

**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.) téziszűzet

Raposa László Bence



**Pécs, 2017**

## Bevezetés

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, hipertónia).

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.

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.

A prevalens összesetszám is - a háziiorvosi praxisokban regisztrált daganatos betegek száma - folyamatosan növekvő tendenciát mutat 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.

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 hatásai, 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).

## Célkitűzések

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- $\kappa$ B*, *GADD45 $\alpha$* , *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).

## **Anyagok és módszerek**

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

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).

Kutatásunkban két azoszínezék: a tartrazin és az azorubin génextpresszióra és metilációs mintázat kialakításában szerepet játszó génre gyakorolt hatását kívántuk vizsgálni mRNS szinten, oly módon, hogy a kísérleti állatok szerveiből mintát véve, Trizoll protokoll alapján RNS-t izoláltunk, majd azt RT-PCR-al analizáltuk.

Kísérleteinket a ROCHE LightCycler 480 készülék segítségével végeztük, mely rendelkezik egy beépített normál PCR géppel és egy CCD kamerával. A 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. Az eredményként kapott fluoreszcens extinciót egy AD-konverteren keresztül számítógépes program segítségével értékeltük ki. A génextpressziós szinteket egy ún. „house keeping” génhez (*HPRT1*) viszonyítva számítottuk ki, majd hasonlítottuk össze az egyes kezelések esetén.

### **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 csoportszámának, valamint a külföldi releváns kutatások protokolljainak megfelelően, 6-6 darabszámban határoztuk meg (n=6). A kísérleti állatokat a kezelési metodika alapján 7 csoportba osztottuk. Az állatok ad libitum fogyasztottak csapvizet a vizsgálat teljes ideje alatt. 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.

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. 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.

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

## 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 variancianalízis 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.

## Eredmények

A *CYP1A1* gén termékei esetében több dózisonál is megfigyelhető volt overexpresszió, illetve szignifikáns eltérés a kontrollcsoportéhoz 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 ( $p < 0,05$ ). További szignifikáns eltérést a szeparált expozíciók tízszeres dózisánál mértünk ( $p < 0,05$ ), az egyszeres dózisoknál nem ( $p > 0,05$ ). A vese szövetszöveti 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. 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 magában.

A *CYP2E1* máj mintái esetében minden csoportnál mértünk emelkedést a vizes kontrollhoz képest. Az azorubin expozíciói nem mutattak az anyagmennyiséggel arányos növekedést. A tartrazin mind egyszeres, mind tízszeres dózisa esetén szignifikáns eltérést detektáltunk ( $p < 0,05$ ), a dózisfüggő 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. 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.

A színezékek tekintetében megállapíthatjuk, hogy az *NF- $\kappa$ B* esetében az azorubin, a tartrazin tízszeres expozíciójú csoportja, továbbá a két anyag mindkét közös expozíciója szignifikáns eltérést mutatott a kontrollcsoporthoz képest ( $p < 0,05$ ). Az eredmények azt mutatják, hogy az *NF- $\kappa$ B* 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.

A *GADD45 $\alpha$*  esetében megállapíthatjuk, hogy a kontrollcsoporthoz hasonlítva egy csoport mutatott csak szignifikáns különbséget ( $p > 0,05$ ). A *GADD45 $\alpha$*  változatlan eredményeit (tartrazin 1x kívül) és teljesen normál tartományban reprezentált expressziós mintázat lehetséges okait a jövőben kívánjuk vizsgálni.

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 bizonyultak szignifikánsnak ( $p > 0,05$ ). A tartrazin egyszeres és tízszeres expozíciójú csoportjának valamint a két anyag közös expozíciójának génexpressziós mintázati eltérései dózisfüggő növekedést mutattak.

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 expozícióknál mind a májban, mind a vesében kimutatható volt a G0-G1-G2 között a szignifikáns eltérés, valamint a tendenciózus fokozódás.

## Megbeszélés

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 mRNA szinten, oly módon, hogy a kísérleti állatok szerveiből mintát véve, Trizol protokoll alapján RNS-t izoláltunk, majd azt RT-PCR-al analizáltuk.

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).

A tartrazinnál jelentős génexpresszió emelkedés, sok esetben szignifikáns eltérés volt megfigyelhető. Megemlítendő, hogy ezek az eltérések esetünkben dózisfüggőnek 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.

A sejtciklus szabályozásában szerepet játszó gének esetében korábbi eredményeink további megerősítést nyertek. A CYP450 metabolizáló enzimeinél tapasztalt eredményeket nagyban lekövezték az *NF-κB*, *GADD45α*, *MAPK8* gének expressziós változásai.

Eredményeink alapján az azorubinnak önmagában a kontrollcsoportéhoz 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 *GADD45α* gént leszámítva, (ennek okát a jövőben vizsgálni kívánjuk) jelentős génextpresszió szint fokozódást mértünk a kontrollcsoportéhoz 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.

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 a daganat kialakulásra, ellenben az irodalomban több helyen is megtalálható eredményekkel (TemaNord, 2002; EFSA ANS, 2009a; Australian Government, 2014).

## Új eredmények összefoglalása

1. Az azorubin egyszeres valamint tízszeres, ADI dózisa nem okoz szignifikáns génexpresszió emelkedést a *CYP1A1* és *CYP2E1* metabolizáló enzimek 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 valamint kémiai karcinogénnel történő hatásaddíciója szignifikáns mértékű emelkedést okoz a szeparált színezékekkel kezelt csoportok és a kontrollcsoport expressziós szintjeihez képest.

2. Az azorubin, egyszeres valamint tízszeres, ADI dózisa nem okoz szignifikáns génexpresszió emelkedést a *NF- $\kappa$ B*, *GADD45a*, *MAPK8* gének esetében.

A tartrazin egyszeres valamint tízszeres, ADI dózisa szignifikáns génexpresszió emelkedést okoz a *NF- $\kappa$ B*, *MAPK8* gének esetében, a *GADD45a* esetében ilyen jellegű és mértékű (szignifikáns) eltérést nem tapasztaltunk.

A vizsgált élelmiszerszínezékek hajlandóságot mutatnak hatásaddícióra, szervezeten belüli interakcióra.

3. A tartrazin egyszeres, ADI dózisa szignifikáns génexpresszió emelkedést okoz a metilációs mintázatot befolyásoló gének, a *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* esetében, G1-G2 esetében (máj-vese homogenizátum -mindkét nemben), míg az anyag tízszeres dózisa mindhárom gén esetében G0-G1-G2 relációjában egyaránt szignifikáns génexpresszió emelkedést okoz, dózisdependens módon (máj-vese homogenizátum -mindkét nemben). Vizsgálatunk során ennek alapján detektáltunk generációk közötti dózisfüggő hatásfokozódást expressziós szinten (vesében kifejezettebb módon).

## **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.

## Publikációk

### 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[ $\alpha$ ]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) Kiegészítő 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 , Szekeréné 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.
  - Szekeréné 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 tartósítószeres 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 BL (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

- 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.
  - 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.
  - Szijártó G , Varjas T. , Berényi K. , Soltész D. , Raposa L. (2014) A pécsi orvostanhallgatók dohányzási, kávé, alkohol, drog- és energiatartóanyag-fogyasztási szokásainak vizsgálata. *III. INTERDISZCIPLINÁRIS DOKTORANDUSZ KONFERENCIA – ABSZTRAKT KÖTET*: 245-246.
  - Soltész Dorottya, Raposa László Bence, Juhász Krisztina, Varjas Tímea (2013) Na-benzoát (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**