

Metil-donorok hatásának vizsgálata tumor sejtvonalakon és daganatos betegekben

Doktori értekezés

Kiss Éva

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Dank Magdolna, PhD, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Árkosy Péter, PhD, egyetemi docens
Dr. Csóka Monika, PhD, egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Nyirády Péter, DSc, egyetemi tanár

Tagok: Veresné Dr. Bálint Márta, PhD, főiskolai tanár
Dr. Horváth-Nikolényi Alíz, PhD, egyetemi adjunktus

Budapest
2022

1. Bevezetés

A daganatos megbetegségek előfordulása növekvő tendenciát mutat világszerte, annak ellenére, hogy az esetek 30-50%-a megelőzhető lenne a kockázati tényezők elkerülésével és a bizonyítékokon alapuló megelőzési irányelvek betartásával. A daganatok kialakulásában környezeti, életmódbeli, illetve szervezeten belül keletkező kiváltó okok is szerepet játszhatnak. A daganatkialakulást előidéző belső tényezőkhöz soroljuk például az öröklött mutációkat, a hormonrendszer eltéréseit vagy az immunrendszer kóros működéseit. A daganatok csupán 5-10%-át okozzák örökletes genetikai rendellenességek. A külső vagy más néven környezeti kockázati tényezők közé soroljuk a táplálkozást és a fizikai aktivitást, illetve az ezek nem megfelelő minőségének és szintjének következtében kialakuló elhízást, továbbá a dohányzást, az alkoholfogyasztást (azaz gyújtó néven az életmódi tényezőket) és a kórokozók okozta fertőzéseket. Az öröklött tényezők befolyásolhatók az életmódbeli tényezők epigenetikai hatásai által, melyek a genetikai szabályozást módosítva szerepet játszhatnak a betegségek kialakulásának megelőzésében. A megelőzésben és a kezelések kiegészítéseként egyre nagyobb szerepet tulajdonítanak a táplálkozásnak, a rendszeres fizikai aktivitásnak, a mentális egészség megőrzésének vagy a megfelelő pszichológiai támogatásnak. A táplálkozás hozzájárulhat a kezelések sikerességéhez, a mellékhatások csökkentéséhez, valamint a betegek tápláltsági állapotának és általános jólétének javításához is. Mindemellett a kiegyensúlyozott és változatos táplálkozás, mely megfelelő arányban tartalmaz zöldségeket, gyümölcsöket, teljes értékű gabonákat és fehérjéket, csökkentheti a daganatok kialakulásának kockázatát. Éppen ezért van szükség az élelmiszerekben található makro- és mikrotápanyagok vagy biológiailag aktív vegyületek hatásainak minél alaposabb és széleskörűbb vizsgálatára.

Az egy-szén ciklus biokémiai reakciók összessége, melyek lehetővé teszik a metabolikus anyagcseréhez szükséges 1-szén egységek (metenil-, formil- és metil-csoportok) szállítását. Ilyen fiziológiai folyamatok például az aminosavak és nukleinsavak felépítése, a génexpresszió metiláció általi szabályozása, a redox-homeosztázis fenntartása, a sejtek szaporodása, illetve a programozott sejthalál szabályozása, valamint a DNS epigenetikai módosítása, a DNS metilációja révén. Azokat az étrendi összetevőket, melyek az 1-szén egységek közvetítése során koenzimként biztosítják a ciklus enzimeinek működését, metil-donor vegyületeknek nevezzük. Ezek a folát, a betain, a kolin, a metionin, valamint

a B2, B6 és B12 vitaminok. Az egy-szén ciklusban részt vevő enzimekben előforduló genetikai eltérések is befolyásolják a ciklus működést. Ezek közül az egyik legismertebb az MTHFR enzimet kódoló gén 677-es pozícióját érintő (*MTHFR* C677T) egyponos nukleotid polimorfizmus (SNP). A gén heterozigóta (CT) mutációja csökkent, megközelítőleg 65%-os, míg a homozigóta (TT) mutáció már csak 30%-os enzimaktivitást eredményez. A metil-donorok hiánya a szervezetben krónikus megbetegedésekhez vezethet, de rendellenességeket okozhat a nukleotid szintézisben is. A táplálkozással bevihető metil-donorok fontosságát, illetve daganat megelőző és kockázat csökkentő hatását széles körben vizsgálták már, többek között emlő, kolorektális, hasnyálmirigy és tüdő tumorok esetében is.

2. Célkitűzések

Munkám első részében az elérhető szakirodalmi adatok összegyűjtésével szerettem volna felmérni a metil-donorokkal kapcsolatos már ismert tudományos eredményeket. Ezért célul tűztem ki, hogy

1. szisztematikus irodalomgyűjtést végzünk, majd metaanalízissel összefüggést keresünk a metil-donor bevitel és a kolorektális daganat kialakulásának kockázata között.

Mivel a metil-donorok hatásmechanizmusára vonatkozó ismeretek, valamint az, hogy mely szignalizációs útvonalon keresztül fejtik ki hatásukat még nem teljesen feltártak, munkám következő részében célul tűztem ki, hogy megvizsgáljuk

2. a metil-donorok hatását a daganatos sejtek növekedésére és proliferációjára,
3. a metil-donorok szerepét a programozott sejthalálhoz kapcsolódó útvonalakban,
4. a metil-donorok hatását gyulladási folyamatokra,
5. a metil-donoroknak a metasztázis markerek expressziójára kifejtett hatását.

Végül szakirodalmi adatok alapján feltételeztük, hogy a daganatos betegek metil-donor bevitele befolyásolhatja a betegség kimenetelét, ezért célom volt

6. a daganatos betegek metil-donor fogyasztásának felmérése,
7. ezzel egyidejűleg egyes életmódbeli és szocioökonómiai tényezők vizsgálata,
8. a metil-donor bevétel túlélésre gyakorolt hatásának vizsgálata,
9. megvizsgálni egyes gyulladássos markerek hatását a túlélésre.

3. Módszerek

3.1 Szisztematikus irodalomelemzés és metaanalízis

Szisztematikus irodalomkutatást végeztünk a PubMed, Ovid-Medline, Web of Science (WoS) és ProQuest elektronikus adatbázisokban. A keresés során olyan publikációkat gyűjtöttünk ki, melyeket a következő keresőszavak kombinációjának eredményeként kaptunk meg: B vitaminok, B2 vitamin, B6 vitamin, B12 vitamin, kolorektális daganat és étrendi bevétel. A keresési találatokat cím és absztrakt alapján vizsgáltuk át, majd bevonási és kizárási feltételek alapján tovább szűrtük a találatokat.

3.1.1 Statisztikai analízis

A véletlen hatás modell (random effects model) alapján összesítettük a megfigyelt hatásnagyságokat, beleértve az esélyhányadosokat, a konfidencia intervallumokat és a tanulmányok súlyozását. Kiszámoltuk a kombinált hatásnagyságokat (CES), valamint a hozzájuk tartozó 95%-os konfidencia intervallumokat és 95%-os előrejelzési értéktartományokat (PI). A heterogenitás meghatározására I^2 statisztikát és Cochran's Q tesztet végeztünk. A heterogenitás lehetséges okának kiszűrésére meghatároztuk a kiugró hatásnagyságokkal rendelkező tanulmányokat, melyhez tölcserdiagramot és Galbraith diagramot használtunk. A tölcserdiagram elemzése során a 'Trim and Fill' módszert is alkalmaztuk a valós hatásnagyság és a kombinált hatásnagyság szórásának becsléséhez. A tanulmányok publikációs torzításának értékeléséhez elvégeztük az Egger regressziós tesztet és a Begg és Mazumdar-féle rangkorrelációs tesztet.

3.2 *In vitro* vizsgálatok

3.2.1 Sejttenyésztés

In vitro kísérleteink során emlő (MCF7, T47D), tüdő (A549, H1650) és hasnyálmirigy (Panc-1) tumor sejtvonalakat használtunk. A sejtvonalakat a nekik megfelelő tápfolyadékokban tenyésztettük, melyeket 10% főtális borjú szérummal és 0,4% gentamicinnel egészítettünk ki. A T47D sejtvonal esetében további 10 µg/ml inzulint is adtunk a tápfolyadékhoz. A sejteket a fenntartás során, valamint a kezelések ideje alatt 37°C-on, 5 %-os CO₂ koncentráció mellett tenyésztettük inkubátorban. A vizsgált tumor sejteken metil-donorokból álló kezelést alkalmaztunk, melyhez L-metionint, kolin-kloridot, folátot és B12 vitamint használtunk 1x-es, 10x-es és 20x-os koncentrációban.

3.2.2 Életképesség mérés

A kezelt sejtek életképesség mérését kolometrikus MTS esszével végeztük el. 24, 48 és 72 órával a metil-donor kezelés után 20 µl MTS reagenst adtunk a sejtekhez, majd 2 óra inkubáció után 490 nm-en lemértük a képződő formazán termék abszorbanciáját plate reader készülék segítségével.

3.2.3 Áramlási citometriás mérések

A 24, 48 és 72 órás metil-donor kezelés után a sejteken lévő tápfolyadékot, majd az egyszeres tripszin-EDTA oldatos kezelés után a sejteket is összegyűjtöttük és lecentrifugáltuk (1500 rpm, 5 perc). Ezt követően a foszfáttal pufferelt sóoldattal (PBS) még kétszer átmosott sejteket a továbbiakban az apoptózis és sejtciklus mérésekhez használtuk fel.

3.2.3.1 Apoptózis mérés

Az apoptotikus sejtfrakció meghatározásához Annexin V (AnnV) és propidium-jodid (PI) festésen alapuló apoptózis detektáló kitet használtunk. Centrifugálás után a kitben található Annexin Binding Buffer-ben oldottuk fel a sejteket, majd hozzáadtuk a szuszpenzióhoz a fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) jelölt Ann V fehérjét 1:100 hígításban és 15 percig inkubáltuk fénytől elzárt helyen. A mérést megelőzően 1 µl PI-dal is megfestettük a sejteket. Minden minta esetén 10.000 eseményt detektáltunk azonos

beállítási paraméterek mellett, CytoFLEX Flow Cytometer és a hozzá tartozó CytExpert szoftver segítségével.

3.2.3.2 *Sejtciklus mérés*

Sejtciklus méréseinket fixált sejteken végeztük el PI-os festést követően. A mosási lépéseket követő centrifugálás után a sejtpellethez cseppenként adtuk hozzá a 70%-os jéghideg etanolt és 20 percig szobahőmérsékleten, majd további 30 percig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on fixáltuk a sejteket. Kétszeri PBS-es mosást követően a sejteket 1%-os RNáz és 20 μl PI tartalmú PBS-ben reszuszpendáltuk, majd 1 órán át inkubáltuk $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. A sejtek fluoreszcens intenzitásának meghatározására 20.000 eseményt detektáltunk azonos beállítási paraméterek mellett, CytoFLEX Flow Cytometer és a hozzá tartozó CytExpert szoftver segítségével.

3.2.4 **Western blot**

A fehérjeizoláláshoz a sejtekre 0,5 mM nátrium-ortovanadáttal (Na_3VO_4), 10 mM nátrium-fluoriddal (NaF) és 1:200 proteáz inhibitor koktéllal kiegészített RIPA (radioimmunoprecipitation assay) lízispuffert pipettáztunk. Az edény aljáról sejtkaparó segítségével összegyűjtöttük, majd pipettával Eppendorf csövekbe helyeztük a lizátumokat. Alapos szuszpendálás után jégen 30 percig állni hagytuk, ezután $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra lehűtött centrifugával 12.000 rpm-en 15 percig centrifugáltuk. A felülúszókat átpipettáztuk tiszta Eppendorf csövekbe és az így kapott fehérje lizátumok összfehérje koncentrációját Pierce Rapid Gold BCA Protein Assay Kit segítségével határoztuk meg a gyártói utasítás szerint. A fehérje extraktumokat ötszörös töménységű mintafelvivő pufferrel egészítettük ki és $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 5 percig melegítettük, majd felhasználásig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

A fehérjék vizsgálatához sejtvonaltól függően mintánként és vizsgálatonként azonos mennyiségű, vizsgalattól függően 12 - 30 μg közötti összfehérje mennyiséget vittünk fel SDS tartalmú 10%-os poliakrilamid géltre (SDS-PAGE), melyeket 80 V-on 20 percig, majd 180 V-on 50 percig futtattunk Mini Protean vertical electrophoresis készülék segítségével. A lefutott fehérjéket polivinil-difluorid (PVDF) membránra blottoltuk 100 V-os feszültséggel 60 percen keresztül $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. Tejporos blokkolás után a membránokat elsődleges antitestekkel inkubáltuk egy éjszakán át $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. Mosási

lépések után a megfelelő torma-peroxidáz (HRP)-konjugált másodlagos ellenanyagokkal történő jelölést végeztük el. A membránok előhívása SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit használatával történt a gyártói utasítás alapján, majd ezt követően az eredmények vizualizálását iBright FL1500 Imaging System készülékkel végeztük el. Az immunoblottok denzitometriás kiértékelése Image J szoftverrel történt.

3.2.5 Citokin array

A gyulladáshoz citokinek vizsgálatához Panc-1 sejtek metil-donor kezelés utáni felülcsúszóját gyűjtöttük be, melyeket a mérésekig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A sejtek által termelt gyulladáshoz citokin szinteket Proteome Profiler Human XL Cytokine Array Kit segítségével határoztuk meg. A mérések a gyártói utasítások szerint történtek. A membránok vizualizálását iBright FL1500 Imaging System készülékkel végeztük el. Az átlagos jelintenzitások kiértékelése Image J szoftverrel történt.

3.2.6 Statisztikai analízis

Eredményeink kiértékelését GraphPad Prism szoftverrel végeztük el. A statisztikai elemzéshez párosított mintás Wilcoxon-féle előjeles rangpróbát és Bonferroni vagy Geisser–Greenhouse post hoc teszttel kiegészített egy- vagy többszemponos ANOVA-t használtunk. A többszörös összehasonlításokat Dunnett-tesztel végeztünk. A csoportok közötti eltéréseket $p < 0,05$ értéknél tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Ez alól kivételt képeztek az MCF7, T47D, A549 és H1650 Western blot-ok értékelése, ahol a szignifikancia szintet a New England Journal of Medicine (NEJM) szerinti $p < 0,033$ értéknél határoztuk meg.

3.3 Kérdőíves felmérés és humán mintán végzett vizsgálatok

3.3.1 A vizsgálatban résztvevő betegek

A vizsgálatba 41 emlő (BC), 37 kolorektális (CRC) és 36 hasnyálmirigy (PC) daganattal diagnosztizált beteget vontunk be életkorra, nemre vagy kezelési protokollra vonatkozó kitétel nélkül. A vizsgálatban való részvétel teljesen önkéntes volt. A vizsgálat megkezdését a szükséges szakhatósági állásfoglalást kiadó etikai bizottság, az

Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (ETT TUKEB) engedélyezte (28123-6/2019/EÜIG).

3.3.2 A szocioökonómiai háttérrel, egyes életmódbeli szokásokat és a metil-donor fogyasztás gyakoriságát felmérő kérdőív

A daganatos betegek körében egy önállóan összeállított, zárt kérdésekből álló kérdőíves felmérést végeztünk, mellyel szocioökonómiai adatokat, életmódbeli tényezőket és metil-donor tartalmú élelmiszerek fogyasztási gyakoriságát rögzítettünk. A fogyasztási gyakoriságok kikérdezését Food Frequency Questionnaire (FFQ) módszerrel végeztük. Az FFQ alapján bevitt metil-donor mennyiségeket az USDA (U.S. Department of Agriculture) FoodData Central elektronikus adatbázisának segítségével határoztuk meg. A beviteli értékek alapján a betegeket alacsony, közepes és magas napi szerinti csoportokba osztottuk, ahol az alacsony napi bevitel jelentette az RDA (Recommended Dietary Allowances) körüli vagy annál alacsonyabb bevitelt. A statisztikai elemzések során a metil-donorok közül a betain, kolin, metionin, folát és B2, B6, B12 vitaminok egyenkénti és összesített hatását vizsgáltuk a betegek túlélésére vonatkozóan.

3.3.3 Humán vérminták

A vizsgálatainkba bevont személyektől laboratóriumi vérvétel során trikálium-etiléndiamin-tetraecetsav (K3-EDTA) antikoagulánst tartalmazó csőbe vénás vért gyűjtöttünk. A vérmintákat centrifugálással szeparáltuk 3000 rpm fordulatszámon 10 percig 4 °C-on. Az alakos elemektől szétválasztott sejtmentes vérplazmát egy tiszta csőben ismét lecentrifugáltuk, majd aliquotokba osztottuk szét és -20 °C-on tároltuk a felhasználásig.

3.3.4 Szendvics ELISA

Az IL-6 és IL-8 citokinek kvantitatív vizsgálatához a vérmintákból származó vérplazmákat használtuk fel. A vérplazmákban található IL-6 és IL-8 koncentrációkat Quantikine Human ELISA Kit segítségével határoztuk meg gyártói utasítás szerint. A méréseket humán IL-6 vagy IL-8 citokinekre specifikus monoklonális ellenanyaggal előre bevont felszínű plate-eken végeztük. A megfelelő mennyiségű minták kiosztása után az inkubációs idő alatt a mintában található citokinek hozzákötődtek az antitestekhez. Mosási lépések után adtuk hozzá a HRP-konjugált poliklonális

ellenanyagot. Ismételt mosási lépéseket követően a szubsztrát oldat hozzáadásával kapott színváltozás intenzitása jól mutatta a plate-eken megkötött citokinek mennyiségét. Az egyes lyukakban mérhető optikai denzitást 450 nm-en mértük le plate reader készülék segítségével. A vérplazmákban mért IL-6 és IL-8 citokin koncentrációkat standard görbék alapján számoltuk ki és pg / ml mértékegységben adtuk meg.

3.3.5 Statisztikai analízis

A kérdőívek szocioökonómiai és életmódbeli tényezőkre vonatkozó adatait leíró statisztika segítségével elemeztük, melyet Microsoft Excel szoftver segítségével végeztünk el. Minden más statisztikai elemzéshez Bonferroni post hoc teszttel kiegészített többszemponos ANOVA-t, Mantel-Cox log-rank tesztet és Spearman-féle nem parametrikus korrelációanalízist alkalmaztunk, melyhez GraphPad Prism szoftvert használtunk. A csoportok közötti eltéréseket $p < 0,05$ értéknél tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Ez alól kivételt képez a szendvics ELISA kiértékelése, ahol a szignifikancia szintet a GP Prism stílus szerint határoztuk meg (*: $0,01 < p < 0,05$; **: $0,001 < p < 0,01$; ***: $0,0001 < p < 0,001$ és ****: $p < 0,0001$).

4. Eredmények

4.1 A szisztematikus irodalomkutatás és metaanalízis felépítése

Az elektronikus irodalomkutatás eredményeként összesen 1021 darab publikációt gyűjtöttünk ki a négy adatbázisból, melyből végül 14 tanulmányt vontunk be a kvantitatív metaanalízisbe (9 kohorsz és 5 eset-kontroll tanulmányt). Az első analízisben a B vitamin bevitel CRC-re gyakorolt hatását vizsgáltuk. A második analízisben a kiszámolt általános esélyhányados reprezentálta az *MTHFR* C667T homozigóta polimorfizmus és a B vitaminok közötti összefüggést, amely befolyásolja a polimorfizmus okozta CRC kialakulásának kockázatát.

4.2 A B vitaminok bevitele és a CRC kialakulásának kockázata közötti összefüggés

A legmagasabb és legalacsonyabb B2 vitamin beviteli kategóriákat összehasonlítva a kombinált hatásnagyság CRC kialakulására 0,90 volt, 95%-os CI mellett (0,83 – 0,97),

ami arra utal, hogy a magasabb B2 vitamin bevitel fordítottan arányos a CRC kialakulásának kockázatával. A metaanalízis során kapott eredmények azt is kimutatták, hogy a magasabb étrendi B6 vitamin bevitel által csökken a CRC kialakulásának esélye (CES = 0,80; CI95% 0,68 – 0,92). A B12 vitaminokat tárgyaló kohorsz tanulmányok esélyhányadosaiból kiszámolt kombinált hatásnagyság alapján megfigyeltük, hogy a magasabb B12 vitamin bevitel megemelheti a CRC kialakulásának kockázatát (CES = 1,10; CI95% 0,80 – 1,39; PI95% 0,50 – 1,69) egyes populációkban. Annak ellenére, hogy a hatásnagyság értékek közül nem igazolt kiugró értéket sem a tölesérdiagram, sem a Galbraith plot, az Ishihara és munkatársai által közölt tanulmányt feltételeztük leginkább eltérőnek az eredmények alapján, ezért az Ishihara által közölt eredményeket kizártuk az elemzésből. Az újraszámolt kombinált hatásnagyságra 1 alatti értéket kaptunk (CES = 0,98) és az I^2 mérsékeltebb, nem szignifikáns értékűre változott ($I^2 = 36,69\%$; $p = 0,177$).

4.3 A B vitaminok bevitele és az *MTHFR* polimorfizmus közötti összefüggés

A véletlen hatás modell alapján azt találtuk, hogy a magasabb B2 és B6 vitamin bevitel csökkentheti a CRC kialakulásának kockázatát azoknál a betegeknél, akiknél jelen volt az *MTHFR* C667T polimorfizmus.

4.4 A metil-donor kezelés hatása a tumorsejtek életképességére

A 20x-os töménységben alkalmazott metil-donor kezelés az összes vizsgált sejtvonal esetében szignifikánsan csökkentette a tumorsejtek proliferációját a kezeletlen kontroll csoporthoz képest. Ez a hatás az A549 sejtvonalnál már 24 óra után jelentkezett ($p < 0,01$), míg MCF7 ($p < 0,05$ és $p < 0,01$) és Panc-1 ($p < 0,01$ és $p < 0,01$) sejtek esetében 48 és 72 órás kezelés után mértünk jelentős csökkenést. A T47D ($p < 0,01$) és H1650 ($p < 0,001$) sejtvonalak proliferációja 72 órás 20x-os töménységű metil-donor kezelést követően csökkent le.

4.5 A sejtciklus subG1 fázisának változása metil-donor kezelés után, valamint az ehhez kapcsolódó jelátviteli útvonal elemeinek változása

A 20x-os metil-donor koncentrációval kezelt tumorsejtek mindegyikében megemelkedett a subG1 sejtek aránya. Szignifikáns változást az MCF7 sejtekben 48 és 72 órás kezelés

után ($p < 0,001$), a T47D sejtekben 72 órás kezelés után ($p < 0,01$, valamint a Panc-1 sejtekben 48 órás kezelés után mértünk ($p < 0,05$).

20x-os koncentrációjú metil-donor kezelés hatására szignifikánsan lecsökkent az AKT szintje az A549 sejtekben 24 óra után, az MCF7 sejtekben 48 óra után és a T47D sejtekben 72 óra után a kontroll csoporthoz képest ($p < 0,001$). Ezeknél a sejtvonalaknál az anti-apoptotikus AKT csökkenésével együtt szintén szignifikánsan csökkentek a sejtekben mért p-ERK1/2 szintek ($p < 0,001$) is, az előbb leírt koncentrációnál és kezelési időknél. Azonban az MCF7 sejtek 72 órás metil-donor kezelése az AKT és a p-ERK1/2 szintjeinek emelkedését okozta az alkalmazott kezelési koncentrációkban ($p < 0,001$). A H1650 sejtek esetében hasonlóan emelkedett AKT szinteket detektáltunk 72 órás kezelés után ($p < 0,001$). Ezen felül az A549 sejtekben a 10x-es koncentrációjú kezelés p-ERK1/2 emelkedést okozott ($p < 0,001$). A másik általunk vizsgált tüdő sejtvonalnál, a H1650-nél, azonban 72 órás 20x-os koncentrációjú metil-donor kezelés után p-ERK1/2 csökkenést tapasztaltunk a kontrollhoz képest ($p < 0,001$).

A p-ERK1/2 szintjének visszaesését szintén kimutattuk a Panc-1 sejtek 48 órás 1x-es ($p < 0,05$) és 20x-os ($p < 0,001$) koncentrációjú metil-donor kezelése után.

A metil-donor kezelések következtében szignifikánsan lecsökkent a p-p53 (Thr55) fehérje szintje az összes vizsgált sejtvonal esetében. A Ser15-ön foszforilált p53 szintje csak az MCF7 sejtekben emelkedett meg 72 órás 10x-es ($p < 0,001$) és 20x-os ($p < 0,002$) koncentrációjú kezelést követően.

A p21^{WAF1/Cip1} fehérje szintjének szignifikáns emelkedést találtunk Panc-1 sejtekben, melyet a 20x-os koncentrációjú metil-donor kezelés hatására detektáltunk 48 óra után a kontroll csoporthoz képest ($p < 0,001$).

4.6 A metil-donor kezelés által okozott apoptózis és az intrinsic apoptózis útvonalban szereplő pro- és anti-apoptotikus fehérjék változása a kezelés hatására

Méréseink alapján azt találtuk, hogy az AnnV egyszeresen pozitív korai apoptotikus sejtek aránya szignifikánsan megemelkedett az A549 sejtekben 24 órás ($p < 0,001$), a H1650 sejtekben ($p < 0,05$) és a T47D sejtekben ($p < 0,01$) 72 órás 20x-os koncentrációjú metil-donor kezelés után a kontrollhoz képest.

Az MCF7 emlő tumor sejtekben a pro-apoptotikus caspase-9 ($p < 0,033$), a BAK ($p < 0,033$) és a BAX ($p < 0,001$) fehérjék szintje szignifikánsan megemelkedett 72 órás 20x-os

koncentrációjú metil-donor kezelés után. A szintén pro-apoptotikus PUMA viszont szignifikáns csökkenést mutatott 48 órás kezelés után mind a 10x-es ($p < 0,002$), mind a 20x-os ($p < 0,033$) koncentrációknál. A caspase-9, BAK és BAX fehérjék növekedésével összhangban szignifikánsan lecsökkent az anti-apoptotikus MCL-1 fehérje szintje ($p < 0,033$), azonban a BCL-2 fehérje esetében 48 órás ($p < 0,033$) és 72 órás ($p < 0,002$) kezelés után is szignifikáns emelkedést tapasztaltunk.

A tüdő tumor sejtvonalak közül a H1650 sejtek esetében szignifikánsan emelkedett pro-apoptotikus fehérje (caspase-9, BAK, BAX, PUMA) szinteket, valamint szignifikánsan csökkent anti-apoptotikus BCL-2 szintet detektáltunk 72 órás kezelés után, ami az összes metil-donor koncentrációnál jelentkezett, kivéve a caspase-9-nél, ahol a növekedést csak a 10x-es metil-donor koncentráció esetében láttuk.

Az A549 sejtek 24 órás metil-donor kezelése után csak a caspase-9 fehérje szintjének szignifikáns növekedését tapasztaltuk ($p < 0,002$) a 20x-os koncentrációnál. A Panc-1 sejtvonal metil-donor kezelése után a caspase-9, a BAK és a PUMA fehérjék szintje emelkedett meg szignifikánsan a 72 órás 20x-os kezelést követően ($p < 0,01$).

4.7 A metil-donorok hatása Panc-1 sejtek metasztatikus potenciáljára

A citokin array eredménye alapján a 20x-os metil-donor koncentrációval történt kezelést követően szignifikáns csökkenést találtunk a VEGF ($p < 0,05$) és az SDF-1a ($p < 0,01$) fehérjék szintjében 48 óra után a kontroll csoporthoz képest. Az SDF-1a szintjének csökkenését Western blot-tal is igazoltuk. Ezen felül szignifikánsan megnövekedett az E-cadherin fehérje szintje mindkét alkalmazott metil-donor koncentráció esetében 48 óra után a kezeletlen kontrollhoz képest ($p < 0,01$).

4.8 A metil-donorok hatása Panc-1 sejtek gyulladási folyamataira

Citokin array-vel kimutattuk, hogy az IL-17 citokin szintje szignifikánsan lecsökkent 48 órás 20x-os koncentrációjú metil-donor kezelés után a kontrollhoz viszonyítva ($p < 0,01$). Ugyezen koncentráció és kezelési idő mellett, az NFkB fehérje szintjében szintén szignifikáns ($p < 0,05$) csökkenést mutattunk ki Western blottal a kontrollhoz képest.

4.9 A kérdőíves felmérés eredménye

4.9.1 Leíró adatok összegzése

A vizsgálatban összesen 122 beteg vett részt, akik közül a kérdőíves felmérésbe végül 41 emlő, 37 kolorektális és 36 hasnyálmirigy daganattal diagnosztizált beteget vontunk be. Összesen 83 nőt és 31 férfit kérdeztünk ki. A BC csoportban $52,95 \pm 12,14$, a CRC csoportban $58,68 \pm 9,23$ és a PC csoportban $60,44 \pm 9,29$ volt az átlag életkor. A betegek körülbelül felének a legmagasabb iskolai végzettsége valamilyen felsőfokú végzettség volt és mindössze 3,57%-uk rendelkezett kizárólag általános iskolai végzettséggel. Családi állapotukra vonatkozóan megállapítottuk, hogy a beválogatott betegek 57,52%-a házasságban élt, 15,04%-uk elvált, 9,73%-uk özvegy volt és 12,39%-uk egyedülálló volt az interjú időpontjában. A legtöbb beteg valamelyik városból vagy község méretű településről érkezett a klinikára, míg a fővárosban élő betegek aránya 34,21% volt.

4.9.2 Dohányzás, alkoholfogyasztás és fizikai aktivitás a betegek körében

Az összes betegcsoportot együtt vizsgálva kiderült, hogy a betegek 84%-a egyáltalán nem dohányzik, a naponta rendszeresen dohányzók aránya 14% volt. Közülük a PC csoportban volt a legmagasabb (28%) és a BC csoportban a legalacsonyabb (2%) a naponta dohányzók száma. A dohányzás szignifikáns negatív korrelációt (Spearman $r = -0,350$; $p = 0,043$.) mutatott az össz-metil-donor bevitellel a PC betegcsoportban.

A résztvevő betegek 84%-a nem vagy legfeljebb egyszer egy hónapban fogyaszt alkoholt. A PC csoportban fordultak elő a legnagyobb arányban az alkoholt egyáltalán nem fogyasztó betegek, illetve ebben a csoportban nem volt olyan beteg, aki naponta fogyasztott volna valamilyen alkohol tartalmú italt. A BC csoportban volt a legnagyobb azon betegek aránya, akik havonta legfeljebb egyszer fogyasztanak alkoholt (47%). A naponta alkoholt fogyasztó betegek 3%-ban voltak jelen a BC és CRC csoportokban egyaránt.

A kikérdezett betegek közel egy harmadánál tapasztaltuk a napi rendszerességű fizikai aktivitás meglétét és mindössze 2%-uk nem végzett semmilyen típusú mozgásformát. A BC csoportban nem volt olyan beteg, aki inaktív lett volna. Megfigyeltük, hogy a PC csoportban voltak a legnagyobb arányban (70%) azok a betegek, akik inkább kevésbé specifikus, könnyedebb mozgásformát végeztek, mint például a kertészkedés vagy egyes házimunkák. A BC csoportban voltak legtöbben azok a betegek, akik a tornát, a jógát

vagy a gyógytornát választották mozgásformaként, míg a CRC csoportban magasabb arányban voltak a nordic walking-ot vagy kerékpározás választó betegek. A már nagyobb terheléssel járó futás vagy úszás kevésbé volt jelen a CRC és PC betegcsoportokban (2% és 3%), azonban a BC csoportba tartozó betegek 9%-ban választották ezeket.

4.10 A vérplazmában mért IL-6 és IL8 citokinek szintje

Szignifikánsan magasabb IL-6 és IL-8 szinteket mértünk a kolorektális (IL-6: $p = 0,0001$, IL-8: $p = 0,0119$) és a hasnyálmirigy (IL-6: $p < 0,0001$, IL-8: $p = 0,0043$) daganatos betegek vérplazmájában a kontroll csoporthoz viszonyítva. Ezen kívül a citokinek túlélésre gyakorolt hatását megvizsgálva azt kaptuk, hogy a kolorektális daganatos betegek esetében a közepes IL-8 szint szignifikánsan jobb túlélést eredményezhet ($p = 0,032$). Ezen kívül a kolorektális betegeknél mért IL-6 szint pozitívan korrelált az IL-8 szinttel (Spearman $r = 0,479$; $p = 0,004$).

4.11 A metil-donor bevitel és a túlélés közötti összefüggés

Az alacsony, vagyis RDA körüli metionin ($\leq 1030,07$ mg), B6 vitamin ($\leq 2,084$ mg) és össz-metil-donor ($\leq 1278,48$ mg) bevitel szignifikánsan (az előbbi sorrendben: $p = 0,014$, $p = 0,017$ és $p = 0,044$) hosszabb túlélést eredményezhet a CRC betegcsoportban. Hasonlóképpen, az RDA érték körüli B6 vitamin és folát ($\leq 0,399$ mg) bevitel hosszabb túlélést mutattak az emlőtumoros betegek körében a közepes és magas beviteli csoportokhoz képest ($p=0,012$ és $p = 0,019$). A hasnyálmirigy daganatos betegek esetében azonban a közepes metionin (1030,07 mg feletti és 1503,58 mg alatti) és össz-metil-donor (1278,48 mg feletti és 2189,79 mg alatti) napi bevitel mutatott szignifikánsan ($p = 0,012$ és $p = 0,015$) jobb túlélést.

A metil-donor bevitel és a citokin szintek közötti összefüggés vizsgálata során azt találtuk, hogy a kolorektális betegekben mért IL-8 szint szignifikáns pozitív korrelációt mutat a betain (Spearman $r = 0,369$; $p = 0,028$) és folát (Spearman $r = 0,378$; $p = 0,032$ bevittel).

5. Következtetések

Eredményeink alapján az alábbi következtetéseket állapíthatjuk meg:

1. A magasabb B2 és B6 vitamin bevitel csökkentheti a CRC kialakulásának kockázatát. Továbbá, a B12 vitamin hatásának vizsgálatakor figyelembe kell venni a dohányzási és alkoholfogyasztási szokásokat, mert ezek torzíthatják a vizsgálati eredményeket.
2. A megfelelő B2 és B6 vitamin bevitel ellensúlyozhatja a csökkent MTHFR enzimaktivitást homozigóta TT genotípusú, CRC-vel diagnosztizált betegekben.
3. A metil-donor kezelés csökkentheti:
 - a. az MCF7, T47D, A549, H1650 és Panc-1 tumor sejtvonalak proliferációját feltételezhetően a MAPK/ERK jelátviteli útvonal gátlása, továbbá
 - b. a Panc-1 sejtek esetén még a megnövekedett a p21^{WAF1/Cip1} fehérje által.
4. A metil-donor kezelés hatására megemelkedhet:
 - a. a sejtciklus apoptotikus sejteket is tartalmazó subG1 fázisának aránya az MCF7, T47D és Panc-1 tumor sejtekben, továbbá
 - b. a korai apoptotikus sejtek aránya a T47D, A549 és H1650 sejtvonalak esetében.
5. A metil-donor kezelés sejtvonaltól függően aktiválhatja a pro-apoptotikus szignalizációs útvonalakat:
 - a. a caspase-9, BAK, BAX és PUMA fehérjék mennyiségének növekedése, illetve
 - b. az anti-apoptotikus MCL-1 és BCL-2 fehérjék mennyiségének csökkentése által.
6. Az MCF7, T47D és A549 sejtvonalak metil-donor kezelése csökkent AKT szinteket eredményezhet, ami megerősítheti az apoptotikus folyamatok jelenlétét.

7. A metil-donor kezelés által csökkenhet a p-p53 (Thr55) szint az emlő és tüdő tumor sejtekben, aminek következtében helyreállhat a p53 sejtmagi elhelyezkedése és ez apoptózist indukálhat a tumor sejtekben.
8. A metil-donor kezelés gyengítheti a Panc-1 sejtek áttétképző tulajdonságát az SDF-1a és VEGF expresszió csökkentésével, továbbá elősegítheti a normál sejtekre jellemző sejt-sejt kapcsolatok helyreállítását a szignifikánsan megnövekedett E-cadherin szint által.
9. A betain, kolin, metionin, folát, B2, B6, és B12 vitaminok együttes bevétele jobb túléléssel járhat együtt kolorektális betegek esetében, ha az összesített mennyiség nem haladja meg a 1278,48 mg-ot. A hasnyálmirigy daganatos csoportban az 1278,48 mg-nál nagyobb, de 2189,79 mg-ot meg nem haladó napi bevétel növelheti leginkább a túlélést.
10. Az ajánlott napi bevitelhez (RDA) közeli metionin (maximum 1030,07 mg) és B6 vitamin (maximum 2,084 mg) bevétel a kolorektális daganatos betegek hosszabb túléléséhez járulhat hozzá. Emlőtumoros betegek esetében az előbbi B6 vitamin bevétel, illetve maximum 0,399 mg folát bevétel járulhat hozzá a jobb túléléshez. Hasnyálmirigy daganatos betegek jobb túlélését az 1030,07 mg-nál nagyobb, de 1503,58 mg-ot meg nem haladó napi metionin bevétel segítheti elő.
11. A megfelelő betain és folát bevétel csökkentheti a kolorektális daganatos betegek IL-8 szintjét, és ez az alacsonyabb IL-8 szint szignifikánsan jobb túléléssel társulhat ebben a betegcsoportban.
12. A hasnyálmirigy daganatos betegeknél mért szignifikánsan magasabb IL-6 és IL-8 citokin szintek megerősítik a hasnyálmirigy tumorokban leírt aktivált NFkB útvonal jelenlétét. Továbbá, mivel az találtuk, hogy a Panc-1 tumor sejtek metil-donor kezelése csökkentheti az NFkB és az IL-17a citokinek szintjét, ezért

feltételezhetően az IL-17/NFκB/STAT3 jelátvitelen keresztül megvalósuló gyulladás mértéke enyhíthető metil-donor bevitellel.

6. Saját publikációk jegyzéke

A megjelent közlemények összesített impakt faktora (IF): 21,386

A disszertáció alapjául szolgáló elsőszerzős közlemények (IF): 12,416

Eva, Kiss; Dorottya, Muhl; Reka, Mohacsi; Magdolna, Dank; Istvan, Takacs; Zsuzsanna, Nemeth

B Vitamin Intake and the Risk of Colorectal Cancer Development: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies

BIOMEDICAL JOURNAL OF SCIENTIFIC AND TECHNICAL RESEARCH40 : 5pp. 32158-32169. , 12 p.(2022)

Kiss, Eva; Forika, Gertrud; Dank, Magdolna; Krenacs, Tibor; Nemeth, Zsuzsanna

Methyl Donors Reduce Cell Proliferation by Diminishing Erk-Signaling and NFκB Levels, WhileIncreasing E-Cadherin Expression in Panc-1 Cell Line

INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES23 : 5Paper: 2546 , 14 p. (2022)

Kiss, E.; Forika, G.; Mohacsi, R.; Nemeth, Z.; Krenacs, T.; Dank, M.

Methyl-Donors Can Induce Apoptosis and Attenuate Both the Akt and the Erk1/2 MediatedProliferation Pathways in Breast and Lung Cancer Cell Lines

INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES22 : 7Paper: 3598 , 14 p. (2021)

Eva Kiss, Anett Hajdu, Forika Gertrud, Magdolna Dank, Tibor Krenacs, Zsuzsanna Nemeth

Dietary methyl-donor intake, smoking/drinking habits, physical activity and their effects on oncological cancer patients in Hungary (accepted)

A disszertáció alapjául szolgáló társszerzős közlemény:

Mühl, Dorottya; Kleiner, D; Hajdú, A ; **Kiss, É**; Szász, A M; Dank, M

The potential of nutritional supplements: methyl donor rich food and their application in oncology

BIOMEDICAL JOURNAL OF SCIENTIFIC AND TECHNICAL RESEARCH 16 : 4pp. 12257-12263. , 7 p.(2019)

A disszertáció alapját nem képező társszerzős közlemények:

Zsuzsanna Nemeth, **Eva Kiss**, Istvan Takacs

The Role of Epigenetic Regulator SIRT1 in Balancing the Homeostasis and Preventing the Formation of Specific "Soil" of Metabolic Disorders and Related Cancers

FRONTIERS IN BIOSCIENCE LANDMARK (in press)

Forika, Gertrud; **Kiss, Eva**; Petovari, Gabor; Danko, Titanilla; Gellert, Aron Bertram; Krenacs, Tibor

Modulated Electro-Hyperthermia Supports the Effect of Gemcitabine Both in Sensitive and Resistant Pancreas Adenocarcinoma Cell Lines

PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 27 Paper: 1610048 , 15 p. (2021)

Krenacs, Tibor; Meggyeshazi, Nora; Forika, Gertrud; **Kiss, Eva**; Hamar, Peter; Szekely, Tamas; Vancsik, Tamas

Modulated Electro-Hyperthermia-Induced Tumor Damage Mechanisms Revealed in Cancer Models

INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 21 : 17 Paper: 6270 , 25 p. (2020)

Dank, Magdolna; Balogh, Andrea; Benedek, Anett; Besztercei, Balázs; Danics, Lea; Forika, Gertrud; Garay, Tamás; Hamar, Péter; Karászi, Ádám; Kaucsár, Tamás et al.
Elektromágneses daganatterápiás készülék preklinikai és klinikai vizsgálatai, valamint műszakitovábbfejlesztése: tapasztalatok szolid tumorokkal
MAGYAR ONKOLÓGIA63 : 4pp. 354-358. , 5 p. (2019)

Krenács, Tibor; Meggyesházi, Nóra; Kővágó, Csaba; **Kiss, Éva**; Forika, Gertrud; Balogh, Andrea; Vancsik, Tamás
A modulált elektrohipertermia (mEHT) indukálta tumorkárosodás mechanizmusa kolorektáliskarcinóma modellben
MAGYAR ONKOLÓGIA63 : 4pp. 359-364. , 6 p. (2019)

Vancsik, Tamas; Forika, Gertrud; Balogh, Andrea; **Kiss, Eva**; Krenacs, Tibor
Modulated electro-hyperthermia induced p53 driven apoptosis and cell cycle arrest additively support doxorubicin chemotherapy of colorectal cancer in vitro.
CANCER MEDICINE8 : 9pp. 4292-4304. , 13 p. (2019)

Vancsik, T; Kovago, C; **Kiss, E**; Papp, E ; Forika, G; Benyo, Z; Meggyeshazi, N**;
Krenacs, T
Modulated electro-hyperthermia induced loco-regional and systemic tumor destruction in colorectal cancer allografts
JOURNAL OF CANCER9 : 1pp. 41-53. , 13 p. (2018)

Könyvfejezet:

Könyvfejezet a disszertáció témájában:

Kiss, Eva; Forika, Gertrud; Mohacsi, Reka; Dank, Magdolna; Krenacs, Tibor; Takacs, Istvan; Nemeth, Zsuzsanna
Methyl-donors Induce Apoptosis and Attenuate Proliferation Pathways Mediated by Akt and Erk1/2 in Breast and Lung Cancer Cell Lines

In: Nozic, Dr. Darko (szerk.) Current Practice in Medical Science Vol. 9
London, Egyesült Királyság / Anglia: Book Publisher International (a part of
SCIENCEDOMAIN International) (2022) pp. 46-67., 22 p.

Kiss, Eva; Forika, Gertrud; Takacs, Istvan; Krenacs, Tibor; Nemeth, Zsuzsanna
Methyl Donors Inhibit Panc-1 Cell Proliferation by Decreasing NFkB and Erk Signaling
Levels and Raising E-Cadherin Expression

In: Sawadogo, Dr. Richard W. Current Practice in Medical Science Vol. 8
Book Publisher International (a part of SCIENCEDOMAIN International) (2022) pp.
119-141., 23 p.)

Könyvfejezet nem a disszertáció témájában:

Nemeth, Zsuzsanna; **Kiss, Eva** ; Takacs, Istvan
A Healthy Balance of Homeostasis by Epigenetic Regulator SIRT1 May Prevent the
Development of a Specific "Soil" that Supports Metabolic Disorders and Related Cancers
In: Karaman, Dr. Rafik (szerk.) Current Overview on Disease and Health Research Vol.
4
London, Egyesült Királyság / Anglia: Book Publisher International (a part of
SCIENCEDOMAIN International) (2022) pp. 71-111., 41 p.

Garay, T; **Kiss, E**; Szentmártoni, Gy; Borbényi, E; Mühl, D; Karászi, Á; Désfalvi, J;
Mohácsi, R;Kvasnika, M ; Szasz, AMet al. Gastrointestinal Cancer Series Treated with
Modulated Electro- Hyperthermia (mEHT) - A SingleCentre Experience In: Szász,
András (szerk.) Challenges and Solutions of Oncological Hyperthermia Newcastle upon
Tyne, Egyesült Királyság / Anglia : Cambridge Scholars Publishing(2020)pp.159-162. ,
4 p.