

TERMÉSZETES ALAPANYAGÚ POTENCIÁLIS
KEMOPREVENTÍV KÉSZÍTMÉNYEK HATÁSÁNAK
MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI VIZSGÁLATA

Ph.D. értekezés tézisei

Varjas Tímea

Témavezető: Dr. Ember István
Doktori Iskola vezetője: Dr. Komoly Sámuel

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar

2009

BEVEZETÉS

A fejlett országokban a mortalitási statisztikákban a daganatos megbetegedések a második helyet foglalják el a keringési rendszer betegségei mögött. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) adatai szerint az 56 milliós évi halálozás 12%-áért felelősek a rosszindulatú daganatok. Több országban, így hazánkban is az összhalálozás közel egynegyedét okozzák. 2002-ben a világon megközelítően 11 millió új rákos beteget diagnosztizáltak, és 7 millió daganatos halálozásról számoltak be. Az újabb rákos esetek 45%-a Ázsiában, 26%-a Európában, 15%-a Észak-Amerikában, 7%-a Közép- és Dél-Amerikában, 6%-a Afrikában és 1%-a Óceániában fordult elő. A WHO előrejelzése szerint a daganatos incidencia 2020-ra akár a 15 milliót is elérheti, ha életmódunk nem változik.

A daganatos betegségek okozta mortalitás/morbiditás Magyarországon súlyos társadalmi problémát okoz több évtizede. Az Európai Unióhoz való csatlakozásunkat követően különös hangsúlyt kap a daganatos betegségek gyakoriságának, illetve a daganatos betegségek következtében kialakult halálozási mutatóinak a többi uniós tagországgal való összehasonlítása, illetve annak javítása. 2008-ban látott napvilágot egy jelentés, melyet a stockholmi Karolinska Intézet kutatói publikáltak. E jelentés alapján ugyan gazdaságilag „megéri” a rákbetegek gyógyítása, azonban Magyarország gazdasági helyzetét, valamint az egészségügyi ellátórendszerünk folyamatos „reformját” figyelembe véve időszerű lenne egy átlagpolgár számára is elfogadható primer prevenció stratégia kialakítása.

A kémiai karcinogenezis folyamata során általában hosszú idő telik el az expozíció és a betegség kialakulása, valamint a klinikai tünetek és a metasztázisok megjelenése között. A daganatos megbetegedések elsődleges megelőzését a kockázati tényezők elkerülése vagy legalábbis csökkentése, egyes esetekben védőoltások adása, a kemoprevenció és az egészségnevelés jelentik. A kockázati tényezők közül az egyik legfontosabb a dohányzás, melynek mellőzése az egyik leghatékonyabb prevenció stratégia, azonban fontos szerep juthat azoknak a kemopreventív hatású vegyületeknek, melyek mindennapi ételmünkkel kerülhetnek be a szervezetünkbe. Az utóbbi években született epidemiológiai tanulmányok döntő bizonyítékot nyújtanak néhány étrendi összetevő kemopreventív, rákmegelőző hatására. Ezen vegyületek megszakíthatják a többlépcsős karcinogenezis folyamatát, detoxikáló, antioxidáns hatással is rendelkezhetnek, valamint szerepet játszhatnak a sejtszintű védelemben, pl. az apoptózis indukálásában. A kemopreventív szerek klasszifikációja azon elven alapul, hogy a karcinogenezis többlépcsős folyamatában melyik ponton fejtenek ki protektív hatást.

A gátló szerek azon vegyületek, melyek a prekursor molekulákból keletkező karcinogének vagy a reaktív metabolitok létrejöttét gátolják.

A blokkoló szerek, melyek a végső elektrofil, karcinogén vegyületek célmolekulákhoz való kötődését blokkolják (DNS-, fehérje-adduktok kialakulásának gátlása), így akadályozva meg az iniciációt. Ezen csoportba tartozó kemopreventív ágensek biokémiai hatása lehet, hogy csökkentik a karcinogén vegyületek metabolikus aktiválását, modulálják az I. és II. típusú metabolizáló enzimek expresszióját, karcinogén vegyületekkel való kémiai reakció folytán „befogják”, inaktiválják a szabad gyököket, valamint erősítik a DNS-hibajavító mechanizmusokat. A szuppresszálo szerek az iniciált sejtek malignus transzformációját akadályozzák meg vagy a promóció, vagy a progresszió gátlásával.

Egyes vegyületek, melyek, kemopreventív hatásukat speciális útvonalon fejtik ki, a preneoplasztikus vagy neoplasztikus sejtekre apoptózist indukáló hatással vannak.

Hasonló szerkezetű vegyületek (pl. flavonoidok, szaponinok, fitoösztrogének) sejten belüli viselkedése, kemopreventív hatásuk mechanizmusa is hasonló, némelyikük blokkoló és szuppresszálo hatással egyaránt rendelkezik.

Sok természetes eredetű gátló, blokkoló vagy szuppresszálo szer kerül szervezetünkbe a napi étrendünkkel, pl. brokkoliból, szőlőből, szójababból, zöldteából, vagy gyömbérral, görögszénával, kurkumával ízesített ételeinkből.

A blokkoló ágensek illetve szuppresszálo ágensek hatását molekuláris biológiai módszerekkel, többek között génexpressziós profil analízisével lehet jellemezni, mRNS vagy fehérje szinten.

Intézetünkben 1992 óta folynak molekuláris epidemiológiai kutatások, elsősorban a daganatokkal kapcsolatos prediktív molekuláris epidemiológiai biomarkerek terén.

Ph.D. értekezésemhez kapcsolódó munkám során a hatás markereit, ezen belül is a korai biológiai hatás markereit tanulmányoztam. A korai biológiai hatás markerei a hosszú látenciaidő alatt bekövetkező változásokra derítenek fényt, s ezen változásokat az expozíciónak kitett egyéneknél a többlépcsős karcinogenezis nagyon korai szakaszában lehet detektálni, amikor még a fenotípusban nincs változás, csak molekuláris (DNS, RNS, fehérje) szinten észlelhetünk a különbségeket

Kutatásaimban olyan vegyületeket, kivonatokat vizsgáltam, melyek hatásukat a daganatok morfológiai detektálhatósága előtt fejtik ki - kémiai, fizikai biológiai tulajdonságaiknál fogva -, lehetnek rákkeltő, mutagén hatásúak, de fellelhetők köztük olyan kemopreventív szerek, mely a többlépcsős karcinogenezis valamely lépésénél fejtenek ki gátló hatásokat.

Eddig ezen hatások megfigyelésére vagy hosszú idejű és drága „long-term” állatkísérleteket vagy humán epidemiológiai vizsgálatokat alkalmaztak.

Intézetünk az elmúlt években kidolgozott egy állatmodellt, mely gyors, olcsó módszer, -„short-term” állatmodell -, amely alkalmas a feltételezetten rákkeltő vegyületek vizsgálatára, valamint hipotézisünk szerint alkalmas potenciális kemopreventív tulajdonságokkal rendelkező vegyületek (keverékek) hatásainak vizsgálatára, valamint a kemoprofilaxis hatásait mérhetjük génszinten, így alkalmas lehet a beavatkozás

hatékonyságának tesztelésre is. A módszer alkalmas az expozíció és a korai biológiai hatás jelzésére a kémiai, fizikai, biológiai karcinogének esetében, valamint kvantitatív kockázatbecslésre ad lehetőséget humán populációban a daganatkeletkezésre nézve.

A tesztrendszer „short-term” rendszer, amely során a karcinogén vegyületeket kémiai karcinogenezis iránt érzékeny állattörzsre (pl. CBA/Ca/H-2^k egerek) gyakorolt hatását monitorizáljuk; a génexpressziót mRNS szinten határozzuk meg.

A biomolekulák (DNS, RNS, fehérjék, enzimek) monitorozása az egészséges állapotól kezdve, az iniciáción keresztül egészen a daganatsejtek, majd a daganat megjelenéséig számos lehetőséget nyújt az esetleges beavatkozásra, prevencióra. Az onkogének, szuppresszorgének expressziójának vizsgálata, apoptotikus folyamatok, sejtciklus szabályozás és a metabolikus útvonalak karcinogén expozícióra való reagálásának detektálása lehetőséget nyújt hatékony kemoprevenációs stratégiák kidolgozására.

Munkám során elsősorban olyan vegyületek, (gyógy- és fűszernövények) korai biológiai hatását vizsgáltam állatkísérletes modellen, melyek alkalmazása táplálkozásunkban lehetőséget nyújthat a daganatok rizikójának csökkentésére.

CÉLKITŰZÉSEK

PhD dolgozatommal csatlakozom az Intézetünkben folyó molekuláris epidemiológiai kutatásokhoz, melyekben a kifejlesztett állatkísérletes, korai karcinogén hatást kimutató tesztrendszer segítségével vegyületeket, kivonatokat vizsgálhatunk, meghatározhatjuk hatásukat a daganatok morfológiai detektálhatósága előtt, a korai génexpresszió-változásokból következtethetünk esetleges rákkeltő, mutagén hatásukra. A kidolgozott tesztrendszert, kis módosítással kemopreventívnek ígérkező vegyületek, készítmények korai vizsgálatára is adaptálhatjuk, vizsgálhatjuk hatásukat a többlépcsős karcinogenezis egyes lépéseire, onko/szuppresszorgének expresszióira gyakorolt hatásukon keresztül, valamint az apoptózisban szerepet játszó gének, sejtciklust szabályozó gének, metabolizáló enzimrendszerek mRNS szintű detektálásával.

Táplálékunkkal potenciális rákkeltő ágensekkel, prokarcinogén vegyületekkel exponáljuk szervezetünket, azonban táplálkozással lehetőségünk nyílik a káros hatások kivédésére, kemopreventív molekulák szervezetünkbe juttatásával, így tudatos primer prevenció és kemoprevenációs programot hajthatunk végre egyéni szinten is.

1. Kutatásaink első felében a **transz-2-hexenál** hatását kívántuk megvizsgálni. Irodalmi adatok szerint ez a növényi eredetű, gyümölcsökben, hüvelyesekben, káposztafélékben termelődő α,β -telítetlen karbonil vegyület Ames tesztben mutagénnek bizonyult, karbonil csoportjának köszönhetően 1,N²-propano-dezoxi-

guanozin exociklikus adduktot képez, így feltehetőleg a humán karcinogenezisben is szerepet játszik.

Célunk volt, hogy hosszútávú („long-term”) állatkísérletben bizonyítsuk tumorképző sajátságát, illetve „short-term” génexpressziós tesztrendszerünk segítségével meghatározzuk egyes onko/szuppresszor génekre, mint kulcsgénekre gyakorolt hatását, az expozíciót követő 24, 48 és 72 óra elteltével.

2. Kutatásaink második szakaszában hazánk táplálkozási szokásainak ismeretében egy potenciális veszélyforrásra szeretnénk volna felhívni a figyelmet. Savas körülmények között - pl. a gyomrunkban - nitritek jelenlétében különböző fehérjeforrásokból (húsokból), nitrózaminok képződhetnek, melyeknek reprezentatív képviselője egy direkt karcinogén vegyület, az **N-nitroso-N-metil-karbamid (MNU)**. E vegyület is adduktképző, a DNS guanin bázisából O^6 -metil-guanin (O^6mG) addukt keletkezik, mutációt hozva létre többek között a *Hras1* gén 12-es kodonjában.

Célunk volt, hogy állatkísérletes modell segítségével megvizsgáljuk, hogy a vegyület befolyásolja-e az általunk vizsgált kulcsgének (onko/szuppresszor gének) expresszióját, s ezen hatás összefügg-e a vegyület karcinogén hatásával.

3. Flavonoidokról, kalkonokról kalkon-származékokról leírtak tumorelles, gyulladáscsökkentő, immunszuppresszív hatásokat, antioxidáns tulajdonságokat. Egy szintetikus kalkon-analógról, **E,E-bis-(2-hidroxi-benzilidén)-aceton-ról (HBA)** ígéretes kutatási eredmények születtek feltételezhető kemopreventív hatásáról.

Célunk volt, hogy meghatározzuk e vegyület antioxidáns kapacitását 2-dezoxi-D-ribóz teszt segítségével, valamint a bizonyítottan karcinogén vegyülettel, DMBA-val, kezelt kísérleti állatok egyes szerveiben meghatározzuk a *Hras1* expressziókat, gyakorlatilag mint a kemoprevenció biomarkerét.

4. Epidemiológiai tanulmányok rávilágítottak arra, hogy a Dél-Európa országaiban élő emberek dohányzási, alkoholfogyatási szokásai ellenére kedvezőbb daganatos halálozási mutatókkal rendelkeznek, mint az Unió átlag. Epidemiológiai tanulmányok bizonyítják, hogy a Földközi tenger partján élő emberek eltérő táplálkozási szokásaiban keresendő a válasz ezen ún. „mediterrán” (vagy francia) paradoxonra; a salátákkal, mártásokkal, és nem utolsósorban különböző borokkal (vörösbor) bevitt kemopreventív hatású polifenoloknak, flavonoidoknak, karotinoidoknak tulajdonítható ez a hatás.

Az irodalmi adatok alapján az anti-karcinogén hatású vegyületek közül a vörösborban található **rezveratrol**, és a paradicsom egyik fő antioxidáns tulajdonságú vegyülete a **likopin**, (Ψ, Ψ' -karotin) onko- és szuppresszor-génekre gyakorolt hatását kívántuk meghatározni a karcinogén vegyületek tesztelésére kidolgozott „short-term” állatmodellen. Célunk az volt, hogy a humán epidemiológiai tanulmányokban

kemopreventínek ítélt vegyületek rövid távú hatását is kimutassuk, bizonyítsuk a tesztrendszerünk alkalmazhatóságát.

5. Napjainkban egyre több figyelem irányul a távol-keleti gyógyászatban használt gyógynövényekre, és a belőlük készült kivonatokra, étrend-kiegészítőkre. A kínai gyógyászatban több ezer éve használt *Panax ginseng*-ről több tanulmány is született, leírták antikarcinogén, kemopreventív hatását.

Célunk, hogy az Intézetünkben kidolgozott rövid távú állatkísérletes modellben vizsgáljuk meg a ginzeng tartalmú tápot fogyasztó egerek génexpressziós mintázatának változását. Vizsgálataink során feltérképezzük az apoptózis regulációban résztvevő gének közül a *Bcl2*, *Bcl2l1* (Bcl-x) és *Ccnd1* (Ciklin D1) gének mRNS expresszióit a kísérleti állatok egyes szerveiben. Feltételeztük azt, hogy a ginzeng tartalmú táp az apoptózis indukcióján keresztül fejti ki kemopreventív hatását.

6. A *Trigonella foenum graecum* (görögszéna, lepkeszeg) magja - a keleti országokban népszerű nevén "Methi" - az indiai fűszerkeverékek kedvelt alkotórésze. Bioaktív komponensei enzimet modulálhatnak, többek között a glükóz- és lipid-metabolizmusban szerepet játszó enzimeket. Gyulladáscsökkentő hatása miatt az ősi keleti gyógyászatban évezredek óta használják.

Feltételezzük, hogy hasonlóan más gyulladáscsökkentő hatású készítményhez a görögszéna tartalmú élelmiszerek szerepet játszhatnak a karcinogenezis gátlásában. Célunk volt hogy, "short-term" tesztrendszerünk segítségével vizsgáljuk meg a görögszéna tartalmú tápot fogyasztó egerek génexpressziós mintázatának változását. Kísérleti összeállításunkban mRNS szinten, RT-PCR segítségével határozzuk meg a görögszéna hatását a zsírsav metabolizáló enzimekre, (*ALOX*-ok és *COX*-ok) karcinogén expozíciónak (DMBA) kitett egereken.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Transz-2-hexenál és MNU hatására kialakuló genexpressziós profil vizsgálata CBA/Ca egereken

A kísérlet során CBA/Ca H-2^k haplotípusú, 4-6 hetes beltenyésztett nőstény egereknek ip. meghatározott dózisú (30 mg/ttkg dózisúban MNU; oldószer: izotóniás oldat), 50mg/ttkg transz-2-hexenál (oldószer kukoricaolaj). A kontroll csoport 0,1 cm³ oldószert kapott, táplálékot mindegyik csoport egyedei igény szerint (*ad libitum*) fogyaszthattak. A karcinogén expozíciót követő 12/24 óra (MNU kezelés esetén) illetve 24/48/72 óra (2-hexenál kezelés esetén) elteltével az állatokat cervicalis diszlokáció (CD) után felboncoltuk, szerveiket (csontvelő, máj, lép, vese, tüdő, hasi nyirokcsomó és csecsemőmirigy) kiemeltük és -80 °C-on tároltuk. A csoportonként, szervenként poolozott 100 mg szövetmintából TRIZOL

reagens (Invitrogen, Paysley, Scotland, UK) használatával teljes RNS-t izoláltunk. Minden mintából 10 µg RNS-t HYBOND N+ membránra blottoltuk, majd kemilumineszcens jelölésű (ECL kit, Amersham, Little Chalfont, England) *Myc*, *Hras1* és *Trp53* (Prof. Dr. Szeberényi József, Pécsi Tudományegyetem, Orvosi Biológiai Intézet) onko- és tumorszupresszor génspecifikus próbákkal hibridizáltuk. A laboratóriumi folyamatok minden lépését a felhasznált termékekhez a gyártó cégek által mellékelte előírásoknak megfelelően végeztük. A jelölés detektálása Rtg filmen történt. A dot-kiértékelést Quantiscan software-el végeztük (Biosoft, Cambridge, UK). A kezelt és kontroll csoportok közti *Myc*, *Hras1* és *Trp53* génexpresszió eltéréseket β-aktin aktivitás %-os arányában ábrázoltuk.

Transz-2-hexenal „long-term” hatása CBA/Ca, AKR/J, C3He-mg egereken valamint Long-Evans, Fischer 344 és Wistar patkányokon

A krónikus kísérletek során CBA/Ca H-2^k, AKR/J H-2^k és C3He-mg H-2^k egér, valamint Long-Evans, Fischer 344 és Wistar patkány 50 mg/ttkg kukoricaolajban oldott transz-2-hexenált kapott ip. a kísérlet 1., 8. és 15. napján (összesen 150 mg/ttkg). A kontroll állatokat azonos mennyiségű kukoricaolajjal oltottuk. 18 hónap túlélési idő után az állatokat felboncoltuk, a bennük kialakult daganatokból szövetmintát vettünk és hagyományos szövettani feldolgozásnak vetettük alá. A paraffinba ágyazott blokkokból vágott 5 µm-es, hematoxin-eozinnal festett metszeteken fénymikroszkóppal, 50x és 100x nagyítással vizsgáltuk a tumorok szövettani képét.

CBA/Ca egerek kezelése „short-term” kemoprevenációs tesztrendszerben

A kísérlet során CBA/Ca H-2^k haplotípusú, 4-6 hetes beltenyésztett nőstény egereket az alábbi kezelés protokoll szerint ip. oltottunk. A negatív kontroll csoport 0,1 cm³ kukoricaolajat kapott, a pozitív kontroll 20 mg/ttkg DMBA-t, a vizsgált vegyületet (dózis: 20 mg/ttkg rezveratrol illetve likopin és 4.36 mg/ttkg HBA) a karcinogén expozíció előtt 24 órával (III: csoport), a karcinogén expozícióval azonos időben (IV. csoport), valamint az azt követő 24. órában (V. csoport), oltottuk az állatokba, táplálékot mindegyik csoport egyedei igény szerint (*ad libitum*) fogyaszthattak. Karcinogén expozíciót valamint az utolsó kezelés után 24 órával cervikális diszlokáció (CD) után az egerek szerveit kiemeltük. A csoportonként, szervenként poolozott 100 mg szövetmintából TRIZOL reagens (Invitrogen, Paysley, Scotland, UK) használatával teljes RNS-t izoláltunk. Minden mintából 10 µg RNS-t HYBOND N+ membránra blottoltuk, majd kemilumineszcens jelölésű (ECL kit, Amersham, Little Chalfont, England) *Myc*, *Hras1* és *Trp53* (Prof. Dr. Szeberényi József, Pécsi Tudományegyetem, Orvosi Biológiai Intézet) onko- és tumorszupresszor génspecifikus próbákkal hibridizáltuk. A laboratóriumi folyamatok minden lépését a felhasznált termékekhez a gyártó cégek által mellékelte előírásoknak megfelelően végeztük. A jelölés detektálása Rtg filmen

történt. A dot-kiértékelést Quantiscan software-el végeztük (Biosoft, Cambridge, UK). A kezelt és kontroll csoportok közti *Myc*, *Hras1* és *Trp53* génexpresszió eltéréseket β -aktin aktivitás %-os arányában ábrázoltuk.

Görögszéna és ginseng tartalmú tápot fogyasztó AKR/J egerek szerveiben meghatározott génexpressziós mintázat

Kísérleti összeállításunkban csoportonként 6-6 db hathetes nőstény beltenyésztett AKR/J egeret használtunk. A kísérlet során alkalmazott ginseng valamint görögszéna tartalmú tápot a laboratóriumban kevertük, 50 % darált normál rágcsáló tápot és 50% ginseng gyökér port (Nyugat-Magyarországi Egyetem, Mezőgazdasági és Élelmiszertudományi Kar, Növénytudományi Intézet, Gyógynövény Termesztési Tanszék) tartalmazott. A porkeveréket csapvíz segítségével pépesítettük, hasábokba szabdaltuk, majd szobahőmérsékleten kiszárítottuk.

Az egereket négy csoportba osztottuk. Az első és második csoport egyedi speciális tápot fogyasztottak a kísérlet végéig, a második csoport a kísérlet hatodik napján DMBA kezelést kapott (20 mg/ttkg, i.p.). A harmadik és negyedik csoportba sorolt egereket normál táppal etettük, a negyedik csoport egyedeit - mint a második csoportba tartozó egereket -, karcinogén expozíciónak tettük ki (DMBA, 20 mg/ttkg, i.p.) Mind a négy csoport egyedeit a karcinogén expozíció után 24 órával - a hetedik napon - leöltük, felboncoltuk, szerveikből (vese, máj, lép, tüdő) mRNS-t izoláltunk MagNA Pure Compact Instrument készülékkel (Roche Applied Science).

A génexpressziókat kvantitatív RT-PCR-rel határoztuk meg, Gene Amp[®] 5700 Sequence Detection System készülékben (Applied Biosystems), SYBR Green protokoll szerint, a technikai utasításnak megfelelően. A primereket Primer Express[™] Software-rel terveztük (Applied Biosystems), és az Integrated DNA Technologies szintetizálta (Bio-Sciences).

A relative génexpressziókat "comparative C_T method"-dal határoztuk meg ($\Delta\Delta C_T$ method, Applied Biosystems) egy belső, un. "housekeeping" génhez viszonyított értékeket számoltuk.

Antioxidáns kapacitás meghatározása

A 2-dezoxi-D-ribóz degradációjának vizsgálatát EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav) jelenlétében és anélkül is elvégeztük.

A reakcióelegy összetétele EDTA alkalmazása nélkül: 30 mM foszfátpuffer (pH=7,4); 9 mM 2-dezoxi-D-ribóz; 40 mM NaCl, 30 μ M vas(II)-szulfát; 50 μ M H₂O₂; 200 μ M HBA nátrium sója (a vegyület ösztérfogatának megfelelő térfogatú 1% (v/v)-os DMSO-ban oldva)

Az EDTA jelenlétében végzett kísérlet során a reakcióelegy 36 μ M EDTA-t tartalmazott. A reakcióelegyeket 37°C-on inkubáltuk, majd meghatározott időpontokban mintát vettünk belőle, amelyben meghatároztuk a tiobarbitursav (TBA) reaktív anyagok mennyiségét. A megfelelő referencia elegyek HBA Na-sója

helyett 1 % (v/v)-os DMSO-t tartalmaztak. A vak összetétele hasonló volt a megfelelő elegyhez, de nem tartalmazott vas(II)-szulfátot.

A mintavételkor jelenlévő TBA reaktív anyagok meghatározását 1 cm³ mintából végeztük. A mintához 0,5 cm³ 1%-os tiobarbitursav oldatot és 0,5 cm³ 5,6%-os triklór-ecetsavat adtunk, majd 8 percig 100°C-os glicerines fürdőben inkubáltuk. A szobahőmérsékletre hűtött oldat abszorbanciáját 532 nm-en mértük, a vakkal szemben.

Statisztikai analízis

A görögszéna és a ginseng hatásának meghatározása során elvégzett három párhuzamos vizsgálat eredményeit átlagoltuk, majd az így meghatározott relatív génexpressziókat ábráztuk, χ^2 próbával számoltuk a konfidencia intervallumokat.

ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Transz-2-hexenál

Bár az Intézetünk által használt kísérleti tesztrendszer kiválóan alkalmas különböző karcinogén vegyületek hatásának kimutatására, az ismert genotoxikus karcinogén vegyületektől (DMBA, NP) eltérően a **transz-2-hexenál nem indukált egyértelmű korai génexpresszió-emelkedést a vizsgált kulcsgénekben**, ugyanakkor a **krónikus kísérletben karcinogén hatásának bizonyult, az állatokban daganatok kialakulását eredményezte**. A kísérletekben használt állatok kis száma miatt eredményeink előzetesek, de a transz-2-hexenálnak az emberi táplálékokban való ubikviter jelenléte miatt fontosnak tartjuk a vizsgálati eredmények előzetes közlését is.

2. N-nitrozo-N-metil-karbamid (MNU)

A DMBA-val szemben az MNU hatására korábban emelkedik a *Hras1*, *Myc* és a *Trp53* expressziója a későbbiekben tumorkialakulást mutató szervekben. Ezen gének expresszió-emelkedése, mint kísérletünk is igazolta, jó korai behatároló molekuláris biomarkere a karcinogén expozíciónak, így a primer prevencióban fontos szerepe lehet. **Eredményeink alátámasztják a tényt, hogy az MNU direkt karcinogén és ezért a hatása gyorsabban jelentkezik (12 órával a beadás után) és előbb le is cseng (24 órával a beadás után), mint a metabolikusan aktiválódó karcinogén DMBA esetében (ahol 24 és 48 óra közt jellemző a hatás).**

3. HBA (E,E-bis-(2-hidroxi-benzilidén)-aceton)

Intézetünkben alkalmazott „short-term” tesztrendszert potenciális kemopreventív vegyületek vizsgálatára is alkalmazzuk. Az általunk vizsgált kalkonanalóg (HBA) ismert kemopreventív szer, irodalomban közölt adatok szerint erős NAD(P)H-dehidrogenáz kinon 1 (NQO1) indukáló potenciállal rendelkezik Hepa 1c1c7 sejtvonalon. **A HBA és a DMBA egyidejű kezelés hatására minden vizsgált**

szervben a *Hras1* expresszió visszaszorulását tapasztaltuk, mely a két vegyület metabolikus kölcsönhatására enged következtetni.

A génextpresszió csökkenés azt jelzi, hogy tesztrendszerünk alkalmas a kemopreventív hatás detektálására.

A 2-dezoxi-D-ribóz degradációs teszt eredményei szerint az első 120 percben az antioxidáns kapacitás észlelhető volt, azonban hosszabb inkubációs idő esetén, függetlenül az EDTA adagolástól inkább a pro-oxidáns jellegű képet mutatott a HBA.

4. *Likopin és rezveratrol*

A likopin mindkét gén - *Hras1* onkogén és *Trp53* tumor szuppresszor gén - expresszióját csökkentette, a rezveratrol főleg a *Trp53* gén-re hatott. Ezen különbségek a vegyületek hatásmechanizmusának különbözőségéből adódhat. A génextpressziós profilok összehasonlítása során arra a következtetésre jutottunk, hogy a két vizsgált vegyület közül a likopin hatása a szembetűnőbb, mint potenciális kemopreventív ágens.

5. *Görögszéna, hatása, az arachidonsav metabolizmus enzimjeire in vivo állatkísérletben (ALOX, COX)*

Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a vesében a DMBA hatására megemelkedett *ALOX12*-mRNS szint expresszióját a görögszéna tartalmú táp visszaszorította a normál szintre. Az *ALOX15* génextpresszióját mind a négy vizsgált szövetben a karcinogén expozíció megemelte, a görögszéna tartalmú diétán tartott egerek máj, tüdő és vese szövetében a normál szinten lévő mRNS koncentrációt mértünk. Hasonló eredményeket kaptunk - a tüdő kivételével - az arachidonsav metabolizmus kulcs enzimjének (*ALOX5*) vizsgálata során is.

A prosztaglandin bioszintézisben szerepet játszó enzimek (*COX1, COX2*) génextpressziója a lép kivételével visszaszorult a görögszéna tartalmú táp fogyasztásának eredményeképp.

Eredményeinket más kutatók sejtvonalakon végzett kísérleteivel összevetve megállapíthatjuk, hogy a görögszéna biológiailag aktív komponensei képesek az arachidonsav metabolizmus gátlásán keresztül potenciális kemopreventív hatást kifejteni.

6. *Ginzeng tartalmú táplálék kemopreventív hatása in vivo állatkísérletben*

„Short-term” teszt-rendszerünkben végzett vizsgálataink szerint, az AKR/J-H2^k beltenyésztett egerek szerveiből izolált mRNS expressziós mintázata alapján a ginzeng tartalmú táp valószínűleg kemopreventív hatású. A máj, tüdő és lép szövetben a *Ccnd1* expresszió csökkent volt a DMBA-val kezelt csoportban mért értékekhez képest. Az apoptózis regulációjában szerepet játszó *Bcl2* gén a máj és vese szövetben alacsony expressziót mutatott a speciális tápot fogyasztó egerek esetén, és *Bcl2l1* gén a tüdőben és a lépben volt alulexpresszált. Irodalmi adatokkal ellentétben állatkísérletes modellünk a ginzeng gyökér tartalmú táp

apoptózis indukáló hatását bizonyítja, mely egy lehetséges mechanizmusa a kemoprevenciónak.

A kidolgozott tesztrendszer alkalmas a kemopreventívnek ígérkező vegyületek, készítmények korai vizsgálatára is, kvantitatív reverz transzkripció polimeráz láncreakcióval kombinálva különböző génspecifikus primerekkel végzett amplifikációkkal választ kaphatunk a többlépcsős karcinogenezis egyes lépéseiben lezajló folyamatokra, valamint a beavatkozások (mint kemoprevenció) hatásosságára.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm az Orvosi Népegészségtani Intézet igazgatójának, témavezetőmnek, Dr. Ember István Professzor úrnak támogatását, és lelkesítését, hogy lehetővé tette számomra a folyamatos tanulást, és fejlődést az intézetben eddig eltöltött 10 év alatt.

Köszönetet mondok dr. Gyöngyi Zoltánnak, dr. Perjési Pálnak, dr. Kiss Istvánnak, és dr. Varga Csabának, akik értékes szakmai tanácsaikkal segítették munkámat, valamint dr. Nowrasteh Ghodratollahnak, dr. Budán Ferencnek, dr. Nádasi Editnek és dr. Gombos Katalinnak, akik publikációim megírásában voltak nagy segítségemre.

Hálával tartozom az Intézet asszisztenseinek, Brunnerné Bayer Zsuzsának, Herczeg Mónikának, Harth Csabánének, Pest Károlynének, és minden jelenlegi és volt munkatársamnak, akik őszintén segítettek munkájukkal, hogy disszertációm elkészülhessen.

Köszönöm biztatását, segítségét és türelmét édesanyámnak, testvéremnek, gyermekeimnek, és mindazoknak, aki közel állnak hozzám, és végigélték velem ezeket az éveket.

THE MOLECULAR BIOLOGICAL INVESTIGATION OF POTENTIAL CHEMOPREVENTIVE COMPOUNDS CONTAINING NATURAL INGREDIENT

Ph.D. Thesis

Tímea Varjas

Consultant: Dr. István Ember

Program Leader: Dr. Sámuel Komoly

University of Pecs

Medical School

2009

INTRODUCTION

According to mortality statistics the tumour diseases are the second cause of mortality in the developed countries after cardiovascular diseases. WHO data indicates that malignant tumours are responsible for 12% of the 56 millions deaths per year. Malignancies are, therefore, responsible for almost a quarter of the total mortality in many countries including Hungary. Close to 11 millions new cancer patients were diagnosed in the year 2002 and 7 millions cases of cancer mortality were registered. Data shows that 45% of new cancer cases are from Asia, 26% Europe, 15% North America, 7% Central and South America, 6% Africa and 1% Australia. According to WHO the incidence of tumours might reach even 15 millions by 2020 unless our life style changes.

For the last few decades malignancy related mortality/morbidity has been responsible for serious social problems in Hungary. Special attention is drawn to the comparison of prevalence and mortality to data collected from other UE countries. As per publication of Karolinska Institute in Stockholm, it is economically "worthwhile" to treat cancer patients but taking into consideration the economical situation and constant health care system "reform" it is time to develop a primary preventive strategy that would be acceptable for the average population.

Generally during the process of chemical carcinogenesis there is a long time interval between the exposure to the carcinogen and the development of the cancer, its clinical manifestation and metastasis formation. The primary prevention of cancer means avoidance of the risk factors, vaccinations in certain cases, chemoprevention and health education. One of the most effective of all risk factors is smoking; however, there is important role of those compounds with chemopreventive effects which gain way into our body via food. Epidemiologic studies evolved lately, have shown hard evidences of chemopreventive and cancer preventive effects of some food ingredients. These compounds would interrupt the multi-step process of carcinogenesis, are detoxifying with antioxidant properties and could play a role in the cellular defence mechanism. The classification of chemopreventive compounds is based on the point of carcinogenesis process at which they exert their protective effect.

Inhibitory compounds are those which inhibit the formation of reactive metabolites or carcinogens originating from the precursor metabolites.

The blocking agents block binding of the final electrophilic carcinogens to the target molecules (inhibition of DNA-, protein-adducts formation) and this is how the initiation is stopped.

The chemopreventive agents in this group may exert their biochemical effect of by decreasing the metabolic activation of carcinogens, modulating the expression of the

type I. and II. metabolising enzymes, inactivating the free radicals and enhancing the DNA repair mechanism. The suppressing compounds inhibit the transformation of the initiated malignant cells through the blocking of promotion or progression.

Certain compounds using special route for exertion of their chemopreventive effect induce apoptosis of preneoplastic or neoplastic cells.

The intracellular behaviour and chemopreventive mechanism of compounds with similar structure (like flavonoids, saponins and fito-estrogens) are similar. Some of them have both suppressing and blocking effects equally.

Many inhibitory, blocking or suppressing compounds of natural origin gain access to our body via our daily food intake. Examples, to name only few of them, are broccoli, grape, green tea, or foods containing ginger, fenugreek and curcuma. The effects of blocking or suppressing agents can be well studied using molecular biological methods via analysis of gene expression profile at the mRNA or protein level.

There have been ongoing molecular epidemiological researches at our department since 1992. This mainly includes investigations on the predictive molecular epidemiological biomarkers in cancer.

In my PhD work I have investigated the effect makers and the markers of the early biological effects.

The markers of early biological effect highlight the changes which occur after long latent period, changes which could be detected in the very early stage of carcinogenesis in the individuals exposed to carcinogens where there are no phenotypic alterations and the differences can only be detected at the molecular level (DNA, RNA, protein).

I investigated compounds and extracts which exert their effect before the tumours are morphologically detectable. Based on their chemical or physical properties they can be carcinogenic or mutagenic. But, there are also possible chemopreventive agents among them with inhibitory properties at a certain stage of carcinogenesis process.

Investigation of these effects, so far, has been limited to either long term and expensive animal experiments or human epidemiological studies.

Our department has introduced a short term, fast, and cheap animal model capable of examining the potential carcinogens, chemopreventive compounds (mixtures). Moreover, their chemoprophylactic effects at gene level could be measured thus it could be used in testing or evaluation of the effectiveness of our interventions. The method is also capable of signalling the exposure and early biological effect in case of chemical, biological and physical carcinogens. It also gives us the opportunity of quantitative risk analysis in human population from the cancer treatment point of view.

This short term test system monitors the effect of chemical carcinogens on sensitive animal strains (CBA/Ca/H-2^k mice). The gene expression is determined at mRNA level. Monitoring biomolecules from the healthy status through the initiation

phase up to the manifestation of cancer cells offers numerous interventional possibilities and prevention. Examination of the expression of onco/suppressor genes and the detection of the metabolic pathways in response to the carcinogenic exposure would help us to formulate effective chemopreventive strategies.

During my work, using animal model, I examined the early biological effect(s) of such compounds (culinary and medical herbs) whose implication in our diet would offer us possibilities of lowering cancer risk

OBJECTIVES

With my PhD work I join the ongoing molecular biological researches in our department which involves investigation of compounds and extracts and their early carcinogenic effects in animal experimental models. We can determine their effect before tumours are morphologically detectable and their possible carcinogenic effect could be prognosticated based on gene expressional changes. With a little modification this model can be used in early examination of potential chemopreventive compounds and products, and their effect on certain steps of multi-step process of carcinogenesis via detecting the expression of onco/suppressor genes.

Our body is exposed to carcinogenic agents and procarcinogenic compounds which are present in the food. However, eating gives us the opportunity of protecting our body against the unfavorable effects as well. Intake of chemopreventive molecules means realization of a planned primary prevention and accomplishment of a chemopreventive program at individual level.

1. First half of our research is mainly comprised of investigation of **trans-2-hexenal** effect. 2-Hexenal is a common component of plants and the main intake for humans is considered to result from consumption of fruit, vegetables and fruit juices, but also from beverages like tea. Like other α,β -unsaturated carbonyl compounds, 2-hexenal is proved to be mutagenic in Ames test. Owing to its carbonyl group produces 1,N²-propano-deoxy-guanosin exocyclic adduct thus it assumingly plays a role in human carcinogenesis.

Our aim was to prove its unique carcinogenic characteristic in long term animal experiment. Moreover, to determine its effect on certain onco/suppressor genes (key genes) in short term model 24, 48 and 72 hours post exposure.

2. In the second half of our research, knowing our country`s habits, we would like to draw attention to one of the potential source of danger. In the stomach in acidic environment with the presence of nitrites nitrosamines are formed from protein sources (meat). The representative of nitrosamines is **N-nitroso-N-methylurea (MNU)** which is a direct carcinogenic compound. It is an adduct-forming compound

with O^6 -methyl-guanine (O^6 mG) adducts formed from the DNA guanine base leading to mutation of the code 12 of *Hras1* gene.

Using an animal model our aim was to find out if this compound affects the expression of the studied key genes (onco/suppressor genes) and whether this effect is related to its carcinogenic effect.

3. The anticancer, anti-inflammatory, immunosuppressive and antioxidant properties and effects of chalcones and their metabolites have been described. Promising results on possible chemopreventive effect of a synthetic chalcone analog, **E,E-bis-(2-hydroxy-benzilidene)-acetone (HBA)** have been published.

Our aim was to determine the antioxidant capacity of the compound with the help of 2-deoxy-D-ribose test in addition to a proved carcinogenic agent (DMBA). The *Hras1* gene expression measured in certain organs of the treated animals has been used as chemopreventive biomarker.

4. Epidemiological studies have shown that populations of Southern European countries have more favourable cancer mortality profiles despite their smoking and drinking habits when compared to other EU countries. Studies has proved that the explanation of this so called "French or Mediterranean" paradox is in the characteristic dietary habit of the people living in these areas.

The polyphenols, flavonoids and carotenoids present in salads, sauces and red wine are thought to be responsible for such chemopreventive effects.

We were to determine the effects of **resveratrol** (anticarcinogenic found in red wine) and **lycopene**, (Ψ,Ψ' -carotene) (antioxidant found in tomato) exerted on onco/suppressor genes in short term animal models. Moreover, our aim was to show the short term effects of compounds which have been proved to be chemopreventive in human and also to prove our model's applicability.

5. Nowadays there has been more attention drawn to the herbs and extracts used in Far East. Many studies have dealt with **Panax ginseng** used in Chinese medicine for thousands of years describing its anticarcinogenic and chemopreventive effects.

Our goal was to examine the pattern of expressional changes of *Bcl2*, *Bcl2l1* (Bcl-x) and *Ccnd1* (Ciklin D1) genes affecting the apoptosis in different organs of animals consuming ginseng-containing diet. We believe that the ginseng-containing diets exert their chemopreventive effect through induction of apoptosis.

6. The seed of *Trigonella foenum graecum* (fenugreek) known as Methi is inseparable part of Indian spice mixtures. Its metabolites modulate enzymes which have role in glucose and lipid metabolism. It has been used for decades in Eastend Medicine.

Assumably they play a role in inhibition of carcinogenesis. We aimed to examine the pattern of gene expression changes in the mice consuming fenugreek containing diet in our short term animal model. We determined the effect of fenugreek on metabolizing enzymes of fatty acids (ALOX and COX enzymes) in mice exposed to carcinogen (DMBA)

MATERIALS AND METHODS

Examination of gene expression pattern in CBA/Ca mice in response to trans-2-hexenal and MNU treatment

Six- to eight week-old conventionally maintained, CBA/Ca inbred mice, with H-2^K haplotype (6-6 in each group, male and female) were used for this experiment. Two groups were treated intraperitoneally (*i.p.*) with a single 30 mg/kg body weight dose of MNU (Sigma Aldrich Budapest, Hungary) dissolved in 0.1 ml Salsol A and 50 mg/kg body weight dose of trans-2-hexenal (Sigma Aldrich Budapest, Hungary; solvent: corn oil). Control groups of mice treated *i.p.* with 0.1 ml dissolving solution. A served as control. At 12, 24 and 24, 48 and 72 hours after the MNU or trans-2-hexenal respectively, the mice were by cervical dislocation killed and the liver, lungs, kidneys, thymus, spleen, lymph nodes and bone marrow were removed and 100 mg samples of each tissue were pooled according to groups and stored at -80 °C. After homogenization of the organs, total cellular RNA was isolated using TRIZOL reagent (Invitrogen, Paisley, Scotland, UK). The concentration and quality of the RNA was checked by absorption measurement of light at 260/280 nm wavelength. RNA of each sample (10 µg) was dot-blotted onto Hybond N+ nitrocellulose membranes (ECL kit, Amersham, Little Chalfont, UK) and hybridized with chemiluminescently labeled specific probes for *Myc*, *Hras1* and *Trp53* (Professor J. Szeberényi, University of Pécs, Hungary) genes. The RNA isolation, hybridization and detection were performed according to the manufacturer's instructions. The signals were detected on X-ray films. The dots were evaluated by Quantiscan software (Biosoft, Cambridge, UK). Gene expression is reported as % relative to the level of the expression of β -actin check.

Long term effect of Trans-2-hexenal on CBA/Ca, AKR/J, C3He-mg, Fischer 344 és Wistar mice

In the "long-term" study, mice and rats (CBA/Ca H-2^K, AKR/J H-2^K és C3He-mg H-2^K mice, and Long-Evans, Fischer 344 és Wistar rats) received 150 mg/kg body weight of 2-hexenal *i.p.* (50 mg/kg on the 1st, 8th and 15th day) and were autopsied after 18 months of survival. Developed tumours were removed and 5-µm formalin-

fixed, paraffin-embedded sections were routinely stained by haematoxylin-eosin and evaluated by light microscopy, (50x and 100x).

Treatment of CBA/Ca mice in „short-term” chemopreventive model

Four to six week-old conventionally maintained, CBA/Ca inbred mice, with H-2^K haplotype were used in this experiment. The negative control group was given 0,1 cm³ of corn oil and positive control group was treated with 20 mg/kg body weight dose of DMBA. The examined compound was administered 24 hour before carcinogenic exposure (Group III.), at the time of carcinogenic exposure (group IV.) and 24 hours after (group V.). The diet was consumed based on the individual need (ad libidum) The mice were by cervical dislocation killed and the liver, lungs, kidneys, thymus, spleen, lymph nodes and bone marrow were removed and 100 mg samples of each tissue were pooled according to groups and stored at -80 °C. After homogenization of the organs, total cellular RNA was isolated using TRIZOL reagent (Invitrogen, Paisley, Scotland, UK). The concentration and quality of the RNA was checked by absorption measurement of light at 260/280 nm wavelength. RNA of each sample (10 µg) was dot-blotted onto Hybond N+ nitrocellulose membranes (ECL kit, Amersham, Little Chalfont, UK) and hybridized with chemiluminescently labelled specific probes for *c-myc*, *p53* and *Ha-ras* (Professor J. Szeberényi, University of Pécs, Hungary) genes. The RNA isolation, hybridization and detection were performed according to the manufacturer's instructions. The signals were detected on X-ray films. The dots were evaluated by Quantiscan software (Biosoft, Cambridge, UK). Gene expression is reported as % relative to the level of the expression of *β-actin* check.

The gene expression pattern in organs of AKR/J mice on fenugreek and ginseng containing diet

In this experiment six mice (6 week female AKR/J H-2^k inbred) were used in each group.

Special food was prepared as follows: normal pet food granules were ground, then the same quantity (50% mass) of ginseng root powder was mixed in (University of West Hungary, Agriculture Science Faculty, Department of Medicinal and Aromatic Plants). By adding a small quantity of water, rod-shape objects were formed and dried at room temperature.

Mice were divided into four groups. The first group was fed with the special nutriment throughout the investigation. The second group was fed with normal nutriment and DMBA was administered on day 6. The third and fourth groups were supplied with normal nutriment, and the fourth group received DMBA intraperitoneally (20 mg/bw kg doses DMBA) similar to the second group. All the groups were autopsied on day 7, 24 h postcarcinogenic exposure, with subsequent isolation of mRNA from lung, liver, spleen and kidney, using MagNA Pure Compact Instrument (Roche Applied Science).

Quantitative RT-PCR was performed using the Gene Amp® 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. All the primers were designed by Primer Express™ Software (Applied Biosystems) and synthesized by Integrated DNA Technologies. Relative gene expression values were calculated by the comparative C_T (threshold cycle) method ($\Delta\Delta C_T$ method, Applied Biosystems). The comparative C_T method gives the amount of target gene normalized to an endogenous reference gene and to a relative calibrator sample.

Investigation of the antioxidant capacity

Degradation of 2-Deoxy-D-ribose with and without the presence of EDTA was examined. The mixture component without EDTA : 30 mM phosphate buffer (pH=7,4); 9 mM 2-desoxy-D-ribose; 40 mM NaCl, 30 μ M Iron(II)-sulphate; 50 μ M H_2O_2 ; 200 μ M HBA disodium salt (dissolved in DMSO, corresponding to 1%(v/v) of the total volume of the mixture) The mixture component with EDTA: similar to the previous reaction mixture but contains 36 μ M EDTA yet.

The mixture was incubated at 37 °C, and the time-course of the 2-deoxy-D-ribose degradation was monitored by determination of the thiobarbituric acid reactive substances formed by the Fenton reaction-initiated degradation. The reference mixtures contained DMSO (1%, w/v) instead of HBA disodium salt. The composition of the blank was the same as above, but iron(II)sulphate was omitted. The thiobarbituric acid reactivity was development dy mixing a 1,0 ml aliquot of the mixture with 0,5 ml thiobarbituric acid reagent (1%, W/v, in 50 mM sodium hydroxide solution) and 0,5 ml 5,6 % (w/v) trichloroacetic acid, followed by heating at 100 °C for 8 min. When the mixture was cool the absorbance was measured at 532 nm against appropriate blank. The composition of the blank was the same as above, but iron(II)sulphate was emitted. All solutions were freshly prepared using doubly distilled water. Each value is the average of 3 independent measurements.

Statistical analysis.

At the determination of the effects of Fenugreek and Ginseng the results of three parallel examinations were averaged and the relative gene expressions were illustrated. Calculation of confidence interval was done with χ^2 test.

SUMMARISING OUR NEW RESULTS

1. Trans-2-hexenal

Although the experimental test system used by our Institute is outstanding, to detect the effects of different kinds of carcinogens, unlike the known carcinogenic substances (DMBA, NP) **trans-2-hexenal did not induced definite early gene expression elevation of the investigated key genes.** Long term

investigations have proved it to be carcinogenic by causing cancer in experimental animals. Owing to the small number of animals our results are only pilot studies, but because of the ubiquitous presence of trans-2-hexenal in human diet it is important to preannounce our results.

2. *N-methyl-N-nitrosourea (MNU)*

Unlike DMBA, in the presence of MNU *Hras1*, *Myc* and *Trp53* expression showed earlier elevation in the organs in which cancer developed later. As our experiments confirmed, the elevated expressions of these genes are an appropriate and early characterising biomarker of carcinogen exposure, so it might have a considerable role in primary prevention. **Our results confirm the fact that MNU is a direct carcinogen, for that reason its effect develops faster** (12 hours after administration) **and it decays sooner than the metabolically activated DMBA** (its effect shows between 24 and 48 hours).

3. *HBA (E,E-bis(2-hydroxybenzylidene) acetone)*

The short-term model used in our institute is also appropriate for the analysis of potential chemopreventive substances. The chalcone analog HBA is a well-known chemopreventive agent, several studies show that it has a strong NQO1 inducing potential in Hepa 1c1c7 cell line. Administration of both HBA and DMBA caused the *Hras1* expression to decrease in all investigated organs, which might indicate the metabolic interaction of the two substances. The gene expression decrease indicates that our test system is appropriate for detecting chemopreventive effects. **The results of the 2-dezoxi-D-ribose degradation test show that in the first 120 minutes antioxidant capacity was present, after longer incubation independently from the EDTA administration HBA acted like a pro-oxidant.**

4. *Lycopene and resveratrol*

Lycopene decreased both *Hras1* oncogene and *Trp53* tumour suppressor gene expression while resveratrol acted mainly on *Trp53*. These dissimilarities are due to the different acting mechanisms of the two substances. **Comparing gene expression profiles we concluded that the effect of lycopene is more significant as a potential chemopreventive agent.**

5. *The effect of fenugreek on the metabolism of arachidonic acid in an in-vivo animal model (ALOX, COX)*

Our investigations show that in the kidney of animals the DMBA induced overexpression of ALOX12-mRNA was suppressed to the normal level by fenugreek rich nutriment consumption. The gene expression of ALOX15 was increased by carcinogen exposure in all of the investigated tissues, but in the liver, in lung and kidney tissues of mice kept on fenugreek diet normal level of mRNA was measured. We got similar results - except of the lung - when

investigating the key enzyme (ALOX5) of arachidonic acid metabolism. Nutrient containing fenugreek caused gene expression of enzymes of the prostaglandin synthesis (COX1, COX2) to decrease.

Comparing to other experiments on other cell lines we can state that biologically active components of fenugreek are potentially chemopreventive by inhibiting the arachidonic acid metabolism.

6. *The chemopreventive effect of nutrient containing ginseng on in vivo animal experiments*

Based on the expression pattern of mRNA isolated from the organs of AKR/J-H2k mice, our short-term studies show that nutrient containing ginseng is probably chemopreventive. In DMBA treated liver, lung and spleen tissues *Ccnd1* expression was reduced comparing to the control group. In the liver and kidney samples of mice fed on special nutrient the expression on *Bcl2* gene - which acts in the regulation of apoptosis - was low, and in their lung and spleen *Bcl2l1* gene were under expressed. **Our animal experiments prove the apoptosis inducing effect of ginseng root, which might be a probable way of chemoprevention.**

Our model is also appropriate for the early investigation of potential chemopreventive substances, combining it with quantitative reverse transcription polymerase chain reaction and amplification with different gene specific primers we can investigate each step of the multistage process of carcinogenesis and also the effect of interventions, like chemoprevention.

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to thank Professor Istvan Ember, Head of the Department of Public Health and Preventive Medicine for his constant support and inspiration which provided me continuous education and progress through the past ten years at the department.

Special thanks to Dr. Zoltán Gyöngyi, Dr. Pál Perjési, Dr. István Kiss and dr. Csaba Varga who have supported my work with their valuable professional advises. I also would like to thank dr. Nowrasteh Ghodrattollah and dr. Ferenc Budán, dr. Edit Nádas and dr. Katalin Gombos for their great help in writing my publications.

I am grateful to Brunnerné Bayer Zsuzsa, Herczeg Mónika, Harth Csabáné, Pest Károlyné and all the present and past colleagues of mine who have supported me with their sincere work and efforts while completing my dissertation.

Special thanks to my mother for her endless encouragement and patience, my sister, my children and close friends who have been with me through all these years.

A DISSZERTÁCIÓHOZ KAPCSOLÓDÓ ÉS KÖZVETLENÜL NEM KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK ÉS PREZENTÁCIÓK LISTÁJA - LIST OF PUBLICATIONS

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk jegyzéke - The thesis is based in the following publications

„In extenso” közlemények - Journal articles

1. E. Nádasi, T. **Varjas**, L. Pajor, I. Ember: Carcinogenic potential of trans-2-hexenal is based on epigenetic effect. *In Vivo* **19**: 559-562 (2005) **imp. f.: 1.037**
2. Amrein K., Papp G., **Varjas T.**, Nádasi E., Pajor L., Ember I.: A transz-2-hexenal in vivo vizsgálata. *Egészségtudomány*, **49**: 111-117 (2005)
3. P. Perjési, I. Ember, R.E. Bozak, E. Nádasi, Z. Rozmer, T. **Varjas**, R.J. Hicks: Effect of the Chalcone Analog E,E-bis(2-Hydroxybenzylidene) acetone on the 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene-induced Ha-ras gene action in vivo. *In Vivo* **20**: 141-146 (2006) **imp. f.: 1.273**
4. Budán F., **Varjas T.**, Varga Zs., Cseh J., Polyák É., Perjési P., Gyöngyi Z., Ember I.: Környezeti metil-nitroso-urea expozíció lehetséges molekuláris biomarkereinek vizsgálata, *Magyar Epidemiológia*, **5(1)**: 55-62. (2008)
5. F. Budán, T. **Varjas**, G. Nowrasteh, Zs.Varga, I. Boncz, J. Cseh, I. Prantner, T. Antal, E. Pázsit, Gy. Göbel, M. Bauer, T. Gracza, P. Perjési, I. Ember Z. Gyöngyi: Early Modification of c-myc Ha-ras and p53 Expressions by N-Methyl-N -nitrosourea. *In vivo* **22(6)**: 793-797 (2008) **imp. f.: 1.273**
6. Budán F., **Varjas T.**, Nowrasteh G., De Blasio A., Prantner I., Gombos K., Varga Zs., Cseh J., Göbel Gy., Polyák É., Perjési P., Ember I., Kiss I.: Kémiai karcinogének korai hatása a c-myc, Ha-ras és p53 génnek expressziójára Magyar Epidemiológia **5(3-4)**: 201-212 (2008)
7. T. **Varjas**, G. Nowrasteh, E. Nádasi, G. Horváth, S. Makai, T. Gracza, J. Cseh, I. Ember: Chemopreventive effect of Panax ginseng. *Phytotherapy Research* **23(10)**: 1399-403 (2009) **impf: 1,772**
8. T. **Varjas**, G. Nowrasteh, G. Horváth, F. Budán, K., Molnár, J., Cseh, S Makai, I Ember: The Effect of Fenugreek on Metabolism of Arachidonic Acid an in-vivo Animal Model *Phytotherapy Research* (közlésre elfogadva) **impf: 1,772**

Könyvfejezetek - Book chapters

1. Ember István, Németh Árpád, Sándor János, **Varjas Tímea**, Sebestyén Andor, Boncz Imre, Bujdosó László, Kvarda Attila: *Fej-nyaki daganatok epidemiológiája és molekuláris epidemiológiája - Az onkológiai prevenció helyzete / Fej-nyaki daganatok prevenciója és ellátása*, könyvfejezet - Szerkesztő: Dózsa Csaba, Dr. Sebestyén Andor OEP, 2003
2. Németh K., Fehér K., Muszil Z., Kiss I., Nowrasteh G., **Varjas T.**, Nádasi E., Mészáros A., Gyöngyi Z., Varga Cs., Perjési P., Ember I: Molekuláris epidemiológiai biomarkerek: új

koncepció a preventív és prediktív medicinában - *Daganatok és daganatmegelőző állapotok molekuláris epidemiológiája*, könyvfejezet - Szerkesztő: Ember István, Kiss István, Medicina, 2005

3. Arany, I., Gombos, K., Nowrasteh, G., **Varjas, T.**: *Kemoprevenció - Népegészségügyi Orvostan*, könyvfejezet - szerkesztő : Ember István Dialog-Campus Kiadó, Budapest-Pécs, 2007

Magyar folyóiratokban megjelent absztraktok - The list of abstracts appeared in Hungarian journals

1. Ember I., Pajor L., **Varjas T.**, Varga Cs.: Transz-hexenal, egy új, potenciális környezeti karcinogén vizsgálata. *Magyar Onkológia* **47**: 3 (2003)
2. Nowrasteh G., Wittmann Á., Budán F., **Varjas T.**, Szele E., Ember I.: Görögszéna kivonat hatása metabolizáló enzimek génexpressziójára in vivo állatmodellben. A PTE OEKK, Orvostudományi és Egészségtudományi Szakosztálya és az Orvosi Népegészségtani Intézet Rendkívüli Jubileumi Tudományos Ülése (Kertai Professzor Úr 80 éves, Boján Professzor Úr 10 éve nincs közöttünk) Pécs, 2007. június 9. *Magyar Epidemiológia, Supplementum*, **4**: 30 (2007)
3. **Varjas T.**, Wittmann Á., Nowrasteh G., Budán F., Gombos K., Ember I.: Metabolizáló enzimek génexpressziójának változása Panax ginseng extraktum hatására állatkísérletes modellben. A PTE OEKK, Orvostudományi és Egészségtudományi Szakosztálya és az Orvosi Népegészségtani Intézet Rendkívüli Jubileumi Tudományos Ülése (Kertai Professzor Úr 80 éves, Boján Professzor Úr 10 éve nincs közöttünk) Pécs, 2007. június 9. *Magyar Epidemiológia, Supplementum*, **4**: 36 (2007)

Nemzetközi folyóiratokban megjelent absztraktok - The list of abstracts appeared in international journals

1. Nadas E., **Varjas T.**, Ember I.: Investigation of the anticarcinogenic effect of Resveratrol in a mouse gene expression model. *Anticancer Research*. **21**(3): 1606 (2001)
2. I. Ember, Cs. Varga, L. Pajor, E. Nádasi, **T. Varjas**, G. Nowrasteh, A. Csejtej, L. Bujdosó, I. Rodler, A. Kvarda: Trans-Hexenal, a new naturally occurring carcinogen. VII. International Conference of Anticancer Research, Corfu. *Anticancer Research* **24**(5D): 3479. (2004)
3. G. Nowrasteh, **T. Varjas**, I. Ember: Lycopene and cancer chemoprevention. VII. International Conference of Anticancer Research, Corfu. *Anticancer Research* **24**(5D): 3583. (2004)
4. G. Nowrasteh, **T. Varjas**, Á. Witmann, K. Gombos, Z. Gyöngyi, I. Ember: Determination of gene expression pattern developing by the results of fenugreek extract applying quantitative PCR. Hersonissos, Crete, Greece, 12-14 October, 2006. *International Journal of Molecular Medicine, Supplement* **18**: 359 (2006)
5. **T. Varjas**, G. Nowrasteh, E. Nádasi, Á. Witmann, K. Gombos, I. Ember: Investigation of the chemopreventive effect of panax ginseng extract in „in vivo” animal models. Hersonissos,

Crete, Greece, 12-14 October, 2006. *International Journal of Molecular Medicine, Supplement 18*: 360 (2006)

6. G. Nowrasteh, **T. Varjas**, F. Budán, K. Amrein, G. Horváth, I. Ember: The in vivo effect of fenugreek on metabolism of arachidonic acid in an animal experiment 8th International Conference of Anticancer Research Greece, Kos 17-22 October, 2008. *Anticancer Research 28*: 3157-3556, A493, (2008)

A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk jegyzéke - Other publications

„In extenso” közlemények - Journal articles

1. Molnár J, Kis A, Meleg B, Nádasi E, **Varjas T**, Kovács E, Kosztolányi G.: [Mutation analysis in the CTG-base multiplication in a family with myotonic dystrophy in three generations]. *Orv Hetil.* **139**(18): 1083-5. (1998)
2. **Varjas T**, Nádasi E, Kovács E, Molnár J, Meleg B, Kosztolányi G.: [Diagnosis of Prader-Willi syndrome by reverse transcriptase polymerase chain reaction]. *Orv Hetil.* **139**(28):1685-7. (1998)
3. Nádasi E., **Varjas T.**, Ember I.: Bioterrorizmus. *Lege Artis Medicinae*; 16(3): 281-284 (2006)
4. Gombos K., **Varjas T.**, Orsós Zs., Polyák É., Peredi J., Varga Zs., Nowrasteh G., Tettinger A., Mucsi Gy., Ember I.: The effect of Aspartame administration on oncogene and suppressor gene expression. *In vivo* **21**: 89-92. (2007) **imp. f. : 1,273**
5. Virág V., **Varjas T.**, Gyöngyi Z., Somlyai G., Ember I., Nádasi E.: The possible role of natural products in the dietotherapy of cancer-related weight loss: an animal model. *Acta Alimentaria*, 36(2): 249-256 (2007) **imp. f. : 0,253**
6. E. Nádasi, **T. Varjas**, I. Prantner, V. Virág, I. Ember: Bioterrorism: warfare of the 21st century. *Gene Therapy and Molecular Biology* **11**: 315-320, (2007)
7. K. Gombos, E. Szele, I. Kiss, **T. Varjas**, L. Puskás, L. Kozma, F. Juhász, E. Kovács, I. Szanyi, I. Ember: Characterization of microarray gene expression profiles of early stage thyroid tumours. *Cancer Genomics and Proteomics* **4**: 403-410. (2007)
8. Nowrasteh G., **Varjas T.**, Benkő Á., Szabó L., Gergely P., Papp A., Horváth Ö. P., Ember I.: Fruit Café[®], egy növényi eredetű kivonat hatása génexpressziókra - klinikai epidemiológiai előkísérletek, *Magyar Epidemiológia*, **5**(1): 41-54. (2008).
9. Ember Á., Budán F., Nowrasteh G., **Varjas T.**, Göbel Gy., Horváth Ö. P., Illényi L., Cseh J., Perjési P., Gergely P., Ember I., Kiss I.: Molekuláris biomarkerek alkalmazása kolorektális karcinómás betegeken, a műtéti hatás monitorozása követéses vizsgálattal. *Egészségtudomány* **53**(2): 50-59 (2009)
10. F. Budán, **T. Varjas**, G. Nowrasteh, I. Prantner, Z. Varga, Á. Ember, J. Cseh, K. Gombos, E. Pázsit, Gy. Göbel, Miklós Bauer, T. Gracza, I. Arany, P. Perjési, I. Ember, I. Kiss: Early Modification of c-myc, Ha-ras and p53 Expressions by Chemical Carcinogens (DMBA, MNU) *In Vivo* **23**(4): 591-8 (2009) **imp. f. : 1.273**

11. E. Nádasi, J.S. Clark, I. Szanyi, **T. Varjas**, I. Ember, R. Baliga, I. Arany: Epigenetic modifiers exacerbate oxidative stress in renal proximal tubule cells. *Anticancer Research* **29(6)**: 2295-9 (2009) **imp. f.: 1,414**
12. Fehér K., Prantner I., Kiss I., **Varjas T.**, Gyöngyi Z., Perjési P., Németh K., Nowrasteh G., Dombi Zs., Ember I.: Molekuláris epidemiológiai biomarkerek a preventive és prediktív medicinában, különös tekintettel a daganatprevencióra. *Orvostudományi értesítő* (közlésre elfogadva)
13. Ember, A., Clark, J. S., Varjas, T., Kiss, I., Ember, I., Bakiga, R., Arany, I.: The Plant-derived Natural Compound Flavin 7® Attenuates Oxidative Stress in Cultured Renal Proximal Tubule Cells. *Inv vivo* (közlésre elfogadva) **imp. f.: 1.273**
- G. Nowrasteh, **T. Varjas**, L. Szabó, Zs. Orsós, A. Á. Benkő, A. Papp, Ö. P. Horváth, I. Ember, I. Kiss Papp, I. Ember, I. Kiss: Effect of Fruit Café® extract on gene expression - a clinical epidemiological trial *Nutrition and Cancer* (közlésre elküldve)
- F. Budán, Á. Ember, K. Amrein, Ö.P. Horváth, L. Illényi, Gy. Göbel, A. De Blasio, T. Dávid, **T. Varjas**, G. Montskó, L. Márk, P. Perjési, I. Ember: The effect of Uncaria extracts on molecular epidemiological biomarkers in the patients with colorectal cancer. *Complementary Therapies in Medicine* (közlésre elküldve)

Magyar folyóiratokban megjelent absztraktok - The list of abstracts appeared in Hungarian journals

1. **Varjas T.**, Szabó L., Orsós Zs., Nádasi E., Dombi Zs., Nowrasteh G., Ember I.: Flavonoidok hatása transzplantált tumorok növekedésére állatkísérletekben. *Orvosi Hetilap*, **146(17)**: 814. (2005)
2. **Varjas T.**, Nowrasteh G., Gunszt B, Simon A., Ember I.: Növényi extrakt kemopreventív hatásának vizsgálata tumor-transzplantációs kísérletben. Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság II. Nemzetközi Kongresszusa, Pécs, 2005. április 1-2. *Magyar Epidemiológia Supplementum*, **2(1)**: 92. (2005)
3. Virág V., Nádasi E., **Varjas T.**, Gyöngyi Z., Somlyai G., Ember I.: Gyógyhatású készítmények lehetséges szerepe a tumoros megbetegedések okozta testsúlycsökkenés kezelésében: egy állatmodell. Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság II. Nemzetközi Kongresszusa, Pécs, 2005. április 1-2. *Magyar Epidemiológia Supplementum*, **2(1)**: 93. (2005)
4. Németh Á., **Varjas T.**, Bero A., Olasz L., Nyárády Z., Ember Á., Csontos Zs., Arany I., Pázsit E., Czakó Gy., Ember I., Dombi Zs.: A Transplatin hatása onkogének korai aktivációjára. Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság II. Nemzetközi Kongresszusa, Pécs, 2005. április 1-2. *Magyar Epidemiológia Supplementum*, **2(1)**: 66. (2005)
5. Németh Á., **Varjas T.**, Bero A., Olasz L., Nyárády Z., Ember Á., Csontos Zs., Arany I., Pázsit E., Czakó Gy., Ember I., Dombi Zs.: A génexpresszió vizsgálata fej-nyaki daganatos megbetegedések eseteiben. Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság II. Nemzetközi Kongresszusa, Pécs, 2005. április 1-2. *Magyar Epidemiológia Supplementum*, **2(1)**: 67. (2005)

6. Orsós Zs., **Varjas T.**, Szabó L., Dombi Zs., Ember I. Kiss I.: Flavin-7 hatása onko/tumor szupresszor gének expressziójára egerekben. Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság II. Nemzetközi Kongresszusa, Pécs, 2005. április 1-2. *Magyar Epidemiológia Supplementum*, **2**(1): 70. (2005)
7. K. Gombos, E. Szele, **T. Varjas**, A. Tettinger, K. Molnár, Zs. Varga, A. Sebestyén, A. Tibold, I. Ember: A VitaCalen® nevű étrendkiegészítő hatása onko- és tumor szupresszor gén expresszókra. IIIrd Congress of the Society of the Hungarian Molecular and predictive Epidemiology, 3-4 November 2006, Pécs *Magyar Epidemiológia Supplementum*, **3**: S42. (2006)
8. É. Polyák, K. Gombos, **T. Varjas**, J. Peredi, I. Ember: Az Aspartame fogyasztás hatása az onko- és tumorszupresszor gén expressziókra. IIIrd Congress of the Society of the Hungarian Molecular and predictive Epidemiology, 3-4 November 2006, Pécs *Magyar Epidemiológia Supplementum*, **3**: S71. (2006)
9. Budán F., Benkó R., Barthó L., **Varjas T.**, Szabó L., Ember I.: Az Equisetum herba mocsári zsúrló szennyezettségének kimutatása fitokémiai módszerrel és hatásának néhány jellemzője. A PTE OEKK, Orvostudományi és Egészségtudományi Szakosztálya és az Orvosi Népegészségtani Intézet Rendkívüli Jubileumi Tudományos Ülése (Kertai Professzor Úr 80 éves, Boján Professzor Úr 10 éve nincs közöttünk) Pécs, 2007. június 9. *Magyar Epidemiológia Supplementum*, **4**: 28. (2007)
10. Gombos K., Szele E., **Varjas T.**, Puskás L., Kozma L., Juhász F., Ember I.: Jelátviteli mechanizmusok összefüggéseinek vizsgálata pajzsmirigy daganatokban. A PTE OEKK, Orvostudományi és Egészségtudományi Szakosztálya és az Orvosi Népegészségtani Intézet Rendkívüli Jubileumi Tudományos Ülése (Kertai Professzor Úr 80 éves, Boján Professzor Úr 10 éve nincs közöttünk) Pécs, 2007. június 9. *Magyar Epidemiológia Supplementum*, **4**: 31. (2007)
11. Szele E., Gombos K., **Varjas T.**, Puskás L., Kozma L., Juhász F., Ember I.: Microarray módszer alkalmazása a pajzsmirigy daganatok korai felismerésében. A PTE OEKK, Orvostudományi és Egészségtudományi Szakosztálya és az Orvosi Népegészségtani Intézet Rendkívüli Jubileumi Tudományos Ülése (Kertai Professzor Úr 80 éves, Boján Professzor Úr 10 éve nincs közöttünk) Pécs, 2007. június 9. *Magyar Epidemiológia Supplementum*, **4**: 34. (2007)
12. **Varjas T.**, Wittmann Á., Nowrasteh G., Budán F., Gombos K., Ember I.: Metabolizáló enzimek génexpressziójának változása Panax ginseng extraktum hatására állatkísérletes modellben A PTE OEKK, Orvostudományi és Egészségtudományi Szakosztálya és az Orvosi Népegészségtani Intézet Rendkívüli Jubileumi Tudományos Ülése (Kertai Professzor Úr 80 éves, Boján Professzor Úr 10 éve nincs közöttünk) Pécs, 2007. június 9. *Magyar Epidemiológia Supplementum*, **4**: 36. (2007)
13. Gombos K., Szele E., **Varjas T.**, Puskás L., Kozma L., Juhász F., Ember I.: Microarray módszer alkalmazása pajzsmirigydaganatok korai felismerésében. MOT XXVII. Jubileumi Kongresszusa, Budapest 2007. november 8-10. *Magyar Onkológia*, **51**(4)

14. Gyöngyi Z., Arany I., Nádasi E., **Varjas T.**, Ember I.: A MAP kinázok potenciális biomarker szerepének vizsgálata állatkísérletben. NETT XVI. Nagygyűlése Pécs, 2008. április 17-19. *Magyar Epidemiológia Supplementum*, **5**: 47. (2008)
15. Nádasi E., **Varjas T.**, Prantner I., Virág V., Ember I.: Bioterrorizmus: a XXI. század hadviselése. NETT XVI. Nagygyűlése Pécs, 2008. április 17-19. *Magyar Epidemiológia Supplementum* **5**: 73. (2008)
16. Gombos K., Szele E., **Varjas T.**, Puskás L., Kozma L., Juhász F., Ember I.: Jelátviteli mechanizmusok összefüggéseinek vizsgálata pajzsmirigy daganatokban. NETT XVI. Nagygyűlése Pécs, 2008. április 17-19. *Magyar Epidemiológia Supplementum*, **5**: 44. (2008)
17. Nowrasteh G., Wittman Á., **Varjas T.**, Ember I.: Görögszéna kivonat hatása metabolizáló enzimek génexpressziójára in vivo állatmodellben. NETT XVI. Nagygyűlése Pécs, 2008. április 17-19. *Magyar Epidemiológia Supplementum*, **5**: 74. (2008)
18. Szele E., Gombos K., **Varjas T.**, Puskás L., Kozma L., Juhász F., Ember I.: Microarray módszer alkalmazása a pajzsmirigy daganatok korai felismerésében. NETT XVI. Nagygyűlése Pécs, 2008. április 17-19. *Magyar Epidemiológia Supplementum*, **5**: 96. (2008)
19. **Varjas T.**, Nowrasteh G., Wittmann Á., Ember I.: Metabolizáló enzimek génexpressziójának változása Panax ginseng extraktum hatására állatkísérletes modellben. NETT XVI. Nagygyűlése, Pécs, 2008. április 17-19. *Magyar Epidemiológia Supplementum*, **5**: 104. (2008)
20. Amrein Krisztina, Budán F., **Varjas T.**, Nowrasteh G., Pőcz V., Raposa B., Ember I.: D-amygalin hatása az onko/szuppresszor gének expressziójára CBA/Ca H-2k egérben. IVth Congress of the Society of the Hungarian Molecular and predictive Epidemiology, Pécs, 28-29 November, 2008. *Magyar Epidemiológia Supplementum* **5**: S.131. (2008)
21. Amrein K., Budán F., **Varjas T.**, Nowrasteh G., Pőcz V., Raposa B., Ember I.: Doxycyclin hatása F344 patkányba transzplantált májtumorra. IVth Congress of the Society of the Hungarian Molecular and predictive Epidemiology, Pécs, 28-29 November, 2008. *Magyar Epidemiológia Supplementum* **5**: S.126. (2008).
22. Budán F., **Varjas T.**, Nowrasteh G., Amrein K., Pőcz V., Raposa B., Ember I.: Diklór-acetát hatása F344 patkányba transzplantált májtumorra. IVth Congress of the Society of the Hungarian Molecular and predictive Epidemiology, Pécs, 28-29 November, 2008. *Magyar Epidemiológia Supplementum* **5**: S.134. (2008)
23. Budán F., **Varjas T.**, Nowrasteh G., Amrein K., Pőcz V., Raposa B., Ember I.: Kémiai karcinogének hatása a c-myc, Ha-ras és p53 gének expressziójára. IVth Congress of the Society of the Hungarian Molecular and predictive Epidemiology, Pécs, 28-29 November, 2008. *Magyar Epidemiológia Supplementum* **5**: S.133. (2008)
24. Horváth G., Nowrasteh G., **Varjas T.**, Paczona R., H. Westerink, Ember I.: A nyelőcsőrák epidemiológiája: Kelet és Nyugat összehasonlítása. IVth Congress of the Society of the Hungarian Molecular and predictive Epidemiology, Pécs, 28-29 November, 2008. *Magyar Epidemiológia Supplementum* **5**: S.148. (2008)

25. Gyöngyi Z., Arany I., Nádas E., **Varjas T.**, Ember I.: Policiklusos aromás szénhidrogének képesek megváltoztatni a p38 MAP kináz expresszióját fehérvérsejtekben . IVth Congress of the Society of the Hungarian Molecular and predictive Epidemiology, Pécs, 28-29 November, 2008. *Magyar Epidemiológia Supplementum 5*: S.147. (2008)
26. Ember Ágoston, Illényi László, Horváth Örs Péter, Budán Ferenc, **Varjas Tímea**, Kiss István, Németh Árpád, Szanyi István, Göbel Gyula, Ember István: Colorectalis carcinoma miatt műtéten átesett betegek monitorizálása molekuláris biomarkerek felhasználásával Magyar Sebész Társaság Coloproctológiai Szekciójának 2009 évi Kongresszusára február 13-14.
27. Kozsuch Réka, Budán Ferenc, Amrein Krisztina, Nowrasteh Ghodratollah, Bencsik Tímea, **Varjas Tímea**, Ember István: Transz-2-hexenal hatására kialakuló génexpressziós változások citokróm P₄₅₀ géncsalád egyes tagjaiban. Népegészségügyi Tudományos Társaság XVII. Nemzetközi Kongresszusa *Magyar Epidemiológia Supplementum 6*: S.59 (2009)
28. Pőcz Viktória, Budán Ferenc, Nowrasteh Ghodratollah, Bencsik Tímea, Lőrincz Tibor, **Varjas Tímea**, Ember István: *Aspalathus linearis* génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata Q-RT-PCR-ral, 7,12-Dimethylbenz[a]antracén exponált egerekben Népegészségügyi Tudományos Társaság XVII. Nemzetközi Kongresszusa Magyar Epidemiológia Supplementum 6: S.80 (2009)
29. Pőcz Viktória, Budán Ferenc, Nowrasteh Ghodratollah, Lőrincz Tibor, Bencsik Tímea, **Varjas Tímea**, Ember István: Zöld tea kivonatok hatásának vizsgálata CYP enzimek génexpressziójára 7,12-Dimethylbenz[a]antracén exponált egereken Népegészségügyi Tudományos Társaság XVII. Nemzetközi Kongresszusa Magyar Epidemiológia Supplementum 6: S.81 (2009)
30. Raposa Bence, Budán Ferenc, Lőrincz Tibor, Gyöngyi Zoltán, Kisbenedek Andrea, **Varjas Tímea**, Ember István: A tartrazin génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata DMBA expozíciónak kitett egerekben Népegészségügyi Tudományos Társaság XVII. Nemzetközi Kongresszusa *Magyar Epidemiológia Supplementum 6*: S.83 (2009)
31. Raposa Bence, Budán Ferenc, Nowrasteh Ghodratollah, Kisbenedek Andrea, **Varjas Tímea**, Ember István: Az azorubin expozíciónak kitett egerekben kialakuló mRNS expressziós mintázat vizsgálata Q-RT-PCR-ral Népegészségügyi Tudományos Társaság XVII. Nemzetközi Kongresszusa Magyar Epidemiológia Supplementum 6: S.84, (2009)
32. Bencsik Tímea, Budán Ferenc, Varjas Tímea, Papp Nóra: A növényi hatóanyagok gyógyászati felhasználásának és toxicitásának tudományos alapjai és irodalmi munkák összegzése Népegészségügyi Tudományos Társaság XVII. Nemzetközi Kongresszusa *Magyar Epidemiológia Supplementum 6*: S.22 (2009)
33. Budán Ferenc, Gyöngyi Zoltán, Nowrasteh Ghodratollah, **Varjas Tímea**, Ember István: Az E-2-(4-metoxibenzilidén)-1-benzoszuberon hatása a génexpresszióra N-nitroso-N-metil-karbamiddal exponált egerekben Népegészségügyi Tudományos Társaság XVII. Nemzetközi Kongresszusa *Magyar Epidemiológia Supplementum 6*: S.27 (2009)
34. Budán Ferenc, Pőcz Viktória, Lőrincz Tibor, Bencsik Tímea, **Varjas Tímea**, Ember István: Zöld- és vörös tea kivonatok 7,12-Dimetilbenz[a]antracén indukálta CYP enzimek génexpressziójának gátlása, állatkísérletben. *Egészségtudomány 53(2)*: 110 (2009)

35. Budán Ferenc, Dávid Tamás, Bencsik Tímea, Finta Hajnal, **Varjas Tímea**, Ember Istvan: A CoD™ tea fogyasztása növeli a 7,12-Dimetilbenz[a]antracén (DMBA) exponált egerek túlélési idejét. *Egészségtudomány* **53(2)**: 111 (2009)
36. Budán Ferenc, Dávid Tamás, Bencsik Tímea, Finta Hajnal, **Varjas Tímea**, Ember István: A CoD™ tea fogyasztása csökkentette a 7,12-Dimetilbenz[a]antracén (DMBA) indukálta onko/szuppresszor gének expressziójának emelkedését, krónikus állatkísérletben *Egészségtudomány* **53(2)**: 112 (2009)

Nemzetközi folyóiratokban megjelent absztraktok - The list of abstracts appeared in international journals

1. **Varjas T.**, Nadasai E., Pusztai Zs., Ember I., Gyöngyi Z., Durnev A., Kiss I.: Anticarcinogenic effect of bemitil (an antioxidant compound) in a gene expression model. *Anticancer Research*. **21(3A)**:1620 (2001)
2. I. Ember, I. Kiss, J. Sandor, Cs. Varga, **T. Varjas**, Z. Gyöngyi: The Biomarker conception. Renewal of the molecular and predictive epidemiology. 18th UICC International Cancer Congress. Norway, Oslo 2002 June30-july 5 *International Journal of Cancer*. Suppl. **13**: 148. (2002)
3. Ember I., Kiss I., Sandor J., Nadasai E., **Varjas T.**, Gyongyi Z., Nowrasteh G., Varga Cs.: Present and future of the molecular epidemiology. *European Journal of Public Health Suppl. Program and abstract of the 11th ANNUAL EUPHA Meeting, Rome, Italy 20-22 november* (2003)
4. I. Ember, Zs. Faluhelyi, I. Kiss, A. Kvarda, L. Bújdosó, Á. Ember, Á. Németh, A. Csejtei, G. Nowrasteh, **T. Varjas**: Molecular epidemiological biomarkers of the primary prevention of cancer. VII. International Conference of Anticancer Research, Corfu, *Anticancer Research*. **24(5D)**: 3479. (2004)
5. **T. Varjas**, G. Nowrasteh, E. Nádasi, V. Virág, A. Simon, B. Gunszt, I. Ember: The early effect of plants extracts on tumor growth due to carcinogen exposure. VII. International Conference of Anticancer Research, Corfu, *Anticancer Research* **24(5D)**: 3664. (2004)
6. I. Ember, I. Kiss, Cs. Varga, **T. Varjas**, G. Nowrasteh, E. Nádasi, Á. Németh: Molecular epidemiological biomarkers in risk assessment of cancer. The 10th World Congress on Advances in Oncology and 8th International Symposium on Molecular Medicine. 13-15 October, 2005, Hersonissos, Crete, Greece, *International Journal of Molecular Medicine*. **16**: suppl. 1. (2005)
7. I. Ember, L. Puskás, I. Kiss, G. Nowrasteh, I. Prantner, L. Kozma, F. Juhász, **T. Varjas**: Using of DNA-chip methods in early recognition of thyroid tumours (first hungarian study) Hersonissos, Crete, Greece, 12-14 October, 2006. *International Journal of Molecular Medicine*. Supplement **18**: 368. (2006)
8. K. Gombos, **T. Varjas**, É. Polyák, J. Peredi, I. Ember: The effect of aspartam consumption on gene expression „in vivo” biological system. Hersonissos, Crete, Greece, 12-14 October, 2006. *International Journal of Molecular Medicine*, Supplement **18**: 369. (2006)

9. Nowrasteh G., **Varjas T.**, Á. Benkő, Ember I.: The impact of plant extract on gene expression - clinical epidemiological trials. Int. Conf. Recent Advances in Clinical Oncology, 2007. 19-22 February, Al Ain - United Arab Emirates, *Emirates Medical Journal*. **25**(1). suppl. (2007)
10. Ember I., Gombos K., **Varjas T.**, Kiss I., Szele E., Varga Cs., Puskás L., Kozma L., Juhász F., Varga Z., Ember Á.: Characterization of microarray gene expression profiles of thyroid tumors. Int. Conf. Recent Advances in Clinical Oncology, 2007. 19-22 February, Al Ain - United Arab Emirates *Emirates Medical Journal*. **25**(1). suppl. (2007).
11. I. Ember, L. Szabó, I. Kiss, **T. Varjas**, Z. Gyöngyi: Can we increase CD34+ stem cell numbers in circulating peripheral blood using natural compounds in animals? 8th International Conference of Anticancer Research, Greece, Kos 17-22 October, 2008. *Anticancer Research* **28**: 3157-3556, A187, (2008)
12. I. Ember, I. Arany, E. Nádasi, **T. Varjas**, Z. Gyöngyi: P38 MAP kinase as a possible biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. 8th International Conference of Anticancer Research, Greece, Kos 17-22 October, 2008. *Anticancer Research* **28**: 3157-3556, A188, (2008)
13. **T. Varjas**, F. Budán, Á. Ember, K. Amrein, Ó. P. Horváth, L. Illényi, D. B. Antonio, T. Dávid, P. Perjési, E. Pázsit, I. Ember: The Effect of unicaria extract on molecular biomarkers in patients with colorectal cancer. 8th International Conference of Anticancer Research, Greece, Kos 17-22 October, 2008. *Anticancer Research* **28**: 3157-3556, A695, (2008)