

# **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

## Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék .....	2
Rövidítésjegyzék .....	5
1. Bevezetés .....	9
1.1 Az egy-szén ciklus .....	11
1.1.1 Az egy-szén ciklus működése és a metil-donorok szerepe .....	11
1.1.2 Metil-donorok jelentősége daganatokban .....	14
1.2 Emlődaganatok.....	16
1.3 Kolorektális daganatok .....	18
1.4 Hasnyálmirigy daganatok .....	19
1.5 Tüdődaganatok.....	20
2. Célkitűzések .....	22
3. Módszerek .....	23
3.1 Szisztematikus irodalomelemzés és metaanalízis .....	23
3.1.1 Statisztikai analízis .....	24
3.2 <i>In vitro</i> vizsgálatok.....	25
3.2.1 Sejttenyésztés .....	25
3.2.2 Metil-donor kezelés.....	26
3.2.3 Életképesség mérés .....	27
3.2.4 Áramlási citometriás mérések .....	27
3.2.4.1 Apoptózis mérés.....	27
3.2.4.2 Sejtciklus mérés .....	28
3.2.5 Western blot .....	29
3.2.5.1 Fehérjeizolálás és minta előkészítés.....	29
3.2.5.2 Western blot analízis .....	29
3.2.6 Citokin array.....	31
3.2.7 Statisztikai analízis .....	32
3.3 Kérdőíves felmérés és humán mintán végzett vizsgálatok .....	33
3.3.1 A vizsgálatban résztvevő betegek .....	33

3.3.2	A szocioökonómiai háttérrel, egyes életmódbeli szokásokat és a metil-donor fogyasztás gyakoriságát felmérő kérdőív.....	33
3.3.3	Humán vérminták.....	34
3.3.4	Szendvics ELISA.....	34
3.3.5	SNP mérés PCR alapú KASPar módszerrel.....	35
3.3.5.1	DNS izolálás.....	35
3.3.5.2	SNP meghatározás.....	35
3.3.6	Statisztikai analízis.....	36
4.	Eredmények.....	37
4.1	A szisztematikus irodalomkutatás és metaanalízis felépítése.....	37
4.2	A B vitaminok bevitel és a CRC kialakulásának kockázata közötti összefüggés.....	38
4.3	A B vitaminok bevitel és az <i>MTHFR</i> polimorfizmus közötti összefüggés.....	41
4.4	A metil-donor kezelés hatása a tumorsejtek életképességére.....	41
4.5	A sejtciklus subG1 fázisának változása metil-donor kezelés után, valamint az ehhez kapcsolódó jelátviteli útvonal elemeinek változása.....	43
4.6	A metil-donor kezelés által okozott apoptózis és az intrinsic apoptózis útvonalban szereplő pro- és anti-apoptotikus fehérjék változása a kezelés hatására.....	48
4.7	A metil-donorok hatása Panc-1 sejtek metasztatikus potenciáljára.....	54
4.8	A metil-donorok hatása Panc-1 sejtek gyulladáshoz vezető folyamataira.....	55
4.9	A kérdőíves felmérés eredménye.....	56
4.9.1	Leíró adatok összegzése.....	56
4.9.2	Dohányzás, alkoholfogyasztás és fizikai aktivitás a betegek körében.....	57
4.10	A vérplazmában mért IL-6 és IL8 citokinek szintje.....	60
4.11	A metil-donor bevitel és a túlélés közötti összefüggés.....	61
4.12	Az <i>MTHFR</i> C677T polimorfizmus előfordulása a vizsgált betegpopulációban.....	64
5.	Megbeszélés.....	65
5.1	A metaanalízis eredményeinek megbeszélése.....	66
5.2	Az <i>in vitro</i> vizsgálatok eredményeinek megbeszélése.....	68

5.3 A humán vizsgálatok eredményeinek megbeszélése .....	72
6. Következtetések.....	76
7. Összefoglalás.....	79
8. Summary .....	80
9. Irodalomjegyzék.....	81
10. Saját publikációk jegyzéke.....	103
11. Köszönetnyilvánítás .....	109
12. Függelék .....	110

## Rövidítésjegyzék

AICR	American Institute of Cancer Research
AKT	protein kinase B
ALK	anaplastic lymphoma kinase
ANOVA	analysis of variance
APC	adenomatous polyposis coli
ATCC	American Type Culture Collection
BAK	BCL2 antagonist/killer 1
BAX	BCL2 associated X
BC	breast cancer
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BHMT	betain-homocisztein S-metiltranszferáz
BRCA1/2	breast cancer gene 1/2
CAPIRI	capecitabine és irinotecan kombinációs kemoterápia
CAPOX	capecitabine és oxaliplatin kombinációs kemoterápia
CD30	cluster of differentiation 30
CES	combined effect size
CI	confidence interval
CRC	colorectal carcinoma
DHF	dihidrofolát
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNS	dezoxirobonukleinsav
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMT	epitheliális-mesenchimális tranzíció
EPIC	European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase 1/2
ETT TUKEB	Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága
FAP	familiáris adenomatous polyposis

FBS	fetal bovine serum
FFQ	food frequency questionnaire
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
FOLFIRI	leucovorin, 5-fluorouracil és irinotecan kombinációs kemoterápia
FOLFIRINOX	folsav, 5-fluorouracil, irinotecan és oxaliplatin kombinációs kemoterápia
FOLFOX	leucovorin, 5-fluorouracil és oxaliplatin kombinációs kemoterápia
f-THF	10-formil-tetrahidrofolát
HCY	homocisztein
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HNPCC	hereditary nonpolyposis colorectal cancer
HR	hazard ratio
HRP	horseradish peroxidase
IGF2	insulin-like growth factor 2
IL-1b, -6, -8, -17	interleukin-1b, -6, -8, -17
K3-EDTA	trikálium-etilén-diamin-tetraecetsav
LOCI	Wisconsini Egyetem Optikai és Számítógépes Laboratóriuma
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAT	metionin adeniltranszferáz
MCL-1	myeloid cell leukemia-1
me-THF	5,10-metilén-tetrahidrofolát
MLH1	MutL homologue 1
MSH2	MutS homologue 2
MSH6	MutS Homologue 6
mTHF	5-metiltetrahidrofolát
MTHFR	metiléntetrahidrofolát reduktáz
MS	metionin szintáz
MTS	3- (4, 5-dimetil-tiazol-2-il) -5- (3-karboxi-metoxi-fenil) -2- (4-szulfofenil) -2H-tetrazolium
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	nátrium-ortovanadát
NaF	nátrium-fluorid
NEJM	New England Journal of Medicine

NFκB	nuclear factor kappa B
NIH	National Institutes of Health
NOS	Newcastle-Ottawa scale
NSCLC	non-small-cell lung cancer
OR	odds ratio
OS	overall survival
PARP	poli-ADP-ribóz-polimeráz
PC	pancreatic cancer
PD-1	programmed death-1
PD-L1	programmed death ligand-1
p-ERK1/2	phospho-extracellular signal-regulated kinase 1/2
PI	prediction interval
PI	propidium-jodid
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PIC	proteáz inhibitor koktél
PMS	fenazin-metoszulfát
PRISMA	Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
PVDF	polivinil-difluorid
RDA	Recommended Dietary Allowances
RIPA	radioimmunoprecipitation assay
RNáz	ribonukleáz
RNS	ribonukleinsav
RNSi	RNS interferencia
RPMI1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
RR	relative risk
SAH	S-adenozil-homocisztein
SAHH	S-adenozil-homocisztein hidroláz
SAM	S-adenozil-metionin
SCLC	small-cell lung cancer

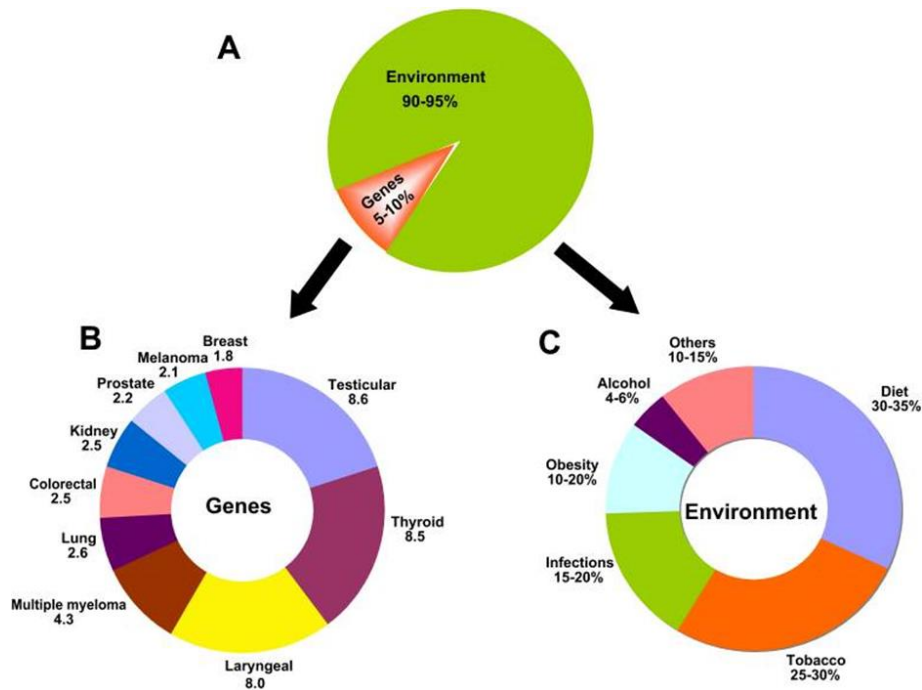
SDF-1a	stromal cell-derived factor-1 alpha
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis
SHMT	szerin hidroximetiltranszferáz
shRNS	rövid hajtú RNS
SNP	single nucleotide polymorphism
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
THF	tetrahidrofolát
TNFa	tumor necrosis factor alpha
TP53	tumor protein p53
USDA	U.S. Department of Agriculture
VEGF	vascular endothelial growth factor
WCRF	World Cancer Research Fund
WHO	World Health Organization



## 1. Bevezetés

A daganatos megbetegedések előfordulása növekvő tendenciát mutat világszerte, 2018-ban 8,1 millió, 2020-ban már 19,3 millió volt az új esetek száma (1, 2), annak ellenére, hogy az esetek 30-50%-a megelőzhető lenne a kockázati tényezők elkerülésével és a bizonyítékokon alapuló megelőzési irányelvek betartásával (3, 4). Korai diagnózissal és a megfelelő kezelés és ellátás biztosításával pedig a betegséggel járó gazdasági terhet is csökkenteni lehetne.

A daganatok kialakulásában környezeti, életmódbeli, illetve szervezetben belülről 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 (1. ábra) (5).



1. ábra. A daganatok kialakulásának külső és belső tényezői (Anand et al., 2008)

Az onkogének vagy tumorszuppresszor gének mutációi kontrollálatlan sejtszaporodáshoz és a normál sejtek tumorsejteké váló transzformációjához vezethetnek (6). Ezen kívül a daganatos sejtek és a környezetükben található stróma sejtek és gyulladásos sejtek közötti kölcsönhatás fontos szerepet tölt be a tumor sejtek proliferációjában, a normál szövetstruktúra felbomlásában és a metasztázisképzésben (7).

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. A megnövekedett táplálékbevitel, az alacsony fizikai aktivitás és az ezekből következő elhízás hatására kialakuló metabolikus és hormonális eltérések hatással lehetnek a DNS (deoxiribonukleinsav) hibajavításában, a sejtproliferációban és az apoptózis folyamatában részt vevő gének kifejeződésére (8). A súlyos elhízás gyakran krónikus gyulladással társul, mely során a gyulladást elősegítő IL-1 $\beta$ , IL-6 és IL-8 citokinek szintje tartósan emelkedett, valamint az NF $\kappa$ B (nuclear factor kappa B) jelátviteli út aktivációja folyamatos. Ez az állapot gyulladásos megbetegedésekhez vezethet, ami egyben a daganatok kialakulásának is kedvez (9). Az elhízáshoz társuló metabolikus szindróma szintén kockázati tényező lehet a daganatok kialakulásában (10-14).

A nyugatias étrendre jellemző energiadús élelmiszerek megnövekedett fogyasztásának és a fizikai inaktivitásnak köszönhetően olyan populációkban is megemelkedett bizonyos daganat típusok előfordulása, ahol korábban ezek alacsony prevalenciával rendelkeztek (15, 16).

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 (4). A táplálkozás hozzájárulhat a kezelések sikerességéhez, a mellékhatások csökkentéséhez, valamint a betegek tápláltsági állapotának és általános jólétének javításához is (17, 18). Mindemellett a kiegyensúlyozott és változatos táplálkozás, mely megfelelő arányban tartalmaz zöldségeket, gyümölcsöket, teljes értékű gabonákat és fehérjéket, csökkentheti a daganatok kialakulásának kockázatát (19). Éppen ezért van szükség az élelmiszerekben

található makro- és mikrotápanyagok vagy biológiailag aktív vegyületek hatásainak minél alaposabb és széleskörűbb vizsgálatára.

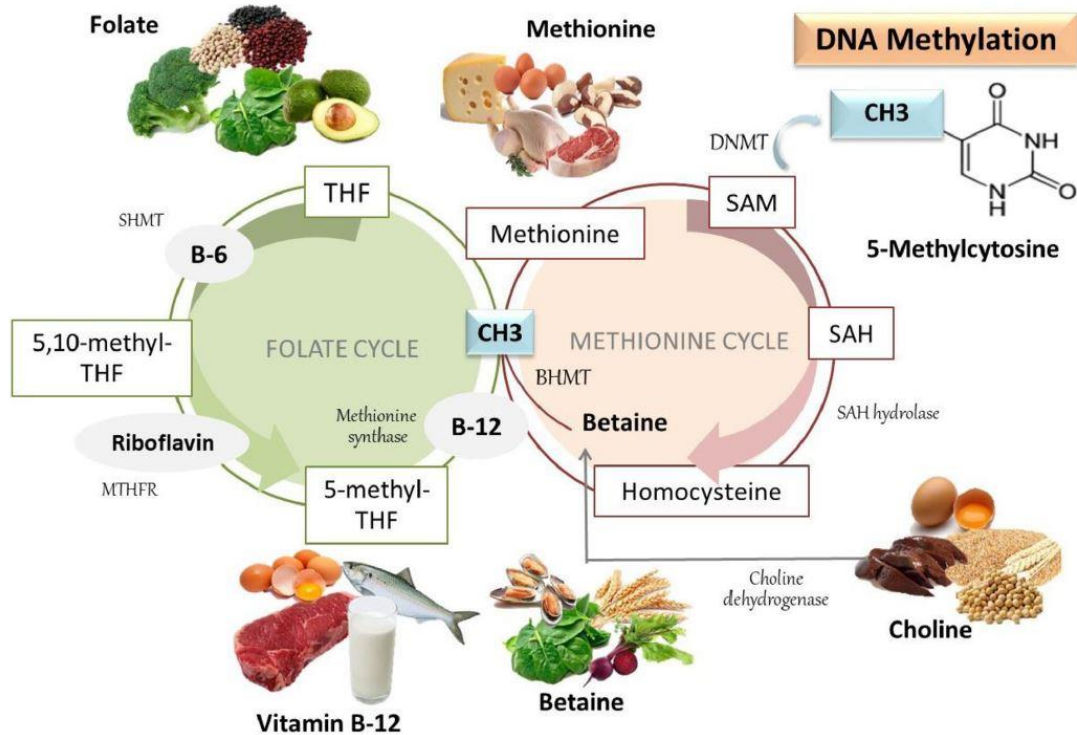
## 1.1 Az egy-szén ciklus

Az egy-szén ciklus biokémiai reakciók összessége, melyek lehetővé teszik a metabolikus anyagcseréhez szükséges 1-szén egységek (metenil-, formil- és metil-csoportok) szállítását (20). Ilyen fiziológiai folyamatok például az aminosavak és nukleinsavak felépítése, a génextpresszió metiláció általi szabályozása, a redox-homeosztázis fenntartása, a sejtek szaporodása, illetve a programozott sejthalál szabályozása (21), valamint a DNS epigenetikai módosítása, a DNS metilációja révén (20, 22).

### 1.1.1 Az egy-szén ciklus működése és a metil-donorok szerepe

Azokat az étrendi összetevőket, melyek az 1-szén egységek közvetítése során koenzimként biztosítják a ciklus enzimjeinek működését, metil-donor vegyületeknek nevezzük. Ezek a folát, a betain, a kolin, a metionin, valamint a B2-, B6- és B12-vitaminok (21, 23, 24). Az egy-szén ciklus a folát és a metionin ciklusokból áll (2. ábra) (25).

A folát (szintetikus formája a folsav) ahhoz, hogy aktív koenzimként tudjon működni, dihidrofoláttá (DHF) redukálódik a DHF reduktáz enzim segítségével. Mielőtt belépne a folát ciklusba tovább redukálódik a biológiailag aktív formájává, tetrahydrofoláttá (THF) (21). A folát ciklusban a THF átalakul 5,10-metilén-tetrahydrofoláttá (me-THF), melyet a B6-vitamin-függő enzim, a szerin hidroximetiltranszferáz (SHMT) katalizál. Ezt követően irreverzibilis folyamatban a me-THF vagy 5-metiltetrahydrofoláttá (mTHF) redukálódik a B2-vitamin-függő metiléntetrahydrofolát reduktáz (MTHFR) enzim segítségével, vagy reakciók sorozatán keresztül 10-formil-tetrahydrofoláttá (f-THF) alakul át. A mTHF demetilálásával a folát ciklus lezárul és a metil-csoport átkerül a metionin ciklusba (26).



**2. ábra.** A folát és metionin ciklusokból álló egy-szén ciklus, valamint a ciklus enzimjei és a működésüköz szükséges metil-donor vegyületek. A képek ábrázolják az egyes metil-donorok lehetséges étrendi forrásait (Mafra et al., 2019).

A metionin ciklus első lépéseként a folát ciklusból átadott metil-csoport homociszteinre (HCY) kerül, melyet a metionin szintáz (MS) enzim katalizál. A MS enzim kofaktora a B12-vitamin (27). A HCY metilálásával metionin keletkezik. Egy másik, metionin cikluson belül végbemenő reakció során, melyet a B6-vitamin-függő betain-homocisztein S-metiltranszferáz (BHMT) enzim katalizál és melyben betainról kerül át a metil-csoport HCY-re, szintén metionin keletkezik (28, 29). Metionin adeniltranszferáz (MAT) enzim segítségével a metioninból képződik az univerzális metil-donornak is nevezett S-adenozil-metionin (SAM), melynek fontos szerepe van a fentebb említett folyamatokban (30). A SAM-ből demetilálással keletkezik az S-adenozil-homocisztein (SAH). Az S-adenozil-homocisztein hidroláz (SAHH) enzim által katalizált reverzibilis folyamat során a SAH visszaalakul HCY-né és ezzel a metionin ciklus befejeződik.

Az egy-szén ciklus megfelelő működéséhez szükség van a metil-donorokra, melyek katalitikus koenzimként funkcionálnak a ciklus során, és biztosítják a metil-csoportok hozzáférhetőségét. Hiányuk a sejtekben található SAM szintjének csökkenéséhez vagy a SAH felhalmozódásához vezethet, melyek a metilációs kapacitást károsítják (22, 31).

Az egy-szén ciklus érzékeny az étrendből származó B vitamin bevitelre, mert ettől függően aktiválódnak az egyes útvonalak (32). Annak ellenére, hogy a B6-vitamin nem közvetlenül az egy-szén ciklus reakcióiban érintett, mégis befolyásolhatja a metilációs reakciókat azáltal, hogy hiánya megemeli a vér homocisztein szintjét (33). Az MTHFR enzim kofaktoraként a B2-vitamin nagyon fontos szerepet tölt be, hiszen a nem megfelelő B2-vitamin ellátottság ronthatja az enzimaktivitást és ez az egy-szén ciklus gátlását is okozhatja (34). Ezen kívül a B vitaminok fontos részei a metabolikus útvonalaknak és részt vesznek alapvető sejt szintű funkciókban is. Következésképpen fontos szerepük van az energiatermelő folyamatokban, az oxigén transzportban és az idegrendszeri funkciókban is (35, 36).

Az egy-szén ciklusban részt vevő enzimekben előforduló genetikai eltérések is befolyásolják a ciklus működését. Ezek közül az egyik legismertebb az MTHFR enzimet kódoló gén 677-es pozícióját érintő (*MTHFR* C677T) egy pontos nukleotid polimorfizmus (SNP). A gén heterozigóta (CT) mutációja csökkent, megközelítőleg 65%-os, míg a homozigóta (TT) mutáció már csak 30%-os enzimaktivitást eredményez. Az *MTHFR* mutáció megakadályozza a me-THF m-THF-á való átalakulását, ami a homocisztein szint megemelkedéséhez vezet, és ezzel gátolhatja a metilációs folyamatokat (37-39). Az *MTHFR* gén mutációja földrajzi és etnikai eltéréseket mutat. Az 1000 Genom Projekt adatai alapján a teljes népesség megközelítőleg 25%-ában van jelen az *MTHFR* C677T polimorfizmusa, mely a spanyol ajkú, hispán népesség körében a leggyakoribb, 47% körüli. Ezt követi az európai populáció, ahol ez az érték 36%, a kelet-ázsiaiaknál 30%, a dél-ázsiaiaknál 12% és az afrikaiaknál 9%. Az európaiak megközelítőleg 13,5%-a hordozza a homozigóta mutációt e felmérés szerint (40, 41). Ezek alapján az *MTHFR* polimorfizmus előfordulási gyakorisága jelentős különbséget mutat a vizsgált népcsoportok között, ami arra utal, hogy az *MTHFR* gén megfelelő működése erősen összefügg az etnikai hovatartozással.

### 1.1.2 Metil-donorok jelentősége daganatokban

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 (42-50).

Ben és Sun arról számoltak be, hogy a B vitaminok dóziszfüggő módon csökkenthetik a kolorektális daganatok kialakulásának kockázatát (46, 51). Cho és munkatársai a betaint szignifikánsan kockázat csökkentő hatásúnak találták kolorektális adenoma kialakulásában, míg kolin esetében pozitív összefüggést találtak az adenoma előfordulásával (52). Sharp és Donk tanulmányaikban a kolorektális daganatok kialakulásában szerepet játszó egy pontos nukleotid polimorfizmusokról (SNP) számolnak be, melyek hatását a metil-donor bevitel befolyásolhatja (53, 54).

Egy pilot tanulmány szerint a magas dózisú B6-vitamin bevitel fokozhatja a kemoterápiás kezelések tumorellenes hatását kolorektális, hasnyálmirigy és nyelőcső karcinómák esetében (55). Egy metaanalíziseken alapuló összefoglaló tanulmány megállapította, hogy a folát bevitel csökkentheti az összhalálozást, valamint a krónikus megbetegedések kialakulásának kockázatát (43). Egy másik tanulmányban hasonló eredményekről számoltak be, melyben a csökkent vagy hiányos folát bevitel összhangban állt bizonyos daganatok kialakulásával, kivéve a prosztatata daganatokat (56).

A European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) 10 európai ország bevonásával készült kohorsz tanulmány, melynek célja volt, hogy megvizsgálja, milyen összefüggés van a táplálkozás, a tápláltsági állapot, az életmód és a környezeti hatások, valamint a daganatok és egyéb krónikus megbetegedések előfordulása között (57). Ennek a tanulmánynak része az az eset-kontroll vizsgálat, mely felfedte, hogy a kolin és a betain magasabb plazma koncentrációja ellensúlyozhatja az alacsony folát szintet, ezzel csökkentve a kolorektális daganatok kialakulásának kockázatát (58).

Epidemiológiai tanulmányok szerint a gyümölcsöknek, zöldségeknek és mikroelemeknek jelentős szerepe van a tüdődaganatok kialakulási kockázatának csökkentésében. Stidley és munkatársai tanulmányukban dohányosokat vizsgálva azt találta, hogy a zöld leveles zöldségekben és a folátban gazdag értend, valamint a multivitaminok valóban

szignifikánsan csökkentették egyes gének promoter régiójának hipermetilációját, így feltételezhetően a daganatok kialakulásának esélyét is (59).

Beszámoltak arról is, hogy a korai fejlődési szakaszban és a tumor kialakulását megelőzően alkalmazott magasabb metil-donor tartalmú étrend megelőző szereppel bírhat a prosztata daganatok kialakulásában (60).

A metil-donorok működése közötti szoros összefüggést állapított meg az az *in vivo* tanulmány, melyben bizonyos metil-donorok együttes étrendi bevitelét és a DNS metiláció közötti kapcsolatot vizsgálták. Azt találták, hogy a kolint, a metionint és a folátot együttesen érdemes vizsgálni azok kölcsönös egymásra hatása miatt (61). Park és munkatársai leírták, hogy metil-donorokkal kezelt emlő daganatos sejtek között szignifikánsan nagyobb százalékban találtak apoptotikus sejteket, ami a BCL-2 fehérje csökkent kifejeződésével társult (62). Szintén *in vitro* vizsgálatokkal mutatták ki, hogy a folát kezelés az emlő tumor sejtekben apoptózist indukál a PTEN/AKT/p53 szignalizációs útvonalon keresztül, miközben csökkentik az AKT és ERK jelátvitelt (63, 64). Ismert, hogy az AKT jelátvitel gátolhatja a pro-apoptotikus caspase-9 és caspase-3 fehérjék aktivációját (65), illetve, hogy a MAPK jelátvitel upstream gátlói csökkenthetik a tumor proliferációt és közvetíthetik az apoptózist, mégis bizonyos esetben az ERK1/2 aktivációja szerepet játszhat az apoptózis indukálásában is (66).

A nukleáris faktor kappa B (NFkB) fehérjének központi szerepe van a jelátviteli útvonalak hálózatában, mivel minden sejtben jelen van; közel 150 gén és számos biológiai folyamat szabályozásáért (sejtek túlélése, proliferációja, apoptózis, stresszválasz, veleszületett és szerzett immunválasz) felelős (67). Többszörösen bizonyított az is, hogy szerepe van több humán megbetegedés, úgymint a daganatos megbetegedések kialakulásában. A hasnyálmirigy sejtekben az NFkB teremt egyensúlyt a proliferáció és az apoptózis között. Aktívan részt vesz a korai karcinogenezisben, azonban szuppressziója normalizálhatja a hasnyálmirigy sejtekben zajló apoptotikus folyamatokat (68). *In vitro* kísérletekkel kimutatták, hogy az NFkB gátlása csökkentette a mezenchimális faktorok és egyes epitheliális-mezenchimális tranzícióban (EMT) szerepet játszó transzkripciós faktorok expresszióját. Mindez *in vivo* körülmények között tumor méret csökkenésben, EMT gének expresszió változásában és a sejt-sejt kapcsolatok helyreállításában nyilvánult meg, csökkentve ezzel az áttétek képződését (69).

Bizonyos tumor típusok legfőbb kockázati tényezője a krónikus gyulladás. Ilyenek a gyulladással járó bélbetegségek, például a colitis ulcerosa, mely a kolorektális daganatok kialakulási kockázatát növelik, vagy a krónikus légzőszervi gyulladások és a dohányzás, melyek pedig a tüdőben indukálhatnak karcinogenezist (70). A gyulladás általi tumorképződésben az NFkB fontos szerepet játszik (70), mely útvonalat az IL-17 citokin termelődése aktivál (71). Hasnyálmirigy daganatok esetében ez a folyamat vezet a pro-tumorigenikus folyamatok aktiválódásához (72). A krónikus gyulladások emelkedett NFkB aktivitást okoznak, ami a TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 és IL-8 citokinek felszabadulásával jár, melyet a STAT3 aktivációja követ (73). A STAT3 és az NFkB szinergisztikus módon ellenőrzi olyan gének csoportját, melyek citokineket és kemokineket kódolnak (70). Ezen kívül képesek saját maguk aktivációját előidézni azáltal, hogy egymás promóter régiójához kötődnek (74), vagyis a foszforilálatlan STAT3 hozzá tud kötődni az *NFkB* promóteréhez és ezáltal aktiválja az *NFkB* transzkripcióját (75). Továbbá a STAT3 poszt-transzlációs acetilációval módosíthatja az NFkB fehérjét, ami meghosszabbítja a sejtmagban maradás idejét és aktívan tartja az NFkB-t, mellyel a daganatok kialakulását segíti elő (74). A STAT3 túlzott mértékű jelenléte prognosztikus jelentőséggel bír több szolid daganat típus esetében, köztük az emlő, hasnyálmirigy és tüdő daganatokban is (76). A STAT3 gátlása a sejtciklus G1/S fázisának eltolódását okozza megnövekedett p21<sup>WAF1/Cip1</sup> szint mellett, valamint a *STAT3* expresszió rövid hajtú RNS (shRNS) és RNS interferencia (RNSi) általi csendesítése csökkent sejtproliferációt, sejtciklus gátlást, megnövekedett apoptózist, és tumor növekedés gátlást okoz (77).

## 1.2 Emlődaganatok

Az emlődaganat a leggyakrabban diagnosztizált daganat típus a nőknél, mely az összes előforduló daganat 11,7%-át teszi ki világszerte és a halálozások tekintetében is vezető helyen áll (2). Az 5 éves relatív túlélési arány körülbelül 10%-kal javult az elmúlt 40 év során a megelőzésnek és a korai diagnózisnak köszönhetően (78).

Az emlődaganatok kisebb részének hátterében áll öröklött genetikai eltérés. Ezek közül a *BRCA1* és *BRCA2* tumorszuppresszor génekben bekövetkező mutációk a leggyakoribbak. Hosszútávon befolyásolhatja az emlődaganat kialakulását a túlsúly és az elhízás, a fizikai



aktivitás hiánya, a nem megfelelő tápanyagbevitel, a finomított, feldolgozott ételek túlzott fogyasztása, a mértéktelen alkoholfogyasztás vagy a különböző gyógyszeres kezelések (79-81).

Szövettani osztályozás szempontjából az invazív emlődaganatok 70-80%-a duktális karcinóma, melyet a lobuláris karcinómák követnek (10%). A génexpressziós vizsgálatok alapján felállított molekuláris osztályozás szerint megkülönböztetünk luminális A, luminális B, HER2 pozitív és bazális típusú emlődaganatokat. Ezek az altípusok különböző génexpressziós mintázatokkal, mutációkkal és nem utolsósorban eltérő prognózissal jellemezhetők (82-85).

A luminális altípusok hormonreceptor-pozitív daganatok (86). A luminális A típusú emlőkarcinóma klinikai szempontból lassan növekvő, alacsony grade-del jellemezhető, az emlődaganatok közül a legjobb prognózissal bíró típus. Ezzel szemben a luminális B típus szövettani grade-je magasabb (80) és rosszabb prognózissal rendelkezik (87). A luminális A típus jobban reagálhat az endokrin terápiára, míg a luminális B típus a kemoterápiás kezelésre adhat kedvezőbb választ (88, 89). Epidemiológiai tanulmányok azt is leírták, hogy a hormonális állapotot befolyásoló tényezők összefüggenek a hormonreceptor-pozitív daganatok előfordulásával 50 év alatti nőknél, míg a hormonreceptor-negatív emlő daganatok érzékenyebben reagálnak a nem hormonális tényezőkre, mint például a táplálkozásra (90, 91).

A HER2 pozitív daganatokat magas szövettani grade és agresszív klinikai lefolyás jellemzi. Mindazonáltal jól reagálnak HER2-céltott terápiás szerekre (trastuzumab, pertuzumab, lapatinib, neratinib) és antraciklin alapú szerekre, melyek alkalmazása nagymértékben hozzájárul a jobb kimenetelhez (88, 89, 92-95).

A bazális típusú vagy tripla-negatív karcinómák csoportjába jellemzően high grade daganatok tartoznak, magas proliferációs rátával. A *BRCA1* mutáció miatt kialakuló emlődaganatok kb. 70-90%-a tripla-negatív típusú, míg a *BRCA2* mutáció esetében ez az arány 16-23% (96). Platina alapú kemoterápiára és poli-ADP-ribóz-polimeráz-gátló (PARP gátló) kezelésre érzékenyen reagálnak (89).

### 1.3 Kolorektális daganatok

Egy 2020-as riport szerint a kolorektális daganatok a harmadik leggyakrabban diagnosztizált daganatos megbetegedések a világon. Előfordulási gyakoriságuk a fejlődő országokban növekvő tendenciát mutat, ami párhuzamba állítható az iparosodással és a gazdasági növekedéssel járó kockázati tényezőkkel (2, 97).

A rosszindulatú daganatok közül a kolorektális daganatoknál fordul elő az egyik legnagyobb arányban családi öröklődés (98). Az öröklődő kolorektális daganatok két leggyakoribb formája a familiáris adenomatous polyposis (FAP) és az örökölt nonpolyposis kolorektális daganat (HNPCC vagy Lynch szindróma), melyeket magas penetranciájú gének mutációi okoznak (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* és *PMS2* az előbbi, *APC* az utóbbi esetben) (99).

A krónikus gyulladások jelentősen növelhetik a kolorektális daganatok kialakulásának esélyét azáltal, hogy a megnövekedett oxidatív stressz következtében DNS károsodást és nukleotid módosulást okoznak a bélhámsejtekben (100, 101). A gyulladással járó bélbetegségek (colitis ulcerosa, Chron-betegség) és a cukorbetegség következtében megemelkedett inzulinszint okozta gyulladással járó állapot is emelkedett kockázattal járhat (102, 103).

Az összes daganat típus közül a kolorektális daganatok esetében van a legnagyobb és leginkább bizonyított szerepe az életmódbeli tényezőknek. A World Cancer Research Fund (WCRF) és az American Institute of Cancer Research (AICR) által elvégzett tanulmányban a táplálkozás, a testsúly és a fizikai aktivitás hatását vizsgálták kolorektális daganat kialakulásának tekintetében. Erős evidenciaként fogalmazták meg a fizikai aktivitás és egyes élelmiszerek kockázatcsökkentő, valamint a vörös húsok, a túlzott alkoholfogyasztás és az elhízás kockázatnövelő hatását (104). Ezekon kívül a dohányzás által szervezetbe kerülő káros anyagok, melyek eléri a kolorektális nyálkahártyát genetikai és epigenetikai elváltozásokat okoznak, melyek hatással lehetnek a kolorektális daganatok kialakulására (105).

A legtöbb kolorektális daganattal küzdő betegnél kemoterápia és célzott terápiás kezelés kombinációját alkalmazzák. A kemoterápiás kezelés során vagy fluoropirimidineket használnak (5-fluorouracil vagy capecitabine) monoterápiában, vagy a fluoropirimidineket kombinálják leucovorinnal, oxaliplatinnal (FOLFOX/CAPOX) és

irinotecannal (FOLFIRI/CAPIRI) (106, 107). A leucovorin egy folsav származék, ami csökkenti a kezelés citotoxikus hatását, míg az oxaliplatinnal vagy irinotecannal való kombináció hosszabb túlélést eredményezhet (106). Metasztatikus kolorektális daganatok esetében a célzott terápiával kiegészített kemoterápia javíthatja a betegség kimenetelét. Az angiogenezis gátló bevacizumabbal (anti-VEGF antitest) kiegészített FOLFOX vagy FOLFIRI kezelés hosszabb progressziómentes túlélést biztosít (108).

#### 1.4 Hasnyálmirigy daganatok

A hasnyálmirigy daganatok előfordulása és halálozási aránya világszerte hasonlóan alakult a 2020-as GLOBOCAN felmérés eredménye szerint (2). Halálozások tekintetében a hetedik leggyakoribb daganatos halálok férfiak és nők esetében egyaránt. Magyarország kiemelkedő jelentőséggel bír, hiszen Európában, de még világviszonylatban is nálunk a legmagasabb az előfordulási arány (109).

A hasnyálmirigy daganatos elváltozásai közül a leggyakoribbak a duktális adenokarcinómák, és csak kisebb részben jellemzők a hormontermelő neuroendokrin daganatok és az emésztőenzimeket termelő acinus karcinómák. A hasnyálmirigy daganatok nagyon rossz prognózissal társulnak, melynek oka többek között az áttétek korai megjelenése, a kezelésre adott rezisztencia kialakulása, a genetikai és epigenetikai elváltozások és a késői diagnózis. Mindezek hozzájárulnak ahhoz, hogy az 5 éves teljes túlélés esélye mindössze 10% alatti (110, 111).

A hasnyálmirigy daganatok 10%-a familiáris öröklődést mutat. Bizonyos familiáris daganat szindrómák (Lynch szindróma, Peutz-Jeghers szindróma, öröklődő emlő- és petefészek daganat szindróma, familiáris adenomatous polyposis és Li-Fraumeni szindróma) is növelik a hasnyálmirigy daganatok kialakulásának kockázatát (112, 113). Az ismert öröklött esetek hátterében leggyakrabban a *BRCA2* gén mutációja áll, mely az érintett családok 5-17%-ában meghatározott (114). A genetikai tényezőkön kívül további nem befolyásolható kockázati tényezők még a férfi nem, az 50 év feletti életkor, a cukorbetegség, a *Helicobacter pylori* fertőzés és a krónikus hasnyálmirigy gyulladás (111).

A megelőzhető kockázati tényezők közül a dohányzás a legfontosabb és leginkább tanulmányozott életmódi tényező. A dohányzásnak tulajdonítható megbetegedést 15-30%-ra becsülik egyes populációkban (115-117). A túlzott alkoholfogyasztás egyfelől kétségtelenül megemeli a hasnyálmirigy daganat kialakulásának kockázatát (118), másrészt krónikus hasnyálmirigy gyulladás kialakulásához vezethet. Ahogy a korábbiakban láttuk, az elhízás és a fizikai inaktivitás kockázatonövelő tényezők lehetnek egyes daganat típusok kialakulásában és ez hasnyálmirigy daganatok esetében is igaz (119-121). A táplálkozási tényezők akár 30-50%-ban befolyásolhatják a hasnyálmirigy daganat kialakulását, melyek közül a vörös húsok, a feldolgozott élelmiszerek és a koleszterindús ételek túlzott fogyasztása kockázatonövelő lehet (122, 123).

A kezelési lehetőségeket nagyban befolyásolja az a tény, hogy a betegek többségénél lokálisan előrehaladott vagy sebészileg nem kimetszhető állapotú daganatot diagnosztizálnak. A korai stádiumban diagnosztizált daganatok esetében szóba jöhet a sebészi kimetszés lehetősége, melyet gemcitabine vagy 5-fluorouracil kemoterápia követ. Az ún. borderline besorolású sebészileg kimetszhető hasnyálmirigy daganatok esetében a műtétet megelőzően FOLFIRINOX (folsav, 5-fluorouracil, irinotecan és oxaliplatin kombinációja) vagy gemcitabine és nab-paclitaxel kombinációjával kemoterápiát alkalmaznak (124, 125). Minden más esetben palliatív céllal alkalmaznak kemoterápiás kezelést az előbb említett szereket alkalmazva, stádiumtól függően (110).

## 1.5 Tüdődaganatok

A tüdődaganat világszerte a leggyakoribb daganatos halálok (2). Kialakulásáért elősorban a dohányzás felelős, azonban egyre kevésbé hagyható figyelmen kívül a nem dohányosokban kialakuló tüdődaganatok növekvő aránya (126).

A malignus tüdődaganatok két nagy, szövettanilag jól elkülönülő csoportját különböztetjük meg: a nagyobb arányban előforduló nem kis-sejtes tüdődaganatokat (NSCLC) és a kis-sejtes tüdődaganatokat (SCLC). A WHO (World Health Organization) osztályozása szerint a NSCLC három leggyakoribb altípusa az adenokarcinóma, a laphámsejtes karcinóma és a nagysejtes karcinóma (127).

A tüdődaganatok kialakulását 85-90%-ban a dohányzás okozza, de ezen kívül kockáztnövelő lehet az ionizáló sugárzásnak, a passzív dohányzásnak, a radonnak és egyes fémeknek (arzén, króm és nikkel), valamint a policiklusos aromás szénhidrogéneknek való kitettség (128). Továbbá, a nem dohányzás okozta tüdődaganatok kialakulásában kockázati tényezőként tartják számon a tüdő egyes gyulladásos állapotait (például asztma, krónikus bronchitis, mellhártyagyulladás, tüdőgyulladás, tuberkulózis), a tüdőfibrozist és a HIV fertőzést is (129-131). Egy kohorsz tanulmány keretén belül találtak olyan összefüggést is, mely szerint a magas húsbevitel megnövelheti a tüdőkarcinóma kialakulásának kockázatát (132).

Az elmúlt évtizedek alatt a NSCLC-k kezelési protokolljában egyre nagyobb jelentőséget kaptak a célzott és az immunterápiás kezelések a standard citotoxikus kemoterápiák mellett (133). Az egyes onkogén mutációk azonosításával lehetővé vált az egyénre szabott terápiák bevezetése, melyek jobb túlélési esélyeket biztosítanak. Első generációs *EGFR* gátlók a gefitinib és az erlotinib, melyek hosszabb progressziómentes túlélést eredményeznek a kemoterápiával kezelt *EGFR* mutációval rendelkező betegekhez képest (134, 135). További *EGRF* gátlók az afatinib és a dacomitinib, valamint az osimertinib, melyek az újabb mutációk következtében fellépő progresszió kezelésére szolgálnak (136-138). Az *ALK* gátlók közül a crizotinib, ceritinib, alectinib és brigatinib nagyobb kezelési hatékonyságot és progressziómentes túlélést eredményeztek a hagyományos platina alapú kemoterápiával (139) vagy az első generációs crizotinibbel szemben kialakult rezisztenciával (140-142) szemben. Mivel az *ALK* és a *ROS1* kináz doménje homológiát mutat, az *ALK* pozitív tüdődaganatok kezelésére szolgáló célzott terápiák a *ROS1* pozitív daganatokban is hatásosak (143-145). Azoknak a NSCLC-s betegeknek, akik *BRAF* mutációt hordoznak, a vemurafenib és a dabrafenib *BRAF* gátlók nyújtanak terápiás lehetőséget (146, 147).

Az immun checkpoint gátlók alkalmazása elfogadott immunterápiás lehetőség olyan előrehaladott vagy metasztatikus NSCLC-k esetében, melyeknél a kemoterápiás kezelés során progresszió mutatkozik. Ide tartoznak a PD-1 gátló antitestek, mint a nivolumab és a pembrolizumab, valamint a PD-L1 gátló atezolizumab, durvalumab és avelumab (148). Az immunterápiás lehetőségek kemoterápiával való kombinációja (pembrolizumab, carboplatin, pemetrexed) előrehaladott NSCLC-k kezelésében jobb progressziómentes túlélést eredményez (149).

## 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 metasztatikus markerek expressziójára kifejtett hatását.

Végül szakirodalmi adatok alapján feltételeztük, hogy a daganatos betegek metil-donor bevitelének 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 bevitel túlélésre gyakorolt hatásának vizsgálata,
9. megvizsgálni egyes gyulladási markerek hatását a túlélésre.

### 3. Módszerek

#### 3.1 Szisztematikus irodalomelemzés és metaanalízis

Munkánk kezdetén, mely az irodalomi adatok feltérképezésével kezdődött, igyekeztünk felmérni, hogy melyek a leggyakrabban előforduló daganat típusok a népesség körében. A kolorektális daganat már akkor is a harmadik leggyakrabban előforduló daganat típus volt a tüdő és az emlő daganatok után. Emellett az akkori szakirodalom a leggyakrabban a kolorektális daganatok vonatkozásában tárgyalta a metil-donorok szerepét. Másrészt a gyakorlat is ezt támasztotta alá, mert az Onkológiai Klinikára érkező betegek körében ez a daganat típus fordult elő leggyakrabban. Mindezek alapján a szisztematikus irodalomelemzést a kolorektális daganatokra fókuszálva végeztük el.

A szisztematikus irodalomelemzés és metaanalízis a PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) ellenőrzési lista iránymutatásai szerint készült el (150).

Szisztematikus irodalomkutatást végeztünk a PubMed, Ovid-Medline, Web of Science (WoS) és ProQuest elektronikus adatbázisokban. A keresést 2021. március 15-től visszamenőleg végeztük el minden lehetséges évre. 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 bevitel. A keresőszavak kombinációi a következők voltak: PubMed esetén B vitaminok ÉS kolorektális daganat, B2-vitamin ÉS kolorektális daganat, B6-vitamin ÉS kolorektális daganat, B12-vitamin ÉS kolorektális daganat; Ovid-Medline esetén B vitaminok ÉS kolorektális daganat ÉS étrendi bevitel; Web of Science és ProQuest esetében: B2-vitamin ÉS kolorektális daganat, B6-vitamin ÉS kolorektális daganat, B12-vitamin ÉS kolorektális daganat.

A keresési találatokat cím és absztrakt alapján vizsgáltuk át, majd bevonási és kizárási feltételek alapján tovább szűrtük a találatokat. A következő bevonási feltételeket határoztuk meg: 1. a publikációnak angol nyelvűnek kell lennie, 2. a publikációnak eredeti közleménynek kell lennie, 3. a vizsgálat felnőttek bevonásával történt, 4. a vizsgálat érdeklődésének tárgya a B2-, B6- vagy B12-vitamin, 5. az érdeklődésre számot

tartó eredmény a CRC diagnózisa. Kizártuk azokat a találatokat, melyek eredményei kizárólag állatkísérlet vagy *in vitro* kísérlet alapján születtek.

A kiválogatási folyamat végén fennmaradó tanulmányokat alkalmassági szempontoknak feleltették meg, melyek a következők voltak: 1. a publikációban esélyhányadossal (OR), relatív kockázattal (RR) vagy kockázati aránnyal (HR) számoltak 95%-os konfidencia intervallum (CI) mellett; 2. a tanulmány kohorsz vagy eset-kontroll típusú vizsgálat, utóbbi esetben csak olyan publikációk kerültek beválogatásra, melyek a B2-, B6- és B12-vitaminok és az *MTHFR* polimorfizmus közötti összefüggést vizsgálták CRC-ben.

A metaanalízisbe bevont kohorsz és eset-kontroll vizsgálatok minőségi osztályozását a Newcastle-Ottawa skála (NOS) szerint végeztük el.

### 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 tölcsérdiagramot és Galbraith diagramot használtunk. A tölcsérdiagram 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. A bevont tanulmányok egyedi publikációs és egyéb torzításait az eredeti közleményben leírtak alapján értékeltük. Minden statisztikai elemzés a Meta-Essentials eszközeivel valósult meg (151).



### 3.2 *In vitro* vizsgálatok

Az *in vitro* vizsgálatokhoz kiválasztott sejtvonalaknál is hasonló volt a szempont, mint a metaanalízis esetében, szeretnénk volna olyan daganat típusokat kiválasztani, melyek előfordulása gyakori a betegek körében. Emlő, tüdő és kolorektális sejtvonalakon kezdtük el a vizsgálatunkat. Mivel a hasnyálmirigy daganattal diagnosztizált betegek állapotának javításában a táplálásterápia kiemelt jelentőségű lehet a rosszabb prognózis miatt, szeretnénk volna megnézni, hogy a táplálkozással bevihető metil-donorok milyen hatással lehetnek a hasnyálmirigy tumor sejtekre. A kezdeti mérések során a kolorektális tumor sejtvonalnál az alkalmazott koncentrációknál nem találtunk szignifikáns különbségeket a vizsgált sejtfunkciók tekintetében, így az előszűrés után az előbb említett három sejtvonalat vizsgáltuk tovább.

#### 3.2.1 Sejttenyésztés

*In vitro* kísérleteink során humán emlő adenokarcinóma (MCF7; HTB-22), ductális emlő karcinóma (T47D; HTB-133), tüdő karcinóma (A549), tüdő adenokarcinóma (H1650; CRL-5883) és hasnyálmirigy adenokarcinóma (Panc-1) sejtvonalakat használtunk (1. táblázat), melyek amerikai (ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) vagy német (DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany) sejtbankból származtak. A sejtvonalakat a nekik megfelelő tápfolyadékokban tenyésztettük, melyeket 10% főtális borjú szérummal (FBS, FB-1090, Biosera, Nuaille, France) és 0,4% gentamicinnel (Sandoz, Basel, Switzerland; 80 mg/2 ml) egészítettünk ki. A T47D sejtvonal esetében további 10 µg/ml inzulint (12585-014; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) is adtunk a tápfolyadékhoz. A sejteket a fenntartás során, valamint a kezelések ideje alatt 37°C-on, 5 %-os CO<sub>2</sub> koncentráció mellett tenyésztettük inkubátorban. A sejtek kezelése 96 lyukú, 6 lyukú, illetve T25-ös tenyésztőedényekben történt a vizsgálat típusától függően.

**1. táblázat.** Az *in vitro* kísérletek során vizsgált sejtvonalak összefoglalása

Sejtvonal	Típus	Forrás	Kat. szám	Tápfolyadék
<b>MCF7</b>	emlő adenokarcinóma	ATCC	HTB-22	RPMI 1640 (LM-R1640; Biosera)
<b>T47D</b>	duktális emlő karcinóma	ATCC	HTB-133	Ham's F12 Nutrient Mix (21765-029; Thermo Fisher Scientific)
<b>A549</b>	tüdő karcinóma	DSMZ	ACC 107	high glucose DMEM (BE12-604Q; Lonza)
<b>H1650</b>	tüdő adenokarcinóma	ATCC	CRL-5883	RPMI 1640 (LM-R1640; Biosera)
<b>Panc-1</b>	hasnyálmirigy duktális karcinóma	ATCC	CRL-1469	high glucose DMEM (BE12-604Q; Lonza)

## 3.2.2 Metil-donor kezelés

A vizsgált tumor sejteken metil-donorokból álló kezelést alkalmaztunk, melynek során L-metionint, kolin-kloridot, folátot és B12-vitamint együtt használtunk, tehát a felhasznált metil-donorok hatását nem külön vizsgáltuk a sejt kultúrákon. Ezeket a metil-donor vegyületeket minden kezelés előtt frissen adtuk hozzá a sejtek tápfolyadékához, majd különböző koncentrációkat (1x-es, 10x-es és 20x-os) alkalmazva kezeltük a sejteket. Az alap (1x-es) koncentráció 17 mg/l L-metionint, 9 mg/l kolin-kloridot, 3 mg/l folátot és 2 mg/l B12-vitamint tartalmazott (ennek megfelelően a többi koncentráció ennek 10x-es vagy 20x-os mennyiségét tartalmazta), melyet a vizsgálataink alapjául szolgáló korábbi tanulmány alapján határoztunk meg. A tervezett vizsgálatról függően a kiinduló sejtszámot a sejtvonal, illetve a tenyésztőedény típusa határozta meg. Minden esetben a sejteket 50%-os konfluencia szintig (a tenyésztőfelület százalékos borítottsága) tenyésztettük 24 órán keresztül, ezután a rajtuk lévő tápfolyadékot a metil-donorok keverékét tartalmazó tápfolyadéokra cseréltük. A 24, 48 és 72 órás inkubációs idő letelte után vizsgáltuk a kezeléseket hatását. A metil-donorokat a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) cégtől rendeltük.

### 3.2.3 Életképesség mérés

A kezelt sejtek életképesség mérését kolometrikus MTS esszével (CellTiter 96®Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, G3582; Promega, Madison, WI, USA) végeztük el, melynek összetevői egy tetrazolium vegyület (MTS; 3- (4, 5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-karboxi-metoxi-fenil) -2- (4-szulfofenil) -2H-tetrazolium) és egy elektronátadó reagens (PMS; fenazin-metoszulfát). Az MTS teszt során a tetrazolium festék fenazin-metoszulfát jelenlétében színes, oldható formazán terméké redukálódik a sejtekben, mely jól oldódik a sejtek tápfolyadékában. A képződő formazán termék mennyisége arányos az élő sejtek számával.

A sejtek proliferációs vizsgálatához sejtvonaltól függően  $1,5 - 3 \times 10^4$  /ml sejtet raktunk ki 96 lyukú sejtenyésző edényekbe. 24, 48 és 72 órával a kezelés után 20  $\mu$ l MTS reagenst adtunk a sejtekhez, majd 2 óra inkubáció után 490 nm-en lemértük a képződő formazán termék abszorbanciáját plate reader készülék (Labsystems Multiskan MS, Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA) segítségével.

### 3.2.4 Áramlási citometriás mérések

Az áramlási citometriával elvégzett vizsgálatainkhoz a sejteket  $3 - 5 \times 10^4$  /ml koncentrációban osztottuk ki 6 lyukú tenyésztőedényekbe. A 24, 48 és 72 órás metildonor kezelés után a sejteken lévő tápfolyadékot, majd az egyszeres tripszin-EDTA (XC-T1717; Biosera, Nuaille, France) 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.

#### 3.2.4.1 Apoptózis mérés

Az apoptotikus sejtfrakció meghatározásához Annexin V (AnnV) és propidium-jodid (PI) festésen alapuló apoptózis detektáló kitet (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with

PI; 640914; BioLegend, San Diego, CA, USA) használtunk. Az Ann V fehérje a sejtmembránban elhelyezkedő foszfatidil-szerinhez kötődik. A membránintegritás sérülésekor vagy korai apoptózis esetén a foszfatil-szerin kihelyeződik a sejtmembrán külső felszínére, ami az Ann V számára specifikus kötődést biztosít. A PI egy olyan fluoreszcens festék, amely csak a késői apoptotikus vagy nekrotikus sejteket jelöli azáltal, hogy bejut a sejtmagba és kötődik a DNS-hez. Ezek alapján az apoptózis méréseink során megkülönböztettünk korai apoptotikus (AnnV+, PI-), késői apoptotikus (AnnV+, PI+) és nekrotikus (AnnV-, PI+) sejtfrakciókat. Az egészséges sejtek (AnnV-, PI-) egyik festékkal sem festődtek meg.

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 (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA) segítségével.

#### 3.2.4.2 Sejtciklus mérés

Sejtciklus méréseinket fixált sejteken végeztük el PI-os festést követően. A módszer során ribonukleáz (RNáz) enzimet használtunk az RNS molekulák emésztésére, így a PI a DNS-hez kötődik, ezért a sejtekben mért fluoreszcens intenzitás arányos a szubG1, G1, S és G2/M fázisokban lévő sejtmagok DNS tartalmával, és ebből következtethetünk a sejtciklus fázisainak változásaira.

A mosási lépéseket követő centrifugálás után a sejtellethez cseppenként adtuk hozzá a 70%-os jéghideg etanolt és 20 percig szobahőmérsékleten, majd további 30 percig -20 °C-on fixáltuk a sejteket. Kétszeri PBS-es mosást követően a sejteket 1%-os RNáz (R5503; Sigma Aldrich, 10 mg/ml) és 20 µl PI (P3566, Thermo Fischer Scientific Inc, Waltham, MA, USA; 1 mg/ml) tartalmú PBS-ben reszuszpendáltuk, majd 1 órán át inkubáltuk 4 °C-on. A sejtek fluoreszcens intenzitásának meghatározására 20.000 eseményt detektáltunk azonos beállítási paraméterek mellett, CytoFLEX Flow Cytometer

és a hozzá tartozó CytExpert szoftver (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA) segítségével.

### 3.2.5 Western blot

A fehérjék vizsgálatához T25-ös flaskában tenyésztettük a sejteket, majd 24, 48 és 72 óras metil-donor kezelés után a sejteket kétszer átmostuk PBS-el, majd a későbbi felhasználás időpontjáig  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

#### 3.2.5.1 Fehérjeizolálás és minta előkészítés

Az izolálás megkezdése előtt a flaskára növesztett sejteket és az izoláláshoz szükséges reagenseket jégre helyeztük. A sejtekre  $0,5\text{ mM}$  nátrium-ortovanadáttal ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ),  $10\text{ mM}$  nátrium-fluoriddal (NaF) és 1:200 proteáz inhibitor koktéllal (PIC; P8340, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) kiegészített RIPA (radioimmunoprecipitation assay) lizispuffert pipettáztunk. Az edény aljáról sejtkeparó 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  $12.000\text{ rpm}$ -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 (A53226; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével határoztuk meg a gyártói utasítás szerint. A fehérje extraktumokat ötszörös töménységű mintafelvívő pufferrel egészítettük ki és  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 5 percig melegítettük, majd felhasználásig  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

#### 3.2.5.2 Western blot analízis

A fehérjék vizsgálatához sejtvonaltól függően mintánként és vizsgálatonként azonos mennyiségű, vizsgálatától függően  $12 - 30\text{ }\mu\text{g}$  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 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) segítségével. A lefuttatott fehérjéket polivinil-difluorid (PVDF) membránra (IPVH00005; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) blottoltuk 100 V-os feszültséggel 60 percen keresztül 4 °C-on. Tejporos blokkolás után a membránokat elsődleges antitestekkel inkubáltuk egy éjszakán át 4 °C-on (2. táblázat). Mosási lépések után a megfelelő torma-peroxidáz (HRP)-konjugált másodlagos ellenanyagokkal történő jelölést végeztük el. A membránok előhívása SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit (34080; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) használatával történt a gyártói utasítás alapján, majd ezt követően az eredmények vizualizálását iBright FL1500 Imaging System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) készülékkel végeztük el. Az immunoblottok denzitometriás kiértékelése Image J szoftverrel történt, melyet a Nemzeti Egészségügyi Intézet (NIH) és a Wisconsini Egyetem Optikai és Számítógépes Laboratóriuma (LOCI) fejlesztett ki.

2. táblázat. A Western blot analízis során használt elsődleges antitestek listája

Antitest	Gyártó	Kat. szám	Hígítás	Faj
<b>Caspase-9</b>	Cell Signaling	9502S	1:1000	nyúl
<b>Bak (D4E4)</b>	Cell Signaling	12105T	1:1000	nyúl
<b>Puma</b>	Cell Signaling	12450T	1:1000	nyúl
<b>Bax (D2E11)</b>	Cell Signaling	5023T	1:1000	nyúl
<b>Bcl-2 (124)</b>	Cell Signaling	15071S	1:1000	egér
<b>Mcl-1 (D5V5L)</b>	Cell Signaling	39224S	1:1000	nyúl
<b>p21 (SX118)</b>	Santa Cruz Biotechnology	sc-53870	1:200	egér
<b>p-Erk1/2</b>	Cell Signaling	4370S	1:2000	nyúl
<b>p-p53 (B-3) (Thr55)</b>	Santa Cruz Biotechnology	sc-377553	1:200	egér
<b>p-p53 (Ser15)</b>	Cell Signaling	9284T	1:1000	nyúl
<b>p-Akt</b>	Cell Signaling	3787S	1:1000	nyúl
<b>Akt (pan) (11E7)</b>	Cell Signaling	4685S	1:1000	nyúl
<b>beta-Actin (13E5)</b>	Cell Signaling	4970S	1:5000	nyúl
<b>CD30</b>	Cell Signaling	25114	1:1000	nyúl
<b>NFkB</b>	Cell Signaling	8242	1:1000	nyúl
<b>SDF-1a (FL-93)</b>	Santa Cruz Biotechnology	sc-28876	1:500	nyúl
<b>STAT3</b>	NeoMarkers	RB-9237-PO	1:500	nyúl
<b>MMP-9 (GE-213)</b>	Sigma-Aldrich	MAB13415	1 µg/mL	egér
<b>E-cadherin</b>	R&D Systems	AF648	0,5 µg/mL	kecske
<b>Anti-mouse IgG, HRP-linked</b>	Cell Signaling	7076S	1:1000	ló
<b>Anti-rabbit IgG, HRP-linked</b>	Cell Signaling	7074S	1:1000	kecske
<b>Anti-goat IgG, HRP-linked</b>	Dako	P0449	1:1000	nyúl

## 3.2.6 Citokin array

A gyulladásos citokinek vizsgálatához Panc-1 sejtek metil-donor kezelés utáni felülúszóját gyűjtöttük be, melyeket a mérésekig  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A sejtek által termelt gyulladásos citokin szinteket Proteome Profiler Human XL Cytokine Array Kit (ARY022B, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) segítségével határoztuk meg. A mérések a gyártói utasítások szerint történtek. A membránok vizualizálását iBRIGHT FL1500 Imaging System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) készülékkel végeztük el. Az átlagos jelintenzitások kiértékelése Image J szoftverrel történt, melyet a

Nemzeti Egészségügyi Intézet (NIH) és a Wisconsini Egyetem Optikai és Számítógépes Laboratóriuma (LOCI) fejlesztett ki.

### 3.2.7 Statisztikai analízis

Eredményeink kiértékelését GraphPad Prism (San Diego, CA, USA) szoftverrel végeztük el. A statisztikai elemzéshez párosított mintás Wilcoxon-féle előjeles rangpróbát és Bonferroni vagy Geisser–Greenhouse post hoc teszttel kiegészített egy- vagy többszempontos ANOVA-t használtunk. A többszörös összehasonlításokat Dunnett-tesztetel 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, mely a betegek részéről indoklás nélkül visszavonható volt. A részvétel feltétele az írásos beleegyező nyilatkozatok aláírása volt. Ezt követően a betegekhez egyéni kódokat rendeltünk, így az adatokat, a válaszokat és az eredményeket személyhez nem köthető, anonim módon dolgoztuk fel. A betegek részvétele nem befolyásolta a kezelésük menetét. 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 háttér, 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 rögzítettük. A fogyasztási gyakoriságok kikérdezését Food Frequency Questionnaire (FFQ) módszerrel végeztük. A kérdőívek interjúszerű kikérdezése személyesen vagy telefonon keresztül történt. A válaszok feldolgozásához egy általunk definiált, számozáson alapuló kódolást használtunk, majd ennek segítségével készítettük el a statisztikai elemzéseket.

A fizikai aktivitás felméréséhez különböző mozgásformákat definiáltunk. Nehezebb, nagyobb megterheléssel járó mozgásforma volt a futás és az úszás; közepes erősségűnek tekintettük a nordic walking-ot és a kerékpározást; a könnyebb, nem nagy intenzitású kategóriába soroltuk a tornát, a jógát és a gyógytornát. Ezekon kívül meghatároztunk egy 'egyéb' kategóriát is, amibe azokat a mindennapos tevékenységeket tartoztak, melyek olyan fizikai aktivitásnak tekinthetők, melyek segíthetik a betegek jó fizikális

állapotának, aktív életformájának megtartását (például séta, házi munka, kertészkedés, kirándulás).

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 bevitel szerinti csoportokba osztottuk, ahol az alacsony napi bevitel jelentette az RDA (Recommended Dietary Allowances) körüli vagy annál alacsonyabb bevittet (5. táblázat). 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. A centrifugálás során visszamaradt vörösvértesteket szintén elraktuk további vizsgálatok céljából.

### 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 (D6050 és D8000C; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 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 (Labsystems Multiskan MS, Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA) 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 SNP mérés PCR alapú KASPar módszerrel

#### 3.3.5.1 DNS izolálás

A humán vérminták szeparálása után elrakott vörösvértestek felhasználásával DNS-t izoláltunk. Az izolálást QIAamp DNA Blood Mini Kit (51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany) segítségével végeztük el a gyártói utasítások betartásával. 200 µl mintát a kitben található proteázzal és Buffer AL-lal alaposan összevortexeltünk, majd 56 °C-on 10 percig inkubáltunk. 200 µl 96%-os etanol hozzáadása után a keveréket a kitben található speciális, DNS-t adszorbeáló szűrővel rendelkező csövekbe helyeztük át és 12.000 g fordulatszámon 1 percig centrifugáltuk. A szűrő felületén megkötött DNS-t a kitben található mosópufferekkel kétszer átmostuk, végül a Buffer AE oldattal 1 percig inkubáltuk. Centrifugálás (6000 g, 1 perc) után megkaptuk a mintákból izolált DNS-eket, melyek koncentrációit (ng / µl) és tisztasági értékeit (OD260/230, OD260/280) NanoDrop 1000 spektrofotométer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) segítségével határoztuk meg.

#### 3.3.5.2 SNP meghatározás

A betegek *MTHFR* (C677T) polimorfizmusának SNP meghatározásához KASP-On-Demand kit-et (KBS-1016-016, LGC Genomics, Hertfordshire, UK) használtunk, melyhez a gyártó által előírt utasításokat követtük. Mindegyik DNS mintából 3 µl-t pipettáztunk 96 lyukú PCR plate-ekre. Ezekhez adtuk hozzá a protokoll szerint

összeállított KASP genotyping mix-et, ami lyukanként 5 µl 2x KASP Master mix-et, 0,14 µl KASP Assay mix-et és 2 µl tisztított vizet tartalmazott. A minták RT PCR-ben való futtatását a KASP thermal protocol szerint végeztük, mely során 94 °C-on történő 15 perces aktivációs ciklus után 10 cikluson keresztül 94 °C-on 20 másodpercig denaturálás és 61-55 °C-on 60 másodpercig (0,6 °C-os ciklusonkénti hőmérséklet visszaeséssel) elongáció történik, majd 26 cikluson át 94 °C-on 20 másodpercig denaturálás és 55 °C-on 60 másodpercig elongáció történik. Az vizsgált allélok jelölése FAM és HEX fluoreszcens festékekkel történt, ahol a FAM jelölte az *MTHFR* gén C allélját és a HEX pedig a T allélját. A termális ciklusok futtatását és az adatok kiértékelését az Applied Biosystems QuantStudio™ 3 Real-Time PCR készülékkel végeztük el (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA).

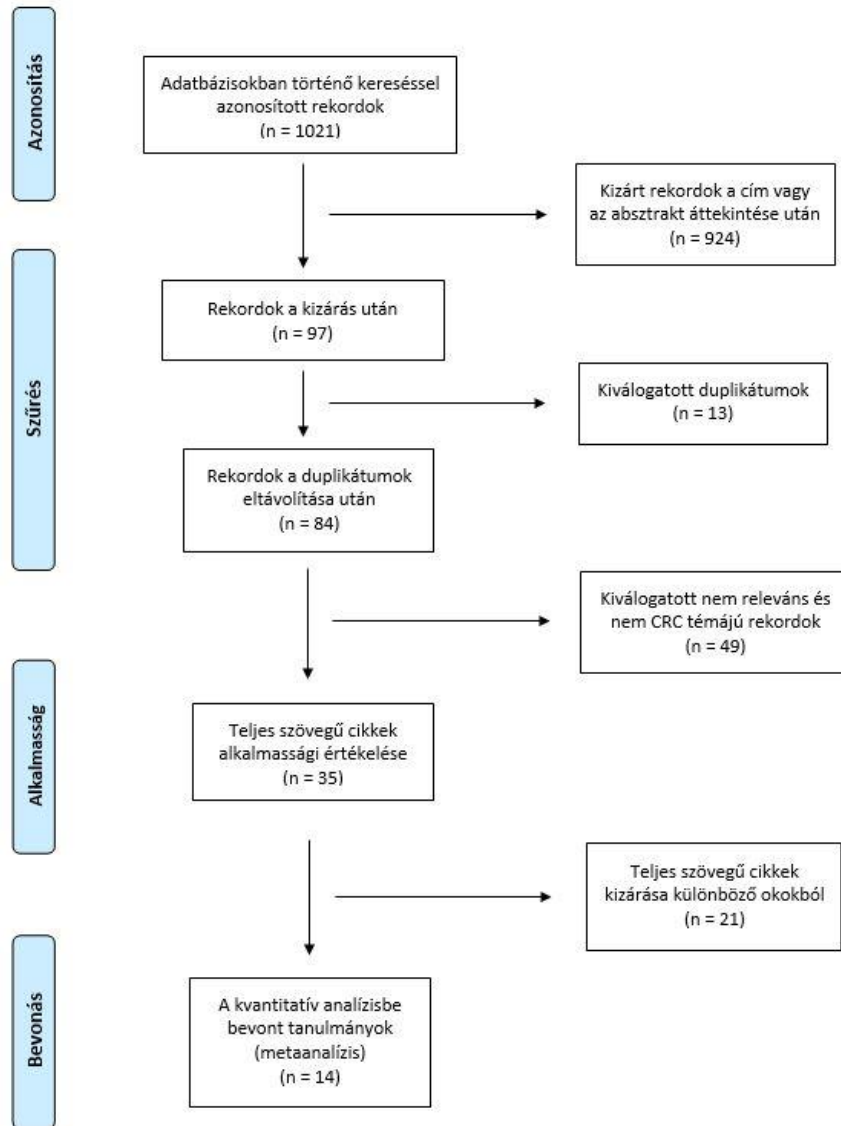
### 3.3.6 Statisztikai analízis

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 (San Diego, CA, USA) 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. A keresési találatok átvizsgálása után 84 cikket vetettünk alá a bevonási és kizárási kritériumok szerinti vizsgálatnak. A feltételeknek megfelelő 35 darab cikk teljes szövegének átnézését követően végül 14 tanulmányt vontunk be a kvantitatív metaanalízisbe (9 kohorsz és 5 eset-kontroll tanulmányt) (3. ábra).



3. ábra. A kiválasztási protokoll PRISMA folyamatábrája (saját ábra)

Az első analízisbe bevont 9 kohorsz tanulmány esetében a kiszámolt általános esélyhányados a B vitamin bevitel CRC-re gyakorolt hatását mutatta meg. Ennek a csoportnak a teljes mintanagysága 777.117 fő volt, melyben 8.146 CRC esetet vizsgáltak. Az elemzést a B vitamin típusa szerint végeztük el és a forest plot-okat külön B2-vitaminra, B6-vitaminra és B12-vitaminra készítettük el.

A második analízis 5 eset-kontroll vizsgálatot foglalt magába. A kiszámolt általános esélyhányados reprezentálta az MTHFR C667T homozigóta polimorfizmus és a B vitaminok közötti összefüggést, amely befolyásolja a polimorfizmus okozta CRC kialakulásának kockázatát. Az eset-kontroll vizsgálatokban összesen 7.790-en vettek részt, ahol 2.230 CRC-vel diagnosztizált beteg volt.

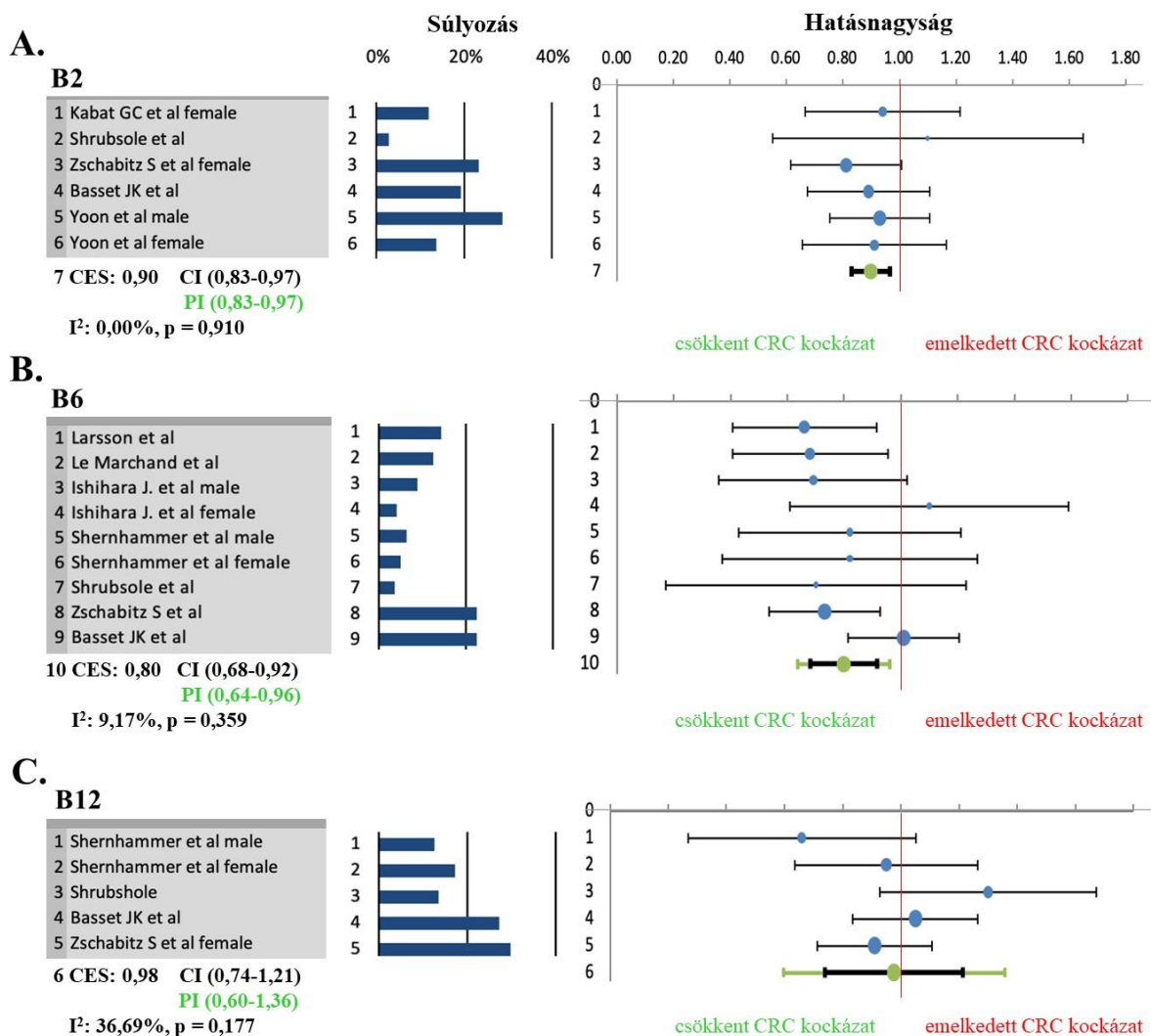
A publikációk alacsony vagy magas csoportokba sorolták a napi B vitamin bevételeket tercilisek, kvartilisek és kvintilisek segítségével. A beviteli értékek különböztek az egyes tanulmányokban, ezért minden esetben a legmagasabb és a legalacsonyabb beviteli értéket hasonlítottuk össze a vonatkozó esélyhányadosokkal.

#### 4.2 A B vitaminok bevétele és a CRC kialakulásának kockázata közötti összefüggés

A legmagasabb és legalacsonyabb B2-, B6- és B12-vitamin bevitel és a CRC kockázat közötti összefüggés kimutatására a kombinált hatásnagyságot használtuk.

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 (4A ábra.). Nem találtunk különbséget a CI95% és PI95% értékek között. Heterogenitás a tanulmányok között nem volt ( $I^2 = 0,00\%$ ;  $p = 0,910$ ,  $PI95\% = 0,83 - 0,97$ ) (4A ábra). A 'Trim and fill' módszerrel sem találtunk heterogenitásra utaló adatot, és sem a tölcsérdiagram, sem a Galbraith diagram nem mutatott kiugró hatásnagyság értékeket. Az Egger regressziós teszt ( $p = 0,202$ ), valamint a Begg és Mazumdar-féle rangkorrelációs teszt ( $p = 0,094$ ) nem bizonyított publikációs torzítást.

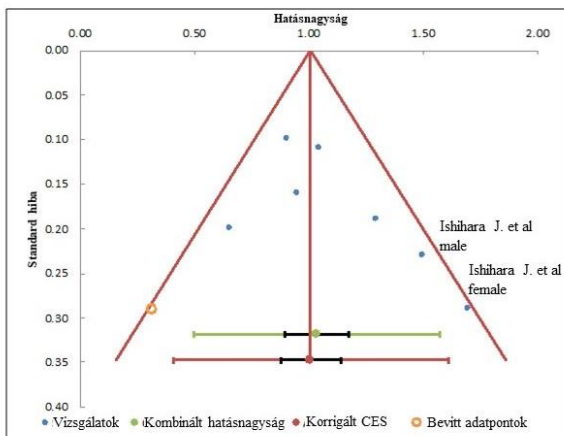
A metaanalízis során kapott eredmények azt is kimutatták, hogy a magasabb étrendi B6-vitamin bevitel által csökken a CRC kialakulásának esélye (CES = 0,80; CI95% 0,68 – 0,92) (4B ábra.). A PI95% érték (0,64 – 0,96) hasonló volt a CI95%-hoz. Alacsony mértékű statisztikai heterogenitást detektáltunk ( $I^2 = 9,17\%$ ;  $p = 0,359$ ; PI95% 0,64 – 0,96) (4B ábra). A 'Trim and fill' módszer szerint azonban B6-vitamin esetében sem volt heterogenitásra utaló bizonyíték. A tölcserdiagram és a Galbraith diagram nem mutatott kiugró értékeket a hatásnagyságok között. Publikációs torzítást nem találtunk az elvégzett Egger regressziós teszt ( $p = 0,880$ ) és Begg és Mazumdar-féle rangkorrelációs teszt ( $p = 0,174$ ) alapján.



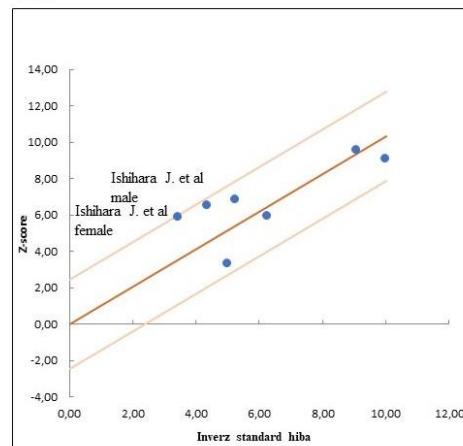
**4. ábra.** A B2-vitamin (A), a B6-vitamin (B) és a B12-vitamin (C) bevitel és a CRC kialakulásának kockázata közötti összefüggés vizsgálata. A forest plot-ok a B vitaminok bevitelére és a CRC közötti összefüggést tárgyaló tanulmányok hatásnagyságát ábrázolják. A pontok mérete arányos az egyes tanulmányok súlyozásával.

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. Szignifikánsan jelentős 64,01%-os ( $p = 0,011$ ; PI95% = 0,50 – 1,69) heterogenitást mutattunk ki. A 'Trim and fill' módszer szintén szignifikáns heterogenitást ( $p = 0,002$ ) mutatott. Annak ellenére, hogy a hatásnagyság értékek közül nem igazolt kiugró értéket sem a tölcsérdiagram, sem a Galbraith plot (5. ábra), az Ishihara és munkatársai által közölt tanulmányt feltételeztük leginkább eltérőnek az eredmények alapján, ezért az Ishihara által közölt eredményeket kizártuk az elemzésből.

A.



B.



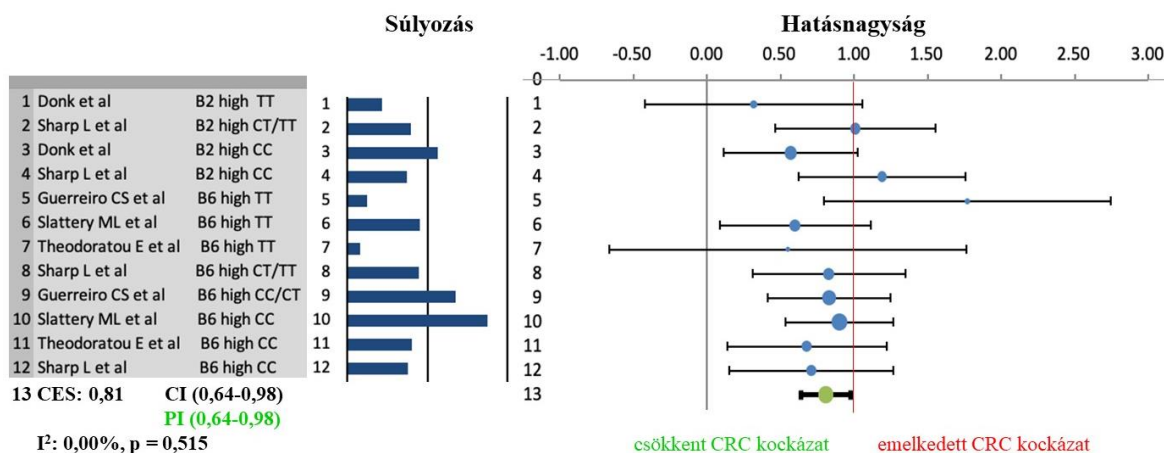
**5. ábra.** A kiugró hatásnagyságok vizsgálata a B12-vitamint tárgyaló tanulmányok között. A tölcsérdiagram (A) ferde határvonalán vagy a Galbraith diagramon (B) kívül eső vizsgálatok lehetséges kiugró értékek.

Ennek hatására jelentősen megváltozott a B12-vitamin bevitellel kapcsolatos metaanalízis eredménye. Az újrászámolt kombinált hatásnagyságra 1 alatti értéket kaptunk (CES = 0,98) és az  $I^2$  mérsékeltebb, nem szignifikáns értékűre változott ( $I^2 = 36,69\%$ ;  $p = 0,177$ ). Ennek ellenére a heterogenitás további jelzői (CI95% 0,74 – 1,21; PI95% 0,60 – 1,36) továbbra is magas heterogenitást jeleztek (4C ábra). A tanulmány kizárását követően azonban nem találtunk már publikációs torzítást ( $p = 0,975$  és  $p = 0,500$ ).



#### 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 bevétel csökkentheti a CRC kialakulásának kockázatát azoknál a betegeknél, akiknél jelen volt az *MTHFR* C667T polimorfizmus (6. ábra). A kiszámolt kombinált hatásnagyság 0,81 volt 95%-os CI (0,64 – 0,98) mellett (a PI95% értéke is hasonló volt). Heterogenitást nem tapasztaltunk az analízisbe bevont tanulmányok között ( $I^2 = 0,00\%$ ;  $p = 0,515$ ) (6. ábra). A 'Trim and fill' módszerrel sem mutattunk ki heterogenitásra utaló adatot. A publikációs torzítás tesztelésére használt Egger regressziós teszt ( $p = 0,759$ ), valamint a Begg és Mazumdar-féle rangkorrelációs teszt ( $p = 0,340$ ) egyike sem mutatott ki szignifikáns publikációs torzítást.

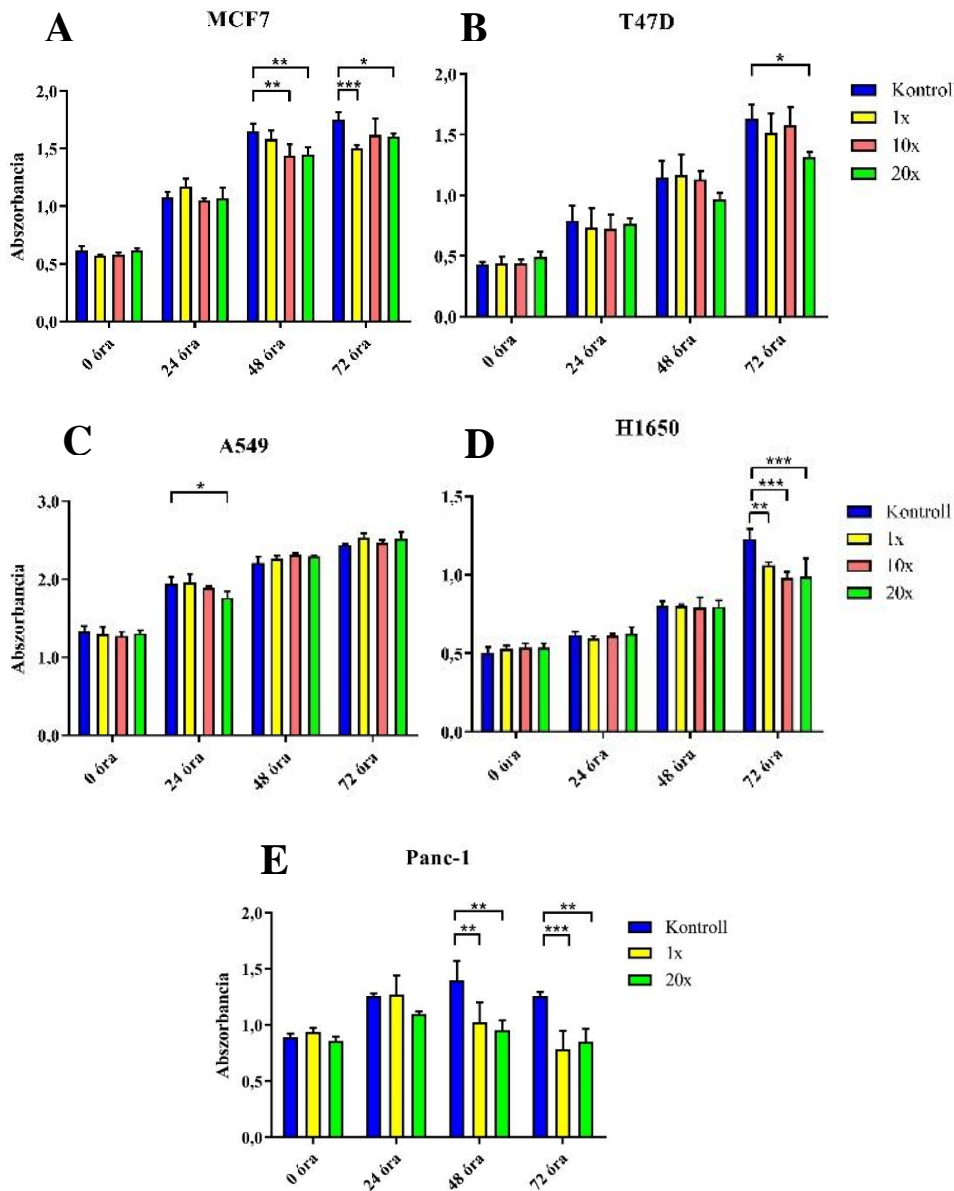


**6. ábra.** Az *MTHFR* C667T polimorfizmusának a B vitamin bevétel és a CRC kialakulás kockázat közötti összefüggésre gyakorolt hatásának metaanalízis vizsgálata. A forest plot-ok a B2- és B6-vitaminok bevitele és a CRC közötti összefüggést tárgyaló tanulmányok hatásnagyságát ábrázolják. A pontok mérete arányos az egyes tanulmányok súlyozásával.

#### 4.4 A metil-donor kezelés hatása a tumorsejtek életképességére

A metil-donor kezelések tumorsejtek növekedésére gyakorolt hatását emlő, tüdő és hasnyálmirigy tumor sejtvonalakon vizsgáltuk meg MTS proliferációs teszt segítségével. A kezelése során alkalmazott 1x-es, 10x-es és 20x-os metil-donor koncentrációk közül a 20x-os töménységben alkalmazott metil-donor kezelés az összes vizsgált sejtvonala esetében szignifikánsan csökkentette a tumorsejtek proliferációját a kezeletlen kontroll

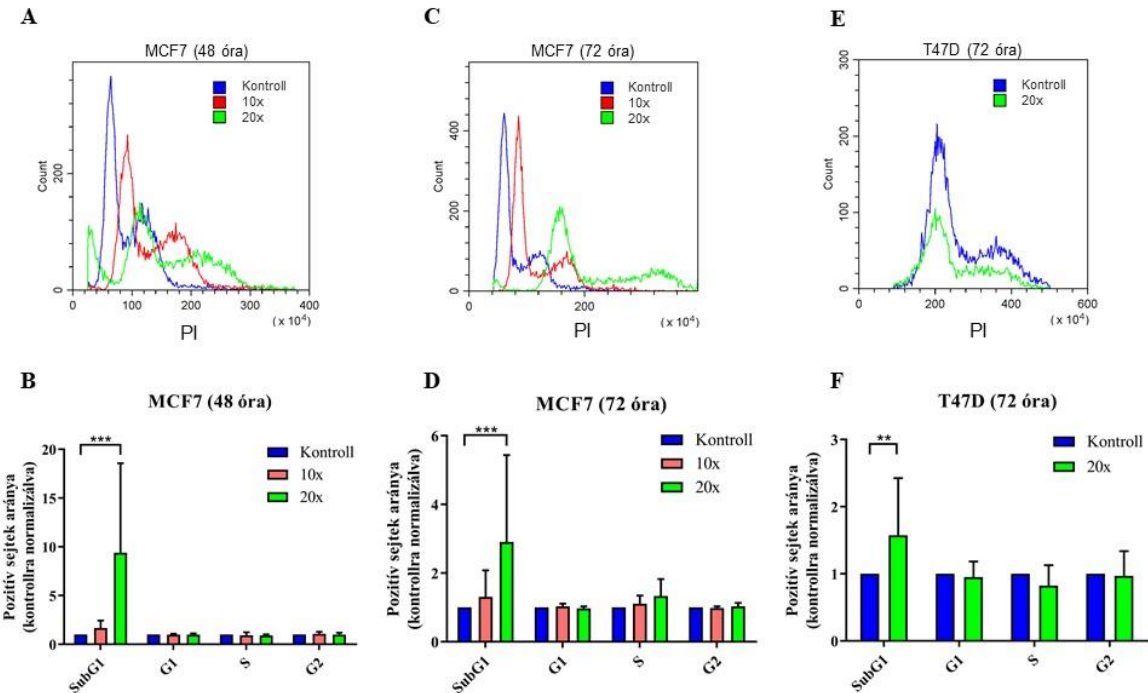
csoporthoz képest (7. ábra). Ez a hatás az A549 sejtvonalnál már 24 óra után jelentkezett ( $p < 0,01$ ) (7C ábra), míg MCF7 ( $p < 0,05$  és  $p < 0,01$ ) és Panc-1 ( $p < 0,01$  és  $p < 0,01$ ) sejtek esetében 48 és 72 órás kezelés után mértünk jelentős csökkenést (7A és 7E ábra). A T47D ( $p < 0,01$ ) és H1650 ( $p < 0,001$ ) sejtvonalak proliferációja 72 órás 20x-os töménységű metil-donor kezelést követően csökkent le (7B és 7D ábra).



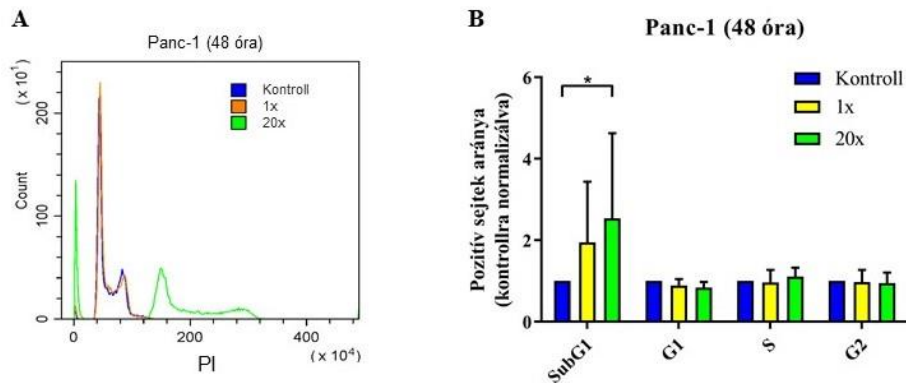
**7. ábra.** A vizsgált emlő, tüdő és hasnyálmirigy daganatos sejtvonalak proliferációja metil-donor kezelés után. Az MCF7 és T47D sejtek proliferációja szignifikánsan lecsökkent 72 órás kezelés hatására, ami az MCF7 sejtek esetében már 48 órás kezelés után is jelentkezett (A, B). Az A549 sejtekben a 24 órás, a H1650 sejtekben 72 órás metil-donor kezelés okozott szignifikáns proliferáció csökkenést (C, D). A Panc-1 sejtek proliferációja 48 és 72 órás kezelés után egyaránt lecsökkent a kontroll csoporthoz képest (E).

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

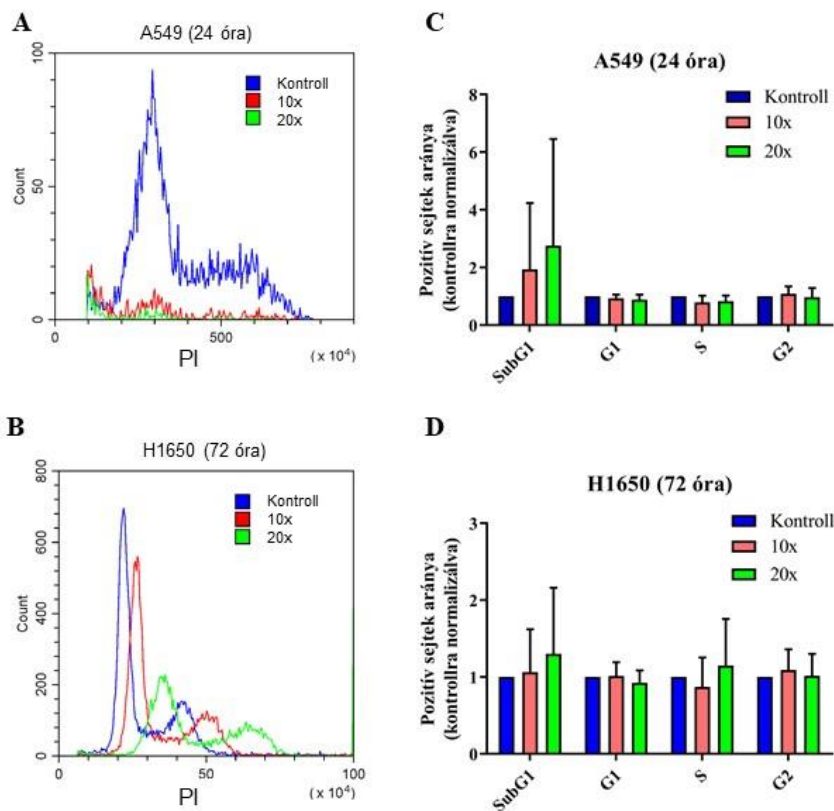
A sejtciklus mérések során az apoptotikus sejtpopulációt jelölő subG1 fázis változását áramlásos citometriával vizsgáltuk, amely a sejtciklus hisztogramján a G1 fázis előtt jelenik meg. A 20x-os metil-donor koncentrációval kezelt tumorsejtek mindegyikében megemelkedett a subG1 sejtek aránya. Szignifikáns változást az MCF7 sejtekben 48 és 72 órás kezelés után ( $p < 0,001$ ) (8B és 8D ábra), a T47D sejtekben 72 órás kezelés után ( $p < 0,01$ ) (8F ábra), valamint a Panc-1 sejtekben 48 órás kezelés után mértünk ( $p < 0,05$ ) (9B ábra). Az általunk vizsgált A549 és H1650 tüdő tumorsejtvonalak esetében csak a subG1 fázis megnövekedett tendenciáját figyelhettük meg (10. ábra).



**8. ábra.** Az MCF7 és T47D sejtek sejtciklus vizsgálata. A vizsgált emlő daganatos sejtvonalak SubG1 fázisa szignifikánsan megnövekedett metil-donor kezelés hatására a kontroll csoporthoz képest. Az MCF7 sejteknél 48 és 72 órás kezelés után (A-C), a T47D sejteknél pedig 72 órás kezelés után nőtt meg a SubG1 fázis (E, F). Minden oszlop a pozitív sejtek átlagos számát mutatja a kontrollra normalizálva. \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ . 10x és 20x: metil-donor koncentrációk.

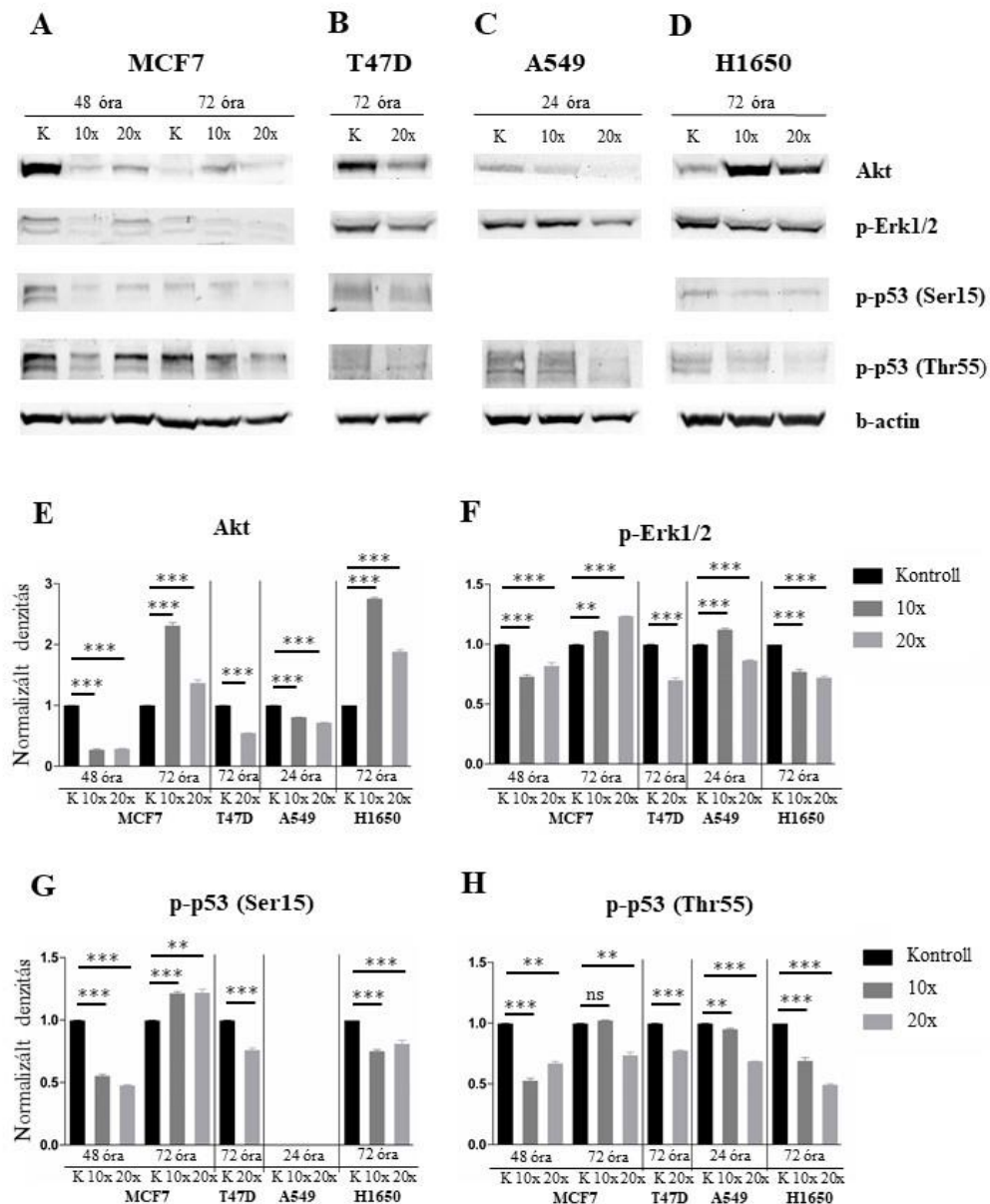


**9. ábra.** A Panc-1 sejtek sejtciklus vizsgálata. A vizsgált hasnyálmirigy daganatos sejtek SubG1 fázisa szignifikánsan megemelkedett 48 órás 20x-os metil-donor kezelés után a kontrollhoz képest (**A**, **B**). Minden oszlop a pozitív sejtek átlagos számát mutatja a kontrollra normalizálva. \*:  $p < 0,05$ . 1x és 20x: metil-donor koncentrációk.



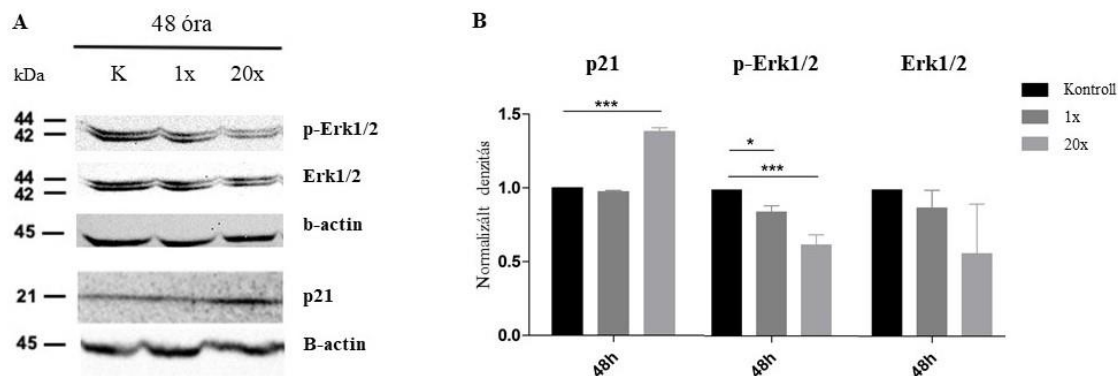
**10. ábra.** Az A549 és H1650 sejtek sejtciklus vizsgálata. A vizsgált tüdő daganatos sejtvonalak esetében megnövekedett tendenciájú SubG1 fázisokat tapasztaltunk metil-donor kezelés hatására a kontroll csoporthoz képest. Az A549 sejteknél 24 órás kezelés után (**A**, **C**), a H1650 sejteknél pedig 72 órás kezelés után nőtt meg a SubG1 fázis (**B**, **D**). Minden oszlop a pozitív sejtek átlagos számát mutatja a kontrollra normalizálva. A549:  $p = 0,35$ ; H1650:  $p = 0,46$ . 10x és 20x: metil-donor koncentrációk.

Ismert, hogy a sejtek növekedésben és szaporodásában jelentős szerepet játszó MAPK/ERK jelátviteli útvonal aktivációja elősegíti a sejciklusba való belépést szabályozó gének aktivációját és elnyomja azokat a géneket, melyek megakadályozzák ezt a folyamatot (ilyen a p21<sup>WAF1/Cip1</sup> fehérjét kódoló *CDKN1A* gén). Ebből kifolyólag Western blot analízissel megvizsgáltuk, hogy a metil-donor kezelés miként befolyásolja a tumor sejtekben a p-p44/42 MAPK (p-ERK1/2) szintet, valamint az AKT és a p53 fehérjék szintjét. Ezen kívül a sejciklus G1 fázisának p53-függő gátlásában szerepet játszó p21<sup>WAF1/Cip1</sup> fehérje expresszióját is mértük. 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 ( $p < 0,001$ ) (11E ábra). 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 (11F ábra). Azonban az MCF7 sejtek 72 órás metil-donor kezelése az AKT és a p-ERK1/2 szintjeinek emelkedését okozta az alkalmazott kezelési koncentrációkban ( $p < 0,001$ ) (11E és 11F ábra). A H1650 sejtek esetében hasonlóan emelkedett AKT szinteket detektáltunk 72 órás kezelés után ( $p < 0,001$ ) (11E ábra). Ezen felül az A549 sejtekben a 10x-es koncentrációjú kezelés p-ERK1/2 emelkedést okozott ( $p < 0,001$ ) (11F ábra). 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 ( $p < 0,001$ ) (11F ábra).



**11. ábra.** Jelátviteli fehérjék szintjének változása metil-donor kezelés után a vizsgált emlő és tüdő daganatos sejtvonalakban. Az AKT, p-ERK1/2, p-p53 (Ser15) és a p-p53 (Thr55) fehérjék Western blot analízise (A-D) és statisztikai elemzése (E-H). Az AKT és p-ERK1/2 fehérjék szintje szignifikánsan lecsökkent a vizsgált sejtvonalakban. Azonban az MCF7 és a H1650 sejtek 72 órás kezelése szignifikánsan megemelte az AKT szintet (E), valamint a p-ERK1/2 szintje is megemelkedett az MCF7 sejtek 72 órás és az A549 10x-es koncentrációval való kezelése után (F). A p53 (Thr55) foszforilációja szignifikánsan lecsökkent mindegyik sejtvonalban (H), míg a p-p53 (Ser15) szintje szignifikánsan megemelkedett az MCF7 sejtek 72 órás kezelése hatására. Minden oszlop az átlagos normalizált denzitást mutatja. \*\*:  $p < 0,002$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ . 10x és 20x: metil-donor koncentrációk.

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 (12B ábra).



**12. ábra.** Sejtproliferációt befolyásoló fehérjék vizsgálata metil-donor kezelés a vizsgált hasnyálmirigy daganatos sejtvonalban. A p21<sup>p21WAF1/Cip1</sup> és p-ERK1/2 fehérkék Westrn blot analízise (A) és statisztikai elemzése (B). A p21<sup>p21WAF1/Cip1</sup> fehérje szintje szignifikánsan megemelkedett, míg a p-ERK1/2 fehérje szignifikánsan lecsökkent 48 órás 1x-es és 20x-os metil-donor kezelés után a kontroll csoporthoz képest (B). Minden oszlop az átlagos normalizált denzitást mutatja. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ . 1x és 20x: metil-donor koncentrációk.

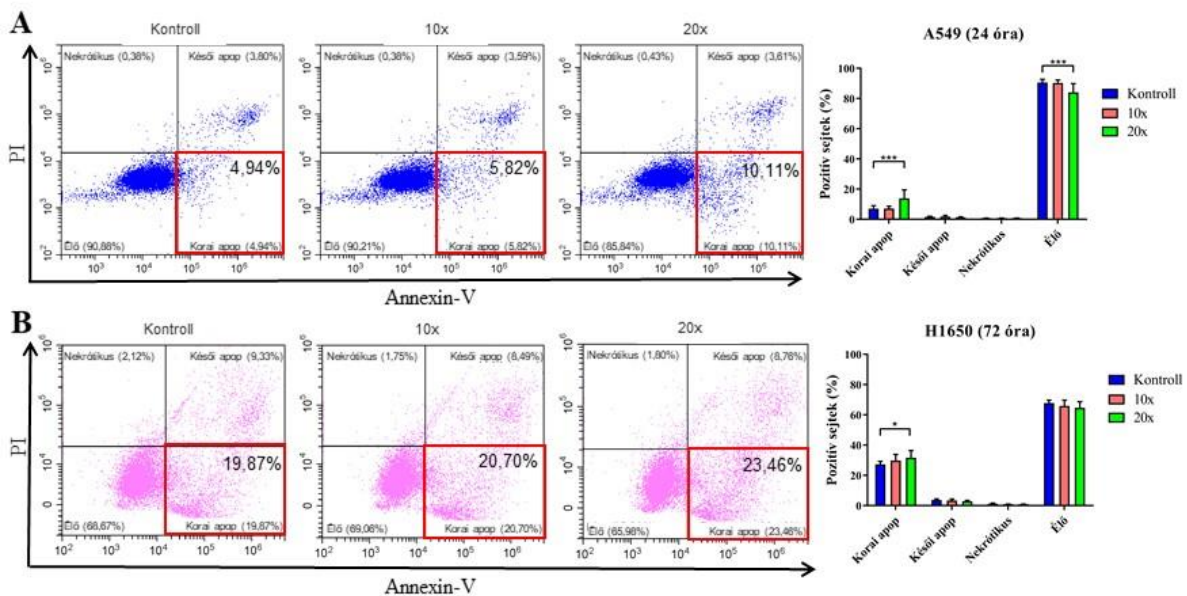
A sejtciklust befolyásoló és apoptózist indukáló p53 fehérje Thr55-ös és Ser15-ös aminosavakon foszforilált állapotát az emlő és tüdő tumor sejtvonalakon vizsgáltuk. A metil-donor kezelések következtében szignifikánsan lecsökkent a p-p53 (Thr55) fehérje szintje az összes vizsgált sejtvonal esetében (11G ábra). 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 (11H ábra).

A p53 által indukált sejtciklus gátlás vizsgálatára a p21<sup>WAF1/Cip1</sup> növekedés gátló fehérje szintjét vizsgáltuk meg a Panc-1 sejtekben. A p21<sup>WAF1/Cip1</sup> fehérje szintjének szignifikáns emelkedését találtunk Panc-1 sejtekben, melyet a 20x-os koncentrációjú metil-donor kezelés hatására detektáltunk 48 óra után a kontroll csoporthoz képest ( $p < 0,001$ ) (12B ábra).

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

Apoptózis vizsgálatainkhoz először áramlásos citometriával határoztuk meg a metil-donor kezelés hatására megjelenő, a korai apoptózis jelét mutató sejtfrakció arányának változását, majd Western blot segítségével megnéztük, hogy az apoptózis folyamatát befolyásoló fehérjék expressziója milyen mértékben változik meg a kezelt csoportokban a kontroll csoporthoz képest.

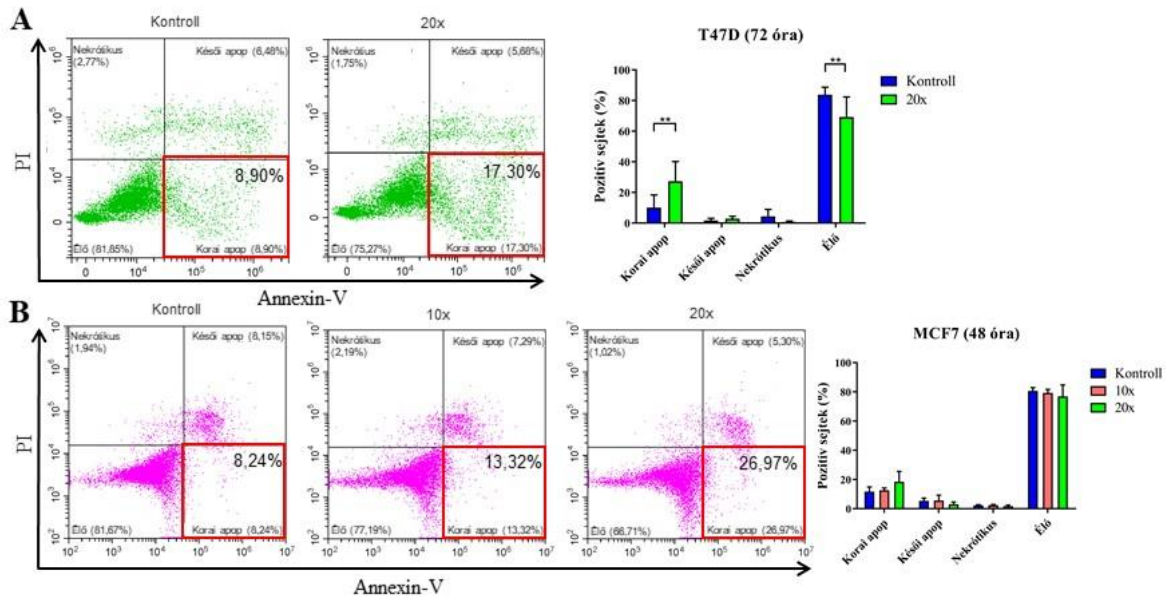
AnnV és PI kettős jelölés segítségével elkülönítettük az élő, a korai apoptotikus, a késői apoptotikus és a nekrotikus tumor sejtpopulációkat. Méréseink alapján azt találtuk, hogy az AnnV egyszeresen pozitív korai apoptotikus sejtek aránya szignifikánsan megemelkedett az A549 sejtekben 24 órás ( $p < 0,001$ ) (13A ábra), a H1650 sejtekben ( $p < 0,05$ ) (13B ábra) és a T47D sejtekben ( $p < 0,01$ ) (14A ábra) 72 órás 20x-os koncentrációjú metil-donor kezelés után a kontrollhoz képest.



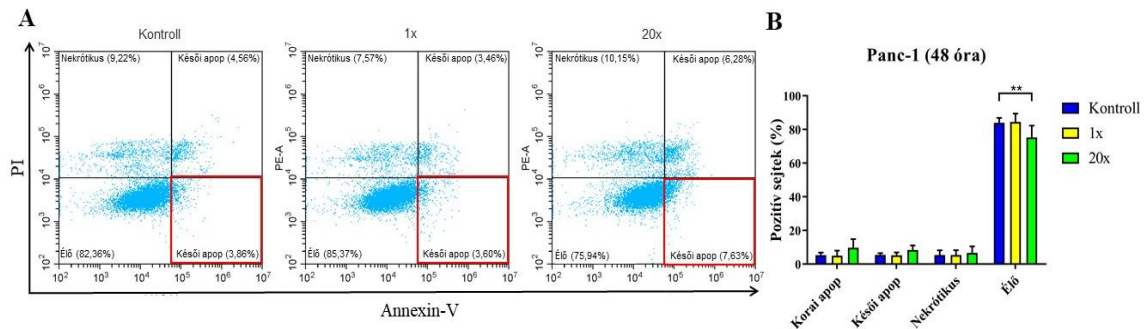
**13. ábra.** Apoptotikus sejtfrakciók flow citometriás detektálása a vizsgált tüdő daganatos sejtvonalakban. A korai apoptotikus sejtek (piros négyzettel jelölve) aránya szignifikánsan megemelkedett a 20x-os koncentrációval kezelt A549 és H1650 sejtvonalakban 24 (A) és 72 (B) óra után a kontroll csoporthoz képest. Minden oszlop a pozitív sejtek átlagos arányát mutatja a korai apoptotikus, késői apoptotikus, nekrotikus és élő sejtfrakciókban. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,001$ . 10x és 20x: metil-donor koncentrációk.



A másik általunk vizsgált emlő tumor sejtvonal (MCF7) ( $p = 0,41$ ) és a Panc-1 sejtek ( $p = 0,326$ ) esetében csak a korai apoptotikus sejtek emelkedő tendenciáját tudtunk megállapítani 48 órás kezelés után (14B és 15B ábra). Továbbá az A549, a T47D és a Panc-1 sejtvonalak esetében a korai apoptotikus sejtfraekció növekedésével fordítottan arányosan szignifikánsan lecsökkent az élő sejtek száma ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$  és  $p < 0,01$  a sejtvonalak említett sorrendjében).

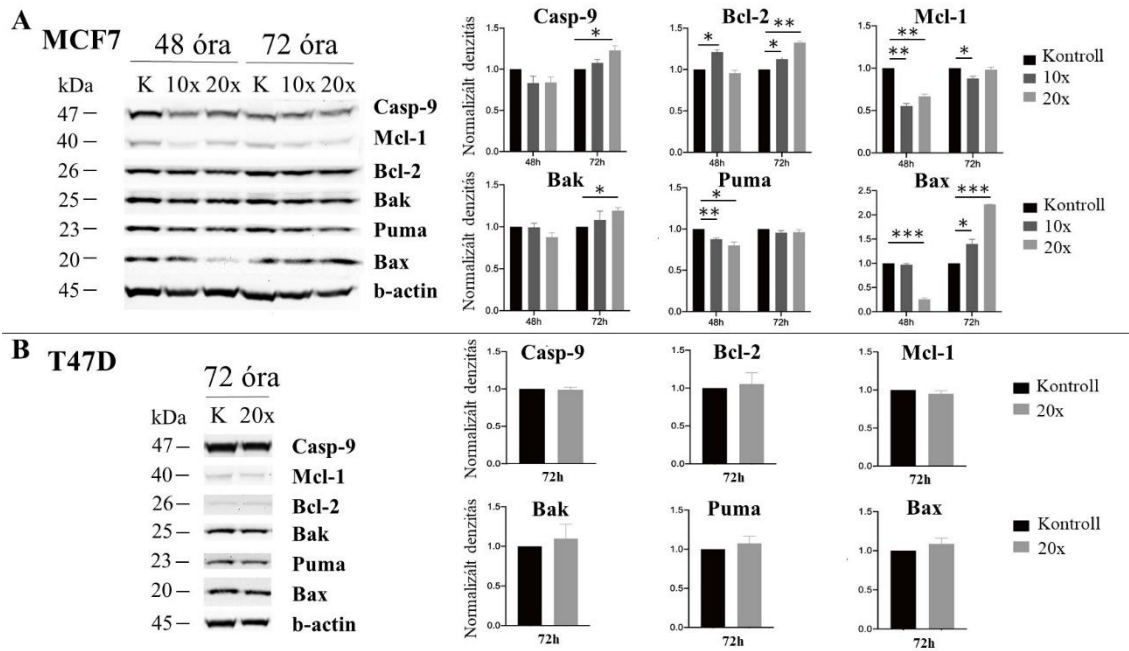


**14. ábra.** Apoptotikus sejtfraekciók flow citometriás detektálása a vizsgált emlő daganatos sejtvonalakban. A korai apoptotikus sejtek (piros négyzettel jelölve) aránya szignifikánsan megemelkedett a 20x-os koncentrációval kezelt T47D sejtvonalban 72 órás kezelés után a kontroll csoporthoz képest (A). Az MCF7 sejtvonal esetében a korai apoptotikus sejtek növekedő tendenciáját figyeltük meg 48 órás kezelés után (B). Minden oszlop a pozitív sejtek átlagos arányát mutatja a korai apoptotikus, késői apoptotikus, nekrotikus és élő sejtfraekciókban. \*\*:  $p < 0,01$ . 10x és 20x: metil-donor koncentrációk.



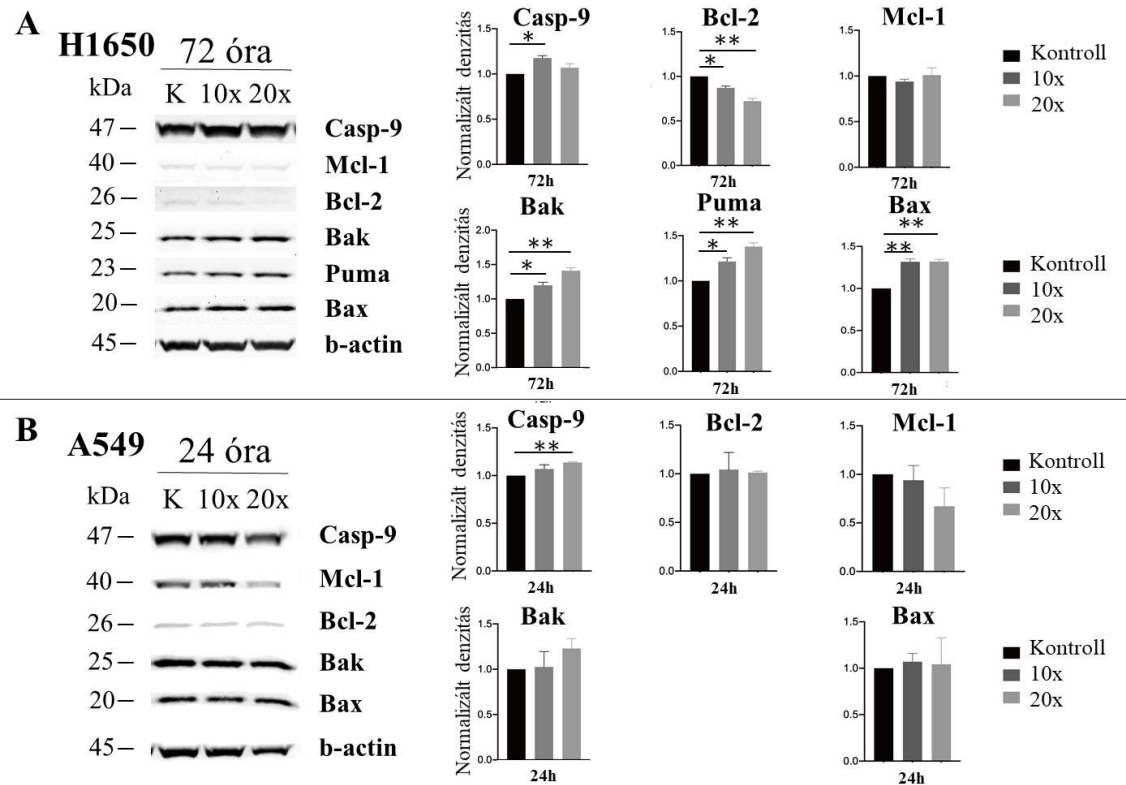
**15. ábra.** Apoptotikus sejtfrakciók flow citometriás detektálása a vizsgált hasnyálmirigy daganatos sejtvonalakban. A korai apoptotikus sejtek (piros négyzettel jelölve) aránya nem mutatott szignifikáns változást a Panc-1 sejtvonalban azonban az élő sejtek aránya szignifikánsan lecsökkent (**A, B**). Minden oszlop a pozitív sejtek átlagos arányát mutatja a korai apoptotikus, késői apoptotikus, nekrotikus és élő sejtfrakciókban. \*\*:  $p < 0,01$ . 1x és 20x: metil-donor koncentrációk.

A pro- és anti-apoptotikus fehérjék szintjeinek metil-donor kezelés hatására bekövetkező változása eltérő koncentrációknál és különböző kezelési időket követően jelentkezett a vizsgált sejtvonalak esetében. 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 (16A ábra). A T47D sejtvonal esetében sem a pro-apoptotikus, sem az anti-apoptotikus fehérjék szintjében nem találtunk változást a metil-donor kezeléseket követően (16B ábra).



**16. ábra.** Apoptotikus fehérjék szintjének változása metil-donor kezelés hatására a vizsgált emlő daganatos sejtvonalakban. A pro-és anti-apoptotikus fehérjék Western blot analízise és statisztikai elemzése (**A**, **B**). A pro-apoptotikus Caspase-9, BAK és BAX fehérjék szintje szignifikánsan megnövekedett az MCF7 sejtekben 72 órás kezelés után, miközben az anti-apoptotikus MCL-1 szintje szignifikánsan lecsökkent. A pro-apoptotikus PUMA és az anti-apoptotikus BCL-2 az elvárttal ellentétes módon változott (**A**). A T47D sejtek esetében szignifikáns változást nem tapasztaltunk (**B**). Minden oszlop az átlagos normalizált denzitást mutatja. \*:  $p < 0,033$ ; \*\*:  $p < 0,002$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ . 10x és 20x: metil-donor koncentrációk.

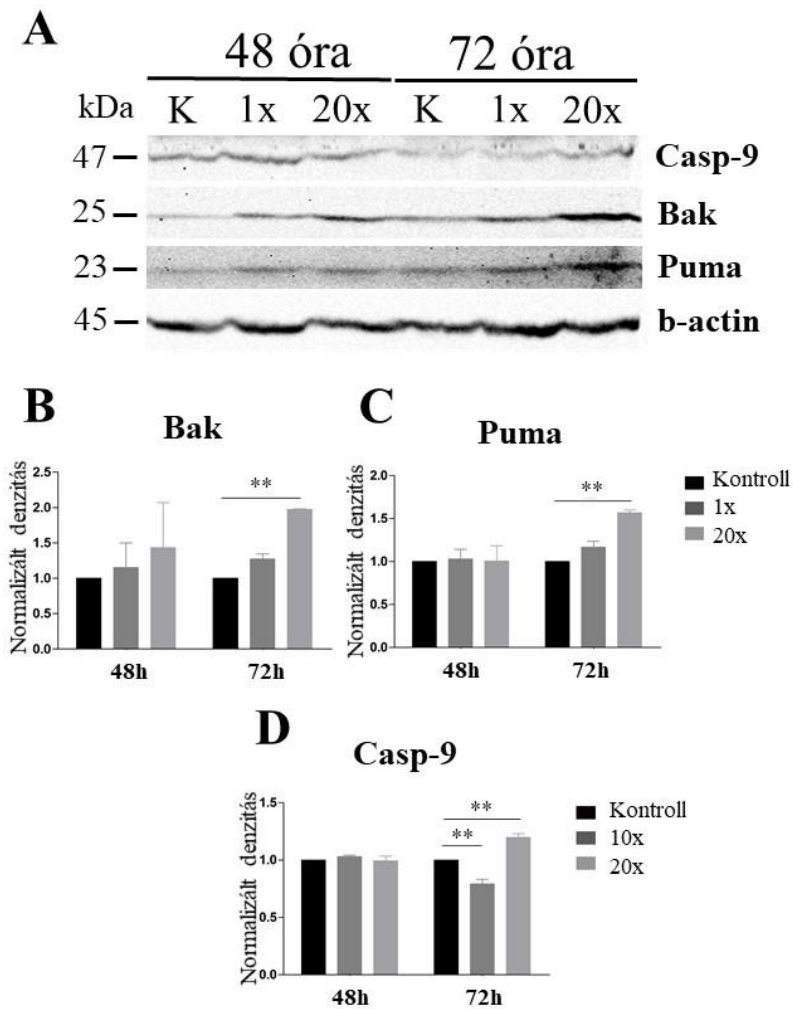
A tüdő tumor sejtvonalak közül a H1650 sejtek esetében szignifikánsan emelkedett pro-apoptotikus fehérje (caspase-9, BAK, BAX, PUMA) szinteket, valamint szignifikánsan csökkent anti-apoptotikus BCL-2 szintet detektáltunk 72 órás kezelés után, ami az összes metil-donor koncentrációnál jelentkezett, kivéve a caspase-9-nél, ahol a növekedést csak a 10x-es metil-donor koncentráció esetében láttuk. Az MCL-1 szintje változatlan maradt (17A ábra).



**17. ábra.** Apoptotikus fehérjék szintjének változása metil-donor kezelés hatására a vizsgált tüdő daganatos sejtvonalakban. A pro-és anti-apoptotikus fehérjék Western blot analízise és statisztikai elemzése (**A**, **B**). A pro-apoptotikus és anti-apoptotikus fehérjék ellentétes irányú változását mutattuk ki mindkét sejtvonal esetében. A H1650 sejtekben mindegyik fehérje szignifikánsan változott a kezelés után, kivéve az MCL-1 (**A**). Az A549 esetében csak a Caspase-9 szint növekedett meg szignifikánsan (**B**). Minden oszlop az átlagos normalizált denzitást mutatja. \*:  $p < 0,033$ ; \*\*:  $p < 0,002$ . 10x és 20x: metil-donor koncentrációk.

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, de emellett erőteljes tendenciát láttunk a BAK fehérje szintjének növekedését ( $p = 0,10$ ) és az MCL-1 fehérje csökkenését ( $p = 0,15$ ) illetően (17B ábra).

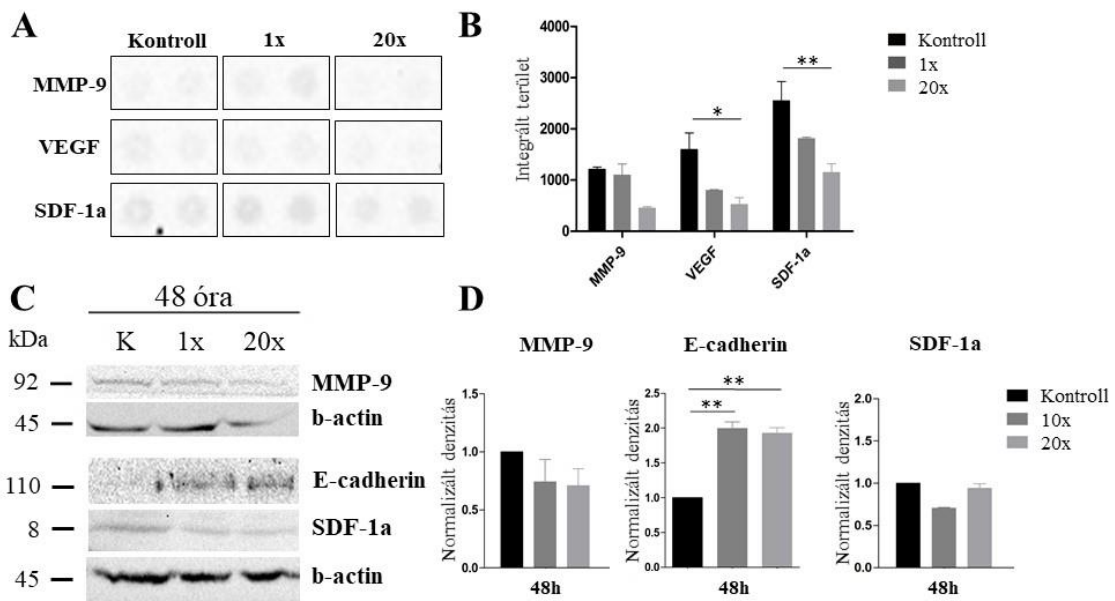
A Panc-1 sejtvonal metil-donor kezelése után csak a pro-apoptotikus fehérjék szintjében történt változás a kontroll csoporthoz képest. A caspase-9, a BAK és a PUMA fehérjék szintje emelkedett meg szignifikánsan a 72 órás 20x-os kezelést követően ( $p < 0,01$ ) (18. ábra).



**18. ábra.** Apoptotikus fehérjék szintjének változása metil-donor kezelés hatására a vizsgált hasnyálmirigy daganatos sejtvonalban. A pro-és anti-apoptotikus fehérjék Western blot analízise (A) és statisztikai elemzése (B-D). A pro-apoptotikus BAK, PUMA és Caspase-9 fehérjék szintje szignifikánsan megnövekedett 72 órás 20x-os kezelés után a kontroll csoporthoz képest (B-D). Minden oszlop az átlagos normalizált denzitást mutatja. \*\*:  $p < 0,01$ . 1x és 20x: metil-donor koncentrációk

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

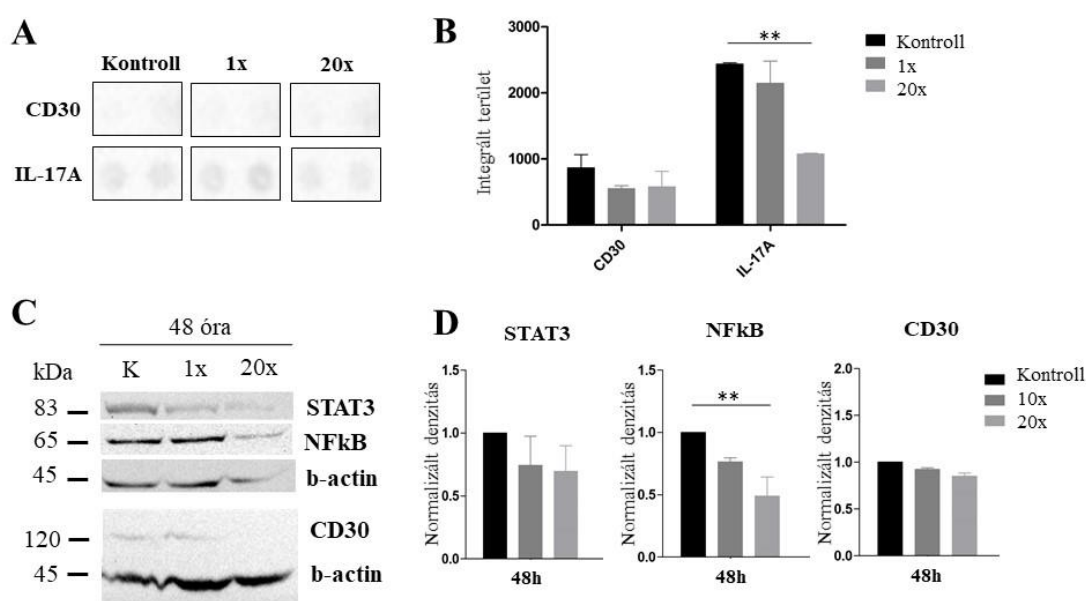
A hasnyálmirigy karcinómák agresszív tulajdonságából adódóan ez a tumor típus jól jellemezhető a korai metasztázisok megjelenésével. Megvizsgáltuk, hogy a metil-donorok meg tudják-e változtatni az áttét képzés folyamatában szerepet játszó egyes fehérjék mennyiségét. Ennek kiderítésére egyrészt Panc-1 sejtek felülűszojából végeztünk citokin array-t, másrészt a sejtekből izolált fehérjéket futtattuk meg Western blottal. 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 (19B ábra). 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 ( $p < 0,01$ ) (19D ábra).



**19. ábra.** Áttétképző tulajdonságot befolyásoló fehérjék szintjének változása metil-donor kezelés után a vizsgált hasnyálmirigy daganatos sejtvonalban. A metasztázis markerek citokin array (A, B) és Western blot (C, D) analízise a hozzájuk tartozó statisztikai elemzésekkel. Citokin array-vel kimutattuk a VEGF és SDF-1a szintek szignifikáns csökkenését (B), valamint az SDF-1a esetében ezt Western blottal is megerősítettük (D). Az E-cadherin szintje szignifikánsan megnövekedett 48 órás 20x-os kezelés után a kontrollhoz képest (D). Minden oszlop az átlagos normalizált denzitást mutatja. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ . 1x és 20x: metil-donor koncentrációk.

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

Mivel a gyulladási folyamatok hozzájárulhatnak a daganatok kialakulásához, ahogy a krónikus hasnyálmirigy gyulladás is hajlamosító tényező lehet a hasnyálmirigy daganatra, megvizsgáltuk, hogy egyes citokinek és gyulladást elősegítő fehérjék szintjét hogyan befolyásolják a metil-donorok. Citokin array-vel kimutattuk, hogy az IL-17 citokin szintje szignifikánsan lecsökkent 48 órás 20x-os koncentrációjú metil-donor kezelés után a kontrollhoz viszonyítva ( $p < 0,01$ ) (20B ábra). Ugyezen koncentráció és kezelési idő mellett, az NFkB fehérje szintjében szintén szignifikáns ( $p < 0,05$ ) csökkenést mutattunk ki Western blottal a kontrollhoz képest. (20D ábra). A CD30 fehérje csökkenését nem tudtuk statisztikai próbával igazolni. Igaz ez a STAT3 fehérjére is, ennél azonban erőteljes csökkenő tendenciát mutat a Western blot eredménye a kontroll csoporthoz képest (20D ábra).



**20. ábra.** Gyulladást befolyásoló fehérjék szintjének változása metil-donor kezelés után a vizsgált hasnyálmirigy daganatos sejtvonalban. A gyulladási markerek citokin array (A, B) és Western blot (C, D) analízise a hozzájuk tartozó statisztikai elemzésekkel. Citokin array-vel kimutattuk az IL-17, valamint Western blottal az NFkB szintjének szignifikáns csökkenését 48 órás 20x-os koncentrációjú kezelés után a kontrollhoz képest (B, D). A CD30 szintjének szignifikáns csökkenését sem a citokine array, sem a Western blot nem igazolta (B, D). Hasonlóan, a STAT3 csökkenése sem mutatott szignifikáns különbséget (D). Minden oszlop az átlagos normalizált denzitást mutatja. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ . 1x és 20x: metil-donor koncentrációk.

#### 4.9 A kérdőíves felmérés eredménye

##### 4.9.1 Leíró adatok összegzése

A kérdőíves felmérés szocioökonómiai adatait a 3. táblázat foglalja össze.

A vizsgálatban összesen 122 beteg vett részt, akik közül az utólagos ellenőrzés során 8 beteget ki kellett zárunk, mert nem a vizsgálatunk tárgyát képező daganat típusal diagnosztizálták őket vagy kizárólag vérmintával rendelkeztek. 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.

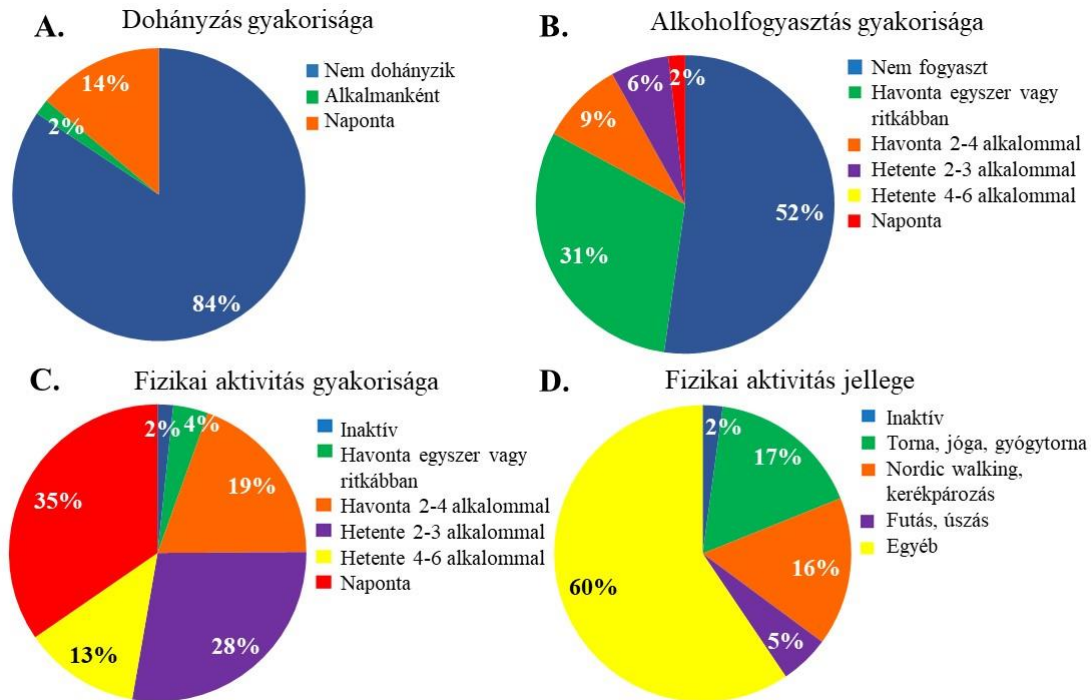


**3. táblázat.** A kérdőíves felmérésben résztvevő beteg populáció szocioökonómiai adatai

<b>Esetszám (n; %)</b>	
emlő	41 (35,96)
kolorektális	37 (32,45)
hasnyálmirigy	36 (31,57)
<b>Nemek eloszlása (n; %)</b>	
nő	83 (73)
férfi	31 (27)
<b>Élekor (év, átlag±szórás)</b>	
emlő	52,95 ± 12,14
kolorektális	58,68 ± 9,23
hasnyálmirigy	60,44 ± 9,29
<b>Iskolai végzettség (n; %)</b>	
posztgraduális vagy doktori	3 (2,68)
főiskolai vagy egyetemi oklevél	46 (41,07)
felsőfokú vagy OKJ	6 (5,36)
gimnázium/érettségi	29 (25,89)
szakmunkásképző/szakiskola	24 (21,43)
általános iskola	4 (3,57)
<b>Családi állapot</b>	
nőtlen/hajadon	14 (12,39)
párkapcsolat	4 (3,54)
élettársi kapcsolat	2 (1,77)
házas	65 (57,52)
elvált	17 (15,04)
özvegy	11 (9,73)
<b>Lakhely</b>	
főváros	39 (34,21)
megyeszékhely	2 (1,75)
megyei jogú város	1 (0,88)
város	50 (43,86)
község	9 (7,89)
falu	13 (11,40)

#### 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 (21A ábra). Közülük a PC csoportban volt a legmagasabb (28%) és a BC csoportban a legalacsonyabb (2%) a naponta dohányzók száma (22A. ábra). A dohányzás szignifikáns negatív korrelációt (Spearman  $r = -0,350$ ;  $p = 0,043$ ,) mutatott az össz-metil-donor bevitellel a PC betegcsoportban.

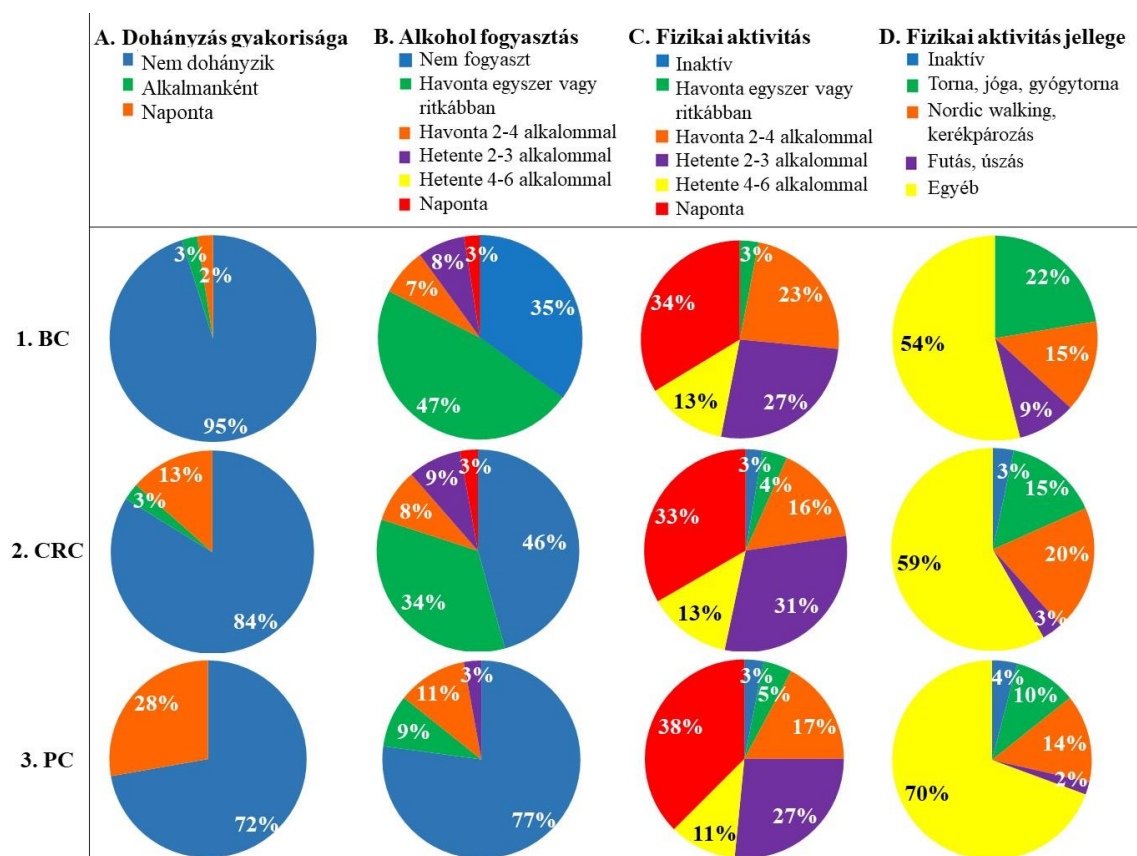


**21. ábra.** Dohányzási és alkoholfogyasztási szokások, és a fizikai aktivitás a vizsgált betegpopulációban. A dohányzás gyakorisága (A), az alkoholfogyasztás gyakorisága (B) és a fizikai aktivitás gyakorisága és típusa (C, D) szerinti eloszlás.

A résztvevő betegek 84%-a nem vagy legfeljebb egyszer egy hónapban fogyaszt alkoholt (21B ábra). 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 (22B ábra).

A kikérdezett betegek közel egy harmadánál tapasztaltuk a napi rendszerességű fizikai aktivitás meglétét és mindössze 2%-uk nem végzett semmilyen típusú mozgásformát (21C ábra). A fizikai aktivitás jellege összességében megközelítőleg azonos volt a három csoportot együtt vizsgálva (21D ábra). 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 (22D ábra).



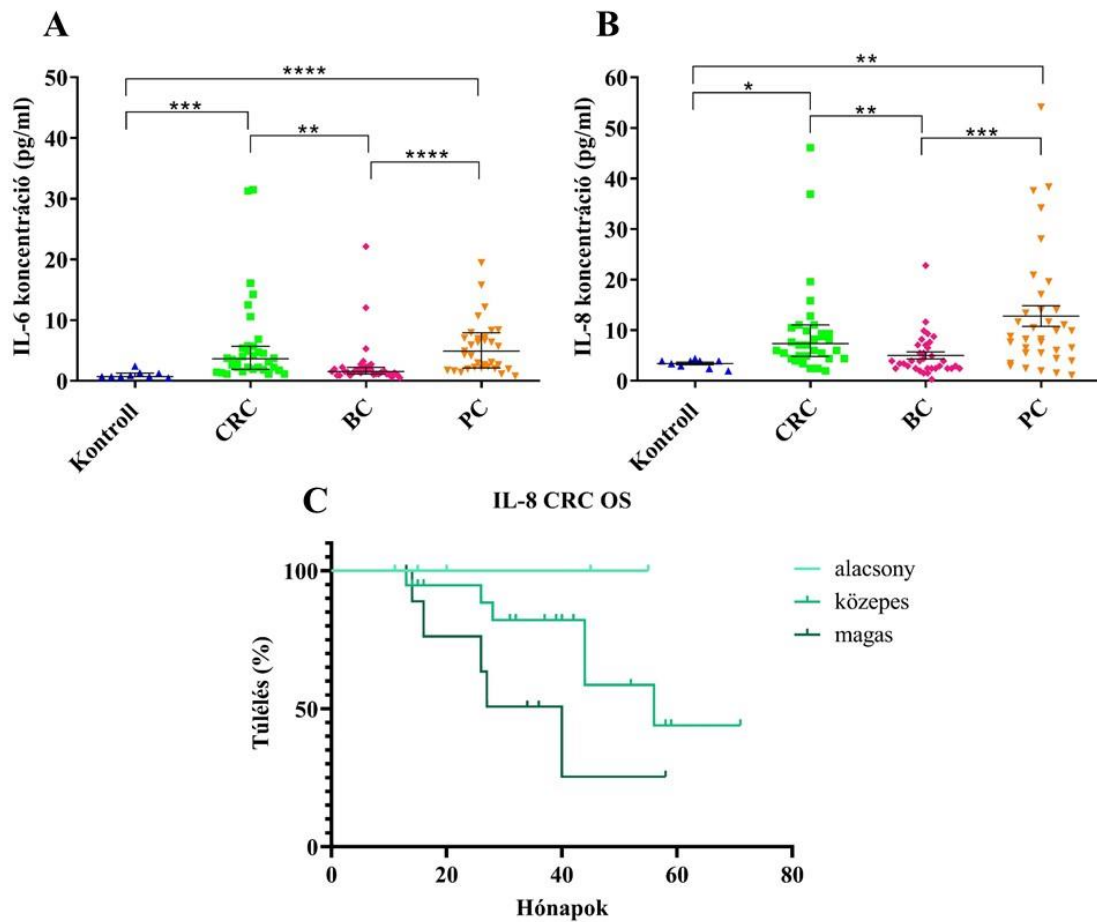
**22. ábra.** Dohányzási és alkoholfogyasztási szokások, és a fizikai aktivitás a vizsgált betegcsoportok szerinti bontásban. A dohányzás gyakorisága, az alkoholfogyasztás és a fizikai aktivitás gyakorisága és típusa szerinti eloszlás az emlő (1. A-D), kolorektális (2. A-D) és hasnyálmirigy (3. A-D) daganatos betegek körében. BC: emlődaganatos betegek, CRC: kolorektális daganatos betegek, PC: hasnyálmirigy daganatos betegek.

## 4.10 A vérplazmában mért IL-6 és IL8 citokinek szintje

A vérminták közül 35 emlő, 34 kolorektális és 35 hasnyálmirigy daganatos mintát elemeztünk, mely során a vérplazmában lévő gyulladáskeltő IL-6 és IL-8 citokinek szintjét mértük meg ELISA módszerrel (4. táblázat). 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. Az emlődaganatos betegek vérplazmájában mért IL-6 és IL-8 citokin szintek alacsonyabbak voltak és ez szignifikáns különbséget mutatott mind a CRC (IL-6:  $p = 0,0013$ , IL-8:  $p = 0,0026$ ), mind a PC (IL-6:  $p < 0,0001$ , IL-8:  $p = 0,0004$ ) csoporthoz képest (23 A, B ábra). Ezen kívül a citokinek túlélésre gyakorolt hatását megvizsgálva azt kaptuk, hogy a kolorektális daganatos betegek esetében az alacsony 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. táblázat. A IL-6 és IL-8 citokinek szintje a vizsgált betegcsoportban

Betegcsoport	Citokin	Citokin plazmaszint (pg / ml)		
		Alacsony	Közepes	Magas
CRC	IL-6	1,138 - 1,343	1,446 - 3,744	4,038 - 31,481
	IL-8	1,987 - 3,925	4,434 - 9,903	10,480 - 120,661
BC	IL-6	0,508 - 1,343	1,446 - 3,250	5,308 - 22,136
	IL-8	0,309 - 3,925	4,434 - 9,903	11,647 - 22,798
PC	IL-6	0,826 - 1,138	1,446 - 3,052	4,137 - 112,118
	IL-8	1,100 - 3,925	4,434 - 9,903	10,480 - 54,105



**23. ábra.** Citokin szintek vizsgálata a betegcsoportok vérplazmájából. Az IL-6 (**A**) és IL-8 (**B**) citokinek szignifikánsan magasabb szintet mutattak a kolorektális és hasnyálmirigy daganatos betegekben a kontroll csoporthoz képest. Ezen kívül szignifikáns különbség van a kolorektális és emlő, valamint a hasnyálmirigy és emlő daganatos betegcsoportok között mért citokin szintekben. A kolorektális daganatos betegek jobb túlélést mutattak alacsony IL-8 szintek mellett (**C**). \*:  $0,01 < p < 0,05$ , \*\*:  $0,001 < p < 0,01$ , \*\*\*  $0,0001 < p < 0,001$ , \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ . BC: emlődaganatos betegek, CRC: kolorektális daganatos betegek, PC: hasnyálmirigy daganatos betegek, OS: overall survival

#### 4.11 A metil-donor bevitel és a túlélés közötti összefüggés

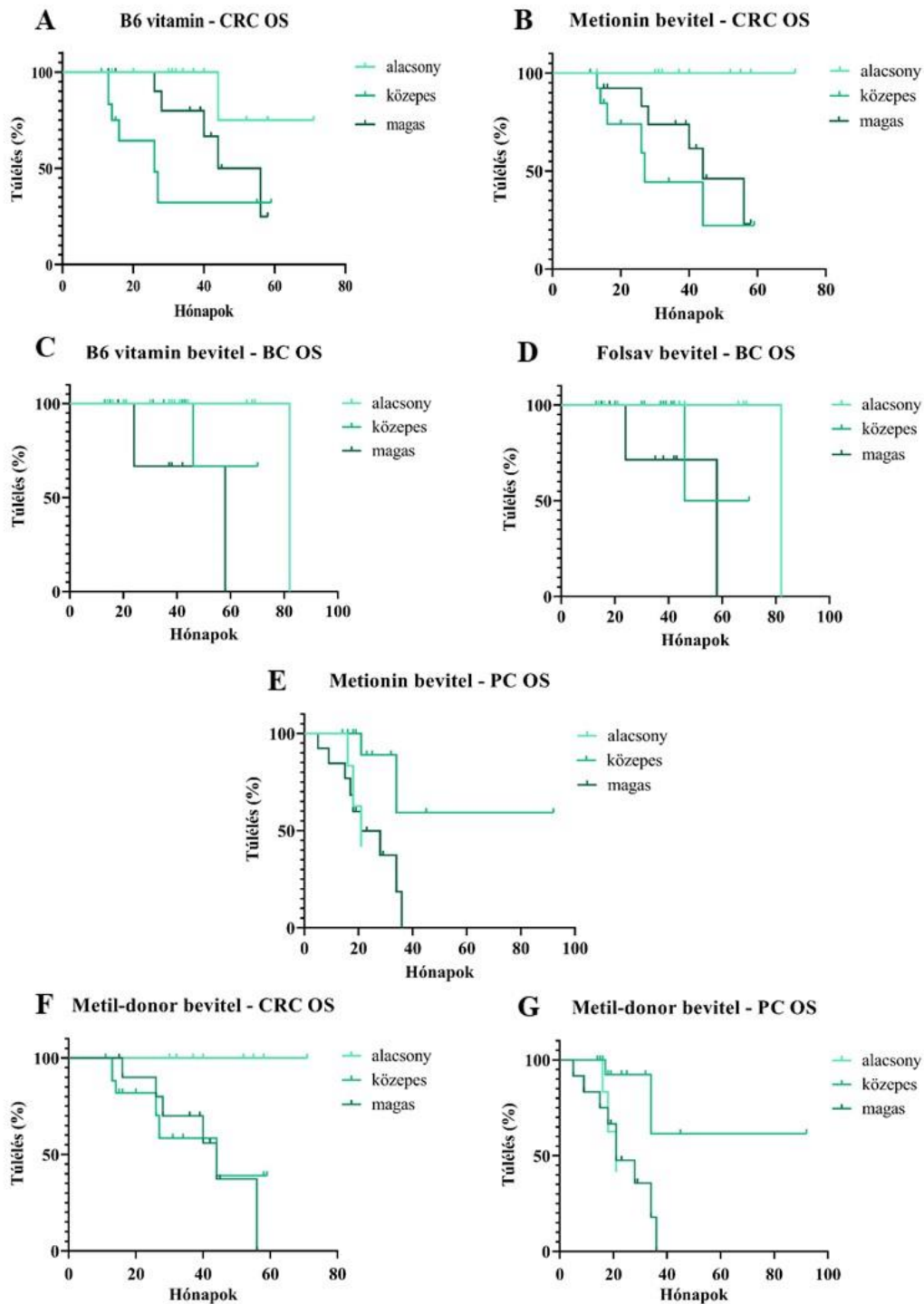
A betegek metil-donor fogyasztási gyakoriságát FFQ segítségével mértük fel és az USDA adatbázisa alapján számoltuk ki a betegek metil-donor bevitelét. Az alacsony, közepes és magas beviteli mennyiségek hatását vizsgáltuk a betegek túlélése (OS) szempontjából (5. táblázat). A vizsgált metil-donorok közül szignifikáns eredményt a metionin, a B6-

vitamin, a folát, valamint az össz-metil-donor (betain, kolin, metionin, folát és B2-, B6-, B12-vitaminok) napi bevitelének tekintetében találtunk.

**5. táblázat.** A metioninra, B6-vitaminra és folátra kiszámolt alacsony, közepes és magas napi beviteli csoportok

Metil-donor típusa és a hozzá tartozó RDA	Napi metil-donor bevétel mennyisége (mg)		
	Alacsony	Közepes	Magas
Metionin (19 mg/kg; 1140 mg / 60 kg)	$\leq 1030,07$	$> 1030,07;$ $\leq 1503,58$	$1503,58 <$
B6-vitamin (1,3 - 2 mg)	$\leq 2,084$	$> 2,084;$ $\leq 2,572$	$2,572 <$
Folát (0,4 mg)	$\leq 0,399$	$> 0,399;$ $\leq$ $0,546$	$0,546 <$
Össz-metil-donor	$\leq 1278,48$	$> 1278,48;$ $\leq 2189,79$	$2189,79 <$

Az alacsony, vagyis RDA körüli metionin ( $\leq 1030,07$  mg), B6-vitamin ( $\leq 2,084$  mg) és össz-metil-donor ( $\leq 1278,48$  mg) bevétel szignifikánsan (az előbbi sorrendben:  $p = 0,014$ ,  $p = 0,017$  és  $p = 0,044$ ) hosszabb túlélést eredményezhet a CRC betegcsoportban (24A, 24B és 24F ábra). Hasonlóképpen, az RDA érték körüli B6-vitamin és folát ( $\leq 0,399$  mg) bevétel hosszabb túlélést mutattak az emlőtumoros betegek körében a közepes és magas beviteli csoportokhoz képest ( $p=0,012$  és  $p = 0,019$ ) (24C és 24D ábra). 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 bevétel mutatott szignifikánsan ( $p = 0,012$  és  $p = 0,015$ ) jobb túlélést (24E és 24G ábra).



**24. ábra.** Metil-donor bevitel hatása az emlő, kolorektális és hasnyálmirigy daganatos betegek túlélésére. A kolorektális daganatos betegek szignifikánsan hosszabb túlélést mutattak alacsonyabb B6-vitamin (A) és metionin (B) bevitel mellett. Hasonlóképpen, az alacsonyabb B6-vitamin és folát bevitel az emlő daganatos betegek jobb túlélését eredményezte (C, D). Hasnyálmirigy daganatos betegeknél a közepes mértékű metionin bevitel szignifikánsan jobb túlélést biztosított (E). Az össz-metil-donor bevitel a kolorektális (F) és a hasnyálmirigy (G) daganatos betegcsoportok szignifikánsan hosszabb túlélését okozta. BC: emlődaganatos betegek, CRC: kolorektális daganatos betegek, PC: hasnyálmirigy daganatos betegek, OS: overall survival.

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  $r = 0,378$ ;  $p = 0,032$  bevitellel).

#### 4.12 Az *MTHFR* C677T polimorfizmus előfordulása a vizsgált betegpopulációban

A vizsgálatunkba bevont betegek közül 87 beteg vérmintáján végeztük el az *MTHFR* gén 677-es pozíciójában előforduló SNP vizsgálatot. A vizsgált betegpopuláció közel fele (47,13%) homozigóta vad típusú (CC) személy volt. Az *MTHFR* enzim aktivitásának csökkenését okozó heterozigóta CT mutáció 49,43 %-ban, míg a homozigóta TT mutáció mindössze 3,44%-ban fordult elő (6. táblázat). Az SNP vizsgálat és a betegek metil-donor bevitele között nem találtunk szignifikáns korrelációt.

**6. táblázat.** Az SNP vizsgálatok eredménye a vizsgált betegpopulációban

<b>Esetszám (n; %)</b>	
összesen	87 (100)
CC	41 (47,13)
CT	43 (49,43)
TT	3 (3,44)
C%	62,5 (71,84)
T%	24,5 (28,16)



## 5. Megbeszélés

A daganatos betegségek előfordulása emelkedik világszerte. A megelőzés nagyon fontos, hiszen a fejlődő gazdaság, az ipari növekedés és az életmód megváltozása egyre több kockázati tényezőt rejt magában. Az öröklött tényezők befolyásolhatók az életmódbeli tényezők epigenetikai hatásai által, melyek a genetikai szabályozást módosítva szerepet játszhatnak a betegségek kialakulásának megelőzésében. A bizonyítékokon alapuló megelőzési irányelvek betartásával, a korai diagnózissal, a megfelelő kezelés és ellátás biztosításával a daganatos betegségek 30-50%-a megelőzhető lenne (3, 4).

A daganatok hagyományos kezelési módjainak (sebészi beavatkozás, kemoterápia, sugárterápia) elsődleges célja a daganatos sejtek elpusztítása és a metasztázisok kialakulásának megakadályozása. A megelőzésben és a kezeléseket kiegészítéseként egyre nagyobb jelentőségű azonban az életmódbeli tényezők közül a táplálkozás, a rendszeres fizikai aktivitás, a mentális egészség fenntartása vagy a megfelelő pszichológiai támogatás (3). A daganatos betegek táplálkozása figyelmet igényel, mert tápláltsági állapotuk nem csak a kezeléseket sikerességét befolyásolhatja, hanem erőnlétük megtartásához, általános jólétük javításához vagy a kezeléseket mellékhatásainak csökkentéséhez is nagyban hozzájárulhat. Ezért szükséges a különböző élelmiszer összetevők hatásának vizsgálata (21, 22, 31, 36).

Azokat a táplálkozással bevihető étrendi összetevőket, melyek koenzimként biztosítják az egy-szén ciklus enzimjeinek működését, metil-donor vegyületeknek nevezzük. Ezek a folát, a betain, a kolin, a metionin, valamint a B2-, B6- és B12-vitaminok (21, 23, 24). A B vitaminok ezen felül részt vesznek az energiatermelő folyamatokban, az oxigén transzportban és az idegrendszeri funkciókban, így hatással lehetnek a kognitív és pszichológiai folyamatokra is (35, 36). Egy átfogó metaanalízis tanulmányban megállapították, hogy a megfelelő folát bevitel csökkentheti az összes halálokból eredő mortalitást és számos krónikus betegség, úgymint a daganatok, a szív-érrendszeri betegségek, a metabolikus eltéréssel összefüggő betegségek, kialakulásának kockázatát (43). Számos tanulmány beszámolt már a táplálkozással bevihető metil-donorok daganatok megelőzésében betöltött szerepéről (44, 49, 50, 152, 153).

## 5.1 A metaanalízis eredményeinek megbeszélése

Munkánk első részében szisztematikus irodalomkutatás és metaanalízis keretén belül felmértük a B2-, B6- és B12-vitamin bevitel és a kolorektális karcinóma (CRC) kialakulás közötti összefüggést, valamint a B2- és B6-vitaminok szerepét az *MTHFR* C677T polimorfizmus hatásának ellensúlyozásában, ezáltal a CRC kialakulás kockázatának csökkentésében (38, 39, 53, 54, 154). A szisztematikus irodalomelemzés és metaanalízis elvégzésére meghatározott protokollok állnak rendelkezésre, azonban az eredmények értékelése tudományterületenként eltérő lehet. A legtöbb esetben Cochrane Q teszt, p értékek és  $I^2$  statisztika használatosak, melyeket alcsoportelemzéssel, heterogenitás és publikációs torzítás számolásával egészítik ki. A heterogenitás értelmezésére általában három csoportot különböztetnek meg az  $I^2$  értéke alapján: 30-60% az alacsony, 50-90% a mérsékelt és 75-100% a jelentős heterogenitást prezentálja. Azonban ez az érték valójában nem alkalmas a heterogenitás mérésére, ezért munkánk során eredményeink értelmezéséhez az előbb említett módszereken felül a  $PI_{95\%}$  (előrejezési értéktartomány) értéket is használtuk a heterogenitás mutatójaként Michael Borenstein “Common mistakes in Meta-analysis and how to avoid them” című könyve alapján (155).

Metaanalízisünk alapján azt találtuk, hogy a cikkekben meghatározott B2- és B6-vitamin beviteli értékek közül a magasabb vitamin bevitel csökkentheti a CRC kialakulásának kockázatát. A cikkekben közölt legmagasabb kvartilisekhez tartozó beviteli mennyiségek átlagát figyelembe véve ez azt jelentette, hogy B2-vitamin esetében 6,535 mg, B6-vitamin esetében pedig 3,101 mg napi bevittel érhető el ezen vitaminok kockázatcsökkentő tulajdonsága. Az összhatás meghatározására a kombinált hatásnagyság (CES) értéket használtuk a hozzá tartozó  $CI_{95\%}$  értékekkel. Általánosságban elmondható, hogy ha egy meta-analízisben az összhatás nagysága 1 feletti érték, akkor az megnövekedett kockázatot jelöl, ha 1 alatti érték, akkor az a kockázat csökkenését jelzi. Analízisünk eredményeként a B2-vitaminra kapott CES érték 0,9, a B6-vitaminé pedig 0,8 volt, ami azt mutatja, hogy ezek a vitaminok csökkenthetik a CRC kialakulásának kockázatát. A heterogenitás értékelésére általában, de nem helyesen, az  $I^2$  és hozzá tartozó p értékeket használják. Az  $I^2$  valójában egy arányszám, mely azt mutatja meg, hogy a vizsgálatokban megfigyelt hatások varianciájának mekkora hányada tükrözi a valóságban ténylegesen meglévő hatások változását, a valódi hatásméretet, tehát nem ad igazán választ a

heterogenitásra. A heterogenitásnak arra kell választ adni, hogy mennyire változik a valódi hatásméret a különböző vizsgálatokban. Ezért használtuk az előrejelzési értéktartomány (PI) mérési módszerét, mely jobban képes leírni, hogy mennyire változik a valódi hatásméret a vizsgálatok során. Vizsgálatunkban a B2-vitamin PI95% értéke 0,83 - 0,97 közötti, a B6-vitaminé pedig 0,64 – 0,96 közötti volt, melyekből látszik, hogy a valódi hatásnagyság ezzel a számolással is 1 alatti. Mivel ezek az értékek szűk intervallumokat jelölnek, megállapíthattuk, hogy heterogenitás nem tapasztalható a tanulmányok között.

A B12-vitaminokat tárgyaló kohorsz tanulmányok esélyhányadosai arra engedtek következtetni, hogy a magasabb (átlagosan napi 10,254 µg) B12-vitamin bevitel megemelheti a CRC kialakulásának kockázatát bizonyos populációkban. Az esélyhányadosok megfelelő statisztikai módszerekkel történő megvizsgálása után, majd ennek eredményeként Ishihara és munkatársai (156) eredményeinek kizárását követően is, az analízisbe bevont vizsgálatok eredményei között jelentős eltérést, heterogenitást találtunk. Az így kapott eredmény tehát ismét azt támasztotta alá, hogy a B12-vitamin bevitel növelheti a CRC kockázatát bizonyos populációkban. Ennek okát megvizsgálva azt találtuk, hogy Ishihara és munkatársai, illetve további tanulmányok is pozitív összefüggést találtak a magasabb B12-vitamin bevitel, a magasabb alkoholfogyasztás, valamint a gyakoribb dohányzás között (157, 158). Ishihara és munkatársai annak lehetőségét vetették fel cikkükben, hogy a dohányzási és alkohol fogyasztási szokások korrekcióját követően, ezek hatása még megjelenhetett az ő eredményekben is. Erre alapozva eredményük valószínűleg inkább a dohányzás és az alkoholfogyasztás CRC kockázatonövelő hatását mutathatja, ami egy jól ismert pozitív összefüggés, és nem a B12-vitamin étrendi bevitelének hatását (156). Mindezekből arra következtethetünk, hogy a táplálkozással bevitt B12-vitamin CRC kialakulásra gyakorolt hatásának vizsgálatakor figyelembe kell venni a dohányzási és alkoholfogyasztási szokásokat, valamint az egyéb emésztőrendszeri betegségeket, mert ezek a tényezők torzíthatják a vizsgálati eredményeket (159).

Az egy-szén ciklusban részt vevő enzimek genetikai eltérései is befolyásolhatják a ciklus normális működését. Ezek közül az egyik legismertebb az MTHFR enzimet kódoló gén 677-es pozícióját érintő (*MTHFR* C677T) egy pontos nukleotid polimorfizmus (SNP). A gén homozigóta (TT) mutációja csökkent enzimaktivitást eredményez. Az *MTHFR*

mutáció megakadályozza a me-THF m-THF-á való átalakulását és ezzel gátolja a metilációs folyamatokat (37-39). Az egy-szén ciklus érzékeny az étrendből származó B vitamin bevitelre is. Hiányuk a sejtekben található SAM szintjét csökkentheti vagy a SAH felhalmozódásához vezethet, melyek a metilációs kapacitás károsodását okozhatják, megnövelve a daganatok kialakulásának esélyét. A B6-vitamin hiánya megemelheti a vér homocisztein szintjét (33), a nem megfelelő B2-vitamin ellátottság pedig ronthatja az MTHFR aktivitást, és ez az egy-szén ciklus gátlását is okozhatja (34). Eredményeink megerősítették, hogy a megfelelő B2- és B6-vitamin bevitel ellensúlyozhatja a csökkent MTHFR enzimaktivitást homozigóta TT genotípusú, CRC-vel diagnosztizált betegekben. A megfelelő B2-vitamin bevitel jótékony hatását emlő és méhnyak daganatokban is leírták, kiemelve lehetséges daganatmegelőző szerepét (160-162). Publikációs torzítást nem tapasztaltunk ezekben az elemzéseinkben. A B12-vitamin MTHFR aktivitásra gyakorolt hatását nem vizsgáltuk a korábban leírtakat figyelembevéve. Továbbá, a B2- és B6-vitamin bevitelt az előző vizsgálattal ellentétben itt együtt kezeltük, mivel mindkét vitamin ugyanúgy az MTHFR enzim által szabályozott folát ciklusban játszik szerepet.

## 5.2 Az *in vitro* vizsgálatok eredményeinek megbeszélése

Kutatásunk következő szakaszában megvizsgáltuk, hogy a metil-donor kezelések miként befolyásolhatják a daganatos sejtek növekedését, milyen jelátviteli útvonalakra lehetnek hatással, hogyan befolyásolhatják a gyulladáshoz kapcsolódó markereket és az áttétképződéshez kapcsolódó fehérjék szintjét.

Ehhez emlő (MCF7, T47D), tüdő (A549, H1650) és hasnyálmirigy (Panc-1) tumor sejtvonalakat kezeltünk metil-donorok (L-metionin, kolin-klorid, folát és B12-vitamin) keverékével. *In vitro* eredményeinkkel alá tudtuk támasztani kezdeti hipotéziseinket, melyek szerint a metil-donor kezelés hatására csökkenhet a tumor sejtek proliferációja, valamint olyan útvonalakat aktiválhat, melyek a tumor sejtek programozott sejthalálához vezethetnek. Mivel a metil-donor kezelés hatással volt az általunk vizsgált összes tumor sejtvonal proliferációjára, ezért a továbbiakban olyan két növekedési útvonalat vizsgáltunk meg, a MAPK/ERK és PI3K/AKT útvonalakat, melyek gyakran érintettek daganatképződés során (163).

Ismert, hogy a caspase-9 a MAPK/ERK útvonal által foszforilálódik, vagyis inaktiválódik, ami az apoptózis gátlását okozhatja (164). A kezelés hatására szignifikánsan emelkedett caspase-9 szinteket és szignifikánsan lecsökkent p-ERK1/2 fehérje szinteket mértünk, ami a MAPK/ERK jelátvitel gátlódását jelezheti és alátámasztja az intrinsic útvonal által kiváltott apoptózis indukálását. Az MCF7, a T47D és az A549 sejtvonalak esetében mindezt a szignifikánsan lecsökkent AKT szintek is alátámasztották. A PI3K/AKT jelátviteli útvonal gyakran túlműködik emlődaganatokban és áttétképződéshez, kemorezisztenciához és rosszabb prognózishoz vezethet (165). Bár az MCF7 és a H1650 sejtekben megemelkedett az AKT szintje a metil-donor kezelést követően, mégsem járt együtt proliferáció növekedéssel. Utóbbi valószínűleg a lecsökkent p-ERK1/2 kompenzáló hatásának volt köszönhető, mivel az ERK1/2 bizonyos szintű aktivitása szükséges a proliferációs útvonal megfelelő működéséhez (66). Park és munkatársai metil-donor kezelést követően a fentiekhez hasonló eredményeket közöltek az előbb említett emlő tumor sejtvonalak esetében (62).

A szakirodalomban jól ismert, hogy a MAPK/ERK jelátviteli útvonal aktiválódása szükséges a sejtciklusba való belépést támogató gének indukálásához, illetve azon génekéhez is, melyek ezt a folyamatot elnyomják, mint például a p21<sup>WAF1/Cip1</sup> (166). Továbbá az is, hogy hasnyálmirigy daganat esetében a p21<sup>WAF1/Cip1</sup> expresszió fordítottan arányos a tumor differenciációval, a klinikai stádiummal és a nyirokcsomó áttétek jelenlétével (167). A Panc-1 tumor sejtek metil-donor kezelése után a p-ERK1/2 szintjének csökkenése mellett szignifikánsan megnövekedett p21<sup>WAF1/Cip1</sup> ciklin-függő kináz inhibitor fehérje szintet is találtunk. A p21<sup>WAF1/Cip1</sup> a sejtciklus G1 fázisának p53-függő gátlásában játszik szerepet. Mivel a Panc-1 sejtekben a TP53 gén mutált, a p21<sup>WAF1/Cip1</sup> fehérje felülregulációja az ismert p53-független útvonalak révén valósulhatott meg (168). Ezek alapján feltételezzük, hogy a metil-donor kezelés hatására lecsökkent p-ERK1/2 expresszió és a p53-független útvonalak hatásának köszönhetően megnövekedett p21<sup>WAF1/Cip1</sup> szintje okozhatta a szignifikáns proliferáció csökkenést ebben a sejtvonalban.

A sejtciklust érintő változásokat, kiváltképp az apoptotikus sejteket is magába foglaló subG1 fázis változását vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a sejtciklus ezen fázisában lévő sejtek aránya szignifikánsan megemelkedett az emlő és hasnyálmirigy tumor sejtvonalak

metil-donor kezelése után, azonban a tüdő tumor sejtvonalaknál csak ilyen irányú tendenciát, de nem szignifikáns változást láttunk. A metil-donor kezelés hatására bekövetkező apoptózist igazolta a szignifikánsan megnövekedett korai apoptotikus sejtek aránya a T47D, A549 és H1650 sejtvonalak esetében. Ezért megvizsgáltuk a pro- és antiapoptotikus fehérjék szintjét metil-donor kezelést követően.

Igazoltuk, hogy a kezelés hatására megnövekedett a mitokondriális membrán permeabilizációjában szerepet játszó pro-apoptotikus BAK és BAX fehérjék expressziója. Továbbá szignifikánsan emelkedett caspase-9 szinteket mértünk a kezelt csoportokban (kivéve T47D-nél), amely a mitokondriális membrán károsodásának hatására aktiválódik az apoptoszómákban, citokróm c felszabadulást követően (164, 169). Az anti-apoptotikus MCL-1 fehérje szintjeiben csökkenést tapasztaltunk a tumor sejtvonalakban, ami szintén az apoptotikus útvonal aktivációját erősíti meg, hiszen az MCL-1 képes a BAK és BAX aktivitás által kiváltott mitokondriális membrán károsodást kivédeni (170-172). A másik általunk vizsgált anti-apoptotikus fehérje, a BCL-2 szignifikánsan emelkedett szintjét mértük metil-donor kezelés után az MCF7 tumor sejtekben, ami gátolhatja a PUMA fehérjét, ezáltal közvetítve az apoptózissal szembeni rezisztanciát (173). Ezzel összhangban a PUMA szintjének szignifikáns csökkenését tapasztaltuk az MCF7 tumor sejtek kezelését követően. Ezzel ellentétesen a BCL-2 fehérje szignifikáns csökkenését tudtuk kimutatni a H1650 tumor sejtek esetében, ahol egyúttal a pro-apoptotikus PUMA fehérje szintjének szignifikáns emelkedését is megfigyeltük. A Panc-1 tumor sejtvonala metil-donor kezelése után is megnövekedett PUMA szintet mértünk. Annak ellenére, hogy a T47D sejtekben nem tapasztaltuk ezeknek a fehérjéknek a szignifikáns változását, a korai apoptotikus sejtek jelenlétéből és a SubG1 fázis megnövekedéséből következtethettünk a metil-donorok által kiváltott apoptózis jelenlétére.

A p53 egy citoplazmában elhelyezkedő tumorszuppresszor fehérje. DNS károsodás hatására a sejtmagba transzlokálódik, és sejtciklus gátlást és apoptózist indukál. A p53 Ser15-ös és Thr55-ös aminosavakon történő foszforilációja jelentős szereppel bír a fehérje sejtmag és citoplazma közötti elhelyezkedésében (174). A Thr55 foszforilációja a citoplazmában tartja a p53 fehérjét. A p-p53 (Thr55) keletkezésének gátlása a p-p53

(Thr55) szint csökkenését eredményezi és lehetővé teszi a p53 sejtmagba való transzlokációját, továbbá a p53-függő útvonalak aktiválódását DNS károsodás hatására. A sejt ezáltal érzékenyebbé válik a DNS károsodással szemben (175, 176), ami a p53 Ser15-ös aminosav foszforilációját eredményezi (177, 178). Ebből következően a metil-donorokkal kezelt emlő és tüdő tumor sejtekben lecsökkent p-p53 (Thr55) szint magyarázhatja a p53 helyreállított működését, ami ezáltal előidézheti a downstream elhelyezkedő pro-apoptotikus szignálútvonalak aktivációját. Zhu és munkatársai kimutatták, hogy a kurkumin és az E vitamin csökkentheti a p53 foszforilációját a Ser15-ön, ami a kemoterápiás szerek által okozott citotoxicitás ellen nyújtott védelmet normál tüdő epithel sejtekben (179). Az általunk vizsgált metil-donorok ennek megfelelően a normál sejtfunkciók támogatását eredményezhetik, illetve a tumor sejteket érzékenyíthetik a különböző kezelésekkel szemben. Mivel a vizsgálatunkban nem használtunk DNS károsító szereket, nem vártunk megnövekedett p-p53 (Ser15) szinteket sem. A kapott eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a metil-donor kezelés helyreállíthatja a p53 sejtmagi elhelyezkedését, miközben apoptózist indukálhat a tumor sejtekben.

A gyulladásszerű állapotok számos betegség kialakulásának okozói lehetnek, beleértve a daganatokat is. A krónikus hasnyálmirigy gyulladás hajlamosító tényező lehet hasnyálmirigy daganatra (180). Az NFkB fehérjének fontos szerepe van a gyulladást elősegítő immunválasz aktivációjában, hozzájárulva az áttétképződéshez és a kemorezisztencia kialakulásához (181). Az NFkB a hasnyálmirigy daganatok kb. 70%-ában aktivált formában van jelen (69). A Panc-1 tumor sejteken elvégzett metil-donor kezelés szignifikánsan csökkentette az NFkB és az IL-17a citokin szinteket, ami arra utalhat, hogy a megfelelő metil-donor bevitel hatékony lehet a hasnyálmirigy daganatos betegek gyulladásszerű folyamatainak befolyásolására. Habár a STAT3 fehérje szintjének csökkenését statisztikailag nem tudtuk igazolni Panc-1 sejtekben, a metil-donor kezelés hatására bekövetkező csökkenő tendenciája összhangban van az NFkB csökkenésével. Ezzel az eredményünkkel párhuzamban, a hasnyálmirigy daganatos betegeknél mért szignifikánsan magasabb IL-6 és IL-8 citokin szintek megerősítik az aktivált NFkB útvonal jelenlétét. Összességében feltételezhetjük, hogy a hasnyálmirigy daganatos betegeknél mérhető emelkedett citokin szintek az IL-17/NFkB/STAT3 jelátvitelen

keresztül valósulhatnak meg és ez a jelátviteli aktivitás csökkenthető metil-donor bevitellel, így enyhítve a gyulladás mértékét. Az NFkB és a STAT3 jelátvitel számos ponton kapcsolódik egymáshoz és nem csak a gyulladásos folyamatokban játszanak szerepet, így például befolyásolhatják az apoptózist és a sejtciklust is (75).

A hasnyálmirigy daganatok jelentős áttétképző potenciállal rendelkeznek, ezért megvizsgáltuk, hogy a metil-donor kezelés befolyásolhatja-e ezeket a folyamatokat jellemző sajátságokat. Az SDF-1 fehérje hasnyálmirigy sejtek migrációjában és érképződésében betöltött szerepét már korábban leírták (182), valamint az is ismert, hogy megemelkedett szintje rosszabb prognózissal jár (183). Ezen kívül az SDF-1 az NFkB útvonalat befolyásolva megvédi a tumor sejteket a gyógyszerek által indukált apoptózistól és befolyásolja a tumor sejtek közötti kapcsolódást (184). A vizsgálataink során mért szignifikánsan csökkent SDF-1a és VEGF expresszió, valamint a megnövekedett E-cadherin szint alapján elmondhatjuk, hogy a metil-donorok gyengítették a Panc-1 sejtek áttétképző tulajdonságait és elősegítették a normál sejtekhez hasonló fenotípus helyreállítását.

### 5.3 A humán vizsgálatok eredményeinek megbeszélése

A metil-donorok daganatokra gyakorolt pozitív hatását nem csak *in vitro* körülmények között vizsgáltuk, hanem szeretnénk volna megvizsgálni a klinikai gyakorlatban betöltött hasznosságukat is. Ennek kiderítésére kérdőíves felmérést végeztünk emlő, kolorektális és hasnyálmirigy daganattal diagnosztizált betegek körében, ami szocioökonómiai és életmódbeli tényezőkkel, valamint metil-donor fogyasztással kapcsolatos kérdéseket tartalmazott. Megvizsgáltuk, hogy a metil-donorok napi bevitele külön-külön és együtt, milyen hatással voltak a betegek túlélésére. Ezen kívül a betegek vérmintáiból gyulladásos folyamatokra jellemző citokinek és az *MTHFR* gén SNP vizsgálatát is elvégeztük.

A szocioökonómiai tényezők hatással lehetnek egyes betegségek előfordulására. Az új daganatos esetek körülbelül fele, míg a daganatok okozta halálozás több, mint fele a kevésbé fejlett országokban fordul elő (185). A különböző daganat típusok előfordulása



összefügghet a szociális helyzettel is. Egy tanulmányban kimutatták, hogy a jobb szociális helyzetben élők között gyakrabban fordultak elő vastagbél, emlő, petefészek és bőrdaganatok (186). Kérdőíves vizsgálatunkból kiderült, hogy a vizsgálatba bevont betegek 85 %-a városban él, körülbelül felének a legmagasabb iskolai végzettsége valamilyen felsőfokú végzettség volt, valamint, hogy több, mint 60 %-uk házasságban vagy párkapcsolatban él.

A dohányzás és a rendszeres alkohol fogyasztás nem volt jellemző a betegek körében, átlagosan 80 %-uk kerülte ezen termékek használatát. A naponta dohányzók aránya a hasnyálmirigy tumoros betegcsoportban volt a legmagasabb (28%) és a dohányzás szignifikáns negatív korrelációt mutatott az össz-metil-donor bevitellel ebben a csoportban. A fizikai aktivitás különböző mértékben volt jellemző a betegek körében. A kérdőívben meghatározott mozgásformákon kívül a betegek nagy arányban végeztek olyan mindennapos tevékenységeket, melyekkel elősegíthetik fizikális állapotuk, aktív életformájuk megtartását (például séta, házi munka, kertészkedés, kirándulás).

Az FFQ módszerrel történő kikérdezés eredményeként azt találtuk, hogy a vizsgált metil-donorok közül a metionin, a folát és a B6-vitamin szignifikánsan befolyásolhatják a daganatos betegek túlélését, abban az esetben, ha a napi bevétel nem haladta meg az ajánlott napi beviteli értéket (RDA). Ez az érték metionin esetében 19 mg/kg (1140 mg / 60 kg), folát esetében 0,4 mg és B6-vitaminnál 1,3 - 2 mg. Vizsgálatunkra vonatkozóan ez azt jelentette, hogy azoknál a kolorektális daganatos betegeknél tapasztalhattunk hosszabb túlélést, akiknek a napi metionin bevétele (60 kg testsúlyra számolva) nem volt több, mint 1030,07 mg és a napi B6-vitamin bevétele 2,084 mg alatti volt. Az emlőtumoros betegeknél abban a csoportban mérhettünk jobb túlélést, amelyben a betegek napi folát bevétele 0,399 mg alatti és napi B6-vitamin bevétele 2,084 mg alatti volt. A hasnyálmirigy daganatos betegek esetében szignifikánsan jobb túlélést a közepes mennyiségű, tehát 1030,07 mg-nál nagyobb, de 1503,58 mg-ot nem meghaladó napi metionin bevétel mutatott. A metil-donorok együttes hatásának vizsgálata azt mutatta, hogy az 1278,48 mg vagy annál kevesebb napi össz-metil-donor bevétel eredményezhet hosszabb túlélést a CRC csoportban. A PC csoportban, ebben az esetben is a közepes (1278,48 mg-nál nagyobb, de 2189,79 mg-ot nem meghaladó) mennyiségű napi össz-metil-donor bevétel növelheti leginkább a túlélést.

*In vitro* tanulmányainkban szintén az RDA értékeket meg nem haladó metil-donor koncentrációk bizonyultak hatásosnak emlő, tüdő és hasnyálmirigy daganatos sejtek életképességének csökkentésében (152, 153), melyek megerősítik a túlélési vizsgálataink eredményeit. Mindezek mellett az egyes tápanyagok hasznosulását, így a metil-donorokét is, nehéz meghatározni, mert nem állnak rendelkezésre megfelelő információk az RDA értékek hasznosulásáról úgy, mint például egy-egy gyógyszer-hatástanulmány esetében. Másrészt a táplálkozással bevihető makro- és mikrotápanyagok hasznosulását több tényező is befolyásolhatja. Ilyen például, hogy a B vitaminok nem csak a táplálékból, hanem a bélben található baktériumok által is termelődnek, de a táplálék kiegészítők általi szuplementáció is ide sorolható, vagy az egyes betegségek, amelyek befolyásolják a tápanyagok felszívódását. A PC csoportban megfigyelt magasabb metil-donor bevitel szükségessége magyarázható egyrészt a hasnyálmirigy daganatok etiológiájával, másrészt azzal, hogy a gyulladásos állapotok csökkenthetik a tápanyagok felszívódását és hasznosulását, ami ezáltal magasabb bevitt igényelhet a szervezet megfelelő működéséhez, így a hosszabb túléléshez is.

A hosszan tartó krónikus gyulladás a daganatok kialakulásának egyik kiinduló tényezője lehet, amelyet az NFκB út vonal aktivációja okoz, ahogy a hasnyálmirigy daganatok esetében is leírták (181). Az IL-8 citokinnek szerepe lehet az epitheliális-mezenchimális tranzícióban humán karcinóma sejtekben (187), valamint a MAPK/ERK jelátviteli út vonal aktiválásával elősegíti a tüdő és kolorektális tumor sejtek proliferációját és áttétképzését (188, 189). A kolorektális daganatos betegekben emelkedett az IL-6 citokin szintje, ami rosszabb túlélést eredményez. Ennek háttérében az IL-6 általi sejtproliferáció növekedés és az apoptózis gátlása áll (190). Hasonlóan emelkedett IL-6 szintet mértek hasnyálmirigy daganatos betegek vérplazmájában is, amihez rosszabb prognózis és túlélés társult (191). Ezekkel az eredményekkel egybehangzóan a kolorektális és hasnyálmirigy daganatos betegek vérplazmája szignifikánsan magasabb IL-6 és IL-8 szinteket mutatott. A kolorektális betegcsoportban pozitív összefüggést találtunk az IL-6 és IL-8 szintek között, valamint a betain és folát bevitel és az IL-8 citokin szint pozitív korrelációját is kimutattuk. Ez arra enged következtetni, hogy a megfelelő betain és folát bevitel csökkentheti a daganatok képződését elősegítő gyulladásos környezet kialakulását. Továbbá, ezzel egybehangzó az az eredményünk, miszerint az alacsonyabb IL-8 szinthez szignifikánsan jobb túlélés társulhat ezen betegcsoportban.

Az egy-szén ciklusban részt vevő enzimeket érintő leggyakoribb genetikai eltérés az MTHFR enzimet kódoló gén 677-es pozícióját érintő polimorfizmus. A gén mutációi csökkent enzimaktivitást eredményeznek, ami a folát ciklus zavarát, és ezáltal a metilációs folyamatok gátlását okozza (192). Az általunk vizsgált betegpopuláció *MTHFR* C677T SNP analízise nem mutatott korrelációt a metil-donor bevitellel, így feltételezzük, hogy a metil-donorok túlélésre gyakorolt hatása a bevitt mennyiségekkel függ össze, azt a genetikai variabilitás nem befolyásolta.

## 6. 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 p21<sup>WAF1/Cip1</sup> 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 bevitele jobb túléléssel járhat 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 bevételhez (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 NFκB útvonal jelenlétét. Továbbá, mivel az találtuk, hogy a Panc-1 tumor sejtek metil-donor kezelése csökkentheti az NFκB és az IL-17a citokinek szintjét, ezért

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

## 7. Összefoglalás

A daganatok megelőzésében egyre nagyobb szerepet tulajdonítanak az életmódbeli tényezőknek. A táplálkozással bevitelű metil-donorok daganat megelőző és kockázat csökkentő hatását széles körben vizsgálták már.

Szisztematikus irodalomgyűjtéssel és metaanalízissel megállapítottuk, hogy a megfelelő mennyiségű B2- és B6-vitamin bevitel csökkentheti a CRC kialakulásának kockázatát, valamint kompenzálhatja a lecsökkent MTHFR enzimaktivitást, ami szintén kockázati tényező lehet e betegség kialakulásában.

*In vitro* kísérletekkel igazoltuk, hogy a metil-donor kezelés szignifikánsan csökkentheti az emlő, tüdő és hasnyálmirigy tumor sejtek proliferációját a MAPK/ERK jelátvitel csökkentésén keresztül, amihez a pro-apoptotikus caspase-9, BAK, BAX és PUMA fehérjék szintjének emelkedése és az anti-apoptotikus MCL-1 és BCL-2 fehérjék csökkenése társult. A metil-donor kezelés által csökkent AKT szinteket mértünk, ami apoptózis jelenlétét támaszthatja alá. A sejtciklus szignifikánsan emelkedett subG1 fázisa és a korai apoptotikus sejtek megnövekedett aránya szintén apoptózis indukálására utalnak. 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 kezelés hatására csökkent az IL-17 és NFkB szintje a Panc-1 tumor sejtekben. Szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a VEGF és SDF-1a szintekben is, valamint megnövekedett az E-cadherin expressziója.

A daganatos betegek körében végzett vizsgálataink azt mutatták, hogy az RDA érték körüli metionin, B6-vitamin és folát bevitel szignifikánsan megnövelheti az emlő és kolorektális daganatos betegek túlélését. A hasnyálmirigy daganatos betegeknél magasabb metionin bevitel biztosíthatja a jobb túlélést. A kolorektális és hasnyálmirigy daganatos betegek IL-6 és IL-8 szintje magasabb volt a kontroll csoporthoz képest, és ez utóbbi pozitív korrelációt mutatott a betain és folát bevittel a kolorektális betegcsoportban. Továbbá az találtuk, hogy az alacsonyabb IL-8 szintekhez szignifikánsan jobb túlélés társulhat a kolorektális daganatos betegek között.

Mindezek alapján elmondható, hogy a megfelelő mennyiségű metil-donor bevitel szerepet játszhat a daganatok kialakulásának megelőzésében, valamint hatékony kiegészítő kezelés lehet a daganatos betegek kiegészítő terápiája során.

## 8. Summary

Lifestyle factors have a greater role in cancer prevention than considered before. The tumor-preventive and risk-reducing effects of dietary methyl donors have already been widely investigated.

In our systematic review and meta-analysis we assessed the relationship between B vitamin intake and CRC development. We found that optimal intake of vitamin B2 and B6 could decrease the risk of CRC development and could compensate the reduced activity of MTHFR enzyme which may be a risk factor of CRC as well.

According to our *in vitro* studies, methyl-donor treatment could significantly reduce proliferation of breast, lung and pancreatic tumor cells through downregulating MAPK/ERK and AKT signaling. These were accompanied by the increase in levels of pro-apoptotic caspase-9, BAK, BAX and PUMA and the decrease in levels of anti-apoptotic MCL-1 and BCL-2 proteins. Induction of apoptosis after methyl-donor treatment could be supported by decreased AKT levels, increased subG1 cell fraction of tumor cells and elevated number of early apoptotic tumor cells. The p-p53 (Thr55) protein levels of breast and lung tumor cells can be reduced after methyl-donor treatment which may result in restored nuclear localization of p53. The treatment significantly reduced the levels of IL-17a and NFkB in Panc-1 tumor cells. A significant decrease in VEGF and SDF-1a levels were also detected. Inversely, E-cadherin showed elevated expression after methyl-donor treatment.

Questionnaire survey of cancer patients revealed that intakes of methionine, vitamin B6 and folate around RDA might significantly increase overall survival of breast and colorectal cancer patients. A relatively higher intake of methionine might be needed to reach better overall survival in case of pancreatic cancer patients. IL-6 and IL-8 cytokine levels were significantly higher in colorectal and pancreatic cancer patients compared to the control group which positively correlated. IL-8 levels positively correlated with intakes of betaine and folate in colorectal patients. Furthermore, lower levels of IL-8 could be associated with better overall survival.

We can conclude that appropriate intakes of methyl-donors may have a role in cancer prevention and might be an effective complementary treatment during the therapy of cancer patients.



## 9. Irodalomjegyzék

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International journal of cancer*. 2019;144(8):1941-1953.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-249.
3. Ferlay J SI, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. Cancer Incidence and Mortality Worldwide= IARC CancerBase. GLOBOCAN 2012 v10. 2012;11.
4. WHO. Cancer. <http://www.who.int/cancer/en/>.
5. Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, Aggarwal BB. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res*. 2008;25(9):2097-2116.
6. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*. 1998;396(6712):643-649.
7. Kinzler KW, Vogelstein B. Landscaping the cancer terrain. *Science*. 1998;280(5366):1036-1037.
8. Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nature Reviews Cancer*. 2004;4(8):579-591.
9. Laveti D, Kumar M, Hemalatha R, Sistla R, Gm Naidu V, Talla V, Verma V, Kaur N, Nagpal R. Anti-inflammatory treatments for chronic diseases: a review. *Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)(Discontinued)*. 2013;12(5):349-361.
10. Cao L, Yao G, Hu X, Chen L, Ye C. Advances in studies on metabolic syndrome and breast cancer. *Zhonghua wai ke za zhi [Chinese Journal of Surgery]*. 2015;53(12):966-969.

11. La Vecchia C, Giordano SH, Hortobagyi GN, Chabner B. Overweight, obesity, diabetes, and risk of breast cancer: interlocking pieces of the puzzle. *The oncologist*. 2011;16(6):726-729.
12. Russo GI, Vanella L, Castelli T, Cimino S, Reale G, Urzi D, Li Volti G, Gacci M, Carini M, Motta F. Heme oxygenase levels and metaflammation in benign prostatic hyperplasia patients. *World journal of urology*. 2016;34(8):1183-1192.
13. Vaag A, Petersen JS. Future breakthroughs in medical treatment of age-related conditions. *Ugeskrift for Laeger*. 2009;171(10):794-796.
14. Zhang H, Xue R, Zhu S, Fu S, Chen Z, Zhou R, Tian Z, Bai L. M2-specific reduction of CD1d switches NKT cell-mediated immune responses and triggers metaflammation in adipose tissue. *Cellular & Molecular Immunology*. 2018;15(5):506-517.
15. Baade PD, Youlden DR, Krnjacki LJ. International epidemiology of prostate cancer: geographical distribution and secular trends. *Molecular nutrition & food research*. 2009;53(2):171-184.
16. Kolonel LN, Altshuler D, Henderson BE. The multiethnic cohort study: exploring genes, lifestyle and cancer risk. *Nature Reviews Cancer*. 2004;4(7):519-527.
17. Baguley BJ, Skinner TL, Wright ORL. Nutrition therapy for the management of cancer-related fatigue and quality of life: a systematic review and meta-analysis. *Br J Nutr*. 2019;122(5):527-541.
18. Pereira P, Reis AD, Diniz RR, Lima FA, Leite RD, da Silva MCP, Guerra RNM, de Moraes Vieira EB, Garcia JBS. Dietary supplements and fatigue in patients with breast cancer: a systematic review. *Breast Cancer Res Treat*. 2018;171(3):515-526.
19. Fund WCR, Research AIfC. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective: Amer Inst for Cancer Research; 2007.
20. Clare CE, Brassington AH, Kwong WY, Sinclair KD. One-Carbon Metabolism: Linking Nutritional Biochemistry to Epigenetic Programming of Long-Term Development. *Annu Rev Anim Biosci*. 2019;7:263-287.

21. Ducker GS, Rabinowitz JD. One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metab.* 2017;25(1):27-42.
22. Mahmoud AM, Ali MM. Methyl Donor Micronutrients that Modify DNA Methylation and Cancer Outcome. *Nutrients.* 2019;11(3).
23. Locasale JW. Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(8):572-583.
24. Clare CE, Brassington AH, Kwong WY, Sinclair KD. One-carbon metabolism: linking nutritional biochemistry to epigenetic programming of long-term development. *Annual review of animal biosciences.* 2019;7:263-287.
25. Mafra D, Esgalhado M, Borges NA, Cardozo LF, Stockler-Pinto MB, Craven H, Buchanan SJ, Lindholm B, Stenvinkel P, Shiels PG. Methyl donor nutrients in chronic kidney disease: impact on the epigenetic landscape. *The Journal of Nutrition.* 2019;149(3):372-380.
26. Mentch SJ, Locasale JW. One-carbon metabolism and epigenetics: understanding the specificity. *Ann N Y Acad Sci.* 2016;1363(1):91-98.
27. Škovierová H, Vidomanová E, Mahmood S, Sopková J, Drgová A, Červeňová T, Halašová E, Lehotský J. The Molecular and Cellular Effect of Homocysteine Metabolism Imbalance on Human Health. *Int J Mol Sci.* 2016;17(10).
28. Finkelstein JD, Martin JJ. Methionine metabolism in mammals. Distribution of homocysteine between competing pathways. *J Biol Chem.* 1984;259(15):9508-9513.
29. Li F, Feng Q, Lee C, Wang S, Pellemounter LL, Moon I, Eckloff BW, Wieben ED, Schaid DJ, Yee V, Weinshilboum RM. Human betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) and BHMT2: common gene sequence variation and functional characterization. *Mol Genet Metab.* 2008;94(3):326-335.
30. Roje S. S-Adenosyl-L-methionine: beyond the universal methyl group donor. *Phytochemistry.* 2006;67(15):1686-1698.

31. Anderson OS, Sant KE, Dolinoy DC. Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. *J Nutr Biochem*. 2012;23(8):853-859.
32. Scotti M, Stella L, Shearer EJ, Stover PJ. Modeling cellular compartmentation in one-carbon metabolism. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2013;5(3):343-365.
33. Mason JB. Biomarkers of Nutrient Exposure and Status in One-Carbon (Methyl) Metabolism. *The Journal of Nutrition*. 2003;133(3):941S-947S.
34. Hustad S, Ueland PM, Vollset SE, Zhang Y, Bjørke-Monsen AL, Schneede J. Riboflavin as a determinant of plasma total homocysteine: effect modification by the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. *Clin Chem*. 2000;46(8 Pt 1):1065-1071.
35. NIDDK. Vitamin B. In: *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury* [Internet]. 2012-. Updated 2016-May-9 ed: Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease (NIDDK).
36. Tardy AL, Pouteau E, Marquez D, Yilmaz C, Scholey A. Vitamins and Minerals for Energy, Fatigue and Cognition: A Narrative Review of the Biochemical and Clinical Evidence. *Nutrients*. 2020;12(1).
37. Davis CD, Uthus EO. DNA methylation, cancer susceptibility, and nutrient interactions. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004;229(10):988-995.
38. Guerreiro CS, Carmona B, Goncalves S, Carolino E, Fidalgo P, Brito M, Leitao CN, Cravo M. Risk of colorectal cancer associated with the C677T polymorphism in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase in Portuguese patients depends on the intake of methyl-donor nutrients. *Am J Clin Nutr*. 2008;88(5):1413-1418.
39. Theodoratou E, Farrington SM, Tenesa A, McNeill G, Cetnarskyj R, Barnetson RA, Porteous ME, Dunlop MG, Campbell H. Dietary vitamin B6 intake and the risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17(1):171-182.
40. Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, Marchini JL, McCarthy S, McVean GA, Abecasis GR. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68-74.

41. Graydon JS, Claudio K, Baker S, Kocherla M, Ferreira M, Roche-Lima A, Rodríguez-Maldonado J, Duconge J, Rúaño G. Ethnogeographic prevalence and implications of the 677C>T and 1298A>C MTHFR polymorphisms in US primary care populations. *Biomark Med.* 2019;13(8):649-661.
42. Ben S, Du M, Ma G, Qu J, Zhu L, Chu H, Zhang Z, Wu Y, Gu D, Wang M. Vitamin B(2) intake reduces the risk for colorectal cancer: a dose-response analysis. *Eur J Nutr.* 2019;58(4):1591-1602.
43. Bo Y, Zhu Y, Tao Y, Li X, Zhai D, Bu Y, Wan Z, Wang L, Wang Y, Yu Z. Association Between Folate and Health Outcomes: An Umbrella Review of Meta-Analyses. *Front Public Health.* 2020;8:550753.
44. Chen P, Li C, Li X, Li J, Chu R, Wang H. Higher dietary folate intake reduces the breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer.* 2014;110(9):2327-2338.
45. Fu H, Zeng J, Liu C, Gu Y, Zou Y, Chang H. Folate Intake and Risk of Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Updated Meta-Analysis of Epidemiological Studies. *Dig Dis Sci.* 2021;66(7):2368-2379.
46. Sun NH, Huang XZ, Wang SB, Li Y, Wang LY, Wang HC, Zhang CW, Zhang C, Liu HP, Wang ZN. A dose-response meta-analysis reveals an association between vitamin B12 and colorectal cancer risk. *Public Health Nutr.* 2016;19(8):1446-1456.
47. Wei DH, Mao QQ. Vitamin B6, vitamin B12 and methionine and risk of pancreatic cancer: a meta-analysis. *Nutr J.* 2020;19(1):111.
48. Wu W, Kang S, Zhang D. Association of vitamin B6, vitamin B12 and methionine with risk of breast cancer: a dose-response meta-analysis. *Br J Cancer.* 2013;109(7):1926-1944.
49. Yang J, Li H, Deng H, Wang Z. Association of One-Carbon Metabolism-Related Vitamins (Folate, B6, B12), Homocysteine and Methionine With the Risk of Lung Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Oncol.* 2018;8:493.

50. Zeng J, Gu Y, Fu H, Liu C, Zou Y, Chang H. Association Between One-carbon Metabolism-related Vitamins and Risk of Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis of Prospective Studies. *Clin Breast Cancer*. 2020;20(4):e469-e480.
51. Ben S, Du M, Ma G, Qu J, Zhu L, Chu H, Zhang Z, Wu Y, Gu D, Wang M. Vitamin B2 intake reduces the risk for colorectal cancer: a dose-response analysis. *Eur J Nutr*. 2019;58(4):1591-1602.
52. Cho E, Willett WC, Colditz GA, Fuchs CS, Wu K, Chan AT, Zeisel SH, Giovannucci EL. Dietary choline and betaine and the risk of distal colorectal adenoma in women. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99(16):1224-1231.
53. Sharp L, Little J, Brockton NT, Cotton SC, Masson LF, Haites NE, Cassidy J. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene, intakes of folate and related B vitamins and colorectal cancer: a case-control study in a population with relatively low folate intake. *Br J Nutr*. 2008;99(2):379-389.
54. van den Donk M, Buijsse B, van den Berg SW, Ocke MC, Harryvan JL, Nagengast FM, Kok FJ, Kampman E. Dietary intake of folate and riboflavin, MTHFR C677T genotype, and colorectal adenoma risk: a Dutch case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(6):1562-1566.
55. Machover D, Almohamad W, Castagné V, Desterke C, Gomez L, Gaston-Mathé Y, Boucheix C, Goldschmidt E. Pharmacologic modulation of 5-fluorouracil by folinic acid and high-dose pyridoxine for treatment of patients with digestive tract carcinomas. *Sci Rep*. 2021;11(1):12668.
56. Pieroth R, Paver S, Day S, Lammersfeld C. Folate and Its Impact on Cancer Risk. *Curr Nutr Rep*. 2018;7(3):70-84.
57. IARC. EPIC. <https://epiciarcfr/>.
58. Nitter M, Norgård B, de Vogel S, Eussen SJ, Meyer K, Ulvik A, Ueland PM, Nygård O, Vollset SE, Bjørge T, Tjønneland A, Hansen L, Boutron-Ruault M, Racine A, Cottet V, Kaaks R, Kühn T, Trichopoulou A, Bamia C, Naska A, Grioni S, Palli D, Panico S, Tumino R, Vineis P, Bueno-de-Mesquita HB, van Kranen H, Peeters PH, Weiderpass E, Dorronsoro M, Jakszyn P, Sánchez M, Argüelles M, Huerta JM, Barricarte A,

Johansson M, Ljuslinder I, Khaw K, Wareham N, Freisling H, Duarte-Salles T, Stepien M, Gunter MJ, Riboli E. Plasma methionine, choline, betaine, and dimethylglycine in relation to colorectal cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Ann Oncol.* 2014;25(8):1609-1615.

59. Stidley CA, Picchi MA, Leng S, Willink R, Crowell RE, Flores KG, Kang H, Byers T, Gilliland FD, Belinsky SA. Multivitamins, folate, and green vegetables protect against gene promoter methylation in the aerodigestive tract of smokers. *Cancer Res.* 2010;70(2):568-574.

60. Shabbeer S, Williams SA, Simons BW, Herman JG, Carducci MA. Progression of prostate carcinogenesis and dietary methyl donors: temporal dependence. *Cancer Prev Res (Phila).* 2012;5(2):229-239.

61. Niculescu MD, Zeisel SH. Diet, methyl donors and DNA methylation: interactions between dietary folate, methionine and choline. *J Nutr.* 2002;132(8 Suppl):2333S-2335S.

62. Park CS, Cho K, Bae DR, Joo NE, Kim HH, Mabasa L, Fowler AW. Methyl-donor nutrients inhibit breast cancer cell growth. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2008;44(7):268-272.

63. Bhanumathi R, Manivannan M, Thangaraj R, Kannan S. Drug-Carrying Capacity and Anticancer Effect of the Folic Acid- and Berberine-Loaded Silver Nanomaterial To Regulate the AKT-ERK Pathway in Breast Cancer. *ACS Omega.* 2018;3(7):8317-8328.

64. Wang H, Fan Q, Zhang L, Shi D, Wang H, Wang S, Bian B. Folate-targeted PTEN/AKT/P53 signaling pathway promotes apoptosis in breast cancer cells. *Pteridines.* 2020;31(1):158-164.

65. Zhou H, Li XM, Meinkoth J, Pittman RN. Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *J Cell Biol.* 2000;151(3):483-494.

66. Cagnol S, Chambard JC. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. *Febs j.* 2010;277(1):2-21.

67. Zhang Z, Rigas B. NF-kappaB, inflammation and pancreatic carcinogenesis: NF-kappaB as a chemoprevention target (review). *Int J Oncol.* 2006;29(1):185-192.

68. Li L, Aggarwal BB, Shishodia S, Abbruzzese J, Kurzrock R. Nuclear factor-kappaB and IkappaB kinase are constitutively active in human pancreatic cells, and their down-regulation by curcumin (diferuloylmethane) is associated with the suppression of proliferation and the induction of apoptosis. *Cancer*. 2004;101(10):2351-2362.
69. Nomura A, Majumder K, Giri B, Dauer P, Dudeja V, Roy S, Banerjee S, Saluja AK. Inhibition of NF-kappa B pathway leads to deregulation of epithelial-mesenchymal transition and neural invasion in pancreatic cancer. *Lab Invest*. 2016;96(12):1268-1278.
70. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*. 2006;441(7092):431-436.
71. Xie S, Li J, Wang JH, Wu Q, Yang P, Hsu HC, Smythies LE, Mountz JD. IL-17 activates the canonical NF-kappaB signaling pathway in autoimmune B cells of BXD2 mice to upregulate the expression of regulators of G-protein signaling 16. *J Immunol*. 2010;184(5):2289-2296.
72. Mucciolo G, Curcio C, Roux C, Li WY, Capello M, Curto R, Chiarle R, Giordano D, Satolli MA, Lawlor R, Scarpa A, Lukac P, Stakheev D, Provero P, Vannucci L, Mak TW, Novelli F, Cappello P. IL17A critically shapes the transcriptional program of fibroblasts in pancreatic cancer and switches on their protumorigenic functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(6).
73. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer*. 2013;12:86.
74. Lee H, Herrmann A, Deng JH, Kujawski M, Niu G, Li Z, Forman S, Jove R, Pardoll DM, Yu H. Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors. *Cancer Cell*. 2009;15(4):283-293.
75. Yang J, Liao X, Agarwal MK, Barnes L, Auron PE, Stark GR. Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFkappaB. *Genes Dev*. 2007;21(11):1396-1408.
76. Wu P, Wu D, Zhao L, Huang L, Shen G, Huang J, Chai Y. Prognostic role of STAT3 in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2016;7(15):19863-19883.



77. Sharma NK, Shankar S, Srivastava RK. STAT3 as an emerging molecular target in pancreatic cancer. *Gastrointestinal Cancer: Targets and Therapy*. 2014;4:115.
78. Trimboli RM, Giorgi Rossi P, Battisti NML, Cozzi A, Magni V, Zanardo M, Sardanelli F. Do we still need breast cancer screening in the era of targeted therapies and precision medicine? *Insights Imaging*. 2020;11(1):105.
79. Rojas K, Stuckey A. Breast cancer epidemiology and risk factors. *Clinical obstetrics and gynecology*. 2016;59(4):651-672.
80. Łukasiewicz S, Czeczulewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanisławek A. Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. *Cancers*. 2021;13(17):4287.
81. Porter P. “Westernizing” women's risks? Breast cancer in lower-income countries. *New England Journal of Medicine*. 2008;358(3):213-216.
82. Koboldt D, Fulton R, McLellan M, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, McMichael J, Fulton L, Dooling D, Ding L, Mardis E. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012;490(7418):61-70.
83. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(19):10869-10874.
84. Gnant M, Filipits M, Greil R, Stoeger H, Rudas M, Bago-Horvath Z, Mlineritsch B, Kwasny W, Knauer M, Singer C, Jakesz R, Dubsy P, Fitzal F, Bartsch R, Steger G, Balic M, Ressler S, Cowens JW, Strohff J, Ferree S, Schaper C, Liu S, Fesl C, Nielsen TO. Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: using the PAM50 Risk of Recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial treated with adjuvant endocrine therapy alone. *Annals of Oncology*. 2014;25(2):339-345.
85. Prat A, Galván P, Jimenez B, Buckingham W, Jeiranian HA, Schaper C, Vidal M, Álvarez M, Díaz S, Ellis C. Prediction of response to neoadjuvant chemotherapy using

core needle biopsy samples with the prosigna assay. *Clinical Cancer Research*. 2016;22(3):560-566.

86. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA. Molecular portraits of human breast tumours. *nature*. 2000;406(6797):747-752.

87. Ades F, Zardavas D, Bozovic-Spasojevic I, Pugliano L, Fumagalli D, De Azambuja E, Viale G, Sotiriou C, Piccart M. Luminal B breast cancer: molecular characterization, clinical management, and future perspectives. *Journal of Clinical Oncology*. 2014;32(25):2794-2803.

88. Tsang J, Tse GM. Molecular classification of breast cancer. *Advances in anatomic pathology*. 2020;27(1):27-35.

89. Szőke J, Udvarhelyi N. Modern pathologic diagnostics of breast cancer. *Orvosi hetilap*. 2012;153(1):22-30.

90. Yang XR, Chang-Claude J, Goode EL, Couch FJ, Nevanlinna H, Milne RL, Gaudet M, Schmidt MK, Broeks A, Cox A, Fasching PA, Hein R, Spurdle AB, Blows F, Driver K, Flesch-Janys D, Heinz J, Sinn P, Vrieling A, Heikkinen T, Aittomäki K, Heikkilä P, Blomqvist C, Lissowska J, Peplonska B, Chanock S, Figueroa J, Brinton L, Hall P, Czene K, Humphreys K, Darabi H, Liu J, Van 't Veer LJ, van Leeuwen FE, Andrulis IL, Glendon G, Knight JA, Mulligan AM, O'Malley FP, Weerasooriya N, John EM, Beckmann MW, Hartmann A, Weihbrecht SB, Wachter DL, Jud SM, Loehberg CR, Baglietto L, English DR, Giles GG, McLean CA, Severi G, Lambrechts D, Vandrope T, Weltens C, Paridaens R, Smeets A, Neven P, Wildiers H, Wang X, Olson JE, Cafourek V, Fredericksen Z, Kosel M, Vachon C, Cramp HE, Connley D, Cross SS, Balasubramanian SP, Reed MWR, Dörk T, Bremer M, Meyer A, Karstens JH, Ay A, Park-Simon T-W, Hillemanns P, Arias Pérez JI, Rodríguez PM, Zamora P, Benítez J, Ko Y-D, Fischer H-P, Hamann U, Pesch B, Brüning T, Justenhoven C, Brauch H, Eccles DM, Tapper WJ, Gerty SM, Sawyer EJ, Tomlinson IP, Jones A, Kerin M, Miller N, McInerney N, Anton-Culver H, Ziogas A, Shen C-Y, Hsiung C-N, Wu P-E, Yang S-L, Yu J-C, Chen S-T, Hsu G-C, Haiman CA, Henderson BE, Le Marchand L, Kolonel LN, Lindblom A, Margolin S, Jakubowska A, Lubiński J, Huzarski T, Byrski T, Górski B,

Gronwald J, Hooning MJ, Hollestelle A, van den Ouweland AMW, Jager A, Kriege M, Tilanus-Linthorst MMA, Collée M, Wang-Gohrke S, Pylkäs K, Jukkola-Vuorinen A, Mononen K, Grip M, Hirvikoski P, Winqvist R, Mannermaa A, Kosma V-M, Kauppinen J, Kataja V, Auvinen P, Soini Y, Sironen R, Bojesen SE, Dynnes Ørsted D, Kaur-Knudsen D, Flyger H, Nordestgaard BG, Holland H, Chenevix-Trench G, Manoukian S, Barile M, Radice P, Hankinson SE, Hunter DJ, Tamimi R, Sangrajrang S, Brennan P, McKay J, Odefrey F, Gaborieau V, Devilee P, Huijts PEA, Tollenaar R, Seynaeve C, Dite GS, Apicella C, Hopper JL, Hammet F, Tsimiklis H, Smith LD, Southey MC, Humphreys MK, Easton D, Pharoah P, Sherman ME, Garcia-Closas M. Associations of Breast Cancer Risk Factors With Tumor Subtypes: A Pooled Analysis From the Breast Cancer Association Consortium Studies. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2010;103(3):250-263.

91. Colditz GA, Rosner BA, Chen WY, Holmes MD, Hankinson SE. Risk Factors for Breast Cancer According to Estrogen and Progesterone Receptor Status. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2004;96(3):218-228.

92. Ishii K, Morii N, Yamashiro H. Pertuzumab in the treatment of HER2-positive breast cancer: an evidence-based review of its safety, efficacy, and place in therapy. *Core evidence*. 2019;14:51.

93. Maximiano S, Magalhaes P, Guerreiro MP, Morgado M. Trastuzumab in the treatment of breast cancer. *BioDrugs*. 2016;30(2):75-86.

94. Moreira C, Kaklamani V. Lapatinib and breast cancer: current indications and outlook for the future. *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2010;10(8):1171-1182.

95. Park JW, Liu MC, Yee D, Yau C, van't Veer LJ, Symmans WF, Paoloni M, Perlmutter J, Hylton NM, Hogarth M. Adaptive randomization of neratinib in early breast cancer. *New England Journal of Medicine*. 2016;375(1):11-22.

96. Newman LA, Reis-Filho JS, Morrow M, Carey LA, King TA. The 2014 society of surgical oncology Susan G. Komen for the cure symposium: triple-negative breast cancer. *Annals of surgical oncology*. 2015;22(3):874-882.

97. Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2019;16(12):713-732.
98. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2044-2058.
99. Sawicki T, Ruszkowska M, Danielewicz A, Niedźwiedzka E, Arłukowicz T, Przybyłowicz KE. A review of colorectal cancer in terms of epidemiology, risk factors, development, symptoms and diagnosis. *Cancers*. 2021;13(9):2025.
100. Meira LB, Bugni JM, Green SL, Lee C-W, Pang B, Borenshtein D, Rickman BH, Rogers AB, Moroski-Erkul CA, McFaline JL. DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(7):2516-2525.
101. Schmitt M, Greten FR. The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer. *Nature Reviews Immunology*. 2021;21(10):653-667.
102. Keller D, Windsor A, Cohen R, Chand M. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: review of the evidence. *Techniques in coloproctology*. 2019;23(1):3-13.
103. Ma Y, Yang W, Song M, Smith-Warner SA, Yang J, Li Y, Ma W, Hu Y, Ogino S, Hu FB. Type 2 diabetes and risk of colorectal cancer in two large US prospective cohorts. *British journal of cancer*. 2018;119(11):1436-1442.
104. Clinton SK, Giovannucci EL, Hursting SD. The World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research Third Expert Report on Diet, Nutrition, Physical Activity, and Cancer: Impact and Future Directions. *The Journal of nutrition*. 2020;150(4):663-671.
105. Giovannucci E, Martinez ME. Tobacco, colorectal cancer, and adenomas: a review of the evidence. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1996;88(23):1717-1730.
106. Van Cutsem E, Cervantes A, Nordlinger B, Arnold D. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology*. 2014;25:iii1-iii9.

107. Van Cutsem E, Nordlinger B, Cervantes A. Advanced colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for treatment. *Annals of oncology*. 2010;21:v93-v97.
108. Baraniskin A, Buchberger B, Pox C, Graeven U, Holch JW, Schmiegel W, Heinemann V. Efficacy of bevacizumab in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Cancer*. 2019;106:37-44.
109. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F. Global cancer observatory: cancer today. International Agency for Research on Cancer. 2020.
110. Kleeff J, Korc M, Apte M, La Vecchia C, Johnson CD, Biankin AV, Neale RE, Tempero M, Tuveson DA, Hruban RH, Neoptolemos JP. Pancreatic cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16022.
111. Rawla P, Sunkara T, Gaduputi V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World journal of oncology*. 2019;10(1):10-27.
112. Solomon S, Das S, Brand R, Whitcomb DC. Inherited pancreatic cancer syndromes. *Cancer Journal (Sudbury, Mass)*. 2012;18(6):485.
113. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. *The lancet*. 2011;378(9791):607-620.
114. Murphy KM, Brune KA, Griffin C, Sollenberger JE, Petersen GM, Bansal R, Hruban RH, Kern SE. Evaluation of candidate genes MAP2K4, MADH4, ACVR1B, and BRCA2 in familial pancreatic cancer: deleterious BRCA2 mutations in 17%. *Cancer research*. 2002;62(13):3789-3793.
115. Bosetti C, Lucenteforte E, Silverman D, Petersen G, Bracci P, Ji B, Negri E, Li D, Risch H, Olson S. Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). *Annals of oncology*. 2012;23(7):1880-1888.
116. Parkin D. 2. Tobacco-attributable cancer burden in the UK in 2010. *British journal of cancer*. 2011;105(2):S6-S13.

117. Whiteman DC, Webb PM, Green AC, Neale RE, Fritschi L, Bain CJ, Parkin DM, Wilson LF, Olsen CM, Nagle CM. Cancers in Australia in 2010 attributable to modifiable factors: summary and conclusions. *Australian and New Zealand journal of public health*. 2015;39(5):477-484.
118. Wang Y-T, Gou Y-W, Jin W-W, Xiao M, Fang H-Y. Association between alcohol intake and the risk of pancreatic cancer: a dose–response meta-analysis of cohort studies. *BMC cancer*. 2016;16(1):1-11.
119. Aune D, Greenwood D, Chan D, Vieira R, Vieira A, Rosenblatt DN, Cade J, Burley V, Norat T. Body mass index, abdominal fatness and pancreatic cancer risk: a systematic review and non-linear dose–response meta-analysis of prospective studies. *Annals of oncology*. 2012;23(4):843-852.
120. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of US adults. *New England Journal of Medicine*. 2003;348(17):1625-1638.
121. Li D, Morris JS, Liu J, Hassan MM, Day RS, Bondy ML, Abbruzzese JL. Body mass index and risk, age of onset, and survival in patients with pancreatic cancer. *Jama*. 2009;301(24):2553-2562.
122. Bosetti C, Bravi F, Turati F, Edefonti V, Polesel J, Decarli A, Negri E, Talamini R, Franceschi S, La Vecchia C. Nutrient-based dietary patterns and pancreatic cancer risk. *Annals of epidemiology*. 2013;23(3):124-128.
123. Larsson S, Wolk A. Red and processed meat consumption and risk of pancreatic cancer: meta-analysis of prospective studies. *British journal of cancer*. 2012;106(3):603-607.
124. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul J-L, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardière C. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *New England journal of medicine*. 2011;364(19):1817-1825.
125. Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, Seay T, Tjulandin SA, Ma WW, Saleh MN. Increased survival in pancreatic cancer with nab-

paclitaxel plus gemcitabine. *New England Journal of Medicine*. 2013;369(18):1691-1703.

126. Wakelee HA, Chang ET, Gomez SL, Keegan TH, Feskanich D, Clarke CA, Holmberg L, Yong LC, Kolonel LN, Gould MK. Lung cancer incidence in never-smokers. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(5):472.

127. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JH, Beasley MB, Chirieac LR, Dacic S, Duhig E, Flieder DB. The 2015 World Health Organization classification of lung tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. *Journal of thoracic oncology*. 2015;10(9):1243-1260.

128. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest*. 2003;123(1):21S-49S.

129. Hubbard R, Venn A, Lewis S, Britton J. Lung cancer and cryptogenic fibrosing alveolitis: a population-based cohort study. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000;161(1):5-8.

130. Kirk GD, Merlo C, O'Driscoll P, Mehta SH, Galai N, Vlahov D, Samet J, Engels EA. HIV infection is associated with an increased risk for lung cancer, independent of smoking. *Clinical Infectious Diseases*. 2007;45(1):103-110.

131. Yano T, Haro A, Shikada Y, Maruyama R, Maehara Y. Non-small cell lung cancer in never smokers as a representative 'non-smoking-associated lung cancer': epidemiology and clinical features. *International journal of clinical oncology*. 2011;16(4):287-293.

132. Tasevska N, Sinha R, Kipnis V, Subar AF, Leitzmann MF, Hollenbeck AR, Caporaso NE, Schatzkin A, Cross AJ. A prospective study of meat, cooking methods, meat mutagens, heme iron, and lung cancer risks. *The American journal of clinical nutrition*. 2009;89(6):1884-1894.

133. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*. 2014;511(7511):543-550.

134. Mok TS, Wu Y-L, Thongprasert S, Yang C-H, Chu D-T, Saijo N, Sunpaweravong P, Han B, Margono B, Ichinose Y. Gefitinib or carboplatin–paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2009;361(10):947-957.
135. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, Palmero R, Garcia-Gomez R, Pallares C, Sanchez JM. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *The lancet oncology*. 2012;13(3):239-246.
136. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Jänne PA, Kocher O, Meyerson M, Johnson BE, Eck MJ, Tenen DG, Halmos B. EGFR mutation and resistance of non–small-cell lung cancer to gefitinib. *New England Journal of Medicine*. 2005;352(8):786-792.
137. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, Digumarthy S, Turke AB, Fidias P, Bergethon K, Shaw AT, Gettinger S, Cospers AK. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Science translational medicine*. 2011;3(75):75ra26-75ra26.
138. Mok TS, Wu Y-L, Ahn M-J, Garassino MC, Kim HR, Ramalingam SS, Shepherd FA, He Y, Akamatsu H, Theelen WS. Osimertinib or platinum–pemetrexed in EGFR T790M–positive lung cancer. *New England Journal of Medicine*. 2017;376(7):629-640.
139. Shaw AT, Kim D-W, Nakagawa K, Seto T, Crinó L, Ahn M-J, De Pas T, Besse B, Solomon BJ, Blackhall F. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *New England Journal of Medicine*. 2013;368(25):2385-2394.
140. Shaw AT, Kim D-W, Mehra R, Tan DS, Felip E, Chow LQ, Camidge DR, Vansteenkiste J, Sharma S, De Pas T. Ceritinib in ALK-rearranged non–small-cell lung cancer. *N Engl j med*. 2014;370:1189-1197.
141. Shaw AT, Gandhi L, Gadgeel S, Riely GJ, Cetnar J, West H, Camidge DR, Socinski MA, Chiappori A, Mekhail T. Alectinib in ALK-positive, crizotinib-resistant, non-small-cell lung cancer: a single-group, multicentre, phase 2 trial. *The lancet oncology*. 2016;17(2):234-242.



142. Kim D-W, Tiseo M, Ahn M-J, Reckamp KL, Hansen KH, Kim S-W, Huber RM, West HL, Groen HJ, Hochmair MJ. Brigatinib in patients with crizotinib-refractory anaplastic lymphoma kinase-positive non-small-cell lung cancer: a randomized, multicenter phase II trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(22):2490-2498.
143. Shaw AT, Ou S-HI, Bang Y-J, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, Riely GJ, Varella-Garcia M, Shapiro GI, Costa DB. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*. 2014;371(21):1963-1971.
144. Lim SM, Kim HR, Lee J-S, Lee KH, Lee Y-G, Min YJ, Cho EK, Lee SS, Kim B-S, Choi MY. Open-label, multicenter, phase II study of ceritinib in patients with non-small-cell lung cancer harboring ROS1 rearrangement. *Journal of clinical oncology*. 2017;35(23):2613-2618.
145. Shaw AT, Felip E, Bauer TM, Besse B, Navarro A, Postel-Vinay S, Gainor JF, Johnson M, Dietrich J, James LP. Lorlatinib in non-small-cell lung cancer with ALK or ROS1 rearrangement: an international, multicentre, open-label, single-arm first-in-man phase 1 trial. *The Lancet Oncology*. 2017;18(12):1590-1599.
146. Hyman DM, Puzanov I, Subbiah V, Faris JE, Chau I, Blay J-Y, Wolf J, Raje NS, Diamond EL, Hollebecque A. Vemurafenib in multiple nonmelanoma cancers with BRAF V600 mutations. *New England Journal of Medicine*. 2015;373(8):726-736.
147. Planchard D, Kim TM, Mazieres J, Quoix E, Riely G, Barlesi F, Souquet P-J, Smit EF, Groen HJ, Kelly RJ. Dabrafenib in patients with BRAFV600E-positive advanced non-small-cell lung cancer: a single-arm, multicentre, open-label, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. 2016;17(5):642-650.
148. Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, Kwon R, Curran Jr WJ, Wu Y-L, Paz-Ares L. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *The Lancet*. 2017;389(10066):299-311.
149. Langer CJ, Gadgeel SM, Borghaei H, Papadimitrakopoulou VA, Patnaik A, Powell SF, Gentzler RD, Martins RG, Stevenson JP, Jalal SI. Carboplatin and pemetrexed with or without pembrolizumab for advanced, non-squamous non-small-cell lung cancer: a randomised, phase 2 cohort of the open-label KEYNOTE-021 study. *The lancet oncology*. 2016;17(11):1497-1508.

150. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, Shamseer L, Tetzlaff JM, Akl EA, Brennan SE, Chou R, Glanville J, Grimshaw JM, Hrobjartsson A, Lalu MM, Li T, Loder EW, Mayo-Wilson E, McDonald S, McGuinness LA, Stewart LA, Thomas J, Tricco AC, Welch VA, Whiting P, Moher D. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ*. 2021;372:n71.
151. Suurmond R, van Rhee H, Hak T. Introduction, comparison, and validation of Meta-Essentials: A free and simple tool for meta-analysis. *Res Synth Methods*. 2017;8(4):537-553.
152. Kiss E, Forika G, Dank M, Krenacs T, Nemeth Z. Methyl Donors Reduce Cell Proliferation by Diminishing Erk-Signaling and NFkB Levels, While Increasing E-Cadherin Expression in Panc-1 Cell Line. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(5):2546.
153. 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 Mediated Proliferation Pathways in Breast and Lung Cancer Cell Lines. *Int J Mol Sci*. 2021;22(7).
154. Slattery ML, Potter JD, Samowitz W, Schaffer D, Leppert M. Methylene tetrahydrofolate reductase, diet, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999;8(6):513-518.
155. Borenstein M. *Common Mistakes in Meta-Analysis and How to Avoid Them: US: Biostat Inc.*; 2019.
156. Ishihara J, Otani T, Inoue M, Iwasaki M, Sasazuki S, Tsugane S, Japan Public Health Center-based Prospective Study G. Low intake of vitamin B-6 is associated with increased risk of colorectal cancer in Japanese men. *J Nutr*. 2007;137(7):1808-1814.
157. Crews H, Alink G, Andersen R, Braesco V, Holst B, Maiani G, Ovesen L, Scotter M, Solfrizzo M, van den Berg R, Verhagen H, Williamson G. A critical assessment of some biomarker approaches linked with dietary intake. *Br J Nutr*. 2001;86 Suppl 1:S5-35.

158. Otani T, Iwasaki M, Yamamoto S, Sobue T, Hanaoka T, Inoue M, Tsugane S, Japan Public Health Center-based Prospective Study G. Alcohol consumption, smoking, and subsequent risk of colorectal cancer in middle-aged and elderly Japanese men and women: Japan Public Health Center-based prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003;12(12):1492-1500.
159. Herrmann W, Obeid R. Causes and early diagnosis of vitamin B12 deficiency. *Dtsch Arztebl Int.* 2008;105(40):680-685.
160. Agnoli C, Gioni S, Krogh V, Pala V, Allione A, Matullo G, Di Gaetano C, Tagliabue G, Pedraglio S, Garrone G, Cancarini I, Cavalleri A, Sieri S. Plasma Riboflavin and Vitamin B-6, but Not Homocysteine, Folate, or Vitamin B-12, Are Inversely Associated with Breast Cancer Risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition-Varese Cohort. *J Nutr.* 2016;146(6):1227-1234.
161. Aili A, Hasim A, Kelimu A, Guo X, Mamtimin B, Abudula A, Upur H. Association of the plasma and tissue riboflavin levels with C20orf54 expression in cervical lesions and its relationship to HPV16 infection. *PLoS One.* 2013;8(11):e79937.
162. Pufulete M, Al-Ghnaniem R, Leather AJ, Appleby P, Gout S, Terry C, Emery PW, Sanders TA. Folate status, genomic DNA hypomethylation, and risk of colorectal adenoma and cancer: a case control study. *Gastroenterology.* 2003;124(5):1240-1248.
163. Cao Z, Liao Q, Su M, Huang K, Jin J, Cao D. AKT and ERK dual inhibitors: The way forward? *Cancer Lett.* 2019;459:30-40.
164. Allan LA, Clarke PR. Apoptosis and autophagy: Regulation of caspase-9 by phosphorylation. *FEBS J.* 2009;276(21):6063-6073.
165. Hinz N, Jucker M. Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: a comprehensive review. *Cell Commun Signal.* 2019;17(1):154.
166. Todd DE, Densham RM, Molton SA, Balmanno K, Newson C, Weston CR, Garner AP, Scott L, Cook SJ. ERK1/2 and p38 cooperate to induce a p21CIP1-dependent G1 cell cycle arrest. *Oncogene.* 2004;23(19):3284-3295.
167. Sun Y, Yang S, Sun N, Chen J. Differential expression of STAT1 and p21 proteins predicts pancreatic cancer progression and prognosis. *Pancreas.* 2014;43(4):619-623.

168. Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(6):400-414.
169. Pena-Blanco A, Garcia-Saez AJ. Bax, Bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis. *FEBS J*. 2018;285(3):416-431.
170. Domina AM, Smith JH, Craig RW. Myeloid cell leukemia 1 is phosphorylated through two distinct pathways, one associated with extracellular signal-regulated kinase activation and the other with G2/M accumulation or protein phosphatase 1/2A inhibition. *J Biol Chem*. 2000;275(28):21688-21694.
171. Domina AM, Vrana JA, Gregory MA, Hann SR, Craig RW. MCL1 is phosphorylated in the PEST region and stabilized upon ERK activation in viable cells, and at additional sites with cytotoxic okadaic acid or taxol. *Oncogene*. 2004;23(31):5301-5315.
172. Yu C, Bruzek LM, Meng XW, Gores GJ, Carter CA, Kaufmann SH, Adjei AA. The role of Mcl-1 downregulation in the proapoptotic activity of the multikinase inhibitor BAY 43-9006. *Oncogene*. 2005;24(46):6861-6869.
173. Chen HC, Kanai M, Inoue-Yamauchi A, Tu HC, Huang Y, Ren D, Kim H, Takeda S, Reyna DE, Chan PM, Ganesan YT, Liao CP, Gavathiotis E, Hsieh JJ, Cheng EH. An interconnected hierarchical model of cell death regulation by the BCL-2 family. *Nat Cell Biol*. 2015;17(10):1270-1281.
174. Cromie MM, Liu Z, Gao W. Epigallocatechin-3-gallate augments the therapeutic effects of benzo[a]pyrene-mediated lung carcinogenesis. *Biofactors*. 2017;43(4):529-539.
175. Cai X, Liu X. Inhibition of Thr-55 phosphorylation restores p53 nuclear localization and sensitizes cancer cells to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(44):16958-16963.
176. Gao W, Lu C, Chen L, Keohavong P. Overexpression of CRM1: A Characteristic Feature in a Transformed Phenotype of Lung Carcinogenesis and a Molecular Target for Lung Cancer Adjuvant Therapy. *J Thorac Oncol*. 2015;10(5):815-825.

177. Lu C, Shao C, Cobos E, Singh KP, Gao W. Chemotherapeutic sensitization of leptomycin B resistant lung cancer cells by pretreatment with doxorubicin. *PLoS One*. 2012;7(3):e32895.
178. Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*. 1997;91(3):325-334.
179. Zhu W, Cromie MM, Cai Q, Lv T, Singh K, Gao W. Curcumin and vitamin E protect against adverse effects of benzo[a]pyrene in lung epithelial cells. *PLoS One*. 2014;9(3):e92992.
180. Pinho AV, Chantrill L, Rooman I. Chronic pancreatitis: a path to pancreatic cancer. *Cancer Lett*. 2014;345(2):203-209.
181. Li Q, Yang G, Feng M, Zheng S, Cao Z, Qiu J, You L, Zheng L, Hu Y, Zhang T, Zhao Y. NF- $\kappa$ B in pancreatic cancer: Its key role in chemoresistance. *Cancer Lett*. 2018;421:127-134.
182. Koshiba T, Hosotani R, Miyamoto Y, Ida J, Tsuji S, Nakajima S, Kawaguchi M, Kobayashi H, Doi R, Hori T, Fujii N, Imamura M. Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression. *Clin Cancer Res*. 2000;6(9):3530-3535.
183. Gelmini S, Mangoni M, Serio M, Romagnani P, Lazzeri E. The critical role of SDF-1/CXCR4 axis in cancer and cancer stem cells metastasis. *J Endocrinol Invest*. 2008;31(9):809-819.
184. Li X, Ma Q, Xu Q, Liu H, Lei J, Duan W, Bhat K, Wang F, Wu E, Wang Z. SDF-1/CXCR4 signaling induces pancreatic cancer cell invasion and epithelial-mesenchymal transition in vitro through non-canonical activation of Hedgehog pathway. *Cancer Lett*. 2012;322(2):169-176.
185. Merletti F, Galassi C, Spadea T. The socioeconomic determinants of cancer. *Environmental Health*. 2011;10(1):1-7.
186. Faggiano F, Partanen T, Kogevinas M, Boffetta P. Socioeconomic differences in cancer incidence and mortality. *IARC scientific publications*. 1997(138):65-176.

187. Fernando RI, Castillo MD, Litzinger M, Hamilton DH, Palena C. IL-8 Signaling Plays a Critical Role in the Epithelial–Mesenchymal Transition of Human Carcinoma Cells. *IL-8 Signaling in Brachyury-Induced Tumor Progression. Cancer research.* 2011;71(15):5296-5306.
188. Najdaghi S, Razi S, Rezaei N. An overview of the role of interleukin-8 in colorectal cancer. *Cytokine.* 2020;135:155205.
189. Yan P, Zhu H, Yin L, Wang L, Xie P, Ye J, Jiang X, He X. Integrin  $\alpha\beta6$  promotes lung cancer proliferation and metastasis through upregulation of IL-8–mediated MAPK/ERK signaling. *Translational oncology.* 2018;11(3):619-627.
190. Waldner MJ, Foersch S, Neurath MF. Interleukin-6-a key regulator of colorectal cancer development. *International journal of biological sciences.* 2012;8(9):1248.
191. Holmer R, Goumas FA, Waetzig GH, Rose-John S, Kalthoff H. Interleukin-6: a villain in the drama of pancreatic cancer development and progression. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International.* 2014;13(4):371-380.
192. Korsmo HW, Jiang X. One carbon metabolism and early development: A diet-dependent destiny. *Trends in Endocrinology & Metabolism.* 2021;32(8):579-593.

## 10. Saját publikációk jegyzéke

**A megjelent közlemények összesített impakt faktora (IF): 31,002**

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

1. **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)
2. **Kiss, Eva**; Forika, Gertrud; Dank, Magdolna; Krenacs, Tibor; Nemeth, Zsuzsanna  
Methyl Donors Reduce Cell Proliferation by Diminishing Erk-Signaling and NFkB Levels, WhileIncreasing E-Cadherin Expression in Panc-1 Cell Line  
INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES23 : 5Paper: 2546 , 14 p. (2022)
3. **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)
4. **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:**

5. 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 RESEARCH16 : 4pp. 12257-12263. , 7 p.(2019)

**A disszertáció alapját nem képező társszerzős közlemények:**

6. 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)
7. 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 RESEARCH27Paper: 1610048 , 15 p. (2021)
8. 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 SCIENCES21 : 17Paper: 6270 , 25 p. (2020)



9. 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)
10. 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)
11. 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)
12. 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; Dészfalvi, 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.

**Idézhető absztrakt a disszertáció témájában:**

Kiss, E; Nemeth, Z; Dank, M

Dietary methyl donors can influence proliferation of human cell lines in vitro

VIRCHOWS ARCHIV475 : Suppl. 1pp. S366-S367. Paper: E-PS-15-002 , 1 p. (2019)

**Idézhető absztrakt nem a disszertáció témájában:**

Kiss, E; Vancsik, T; Forika, G; Hamar, P ; Krenacs, T

Optimised in vitro model for testing the molecular background of tumour damage caused bymodulated electro-hyperthermia

VIRCHOWS ARCHIV471 : Suppl. 1.pp. S248-S248. , 1 p. (2017)

Kiss, E; Kovago, C; Oster-Weinberg, J ; Vancsik, T; Krenacs, T

Testing tumour cell death and stress responses induced by modulated electro-hyperthermia in3D cell cultures

VIRCHOWS ARCHIV469 : Suppl. 1pp. S91-S91. (2016)

Kiss, É; Vancsik, T; Andócs, G; Meggyesházi, N ; Kővágó, C; Papp, E ; Krenács, T

The thermal effect of modulated electro-hyperthermia on tumor-cell membranes

EUROPEAN JOURNAL OF INTEGRATIVE MEDICINE8 : Suppl 1p. 36 (2016)

Kiss, E; Andocs, G; Meggyesházi, N; Vancsik, T; Kővágó, C; Krenács, T  
Modulated electro-hyperthermia (mEHT) of allografted colorectal cancer: Does  
modulation make any difference?  
VIRCHOWS ARCHIV 467 : Suppl 1pp. S248-S249. (2015)

## 11. Köszönetnyilvánítás

Szeretném mindazoknak megköszönni a segítséget és a támogatást, akik nélkül doktori munkám nem valósult volna meg és talán én sem tartottam volna ki a végsőig.

Szeretném hálámat és köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Dr. Dank Magdolna professzor asszonynak, hogy lehetőséget biztosított doktori munkám elkészítéséhez és hogy a nehézségek ellenére mindvégig biztosított támogatásáról. Köszönöm, hogy a képzésem ideje alatt minden szakmai fejlődésemet támogató intézkedéssel mögöttem állt.

Nagyon nagy köszönettel tartozok Dr. Németh Zsuzsannának az iránymutatásért, a szakmai támogatásért, a bizalomért, az építő kritikákért és a kitartó segítségért. Köszönöm neki, hogy tudásával és lelkesedésével támogatott, és kitartott mellettem.

Hálával tartozok Dr. Krenács Tibornak, hogy laborjában lehetőséget adott munkáim elvégzéséhez. Köszönöm szakértelmét és támogatását a cikkeim megjelenésében.

Szeretném megköszönni az Onkológiai Klinika minden orvosának, nővérének és munkatársának, hogy segítették a klinikumban végzett munkám megvalósulását. Külön köszönöm Rimanóczy Ritának a hematológiai mérésekben nyújtott segítségét, valamint Hajdú Anettnek a kérdőíves felmérésben nyújtott segítségét és az értékes szakmai tanácskozásokat, beszélgetéseket.

Köszönöm Dankó Titanillának a sejttenyésztésben nyújtott segítségét, és hogy bizalommal fordulhattam hozzá bármikor.

Köszönettel tartozok Dr. Forika Gertrudnak a sok nevetésért és az együtt megküzdött pillanatokért. Nagyon hálás vagyok a végtelen szakmai és baráti segítségért, amit kaptam.

Végül szeretném megköszönni a családom és a barátaim szeretetét, támogatását, és hogy ők mindvégig tudták, sikerülni fog.

## 12. Függelék

### 1. melléklet: PRISMA ellenőrzési lista

Section and Topic	Item #	Checklist item	Location where item is reported
<b>TITLE</b>			
Title	1	Identify the report as a systematic review.	
<b>ABSTRACT</b>			
Abstract	2	See the PRISMA 2020 for Abstracts checklist.	
<b>INTRODUCTION</b>			
Rationale	3	Describe the rationale for the review in the context of existing knowledge.	
Objectives	4	Provide an explicit statement of the objective(s) or question(s) the review addresses.	
<b>METHODS</b>			
Eligibility criteria	5	Specify the inclusion and exclusion criteria for the review and how studies were grouped for the syntheses.	
Information sources	6	Specify all databases, registers, websites, organisations, reference lists and other sources searched or consulted to identify studies. Specify the date when each source was last searched or consulted.	
Search strategy	7	Present the full search strategies for all databases, registers and websites, including any filters and limits used.	
Selection process	8	Specify the methods used to decide whether a study met the inclusion criteria of the review, including how many reviewers screened each record and each report retrieved, whether they worked independently, and if applicable, details of automation tools used in the process.	
Data collection process	9	Specify the methods used to collect data from reports, including how many reviewers collected data from each report, whether they worked independently, any processes for obtaining or confirming data from study investigators, and if applicable, details of automation tools used in the process.	
Data items	10a	List and define all outcomes for which data were sought. Specify whether all results that were compatible with each outcome domain in each study were sought (e.g. for all measures, time points, analyses), and if not, the methods used to decide which results to collect.	
	10b	List and define all other variables for which data were sought (e.g. participant and intervention characteristics, funding sources). Describe any assumptions made about any missing or unclear information.	
Study risk of bias assessment	11	Specify the methods used to assess risk of bias in the included studies, including details of the tool(s) used, how many reviewers assessed each study and whether they worked independently, and if applicable, details of automation tools used in the process.	
Effect measures	12	Specify for each outcome the effect measure(s) (e.g. risk ratio, mean difference) used in the synthesis or presentation of results.	
Synthesis methods	13a	Describe the processes used to decide which studies were eligible for each synthesis (e.g. tabulating the study intervention characteristics and comparing against the planned groups for each synthesis (item #5)).	

Section and Topic	Item #	Checklist item	Location where item is reported
	13b	Describe any methods required to prepare the data for presentation or synthesis, such as handling of missing summary statistics, or data conversions.	
	13c	Describe any methods used to tabulate or visually display results of individual studies and syntheses.	
	13d	Describe any methods used to synthesize results and provide a rationale for the choice(s). If meta-analysis was performed, describe the model(s), method(s) to identify the presence and extent of statistical heterogeneity, and software package(s) used.	
	13e	Describe any methods used to explore possible causes of heterogeneity among study results (e.g. subgroup analysis, meta-regression).	
	13f	Describe any sensitivity analyses conducted to assess robustness of the synthesized results.	
Reporting bias assessment	14	Describe any methods used to assess risk of bias due to missing results in a synthesis (arising from reporting biases).	
Certainty assessment	15	Describe any methods used to assess certainty (or confidence) in the body of evidence for an outcome.	
<b>RESULTS</b>			
Study selection	16a	Describe the results of the search and selection process, from the number of records identified in the search to the number of studies included in the review, ideally using a flow diagram.	
	16b	Cite studies that might appear to meet the inclusion criteria, but which were excluded, and explain why they were excluded.	
Study characteristics	17	Cite each included study and present its characteristics.	
Risk of bias in studies	18	Present assessments of risk of bias for each included study.	
Results of individual studies	19	For all outcomes, present, for each study: (a) summary statistics for each group (where appropriate) and (b) an effect estimate and its precision (e.g. confidence/credible interval), ideally using structured tables or plots.	
Results of syntheses	20a	For each synthesis, briefly summarise the characteristics and risk of bias among contributing studies.	
	20b	Present results of all statistical syntheses conducted. If meta-analysis was done, present for each the summary estimate and its precision (e.g. confidence/credible interval) and measures of statistical heterogeneity. If comparing groups, describe the direction of the effect.	
	20c	Present results of all investigations of possible causes of heterogeneity among study results.	
	20d	Present results of all sensitivity analyses conducted to assess the robustness of the synthesized results.	
Reporting biases	21	Present assessments of risk of bias due to missing results (arising from reporting biases) for each synthesis assessed.	
Certainty of evidence	22	Present assessments of certainty (or confidence) in the body of evidence for each outcome assessed.	
<b>DISCUSSION</b>			
Discussion	23a	Provide a general interpretation of the results in the context of other evidence.	

Section and Topic	Item #	Checklist item	Location where item is reported
	23b	Discuss any limitations of the evidence included in the review.	
	23c	Discuss any limitations of the review processes used.	
	23d	Discuss implications of the results for practice, policy, and future research.	
<b>OTHER INFORMATION</b>			
Registration and protocol	24a	Provide registration information for the review, including register name and registration number, or state that the review was not registered.	
	24b	Indicate where the review protocol can be accessed, or state that a protocol was not prepared.	
	24c	Describe and explain any amendments to information provided at registration or in the protocol.	
Support	25	Describe sources of financial or non-financial support for the review, and the role of the funders or sponsors in the review.	
Competing interests	26	Declare any competing interests of review authors.	
Availability of data, code and other materials	27	Report which of the following are publicly available and where they can be found: template data collection forms; data extracted from included studies; data used for all analyses; analytic code; any other materials used in the review.	



## 2. melléklet: A szocioökönómiai háttér, egyes életmódbeli szokásokat és a metil-donor fogyasztás gyakoriságát felmérő kérdőív

Kérdőívet feltevő neve:

Semmelweis Egyetem Onkológiai Központ  
1083 Budapest, Tömör u. 25-29.

Felvétel dátuma:

## Táplálkozási szokások felmérése

Transzmetilást befolyásoló természetes hatóanyagok fogyasztási gyakoriságának vizsgálata

## SZEMÉLYES ADATOK

Sorszám: \_\_\_\_\_

 InBody 770 melléklet csatolvaNem:  Férfi  Nő

Diagnózis, fennálló betegség(ek): \_\_\_\_\_

Állandó lakhelye a lakhely típusa szerint:

 főváros megyeszékhely megyei jogú város város község falu

Legmagasabb iskolai végzettsége:

 8 általános vagy kevesebb nem egyetemi szintű felsőfokú iskolai oklevél / OKJ-s képzés gimnázium / érettségi főiskolai vagy egyetemi oklevél, diploma szakmunkásképző/szakiskola posztgraduális vagy doktori végzettség

Jelenlegi családi állapota

 nőtlen/hajadon bejegyzett élettársi kapcsolatban él együtt él a partnerével elvált (házasság vagy bejegyzett élettársi kapcsolat nélkül) özvegy házasságban él

## ÉLETMÓDBELI SZOKÁSOK

Dohányzik jelenleg?

 igen, naponta

dohányzás kezdete: \_\_\_\_\_

 igen, alkalmanként

dohányzás kezdete: \_\_\_\_\_

 nem

Milyen dohányterméket szív naponta?

 készen kapható, gyárilag előállított szivar (naponta: db) cigaretta (naponta: db) pipadohány (naponta: adag) kézzel sodort cigaretta (naponta: db) egyéb termék, éspedig: (naponta: db v adag)

Az elmúlt 12 hónapban fogyasztott Ön bármilyen alkoholtartalmú italt?

(mint például sör, bor, pezsgő, pálinka, vodka, rum, whiskey, likőr, alkoholos üdítőitalok)

 nem hetente 2-3 alkalommal havonta egyszer vagy ritkábban hetente 4-6 alkalommal havonta 2-4 alkalommal mindennap

Az elmúlt héten fogyasztott-e alkoholtartalmú italt?

 igen nem

Amennyiben igen, mit és mennyit fogyasztott az egyes napokon?

Hétfő	Sör (dl)	Bor (dl)	Rövidital (dl)
Kedd	Sör (dl)	Bor (dl)	Rövidital (dl)
Szerda	Sör (dl)	Bor (dl)	Rövidital (dl)
Csütörtök	Sör (dl)	Bor (dl)	Rövidital (dl)
Péntek	Sör (dl)	Bor (dl)	Rövidital (dl)
Szombat	Sör (dl)	Bor (dl)	Rövidital (dl)
Vasárnap	Sör (dl)	Bor (dl)	Rövidital (dl)

\* Rövidital: pálinka, rum, vodka, gin, whiskey, konyak stb.

Milyen gyakran fogyaszt teát?

 nem fogyasztok hetente 2-3 alkalommal havonta egyszer vagy ritkábban hetente 4-6 alkalommal havonta 2-4 alkalommal naponta

Kérdőív feltevő neve:

Semmelweis Egyetem Onkológiai Központ  
1083 Budapest, Tótmó u. 25-29.

Felvétel dátuma:

**Táplálkozási szokások felmérése**

Transzmetilálást befolyásoló természetes hatóanyagok fogyasztási gyakoriságának vizsgálata

Milyen teát fogyaszt a felsoroltak közül?

 fekete tea fehér tea egyéb: \_\_\_\_\_ zöld tea roiboos gyümölcs tea gyógynövény

Milyen gyakran és milyen jellegű fizikai aktivitást végez?

Fizikai aktivitás és gyakorisága	Nem	Igen	Havonta egyszer vagy ritkábban	Havonta 2-4 alkalommal	Hetente 2-3 alkalommal	Hetente 4-6 alkalommal	Naponta
Sport							
futás							
úszás							
torna							
Nordic walking							
yoga							
gyógytorna							
kerékpározás							
egyéb:							
Kerti munka							
Takarítás							
Könnyű egyéb házi munka							
Nehéz csomagok cipelése							
egyéb:							

Történt-e radikális táplálkozásbeli változás a betegsége óta?

 nem igen, pontosan miben:

- többszöri étkezés bevezetése
- új, egészségesebb nyersanyagok használata
- egészségtelen nyersanyagok, ételek elhagyása
- bizonyos nyersanyagok, táplálékok nagyobb mennyiségű fogyasztása
- alkohol elhagyása
- nagyobb odafigyelés a minőségre (pl. áruház =: piac)
- ételkészítési technológia változtatása
- tudatosabb vásárlás
- egyéb: \_\_\_\_\_

Rendszeresen szedett gyógyszerek (név, rendszeresség): \_\_\_\_\_

Rendszeresen szedett étrendkiegészítők (név, rendszeresség): \_\_\_\_\_

Speciális gyógyászati célra szánt tápszerek (név, rendszeresség, mennyiség): \_\_\_\_\_

Kérdőívet feltevő neve:

Semmelweis Egyetem Onkológiai Központ  
1083 Budapest, Tömő u. 25-29.

Feltétele dátuma:

**Táplálkozási szokások felmérése**

Transzmetilálást befolyásoló természetes hatóanyagok fogyasztási gyakoriságának vizsgálata

**RÉSZLETES TÁPLÁLKOZÁSI ANAMNÉZIS**(betain, folát, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, B<sub>2</sub>, metionin, choline, szelén)

	Igen	Nem	Havonta egyszer vagy ritkábban	Havonta 2-4 alkalommal	Havonta 2-3 alkalommal	Havonta 4-6 alkalommal	Naponta	Naponta többször	Feldolgozási mód (nyersen, főzve, párolva, sültve)
<b>GABONAFÉLÉK / CEREÁLIÁK</b>									
gabonafélék és gabonapari termékek (b, B <sub>1</sub> )									
gabonamagvak (B <sub>1</sub> , M)									
fehér lisztből készült pékáruk									
tejjes kőrésű lisztből készült pékáruk									
édes péksütemények, cukrász készítmények									
búzakorpa (b, Se)									
búzacsíra (Se)									
fehér rizs									
barna rizs (Se)									
árpa									
zab (Se) - korpa, pehely									
bulgur									
gluténmentes készítmények									
pszeudocereáliák (hajdina, amaránt, quinoa)									
quinoa (b)									
kóles (B <sub>1</sub> , M)									
száraz liszták:									
tojásos									
durum									
tejjes kőrésű									
kukorica (B <sub>1</sub> )									
<b>TEJ ÉS TEJTERMÉKEK</b>									
tejtermékek (CH)									
tej (f, B <sub>1</sub> , B <sub>12</sub> , CH)									
3,5%									
2,8%									
1,5%									
sajt (B <sub>1</sub> , B <sub>12</sub> )									
lágy sajt									
kemény sajt									
őrlemezlet sajt									
tejtő									
12%									
20%									
joghurt, kefir									
lúró (B <sub>1</sub> )									
<b>HÚS, HÚSKÉSZÍTMÉNYEK/ HAL</b>									
vörös húsok (B <sub>1</sub> , B <sub>12</sub> , M, CH)									
vöröses húsok (Se)									
fehér húsok									
szarvas húsok (B <sub>1</sub> , Se)									
feldolgozott húskészítmények (B <sub>1</sub> , B <sub>12</sub> , M) (szalámi, felvágott, kenőmájas, vinski, kolbász)									
hal (B <sub>1</sub> , B <sub>12</sub> , M)									
lazac (Se)									
tenger gyümölcsei (b, B <sub>1</sub> )									
belsőégek									
marha máj (f, B <sub>1</sub> , B <sub>12</sub> , B <sub>6</sub> , CH)									
vese (B <sub>1</sub> , B <sub>12</sub> )									
szív (B <sub>1</sub> )									
tojás (f, B <sub>1</sub> , B <sub>12</sub> , M, CH)									

Kérdőívet tevő evő neve:

Semmelweis Egyetem Onkológiai Központ  
1083 Budapest, Tótmű u. 25-29.

Felvételi dátuma:

**Táplálkozási szokások felmérése**

Transzmetilálást befolyásoló természetes hatóanyagok fogyasztási gyakoriságának vizsgálata

	Igen	Nem	Havonta egyszer vagy ritkábban	Havonta 2-4 alkalommal	Hetente 2-3 alkalommal	Hetente 4-6 alkalommal	Naponta	Naponta többször	Feldolgozási mód (nyersen, főzve, párolva, sültve)
<b>ZÖLDSEGEK</b>									
friss									
fagyasztott									
cékka (b)									
spenót (b, f, M)									
brokkoli (b,f)									
sóska (f)									
spárga (f)									
keltöbű (f)									
római saláta (f)									
lencse (f, Ch)									
fekete bab (f)									
vesebab (f)									
borsó (f)									
hagyma (f, B <sub>1</sub> )									
hüvelyesek (B <sub>1</sub> )									
leveles zöldségek (B <sub>1</sub> )									
káposztafélék (Ch)									
kartof (Ch)									
földimogyoró (Ch)									
<b>GYÜMÖLCSÖK</b>									
friss									
fagyasztott									
avokádó (f)									
citrusfélék (f)									
banán (f)									
sárgadinnye (f)									
eper									
málna									
szeder									
meggy									
mandula (B <sub>1</sub> )									
brazil dió / paradó (B <sub>1</sub> , M, Se)									
mogyorófélék (f)									
olajos magvak (B <sub>1</sub> , Ch)									
szeszamag (B <sub>1</sub> )									
lenmag (Ch)									
szója és szójakészítmény (Ch, B <sub>1</sub> , M)									
élesztő (f, B <sub>1</sub> )									

Igényel-e visszajelzést, tanácsadást az eredmények kiértékelését követően?

 igen elérhetőség (email, telefon): \_\_\_\_\_ nem