

Flavonoid kivonat, zöldtea kivonat, japán viaszbogyó kivonat, kávé
kivonat, olívaolaj és transz-zsírsv hatása a DMBA indukálta

LINE-1 DNS-metilációra

Doktori (Ph.D.) értekezés

Szabó László



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

Flavonoid kivonat, zöldtea kivonat, japán viaszbogyó kivonat, kávé
kivonat, olívaolaj és transz-zsír-sav hatása a DMBA indukálta LINE-1
DNS-metilációra

Doktori (Ph.D.) értekezés

Szabó László

Pécs, 2022

TARTALOMJEGYZÉK

| | |
|--|----|
| RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE | 4 |
| 1. BEVEZETÉS | 7 |
| 1.1. Daganatos megbetegedések statisztikája | 10 |
| 1.2. Kiemelt táplálkozási faktorok epigenetikai jelentősége. | 16 |
| 1.2.1. A flavonoidok epigenetikai aktivitása | 17 |
| 1.2.2. Zöld tea és a katekinjeinek az epidemiológiai vonatkozásai | 18 |
| 1.2.3. Transz-zsírsavak | 20 |
| 1.2.4. Olívaolaj..... | 21 |
| 1.3. DNS-metiláció és szerepe az epigenetikai kutatásokban..... | 22 |
| 1.4. A LINE-1 transzpozonok..... | 24 |
| 1.5. DMBA | 26 |
| 1.6. Célkitűzés..... | 26 |
| 2. ANYAG ÉS MÓDSZER | 28 |
| 2.1. A DNS izolálása..... | 28 |
| 2.2. LINE-1 DNS-metiláció..... | 29 |
| 2.3. Számítás és statisztikai elemzés..... | 29 |
| 3. EREDMÉNYEK | 31 |
| 3.1. Metilációs mintázatok változásai a lépben | 31 |
| 3.2. Metilációs mintázatok változásai a májban | 34 |
| 3.3. Metilációs mintázatok változásai a vesékben | 36 |
| 4. MEGBESZÉLÉS | 40 |
| 4.1. A DMBA hatása a LINE-1 metilációs mintázatra | 40 |
| 4.2. A DMBA okozta oxidatív ártalmak hatása a LINE-1 metilációs mintázatra | 40 |
| 4.3. DMBA, másodlagos jelátvitel és a LINE-1 metiláció | 41 |
| 4.4. A TFA ártalmas hatásai a LINE-1 metilációs mintázatra..... | 42 |
| 4.5. A TFA sejtmembránokra kifejtett hatásai..... | 43 |

| | |
|--|-----------|
| 4.6. TFA és az oxidatív ártalmak, másodlagos szignáltranszdukciók | 44 |
| 4.7. Az F2-izoprosztánok hatása..... | 45 |
| 4.8. A polifenolok hatásai a DMBA indukálta LINE-1 hipometilációra..... | 46 |
| 4.9. A polifenolok antioxidáns hatása és a DMBA indukálta LINE-1 hipometiláció | 47 |
| 4.10. A polifenolok epigenetikus hatásai a DMBA indukálta LINE-1 hipometilációra | 47 |
| 4.11. A polifenolok hatásai a DMBA indukálta LINE-1 hipometilációra másodlagos jelátviteli utakon keresztül..... | 48 |
| 4.12. A myricetin lehetséges pro-oxidáns hatása..... | 48 |
| 4.13. Az EVOO polifenoljainak és fenolos vegyületének a hatásai | 49 |
| 4.14. Egyéb anyagok hatása a LINE-1 metilációs mintázatra | 50 |
| 4.14.1. A kávé potenciálisan ártalmas anyagainak a hatása | 50 |
| 4.14.2. Az olívaolaj lipidjeinek a hatásai a LINE-1 metilációs mintázatra | 51 |
| 5. ÖSSZEFOGLALÁS, ÚJ EREDMÉNYEK..... | 54 |
| 5.1. A DMBA és a TFA hatása a LINE-1 metilációs mintázatra | 54 |
| 5.2. A polifenol-kivonatok, kávé és EVOO hatása a DMBA indukálta LINE-1 metilációs mintázatra | 55 |
| 5.3. A vizsgálatunk alapján igazolást nyert új eredmények:..... | 56 |
| KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS | 58 |
| IRODALOMJEGYZÉK | 59 |
| FÜGGELÉK | 78 |
| KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA | 80 |

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

| | |
|--------|--|
| AGE | Advanced glycation end product |
| BMI | body mass index |
| CAT | Catalase |
| CBA/Ca | Beltenyésztett kísérleti egértörzs |
| CDK6 | cyclin-dependent kinase-6 |
| CpG | cytosine preceeding guanosine |
| CVD | Cardiovascular disease |
| CYP1A1 | cytochrome P450 monooxygenase 1A1 |
| DMBA | 7,12-dimethylbenz [a] anthracene |
| DNMT | DNA methyltransferase |
| EA | elaidic acid |
| EC | Epicatechin |
| ECG | Epicatechin-3-gallate |
| EGC | Epigallocatechin-3-gallate |
| EGCG | epigallocatechin-3-gallate |
| EPIC | European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition |
| ER | endoplasmic reticulum |
| ERK | extracellular signal-regulated kinase |
| ESCC | esophageal squamous cell carcinoma |
| EVOO | Extra virgin olive oil |
| GCO | Global Cancer Observatory |
| GPI | Glycosylphosphatidylinositol |
| GSH | glutathione |
| GST | glutathione S-transferase |
| GSTM5 | glutathione S-transferase Mu 5 |
| GTC | green tee catechins |
| HAT | Histone acetyltransferase |
| HCA | Heterocyclic amines |
| HDAC3 | Histone Deacetylase 3 |
| HDI | human development index |
| HPTM | Histone Post-Translational Modifications |
| hTERT | Human telomerase reverse transcriptase |

| | |
|----------------|--|
| IARC | International Agency for Research on Cancer |
| ICAM-1 | Intercellular Adhesion Molecule 1 |
| IL1 | Interleukin 1 |
| IL-10 | Interleukin 10 |
| IL6 | Interleukin 6 |
| JAK | Janus kinase |
| KSH | Hungarian Central Statistical Office |
| L1-RTP | LINE-1-retrotransposition |
| LA | trans-linoleic acid |
| LINE1 | Long Interspersed Element-1 |
| LTR | Long terminal repeats |
| MAML2 | mastermind-like protein 2 |
| MAPK | mitogen-activated protein kinase |
| MBD2 | Methyl-CpG Binding Domain Protein 2 |
| miRNS | microRNS |
| MMPk | matrix metalloproteinase |
| mTOR | Mammalian target of rapamycin |
| MUFA | egyszeresen telítetlen zsírsav |
| NASH | non-alcoholic steatohapatitis |
| NF- κ B | Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells |
| nkRNS | non-coding RNAs |
| OO | Olive oil |
| ORF1 | Open reading frame 1 |
| ORF2 | Open reading frame 2 |
| PAH | Polycyclic aromatic hydrocarbons |
| PI3-K | phosphatidylinositol 3 kinase |
| PKC | protein kinase C |
| PPAR | peroxisome proliferator-activated receptors |
| PTEN | Phosphatase and tensin homolog |
| PUFA | polyunsaturated fatty acid |
| RAR β | Retinoic acid receptor beta |
| ROS | Reactive Oxigene Species |
| RR | Relative risk |

| | |
|--------------|---|
| SAH | S-adenosyl homocysteine |
| SAM | S-adenosylmethionine |
| SCID | Severe combined immunodeficient |
| SDF1 | Stromal Cell–derived Factor 1 |
| SINE | Short interspersed nuclear elements |
| siRNA | Small interfering RNA |
| SOD | superoxide dismutase |
| TE | Transposable elements |
| TET | ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase |
| TFA | Trans Fatty Acid |
| TGF- β | Transforming growth factor beta |
| TNF | Tumor necrosis factor |
| VCAM-1 | Vascular Cell Adhesion Protein 1 |
| WHO | World Health Organization |

1. BEVEZETÉS

Mind a magyar, mind az európai és a világszervezetek – Egészségügyi Világszervezet (WHO) daganatkutatásra szakosodott ügynöksége, a Nemzetközi Daganatkutató Ügynökség (IARC) és a Globális Daganatmegfigyelő Intézet (GCO) által közölt adatok alapján a daganatok által okozott betegségteher globálisan növekszik (Sung, 2021).

Annak ellenére, hogy specifikus molekuláris biomarkerek állnak rendelkezésre, a jelenlegi adatok alapján a daganatos betegségekben szenvedők fele hal bele a betegségbe még az egyre szélesebb körben elérhető szűrővizsgálatok, a diagnosztikai módszerek fejlődése, és a célzott terápiák alkalmazása ellenére is (Sung, 2021).

Tehát a rosszindulatú daganatos megbetegedések korai diagnosztizálásán túl a megelőzés továbbra is a leghatékonyabb stratégia az incidencia és a mortalitás csökkentésére. A daganatok megelőzése nemcsak költséghatékonyabb, hanem fenntartható, hosszú távú stratégiát is kínál a betegség elkerülésére, ami annál is inkább fontos, mivel a betegség óriási terhet jelent társadalmilag és gazdaságilag.

Jelen ismereteink szerint a rosszindulatú daganatok 5-10 %-a genetikai okok következménye, és a fennmaradó nagyobb része környezeti okokra vezethető vissza és ezek legnagyobb része a táplálkozással kapcsolatos (Irigaray, 2007).

Tehát a megelőzésben kiemelten jelentős szerep jut a hátrányos életmódbeli tényezők javításának, úgymint az egészségtelen táplálkozás, a mozgásszegény életmód, káros szokások (például dohányzás, túlzott alkoholfogyasztás), amelyek összesen 70-80%-ban járulnak hozzá a rosszindulatú daganatok kialakulásához. A meglévő, bizonyítékokon alapuló stratégiák megvalósításával, a kockázati tényezők részleges vagy teljes elkerülésével, a daganatok okozta halálozások jelentősen, 30-50% -ban csökkenthetők.

Az újabb molekuláris daganatepidemiológiai összefüggések igazolása megfelelő biomarkereken keresztül újabb kemopreventív stratégiák kifejlesztését segítheti elő, melyekre továbbra is nagy szükség van.

Az elmúlt évtizedek tudományos-technikai fejlődése exponenciális. A Human Genom Projekt eredményeként a teljes emberi genom DNS-szekvenciájának meghatározása a kapcsolódó interdiszciplináris tudományok jelentős fejlődését, valamint újak megjelenését hozta magával (Pellmar, 2000).

Hasonlóan meghatározó a Cancer Genome Project, amely a különböző daganatokban előforduló genetikai változásokban, mutációkban érintett géneket egy adatbázisban rendszerezi (<http://cancer.sanger.ac.uk/census>), amelyet rendszeresen frissítenek.

A fentiek szerint a genetika dinamikusan fejlődő tudományterület, amelynek egy ágazata az epigenetika. Tárgykörébe a genomot érintő azon folyamatok tartoznak, amelyek a DNS-szekvencia” felett, kívül” állnak. A genom olyan sajátosságai tartoznak ide, melyek nem a DNS nukleotid sorrendjét érintik, de mitotikusan, vagy akár meiotikusan is átörökíthetőek. Az epigenetikus tényezők a géneket nem változtatják meg, de a szabályozásukban nagy szerepet játszanak, gyakorlatilag a gének expresszióját irányítják. Ilyen például a promóter régiók metilálódása-demetilálódása vagy a hiszton fehérjék acetilálódása vagy deacetilálódása.

Az epigenetikai mechanizmusok iránt fokozódó érdeklődés háttérében nyilvánvalóan az áll, hogy a környezeti hatásoknak való kitétség olyan epigenetikai állapotváltozások vizsgálatának lehetőségét adja, amely módosulások az emberi egészség állapotváltozását is eredményezhetik. Az epigenetikai mechanizmusokat módosíthatja a környezet és ezek a módosulások megmaradhatnak még azoknak a faktoroknak a hiányában is, amelyek létrehozták őket. Így ezek a hatások kumulatívak lehetnek és sok év telhet el, mielőtt bármilyen betegség klinikailag manifesztálódna. Az epigenetikai változásoknak így megvan az a potenciáljuk, hogy stabil biomarkereket nyújtsanak az ártalmas hatásoknak való kitétség ujjlenyomataiként.

Indokolt tehát a környezeti hatások indikátoraként az epigenetikai faktorokat, köztük a DNS-metilációs mintázatot vizsgálni.

Genomunkban az intronikus és intergenikus tér nagy része ismétlődő szekvenciákból áll, amelyeknek az egyik legelterjedtebb típusa a Long Interspersed Element-1 (LINE-1) retrotranszpozon, ami a DNS egyik mobilis eleme. Ezen génszakasz a transzpozáz enzim szekvenciáját is tartalmazza, ami lehetővé teszi, hogy a genomba inzertálódjon újra a LINE-1 retrotranszpozon – így a LINE-1 DNS szakasz elméletileg önszorozásra képes. Gyakorlatilag azonban az egészséges sejtek genomjában a LINE-1 retrotranszpozon promóter régiója hipermetilált, ami a génexpresszió lecsendesítését okozza. Viszont malignizálódás esetén a LINE-1 DNS szakasz promótere demetilálódik (akárcsak a globális DNS-é, melynek a metiláltsági állapotát a LINE-1 metiláltsági állapota tükrözi). Tehát a LINE-1 retrotranszpozon fokozott expressziója is hozzájárul

a genom instabilitásához, illetve a promóterének a metiláltsági állapota biomarkerként reprezentálja a globális DNS metiláltsági állapotát (Ardeljan, 2017).

Környezetünkben található anyagok közül egy reprezentatív kémiai daganatkeltő a 7,12-dimetil-benz[a]antracén (DMBA) az irodalmi adatok alapján *in vivo*, a kezelést követően daganatokat indukált – és ezt a folyamatot számos génexpresszió-változás kíséri (Gyöngyi, 2002).

A megalapozottság ellenére viszont eddig kevés vizsgálat történt a DMBA karcinogénnel indukált LINE-1 DNS hipometilációval kapcsolatban.

Dolgozatom témája a fentiek alapján a táplálkozási eredetű karcinogén anyagok és a kemopreventív molekulák hatása a LINE-1 transzpozon metilációs mintázatára.

A téma további jelentősége, hogy a kemopreventív anyagok a megelőző stratégiák részeként az ártalmas korai epigenetikus változásokat visszafordíthatják.

1.1. Daganatos megbetegedések statisztikája

Magyarországon, a világ legtöbb országához hasonlóan, a rosszindulatú daganatos betegségek jelentik a második leggyakoribb halálokat. A daganatok kialakulását meghatározó környezeti és örökletes tényezők mutációkon keresztül nyilvánulnak meg. A sejtek növekedésében, szaporodásában bekövetkező eltérések a genetikai állomány további instabilitásához vezetnek. A hibajavító rendszer elégtelensége és a sejtek működésének zavara további ellenőrizetlen sejtosztódást és a programozott sejthalál elkerülését vonhatja maga után. Így a mutációs ráta növekszik, a daganat fejlődése felgyorsul.

A WHO adatai szerint 2018-ban az újonnan regisztrált rosszindulatú daganatos megbetegedések esetszáma világszerte kb. 18,1 millió volt és az elhunytak száma megközelítette a 9,6 milliót. A gyakoriság szempontjából az első négy helyen a tüdő, az emlő, a vastagbél és a prosztata rosszindulatú elváltozásait láthatjuk. A mortalitási mutatók sorrendje: tüdő, vastagbél, máj, gyomor, valamint az emlő daganatok. A daganatok által okozott mortalitás általában magasabb a férfi népesség körében, mint a nőkében. A nemeként látható mortalitás alapján a sorrend változik, hiszen férfiak körében a tüdő, máj, gyomor, vastagbél, a nők esetében az emlő, tüdő, vastagbél, méhnyak rosszindulatú megbetegedései okozzák a legtöbb halálesetet (WHO, 2020)

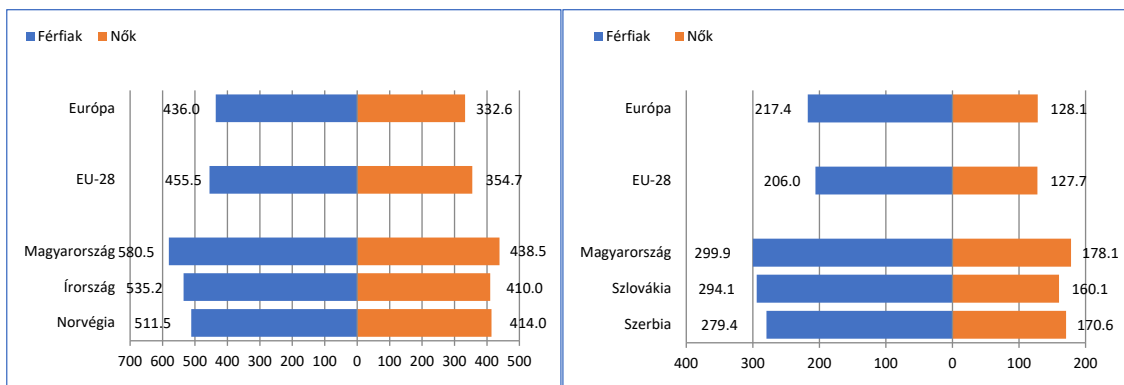
Különböző daganatos betegségek incidenciája és mortalitása a világviszonylatban 2018-ban

| DAGANAT TÍPUSOK | ÚJ ESETEK SZÁMA | | HALÁLOZÁSOK SZÁMA | |
|---------------------|--------------------|--------|--------------------|--------|
| | (ÖSSZES TÍPUS %-A) | | (ÖSSZES TÍPUS %-A) | |
| Tüdő | 2,093,876 | (11.6) | 1,761,007 | (18.4) |
| Emlő | 2,088,849 | (11.6) | 626,679 | (6.6) |
| Prosztata | 1,276,106 | (7.1) | 358,989 | (3.8) |
| Vatagbél | 1,096,601 | (6.1) | 551,269 | (5.8) |
| Nem melanoma bőr | 1,042,056 | (5.8) | 65,155 | (0.7) |
| Gyomor | 1,033,701 | (5.7) | 782,685 | (8.2) |
| Máj | 841,080 | (4.7) | 781,631 | (8.2) |
| Végbél | 704,376 | (3.9) | 310,394 | (3.2) |
| Nyelőcső | 572,034 | (3.2) | 508,585 | (5.3) |
| Méhnyak | 569,847 | (3.2) | 311,365 | (3.3) |
| Minden típus | 18,078,957 | | 9,555,027 | |

Forrás: (Bray, 2018)

A 2018-as becslés szerint 40 ország és 25 fő daganatos megbetegedés adatai alapján európai összehasonlításban, Magyarországon a legmagasabb a daganatos megbetegedések előfordulása és halálózása. A legtöbbet továbbra is tüdő-, vastagbél-, prosztata-, emlő- és hasnyálmirigy daganatban halnak meg. (Ferlay, J. 2018)

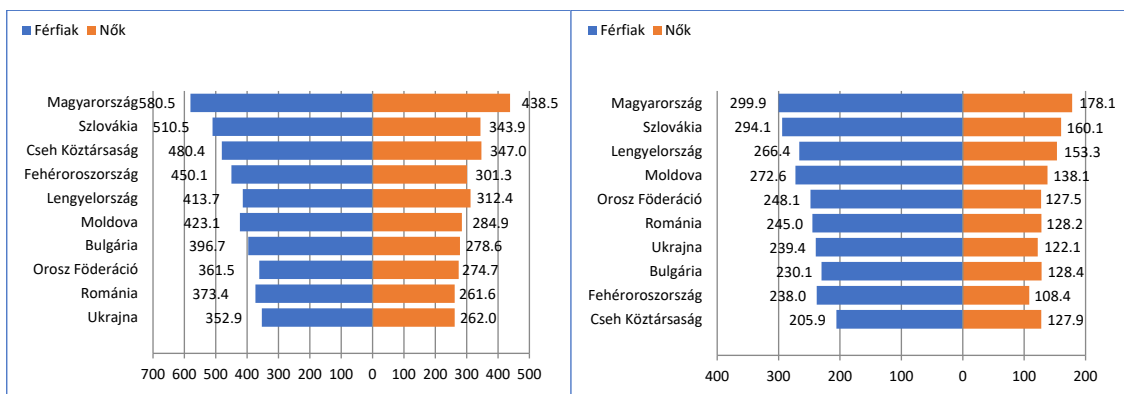
Daganatos halálózás és új esetek előfordulása, az első három legmagasabb érték Európában (2018)



Incidencia

Mortalitás

Daganatos halálózás és új esetek előfordulása Közép- és Kelet-Európában (2018)



Incidencia

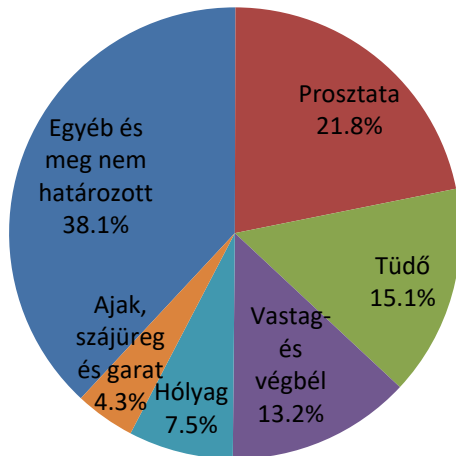
Mortalitás

Forrás: (Ferlay, J. 2018)

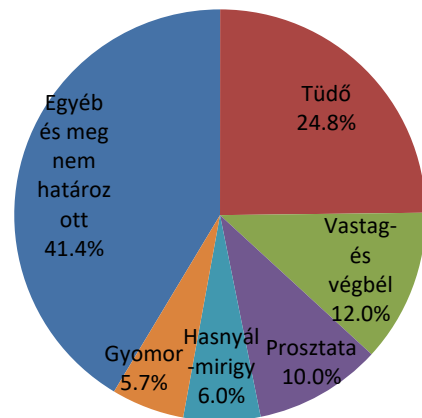
A várható esetek és halálozások megoszlása az 5 leggyakoribb daganat esetében Európában (2018) férfiaknál és nőknél.

Férfiak

Incidencia

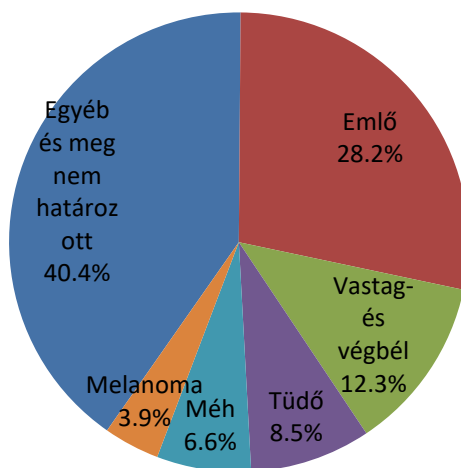


Mortalitás

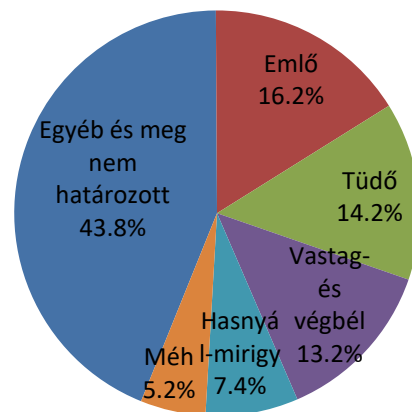


Nők

Incidencia



Mortalitás



Forrás: (Ferlay, J. 2018)

Magyarországi adatok 2020

Magyarországon a KSH legfrissebb közlése szerint a rosszindulatú daganatok miatti mortalitás 2019-ben 32012 fő, melyből 17241 férfi és 14771 nő. Az elmúlt évekhez képest inkább stagnálásról beszélhetünk és továbbra is magasabb a férfi népesség daganatos halálozása. Az új daganatos betegek incidenciája az elmúlt 6 évhez képest csökken nemenként vizsgálva és összesítve nézve is. 2019-ben összesen 74353 új esetet regisztráltak, melyből 36877 férfi és 37476 nő volt (KSH, 2021).

A következő években a daganatos betegségek előfordulásában növekedés várható

A daganatos betegek száma globálisan növekszik. A WHO, IARC és a GCO által a daganatos betegségek incidenciájára és mortalitására vonatkozó előrejelzések alapján a világ 185 országára köztük Magyarországra is növekvő trendeket és átrendeződést mutat (Global Cancer Observatory, 2020).

A globális számok tükrében minden ötödik emberben alakul ki daganat életében. A nemenkénti halálozás továbbra is eltérő képet mutatva azt jelzi, hogy a férfiak esetében 8-ból 1, a nők esetében 11-ből 1 hal meg a betegségben. A különböző daganat fajták halálos eseteit vizsgálva hasnyálmirigy (94%), máj (92%), nyelöcső (90%), a központi idegrendszer (82%) illetve a tüdő (81%) letalitása a legjelentősebb (Globocan, 2020).

A trendek növekedését ösztönző tényezők között továbbra is elsődlegesen jelenik meg globálisan a népesség öregedése, illetve a társadalmi különbségek és gazdasági kockázatok. Mivel a megbetegedések kétharmada 60. életév felett jelentkezik (WHO-Europe), tehát a jövőben egyre inkább öregedő társadalmakban valószínűleg növekedni fognak a daganatos mortalitási mutatók is. Az alacsonyabb és magasabb jövedelmű országok között továbbra is jelentős különbségek mutatkoztak 2020-ban. Az előrejelzések alapján az alacsony vagy közepes humán fejlődési index (HDI) besorolású országokban lesz a legnagyobb relatív növekedés a daganat előfordulásában 2040-ig (WHO, 2020).

A daganat összetett betegség és egyes típusainak mortalitási trendjei jelentősen eltérnek a különböző országokban, illetve kontinenseken. Az eltérő adatokra hatással van a változó életmód, a helyi jellegzetességek, strukturális különbségek (pl. korfa), az étrend, a környezeti ártalmak expozíciója. Az egészségügyi infrastruktúra, az orvosi gyakorlat közvetlenül befolyásolják a daganatos halálozások eltérő mintázatait és tendenciáit. A

magasabb HDI-vel rendelkező országokban a halálozás aránya csökken, amely elsősorban a betegség elleni küzdelem sikereinek tudható be, mint a hatékony beavatkozások és terápiák, a korai felismerés és a megelőzés. Ezzel szemben az alacsonyabb fejlődési indexszel rendelkező országokban stagnál vagy romlik a helyzet főleg az emlő-, vastagbél- és prosztaták tekintetében (DeSantis, 2015; Siegel, 2014; Center, 2012).

Globálisan évente 27 millió új daganatos megbetegedés várható 2040-ig, ami 50%-os emelkedést jelent a 2018-as 18,1 milliós adatához viszonyítva (World cancer report, 2020).

A rosszindulatú daganatos megbetegedések korai diagnosztizálásán túl a megelőzés továbbra is a leghatékonyabb stratégia az incidencia és a mortalitás csökkentésére.

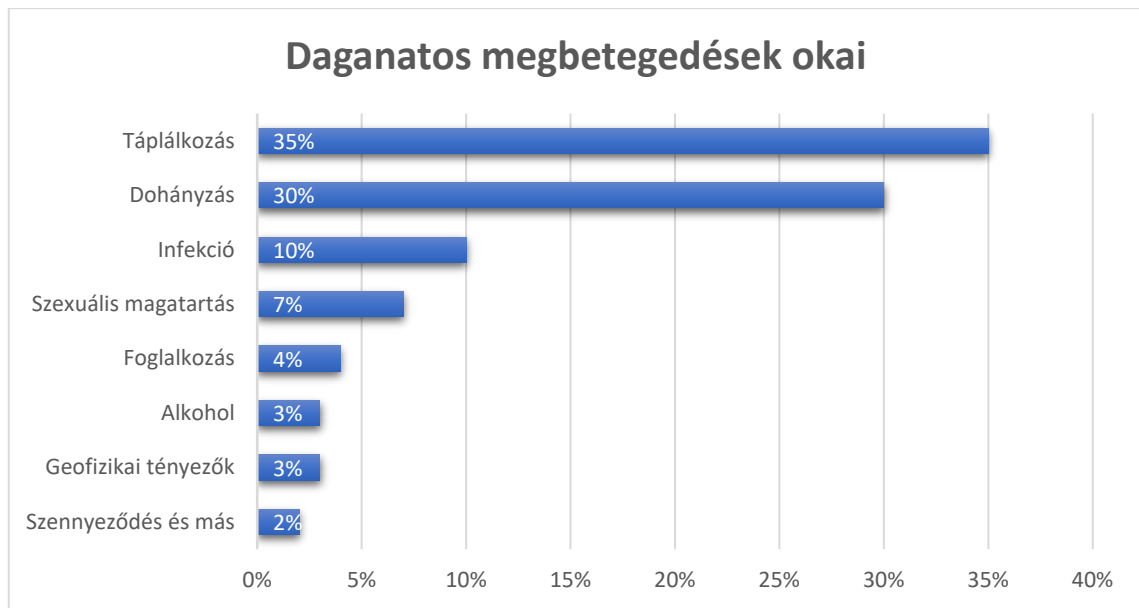
A megelőzésben a rossz életmódbeli tényezők (egészségtelen táplálkozás, kevés mozgás, káros szokások) javítása döntő szerepű. Emellett még a daganatkeltő veszélyek azonosítása kulcskérdés: Az összhálaózás közel fele megelőzhető lenne a kockázati tényezők elkerülésével.

Továbbá az epigenetikai és a genomikai technológiák segítségével egyre pontosabban meghatározható az egyéni fogékonyság.

Természetesen a különböző külső daganatkeltő ágenseknek való kitettség is eltérő mértékű a különböző populációkban. Ilyen például az ultraibolya (UV) sugárzás miatti expozíció.

A gasztrokultúra és szokásfüggő társadalmi tényezők egyre nagyobb mértékben hozhatók összefüggésbe a növekvő BMI-vel. Az elhízással kapcsolatos daganatok előfordulását, jelentősen befolyásolja az étrendi összetétel, a fizikai aktivitás, illetve a mozgásszegény életmód, amelyek szintén eltérőek lehetnek a különféle közösségekben.

Az emberi szervezetet a növekvő környezeti terhelés miatt egyre több olyan expozíció éri, amely a daganatkeletkezés esélyét növeli vagy közvetlenül karcinogén. Tehát a leghatékonyabb prevenció eszközök ezen környezeti és életmódbeli tényezők megváltoztatásában keresendők. A tudományos bizonyítékok rámutatnak a leginkább daganatkeltő hatásokra, amelyek közül a legfontosabbak: a táplálkozási tényezők, a dohányzás, a fertőzések, a foglalkozás rizikói, az alkoholfogyasztás, az UV sugárzás (IARC).



Forrás: (Doll R, 1981)

1.2. Kiemelt táplálkozási faktorok epigenetikai jelentősége.

Egyre nő azon esetek száma, amelyek során aberráns epigenetikai módosulásokról számolnak be az alábbi betegségekben: a neurodegeneratív betegségek, a szív- és érrendszeri betegségek, a 2-es típusú diabetes mellitus, az elhízás és a daganatos megbetegedések. Az epigenetikai változások általános visszafordíthatósága izgalmas és ígéretes célterület, jelenleg is egyre több epigenetikailag aktív vegyület terápiás potenciálját vizsgálják (Busch, 2015).

A karcinoprotektív stratégiák közül a táplálkozási tényezők a legjelentősebbek, melyet számos *in vitro*, *in vivo*, valamint klinikai vizsgálat is alátámaszt (Cui, 2008; Aggarwal, 2004; Narayanan, 2006). Közöttük számos gyulladáscsökkentő, sejtosztódást lassító, proapoptotikus, antioxidáns anyag megtalálható.

Ezen táplálkozási tényezők között a polifenolok, flavonoidok, rezveratrol, myricetin és a zöldtea (*Camellia sinensis*) kivonatok, katechinek daganatellenes hatásaival foglalkozó tanulmányok előkelő helyet foglalnak el. A gyümölcsök, a zöldségek, valamint a zöldtea fogyasztása világszerte jelentős, (A zöldtea fogyasztása évente körülbelül 600 000 tonnára tehető). Főleg az antioxidáns, gyulladáscsökkentő hatások és további molekuláris biológiai útvonalak (úgy, mint sejtosztódást gátló, mismatch-repair támogató, proapoptotikus, differenciációt segítő, vagy érépződést gátló hatások) állnak a polifenolok, például a flavonoidok és egyéb élelmiszerek, például a kávé antikarcinogén tulajdonságainak a hátterében (Cui, 2008; Aggarwal, 2004; Narayanan, 2006; Bøhn, 2014). 2019/2020-ban a világ Coffee arabica termelése 93.83 millió 60 kg-os zsák volt. A napi négy csésze feletti kávé fogyasztása esetén a rosszindulatú májdaganat relatív rizikója (RR) 0,50 (95% CI: 0,42-0,59) és a kolorektális karcinóma RR-ja pedig 0,83 (95% CI: 0,75-0,92) (Bøhn, 2014).

Ismert az olívaolaj (OO) – különösen az extraszűz olívaolaj (EVOO) – szív-érrendszeri- és rosszindulatú daganatos betegségekől védő hatása (Fernández del Río, 2016; Giovannelli, 2012) Ennek hátterében az antioxidáns, gyulladáscsökkentő hatás és a másodlagos jelátvivők szabályozása mellett még a globális DNS hipermetiláló hatása is részt vesz (Fernández del Río, 2016; Giovannelli, 2012).

Sőt, irodalmi adatok alapján az EVOO fogyasztás a várható élettartamot is növeli (Fernández del Río, 2016; Giovannelli, 2012). Az EU-ban Olaszország és Spanyolország a legnagyobb olívaolaj-fogyasztók: az éves fogyasztás mindkét

országban eléri az 500 000 tonnát. Az egy főre jutó felhasználásban pedig Görögország jár az élen, fejenként évi 12 kg-mal. Az EU a világszintű fogyasztás 53%-át adja (Európai Bizottság, 2021).

Ezzel szemben a transzsírsavak (TFA) által okozott károsodások növelik a kardiovaszkuláris betegségek (CVD), mellrák, prosztatatarák, cukorbetegség és elhízás esélyét (Abd El-Aal, 2019), melyeken keresztül nyilvánvalóan a várható élettartamot is rövidítik.

1.2.1. A flavonoidok epigenetikai aktivitása

Fokozott érdeklődésre számot tartó felvetés, hogy a növényi eredetű élelmiszerekben jelen levő polifenolok, flavonoidok képesek epigenetikai hatásokat kifejteni. A flavonoidok természetes fenolvegyületek, figyelemre méltó biológia aktivitással a két legfontosabb epigenetikai mechanizmusra, a DNS metilációra és a hiszton acetilációra. Számos epidemiológiai tanulmányban határozott eredmény van arra, hogy a magas étrendi flavonoid bevitel számos daganatos betegség kialakulásának a kockázatát csökkenti (Cui, 2008; Aggarwal, 2004; Narayanan, 2006). Az igazoltan egészségjavító hatású, gyümölcsökben és a zöldségekben gazdag étrend mellett a tisztított flavonoidok étrend-kiegészítőként történő fogyasztása is kínálkozik lehetőségként.

A flavonoidok a másodlagos növényi metabolitok nagy csoportja. A flavonoidok a polifenol családhoz tartoznak, alap kémiai szerkezetüket a flavan alapváz adja. Kémiai szerkezetüktől függően a flavonoidokat hat alosztályba sorolják: flavan-3-olok (amelyek flavonolként vagy katekinekként is ismertek), flavonolok, flavonok, flavanonok, izoflavonok és antocianidinek. Az ezeken az egyes alosztályokon belüli egyedi vegyületeknek ezért a nagy számáért a gyűrűk szaturációjában, hidroxilációjában és glikolizációjában lévő eltérések a felelősek. A flavonoidok széles körben jelen vannak a növényekben, ahol festékanyagként, fitohormonként funkcionálnak és az UV sugárzással, a rovarkártevőkkel és növénybetegségekkel szemben nyújtanak védelmet. A flavonoidokkal kapcsolatban arról is beszámoltak, hogy számos biológiai hatást fejtenek ki az emlősöknél: csak néhányat említve ezek közül ilyen az antibakteriális, vírusellenes, fájdalomcsillapító, antiallergén, hepatoprotektív, citosztatikus, apoptotikus, ösztrogén, és antiösztrogén hatás. Ezeket a különböző biológiai aktivitásokat számos molekuláris mechanizmushoz kötötték: az I. és II. fázisú detoxifikációs enzimek aktivitásának modifikációjához, a közvetlen és közvetett antioxidáns aktivitásokhoz, a

fehérje kináz enzimek gátlásához, a sejtciklusra gyakorolt hatásokhoz, a géntranszkripció modulációjához és az epigenetikai aktivitásokhoz. Ezek a vegyületek jelen vannak az emberi étrendben. Egy francia kutatás szerint, a gyümölcsökből származó teljes polifenol bevitel körülbelül háromszor magasabb a zöldségekből származó bevitelnél (Brat, 2006). A francia felnőttek átlagos teljes polifenol bevételét 1193 ± 510 mg/nap-ra becsülik (Brat, 2006). Az ausztrál populáció flavonoid bevételét pl. 454 mg/nap-ra becsülik úgy, hogy ennek 92 %-a flavan-3-ol. Chun és munkatársai szerint például az USA felnőtt lakossága körében a becsült átlagos teljes flavonoid bevitel napi 189,7mg, amelynek arányait tekintve 83,5 % flavan-3-olokból, 7,6 % flavononból, 6,8 % flavonolból, 1,6 % antocianidinből, 0,8 % flavonokból és 0,6 % izoflavonokból tevődik össze (Chun, 2007).

1.2.2. Zöld tea és a katekinjeinek az epidemiológiai vonatkozásai

A világ egyik legszélesebb körben elfogyasztott italát, a zöldteát (*Camellia sinensis*) már az ókortól kezdve szedték, eredetileg gyógyászatra használt tealevelekkel. A tea polifenolokat tartalmaz, például a katechineket és flavonoidokat. A zöldtea más teafajtákhoz képest nagy mennyiségű zöldtea katekint (GTC) tartalmaz (Basu, 2007). A zöld tea fő katekinjei a (-) - epigallokatekin-3-gallát (EGCG), (-) - epikatekin-3-gallát (EKG), (-) - epigallokatekin (EGC) és (-) - Az epicatekin (EC). Ezek közül az EGCG tartalom a legbőségesebb, a teljes kateckn alkotóelem tartalmának körülbelül 70% -át teszi ki (Siddiqui, 2006).

Az EGCG-t, a GTC-eket alaposan megvizsgálták rákellenes mechanizmusaik feltárására. Tanulmányok kimutatták, hogy az EGCG kezelés apoptózist indukált a ROS, valamint a kaspáz-3 és -9 aktivációk generálása miatt, ami sejtciklus leállításához vezetett a G1 fázisban a ciklin D1, cdk4 és p21 CIP1 expresszióinak kontrollálásával. Összességében a vizsgálatok azt sugallják, hogy az EGCG gátolja a hasnyálmirigy rák növekedését, invázióját, metasztázisát és angiogenezisét. (Shankar, 2008; Shankar, 2007). Emberi vastagbélrákos sejtekben megfigyelték, hogy EGCG-vel vagy PolyE-vel történő kezelés növeli a sejtek arányát a G1 fázisban és apoptózist vált ki (Shimizu, 2005). A nukleáris faktor- κ B (NF- κ B) transzkripció faktorról ismert, hogy létfontosságú szerepet játszik a rákos sejtekben az apoptózis gátlásában (Kaltschmidt, 2018). Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy az EGCG-kezelés gátolta az NF- κ B aktivációt humán HNSCC, emlőrák és tüdőrák sejtekben (Masuda, 2002; Fujiki, 1998). Továbbá humán

vastagbélrákban és epidermoid karcinóma sejtekben az NF- κ B aktivitást és annak nukleáris transzlokációját is gátolta az EGCG (Gupta, 2004; Ahmed, 2004).

Korábbi epidemiológiai vizsgálatok kimutatták, hogy a teakészítmények és a tea polifenolok gátolhatják a különféle daganatok megjelenését. A zöld tea-fogyasztók körében a zöld teát nem ivókkal összehasonlítva jelentősen csökken a daganatos betegségek kockázata (Liu, 2016). Egy sanghaji eset-kontroll tanulmányban nemdohányzó nők körében a zöldtea fogyasztás a tüdőrák kockázatának csökkenésével járt, ami erősebb korrelációt mutatott a növekvő fogyasztás mellett (Zhong, 2001). Alátámasztva az előzőket egy kínai vizsgálat megállapította, hogy mind a nőknél, mind a férfiaknál az egyes rákokkal fordított összefüggést figyelhető meg a növekvő mennyiségű zöld tea fogyasztás mellett, a rektális és hasnyálmirigyrákok esetében a legerősebb tendenciákkal (Ji, 1997). Ezenfelül jelentős fordított dózis-hatás összefüggést találtak a zöld tea fogyasztása és a vastagbélrák kockázata között, a legjelentősebb csökkenésről a rendszeres fogyasztóknál számoltak be (Yang, 2007).

Zöldtea és az epigenetikus változások

Az epigenetika olyan, esetenként öröklődő változásokkal foglalkozik, amelyek a DNS-szekvencia megváltozása nélkül következnek be. Ezek a változások jelentős szerepet töltenek be az általános génextpresszió-szabályozásban, és hozzájárulnak a rák kialakulásához, mivel befolyásolják a hiszton módosulását, megváltoztatják a kromatin szerkezetét és szabályozzák a nem kódoló mikroRNS-ek expressziót. A DNS-javító és a daganatot elnyomó gének epigenetikus lecsendesítése, amely általában a rák korai szakaszában a gének hipermetilezéséből származik, gyakran különböző betegségekhez kapcsolódik. Beszámoltak arról, hogy az EGCG hisztonmódosítással, valamint DNS-metilációval megváltoztatja a rákos sejtek epigenetikáját (Fang, 2003; Choi, 2009). Mások azt találták, hogy az EGCG elnyomta a DNS metiltranszferáz-aktivációt, vezetve a citozin-foszfát-guanin demetilácót és a lecsendesített tumor-szuppresszor gének helyreállítását, beleértve a retinsav receptor- β (RAR β), p16 INK4a, és az O⁶-methylguanine-DNS metil-transzferázt (Fang, 2007). További *in vitro* vizsgálatok azt mutatták, hogy az EGCG-kezelés elősegítette a részleges demetilációt a hipermetilezett RAR β reaktivációjához az emlőrákos sejtekben, valamint csökkentette a telomeráz reverz transzkriptáz promoter metilációját (Link, 2010; Guilleret, 2004).

1.2.3. Transz-zsírsavak

Már a '40-es években leírták, hogy a túlzott energiabevitel és bizonyos daganatok előfordulása között összefüggés látszik. Emellett állatkísérletek azt is feltárták, hogy a kalória restrikció csökkenti a tumor-előfordulást, amely során a sejtek proliferatív és metasztatikus képessége is redukálódik (Longo, 2010).

Az étrend meghatározó szerepét a daganat keletkezésben egyes kutatások úgy figyelik meg, hogy a táplálkozás és bizonyos környezeti karcinogén ágensek együttes hatását vizsgálják. Az egyik ilyen vizsgálatban, a zsírban gazdag étrend és a röntgensugárzás együttesen növelte az emlődaganatok előfordulását. Az étkezési olajok hevítése és főleg az újra hevítése során, magas hőmérsékleten, az egészségre ártalmas policiklusos aromás szénhidrogének (PAH-k) és a heterociklusos aminok (HCA-k) keletkeznek, melyek potenciálisan mutagén hatásúak (Purcaro, 2006; Perumalla, 2016; Galeone, 2006).

A zsírsavak térbeli szerkezete illetve annak megváltozása szintén befolyásolja a daganatkialakulásra kifejtett hatásukat. A telítetlen zsírsavak egy csoportját alkotják a TFA, amelyek két úton jöhetnek létre. Egyrészt természetes módon a kérődző állatok anyagcseréje során termelődnek és tartalmazza őket az állatok húsa, testzsírja és a teje, illetve a belőle készülő tejtermékek, másrészt a TFA létrejöhet mesterséges úton a növényi olajok részleges hidrogénezésével. Ez utóbbi jellemző technológia az élelmiszeriparban, ami miatt az elmúlt évtizedekben jelentősen megnőtt a táplálékaink TFA tartalma, aminek több vizsgálat szerint egészségkárosító hatása van. A magas TFA tartalmú étrendet összefüggésbe hozták a szívbetegségekkel, a cukorbetegséggel, az elhízással és szövődényeivel, egyes daganatos megbetegedésekkel, valamint számos egyéb kórképpel (Ginter, 2016; Michels, 2021). Az IARC nemrég közzétett legújabb eredményei azt sugallják, hogy az ipari feldolgozott élelmiszerekből származó TFA fogyasztása a petefészekrák kialakulásának nagyobb kockázatával járhat. Kevés epidemiológiai tanulmány vizsgálta a zsírsavak és a petefészekrák kapcsolatát. A rák és táplálkozás európai prospektív vizsgálatán (EPIC) belül 1486 incidens petefészekrákot azonosítottak. Az EPIC tanulmány 521 330 résztvevőt foglal magában 1992 és 2000 között, 10 európai ország 23 központjából. Pozitív összefüggést találtak a petefészekrák és az ipari TFA bevitel között (Yammine, 2020).

A WHO már korábban felhívta a figyelmet arra, hogy a TFA túlzott fogyasztása súlyos egészségügyi problémákhoz vezet. Javaslata alapján a napi energiabevitel legfeljebb 1%-a származzon csak TFA-ból. A magyarországi szabályozás alapján a különféle élelmiszerek összes zsírtartalmának maximálisan 2%-a lehet TFA (OÉTI, 2013; NÉBIH 2014).

1.2.4. Olívaolaj

Az olívaolaj a mediterrán étrend alapvető eleme. Jótékony sajátosságainak tulajdonítják a magas egyszeresen telítetlen zsírsavtartalmat (MUFA), amely az összes lipidtartalom 80% -át teszi ki. A közelmúltban összesített bizonyítékok azonban azt mutatták, hogy az olívaolaj kisebb komponensei, mint a fenolok és fitoszterolok illetve flavonoidok, szkvalének, triterpének és lignánok, szintén hozzájárulhatnak az egészséggel kapcsolatos tulajdonságaihoz (Tripoli, 2005; Borzi, 2018). Az olívaolaj fogyasztása képes csökkenteni a lipid- és DNS-oxidációt, javítani a lipidprofilot és az inzulinrezisztenciát, az endotheliális diszfunkciókat, a gyulladásokat és csökkenteni a vérnyomást hipertóniás betegekben. Ezek a hatások kivédhetik mind a szív- és érrendszeri betegségeket, mind az anyagcserezavarokat (Violi, 2015; Buckland, 2015).

Több vizsgálat foglalkozott az olívaolaj fogyasztás és a daganatos betegségek összefüggésével. Az egyik ilyen összefoglaló metaanalízis szerint az olívaolaj-bevitel fordított összefüggésben van a daganatos betegségek prevalenciájával. A vizsgálatban összesen 38 tanulmányt választottak ki eredetileg; melyek közülük 19 eset-kontroll vizsgálatban tartalmazta végül 13800 daganatos beteg és 23340 kontroll adatait, melyek részt vettek ezen tanulmányban. Megállapították, hogy a legalacsonyabb olívaolaj-fogyasztáshoz képest a legmagasabb kategóriához alacsonyabb kockázat társult a legtöbb típusú daganatos megbetegedés előfordulása esetén (Psaltopoulou, 2011).

Más összefoglaló epidemiológiai vizsgálat, amelybe 25 vonatkozó tanulmányt vontak be, arra a következtetésre jutott, hogy az olívaolaj előnyben részesítése a más zsírokkal szemben, csökkentheti a felső emésztőrendszeri és légzőszervi daganatok, valamint az emlő, esetleg a vastagbél és más daganatos betegségek kockázatát (Pelucchi, 2010).

Az étrendi komponensek által kiváltott epigenetikai terápia jelentős érdeklődés középpontjává vált a daganatprevencióban. A mediterrán étrend összetevői, mint a gyümölcsök, zöldségek, vörös bor és olíva olaj illetve ezek komponensei régóta központi szerepet kapnak a különböző kutatásokban. Ebben a vizsgálatban az olívaolaj

kemopreventív szerepét vizsgálták a vastagbélrák kialakulásában genetikai és epigenetikai mechanizmusok megcélzásával. Az eredmények szerint olívaolaj hatásmechanizmusa magában foglalja az NF- κ B által közvetített út gátlását és az apoptotikus út helyreállítását a miRNS-ek és a metilációs mintázat szabályozásával (Nanda, 2019).

1.3. DNS-metiláció és szerepe az epigenetikai kutatásokban

Az epigenetika eltérést jelent a génkifejeződési potenciálban, anélkül, hogy a génszekvenciában bármilyen változás történne. Az epigenetika fontos szerepet játszik a daganatok biológiájában, a vírusos fertőzésekben, a mobilis elemek aktivitásában, a szomatikus génterápiában, a klónozásban, a transzgén technológiákban, a genomikus imprintingben, a fejlődési rendellenességek kialakulásában, a mentális egészségben és az X kromoszóma inaktivációjában (Dupont, 2009). Az epigenetika a kutatás gyorsan fejlődő területévé vált, melynek legfontosabb mechanizmusa a DNS metiláció.

A DNS metiláció lényege, hogy a DNS-metiltranszferáz (DNMT) enzimek hatására egy metil (CH_3) csoport szubsztituálja a citozin gyűrű 5-ös számú szénatomjának a hidrogén atomját. Bár a legtöbb citozin metiláció az 5'CG3' (amit CpG dinukleotidnak is neveznek) szekvencián történik, néhány érinti a CpA és a CpT dinukleotidot is.

A DNS négyféle bázisból épül fel, így 16 lehetséges dinukleotid kombináció fordulhat elő. Ezért a CpG dinukleotidnak megközelítőleg 6 %-os gyakorisággal kellene előfordulnia. Azonban tényleges jelenléte a várható előfordulásnak csak 5-10 %-át teszi ki. Ez a CpG szuppresszió szabályozó szerepével állhat kapcsolatban. Az emberi genom nem egyformán metilálódik; metilálatlan szegmens régiókat is tartalmaz a metilált régiókkal elvegyülve. A genom többi részével ellentétben, a DNS CpG szigeteknek nevezett kisebb régióinak, amelyek 0,5-től 5 kb-ig terjednek, és átlagosan minden 100 kb-ban előfordulnak, eltérő tulajdonságai vannak. Ezek a régiók metilálatlanok, GC-ben gazdagok (60-70 %), a CpG-CpC arányuk legalább 0,6. Az embereknél a gének megközelítőleg fele rendelkezik CpG szigetekkel és ezek jelen vannak mind a háztartási (housekeeping) génekben, mind pedig a szövetspecifikus mintázatra jellemző génekben (Deaton, 2011; Takai, 2002).

A DNS metilációt tehát a DNMT enzimcsoport hozza létre. A mai napig megismert DNMT-k: a DNMT1, a DNMT1b, a DNMT1o, a DNMT1p a DNMT2, a DNMT3A, a DNMT3b az izoformáival, és a DNMT3L. A metiláció lehet új (amikor a CpG

dinukleotidok mindkét DNS szálon metilálatlanok), vagy fenntartott (amikor a DNS dinukleotidok az egyik szálon metilálódtak). A DNMT1-nek mind új, mind pedig fenntartott metiltranszferáz aktivitása is van, és a DNMT3A, valamint a DNMT3b erős új metiltranszferázok. Ezeknek az enzimeknek a fontosságát számos állatkísérlet során kimutatták, például az egerek, amelynél hiányzott ez a gén, a születésük után hamar elpusztultak.

A DNS metilációs mintázatok már a korai embriogenezis során kialakulnak, és nagyon finoman szabályozódnak a fejlődés során. A DNMT-k mellett a metiláció egyéb mechanizmusai közé tartoznak a demetilázok. A DNS-t aktívan demetiláló enzimek közé tartozik az 5-metilcitozin glikoziláz, ami a dezoxiribózt érintetlenül hagyva távolítja el a metilálódott citozint a DNS-ből. (A citozin aztán a DNS javító [repair] enzimek visszaszintetizálják nukleotid formában).

A DNS metiláció mintázata részben öröklődő – de meg is változtatható – és emiatt a DNS metiláció terápiás célpont is.

A DNS metiláció a géntranszkripció fontos szabályozója, és a karcinogenezisben betöltött szerepe jelentős érdeklődés tárgya volt az elmúlt néhány évben. A DNS metilációs eltérések általánosak számos daganatban. Az összes epigenetikai modifikáció közül a tumorszuppresszor gének promóter régióit (és így a transzkripciót) elnyomó, a gén elnémításához vezető hipermetiláció a legkiterjedtebben kutatott. Azonban azt is felismerték, hogy a globális hipometiláció az egyik oka az onkogenezisnek is. Míg a magas DNS-metilációs szint a promóter szakaszokon gátolja a transzkripciós faktorok kötődését ezen keresztül a génexpressziót, addig a DNS-hipometiláció ezen gátlás csökkenésén vagy megszűnésén keresztül lehetővé teszi a transzkripciós faktorok kötődését, így az adott gén megnövekedett kifejeződését [Clouaire, 2008]. A karcinogenezis szempontjából tehát lényeges a globális hipometiláció mértéke, az onkogének hipometiláltsága ugyanis fokozott expressziójukon keresztül a sejtciklus szabályozásának zavarához, végül daganatok kialakulásához vezethet [Szigeti, 2018]. A globális hipometiláció nemcsak a daganatkialakulás kockázatát növelheti, hanem ismeretes az is, hogy pl. kolorektális karcinómás betegek esetén a globális DNS hipometiláció rontja a túlélés esélyeit (Chuang, 2017). A folyamat komplexitását mutatja, hogy a transzformált sejt genomja egyszerre megy keresztül globális genomi hipometiláción és egyes génszabályozó régiókhoz kapcsolódó CpG-szigetek

hipermetilációján [Esteller, 2001]. A metilációs változásokat előidéző hatások feltérképezése és megértése tehát szükséges a karcinogenezis folyamatának pontosabb megértéséhez. A metiláció mechanizmusával és szabályozásával kapcsolatos új információk sok szabályozó fehérje és enzim felfedezéséhez vezettek. Intenzív kutatások tárgyát képezi, hogy az étrendi folát és a metilén-tetrahidrofolát redukáz polimorfizmusok mennyiben befolyásolják a metilációs mintázatok alakulását a normál és a rákos szövetekben. Mivel a metiláció korán bekövetkezik és kimutatható a testnedvekben, ez potenciálisan hasznos lehet a daganatok korai felderítésében és prognózisuk meghatározásában. Sőt a DNS metiláció visszafordítható. Ezért számos daganat kezelésére használják az olyan gyógyszereket, mint az 5'-azacytidin, decitabin és a hiszton deacetiláz gátlókat. Olyan újabb demetiláló ágensek állnak kifejlesztés alatt, mint az antiszenz DNS-metiltransferáz és a kis interferáló RNS (siRNA). Ezek a DNS metiláció jelentőségét tovább fokozzák (Dupont, 2009).

1.4. A LINE-1 transzpozonok

Barbara McClintock 1983-ban Nobel díjat kapott a DNS mobilis elemeinek a forradalmi és nagy horderejű felfedezéséért. Ezt követően a genom megítélése megváltozott, mivel ez a felfedezés a genom mozgékonyágát és dinamikáját tanúsította.

A transzpozázibilis elem (TE, transzpozon vagy ugráló gén) egy DNS szekvencia, amely képes arra, hogy a genomon belül megváltoztassa a helyét, néha mutációkat hozva létre és megváltoztatva a sejt genetikai identitását és a genom méretét. A transzpozíció gyakran ugyanannak a genetikai anyagnak a megkettőződését, azaz a gén duplikálódását vagy amplifikációját eredményezi.

A genom tartalmaz ismétlődő szekvenciákat, és ezek a transzpozázibilis genetikai elemek az emberi genom több mint 45 %-át teszik ki.

A transzpozonok két csoportba sorolhatók:

I. csoport, a retrotranszpozonok csoportja melyek általában a reverz transzkripció mechanizmusával juttat információt a genomba.

II. csoport, a DNS transzpozonok kódolják azt a transzpozáz fehérjét, amelyekre szükségük van a beillesztéshez és a kivágáshoz, és ezek közül a transzpozonok közül néhány más fehérjéket is kódol.

Az I. csoportba tartozó transzpozonok két fázisban másolódnak: először DNS-ből RNS-sé íródnak át a transzkripció szokásos mechanizmusával, de az eredményül kapott RNS azután reverz transzkripcióval a DNS-be juttatja a komplementer szakaszának megfelelő információt. Az így lemásolt DNS azután egy új pozíciónál helyeződik vissza a genomba. A reverz transzkripció lépést egy reverz transzkriptáz katalizálja, amelyet gyakran maga a transzpozon kódol. A retrotranszpozonok jellemzői hasonlóak az olyan retrovírusokéhoz, mint amilyen a humán immundeficiencia vírus (HIV) is.

A retrotranszpozonokat általában három fő további csoportra bontják:

- Retrotranszpozonok: hosszú láncvégi ismétlésekkel (LTR – long terminal repeats), amelyek a retrovírusokhoz hasonlóan kódolják a reverz transzkriptázt
- Retropozonok: hosszú, szétszórtan ismétlődő sejtmagi elemek (long interspersed nuclear elements – LINE-k, LINE-1-ek, vagy L1-ek), amelyek kódolják a reverz transzkriptázt, de hiányoznak belőlük az LTR-ek és az RNS polimeráz II írja át őket
- Rövid, szétszórtan ismétlődő sejtmagi elemek (SINE-k – short interspersed nuclear elements): nem kódolják a reverz transzkriptázt és az RNS polimeráz III írja át őket.

A LINE-1 körülbelül 6-8 kilobázis hosszúságú, és RNS polimeráz III promóterből, 5' végi nem transzlálódó régióból, két, egymást nem-átfedő nyitott leolvasási keretből (ORF1 és ORF2), valamint 3' végi nem transzlálódó régióból áll, és célspecifikus közvetlen ismétlődések határolják. Az ORF1 és az ORF2 megközelítőleg 1 kilobázis, illetve 4 kilobázis hosszú. Az ORF1 kódolja a megközelítőleg 40 kDa molekulásúlyú RNS-kötő fehérjét, míg az ORF2 kódolja az endonukleáz és reverz transzkriptáz funkcionális aktivitással rendelkező 150 kDa-os fehérjét. A kutatások azt mutatják, hogy ez a két fehérje, az ORF1p és az ORF2p fontos a retrotranszpozícióhoz.

Az olyan retrotranszpozonok, mint a hosszú szétszórtan ismétlődő nukleáris elem/szekvencia 1 (LINE 1) bőségesen fordulnak elő a transzpozonok körében és a genom 17 %-ában vannak jelen. Ezeknek az elemeknek ismétlődő szekvenciáik vannak. A LINE 1 képes másolódní és beilleszkedni egy új gén helyre és megszakítani a kapcsolódó génkifejeződését.

A retrotranszpozonokat olyan epigenetikai módosulások szabályozzák, mint a metilációs eltérések, amelyek a LINE 1 aberráns kifejeződéséhez vezetnek. A

szakirodalom szerint a globális DNS metiláció elvesztése összefügg a daganatok iniciációjával és progressziójával. A LINE 1 metilációs státusz a daganat biomarkerének tekinthető. A LINE 1 hipometilációja transzkripciós deregulációt, genomikus instabilitást, kromoszómális rekombinációt, az onkogének aktiválódását és a tumor szupresszor gének elnyomását okozza. Kevesebb bizonyíték van a genomikus instabilitásra és a LINE 1 elemek hipometilációja miatti rák progresszió mögött álló mechanizmusra. Így a LINE1 metilációja lehetséges markere lehet a daganat prognózisának.

1.5. DMBA

A 7,12-dimetilbenz [a] antracén (DMBA), a környezetünkben gyakran előforduló policiklusos aromás szénhidrogének egyike. A DMBA kipufogógázokban, dohányfüstben és odaégett ételekben is előforduló ártalmas anyag, ami képes szabadgyököket felszabadítva DNS-adduktumokat képezni és ezen keresztül tumorszupresszor géneket gátolni, onkogéneket aktiválni. A DMBA CYP enzimeken keresztül történő metabolizmusa (Budán, 2009) reaktív oxigén gyököket (ROS)-t képez, ami citokineket (például TNF, IL1, IL6) (Storz, 2005; Reuter, 2010) és transzkripciós faktorokat (például NF- κ B-t) indukál.

A DMBA-t kísérletünkben kukoricaolajban oldottuk fel, mivel mindkét anyag erősen lipofil. Bár a kukoricaolaj nagy mennyiségben tartalmaz kemopreventív linolsavat (58-62 %) de korábbi génexpressziós kísérleti modelljeink szerint a kémiai karcinogén DMBA hatását ez nem csökkenti jelentősen (Ghazani, 2016; Budán, 2009; Budán 2008; Gyöngyi, 2002).

1.6. Célkitűzés

Jelen *in vivo* állatkísérletes vizsgálatban a LINE-1 DNS metilációs mintázatát vizsgáltuk DMBA-val előkezelt egerek májában, lépében és veséiben. Egy csoport zöld tea (*C. sinensis*) kivonatot, egy csoport japán viaszbogyó (*Myrica rubra*) kivonatot, egy csoport flavonoid kivonatot (4 gramm / 100 ml hozzáadott rezveratrollal), egy csoport kávé (*C. arabica*) kivonatot kapott. További két csoport TFA-t valamint EVOO-t kapott. Az eredményeket összehasonlítottuk egy DMBA-val kezelt pozitív és egy kezeletlen negatív kontrollcsoport adataival.

A kísérlet célja annak meghatározása volt, hogy ezek a karcinogén/kemopreventív hatások hogyan jelennek meg a LINE-1 DNS metilációs mintázataiban, a vizsgált kemopreventív anyagok milyen mértékben képesek megakadályozni a DMBA által okozott hipometilációt, és felhasználhatók-e ezen hatások potenciális biomarkerként. További cél volt a TFA hatásának a vizsgálata a DMBA által okozott LINE-1 DNS hipometilációra, hogy vajon képes volt-e azt erősíteni, vagy sem?

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgálatunk során nyolc csoport 12 hetes nőtény CBA/Ca egeret használtunk (n=6). A kezeletlen kontroll és a DMBA-val kezelt kontroll csoportok nem kaptak előtáplálást, míg egy-egy állatcsoport a szokásos étrend mellett két hétig a DMBA kezelés előtt:

1. 4 mg/nap/állat zöld tea (*C. sinensis*) kivonatot (katekin tartalom 80%) (Xi'an Longze Biotechnology Co. Ltd.),
2. 2,5 mg/nap/állat japán viaszbagyó (*M. rubra*) kivonatot (miricetin [3,5,7,3',4',5'-hexahidroxi-flavon] tartalom: 80 %) (Xi'an Longze Biotechnology Co. Ltd.),
3. 30 mg/nap/állat flavonoid kivonatot (közönséges szőlő (*Vitis vinifera* "Cabernet Sauvignon") mag és héj, szeder (*Rubus fruticosus* "Thornfree") mag és héj, fekete ribiszke (*Ribes nigrum*) mag és héj, hozzáadott rezveratrol 4 gramm 100 ml-ben, nevezetesen FruitCafe™ (SC Vita Crystal Research SRL)),
4. 30 mg/nap/állat (150 ml) kávé (*C. arabica*) kivonatot,
5. 300 mg/nap/állat olívaolajat (Agraria Riva Del Garda SCA), illetve
6. 300 mg/nap/állat TFA-t (transz-3-hexadecénsav) (Sigma Aldrich) kapott.

A kezeletlen (negatív kontroll) kontrollcsoport kivételével a másik hét csoport 20 mg/testsúlykilogramm DMBA-t kapott intraperitoneálisan (Sigma-Aldrich), 0,1 ml kukoricaolajban feloldva. (A kezeletlen kontroll csoport is kapott 0,1 ml kukoricaolajat intraperitoneálisan). A 24 órás DMBA-expozíciót követően nyaki diszlokáció után eltávolítottuk a vizsgálandó szerveket (máj, vesék és lép).

Az egereket az állatkísérleti alapelveknek és irányelveknek megfelelően tartottuk. Minden erőfeszítést megtettünk a szenvedés minimalizálására. A kísérletet a hatályos etikai előírásoknak megfelelően végeztük (Pécsi Tudományegyetem Állatjóléti Bizottsága; Etikai engedélyszám: BA02/2000-79/2017).

2.1. A DNS izolálása

A DNS izolálását a High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Madison, WI, USA) segítségével végeztük a gyártó utasításai szerint.

2.2. LINE-1 DNS-metiláció

A biszulfát-konverzióhoz EpiTect Bisulfite kitet (Qiagen, Hilden, Németország) használtunk a gyártó utasításai szerint. Ez a folyamat a nem metilezett citozinek uracillá történő átalakítását eredményezte. Ezt követően nagy felbontású olvadáselemzést (HRM) végeztünk, amely az olvadáspont különbség alapján képes volt megkülönböztetni az uracil és a metilált citozin bázisokat. Ha a DNS erősen metilált régiókat tartalmaz, a biszulfit átalakítás és az azt követő amplifikáció magasabb olvadáspontot eredményez, mivel több citozin megtartása az amplifikált fragmentum magasabb GC-tartalmát eredményezi (a guanin és a citozin között 3 hidrogénkötés van). A nem metilált citozinok uracillá alakulnak át, aminek a jelentősége, hogy csak két hidrogén kötést alakít ki a hozzá kapcsolódó purin bázissal és ez alacsonyabb olvadáspontot eredményez.

A HRM-elemzéshez a LINE-1 CpG-gazdag régióját célzó primereket használtunk (Newman, 2012), a szekvenciák a következők voltak: forward: 5'-GGT TGA GGT AGT ATT TTG TGT G-3', reverse: 5'- TCC AAA AAC TAT CAA ATT CTC TAA C-3'. Az amplifikációt 96 lyukú lemezekben, Roche LightCycler480 qPCR készülékben (Roche, Madison, WI, USA) végeztük. A reakciómix 20 ng biszulfit kezelt DNS-t, 0,75-0,75 μ M előre- és fordított primert, 1x LightCycler 480 High Resolution Melting Master (Roche, Madison, WI, USA) 20 μ l végső mennyiségben tartalmazott (Bray, 2018). A PCR paraméterei a következők voltak: 5 percig 95°C-ra történő melegítés, majd 35 ciklus következett: 1. 95°C 20 másodpercig, 2. 60°C 30 másodpercig, 3. 72°C 20 másodpercig. Ezt követően az olvadáspont/olvadási görbe elemzését 73°C és 84°C között végeztük 0,1°C/2 sec hőmérsékletlépésekkel.

Pozitív és negatív kontrollok céljára Mouse high methylated genomic DNA-t (EpigenDx, Hopkinton, MA, USA) és Mouse low methylated genomic DNA-t (EpigenDx, Hopkinton, MA, USA), valamint ezek különböző arányú keverékeit használtuk, hogy lehetővé váljon a mintáink metilációs szintjének számszerűsítése.

2.3. Számítás és statisztikai elemzés

A LINE-1 expressziós szintek relatív LINE-1 metilációs szintjeit a $2^{-\Delta\Delta CT}$ módszerrel kiszámoltuk és összehasonlítottuk. Az eredmények eloszlásának vizsgálatát a Kolmogorov-Smirnov teszttel végeztük, majd az átlagok egybevetésére a Levene-féle F-próba után *t*-próbát használtunk. Az IBM SPSS 21 statisztikai szoftverével végeztük a

számításokat és az elemzéseket, a statisztikai szignifikancia szintjét $p < 0,05$ -értéknél határoztuk meg.

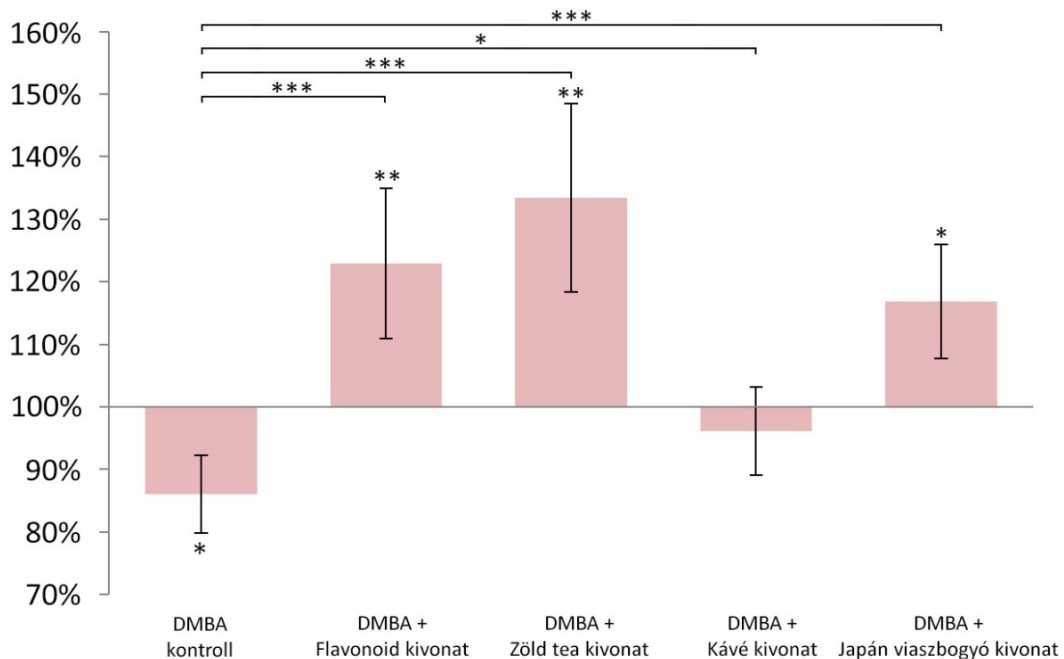
Az átlagos DNS-metilációs szinteket a kezelés nélküli állatok (negatív kontrollok) százalékában fejeztük ki.

3. EREDMÉNYEK

Az eredmények feldolgozása a CBA/Ca nőstény egerek három szervet (lép, máj, vese) érintő LINE-1 metilációs mintázat változását elemzi úgy, hogy az önmagában DMBA-val kezelt kontrollhoz képest a DMBA és az alkalmazott anyagok együtt milyen hatással vannak a LINE-1 metilációra illetve képesek-e kivédeni a DMBA indukálta LINE-1 hipometilációt.

3.1. Metilációs mintázatok változásai a lépben

A lép esetében DMBA-val együtt adott flavonoid kivonat, zöld tea kivonat és japán viaszbogó kivonat kivédte a DMBA indukálta LINE-1 hipometilációt, sőt kifejezetten ellenkező irányú változást – hipermetilációt – idézett elő. A kávé kivonat esetében kismértékű hipometilációt tapasztaltunk. Az 1. ábra jól mutatja az arányokat.



1. Ábra: LINE-1 metilációs mintázat CBA/Ca nőstény egerek (n=6) lépében DMBA, valamint DMBA-val egyidejűleg flavonoid kivonat, zöld tea kivonat, kávé kivonat vagy japán viaszbogó kivonat hatására, a kezeletlen kontrollt száz százaléknak tekintve (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 – az oszlopok feletti és alatti jelölések a kezeletlen kontrollal való összehasonlítás szignifikanciaszintjét, a vízszintes vonalaknál levő jelölések a DMBA-kezelt csoporttal való összehasonlítás szignifikanciaszintjét mutatják).

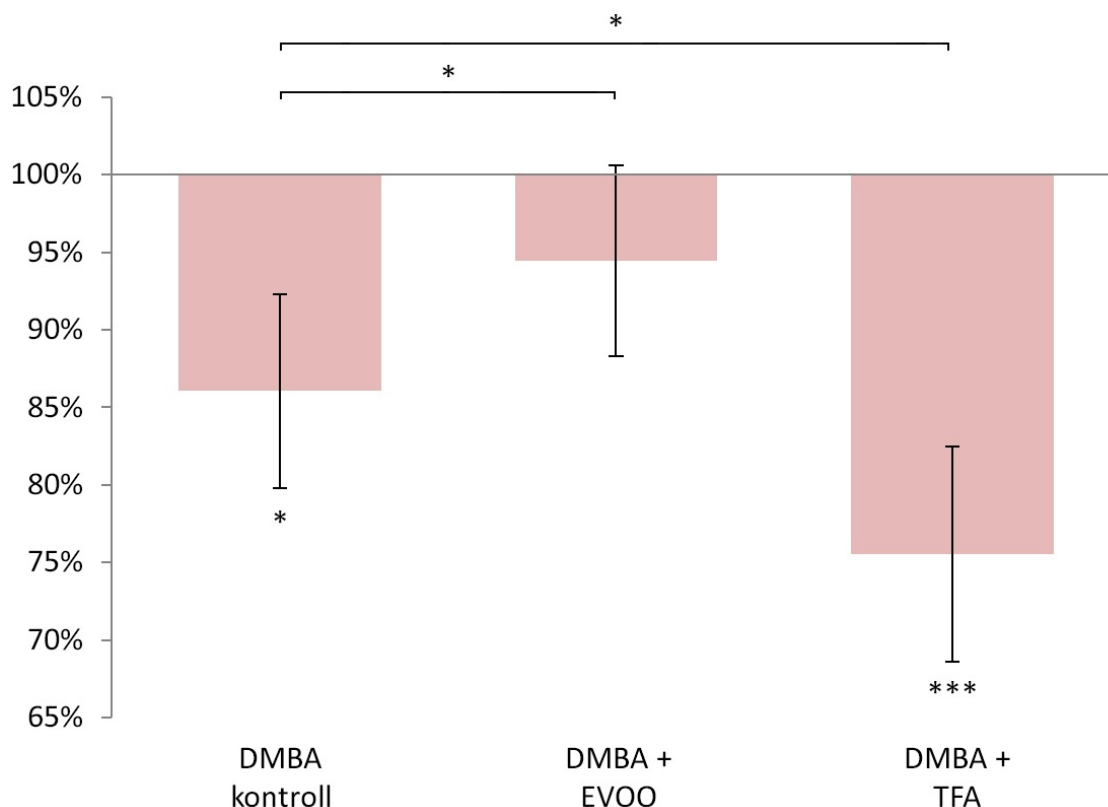
Az 1. táblázat a lép esetében megmutatja, hogy a flavonoid kivonat 122,9% (SD=12,0%), a zöld tea kivonat 133,4% (SD=15,0%) és a japán viaszbogó kivonat esetén 116,8% (SD=9,2%) nemcsak a DMBA-kezelt, hanem a kezeletlen kontroll

csoport értékeihez képest is statisztikailag szignifikáns hipermetilációt okozott. Ezekkel ellentétben a kávé kivonat a metiláció mértékét lényegében a kezeletlen kontrollok szintjére 96,1% (SD=7,0%) vitte vissza.

| | DMBA kontroll | DMBA + Flavonoid kivonat | DMBA + Zöld tea kivonat | DMBA + Kávé kivonat | DMBA + Japán viaszbogyó kivonat |
|---------------------|--------------------------|---|--|--------------------------------|--|
| átlagos | | | | | |
| LINE-1 metiláció | 86,1% | 122,9% | 133,4% | 96,1% | 116,8% |
| szórás | 6,3% | 12,0% | 15,0% | 7,0% | 9,2% |
| p-érték | 0,0180 | 0,0054 | 0,0012 | 0,4639 | 0,0137 |

1. Táblázat: LINE-1 metilációs mintázat CBA/Ca nőstény egerek (n=6) lépében DMBA, valamint DMBA-val egyidejűleg flavonoid kivonat, zöld kivonat, kávé kivonat vagy japán viaszbogó kivonat hatására, a kezeletlen kontroll arányában kifejezve.

A lépben a DMBA-val együtt adott EVOO számottevően csökkentette, a TFA viszont jelentős mértékben fokozta a DMBA által okozott LINE-1 hipometilációt (2. ábra).



2. Ábra: LINE-1 metilációs mintázat CBA/Ca nőstény egerek (n=6) lépében DMBA, valamint DMBA-val egyidejűleg EVOO vagy TFA hatására, a kezeletlen kontrollt száz százaléknak tekintve (* p<0,05; * p<0,001 – az oszlopok alatti jelölések a kezeletlen kontrollal való összehasonlítás szignifikancia-szintjét, a vízszintes vonalaknál levő jelölések a DMBA-kezelt csoporttal való összehasonlítás szignifikanciaszintjét mutatják).**

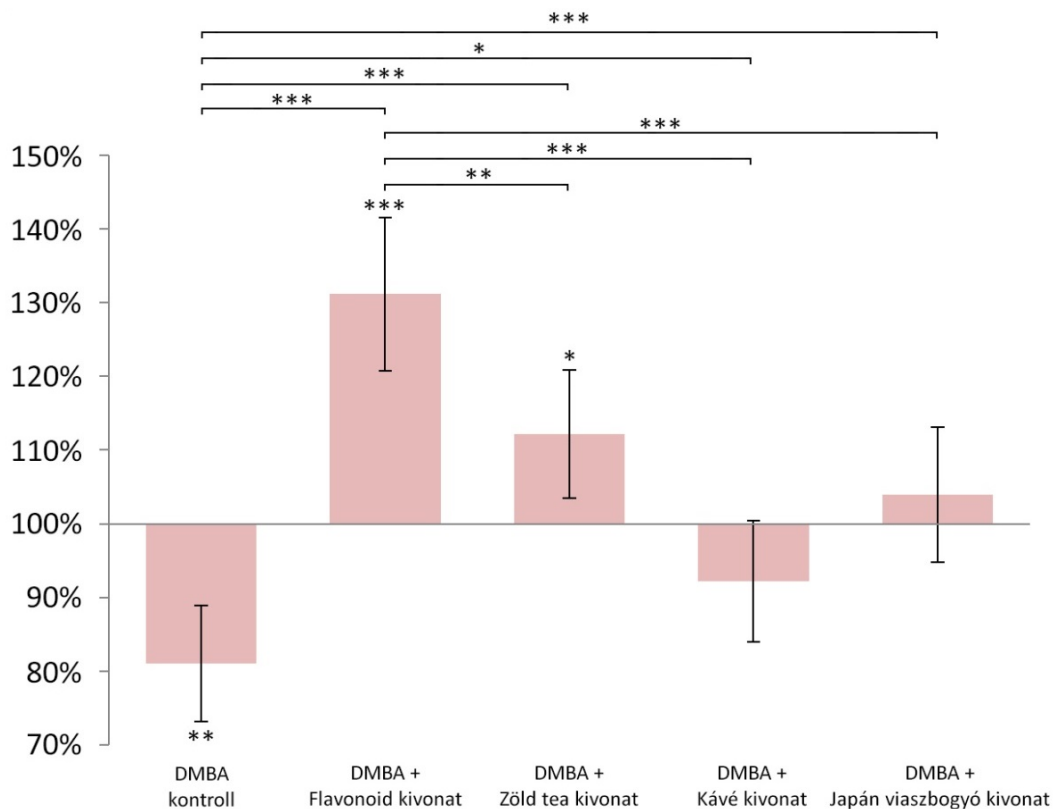
A 2. táblázatban láthatók a számszerű értékek: Az EVOO statisztikailag szignifikáns mértékben csökkentette a DMBA-okozott hipometilációt, míg a TFA pedig szignifikánsan fokozta azt.

| | DMBA kontroll | DMBA + EVOO | DMBA + TFA |
|--------------------------|---------------|-------------|------------|
| átlagos LINE-1 metiláció | 86,1% | 94,5% | 75,5% |
| szórás | 6,3% | 6,2% | 6,9% |
| p-érték | 0,0180 | 0,2852 | 0,0007 |

2. Táblázat: LINE-1 metilációs mintázat CBA/Ca nőstény egerek (n=6) lépében DMBA, valamint DMBA-val egyidejűleg EVOO vagy TFA hatására, a kezeletlen kontroll arányában kifejezve.

3.2. Metilációs mintázatok változásai a májban

A máj esetében DMBA-val együtt adott flavonoid kivonat, és zöld tea kivonat sikeresen kivédte a DMBA indukálta LINE-1 hipometilációt, sőt hipermetilációt eredményeztek. A japán viaszbogó kivonat és a kávé kivonat is statisztikailag szignifikáns védő hatást mutattak, ami a kávé esetén gyengébb volt. Ez esetben kismértékű hipometilációt tapasztaltunk. A 3. ábra, illetve a 3. táblázat mutatja az arányokat, illetve a számszerű eredményeket.

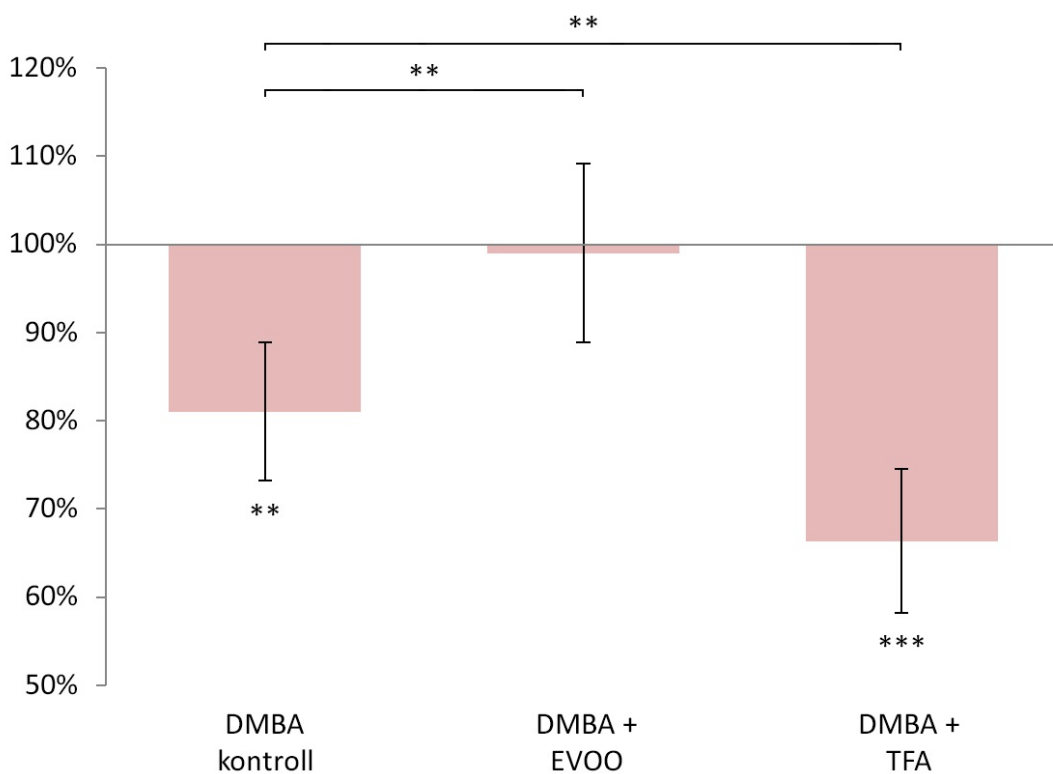


3. Ábra: LINE-1 metilációs mintázat CBA/Ca nőtény egerek (n=6) májában DMBA, valamint DMBA-val egyidejűleg flavonoid kivonat, zöld tea kivonat, kávé kivonat vagy japán viaszbogó kivonat hatására, a kezeletlen kontrollt száz százalékknak tekintve (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 – az oszlopok feletti és alatti jelölések a kezeletlen kontrollal való összehasonlítás szignifikanciaszintjét, a vízszintes vonalaknál levő jelölések a DMBA-kezelt csoporttal való összehasonlítás szignifikanciaszintjét mutatják).

| | DMBA kontroll | DMBA + Flavonoid kivonat | DMBA + Zöld tea kivonat | DMBA + Kávé kivonat | DMBA + Japán viaszbogó kivonat |
|---------------------|------------------|-----------------------------|-------------------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| átlagos | | | | | |
| LINE-1 metiláció | 81,0% | 131,1% | 112,2% | 92,2% | 104,0% |
| szórás | 7,9% | 10,4% | 8,7% | 8,2% | 9,1% |
| p-érték | 0,0042 | 0,0003 | 0,0456 | 0,1642 | 0,4844 |

3. Táblázat: LINE-1 metilációs mintázat CBA/Ca nőstény egerek (n=6) májában DMBA, valamint DMBA-val egyidejűleg flavonoid kivonat, zöld kivonat, kávé kivonat vagy japán viaszbogó kivonat hatására, a kezeletlen kontroll arányában kifejezve.

A léphez hasonlóan a máj esetében is DMBA-val együtt adott EVOO kivédte a LINE-1 hipometilációt, míg a TFA tovább fokozta azt (4. ábra, 4. táblázat).



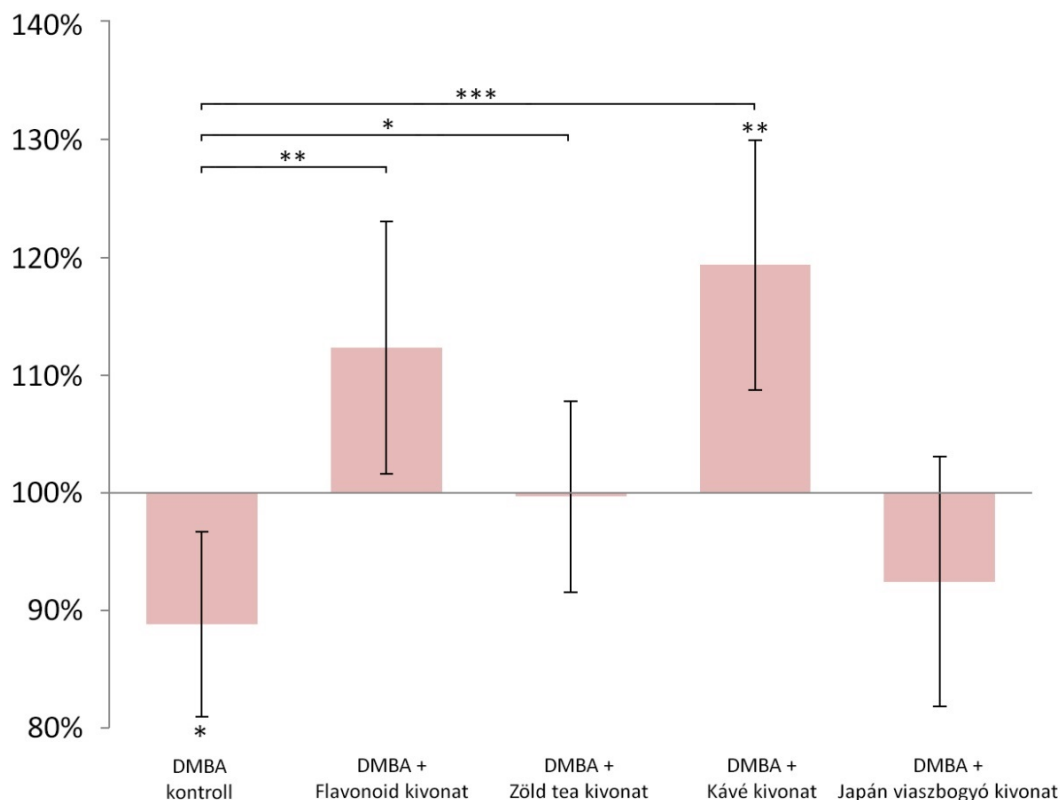
4. Ábra: LINE-1 metilációs mintázat CBA/Ca nőstény egerek (n=6) májában DMBA, valamint DMBA-val egyidejűleg EVOO vagy TFA hatására, a kezeletlen kontrollt száz százaléknak tekintve (p<0,01; *** p<0,001 – az oszlopok alatti jelölések a kezeletlen kontrollal való összehasonlítás szignifikancia-szintjét, a vízszintes vonalaknál levő jelölések a DMBA-kezelt csoporttal való összehasonlítás szignifikanciaszintjét mutatják).**

| | DMBA kontroll | DMBA + EVOO | DMBA + TFA |
|-----------------------------|----------------------|------------------------|-------------------|
| átlagos LINE-1 metiláció | 81,0% | 99,0% | 66,4% |
| szórás | 7,9% | 10,1% | 8,2% |
| p-érték | 0,0042 | 0,8635 | 0,0001 |

4. Táblázat: LINE-1 metilációs mintázat CBA/Ca nőstény egerek (n=6) májában DMBA, valamint DMBA-val egyidejűleg EVOO vagy TFA hatására, a kezeletlen kontroll arányában kifejezve.

3.3. Metilációs mintázatok változásai a vesékben

A vesékben a flavonoidok, a kávé kivonat és a zöld tea kivonat kivédtek a DMBA indukálta LINE-1 hipometilációt, míg a japán viaszbogyó kivonat kis mértékű, statisztikailag nem szignifikáns csökkenést okozott. A flavonoid kivonat és a kávé kivonat a kezeletlen kontrollhoz képest is hipermetilációt okozott, ami a kávé esetén volt statisztikailag szignifikáns (5. ábra, 5. táblázat).

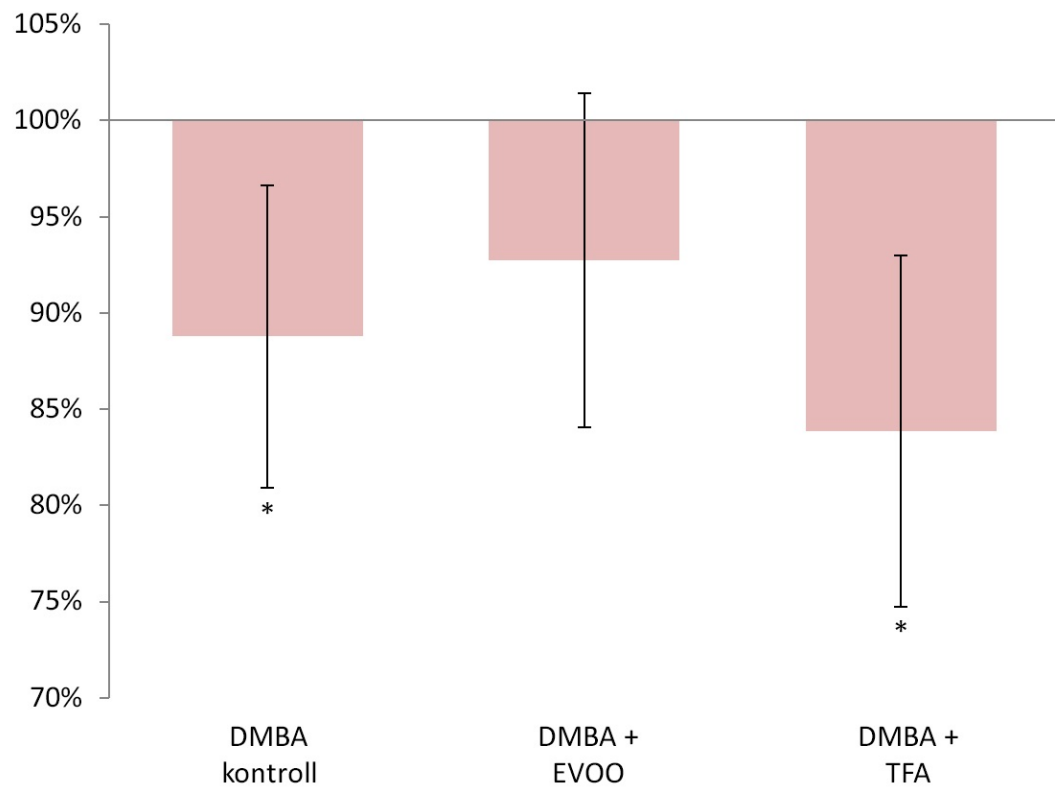


5. Ábra: LINE-1 metilációs mintázat CBA/Ca nőstény egerek (n=6) veséiben DMBA, valamint DMBA-val egyidejűleg flavonoid kivonat, zöld tea kivonat, kávé kivonat vagy japán viaszbogó kivonat hatására, a kezeletlen kontrollt száz százaléknak tekintve (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 – az oszlopok alatti és feletti jelölések a kezeletlen kontrollal való összehasonlítás szignifikanciaszintjét, a vízszintes vonalaknál levő jelölések a DMBA-kezelt csoporttal való összehasonlítás szignifikanciaszintjét mutatják).

| | DMBA kontroll | DMBA + Flavonoid kivonat | DMBA + Zöld tea kivonat | DMBA + Kávé kivonat | DMBA + Japán viaszbogó kivonat |
|------------------|----------------------|---------------------------------|--------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|
| átlagos | | | | | |
| LINE-1 metiláció | 88,8% | 112,3% | 99,7% | 119,4% | 92,4% |
| szórás | 7,9% | 10,7% | 8,1% | 10,6% | 10,6% |
| p-érték | 0,0444 | 0,0569 | 0,9467 | 0,0068 | 0,2129 |

5. Táblázat: LINE-1 metilációs mintázat CBA/Ca nőstény egerek (n=6) veséiben DMBA, valamint DMBA-val egyidejűleg flavonoid kivonat, zöld kivonat, kávé kivonat vagy japán viaszbogó kivonat hatására, a kezeletlen kontroll arányában kifejezve.

A vesék esetében a DMBA-val együtt adott EVOO csökkentette, a TFA fokozta a LINE-1 hipometilációt. A 6. ábra mutatja az arányokat, illetve azt, hogy a DMBA-kezelt csoporthoz képest egyik összetevő sem okozott statisztikailag szignifikáns változást.



6. Ábra: LINE-1 metilációs mintázat CBA/Ca nőstény egerek (n=6) veséiben DMBA, valamint DMBA-val egyidejűleg EVOO vagy TFA hatására, a kezeletlen kontrollt száz százaléknak tekintve (* $p < 0,05$ – az oszlopok alatti jelölések a kezeletlen kontrollal való összehasonlítás szignifikancia-szintjét mutatják).

A vesék esetén a 6. táblázatban láthatók a mért értékek.

| | DMBA kontroll | DMBA + EVOO | DMBA + TFA |
|--------------------------|---------------|----------------|------------|
| átlagos LINE-1 metiláció | 88,8% | 92,7% | 83,9% |
| szórás | 7,9% | 8,7% | 9,1% |
| p-érték | 0,0444 | 0,1861 | 0,0117 |

6. Táblázat: LINE-1 metilációs mintázat CBA/Ca nőstény egerek (n=6) veséiben DMBA, valamint DMBA-val egyidejűleg EVOO vagy TFA hatására, a kezeletlen kontroll arányában kifejezve.

Megfigyeléseink szerint összességében tehát azt a megállapítást lehet tenni, hogy a LINE-1 hipometiláció kivédésében a flavonoid kivonat és a zöld tea kivonat mutatta a legerősebb hatást a lép és a máj esetében. A vesékben a kávé kivonat eredményezte a legnagyobb változást. A hatások többnyire túlmentek a DMBA-okozta hipometiláció kivédésén, és ellenkező irányú eltérést – hipermetilációt – okoztak. Az EVOO vagy csökkentette, vagy kivédte a DMBA-okozta hipometilációt, de hipermetilációt nem idézett elő. A várakozásnak megfelelően a TFA mindhárom szerv esetében fokozta a LINE-1 hipometilációt, vagyis erősítette a policiklusos karcinogén molekula (DMBA) által okozott változásokat.

4. MEGBESZÉLÉS

4.1. A DMBA hatása a LINE-1 metilációs mintázatra

A DMBA hatásai lehetnek egyrészt közvetlenek, például a sejtalkotókra (DNS, fehérjék, membránok, stb) kifejtett oxidatív stressz, vagy a DNS-t érő direkt mutagén hatások. Másrészt a DMBA közvetett hatásokat is kifejt, például a sejtosztódás szabályozásának az onkogenezis számára kedvező irányba történő megváltoztatásával, vagy gyulladáskeltő másodlagos jelátviteli folyamatok elindításával, serkentésével.

Továbbá a DMBA által okozott károsodásokhoz még hozzájárulhatnak egyéb hatások, például környezeti – és ezen belül például táplálkozási tényezők, úgymint az antioxidáns enzimek sérülése esetén aktiválódó myricetin pro-oxidáns szerepe, vagy a TFA ab ovo membránkárosító hatásának a következményei, lsd alább.

Ezen hatások összegződése jelenik meg az általunk vizsgált szervekben megfigyelt LINE-1 metilációs mintázatokban.

4.2. A DMBA okozta oxidatív ártalmak hatása a LINE-1 metilációs mintázatra

Irodalmi adatok alapján is az oxidatív károsodások jelentősen hozzájárulhat a globális hipometilációhoz, amit a DMBA is képes kiváltani (Furlan, 2017).

A közvetlen oxidatív károsodásokat további, másodlagos szinten jelentkező és következményes oxidatív ártalmak követhetik. Például a DMBA bomlása során keletkező karbónium-ion és reaktív oxigén-gyök (*reactive oxigene species*) (ROS) is más-más károsodásokat, (mutációkat, onkogén aktivációt, stb.) okoz – viszont eredetüket tekintve oxidatív ártalmak, egyértelműen levezethető keletkezésük a DMBA anyamolekulából. Például a DNS-adduktum képződés a karbónium-ionra vezethető vissza (Budán, 2008). Sőt, a HA-RAS protoonkogén site-specifikus onkogénné aktiválódása is a DMBA hatására képződő oxidatív molekula DNS-adduktum képző hatásán keresztül történik (Budán, 2008).

Ugyanúgy az antioxidánsok (például a glutation [GSH]) depléciója, valamint antioxidáns enzimek depléciója (például az alkil-guanil-transzferáz enzim csak egy alkalommal képes redukálni egy guanozil bázishoz kötődő adduktumot) is oxidatív ártalom egyértelmű következménye.

Tehát a DMBA - ROS képzésen keresztül (Storz, 2005) - GSHT is depletál (Park LK, 2012; Reuter, 2010), és így közvetetten az S-adenozil-metionin (SAM) valamint az S-adenozil-homocisztein (SAH) szintjét is csökkenti (Park LK, 2012). Bár a SAH csökkenése serkenti a DNMT1 enzimet (Ponnaluri, 2018), viszont a SAM szubsztrát depléciója végső soron onkogén hipometilációt támogat, így tehát a malignus transzformációnak kedvez (Tibbetts, 2010; Beetch, 2019). Továbbá a GSH nem-kódoló RNS-ek (nkRNS) expressziójának a növelésével és hiszton posztranszlációs módosulás (HPTM) befolyásolásán keresztül is szabályozza a sejtproliferációt (García-Giménez, 2017). A GSH a sejteken belül a legnagyobb mennyiségű szulfhidril-csoport donor (García-Giménez, 2017). Azonban ebből kifolyólag a metionin-ciklus más résztvevőinek sérülése - például oxidatív ártalmak miatt – végső soron a GSH mennyiségét csökkenti (García-Giménez, 2017). Tehát ezen visszacsatolási mechanizmusok is alátámasztják, hogy a DMBA (és más, legalább részben oxidatív ártalmakat is kifejtő noxák szintén) L1-RTP DNS hipometilációt okozhatnak, továbbá feltételezi, hogy az antioxidánsok - a GSH-t védve – ezen szempontból is kemopreventívek (Beetch, 2019).

Az oxidatív ártalom a másodlagos jelátviteli utak aktiválásával pozitív visszacsatolást is kaphat. Például a DMBA kezelt egerekben ROS szabadul fel, amik az interleukin 1 β (IL1 β), interleukin 6 (IL6) és a tumor nekrozis faktor (TNF) mennyiségét is növelik és ezek a nukleáris faktor kappa B-val (NF- κ B) kölcsönösen aktiválják egymást – sőt még további ROS-t is képeznek (Brasier, 2010; De Souza, 2009). Ennek jelentősége, hogy a ROS a helyi gyulladáshoz vezető jelátvitel elindítása mellett közvetetten a malignus transzformáció valószínűségét is növeli (De Souza, 2009) és ez végső soron globális DNS hipometilációhoz vezet (aminek a biomarkere a LINE-1 metilációs mintázat.)

A vizsgált szervek LINE-1 hipometilációja feltehetően ezen hatások összegződésének az eredményeiből adódnak (Ardeljan, 2017; Gyöngyi, 2002) (1-6. ábra).

4.3. DMBA, másodlagos jelátvitel és a LINE-1 metiláció

Tehát a fent említett DMBA expozícióhoz köthető ártalmak másodlagos jelátviteli utakat is aktiválnak, például az említett NF- κ B mellett a mitogén aktivált protein kináz (*mitogen-activated protein kinase*) (MAPK) és a Janus kináz (*Janus kinase*) (JAK) jelátvivőket is (Brasier, 2010). Ezek aktiválják a gyulladáskeltő és közvetetten az onkogenezisnek kedvező említett interleukineket, illetve pozitív visszacsatolási

hurokban a NF- κ B-t – ami így direkt proinflammatorikus hatást is nyer (Bryk, 2011; Hendrayani, 2016; Kyriakis, 2001). Ennek további jelentősége az, hogy a NF- κ B aktiválódás a gyulladáshoz vezető jelátviteli utak mellett még összefüggésbe hozható malignus transzformációs folyamatokkal is, szintén másodlagos jelátviteli utakon keresztül (Pikarsky, 2004).

A DMBA által a RAS proto-onkogén családban onkogénné aktivált mutációjához vezetve a korai karcinogenezis lépéseit elindítja (Furlan, 2017). Az aktivált K-RAS protein pedig több kolorektális karcinóma sejt vonalban is képes a tumorszuppresszor gének (például az *INK4-ARF*) transzkripció faktorait hipermetilálni, (Struhl, 2014) és ezáltal epigenetikus módon lecsendesíteni ezen tumorszuppresszor gének expresszióit. Az aktivált K-RAS szintén gátolja a ZNF304 transzkripció faktor lebontását, amely a tumorszuppresszor β 1 integrin transzkripció szabályozója (Aslan, 2015). Ugyanakkor az aktivált és/vagy amplifikált RAS géncsalád tagjai végső soron változatos mértékben és az adott sejttípusoknak megfelelően befolyásolják a DNS metilációs-mintázatát (Tew, 2020). Tehát ezen másodlagos jelátviteli mechanizmusok is főleg a karcinogenezist támogatják.

A DMBA szignifikáns L1-RTP DNS hipometilációt okozott a kontroll csoportban mért metilációs mintázathoz képest, ami, legalábbis részben, feltehetően a DNMT enzim gátlásán keresztül érvényesülhetett (Watson, 2003). Továbbá a DMBA szintén a DNMT enzimek említett CpG szigeteinek a metilációs mintázatát befolyásolva onkogének (például a *HA-RAS*) hipo- és tumorszuppresszor gének (például *P53*) hipermetilációját okozza (Laird, 1997). Következésképpen, ezek fokozott proliferációhoz vezetnek és így növelik a karcinogenezis esélyét.

4.4. A TFA ártalmas hatásai a LINE-1 metilációs mintázatra

Bár a TFA fogyasztás és az általa okozott ártalmak közti közvetlen összefüggések még nem teljesen feltártak, de a TFA sejtmembrán foszfolipid rétegébe történő inkorporálódása bizonyított tény (Ali Abd El-Aal, 2019). Ezenfelül (közvetetten) a TFA oxidatív károsodásokhoz is hozzájárul, illetve másodlagos szignáltranszdukciós utakon keresztül is gyulladáskeltő, daganatképző hatást fejt ki, lsd alább (Morrow, 1992; Clandinin, 1991). Továbbá a TFA képes antioxidáns enzimeket (pl. SOD) gátolni (Oteng, 2019), és antioxidáns molekulákat (pl. GSH) depletálni (Reuter, 2010) - amik

májtoxicus folyamatokhoz járulnak hozzá – és ez is közvetetten az említett gyulladásoknak, daganatképződésnek kedvez.

4.5. A TFA sejtmembránokra kifejtett hatásai

A TFA etetése állatkísérletesen a zsírszövetben csökkentette az n-3 többszörösen telítetlen zsírsavak (*polyunsaturated fatty acid*) (PUFA) mennyiségét a sejtmembránokban és ezzel annak a rigiditását növelte (Ali Abd El-Aal, 2019). Ehhez hozzájárul, hogy a - legalább egy transz konfigurációjú konjugált kötést tartalmazó és ezért (legalább részben) lineáris alakú - TFA szintén merevíti a membránszerkezetet (Ali Abd El-Aal, 2019). Továbbá a TFA-val összefüggésben képződő F2-izoprosztánok is hozzájárulnak ezen hatáshoz (lsd alább).

A membránt alkotó foszfolipid réteg merevségének változása a membránfunkció változását is maga után vonja. A membránfluiditás csökkenése pozitív asszociációt mutat a ROS aktivitás növekedésével a membrán foszfolipid kettősrétegén belül (Colomer, 2007) illetve gyulladás kialakulásának és a malignus transzformáció esélyével is (Morrow, 1992; Clandinin, 1991). Így közvetlenül is hozzájárul a TFA az oxidatív ártalmakhoz is, illetve a másodlagos szignáltranszdukciós mechanizmusokon keresztül hozzájárul még a gyulladásához és a daganatképződéshez (Morrow, 1992; Clandinin, 1991).

A TFA az endoplazmatikus retikulumot (ER) ért oxidatív stresszt növeli (Oteng, 2019). Ezen felül a TFA az ERban is gyulladásos faktorokat aktivál, továbbá a sejtek koleszterin szintézisét is fokozza (Oteng, 2019). Ez utóbbi közvetetten a korábban említett RAS onkogéncsalád aktiválásának kedvez. Továbbá állatkísérletesen hepatocitákban és adipocitákban is a koleszterin szintézis fokozódását figyelték meg a TFA ártalommal összefüggésben (Oteng, 2019), bár Wistar patkányokban a koleszterinszint csökkenéséről is számolt be más irodalom (Huang, 2009). Ez nyilvánvalóan direkt módon is a membrán-tutajok befolyásolásán keresztül.

A membrán-tutajok (melyeket főleg koleszterin, telített zsírsavak, foszfolipidek, szfingolipidek alkotnak) merev szerkezetek, melyek valóban tutaj módjára úsznak a membrán felszínén és számos jelátviteli folyamatban kulcsfontosságúak (Ma, 2007). Ennek oka, hogy gyakran a membrántutajokhoz kötődnek az úgynevezett glikozil-foszfatidil-inozitol (GPI) horgonyzott fehérjék (melyek ténylegesen horgony módjára

kilógnak a membránszerkezetből), és ez a másodlagos jelátviteli szempontból fontos, pl. az apoptózis és a sejtosztódás szabályozásában (Ma, 2007). Jó példa az ilyen szabályozásra a RAS onkogéncsalád, melynek a különböző tagjai (HA-RAS, K-RAS, N-RAS) más-más a GPI horgonyzott fehérjékhez kapcsolódnak – és így a funkciójuk is különböző (Prior, 2001). A RAS géncsalád tagjainak szerepéről a metilációs-mintázat a kialakításában korábban értekeztünk (ld fent).

Továbbá a koleszterin-szintre kifejtett hatása mellett a TFA májtoxicus hatását is megfigyelték a CAT, SOD és GSH-peroxidáz enzimek aktivitásának gátlásán keresztül is (Oteng, 2019). Ezen hatásmechanizmusok szintén alátámasztják az általunk tapasztalt LINE-1 DNS szakasz hipometilációt a májban, illetve a lépben is, mivel a lép is lipid-szenzitív szerv (Kelley, 2006) (2, 4. ábra).

A TFA általomban a lipid-szenzitivitás jelentőségére utal még, hogy vizsgálatunkban a vesékben csak a kezeletlen kontrollcsoporthoz képest volt szignifikáns a hipometiláció, míg a DMBA-kezelt pozitív kontrollcsoporthoz képest mért LINE-1 metiláció csökkenés nem volt szignifikáns ezen szervekben. Ezt alátámasztja, hogy Huang és tsai. Wistar patkányokban egy 16 héten keresztül tartó 4,5%-os TFA tartalmú étrend fogyasztása után a májban 1,2 mg/g és a vesékben csak 0,6 mg/g TFA mennyiséget mértek (Huang, 2009). Tehát az ártalmakért felelős TFA a vesékbe kisebb mennyiségben hajlamos beépülni a májhoz képest.

4.6. TFA és az oxidatív ártalmak, másodlagos szignáltranszdukciók

Ismeretesek a TFA fogyasztással összefüggő, közvetlen és közvetett ártalmas molekuláris mechanizmusok. Például a TFA-k közé tartozó transz-linolsav (transz-9, transz-12-oktadekadiénsav) (LA) és elaidinsav (transz-9-oktadekánsav) (EA) növelik az intercelluláris adhézións molekula-1 (ICAM-1) és a vaszkuláris sejtadhézións molekula-1 (VCAM-1) mennyiségét (Bryk, 2011). Az ICAM-1 és a VCAM-1 is ROS-t generál, ami aktiválja a NF- κ B-t – ami direkt proinflammatorikus hatású (Bryk, 2011). (A korábban említett DMBA bomlása is ROS-t generál, ezek hatásai bizonyára összeadódnak (Storz, 2005).)

Ezek további jelentősége az, hogy a NF- κ B aktiválódás a gyulladáson jelátviteli utak (pl. TNF, IL1, IL6 citokineket) mellett még összefüggésbe hozható malignus transzformációs folyamatokkal is (Pikarsky, 2004), valamint csökkenti a protektív GSH

szintjét (Reuter, 2010). Továbbá ha az IL1 β nagy mennyiségben van jelen, az további gyulladásszerű növekedési faktorokat stimulál, például a TNF-et, mátrix metalloproteinázokat (MMPk), stb. (Apte, 2006). Az MMPk és a TNF is (redundáns módon) elősegítik a sejtek malignus transzformációját, valamint azok progresszióját is (Stetler-Stevenson, 2001) illetve aktiválják az NF- κ B-t (Apte, 2006; Yeh 2012; Wajant, 2009; Webster, 1999) és ezáltal pozitív visszacsatolási hurkot képeznek. Továbbá az NF- κ B aktiválása a daganatellenes miR-134 és a P53 gén expresszióját gátolja (Webster, 1999; Shuang, 2017). Ez is összevethető, azzal, hogy a DMBA kezelt egerekben is az interleukin 1 β (IL1 β), interleukin 6 (IL6) és a tumor nekrozis faktor (TNF) mennyisége megemelkedett és ez is végső soron a malignus transzformáció esélyét növelte (De Souza, 2009) illetve másodlagos jelátviteli utakon keresztül LINE-1 hipometilációhoz vezetett.

Sőt, ezen mechanizmusok a DMBA és a TFA szinergiájára utalnak a karcinogenezis szempontjából (2, 4, 6. ábra).

Bár a vesékben a hipometilezés nem volt annyira kifejezett, mint a májban és a lépben, de a vese mezangiális sejtjeitől eredő szolid fibrózus tumor, neopláziák (angiomiolipoma, leiomioma, hemangioma, limfangioma, juxtaglomeruláris sejt daganat, renomeduláris intersticiális sejt daganat, lipoma és schwannoma) és rosszindulatú daganatok (leiomioszarkoma, rhabdomioszarkoma, angioszarkoma, oszteoszarkoma, synoviális szarkoma, fibroszarkoma, malignus fibrozus hisztocitoma) esetén is (Katabathina, 2010) a TFA-ártalom sorsdöntő lehet a TGF- β termelés fokozásán keresztül – mivel a TGF- β ilyenkor immunszuppresszor, és az érképződést, valamint áttét kialakulását is elősegítő hatású is lehet (Massagué, 2000), (6. ábra).

4.7. Az F2-izoprosztánok hatása

A foszfolipázok szabadgyök-katalizálta módon F2-izoprosztánokat képeznek főleg az arachidonsavból, de más PUFA-ból is. Az oxidatív stressz képes az F2-izoprosztánok koncentrációját akár a százszorosára növelni (Morrow, 1992). Azonban az F2-izoprosztánok nemcsak az oxidatív stressz által okozott lipidperoxidáció biomarkerei, hanem biológiai hatásokért is felelősek.

Az F2-izoprosztánok membránfluiditás és integritás torzító hatásúak (akárcsak a TFA) és megjelenhetnek a vérkeringésben is (Morrow, 1992). Tehát a TFA okozta oxidatív

károsodás a sejt- és mitokondriális membránokon kiegészül még az F2-izoprosztánok hatásával. Sőt, az F2-izoprosztánok további hatásokat is kifejtenek, például a májban található csillagsejtek proliferációját fokozzák, illetve a májzsírosodásban szerepet játszó kollagén termelést is serkentik (Comporti, 2007).

Ezen hatásokat megerősítik a májban tapasztalt eredményeink, ahol is a TFA fogyasztás és a DMBA injekció hatására szignifikáns LINE-1 hipometiláció történt még az önmagában adott DMBA hatásához képest is (4. ábra).

A DMBA expozíció nőstény Spargue Dawley patkányokban a kezeletlen kontrollhoz képest szignifikánsan emelte a vércukor-szintet (Padlianah, 2019). Az F2-izoprosztánok az oxidáns-szenzitív hem oxigenáz és az előrehaladott glikációs termékek (*Advanced glycation end product*) (AGE) és ezek receptorainak is életkor függő vesekárosodást jelző biomarkereként korrelál – a megemelkedett vércukor-szint vesekárosító hatását tükrözve. Ugyanakkor az F2-izoprosztánok *in vitro* a vese mezangiális sejtjeihez adva (magas glükózsint mellett, amihez a DMBA hozzájárul, lsd fent) a proteinkináz-C (PKC) aktiválásával növelték a transzformáló növekedési faktor béta (transforming growth factor-beta) (*TGF-β*) génexpresszióját (Badr, 2005). Ennek jelentősége, hogy a *TGF-β* kétélű kard módjára tumorszuppresszor, gyulladáscsökkentő jelátvitelt aktivál, de receptorának malignus transzformációja során bekövetkező funkcióvesztése esetén indirekt úton immunszuppresszor, valamint érképződést és metasztázis képződést elősegítő – és így fokozza a malignitást (Massagué, 2000).

Ezen adatokkal tehát molekuláris epidemiológiai szinten is összefügg az általunk tapasztalt LINE-1 metilációs mintázat szignifikáns hipometilációja a májban és a lépben, valamint a nem szignifikáns hipometiláció is a vesékben – a pozitív DMBA kontrollhoz képest (2, 4, 6. ábra).

4.8. A polifenolok hatásai a DMBA indukálta LINE-1 hipometilációra

A rezveratrol (Diaz-Gerevini, 2016), az EGCG (Ramadass, 2003) és a myricetin (Santes-Palacios, 2020) képes enyhíteni a fent említett káros hatásokat azáltal, hogy gátolja a DMBA prokarcinogén formáját aktív karcinogénné aktiváló CYP1A1 enzimet (míg a DMBA indukálja a CYP1A1-et) (Budán 2009). Ezt megerősítették eredményeink, ahol minden vizsgált polifenol tartalmú anyag jelentősen gátolta a hipometilációt; továbbá a flavonoidokat fogyasztó csoportban hipermetilációt figyeltek

meg a kezeletlen kontrollokhöz képest is és más kemopreventív anyagokkal összehasonlítva is (1, 3, 5. ábra). Ezt az magyarázza, hogy a flavonoidokat fogyasztó csoport a hozzáadott rezveratrol mellett a közönséges szőlő (*V. Vinifera* 'Cabernet Sauvignon'), a 'tövis nélküli' szeder (*R. fruticosus* „Thornfree”) és a fekete ribiszke (*R. nigrum*) (1, 2. táblázat) leforrázott magját és héját is fogyasztotta. Ezek a növényi kivonatok gazdagok 4-hidroxi-benzoésavban, 4-hidroxi-fahéjsavban, flavanolban, flavonolban, antocianidinben és stilbén-polifenolokban, amelyek antioxidánsok, gyulladáscsökkentők (pl. gátolják a TNF- α -t, IL-1 β -t, IL-6-ot), daganatellenesek (pl. szabályozzák a sejtek proliferációját) (Burin, 2014; Serrano, 2018; Zia-Ul-Haq, 2014). Mindazonáltal az említett kemopreventív hatások szinergizálnak.

4.9. A polifenolok antioxidáns hatása és a DMBA indukálta LINE-1 hipometiláció

A szakirodalom szerint a rezveratrol megakadályozza mind az oxidatív, mind pedig a gyulladáscsökkentő károsodások által kiváltott *DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b* és *SIRT2* expresszió csökkenést és ezáltal kivédte az említett ártalmak által okozott LINE-1 hipometilációt (Maugeri, 2018). A kávé klorogénsav és hidroxifahéjsav (4-hidroxifahéjsav) tartalma (Capek, 2014), a GTC (Valcic, 1999), a flavonoidok, valamint a rezveratrol (Ross, 2002) szabadgyök-fogó hatásúak, amelyek csökkentik a ROS által okozott károsodást. Ezen túlmenően ezek az anyagok az antioxidáns SOD és a GST enzimeket is indukálják (Gerszon, 2014; Liang, 2015; Pastore, 2006), támogatva a saját vizsgálatunkban tanulmányozott anyagok DMBA által kiváltott hipometilációt gátló eredményeit (1, 3, 5. ábra). Ezt támasztja alá az az irodalmi adat is, hogy a „GSH-t helyettesítő” antioxidánsok, például az alfa-tokoferol-acetát, az N-acetil-cisztein, a metionin, a SAM és a folsav-metilcsoport-donorok szintén megfordították a LINE-1 hipometilációt (Kloypan, 2015). Az oxidatív stressz a SOD enzimesalád és a GSTM5 promóterek ismétlődő LINE-1 elemeinek hipermetilációját indukálja (Narváez, 2017; Wang SC, 2016), de ezeket az kedvezőtlen pozitív visszacsatolási mechanizmusokat a modellünkben vizsgált polifenolok gátolják.

4.10. A polifenolok epigenetikus hatásai a DMBA indukálta LINE-1 hipometilációra

A DNS-metiláció és a hiszton-metiláció is olyan epigenetikus tényező, ami a daganatbiológiában központi szerepet tölt be és daganatellenes irányba befolyásolható a polifenolok (pl. rezveratrol és katechinek) által (Beetch, 2019; Busch, 2015). A DNS

metilációs mintázat szempontjából jelentős szerep juthat a miRNSeknek is, mivel például a miR-29 számos daganattípusban gátolja a DNMT3a és DNMT3b enzimet (Wang L, 2018). Ez a felgyorsult sejtciklusnak kedvez, azonban ezt - a kísérletes eredményeinknek megfelelően - a GTC kivédi, mivel a miR-29 expresszióját a GTC képes csökkenteni (Zhu, 2019). Így a DMBA indukálta LINE-1 hipometilációt a jelen tanulmányunkban vizsgált polifenolok epigenetikus szabályozásokon keresztül is gátolták.

4.11. A polifenolok hatásai a DMBA indukálta LINE-1 hipometilációra másodlagos jelátviteli utakon keresztül

A vizsgált polifenolok a metilációs mintázatot másodlagos jelátviteli utakon keresztül is befolyásolják, például a rezveratrol növeli a foszfatáz- és tenzin homológ gén (*PTEN*) expresszióját, ami a DNMT1 gátlásához vezet (Beetch, 2019). A DNMT1 vesz részt a tumorszuppresszor gének CpG régióinak a hipermetilálásában, tehát ezen enzim gátlása daganatellenes hatáshoz vezet. Az EGCG is a DNMT1 enzim inhibitora (Aydin, 2020).

Emellett emlődaganat sejtvonalban a *MAML2* onkogén promótere demetilálódik, ami a *MAML2* aktivációjához vezet, amely aktiválja a NOTCH onkogén szignáltranszdukciós útvonalat (Lubecka, 2016). A rezveratrol azonban *in vitro* a DNMT3B enzim révén képes a *MAML2* újrametilezésére (Lubecka, 2016), ez pedig blokkolja a NOTCH kaskádöt, mert a *MAML2* a NOTCH ko-aktivátora (Lubecka, 2016). Másrészt a LINE-1 metilációs-mintázat szabályozó szerepére és patológiai jelentőségére is utal, hogy LINE-1 hipometilált, ciklin-függő kináz-6 (CDK6) amplifikált nyelőscső laphámsejtes karcinóma (ESCC) betegekben a *P21* expressziója (még számos más tumorszuppresszor gén mellett) csökkent (Baba, 2014). Ez összefüggésbe hozható az EGCG tumorellenes hatásával is, mert az EGCG a *P21* promóter régiójának hipometilációjával növeli a *P21* tumor szuppresszor gén expresszióját *in vivo*, függetlenül a P53 tumor szuppresszor által kiváltott jelátviteli útvonaltól (Beetch, 2019; Dickinson, 2014) - és a *P21* gátolja a DNMT1-et (Beetch, 2019).

4.12. A myricetin lehetséges pro-oxidáns hatása

A japán viaszbogytó fogyasztó csoportban a bevitt myricetin szintén indukálja a SOD-ot és a GST-t (Ross, 2002; Fiander, 2000), viszont a DMBA a kataláz (CAT) és a SOD enzimet is károsítja (Stevens, 1968; Ma, 2017), melyek csökkent működése vagy hiánya

esetén a myricetin pro-oxidánsként viselkedik (Laughton, 1989). A myricetin bizonyára ezzel összhangban nem volt képes a DMBA indukálta LINE-1 hipometilációt kivédeni a vesékben, ahol az erőteljesen működő metabolikus CYP-1 enzimek olyan mértékben aktiválhatták a DMBA-t, hogy a myricetin pro-oxidáns hatást fejthetett ki (5. ábra).

Bár a májban is magas a CYP-1 enzimek aktivitása (Sweeney, 2006), de ebben a szervben a GSH szintje is magasabb (Kretschmar, 1996). Ez lehet a magyarázata annak, hogy – bár erős hipermetilációt nem okozott –, de a myricetin LINE-1 hipometilációt ellensúlyozó hatása a májban erősebb volt, mint a vesében (3. ábra).

4.13. Az EVOO polifenoljainak és fenolos vegyületének a hatásai

Az oleocanthal fenolos vegyület és az oleuropein polifenol az olíva olaj vízdoldékony anyagai közt szerepel. Ezen vegyületek jól felszívódnak a vékonybélből, valamint eléri a lépét és a májat is (Bermúdez, 2004). Az említett anyagok a vizsgált szervekben a szabadgyökök ellen védő, oxidatív stresszt gátló hatást fejtenek ki (Nakabi, 2010; Seiquer, 2015) és főleg sejtmembránt védő tulajdonságúak (Ferreri, 2017).

Az oleuropein szintén a másodlagos jelátviteli utakon keresztül is védő hatást fejt ki, nevezetesen képes az NF- κ B aktivációját gátolni (Hornedo-Ortega, 2018; Park J, 2017). Továbbá az EVOO komponensei DMBA expozíciós kisállat modellben az állatok májában és a lépében is szignifikánsan csökkentették az *mTOR* génexpresszióját (Molnar, 2021) és más irodalmi adatok is alátámasztják, hogy az oleocanthal potens mTOR gátló hatású (Khanfar, 2015), illetve az IL-6, IL-1 β és a TNF- α szintézisét is gátolja (Scotece, 2012).

Közvetetten mind az NF- κ B, mind a mTOR gyulladássos és daganatképződéses aktiváló tényezőként ismert, lsd feljebb. Az mTOR gátlása azért fontos kemopreventív hatás, mert az NF- κ B a PTEN-t is gátolja (Verzella, 2020) és ezen keresztül is aktiválja az mTOR-t, így pozitív visszacsatolási hurkot képez. Továbbá maga a foszfatidil-inozitol 3-kináz (PI3-K)/AKT/mTOR jelátviteli út is kapcsolatba hozható az NF- κ B-vel és ezen jelátviteli út (akár más okból történő) aktivációja is számos onkogén folyamatot indukál, ami a daganatsejtek növekedéséhez, túléléséhez és proliferációjához járul hozzá (Laplante, 2012; Battelli, 2011).

Ezen felül az oleocanthal - a szabadgyökök által egyébként csökkentett - GSH intracelluláris szintjét növeli (Giusti, 2018; Kouka, 2019; Lopez-Miranda, 2008), ami

fent említett utakon keresztül összefüggésbe hozható a DMBA által okozott LINE-1 hipometiláció kivédésével vagy csökkentésével.

4.14. Egyéb anyagok hatása a LINE-1 metilációs mintázatra

4.14.1. A kávé potenciálisan ártalmatlan anyagainak a hatása

A kávéban nyomokban előforduló akril-amid és furán tartalma által okozott GSH csökkenés (és egyéb karcinogén hatások) elenyészőnek bizonyultak a LINE-1 metilációs mintázat eredményeinek szempontjából, mivel valószínűsíthetően az erőteljes jótékony hatások elfedték ezeket (1, 3, 5. ábra) (Xu, 2019).

A koffein hatása

A koffein (1,3,7-trimetilpurin-2,6-dion) mind a kávé, mind a zöldtea kivonatban jelen van. A koffein a koleszterin-szint csökkentő atorvasztatinnal együtt adva humán prosztata sejtvonalban csökkentette az AKT, *extracellular-regulated kinase 1* (ERK1), ERK2, Survivin és az anti-apoptotikus BCL-2 fehérjék mennyiségét (Wang Z, 2020). Valóban, Miwa és tsai. megállapították, hogy a koffein humán oszteoszarkóma MG63 sejtekben és fibroszarkóma HT1080 sejtekben is az intracelluláris cAMP szint növelésével a *PTEN* gént aktiválta (Miwa, 2011). Ez a PI3-K/AKT/mTOR jelátviteli út gátlásához vezetett, ami proapoptotikus hatású (Miwa, 2011).

Emellett JB6 sejtekben a koffein BAX és kaszpáz-3 jelátviteli utak aktiválásával P53 dependens apoptózist is indukál (He, 2003). Továbbá a koffein mellodaganat-eredetű miofibroblasztokban növeli a *P16*, *P21* és *P53* tumorszuppresszorok génexpresszióját és represszálja a SDF1, IL-6 és TGF- β 1 prokarcinogén citokineket (és gèneik expresszióját is) (Hendrayani, 2016; Al-Ansari, 2014). Ezekből is következik, (ahogy korábban említettük), hogy a koffein az mTOR-t is gátolja (Laplante, 2012; Battelli, 2011), ami végső soron a koffein daganatellenes hatására utal.

Ezzel szemben Mateo-Fernández és tsai. kísérletében HL-60 sejtes daganatmodellben a koffein LINE-1 hipometilációt okozott (a DNMT3 gátlásán keresztül) a kezeletlen kontrollhoz képest (Mateo-Fernández, 2011). Ez bizonyára eltérő mechanizmussal történhet, mint a korábban említett rezveratrol (Maugeri, 2018) és EGCG (Aydin, 2020) DNMT1-et gátló antikarcinogén hatása.

Így a koffein kemopreventív hatása éppen a LINE-1 hipometilációt okozó hatása miatt kérdéses, viszont minden más molekuláris biológiai jelátviteli út az antikarcinogén hatás mellett szól. Valóban, Hashibe és mtsai. egy nagy mintaelemszámú epidemiológiai vizsgálatban nem találtak összefüggést a koffein bevitel dózisa és a vizsgálat daganatok (prosztata-, tüdő-, kolorektális- és petefészekrák) rizikója közt (Hashibe, 2015).

4.14.2. Az olivajlipidjeinek a hatásai a LINE-1 metilációs mintázatra

Az omega-9-olajsav (egy fontos MUFA) az EVOO-ban 55-83 %-ban van jelen, a linolsav, ami egy többszörösen (kétszeresen) telítetlen omega-6 zsírsav (*polyunsaturated fatty acid*) (PUFA) 3,5-21 %-ban, a telített palmitinsav 7,5-20%-ban és a sztearinsav 0,5-5%-ban, míg a háromszorosan telítetlen omega-3 α -linolénsav 0-1,5%-ban (Beltrán, 2004).

Korábban említettük a membránfluiditás jelentőségét: a fluiditás csökkenése növeli a ROS aktivitást (Colomer, 2007), továbbá gyulladáskeltő és karcinogenezisnek kedvező (Morrow, 1992; Clandinin, 1991). Ennek fényében a MUFA és a PUFA sejtmembrán fluiditást növelő hatásának a jótékonyága nyilvánvaló és fent említett másodlagos jelátviteli utakon keresztül LINE-1 metilációt fokozó hatása valószínűsíthető, továbbá a telített zsírsavak LINE-1 hipometiláló hatása is várható.

A fentiek értelmében a palmitinsav a sejtmembrán rigiditását növeli. Ennek ellenére humán izomsejtekben a proxiszóma proliferátor-aktiválta receptor (*peroxisome proliferator-activated receptor- γ*) (PPAR γ)-koaktivátor gén indukcióján keresztül globális hipermetilációt okozott – ami kemopreventív hatásra utal (Silva-Martínez, 2016).

Ugyanakkor az olajsav is (akárcsak a palmitinsav) képes nem alkoholos steatohepatitist (NASH) kiváltani, melyek közt a májfibrózis és a májrák is szerepel – és ennek gátlásában a proxiszóma proliferátor-aktiválta receptor (*peroxisome proliferator-activated receptor- α*) (PPAR α) fontos, továbbá a sejtmembrán összetétele és a DNS metilációs mintázata is jelentős hatást fejt ki (Hong, 2019; Silva-Martínez, 2016). Valóban hepatocelluláris karcinómákban megfigyelték, hogy a környező egészséges sejtektől számos gén metilációs mintázata szignifikánsan eltért, például az *APC* és a *RASSF1* hipermetilálalt és *MEST* gént hipometilált (Lambert, 2015). Az APC és a RASSF1 is sejtproliferációt lassít – az előbbi a β -katenint gátolja, míg az utóbbi a ciklin

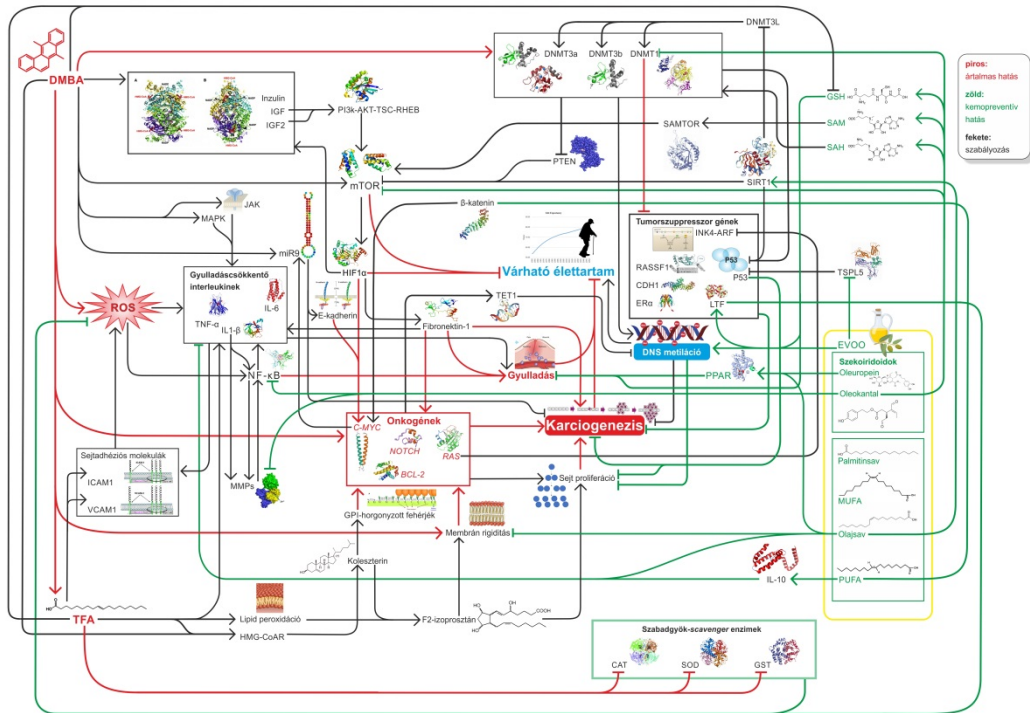
D1 gátlásával *cell cycle arrest* mechanizmust vált ki – míg a MEST foszforilálja és ez által aktiválja a CREB transzkripciós faktort, ami a *C-FOS* protoonkogén expresszióját fokozza (Sheng, 1990).

A MUFA és a PUFA által aktivált, másodlagos jelátviteli utak kemopreventív hatást testesítenek meg. Az omega-9-olajsav szepszises egerekben csökkentette a TNF- α és az IL-1 β gyulladást okozó interleukinek expresszióját és növelte a gyulladásgátló IL-10 mennyiségét (Medeiros-de-Moraes, 2018). Továbbá az omega-9-olajsav a PPAR-okat is képes serkenteni (Bento-Abreu, 2007). Ez utóbbiak (bár pleiotróp módon viselkednek) de főleg antioxidáns választ aktivál, gyulladáscsökkentő és neuroprotektív hatású (Medeiros-de-Moraes, 2018; Fidaleo, 2014). Az omega-9-olajsav *in vivo* hím KKAy II-es típusú cukorbeteg egér modellben is kivédte a TNF által okozott inzulin-szint csökkenést a PPAR γ transzkripciós faktor sejtmagba történő transzlokációjának az elősegítésével (Vassiliou, 2009).

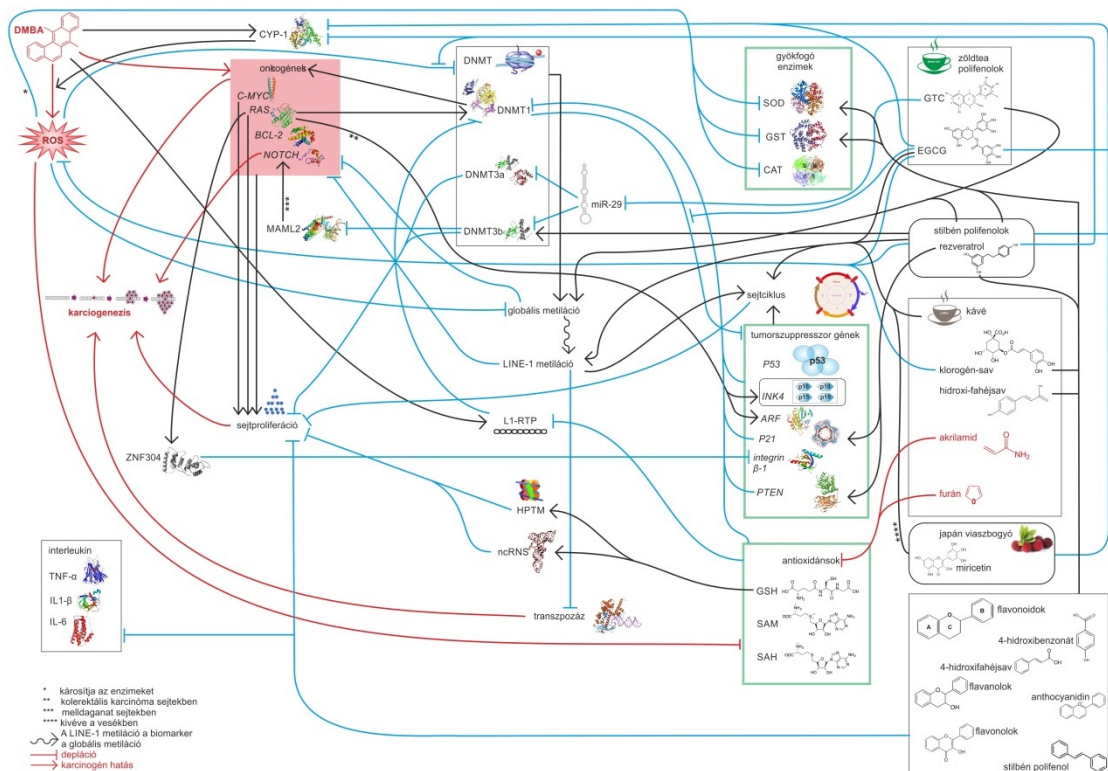
A *C-MYC* egy DMBA által indukált onkogén és a PUFA direkt β -katenin gátló hatásán keresztül ezen gén expresszióját szignifikánsan csökkentette (Notarnicola, 2017). Ennek jelentősége a DNS metilációs mintázatára nézve nagy, mivel a *C-MYC* a *ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase (TET)* gének expresszióját is befolyásolja (a TET1 tumor proliferációt fokoz és a *C-MYC* ezt indukálja) valamint a TET enzimek ismertek a DNS-demetiláló hatásokról (Poole, 2019).

A kísérleti állatok májában és a lépében is az EVOO szignifikánsan növelte a LINE-1 metilációt a DMBA indukálta hipometilációhoz képest, míg a vesékben nem. Ez az olíva olaj paradox oxidatív stressz indukáló hatásával függhet össze, ugyanis az oxidatív stressz hiányában (pl. a vesékben) az ettől függő *P53* gén expressziója sem nő meg (Kouka, 2020) és a *P53* LINE-1 metilációt serkent (Tiwari, 2018). Valóban már korábban a *P53* szerepe a DNS metilációban bizonyítást nyert (Nasr, 2003). (2, 4, 6. ábra). Ezen adatok alapján kijelenthető, hogy a disszertációmban nem említett hatások mellett is egyidejűleg számos említett hatás befolyásolja a LINE-1 metilációt.

Az általunk vizsgálat anyagok malignus transzformációval kapcsolatos legfontosabb összefüggéseit, amelyek fentebb a diszkusszióban tárgyalásra kerültek, két saját készítésű összefoglaló ábra mutatja be. A vízdoldékony vegyületekre vonatkozó hatásmechanizmusok a 7. ábrán, a lipidoldékony komponensek molekuláris szintű hatásai pedig a 8. ábrán láthatók.



7. Ábra: A DMBA, TFA vagy EVOO expozíció következtében érintett molekuláris mechanizmusok és jelátviteli folyamatok összefoglalása (az ábra nagyobb méretben megtalálható a függelékben).



8. Ábra: A DMBA, flavonoid kivonat, zöld tea kivonat, kávé kivonat vagy japán viaszbogyó kivonat expozíció következtében érintett molekuláris mechanizmusok és jelátviteli folyamatok összefoglalása (az ábra nagyobb méretben megtalálható a függelékben).

5. ÖSSZEFOGLALÁS, ÚJ EREDMÉNYEK

5.1. A DMBA és a TFA hatása a LINE-1 metilációs mintázatra

Eredményeink arra utalnak, hogy a DMBA indukálta LINE-1 hipometiláció jól reprezentálta a pro-oxidáns környezeti hatást, illetve a mellette etetett pedig TFA további ártalmas hatásokat is. Ez utóbbi membránrigiditást növelő, anti-oxidáns depletáló és antioxidáns enzimeket károsító, valamint másodlagos jelátviteli hatásai is megnyilvánulnak az eredmények mögött.

A májban és a lépben mért LINE-1 hipometiláció alapján megállapíthatjuk, hogy a DMBA ártalom és a TFA bevitel pozitív összefüggést mutat a karcinogenezis esélyével és hogy ezen tényezők hatása összeadódik.

A TFA a vesékhez képest a májban történő erőteljesebb LINE-1 hipometiláló hatása a TFA koleszterin-szint befolyásoló hatása helyett annak a SOD, CAT és GSH-peroxidáz enzim gátló hatásának a jelentőségére mutat rá. Eredményeinkkel megerősítettük, hogy a mind a DMBA expozíció, mind a TFA fogyasztása összefüggésbe hozható a ROS generálásával is valamint a SAM, SAH és antioxidáns GSH deplációjában betöltött szerepével is – amik összeadódva LINE-1 DNS hipometilációt okoztak (Klopan, 2015) (6. ábra).

Fontos megemlíteni, hogy számos irodalmi adat alátámasztja, hogy a DMBA mellett a TFA expozíció is a másodlagos jelátviteli utak befolyásolásával (gyulladásokkeltő NF- κ B, TNF, IL1, IL6, mTOR, MMPk, stb. aktiválása) és tumorszuppresszor gének (pl. *P53*) gátlásával is - gyulladásos és karcinogenezisben szerepet játszó hatások kifejtésén keresztül ártalmas (Laplante, 2012; Battelli, 2011; De Souza, 2009; Pikarsky, 2004; Reuter, 2010; Apte, 2006; Stetler-Stevenson, 2001; Yeh 2012; Wajant, 2009; Webster, 1999; Shuang, 2017; Bryk, 2011; Storz, 2005; Oteng, 2019; Brasier, 2010; Hendrayani, 2016; Kyriakis, 2001; Furlan, 2017; Struhl, 2014; Aslan, 2015; Tew, 2020) és ez kísérleteink alapján is - LINE-1 DNS hipometilációt okozott (Szabó, 2021; Szabó, 2022).

A vesékbe kevesebb TFA jut el és kisebb is volt a LINE-1 hipometiláló hatása, de a mezangiális sejteitől eredő szolid fibrózus daganatok esetén (Katabathina, 2010) a TFA-ártalom sorsdöntő lehet a TGF- β termelés fokozásán keresztül, ami

immunszuppresszor, érzékszódést, valamint áttét kialakulását is elősegítő hatású (Massagué, 2000).

A LINE-1 hipometiláció tehát, a funkcionális megnyilvánulásain felül biomarkerként is jelezte mind a DMBA, mind a TFA ártalmas hatásait.

5.2. A polifenol-kivonatok, kávé és EVOO hatása a DMBA indukálta LINE-1 metilációs mintázatra

A védő hatású polifenol-kivonatok, kávé és az extraszűz olíva olajat fogyasztó csoportban is az antioxidáns és másodlagos jelátviteli utak is hozzájárulhattak a DMBA indukálta LINE-1 hipometiláció kivédéséhez - majdnem az összes vizsgált csoport majdnem összes szervében (Szabó, 2021; Szabó, 2022). Ehhez az EVOO-t fogyasztó csoportban a membránfluiditást növelő hatás is hozzáadódott. Sőt a hozzáadott rezveratrolt is tartalmazó flavonoid kivonat még a DMBA kezeletlen kontrollcsoportéhoz képest is LINE-1 hipermetilációt okozott, az antioxidáns és a másodlagos jelátviteli utakra kifejtett hatásai okán (Szabó, 2021). Központi szerep jutott a GSH és más antioxidánsok támogatásának és a NF- κ B, TNF, IL1, IL6, mTOR, gyulladáskeltők gátlásának, illetve a tumorszuppresszor *P53* gén expresszáálásának. Ugyanakkor a japán viaszbogytó fogyasztó csoport veséiben megfigyelt eredmények alapján a LINE-1 biomarker tesztrendszer visszaigazolta a myricetin fokozott DMBA expozícióval összefüggő, potenciális prooxidáns hatását (Sweeney, 2006). Tehát tesztrendszerünk képes kimutatni az említett ártalmas és a kemopreventív hatások összegződését.

A kávéfogyasztás a LINE-1 metiláció szempontjából kemopreventív hatású. Például a májrák kialakulási esélyét csökkentő hatását irodalmi adatoknak is alátámasztják, (Wang A, 2016), viszont irodalmi adatok alapján megállapíthatjuk, hogy a koffein kemopreventív másodlagos jelátviteli utakat ugyan támogat, de a LINE-1 metilációban a szerepe pleiotróp (Chuang, 2017). Így a jelen vizsálatunk eredményei a koffein tartalmú anyagokat fogyasztó (kávé és zöldtea kivonatot fogyasztó) csoportokban a LINE-1 metiláció szignifikáns növekedése a DMBA kezelt kontroll csoportéhoz képest a többi anyag (kávé esetén klorogénsav és hidroxifahéjsav, zöldtea esetén GTC) hatásának volt betudható és nem a koffeinnek.

Az EVOO-t fogyasztó csoportban a membránok rigidségét okozó koleszterin mennyiségének a csökkenése is - és a MUFA, PUFA közvetlen membránfluiditást

növelő hatásával is - a ROS aktivitás, a gyulladás kialakulásának és a malignus transzformáció esélyének a csökkenését vonja maga után (Colomer, 2007; Morrow, 1992; Clandinin, 1991) – de a fent említett másodlagos jelátviteli utaknak is fontos szerepe van a DMBA indukálta LINE-1 hipometiláció kivédésében.

Az alapján, hogy olyan központi jelátviteli utak, mint az AKT/mTOR és olyan molekulák, mint az NF- κ B érintettek – feltételezhetjük, hogy a vizsgált modell képes kimutatni más oxidatív ártalmat is okozó környezeti karcinogének, vagy egyéb ártalmas anyagok hatásait, illetve igazolni a kemopreventív anyagok jótékony hatásait.

Irodalmi adatok alapján továbbá az oxidatív stressz által kiváltott LINE-1 DNS hipometiláció reverzibilis, így valószínűleg a vizsgált anyagok nemcsak előzetes táplálás, hanem a későbbi fogyasztás során is védőhatást fejthetnek ki (legalább részben) (Kloypan, 2015).

5.3. A vizsgálatunk alapján igazolást nyert új eredmények:

- a) A flavonoid kivonat kivédte a DMBA által indukált LINE-1 hipometilációt a nőstény CBA/Ca egerek májában***, lépében*** és veséiben**, és a kezeletlen kontrollhoz képest szignifikáns hipermetilációt okozott a májban*** és a lépben** (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).
- b) A zöldtea kivonat kivédte a DMBA által indukált LINE-1 hipometilációt a nőstény CBA/Ca egerek májában***, lépében*** és veséiben*, és a kezeletlen kontrollhoz képest szignifikáns hipermetilációt okozott a májban* valamint a lépben** (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).
- c) A japán viaszbugyó kivonat kivédte a DMBA által indukált LINE-1 hipometilációt a nőstény CBA/Ca egerek májában*** és lépében***, és a kezeletlen kontrollhoz képest szignifikáns hipermetilációt okozott a lépben* (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).
- d) A kávé kivonat kivédte a DMBA által indukált LINE-1 hipometilációt a nőstény CBA/Ca egerek májában*, lépében* és veséiben***, és a kezeletlen kontrollhoz képest szignifikáns hipermetilációt okozott a vesékben** (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

- e) Az extra szűz olívaolaj kivédte a DMBA által indukált LINE-1 hipometilációt a nőstény CBA/Ca egerek májában** és lépében* (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).
- f) A transz-zsírsavak tovább erősítették a DMBA által indukált LINE-1 hipometilációt a nőstény CBA/Ca egerek májában** és lépében* (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Összegezve: Az eddig ismert és alaposan vizsgált hatásmechanizmusokon túl, az általunk talált DNS metilációs változások hozzájárulhatnak a vizsgált anyagok antikarcinogén, illetve a transz-zsírsavak esetében karcinogén hatásához.

Továbbá a LINE-1 DNS hipometilációs mintázati tesztrendszer megfelelő molekuláris epidemiológiai biomarkernek tekinthetjük további potenciálisan kemopreventív anyagok epigenetikai hatásának vizsgálatához.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ennek a disszertációnak a létrejöttében meghatározó szerepe van a néhai Prof. Dr. Ember Istvánnal 2002-től kialakult barátságunknak. Számos vizsgálatba és publikációba vont be. Mindig izgalmas epidemiológiai, epigenetikai kérdésekre irányította a figyelmemet. Munkássága és elhivatottsága maradandó nyomot hagyott bennem, folyton ösztönzött, hogy kezdjem el a PhD munkát, hiszen több közös publikációnak voltam részese. Távozásával az elhatározásom megszilárdult.

A szerző itt fejezi ki köszönetét első sorban Prof. Dr. Kiss István intézetvezető úrnak, mint témavezetőnek minden tekintetben.

Köszönettel tartozom továbbá Dr. Varjas Tímeának, a kísérletek kivitelezésében nyújtott segítségért, Dr. Budán Ferenc Csabának a disszertáció írásával kapcsolatos hasznos tanácsaiért és az Orvosi Népegészségtani Intézet dolgozóinak az egyéb segítségeiért.

Mindemellett hálás vagyok doktorandusz társaimnak, Tomesz Andrásnak és Molnár Richárdnak figyelmükért és minden praktikus ötletükért!

Amikor minden figyelmemet és energiámat erre a munkára fordítottam tartósan, akkor a feleségem hiányzott nekem a legjobban az elmélyült munkát követően. Örömmel írom, befejeztem ezt a munkát. Köszönöm, hogy büszkén támogattál!

IRODALOMJEGYZÉK

Al-Ansari MM, Aboussekhra A. Caffeine mediates sustained inactivation of breast cancer-associated myofibroblasts via up-regulation of tumor suppressor genes. *PLoS One*. 2014 Mar 3;9(3):e90907.

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.

Ahmed S, Wang N, Lalonde M, Goldberg VM, Haqqi TM. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) differentially inhibits interleukin-1 beta-induced expression of matrix metalloproteinase-1 and -13 in human chondrocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004 Feb;308(2):767-73.

Ali Abd El-Aal Y, Mohamed Abdel-Fattah D, El-Dawy Ahmed K. Some biochemical studies on trans fatty acid-containing diet. *Diabetes Metab Syndr*. 2019. 13(3):1753-1757.

Apte RN, Dotan S, Elkabets M, White MR, Reich E, Carmi Y, et al. The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. *Cancer Metastasis Rev*. 2006 Sep;25(3):387-408.

Ardeljan D, Taylor MS, Ting DT, Burns KH. The Human Long Interspersed Element-1 Retrotransposon: An Emerging Biomarker of Neoplasia. *Clin Chem*. 2017 Apr;63(4):816-822.

Aslan B, Monroig P, Hsu MC, Pena GA, Rodriguez-Aguayo C, Gonzalez-Villasana, et al. The ZNF304-integrin axis protects against anoikis in cancer. *Nat Commun*. 2015 Jun 17;6:7351.

Aydin C, Kalkan R. Cancer Treatment: An Epigenetic View. *Glob Med Genet*. 2020;7(1):3-7.

Baba Y, Watanabe M, Murata A, Shigaki H, Miyake K, Ishimoto T, et al. LINE-1 hypomethylation, DNA copy number alterations, and CDK6 amplification in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2014 Mar 1;20(5):1114-24.

- Badr KF, Abi-Antoun TE. Isoprostanes and the kidney. *Antioxid Redox Signal*. 2005 Jan-Feb;7(1-2):236-43.
- Basu A, Lucas EA. Mechanisms and effects of green tea on cardiovascular health. *Nutr Rev*. 2007 Aug;65(8 Pt 1):361-75.
- C Battelli, CD Cho. mTOR Inhibitors in Renal Cell Carcinoma. *Therapy*. 2011. 8(4) 359-367
- Beetch M, Stefanska B. DNA Methylation in Anti-cancer Effects of Dietary Catechols and Stilbenoids: An Overview of Underlying Mechanisms. In: Patel V., Preedy V. (eds) *Handbook of Nutrition, Diet, and Epigenetics* pp 1819-1844. 2019 Springer, Cham.
- Beltrán G, Del Rio C, Sánchez S, Martínez L. Influence of harvest date and crop yield on the fatty acid composition of virgin olive oils from cv. Picual. *J Agric Food Chem*. 2004 Jun 2;52(11):3434-40.
- Bento-Abreu A, Taberero A, Medina JM. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha is required for the neurotrophic effect of oleic acid in neurons. *J Neurochem*. 2007 Nov;103(3):871-81.
- 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.
- Bøhn SK, Blomhoff R, Paur I. Coffee and cancer risk, epidemiological evidence, and molecular mechanisms. *Mol Nutr Food Res*. 2014;58(5):915-930.
- Borzi AM, Biondi A, Basile F, Luca S, Vicari ESD, Vacante M. Olive Oil Effects on Colorectal Cancer. *Nutrients*. 2018 Dec 23;11(1):32.
- Brasier AR. The nuclear factor-kappaB-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. *Cardiovasc Res*. 2010 May 1;86(2):211-8.
- Brat P, Georgé S, Bellamy A, Du Chaffaut L, Scalbert A, Mennen L, Arnault N, Amiot MJ. Daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables. *J Nutr*. 2006 Sep;136(9):2368-73.

- 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. 68(6):394-424.
- 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- κ B activation. *J Physiol Pharmacol.* 2011. 62(2) 229-38.
- Buckland G, Gonzalez CA. The role of olive oil in disease prevention: a focus on the recent epidemiological evidence from cohort studies and dietary intervention trials. *Br J Nutr.* 2015 Apr;113 Suppl 2:S94-101.
- 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.
- Budán F, Varjas T, Varga Zs, Cseh J, Polyák É, Perjési P, Gyöngyi Z, Ember I. Környezeti metil-nitrozo-urea expozíció lehetséges molekuláris biomarkereinek vizsgálata. *MAGYAR EPIDEMIOLOGIA* 5 : 1 pp. 55-62. , 8 p. (2008)
- Burin VM, Ferreira-Lima NE, Panceri CP, Bordignon-2009iz MT. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: Evaluation of different extraction methods. *Microchemical Journal.* 2014. (114). 55-163. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2013.12.014>.
- Busch C, Burkard M, Leischner C, Lauer UM, Frank J, Venturelli S. et al. Epigenetic activities of flavonoids in the prevention and treatment of cancer. *Clin Epigenetics.* 2015 Jul 10;7(1):64.
- Capek P, Paulovičová E, Matulová M, Mislovičová D, Navarini L, Suggi-Liverani F. *Coffea arabica* instant coffee—Chemical view and immunomodulating properties. *Carbohydrate Polymers.* 2014 Mar 15;103:418-26.
- Center MM, Jemal A, Lortet-Tieulent J, Ward E, Ferlay J, Brawley O, Bray F. International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. *Eur Urol.* 2012 Jun;61(6):1079-92.

Choi KC, Jung MG, Lee YH, Yoon JC, Kwon SH, Kang HB, Kim MJ, Cha JH, Kim YJ, Jun WJ, Lee JM, Yoon HG. Epigallocatechin-3-gallate, a histone acetyltransferase inhibitor, inhibits EBV-induced B lymphocyte transformation via suppression of RelA acetylation. *Cancer Res.* 2009 Jan 15;69(2):583-92.

Chuang YH, Quach A, Absher D, Assimes T, Horvath S, Ritz B. Coffee consumption is associated with DNA methylation levels of human blood. *Eur J Hum Genet.* 2017;25(5):608-616.

Chun OK, Chung SJ, Song WO. Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults. *J Nutr.* 2007 May;137(5):1244-52.

Clandinin MT, Cheema S, Field CJ, Garg ML, Venkatraman J, Clandinin TR. Dietary fat: exogenous determination of membrane structure and cell function. *FASEB J.* 1991 Oct;5(13):2761-9.

Clouaire T, Stancheva I. Methyl-CpG binding proteins: specialized transcriptional repressors or structural components of chromatin?. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(10):1509-1522.

Colomer R, Moreno-Nogueira JM, García-Luna PP, García-Peris P, García-de-Lorenzo A, Zarazaga A, Quecedo L, del Llano J, Usán L, Casimiro C. N-3 fatty acids, cancer and cachexia: a systematic review of the literature. *Br J Nutr.* 2007 May;97(5):823-31.

Comporti M, Signorini C, Arezzini B, Vecchio D, Monaco B, Gardi C. F2-isoprostanes are not just markers of oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2008 Feb 1;44(3):247-56.

Cui Y, Morgenstern H, Greenland S, Tashkin DP, Mao JT, Cai L, et. al.. Dietary Flavonoid Intake and Lung Cancer—A Population-based Case-control Study. *Cancer.* 2008. 112(10). 2241–2248.

Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* 2011;25(10):1010-1022. doi:10.1101/gad.2037511

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.

DeSantis CE, Bray F, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Anderson BO, Jemal A. International Variation in Female Breast Cancer Incidence and Mortality Rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2015 Oct;24(10):1495-506.

Diaz-Gerevini GT, Repposi G, Dain A, Tarres MC, Das UN, Eynard AR. Beneficial action of resveratrol: How and why? *Nutrition.* 2016 Feb;32(2):174-8.

Dickinson D, Yu H, Ohno S, Thomas C, Derossi S, Ma Y, et al. Epigallocatechin-3-gallate prevents autoimmune-associated downregulation of p21 in salivary gland cells through a p53 independent pathway. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2014 Feb;13(1):15-24.

Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst.* 1981 Jun;66(6):1191-308.

Dupont C, Armant DR, Brenner CA. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Semin Reprod Med.* 2009 Sep;27(5):351-7.

Európai Bizottság: Az olívaolaj EU-beli előállításának és forgalmazásának áttekintése.– Olívaolaj az EU-ban Keresés: 2021.02.15. https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/plants-and-plant-products/plant-products/olive-oil_hu

Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol.* 2002;196(1):1-7.

Fang MZ, Wang Y, Ai N, Hou Z, Sun Y, Lu H, Welsh W, Yang CS. Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res.* 2003 Nov 15;63(22):7563-70.

Fang M, Chen D, Yang CS. Dietary polyphenols may affect DNA methylation. *J Nutr.* 2007 Jan;137(1 Suppl):223S-228S. doi: 10.1093/jn/137.1.223S.

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Dyba, T., Randi, G., Bettio, M., Gavin, A., Visser, O., & Bray, F. (2018). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *European journal of cancer* (Oxford, England : 1990), 103, 356–387. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.07.005>

Fernández del Río L, Gutiérrez-Casado E, Varela-López A, Villalba JM. Olive Oil and the Hallmarks of Aging. *Molecules*. 2016 Jan 29;21(2):163.

Ferreri C, Masi A, Sansone A, Giacometti G, Larocca AV, Menounou G, Scanferlato R, Tortorella S, Rota D, Conti M, Deplano S, LoukaM , Maranini AR, Salati A, Sunda V, Chatgialiloglu C. Fatty Acids in Membranes as Homeostatic, Metabolic and Nutritional Biomarkers: Recent Advancements in Analytics and Diagnostics. *Diagnostics (Basel)*. 2017. 7(1)1.

Fiander H, Schneider H. Dietary ortho phenols that induce glutathione Stransferase 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 Aug 11;156(2):117-24.

Fidaleo M, Fanelli F, Ceru MP, Moreno S. Neuroprotective properties of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) and its lipid ligands. *Curr Med Chem*. 2014;21(24):2803-21.

Fujiki H, Suganuma M, Okabe S, Sueoka N, Komori A, Sueoka E, Kozu T, Tada Y, Suga K, Imai K, Nakachi K. Cancer inhibition by green tea. *Mutat Res*. 1998 Jun 18;402(1-2):307-10.

Furlan D, Trapani D, Berrino E, Debernardi C, Panero M, Libera L, et al. Oxidative DNA damage induces hypomethylation in a compromised base excision repair colorectal tumourigenesis. *Br J Cancer*. 2017 Mar 14;116(6):793-801.

Galeone C, Talamini R, Levi F, Pelucchi C, Negri E, Giacosa A, Montella M, Franceschi S, La Vecchia C. Fried foods, olive oil and colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2007 Jan;18(1):36-39.

García-Giménez JL, Romá-Mateo C, Pérez-Machado G, Peiró-Chova L, Pallardó FV. Role of glutathione in the regulation of epigenetic mechanisms in disease. *Free Radic Biol Med*. 2017 Nov;112:36-48.

Gerszon J, Rodacka A, Puchała M. Antioxidant Properties of Resveratrol and its Protective Effects in Neurodegenerative Diseases. *Medical Journal of Cell Biology*, vol.4, no.2, 2014, pp.97-117. <https://doi.org/10.2478/acb-2014-0006>

Ginter E, Simko V. New data on harmful effects of trans-fatty acids. *Bratisl Lek Listy*. 2016;117(5):251-253.

Giusti L, Angeloni C, Barbalace MC, Lacerenza S, Ciregia F, Ronci M, Urbani A, Manera C, Digiacomio M, Macchia M, Mazzoni MR, Lucacchini A, Hrelia S. A Proteomic Approach to Uncover Neuroprotective Mechanisms of Oleocanthal against Oxidative Stress. *Int J Mol Sci*. 2018. 19(8): 2329.

Ghazani SM, Marangoni AG. Nutrition and food grains. *Encyclopedia of Food Grains (Second Edition)*. 2016

Cancer today. (n.d.). Global Cancer Observatory. <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table> keresés: 2021.03.26

GLOBOCAN 2020: New Global Cancer Data [Internet]. UICC. 2021 keresés: 2021.03.26. Available from: <https://www.uicc.org/news/globocan-2020-new-global-cancer-data>

Guilleret I, Benhattar J. Unusual distribution of DNA methylation within the hTERT CpG island in tissues and cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Dec 17;325(3):1037-43.

Gupta S, Hastak K, Afaq F, Ahmad N, Mukhtar H. Essential role of caspases in epigallocatechin-3-gallate-mediated inhibition of nuclear factor kappa B and induction of apoptosis. *Oncogene*. 2004 Apr 1;23(14):2507-22.

Gyöngyi Z. Daganat-kialakulásban szerepet játszó gének expresszió-változásai kémiai karcinogének hatására [Doktori disszertáció] 2002. Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Humán Közegészségtani Intézet

Hashibe M, Galeone C, Buys SS, et al. Coffee, tea, caffeine intake, and the risk of cancer in the PLCO cohort. *Br J Cancer*. 2015;113(5):809-816.

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.

Hendrayani SF, Al-Harbi B, Al-Ansari MM, Silva G, Aboussekhra A. The inflammatory/cancer-related IL-6/STAT3/NF- κ B positive feedback loop includes AUF1

and maintains the active state of breast myofibroblasts. *Oncotarget*. 2016 Jul 5;7(27):41974-41985.

Hong M, Hwang J-T, Shin EJ, Hur HJ, Kang K, Choi H-K, et al. (2019) Genome-wide analysis of DNA methylation identifies novel differentially methylated regions associated with lipid accumulation improved by ethanol extracts of *Allium tuberosum* and *Capsella bursa-pastoris* in a cell model. *PLoS ONE* 14(6): e0217877.

Hornedo-Ortega R, Cerezo AB, de Pablos RM, Krisa S, Richard T, García-Parrilla CM, Troncoso AM. Phenolic Compounds Characteristic of the Mediterranean Diet in Mitigating Microglia-Mediated Neuroinflammation. *Front Cell Neurosci*. 2018; 12: 373.

Huang Z, Wang B, Pace RD, Yoon S. Trans fat intake lowers total cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol levels without changing insulin sensitivity index in Wistar rats. *Nutr Res*. 2009 Mar;29(3):206-12.

Irigaray P, Newby JA, Clapp R, et al. Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview. *Biomed Pharmacother*. 2007;61(10):640-658.

Ji BT, Chow WH, Hsing AW, McLaughlin JK, Dai Q, Gao YT, Blot WJ, Fraumeni JF Jr. Green tea consumption and the risk of pancreatic and colorectal cancers. *Int J Cancer*. 1997 Jan 27;70(3):255-8.

Kaltschmidt B, Greiner JFW, Kadhim HM, Kaltschmidt C. Subunit-Specific Role of NF- κ B in Cancer. *Biomedicines*. 2018 Apr 17;6(2):44.

Katabathina VS, Vikram R, Nagar AM, Tamboli P, Menias CO, Prasad SR. Mesenchymal neoplasms of the kidney in adults: imaging spectrum with radiologic-pathologic correlation. *Radiographics*. 2010 Oct;30(6):1525-40.

Kelley DS, Bartolini GL, Newman JW, Vemuri M, Mackey BE. Fatty acid composition of liver, adipose tissue, spleen, and heart of mice fed diets containing t10, c12-, and c9, t11-conjugated linoleic acid. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2006 May;74(5):331-8.

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. 29(11):1776-82.

Kloypan C, Srisa-art M, Mutirangura A, Boonla C. LINE-1 hypomethylation induced by reactive oxygen species is mediated via depletion of S-adenosylmethionine. *Cell Biochem Funct.* 2015 Aug;33(6):375-85.

Kouka P, Tsakiri G, Tzortzi D, Dimopoulou S, Sarikaki G, Stathopoulos P, Veskoukis AS, Halabalaki M, Skaltsounis AL, Kouretas D. The Polyphenolic Composition of Extracts Derived from Different Greek Extra Virgin Olive Oils Is Correlated with Their Antioxidant Potency. *Oxid Med Cell Longev.* 2019. 2019:1870965.

Kouka P, Tekos F, Papoutsaki Z, Stathopoulos P, Halabalaki M, Tsantarliotou M, Zervos I, Nepka C, Liesivuori J, Rakitskii VN, Tsatsakis A, Veskoukis AS, Kouretas D. Olive oil with high polyphenolic content induces both beneficial and harmful alterations on rat redox status depending on the tissue. *Toxicol Rep.* 2020 Feb 13;7:421-432.

Kretzschmar M. Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Exp Toxicol Pathol.* 1996 Jul;48(5):439-46.

(KSH, 2021) Halálózások a gyakoribb halálokok szerint (1990–) [Internet]. STADAT – 1.5. [cited 2021Apr28]. Available from:

https://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat_eves/i_wnh001.html

Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.* 2001 Apr;81(2):807-69.

Laird, PW. Oncogenic mechanisms mediated by DNA methylation. *Mol. Med. Today.* 1997 May;3(5):223-9.

Lambert MP, Ancy PB, Esposti DD, et al. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in hepatocellular carcinoma and after in vitro exposure to common risk factors. *Clin Epigenetics.* 2015;7(1):15. Published 2015 Feb 27.

Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell.* 2012 Apr 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 Sep 1;38(17):2859-65.

Liang N, Kitts DD. Role of Chlorogenic Acids in Controlling Oxidative and Inflammatory Stress Conditions. *Nutrients.* 2015 Dec 25;8(1):16.

Link A, Balaguer F, Goel A. Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: promising role for epigenetics. *Biochem Pharmacol.* 2010 Dec 15;80(12):1771-92.

Liu J, Liu S, Zhou H, Hanson T, Yang L, Chen Z, Zhou M. Association of green tea consumption with mortality from all-cause, cardiovascular disease and cancer in a Chinese cohort of 165,000 adult men. *Eur J Epidemiol.* 2016 Sep;31(9):853-65.

Longo VD, Fontana L. Calorie restriction and cancer prevention: metabolic and molecular mechanisms. *Trends in Pharmacological Sciences.* Volume 31, Issue 2, 2010, Pages 89-98, ISSN 0165-6147.

Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F, Ros E, et al. Olive oil and health: summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaen and Cordoba (Spain) 2008. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010; 20: 284-94.

Lubecka K, Kurzava L, Flower K, Buvala H, Zhang H, Teegarden D, et al. Stilbenoids remodel the DNA methylation patterns in breast cancer cells and inhibit oncogenic NOTCH signaling through epigenetic regulation of MAML2 transcriptional activity. *Carcinogenesis.* 2016 Jul;37(7):656-68.

Ma DW. Lipid mediators in membrane rafts are important determinants of human health and disease. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2007 Jun;32(3):341-50.

Ma X, Deng D, Chen W. Inhibitors and Activators of SOD, GSH - Px, and CAT. *Enzyme Inhibitors and Activators, Chapter 9.* Murat Senturk, IntechOpen, 2017.

Massagué J, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell.* 2000 Oct 13;103(2):295-309.

Masuda M, Suzui M, Lim JT, Deguchi A, Soh JW, Weinstein IB. Epigallocatechin-3-gallate decreases VEGF production in head and neck and breast carcinoma cells by inhibiting EGFR-related pathways of signal transduction. *J Exp Ther Oncol.* 2002 Nov-Dec;2(6):350-9.

Mateo-Fernández M, Merinas-Amo T, Moreno-Millán M, Alonso-Moraga Á, Demyda-Peyrás S. "In Vivo and In Vitro Genotoxic and Epigenetic Effects of Two Types of Cola Beverages and Caffeine: A Multiassay Approach", *BioMed Research International*, vol. 2016, Article ID 7574843, 15 pages, 2016.

Maugeri A, Barchitta M, Mazzone MG, Giuliano F, Basile G, Agodi A. Resveratrol Modulates SIRT1 and DNMT Functions and Restores LINE-1 Methylation Levels in ARPE-19 Cells under Oxidative Stress and Inflammation. *Int J Mol Sci*. 2018 Jul 20;19(7):2118.

Isabel Matos Medeiros-de-Moraes, Cassiano Felipe Gonçalves-de-Albuquerque, Angela R. M. Kurz, Flora Magno de Jesus Oliveira, Victor Hugo Pereira de Abreu, Rafael Carvalho Torres, Vinícius Frias Carvalho, Vanessa Estado, Patrícia Torres Bozza, Markus Sperandio, Hugo Caire de Castro-Faria-Neto, Adriana Ribeiro Silva, "Omega-9 Oleic Acid, the Main Compound of Olive Oil, Mitigates Inflammation during Experimental Sepsis", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2018, Article ID 6053492, 13 pages, 2018.

Michels N, Specht IO, Heitmann BL, Veronique Chajès, Inge Huybrechts, Dietary trans-fatty acid intake in relation to cancer risk: a systematic review and meta-analysis, *Nutrition Reviews*, Volume 79, Issue 7, July 2021, Pages 758–776,

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 Aug;39(2):465-72.

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.

Morrow JD, Awad JA, Boss HJ, Blair IA, Roberts LJ. Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Nov 15; 89(22): 10721–10725.

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-Dexposed rats. *Lipids in Health and Disease*. 2010. 9:89.1-10.

Nanda N, Mahmood S, Bhatia A, Mahmood A, Dhawan DK. Chemopreventive role of olive oil in colon carcinogenesis by targeting noncoding RNAs and methylation machinery. *Int J Cancer*. 2019 Mar 1;144(5):1180-1194.

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.

Narváez DM, Groot H, Diaz SM, Palma RM, Muñoz N, Cros MP, et al. Oxidative stress and repetitive element methylation changes in artisanal gold miners occupationally exposed to mercury. *Heliyon*. 2017 Sep 12;3(9):e00400.

Nasr, A., Nutini, M., Palombo, B. et al. Mutations of TP53 induce loss of DNA methylation and amplification of the TROP1 gene. *Oncogene* 22, 1668–1677 (2003).

NÉBIH 2014: Tájékoztató a transz-zsírsvakról (71/2013. (XI.20.) EMMI rendelet) - Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Élelmiszer- és Takarmánybiztonsági Igazgatóság, 2014.03.03. Keresés: 2021.02.21. <https://portal.nebih.gov.hu/-/tajekoztato-a-transz-zsirsavakrol>

Newman M, Blyth BJ, Hussey DJ, Jardine D, Sykes PJ, Ormsby RJ. Sensitive quantitative analysis of murine LINE1 DNA methylation using high resolution melt analysis. *Epigenetics*. 2012 Jan 1;7(1):92-105.

Notarnicola M, Tutino V, De Nunzio V, Dituri F, Caruso MG, Giannelli G. Dietary ω -3 Polyunsaturated Fatty Acids Inhibit Tumor Growth in Transgenic ApcMin/+ Mice, Correlating with CB1 Receptor Up-Regulation. *Int J Mol Sci*. 2017 Feb 24;18(3):485.

OÉTI, 2013: Kereskedelmi forgalomból származó élelmiszerek transz-zsírsv tartalma – Országos Élelmezés- és Táplálkozástudományi Intézet (2013.03.11.) Keresés: 2021.02.17.

<https://web.archive.org/web/20130316122054/http://www.oeti.hu/download/tfacso.pdf>

Oteng AB, Kersten S. Mechanisms of Action of trans Fatty Acids. *Adv Nutr.* 2019. pii: nmz125.

Padlianah, Arif, M., & Yustisia, I. (2019). Blood chemistry profiles of DMBA-induced mammary tumor in female sprague dawley rats. *INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOINFORMATICS AND NANO-MEDICINE FROM NATURAL RESOURCES FOR BIOMEDICAL RESEARCH: 3rd Annual Scientific Meeting for Biomedical Sciences.*

Park J, Min JS, Chae U, Lee JY, Song KS, Lee HS. Anti-inflammatory effect of oleuropein on microglia through regulation of Drp1-dependent mitochondrial fission. *J. Neuroimmunol.* 2017. 306. 46–52.

Park LK, Friso S, Choi SW. Nutritional influences on epigenetics and age-related disease. *Proc Nutr Soc.* 2012 Feb;71(1):75-83.

Pastore RL, Fratellone P. Potential health benefits of green tea (*Camellia sinensis*): A narrative review. *Explore (NY).* Nov-Dec 2006;2(6):531-9.

Pellmar TC, Eisenberg L, editors. *Bridging Disciplines in the Brain, Behavioral, and Clinical Sciences.* Institute of Medicine (US) Committee on Building Bridges in the Brain, Behavioral, and Clinical Sciences. Washington (DC): National Academies Press (US); 2000. 2, The Potential of Interdisciplinary Research to Solve Problems in the Brain, Behavioral, and Clinical Sciences.

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.

Perumalla Venkata R, Subramanyam R. Evaluation of the deleterious health effects of consumption of repeatedly heated vegetable oil. *Toxicol Rep.* 2016 Aug 16;3:636-643.

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.

Ponnaluri VKC, Estève PO, Ruse CI, Pradhan S. S-adenosylhomocysteine Hydrolase Participates in DNA Methylation Inheritance. *J Mol Biol.* 2018 Jul 6;430(14):2051-2065.

Poole, C.J., Lodh, A., Choi, JH. et al. MYC deregulates TET1 and TET2 expression to control global DNA (hydroxy)methylation and gene expression to maintain a neoplastic phenotype in T-ALL. *Epigenetics & Chromatin* 12, 41 (2019).

Prior IA, Hancock JF. Compartmentalization of Ras proteins. *J Cell Sci.* 2001 May;114(Pt 9):1603-8.

Psaltopoulou T, Kosti RI, Haidopoulos D, Dimopoulos M, Panagiotakos DB. Olive oil intake is inversely related to cancer prevalence: a systematic review and a meta-analysis of 13,800 patients and 23,340 controls in 19 observational studies. *Lipids Health Dis.* 2011 Jul 30;10:127.

Purcaro G, Navas JA, Guardiola F, Conte LS, Moret S. Polycyclic aromatic hydrocarbons in frying oils and snacks. *J Food Prot.* 2006 Jan;69(1):199-204.

Ramadass P, Meerarani P, Toborek M, Robertson LW, Hennig B. Dietary flavonoids modulate PCB-induced oxidative stress, CYP1A1 induction, and AhR-DNA binding activity in vascular endothelial cells. *Toxicol Sci.* 2003 Nov;76(1):212-9.

Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med.* 2010 Dec 1;49(11):1603-16.

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.

Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:19-34.

Santes-Palacios R, Marroquín-Pérez AL, Hernández-Ojeda SL, Camacho-Carranza R, Govezensky T, Espinosa-Aguirre JJ. Human CYP1A1 inhibition by flavonoids. *Toxicol In Vitro.* 2020 Feb;62:104681.

Scotece M, Gómez R, Conde J, Lopez V, Gómez-Reino JJ, Lago F, Smith AB 3rd, Gualillo O. Further evidence for the anti-inflammatory activity of oleocanthal: inhibition of MIP-1 α and IL-6 in J774 macrophages and in ATDC5 chondrocytes. *Life Sci.* 2012 Dec 10;91(23-24):1229-35.

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. 188:496-503.

Serrano A, Ros G, Nieto G. Bioactive Compounds and Extracts from Traditional Herbs and Their Potential Anti-Inflammatory Health Effects. *Medicines (Basel)*. 2018 Jul 16;5(3):76.

Shankar S, Suthakar G, Srivastava RK. Epigallocatechin-3-gallate inhibits cell cycle and induces apoptosis in pancreatic cancer. *Front Biosci.* 2007 Sep 1;12:5039-51.

Shankar S, Ganapathy S, Hingorani SR, Srivastava RK. EGCG inhibits growth, invasion, angiogenesis and metastasis of pancreatic cancer. *Front Biosci.* 2008 Jan 1;13:440-52.

Sheng M, McFadden G, Greenberg ME. Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron.* 1990 Apr;4(4):571-82.

Shimizu M, Deguchi A, Lim JT, Moriwaki H, Kopelovich L, Weinstein IB. (-)-Epigallocatechin gallate and polyphenon E inhibit growth and activation of the epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor-2 signaling pathways in human colon cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2005 Apr 1;11(7):2735-46.

Shuang T, Wang M, Zhou Y, Shi C, Wang D. NF- κ B1, c-Rel, and ELK1 inhibit miR-134 expression leading to TAB1 upregulation in paclitaxel-resistant human ovarian cancer. *Oncotarget.* 2017 Apr 11;8(15):24853-24868.

Siddiqui IA, Adhami VM, Saleem M, Mukhtar H. Beneficial effects of tea and its polyphenols against prostate cancer. *Mol Nutr Food Res.* 2006 Feb;50(2):130-43.

Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014 Mar-Apr;64(2):104-17.

Silva-Martínez GA, Rodríguez-Ríos D, Alvarado-Caudillo Y, et al. Arachidonic and oleic acid exert distinct effects on the DNA methylome. *Epigenetics.* 2016;11(5):321-334.

- 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
<https://doi.org/10.1021/j100856a019>
- Storz P. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci.* 2005 May 1;10:1881-96.
- Storz P: Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci.* 2005 May 1;10:1881-96.
- Struhl K. Cancer: Is DNA methylation of tumour suppressor genes epigenetic? *Elife* 2014 Mar 12;3:e02475.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249.
- Sweeney BP, Bromilow J. Liver enzyme induction and inhibition: implications for anaesthesia. *Anaesthesia.* 2006 Feb;61(2):159-77.
- 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.
- 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.
- Szigeti, K. A., Galamb, O., Kalmár, A., Barták, B. K., Nagy, Z. B., Márkus, E., Igaz, P., Tulassay, Z., & Molnár, B. (2018). A DNS-metiláció szerepe és megváltozása az öregedés és a daganatos betegségek kialakulása során, *Orvosi Hetilap OH*, 159(1), 3-15.

Retrieved Aug 4, 2022, from <https://akjournals.com/view/journals/650/159/1/article-p3.xml>

Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(6):3740-3745.

Tew, B.Y., Durand, J.K., Bryant, K.L. et al. Genome-wide DNA methylation analysis of KRAS mutant cell lines. *Sci Rep* 10, 10149 (2020).

Tibbetts AS, Appling DR. Compartmentalization of mammalian folate-mediated one-carbon metabolism. *Annu Rev Nutr*. 2010 Aug 21;30:57-81.

Tiwari B, Jones AE, Abrams JM. Transposons, p53 and Genome Security. *Trends Genet*. 2018;34(11):846-855.

Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, Di Majo D, Giammanco S, La Guardia M. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr Res Rev*. 2005 Jun;18(1):98-112.

Valcic S, Muders A, Jacobsen NE, Liebler DC, Timmermann BN. Antioxidant chemistry of green tea catechins. Identification of products of the reaction of (-)-epigallocatechin gallate with peroxy radicals. *Chem Res Toxicol*. 1999 Apr;12(4):382-6.

Vassiliou EK, Gonzalez A, Garcia C, Tadros JH, Chakraborty G, Toney JH. Oleic acid and peanut oil high in oleic acid reverse the inhibitory effect of insulin production of the inflammatory cytokine TNF-alpha both in vitro and in vivo systems. *Lipids Health Dis*. 2009 Jun 26;8:25.

Verzella D, Pescatore A, Capece D, Vecchiotti D, Ursini MV, Franzoso G, Alesse E, Zazzeroni F. Life, death, and autophagy in cancer: NF- κ B turns up everywhere. *Cell Death Dis*. 2020 Mar 30;11(3):210.

Violi F, Loffredo L, Pignatelli P, Angelico F, Bartimoccia S, Nocella C, Cangemi R, Petruccioli A, Monticolo R, Pastori D, Carnevale R. Extra virgin olive oil use is associated with improved post-prandial blood glucose and LDL cholesterol in healthy subjects. *Nutr Diabetes*. 2015 Jul 20;5(7):e172.

Wajant H. The role of TNF in cancer. *Results Probl Cell Differ*. 2009;49:1-15.

Wang A, Wang S, Zhu C, et al. Coffee and cancer risk: A meta-analysis of prospective observational studies. *Sci Rep.* 2016;6:33711. Published 2016 Sep 26.

Wang L, Huang J, Wu C, Huang L, Cui J, Xing Z, et al. Downregulation of miR-29b targets DNMT3b to suppress cellular apoptosis and enhance proliferation in pancreatic cancer. *Molecular Medicine Reports.* 2018 Feb;17(2):2113-2120.

Wang SC, Huang CC, Shen CH, Lin LC, Zhao PW, Chen SY, et al. Gene Expression and DNA Methylation Status of Glutathione S-Transferase Mu1 and Mu5 in Urothelial Carcinoma. *PLoS One.* 2016 Jul 12;11(7):e0159102.

Wang Z, Zhang L, Wan Z, He Y, Huang H, Xiang H, Wu X, Zhang K, Liu Y, Goodin S, Du Z, Zheng X. Atorvastatin and Caffeine in Combination Regulates Apoptosis, Migration, Invasion and Tumorspheres of Prostate Cancer Cells. *Pathol Oncol Res.* 2020 Jan;26(1):209-216.

Watson RE, Curtin GM, Doolittle DJ, Goodman JI. Progressive alterations in global and GC-rich DNA methylation during tumorigenesis. *Toxicol Sci.* 2003 Oct;75(2):289-99.

Webster GA, Perkins ND. Transcriptional cross talk between NF-kappaB and p53. *Mol Cell Biol.* 1999 May;19(5):3485-95.

WHO Cancer Regional Profile 2020. WHO | World Health Organization. https://www.who.int/cancer/country-profiles/Global_Cancer_Profile_2020.pdf

WHO European health information at your fingertips. [Internet]. World Health Organization. World Health Organization; [cited 2021Apr28]. Available from: <https://gateway.euro.who.int/en/datasets/european-mortality-database/>

Wild C, Weiderpass E, Stewart BW. World cancer report cancer research for cancer prevention. Lyon: IARC Press; 2020.

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 Jun 4;33(3):181-191.

Yamine S, Huybrechts I, Biessy C, Dossus L, Aglago EK, Naudin S, et al. Dietary and Circulating Fatty Acids and Ovarian Cancer Risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition [Internet]. *Cancer Epidemiology, Biomarkers*

& Prevention. American Association for Cancer Research; 2020 [cited 2021Apr28]. Available from: <https://cebp.aacrjournals.org/content/29/9/1739>

Yang G, Shu X-O, Li H, Chow W-H, Ji B-T, Zhang X, et al. Prospective Cohort Study of Green Tea Consumption and Colorectal Cancer Risk in Women [Internet]. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. American Association for Cancer Research; 2007 [cited 2021Apr28]. Available from: <https://cebp.aacrjournals.org/content/16/6/1219.article-info>

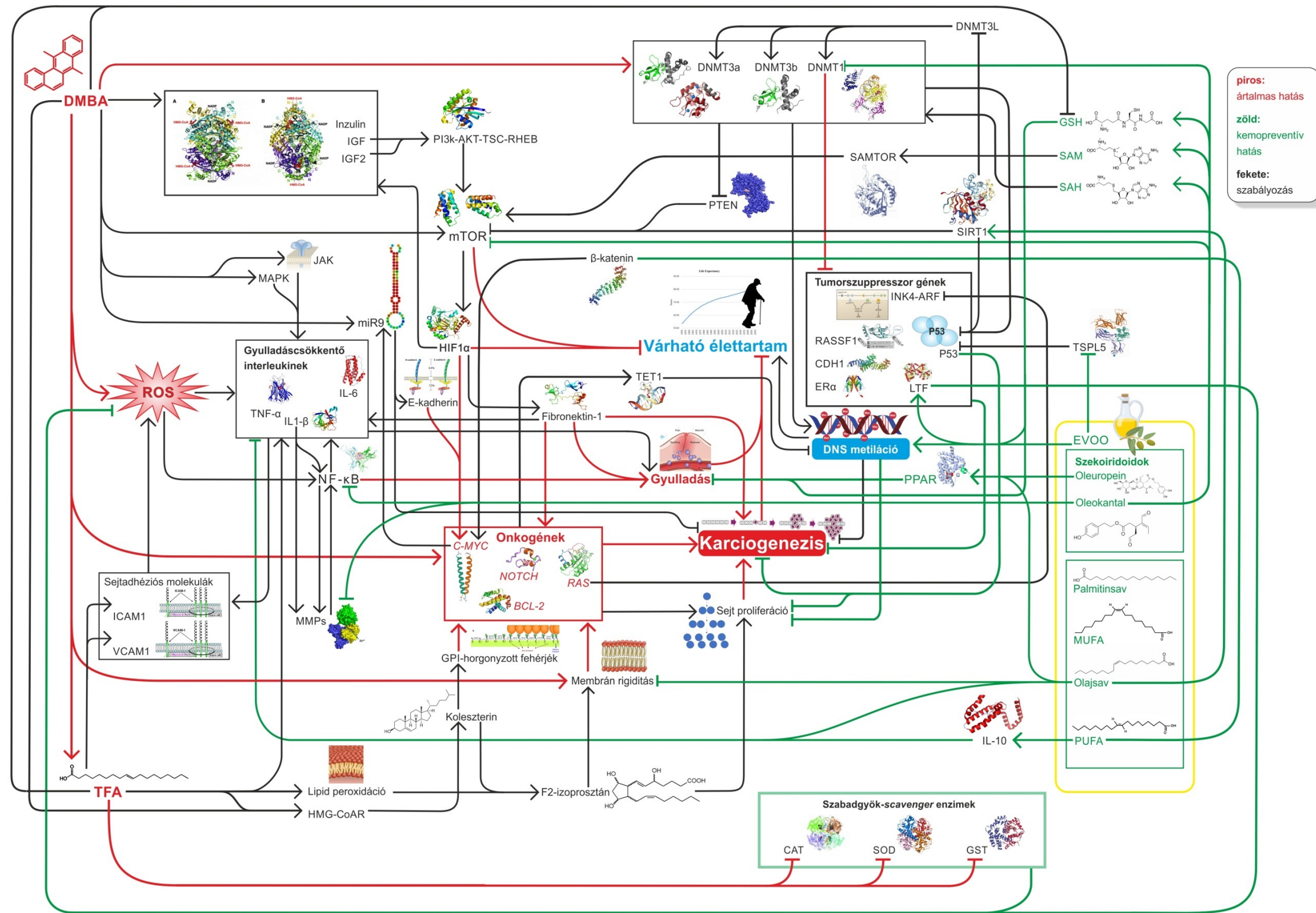
Yeh CB, Hsieh MJ, Hsieh YH, Chien MH, Chiou HL, Yang SF. Antimetastatic effects of norcantharidin on hepatocellular carcinoma by transcriptional inhibition of MMP-9 through modulation of NF-kB activity. *PLoS One*. 2012;7(2):e31055.

Zhong L, Goldberg MS, Gao YT, Hanley JA, Parent ME, Jin F. A population-based case-control study of lung cancer and green tea consumption among women living in Shanghai, China. *Epidemiology*. 2001 Nov;12(6):695-700.

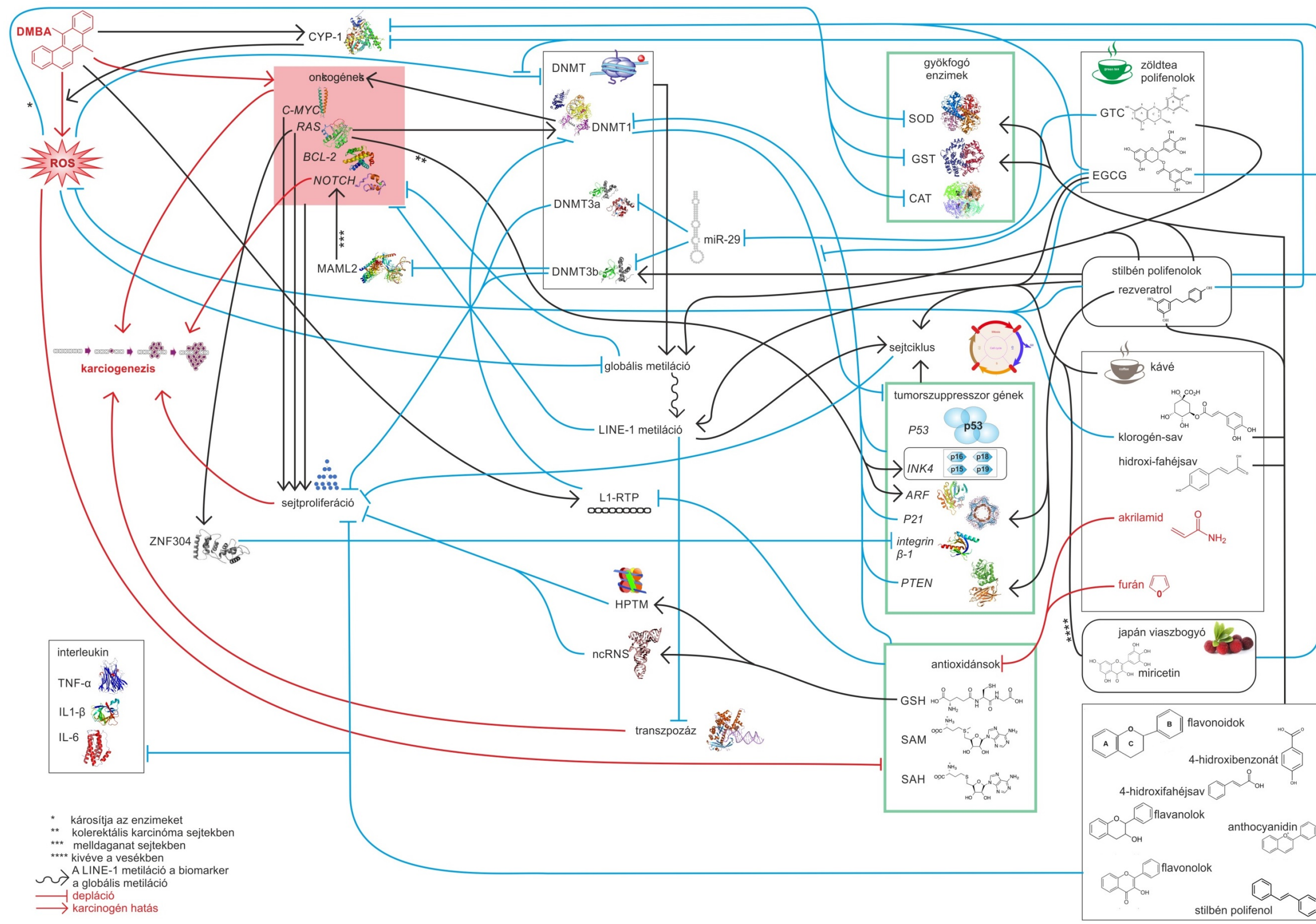
Zhu Y, Huang Y, Liu M, Yan Q, Zhao W, Yang P, et al. Epigallocatechin gallate inhibits cell growth and regulates miRNA expression in cervical carcinoma cell lines infected with different high-risk human papillomavirus subtypes. *Exp Ther Med*. 2019 Mar;17(3):1742-1748.

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.

FÜGGELÉK



7. Ábra: A DMBA, TFA vagy EVOO expozíció következtében érintett molekuláris mechanizmusok és jelátviteli folyamatok összefoglalása.



8. Ábra: A DMBA, flavonoid kivonat, zöld tea kivonat, kávé kivonat vagy japán viaszbogyó kivonat expozíció következtében érintett molekuláris mechanizmusok és jelátviteli folyamatok összefoglalása.

KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

A disszertáció alapjául szolgáló 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

Konferencia szereplések

Andreidesz K, Szabo L, Molnar R, Tomesz A, Darago R, Deutsch A, Varjas T, Ritter Zs, Szentpeteri LJ, Mathe D et al. A transz-zsír-savak súlyosbítják a LINE-1 retrotanszpozon DNS hipometilációt DMBA környezeti karcinogén modellben. 51. MEMBRÁN TRANSZPORT 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 11-RTP DNS hipometiláló hatását. 51. MEMBRÁN TRANSZPORT KONFERENCIA POSZTER ABSZTRAKTOK. 2022.

Egyéb közlemények

Tomesz A, Szabo L, Molnar R, Deutsch A, Darago R, Raposa BL, Ghodrattollah 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

Molnar R, Szabo L, Tomesz A, Deutsch A, Darago R, Raposa BL, Ghodrattollah 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, Ghodrattollah 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

Tomesz A, Szabo L, Molnar R, Deutsch A, Darago R, Mathe D, Budan F, Ghodrattollah 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

DOKTORI ÉRTEKEZÉS BENYÚJTÁSA ÉS NYILATKOZAT A DOLGOZAT EREDETISÉGÉRŐL

Alulírott

név: Szabó László

anyja neve: Daragó Róza

születési hely, idő: Mezőkövesd, 1961.09.25.

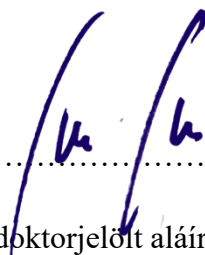
„Flavonoid kivonat, zöld tea kivonat, japán viaszbogó kivonat, kávé kivonat, olívaolaj és transz-zsír sav hatása a DMBA indukálta LINE-1 DNS-metilációra” című doktori értekezésemet a mai napon benyújtom a Pécsi Tudományegyetem, Egészségtudományi Kar, Egészségtudományi Doktori Iskola részére. Program száma: PR-6. Téma száma: O-6.

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