

Pécsi Tudományegyetem
Egészségtudományi Kar
Egészségtudományi Doktori Iskola
Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Kiss István
Programvezető: Prof. Dr. Kiss István
Témavezető: Dr. Varjas Tímea

A tartrazin, betanin és kurkumin hatásának vizsgálata a DNS metil-transzferáz és hiszton-dezacetiláz enzimek génexpressziójára *in vivo* és *in vitro*

PhD értekezés tézisei

Dr. Zand Afshin



Pécs, 2024

1. Bevezetés

Élelmiszerszínezékeket i.e. 1500 óta széles körben használnak, és napjainkban is kulcsfontosságúak az élelmiszer-előállítók számára a fogyasztói preferenciák tekintetében. A színezékek közül a mesterséges eredetűek különösen népszerűek stabilitásuk, költséghatékonyságuk és élénk színek kölcsönzésére való képességük miatt. A különféle típusokban és színekben kapható mesterséges adalékanyagok gyakran titokban kerülnek be étrendünkbe, hangsúlyozva biológiai hatásuk feltárásának alapvető szükségességét. Az egészségünkre gyakorolt lehetséges hatások megértése létfontosságú ahhoz, hogy jól megalapozott döntéseket hozzunk arról, hogy mit fogyasztunk. A színező adalékanyagok számos fő funkciót látnak el az élelmiszerekben:

- 1) Ellensúlyozzák az olyan tényezők által kiváltott színvesztést, mint a fény, a levegő, a hőmérséklet és a tárolási körülmények.
- 2) Feladatuk a természetes tónusok fokozása az étel vizuális vonzerejének és étvágygerjesztő jellegének növelése érdekében.
- 3) Szín hozzáadása olyan élelmiszerekhez, amelyekből ez természetesen hiányzik.
- 4) A termékek vizuális azonosításának megkönnyítése a fogyasztók számára, különösen a gyógyszeriparban.

Az utóbbi időben egyre nagyobb figyelem irányul az élelmiszer-adalékanyagok, különösen az élénk színekről híres azofestékek lehetséges toxicitására. A használatukat korlátozó elsődleges aggodalom a rákkeltő hatások lehetősége miatt fontos. Ez a kockázat akkor merül fel, amikor ezek a színezékek a bélmikrobióta által azoredukción mennek keresztül, és rákkeltő melléktermékeket képeznek.

Ebben a kutatásban bemutatjuk a tartrazin (E 102) negatív hatását epigenetikai szabályozását közvetítő kulcsfontosságú enzimek a génexpressziójára, nevezetesen a DNS-metiltranszferázokra (*DNMT*) és a hiszton-deacetilázokra (*HDAC*) *in vivo* - NMRI egérmodellben - és *in vitro* vizsgálatokban, különböző humán sejtvonalakon (HepG2, A549, HaCaT). Másik célunk a természetes színezékként engedélyezett betanin (E 162) és a kurkumin (E 100) dóziszfüggő esetleges kemoprotektív hatásának mérése fent említett humán sejtvonalakon, UV expozíció mellett és nélküle a *DNMT* és a *HDAC* enzimeket kódoló gének mRNS szintjére.

2. Célkitűzések

1. Jelen kutatásunkban az általánosan használt élelmiszer-adalékanyagok, pontosabban természetes eredetű és mesterséges élelmiszer-színezékek (kurkumin (E 100) tartrazin (E 102) céklavörös, betanin (E 162) örökletes és nem öröklődő epigenetikai változásainak hatását kívánjuk nyomon követni és mérni, humán karcinóma sejtvonalakon (HepG2, A549), normál immortalizált sejtvonalon (HaCat), valamint állatmodellben.

Célunk a DNMT és HDAC enzimsaládok mRNS expressziós szintjének felmérése a fent említett sejtvonalakban, a housekeeping génhez (HPRT1) viszonyítva, mind in vivo, NMRI egerek qRT-PCR segítségével. Ehhez a vizsgálathoz különböző koncentrációjú természetes és mesterséges élelmiszer-színezékeket alkalmazunk.

1. Az egyik cél a tartrazin és a HDAC2, HDAC3, HDAC8, valamint a DNMT1, DNMT3a és DNMT3b expressziós szintje közötti kapcsolat vizsgálata Q-RT-PCR elemzéssel humán sejtvonalakon. Ezek közé tartoznak mind a normál, mind a rákos szövetekből származók, hogy értékeljék, vannak-e különbségek az expressziós mintázatokban, mint például a humán hepatocelluláris karcinóma (HepG2), a tüdő adenokarcinóma (A549) és az immortalizált keratinocita (HaCaT) sejtvonalak.
 - a. Hipotézisünk szerint a vizsgált gének expressziós mintázata jelentősen el fog térni a kezeletlen kontrollokétól. Ez várhatóan bizonyos gének promoter régióiban a metiláció mértékével függ össze.
 - b. Azt állítjuk, hogy meg tudjuk állapítani azt a minimális koncentrációt, amelynél a mono-azofesték élelmiszer-színezékek növelik a HDAC-k és a DNMT-k mRNS-szintjét mind a daganatos, mind a normál sejtvonalakban.
2. Második célunk a tartrazin által okozott és a HDAC2, HDAC3, HDAC8, valamint DNMT1, DNMT3a és DNMT3b expressziós változás felmérése qRT-PCR segítségével fiatal hím és nőstény egerek tüdejében, veséjében, májában és lépében. A vizsgálat során különböző expozíciós időket alkalmazunk, s modellezzük a hőkezelés hatását is.
 - a. Hipotézisünk szerint mind a DNMT-ok, mind HDAC-ok mRNS szinten expresszióváltozással reagálnak a tartrazin különböző idejű expozíciójára a kísérleti állatok szerveiben
 - b. Feltételezzük, hogy a hőkezelés hatása korrelál az egerek szerveiben mérhető génexpresszió változással.

3. Harmadik célunk a természetes élelmiszer-színezékként alkalmazott kurkumin és a betanin génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata daganatos sejtvonalakon - humán hepatocelluláris karcinóma (HepG2), a tüdő adenokarcinóma (A549) -, és az immortalizált keratinocita (HaCaT) sejtvonalon különböző koncentrációkban UV expozíció, mint oxidatív stressz okozó faktor hatása mellett.
 - a. Feltételezzük, hogy ellentétben a tartazinnal a természetes eredetű színezékek nem változtatják meg a génexpressziós mintázatokat a DNMT-ok és HDAC-ok esetén
 - b. Hipotézisünk szerint a betanin és a curcumin az UV sugárzás hatására kialakuló mRNS szint változásokat dóziszfüggő módon csökkenti
4. Betanin esetén célunk meghatározni az UV sugárzás és a betanin kezelés DNS töredezettségre gyakorolt együttes hatását HaCaT sejtvonalon
 - a. Feltételezésünk szerint az UV sugárzás hatására dóziszfüggő módon megemelkedik a DNS töredezettség mértéke
 - b. Hipotézisünk szerint ezen megemelkedett DNS töredezettséget a sejtenyészetbe adagolt betanin a normál szintre csökkenti

3. Anyag és módszer

3.1. *In vivo* kezelési protokoll és total RNS izolálás

A kísérleti csoportban a 6-8 hetes hím és nőstény NMRI egerek olyan rágesálótápot fogyasztottak, amely egyszeres mennyiségben tartalmazott a az ADI-nak megfelelő a humán ekvivalens dózis tartrazint (humán ADI = 7,5 mg/kg/nap, ami 1,845 mg/nap tartrazinnak felel meg, egy egér esetében átlagos testtömeg 20 g) hőkezelt és hőkezelés nélkül állapotban 30 és 90 napig. A kijelölt kezelési időszakot követően cervicalis dislocatio-t követően az állatokat felboncoltuk, szerveiket kiemeltük, mintát vettünk belőlük, majd total RNS-t izoláltunk ExtraZol Tri-reagens protokoll szerint (tüdő, máj, vese és a lép).

3.2. *In vitro* kezelési protokoll és total RNS izolálás.

A felszaporított, friss tápfolyadékkal feltöltött sejtkultúrát (A549, HepG2, HaCaT sejtvonalak) élelmiszer-színezék (tartrazin, betanin vagy kurkumin) törzsoldat adott mennyiségével kezeltük, hogy elérjük a 20, 40, 80 μM végső koncentrációt. A kezelést követően betanin és kurkumin esetén 15, 30 és 60 s UV sugárzásnak is kitettük a kezelt és kontroll sejtenyészeteket.

A sejtenyészeteket 37 °C-on 24 órán át inkubáltuk. Az inkubáció után a sejtek állapotát fénymikroszkóppal ellenőriztük, majd RNS-t izoláltuk. A betanin HaCat sejtekre gyakorolt fényvédő hatásával kapcsolatos kutatásainhoz Maxwell® RSC Instrument (Promega, Wisconsin, USA) készülékben a hozzá tervezett kittel (Maxwell® RSC RNS FFPE Kit, AS1440, Promega, Wisconsin, USA) izoláltunk total RNS-t. A többi kísérletünkben RNS izolálást ExtraZol Tri-reagens (Nucleotest Bio Kft) protokolljának megfelelően végeztük.

3.3. Q-RT-PCR protokoll

A mRNS expresszió Roche 480 készüléken végeztük, KAPA SYBR FAST One-Step qRT-PCR Master Mix (Sigma) illetve qPCRBIO SyGreen 1-Step Go Lo-ROX (NucleotestBio) egy lépéses kettekkel az alábbi protokoll szerint: 20 µl-es reakciótérfogatban dolgoztunk. A reakcióelegy 5 µl RNS-t (50-100 ng között), 10 µl master mix-et, 0,4 µl RT mixet, 0,4 µl dUTP-t, 0,8 µl primer mixet és 3,8 µl steril, kétszer desztillált vizet tartalmazott. A hőprogram profil a következő volt: 5 perces hőtartás 42 °C-on a reverz transzkripcióhoz, 3 perc denaturál/ enzimaktiváló lépés után 45 cikluson keresztül 95 °C-on 10 másodpercig (denaturáció), 60 °C-on 20 másodpercig (primer bekötődés és szintézis). A minőségétolvasási görbe felvételével ellenőriztük, a program 0,5 °C-kal növelte a hőmérsékletet 80 cikluson keresztül, az 55,0 °C-os beállított hőmérséklettől kezdve, minden ciklus 10 másodpercig tart. A felhasznált primereket Primer Express szoftverrel terveztük, és az IDT szintetizálta.

Meghatároztuk a DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, HDAC2, HDAC3, HDAC5 és HDAC6 génekről expresszált mRNS szintet, a belső kontrol – HPRT1 – mellett. A Roche 480-as PCR gép kezelő szoftvere által meghatározott Cp értékek segítségével a $2^{-\Delta\Delta C_p}$ módszerrel határoztuk meg a relatív génexpressziókat (Livak módszer).

3.4. Statisztikai analízis

Kolmogorov–Smirnov tesztet használtunk az eloszlás és a szórás meghatározására. A Q-PCR eredményeket a Levene-féle F-teszt post hoc elemzések követték (ANOVA: Scheffe és LSD) f Az comet assay adatok elemzése során a statisztikai értékeléshez Mann–Whitney és Kruskal–Wallis teszteket használtunk. Minden statisztikai értékelést az IBM SPSS Statistics Version 26.0 for Windows (Armonk, NY, USA) segítségével végeztünk, a szignifikancia meghatározása $p < 0,05$ értékkel történt.

4. Eredmények

4.1. *In vivo* kísérletek eredményei

NMRI egereken végzett vizsgálatban megfigyeltük, hogy a tartrazin fokozza az epigenetikai változásokkal kapcsolatba hozható enzimek, a DNS-metil transzferázok és hiszton-deacetilázok, expresszióját mRNS szinten különböző szervekben (lép, máj, tüdő és vese).

A tartrazin kezelés időtartama és a táp hőkezelése eltérően befolyásolta a génextpressziót ezen enzimeket kódoló génekről. A DNMT1 fokozott expressziót mutatott a legtöbb szervben hosszan tartó és magas hőmérsékleten kezelt tartrazin tartalmú táp, mint kezelés hatására. A DNMT3a expressziója jelentősen megemelkedett több szervben az azofesték kezelés hatására, az expozíció különböző időtartama mellett. A DNMT3b expressziója kevésbé konzisztens változásokat mutatott, de bizonyos szervekben jelentősen megnőtt hosszabb expozíciós idő vagy magas hőmérsékletű tartrazin kezelések esetén. Összességében úgy tűnt, hogy a vizsgált élelmiszer színezék expozíció befolyásolja ezen epigenetikai enzimek expresszióját, a speciális táp fogyasztásának időtartamától és a táp hőkezelésétől függően.

Vizsgáltuk a tartrazin hatását az egerek különböző szerveiben, a hiszton-deacetiláz enzimeket kódoló gének expressziós mintájára (HDAC2, HDAC3 és HDAC8). Ezen mRNS-ek megnövekedett szintjét figyelték meg a lépben, a májban, a tüdőben és a vesében 30 és 90 napos kezelést követően a nem hőkezelt tartrazin tartalmú táp fogyasztása után. A magas hőmérsékleten kezelt tartrazin tartalmú tápot fogyasztó egerek szerveiben a HDAC2 mRNS szint szignifikáns emelkedést mutatott a vizsgált szervekben. A HDAC3 expresszióját, bár általában alacsonyabb, mint a HDAC2, az azofesték jelentősen megnövelte, különösen a májban és a tüdőben 90 nap után. A HDAC8 expressziója a vesék kivételével a többi szervben megnövekedett szobahőmérsékletű tartrazin expozíció mellett, és változatos választ mutatott a megnövekedett kezelési időtartam mellett. Összességében a tanulmány azt jelzi, hogy a tartrazin befolyásolta a HDAC család géneinek aktivitását az összes vizsgált szervben, a kezelés időtartamától, a szervtől és a vizsgált géntől függően eltérő erősséggel.

4.2. *In vitro* kísérletek eredményei

Tartrazin

A kutatás az epigenetikai folyamatok szabályozásában szerepet játszó enzimek (*DNMT1*, *DNMT3a* és *DNMT3b*) mRNS expressziós szintjének felmérésére összpontosított HaCaT, HepG2 és A549 sejtenyészetekben tartrazin expozíció

hatására. A tartrazin expozíció (20-80 μM) szignifikánsan növelte a DNMT1 gén expresszióját az vizsgált sejtvonalakban. A HaCaT és HepG2 sejtenyészetben az emelkedés dózisfüggő volt, míg az A549 sejtek következetes 3-szoros növekedést mutattak.

A DNMT3a elemzése dózisfüggő és statisztikailag szignifikáns génexpresszió növekedést mutatott a HaCaT sejtvonalban, emelkedő koncentrációjú tartrazin expozíció mellett. Figyelemre méltó 3-szoros emelkedést figyeltünk meg 80 μM -nál a kontrollhoz képest. Hasonlóképpen, a HepG2 sejtvonal jelentős dózisfüggő emelkedést mutatott a DNMT3a expressziójában, 2-4-szeres tartományban. Az A549 sejtvonalban a génexpresszió szignifikáns, háromszoros növekedését figyelhettük meg minden vizsgált tartrazin koncentráció mellett. A tartrazin expozíció hatására a DNMT3b megnövekedett szintjéhez vezetett az összes vizsgált sejtvonalban. A HaCaT sejtekben a génexpresszió dózisfüggő növekedést mutatott, 80 μM -nál körülbelül hatszorosára emelkedett a kontrollhoz képest. A HepG2 sejtek esetén a génexpressziók szignifikáns emelkedett értéket mutattak, 4-szeres növekedéssel a kontrollhoz képest. Az A549 sejtvonalban a DNMT3b expressziója közel 8-szoros növekedést mértünk 80 μM -os expozíciónál, 2-szer, illetve 4-szer magasabb expressziót mutatott a 40 μM és 20 μM koncentrációk esetén.

A tartrazin HDAC5 génexpresszióra gyakorolt hatásának értékelése során HaCaT és HepG2 sejtvonalakban közel négyszeres szignifikáns növekedést figyeltünk meg 20 μM -nál, és az expresszió magasabb koncentrációknál is mutatkozott. Az A549 sejtekben a HDAC5 génexpresszió közel hatszoros növekedést ért el 80 μM azofesték expozíció után. A HDAC5 expresszióhoz hasonló mintázatot figyeltünk meg a HDAC6 génben a HaCaT és HepG2 sejtvonalakban, közel négyszeres óverexpresszióval. Az A549 sejtvonalon 20 μM és 40 μM tartrazin expozíciót követően négyszeres túlexpressziót figyeltünk meg, és jelentős, ötszörös növekedést figyeltünk meg 80 μM élelmiszer színezék expozíció után.

Betanin

Az eredmények azt mutatták, hogy a betanin befolyásolta a HDAC és DNMT géncsaládban vizsgált gének expresszióját, bizonyítva fényvédő hatását. Ezen túlmenően, a DNMT3b és a HDAC6 korai válasz gének lehetnek a betanin kezelésre még rövid ideig tartó sugárzás után is.

Comet assay kísérleteink során azt figyeltük meg, hogy a HaCaT sejtvonalban a DNS léziók (tail moment) értéke szignifikánsan megnőtt UV sugárzás hatására kétszeresére, illetve közel négyszeresére 15 másodperc, illetve 60 másodperc UV expozíció után. A

betanin kezelés dóziszfüggően javította a tail moment értékének növekedését 15, 30 60 másodperces UV besugárzás mellett. A legjelentősebb csökkenést a 80 μM betaninnal kezelt csoportban észleltük a 30 másodperces pozitív kontrollcsoporthoz képest. A 20, 40 és 80 μM betanin kezelés azonban dóziszfüggő módon szignifikánsan csökkentette a faroknyomatékokat 60 másodperces UV besugárzás után, ami a legnagyobb növekedést jelentette.

Kurkumin

HaCat sejtvonala

Meghatároztuk a különböző időtartamú UV kezelés valamint kurkumin különböző koncentrációinak hatására bekövetkező génexpresszió változásokat (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, HDAC5 és HDAC6). Összességében az UV expozíció növelte a vizsgált géneknek, nevezetesen a DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, HDAC5 és HDAC6 expresszióját. Azonban a kurkumin, 20, 40 és 80 $\mu\text{M}/\text{ml}$ koncentrációban, dóziszfüggő módon csökkentette az UV kezelés által kiváltott fokozott génexpressziót ezekben a génekben, kivéve bizonyos DNMT3a és HDAC6 expressziós eseteket, ahol a kurkumin hatásait hosszabb UV expozíciónál figyelték meg.

HepG2 sejtvonala

Jelen fejezetben a hepatocelluláris karcinóma sejtvonalon a különböző időtartamú UV kezelés és a kurkumin génexpresszióra gyakorolt hatásait tárgyaljuk. A DNMT1 expressziója megemelkedett az UV expozíció hatására, amelyet a kurkumin csökkentett, különösen hosszabb expozíció esetén. A DNMT3a expressziója is emelkedett szintet mutatott a 30 és a 60 másodperces UV kezelések hatására, a kurkumin azonban nem befolyásolta ezt szignifikánsan. A DNMT3b expressziója nőtt az UV expozíció hatására, és a kurkumin szignifikánsan csökkentette, különösen rövidebb expozíció esetén. A HDAC5 mRNS szint szintén nőtt az UV expozíció hatására, a kurkumin pedig különböző mértékben csökkentette azt az expozíciós idők során. A HDAC6 megemelkedett az UV expozíció hatására, és a kurkumin általában csökkentette, különösen rövidebb expozíció esetén, szignifikáns különbséget tapasztaltunk 60 s-os UV expozíciós esetet, ahol a különböző kurkumin koncentrációk hatékonyak voltak.

A549 sejtvonala

A 20, 40 és 80 $\mu\text{M}/\text{ml}$ kurkumint tartalmazó A549 sejtenyészetekben szignifikánsan alacsonyabb a DNMT1 expresszió a DMSO-s kontrollhoz valamint az UV sugárzással kezelt csoportokhoz képest. A DNMT3a expresszióját a kurkumin csökkentette az UV-

kezelt csoportokban, míg a DNMT3b expressziója nőtt a hosszabb UV-expozícióval, de a kurkumin kezelés ezt lecsökkentette. A HDAC5 expressziója megemelkedett a UV-expozícióval dózisfüggően, mely csökkent a kurkumin hatására ezekben a csoportokban. A HDAC6 expressziója szintén emelkedett volt a különböző időtartamú UV-expozíció hatására, és a kurkumin kezelés csökkentette dózisfüggő módon az összes UV-kezelt csoportban.

5. Összefoglalás

5.1. Tartazin hatása sejtvonalon és állatkísérletes teszrendszerben

Első kísérletünkben a tartrazin – az élelmiszerekben és kozmetikumokban általánosan használt azofesték – epigenetikai változásokban szerepet játszó gének expressziójára gyakorolt hatását vizsgáltuk kísérleti állatok különböző szerveiben. A tartrazin elfogadható napi beviteli (ADI) szinten potenciális kockázatokat mutatott a DNS-károsodással, az oxidatív stresszel és a biokémiai profilok megváltozásával kapcsolatban olyan szervekben, mint a máj és a vese. Azt találtuk, hogy a tartrazin növeli a *DNMT-k* és *HDAC-k* mRNS szintű expresszióját, e folyamatok potenciálisan DNS-hipermetilációhoz és ezen keresztül különféle egészségügyi következményekhez vezethet.

A tartrazin metabolitjai összefüggésbe hozhatók az oxidatív stresszel, a gyulladással és a megváltozott biokémiai markerekkel a patkányok máj- és veseszövetében, amely aggodalmat kelt a szervek egészségére gyakorolt hatása miatt. Ezenkívül vannak olyan tanulmányok, melyek szerint a tartrazin negatív hatással lehet a tüdőre, potenciálisan súlyosbíthatja a légzőszervi betegségeket, például az asztmát azáltal, hogy oxidatív stresszt, gyulladást és gyulladást elősegítő tényezőket idéz elő. Bár az eredmények korlátozottak, egyes tanulmányok utalnak arra, hogy a tartrazin befolyásolhatja a neurológiai funkciót, mivel képes átjutni a vér-agy gáton, és hatással van a DNMT-kre és a HDAC-kra. Ez az összefüggés további vizsgálatokat tesz szükségessé a tartrazin potenciális hosszú távú agyműködésre gyakorolt hatásával kapcsolatban, különösen a jelenlegi szabályozási határokon belüli napi dózisok mellett.

Az eredményeink felhívják a figyelmet a tartrazin fogyasztásával összefüggő lehetséges kockázatokra, még az ADI szinten is, és ezért a közeljövőben átfogó kutatásra van szükség annak érdekében, hogy megértsük a tartrazin különböző szervrendszerekre, köztük az idegrendszerre gyakorolt hatásaira, valamint lehetséges szerepét olyan a neurológiai rendellenességekben és a viselkedési zavarokban.

5.2. *Betanin hatása HaCat sejtvonalon*

Jelen kísérlet a DNS-metiláció kromatin-stabilitásban, génexpresszióban és genetikai imprintingben betöltött jelentőségére összpontosított, különös tekintettel a DNS-metiltranszferázokra (DNMT), mint a DNMT1, DNMT3A és DNMT3B. A kutatások azt mutatják, hogy a DNMT enzimek alacsony szintje hozzájárulnak a daganatok kialakulásához, összekapcsolva az epigenetikai változásokat a karcinogenezissel. Míg az UV-sugárzás DNS-mutációkra gyakorolt hatása ismert, az epigenetikai változásokkal (epimutációkkal) való kapcsolata továbbra is tisztázatlan, bár az UV-sugárzás megváltoztathatja a DNS-metilációt a bőrsejtekben.

Kutatásaink kifejezetten rávilágítanak a betanin kezelés előnyeire HaCaT sejtenyészetekben, megmutatva, hogy képes csökkenteni a DNMT1, DNMT3A és DNMT3B mRNS szintű expresszióját. A betanin magas koncentrációjú kezelés sugárvédő hatást fejtett ki azáltal, hogy gátolta ezen célgéneket, potenciálisan ellensúlyozva az UV-sugárzás által kiváltott fotokarcinogenezist és az ahhoz kapcsolódó epigenetikai módosulásokat.

Ezenkívül a tanulmány hangsúlyozza a DNMT3A és a DNMT3B szerepét az embriogenezisben és a rák kialakulásában, összekapcsolva a megnövekedett DNMT-expressziót a sejtmitózissal és a karcinogenezissel. A betanint ígéretes fényvédő vegyületként mutatják be az UV-sugárzás ellen, hatékonyan csökkentve a DNMT géneket.

A kutatás kiterjed a hiszton-dezacetilázokra (HDAC), különösen a HDAC5-re és a HDAC6-ra is, megvitatva a sejtfunkciókban és betegségekben betöltött szerepüket. A betaninról kiderült, hogy a HDAC5 és HDAC6 hatékony inhibitora, jelezve, hogy terápiás ágens lehet, és fényvédő immunválaszt kínál az UV-sugárzással szemben.

Összefoglalva, a tanulmány aláhúzza a DNS-metiláció és a hiszton-dezacetiláció hatását a génszabályozásban és a betegségek kialakulásában, és a betanint ígéretes szerként mutatja be az epigenetikai folyamatok modulálására és az UV-sugárzás káros hatásainak ellensúlyozására.

5.3. *Kurkumin vizsgálata HaCat, HepG2 és A 549 sejtvonalakon*

Kutatásunkban a fókusz a kurkumból származó kurkumin UV-sugárzás hatására a különböző sejtvonalak génexpressziós mintázataira gyakorolt hatásának elemzésén volt. A tanulmányunkban megállapítottuk, hogy a kurkumin kezelés jelentősen ellensúlyozta az UV-sugárzás által kiváltott génexpresszió növekedést különböző sejtvonalakban.

- HaCat sejtekben a kurkumin elnyomta a géneexpresszió UV-sugárzás által kiváltott géneexpressz növekedését.
- A HepG2 sejtekben az UV sugárzással összefüggő specifikus gének mRNS-szintje csökkent kurkumin kezelés hatására.
- Az A549 tüdő adenokarcinóma sejtek fokozott géneexpressziót mutattak UV sugárzás hatására, melyet a kurkumin dózisfüggő módon képes elnyomni.

Huiyang Deng és munkatársainak és más szerzők tanulmányai rávilágítottak arra, hogy a kurkumin képes megvédeni az UV-sugárzás által kiváltott fotoöregedést a HaCat sejtekben az antioxidáns védelem és az NRF2 jelátviteli útvonalak mentén. Eközben Masumeh Sanaei és csapata kutatása feltárta a HDAC-inhibitorok hatását a hepatocelluláris karcinóma sejtekben az apoptózis kiváltására, és kimutatta, hogy a valproinsav-kezelés specifikus útvonalak aktiválásával apoptózist vált ki.

Összességében ezek az eredmények azt sugallják, hogy a kurkumin védő hatást fejthet ki az UV-sugárzás által kiváltott károsodásokkal szemben, és hogy a HDAC-inhibitorok, mint a valproinsav, potenciálisan apoptózist indukálhatnak bizonyos rákos sejtekben.

Egy közelmúltbeli kutatásban Youwei Zhang és munkatársai az epigallocatechin-3-gallate (EGCG) hatását vizsgálták a ciszplatinnal szemben rezisztens kissejtes tüdőráksejtekre. Az EGCG-vel, majd ciszplatinnal végzett előkezelés jelentős tumorgátlást eredményezett *in vivo*, ami arra utal, hogy az EGCG által kiváltott demetiláció új terápiás megközelítést kínálhat a ciszplatin-rezisztens sejtek számára.

Ezenkívül a ez a tanulmány kiemelte, hogy a hasnyálmirigy-sejtvonalak emelkedett NFκB szintje növelte a DNMT-1 expresszióját. A hasnyálmirigyrákban elterjedt NFκB megcélzása akadályozhatja a DNMT-1 és a metilációs folyamatokat. Az NFκB gátlásáról ismert kurkumin e tekintetben ígéretes.

Az eredmények együttesen alátámasztják azt az elképzelést, hogy a kurkumin, ami egy gyakori élelmiszer-eredetű anyag, ellensúlyozhatja a rákkeltő anyagok hatását a különböző sejtvonalakban és koncentrációkban. Potenciális kemopreventív ágensként csökkentheti a rák kialakulásának kockázatát. Az *in vitro* eredmények *in vivo* körülményekre történő átültetése azonban kihívást jelent a kurkumin korlátozott vízoldhatósága és alacsony koncentrációja miatt, abban az esetben, ha élelmiszerfestékként használják. A folyamatban lévő kísérletek célja az adagolási módszerek, például a nano-kurkumin készítmények javítása, hogy potenciálisan fokozzák kemopreventív hatásait még alacsonyabb dózisok mellett is.

6. Új eredmények

6.1. *A tartrazin epigenetikai változást okozhat állatmodellben*

Miután a kísérleti állatokat a tartrazin humán ADI értékének megfelelő ekvivalens dózisban kezeltük (30 és 90 napig), a HDAC és a DNMT családon belül az összes tesztelt gén expressziójában mRNS szinten változást észleltünk a kísérleti állatok vizsgált szerveiben (máj, lép, tüdő vesék), a kontroll állatokhoz képest. A válasz intenzitása az kezelés hosszától, szervtől és géntől függően változott.

6.2. *Különböző humán sejtvonalakban a tartrazin DNMT-k és HDAC-k túlzott expresszióját okozhatja mRNS szinten*

Vizsgálatunkban a tartrazin különböző koncentrációinak hatását vizsgáltuk humán sejtvonalakon, (HaCat, HepG2 A549). Felmértük a DNMT és HDAC gének expressziós szintjét a HPRT1 housekeeping génnel összehasonlítva. Eredményeink azt mutatják, hogy az említett gének expressziós szintje szignifikáns növekedést mutat a tartrazin hatására. Magasabb koncentrációknál ez a növekedés akár a nyolcszorosát is elérheti a vizsgált sejtvonalakban.

6.3. *A betanin enyhíti az epigenetikai folyamatokat és az UV-indukált DNS-törést HaCaT sejtekben: jelentősége lehet a bőrrák kemoprevencióban.*

A betaninnal végzett kezelés dóziszfüggően csökkentette a DNS-károsodást a 30 és 60 másodperces UV-sugárzásnak kitett sejtekben. A vizsgált koncentráció-tartományon belül a betanin nem mutatott toxicitást (20-80 μM). Ez a megállapítás arra utalt, hogy a betanin potenciális védőfaktor lehet az UV-indukált DNS-károsodás ellen azáltal, hogy epigenetikai mechanizmusokon keresztül újraaktiválja a keratinociták elnémított tumorszuppresszor génjeit.

6.4. *A kurkumin modulálja az UV sugárzás által kiváltott génextpressziós változásokat, feltételezett kemopreventív tulajdonságokat mutat humán sejtvonalakban*

A tanulmányunkban azt találtuk, hogy a kurkumin önmagában nem befolyásolta a génextpressziót, de a 15, 30 és 60 másodpercig tartó UV-sugárzás hatására a DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, HDAC5 és HDAC6 gének expressziója megnőtt. A 20, 40 és 80 $\mu\text{M/ml}$ -es kurkumin adagolása dóziszfüggően csökkentette ezeket az emelkedett génextpressziókat. Az eredmények az UV-expozíció időtartamától függően változtak a HaCat, HepG2, A549 sejtvonalakban.

7. Köszönetnyilvánítás

Mélységes köszönetemet szeretném kifejezni dr. Varjas Tímeának, a témavezetőmnek. Megingathatatlan támogatása, folyamatos útmutatása, gazdag tapasztalata és mélyreható tudása nagyban hozzájárult a Ph.D. disszertációm sikeres befejezéséhez. Őszintén hálás vagyok az időért és az odaadásért, amelyet doktori pályafutásom során rám fordított.

Szeretném megragadni ezt a pillanatot, hogy kifejezzem hálámat a Pécsi Tudományegyetem Egészségtudományi Doktori Iskolája felé. Nagyra értékelem a folyamatos segítséget és támogatást dr. Prémusz Viktóriának, és munkatársainak.

Köszönetemet fejezem ki az Orvosi Népegészségtani Intézet vezetőjének, Dr. Kiss István professzor úrnak, valamint dr. Gyöngyi Zoltánnak, dr. Szabó Istvánnak, dr. Gerencsér Gellértnek, Brunnerne Bayer Zsuzsannának valamint minden kollégámnak. Megingathatatlan támogatásuk és értékes szakmai tanácsaik nagy segítségemre voltak a munkám során.

Végezetül szívből jövő köszönetemet fejezem ki családomnak és közeli barátaimnak, akik mellett álltak ezekben az években.