

**PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI KAR
EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA**

**DOKTORI ISKOLA VEZETŐJE:
PROF. DR. KISS ISTVÁN, EGYETEMI TANÁR**

**PROGRAMVEZETŐ:
PROF. DR. KISS ISTVÁN, EGYETEMI TANÁR**

**TÉMAVEZETŐK:
DR. HABIL. RAPOSA LÁSZLÓ BENCE
DR. HABIL. KÁPOSZTÁS ZSOLT**

**EGYES GYÓGYNÖVÉNYEK ÉS BIOAKTÍV METABOLITJAIK
FITOTERÁPIÁS TULAJDONSÁGAINAK ÉRTÉKELÉSE ÉS
MEGHATÁROZÁSA A VASTAGBÉLRAKBAN SZEREPET JÁTSZÓ
GÉNEK TEKINTETÉBEN**

DOKTORI (PH.D.) TÉZISFÜZET



MACHARIA JOHN MACHARIA

Pécs, 2023

BEVEZETÉS

Rosszindulatú vastag és végbélrák

A vastagbélrák a leggyakoribb rosszindulatú daganatok közé tartozik, de a rákos halálozás harmadik fő oka mind a férfiak, mind a nők körében, különösen a fejlett országokban. Jelentős előrelépések történtek az adenomatosus polipok (rák előfutárai) és a rák kialakulásához vezető molekuláris tevékenységek megismerésében. Számos vastagbél-daganat sporadikusan alakul ki, de jelentős százalékuk (5-6%) egyértelmű genetikai összefüggést mutat. Az aberráns promóter-metiláción és a hisztonmódosulások gyakorlásán keresztül bekövetkező epigenetikai változások kulcsszerepet játszanak a vastagbélrákok kialakulásában és proliferációjában. Az epigenetikai jelek visszafordítása az aberráns transzkripciós faktorokat, koaktivátor, ko-represszor kölcsönhatásokat és hiszton-módosító aktivitásokat célzó vegyületekkel olyan felismerhető lehetőségeket kínál, amelyekkel a rákos sejtek epigenomja manipulálható, és ez valószínűleg terápiás előnyökkel jár.

Bár a vastagbélrák (CRC) patofiziológiája bonyolult és kevésbé ismert, úgy tűnik, hogy a fejlődő országokban előforduló betegség kialakulásában és progressziójában a kockázati tényezők, például a genetika, az életmód és a környezet közötti kölcsönhatások kulcsfontosságúak. A műtét és a kemoterápiás beavatkozások a tudományosan feltárt alternatívák hiánya miatt a vastagbélrák leggyakrabban alkalmazott kezelési formái. Rendkívül fontos azonban olyan molekuláris vegyületek kifejlesztése és azonosítása, amelyek képesek elpusztítani vagy gátolni a karcinogenezist elősegítő transzformált sejteket anélkül, hogy toxikus hatást váltanának ki, vagy toxikusak lennének a normál sejtekre.

A különböző CRC-terápiák kifejlesztése nem tudta megfékezni a CRC-ben szenvedő betegek halálozását az áttétek nagy gyakorisága miatt. Ennek fényében a növényekből származó étrend-kiegészítőkkel való kezelés kezd kellő elismerést kapni, mint a vastagbélrákkal összefüggő halálozási terhek csökkentésének leghatékonyabb megközelítése. A növények jelentős bioaktív vegyületeket tartalmaznak, amelyek szinte minden élő szervezet növekedéséhez és fejlődéséhez nélkülözhetetlenek. Gyakorlatilag minden kultúrában széles körben fogyasztják őket élelmiszerként és gyógyászati értékük miatt. Farmakológiai tulajdonságaik és hatékonyságuk azonban kevésbé ismertek. A legtöbb, meghatározott bioaktív potenciállal rendelkező fitokémiai anyagot a növényekkel hozták összefüggésbe. A tanulmányunkban szereplő növények természetes összetevői a rákellenes kezelés új forrását jelentik, elegendő új hatásmechanizmussal. A szintetikus szerekkel összehasonlítva a növényi eredetű fitokomponensek ritkán korrelálnak számos mellékhatással, és bizonyítottan elsősorban terápiás

aktivitást mutatnak számos fertőző betegség gyógyítására. A növényekből származó természetes termékek az új vastagbélrák elleni gyógyszerek termékeny forrása, a jelenleg alkalmazott rákellenes kezelések mintegy felét teszik ki, közvetlenül vagy közvetve. Kutatásunk célja az afrikai Kenyában őshonosan előforduló három fontos, eddig feltáratlan növényfaj, nevezetesen a *Withania somnifera* L. (WS), a *Warbugia ugandensis* (WU) és az *Aloe secundiflora* (AS) fitokémiai vegyületeinek kivonása, elemzése és hatásosságának vizsgálata volt.

Célok

1. Három feltételezett gyógynövényfajból hexánsavas, etanolos és metanolos nyers kivonatok előállítás: WS, WU és AS a CRC értékelése céljából.
2. A különböző extrakciós oldószerekkel nyert növényi kivonatokban lévő aktív fitokémiai vegyületek jelenlétének meghatározása és azonosítása.
3. A COX-2, 5-LOX, Bcl-xL, Bcl2 és CASP9 moduláló génexpressziójának meghatározása a különböző növényi kivonatokkal történő kezelés után.
4. Meghatározni a leghatékonyabb extrakciós oldószert a CRC-sejtvonalak növekedésére a legnagyobb gátló potenciált mutató bioaktív metabolitok kinyerésére.

ANYAG ÉS MÓDSZEREK

Vizsgálati terület

A növényfajokat Kenya (Afrika) két különböző megyéjéből gyűjtöttük, amelyek Nakuru és Baringo megyék voltak. A növényi szervek feldolgozását az Egerton Egyetemen végezték Njoróban, Nakuru megyében, amely a Mau keleti vízgyűjtő terület része. A célszervekből nyert növényi kivonatok ezután a Baranya megyei Pécsi Egyetemre szállították fitokémiai elemzésre és az azt követő kísérleti tevékenységekre.

Caco-2 sejtvonalak beszerzése

A Caco-2 sejtvonalakat az ATCC-től szereztük be, és a Pécsi Tudományegyetem Biokémiai és Orvosi Kémiai Tanszékéről közvetlenül laboratóriumunkba (Népegészségügyi Tanszék) szállítottuk. A Caco-2 (Caco2) epitelsejtek egy 72 éves fehér bőrű férfi vastagbél adenokarcinómában szenvedő karcinóma sejtjeiből nyert epitelsejtek.

Növények gyűjtése

A WU növényből származó szerveket az Egerton Egyetemen gyűjtötték Njoróban - amely a Nakuru megyei Kelet-Mau vízgyűjtő terület része. Az AS szerveit a Nakuru megyében, Rongai Sub County-ban található Kampi ya Moto-ban gyűjtötték. Másrészt a WS szerveit a Perkerra öntözőrendszerből nyerték, Baringo South Sub-County, Baringo megye Baringo megyéjében.

A növényi kivonatok kivonása szerves oldószerekkel

A kiválasztott növényeket árnyékban szárították és finom porrá őrölték. A sorozatos kimerítő extrakciót (SEE) három, növekvő polaritású oldószerral végeztük. Ezt a folyamatot háromszor megismételtük, amíg az összes oldható összetevő teljes extrakciója meg nem történt. A kivonatot (mindhárom szűrési tételben összevontan) végül az oldószer elpárologtatásával koncentrálták. Az oldószer eltávolítása rotációs párologtatóval történt 40oC és 50oC közötti hőmérsékleten, csökkentett nyomáson. A vizes kivonatot fagyasztószárítóval liofilizáltuk. A száraz, oldószermentes metabolitokat szorosan lezárt, parafilmes szalaggal lezárt mintaüvegekben tároltuk, és felhasználásig 4oC-os exsikkátorban, hűtőszekrényben helyeztük el.

Növényi kivonatok rekonstitúciója

A dimetil-szulfoxid (DMSO) egy sokoldalú anyag, amelyet gyakran alkalmaznak oldószerként a farmakológiában és a toxikológiában a gyógyszeradagolás javítására, különböző gyógyszerek feloldására és növényi kivonatok feloldására. Inert hígítószerként és vízben nem oldódó nyers növényi kivonatok szuszpendáló közegeként használták. 30 mg/ml (törzsoldat) készült 0,5% DMSO és kétszer desztillált foszfátpuffer sóoldat (ddPBS) mint oldó-, illetve hígító oldószer felhasználásával. A törzsoldatból 2 mg/ml, 1 mg/ml és 0,5 mg/ml végső koncentrációt készítettünk a Caco-2 sejtvonal kezeléséhez.

Az RNS kezelése és izolálása Caco-2 sejtvonalakban

A friss Caco-2 médiummal feltöltött, passzív Caco-2 sejtvonalakat 200µL különböző koncentrációjú (0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml) kivonatokkal kezeltük. A kezelt sejteket ezután 36 órán át 37 0C-on inkubáltuk. Az inkubációs időszak után a sejtek állapotát fénymikroszkóp alatt figyeltük meg az RNS izolálás előtt.

A hatékony RNS extrakcióhoz használt reagensek a következők voltak: ExtraZol Tri-reagens (Nucleotest Bio Kft, #EM30-200), kloroform (Merck Sigma, #C7559), izopropil-alkohol (Merck Supelco, #1.00997), 75%-os alkohol (abszolút etanolból hígítva; BioTech Hungary

Kft, #1001901000) és DEPC víz 0,1%-os DEPC (Dietilpirokarbonsav; Merck Sigma, #D5758). Mindegyiket a gyártók utasításainak megfelelően és azok szerint használtuk a maximális és minőségi RNS extrakció érdekében.

A qRT-PCR-hez használt protokoll és berendezések (SYBR Green protokoll)

Az egylépéses PCR-t, beleértve a reverz transzkripciót és az amplifikációt, a One-Step Detect SyGreen Lo-ROX egylépéses RT-PCR kit (Nucleotest Bio Ltd PB25.11-12) segítségével végeztük 96 lyukú lemezen, LightCycler 480 qPCR platformon (a gyártó utasításainak megfelelően). A termikus programot a következőképpen állítottuk be: inkubáció 42°C-on 5 percre, majd inkubáció 95°C-on 3 percre, majd 45 ciklus (95°C-5s, 56°C-15s, 72°C-5s), és minden ciklus végén fluoreszcens leolvasást végeztünk. Minden egyes futtatást olvadási görbeelemzés követett (95°C - 5s, 65°C - 60s, 97°C∞) az amplifikációs specificitás megerősítése érdekében. A reakciómix a következő volt: 10 µl Master Mix, 0,4 µl RT Mix, 0,4 µl dUTP, 0,4 µl primerek, 5 µl mRNS-templát steril kétszer desztillált vízzel kiegészítve, így a teljes térfogat 20 µl volt. A primereket az Integrated DNA Technologies (Bio-Sciences) szintetizálta, a szekvenciákat pedig a primer express szoftver segítségével terveztük. Az RNS tisztítása UV spektroszkópia segítségével történt.

qRT-PCR eredményelemzés

A cél-DNS-szekvenciák qRT-PCR nagy áteresztőképességű detektálási és mennyiségi meghatározási mátrixainak segítségével meghatároztuk a COX-2, 5-LOX, Bcl-xL, Bcl2 és CASP9 célzott gének relatív génexpresszióját. Belső kontrollként a kísérleti vizsgálatunkban használt házőrző gén a HPRT1 volt. A PCR-eredményeket Cp-értékként fejeztük ki, ami az amplifikációs görbe és a küszöbérték közötti keresztpontot jelzi. A Cp-értékeket a célgének kontrollmintához képest bekövetkezett hajtásváltozásainak kiszámításához használtuk a $2^{-\Delta\Delta C_p}$ (Livak-módszer) segítségével.

Kémiai összetevők elemzése nyers növényi kivonatokból

Nagy teljesítményű folyadékkromatográfiát (HPLC) alkalmaztunk az egyes bioaktív vegyületek kimutatására és meghatározására komplex metanolos növényi kivonatokból. A metanolt részesítettük előnyben, mivel a többi extrakciós oldószerhez képest erősen poláris vegyület, és a költségvonzat miatt a metabolitokat minden extrakciós oldószerből meg kellene határozni. A HPLC-be történő befecskendezés előtt minden mintát 0,45 µm-es szűrővel (Nylon Membranes, Supelco) szűrtünk. A HPLC-DAD rendszert minden futtatás előtt hagytuk

felmelegedni, és a mintaelemzés előtt az alapvonalat stabilizálódásig figyeltük. A csúcok azonosítása az UV-abszorpciós spektrum és a retenciós idő összehasonlításával történt a standardok segítségével kapott értékekkel. A referencia vegyületeket tartalmazó standard oldatok 30 percen keresztül történő injektálásával értékeltük az injektálás integrációjának ismételhetségét a standardok esetében, és kiszámítottuk az integrációs terület relatív standard eltérését (R.S.D.).

Az adatok elemzése

A statisztikai elemzést az MS Excel (Microsoft Corp. Released 2013. Redmond, WA, US) és az IBM SPSS (IBM Corp. Released 2019. IBM SPSS Statistics for Windows, 26.0 verzió. Armonk, NY, US). A kapott adatokból Kolmogorov-Smirnov tesztet használtunk a normalitáselemzés elvégzésére, míg a multiparametrikus Post Hoc tesztet is alkalmaztuk. Az ANOVA-tesztet a vizsgált változók átlagainak összehasonlítására használták. Az eredményeket akkor tekintették szignifikánsnak, ha $p \leq 0,05$ 95%-os konfidenciaintervallum mellett.

EREDMÉNYEK

A *Withania somnifera* L.

Amikor a Caco-2 sejtvonalakat a WS etanolos gyökér- és szárkivonataival kezelték növekvő koncentrációban, a COX-2 gének fokozatosan, dóziszfüggő módon szabályozódtak le (4.1. ábra), mindkét kivonatban. Hasonló arányban, statisztikailag szignifikáns különbség is megfigyelhető volt a downreguláló hatásukban ($p = 0,001$). A Caco-2 sejtvonalaknak a WS etanolos gyökér- és szárkivonattal történő kezelése során a CASP9 gének expressziója mindkét kivonatban dóziszfüggő módon felfelé szabályozódott. A megnövekedett expresszió aktivitása azonban a gyökérkivonatokban magasabb volt, mint a szárkivonatokban megfigyelt (4.2. ábra). Szignifikáns különbség volt a felszabályozó tulajdonságaikban ($p = 0,001$). Amikor a Caco-2 sejtvonalakat a WS etanolos gyökér- és szárkivonatának tettük ki, a Bcl-xL gének expressziója dóziszfüggő módon mindkét kivonatban lecsökkent. Szignifikáns különbség volt megfigyelhető a downreguláló tulajdonságaikban ($p = 0,011$, gyökér és $p = 0,001$, szár) mindkét kivonat esetében. A WS etanolos gyökér- és szárkivonatának hatására a Bcl2 gének expressziója mindkét kivonatban dóziszfüggő módon csökkent. Megfigyelhető hasonlóság volt a downreguláló tulajdonságaik szignifikáns különbségében ($p = 0,001$) mind a gyökér-, mind a szárkivonatokban. Amikor a Caco-2 sejtvonalakat a WS hexánsavas gyökér- és szárkivonataival kezelték növekvő koncentrációban, a COX-2 gének fokozatosan, dóziszfüggő módon szabályozódtak le a gyökérkivonatokban, míg a szárkivonatoknál fokozott expresszió

volt megfigyelhető. Statisztikailag szignifikáns különbség volt megfigyelhető a gyökérkivonatok downreguláló tulajdonságai között ($p=0,007$), míg a szárkivonatok esetében nem ($p=0,531$). A Caco-2 sejtvonalak gyökér- és szárkivonatokkal történő kezelését követően a CASP9 enzimikus gének mindkét kivonatban változóan szabályozottnak mutatkoztak. A gyökérkivonatokban azonban a 2,00 mg/ml koncentráció növekedésével csökkent az expressziójuk. Mindkét kivonat CASP9-re gyakorolt felszabályozó hatása statisztikailag szignifikáns volt (gyökér, $p=0,001$, szár, ($p=0,014$). Amikor a Caco-2 sejtvonalakat metanolos gyökér- és szárkivonattal kezelték, a COX-2 gének fokozatosan, dózisfüggő módon mindkét kivonatban lecsökkentek. A gyökérkivonatok ($p=0,001$) és a szárkivonatok ($p=0,010$) downreguláló hatásában is megfigyelhető volt statisztikailag szignifikáns különbség. Az azonosított metabolitok a következők: Withanolide A, Withaferin A, Withanolide szulfoxid, 27 Hydroxy withanon and kolin, Kolin, Somniferine, Withanine, Withanoside I, Quercetin, klorogénsav és katechin és Ashwagandhine.

Warbugia ugandensis

Amikor a Caco-2 sejtvonalakat WU etanolos gyökér- és szárkivonataival kezelték, a COX-2 gének dózisfüggő módon egyre inkább leszabályozták mindkét kivonatban. A szárkivonatoknál azonban statisztikailag ($p = 0,001$) szignifikáns szabályozó hatásokat figyeltek meg a gyökérkivonatokhoz képest ($p = 0,379$). Megfelelő kezelése alkalmazása után a Bcl2 gének dózisfüggő leszabályozását figyelték meg, ami jelentős hatást gyakorolt a szárkivonatokra a gyökérkivonatokhoz képest. Aggodalomra ad okot, hogy a gyökérkivonatokban 2,00 mg/ml koncentrációnál a génexpresszió hirtelen felfelé ívelt szabályozása volt megfigyelhető, mint a Bcl-xL expressziójában. Ennek ellenére mindkét kivonat esetében statisztikailag szignifikáns volt a szabályozó hatás ($p = 0,001$). A gyökérkivonatokban a Bcl2 gének expresszióját felfelé szabályozták. Azonban expressziójukat a szárkivonatok dózisfüggően csökkentették. Az eredmények statisztikailag nem voltak szignifikánsak mindkét kivonatban ($p = 0,157$, gyökerek) és ($p = 0,234$, szárok).

A szárkivonatok azonban kiváltották a szükséges szabályozó válaszokat, szemben a gyökérkivonatokkal. A Caco-2 sejtvonalakat WU metanolos gyökér- és szárkivonataival kezelve a Bcl-xL gének expressziója dózisfüggő módon csökkent mindkét kivonatban. A gyökérkivonatokban azonban enyhe eltolódás volt megfigyelhető a fokozott expresszióban magas koncentrációnál (2 mg/ml). Ennek ellenére a kifejezések statisztikailag szignifikánsak voltak ($p = 0,002$, gyökerek és $p = 0,001$, szárok) mindkét kivonatban. A Caco-2 sejtvonalak WU metanolos gyökér- és szárkivonataival történő kezelése során a CASP9 gének fokozott

(upregulációs) expressziója volt megfigyelhető dózisfüggő módon a gyökérkivonatokban, magas aktivitással minden dózisban. A szabályozó hatások azonban változatosak voltak a szárkivonatokban, jelentős hatásokat csak alacsonyabb koncentrációknál figyeltek meg. A szabályozó hatások statisztikailag nem voltak szignifikánsak ($p=0,059$) a gyökérkivonatoknál, míg a szárkivonatoknál megfigyelhetőek voltak ($p=0,001$). A legmagasabb szabályozó aktivitást magasabb koncentrációknál figyelték meg a gyökérkivonatokban. Amikor a Caco-2 sejtvonalakat WU metanolos gyökér- és szárkivonatának tették ki, az 5-LOX gén expressziója dózisfüggő módon csökkent mindkét kivonatban. A gyökérkivatokhoz képest azonban a szárkivatok mutatták a legjelentősebb jótékony hatásokat. Magas koncentrációban a gyökérkivatok enyhe növekedést mutattak a génexpresszió elősegítésében. Mindkét kivonat statisztikailag szignifikáns hatást váltott ki ($p=0,048$, gyökérkivatok és $p=0,001$, szárkivatok). Az azonosított metabolitok a következők: Drimane, ugandensial, warburganal, flavonoidok, szaponinok, szteroidok, terpenoidok, drimane, coloratan szeszkviterpenoidok, ugandensium, warburganal, mukaadial, tanninok, flavonoidok, szaponinok, szteroidok.

Aloe secundiflora

Amikor a Caco-2 sejtvonalakat hexános, etanolos és metanolos levélkivatokkal kezelték, a COX-2 gén a három különböző oldószerben növekvő dózissal változó mértékben csökkentek. A hexános kezeléseknél a downreguláció progresszív volt, és magas aktivitást figyeltek meg 0,50 mg/ml-nél. A hatások statisztikailag nem voltak szignifikánsak ($p=0,794$), de elegendőek ahhoz, hogy jótékony hatásokat váltsanak ki. Az etanolos kivonatoknál csak magas dóziskoncentrációnál (2,0 mg/ml) figyeltek meg szabályozó hatásokat. A metanolos kivatok esetében a szabályozó hatás minimális volt minden alkalmazott dózisban. A hexános kivatokhoz hasonlóan az etanolos és metanolos kivatok alkalmazása sem volt statisztikailag szignifikáns ($p=0,69$ és $p=0,0942$). Minden kezelésnél a szabályozó hatások fokozatosan dózisfüggőek voltak, és 0,50 mg/ml-nél magasabb aktivitást figyeltek meg. A hatások statisztikailag szignifikánsak voltak az etanolos kivatoknál ($p=0,001$), de nem a hexános ($p=0,129$) és a metanolos ($p=0,330$) kivatoknál. Mindazonáltal az összes kivonatkezelés jelentős csökkentő és előnyös tulajdonságokat mutatott, amelyek szükségesek a downreguláció serkentéséhez. A szabályozó hatások minden kezelésnél fokozatosan dózisfüggőek voltak, nagyobb jótékony hatást figyeltek meg az etanolos és metanolos kivatoknál. A hatások statisztikailag szignifikánsak voltak az etanolos és metanolos kivatoknál ($p=0,001$), közel azonos arányban. A hexános kivatok hatásai nem voltak statisztikailag szignifikánsak ($p=0,569$) a kivatok esetében. Mindazonáltal a kimutatott

downregulációs tulajdonságok elegendőek voltak ahhoz, hogy jótékony hatásokat váltsanak ki a CRC sejtnövekedés ellen (6.9. ábra, 6.10. ábra). A CASPS9, 5-LOX, Bcl2/Bcl-xL és COX-2 relatív génexpresszióinak mechanikus grafikus ábrázolása növekvő AS kivonatkoncentráció mellett. Az azonosított metabolitok a következők voltak: aloenin, ntoxantinok, flavanonok, antrakinonok, aloina és terpenoid.

Diszkusszió

W. somnifera* és *W.ugandensis

A gyökerek és szárkivonatok fitoterápiás hatásai a COX-2 expressziójára

A ciklooxygenáz 1 és 2 (COX-1 és COX-2) sebességkorlátozó enzimek, amelyek részt vesznek az arachidonsav gyulladáshoz vezető prosztaglandinokká történő átalakulásában. A krónikus gyulladás növeli a rák kockázatát. Gyulladás során a COX-2 erősen indukálható. Úgy gondolják, hogy a szelektív COX-2 inhibitorok ugyanolyan gyulladáscsökkentő, lázcsillapító és fájdalomcsillapító hatással rendelkeznek, mint a nem szelektív gátló NSAID-k, minimális gasztrointesztinális mellékhatásokkal vagy egyáltalán nem. Mivel a lipid prosztaglandinok szintézisében részt vevő enzimek, jelentősek a szervezet anyagcsere-aktivitásaiban. Míg a COX-2 hatással van a gyulladáshoz vezető folyamatokra, és jelentős szerepet játszik a gyulladáshoz vezető folyamatokban, addig a COX-1 modulálja a homeosztázist. A vastagbélben a COX-2 alacsony szinten expresszálódik, de stresszes körülmények között citokinek, tumornekrózis faktorok, növekedési faktorok és lipopoliszacharidok befolyásolhatják. A megemelkedett COX-2 szint összefüggésbe hozható a vastagbélrák kialakulásával és terjedésével. Kísérleti vizsgálatunk eredményei azt mutatják, hogy a Caco-2 sejtvonalak WS és WU gyökér- és szárkivonatokon való expozíciója hatására a COX-2 gén expressziója dóziszfüggő módon egyre inkább leszabályozódik, és nagyobb hatásos előnyök figyelhetők meg etanolban és metanolban. oldószeres. A vizsgálatunkban megfigyelt jelentős előny a COX-2 gátlásában a WS és WU gyökereiben és szárában már kialakult biokémiai metabolitok bőséges jelenlétének tulajdonítható. A WS-ben 27-dezoxi-24, 25-dihidro-aneferin A, 27-O-glükopiranozil-viszkózalakton B, 4,16-dihidroxi-5 h, 6h-epoxi-fizagulin D, diacetyl-aferin A, fizagulin D (1→D-6)-gluko-pirán Az (1→4)-h-D-glükopiranozid, a Viscosalactone B, a Withaferin A, a Withanolide-szulfoxid és a Withanoside IV egyaránt szerepet játszanak a COX-2 expressziójának elnyomásában. A WU-ban a terpenoidok, a szeszkviterpenoidok, a tanninok, a flavonoidok, a szaponinok, a muzigadiolok, a szteroidok, a poligodiális és a mannit széles körben szerepet játszanak a COX-2 expressziójának gátlásában. A megfigyelt szabályozó hatást ezért potenciálisan ezek a

gyulladáscsökkentő metabolitok okozzák, amelyek a WU gyökerében és szárában jelen vannak, és a vizsgálatunkban felhasználtuk. A metabolitok, különösen a drimán és koloratán szeszkviterpenoidok koncentrációja nagy mennyiségben fordul elő a szárban, és ez magyarázhatja a szárkivonatokkal elért eredményeinkben elért hatékony szignifikáns különbséget. Nevezetesen, a WS és a WU gyökerei és szárai ezért ígéretes alternatív fitoterápiás COX-2-inhibitorokként szolgálhatnak a szintetikus szerek helyett, amelyekről széles körben beszámoltak, hogy káros hatásokat mutatnak. A CASP9, a mitokondriális kaszpáz útvonal elindítója, fontos mediátor az apoptózis szabályozásában. Ezek az enzimek (kaspázok) egy kaszkád részét képezik, amelyet proapoptotikus mandátumok aktiválnak, és számos peptid disszociációját és sejtfragmentációt eredményeznek. A kaszpáz programozás megértése kritikus fontosságú az apoptózis gyógyászati célú szelektív modulálásához. Az apoptózis létfontosságú élettani folyamat, amely magában foglalja a sejtek szelektív eltávolítását számos biológiai esemény során. Azzal érveltek, hogy a spontán apoptózis elnyomása növeli a rák kockázatát. Ehhez képest a kolorektális adenoma gyakoribb előfordulása szorosan összefügg az apoptózis csökkenésével. Eredményeink azt mutatták, hogy a CASP9 felszabályozása Caco-2 sejtekben változóan ment végbe a gyökerek és szárkivonatok hatására, ami a WS-t és a WU-t az apoptotikus hatás vonzó stimulátoraként mutatja be. Megfigyeltük, hogy a Caco-2 sejtvonalak WS és WU gyökér- és szárkivonatokon való expozíciója során a CASP9 génnek dózisfüggő módon egyre inkább felszabályozódnak, és a nagyobb hatékonyságú előnyöket megfelelően rögzítik a gyökér és szár etanolos és metanolos kivonataiban. kivonatok. Minimális hangsúllyal a legmagasabb szabályozó aktivitást nagyobb koncentrációknál figyelték meg a gyökérkivonatokban a WU-ban, mint a szárkivonatokban. Ez azt jelenti, hogy a gyökérkivonatok jelentős jótékony hatásokat váltottak ki a szárkivonatokhoz képest. A hexán csak gyökérkivonatokban mutatott jelentős extrakciós potenciált.

Az egyik lehetséges kemoprevenációs stratégia az apoptózis indukálása a gasztrointesztinális epitelialis sejtekben. Feltételezik, hogy a természetes apoptózis elnyomása fokozza a rák előfordulását. Hasonlóképpen megfigyelték, hogy a kolorektális adenoma magasabb prevalenciája erősen korrelál az apoptózis alacsonyabb arányával. A kemoprevenáció egyik lehetséges stratégiája az apoptózis kiváltására való képesség a gasztrointesztinális eredetű hámsejtekben. Ennek eredményeként az apoptotikus mechanizmus vizsgálata életképes út a vastag- és végbélrák számára. A II. stádiumú vastagbélrákban szenvedő betegek prognózisának meghatározásakor hasznosnak bizonyulhat az apoptózissal összefüggő CASP9 és CASP10

gének expressziós foka. Úgy tűnik, hogy a kolorektális rák karcinogenezise magában foglalja mind a halál-receptor által közvetített, mind a mitokondriális útvonalakat.

Aloe secundiflora

Az apoptotikus sejthalál szabályozásában a legjobban definiált fehérjecsald a Bcl-2 fehérjecsald, amely anti- és pro-apoptotikus tagokat is tartalmaz. Ennek a családnak az anti-apoptotikus tagjai közé tartozik többek között a Bcl2 és a Bcl-xL. Jelen tanulmányban kizárólagosan igazoltuk, hogy minden kezelésnél a kivonatok (etanolos, hexános és metanolos) Bcl-xL-re és Bcl2-re gyakorolt csökkentő hatásai fokozatosan dózisfüggően befolyásolták. Az összes kivonatkezelés jelentős szabályozó és előnyös tulajdonságokat mutatott, amelyek szükségesek a genetikai expressziót gátló tulajdonságok serkentéséhez. Más kutatók azt is megerősítették, hogy az aloin hatékonyan csökkenti a tumor angiogenezist és növekedését azáltal, hogy blokkolja a STAT3 aktiválását a CRC sejtekben, ami viszont szabályozza az antiapoptotikus fehérje Bcl-xL gén expresszióját. A citoplazmában az egyik látens önjelző transzkripciós faktor a STAT3 (pl. VEGF), amelyet citokinek (például IL-6) és progenitor sejtek aktiválnak. A STAT3 homodimerizációjának és nukleáris transzlokációjának stimulálása modulálja az apoptotikus sejthalál inhibitorokat (például Bcl-xL, Bcl2) és az angiogenezis indukálóit (például VEGF) kódoló reagáló gének transzkripcióját. Ezek a gének szerepet játszanak az emberi védekezés elkerülésében, az angiogenezisben, a metasztatikus terjedésben, a sejtek túlélésében, a differenciálódásban és a programozott sejthalálban. Az elmúlt években rengeteg kutatás igazolta, hogy a konstitutív STAT3 jelátvitel blokkolása lényegesen gátolja a tumor fejlődését és apoptózist vált ki. Ezért elengedhetetlen annak megértése, hogy a Bcl2 és Bcl-xL gátlása kedvező apoptotikus hatásokat vált ki, ami következképpen csökkenti a CRC tumor növekedését. Ez tehát az első olyan tanulmány, amely sikeresen értékelte az AS kivonatainak különböző extrakciós oldószereket használó, a Bcl2 és Bcl-xL expressziójára gyakorolt szabályozó hatásait vastag- és végbélrák sejtvonalakban. Ezekkel az alapvető megállapításokkal összhangban az AS etanolos, hexános és metanolos levélkivonatai erősen ajánlottak további in vivo vizsgálatokhoz és az azt követő klinikai vizsgálatokhoz a CRC terápiás kezelésére emberekből, jelentős jótékony hatásokkal. A vastag- és végbélrákban fokozottan szabályozott 5-LOX expressziójának gátlása a betegség megelőzésében és terápiájában egyaránt hasznos lehet. Kimutatták, hogy az eikozanoidok, mint például a prosztaglandinok, tromboxánok és leukotriének, a sejtbiológia erőteljes autokrin és parakrin szabályozóiként működnek, amikor az arachidonsav, egy többszörösen telítetlen zsírsav, akár a COX-, akár a LOX-útvonalon keresztül metabolizálódik. A tumorsejtek

proliferációja és invazivitása, valamint az immunrendszer felügyeletének elnyomása csak néhány a fiziológiai és patológiás válaszok közül, amelyekről ismert, hogy ezek a vegyszerek befolyásolják. Az arachidonsav útvonalak megcélzása hasznos lehet a CRC és más típusú rosszindulatú daganatok progressziójának késleltetésében, mivel a LOX-ok metabolitokat termelnek az arachidonsav útvonalon, amelyek úgy tűnik, hogy elősegítik a karcinogenezist. Ennek a vizsgálatnak az eredményei kizárólag azt bizonyították, hogy minden kivonatkezelésnél dóziszfüggő módon, de nagyobb jótékony hatást figyeltek meg az etanolos és metanolos kivonatok esetében. Ezenkívül azt is megfigyelték, hogy a hexános kivonatok, bár az etanolos és metanolos kivonatokhoz képest kisebb hatást fejtenek ki, jelentős hatást fejtettek ki, amelyek elegendőek ahhoz, hogy az 5-LOX expresszióját csökkentő jótékony hatásokat váltsanak ki. Bár a prosztaglandinok (PG-k) és más Cox-eredetű metabolitok kapták a legtöbb figyelmet, az új kutatások azt mutatják, hogy a leukotriének (LT-k) és a hidroxikózatetraénsavak (HETE-k), a LOX által katalizált két termék, szintén jelentős biológiai hatással vannak a kezdetekre és a progresszióra. emberi rákos megbetegedések. Számos humán rákos sejtvonalban és szövetben, köztük a vastagbélben, az 5-LOX és metabolitjaik expressziójának növekedését észlelték. Ez a túlzott expresszió szignifikánsan összefügg a tumorsejtek proliferációjával, az apoptózissal szembeni rezisztenciával és az angiogenezissel. Ezenkívül felfedezték, hogy az 5-LOX vagy a 12-LOX közvetlen szuppressziója jelentősen csökkentette a tumorsejtek fejlődését. Az 5-LOX expressziós szintje és a kivonat dóziskoncentrációja közötti szoros összefüggés volt a legjelentősebb felfedezésünk.

AZ ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Legjobb tudomásunk szerint ez az 1. tanulmány, amely a WU gyökér- és szárkivonatok CRC-re gyakorolt hatását értékeli. Ennek fénypontja a különböző dóziskoncentrációk alkalmazása az optimális hatásértékelés érdekében.
2. Legjobb tudomásunk szerint ez az 1. tanulmány, amely összehasonlítja a WU kivonatok hatását, amelyeket 3 különböző extrakciós oldószerrel (hexán, etil-acetát és metanol) nyertek, amelyek mindegyike különböző polaritású, hogy meghatározzák hatékonyságukat a célzott gének modulálásában a CRC jelentős kezelése érdekében.
3. Legjobb tudomásunk szerint ez az 1. tanulmány, amely beszámol a WU gyökér- és szárkivonatok pozitív hatásairól a COX-2, 5-LOX, Bcl-xL, Bcl2 és CASP9 génekre, amelyek alkalmasak a CRC kezelésére.
4. Legjobb tudomásunk szerint ez az 1. tanulmány, amely értékeli és összehasonlítja a WS gyökér- és szárkivonatok hatását 3 különböző extrakciós oldószerrel. Ennek fénypontja ismét a különböző dóziskoncentrációk használata az optimális hatásértékelés érdekében.
5. Legjobb tudomásunk szerint ez az 1. tanulmány, amely a WS gyökér- és szárkivonatok pozitív hatásairól számol be a COX-2, 5-LOX, Bcl-xL, Bcl2 és CASP9 célzott génekre dóziszfüggő módon a jelentős CRC kezelésében.
6. Legjobb tudomásunk szerint ez az 1. tanulmány, amely értékeli az AS levelek hatását az emberi CRC-re. Ennek fénypontja ismét a különböző dóziskoncentrációk használata az optimális hatásértékeléshez.
7. Ez az 1. egyedülálló vizsgálat, amely dóziszfüggő módon összehasonlítja az AS levélkivonatok hatását 3 extrakciós oldószer (hexán, etil-acetát és metanol) használatával.
8. Végül, és legjobb tudomásunk szerint ez az 1. egyedülálló tanulmány, amely beszámol az AS pozitív hatásairól a humán COX-2, 5-LOX, Bcl-xL, Bcl2 és CASP9 génekre.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném kifejezni őszinte elismerésemet témavezetőmnek, Dr. habil. Raposa L. Bencének és Dr. habil. Káposztás Zsoltnak, a tanulmányaim sikeres kivitelezésében és elvégzésében tett fáradhatatlan erőfeszítéseikért. Hálásan köszönöm továbbá Dr. Varjas Timea, Dr. Szabó István és Afshin Zand segítségét, akiknek köszönhetően kutatási képességeimet továbbfejlesztettem és megerősítettem.

Sokat köszönhetek a Pécsi Egyetem Egészségtudományi Kar Egészségtudományi Doktori Iskola munkatársainak is. Mindenekelőtt őszinte elismerésemet fejezem ki Prof. Dr. Kiss Istvánnak, az Egészségtudományi Doktori Iskola vezetőjének és Prof. Dr. Sulyok Endrének, a Doktori Iskola titkárának. Továbbá szeretném kiemelni Dr. Prémusz Viktóriát, Bakonyi Piroska asszonyt, Szentpéteri Csillát és Zsabó Petrát, akiknek adminisztratív képességei a Doktori Iskolában a megkönnyebbülés és a megnyugvás auráját teremtették meg, a rendíthetetlen támogatás és a pozitív eredményekkel előre jelzett bizonyosság révén, amikor csak segítségért folyamodtam.

Továbbá szívből köszönöm a Pécsi Tudományegyetemnek, hogy kölcsönadta a munkám befejezéséhez nagy segítséget jelentő könyvtári tárgyakat, valamint a Tempus Közalapítványnak, hogy a Stipendium Hungaricum ösztöndíj keretében teljes mértékben finanszírozta doktori tanulmányaimat.

A DISSZERTÁCIÓHOZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

1. **John M. Macharia**, Ruth W. Mwangi, István Szabó, Afshin Zand, Zsolt Kaposztas, Tímea Varjas, Nóra Rozmann, Bence L. Raposa, Regulatory activities of *Warbugia ugandensis* ethanolic extracts on colorectal cancer-specific genome expression dose-dependently, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Volume 166, 2023, 115325, ISSN 0753-3322, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115325>
2. **Macharia, J. M.**, Varjas, T., Mwangi, R. W., Káposztás, Z., Rozmann, N., Pintér, M., Wagara, I. N., & Raposa, B. L. (2023). Modulatory Properties of Aloe secundiflora's Methanolic Extracts on Targeted Genes in Colorectal Cancer Management. *Cancers*, 15(20), 5002. <https://doi.org/10.3390/cancers15205002>
3. **Macharia, John M.**, Zsolt Káposztás, and Raposa L. Bence. 2023. Medicinal Characteristics of *Withania somnifera* L. in Colorectal Cancer Management *Pharmaceuticals* 16, no. 7: 915. <https://doi.org/10.3390/ph16070915>, Published with
4. **Macharia, John M.**, Veronica Ngure, Barnabás Emődy, Bence Király, Zsolt Káposztás, Nóra Rozmann, Attila Erdélyi, and Bence Raposa. 2023. Pharmacotherapeutic Potential of *Aloe secundiflora* against Colorectal Cancer Growth and Proliferation. *Pharmaceutics* 15,no.5:1558. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051558>.
5. **John M. Macharia**, Ruth W. Mwangi, Nora Rozmann, Kaposztas Zsolt, Tímea Varjas, Paschal O. Uchechukwu, Isabel N. Wagara, Bence L. Raposa (2022). Medicinal plants with anti-colorectal cancer bioactive compounds: Potential game-changers in colorectal cancer management, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Volume 153, 2022, 113383, ISSN 0753-3322, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113383>.
6. **John M. Macharia**, Ruth W. Mwangi, Nora Rozmann, Isabel N. Wagara, Zsolt Kaposztas, Tímea Varjas, John Mathenge, Raposa L. Bence, A systematic review of selected plants and their metabolites with anticorectal cancer effects, *Phytomedicine Plus*, Volume 2, Issue 4, 2022, 100332, ISSN 2667-0313, <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2022.100332>.
7. **John M. Macharia**, Zsolt Kaposztas, Tímea Varjas, Ferenc Budán, Afshin Zand, Imre Bodnar, Raposa L. Bence, Targeted lactate dehydrogenase genes silencing in probiotic lactic acid bacteria: A possible paradigm shift in colorectal cancer treatment? *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Volume 160, 2023, 114371, ISSN 0753-3322, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114371>.

8. **John M. Macharia**, Lu Zhang, Ruth W. Mwangi, Nora Rozmann, Zsolt Kaposztas, Tímea Varjas, Miklós Sugár, Huda Alfatafta, Márton Pintér, Raposa L. Bence, (2022) Are chemical compounds in medical mushrooms potent against colorectal cancer carcinogenesis and antimicrobial growth? <https://doi.org/10.1186/s12935-022-02798-2>.

A DISSZERTÁCIÓHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

1. **John M. Macharia**, Grace W. Gakenye, Nóra Rozmann, David Onchonga, Ruth W. Mwangi, Zsolt Kaposztas, John M. Mathenge, Dorina Pusztai, Marton Pinter, Miklos Sugar, Bence L. Raposa (2022). An empirical assessment of the factors influencing acceptance of COVID-19 vaccine uptake between Kenyan and Hungarian residing populations: A cross-sectional study, *BMC Springer. Scientific Reports*, <https://doi.org/10.1038/s41598-022-26824-5>,
2. Raposa-Rozmann, N., Fusz, K., Bodnár, I., Madarász, I., Deák, A., **Macharia, J.**, and Raposa, B. "Cross-sectional study of the stress level and sleep quality of nurses during the COVID-19 during a pandemic". *Multidisciplinary Health and Well-Being* , Vol. 1, no. 3, September 2023, p. 5-23, doi:10.58701/mej.11084.
3. [Márton Pintér, Tímea Varjas, John M. Macharia, Nóra Rozmann, Miklós Sugár, Bence László Raposa. Assessment of teachers' knowledge, preparation, and willingness to help in the event of a food allergic reaction, NEW DIET: JOURNAL OF HUNGARIAN DIETETICS \(2001-\) 32 : 3 pp. 19-23. , 5 p. \(2023\).](#)
4. Zand, Afshin, Sodbuyan Enkhbilguun, **John M. Macharia**, Ferenc Budán, Zoltán Gyöngyi, and Tímea Varjas. 2023. "Tartrazine Modifies the Activity of DNMT and HDAC Genes—Is This a Link between Cancer and Neurological Disorders?" *Nutrients* 15, no. 13: 2946. <https://doi.org/10.3390/nu15132946>.
5. M. Sugár, K. Fusz, D. Pusztai, N. Rozmann, **J.M. Macharia**, M. Pintér and B. Raposa (2022). A survey of changes in taste and food preferences related to the coronavirus disease (COVID-19) in Hungary, *Acta Alimentaria*. DOI: <https://doi.org/10.1556/066.2022.00184>
6. Dorina Pusztai, **John M. Macharia**, Nóra Rozmann, Márton Pintér, Miklós Sugár, Dr. Judit Turcsán, Ildikó Madarász, Dr. Bence L. Raposa. Assessing the health behavior and lifestyle habits of foreign students during the COVID-19 pandemic *NEW DIET: JOURNAL OF HUNGARIAN DIETETICS (2001-) 31 : 3 pp. 20-23. , 4 p. (2022)* Scientific.

7. N Rozmann, J Turcsán, D Pusztai, M Sugár, **J Macharia**, A Pakai, M Pintér, I Boncz, B Raposa L., PCR50 Survey on the Management of Viral Diarrhoea Among Young Children in Hungary, Value in Health, Volume 25, Issue 7, Supplement, 2022, Page S550, ISSN 1098-3015, <https://doi.org/10.1016/j.jval.2022.04.1395>.
8. Bence László Raposa, **John M. Macharia**, Judit Turcsán, Nora Rozmann, Varjas Tímea, Doma Valentina, Zsolt cabbage. Significance of microbiome composition in the prevention of colorectal tumors, NEW DIET: THE MAGAZINE OF HUNGARIAN DIETETICS (2001-) 29 : 3-4 pp. 12-14. , 3 p. (2020)
9. Bence Raposa, Csaba Melczer1, Nóra Rozmann1, Tímea Károlyi, Gyula Takacs, Valentina Doma, Viktoria Premusz, Márton Pintér, **John Macharia**, Pongrác Ács. (2020). Investigation Of Physical Activity And Sports Consumption Habits In University Students. DOI: [10.5114/hpc.2020.97897](https://doi.org/10.5114/hpc.2020.97897)
10. B. Raposa, E. Antal, **J. Macharia**, M. Pintér, N. Rozmann, D. Pusztai, M. Sugár, D. Bánáti. The issue of acidity and alkalinity in our diet - facts, popular beliefs and the reality *Acta Alimentaria: An International Journal Of Food Science* (2022) Scientific. Published
11. Mwangi, R. W., **Macharia, J. M.**, Wagara, I. N., & Bence, R. L. (2021). The medicinal properties of Cassia fistula L: A review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 144, 112240. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112240>
12. Mwangi, R. W., **Macharia, J. M.**, Wagara, I. N., & Bence, R. L. (2022). The antioxidant potential of different edible and medicinal mushrooms, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 147(January), 112621. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112621>.
13. Raposa László Bence, **John M. Macharia**, Turcsán Judit, Rozmann Nora, Varjas Tímea ,Doma Valentina, Zsol Káposztá. The importance of the composition of the microbiome in the prevention of colorectal tumors, New diet: the magazine of hungarian dietetics, ISSN 1587-169X, (2001-) 29 : 3-4 pp. 12-14. , 3 p. (2020)
14. Lu Zhang, Éva Pozsgai, Yongan Song, **John Macharia**, Huda Alfatafta, Jia Zheng, Zhaoyi Li, Hongbo Liu and István Kiss (2023). The relationship between single nucleotide polymorphisms and skin cancer susceptibility: A systematic review and network meta-analysis. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1094309>
15. Ruth, Wambui Mwangi; **John, Macharia**; Isabel, Wagara; Raposa, Bence. The Medicinal Properties of Cassia fistula L: A Potential Game Changer in the Field of Medicine, Online edition, International: Eliva Press (2022), 43 p. ISBN: 9781636485782 (**BOOK**)