microglia through regulation of Drp1-dependent mitochondrial fission. *J Neuroimmunol*. 2017. May 15;306:46–52.
- Park JK, Henry JC, Jiang J, Esau C, Gusev Y, Lerner MR, Postier RG, Brackett DJ, Schmittgen TD. miR-132 and miR-212 are increased in pancreatic cancer and target the retinoblastoma tumor suppressor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Mar 25;406(4):518-23.
- Parveen A, Akash MS, Rehman K, Kyunn WW. Dual Role of p21 in the Progression of Cancer and Its Treatment. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2016;26(1):49-62.
- Pastore RL, Fratellone P. Potential health benefits of green tea (*Camellia sinensis*): a narrative review. *Explore (NY)*. 2006 Nov-Dec;2(6):531-9.
- Pelucchi C, Bosetti C, Negri E, Lipworth L, La Vecchia C. Olive oil and cancer risk: an update of epidemiological findings through 2010. *Curr Pharm Des*. 2011;17(8):805–12.
- Pérez-Ortiz JM, Alguacil LF, Salas E, Hermosín-Gutiérrez I, Gómez-Alonso S, González-Martín C. Antiproliferative and cytotoxic effects of grape pomace and grape seed extracts on colorectal cancer cell lines. *Food Sci Nutr*. 2019 Aug 2;7(9):2948-2957.
- Peterson LA. Reactive metabolites in the biotransformation of molecules containing a furan ring. *Chem Res Toxicol*. 2013 Jan 18;26(1):6-25.
- Pietsch EC, Sykes SM, McMahon SB, Murphy ME. The p53 family and programmed cell death. *Oncogene*. 2008 Oct 27;27(50):6507-21.
- Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, Gutkovich-Pyest E, Urieli-Shoval S, Galun E, Ben-Neriah Y. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*. 2004. 431(7007):461-6.
- Pratheeshkumar P, Son YO, Budhraj A, Wang X, Ding S, Wang L, Hitron A, Lee JC, Kim D, Divya SP, Chen G, Zhang Z, Luo J, Shi X. Luteolin inhibits human prostate tumor growth by suppressing vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis. *PLoS One*. 2012;7(12):e52279.
- Qi A, Han J, Jia F, Liu C. miR-3175 and miR-134 affect proliferation, invasion and apoptosis of glioma cells through PI3K/AKT signaling pathway. *J BUON*. 2019 Nov-Dec;24(6):2465-2474.
- Quoc Trung L, Espinoza JL, Takami A, Nakao S. Resveratrol induces cell cycle arrest and apoptosis in malignant NK cells via JAK2/STAT3 pathway inhibition. *PLoS One*. 2013;8(1):e55183.
- Radu A, Neubauer V, Akagi T, Hanafusa H, Georgescu MM. PTEN induces cell cycle arrest by decreasing the level and nuclear localization of cyclin D1. *Mol Cell Biol*. 2003. 23(17) 6139-49.

- Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Dec;1863(12):2977-2992.
- Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*. 2010;49(11):1603-1616.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*. 1996;20(7):933-56.
- Rodríguez-García C, Sánchez-Quesada C, J Gaforio J. Dietary Flavonoids as Cancer Chemopreventive Agents: An Updated Review of Human Studies. *Antioxidants (Basel)*. 2019 May 18;8(5):137.
- Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr*. 2002;22:19-34.
- Sato T, Nakashima A, Guo L, Coffman K, Tamanoi F. Single amino-acid changes that confer constitutive activation of mTOR are discovered in human cancer. *Oncogene*. 2010. May 6;29(18):2746–52.
- Schneider Y, Vincent F, Durantou B, Badolo L, Gossé F, Bergmann C, Seiler N, Raul F. Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. *Cancer Lett*. 2000 Sep 29;158(1):85-91.
- Schooley AM, Andrews NM, Zhao H, Addison CL.  $\beta$ 1 integrin is required for anchorage-independent growth and invasion of tumor cells in a context dependent manner. *Cancer Lett*. 2012. March 28;316(2):157–67.
- Schrör K. Aspirin and platelets: the antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis. *Semin Thromb Hemost*. 1997;23(4):349-56.
- Seiquer I, Rueda A, Olalla M, Cabrera-Vique C. Assessing the bioavailability of polyphenols and antioxidant properties of extra virgin argan oil by simulated digestion and Caco-2 cell assays. Comparative study with extra virgin olive oil. *Food Chem*. 2015 Dec 1;188:496-503.
- Senda T, Shimomura A, Iizuka-Kogo A. Adenomatous polyposis coli (Apc) tumor suppressor gene as a multifunctional gene. *Anat Sci Int*. 2005 Sep;80(3):121-31.
- Shakibaei M, John T, Schulze-Tanzil G, Lehmann I, Mobasheri A. Suppression of NF-kappaB activation by curcumin leads to inhibition of expression of cyclo-oxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human articular chondrocytes: Implications for the treatment of osteoarthritis. *Biochem Pharmacol*. 2007 May 1;73(9):1434-45.
- Shankar S, Singh G, Srivastava RK. Chemoprevention by resveratrol: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Front Biosci*. 2007 Sep 1;12:4839-54.
- Shashirekha MN, Mallikarjuna SE, Rajarathnam S. Status of bioactive compounds in foods, with focus on fruits and vegetables. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2015;55(10):1324-39.
- Shen J, Xu L, Qu C, Sun H, Zhang J. *Behav Brain Res*. Resveratrol prevents cognitive deficits induced by chronic unpredictable mild stress: Sirt1/miR-134 signalling pathway regulates CREB/BDNF expression in hippocampus in vivo and in vitro. 2018. (3)349:1-7.
- Shi JY, Rubino RE, Nicol CJB. Examining the Role of Nuclear Receptors During In Vivo Chemical-Mediated Breast Tumorigenesis. *Methods Mol Biol*. 2019;1966:203-210.



Shi XB, Xue L, Ma AH, Tepper CG, Gandour-Edwards R, Kung HJ, deVere White RW. Tumor suppressive miR-124 targets androgen receptor and inhibits proliferation of prostate cancer cells. *Oncogene*. 2013 Aug 29;32(35):4130-8.

Shuang T, Wang M, Zhou Y, Shi C, Wang D. NF- $\kappa$ B1, c-Rel, and ELK1 inhibit miR-134 expression leading to TAB1 upregulation in paclitaxel-resistant human ovarian cancer. *Oncotarget*. 2017. 8(15): 24853–24868.

Siddiqui IA, Afaq F, Adhami VM, Ahmad N, Mukhtar H. Antioxidants of the beverage tea in promotion of human health. *Antioxid Redox Signal*. 2004 Jun;6(3):571-82.

Smith ML, Chen IT, Zhan Q, O'Connor PM, Fornace AJ Jr. Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of u.v.-type DNA damage. *Oncogene*. 1995 Mar 16;10(6):1053-9.

Smoliga JM, Baur JA, Hausenblas HA. Resveratrol and health – A comprehensive review of human clinical trials. *Mol. Nutr. Food Res*. 2011, 55, 1129–1141.

Sorrentino ZA, Smith G, Palm L, Motwani K, Butterfield J, Archer C, Henderson R, Heldermon C, Gautam S, Brantly ML. An Erythritol-Sweetened Beverage Induces Satiety and Suppresses Ghrelin Compared to Aspartame in Healthy Non-Obese Subjects: A Pilot Study. *Cureus*. 2020 Nov 10;12(11):e11409.

Stetler-Stevenson WG, Yu AE. Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. *Semin Cancer Biol*. 2001 Apr;11(2):143-52.

Stevens B, Algar BE. Photoperoxidation of unsaturated organic molecules. II. Autoperoxidation of aromatic hydrocarbons. *J. Phys. Chem.*1968. (72)10. 3468-3474.

Steward WP, Brown K. Cancer chemoprevention: a rapidly evolving field. *Br J Cancer*. 2013 Jul 9;109(1):1-7.

Stoner GD, Chen T, Kresty LA, Aziz RM, Reinemann T, Nines R. Protection against esophageal cancer in rodents with lyophilized berries: potential mechanisms. *Nutr Cancer*. 2006;54(1):33-46.

Storz P. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci*. 2005 May 1;10:1881-96.

Sun CC, Li SJ, Li DJ. Hsa-miR-134 suppresses non-small cell lung cancer (NSCLC) development through down-regulation of CCND1. 2016. *Oncotarget*. 7 35960–35978.

Sun S, Gong F, Liu P, Miao Q. Metformin combined with quercetin synergistically repressed prostate cancer cells via inhibition of VEGF/PI3K/Akt signaling pathway. *Gene*. 2018 Jul 20;664:50-57.

Sun X, Hu Y, Wu J, Shi L, Zhu L, Xi PW, Wei JF, Ding Q. RBMS2 inhibits the proliferation by stabilizing P21 mRNA in breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018 Dec 4;37(1):298.

Sun Y, Ai X, Shen S, Lu S. NF- $\kappa$ B-mediated miR-124 suppresses metastasis of non-small-cell lung cancer by targeting MYO10. *Oncotarget*. 2015. 6(10). 8244–8254.

Switon K, Kotulska K, Janusz-Kaminska A, Zmorzynska J, Jaworski J. Molecular neurobiology of mTOR. *Neuroscience*. 2017 Jan 26;341:112-153.

Szpechcinski A, Florczuk M, Duk K, Zdral A, Rudzinski S, Bryl M, et al. The expression of circulating miR-504 in plasma is associated with EGFR mutation status in non-small-cell lung carcinoma patients. *Cell Mol Life Sci*. 2019. September;76(18):3641–3656.

- Tan X, Wang S, Yang B, Zhu L, Yin B, Chao T, Zhao J, Yuan J, Qiang B, Peng X. The CREB-miR-9 negative feedback minicircuitry coordinates the migration and proliferation of glioma cells. *PLoS One*. 2012.7(11):e49570.
- Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*. 1999 Apr 1;398(6726):422-6.
- Tomesz A, Szabo L, Molnar R, Deutsch A, Darago R, Mathe D, et al. Effect of 7,12-Dimethylbenz( $\alpha$ )anthracene on the Expression of miR-330, miR-29a, miR-9-1, miR-9-3 and the mTORC1 Gene in CBA/Ca Mice. *In Vivo*. 2020. Sep-Oct;.
- Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2016. 25(1):16-27.
- Tozer GM, Kanthou C, Baguley BC. Disrupting tumour blood vessels. *Nat Rev Cancer*. 2005 Jun;5(6):423-35.
- Turati F, Rossi M, Pelucchi C, Levi F, La Vecchia C. Fruit and vegetables and cancer risk: a review of southern European studies. *Br J Nutr*. 2015 Apr;113 Suppl 2:S102-10. doi: 10.1017/S0007114515000148. PMID: 26148912. Vauzour D. Dietary polyphenols as modulators of brain functions: biological actions and molecular mechanisms underpinning their beneficial effects. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:914273.
- Vannini I, Fanini F, Fabbri M. MicroRNAs as lung cancer biomarkers and key players in lung carcinogenesis. *Clin Biochem*. 2013. July;46(10-11):918-25. 10.1016/j.clinbiochem.2013.01.024 Epub 2013 Feb 8. Erratum in: *Clin Biochem*. 2019 Jan;63:162. Erratum in: *Clin Biochem*. 2019 Jun;68:58.
- Vauzour D. Dietary polyphenols as modulators of brain functions: biological actions and molecular mechanisms underpinning their beneficial effects. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:914273.
- Vélez-Cruz R, Johnson DG. The Retinoblastoma (RB) Tumor Suppressor: Pushing Back against Genome Instability on Multiple Fronts. *Int J Mol Sci*. 2017 Aug 16;18(8):1776.
- Viedma-Rodríguez R, Baiza-Gutman L, Salamanca-Gómez F, Diaz-Zaragoza M, Martínez-Hernández G, Ruiz Esparza-Garrido R, Velázquez-Flores MA, Arenas-Aranda D. Mechanisms associated with resistance to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer (review). *Oncol Rep*. 2014 Jul;32(1):3-15.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000 Nov 16;408(6810):307-10.
- Wajant H. The role of TNF in cancer. *Results Probl Cell Differ*. 2009;49:1-15.
- Walker EH, Pacold ME, Perisic O, Stephens L, Hawkins PT, Wymann MP, Williams RL. Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Mol Cell*. 2000 Oct;6(4):909-19.
- Wallström et al., 2000 Wallström P, Wirfält E, Janzon L, Mattisson I, Elmståhl S, Johansson U, Berglund G. Fruit and vegetable consumption in relation to risk factors for cancer: a report from the Malmö Diet and Cancer Study. *Public Health Nutr*. 2000 Sep;3(3):263-71.
- Wan HY, Guo LM, Liu T, Liu M, Li X, Tang H. Regulation of the transcription factor NF-kappaB1 by microRNA-9 in human gastric adenocarcinoma. *Mol Cancer*. 2010 Jan 26;9:16.

- Wang D, Ren J, Ren H, Fu JL, Yu D. MicroRNA-132 suppresses cell proliferation in human breast cancer by directly targeting FOXA1. *Acta Pharmacol Sin.* 2018 Jan;39(1):124-131.
- Webster GA, Perkins ND. Transcriptional cross talk between NF-kappaB and p53. *Mol Cell Biol.* 1999 May;19(5):3485-95.
- Wu Y, Lin Y, Liu H, Li J. Inhibition of invasion and up-regulation of E-cadherin expression in human malignant melanoma cell line A375 by (-)-epigallocatechin-3-gallate. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2008 Jun;28(3):356-9.
- Xavier CP, Lima CF, Rohde M, Pereira-Wilson C. Quercetin enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis in MSI colorectal cancer cells through p53 modulation. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011 Dec;68(6):1449-57.
- Xianyong Ma, Deng, D. , Chen, W. . Inhibitors and Activators of SOD, GSH-Px, and CAT. In: Senturk, M. , editor. *Enzyme Inhibitors and Activators* [Internet]. London: IntechOpen; 2017 [cited 2022 Jul 26]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/52877>
- Xiao ZP, Peng ZY, Peng MJ, Yan WB, Ouyang YZ, Zhu HL. Flavonoids health benefits and their molecular mechanism. *Mini Rev Med Chem.* 2011 Feb;11(2):169-77.
- Xu DP, Li Y, Meng X, Zhou T, Zhou Y, Zheng J, Zhang JJ, Li HB. Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *Int J Mol Sci.* 2017 Jan 5;18(1):96.
- Xu L, Dai W, Li J, He L, Wang F, Xia Y, Chen K, Li S, Liu T, Lu J, Zhou Y, Wang Y, Guo C. Methylation-regulated miR-124-1 suppresses tumorigenesis in hepatocellular carcinoma by targeting CASC3. *Oncotarget.* 2016 May 3;7(18):26027-41.
- Xu Y, Wang P, Xu C, Shan X, Feng Q. Acrylamide induces HepG2 cell proliferation through upregulation of miR-21 expression. *J Biomed Res.* 2019. 33(3):181-191.
- Yang C, Ma X, Wang Z, Zeng X, Hu Z, Ye Z, Shen G. Curcumin induces apoptosis and protective autophagy in castration-resistant prostate cancer cells through iron chelation. *Drug Des Devel Ther.* 2017 Feb 14;11:431-439.
- Yang WC, Mathew J, Velcich A, Edelmann W, Kucherlapati R, Lipkin M, Yang K, Augenlicht LH. Targeted inactivation of the p21(WAF1/cip1) gene enhances Apc-initiated tumor formation and the tumor-promoting activity of a Western-style high-risk diet by altering cell maturation in the intestinal mucosal. *Cancer Res.* 2001 Jan 15;61(2):565-9.
- Yeh CB, Hsieh MJ, Hsieh YH, Chien MH, Chiou HL, Yang SF. Antimetastatic effects of norcantharidin on hepatocellular carcinoma by transcriptional inhibition of MMP-9 through modulation of NF-kB activity. *PLoS One.* 2012;7(2):e31055.
- Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, et al. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J.* 2004;23:2369-80
- Yin C, Wang PQ, Xu WP, Yang Y, Zhang Q, Ning BF, et al. Hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  reverses malignancy of hepatocellular carcinoma through regulating miR-134 in the DLK1-DIO3 region. *Hepatology.* 2013. December;58(6):1964–76.
- Zha R, Guo W, Zhang Z, Qiu Z, Wang Q, Ding J, et al. Genome-wide screening identified that miR-134 acts as a metastasis suppressor by targeting integrin  $\beta$ 1 in hepatocellular carcinoma. *PLoS One.* 2014. February 3;9(2):e87665.

- Zhang G, Liu Y, Xu L, Sha C, Zhang H, Xu W. Resveratrol alleviates lipopolysaccharide-induced inflammation in PC-12 cells and in rat model. *BMC Biotechnol.* 2019. 19(1):10.
- Zhang J, Cheng J, Zeng Z, Wang Y, Li X, Xie Q, Jia J, Yan Y, Guo Z, Gao J, Yao M, Chen X, Lu F. Comprehensive profiling of novel microRNA-9 targets and a tumor suppressor role of microRNA-9 via targeting IGF2BP1 in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2015 Dec 8;6(39):42040-52.
- Zhang K, Wu L, Zhang P, Luo M, Du J, Gao T, O'Connell D, Wang G, Wang H, Yang Y. miR-9 regulates ferroptosis by targeting glutamic-oxaloacetic transaminase GOT1 in melanoma. *Mol Carcinog.* 2018 Nov;57(11):1566-1576.
- Zhao Y, Ling Z, Hao Y, Pang X, Han X, Califano JA, Shan L, Gu X. MiR-124 acts as a tumor suppressor by inhibiting the expression of sphingosine kinase 1 and its downstream signaling in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2017 Apr 11;8(15):25005-25020.
- Zhao YN, Li WF, Li F, Zhang Z, Dai YD, Xu AL, Qi C, Gao JM, Gao J. Resveratrol improves learning and memory in normally aged mice through microRNA-CREB pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013.435(4).597-602.
- Zheng J, Yang B, Huang T, Yu Y, Yang J, Li D. Green tea and black tea consumption and prostate cancer risk: an exploratory meta-analysis of observational studies. *Nutr Cancer.* 2011;63(5):663-72.
- Zhuang P, Zhang Y, He W, Chen X, Chen J, He L, et al. Dietary Fats in Relation to Total and Cause-Specific Mortality in a Prospective Cohort of 521 120 Individuals With 16 Years of Follow-Up. *Circ Res.* 2019. March;124(5):757-768.
- Zia-Ul-Haq M, Riaz M, De Feo V, Jaafar HZ, Moga M. *Rubus fruticosus* L.: constituents, biological activities and health related uses. *Molecules.* 2014 Jul 28;19(8):10998-1029.

## Közlemények listája

### A disszertáció alapját képező közlemények:

Molnar R, Szabo L, Tomesz A, Deutsch A, Darago R, Raposa BL, Ghodratollah N, Varjas T, Nemeth B, Orsos Z, Pozsgai E, Szentpeteri JL, Budan F, Kiss I. The Chemopreventive Effects of Polyphenols and Coffee, Based upon a DMBA Mouse Model with microRNA and mTOR Gene Expression Biomarkers. *Cells*. 2022 Apr 12;11(8):1300.

IF: 7,666

Molnar R, Szabo L, Tomesz A, Deutsch A, Darago R, Ghodratollah N, Varjas T, Nemeth B, Budan F, Kiss I. In vivo effects of olive oil and trans-fatty acids on miR-134, miR-132, miR-124-1, miR-9-3 and mTORC1 gene expression in a DMBA-treated mouse model. *PLoS One*. 2021 Feb 4;16(2):e0246022.

IF: 3,752

### Egyéb közlemények:

Szabo L, Molnar R, Tomesz A, Deutsch A, Darago R, Varjas T, Ritter Z, Szentpeteri JL, Andreidesz K, Mathe D, Hegedüs I, Sik A, Budan F, Kiss I. Olive Oil Improves While Trans Fatty Acids Further Aggravate the Hypomethylation of LINE-1 Retrotransposon DNA in an Environmental Carcinogen Model. *Nutrients*. 2022 Feb 21;14(4):908.

IF: 6,706

Szabo L, Molnar R, Tomesz A, Deutsch A, Darago R, Nowrasteh G, Varjas T, Nemeth B, Budan F, Kiss I. The effects of flavonoids, green tea polyphenols and coffee on DMBA induced LINE-1 DNA hypomethylation. *PLoS One*. 2021 Apr 20;16(4):e0250157.

IF: 3,752

Tomesz A, Szabo L, Molnar R, Deutsch A, Darago R, Raposa BL, Ghodratollah N, Varjas T, Nemeth B, Orsos Z, Pozsgai E, Szentpeteri JL, Budan F, Kiss I. Changes in miR-124-1, miR-212, miR-132, miR-134, and miR-155 Expression Patterns after 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene Treatment in CBA/Ca Mice. *Cells*. 2022 Mar 17;11(6):1020.

IF: 7,666

Tomesz A, Szabo L, Molnar R, Deutsch A, Darago R, Mathe D, Budan F, Ghodratollah N, Varjas T, Nemeth B, Kiss I. Effect of 7,12-Dimethylbenz(α)anthracene on the Expression of miR-330, miR-29a, miR-9-1, miR-9-3 and the mTORC1 Gene in CBA/Ca Mice. *In Vivo*. 2020 Sep-Oct;34(5):2337-2343.

IF: 2,09

**Konferenciák:**

Andreidesz K, Szabo L, Molnar R, Tomesz A, Darago R, Deutsch A, Varjas T, Ritter Zs, Szentpeteri LJ, Mathe D et al. A transz-zsírsvak súlyosbítják a LINE-1 retrotanszpozon DNS hipometilációt DMBA környezeti karcinogén modellben. 51. MEMBRÁN TRANSPORT KONFERENCIA POSZTER ABSZTRAKTOK. 2022.

Budan F, Szabo L, Molnar R, Tomesz A, Varjas T, Ritter Zs, Szentpeteri LJ, Mathe D, Hegedus I, Sik A et al. Az extraszűz olíva olaj csökkenti a karcinogén DMBA I1-RTP DNS hipometiláló hatását. 51. MEMBRÁN TRANSPORT KONFERENCIA POSZTER ABSZTRAKTOK. 2022.

## **Köszönetnyilvánítás**

Első helyen köszönettel tartozom prof. Dr. Kiss István intézetvezető úrnak, témavezetőmnek a konzultációkért, dolgozatom véleményezéséért, a konstruktív kritikákért, a szakmai támogatásért.

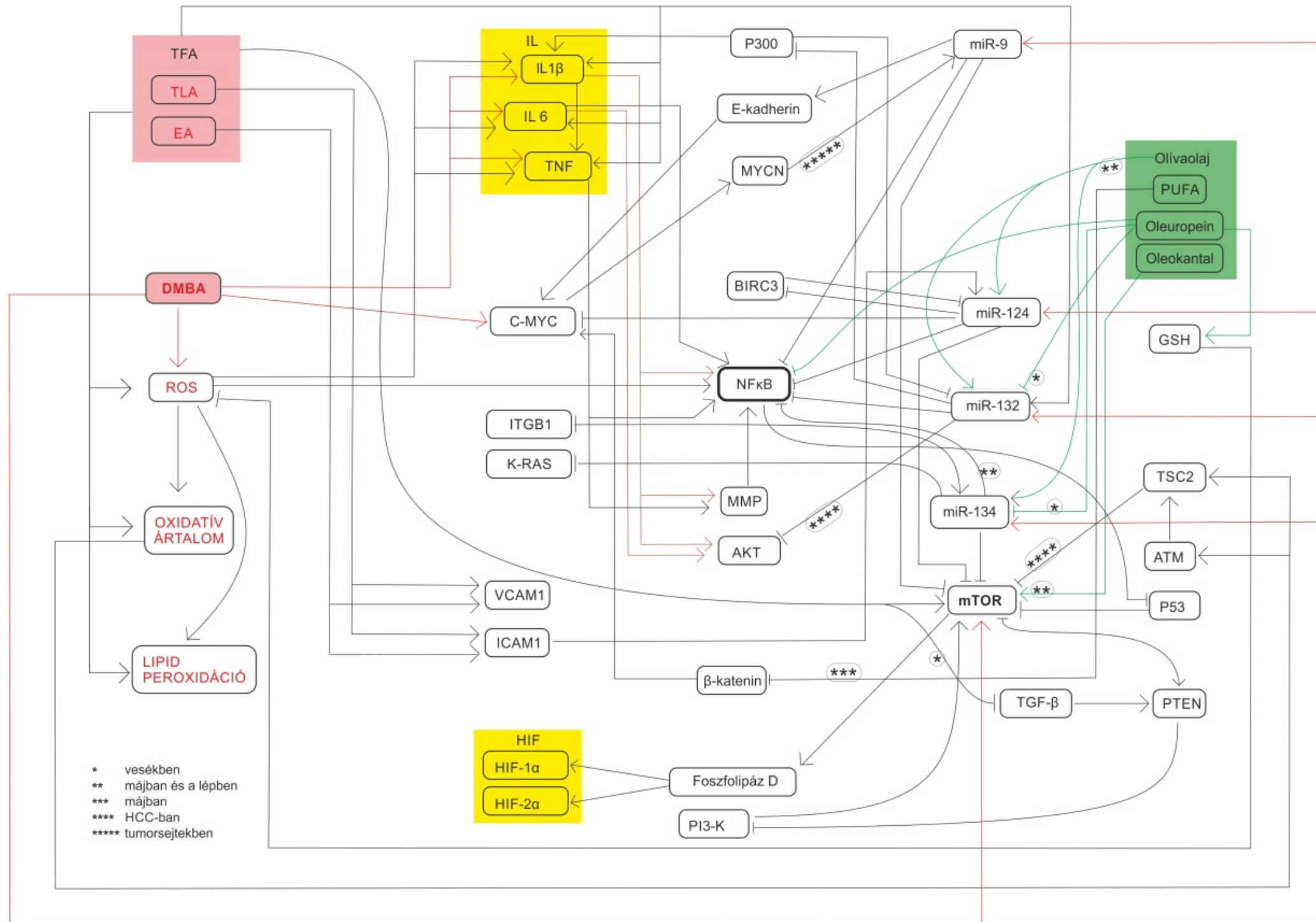
Az ő segítségével jobban megértettem a lehetőségeimet és korlátaimat a témában. Így élhettem az előbbiekkal, és lebonthattam az utóbbiakat.

Tomesz András doktorandusz kollégám szakmai és emberi támogatását évtizedek óta élvezhetem. Megosztotta velem szerzőtársként is a doktorandusz lét és a kutatás minden örömét és bánatát. Köszönet érte.

Megkülönböztetett hálával köszönet Szabó László barátomnak, aki adott lendületet, mutatott profizmust és biztatott amikor elfáradtam.

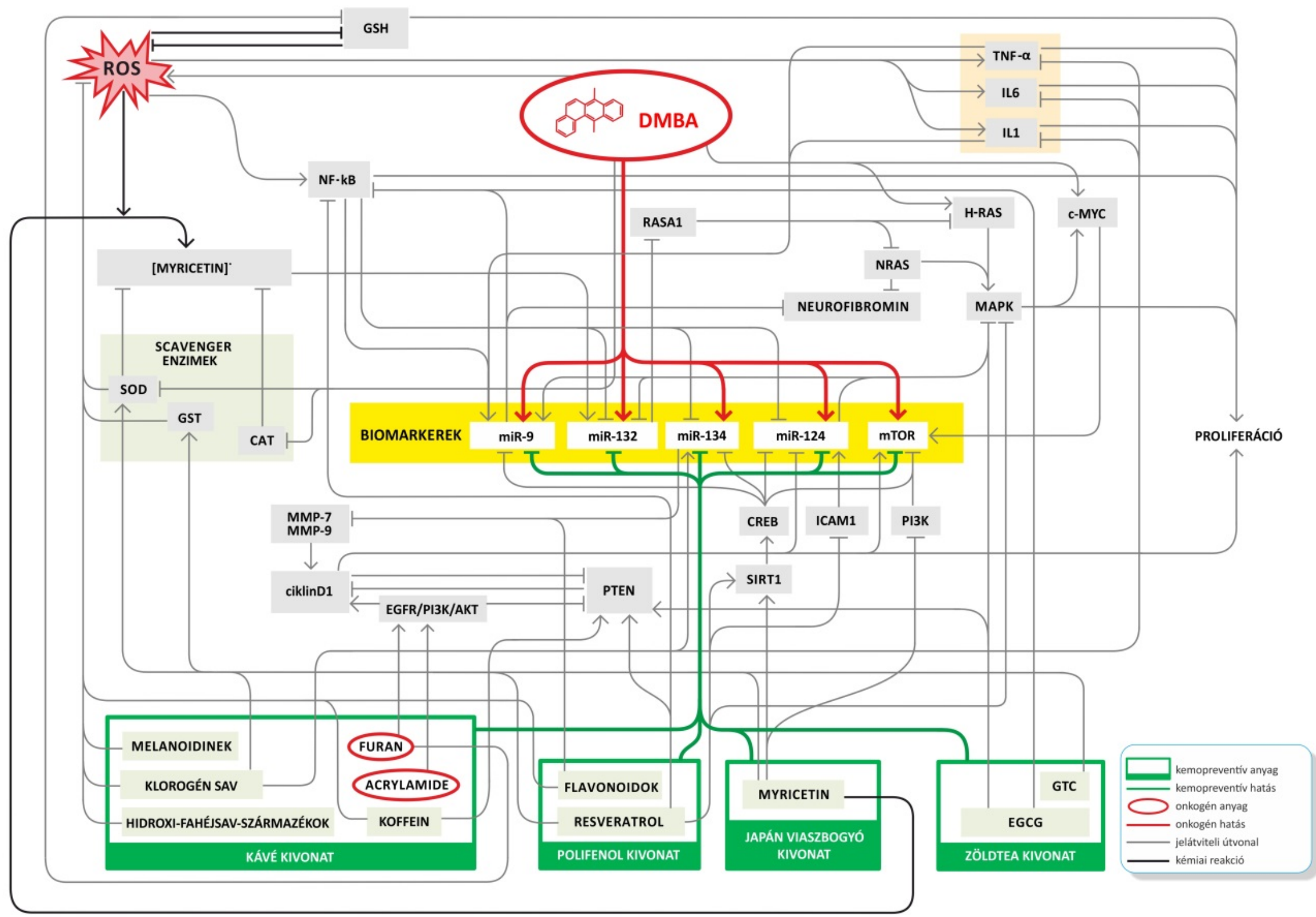
Végül, de nem utolsó sorban családomnak szeretném megköszönni azt az állandó és mindig magától értetődő támogatást, amit tanulmányaim során kaptam, kedvesem kitartó türelmét és a mindennapi feladatokban nyújtott segítségét és amiért végig bíztak bennem.

Függelék



21. ábra: A miR-9-3, a miR-124-1, a miR-132, a miR-134 és az mTORC1 expressziós mintázatát befolyásoló hatások és másodlagos jelátvivők összefüggései





22. ábra: Összefoglalás a miR-9-3, a miR-124-1, a miR-132, a miR-134 és az mTORC1 expressziós mintázatát befolyásoló hatások és másodlagos jelátvivők összefüggéseiről

## DOKTORI ÉRTEKEZÉS BENYÚJTÁSA ÉS NYILATKOZAT A DOLGOZAT EREDETISÉGÉRŐL

Alulírott

név: Molnár Richárd

anyja neve: Puzsa Mária

születési hely, idő: Eger, 1976.09.26.

„Olívaolaj, kávé kivonat, japán viaszbogyó kivonat, zöld tea kivonat, polifenol kivonat és transzsírsavak hatása a miR-134, miR-132, miR-124-1, miR-9-3 és az mTORC1 gén expresszióra in vivo DMBA-kezelt egérmodellben” című doktori értekezésemet a mai napon benyújtom a Pécsi Tudományegyetem, Egészségtudományi Kar, Egészségtudományi Doktori Iskola részére. Program száma: PR-6/1. Téma száma: O-17.

Témavezető neve: Prof. Dr. Kiss István

Egyúttal nyilatkozom, hogy jelen eljárás során benyújtott doktori értekezésemet  
- korábban más doktori iskolába (sem hazai, sem külföldi egyetemen) nem nyújtottam be,

- fokozatszerzési eljárásra jelentkezésemet két éven belül nem utasították el,

- az elmúlt két esztendőben nem volt sikertelen doktori eljárásom,

- öt éven belül doktori fokozatom visszavonására nem került sor,

- értekezésem önálló munka, más szellemi alkotását sajátomként nem mutattam be, az irodalmi hivatkozások egyértelműek és teljeseek, az értekezés elkészítésénél hamis vagy hamisított adatokat nem használtam.

Dátum: 2022.08.08.

doktorjelölt aláírása

témavezető aláírása