

**PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI KAR
EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA**

Doktori Iskola vezetője:

Prof. Dr. Bódis József, egyetemi tanár

Programvezető:

Prof. Dr. Kiss István, egyetemi tanár

Témavezetők:

Prof. Dr. Kiss István

Prof. Dr. Figler Mária

**Mesterséges élelmiszerszínezékek molekuláris epidemiológiai és
epigenetikai vizsgálata**

Doktori (Ph.D.) értekezés

Raposa László Bence



Pécs, 2017

*Doktori értekezésemet édesapám és nagymamám
emlékének ajánlom.*

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	5
2. Háttér, előzmények	8
2.1. Az élelmiszer-adalékanyagok fogalma és szabályozása	8
2.2. Az élelmiszer-adalékanyagok csoportosítása	9
2.3. Az élelmiszerszínezékek fajtái és csoportjai	10
2.4. A mesterséges színezékek.....	11
2.5. Monoazo színezékek: a tartrazin és az azorubin.....	12
2.5.1. A tartrazin (E102) jellemzői és felhasználása.....	12
2.5.2. Az azorubin (E122) jellemzői és felhasználása	17
2.6. A táplálkozás hatása a tumoros elváltozások kialakulására	24
2.6.1. A táplálkozás és a rák kapcsolata.....	24
2.6.2. Táplálkozási tényezők epigenetikai vonatkozásai.....	26
2.7. Karcinogenezis és a daganatkeletkezési modell jellemzői.....	27
2.7.1. A sejtosztódás.....	27
2.7.2. Karcinogenezis: a tumor kialakulás folyamatának tényezői.....	27
2.7.3. Biomarkerek, mint a vizsgálat indikátorai.....	29
3. Problémafelvetés, célkitűzések	42
4. Anyagok és módszerek.....	47
4.1. A vizsgálat során felhasznált anyagok	47
4.1.1. Kísérleti állatok	47
4.1.2. Felhasznált vegyszerek, oldatok, tápok, primerek	47
4.2. Vizsgálati módszerek	50
4.2.1. Kísérleti állatok kezelési sémája	50
4.2.2. RNS izolálás Trizol protokollal.....	53
4.2.3. Kvantitatív RT-PCR protokoll	53
4.2.4. Statisztikai elemzések módja	54

5. Eredmények	55
5.1. A CYP450 metabolizáló enzimeinek génexpressziós mintázatára vonatkozó vizsgálati eredmények (<i>CYP1A1</i> , <i>CYP2E1</i>).....	55
5.1.1. A <i>CYP1A1</i> génexpressziós vizsgálati eredményei	55
5.1.2. A <i>CYP2E1</i> génexpressziós vizsgálati eredményei	56
5.2. A sejtciklus szabályozásában résztvevő gének, kinázok (<i>NF-κB</i> , <i>GADD45α</i> , <i>MAPK8</i>) génexpressziós mintázatára vonatkozó vizsgálati eredmények	58
5.2.1. Az <i>NF-κB</i> génexpressziós vizsgálati eredményei	58
5.2.2. A <i>GADD45α</i> génexpressziós vizsgálati eredményei.....	59
5.2.3. A <i>MAPK8</i> génexpressziós vizsgálati eredményei.....	60
5.3. A metilációban szerepet játszó gének expressziós mintázatára vonatkozó, multigenerációs, epigenetikai vizsgálat eredményei.....	62
5.3.1. Hím egyedek metilációban szerepet játszó génjeinek expressziós vizsgálati eredményei.....	62
5.3.2. Nőstény egyedek, metilációban szerepet játszó génjeinek, expressziós vizsgálati eredményei.....	66
6. Megbeszélés	71
7. Új eredmények összefoglalása	76
7.1. A CYP450 metabolizáló enzimeinek génexpressziós mintázatára vonatkozó, új eredmények összefoglalása (<i>CYP1A1</i> , <i>CYP2E1</i>).....	76
7.2. A sejtciklus szabályozásában szerepet játszó gének, kinázok génexpressziós mintázatára vonatkozó, új eredmények összefoglalása (<i>NF-κB</i> , <i>GADD45α</i> , <i>MAPK8</i>).....	77
7.3. A metilációban szerepet játszó gének, multigenerációs, epigenetikai vizsgálat eredményei (<i>DNMT1</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>DNMT3B</i>).....	78
8. Köszönetnyilvánítás	79
9. Irodalomjegyzék.....	80
10. A disszertációhoz kapcsolódó és közvetlenül nem kapcsolódó publikációk és prezentációk listája	94

1. Rövidítések jegyzéke

ACS (American Cancer Society): Amerikai Rák Társaság

ADHD (Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder): figyelemhiány, -zavar/
hiperaktív rendellenesség

ADI (Acceptable Daily Intake): elfogadható, megengedhető napi beviteli mennyiség

AHH (aryl hydrocarbon hydroxylase): aril szénhidrogén hidroxiláz

ALP: alkalikus foszfatáz

ALT: alanin amino-transzferáz

AST: anti-streptolizin titer

bcl-2: B-cell lymphoma 2

CDK (cyclin-dependent kinases): ciklin-függő kináz

c-erb-B2: Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2

C-myc: Myc gén

COT (The Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment): élelmiszerekben, fogyasztói termékekben és a környezetben előforduló vegyi anyagok toxicitásával foglalkozó bizottság

CYP1A1: citokróm P450 1A1

CYP2E1: citokróm P450 2E1

DBPCFC (double-blind placebo controlled food challenge): kettős vak, placebo kontrollált, élelmiszer teszt

DFG (Deutsche Forschungs Gemeinschaft - Farbstoff-Kommission): Német Tudományos Társaság

DMBA: dimetil-benzantracén

DNMT1 (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1): DNS-metil-transzferáz 1

DNMT3A (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A): DNS-metil-transzferáz 3A

DNMT3B (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3B): DNS-metil-transzferáz 3B

EFSA (European Food Safety Authority): Európai Élelmiszer-biztonsági Hatóság

EFSA ANS (European Food Safety Authority, Panel on Food Additives and Nutrient Sources): EFSA, Élelmiszer-adalékanyagok és élelmiszerhez hozzáadott tápanyagok tudományos testülete

ERK: extracellular signal-regulated kinases

EU SCF (EU Scientific Committee for Food): Európai Unió, Élelmiszertudományi Bizottság

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations): Élelmezési és Mezőgazdasági Világszervezet (Egyesült Nemzetek)

FDA (U.S. Food and Drug Administration): USA, Élelmiszerbiztonsági és Gyógyszerészeti Hivatal

FDA CFSAN (U.S. Food and Drug Administration, The Center for Food Safety and Applied Nutrition): FDA, Élelmiszerbiztonsági és Alkalmazott Táplálkozástudományi Központ

GADD45 α : growth arrest and DNA damage-inducible 45 α

GAS: growth arrest specific

GSH: glutation

GTP: guanozin-trifoszfát

HCA: heterociklikus amin

IKK- γ : inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase gamma

JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives): FAO/WHO Élelmiszer adalék Szakértői Bizottság

JNK: c-Jun N-terminal kinases

KSH: Központi Statisztikai Hivatal

LD₅₀ (Lethal dose 50): végzetes toxikológiai mennyiség

MAPK, MAP2K, MAP3K: mitogen-activated protein kinase cascade

MAPK8: mitogen-activated protein kinase 8

MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1

MDA: malondialdehid

MÉBIH: Magyar Élelmiszer-biztonsági Hivatal

mg/ttkg: milligramm / testtömeg kilogramm

mRNS (messenger RNS): hírvivő ribonukleinsav

mtsai: munkatársai

NÉBIH: Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal

NEMO: NF-kappa-B essential modulator

NF- κ B: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NOAEL (no observed adverse effect level): a megfigyelhető káros hatást még nem okozó szint

OÉTI: Országos Élelmezés- és Táplálkozástudományi Intézet

OGYÉI: Országos Gyógyszerészeti és Élelmezés-egészségügyi Intézet

p53: TP53 gén

PAH (polycyclic aromatic hydrocarbon): policiklusos aromás szénhidrogén

PCNA: proliferating cell nuclear antigen

PCV (packed cell volume): hematokrit érték

PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor

RAS: Ras gén szupercsalád

SAPK: stress-activated protein kinases

SOD: szuperoxid dizmutáz

TK: thymidine kinase

ttkg: testtömeg kilogramm

VCAM-1: Vascular cell adhesion protein 1

WHO (World Health Organization): Egészségügyi Világszervezet

2. Háttér, előzmények

2.1. Az élelmiszer-adalékanyagok fogalma és szabályozása

Az emberiség már több évszázada használ adalékanyagokat egyes élelmiszerek tartósítására, állaguk megőrzésére, emellett az utóbbi évszázadban nagy teret hódítottak a forgalomban levő élelmiszerek vizuális tulajdonságának és tápértékének javítására alkalmazott adalékanyagok. Az infrastrukturális fejlődést megelőzően, felhasználás tekintetében az emberiség természetes anyagokkal dolgozott (Sohárné, 1998a). Az idő előrehaladtával és a technológia fejlődésével azonban „teret hódított” a mesterséges anyagok felhasználása (pénzügyi és kezelhetőségi okokból), egyes esetekben részletes biológiai és biokémiai hatásmechanizmus vizsgálat nélkül (Diehl, 2002) .

Az adalékanyagok fogalmát és felhasználását hazánkban egyrészt a 1333/2008/EK rendelet (az élelmiszer-adalékanyagokról), a 231/2012/EU rendelet (az élelmiszer- adalékok specifikációjának meghatározásáról) szabályozza valamint a Magyar Élelmiszerkönyv (Codex Alimentarius Hungaricus) ide vonatkozó 1-2-89/107 számú előírása (az élelmiszerekhez engedélyezett adalékanyagok általános előírásai) határozza meg (Sohárné, 1993).

„Adalékanyag minden olyan élelmiszerként önmagában nem fogyasztott és jellemző élelmiszer összetevőként nem alkalmazott anyag – tekintet nélkül arra, hogy van-e tápértéke vagy sem, – amelyet az adott élelmiszer gyártása, feldolgozása, elkészítése, kezelése, csomagolása, szállítása és tárolása során technológiai célból, szándékosan adnak az élelmiszerhez, melynek eredményeként önmaga vagy származéka közvetlenül vagy közvetetten az élelmiszer összetevőjévé válik.”

(1333/2008/EK rendelet)

Az Európai Unió szabályozás mellett az adalékanyagokkal kapcsolatos felhasználási és dóziselőírásokat, azok betartását az EFSA, hazai szinten a NÉBIH és az OGYÉI végzi. Ezen okból ma már elképzelhetetlen, hogy a törvényes

élelmiszeriparban nem engedélyezett adalékanyagok felhasználásra kerüljenek. A technológiában csak olyan anyagokat, adalékokat használhatnak fel, amelyek a fogyasztók életét semmilyen formában nem veszélyeztetik, illetve nem szolgálnak a termék hibáinak elfedésére, a vásárlók megtévesztésére, és a szervezetbe juttatható összes mennyiségük nem több a toxikológiailag megengedhető bevitelnél. Ismert az „alkalmazható legkisebb mennyiség elve” is, tehát adalékanyagok nem kerülhetnek feleslegesen élelmiszerbe, alkalmazásuk során pedig a kívánt hatást még biztosító legkisebb mennyiséget kell felhasználni a termék tulajdonságainak kialakítására (Sohárné, 2001).

Az élelmiszer-adalékanyagok esetleges ártalmasságának meghatározását, valamint egészségre gyakorolt rizikóbecslését a JECFA állatkísérletes, toxikológiai vizsgálatokkal és különféle *in vitro* biológiai tesztekkel végzi és vizsgálja. Az ember számára megengedhető napi beviteli mennyiséget (ADI) állatkísérletek adatainak figyelembe vételével, biztonsági faktorok alkalmazásával számítják ki, a végzetes toxikológiai mennyiség (LD₅₀) szem előtt tartása mellett (JECFA, 1957).

2.2. Az élelmiszer-adalékanyagok csoportosítása

Az élelmiszer-adalékanyagokat felhasználási céljuk, -technológiai funkciójuk és eredetük alapján csoportosítják.

Eredetük alapján (aromáknál alkalmazott kategóriák elfogadottak) három csoportba oszthatók, így megkülönböztetünk természetes, természetazonos és mesterséges eredetű adalékanyagokat.

Felhasználási céljuk és funkciójuk alapján már jóval nagyobb ezen anyagok cizelláltsága. Ez alapján megkülönböztetünk színezékeket, stabilizátorokat, tartósítószeret, ízfokozókat, antioxidánsokat, étkezési savakat, emulgeáló szereket, savanyúságot szabályozó anyagokat, emulgeáló sókat, csomósodást és lesülést gátló anyagokat, sűrítő anyagokat, módosított keményítőket, zselésítő anyagokat, térfogatnövelő szereket, habzástgátlókat, kelátképző anyagokat, fényező anyagokat, enzimeket, lisztkezelő szereket, szilárdító anyagokat, nedvesítő szereket, tömegnövelő szereket. A fent említett adalékanyagokat, az élelmiszeripar, a könnyebb kezelhetőség és beazonosíthatóság szempontjából E-számokkal jelöli (***I. táblázat***) (Sohárné, 1998b).

Színezékek	E100-199
Tartósítószer	E200-299
Antioxidánsok	E300-399
Stabilizátorok, sűrítők, zselésítők	E400-499
Savanyúságot szabályozó anyagok és csomósodás gátlók	E500-599
Ízfokozók	E600-699
Egyéb vegyületek	E900-999
Kiegészítő vegyületek	E1100-1599

1. táblázat: Az élelmiszer-adalékanyagok csoportjai E-szám alapján

2.3. Az élelmiszerszínezékek fajtái és csoportjai

Az élelmiszerszínezékeket az előállítási eljárás során a végtermék színének meghatározása érdekében alkalmazzák. Eredetük alapján ugyanazon három csoportba oszthatók be, mint az adalékanyagok. Lehetnek természetes, természetazonos (természetes eredetű) vagy mesterséges színezékek.

Az eredet vagyis a színt kialakító anyagok tulajdonságai nemcsak minőségüket, hanem árukat is jelentősen befolyásolják. Ebből adódóan a természetes színezékek drágábbak, ugyanakkor kémiai stabilitásuk általában gyengébb, így kíméletesebb gyártástechnológiát igényelnek.

A koncentrátumok bár olcsóbbak és hasonló hatás érhető el velük, ezenfelül kiérezhetőek más, a koncentrátumban jelenlevő kísérő és adalékanyagok is, melyek felhasználhatósági korlátokat illetve problémát jelenthetnek.

Az élelmiszeripar kísérőanyag mentes, de legalább azoktól nagymértékben megtisztított, standard összetételű színezékanyagokat alkalmazhat. Napjainkban a természetes színezékek a növényi alapú élelmiszerek általános komponensei (Raposa et al., 2012a; Sohárné, 2003).

2.4. A mesterséges színezékek

A mesterséges színezékek szintetikus úton készített, az élelmiszerektől idegen szerkezetű anyagok. Jellemző rájuk, hogy íztelenek, szagtalanok, színező képességük kifejezetten nagy, és a színskála szinte bármely színárnyalatának kialakítására alkalmasak. Finanziális szempontból kedvezőbbek, mint természetes „társaik”, a technológiai eljárásokat és beavatkozásokat jobban tűrik. Ellenállóbbak a fényvel, kémiai hatásokkal és a hővel szemben egyaránt (Raposa et al., 2014).

A mesterséges színezékek élelmiszeriparban is felhasznált, hat csoportjába tartoznak a mono, di és triazo színezékek, a triaril, metán színezékek, a kinaftalon és a xantén, valamint az indigoid származékok (**2. táblázat**). Ezen molekulák tartalmaznak valamilyen kromofor csoportot, konjugált rendszert, melyek a fény egy adott részét, az elektronok átrendeződése útján elnyelik. Az így kialakított szín attól függ, hogy a spektrum melyik része abszorbeálódott. A kémiai szerkezetnek a vegyület színének kialakításán felül szerepe van a színezék toxikológiai és biokémiai tulajdonságában is. A monoazo színezékeknek sárga, narancssárga vagy vörös színük, míg a triaril származékoknak nagyrészt zöld vagy kék színük van. A di- és triazo vegyületek sötétebb, barna vagy fekete színűek. Az egészségre gyakorolt hatás kialakításában a kiindulási anyag, anyamolekula mellett szerepe van a belőle szervezetben modifikálódott metabolitoknak is. Gyakorlatban és kísérleti úton igazolást nyert, hogy elsősorban a zsírokban oldható és bázikus színezékeknél gyakoribb a karcinogén hatás. Ugyanakkor savas jellegű csoportok bevitelével részben csökkenthető, egyes esetekben teljes mértékben megszüntethető a molekula mutagén hatása. Az előbb leírt okokból az élelmiszeriparban használt színezékek molekuláit, olyan módon építik fel, hogy a végbemenő összes metabolikus folyamat bomlásterméke tartalmazzon savas komponenst, ezáltal az azo-kötés széthasadásakor káros hatású aromás aminok helyett ártalmatlan szulfonsavak, s ezek sói keletkeznek az emberi szervezetben. Ha a gyártástechnológiai folyamat defektust szenved, elképzelhető, hogy a termékben karcinogén aromás aminok maradnak vissza (szennyeződés formájában), melyek ártalmassá tehetik a forgalomban és emberi fogyasztásra kínált terméket (Sohárné, 2005; Tarnavölgyi 2009 a; b; c).

Monoazo színezékek	Di-és triazoszínezékek	Triaril metán színezékek	Kinaftaton színezékek	Xantén származék	Indigoid színezék
Narancssárga S (E110)	Brillantfekete BN (E151)	Zöld S (E142)	Kinolinsárga (E104)	Eritrozin (E127)	Indigo karmin (E132)
Tartrazin(E102)					
Alluravörös AC (E129)	Barna FK (E154)	Patentkék V (E131)			
Neukocin (E124)					
Azorubin(E122)	Barna HT (E155)	Brillantkék FCF(E133)			
Amaranth(E123)					

2. táblázat: A mesterséges színezékek csoportjai

2.5. Monoazo színezékek: a tartrazin és az azorubin

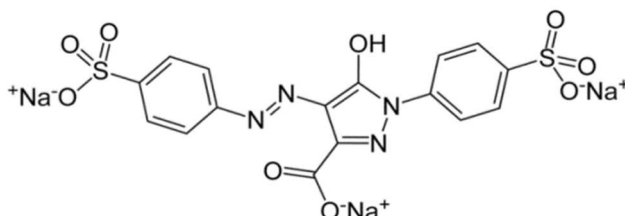
2.5.1. A tartrazin (E102) jellemzői és felhasználása

Az élelmiszeriparban egy színezéknek, laikus nevén és strukturális, kémiai meghatározásán kívül, hasonlóan a gyógyszeriparhoz szinonimanevet adnak. A tartrazin esetében ez a *FD* és *C Yellow*, *Acid Yellow 23* (EFSA ANS, 2009a).

Összetétel, szerkezet

A tartrazin ($C_{16}H_9N_4Na_3O_9S$) nagyrészen *trinátrium-5-hidroxi-1-(4-szulfonáto-fenil)-4-(4-szulfonáto-fenil-azo)-1H-pirazol-3-karboxilátból* és néhány mellékszínezékből áll, emellett szintelen komponensként tartalmazhat még nátrium-szulfátot (Na_2SO_4) és nátrium-kloridot ($NaCl$) is.

Jellemzően citromsárgás színt ad a vele színezett termékeknek. Általános jellemzője még, hogy vízzel oldható, valamint a savas közegnek és magas hőmérsékletnek is jól ellenáll, megtartja színét (Raposa et al., 2012b). Elfogadható napi beviteli mennyiség (ADI): 7,5 mg/ttkg/nap (European Parliament, 2008; EFSA ANS, 2009a)(*1. ábra*).



1. ábra: A tartrazin szerkezeti képlete

Forrás: EFSA ANS, 2009a

Felhasználás

A tartrazin felhasználása korlátozott, csak egyes élelmiszerekben és pontosan meghatározott mennyiségben lehet használni. Gyümölcs-készítményekben, italokban, mustárban, pudingokban, fagyaltokban, süteményekben, édességekben, rágógumikban alkalmazzák (Raposa et al., 2016a). A többféle színárnyalat kialakítása érdekében a sárgás, zöldes vagy barnás színárnyalatoknál gyakran más színezékekkel együtt is alkalmazzák.

Felhasználása nemcsak az élelmiszeriparban jellemző, alkalmazzák még a gyógyszer-, kozmetikai-, és textiliparban is. A gyógyszerek esetében a tartalomra vonatkozóan figyelmeztetés található a csomagoláson (Csapó és Kiss, 2003; Tarnavölgyi, 2009 a; b; c).

Tudományos vizsgálati eredmények (E102)

Szenzitivitás, intolerancia vizsgálatok

A tartrazinnal szemben fellépő érzékenység és intolerancia létezése régóta ismert tény (Settipane et al., 1976). A túlérzékenység jelei jelentkezhettek mind emésztőrendszer általi felszívódást - élelmiszer, gyógyszer, (Smith és Raymond, 1976) mind bőrön keresztüli felszívódást követően (kozmetikumok). A tünetek megjelenése időben és egyénenként változó, az első jelek akár néhány perc után is jelentkezhettek, de ez az időperiódus akár a felszívódást követő 6-14 óráig is kitolódhat. Sokféle és egymástól különböző immunológiai választ azonosítottak már a tartrazin expozíciót követően, így ismert válasz a migrén, klinikai depresszió, látászavar, általános gyengeségérzet, pseudoallergia, hőhullámok, fulladás, viszketés, a bőr piros foltos elváltozása is (Corder és Buckley, 1995; Raposa et al., 2013).

A tartrazin az azofestékek egyik legallergénebb fajtája, ezen okból legtöbbet vizsgált képviselője is (Gunda, 2004). A tartrazin-túlérzékenység a népesség mintegy 0,01-0,06%-át érinti (Bush és Taylor, 1998; Hannuksela és Haahtela, 2001; Thorngate, 2001). Az élelmiszerszínezék intoleranciák prevalenciája becslések szerint Amerikában eléri a 360000 főt, ami a lakosság 0,12 %-a (Elkhim et al., 2007;

Young, 1997). Az FDA állásfoglalása szerint ez a probléma valóban minden 10000 emberből egy főt érint ami, a lakosság 0,01 %-a (FDA, 2007). Ezek alapján elmondható, hogy népegészségügyi és élelmezésügyi jelentőséggel bír.

A tartrazin keresztreakciót válthat ki más szintetikus színezékekkel, többek között az amaranttal, a narancssárga S-sel és az eritrozinnal. Az érzékeny emberek körében az étrendjükben történő teljes eliminálás a leggyakoribb módja a tartrazin intoleranciával szemben történő fellépésnek (Michel et al., 1984; Raposa et al., 2012, Tarnavölgyi, 2009d, Szatlóczky, 1994).

Viselkedési, magatartástani vizsgálatok

Több viselkedéstani vizsgálat eredménye is arra utal, hogy az általunk vizsgált azoszínezékek valamilyen formában kapcsolatba hozhatóak a hiperaktivitással és figyelemzavarral gyerekek, tinédzserek esetében egyaránt (McCann et al., 2007; Conolly et al., 2010; Gao et al., 2011).

Az, hogy a viselkedési zavarok kialakulása egy-egy színezékanyagnak vagy azok együttes hatásának tudható be, nem egyértelmű. A vizsgált adalékanyagkeverékekben több esetben további összetevők szerepeltek, és a megfigyelt hatások nem voltak szeparálhatóak (Rowe és Rowe, 1994). A színezékek hatásainak összegzésére, valamint tényleges hatásainak felderítésére több metaanalízis is készült. Az egyik legjelentősebb Schab és mtsai. munkája (Schab és Trinh, 2004), melyben több klinikai és további vizsgálat eredményét hasonlították össze a fent említett hatás felderítésére. Esetükben a feltételezett hatás nem igazolódott, mivel a vizsgálatok nagy része eltérő kutatási (klinikai/ pszichológiai viselkedéselemzés, viselkedésvizsgálati metódus) és adatrögzítési módszerrel történt (szülő, tanár, klinikus által rögzítve)(FDA/CFSAN, 2011; Watson, 2008). Nem került tisztázásra sem a feltételezett figyelemzavar, sem az anyagok által kiváltott intolerancia, allergiás reakció (Arnold et al., 2012; Elhkim et al., 2007). A fent említettek mellett az eltérő eredményeket többek között a nem standardizált diagnózis, a mintaválasztás típusa, eltérősége és a „blind”- vak, kettős vak tesztek tervezetlensége okozhatta (Australian Government, 2014).

Fontos megemlíteni, hogy mesterséges színezékek étrendből történő teljes

eliminációja csak részleges megoldás, teljes védettséget nem jelent ezen viselkedés zavarok kialakulásának megelőzésében. A probléma multifaktoriális mivolta miatt ugyanakkor a kockázati tényezők redukálásával, az előfordulás gyakorisága jelentős mértékben csökkenthető (NÉBiH, 2012; Stevenson et al., 2007; Raposa et al., 2013; Tarnavölgyi, 2009d).

Genotoxicitás, karcinogenitás

Genotoxicitás tekintetében is eltérő irodalmi adatokról tudunk beszámolni. Míg a vizsgálatok több esetben mutagén hatást nem detektáltak (EFSA ANS, 2009a; Elhkim et al., 2007; Rafii et al., 1997), addig több esetben a potenciális klasztogén hatás egyértelműen kimutatható volt. Külön érdekesség, hogy az experimentális vizsgálatok eredményei változóak annak alapján, hogy milyen kísérleti állatot alkalmaztak, így kromoszómakészlettől való eltérést figyeltek meg kínai hörcsögök (*Cricetulus griseus*) (Ishidate et al., 1981; 1984), valamint patkányok esetében egyaránt (Giri et al., 1990). Ugyanezt a hatást egérben már nem tudták detektálni (Durnev et al., 1995).

Sasaki és mtsai. Comet Assay segítségével kimutatták, hogy az ADI mennyiség feletti, tartós expozíció a vastagbélben tranziens DNS károsodást okoz (Sasaki et al., 2002; Australian Government, 2014).

Poul és mtsai. kutatásukban többek között nagyobb dózisu tartrazin bevitelt és a vegyület metabolitjainak hatásvizsgálatát végezték *in vivo* állatkísérletes tesztrendszerben. A mikronukleusz tesztet követően széklelelemzést is végeztek HPLC-vel. A vizsgálat eredményeként megállapították, hogy a tartrazin expozíció hatására mikronukleusz számbeli eltérés nem volt, és ez ellentmondott az eddigi adatokkal. Ugyanakkor tisztázatlan az a kérdés, hogy ezen eredmény az anyag semleges hatásának vagy az *in vivo* DNS repair mechanizmusoknak tulajdonítható-e (Poul et al., 2009). Az EFSA a Poul és mtsai. által vizsgált 2000 mg/ttkg/ nap dózist biztonságosnak ítélte meg, a pozitív eredménnyel zárult genotoxicitási vizsgálatok kimenetelét pedig a nagy anyagmennyiség lokális, citotoxikus hatásának tudja be, nem pedig globális, mutagén faktornak (EFSA ANS, 2009a). Ezen felül elemzésében „szamba vette” az egyik legnagyobb, több tanulmányt összegző kutatást (TemaNord,

2002), melyben előzetesen többféle típusú és eredményű kutatási adatot vetettek össze az alábbiak alapján:

- **Case reports** (Baumgartner, 1989; Bhatia, 1996; Michel et al., 1984; Orchard és Varigos, 1997; Pohl et al., 1987; Prieto et al., 1986; Thuvander, 1995).
- **Challenge studies** (Corder és Buckley, 1995; David, 1987; Devlin és David, 1992; Grzelewska-Rzymowska et al., 1986; Hong et al., 1989; Jimenez-Aranda et al., 1996; Kemp és Schembri, 1985; Marques et al., 1995; Montano és Orea, 1989; Morales et al., 1995; Rowe, 1988,1994; Schulte-Korne et al., 1996; Timberlake et al., 1992; Van Bever et al., 1989; Virchow et al., 1988; Wilson és Scott,1989)
- **Reviews** (Collins-Williams, 1985; Simon, 1986; Wuthrich, 1993).
- **„Case studies” - esettanulmányok** (Baumgartner, 1989; Bhatia, 1996; Michel et al., 1984; Orchard és Varigos, 1997; Pohl et al., 1987; Prieto et al., 1986; Thuvander, 1995).
- **„Challenge studies” – tanulmányok** (Corder és Buckley, 1995; David, 1987; Devlin és David, 1992; Grzelewska-Rzymowska et al., 1986; Hong et al., 1989; Jimenez-Aranda et al., 1996; Kemp és Schembri, 1985; Marques et al., 1995; Montano és Orea, 1989; Morales et al., 1995; Rowe, 1988; 1994; Schulte-Korne et al., 1996; Timberlake et al., 1992; van Bever et al., 1989; Virchow et al., 1988; Wilson és Scott,1989)
- **„Reviews” – összefoglaló tanulmányok** (Collins-Williams, 1985; Simon, 1986; Wuthrich, 1993).

Ugyanakkor összevetve az addig rendelkezésre álló adatokat nem tekintette bizonyító erejűnek és reprezentatívnak azon eredményeket, melyek a fent említett hatásokról számoltak be, amellet, hogy az arra érzékeny személyeknél releváns, szakmai alkalmazhatósággal bírtak (EFSA ANS, 2009a).

A karcinogenitást vizsgáló kutatások eredményeinek tekintetében már homogénebb álláspontról beszélhetünk, ezekből a dolgozat terjedelme miatt csak pár jelentősebbet emelünk ki. Sem a JECFA 1964-es vizsgálata, - állásfoglalása (JECFA, 1964), sem a később készült, hosszútávú, állatkísérletes tanulmányok nem

támasztották alá a feltételezhető karcinogén hatást (Maekawa et al., 1987). Az állatkísérletek több orális táplálási módszert (táplálék, folyadék), valamint expozíciót is vizsgáltak, nemre való tekintet nélkül (Borzelleca és Hallagan, 1988a; b; Moutinho et al., 2007; Australian Government, 2014).

Reproduktív toxikológia

Ezen jellegű tanulmányok esetében nem észleltek teratogén hatást sem patkányok, sem nyulak esetében valamint a szaporulat tekintetében nem volt káros hatással az élelmiszerszínezék a reproduktív paraméterekre (JECFA, 1964). Megemlíthető azonban, hogy ezeket csak egy generációs rendszerben tesztelték, melyben - vélhetően a humán ekvivalens dózis figyelembe vételével - az anyagmennyiség, az étrend 2%-át tette ki (G0, G1) (Elhkim et al., 2007; Tanaka, 2006). Az utódok viselkedésfejlődését egy esetben sem érintette a tartrazin fogyasztása (Australian Government, 2014).

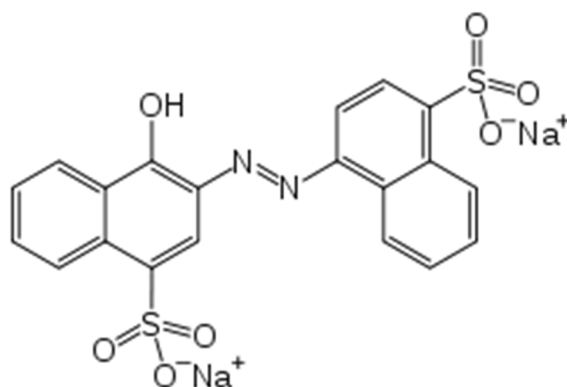
2.5.2. Az azorubin (E122) jellemzői és felhasználása

Az azorubin esetében több szinonima nevet használ az élelmiszeripar, ezek pedig a következők: azorutén, carmoisine, karmoizin, karmazsin, Food Red 3, Azorubin S, Brillantcarmoisín O, Acid Red 14 (EFSA ANS, 2009b).

Összetétel, szerkezet

Az azorubin főösszetételét *dinátrium-4-hidroxí-3-(4-szulfonáto-1-naftil-azo)-naftalin-1-szulfonát* adja, a szintetikus színezékekhez tartozik. Mint szintelen alkotórész hasonlóan a tartrazinhoz komponensként fellelhető benne, nátrium-klorid és/vagy nátrium-szulfát is.

Az azorubin, mint színezék alatt annak nátriumsóját értjük. Kalcium és a káliumsóit is alkalmazzák élelmiszerszínezékként (Raposa et al. 2012b). Elfogadható napi beviteli mennyiség (ADI): 4 mg/ttkg/nap (EFSA ANS, 2009b; JECFA, 1983a; 1983b; SCF, 1984)(2. ábra).



2. ábra: Az azorubin szerkezeti képlete

Forrás: EFSA ANS 2009b

Felhasználás

Az azorubin felhasználása hasonlóan a tartrazinéhoz, korlátozott, csak egyes élelmiszer fajtákban és meghatározott mennyiségben alkalmazható. Felhasználása a következő élelmiszerekben a feltüntetett mennyiségben engedélyezett. Italokban, burgonya- és gabonaalapú sós snackekben, süteményekben, kekszekben, levelestésztában, lekvárokbán, gyümölcs készítményekben, édességekben egyaránt használják (Codex Alimentarius Hungaricus, 1-2-89/107).

A különböző lila és barna színárnyalatok érdekében az azorubint más színezékekkel is keverik, alkalmazzák együtt. Ezt az anyagot ugyancsak felhasználhatják kozmetikumok, gyógyszerek és textilek színezésére is (Raposa et al., 2016a; Tarnavölgyi, 2009 a; b; c).

Tudományos vizsgálati eredmények (E122)

Szenzitivitás, intolerancia vizsgálatok

A fent ismertetettek alapján az azorubin is az azoszínezékek csoportjába tartozik, hasonlóan a tartrazinhoz. Ezen csoportnak kifejezett pseudoallergén hatása ismert. Több, szakirodalmi adat számol be az anyag allergizáló hatásairól az arra érzékeny emberek körében (Raposa et al., 2013; Sweatman et al., 1986; Titova, 2011). Ugyanakkor ismertek ezzel ellentétes konklúziójú vizsgálati eredmények is, mind állatkísérletes tesztrendszerű, mind humán vizsgálatok esetében (EFSA ANS, 2009b).

Az élelmiszerszínezékek hatása következtében kialakuló immunreakciók (hiperszenzitivitás), valamint a nem immuneredetű mechanizmusok (intolerancia) prevalenciája már a tartrazin ezen témakört ismertető részénél bemutatásra kerültek, ugyanakkor megemlítendő, hogy az azorubin esetében több esetben számos mellékhatás is jelentkezhet. Ezen mellékhatások csalánkiütéssel, vasculitissel, atópiás dermatitisszel járnak, de többször előfordul, hogy az ilyen eredményű vizsgálatokat színezék keverékekkel végzik, így nem kimondható egyértelműen, hogy ezen hatások csak az azorubinnak köszönhetőek (Lowry et al., 1994; Mikkelsen et al., 1978; Worm et al., 2000). Egyes tanulmányok - melyek metodikai kizárják a hatás addíciót - eredményei alapján ezen tünetek leggyakrabban azoknál fordulnak elő, akik alapvetően krónikus urtikáriában/angioödémában vagy asztmában szenvednek (Simon, 2003; Supramaniam és Warner, 1986; EFSA ANS, 2009b).

Viselkedési, magatartástani vizsgálatok

A tartrazinnál leírt és hivatkozott vizsgálatok többségében az azorubin is szerepelt, - változó eredménnyel - mint vizsgált mesterséges színezék (TemaNord, 2002; McCann et al., 2007; Rowe, 1988; Schab és Trinh, 2004), így ebben az alfejezetben azon vizsgálatokat részletezzük, melyek részben vagy teljes egészében az azorubin hatástanával és a viselkedésre gyakorolt hatásával foglalkoznak.

Bateman és mtsai. vizsgálták az azorubint, kettős vak, keresztezett, prospektív vizsgálatban. A vizsgálatban szereplő gyermekeket ($n=2878$) három csoportra

osztották. Majd az egyes csoportokat, színezéket tartalmazó termékekkel itatták. A színezékeket fogyasztó gyermekeknél hiperaktivitást felmérő, valamint viselkedési tesztet végeztek, majd a teszt eredményét és a fogyasztás összefüggését vizsgálták (az italok elfogyasztása előtt és után egyaránt elvégeztették a teszteket). Az adott színezékanyagokkal ellátott termékeknel a többi termékkel összehasonlítva nagyobb szintű hiperaktivitást és alacsonyabb szintű figyelem összpontosítást mértek a kutatók, ezen hatás ugyanakkor klinikai körülmények között nem nyert bizonyítást (Bateman et al., 2004; Raposa et al., 2016a).

Pollock és mtsai. ugyancsak vizsgálták a mesterséges színezékek, így az azorubin magatartástani vonatkozásait, hatásait. Vizsgálatukban 39 gyermek (n=39), kettős vak, placebo – kontrollált vizsgálatát kívánták elvégezni és a mesterséges színezékmentes étrend előnyeit felderíteni. Vizsgálatukban egy mesterséges színezékeket tartalmazó keveréket használtak (azorubin (25 mg), tartrazin (50 mg), sunset yellow FCF (25 mg) és amarant (25 mg). A vizsgálat limitációja ebben az esetben is az előzőekben említett, nem szeparálható hatásmechanizmus. Eredményeiket végül 19 gyermek (n=19) adatai adták. A „Conner”-féle teszt (ADHD Connors test) alapján mérhető hatása volt a színezékelegynek, ugyanakkor ezen hatást a szülők nem észlelték gyermekeiken (Pollock és Warner, 1990; EFSA ANS, 2009b).

Jelentős vizsgálati eredmény még a Carter és mtsai. által végzett DBPCFC vizsgálat, melyben hasonló eredményre jutottak. Az adalékanyagot fogyasztó 19 főnél (n=19) szignifikánsan rosszabb teljesítményt és viselkedési problémát figyeltek meg. Ugyanakkor ebben az esetben is színezékkeverékkel történt a vizsgálat, 1 mg tartrazine, 1 mg sunset yellow FCF, 1 mg kinolin sárga, 0,5 mg azorubin, 0,5 mg brillant kék, 0,5 mg eritrozín, 0,5 mg green S, 0,5 mg indigó karmin, 0,5 mg amarant)(Carter et al., 1993; EFSA ANS, 2009b).

Joel és mtsai. egy metaanalízis keretében vizsgálták a mesterséges színezékek ADHD hatásait. Tanulmányukba 24 vizsgálat eredményeit vetették össze, majd ebből vonták le konklúziójukat. Következésképpen megállapították, hogy a mesterséges színezékek (többek között az azorubin is) fogyasztásának korlátozása, mellőzése pozitív hatással van az ADHD tüneteire, mindemellett - bár a színezékek hatásai megfigyelhetők voltak egyes tanulmányokban – több esetben kutatási hibák, torzítás,

valamint helytelen mintanagyság választás jellemezte azokat. A pontos hatástan megismeréséhez további vizsgálatok lefolytatását tartották szükségesnek (Joel et al., 2012).

Genotoxicitás, karcinogenitás

Genotoxicitás tekintetében több *in vivo* és *in vitro* tanulmány is hasonló eredménnyel zárult, melyek alapján az azorubin hatása több esetben sem bizonyult mutagénnek. Az *E. coli* esetében, az anyagot 0,5 g/100 ml koncentrációban alkalmazva nem volt megfigyelhető mutagén hatás (Lück és Rickerl, 1960). A színezéket *Salmonella typhimurium* (TA1538) baktérium törzsön vizsgálva 50 µg/plate mennyiségben sem mutatott genotoxicitásra utaló jelet (Garner és Nutman, 1977).

A fent említett baktérium más törzseit vizsgálva - *S. typhimurium* TA1535, TA1538, TA100, TA98 - különböző koncentrációban (1, 2, 20, 500 és 1000 µg/plate/108 baktérium) sem mutatott citotoxicitásra vagy mutagenitásra utaló jelet, attól függetlenül, hogy metabolikus aktiváció történt-e vagy sem (Viola és Nosotti, 1978; EFSA ANS, 2009b).

A színezék hatását vizsgálták *Saccharomyces cerevisiae* (BZ34) esetében is. A kezelést (5mg/ml) stabil és növekedési fázisban egyaránt elvégezték, ugyanakkor az mitotikus génkonverziót nem indukált, sem szignifikáns sejthalál szám növekedés, sem sejtosztódás gátlás nem volt megfigyelhető (Sankaranarayanan és Murthy, 1979; EFSA ANS, 2009b).

In vivo vizsgálatok tekintetében eltérő eredményekről tudunk beszámolni. Egy rövidtávú („short term study”) vizsgálat alapján (5 nap) az azorubin kezelés (orális bevitel) hatására (1 vagy 10 mg/ttkg/nap) a mitózis, metafázisában lévő sejtek esetén nem emelkedett a kromoszómakárosodást szenvedett sejtek száma *C57Bl/6* törzsű egerekben (Durnev et al., 1995; EFSA ANS, 2009b).

Ezzel ellentétes eredménnyel zárult a K.A. Amin és mtsai. által végzett kutatás, melyben az azorubin biokémiai paraméterekre gyakorolt hatását vizsgálták, hím, albínó patkányokban (*Rattus Norvegicus*). Ez esetben a vese és májfunkció illetve az oxidatív stressz biomarkereit figyelték meg. A vizsgálatban vérképanalízist,

a boncolást követően a máj szöveti homogenizátumából GSH, kataláz, SOD és MDA szinteket mértek és vizsgáltak.

Eredményként az ALT, AST, ALP, karbamid, kreatinin, összfehérje és albumin szintek szignifikánsan emelkedtek a kontrollhoz képest, nagyobb expozícióban még hangsúlyosabban. A GSH, SOD, kataláz szint csökkent, az MDA szint nőtt, a az azorubin expozíció hatására. Megállapították, hogy nem csak a nagy expozíció, hanem tartós kisebb expozíció is hatással van az egyes szervek pl. vese, máj biokémiai paramétereire (Amin et al., 2010; Raposa et al., 2013).

A tartrazinnál már említett TemaNord tanulmány az azorubin esetében is széleskörben megvizsgálta az *in vivo* és *in vitro* vizsgálatok jelentősebb eredményeit, majd azokból következtetést vont le. Figyelembe véve a *Salmonella/mikroszóma* tesztek, az egér lymphoma (vad típusos TK (+/-) sejt halálozás) vizsgálatok, a kromoszóma abberáció/ testvér kromatid vizsgálatok (kínai hörcsögök ovárium sejtjei esetében), valamint DNS repair vizsgálatok (patkányok májsejtjei esetében) eredményeit, nem talált összefüggést az anyag hatástana és a genotoxicitás között (EFSA ANS, 2009b; TemaNord, 2002; Ashby és Tennant, 1988; Benigni, 1989; Cameron et al., 1987; Gulati et al., 1989; Kornbrust és Barfknecht, 1985; McGregor et al., 1988; Mortelmans et al., 1986; Shelby és Stasiewics, 1984; Sweeney et al., 1994; Tennant et al., 1986; 1987; Zeiger, 1987).

A hosszútávú, karcinogenitást vizsgáló kutatások eredménye több esetben igazolta azt a tényt, hogy az anyagnak nincs daganatkeltő hatása. Ugyanakkor Mason és mtsai. tanulmányukban nagyobb dózis hatására (1786 mg/ttkg/ nap) szignifikáns haemoglobin szint, valamint PCV érték (packed cell volume) csökkenést mértek, megemlítendő ugyanakkor a nagy dózismennyiség, hiszen ez esetben a NOAEL (no observed adverse effect level) dózismennyisége csupán 375 mg/ttkg/ nap (JECFA 1983a; b), így annak 4,7-szeres expozíciójánál volt csak megfigyelhető a fent leírt hatás (Mason et al., 1974).

Bonser és mtsai. által folytatott vizsgálatban az azorubin olajos oldatát, szubkután formában kapták az egerek (törzsre vonatkozó adat nem állt rendelkezésre) (n= 15/ nem/ csoport). A kezelés a következőképpen épült fel: 6 hónapon keresztül 2 injekció hetente (6 mg azorubin), majd 6 hónapon keresztül 2 injekció hetente (3 mg azorubin), ami összességében 468 mg dózisterhelést jelentett

a vizsgálat során. A kontrollcsoport színezékanyagmentes olajat kapott, szubkután. A 12 hónapos kezelési időt követően az állatok túlélését vizsgálták a természetes halálig. 89 héttel a kezelés megkezdése után 7 nőstény állat esetében találtak limfómát, szubkután eredetű szarkómát vagy hepatómát nem detektáltak. Mivel limfómát a kontrollcsoport esetében is találtak, így azt spontán esetként értelmezték a kutatók és konklúzióként kijelentették, hogy az anyagnak nincs hosszú távon, karcinogén hatása az egerekre nézve (Bonser et al., 1956).

A DFG (Német Tudományos Társaság) több dózisban és expozíció típusban vizsgálta az azorubint patkányok esetében (törzsre vonatkozó adat nem állt rendelkezésre). A színezéket 1%-os koncentrációban (ivóvízben feloldva), 209 napig fogyasztó állatok esetében (919 napon át vizsgálva), a színezéket 1%-os koncentrációban (ivóvízben feloldva), 250 napig fogyasztó állatok esetében (545 napon át vizsgálva), valamint a színezéket 0,2 %-os koncentrációban (ivóvízben feloldva), 417 napig fogyasztó állatok esetében (838 napon át vizsgálva) sem volt fellelhető tumor kialakulásra utaló jel, képlet.

Másik vizsgálatukban szubkután injekció formájában is lefolytatták a kezelést, melyben az állatok heti 2 alkalommal, 5 mg színezékanyagot- azorubint kaptak, 1 éven keresztül. Az állatokat összesen 938 napon át vizsgálva, egy állatnál detektáltak axilláris tumort. Az ismételt vizsgálatot lefolytatva – azonos kezeléssel és feltételekkel – nem találtak semmilyen elváltozást 521 nap elteltével. Így azt nem tekintették mutagénnek (DFG, 1957; EFSA ANS, 2009b).

Reproduktív toxikológia

A JECFA és az SCF által meghatározott napi ajánlott mennyiség (0-400 mg/ttkg/nap) mellett, – melyet már a felhasználás alfejezetben ismertettünk – legyen szó akár egy generációs, akár többgenerációs hosszútávú vizsgálatról, több esetben sem találtak karcinogén hatásra vagy reprodukivitásra gyakorolt hatást patkányokban (Holmes et al., 1978a; b; Gaunt et al., 1967).

Holmes és mtsai. egy négy generációs vizsgálat lefolytatását követően a generációk között nem találtak változást a fertilitás, életképesség, illetve a laktáció terén. Továbbá a 3b generáció egy éves kezelési periódusát követően sem figyeltek meg

abnormálitást a testtömeg változásban, vizeletmintákban, vérmintákban, hisztológiában (Holmes et al., 1978b; COT, 2006).

Egy két generációs, reprodukivitási vizsgálat ugyancsak széleskörűen vizsgálta az azorubin örökletes neurológiai és toxikológiai hatásait, magas dózisterhelés mellett patkányokban (törzsre vonatkozó adat nem állt rendelkezésre) (1200 mg/ttkg/nap). Az F1 generáció (n=15) 110-115 hétig kapta az előzőekben említett dózist (orálisan). Nem volt megfigyelhető semmilyen klinikai, viselkedésbeli vagy reprodukív toxikológiai hatás az F0 generációban. Az F1 generáció mortalitását nem befolyásolta a kezelés. A szövetminták hisztopatológiája alapján az agyban, az ülőidegben (nervus ischiadicus) és a gerincvelőben sem volt eltérést a tumor incidenciát tekintve (Ford et al., 1987, COT, 2006).

2.6. A táplálkozás hatása a tumoros elváltozások kialakulására

2.6.1. A táplálkozás és a rák kapcsolata

A krónikus, nem fertőző betegségek kockázati tényezői közé tartozó, egyik fő módosítható tényező a táplálkozás.

Doll és Peto tanulmánya szerint a helytelen, nem megfelelő táplálkozás a karcinogén elváltozások miatti összes halálozás mintegy harmadáért felelős (30-35%). Ugyanakkor az is megemlítendő, hogy ezen betegség előfordulási gyakorisága szervi lokalizáltság tekintetében eléggé eltérő, differenciált. Az egyes tápanyagok, élelmiszer összetevők közötti pontos kapcsolat amellet a mai napig nem ismert teljes mértékben. Ennek oka a daganatos megbetegedések kialakulásának hosszú időtartama (prospektív dimenzióban nagy a résztvevői kiesés, halálozás), valamint a táplálkozási és életmódbeli tényezőkre történő hosszú idejű visszaemlékezés (retrospektív dimenzióban gyakori a visszaemlékezési torzítás) (Doll és Peto, 1981; Rodler, 2008a; b).

A daganatos megbetegedések kialakulásának számtalan oka lehet, örökléstani, életvitelbeli és környezeti rizikótényezők tekintetben is. Az életvitel szempontjából olyan rizikótényezők befolyásolják a daganat kialakulását, mint a dohányzás, alkoholfogyasztás, táplálkozás.

A táplálkozás, mint befolyásoló faktor, jelentős oki tényező a daganatos betegségek kialakulásában. Míg a gyomor és vastagbél érintettsége 35-70%, addig az

epehólyag, a hasnyálmirigy és az emlő 50%-ban, a tüdő, hólyag, száj és garat valamint a nyelőcső mintegy 20%-ban érintett a táplálkozás kapcsán (*részletesen a 3. ábra alapján*). A helytelen táplálkozási faktorok és táplálkozással összefüggő kóros állapotok, mint a magas energiabevitel, magas telített zsírsav bevitel, az antioxidánsok, vitaminok és élelmi rostok csökkent fogyasztása, mind hajlamosító és rizikótényező lehet a daganatos betegségek kialakulásában.

Ezen betegségek nagy része tehát megelőzhető a primer prevenció eszközeivel, helyes táplálkozással. Az egészségfejlesztésre és az egészséges táplálkozásra való nevelésre már fiatal korban nagy hangsúlyt kell fektetni (Willet, 2000; Anés et al., 2008; Rodler, 2008a, Ember et al., 2013b).



3. ábra: Táplálkozás következtében kialakuló daganatos halálozások (%)

Forrás: Willet, 2000

Összefoglalva az élelmiszer-adalékanyagokkal, színezékekkel, valamint a táplálkozási tényezők rákkal kapcsolatos szakirodalmát, kijelenthetjük, hogy korunk élelmiszerei bonyolult komponensű komplexek. Tápanyagok, illetve a gyártás során élelmiszerbe jutó adalék és segédanyagok határozzák meg felépítésüket.

Számos kutatás foglalkozik egyes elemek állatkísérletes és humán vizsgálatával, de ezekben az esetekben csak annak az egy összetevőnek vizsgálhatók élettani vagy akár génexpressziós hatásai. Ezért is indokolt vizsgálni a jövőben az élelmiszerek és

azok csoportjainak együttes hatását, mivel egyes anyagok esetében feltételezhető karcinogén hatás addíció.

2.6.2. Táplálkozási tényezők epigenetikai vonatkozásai

Az epigenetika a 21. század egyik újkeletű tudományága, amely a gének olyan öröklődési formáját vizsgálja, mely nem jár a DNS nukleotid sorrendjének megváltozásával.

Az epigenetika mindemellett arra a kérdésre keresi a választ, hogy a szülőket ért környezeti behatások és azok molekuláris következményei, hogyan befolyásolják az utódok génkifejeződését. Részben az epigenetikához kapcsolható tudományág a nutrigenomika, mely az egyes táplálkozás faktorok és az emberi genom interakciójával foglalkozik (Ember et al., 2007; 2013a, Simopoulos és Ordovas, 2004).

A gének expressziójának regulátorai lehetnek az egyes élelmiszerkomponensek, így a makro- és mikronutriensek (pl: ásványi anyagok, zsírsavak) antinutritív anyagok, fitokemikáliák, táplálék komponensek anyagcsere termékei (pl: eikozanoidok) vagy az egyes szervezetben végbemenő folyamatok anyagcsere és melléktermékei (pl: ecetsav, propionsav, vajsav, izovajsav, valeriánsav, izovaleriánsav), az ételkészítési eljárás melléktermékei (pl: heterociklikus amin - HCA), vagy akár az egyes élelmiszer-adalékanyagok is.

A génexpresszió tápanyagfüggő szabályozása olyan módon történhet, hogy a gén működését, annak transzkripcióját a táplálék egyes összetevői befolyásolják (*lásd a 3. táblázatban*) (Harlés et al., 2005, Bíró et al., 2008).

Célhely	Szabályozó tápanyag
Génátírás	Zsírsavak, glükóz, koleszterin, retinoidok, D-vitamin
mRNS stabilitása	Zsírsavak, glükóz, szelén, vas
mRNS feldolgozása	Többszörösen telítetlen zsírsavak, glükóz
mRNS átírása	Vas, aminosavak
Átírás utáni módosítás	Vitaminok, ásványi anyagok

3. táblázat: Szabályozó tápanyagok és célhelyeik

Forrás: Bíró et al., 2008

A vizsgálatban felhasznált metilációs markerek jellemzőit részletesen a későbbiekben ismertetjük.

2.7. Karcinogenezis és a daganatkeletkezési modell jellemzői

2.7.1. A sejtosztódás

Az élő sejtek fő mechanizmusai közül megkülönböztetjük a nyugalmi állapotot, az osztódást (proliferáció) és a sejt elhalást, programozott sejthalált, más néven apoptózist. Normál esetben, valamint fiziológias körülmények mellett a proliferáció és az apoptózis arányban van egymással. A proliferáció során DNS replikáció történik, azaz a sejt genetikai állománya duplikálódik. Ha a jelátviteli rendszer, a transzkripció rendszere vagy folyamata defektust szenved, úgy az osztódás illetve az aktív sejthalál kontrollálatlanná válik.

Genetikai állományunkat folyamatos károsodások, törések érik, melyeket celluláris szinten a DNS repair mechanizmus javít ki (karcinogenezis egyik oka DNS repair defektusa).

Amennyiben sem az apoptózis, sem a DNS repair nem képes kiküszöbölni a DNS-t ért károsodást, úgy az sejtburjánzáshoz és a daganatos betegség kialakulásához vezethet (a sejt növekedését és osztódását befolyásoló proto-onkogének és tumorszuppresszor gének valamint a mutátorgének károsodásán kívül).

A normális sejtosztódástól a daganatos sejtosztódás folyamata nagyban eltér (Krémer et al., 2001; Gomba et al., 1997).

2.7.2. Karcinogenezis: a tumor kialakulás folyamatának tényezői

A daganat kialakulás egy több lépcsős, bonyolult folyamat. A környezeti illetve kémiai karcinogének a DNS-hez csatlakozva adduktokat képeznek (direkt karcinogének és prokarcinogének – utóbbi esetben a metabolikus aktivációval jön létre a reaktív metabolit).

A daganat kialakulását elősegítő mutációk háromféle géncsoport állományát érinthetik, ezek a tumorszuppresszor gének, a proto-onkogének és a mutátorgének. A tumorszuppresszor gének esetében a defektus a sejtosztódás mechanizmusának

szabályozását érinti, bekövetkezésekor a normál sejtciklus kontrollálása kerül veszélybe. A proto-onkogének illetve azok anyagszertermékei a sejtosztódás stimulálását végzik. Mutáció esetén onkogénné transzformálódnak, melyek egyes esetekben folyamatos aktiváció alatt állhatnak, más mutáció típusok esetén emelkedett mennyiségben termelődhetnek. A mutatórgének a DNS különböző hibáinak korrigálásában játszanak szerepet, ezen faktorok hibás funkciójának esetén a genomban rögzülhetnek a daganat kialakuláshoz vezető mutációk (Ember et al., 2013b)

Az onkogenezis komplex rendszerében több olyan kóros mechanizmus került már detektálásra, melyekhez szorosan köthető a daganat kialakulás. Ilyen kóros mechanizmus a fokozott növekedés, mely egyrészt a növekedési faktorok overexpresszióján alapul (pl: EGFR, epidermális növekedési faktor) másrészt növelheti a sejtek növekedési stimulusokra vonatkoztatott szenzitivitását (c-erb-B2) (Stern et al., 1986).

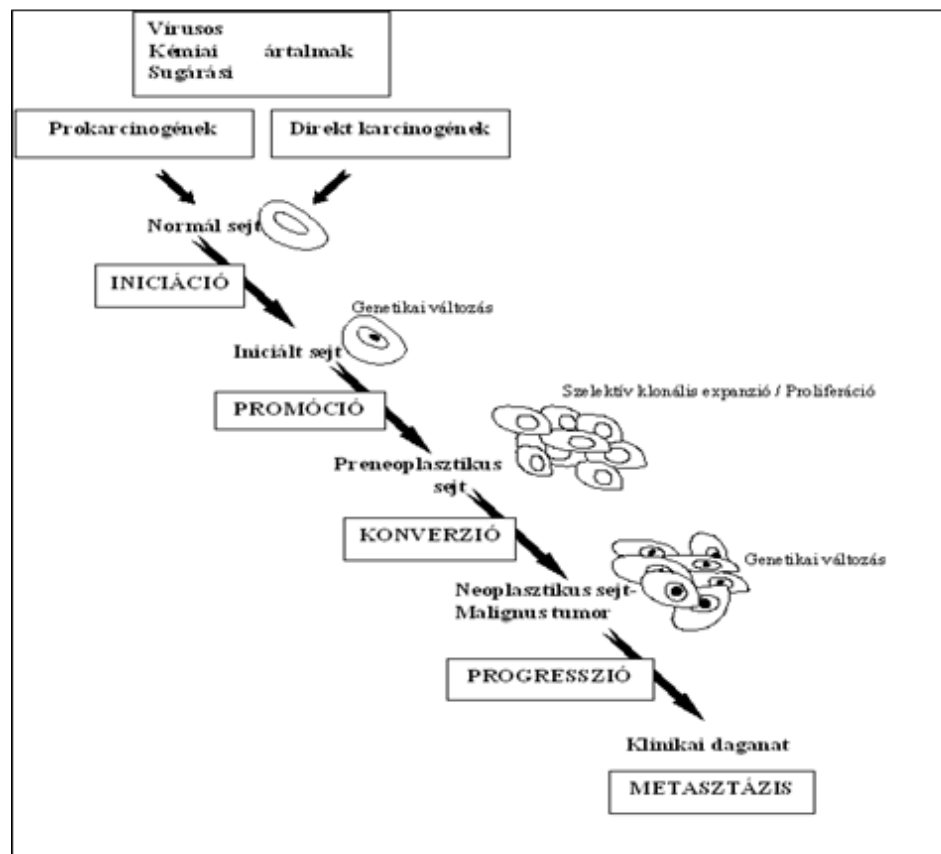
Ismert továbbá az egyes onkogének hiányzó GTP-áz aktivitásának következménye is, mely a növekedési faktor jelátvitelének túlműködéséhez vezethet (*ras*) (Medarde és Santos, 2011). Továbbá bizonyos fehérjék ezúton történő overexpressziójához (c-sis) (Liu et al., 2001). Mindemellett számos onkogén segítheti a sejtciklusba történő belépést (*c-myc*) (NCBI, 2017).

Ilyen mechanizmus még a tumorszupresszor gének gátlása is, mely történhet a kontakt gátlás megszűnése útján, a növekedést aktiváló jelátvitel alulreguláltságának hiánya esetén vagy akár a sejtciklus kontrolláltságának hiányából adódóan. A *p53* esetében a sérült DNS javításához szükséges, sejt proliferáció gátlás feletti kontroll hiánya okozza a kóros folyamatot (Balajthy et al., 2011; Kopper, 2005; Rodler, 2008a).

Fontos megemlíteni még az apoptózis gátlásának mechanizmusát, mely egyes esetekben a transzlokáció által aktivált, apoptózist gátló gének overexpresszióján alapul (*bcl-2*) (Tsujimoto et al., 1984; Ember et al., 2013b; Varga, 2002)

Bár a tumor kialakulás hosszú latenciaidejű, akár évekig eltartó folyamat lehet, a biomarkerek segítségével kromoszómális és DNS-t érintő változásaik már korai stádiumban megfigyelhetőek.

A klinikai daganat kialakulásának főbb szakaszait a **4. ábra** szemlélteti.

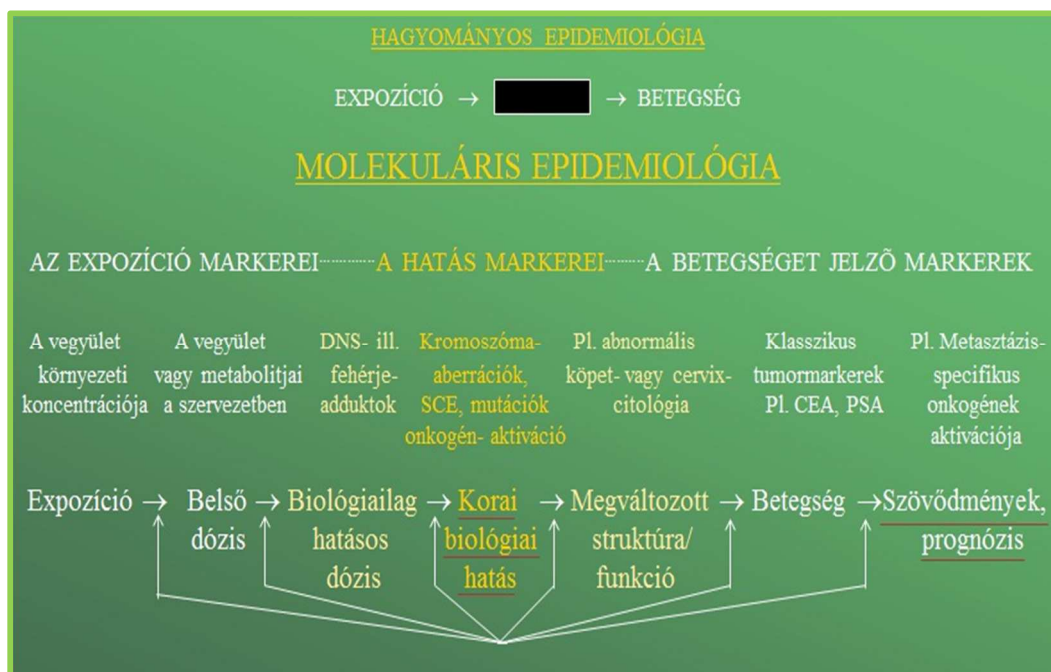


4. ábra: A karcinogenezis többlépcsős folyamata
 Forrás: Ember et al., 2013b

2.7.3. Biomarkerek, mint a vizsgálat indikátorai

A biomarkerek, olyan biológiai paraméterek valamint anyagcsereközti-termékek (metabolitok) lehetnek, melyek jelenléte normális valamint kóros folyamatokat, kezelésekre adott válaszokat jeleznek és mértékük értékekkel kifejezhető, objektívan megállapítható.

A biomarkereket leggyakrabban több főcsoportba osztják, több klasszifikáció ismert (5. ábra), Az egyes kategóriák között vannak bizonyos átfedések, mivel az expozíció és az adott betegség közötti kapcsolat egyénenként eltérő lehet (Ember et al., 2013c).



5. ábra: A hagyományos epidemiológia és a molekuláris epidemiológia dimenziói
 Forrás: Ember et al., 2013c

Így megkülönböztetjük a belső dózis biomarkereit. Ezek esetében napjaink szenzitív immunoassay-i lehetőséget adnak arra, hogy a kémiai karcinogéneket szövetmintából, metabolitjaikat vér és vizelet mintából már alacsony koncentrációban is mérhessük. Ugyanakkor az is fontos, hogy a mért összetételi arány a célsejtekkel való kölcsönhatásra nem utal. Már itt is nagy jelentőségűek az egyéni fiziológiás különbségek, a vegyület abszorpciója, szervezeten belüli metabolizmusa, kiválasztása (pl.: dohányosok esetében a nikotin metabolitjának a kotininnek a kimutatása).

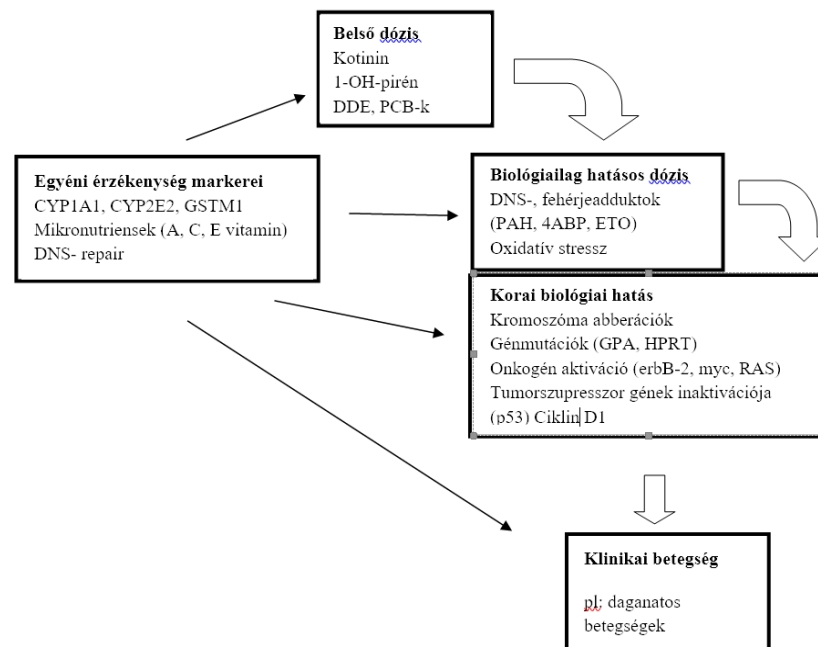
A következő dimenziót a biológiailag hatásos dózis biomarkereivel jellemezhetjük. Ebben az esetben az a dózis mérvadó, mely a betegség kialakulásában szerepet játszó szervet elérte. Gyakorlati tekintetben a biológiailag hatásos dózis a célsejtekhez eljutott anyagmennyiség. A kimutatható specifikus karcinogén DNS/fehérje adduktok mérése nemcsak az abszorpció és disztribúció egyéni különbségeit fejezi ki, hanem az adott vegyület metabolizmusát és DNS repair mechanizmusra gyakorolt hatását is (Ember et al., 2013c; Fehér et al., 2008).

Ezt követi a korai biológiai hatás és azok biomarkerei. Ezek a vizsgált betegséggel kapcsolatos korai változásokat jelzik. Hasonlóan az előzőekben

elmondottakhoz, ezen hatások is direkt módon mérhetők a célsejtekben. Megjelenésük és mennyiségük arányos a betegség kialakulásának kockázatával. Karcinogenezis esetében a mutagén változás többféle módja ismert, lehet génszintű, pontmutáció, génamplifikáció. A mutagenitás lokalizációja lehetőséget ad a kialakító ágens azonosítására. A mutációk spektrumának ismeretében pedig lehetőség nyílik azok etiológiájának feltárására.

Az utolsó dimenzióban az egyéni érzékenység biomarkereit a „főszerep”. Egyénenként változó, hogy milyen a karcinogén anyag metabolizmusának mértéke, milyen módon működik az expozíciónak kitett egyén DNS repair mechanizmusa, milyen a proto-onkogének és tumorszupresszor gének polimorfizmusa,- működésük nagyban függ az egyén egészségi állapotától, immunrendszerének stabilitásától (Ember et al., 2013c, Fehér et al., 2008).

Meg kell említenünk, hogy a daganatok vonatkozásában jelenleg nem rendelkezünk globálisan alkalmazható, daganatspecifikus biomarkerrel, ezért széleskörű kutatás folyik, a prevenció és a diagnosztika illetve a célzott molekuláris terápia fejlesztése irányába. Fontos tény, hogy az egyes szakaszokban (exp. → betegség) ismertek alkalmazható markerek, de azok felhasználhatósága nem a daganat kialakulás egészére terjed ki (*részletesen lásd 6. ábra*).

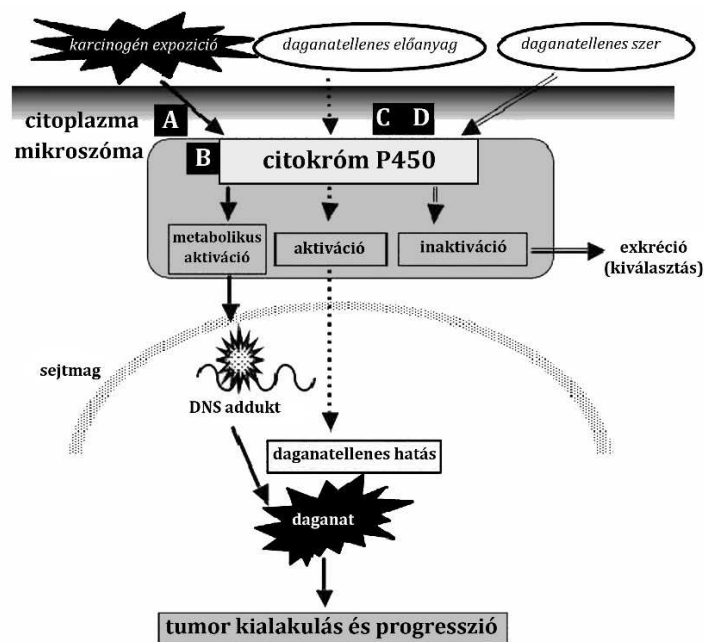


6. ábra: A biomarkerek főbb kategóriái
Forrás: Ember et al., 2013c

A citokróm P450 enzimcsalád

A citokróm P450 vegyes funkciójú, exogén és endogén szubsztrátok oxidációjáért és a szteroid hormonok metabolizmusáért felelős mono-oxigenáz enzim család.

A CYP450 enzimek vastartalmú fehérjék, esetükben a vasion a vas-protoporfirin IX (hem) komplexként kapcsolódik az enzim fehérjéhez. Az enzimcsalád minden tagját összességében egy polipeptid lánc alkotja, mely egy hidrofób, elektrosztatikus és kovalens kötéssel kapcsolódó hem gyűrűt tartalmaz. Jelenleg 57 tagja ismert, melyek a koleszterin, a szteroid, valamint a lipidszintézis mellett a gyógyszermetabolizmusban is szerepet játszanak (Smith et al., 1998; Nelson et al., 2004)(7. ábra).



7. ábra: A citokróm P450 működési mechanizmusa a daganatos betegségek kialakulásában

Forrás: Tsunehiro et al., 2008

A CYP1A1 jellemzői

A CYP1A1 gén, a sejt endoplazmatikus retikulumának egyik fehérjéjét kódolja, AHH-ként (aril szénhidrogén hidroxiláz) is közismert enzim. Fontos

szerepet tölt be a policiklusos aromás szénhidrogének metabolikus aktivációjában. Endogén szubsztátjai részt vesznek a szteroidok, a zsírsavak valamint a koffein, phetidin, phenacetin oxidációjának katalizálásában is (Ma és Lu, 2007, Badal és Delgoda, 2014). Működését tekintve hozzájárul a xenobiotikumok és a gyógyszerek valamint a policiklikus aromás szénhidrogének metabolizmusához.

Katalizáló működésére jó példa a benzopirén epoxidba történő átalakulási folyamata. A reakció során a benzopirén oxidációját katalizálja a *CYP1A1*, így a vegyület először BP-7,8 epoxiddá alakul, majd az epoxid hidroláz BP-7,8-dihydrodiollá alakítja. Végül a *CYP1A1* katalizációja következtében alakul ki végleges, karcinogén formája a BP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (Beresford, 1993). Reguláció szempontjából a *CYP1A1*, a *CYP1A2* és a *CYP1B1* gének szabályozását az aryl hidrokarbon receptorok végzik egy ligés aktivált transzkripcós faktorial. A *CYP1A1* fokozott működése, metabolizáló funkciója révén több humán karcinómában is megfigyelhető (tüdőrák, emlőrák, vastagbélrák, méhtrák, bazálsejtes karcinóma) (Raposa et al., 2013; 2016a; Badal és Delgoda, 2014, Go et al., 2015).

A *CYP2E1* jellemzői

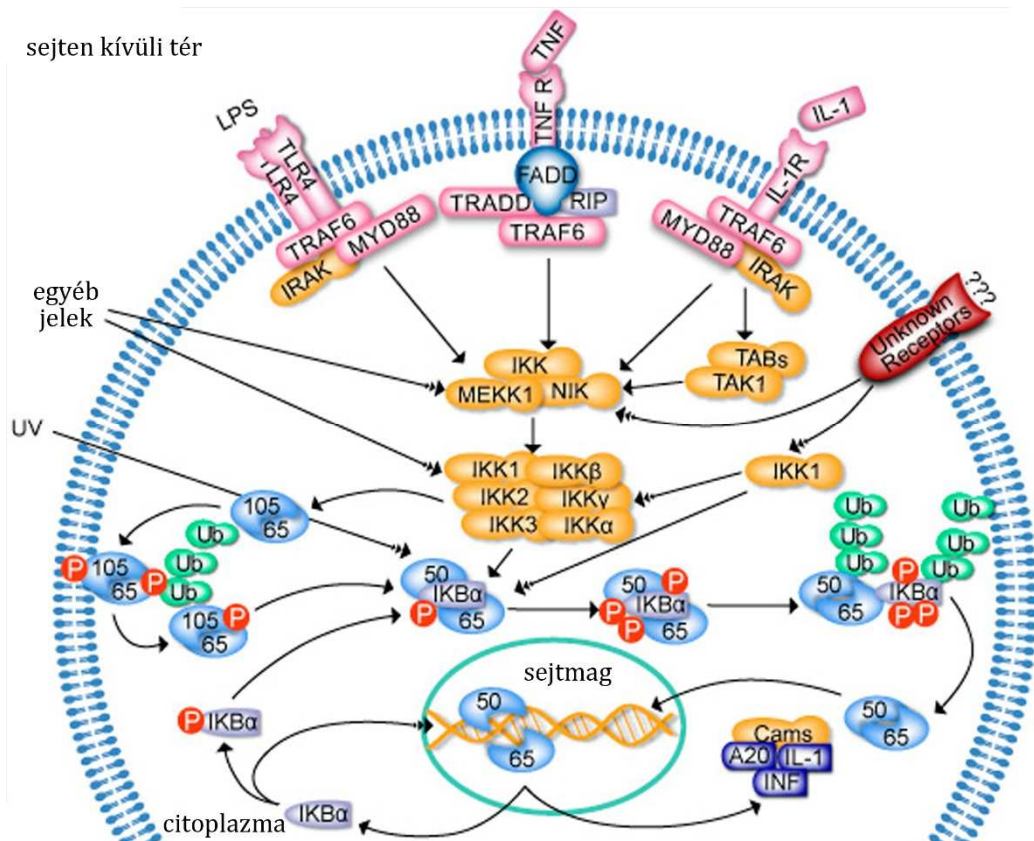
A Citokróm P450 2E1 gén által kódolt, kevert funkciójú oxidázrendszerrel rendelkező membrán fehérje, enzim, a xenobiotikumok anyagcseréjében játszik szerepet. Nagy mennyiségben a májban található meg, ahol az összes citokróm P450 mRNS 50%-át, a citokróm P450 fehérje 7%-át teszi ki ezen izoforma (Bièche et al., 2007; Shimada et al., 1994). A legtöbb gyógyszer deaktiválásában részt vesz direkt és indirekt módon. Az oxidációs anyagcserében, a szubsztátok csak egy kis részét érinti (javarészt kisebb poláris molekulák) (Kessova és Cederbaum, 2003).

A *CYP2E1* ugyancsak az endoplazmatikus retikulumban található (hasonlóan a *CYP1A1*-hez), endogén szubsztátjai: aceton, acetol, exogén szubsztátjai az acetaminophen, halothan, isofluran, paracetamol, benzén, anilin, nitrosamin, etanol és metanol (Tomaszewski et al., 2008). A máj *in vivo* vizsgálata során bizonyították a *CYP2E1* szerepét az alkohol kiváltotta oxidatív stressz kialakulásában, mely zsírmáj kialakulásához vezetett (Lu et al., 2008).

Sejtciklus szabályozásában résztvevő gének, kinázok jellemzői

Az *NF-κB* (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) jellemzői

Az *NF-κB* egy Toll-like receptorokon, $TNF\alpha$, tirozin kináz receptoron és adhéziós receptorokon (pl. T-sejt receptorok) keresztül aktiválódó transzkripciós faktor, elsődlegesen a sejttúlélést és a sejtproliferációt segíti elő. Széleskörű receptorális aktivációja lehetővé teszi, hogy többféle hatásra adott választ indukál (bakteriális, virális antigének, lymphotoxin, $TNF\alpha$, UV, szabadgyökök). Működési mechanizmusát tekintve, aktivációjakor a sejt túléléséhez szükséges antiapoptotikus folyamatokat segíti elő, ezen kívül az apoptotikus folyamatokat gátló fehérjék átíródását serkenti (Gilmore, 2006; Brasier, 2006; Liu et al., 2012, Raposa et. al., 2016)(8. ábra).



8. ábra: Az *NF-κB* működési mechanizmusa (intracelluláris dimenzióban)
 Forrás: http://www.genecopoeia.com/product/search/pathway/h_NF-κBPathway.jpg

Normál esetben nagyon kis mértékben expresszálódik a sejtekben, illetve a jelen lévő *NF-κB* fehérje egy öt inaktív IκB komplexhez (Inhibitor kappa B $\alpha + \beta$

egységhez) kapcsolódva található a sejt citoplazmájában. Aktivációkor ezt a kötést egy úgynevezett NEMO (IKB γ komplex) lelassítja (foszforilálja az IKB $\alpha+\beta$ -t az IKK segítségével) és az *NF-KB* p50-p65 alegységek felszabadulnak, ezt követően transzportálódnak a sejtmagba, ahol transzkripció aktivátorként és promoter specifikus aktivátorként szerepelnek az antiapoptotikus fehérjék átírásakor, illetve a proapoptotikus fehérjék transzkripció represszorai (Vlahopoulos et al., 2015; Perkins, 2007; Tian és Brasier, 2003; Sheikh és Huang, 2003).

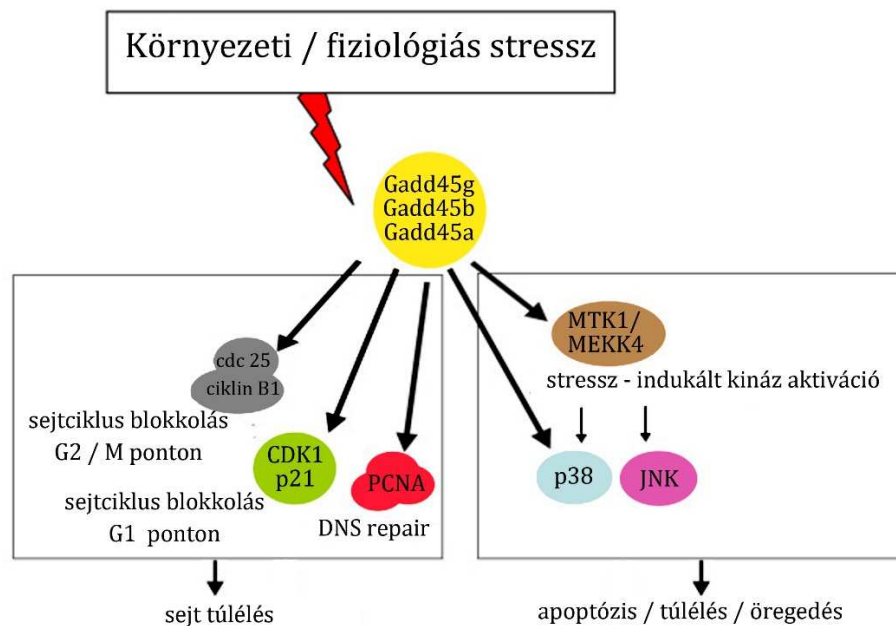
Jelátviteli kapcsolattrendszere nagyon kiterjedt, széleskörű. Összeköttetésben áll a *RAS* onkogén jelátvitellel, a *MAPK*, *JNK*, *ERK* apoptotikus jelátvitellel, a *SAPK*, *p38* jelátvitellel (Escárcega et al., 2007). Direkt módon szabályozza a Ciklin D1 kifejeződést (epitheliális szöveti architektúra kialakulása) a PPAR γ kifejeződést és közvetetten számos más transzkripció faktort és sejtciklus szabályozásban résztvevő gént (Meffert et al., 2003; Gombos et al., 2007). Számos vizsgálat bizonyította, hogy különböző típusú daganatok - pajzsmirigy (Gombos et al., 2007; 2011), emlő (Ahmed et al., 2006), uroepitheliális és intesztinális daganatok (Carrabino et al., 2006), fej-nyaki daganatok (Chung et al., 2006), nazofarinx (Li et al., 2017) valamint Barrett özofágusz - esetén (Abdel-Latiff et al., 2005; 2008) az *NF-KB* kulcsszerepet játszik a jelátvitelben.

Kifejeződése primer tumor sejtvonalakon egyenes arányú összefüggést mutatott a malignitás fokával: pajzsmirigy NPA (papilláris cc), WRO (follikuláris cc), FRO (anaplasztikus cc) sejtek. Az *NF-KB* állandó aktivációja a tumorsejtekben klonális szelekciónál kézenfekvően óriási előnyt jelent (Gombos et al., 2007, Pacifico és Leonardi, 2010).

A *GADD45a* (growth arrest és DNA damage inducible gene) jellemzői

A *GADD45* családjába tartozik a *GADD45a*. A génterméket, fehérjét a *GADD45a* gén kódolja. Ezen fehérjék (*GADD45*) számos sejtben belüli szabályozási feladatot látnak el, úgy mint a DNS repair, a normál sejtciklus és az öregedés. A *GADD45* gének transzkripció szintje emelkedést mutat stressz indukálta növekedési állapotok (környezeti stressz) és a DNS károsodást okozó mutagén faktorokkal történő kezelés hatására. A *GADD45a* gén, DNS károsodás okozta transzkripcióját

p53 dependens és attól független mechanizmusok is szabályozzák (Raposa et al., 2016a, Papathanasiou et al., 1991, Hollander et al., 1993)(9. ábra).



9. ábra: A A *GADD45a* működési mechanizmusa környezeti stressz hatására
 Forrás: Liebermann és Hoffmann, 2008

Funkcióját tekintve kötődhet a proliferáló sejt nukleáris antigénjéhez, lehetséges a PCNA-val történő interakciója CDK komplex jelenlétében, kötheti a *GADD45A*-hoz a PCNA-t (CDK komplexumból mozdítja ki), kettős szálú DNS károsodás esetén aktiválódik, stimulálja a DNS repairt és az apoptózist, gátolja a sejtek S fázisba történő lépését. A *GADD45A*, *GADD45B* és a *GADD45G* köti az Mtk1 kináz N-terminális tartományában, emellett a kináz tevékenységet aktiválja. A *GADD45G**IP1*-el történő kölcsönhatása is ismert (Tamura et al., 2012; Smith et al., 1994). Patológiáját tekintve a GADD45 indukciója ataxia telangiectáziás (Louis Bar-szindróma) sejtekben rendellenes (Kastan et al., 1992).

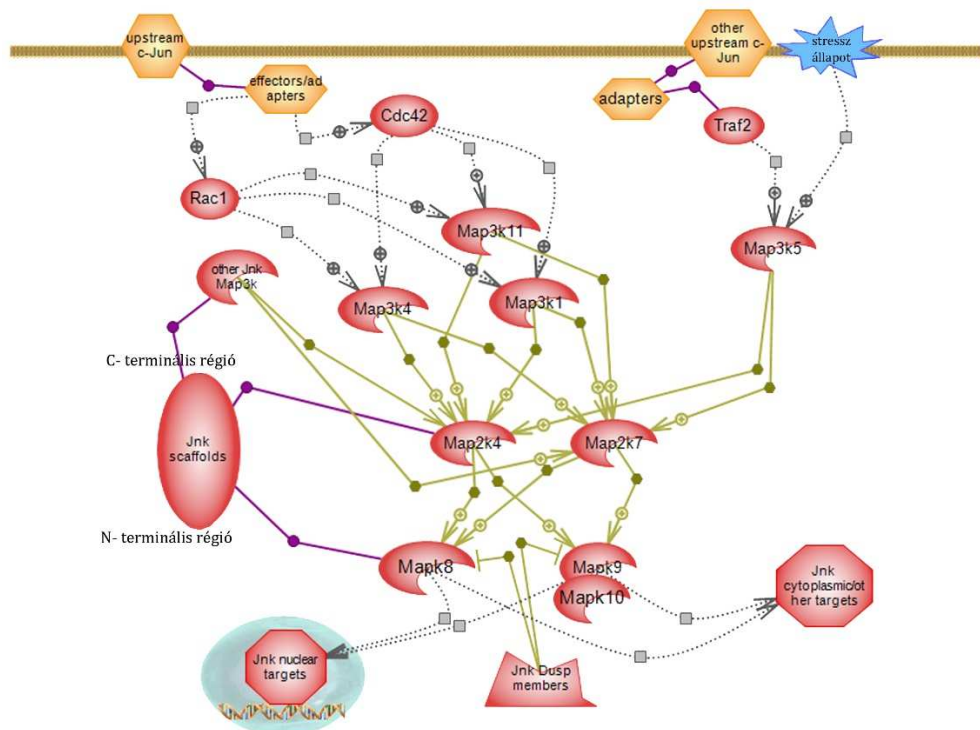
A *MAPK8* (Mitogen-activated protein kinase 8) jellemzői

A mitogén aktiválta protein kináz (MAPK) útvonal, különböző ugyanakkor nagyon sokféle sejten kívüli jel továbbításában játszik szerepet, így számos a sejten belül végbemenő mechanizmust befolyásol, regulál úgy, mint a növekedési

folyamatok, gyulladásos mechanizmusok vagy akár az apoptózis. A MAPK kaszkádrendszer kisebb alegységekből felépülő struktúrát mutat, mely több egymást követő foszforillációs lépésből áll. Ezen kaszkádot olyan kettős szelektív szerin/treonin valamint tirozin kinázok alkotják, melyek foszforillációja útján aktiválódnak a rendszert alkotó további kinázok. A folyamat utolsó kinázai a MAP kinázok, melyet az előtte elhelyezkedő *MAP2K* vagy *MKK* aktivál, melyet az *MAPKKK* vagy *MAP3K* foszforillál, amennyiben a receptor felől érkező jel indukálja azt (Zhang és Liu, 2002, Zhou et al., 2015, Pimienta és Pascual, 2007).

A leginkább ismert és gyakran vizsgált MAPK útvonal a *p38*, a *JNK* és az *ERK*, ezen jelátviteli utak az utolsó kinázokról kapták elnevezésüket. A *JNK* és a *p38* útvonalnak leginkább a gyulladásos folyamatok során betöltött szerepükről ismertek. A MAPK útvonal illetve a *MAPK8* több daganatképződéssel és genotoxikológiával foglalkozó kutatás alapját képezi. A *p38* MAPK szerepét detektálták már *VCAM-1* és az *MCP-1* expresszióban is (Makó, 2011; Hoefen és Berk, 2002)

A *MAPK8* gén, egérpárokkal végzett tanulmányaiban említik a kináz szerepét a T-sejtek proliferációjában, apoptózisában és differenciálásában egyaránt (Klock és Herrmann, 2002; Banning et al., 2014)(10. ábra).



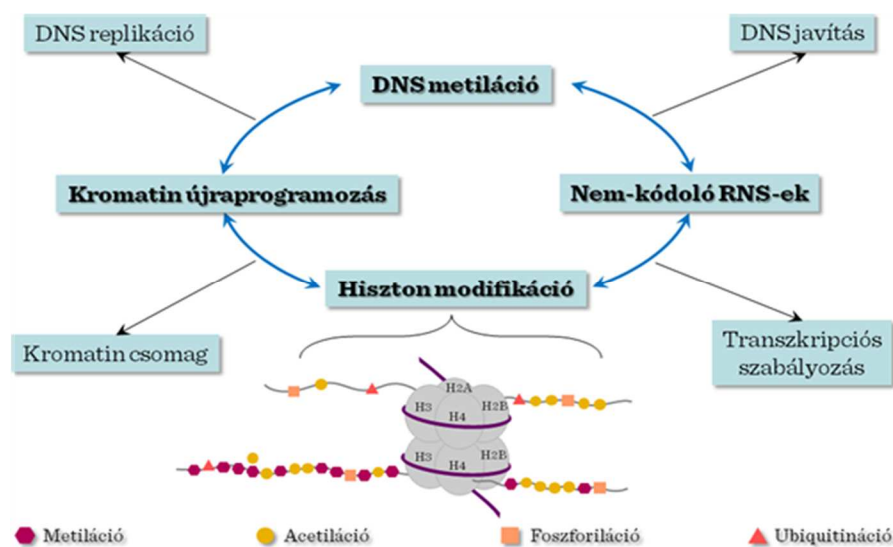
10. ábra: C-Jun N-terminális kinázok és a MAPK jelátviteli út

Forrás: http://rgd.mcw.edu/rgdweb/pathway/pathwayRecord.html?acc_id=PW:0000313

Epigenetikai biomarkerek jellemzői

A genom epigenetikai regulációjának meghatározója a kromatin újrendeződés és a hiszton módosulások. A hiszton módosulások posztranszlációs módosítások a hiszton globuláris doménjén. A nukleoszómákat alkotó hiszton fehérjék két fő részből állnak, egy globuláris C-terminális és egy struktúrátlan, flexibilis N-terminális részből. A hisztonok N-terminális részei, melyek kilógnak az oktamer nukleoszóma magból, többféle posztranszlációs kémiai módosuláson mehetnek keresztül. Ezen módosulások a következők lehetnek: metiláció, acetiláció, citrulláció, ubiquitináció, foszforiláció, sumoiláció.

Az előzőekben említett kromatin szerveződésre valamint a transzkripció regulációjára hatást gyakorló mechanizmusok és azok részletei még nem ismertek teljes mértékben. Ugyanakkor a jelenlegi elképzelés szerint a módosító enzimek és az átalakító faktorok úgy alakítják át a kromatint, hogy további cis és trans kapcsolódások, kötések jönnek létre. Ezek a kötés újraszerveződések a DNS és egyben a kromatin teljes struktúráját megváltoztatják. Fontos megemlíteni, hogy ezen módosulások újabb fehérje komplexekkel való kapcsolatot indukálnak, melyek konformációs változást hoznak létre a kromatin szerkezetében. Az új kapcsolatok pedig nagyban befolyásolják a kromatin tulajdonságait, valamint magasabbrendű szerveződését (Ember et al., 2013b; Balogh és Engelmann, 2011)(11. ábra).



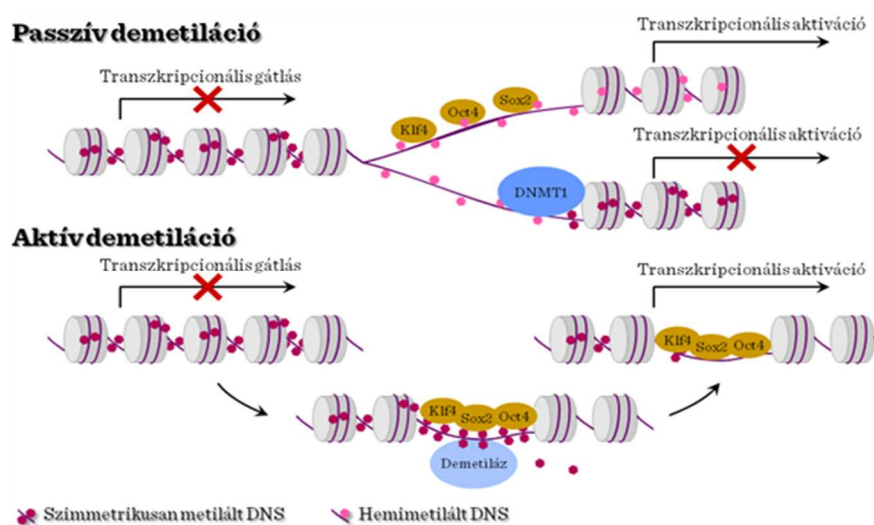
11. ábra: A genom epigenetikus szabályozása
Forrás: Balogh és Engelmann, 2011

A DNS metiláció és a metil-transzferázok

A DNS metiláció az emberi genom előzőekben már ismertetett módosulása, mely nincs hatással a DNS szekvenciára, ugyanakkor regulálja. A tudomány mai állása szerint a DNS metilációnak több intracelluláris folyamatban is szerepe van, ilyen a szövetspecifikus génexpresszió, sejtdifferenciálódás, a genomi imprinting vagy akár az X kromoszóma inaktiváció, az öregedés (Esteller, 2008, Bibikova et al., 2006).

A DNS-metiláció során a citozin pirimidin gyűrűjének szénatomjához a DNS-metiltranszferáz enzimek segítségével metil csoport kapcsolódik. A folyamatot a DNS-metil-transzferáz családba tartozó enzimek (*DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*) katalizálják. Ez a metiláció a CpG dinukleotidok (citozin - guanin nukleotid szomszédos) esetében figyelhető meg. A CpG dinukleotidok egyenletesen vannak jelen- CpG szigetekben csoportosítva - a genomban (Yoder et al., 1997).

Az emberi gének megközelítőleg 50%-ának promoterében CpG-sziget van, melyek általában metilálatlanok. Abnormális metilációjuk - a génműködés szabályozásának megváltoztatásával - daganatos megbetegedések kialakulásához vezethet. Ezzel szemben a normál sejtekben a promótereknek csak 5%-a metilált, prezentálva, hogy az epigenetikus jelek nem uralkodó folyamatok. Az intragenikus CpG dinukleotidok növelik a transzkripciót és/vagy aktiválják az alternatív promótert (Hung és Shen, 2003; Eden és Cedar, 1994; Balogh és Engelmann, 2011)(12. ábra).



12. ábra: Az aktív és passzív demetiláció folyamata
Forrás: Balogh és Engelmann, 2011

A metiláció és daganatos megbetegedés közötti kapcsolatot már régóta tanulmányozzák. Abnormális metilációt okozhatnak többek között a környezeti hatások, a táplálkozás (nutrigenomika) és egyéb úton a szervezetbe jutó karcinogén anyagok. Normál, fiziológiás állapotban a genomban előforduló CpG szakaszok demetiláltak maradnak, ezáltal nem vesznek részt a génműködés regulációjában (5%). Azok a különálló CpG dinukleotidok, melyek egy gén promóter régiójában lokalizáltak és hordoznak valamilyen szövetspecifikus metilációs mintázatot, demetilálódhatnak, így fokozhatják az adott gén kifejeződését. Amennyiben protoonkogének is felszabadulnak a metilációs gátlás alól, úgy azok daganatképződést indukálhatnak (Esteller, 2008, Baylin és Herman, 2000).

Az első identifikált metil-transzferáz a *DNMT1*, amely DNS-replikáció során a DNS metiláció újra szintetizált szálának pontos kópiájáért felel. A *DNMT1* expresszió egy pontosan regulált folyamat a sejtciklusban. Transzkripció szempontjából, a *DNMT1*-nek két transzkripciós változatát detektálták: egy teljes hosszúságú aminosav és egy petesejt specifikus variáns formában. Fontos megemlíteni, hogy *DNMT1* de novo metilációra képes. A *DNMT1* döntőrészt a metiláció transzkripciójáért felelős. (Delpu et al., 2013; Denis et al., 2011)

A *DNMT3A* és a *DNMT3B* más néven *de novo* metil-transzferáz, amely kiemelten fontos szerepet játszik az embrionális fejlődésben. A *DNMT3A* és a *DNMT3B* a DNS metiláció folyamatáért felelős. Ezek a metil-transzferázok, az embriogenezis során magasan expresszálódtak. A *DNMT3A* két enzimatikusan aktív fehérjeterméket kódol, míg a *DNMT3B* gén két aktív és három inaktív izoformát. A de novo metiláció egy kritikus fejlődési folyamat az embrionális fejlődés során, aminek folyamán a *DNMT3B* defektusa, hiánya halálos kimenetelű lehet.

A humán daganatok többségében az előzőekben bemutatott három DNS-metil-transzferáz emelkedett mRNS és fehérje expressziós szintje jellemző. A tumor szupresszorgének hipermetilációja korrelál a DNS-metil-transzferázok magas expressziójával. Vizsgálati eredmények alapján a tumoros elváltozások kialakulását ezen enzimek túltermelődése előzi meg. A *DNMT3A*-ban előforduló káros mutációk okozta daganatok ugyanakkor ritkák, azonfelül általában rossz prognózisúak.

Állatkísérletekben kimutatták, hogy a *DNMT1*-ben bekövetkező heterozigóta mutációk a DNS metiláció csökkenését eredményezték, továbbá csökkentették az intesztinumot érintő tumorok fejlődését, emellett növelték a lymphomagenézis kockázatát (metilációs szintjének változása különböző hatásokkal bírhat). A tüdődagyanatos rágcsáló modellben pedig a *DNMT3A* deléciója elősegítette a tumor progresszióját (Keith, 2001; Antúnez et al., 2014). A DNS-metil-transzferázok gén szimbólumát és kromoszómális lokalizációját a **4. táblázat** szemlélteti.

DNS-metil-transzferáz-1	DNS-metil-transzferáz-3A	DNS-metil-transzferáz-3B
Gén szimbólum: <i>DNMT1</i>	Gén szimbólum: <i>DNMT3A</i>	Gén szimbólum: <i>DNMT3B</i>
A gén kromoszómális lokalizációja: 19p13.2	A gén kromoszómális lokalizációja: 2p23.3	A gén kromoszómális lokalizációja: 20q11.21

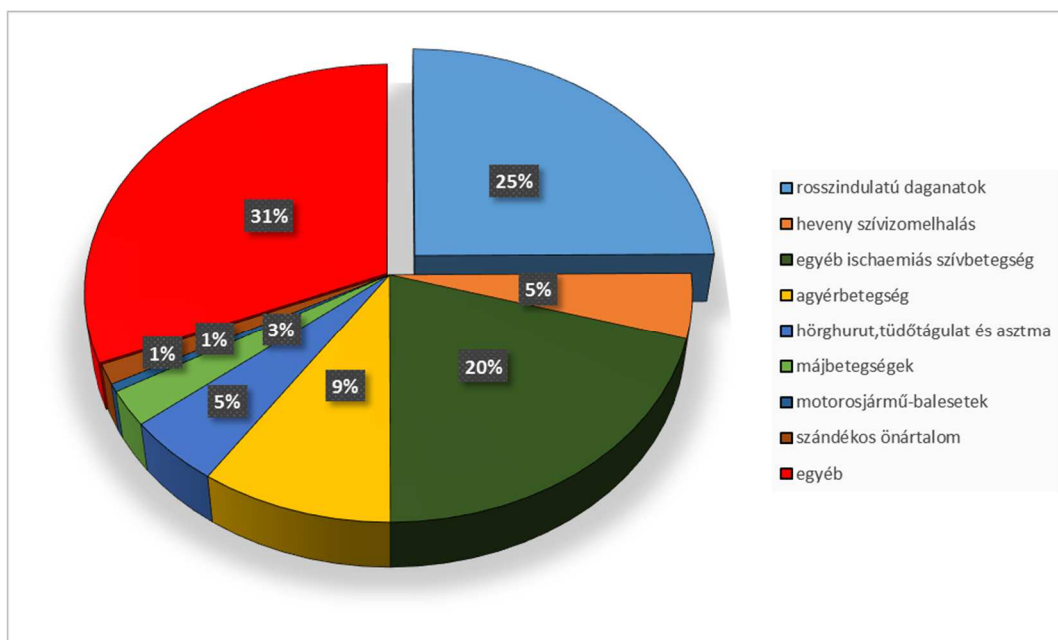
4. táblázat: DNS-metil-tanszferázok szimbóluma valamint citogenetikai helyei

3. Problémafelvetés, célkitűzések

A táplálkozás kiemelten fontos része életünknek, hiszen az ételekkel, italokkal szervezetünkbe juttatott makro- és mikronutriensek, egyéb élelmiszer komponensek állandó hatással vannak szervezetünk élettani folyamataira, egészségünkre, életminőségünkre egyaránt.

A legtöbb krónikus, nem fertőző betegség kialakulásának számos esetben van táplálkozás vonatkozású indikációja, azok halmozottan akár ok-okozati viszonyban is állhatnak egymással (obezitás - daganat, diabétesz, hipertonia).

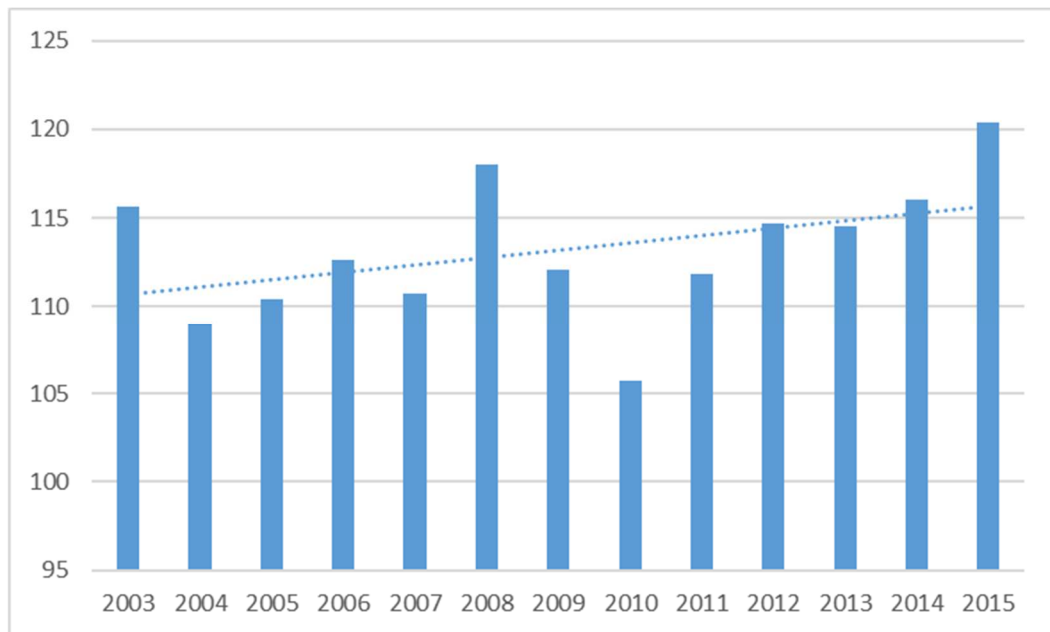
A daganatos megbetegedések kiemelt helyet töltenek be a mortalitási statisztikákban. A világon az évi 56 millió haláleset 12%-ért ezen kórkép a felelős a WHO adatai szerint (WHO, 2017). Magyarországi adatok szerint, amennyiben a szív és érrendszeri betegségek okán történő halálozást egy kategóriának tekintjük, úgy a második helyen a rosszindulatú daganatos megbetegedések kapcsán bekövetkező halálozások szerepelnek (összhalálozás 25%-a). A kardiovaszkuláris betegségek szeparálása esetén (heveny szívizomelhalás, egyéb ischaemiás szívbetegség, cerebrovasculáris betegség) még inkább látható ezen esetek magas száma, összhalálozásra vonatkoztatott aránya (13. ábra).



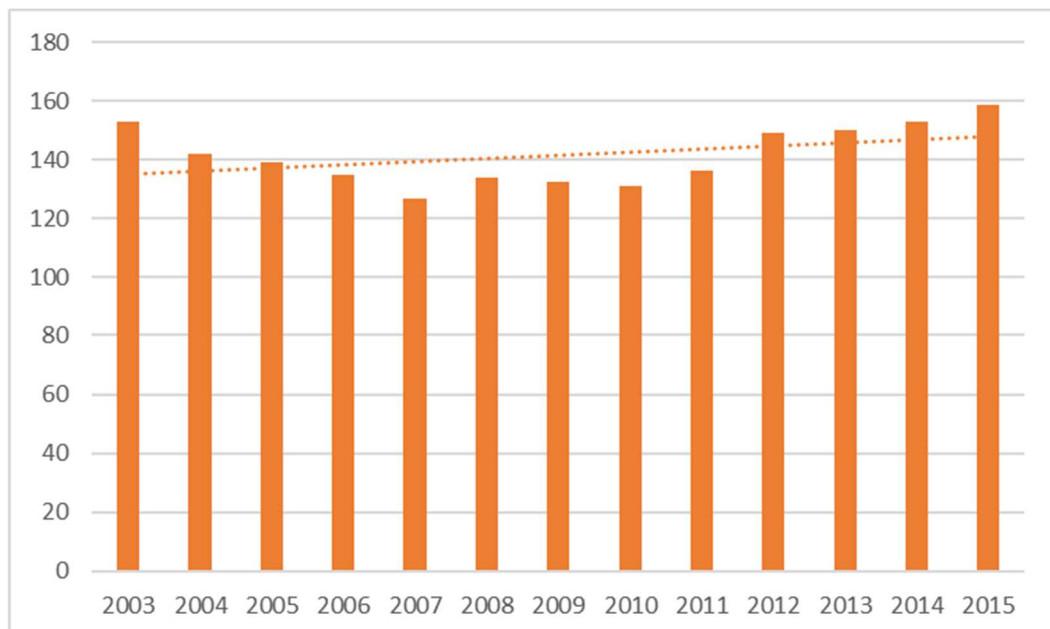
13. ábra: Halálozások a gyakoribb halálokok szerint Magyarországon (2015)

Forrás: KSH

A daganatos megbetegedések egyes fajtáinak előfordulási gyakoriságát is növekedés jellemzi Magyarországon. Ha a tüdődaganatok és a női emlődaganatok százezer lakosra vonatkoztatott, incidens morbiditási adatait szemügyre vesszük 2003 és 2015 között, jól megfigyelhető az emelkedő esetszám (14. és 15. ábra)

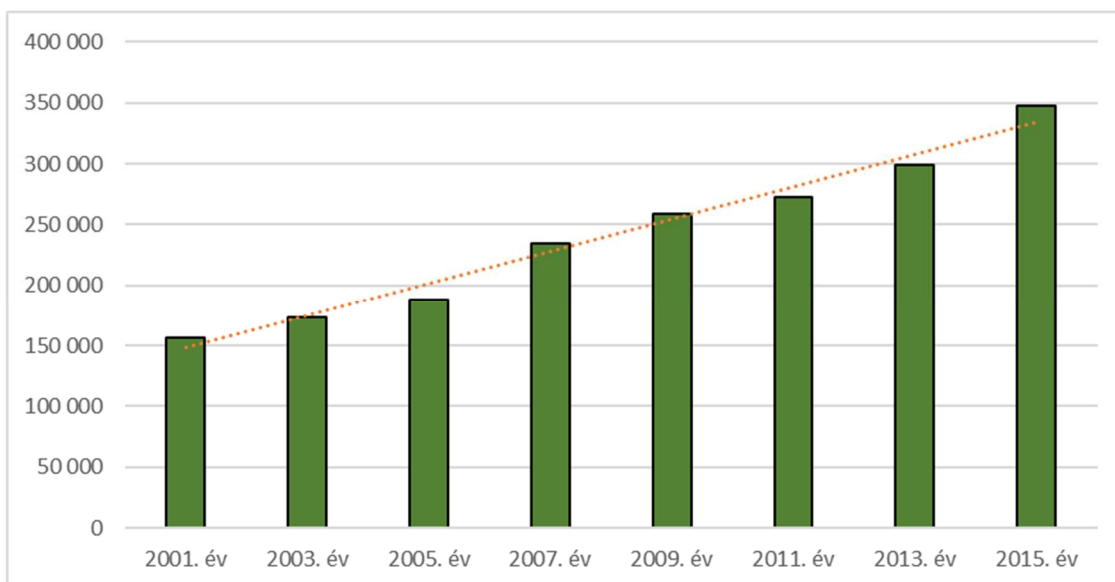


14. ábra: Tüdőrák-incidencia, százezer lakosra nézve Magyarországon (2003-2015)
 Forrás: KSH Stadata



15. ábra: A női emlő rosszindulatú daganata-incidencia, százezer lakosra nézve Magyarországon (2003-2015)
 Forrás: KSH Stadata

A prevalens összesetszám is - a háziiorvosi praxisokban regisztrált daganatos betegek száma - folyamatosan növekvő tendenciát mutat (**16. ábra**) úgy, hogy a regisztrált betegek csak egy töredékét képviselik a ténylegesen beteg egyének számának (rejtett morbiditás). Ebből kifolyólag megállapítható, hogy jelentős népegészségügyi kockázatú kórképpel állunk szemben.



16. ábra: Háziiorvosi praxisban regisztrált rosszindulatú daganatos betegek számának alakulása Magyarországon (2001-2015)
 Forrás: KSH Stadata

A táplálkozással potenciális rákkeltő vegyületek kerülhetnek szervezetünkbe, melyek megemelik korunk népbetegségeinek, így a daganatok kialakulásának kockázatát is. Helyes táplálkozással lehetőségünk nyílik a káros hatások kivédésére, melynek egyik formája a kemopreventív molekulák szervezetünkbe juttatása, másik lehetőség, hogy tudatosan elkerülhetjük a lehetséges rákkeltő vegyületeket.

A 21. században a „tudatos táplálkozás” mint fogalom, már jól ismert, mindemellett azon laikusok száma, akik tartják is az effajta vásárlási attitűdöt (megfelelő nyersanyag választás) és táplálkozási szokásokat, még mindig nagyon alacsony. Az elfogyasztott élelmiszer-összetevők ismeretének hiánya mellett az összetevők termékekben megtalálható mennyiségével, ADI (Acceptable Daily Intake) értékével, egyes élettani hatásaival sincsenek tisztában.

A fejlett országok élelmiszeripara folyamatosan próbál alkalmazkodni az egyes fogyasztói igényekhez, ez ideális esetben folyamatos termékminőséget foglal magában. Ezen kívül nem szabad elfelejteni, hogy ez számos kedvezőtlen következménnyel is járhat, az egyik ilyen az adalékanyagok használatának terjedése, alkalmazásuk folyamatos növekedése. Az élelmiszeripar sem anyagi megfontolásból, sem a technológián belüli kezelhetőség szempontjából nem kíván változtatni a már „bevált” gyártási folyamatokon, előállítási protokollokon; annak ellenére, hogy ezek jelentős részében szintetikus, mesterséges úton előállított adalékanyagokat használnak fel (Szakály, 2008).

Ugyanakkor felvetődik a kérdés, hogy ezen anyagoknak lehetnek-e káros, az egészségre ártalmas hatásaik, illetve ezek a hatások milyen formában észlelhetők? Az adalékanyagok egyik leggyakrabban - érzékszervi tulajdonságok befolyásolására - használt csoportja a mesterséges színezékek csoportja (Raposa et al., 2016a).

A mesterséges színezékek, daganatokat indukáló hatásával kapcsolatban ellentmondásos eredmények sokszor nem egyértelműek, mivel a legtöbb vizsgálatban ezeket az anyagokat elemi állapotban és egymástól teljesen eltérő dózisban tanulmányozzák. Szervezetben belüli metabolizációjuk, hatásuk, genotoxicitásuk, esetleges rákkeltő hatásuk különböző vizsgálatok során, eltérő eredményeket mutat (Poul et al., 2009; Tsuda et al., 2001).

Számos tudományos publikáció számolt már be a mesterséges színezékek azo csoportjának, szervezetben belüli negatív hatásairól. Az általunk választott azo színezékek: azorubin (E122) és tartrazin (E102), egyes irodalmi adatok alapján befolyásolhatják a viselkedést (McCann et al., 2007; Conolly et al., 2010), a biokémiai paramétereket, (Amin et al., 2010) valamint feltételezhetően genotoxikus hatásuk is lehet (Schweikl et al., 2008).

Kutatásunkban a tumor kialakulás többlépcsős folyamatának különféle pontjain kívántuk vizsgálni azon biomarkereket, melyek mind molekuláris epidemiológiai, mind epigenetikai szempontból „fényt deríthetnek” ezen anyagok *in vitro* mechanizmusaira és tumor kialakulásban betöltött szerepére.

Az élelmiszeripar által alkalmazott adalékanyagok, különösen a színezékek folyamatos kis dózisú expozíciót jelentenek már kisgyermekkorától kezdve szervezetünk számára. A több évig fennálló expozíció hatására bekövetkező

genetikai/epigenetika változások összefüggésbe hozhatóak a daganatkialakulással.

1. Vizsgálataink kezdetekor feltételeztük, hogy a mesterséges színezékeket (szeparálva és együtt adva) adott koncentrációban (többféle dózis) tartalmazó tápot fogyasztó kísérleti állatok esetében, a metabolizáló enzimek szintjén a citokróm P450 enzimes család tagjainak (*CYP1A1*, *CYP2E1*) aktivitása eltérő lesz a kontrollcsoportéhoz képest, több szervből vett minta esetén, valamint feltételezhetően a dózis növekedésével egyenesen arányos mRNS koncentráció növekedést figyelhetünk meg.
2. Feltételeztük továbbá, hogy a sejtciklus szabályozásában szerepet játszó gének, kinázok esetében (*NF- κ B*, *GADD45 α* , *MAPK8*) a már ismertetett mesterséges színezék expozíció hatására, magasabb mRNS koncentrációt mérünk a kontrollcsoportéhoz viszonyítva. Expozíció – hatás lineáris kapcsolatát ebben az esetben is feltételeztük.
3. Kutatásunk során választ kerestünk arra is, hogy az élelmiszerszínezékek milyen interakcióban állnak egymással, befolyásolja-e együtt fogyasztásuk a fent említett biomarkereket.
4. Feltételeztük, hogy metilációs biomarkereink (*DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*) expressziós szintjei - dózisdependens módon - szignifikáns különbséget mutatnak majd kezelési csoportonként, egymáshoz viszonyítva.
5. Továbbá, hogy a generációkat összehasonlítva találunk olyan jelentős eltéréseket (expozícióktól függően), a metilációban szerepet játszó gének expressziós mintázatában, mely bizonyítja a generációs fokozódást (célunk a szülői és nagyszülő táplálkozás következményeinek megismerése volt).

4. Anyagok és módszerek

4.1. A vizsgálat során felhasznált anyagok

4.1.1. Kísérleti állatok

Vizsgálatainkban 4-6 hetes korú karcinogenezis iránt érzékeny, beltenyésztett Balb/c nude, AKR/J és CD1 törzsű egereket használtunk. Kísérleteinkben egyaránt használtunk fel hím és nőstény egyedeket, azok kiválasztását random mintavétellel végeztük. Az állatokat a PTE ÁOK Orvosi Népegészségtani Intézetéhez tartozó állatházban tenyésztették.

4.1.2. Felhasznált vegyszerek, oldatok, tápok, primerek

Felhasznált vegyszerek, oldatok:

- 7,12-dimetil-benzantracén (7,12-Dimethylbenz[a]anthracene – DMBA, Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Magyarország, Gy.sz.: 39570-100MG)
- Kukoricaolaj (Corn oil, Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Magyarország, Gy.sz.: C8267)

Speciális táp

- Tartrazin (E102, Sensient Colors, Medimpex Kereskedelmi Zrt., Budapest, Magyarország, Gy.sz.: 14188)
- Azorubin (E122 , Sensient Colors, Medimpex Kereskedelmi Zrt., Budapest, Magyarország, Gy.sz.: 14401)
- CRLT/n standard, rágcsálótáp pellet (Szindbád Kft., Gödöllő, Magyarország)

A speciális táp keverési protokollja

A darált, normál rágcsálótápot a kiszámolt mennyiségű tartrazinnal és azorubinnal összekevertük. A porkeveréket csapvíz segítségével pépesítettük, elegyítettük, hasábokba szabdaltuk, majd szárítószekrényben kiszárítottuk (hőfok: 40 C°, szárítási idő: 48 óra).

A speciális táp elkészítéséhez és a dózisok meghatározáshoz szükséges számítások

Először a humán ekvivalens dózis modifikált verzióját határoztuk meg, a használni kívánt állat konverziós szorzószámának (12,3) segítségével (Shannon et al. 2007).

Amikor megkaptuk egy darab egér tápjának humán ekvivalens dózismennyiségét, kiszámoltuk egy átlagos (tt: 20g) egér egyszeres expozíciójának mértékét (egér beviteli dózis (mg/ttkg)/ 1000 x20 = 20 g-os, átlagos egér napi beviteli mennyisége (mg)). Az egyszeres expozíció mértékének meghatározása után, megállapításra került a napi beviteli mennyiség egyszeres illetve tízszeres mennyisége (a pontos expozíciókat bővebben a kezelési metodikánál fejtjük ki).

RNS izolálás reagensei

- Trizol Reagent (cat. no.: 15596018; Invitrogen – Csertex Kft)
- Kloroform (cat. No.: C7559 Sigma-Aldrich)
- i-propil-alkohol (cat. No.: I9516 Sigma-Aldrich)
- 75 %-os etil-alkohol (96%-os etanolból hígítva – Egyetemi Gyógyszertár)
- DEPC víz - Dietil-pirokarbamát – Cat. No.: D5758 Sigma Aldrich – oldatából 0,1%-ra hígítva
- MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit (Tissue) (Roche Applied Science – Roche Magyarország Kft)

Q-RT-PCR reagensei

- KAPA SYBR® FAST One-Step qRT-PCR Kit (KapaBiosystems - KK4680)
- KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X)
- dUTP (10 mM) 1 x 40 µl
- KAPA RT Mix (50X) 1 x 40 µl

A primereket (forward – reverse) a **5. táblázat** mutatja be részletesen. A primer szekvenciák a gyártó (Roche Warehouse, Budapest) adatai alapján a következők voltak:

Gén megnevezése	Szimbólum	Forward Primer / Reverse Primer
Cytochrome P1-450 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin	<i>CYP1A1</i>	5'-AGGTCCAAAACAATCGTGATGAC-3' 5'-CTACAGGACATTTGAGAAGGGC-3'
Cytochrome P450IIE Ethanol	<i>CYP2E1</i>	5'-AAGAAAGGAATTGGGAAAGGTCC-3' 5'-CGTTGCCTTGCTTGTCTGGA-3'
Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell	<i>NFκB</i>	5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3' 3'-TCAACTCCCCTGAAAGGGTCCG-5'
Growth arrest és DNA damage inducible gene	<i>GADD45α</i>	5'-GTGCT AGCAAGGCTCGGA-3' 5'-GCTGCTCAACGTAGACCCC-3'
Mitogen-activated protein kinase 8	<i>MAPK8</i>	5'-GTTGCTCATAAACACAAACCTCC-3' 5'-GGGATGGGTTATGTTTTCTAGAC-3'
DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	<i>DNMT1</i>	5'-AAGAATGGTGTGTCTACCGAC-3' 5'-CATCCAGGTTGCTCCCCTTG-3'
DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A	<i>DNMT3A</i>	5'-GAGGGAAGTCTGAGACCCAC-3' 5'-CTGGAAGGTGAGTCTTGCA-3'
DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3B	<i>DNMT3B</i>	5'-AGCGGGTATGAGGAGTGCAT-3' 5'-GGGAGCATCCTTCGTGTCTG-3'
Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1	<i>HPRT1</i>	5'-AGGGCATATCCAACAACAACTT-3' 5'-GTTAAGCAGTACAGCCCCAAA-3'

5. táblázat: Primer szekvenciák

Készülékek

ROCHE LightCycler 480

Kísérleteinket a ROCHE LightCycler 480 készülék segítségével végeztük, mely rendelkezik egy beépített normál PCR géppel és egy CCD kamerával. Az emittált fluoreszcens jeleket 500-600 nm között detektálja. Az eredményként kapott fluoreszcens extinciót egy AD-konverteren keresztül számítógépes program segítségével értékeltük ki.

4.2. Vizsgálati módszerek

4.2.1. Kísérleti állatok kezelési sémája

A Balb/c nude egértörzs - CYP450 metabolizáló enzimeire vonatkozó - „short term” kezelése

A 4-6 hetes korú Balb/c nude egerek nemre való tekintet nélkül (hím és nőstény egyedek egyaránt) random mintaválasztás útján kerültek vizsgálatunkba. Az csoportok elemszámát a kutatás típusnak és a csoportszámnak, valamint a külföldi releváns kutatások protokolljainak megfelelően, 6-6 darabszámban határoztuk meg (n=6). A kísérleti állatokat a kezelési metodika alapján 7 csoportba osztottuk. A csoportok felosztására, továbbá a táp adagolására vonatkozó adatokat a **6. táblázat** tartalmazza. Az állatok ad libitum fogyasztottak csapvizet a vizsgálat teljes ideje alatt.

Csoport	Kezelés	Dózis
1. csoport	Tartrazin 1x	92.5 mg/ttkg
2. csoport	Tartrazin 10x	925 mg/ttkg
3. csoport	Azorubin 1x	49.3 mg/ttkg
4. csoport	Azorubin 10x	493 mg/ttkg
5. csoport	Tartrazin 10x + DMBA	tartrazin - 925 mg/ttkg + DMBA 20 mg/ttkg
6. csoport	DMBA	DMBA 20 mg/ttkg
7. csoport	Kontroll	---

6. táblázat: Csoportok felosztása és kezelési expozíciója 1.

A vizsgálati állatokat 15 napig etettük a kiszámolt mennyiségű táppal (2g standard rágcsálótáp/ nap/ egyed) és a hozzáadott színezékanyaggal, valamint két csoportot a 14. napon intraperitoneálisan (dózis: 20 mg/ ttkg) DMBA-val oltottunk be. A cervikális diszlokációt követően mintát vettünk az egyes szervekből (máj, vese). A szervekből a Trizol protokoll alapján RNS-t izoláltunk.

Az AKR/J egértörzs – sejtciklus szabályozásban szerepet játszó gének expressziójának vizsgálata - „long term” kísérlet

Vizsgálatunk második üteméhez 4-6 hetes korú AKR/J egereket választottunk ki, nemre való tekintet nélkül (hím és nőstény egyedek egyaránt) random mintaválasztás módszerével. A csoportok elemszámát hasonlóan az első ütemhez 6-6 darabszámban határoztuk meg (n=6). A kísérleti állatokat a kezelési metodika alapján 7 csoportba osztottuk, melynek részleteit a 7. **táblázat** részletezi. Az első ütem után felmerült, hogy megvizsgáljuk az anyagok esetleges hatásaddícióit és azok hatását, ezért a kezelést ennek megfelelően határoztuk meg. Az állatok ad libitum fogyasztottak csapvizet a vizsgálat teljes ideje alatt.

Csoport	Kezelés	Dózis
1. csoport	Tartrazin 1x	92.5 mg/ttkg
2. csoport	Tartrazin 10x	925 mg/ttkg
3. csoport	Azorubin 1x	49.3 mg/ttkg
4. csoport	Azorubin 10x	493 mg/ttkg
5. csoport	Tartrazin 1x + Azorubin 1x	tartrazin - 92.5 mg/ttkg + azorubin - 49.3 mg/ttkg
6. csoport	Tartrazin 10x + Azorubin 10x	tartrazin - 925 mg/ttkg + azorubin - 493 mg/ttkg
7. csoport	Kontroll	---

7. táblázat: Csoportok felosztása és kezelési expozíciója 2.

A vizsgálati állatoknak 42 napig adagoltuk a kiszámolt mennyiségű tápot (2g standard rágcsálótáp/ nap/ egyed) és a hozzáadott színezékanyagokat. A kezelést követően a kísérlet 43. napján az állatokat leöltük. Cervikális diszlokációt követően mintát vettünk azok májából. A szervekből a Trizol protokoll alapján RNS-t izoláltunk. Vizsgált csoportjaink összehasonlító elemzéséhez egy kontroll csoportot használtunk fel.

Az CD1 egértörzs – metilációs mintázat kialakításáért felelős génekre vonatkozó -, „multigenerációs” kezelése

Multigenerációs vizsgálatunkat úgy terveztük meg, hogy az alábbiakban ismertetett kezelés - generáción belüli és generációk közötti - metilációs mintázat kialakításáért felelős génekre gyakorolt hatását egyaránt megvizsgálhassuk.

Vizsgálatunk utolsó szakaszában 4-6 hetes korú, CD1 egereket alkalmaztunk kiindulásként. A teljeskörűbb eredmény érdekében ez esetben különválasztottuk a nemeket, így külön vizsgáltuk a hím és nőstény egyedeket, kezelési csoporton belül. A csoportok elemszáma, így generációnként, 6 db nőstény és 6 db hím egyed volt (n=12). Az állatokat adott kezelési csoporton belül (egymás között) szaporítottuk, hogy vizsgálható legyen az azonos kezelés esetleges generációkra gyakorolt hosszútávú, epigenetikai hatása. A teljes vizsgálat 3 generáció kezelését foglalta magában a kiindulási G0 generációt is beleértve.

A kísérleti állatokat a kezelési metodika alapján 3 csoportba osztottuk, melynek részleteit a **8. táblázat** tartalmazza. A vizsgálat időigénye miatt előzetes eredményeink alapján expozícióként a már több szempontból vizsgált tartrazint választottuk. Az állatok ad libitum fogyasztottak csapvizet a vizsgálat teljes ideje alatt.

Csoport	Kezelés	Dózis
1. csoport	Tartrazin 1x	92.5 mg/ttkg
2. csoport	Tartrazin 10x	925 mg/ttkg
3. csoport	Kontroll	---

8. táblázat: Csoportok felosztása és kezelési expozíciója 3. (G0,G1,G2)

A 0. generáció (G0) egyedeit 4-6 hetes koruktól kezdődően, 42 napig etettük a kiszámolt mennyiségű táppal (2g standard rágcsálótáp/ nap/ egyed) és a hozzáadott színezékanyaggal majd szaporítottuk azokat. Az utódok megszületése (18-19 nap) után az anyaállatról történő leválasztásig (21 nap) a szülők továbbra is kapták a speciális illetve kontroll tápot. A leválasztást követően a G0 egyedek cervikális diszlokációt végeztünk, majd mintát vettünk azok májából és veséjéből (figyelembe véve a DNS-metil-transzferázok kifejeződésének főbb lokalizációját).

A G1 egyedeket csoportazonosan azok elődeinek kezelésével tovább tápláltuk, míg el nem érték az ivarérett kort (7-8 hét), ekkor egymás között szaporítottuk őket és hasonlóképpen jártunk el, mint a G0 egyedeknek esetében (vemhesség, leválasztás alatti folytonos kezelés).

A G2 esetében kezelés és metodika szempontjából ugyanúgy jártunk el, mint a G1 esetében. A szervek szövetmintáiból mindegyik esetben Trizol protokoll alapján RNS-t izoláltunk.

4.2.2. RNS izolálás Trizol protokollal

- 50-100 mg szövetmintát homogenizáltunk 1 cm³ Trizol reagensben 4 cm³-es csőben 45-90 másodpercig. A minta mennyisége nem haladhatja meg a homogenizáláshoz használt Trizol reagens mennyiségének 10 %-át
- a homogenizált mintát 5 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten
- hozzáadtunk 0,2 cm³ kloroformot. Összeráztuk erősen a csövet 15 mp-ig
- 2-3 perc inkubálás után lecentrifugáltuk a mintát 12000 g-vel 15 percig 2-8 C°-on
- átvittük a vizes fázist egy tiszta csőbe. Hozzáadtunk 0,5 cm³ izopropil-alkoholt
- 10 perc inkubálás után újra lecentrifugáltuk 12000 g-vel 10 percig 2-8 C°-on. Centrifugálás előtt az RNS precipitátum gyakran nem látható, centrifugálás után a cső alján gélyszerű pelletet ad
- a felülúszó leöntése után az RNS pelletet mostuk 1 cm³ 75 %-os alkohollal
- vortexelés után lecentrifugáltuk 7500 g-vel 5 percig 2-8 C°-on
- a felülúszót leöntöttük, majd megszáritottuk a pelletet. 300-500 µl RN-áz mentes vízben (DEPC víz) oldottuk

A szervekből izolált mRNS-t a felhasználásig -80 C°-on tároltuk

4.2.3. Kvantitatív RT-PCR protokoll

A kvantitatív RT-PCR-t a KAPA SYBR FASTqPCR Master Mix protokollja alapján az alábbiak szerint végeztük. A használt kit - a primereken kívül - a reakcióelegy összes alkotó elemét tartalmazta.

A szoftverben beállítottuk a hőprogramot, a megtervezett plate alapján a reakció paramétereit.

A reakció tervezésétől függő reakcióelegyet jégen összemértük (10µl/cella KAPA SYBR FASTqPCR Master Mixet, 0,4µl/cella KAPA RT Mixet, 0,4µl/cella dUTP, 0,4µl/cella primereket, steril bidesztvizet, 5µl/cella templát RNS), majd a cellákba pipettáztuk (végtérfogat 20 µl/cella). Ezt követően a platet lefedtük egy speciális fóliával. A ROCHE LightCycler 480 készülék szoftverén a hőprogramot a kit protokolljában leírtak szerint beprogramoztuk, majd a plate-t a készülékbe helyeztük, a megfelelő pozícióba rögzítettük a CCD kamerát, ezután a szoftver segítségével elindítottuk a reakciót (**9. táblázat**). A képalkotás 40 db PCR cikluson keresztül zajlott (denaturáció - extenzió). A készüléket vezérlő program „output”-ja egy riport, melyet Microsoft Excel táblázatkezelő szoftverrel beolvastunk, belőle az alábbi képlet alapján génexpressziós adatokat számoltunk (comparative CT experiments) (a relatív génexpressziós szinteket a *HPRT1* „house keeping” génhez viszonyítottuk):

$$\text{Génexpresszió \%: } 2^{-\Delta CT} = 2^{-(CT\text{-vizsgált gén} - CT\text{-HPRT1 gén})}$$

	Reverz Traszkripció	AmpliTaq Gold aktiváció	40 db PCR ciklus denaturáció extenzió	
Hőmérséklet/idő	48 C° 30 perc	95 C° 10 perc	95 C° 15 mp.	60 C° 1 perc
Végtérfogat cellánként	20 µl			

9. táblázat: A Q-RT-PCR során alkalmazott hőprogram

4.2.4. Statisztikai elemzések módja

Statisztikai módszerek tekintetében a normál eloszlást egymintás Kolmogorov-Smirnov teszttel vizsgáltuk, a szórás megállapítására Levene-féle F próbát alkalmaztunk, ezt követően ANOVA tesztet valamint a varianciánálzis post-hoc elemzéseit alkalmaztuk.

Számolásainkhoz, elemzéseinkhez: Microsoft Office Excel 2016, illetve SPSS 22.0 Statistics szoftver programot használtunk. A statisztikai szignifikancia szintet $p \leq 0,05$ értéknél határoztuk meg, 95% konfidencia intervallum mellett.

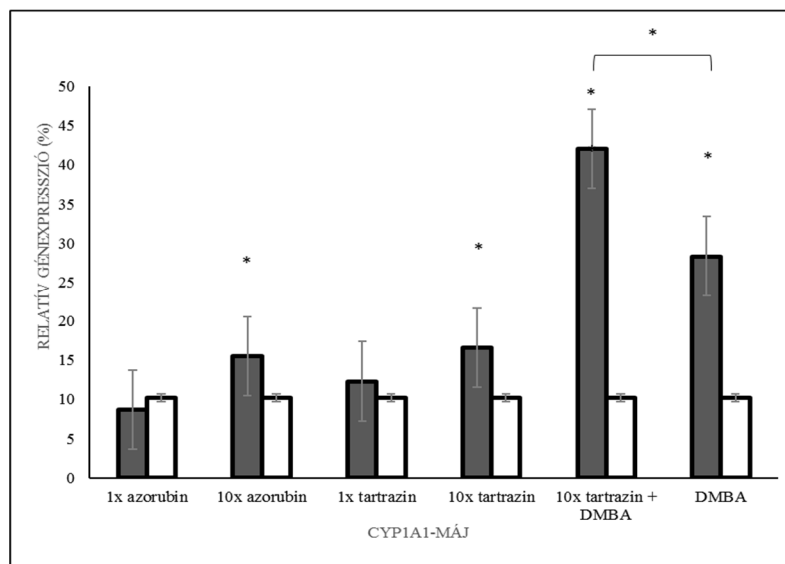
5. Eredmények

5.1. A CYP450 metabolizáló enzimeinek génexpressziós mintázatára vonatkozó vizsgálati eredmények (*CYP1A1*, *CYP2E1*)

5.1.1. A *CYP1A1* génexpressziós vizsgálati eredményei

Ezen gén termékei esetében több dózisonál is megfigyelhető volt overexpresszió, illetve szignifikáns eltérés a kontrollcsoporthoz képest (máj esetében). A legnagyobb overexpressziót a tartrazin tízszeres valamint a DMBA közös expozíciójának elegye adta, ahol feltehetően hatás összeadódásnak köszönhető a szignifikáns eltérés a kontrollhoz képest ($p < 0,05$). Fontos megemlíteni, hogy ez esetben 24 órás DMBA kezelés (pozitív kontroll), valamint a fent említett tízszeres tartrazin + DMBA kezelés ugyancsak szignifikáns eltérést mutat egymáshoz viszonyítva ($p < 0,05$).

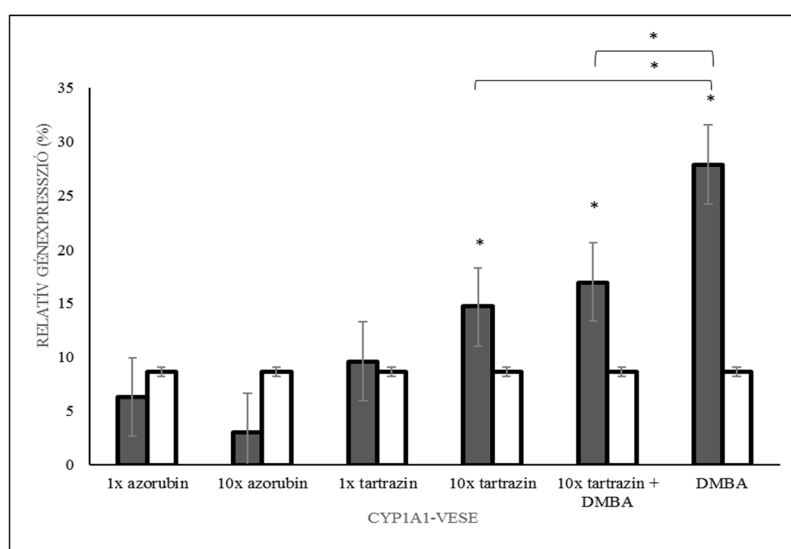
További szignifikáns eltérést a szeparált expozíciók tízszeres dózisánál mértünk ($p < 0,05$), az egyszeres dózisoknál nem ($p > 0,05$), így a modifikáló hatás elképzelhetően dóziszfüggő faktor ebben az esetben. A *CYP1A1* változásait a májban a **17. ábra** mutatja be.



17. ábra: A *CYP1A1* relatív génexpressziós változásai májban, színezék expozíciók hatására, *HPRT*-hez viszonyítva (kezelt ■, kontroll □). A hibasávok a standard deviációt mutatják (n=12).
* $p < 0,05$

A vese szöveti homogenizátumából mért relatív génexpressziók részben hasonló eredményeket mutattak. Ugyanakkor elmondható, hogy ebben az esetben az

azorubin egyszeres és tízszeres expozíciója sem indukált a vizsgált génben (*CYP1A1*) génexpresszió-emelkedést. Az egyszeres tartrazin expozíció bár nagyobb emelkedés produkált a vizes kontrollnál, jelentős különbség itt sem volt tapasztalható ($p>0,05$). A vesében jellemzően a tízszeres tartrazin okozott szignifikáns emelkedést ($p<0,05$), de ebben a szervben még DMBA-val együtt adva sem volt akkora expressziós növekedése, mint a DMBA-nak. A vesében tapasztalt expressziós mintázat változásokból, ugyancsak dóziszfüggő faktorra utaló jeleket találtunk, de ebben az esetben ez csak a tartrazin kapcsán mondható el. A *CYP1A1* génexpressziós mintázatának eltéréseit a vesében a **18. ábra** mutatja be.



18. ábra: A *CYP1A1* relatív génexpressziós változásai vesében, színezék expozíciók hatására, *HPRT*-hez viszonyítva (kezelt ■, kontroll □). A hibásávok a standard deviációt mutatják (n=12).
* $p<0,05$

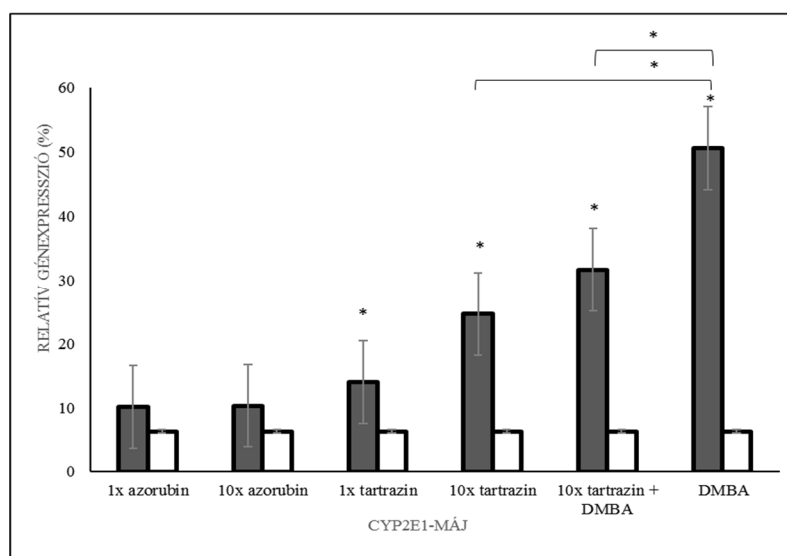
5.1.2. A *CYP2E1* génexpressziós vizsgálati eredményei

A *CYP2E1* máj mintái esetében minden csoportnál mértünk emelkedést a vizes kontrollhoz képest. Az azorubin expozíciói nem mutattak az anyagmennyiséggel arányos növekedést, közel hasonló mértékben okoztak génexpresszió emelkedést, mely egy esetben sem bizonyult szignifikánsnak ($p>0,05$). A tartrazin esetében már más volt a helyzet, ezen anyagnál mind egyszeres, mind tízszeres dózisban szignifikáns eltérést detektáltunk ($p<0,05$), a dóziszfüggő emelkedés ebben az esetben is megmutatkozott.

A DMBA-val kezelt csoportokban hasonló eredményeket kaptunk, mint a *CYP1A1* vese mintáinál. Ebben az esetben a tízszeres tartrazin + DMBA-val kezelt

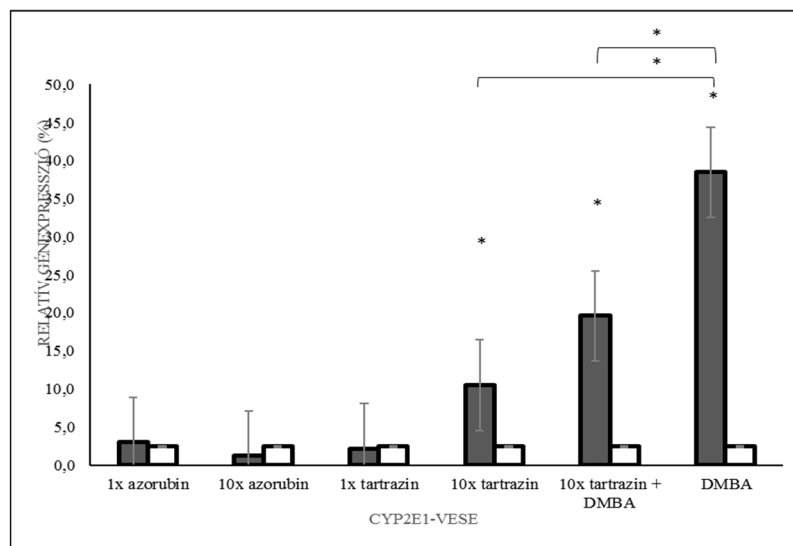
csoport szignifikáns növekedést mutatott nemcsak a kontrollhoz, hanem még a sima tízszeres tartrazin expozíciójú csoporthoz viszonyítva is. Ennek értelmében, jelentős hatás összeadódásról beszélhetünk, melyre a tartrazin igencsak hajlamos a kémiai karcinogének – esetünkben a DMBA – jelenlétében. A 24 órás DMBA adta a legnagyobb, szignifikáns eltérést a kontrollhoz és a többi csoporthoz képest egyaránt ($p < 0,05$).

A *CYP2E1* májban detektált génexpressziós eltéréseit a **19. ábra** demonstrálja.



19. ábra: A *CYP2E1* relatív génexpressziós változásai májban, színezék expozíciók hatására, *HPRT*-hez viszonyítva (kezelt ■, kontroll □). A hibásávok a standard deviációt mutatják ($n=12$).
* $p < 0,05$

A *CYP2E1* vese mintáiban tapasztalt génexpressziós mintaváltozások arányaiban lekövezték a *CYP1A1* vese mintáinál tapasztaltakat. Kiemelendő, hogy ezekben a mintákban először fordult elő, hogy a tartrazin expozíció kisebb emelkedést okozott, mint a kontrollcsoport. Az azorubinnál mért eltérések, hasonló képet mutatnak mint az eddig tapasztaltak, jelentős eltérést nem találtunk, az emelkedés mértéke irreguláris: az anyagmennyiség és a kontrollcsoport figyelembe vételével egyaránt. Jelentős génexpresszió emelkedést a tartrazin tízszeres, a tartrazin tízszeres + DMBA valamint a 24 órás DMBA expozíciójánál mértünk ($p < 0,05$). A legkifejezettebb génexpresszió emelkedést ebben az esetben is a 24 órás DMBA, mint pozitív kontroll mutatta ($p > 0,05$). A *CYP2E1* vese mintáiban mért relatív génexpresszió változásokat a **20. ábra** szemlélteti.



20. ábra: A *CYP2E1* relatív génexpressziós változásai vesében, színezék expozíciók hatására, *HPRT*-hez viszonyítva (kezelt ■, kontroll □). A hibásávok a standard deviációt mutatják (n=12). * p<0,05

5.2. A sejtciklus szabályozásában résztvevő gének, kinázok (*NF-κB*, *GADD45α*, *MAPK8*) génexpressziós mintázatára vonatkozó vizsgálati eredmények

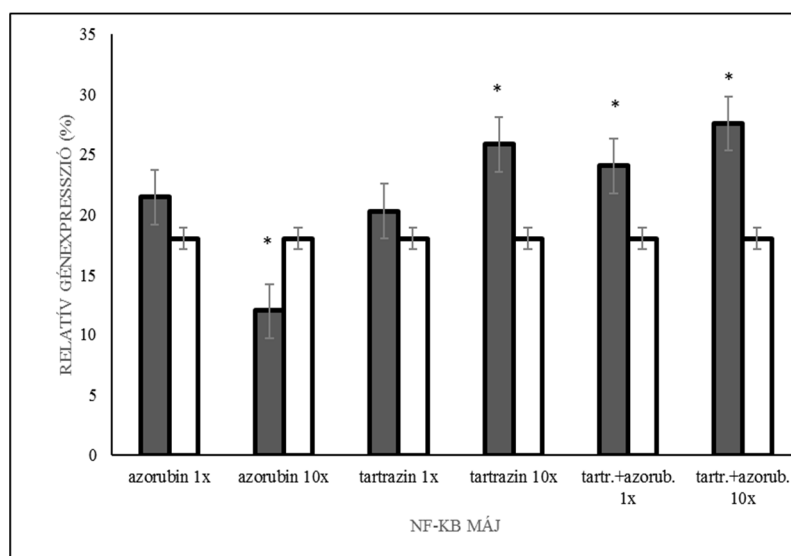
Kutatásunk első ütemének összefoglalása alapján a sejtciklus szabályozásában résztvevő génekre vonatkozó vizsgálatunkat ugyancsak tartrazin és azorubin expozícióval végeztük. Ebben az ütemben, a kontrollcsoporthoz képest a májban történő génexpressziós mintázat változásokra, valamint szignifikáns eltérésekre voltunk kíváncsiak.

5.2.1. Az *NF-κB* génexpressziós vizsgálati eredményei

A színezékek tekintetében megállapíthatjuk, hogy az *NF-κB* esetében az azorubin, a tartrazin tízszeres expozíciójú csoportja, továbbá a két anyag mindkét közös expozíciója szignifikáns eltérést mutatott a kontrollcsoporthoz képest (p<0,05). Megemlítendő ugyanakkor, hogy az azorubin tízszeres expozíciójú csoportja esetében ez az eltérés negatív irányú, tehát a kontrollcsoport alatti génexpressziós aktivitás.

Vizsgálatainkban feltételeztük még, hogy az egyszeres expozícióval kezelt csoportokban a vizsgált gének expressziós változása szignifikánsan alacsonyabb mértékű lesz majd ugyanazon szerek tízszeres expozíciójú csoportjaihoz viszonyítva, mint ahogyan ezt már más karcinogén anyagok genotoxicitási vizsgálatában is

megfigyelték (Bolognesi, 2003; Sasaki et al., 2002). Az *NF-κB* esetében, az azorubin csoportjainál nem figyelhető meg dózisdependens növekedés, ugyanakkor a tartrazinnál és a közös expozícióknál igen. Az előzőekben ismertetett génexpresszió emelkedések egymáshoz viszonyítva ugyanakkor csak a tartrazin expozíciójánál szignifikánsak ($p < 0,05$). Összevetve továbbá az azorubint és tartrazint együttesen egyszeres és tízszeres ADI dózisban fogyasztó csoportokat egymással - mivel nagyobb dózisú tartrazin esetében több vizsgálati eredmény is DNS károsodásról számol be (Sasaki et al., 2002, Ishidate et al., 1981; Giri et al., 1990; Durnev et al., 1995) - az eredmények azt mutatják, hogy az *NF-κB* esetében a tartrazin+ azorubin egyszeres expozíciójú csoportjához képest, egyedül a tartrazin tízszeres expozíciójú csoportja mutat nagyobb emelkedést. Ugyanezen szerek tízszeres expozíciójánál több esetben találtunk dózis-hatás fokozódásra utaló jelet, mind a közös expozíció, mind a tartrazin tízszeres expozíciójú csoportjánál egyaránt (21. ábra).

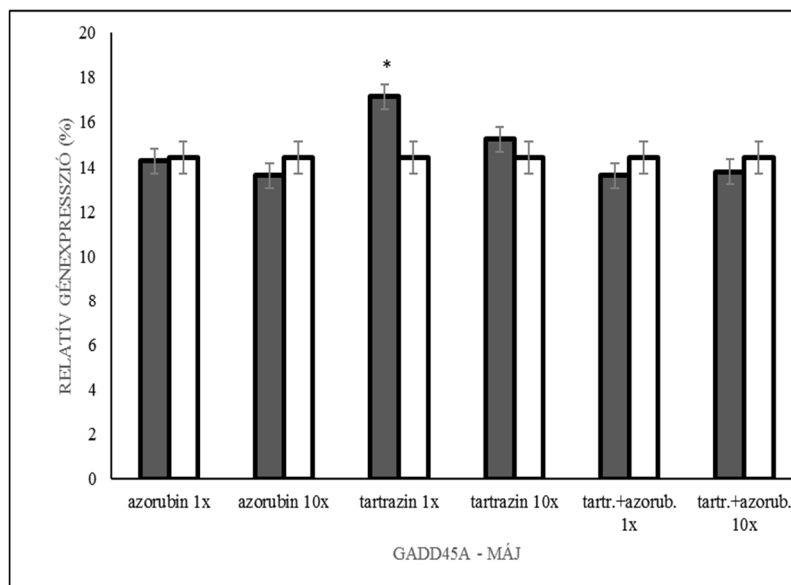


21. ábra: Az *NF-κB* relatív génexpressziós változásai májban, színezék expozíciók hatására, *HPRT*-hez viszonyítva (kezelt ■, kontroll □). A hibásávok a standard deviációt mutatják (n=12).
* $p < 0,05$

5.2.2. A *GADD45α* génexpressziós vizsgálati eredményei

A *GADD45α* expressziós sajátosságait a DNS repair és a proliferáció közötti kapcsolat és az adalékanyagok ebben betöltött módosító szerepe miatt vizsgáltuk (Gramantieri et al. 2005). A színezékekkel kezelt csoportok esetében megállapíthatjuk, hogy a kontrollcsoporthoz hasonlóan egy csoport mutatott

szignifikáns különbséget ($p > 0,05$). A teszteket elvégeztük olyan módon is, hogy az egyszeres és tízszeres expozícióval kezelt csoportokat egymással is összevetettük. Ugyanakkor szignifikancia szinthez közeli értékről nem tudunk beszámolni. A *GADD45a* változatlan eredményeit (tartrazin 1x kívül) és teljesen normál tartományban reprezentált expressziós mintázat lehetséges okait a jövőben kívánjuk vizsgálni (Raposa et al., 2016b)(22. ábra).



22. ábra: Az *GADD45a* relatív génexpressziós változásai májban, színezék expozíciók hatására, *HPRT*-hez viszonyítva (kezelt ■, kontroll □). A hibásávok a standard deviációt mutatják (n=12).
* $p < 0,05$

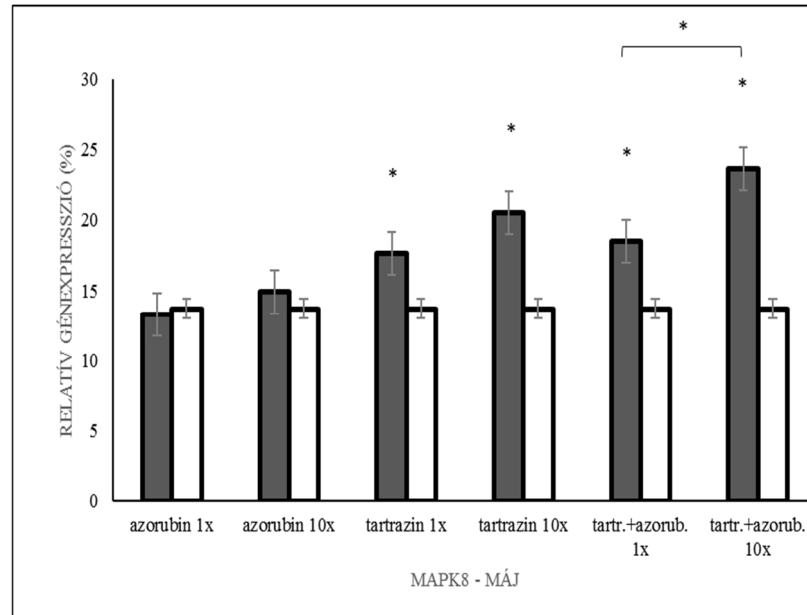
5.2.3. A *MAPK8* génexpressziós vizsgálati eredményei

A *MAPK8* génexpressziós szintjei jó indikátorként használhatóak genotoxicitás, illetve tumorpromóció vizsgálatára (Govindarajan et al., 2002; Ke et al., 2008).

Feltételezhetően karcinogén anyagok hatására kialakuló aktivációja, vizsgálatunk több expozíciójánál is megmutatkozott.

A *MAPK8* esetében ismét a tartrazin valamint a két anyag közös expozíciói mutattak szignifikáns eltérést a kontrollcsoporthoz képest ($p < 0,05$). Az azorubinnál is mértünk változásokat a génexpressziós profilban, melyek ez esetben anyagmennyiséggel egyenes arányosan növekedtek, de nem szignifikánsak ($p > 0,05$). Figyelembe véve eddigi eredményeinket, nagyobb jelentőséget nem tulajdonítottunk neki. A tartrazin egyszeres és tízszeres expozíciójú csoportjának valamint a két

anyag közös expozíciójának génexpressziós mintázati eltérései dóziszfüggő növekedést mutattak, külön érdekesség, hogy bár ebben az esetben is látható a két anyag hatásaddíciójának modifikáló hatása, az csak a két anyag közös expozíciójának esetében mutat statisztikailag szignifikáns eltérést. A *MAPK8* génexpressziós profiljának változásait mRNA szinten a **23. ábra** mutatja be.



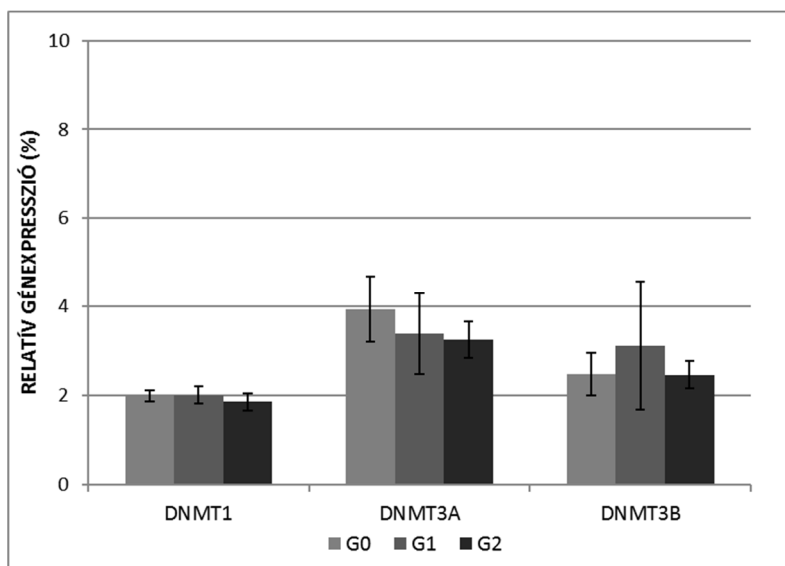
23. ábra: Az *MAPK8* relatív génexpressziós változásai májban, színezék expozíciók hatására, *HPRT*-hez viszonyítva (kezelt ■, kontroll □). A hibaszávok a standard deviációt mutatják (n=12).
* p<0,05

5.3. A metilációban szerepet játszó gének expressziós mintázatára vonatkozó, multigenerációs, epigenetikai vizsgálat eredményei

Vizsgálati eredményeinket a májban és a vesében, - tekintettel a metilációban szerepet játszó gének expressziós változásainak epigenetikai vonatkozásaira - az általunk vizsgált három generáció összehasonlító elemzéseként közöljük. A hím és nőstény egyedek eredményeit szeparáltan mutatjuk be.

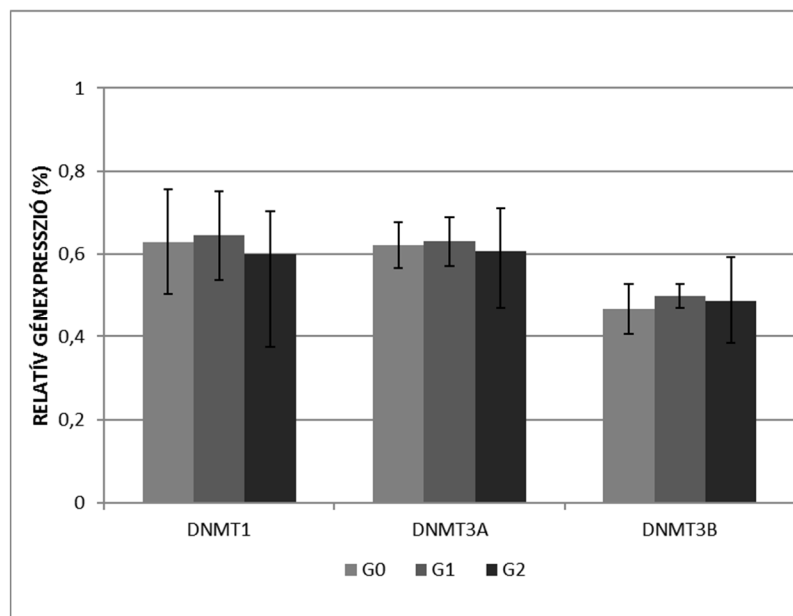
5.3.1. Hím egyedek metilációban szerepet játszó génjeinek expressziós vizsgálati eredményei

A hím egyedek DNS-metil-transzferáz enzimeket (*DNMT*) kódoló gének génexpressziós profiljai, három generációra vonatkoztatva értendőek (G0= kiindulási generáció, G1= beltenyésztett, második generáció, G2= beltenyésztett, harmadik generáció) kezelést és az érintett szerv eredményeit figyelembe véve. A kontrollcsoport tekintetében várakozásunknak megfelelően, nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a három generáció között, egyik gén esetében sem ($p > 0,05$). A vizsgált szervek (máj, vese) változatlan profilja az „inbred” tenyésztésnek és a reguláris rágcsálótáp fogyasztásnak köszönhető. A kontrollcsoportok három generációs változásait a **24. és 25. ábra** szemlélteti.



24. ábra: A kontrollcsoport expressziós mintázatának változásai, májban, *HPRT*-hez viszonyítva. A hibasávok a standard deviációt mutatják (n=18).

* $p < 0,05$



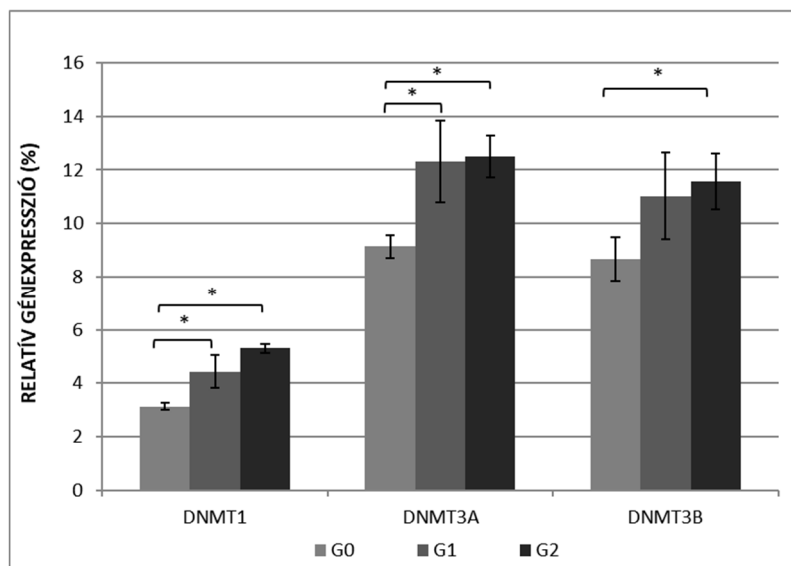
25. ábra: A kontrollcsoport expressziós mintázatának változásai, vesében, *HPRT*-hez viszonyítva. A hibasávok a standard deviációt mutatják (n=18).
* p<0,05

A tartrazin egyszeres expozíciójú csoportjánál több változás is megfigyelhető volt a máj expressziós profiljában. Míg az első generációban egy aránylag alacsony expressziós szintről beszélhetünk, addig a második és harmadik generáció emelkedett szintje több esetben megmutatkozott. Szintjeiket minden esetben (*DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*) mérhető változás (emelkedés) jellemezte.

Ugyanakkor *DNMT1* esetében statisztikailag szignifikáns eltérés mutatkozott a G0 generációt összehasonlítva a G1 és G2 generációval egyaránt (p<0,05). A G1 és G2 között szignifikáns különbséget nem találtunk (p>0,05).

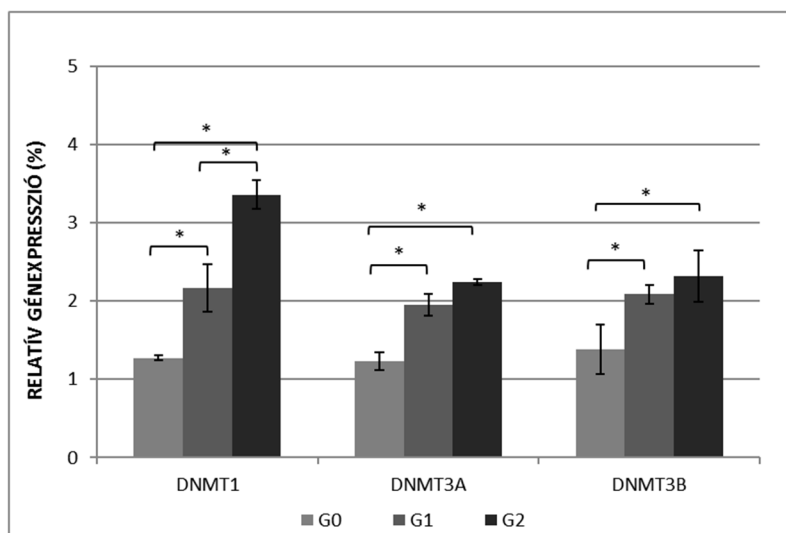
A *DNMT3A* hasonlóan a *DNMT1* gén expressziós szintjeihez, fokozódó tendenciát mutatott a generációk előrehaladtával, ezen kívül szignifikáns eltérés mutatkozott (p<0,05) a G0 expressziós szintjének és a G1, G2 expressziós szintjének összehasonlítása esetén.

A *DNMT3B* esetében, – hasonlóan az előzőekben leírtakhoz - növekedés jellemezte az expressziót, ugyanakkor csak a G2 emelkedett szintje mutatott szignifikáns eltérést a G0-hoz képest (p<0,05), a többi összehasonlításban nem detektáltunk szignifikáns eltérést (G0-G1, G1-G2) (26. ábra).



26. ábra: A tartrazin egyszeres expozíciójú csoportjának expressziós mintázatbeli változásai, májban, *HPRT*-hez viszonyítva. A hibásávok a standard deviációt mutatják (n=18). * p<0,05

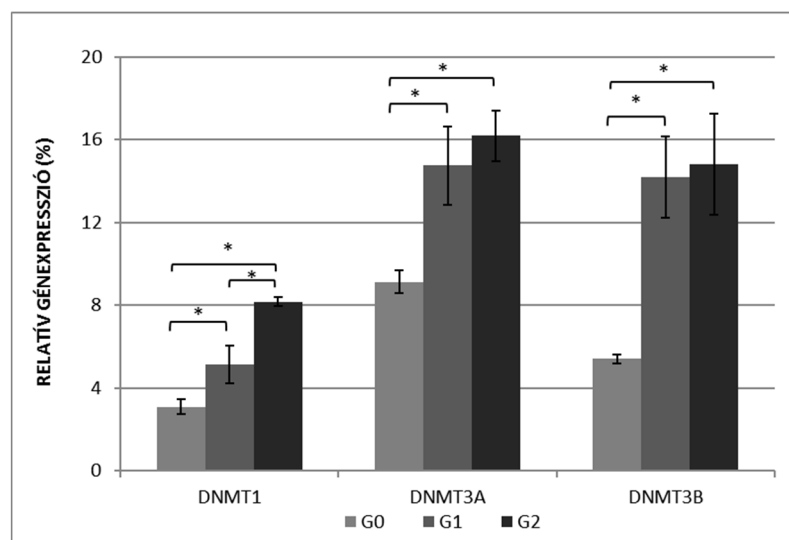
A tartrazin egyszeres expozíciójának eredményei a vesében még kifejezettebbek voltak. A metilációt befolyásoló gének, génexpressziós szintjeinek növekedésekor a *DNMT1* szignifikáns eltérést mutatott minden esetben (G0-G1, G1-G2, G0-G2), így nem csak az emelkedő trend volt megfigyelhető, hanem az anyagmennyiség generációs hatása is (p<0,05). A *DNMT3A*, *DNMT3B* lekövette a májban tapasztalt változásokat, miszerint a G0 expressziós szintjét összehasonlítva a G1, G2 expressziós szintjeivel szignifikáns eltérést találtunk, ugyanakkor a G1-G2 nem mutatott ilyen mértékű eltérést (27.ábra).



27. ábra: A tartrazin egyszeres expozíciójú csoportjának expressziós mintázatbeli változásai, vesében, *HPRT*-hez viszonyítva. A hibásávok a standard deviációt mutatják (n=18). * p<0,05

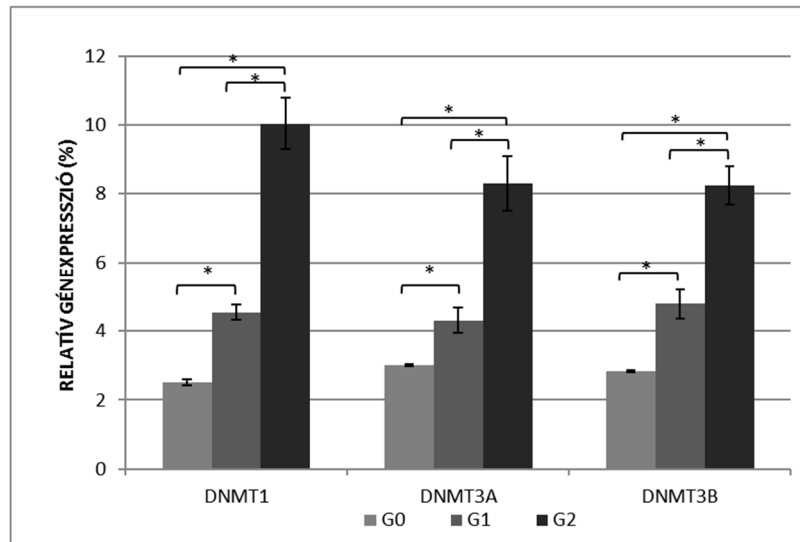
A tartrazin tízszeres expozíciójának ugyancsak egyértelmű hatása volt a kísérleti állatok generációinak expressziós mintázatára.

A máj, *DNMT3A* és a *DNMT3B* génjéről expresszált szintek esetében a G0 expressziós szintjét összehasonlítva a G1, G2 expressziós szintjeivel szignifikáns eltérést találtunk ($p < 0,05$) ugyanakkor a G1-G2 összehasonlítása nem mutatott ilyen mértékű differenciát. A *DNMT1* expressziós mintázata ugyanakkor ismét nemcsak az emelkedő trendet prezentálta, hanem az anyagmennyiség generációs hatását is, mivel az minden esetben szignifikáns eltérést mutatott ($p < 0,05$)(28. ábra).



28. ábra: A tartrazin tízszeres expozíciójú csoportjának expressziós mintázatbeli változásai, májban, *HPRT*-hez viszonyítva. A hibasávok a standard deviációt mutatják (n=18).
* $p < 0,05$

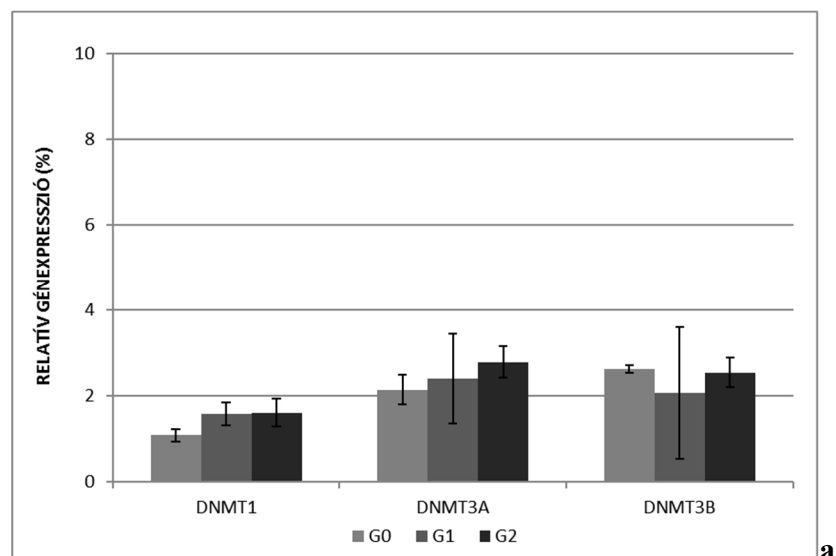
A tartrazin, vesére ható tízszeres expozíciója még kifejezettebb hatással volt az expressziós profilra, mint az egyszeres expozíció. Ebben az esetben egyértelműen igazolódik, mind a generációs fokozódás kérdése, mind az anyagmennyiség függő dózis-hatás. A metilációban szerepet játszó gének, expressziós szintjének növekedése a *DNMT1* *DNMT3A*, *DNMT3B* esetében egyaránt szignifikáns eltérést mutatott minden esetben (G0-G1, G1-G2, G0-G2) ($p < 0,05$). A szignifikánsan emelkedő trend (összes gén esetén), valamint az egyszeres expozíció okozta eredményekkel történő összehasonlítása, jelentős modifikáló hatásra hagy következtetni (29. ábra).

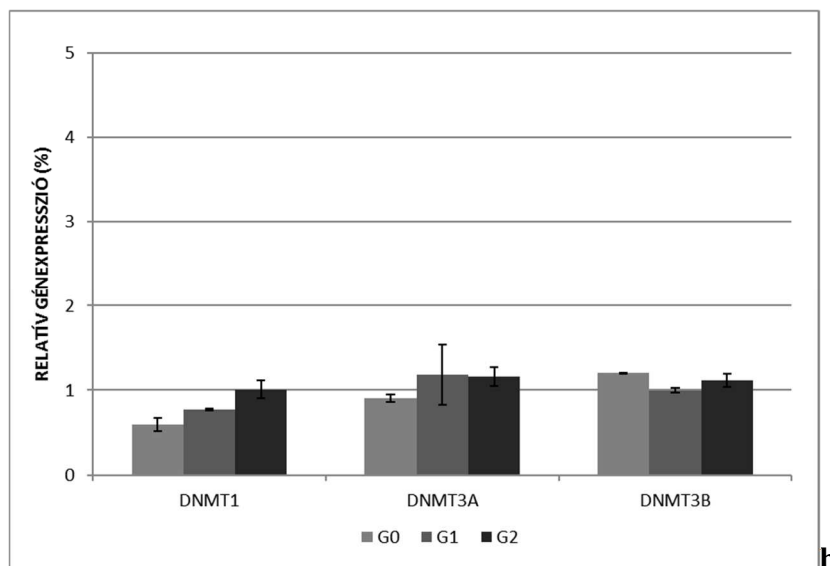


29. ábra: A tartrazin tízszeres expozíciójú csoportjának expressziós mintázatbeli változásai, vesében, *HPRT*-hez viszonyítva. A hibásávok a standard deviációt mutatják (n=18).
* p<0,05

5.3.2. Nőstény egyedek, metilációban szerepet játszó génjeinek, expressziós vizsgálati eredményei

A nőstények esetében, hasonló eredményt mértünk a kontrollcsoportoknál. Várakozásunknak megfelelően nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést az expressziós mintázatban a három generáció között, egyik gén esetében sem (p>0,05). A máj és a vese változatlan génexpressziós profilja, vélhetően az „inbred” tenyésztésnek és a reguláris rágcslótáp fogyasztásnak köszönhető. A kontrollcsoport megbízhatósági tartományon belüli változása elengedhetetlen a szignifikáns eltérések tényleges észlelése érdekében (30. és 31. ábra).

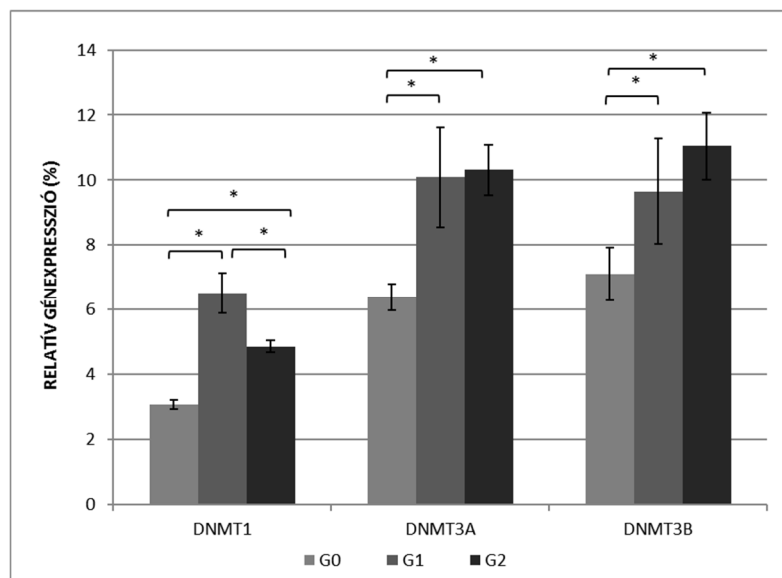




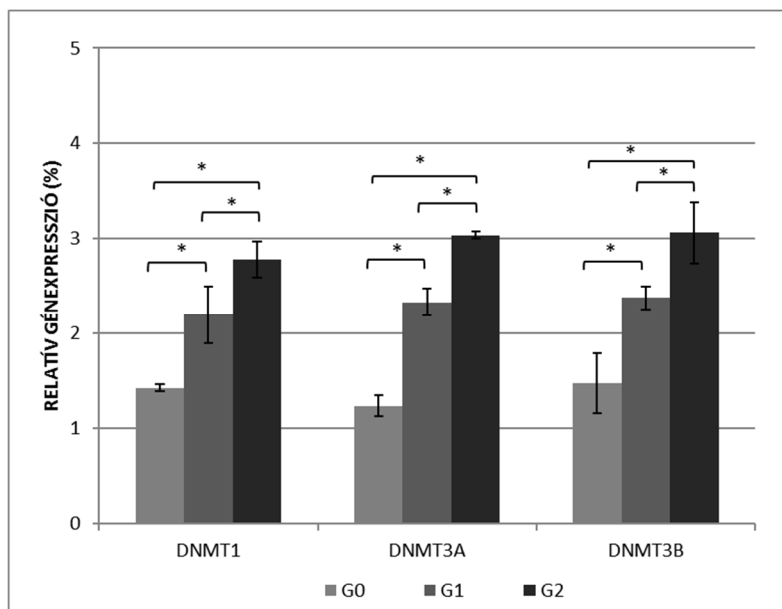
30, 31. ábra: A kontrollcsoport expressziós mintázatának változásai, májban (a), vesében (b), *HPRT*-hez viszonyítva. A hibasávok a standard deviációt mutatják (n=18; n=18).
* p<0,05

A tartrazin egyszeres expozíciójú csoportjánál, a máj esetén, a *DNMT1*-ben eddig nem tapasztalt tendenciát figyeltünk meg. Bár az eltérések minden esetben szignifikánsnak bizonyultak (p<0,05) eddigi eredményeinkkel ellentétesen a dózis és az általa kiváltott hatás nem követte a reguláris tendenciát. Ebben az esetben a G1 generáció magasabb expressziós szintet mutatott mint a G2. Mindemellett hasonlóan a hímek ezen csoportjához, a máj *DNMT3A* és a *DNMT3B* génjéről expresszált szintek esetében a G0 expressziós szintjét összehasonlítva a G1, G2 expressziós szintjeivel szignifikáns eltérést találtunk (p<0,05), ugyanakkor a G1-G2 összehasonlítása nem mutatott ilyen mértékű differenciát (32. ábra).

Nőstények esetében, a vesében már egyszeres expozícióban mutatkozik azon jelentős hatás, melyet a hímek esetében csak a tízszeres expozíció eredményezett. Ez esetben is egyértelműen igazolódik mind a generációs fokozódás kérdése, mind az anyagmennyiség függő dózis-hatás. A metilációban szerepet játszó gének, expressziós szintjeinek növekedése a *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* esetében egyaránt szignifikáns eltérést mutatott minden esetben (G0-G1, G1-G2, G0-G2) (p<0,05)(33. ábra).



32. ábra: A tartrazin egyszeres expozíciójú csoportjának expressziós mintázatbeli változásai, májban, *HPRT*-hez viszonyítva. A hibásávok a standard deviációt mutatják (n=18).
* p<0,05

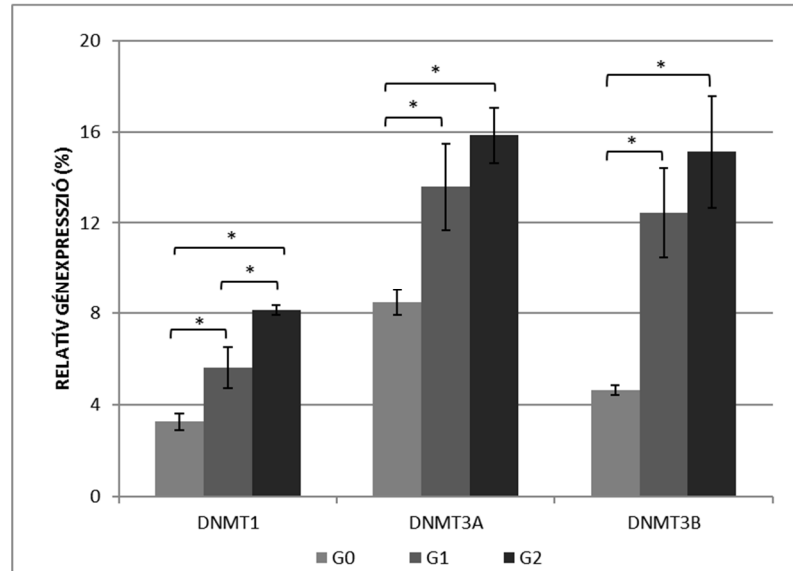


33. ábra: A tartrazin egyszeres expozíciójú csoportjának expressziós mintázatbeli változásai, vesében, *HPRT*-hez viszonyítva. A hibásávok a standard deviációt mutatják (n=18).
* p<0,05

A tartrazin tízszeres expozíciója a májban és a vesében is teljes mértékben lekövette a hímeknél tapasztalt eredményeket.

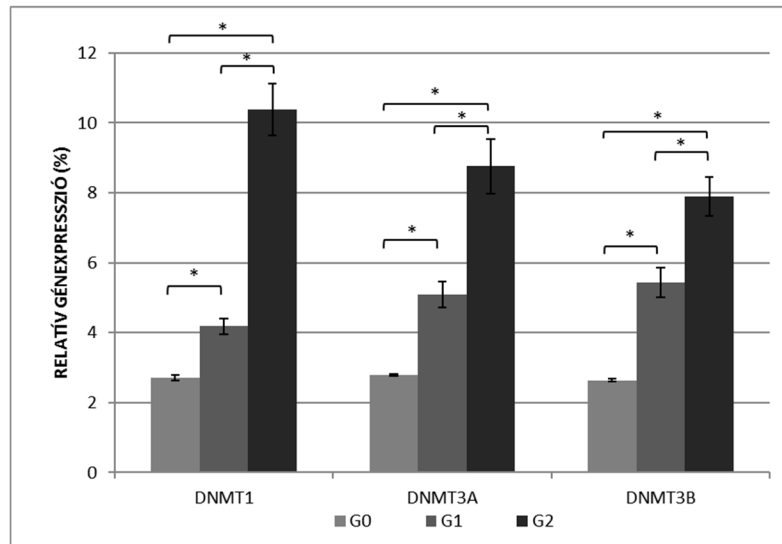
A máj esetében, a *DNMT1* nemcsak az emelkedő trendet prezentálta, hanem az anyagmennyiség generációkra gyakorolt hatását, minden esetben szignifikáns eltérést tapasztaltunk (p<0,05). *DNMT3A* és a *DNMT3B* génjéről expresszált szintek esetében a G0 expressziós szintjét összehasonlítva a G1, G2 expressziós szintjeivel

szignifikáns eltérést mutatott ($p < 0,05$), de a G1-G2 szintjeit összevetve ez már nem mondható el (csak egy esetben *DNMT1*)(34. ábra).



34. ábra: A tartrazin tízszeres expozíciójú csoportjának expressziós mintázatbeli változásai, májban, *HPRT*-hez viszonyítva. A hibasávok a standard deviációt mutatják ($n=18$).
* $p < 0,05$

A tartrazin, vesére ható tízszeres expozíciója itt is kiemelten jelezte a modifikáló hatást. Ebben az esetben is egyértelműen igazolódik, mind a generációs fokozódás kérdése, mind az anyagmennyiség függő dózis-hatás. A metilációt befolyásoló gének, expressziós szintjeinek növekedése a *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* esetében egyaránt szignifikáns eltérést mutatott, minden esetben (G0-G1, G1-G2, G0-G2) ($p < 0,05$). Mivel ezen irányú emelkedés és szignifikáns eltérés mindkét nem esetében hasonló effektivitást mutatott, így az megbeszélésben hatalmas jelentőséggel bír majd (35. ábra).



35. ábra: A tartrazin tízszeres expozíciójú csoportjának expressziós mintázatbeli változásai, vesében, *HPRT*-hez viszonyítva. A hibásávok a standard deviációt mutatják (n=18).
* p<0,05

6. Megbeszélés

Megvizsgálva a fejlett országok mortalitási statisztikáit könnyen megállapítható, hogy a daganatos megbetegedések, a vezető halálokok közül, kiemelt helyen szerepelnek. A WHO adatai szerint az évi 56 millió haláleset 12%-ért ezen kórkép felelős. Magyarországon az évi összhalálozás mintegy 25%-a daganatos eredetű.

A daganatos megbetegedések egyes fajtáinak előfordulási gyakoriságát is növekedés jellemzi hazánkban. Ha a tüdődaganatok és a női emlődaganatok százezer lakosra vonatkoztatott, incidens morbiditási adatait szemügyre vesszük 2003 és 2015 között, jól megfigyelhető az emelkedő esetszám.

A prevalens összesetszám is tendenciózus növekedést mutat úgy, hogy a regisztrált betegek csak egy töredékét képviselik a ténylegesen beteg egyének számának (rejtett morbiditás). Kijelenthető, hogy a daganatos megbetegedések korunk egyik legjelentősebb népegészségügyi kockázatát jelentik.

Az élelmiszeripar folyamatosan próbál alkalmazkodni az egyes fogyasztói igényekhez, ez ideális esetben állandó termékminőséget foglal magában. Ugyanakkor nem szabad elfelejteni, hogy számos kedvezőtlen következménnyel is járhat ez a tendencia. Az egyik ilyen tényező az adalékanyagok használatának folyamatos terjedése, alkalmazásuk növekedése. Az élelmiszeripar sem anyagi megfontolásból, sem a technológián belüli kezelhetőség szempontjából nem kíván változtatni a már „bevált” gyártási folyamatokon, előállítási protokollokon, annak ellenére, hogy ezek jelentős részében szintetikus, mesterséges úton előállított adalékanyagokat használnak fel (Raposa et al., 2016a).

Az adalékanyagok fogalmát és felhasználását hazánkban egyrészt a 1333/2008/EK rendelet (az élelmiszer-adalékanyagokról), a 231/2012/EU rendelet (az élelmiszer- adalékok specifikációinak meghatározásáról) szabályozza valamint a Magyar Élelmiszerkönyv (Codex Alimentarius Hungaricus) ide vonatkozó 1-2-89/107 számú előírása (az élelmiszerekhez engedélyezett adalékanyagok általános előírásai) határozza meg (Sohárné, 1993).

Az adalékanyagok egyik leggyakrabban - érzékszervi tulajdonságok befolyásolására - használt csoportja a mesterséges színezékek. A mesterséges színezékekkel

kapcsolatos tudományos eredmények sokszor eltérőek, nem egyértelműek, annak ellenére, hogy nagy publicitásnak „örvend” ez a témakör. A legtöbb vizsgálatban ezeket az anyagokat elemi állapotban és egymástól teljesen eltérő dózisban tanulmányozzák. Szervezetbeli metabolizációjuk, hatásvizsgálataik, genotoxicitásuk esetleges karcinogén hatásuk eltérő vizsgálati eredményeket mutat (Raposa et al., 2016a). Emellett felvetődik az a kérdés, hogy ezen anyagoknak vannak-e káros, az egészségre ártalmas hatásaik illetve ezek a hatások milyen formában észlelhetők?

A tumor kialakulás többlépcsős folyamatának különféle pontjain kívántuk vizsgálni azon biomarkereket, melyek mind molekuláris epidemiológiát, mind az epigenetikát közvetetten érintő szempontból (metilációs mintázat expressziós változásai) „fényt deríthetnek” ezen anyagok *in vivo* mechanizmusaira és tumor kialakulásban betöltött szerepére.

Az élelmiszeripar által alkalmazott adalékanyagok, különösen a színezékek folyamatos kis dózisú expozíciót jelentenek már kisgyermek kortól kezdve szervezetünk számára. A több évig fennálló expozíció hatására bekövetkező genetikai/epigenetika változások feltételezhetően összefüggésbe hozhatóak a daganatkialakulással (Esteller, 2008).

Kutatásunkban két azoszínezék: a tartrazin és az azorubin génexpresszióra és metilációs mintázat kialakításában szerepet játszó génre gyakorolt hatását kívántuk vizsgálni mRNS szinten, oly módon, hogy a kísérleti állatok szerveiből mintát véve, Trizol protokoll alapján RNS-t izoláltunk, majd azt RT-PCR-al analizáltuk. A génexpressziós szinteket egy ún. „house keeping” génhez (*HPRT1*) viszonyítva számítottuk ki, majd hasonlítottuk össze az egyes kezelések esetén.

A citokróm P450 enzimcsalád képviselőinél (*CYP1A1* és *CYP2E1*) mért változások alapján elmondhatjuk, hogy az azorubin jelentős génexpresszió változást nem okozott a metabolizáló enzimek esetében. Ennek értelmében vizsgálati eredményünk tovább bővíti azokat az *in vivo* és *in vitro* szakirodalmi adatokat, melyekben genotoxicitásra illetve karcinogenezisre utaló jelet nem találtak (EFSA ANS, 2009b; TemaNord, 2002; Ashby és Tennant, 1988; Benigni, 1989; Cameron et al., 1987; Gulati et al., 1989; Kornbrust és Barfknecht, 1985; McGregor et al., 1988; Mortelmans et al., 1986; Shelby és Stasiewics, 1984; Sweeney et al., 1994; Tennant et al., 1986; 1987; Zeiger, 1987). Ugyanakkor mégis érdekes kérdés az expozíció

nagyság kérdése, mivel a laikusok általában tájékozatlanok az egyes élelmiszerek összetevőinek mennyiségével kapcsolatban. Magasabb dózis fogyasztása esetén (min. 4,7x ADI) ugyanakkor az azorubinnak igazoltan negatív hatása van az egyes biokémiai paraméterekre (Amin et al., 2010; Mason et al., 1974).

A tartrazinnál jelentős génexpresszió emelkedés, sok esetben szignifikáns eltérés volt megfigyelhető. Megemlítendő, hogy ezek az eltérések esetünkben dóziszfüggőnek bizonyultak, nem is beszélve a kémiai karcinogénnel történő interakcióról a *CYP1A1* és *CYP2E1* esetében egyaránt. Mégis megemlítendő, hogy a DMBA kezelés valamint a tízszeres tartrazin expozíció + DMBA kezelés expressziós szintjének összehasonlítása érdekes eredményt hozott, mivel a DMBA szintje bizonyult magasabbnak, így felmerülhet a kérdés, hogy az anyag, nagy dózisban kemopreventív hatással bírhat e kémiai karcinogének esetén. Ezen megállapítás eldöntésére valamint eredményünk felülvizsgálatára további vizsgálatot tervezünk, mivel a szakirodalomban nem találtunk hasonló hatásra utaló adatot.

Feltételezésünket, mely szerint: a mesterséges színezékeket (szeparálva és együtt adva) adott koncentrációban (többféle dózis) tartalmazó tápot fogyasztó kísérleti állatok esetében, a *CYP1A1* és *CYP2E1* aktivitása eltérő lesz a kontrollcsoportéhoz képest több szervből vett minta esetén, továbbá feltételezhetően a dózis növekedésével egyenes arányú mRNS koncentráció növekedést figyelhetünk meg – a tartrazin esetében teljes mértékben alátámasztottuk, míg az azorubin esetében azt megcáfoltuk (kontrollcsoporthoz viszonyított szignifikáns különbséget, azonkívül dóziszfüggő expresszió szint fokozódást nem tapasztaltunk).

A sejtciklus szabályozásában szerepet játszó gének esetében korábbi eredményeink további megerősítést nyertek. A CYP450 metabolizáló enzimeinél tapasztalt eredményeket nagyban lekövezték az *NF- κ B*, *GADD45 α* , *MAPK8* gének expressziós változásai.

Feltételezésünk szerint, a tumor kialakulásban jelentős szerepet játszó kinázok, sejtciklus szabályozó gének (*NF- κ B*, *GADD45 α* , *MAPK8*) esetében a már ismertett mesterséges színezék expozíció hatására magasabb mRNS koncentrációt mérünk a kontrollcsoporthoz viszonyítva. Expozíció – hatás egyenes arányú kapcsolattal.

Eredményeink alapján az azorubinnak önmagában a kontrollcsoporthoz képest nem volt jelentős, szignifikáns génextpresszió modifikáló hatása. Így azon tudományos eredményeket támasztja alá vizsgálatunk eredménye, melyben nem volt megfigyelhető karcinogén hatás (Durnev et al., 1995; EFSA ANS 2009b; Holmes et al., 1978 a; b; Gaunt et al., 1967).

A tartrazin hatását tekintve már jelentősebb eredményekről tudunk beszámolni. A *GADD45a* gént leszámítva, (ennek okát a jövőben vizsgálni kívánjuk) jelentős génextpresszió szint fokozódást mértünk a kontrollcsoporthoz képest (szignifikáns emelkedés). Dózisfüggő emelkedést figyeltünk meg az *NF-κB* valamint a *MAPK8* esetében egyaránt. Ennek értelmében feltételezésünk csak a tartrazin esetében igazolódott.

Kiemelendő, hogy a tartrazin több esetben hajlandóságot mutatott az azorubin expozícióval történő hatásaddícióra az *NF-κB*, *MAPK8* esetében egyaránt. Magasabb dózisonál, több alkalommal szignifikáns eltérést detektáltunk a kontrollcsoporthoz képest és emelkedett szintet az egyszeres expozícióhoz viszonyítva. A fentiek tükrében elmondható, hogy a vizsgált élelmiszerszínezékek hajlandóságot mutathatnak szervezeten belüli kölcsönhatásra.

A metilációban szerepet játszó gének, expressziós vizsgálati eredményeit összefoglalva elmondható, hogy a második és harmadik generációban szignifikáns fokozódás volt megfigyelhető, mRNS szinten, minden gén esetén (*DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*), míg a májban ezek a változások több esetben csak a G0 – G2 összehasonlításának relációjában mutatkoztak meg, addig a vese mintáinak esetében ez már a G0-G1 összevetésében is megfigyelhető volt, nem beszélve a G2 „overexpresszió” szintjéről. A feltételezett generációk közötti dózisfüggő hatásfokozódást expressziós szinten alátámasztottuk.

Megemlítendő, hogy a generációs fokozódásra vonatkozó feltételezésünk is igazolódott, mivel az anyagmennyiség növekedésével, a tízszeres expozíciónál mind a májban, mind a vesében kimutatható volt a G0-G1-G2 között a szignifikáns eltérés, valamint a fokozódó trend.

Metilációs mintázatot befolyásoló génekre vonatkozó, vizsgálati anyagot, a rendelkezésre álló tudományos adatbázisokban nem találtunk, ugyanakkor a fent leírt

eredmények eddigi ismereteink alapján daganatkeltő hatásra utalhatnak. Tekintettel arra, hogy a sejtciklust szabályozó gének hipermetilációja esetén allélvesztéssel járó inaktiváció valamint facilitált génmutációt történhet illetve, hogy a humán daganatok többségében az előzőekben bemutatott három DNS-metil-transzferáz emelkedett mRNS és fehérje expressziós szintje jellemző (Chen és Chan, 2014; Jurasek et al., 2017).

Összefoglalva vizsgálati eredményeinket az azorubin esetében igazoltuk az eddig publikált evidenciákat, mivel daganatkeltő hatásra utaló jelet, több esetben sem találtunk.

A tartrazin esetében ugyanakkor jelentős eredménynek számít, hogy mind a metabolizáló enzimek, a sejtciklus szabályozás és a metilációt befolyásoló gének szintjén dózisfüggő növekedést, generációs fokozódást, más színezékanyagokkal és kémiai karcinogénnel történő interakciót (több esetben hatásaddíciót) mutattunk ki, mely értelmében a tartrazin potenciális rizikótényező lehet a daganat kialakulásra, ellenben az irodalomban több helyen is megtalálható eredményekkel (TemaNord, 2002; EFSA ANS, 2009a; Borzelleca és Hallagan, 1988a; b; Moutinho et al., 2007; Australian Government, 2014).

A disszertációban bemutatott vizsgálati eredményeink felhívják a figyelmet arra, hogy érdemes megismerni az élelmiszerbiztonsági szabályozások színezékekre vonatkozó részeit és megfontolni felülvizsgálatukat. A fogyasztók tekintetében előnyösebb lehet, ha egészségük megőrzése érdekében, olyan élelmiszereket választanak, melyek természetes vagy természetazonos élelmiszerszínezék(ek)et tartalmaznak, vagy egyáltalán nem tartalmaznak ilyen adalékanyagot.

7. Új eredmények összefoglalása

7.1. A CYP450 metabolizáló enzimeinek génexpressziós mintázatára vonatkozó, új eredmények összefoglalása (*CYP1A1*, *CYP2E1*)

A citokróm P450 enzimes család képviselőinél mért változásokat tekintve, az azorubin jelentős génexpresszió változást nem okozott a metabolizáló enzimek esetében (máj és vese minták esetében).

- Az azorubin egyszeres valamint tízszeres, ADI dózisa nem okoz szignifikáns génexpresszió emelkedést a *CYP1A1* és *CYP2E1* metabolizáló enzimek esetében.

A tartrazinnál jelentős emelkedés sok esetben szignifikáns eltérés volt megfigyelhető. Megemlítendő, hogy ezek az eltérések esetünkben dózisfüggőnek nyilvánultak, nem is beszélve a kémiai karcinogénnel történő hatásaddícióról a *CYP1A1* és *CYP2E1* egyaránt (máj és vese minták esetében).

- A tartrazin tízszeres, ADI dózisa jelentős, szignifikáns génexpresszió emelkedést okoz a *CYP1A1*, *CYP2E1* metabolizáló enzimek esetében, dózisfüggő módon, mely a nagyobb dózis által okozott nagyobb mértékű fokozódást jelenti.
- A tartrazin kémiai karcinogénnel történő hatásaddíciója szignifikáns mértékű emelkedést okoz a szeparált színezékekkel kezelt csoportok és a kontrollcsoport expressziós szintjeihez képest.

7.2. A sejtciklus szabályozásában szerepet játszó gének, kinázok génexpressziós mintázatára vonatkozó, új eredmények összefoglalása (*NF-κB*, *GADD45α*, *MAPK8*)

Eredményeink alapján az azorubinnak önmagában a kontrollcsoporthoz képest nem volt szignifikáns, génexpresszió modifikáló hatása a vizsgált génekre (máj). E tényt figyelembe véve, vizsgálatunk eredménye azon kutatásokat támasztja alá, melyben nem volt megfigyelhető genotoxikus vagy karcinogén hatás.

- Az azorubin, egyszeres valamint tízszeres, ADI dózisa nem okoz szignifikáns génexpresszió emelkedést a *NF-κB*, *GADD45α*, *MAPK8* gének esetében.

A tartrazin hatását tekintve a *GADD45α* gént leszámítva, jelentős génexpressziós mintázat változást mértünk a kontrollcsoporthoz képest (szignifikáns emelkedést okozott). Következésképpen dóziszfüggő emelkedést figyeltünk meg az *NF-κB*, valamint a *MAPK8* esetében egyaránt (máj).

- A tartrazin egyszeres, illetve tízszeres, ADI dózisa nem okoz szignifikáns génexpresszió emelkedést a *GADD45α* gén esetében.
- A tartrazin egyszeres valamint tízszeres, ADI dózisa szignifikáns génexpresszió emelkedést okoz a *NF-κB*, *MAPK8* gének esetében.

A tartrazin kifejezett hajlandóságot mutatott az azorubin expozícióval történő hatásaddícióra az *NF-κB*, *MAPK8* esetében egyaránt. Magasabb dózisnál, több alkalommal szignifikáns eltérést detektáltunk a kontrollcsoporthoz képest, illetve emelkedett szintet az egyszeres expozícióhoz viszonyítva (máj).

- A vizsgált élelmiszerszínezékek (tartrazin és azorubin) hajlandóságot mutatnak hatásaddícióra, szervezeten belüli interakcióra.

7.3. A metilációban szerepet játszó gének, multigenerációs, epigenetikai vizsgálat eredményei (*DNMT1, DNMT3A, DNMT3B*)

A második és harmadik generációban szignifikáns, expresszió belüli modifikáció, fokozódás volt megfigyelhető, minden gén esetén (*DNMT1, DNMT3A, DNMT3B*), míg a májban ezek a változások több esetben csak a G0 – G2 összehasonlításának relációjában mutatkoztak meg, addig a vese mintáinak esetében ez már a G0-G1 összevetésében is megfigyelhető volt, nem beszélve a G2 maximálisan fokozódott expressziós szintjéről (tartrazin expozíció hatása, máj homogenizátumban).

- A tartrazin egyszeres, ADI dózisa szignifikáns génexpresszió emelkedést okoz a metilációs mintázatot befolyásoló gének, a *DNMT1, DNMT3A, DNMT3B* esetében, G1-G2 generációk között (máj-vese homogenizátum - mindkét nemben).
- A tartrazin tízszeres, ADI dózisa jelentős, szignifikáns génexpresszió emelkedést okoz a metilációs mintázatot befolyásoló gének, a *DNMT1, DNMT3A, DNMT3B* esetében, G0-G1-G2 relációjában egyaránt, dózisdependens módon (máj-vese homogenizátum -mindkét nemben).
- A generációk közötti dózisfüggő hatásfokozódást, expressziós szinten bizonyítottuk (vesében kifejezettebb módon).

Az anyagmennyiség növekedésével, a tízszeres expozícióknál mind a májban, mind a vesében kimutatható volt a G0-G1-G2 között a szignifikáns eltérés (kontrollhoz és egymáshoz viszonyítva egyaránt) valamint a fokozódó trend.

- A metilációs mintázatot befolyásoló gének termékeinek generációs fokozódására vonatkozó feltételezésünk is igazolódott (máj, vese).

8. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani néhai témavezetőmnek Dr. Ember István † Professzor Úrnak, a PTE-ÁOK Orvosi Népegészségtani Intézet egykori vezetőjének, hogy lehetővé tette számomra, hogy kutatásaimat intézetében végezzem, valamint hogy elindított a tudományos pályán.

Köszönettel tartozom továbbá Dr. Varjas Tímeának, korábbi témavezetőmnek, munkatársamnak, aki nélkül kutatásom, tudományos munkám nem valósulhatott volna meg. Áldozatos munkája, fáradhatatlan segítségnyújtása mindig erősített abban, hogy jó úton járok. Hálámat fejezem ki több éve folyó tudományos dotációjáért.

Hálával tartozom továbbá témavezetőimnek prof. Dr. Kiss Istvánnak és prof. Dr. Figler Máriának áldozatos munkájukért és szellemi támogatásukért valamint, hogy szakmai tudásuk átadásával hozzájárultak értekezésem elkészüléséhez. Dr. Berényi Károlynak, statisztikai és epidemiológiai szubvenciójáért, illetve munkám segítéséért, barátságáért.

Köszönettel tartozom továbbá mind a PTE ÁOK Orvosi Népegészségtani Intézet, mind a PTE ETK Dietetikai és Táplálkozástudományi Intézet valamennyi dolgozójának, kollégáimnak, hogy türelmükkel és biztatásukkal segítették munkámat.

Köszönöm biztatását, segítségét és türelmét édesanyámnak, családomnak, barátaimnak és mindazoknak, akik közel állnak hozzám és átérték velem ezeket az éveket.

9. Irodalomjegyzék

1. 1333/2008/EK rendelet (az élelmiszer-adalékanyagokról): <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:354:0016:0033:hu:PDF> [Pécs, 2016.09.25.]
2. 231/2012/EU rendelet (az élelmiszer- adalékok specifikációinak meghatározásáról): <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:083:0001:0295:HU:PDF> [Pécs, 2016.10.02.]
3. Abdel-Latif MM, Kelleher D és Reynolds JV (2008) Potential role of NF-kB in esophageal adenocarcinoma: as an emerging molecular target. *Journal of Surgical Research.* 27: 293–319.
4. Abdel-Latif MM, O’Riordan JM, Ravi N, Kelleher D és Reynolds JV (2005) Activated nuclear factor-kB és cytokine profiles in the esophagus parallel tumor regression following neoadjuvant chemoradiotherapy. *Diseases of Esophagus.* 18: 246-252.
5. Aboel-Zahab H, el-Khyat Z, Sidhom G, Awadallah R, Abdel-al W és Mahdy K (1997) Physiological effects of some synthetic food colouring additives on rats. *Boll.Chim. Farm.* 136: 615-627.
6. Ahmed KM, Cao N és Li JJ (2006) HER-2 és NF-kB as the targets for therapy-resistant breast cancer. *Anticancer Research.* 26: 4235-4243.
7. Alberto Fernández-Medarde és Eugenio Santos (2011) Ras in Cancer and Developmental Diseases. *Genes Cancer.* 2(3): 344–358.
8. Andrea Klock, Bernhard G Herrmann (2002) Cloning és expression of the mouse dual-specificity mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase Mkp3 during mouse embryogenesis. *Mechanisms of Development.* 116: 243-247.
9. Antje Banning, Christian R.A. Regenbrecht, Ritva Tikkanen (2014) Increased activity of mitogen activated protein kinase pathway in flotillin-2 knockout mouse model. *Cellular Signalling.* 26:198-207.
10. Arnold LE, Lofthouse N és Hurt E. (2012) Artificial food colors és attentiondeficit/hyperactivity symptoms: conclusions to dye for. *Neurotherapeutics.* 9: 599–609.
11. Ashby J és Tennant RW (1988) Chemical structure, Salmonella mutagenicity és extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested in rodents by the U.S. NCI/NTP. *Mutat. Res.* 204 (1):17-115.
12. Australian Government, Department of Health: Toxicity of tartrazine: Scientific review report (2014) <https://www.tga.gov.au/sites/default/files/tartrazine-toxicity-1402.pdf> [Pécs, 2016.12.05.]
13. B. Govindarajan, R. Klafter, M.S. Miller, C. Mansur, M. Mizesko, X. Bai, K. LaMontagne Jr., J.L. Arbiser (2002) Reactive oxygen-induced carcinogenesis causes hypermethylation of p16(Ink4a) és activation of MAP kinase. *Mol. Med.* 8: 1–8.
14. B. Raposa, R. Pónusz, G. Gerencsér, F. Budán, Z. Gyöngyi, A. Tibold, D. Hegyi, I. Kiss, Á. Koller, T. Varjas (2016b) Food additives: sodium benzoate, potassium sorbate, azorubine és tartrazine modify the expression of NFkB, GADD45A és MAPK8 genes. *Acta Physiologica Hungarica/ Physiology International.* 103 (3): 334-

- 343.
15. Badal S, Delgoda R. (2014) Role of the modulation of CYP1A1 expression és activity in chemoprevention. *Journal of Applied Toxicology*. 34 (7): 743–53.
 16. Balajthy Zoltán, Aradi János, Csósz Éva, Scholtz Beáta, Szatmári István, Tózsér József, Varga Tamás (2011) *Molekuláris terápiák*, Debreceni Egyetem
 17. Balogh Péter, Engelmann Péter (2011): *Transzdzifferenciáció és regeneratív medicina*. Pécsi Tudományegyetem. http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0011_1A_Transzdzifferenciacio_hu_book/ch01s03.html [Pécs, 2016.12.20.]
 18. Bateman, B., Warner, J.O., Hutchinson, E., Dean, T., Rowlandson, P., Gant, C., Grundy, J., Fitzgerald, C., Stevenson, J. (2004) The effects of a double blind, placebo-controlled, artificial food colourings és benzoate preservative challenge on hyperactivity in a general population sample of preschool children. *Arch. Dis. Child*. 89: 506-511.
 19. Baumgardner DJ. (1989) Persistent urticaria caused by a common coloring agent. *Postgrad. Med*. 85: 265-266.
 20. Baylin SB, Herman JG. (2000): DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet*. 16 (4):168-74.
 21. Benigni R. (1989) Analysis of the National Toxicology Program data on in vitro genetic toxicity tests using multivariate statistical methods. *Mutagenesis*. 4: 412-419.
 22. Beresford AP. (1993) CYP1A1: friend or foe. *Drug metabolism reviews* 25 (4): 503–17.
 23. Bhatia MS. (1996) Allergy to Tartrazine in alprazolam. *Indian J. Med. Sci*. 50: 285-286.
 24. Bibikova M, Lin Z, Zhou L, Chudin E, Garcia EW, Wu B, Doucet D, Thomas NJ, Wang Y, Vollmer E, Goldmann T, Seifart C, Jiang W, Barker DL, Chee MS, Floros J, Fan JB. (2006) High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays. *Genome Res*. 16 (3): 383-93.
 25. Bièche I, Narjoz C, Asselah T, Vacher S, Marcellin P, Lidereau R, Beaune P, de Waziers I (2007) Reverse transcriptase-PCR quantification of mRNA levels from cytochrome CYP1, CYP2 és CYP3 families in 22 different human tissues. *Pharmacogenetics és Genomics*. 17 (9): 731–42.
 26. Bi-Feng Chen és Wai-Yee Chan (2014): The de novo DNA methyltransferase DNMT3A in development és cancer. *Epigenetics*. 9 (5):669-677.
 27. Biró György (2008) Gondolatok a táplálkozás és genetika kapcsolatáról, *Új Diéta*, 18 (2): 2-5.
 28. Bonser GM, Clayson DB és Jull IW (1956) The induction of tumors of the subcutaneous tissues, liver és intestine in the mouse by certain dyestuffs és their intermediates. *Brit. J. Cancer*. 10: 653-667.
 29. Borzelleca J.F és Hallagan JB. (1988a) Chronic toxicity/carcinogenicity studies of FD és C Yellow No. 5 (tartrazine) in rats. *Food Chem. Toxicol*. 26: 179–187.
 30. Borzelleca JF és Hallagan JB, (1988b) A chronic toxicity/carcinogenicity study of FD és C Yellow No.5 (Tartrazine) in mice. *Food Chem. Toxicol*. 26: 189-194.
 31. Brasier AR (2006) The NF-kappaB regulatory network. *Cardiovascular Toxicology*. 6 (2): 111–30.

32. Bush R. K., Taylor S. L. (1998) Adverse reactions to food és drug additives. *Allergy: Principles és Practice*. 5 (2): 1183-1198.
33. C. Bolognesi (2003) Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research*. 543: 251–272.
34. Cameron TP, Hughes TJ, Kirby PE, Fung VA és Dunkel VC (1987) Mutagenic activity of 27 dyes és related chemicals in the Salmonella/microsome és mouse lymphoma TK+/- assays. *Mutat. Res.* 189: 223-261.
35. Carlos Alberto Valencia Antúnez, Lucía Taja Chayeb, Miguel Ángel Rodríguez-Segura, Guadalupe Soledad López Álvarez, Claudia M. García-Cuéllar, Saúl Villa Treviño; (2014) DNA methyltransferases 3a és 3b are differentially expressed in the early stages of a rat liver carcinogenesis model. *Oncology Reports*. 32: 2093-2103.
36. Carrabino S, Carpani D, Livraghi A, Di Cicco M, Costantini D, Copreni E, Colombo C és Conese M (2006) Dysregulated interleukin-8 secretion és NF-kB activity in human cystic fibrosis nasal epithelial cells. *Journal of Cystic Fibrosis*. 5: 113-119.
37. Carter, C.M., Urbanowicz, M., Hemsley, R., Mantilla, L., Strobel, S, Graham, P.J., Taylor, E. (1993) Effects of a few food diet in attention deficit disorder. *Arch. Dis. Child*. 69: 564-568.
38. Chung CH, Parker JS, Ely K, Carter J, Yi Y, Murphy BA, Ang KK, El-Naggar AK, Zanation AM, Cmelak AJ, Levy S, Slebos RJ és Yarbrough WG (2006) Gene expression profiles identify epithelial-to-mesenchymal transition és activation of nuclear factor-kB signaling as characteristics of a high-risk head és neck squamous cell carcinoma. *Cancer Research*. 66: 8210-8218.
39. Chung KT. (1983) The significance of azo-reduction in the mutagenesis és carcinogenesis of azo dyes. *Mutat. Res.* 114: 269-281.
40. Codex Alimentarius Hungaricus, 1-2-89/107 számú előírás (az élelmiszerekhez engedélyezett adalékanyagok általános előírásai): <http://www.omgk.hu/Mekv/1/1289107.pdf> [Pécs, 2016.12.02.]
41. Collins-Williams C. (1985) Clinical spectrum of adverse reactions to Tartrazine. *J. Asthma*. 22: 139-143.
42. Combes RD. (1986) On the mutagenicity of tartrazine (FDés C Yellow No 5) *Arch. Toxicol.* 59 (1):68-70.
43. Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumerproducts és The Environment (COT) (2006) Statement on food additives és developmental neurotoxicity. <https://cot.food.gov.uk/sites/default/files/cot/cotstatementadditives.pdf> [Pécs, 2016.12.10.]
44. Connolly, A., Hearty, Á., Nugent, A., McKeivitt, A., Boylan, E., Flynn, A., Gibney, M.J. (2010) Pattern of intake of food additives associated with hyperactivity in Irish children és teenagers. *Food Additives és Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure és Risk Assessment*. 27: 447-456.
45. Corder EH és Buckley CE (1995) Aspirin, salicylate, sulfite és tartrazine induced bronchoconstriction. Safe doses és case definition in epidemiological studies. *J. Clin.Epidemiol.* 48:1269-1275.
46. Csapó J., Csapóné Kiss Zs. (2003) *Élelmiszer-kémia*. Mezőgazda Kiadó, Budapest. 358-362.
47. David TJ. (1987) Reactions to dietary Tartrazine. *Arch. Dis. Child*. 62: 119-122.

48. Devlin J és David TJ. (1992) Tartrazine in atopic eczema. *Arch. Dis. Child.* 67: 709-711.
49. DFG (1957) Toxikologische Daten von Farbstoffen und ihre Zulassung für Lebensmittel in verschiedenen. Mitteilung 6, 2. Auflage. Ländern, Franz Steiner Verlag GmbH, Wiesbaden. p:38.
50. Diehl J. F. (2002): Some established facts és some new concepts in food toxicology – A review. *Acta Alimentaria*, 31 (4): 355–369.
51. Doll R, Peto R. (1981) The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer Inst.* 66 (6):1191-308.
52. Donna McCann, Angelina Barrett, Alison Cooper, Debbie Crumpler, Lindy Dalen, Kate Grimshaw, Elizabeth Kitchin, Kris Lok, Lucy Porteous, Emily Prince, Edmund Sonuga-Barke, John O Warner, Jim Stevenson (2007) Food additives és hyperactive behaviour in 3-year-old és 8/9-year-old children in the community a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *The Lancet.* 370: 1560–15.
53. Durnev AD, Oreshchenko AV, Kulakova AV és Beresten NF (1995) Analysis of cytogenetic activity of food dyes. *Vopr. Med. Khim.* 41: 50-53.
54. E Young (1997) Prevalence of intolerance to food additives, *Environmental Toxicology és Pharmacology.* 4 (1–2): 111-114.
55. Eden S és Cedar H. (1994) Role of DNA methylation in the regulation of transcription. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4 (2): 255-9.
56. EFSA (European Food Safety Authority) Panel on Food Additives és Nutrient Sources added to food (ANS; 2009a) Scientific Opinion on the re-evaluation of tartrazine (E 102). *EFSA Journal.* 7 (11): 1331. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2009.1331/epdf> [Pécs, 2016.01.05]
57. EFSA (European Food Safety Authority) Panel on Food Additives és Nutrient Sources added to food (ANS; 2009b) Scientific Opinion on the re-evaluation of Azorubine/Carmoisine (E 122) as a food additive. *EFSA Journal.* 7 (11):1332. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2009.1332/epdf> [Pécs, 2016.01.05]
58. Elhkim MO, Héraud F, Bemrah N, Gauchard F, Lorino T, Lambré C, Frémy JM, Poul JM. (2007) New considerations regarding the risk assessment on tartrazine. An updated toxicological assessment, intolerance reactions és maximum theoretical daily intake in France. *Regulatory Tox. Pharmacol.* 47: 308–316.
59. Ember István (2007) Népegészségügyi Orvostan, Dialóg Campus Kiadó, Budapest – Pécs. XVI. Táplálkozás egészségtan és élelmiszerbiztonság. p: 653-712.
60. Ember István, Kiss István, Cseh Károly (2013a) Népegészségügyi Orvostan, Dialóg Campus Kiadó, Pécs, XIX. Táplálkozás egészségtan és élelmiszer-biztonság. p: 497-528.
61. Ember István, Kiss István, Cseh Károly (2013b) Népegészségügyi Orvostan, Dialóg Campus Kiadó, Pécs, XIV. Karcinogenezis. p: 357-374.
62. Ember István, Kiss István, Cseh Károly (2013c) Népegészségügyi Orvostan, Dialóg Campus Kiadó, Pécs, X. Epidemiológia. p: 111-152.
63. Escárcega RO, Fuentes-Alexandro S, García-Carrasco M, Gatica A, Zamora A (2007) The transcription factor nuclear factor-kappa B és cancer. *Clinical Oncology.* 19 (2): 154–61.
64. Esteller, M. (2008): Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.* 358:1148-1158.

65. European Parliament és of the Council (2008) Regulation No. 1333/2008: establishing a common authorisation procedure for food additives, food enzymes és food flavourings. OJ. L. 354: 1–33.
66. FDA/CFSAN (2011) Interim Toxicology Review. <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/FoodAdvisoryCommittee/UCM248102.pdf> [Pécs, 2016.01.06]
67. Fehér Katalin, Prantner Ida, Kiss István, Varjas Tímea, Gyöngyi Zoltán, Perjési Pál, Németh Katalin, Nowrasteh Ghodrattollah, Dombi Zsuzsanna, Ember István (2008) Molekuláris epidemiológiai biomarkerek a preventív és a prediktív medicinában, különös tekintettel a daganatkemprevencióra. *Orvostudományi Értesítő*. 81 (3): 163-168.
68. Ford GP, Stevenson BI, Evans JG (1987) Long term toxicity study of carmoisine in rats using animals exposed in utero. *Food Chemical Toxicology*. 25: 919-925.
69. Gao Y, Li C, Shen J, Yin H, An X, Jin H (2011) Effect of food azo dye tartrazine on learning és memory functions in mice és rats, és the possible mechanisms involved. *J Food Sci*. 76 (6):125-9.
70. Garner RC. és Nutman CA. (1977) Testing of some azo dyes és their reduction products for mutagenicity using *Salmonella typhimurium* TA 1538. *Mutat. Res*. 44: 9-19.
71. Gaunt I.F., Farmer, M., Grasso, P., Gangolli, S.D. (1967) Acute (rat és mouse) és short-term (rat) toxicity studies on carmoisine. *Food és Cosmetic Toxicology*. 5: 179-185.
72. Gilmore TD. (2006) Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 25 (51): 6680–4.
73. Giri, A.K., Das, S.K., Talukder, G., Sharma, A. (1990) Sister chromatid exchange és chromosome aberrations induced by curcumin és tartrazine on mammalian cells in vivo. *Cytobios*. 62: 111–117.
74. Go RE, Hwang KA, Choi KC (2015) Cytochrome P450 1 family és cancers. *The Journal of Steroid Biochemistry és Molecular Biology*. 147: 24–30.
75. Gomba, Sz., Ádány, R., Kásler, M., Ember, I., Kopper, L., Thurzó, L. (1997) *Az onkológia alapjai*. Medicina Kiadó, Budapest.
76. Gombos K, Pajkos G, Szele E, Gócze K, Juhász K, Juhász F, Tibold A, Ember I (2011) Microarray gene expression analysis of NF-KB p65 overexpressing primary papillary thyroid carcinomas. *Acta Medica Marisiensis*. 57 (S3): 4.
77. Gombos K, Zele E, Kiss I, Varjas T, Puskás L, Kozma L, Juhász F, Kovács E, Szanyi I, Ember I (2007) Characterization of microarray gene expression profiles of early stage thyroid tumours. *Cancer Genomics Proteomics*. 4 (6):403-9.
78. Grzelewska-Rzymowska I, Szmidt M, Kowalski ML és Rozniecki J (1986) Sensitivity és tolerance to Tartrazine in aspirin-sensitive asthmatics. *Allergol. Immunopathol*. 14: 31-36.
79. Gulati DK, Witt K, Anderson B, Zeiger E és Shelby MD (1989) Chromosome aberration és sister chromatid exchange tests in Chinese hamster ovary cells in vitro. III. Results with 27 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen*. 13: 133-193.
80. Gunda T. (2004) Számok az élelmiszeren – 2. rész. *Természet Világa*, 135 (3): 118–121.

81. Guy A. Settipane, Francis H. Chafee, I. Marshall Postman, Macy I. Levine, James H. Saker, Richard H. Barrick, S. Scott Nicholas, Howard J. Schwartz, Richard W. Honsinger, Donald E. Klein (1976) Significance of tartrazine sensitivity in chronic urticaria of unknown etiology, *Journal of Allergy és Clinical Immunology*. 57 (6): 541-546.
82. Hannuksela M., Haahtela T. (2001) Food Additives és Hypersensitivity. In: Branen A. L., Davidson P. M., Salminen S., Thorngate J. H. (szerk.): *Food Additives*. 2. kiadás. Marcel Dekker, New York, USA, p: 43–86.
83. Harland, J. I. (2005) Nutrition és genetics. ILSI Europe, Brussels, p: 32.
84. Hélène Denis, Matladi N Ndlovu, François Fuksa (2011) Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO Rep*. 12 (7): 647–656.
85. Helmut Schweikl, Karl-Anton Hiller, Alexander Eckhardt, Carola Bolay, Gianrico Spagnuolo, Thomas Stempf, Gottfried Schmalz (2008) Differential gene expression involved in oxidative stress response caused by triethylene glycol dimethacrylate. *Biomaterials*. 29 (10): 1377-1387.
86. Hoefen, R. J., és B. C. Berk (2002) The role of MAP kinases in endothelial activation. *Vascul Pharmacol*. 38: 271.
87. Hollander MC, Alamo I, Jackman J, Wang MG, McBride OW, Fornace AJ Jr (1993) Analysis of the mammalian gadd45 gene és its response to DNA damage. *J. Biol. Chem*. 268 (32): 24385–93.
88. Holmes, P.A., Pritchard, A.B., Kirschman, J.C. (1978a) A one-year feeding study with carmoisine in rats. *Toxicology*. 10:185-193.
89. Holmes, P.A., Pritchard, A.B., Kirschman, J.C. (1978b) Multigeneration reproduction studies with carmoisine in rats. *Toxicology*. 10:169-183.
90. Hong SP, Park HS, Lee MK és Hong CS (1989) Oral provocation tests with aspirin és food additives in asthmatic patients. *Yonsei. Med. J*. 30: 339-345.
91. Hung MS és Shen CK.(2003) Eukaryotic methyl-CpG-binding domain proteins és chromatin modification. *Eukaryot. Cell*. 2 (5): 841-6.
92. Ishidate, M., Sofuni, J., Yoshikawa, K. (1981) Chromosomal aberration tests in vitro as a primary screening tool for environmental mutagens and/or carcinogens. *Gann Monogr. Cancer Res*. 27: 95–108.
93. Ishidate, M., Sofuni, T., Yoshikawa, K., Hayashi, M., Nohmi, T., Sawada, M., Matsuka, A. (1984) Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. *Food Chem. Toxic*. 22: 623–636.
94. Izbirak A., Sumer S és Diril N. (1990) Mutagenicity testing of some azo dyes used as food additives. *Mikrobiyol. Bul*. 24: 48-56.
95. JECFA (1957) General principles governing the use of food additives. First report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. FAO Nutrition Meetings Report Series No. 15; WHO Technical Report Series No. 129. FAO/WHO, Genf, Svájc, p. 1–22.
96. JECFA (1983a) Joint WHO/FAO Expert Committee on Food Additives. Toxicological evaluation of certain food additives és contaminants. WHO Food Additives Series, No. 18.
97. JECFA (1983b) Joint WHO/FAO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain food additives és contaminants. WHO Technical Report Series, No. 696.

98. JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) (1966) 8th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Specifications for identity és purity és toxicological evaluation of food colours. WHO Food additives series, 66 (25): 88-92.
99. JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)(1964) Specifications for identity purity és toxicological evaluation of food colours in FAO nutrition. Meetings Report Series No 38B, WHO, Geneva
100. Jing Liu, Ren-Huan Xu, You-Xin Jin, De-Bao Wang (2001) Triplex targeting of human PDGF-B (c-sis, proto-oncogene) promoter specifically inhibits factors binding and PDGF-B transcription, *Nucleic Acids Res.* 29 (3): 783–791.
101. Joel T. Nigg, Ph.D., Kara Lewis, Ph.D., Tracy Edinger, N.D., és Michael Falk, Ph.D. (2012) Meta-Analysis of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder or Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Symptoms, Restriction Diet, és Synthetic Food Color Additives. *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry.* 51 (1): 86–97.
102. Jurasek Júlia Vanda, Raposa László Bence, Gubicskóné dr. Kisbenedek Andrea, Varga Veronika, Szabó Zoltán, dr. Varjas Tímea (2017) A nátrium-glutamát génexpresszióra gyakorolt hatásainak vizsgálata. *Orvosi Hetilap.* 158 (10): 383–388.
103. K.A. Amin, H. Abdel Hameid, A.H. Abd Elsttar (2010) Effect of food azo dyes tartrazine és carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function és oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food és Chemical Toxicology.* 48: 2994–2999.
104. Karpliuk IA, Volkova NA, Okuneva LA, Gogol AT és Rybakova KD. (1984) Mutagenic effect of the food-coloring agents Tartrazine és indigo carmine. *Vopr. Pitan.* 2: 58-61.
105. Keith D Robertson (2001) DNA methylation, methyltransferases, és cancer. *Oncogene.* 20 (24): 3139-55.
106. Kemp AS. és Schembri G. (1985) An elimination diet for chronic urticaria of childhood. *Med. J. Aust.* 143: 234-235.
107. Kessova I, Cederbaum AI (2003) CYP2E1: biochemistry, toxicology, regulation és function in ethanol-induced liver injury. *Curr. Mol. Med.* 3 (6): 509–18.
108. Kopper László (2005): *Onkogenomika. Magyar Tudomány, Onkológia.* 8: 945. <http://www.matud.iif.hu/05aug/04.html> [Pécs, 2016.01.10]
109. Kornbrust D és Barfknecht T. (1985) Testing of 24 food, drug, cosmetic, és fabric dyes in the in vitro és the in vivo/in vitro rat hepatocyte primary culture/DNA repair assays. *Environ. Mutagen.* 7: 101-120.
110. Koutsogeorgopoulou L, Maravelias C, Methenitou G és Koutselinis A. (1998) Immunological aspects of the common food colorants, amaranth és tartrazine. *Vet.Hum. Toxicol.* 40: 1-4.
111. Krémer Ildikó (2001) A tumorok keletkezésének biokémiája, fajtái. *Új Diéta.* 1: 22-25.
112. KSH Stadata: www.statinfo.ksh.hu [Pécs, 2016.09.25.]
113. KSH: http://www.ksh.hu/docs/hun/xstadat/xstadat_eves/i_wnh001.html [Pécs, 2016.09.25.]
114. Kulis M, Esteller M (2010) DNA Metilation és cancer. *Adv. Genet.* 70: 27-56.

115. Laura Gramantieri, Pasquale Chieco, Catia Giovannini, Michela Lacchini, Davide Treré, Gian Luca Grazi, Annamaria Venturi, Luigi Bolondi (2005) GADD45- α expression in cirrhosis és hepatocellular carcinoma: relationship with DNA repair és proliferation. *Human Pathology*. 36 (11): 1154-1162.
116. Laurie J. Smith, Raymond G. Slavin (1976) Drugs containing tartrazine dye. *Journal of Allergy és Clinical Immunology*. 58 (4): 456-470.
117. Liebermann DA, Hoffman B.(2008) Gadd45 in stress signaling. *Journal of Molecular Signaling*. 3: 15.
118. Liu F, Bardhan K, Yang D, Thangaraju M, Ganapathy V, Waller JL, Liles GB, Lee JR, Liu K (2012) NF- κ B directly regulates Fas transcription to modulate Fas-mediated apoptosis és tumor suppression. *The Journal of Biological Chemistry*. 287 (30): 25530–40.
119. Lu Y, Zhuge J, Wang X, Bai J és Cederbaum AI (2008) Cytochrome P450 2E1 Contributes to Ethanol-Induced Fatty Liver in Mice. *Hepatology*. 47 (5): 1483-1494.
120. Lück H és Rickerl E (1960) Lebensmittelzusatzstoffe und Mutagene Wirkung. VI Mitteilung: Prüfung der in Westdeutschlès zugelassenen und ursprünglich vorgeschlagenen, lebensmittelfarbstoffe auf mutagene Wirkung an E. coli. *Z. Lebensm.Unt.* 112: 157-174.
121. Ma Q, Lu AY (2007) CYP1A induction és human risk assessment: an evolving tale of in vitro és in vivo studies. *Drug metabolism és disposition: the biological fate of chemicals*. 35 (7): 1009–16.
122. Maekawa A, Matsuoka C, Onodera H, Tanigawa H, Furuta K, Kanno J, Jang JJ, Hayashi Y és Ogiu T (1987) Lack of carcinogenicity of Tartrazine (FD és C Yellow No. 5) in the F344 rat. *Food Chem. Toxicol.* 25: 891-896.
123. Makó Veronika (2011) Gyulladásos folyamatok vizsgálata endotélsejteken – doktori értekezés
http://phd.semmelweis.hu/mwp/phd_live/vedes/export/makoveronika.d.pdf
[Pécs, 2017.03.11]
124. Marques L, Dordal MT és Marti E. (1995) Tartrazine-induced rhinitis? *Arch. Bronconeumol.* 31 (5): 255.
125. Martine Poul, Gérard Jarry, Mostafa Ould Elhkim, Jean-Michel Poul (2009) Lack of genotoxic effect of food dyes amaranth, sunset yellow és tartrazine és their metabolites in the gut micronucleus assay in mice. *Food és Chemical Toxicology*. 47: 443–448.
126. Mason PL, Gaunt IF, Butterworth KR, Hardy J, Kiss IS., Grasso P (1974) Long-term toxicity studies of Carmoisine in mice. *Food Cosmet. Toxicol.* 12: 601-607.
127. McGregor DB, Brown A, Cattnach P, Edwards I, McBride D, Riach C, Caspary WJ, (1988) Responses of the L5178Y tk+/tk- mouse lymphoma cell forward mutation assay: III. 72 coded chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.* 12 : 85-154.
128. Meffert MK, Chang JM, Wiltgen BJ, Fanselow MS, Baltimore D (2003) NF-kappa B functions in synaptic signaling és behavior. *Nature Neuroscience*. 6 (10): 1072–8.
129. Michel O, Naeije N, Bracamonte M, Duchateau J, Sergysels R (1984) Decreased sensitivity to tartrazine after aspirin desensitization in an asthmatic patient intolerant to both aspirin és tartrazine. *Annals of Allergy*. 52 (5): 368–70.
130. Montano GM és Orea M. (1989) Frequency of urticaria és angioedema induced by

- food additives. *Rev. Alerg. Mex.* 36: 15-18.
131. Morales C, Penarrocha M, Bagan JV, Burches E, Pelaez A. (1995) Immunological study of Melkersson-Rosenthal syndrome. Lack of response to food additive challenge. *Clin. Exp. Allergy.* 25: 260-264.
 132. Mortelmans K, Haworth S, Lawlor T, Speck W, Tainer B, Zeiger E (1986) Salmonella mutagenicity tests: II. Results from the testing of 270 chemicals. *Environ. Mutagen.* 8: 1-119.
 133. Moutinho, ILD, Bertges LC, Assis RVC. (2007) Prolonged use of the food dye tartrazine (FDésC Yellow No. 5) és its effects on the gastric mucosa of Wistar rats. *Braz J Biol.* 67: 141–145.
 134. NCBI Gene card: Myc myelocytomatosis oncogene (2017) *Mus musculus* (house mouse): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/17869>
 135. NÉBIH (2012): Európa élelmiszer-adalékanyagainak újraértékelése. <http://portal.nebih.gov.hu/-/europa-elelmiszer-adalekanyagainak-ujraertekelese> [Pécs, 2016.09.25.]
 136. Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SM, Maltais LJ, Wain HM, Nebert DW (2004) Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse és human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes és alternative-splice variants. *Pharmacogenetics.* 14 (1): 1–18.
 137. Novembre E, Dini L, Bernardini R, Resti M és Vierucci A. (1992) Unusual reactions to food additives. *Pediatr. Med. Chir.* 14: 39-42.
 138. Orchard DC, Varigos GA. (1997) Fixed drug eruption to Tartrazine. *Australas. J. Dermatol.* 38: 212-214.
 139. Pacifico F, Leonardi A. (2010) Role of NF-kappaB in thyroid cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 321 (1): 29-35.
 140. Papathanasiou MA, Kerr NC, Robbins JH, McBride OW, Alamo I Jr, Barrett SF, Hickson ID, Fornace AJ Jr (1991) Induction by ionizing radiation of the gadd45 gene in cultured human cells: lack of mediation by protein kinase C. *Mol Cell Biol.* 11 (2): 1009–16.
 141. Perkins ND (2007) Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB és IKK function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 8 (1): 49–62.
 142. Pimienta, G., és J. Pascual (2007) Canonical and alternative MAPK signaling. *Cell Cycle.* 6: 2628.
 143. Pollastrini MT, Barea M és Salas J,(1990) Genotoxic study of commercial dyes with Tartrazine base in *S. typhimurium* his- és *E. coli* trp. *Rev. Sanid. Hig. Publica.* 64: 203-209.
 144. Pollock I, Warner JO. (1990) Effect of artificial food colours on childhood behaviour. *Arch. Dis. Child* 65: 74-77.
 145. Preetha Anand, Ajaikumar B. Kunnumakara, Chitra Sundaram, Kuzhuvilil B. Harikumar, Sheeja T. Tharakan, Oiki S. Lai, Bokyung Sung, Bharat B. Aggarwal (2008) Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharm Res.* 9: 2097–2116.
 146. Prieto L, Pastor A., Palop A., Castro J, Paricio A, Piquer A, (1986) Rhinitis with intolerance to non-steroidal anti-inflammatory agents. Report of 3 cases. *Allergol. Immunopathol.* 14: 147-153.

147. Prival MJ, Davis VM, Peiperl MD, Bell SJ. (1988) Evaluation of azo food dyes for mutagenicity és inhibition of mutagenicity by methods using *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res.* 206: 247-259.
148. Q. Ke, Q. Li, T.P., Ellen, H. Sun, M. Costa (2008) Nickel compounds induce phosphorylation of histone H3 at serine 10 by activating JNK-MAPK pathway. *Carcinogenesis*. 29: 1276–1281.
149. Rafii F, Hall JD, Cerniglia CE (1997) Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs és cosmetics before és after reduction by *Clostridium* sp. from the human intestinal tract. *Food Chem Toxicol.* 35: 897–901.
150. Raposa B, Szijártó Gy, Berényi K, Szabó I, Varjas T, Wolher V, Soltész D, Ember I (2012b) A brief review on the health effects of tartazine (E102) *Journal of Proactive Medicine*. 1 (2): 51-55.
151. Raposa Bence, Szijártó György, Berényi Károly, Szabó István, Szabó Zoltán, Varjas Tímea, Wolher Veronika, Soltész Dorottya, Ember István (2013) Rövid összefoglaló a tartazin (E102) egészségre gyakorolt hatásairól. *Magyar Epidemiológia*. IX-X:(4-1): 41-45.
152. Raposa Bence, Szijártó György, Kisbenedek Andrea, Berényi Károly, Varjas Tímea (2012a) Mono-azo színezékek testtömeg-változásra és génexpresszióra gyakorolt hatásainak vizsgálata állatkísérletes tesztrendszerben. *Magyar Epidemiológia*. 9 (2): 129-138.
153. Raposa Bence, Szijártó György, Soltész Dorottya, Pónusz Róbert, Szabó Zoltán, Tibold Antal, Juhász Krisztina, Kiss István, Varjas Tímea (2014) Élelmiszer-adalékanyagok tumor kialakulásra gyakorolt hatásainak molekuláris epidemiológiai vizsgálata. *Magyar Epidemiológia*. 11 (3-4): 87-98.
154. Raposa L. B, Szabó Z, Szabó Sz, Kovács R, Kisbenedek A, Breitenbach Z, Csölle I. Polyák É, Varjas T, Soltész D, Kubányi J, Kiss I, Figler M. (2016a) Mesterséges színezékek tumor kialakulásában betöltött szerepének és génexpresszió modifikáló hatásainak vizsgálata. 25 év a táplálkozástudományban a Pécsi Tudományegyetem Egészségtudományi Karán. *PTE ETK*. p: 93-102.
155. Rodler Imre (2008a) Élelmezés- és táplálkozásegészségtan, *Medicina Kiadó*, Budapest, 8.7. Rosszindulatú daganatos megbetegedések. p: 160-167.
156. Rodler Imre (2008b) Élelmezés- és táplálkozásegészségtan, *Medicina Kiadó*, Budapest, (2008b), p: 228-229.
157. Rodrigo Esaki Tamura, Jaíra Ferreira de Vasconcellos, Devanés Sarkar, Towia A. Libermann, Paul B Fisher, Luiz Fernando Zerbina (2012) GADD45 proteins: central players in tumorigenesis. *Curr Mol Med*. 12 (5): 634–651.
158. Rowe KS, Rowe KJ.(1994) Synthetic food coloring és behavior: a dose response effect in a double-blind, placebo-controlled, repeated-measures study. *J Pediatr*. 125 (5): 691-8.
159. Rowe KS. (1988) Synthetic food colourings és 'hyperactivity': a double-blind crossover study. *Aust. Paediatr. J.* 24: 143-147.
160. Sankaranarayanan N, Murthy MSS. (1979) Testing of some permitted food colors for the induction of gene conversion in diploid yeast. *Mutat. Res.* 67: 309-314.
161. Sasaki, Y.F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., Taniguchi, K., Tsuda (2002) The comet assay with 8 mouse organs: results with 39

- currently used food additives. *Mutat. Res.* 59: 103–119.
162. SCF (1984) Reports of the Scientific Committee for Food (14th series), opinion expressed 1983: 59.
 163. Schab DW, Trinh NT. (2004) Do artificial food colours promote hyperactivity in children with hyperactive syndromes? A meta-analysis of double-blind placebo-controlled trials. *J Dev Behav. Pediatr.* 25: 423–434.
 164. Schaubsluger W, Ruschmeyer J, Zabel P, Schlaak M. (1988) Intra-gastric provocation és antigen-induced in vitro histamine liberation by the food additive E 102. *Immun. Infekt.* 16: 118-119.
 165. Schulte-Korne G, Deimel W, Gutenbrunner C, Hennighausen K, Blank R, Rieger C, Renschmidt H, (1996) Effect of an oligo-antigen diet on the behavior of hyperkinetic children. *Z. Kinder. Jugendpsychiatr. Psychother.* 24: 176-183.
 166. Shannon Reagan-Shaw, Minakshi Nihal, és Nihal Ahmad (2007) Dose translation from animal to human studies revisite. *FASEB J.* 22: 659–661.
 167. Sheikh MS, Huang Y. (2003) Death receptor activation complexes: it takes two to activate TNF receptor 1. *Cell Cycle.* 2 (6): 550–2.
 168. Shelby MD, Stasiewicz S. (1984) Chemicals showing no evidence of carcinogenicity in long-term, two-species rodent studies: the need for short-term test data. *Environ. Mutagen.* 6: 871- 878.
 169. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens és toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese és 30 Caucasians. *The Journal of Pharmacology és Experimental Therapeutics.* 270 (1): 414–23.
 170. Simon RA, (2003) Adverse reactions to food additives. *Curr Allergy Asthma Rep* 3 (1): 62-6.
 171. Simon RA, (1986) Adverse reactions to food additives. *N. Engl. Reg. Allergy Proc.* 7: 533-542.
 172. Simopoulos AP, Ordovas JM. (2004) Nutrigenetics és Nutrigenomics. *World Rev. Nutr. Diet. Basel, Karger.* 93: 1-12.
 173. Smith G, Stubbins MJ, Harries LW, Wolf CR (1998) Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily. *Xenobiotica.* 28 (12): 1129–65.
 174. Smith ML, Chen IT, Zhan Q, Bae I, Chen CY, Gilmer TM, Kastan MB, O'Connor PM, Fornace AJ Jr. (1994) Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science.* 266: 1376-1380.
 175. Sohár Pné (1993) EK–adalékanyag–irányelvek honosítása. *Konzervújság.* 41 (2–3) 51–55.
 176. Sohár Pné (1998a) A húsiparban használható élelmiszer-adalékanyagok. *A Hús.* 8 (1) 18–22.
 177. Sohár Pné (1998b) E–gyem ne E–gyem? Tájékoztató az élelmiszer-adalékanyagokról. *Élelmészvezetők Lapja.* 2 (5): 8.
 178. Sohár Pné (2001) Tájékoztató az élelmiszer-adalékanyagokról. *Új diéta.* 10 (3-4): 23–24.
 179. Sohár Pné (2003) Élelmiszer-adalékanyagok. In: Rodler I. (szerk.): *Élelmiszerbiztonság és táplálkozás–egészségügy – Élelmiszerbiztonsági veszély*

- kockázatelemzés. Jegyzet az élelmiszerbiztonsági felügyelő képzéshez. Fodor József Országos Közegészségügyi Központ Országos Élelmezés- és Táplálkozástudományi Intézete, Budapest.
180. Sohár Pné (2005) Az élelmiszer-adalékanyagok biztonságos felhasználásának szabályai, alkalmazásuk várható előnyei. In: Sohár Pné, Domoki J. (szerk.): Mit kell tudni az élelmiszeripari adalékanyagokról? A Földművelésügyi és Vidékfejlesztési Minisztérium szakmai kiadványai. Budapest, 2005.
 181. Stern DF, Heffernan PA, Weinberg RA (1986) p185, a product of the neu proto-oncogene, is a receptorlike protein associated with tyrosine kinase activity. *Mol Cell Biol.* 1986, 6: 1729-1740.
 182. Stevenson J., Sonuga-Barke E., Warner J. O. (2007) Chronic és acute effects of artificial colourings és preservatives on children's behaviour. https://www.food.gov.uk/sites/default/files/137-1-233_additivesbehaviourfinrep_0.pdf [Pécs, 2016.11.20.]
 183. Supramaniam G, Warner JO. (1986) Artificial food additive intolerance in patients with angio- oedema és urticaria. *Lancet* 2 (8512): 907-9.
 184. Sweatman MC, Tasker R, Warner JO, Ferguson MM, Mitchell DN. (1986) Oro-facial granulomatosis. Response to elemental diet és provocation by food additives. *Clin Allergy.* 16 (4): 331-8.
 185. Sweeney EA, Chipman JK és Forsythe SJ,(1994) Evidence for direct-acting oxidative genotoxicity by reduction products of azo dyes. *Environ. Health Perspect.* 102 (6) 119- 122.
 186. Szakály Z. (2008) Trendek és tendenciák a funkcionális élelmiszerek piacán: mit vár el a hazai fogyasztó? *Élelmiszer, Táplálkozás és Marketing.* 5: 3-11.
 187. Szatlóczky E. (1994) Idegen anyagok és élelmiszer adalékok a táplálékban. In: Nékám K., Szemere P. (szerk.): *Táplálkozási allergiák.* Springer Hungarica Kiadó, Budapest, p: 130–139.
 188. Tanaka, T. (2006) Reproductive és neurobehavioural toxicity study of tartrazine administered to mice in the diet. *Food Chem. Toxicol.* 44: 179–187.
 189. Tarnavölgyi Gábor (2009a) Az élelmiszer-színezékek technológiai és humánegészségügyi vonatkozásai 1. rész. *Élelmezési ipar.* 63 (4): 97-100.
 190. Tarnavölgyi Gábor (2009b) Az élelmiszer-színezék technológiai és humánegészségügyi vonatkozásai 2. rész. *Élelmezési ipar.* 63 (5): 133-136.
 191. Tarnavölgyi Gábor (2009c) Az élelmiszer-színezékek technológiai és humánegészségügyi vonatkozásai 3. rész. *Élelmezési ipar.* 63 (6): 164-167.
 192. Tarnavölgyi Gábor (2009d): Az Élelmiszer-adalékanyagok szakmai és fogyasztói megítélése – doktori disszertáció. http://phd.ke.hu/fajlok/1258637968-tarnavolgyi_gabor_ertekezes.pdf [Pécs, 2016.11.20.]
 193. TemaNord (2002) Food additives in Europe 2000; Status of safety assessments of food additives presently permitted in the EU. *TemaNord.* 560: 53-60.
 194. Tennant RW, Margolin BH, Shelby MD, Zeiger E, Haseman JK, Spalding J, Caspary W, Resnick M, Stasiewicz S és Anderson B,(1987) Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from in vitro genetic toxicity assays. *Science.* 236: 933-941.
 195. Tennant RW, Stasiewicz S, Spalding JW,(1986) Comparison of multiple parameters of rodent carcinogenicity és in vitro genetic toxicity. *Environ. Mutagen.* 8: 205-227.

196. Thorngate J. H. (2001) Synthetic food colorants. In: Branen A. L., Davidson A.M., Salminen S., Thorngate J. H. (szerk.): Food Additives. 2. kiadás. Marcel Dekker, New York, USA, p: 477–500.
197. Thuvander A. (1995): Hypersensitivity to azo coloring agents. Tartrazine in food may cause rash és asthma. *Lakartidningen*. 92: 296-298.
198. Tian B, Brasier AR. (2003) Identification of a nuclear factor kappa B-dependent gene network. *Recent Progress in Hormone Research*. 58: 95–130.
199. Timberlake CM, Toun AK és Hudson BJ. (1992) Precipitation of asthma attacks in Melanesian adults by sodium metabisulphite. *P.N.G. Med. J.* 35: 186-190.
200. Titova ND. (2011) Use of the granulocytic myeloperoxidase release reaction to diagnose food additive allergies. *Klin. Lab. Diagn.* 3: 42-4.
201. Tomaszewski P, Tomaszewska GK, Pachecka J (2008) Cytochrome P450 Polymorphism – Molecular, Metabolic és Pharmatogenetic Aspects. II. Participation of CYP Isoenzymes in the Metabolism of Endogenous Substances és Drugs. *Acta Pol Pharm.* 65 (3): 307-318.
202. Tripathy NK, Patnaik KK, Nabi MJ. (1989) Genotoxicity of Tartrazine studied into somatic assays of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 224: 479-483.
203. Tsuda S, Murakami M, Matsusaka N, Kano K, Taniguchi K, Sasaki YF (2001) DNA damage induced by red food dyes orally administered to pregnant és male mice. *Toxicol. Sci.* 61: 92–99.
204. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM (1984) Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t (14;18) chromosome translocation. *Science*. 226 (4678): 1097–9.
205. Tsunehiro Oyama, Kenji Sugio, Toyohi Isse, Last Toshihiro Kawamoto (2008) Expression of Cytochrome P450 in non-small cell lung cancer. *Frontiers in Bioscience*. 13 (15): 5787-93.
206. TVE (2009) E-szám adatbázis. Tudatos Vásárlók Egyesülete. <http://www.tudatosvasarlo.hu/eszam> [Pécs, 2017.01.09.]
207. United States Food és Drug Administration (2007) Does FD és C Yellow No. 5 cause any allergic reactions? <http://web.archive.org/web/20090512004704/http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/foodaddi.html> [Pécs, 2016.10.10.]
208. Van Bever HP, Docx M, Stevens WJ,(1989) Food és food additives in severe atopic dermatitis. *Allergy*. 44: 588-594.
209. Varga Gábor (2002) Daganatok kórélettana, Semmelweis Egyetem, Orálbiológiai Tanszék, elektronikus tananyag: <http://semmelweis.hu/oralbiologia/files/2012/12/12-Daganatok-Varga.pdf> [Pécs, 2017.01.12.]
210. Viola M és Nosotti A. (1978) Applicazione del test di Ames su alcuni coloranti. *Boll. Chim. Farm.* 117: 402-415.
211. Vlahopoulos SA, Cen O, Hengen N, Agan J, Moschovi M, Critselis E, Adamaki M, Bacopoulou F, Coplés JA, Boldogh I, Karin M, Chrousos GP (2015) Dynamic aberrant NF-κB spurs tumorigenesis: a new model encompassing the microenvironment. *Cytokine és Growth Factor Reviews*. 26 (4): 389–403.
212. W. C. Willett (2000) Diet és cancer. *Oncologist*. 5: 393–404.
213. Watson R. (2008) European agency rejects links between hyperactivity és food

- additives. *BMJ*. 336: 687.
214. Wei Zhang, Hui Tu Liu (2002) MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*. 12: 9–18.
 215. WHO (2017) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> [Pécs, 2016.09.25.]
 216. Wilson N, Scott A. (1989) A double-blind assessment of additive intolerance in children using a 12-day challenge period at home. *Clin. Exp. Allergy*. 19: 267-272.
 217. Worm MA, Ehlers I, Sterry W és Zuberbier T. (2000) Clinical relevance of food additives in adult patients with atopic dermatitis. *Clin. Exp. Allergy*. 30 (3): 407-414.
 218. Wuthrich B,(1993) Adverse reactions to food additives. *Ann. Allergy*. 71: 379-384.
 219. Yannick Delpu, Pierre Cordelier, William C. Cho, Jérôme Torrisani (2013) DNA Methylation és Cancer Diagnosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 14: 15029-15058.
 220. Yoder JA, Yen RW, Vertino PM, Bestor TH, Baylin SB (1997) New 5' regions of the murine és human genes for DNA (cytosine-5)-methyltransferase. *J. Biol. Chem*. 271 (49): 31092–7.
 221. Yuan-Yuan Zhou, Ying Li, Wei-Qin Jiang, Lin-Fu Zhou (2015) MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Biosci. Rep*. 35 (3): e00199.
 222. Yvonne Y Li, Grace T. Y. Chung, Vivian W. Y. Lui, Ka-Fai To, Brigitte B. Y. Ma, Chit Chow, John K, S. Woo, Kevin Y. Yip, Jeongsun Seo, Edwin P. Hui, Michael K. F. Mak, Maria Rusan, Nicole G. Chau, Yvonne Y. Y. Or, Marcus H. N. Law, Peggy P. Y. Law, Zoey W. Y. Liu, Hoi-Lam Ngan, Pok-Man Hau, Krista R. Verhoeft, Peony H. Y. Poon, Seong-Keun Yoo, Jong-Yeon Shin, Sau-Dan Lee, Samantha W. M. Lun, Lin Jia, Anthony W. H. Chan, Jason Y. K. Chan, Paul B. S. Lai, Choi-Yi Fung, Suet-Ting Hung, Lin Wang, Ann Margaret V. Chang, Simion I. Chiosea, Matthew L. Hedberg, Sai-Wah Tsao, Andrew C. van Hasselt, Anthony T. C. Chan, Jennifer R. Grandis, Peter S. Hammerman és Kwok-Wai Lo (2017) Exome és genome sequencing of nasopharynx cancer identifies NF- κ B pathway activating mutations. *Nature Communications*. 8: 14121.
 223. Zeiger E. (1987) Carcinogenicity of mutagens: predictive capability of the Salmonella mutagenesis assay for rodent carcinogenicity. *Cancer Res*. 47: 1287-1296.

10. A disszertációhoz kapcsolódó és közvetlenül nem kapcsolódó publikációk és prezentációk listája

Értekezéshez kapcsolódó publikációk jegyzéke

„In extenso” közlemények jegyzéke

- B. Raposa, R. Pónusz, G. Gerencsér, F. Budán, Z. Gyöngyi, A. Tibold, D. Hegyi, I. Kiss, Á. Koller, T. Varjas (2016) Food additives: sodium benzoate, potassium sorbate, azorubine és tartrazine modify the expression of NFκB, *GADD45A* és *MAPK8* genes. *ACTA PHYSIOLOGICA HUNGARICA/ PHYSIOLOGY INTERNATIONAL*. 103 (3): 334-343.

IF: 0,814

- Raposa L B, Szabó Z, Szabó Sz, Kovács R, Kisbenedek A, Breitenbach Z, Csölle I, Polyák É, Varjas T, Soltész D, Kubányi J, Kiss I, Figler M (2016) Mesterséges színezékek tumor kialakulásában betöltött szerepének és génexpresszió modifikáló hatásainak vizsgálata. *25 ÉV A TÁPLÁLKOZÁSTUDOMÁNYBAN A PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI KARÁN*. p: 93-102.
- Raposa Bence, Szijártó György, Soltész Dorottya, Pónusz Róbert, Szabó Zoltán, Tibold Antal, Juhász Krisztina, Kiss István, Varjas Tímea (2014) Élelmiszer-adalékanyagok tumor kialakulásra gyakorolt hatásainak molekuláris epidemiológiai vizsgálata. *MAGYAR EPIDEMIOLOGIA*. 11 (3-4): 87-98.
- Raposa Bence, Szijártó György, Berényi Károly, Szabó István, Szabó Zoltán, Varjas Tímea, Wolher Veronika, Soltész Dorottya, Ember István (2013) Rövid összefoglaló a tartazin (E102) egészségre gyakorolt hatásairól. *MAGYAR EPIDEMIOLOGIA*. 9-10 (4-1): 41-45.
- Raposa B, Szijártó Gy, Kisbenedek A, Berényi K, Varjas T (2012) Mono-azo színezékek testtömeg-változásra és génexpresszióra gyakorolt hatásainak vizsgálata állatkísérletes tesztrendszerben. *EGÉSZSÉG-AKADÉMIA*. 3 (3): 177-184.
- Raposa B, Szijártó Gy, Berényi K, Szabó I, Varjas T, Wolher V, Soltész D, Ember I (2012) A brief review on the health effects of tartazine (E102). *JOURNAL OF PROACTIVE MEDICINE*. 1 (2): 51-55.

Értekezéshez kapcsolódó absztraktok, előadások jegyzéke

- Raposa László Bence (2016) Mesterséges élelmiszerszínezékek molekuláris epidemiológiai és epigenetikai vizsgálata. PTE ETK Egészségtudományi Doktori Iskola és az MTA TAB Egészségtudományi Munkabizottság VI. TUDOMÁNYOS FÓRUMA, Pécs, 2016.11.30.
- Raposa Bence, Szabó Zoltán, Szabó Szilvia, Kovács Réka, Kisbenedek Andrea, Breitenbach Zita, Csölle Ildikó, Polyák Éva, Varjas Tímea, Figler Mária, Kiss István (2016) Mesterséges színezékek génexpresszió módosító hatásainak vizsgálata „in vivo” állatkísérletes tesztrendszerben, *TÁPLÁLKOZÁSTUDOMÁNYI KUTATÁSOK CÍMŰ VI. PHD KONFERENCIA – ABSZTRAKT KÖTET*. p: 14.
- Raposa Bence, Pónusz Róbert, Szabó Zoltán, Szabó Szilvia, Kovács Réka, Kisbenedek Andrea, Breitenbach Zita, Hegyi Dávid, Csölle Ildikó, Polyák Éva, Varjas Tímea, Figler Mária, Kiss István (2016) Mesterséges színezékek molekuláris epidemiológiai vizsgálata állatkísérletes tesztrendszerben, *TAVASZI SZÉL 2016: NEMZETKÖZI MULTIDISZCIPLINÁRIS KONFERENCIA – ABSZTRAKT KÖTET*. p: 375.
- Raposa László Bence, Varjas Tímea, Soltész Dorottya (2015) Élelmiszer-adalékanyagok tumor kialakulásra gyakorolt hatásainak molekuláris epidemiológiai vizsgálata RT-PCR-ral. Népegészségügyi Képző- és Kutatóhelyek Országos Egyesületének IX. konferenciája. *NÉPEGÉSZSÉGÜGY*. 93 (2): 88-89.
- Raposa L., Szijártó G., Soltész D., Szabó Z., Varjas T (2014) Tumorpromócióban szerepet játszó gének expresszió-változásainak vizsgálata mesterséges színezék valamint tartósítószer expozíció hatására, *III. INTERDISZCIPLINÁRIS DOKTORANDUSZ KONFERENCIA*. p: 172.
- Raposa László Bence, Szabó István, Szijártó György Ágoston, Varjas Tímea (2013) Mesterséges színezékek molekuláris epidemiológiai vizsgálata. Magyar Epidemiológiai Társaság VII. és a Közép-európai Kemoprevenációs Társaság I. közös nemzetközi kongresszusa. *MAGYAR EPIDEMIOLOGIA*. 9-10 (4-1.) p: S.36.

- Raposa László Bence (2013) Molecular epidemiological examination of artificial food colourants. Tudományos előadás, saját kutatási témában (Centro Biomédico, Faculdade de Ciências Médicas/UERJ, Rio De Janeiro, Brazília)
 - Raposa László Bence (2013) Molecular epidemiological examination of artificial food colourants, Tudományos előadás, saját kutatási témában (USP, Departamento de farmacologia, Sao Paulo, Brazília).
 - Bence Raposa, György Szijártó, Andrea Kisbenedek, Károly Berényi, Katalin Gombos, Tímea Varjas, István Ember (2012) Molecular epidemiological examination of artificial food colourants. *ABSTRACTS OF THE JÁNOS SZENTÁGOTHAÍ MEMORIAL CONFERENCE ÉS STUDENT COMPETITION*. p: 62.
 - Kisbenedek A., Raposa B., Polyak E., Muller K., Szabo S., Armbruszt S., Varjas T., Figler M., Ember I. (2011) Examination of effect of tartazin és azurobin on gene expression in mice treated DMBA. *ZEITSCHRIFT FÜR GASTROENTEROLOGIE*. 5: 647.
- IF: 0,896**
- Kisbenedek A, Raposa B, Polyák É, Müller K, Szabó S, Armbruszt S, Varjas T, Figler M, Ember I (2011) Examination of effect of tartrazin és azurobin on gene expression in mice treated DMBA. *Magyar Gasztroenterológiai Társaság 53. nagygyűlése program és előadáskivonatok. PROGRAM ÉS ABSTRACTS OF 53RD ANNUAL MEETING OF THE HUNGARIAN SOCIETY OF GASTROENTEROLOGY*. p: 104.
 - Raposa Bence, Budán Ferenc, Ghodrattollah Nowrasteh, Kisbenedek Andrea, Varjas Tímea, Ember István (2009) Examination of gene expression pattern with Q-RT-PCR in mice, exposed to azorubin. *MAGYAR EPIDEMIOLOGIA*. 6 (1) p: 85-86.
 - Raposa Bence, Budán Ferenc, Lőrincz Tibor, Gyöngyi Zoltán, Kisbenedek Andrea, Varjas Tímea, Ember István (2009) Examination of the effect of tartrazine on gene expression in Dimethylbenz[α]anthracene treated mice. *MAGYAR EPIDEMIOLOGIA*. 6 (1) p: 84.

Értekezéshez közvetlenül nem kapcsolódó publikációk jegyzéke

„In extenso” közlemények jegyzéke

- Jurasek Júlia Vanda, Raposa László Bence, Gubicskóné dr. Kisbenedek Andrea, Varga Veronika, Szabó Zoltán, dr. Varjas Tímea (2017) A nátrium-glutamát génexpresszióra gyakorolt hatásainak vizsgálata. *ORVOSI HETILAP*. 158 (10): 383–388.

IF: 0,291

- Szabó Z, Erdélyi A, Gubicskóné Kisbenedek A, Ungár Tamás Lászlóné Polyák É, Szekeresné Szabó Sz, Kovács R, Raposa László B, Figler M (2016) A növényi alapú étrendről. *ORVOSI HETILAP*. 157 (47): 1859-1865.

IF:0,291

- Schiszler Bence, Karamánné Pakai Annamária, Szabó Zoltán, Raposa László Bence, Pónusz Róbert, Radnai Balázs, Endrei Dóra (2016) Munkahelyi stressz és megküzdési stratégiák vizsgálata földi és légi mentésben dolgozók körében. *ORVOSI HETILAP*. 157 (45): 1802-1808.

IF:0,291

- Z Breitenbach, B Raposa, Z Szabó, É Polyák, Zs Szűcs, J Kubányi, M Figler (2016) Examination of Hungarian college students' eating habits, physical activity és body composition *EUROPEAN JOURNAL OF INTEGRATIVE MEDICINE*, 8 (2): 13-17.

IF: 0,769

- Breitenbach Z , Szabó K , Szekeresné Szabó Sz , Szabó Z , Raposa L B , Kovács R , Polyák É , Gubicskóné Kisbenedek A , Csölle I , Figler M (2016) Depresszióban szenvedő betegek táplálkozásának vizsgálata. *25 ÉV A TÁPLÁLKOZÁSTUDOMÁNYBAN A PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI KARÁN*. p: 65-73.

- Csölle I , Breitenbach Z , Gubicskóné Kisbenedek A , Kovács R , Polyák É , Raposa L B , Szabó Z , Szekeresné Szabó Sz , Kiss E Cs , Figler M (2016) Kiegész vizsgálata egy egészségügyi szegmensben. *25 ÉV A TÁPLÁLKOZÁSTUDOMÁNYBAN A PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI KARÁN*. p: 83-92.

- Gubicskóné Kisbenedek A , Breitenbach Z , Polyák É , Szekeresné Szabó Sz , Szabó Z , Raposa L B , Kovács R E , Csölle I , Márk L , Figler M (2016) A mustármag analitikai vizsgálata. *25 ÉV A TÁPLÁLKOZÁSTUDOMÁNYBAN A PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI KARÁN*. p: 36-44.

- Kovács R E , Breitenbach Z , Csölle I , Gubicskóné Kisbenedek A , Raposa L B , Szabó Z , Szekeresné Szabó Sz , Polyák É , Figler M (2016) Táplálkozási jellemzők vizsgálata súlyos elhízásban, különös tekintettel a vitamin, ásványi anyag és nyomelem bevitelre. *25 ÉV A TÁPLÁLKOZÁSTUDOMÁNYBAN A PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI KARÁN*. p: 103-111.
- Kubányi J , Breitenbach Z , Raposa L B , Szabó Z (2016): E3-Energia-egyensúly Egészségprogram Egyetemistáknak. *25 ÉV A TÁPLÁLKOZÁSTUDOMÁNYBAN A PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI KARÁN*. p: 113-123.
- Polyák É , Fülöp L , Gubicskóné Kisbenedek A , Breitenbach Z , Szekeresné Szabó Sz , Kovács R , Csölle I , Szabó Z , Raposa L B , Figler M (2016) Serdülő esztétikai sportolók tápláltsága és az étkezési zavarok kockázatának vizsgálata *25 ÉV A TÁPLÁLKOZÁSTUDOMÁNYBAN A PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI KARÁN*. p: 46-53.
- Soltész D , Gubicskóné Kisbenedek A , Varjas T , Raposa L B , Figler M (2016) Tumorpromócióban szerepet játszó gének expresszió-változásainak vizsgálata tartósítószer expozíció hatására. *25 ÉV A TÁPLÁLKOZÁSTUDOMÁNYBAN A PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI KARÁN*. p: 150-156.
- Szabó Z , Marosvölgyi T , Breitenbach Z , Gubicskóné Kisbenedek A , Kovács R , Raposa L B , Szekeresné Szabó Sz , Polyák É , Csölle I , Kubányi J , Decsi T , Figler M (2016) Lipidmetabolizmus aktuális kérdéseinek bemutatása: a növényi eredetű tejek és tejkészítmények gázkromatográfiás vizsgálata. *25 ÉV A TÁPLÁLKOZÁSTUDOMÁNYBAN A PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI KARÁN*. p: 74-82.
- Szekeresné Szabó Sz , Breitenbach Z , Csölle I , Gubicskóné Kisbenedek A , Kovács R , Polyák É , Raposa L B , Szabó Z , Figler M (2016) A növényi csírák beltartalmi összetételének analitikai vizsgálata, egészségre gyakorolt hatásuk. *25 ÉV A TÁPLÁLKOZÁSTUDOMÁNYBAN A PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI KARÁN*. p: 54-64.

- Ponusz R, Kovacs D, Raposa LB, Hock M, Decsi T, Kranicz J, Endrei D (2016): Külföldi munkavállalás és pályaelhagyási indítékok a magyar gyógytornászok körében. *ORVOSI HETILAP*. 157 (9): 342-349.
- IF: 0,291**
- Kubányi Jolán, Breitenbach Zita, Raposa L Bence, Szabó Zoltán (2016) E3 - Energia-Egyensúly Egészségprogram Egyetemistáknak. *ÚJ DIÉTA*. (2001-) 25 (1): 17-19.
 - Breitenbach Zita, Raposa L. Bence, Szabó Zoltán, Kubányi Jolán , Figler Mária (2016) E3- Energia - Egyensúly Egészségprogram Egyetemistáknak 2. rész. *ÚJ DIÉTA*. (2001-) 25 (2-3.): 3-7.
 - Soltész D , Raposa L B , Szijártó Gy Á , Gubicskóné Kisbenedek A , Varjas T (2014) Tumorpromócióban szerepet játszó gének expresszió-változásainak vizsgálata tartósítószer expozíció hatására. *EGÉSZSÉG-AKADÉMIA*. 4 (3): 166-173.
 - Soltész Dorottya , Raposa L. Bence , Gubicskóné Kisbenedek Andrea , Varjas Tímea (2014) Élelmiszerekhez felhasznált tartósítószer genexpresszió-modifikáló hatásának vizsgálata. *ÚJ DIÉTA*. (2001-) 23 (2-3): 29-31.
 - Szabó Zoltán , Marosvölgyi Tamás , Raposa László Bence , Figler Mária (2014) Az Omega-3 típusú hosszú szénláncú többszörösen telítetlen zsírsavak szerepe a humán táplálkozásban. *EGÉSZSÉG-AKADÉMIA*. 4 (4): 252-258.
 - Szijártó György Ágoston , Raposa L Bence , Berényi Károly , Gubicskóné Kisbenedek Andrea , Kiss Zsuzsanna (2012) A Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar általános orvos szakos hallgatók élvezeti szer-fogyasztási és életmód szokásainak felmérése. *MAGYAR EPIDEMIOLOGIA*. 9 (2): 101-109.

Értekezéshez közvetlenül nem kapcsolódó könyvek, könyvfejezetek jegyzéke

- Ács P , Oláh A , Karamánné Pakai A , Raposa B L (2015) *DATA ANALYSIS IN PRACTICE*. p. 287. (ISBN:978-963-642-724-5)
- Raposa L Bence (2015) Prezentációs alapismeretek. In: *A SPORTTÁPLÁLKOZÁS ALAPJAI*. p: 161-168.

- Ács P , Raposa B L (2015) Descriptive statistics, tables és graphs. In: *DATA ANALYSIS IN PRACTICE*. p:163-202.
- László Bence Raposa (2015) Editing online questionnaires in practice. In: *DATA ANALYSIS IN PRACTICE*. p: 92-123.
- Ács P , Oláh A , Karamánné Pakai A , Raposa L B (2014) *GYAKORLATI ADATELEMZÉS*. p. 295. (ISBN:978-963-642-682-8)
- Ács P, Raposa L B (2014) Leíró statisztika, statisztikai táblázatok, statisztikai ábrák. In: *GYAKORLATI ADATELEMZÉS*. p: 162-202.
- Raposa László Bence (2014) Online kérdőívek szerkesztése a gyakorlatban. In: *GYAKORLATI ADATELEMZÉS*. p: 93-123

Értekezéshez közvetlenül nem kapcsolódó absztraktok, előadások jegyzéke

- Hegyi Dávid, Gerencsér Gellért, Horváth Orsolya, Raposa L. Bence, Bohonyi Noémi, Gyöngyi Zoltán (2016) Korai stádiumú tüdődaganatok azonosítása illékony szerves molekulák segítségével - nemzetközi kutatások áttekintése. *V. INTERDISZCIPLINÁRIS DOKTORANDUSZ KONFERENCIA – ABSZTRAKT KÖTET*. p: 164.
 - Ghodrattollah Nowrasteh , Thuren Gergely , Raposa László Bence , Varjas Tímea (2015) Examination of the pattern of gene expression among genes playing role in DNA methylation in animal experimental model. Népegészségügyi Képző- és Kutatóhelyek Országos Egyesületének IX. Konferenciája. *NÉPEGÉSZSÉGÜGY*. 93 (2): 130-131.
 - Pónusz R , Kovács D , Varga A , Hock M , Raposa B , Boncz I , Endrei D (2015) Survey of the Hungarian Physiotherapists' Migration és Career Changing Behaviour. *VALUE IN HEALTH* 18 (7): p. A555.
- IF: 3,824**
- Soltész Dorottya, Raposa László Bence ,Varjas Tímea (2015) Examination of the food preservatives' effect in carcinogenesis. Népegészségügyi Képző- és Kutatóhelyek Országos Egyesületének IX. Konferenciája. *NÉPEGÉSZSÉGÜGY*. 93 (2): p. 132.

- Bence Raposa, Kata Füge, György Ágoston Szijártó, Zoltán Szabó, Viktória Prémusz (2014) Graduate Career Tracking Programme of Faculty of Health Sciences, University of Pécs (UP). *9TH ORPHEUS CONFERENCE (SWITZERLAND): CREATING CAREER OPPORTUNITIES FOR PHDS IN LIFE ÉS HEALTH SCIENCES – ABSTRACTS*: p.19.
- Katalin Füge, Viktória Prémusz, Bence Raposa, Mária Figler (2014) Incubation of Transferable Skills In Health Sciences Research. *9TH ORPHEUS CONFERENCE (SWITZERLAND): CREATING CAREER OPPORTUNITIES FOR PHDS IN LIFE ÉS HEALTH SCIENCES – ABSTRACTS*: p.33.
- Szijártó G , Varjas T. , Berényi K. , Soltész D. , Raposa L. (2014) A pécsi orvostanhallgatók dohányzási, kávé, alkohol, drog- és energiatalefogyasztási szokásainak vizsgálata. *III. INTERDISZCIPLINÁRIS DOKTORANDUSZ KONFERENCIA – ABSZTRAKT KÖTET*: 245-246.
- Soltész Dorottya, Raposa László Bence, Juhász Krisztina, Varjas Tímea (2013) Nabenzoát (E211) és K-szorbát (E202) élelmiszeradalékok génexpresszió módosító hatásainak vizsgálata állatkísérletes tesztrendszerben. *MAGYAR EPIDEMIOLOGIA*. 9-10 (4-1,) p: S.40.
- Z Szabó , S Szekeresné Szabó , B Raposa , M Figler (2013) Analytical chemistry examination of grape pomace extract. *ZEITSCHRIFT FÜR GASTROENTEROLOGIE*. 51: p. A67.
- **IF: 1,671**
- Szabó Z , Szekeresné Szabó Sz , Raposa B , Figler M (2013) Analytical chemistry examination of grape pomace extract. *MAGYAR GASZTROENTEROLÓGIAI TÁRSASÁG 55. NAGYGYŰLÉSE PROGRAM ÉS ELŐADÁSKIVONATOK*. p: 119.
- Varjas Tímea , Raposa Bence , Szabó László , Nowrasteh Ghodrathollah , Ember István (2013) Új perspektíva a karcinogenezis gátlásában: nanokemoprevenció. *MAGYAR EPIDEMIOLOGIA*. 9-10 (4-1) p: S.49.