

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 Iskolavezető: Prof. Dr. Bódis József

Programvezető: Prof. Dr. Kiss István

Témavezető: Prof. Dr. Kiss István

Ph.D. tézisfüzet

Molnár Richárd



Pécsi Tudományegyetem Egészségtudományi Kar

Egészségtudományi Doktori Iskola

Pécs, 2022

1. Bevezetés

A rosszindulatú daganatos betegségek előfordulása és/vagy mortalitása a magas jövedelmű országokban általában csökken, de az alacsony és közepes jövedelmű országokban a trendvonal továbbra is enyhe emelkedést mutat. A WHO értékelése szerint a rákos esetek 30-50%-át meg lehetett volna előzni.

A daganatos betegségek kialakulásának egyik fő oka a környezeti ártalmak, például a dohányzás és a nem megfelelő mértékű és összetételű zsírbevitel. Ennek megfelelően a 7,12-dimetilbenz(a)antracént (DMBA) dohányfüstben is megtalálható kémiai karcinogént évtizedek óta használják kísérleti állatokon daganatos elváltozások indukálására. Továbbá a kutatásom során alkalmazott transz-3-hexadecénsav – ami egy transzszírsav (TFA) – az állati szervezetekre gyakorol káros hatást számos tanulmány szerint.

Ugyanakkor *in vitro* és *in vivo* és epidemiológiai vizsgálatok alapján is a kemopreventív polifenolok a daganatképződés esélyét csökkentik. Ezen belül a flavonoidok különösen ígéretes kemopreventív anyagok. Ennek megfelelően tanulmányomban az extraszűz olíva (*Olea europaea*) olaj, a zöldtea (*Camellia sinensis*), a japán viaszbogyó (*Myrica rubra*), a kávé (*Coffea arabica*) és egy polifenol kivonat (ami főleg rezveratrolt és flavonoidokat tartalmazott) kemopreventív hatásait, valamint a DMBA és a TFA ártalmas hatását teszteltem.

Ezen hatások feltehetően megfelelően monitorozhatók a mikroRNS-ek (miRNS) közül a miR-134, miR-132, a miR-124-1, miR-9 valamint az m-TOR gén expressziójának mérésén keresztül, ugyanis a DMBA által okozott ártalom ezek expresszióját növeli, és ezt a TFA fokozhatja, míg az említett kemopreventív anyagok csökkentik.

2. Célkitűzés

Munkám során négy miRNS (miR-134, miR-132, miR-124-1, miR-9-3) és az mTORC1 gén expresszióját vizsgáltam DMBA-val kezelt állatok szerveiben (máj, lép, vese), különböző humán táplálkozásban előforduló anyagok ezekre gyakorolt hatását kutatva. Ezt a miRNS és génexpressziós panelt egy korábbi vizsgálat a karcinogén hatás megbízható korai biomarkerének találta. Arra kerestem a választ, hogy a vizsgált kemopreventív anyagok képesek-e a karcinogén hatású DMBA által okozott gén- és miRNS expresszió-változásokat kivédeni és vajon érdemes lenne-e azokat preventív céllal az étrendbe iktatni? A TFA esetén a vizsgálat célja a potenciális karcinogén hatás megerősítése vagy elvetése volt.

3. Anyag és módszer

3.1 Használt anyagok:

1. olívaolaj (*Olea europaea*) bogyóterméséből hidegen sajtolt extraszűz olaj
2. zöld tea (*Camellia sinensis*) kivonat
3. japán viaszbogó (*Myrica rubra*) kivonat
4. polifenol-kivonat (bortermő szőlő (*Vitis vinifera* „Cabernet Sauvignon”), túskenéklüli 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)

A vizsgált csoportok kezelését és a fogyasztott anyagok összetevőit az 1. táblázat foglalja össze.

csoport neve	ip. DMBA	napi dózis / állapot	kísérleti anyag			
			gyártó / termék	lényeges összetevők	latin / tudományos nevek	Mennyiség
negatív kontroll	-					
pozitív kontroll	+		Sigma Aldrich Ltd.		dimetil-benz[a]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	(2R,3S)-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, transzszsírsavval 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.) testtömeg-kilogrammonként 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 $A > 2,0$ volt 260/280 nm esetén.

3.4 Reverz transzkripció polimeráz-lánreakció (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 specificitását. 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.

	FORWARD	REVERSE
miR-134	TGTGACTGGTTGACCAGAGG	GTGACTAGGTGGCCACAG
miR-132	ACCGTGGCTTCGATTGTTA	CGACCATGGCTGTAGACTGTT
miR-124-1	TCTCTCTCCGTGTTACAGC	ACCGCGTGCCTTAATTGTAT
miR-9-3	GCCCGTTTCTCTTTGGTT	TCTAGCTTTATGACGGCTCTGTG G
mTORC1	AAGGCCTGATGGGATTTGG	TGTCAAGTACACGGGGCAAG
mouse U6	CGCTTCGGCAGCACATATAC	TTCACGAATTTGCGTGTCAT

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, 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.

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.

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.

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.

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% ($p=0,10$; $SD=18\%$).

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.

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.

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, míg a miR-132 (-27,1%; $p=0,051$; $SD=13,7\%$) értékei nem voltak statisztikailag szignifikánsak.

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.

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.

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.

4.5. Kávé kivonat és DMBA-kezelés hatása a vizsgált szervekben

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.

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.

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.

4.6. Japán viaszbogyó kivonat és DMBA-kezelés hatása a vizsgált szervekben

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.

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 viaszbogó kivonatot fogyasztó csoportban.

A vesékben a pozitív DMBA-kontrollhoz képest a japán viaszbogó 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.

5. Megbeszélés

5.1. A DMBA ártalmas hatása

A DMBA bomlása reaktív oxigén gyökök (ROS) képződésével jár és ez transzkripciósfaktorokat (például NF- κ B-t) aktivál és ez végső soron különböző citokineket (például IL1 β , IL6, TNF) indukál továbbá a védő hatású glutationt (GSH) depletálja. Az IL1 β nagy mennyiségben történő jelenléte gyulladáshoz vezető faktorok (TNF, MMP-k) keletkezését vonja maga után, amik a sejtek rosszindulatú burjánzásának az esélyét is növeli az NF- κ B indukálásával, mert ez a tumorszuppresszor hatású miR-134 és a P53 gén expresszióját csökkenti. Tehát az proinflammatorikus és sejt proliferációt fokozó tényezők egymást erősítve érvényesülnek.

5.2. A TFA ártalmas hatása

A TFA-fogyasztás aktiválja 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- κ B-t. Tehát ebből következhet, hogy a TFA- és DMBA-kezelt csoportban szignifikánsan overexpresszálódtak a vizsgált miR-ek és az *mTOR* gén is.

5.3. A vizsgált kemopreventív anyagok hatása

A ROS által indukált sejtkárosodást képesek csökkenteni a flavonoidok és az olívaolaj is a molekuláris szerkezetüknek köszönhetően. Ugyanez igaz a kávé klorogénsav-, hidroxi-fahéjsav- és koffein tartalmára és a melanoidintartalmára is. Továbbá a polifenolok képesek gátolni az indirekt karcinogén aktivátor mikroszomális enzimeket, amin keresztül szignifikánsan csökkentik a DNS adduktok kialakulását. A rezveratrol, a myricetin, a GTC és a klorogénsav is indukálja a protektív szuperoxid-diszmutáz és a glutation-S-transzferáz (GST) enzimeket is. Továbbá a PUFA közvetetten képes a GSH-szintjét is növelni.

5.3.1. Az olívaolaj védő hatása

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

5.3.2. Az olívaolaj vízdékony anyagai

Az oleuropein és az oleokantal antioxidáns és membránvédő hatású vízdékony szekoiridoid. Az oleuropein blokkolja az NF- κ B-t, és az oleokantal védi az intracelluláris GSH-t. Ez a miR-134, miR-132 és a miR124-1 expresszió csökkenéséhez vezethet negatív visszacsatolási mechanizmusokon keresztül, illetve a DMBA-kezelés hatására overexpresszált miR-9-3 mennyiségét szignifikánsan csökkenti.

Az oleuropein okozta a vesében a miR-134 és miR-132-nek az erőteljes és szignifikáns csökkenését, az említett negatív visszacsatolási szabályozáson keresztül. A májban és a lépben is tapasztalt szignifikánsan csökkent mTOR génexpressziót is az oleokantal potens mTOR gátló hatása okozta.

5.3.2. Az olívaolaj zsírdékony anyagai

A PUFA közvetlen β -katenin gátló hatása, ami a C-MYC expresszió szignifikáns csökkenéséhez vezet, míg a C-MYC a miR-9 expresszió növekedését okozza. Továbbá a PUFA növelte a P300 mennyiségét, aminek a növekedése szintén a miR-132 expressziójának a csökkenéséhez vezet, mivel ezek keresztbe-szabályozzák egymást. A BIRC3 és a miR-124 expresszió negatív összefüggést mutatott, ami negatív visszacsatolások hurokra utal, mivel az ICAM-1 pozitívan modulálja a miR-124 expressziót.

5.4. A polifenolok védő hatása

A polifenolok a klasszikus gyulladást okozó interleukinokat (IL1, TNF- α , stb.) és például NF- κ B transzkripciósfaktort gátló hatásuk okán védhették ki a DMBA indukálta overexpresszióit – a vizsgált biomarkerekre nézve. Például a rezveratrol csökkenti többek közt az IL-1 β , IL-6, TNF- α expresszióját. A rezveratrol és a myricetin az aktivált

SIRT1 függő jelátviteli útvonalon keresztül serkenti a CREB fehérjét és ez a miR-134, miR-124 és mTOR expresszió csökkenéséhez vezet.

Az EGCG és a rezveratrol is gátolja a NF- κ B-t és aktiválja a PTEN gént. Az előbbi mechanizmusok keresztül csökkentik a miR-132, miR-124 és a miR-9 expresszióját, míg az utóbbi csökkenti a ciklin D1 sejtosztódási protein mennyiségét. Ezenfelül a rezveratrol és az EGCG is gátolja az antiapoptotikus kaszkádokat a MAPK-útvonal szuppresszával. Ez sejtciklus gátlást (cell cycle arrest) indukál a G₀/G₁ fázisban, ami csökkenti miR-132 és növeli a miR-9 expresszióját.

Az összes vizsgált csoportban az említett módokon csökkentett ciklin D1-szint vezethetett az mTOR expresszió csökkenéséhez. Továbbá a myricetin gátolta a PI3K-t, aminek szintén van mTOR expressziót csökkentő hatása.

5.4.1. A kávé klorogénsav tartalma

A klorogénsav szintén csökkenti az IL-1 β , IL-6, TNF- α génexpresszióját. Mérésünk eredményének ellentmondanak az irodalmi adatok, melyek szerint a kávé klorogénsav-tartalma vesevédő hatást fejtett ki a miR-134 indukálásával, ami a MMP-9 és MMP-7 szuppressziójához vezet. Ez végső soron csökkentette a – CCND1 által kódolt – ciklin D1-et és inverz korrelációban van az expressziója a miR-134-gyel – ez szintén ellentmond eredményeinknek, melynek így a közvetlen alátámasztása helyett negatív visszacsatolási mechanizmusra utal.

5.4.2. A koffein hatása

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

6. Következtetés és összefoglalás

Megállapíthatjuk, hogy a vizsgált kemopreventív anyagok gyulladáson és karcinogén mechanizmusokat gátolva védő hatásúak. Ez alapján, mint táplálkozási tényezők hozzájárulnak a rosszindulatú daganatos megelőzéséhez. A TFA gyulladáskeltő és karcinogén hatásokat fokozó tulajdonsága is megállapítást nyert. Ezen mechanizmusok összegződését a miR-134, miR-132, miR-124-1, miR-9-3 és az mTORC1 gén expressziója, mint biomarker megfelelően jelezte.

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.

Az olívaolaj-tartalmú táp etetése a DMBA indukálta gyulladáson és proliferációt fokozó jelátviteli utakat (TNF, IL1, IL6 és a NF- κ B) gátolta.

6.2. DMBA és a TFA

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, 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. Közlemények listája

7.1. 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

7.2. 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

7.3. 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-zsírsavak súlyosbítják a LINE-1 retrotranszpozon 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.