

**BIOMARKER MÉRÉSI MÓDSZEREK FEJLESZTÉSE ÉS ALKALMAZÁSA
A MOLEKULÁRIS KÖRNYEZET-EPIDEMIOLOGIÁBAN POLICIKLUSOS
AROMÁS SZÉNHYDROGÉN EXPOZÍCIÓ KIMUTATÁSÁRA**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Kovács Katalin

**Pécsi Tudományegyetem,
Általános Orvostudományi Kar,
Orvosi Népegészségtani Intézet**

**Témavezető: Dr. Schoket Bernadette, PhD
Programvezető: Prof. Dr. med. habil. Ember István, DSc**

2012

Bevezetés

A környezetszennyező testidegen vegyületek emberi szervezetre gyakorolt hatása számos ponton követhető a kitettség (expozíció) mértékétől a kifejlődött egészségkárosító hatásig. Egy adott vegyület okozta expozíció mértékét vizsgálni lehet a biológiai mintákból az expozíció biomarkereivel, a korai és késői hatásokat az úgynevezett hatás markerekkel. Egy környezetszennyező potenciális daganatkeltő vegyület biológiailag hatásos dózisa a DNS és a genotoxikus ágens között kovalens kötődéssel kialakuló DNS-adduktok* mennyiségével jellemezhetjük egy adott szövetben.

A DNS-addukt biomarkerként tükrözi az egyedi expozíciót és sokkal pontosabb expozícióbecslést tesz lehetővé, mint a potenciális daganatkeltő vegyületnek a környezeti mintákban lévő koncentrációja, ezzel javítja az epidemiológiai vizsgálatok hatékonyságát és pontosságát. Számos DNS-addukt prekarcinogén DNS-módosulás, így humán DNS-ből történő kimutatása nagy jelentőségű a potenciális daganatkeltő környezeti ágensek hatásmechanizmusának felderítése szempontjából. A DNS-addukt meghatározást számos expozíció típus kimutatására alkalmazzák, így környezeti expozíciónál, táplálkozási expozíciónál, egészségügyi expozíciónál, munkahelyi expozíciónál.

A DNS-adduktok mérésére szolgáló vizsgálati módszerek jelentősen különböznek érzékenységükben és az alkalmazásukhoz szükséges DNS-mennyiségben. A policiklusos aromás szénhidrogén (PAH)-DNS-adduktok kimutatására a leggyakrabban a ³²P-utójelöléses módszert és az immunkémiai módszereket használják, amelyek szemi-kvantitatív addukt meghatározást tesznek lehetővé. A ³²P-utójelöléses módszer széles szubsztrátspecifitása és nagy érzékenysége miatt különösen alkalmas a humán molekuláris epidemiológiai vizsgálatokban összetett környezeti expozíció, elsősorban PAH-expozíció kimutatására. A ³²P-utójelöléses módszernél a DNS-adduktokat egy nagy specifikus radioaktivitású izotóppal – ³²foszforral – jelöljük, és a radioaktív bomlást mérjük. Az ³²P-utójelöléses módszer kimutatási határa 10 µg DNS-nél 1 addukt/10¹⁰ nukleotid. A

* Saját korábbi magyar nyelvű publikációink szóhasználatát követve, az angol „adduct” megfelelőjeként disszertációmban az „addukt” szót használom egyes magyar szakszövegekben előforduló „adduktum” szó helyett.

PAH-DNS-adduktok meghatározására szolgáló benz[a]pirén-7,8-diol-9,10-epoxid (BPDE)-DNS immunkémiai módszerekben BPDE-vel *in vitro* módosított DNS ellen termelt antiszérumot/antitestet alkalmaznak. Az antitest nemcsak a BPDE–DNS-adduktot ismeri fel, hanem az antitest keresztreaktivitása következtében kémiai rokon szerkezetű más PAH–DNS-adduktokat is. Az ELISA, DELFIA és CIA kompetitív immunkémiai módszereknél a mérendő jel az adduktokhoz van kapcsolva. A kompetitív immunkémiai módszerek érzékenysége 1-10 addukt/ 10^8 nukleotid tartományban van 10-35 μg DNS mintával.

Mindkét módszer típus nagy érzékenysége miatt humán minták vizsgálatára alkalmas. Azonban technikai összetettségük, csekély automatizálási lehetőségük, és ezért nagyfokú emberi munkaerő igényük miatt több száz vagy több ezer vizsgálati alanyt magába foglaló molekuláris epidemiológiai projektekben csak korlátozottan használhatók. Ezért különösen nagy szükség van nagy érzékenyséű és nagy minta kapacitású gazdaságos módszerek kidolgozására.

Célkitűzés

PhD munkám fő célkitűzése környezeti PAH expozíció kimutatására alkalmas ^{32}P -utójelöléses és immunkémiai DNS-addukt módszer fejlesztése és validálása volt.

A ^{32}P -utójelölési metodika továbbfejlesztésének célja:

- a módszerhez szükséges radioizotóp felhasználás növelése nélkül számottevően fokozni lehessen a minta feldolgozási kapacitást a vizsgáló laboratóriumokban úgy, hogy a laboratóriumi személyzet sugárvédelme ne sérüljön;
- olyan metodika kidolgozása, mely különböző eredetű DNS-minták DNS-adduktszintjeinek meghatározására általánosan alkalmas.

Az újonnan kifejlesztett nagy mintakapacitású PAH-DNS direkt szendvics kemilumineszcens immunkémiai módszer (BPDE-DNS SCIA) validálása:

- különböző típusú DNS-mintákból összehasonlító DNS-addukt vizsgálatok az immunkémiai módszer és a ^{32}P -utójelöléses módszer között;

- a két módszer közötti korreláció vizsgálata.

A biológiai minták előkészítése (tárolás, DNS izolálás) hatásának a vizsgálata a DNS-addukt mennyiségi meghatározásra a ^{32}P -utójelölés és a SCIA új immunkémiai módszer esetében.

Anyagok és Módszerek

DNS-minták:

- i) BPDE–DNS-addukt standard;
- ii) Sejtkultúra – MCF-7 sejtvonal - aliquotonként 2×10^7 sejt $1 \mu\text{M}$ benz [a]pirénnel (B[a]P) 37°C -on 24 óráig kezelve;
- iii) Kezelt egerek: CD2F1 egerek intraperitoneálisan kezelve B[a]P-vel (100 és 200 mg/testsúly kg), benz[b]fluoranténnal (200 és 400 mg/testsúly kg) és dibenz[a,h]antracénnal (2,5; 5 és 10 mg/testsúly kg). A Qiagen Midi kittel izolált DNS-mintákat Dr. Soterios Kyrtopoulostól (NHRF, Athén, Görögország) kaptuk;
- iv) Humán tüdőszövet és perifériás vér limfocita;
- v) Egészséges anyai perifériás vér és újszülött köldökzsínór vér összfehérvérsejt frakciója (buffy coat).

DNS kinyerés:

A DNS izolálás az MCF-7 sejt mintákból és a humán biológiai mintákból fenol – kloroform - izo-amilalkohol extrakciós módszerrel, módosított Qiagen Midi kittel és kisózásos módszerrel történt.

DNS-addukt meghatározás a hagyományos ^{32}P -utójelöléses módszerrel:

A DNS mintát ($4 \mu\text{g}$) mikrokokkusz nukleáz és lép foszfodiészteráz enzim keverékével mononukleotidokra emésztettük, ezt követően az emésztett DNS adduktjainak dúsítása történt nukleáz P1 enzimmal, majd az addukt(ok) izotópos jelölését $50 \mu\text{Ci}$ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -vel és T4 polinukleotid kinázzal végeztük. A DNS-adduktokat többlépcsős vékonyréteg kromatográfiával választottuk el. A radioaktív mintázatot elektronikus autoradiográffal jelenítettük meg és mértük egyidejűleg. Az

adduktértékeket terület-arányosan korrigáltuk a kromatográfiás lemez háttér radioaktivitásának a levonásával.

A módosított ^{32}P -utójelöléses módszer:

A DNS-mintát (4 μg) emésztettük, majd addukt dúsítást végeztünk a hagyományos módszernél leírtak szerint. Az addukt dúsítási lépést követően szárazra pároltuk az emésztett DNS-mintát a ^{32}P -utójelölés előtt. A $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ radioizotópot 50 $\mu\text{Ci}/4 \mu\text{g}$ DNS-minta mennyiségről 10 $\mu\text{Ci}/4 \mu\text{g}$ DNS minta mennyiségig csökkentettük le. Az izotóp jelölési lépéshez a reakcióelegy végső térfogatát 5 μl -re állítottuk be. A kromatográfiás elválasztás, a radioaktív mintázat megjelenítése, valamint a háttér radioaktivitással való korrigálás megegyezett a hagyományos ^{32}P -utójelöléses módszernél alkalmazott eljárással.

DNS-addukt meghatározás az újonnan kifejlesztett BPDE-DNS SCIA módszerrel:

Az adduktot hordozó DNS-t egyszálú DNS-sé denaturáltuk, majd restriktációs enzimes emésztéssel megfelelő méretű fragmentumokra hasítottuk (2000 bp/fragmentum). Az adduktot hordozó DNS-fragmentumokat szelektíven kötöttük BPDE-DNS standard ellen termelt specifikus nyúl-antiszérummal egy szilárd felületre (mikrotiter lemezre). A DNS fragmentumok normál nukleotidjaihoz kapcsoltuk a mérendő jelet, ehhez monoklonális DNS-antitestet és kemilumineszcens végpontot alkalmaztunk. A PAH-DNS-adduktszinteket BPDE-DNS standard görbe alapján számoltuk.

Statisztikai elemzések:

A mintákat a ^{32}P -utójelöléses módszernél kétszer, a BPDE-DNS SCIA módszernél háromszor mértük. A statisztikai elemzéseket a GraphPad Prism 4.0 programmal végeztük Mann-Whitney, Wilcoxon és páros t teszttel. A korrelációs elemzést Spearman korrelációs teszttel végeztük. Kétoldali p értékeket adtunk meg. $P < 0,05$ esetén az értékek statisztikailag szignifikánsak voltak.

Eredmények összefoglalása

A ^{32}P -utójelöléses módszerfejlesztést célzó kutatásaim arra irányultak, hogy a mérési határfok megtartása mellett lecsökkentsem a mintánkénti radioizotóp felhasználást, hogy ezen keresztül meg tudjuk növelni a laboratóriumi mintafeldolgozó kapacitást.

BPDE–DNS-addukt standard, B[a]P-vel kezelt MCF-7 sejtvonalból izolált DNS-minták, humán perifériás tüdőszövetből izolált DNS-minták, perifériás vér limfocitából és buffy coat frakcióból izolált DNS-minták hagyományos és módosított ^{32}P -utójelöléses módszerrel mért DNS-adduktszintjeinek összehasonlítását végeztem. A hagyományos ^{32}P -utójelöléses módszerhez képest egy bepárlási művelet beiktatásával harmadára lecsökkentettem az izotópjelölési reakcióelegy térfogatát, mely mellett le lehetett csökkenteni a DNS mintánként felhasznált $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ szubsztrát mennyiségét 50 μCi -ről – a DNS-izolálására alkalmazott módszertől függően, - Qiagen kittel történő izolálás során a felére (25 μCi), illetve fenolos extrakciót alkalmazva az egyötödére (10 μCi), kísérletes és humán eredetű DNS-mintáknál egyaránt.

A PAH-DNS adduktok kimutatására újonnan kifejlesztett BPDE-DNS szendvics kemilumineszcens immunkémiai módszert (BPDE-DNS SCIA) 2012-ben publikáltuk. Míg a régebbi kompetitív immunkémiai módszereknél a mérendő jel az adduktokhoz van kapcsolva, a SCIA módszernél a normál nukleotidokhoz. Az adduktot hordozó nukleotidok mennyiségéhez viszonyítva a nagyságrendekkel több normál nukleotidhoz kapcsolt szignál eredményezi a nagy jelerősséget. A módszer kimutatási határa $\sim 1,5$ addukt/ 10^9 nukleotid 5 μg DNS-sel. A BPDE-DNS SCIA validálása céljából összehasonlító vizsgálatokat végeztem az új immunkémiai módszer és a ^{32}P -utójelöléses módszer között. A DNS-minták B[a]P-vel kezelt MCF-7 sejtvonalból, B[a]P-vel, benzo[b]fluoranténnel (B[b]F), illetve dibenz[a,h]antracénnel (DB[a,h]A) több dózisban kezelt egerek májából, valamint anyai perifériás és újszülött köldökzsinórvér mintákból származtak. Az MCF-7 sejtekből mért B[a]P–DNS-adduktszintekben a SCIA/ ^{32}P -utójelölés mérési aránya kb. 0,5 volt. Az állatkísérletes mintákból az immunkémiai módszerrel sokszorososan kisebb DNS-adduktértékeket kaptunk, mint a ^{32}P -utójelöléssel ($\approx 1:5$ B[a]P-re, $\approx 1:30$ B[b]F-

re és $\approx 1:5$ DB[a,h]A-ra). A dózisfüggésre nagyon szoros, szignifikáns pozitív korreláció volt a két módszer között ($r=0,87-0,99$). A humán mintáknál átlagosan kb. 1:10 volt az arány a SCIA/ ^{32}P -utójelölés között, de nem volt korreláció a SCIA/ ^{32}P -utójelölés adatpárok között. A humán mintáknál a korreláció hiánya a két módszer között az összetett humán környezeti expozícióból származó különböző szerkezetű DNS-adduktok eltérő hatásfokú kimutathatóságára vezethető vissza.

Új tudományos eredmények és hasznosításuk

- A ^{32}P -utójelöléses módszernél az általam kidolgozott módszermódosítással 2-5-szörösére lehet növelni a DNS-addukt meghatározásra egyidejűleg feldolgozható biológiai minták számát a DNS izolálására alkalmazott módszertől függően, kísérletes és humán eredetű DNS-mintáknál egyaránt, az adduktok optimális izotóp jelölési hatásfokának a megőrzése mellett, és a sugárvédelmi biztonság megőrzésével.
- A fenti előnyök alapján különösen ajánlom a módosított módszert nagymintaszámú molekuláris epidemiológiai vizsgálatokban való alkalmazásra környezeti PAH-expozíció kimutatására.
- Bevezettem a módosított ^{32}P -utójelöléses módszert a nemzetközi molekuláris epidemiológiai kutatásokba, és alkalmaztam a NewGeneris EU FP6 Nr. 016320 Integrált Projektben (konzorciumvezető: Prof. Dr. J. Kleinjans, Maastricht University, Hollandia) környezeti és táplálkozási eredetű PAH-expozíció kimutatására európai anya-újszülött gyermek kohorszokból származó ~ 600 fős populációban.
- Az újonnan kifejlesztett BPDE-DNS SCIA direkt szendvics kemilumineszcens immunkémiai módszer validálása során megállapítottam, hogy ez az új immunkémiai módszer a ^{32}P -utójelöléses eljárással megegyező módon mutatja ki a PAH-expozícióbeli különbségeket expozíciós csoportok között. Ebből a minőségi szempontból a SCIA a ^{32}P -utójelöléses módszerrel egyenértékű, kísérletes rendszerekben és molekuláris környezet-epidemiológiai vizsgálatokban kiválóan alkalmazható. Az egyedi mintáknál a kétféle

adduktérték közötti korreláció hiánya megerősíti ismereteinket a két módszer szubsztrátspektruma közötti részleges átfedésről/eltérésről.

- Jelen doktori értekezésem írásakor a BPDE-DNS SCIA módszerrel már mintegy 2000 anyai és újszülött vérminta elemzése történt meg európai kohorszokból magzati PAH expozíció kimutatása céljából a NewGeneris EU FP6 Nr. 016320 Integrált Projektben.–Az eredmények statisztikai elemzése és a konzorciumi publikációk előkészítése folyamatban van.
- Megállapítottam, hogy a mintaelőkészítés során alkalmazott DNS-izolálási módszer és a DNS-minták tárolási módja kritikus hatással van a DNS-addukt mennyiségi kimutatásra. Erre különös figyelemmel kell lenni archív DNS-minták molekuláris epidemiológiai célú felhasználásánál és jövőbeni DNS-mintabankok tervezésénél.

A doktori (PhD) munkámhoz kapcsolódó publikációk szakfolyóiratokban, illetve szakkönyvben:

Georgiadis P, Kovács K, Kaila S, Makedonopoulou P, Anna L, Poirier MC, Knudsen LE, Schoket S, Kyrtopoulos S. (2012) Development and validation of a direct sandwich chemiluminescence immunoassay (SCIA) for measuring DNA adducts of benzo[a]pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutagenesis*, 2012. Május 18. [Epub ahead of print] ***Impakt faktor: 3,98***

Kovács K, Anna L, Rudnai P, Schoket B. (2011) Recovery of bulky DNA adducts by the regular and a modified ³²P-postlabelling assay; influence of the DNA-isolation method. *Mutat. Res.*, 721:95-100. ***Impakt faktor: 2,94***

Gallo V, Khan A, Gonzales C, Phillips DH, Schoket B, Györffy E., Anna L, Kovács K, Möller P, Loft S, Kyrtopoulos S, Matullo G, and Vineis P. (2008) Validation of biomarkers for the study of environmental carcinogens: a review. *Biomarkers*, 13: 505-534. ***Impakt faktor: 1,73***

Györffy E, Anna L, Kovács K, Rudnai P, Schoket B. (2008) Correlation between biomarkers of human exposure to genotoxins with focus on carcinogen DNA adducts. *Mutagenesis*, 23:1-18. ***Impakt faktor: 3,16***

Kovács K, Györffy E, Anna L, Schoket B. (2006) Környezeti policiklusos aromás szénhidrogén expozíció biomonitorozása vizelet 1-hidrokipirén tartalmának meghatározásával – gyermekekre és felnőttekre vonatkozó szakirodalmi adatok összehasonlítása. *Egészségtudomány*, 50: 188-193.

Kovács K, Györffy E, Anna L, Schoket B.: 1-Hydroxypyrene. In: *Epidemiological concepts of validation of biomarkers for the identification/quantification of environmental carcinogenic exposures*. Eds. Vineis P, Gallo V. The Nofer Institute of Occupational Medicine, Lodz, Poland, ECNIS 2007.

Györffy E, Anna L, Rudnai P, Kovács K, Schoket B.: Correlations among biomarkers. In: *Biomarkers of carcinogen exposure and early effects*, Eds: Farmer PB, Emery JM, The Nofer Institute of Occupational Medicine, Lodz, Poland, ECNIS, 2006.

A disszertációtól független közlemények:

Anna L, Kovács K, Györffy E, Schoket B, Nair J. (2011) Smoking-related O⁴-ethylthymidine formation in human lung tissue and comparisons with bulky DNA adducts. *Mutagenesis*, 26: 523-527. ***Impakt faktor: 3,98***

Anna L, Holmila R, Kovács K, Györffy E, Györi Z, Segesdi J, Minárovits J, Soltész I, Kostič Sz, Csekeő A, Husgafvel-Pursiainen K, Schoket B. (2010) *TP53* tumorsupresszor génmutáció vizsgálatok magyar tüdőrákos betegcsoportban. *Egészségtudomány*, 54: 56-69.

Anna L, Holmila R, Kovács K, Györffy E, Györi Z, Segesdi J, Minárovits J, Soltész I, Kostič Sz, Csekeő A, Husgafvel-Pursiainen K, Schoket B. (2009) Relationship between *TP53* tumour suppressor gene mutations and smoking-related bulky DNA

adducts in a lung cancer study population from Hungary. *Mutagenesis*, 24: 475-480.
Impakt faktor: 3,54

Absztraktok szakfolyóiratokban:

Kovács K, Anna L, Győrffy E, Schoket B: The impact of pre-analytical processing of human tissue samples on the measurement of bulky DNA adducts by ³²P-postlabelling. *Mutagenesis* vol. 26, no. 5, pp. 689–722, 2011. **Impakt faktor: 3,98**

Anna L, Kovács K, Lukács V, Győrffy E, Rudnai P, Schoket B: Assessment of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons during pregnancy with bulky DNA adduct biomarker in European mother - child cohorts. *Mutagenesis* vol. 26, no. 5, pp. 689–722, 2011. **Impakt faktor: 3,98**

Rudnai P, Varró MJ, Rudnai T, Náráy M, Schoket B, Anna L, Győrffy E, Kovács K, Ürömi J, Herczegh T, Bodnár J: Associations between the children's blood lead level and their health status. *Epidemiology* 20(6):S260, 2009. **Impakt faktor: 5,5**

Anna L, Holmila R, Kovács K, Győrffy E, Győri Z, Segesdi J, Minárovits J, Soltész I, Kostič Sz, Csekeő A, Husgafvel-Pursiainen K, Schoket B: A *TP53* génmutáció és az aromás DNS-addukt szint közötti összefüggés tüdőrákos dohányzóknál. *Magyar Onkológia* 53: 6, 2009.

Kovács K, Győrffy E, Anna L, Schoket B: Urinary 1-hydroxypyrene as a biomarker of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in the general population and correlation between 1-hydroxypyrene and white blood cell DNA adducts - Results of our literature survey, *European Journal of Molecular and Genetic Toxicology* <http://www.swan.ac.uk/cget/ejgt1.htm>, 2006.

Nemzetközi és hazai konferencia részvételek poszter bemutatással és/vagy előadással első szerzőként: 24 db

Nemzetközi és hazai konferencia részvételek poszter bemutatással és/vagy előadással társszerzőként: 41 db

Köszönetnyilvánítás

Doktori munkámat az Országos Környezetegészségügyi Intézet, Környezetegészségügyi Hatásvizsgáló Főosztály, Molekuláris Környezet-epidemiológiai Osztályán végeztem biológusként. Szeretném megköszönni Dr. Dura Gyulának, az Országos Környezetegészségügyi Intézet megbízott főigazgatójának és Dr. Rudnai Péternek, a Környezetegészségügyi Hatásvizsgáló Főosztály főosztályvezető főorvosának nagyvonalú segítőkészségét, amely lehetővé tette, hogy munkám során az intézmény szellemi és technikai lehetőségeit igénybe vehessem, és köszönöm támogatásukat doktori célkitűzésemhez.

Kiemelten köszönöm Dr. Schoket Bernadette témavezetőmnek tudományos munkám irányítását, hogy bevezetett a molekuláris környezetepidemiológia tudományába, elősegítette szakmai fejlődésemet, szakmai tanácsaival támogatta kísérletes munkámat, és külön köszönöm az értekezés elkészítésében nyújtott nagy segítségét.

Köszönöm Professzor Dr. Ember István a Pécsi Tudományegyetem Orvosi Népegészségtani Intézet vezetőjének, hogy a PhD eljárásban és értekezésem elkészítésében támogatott.

Köszönettel tartozom munkatársaimnak, a Molekuláris Környezet-epidemiológiai Osztály jelenlegi és volt tagjainak: Anna Líviának, Dr. Gyórfy Erikának, Bodnár Lászlónénak, Papp Istvánnénak, Karácsonyi Gábornénak és Lévay Katalinnak szakmai és emberi segítőkészségükért.

Köszönöm Dr. Soterios Kyrtopoulosnak és Dr. Panagiotis Georgiadisnak a National Hellenic Research Foundationban, Athénban, szakmai útmutatásukat, tanácsukat három hónapos ECNIS tanulmányi ösztöndíjam alatt 2008-ban, mely megalapozta további tudományos együttműködésünket a SCIA immunkémiai módszer kifejlesztésében és validálásában. Köszönöm Stella Kailanak és Paraskevi Makedonopoulounak a technikai segítséget.

Köszönöm Dr. David H. Phillips professzor úrnak, a DNS-addukt kutatás és a ³²P-utójelölés nemzetközi szaktekintélyének, hogy az Institute of Cancer Research, UK, suttoni laboratóriumában az ECNIS által szponzorált tanulmányi ösztöndíj keretein belül 2007-ben összehasonlító laboratóriumi vizsgálatokat végezhettem a ³²P-utójelöléses módszerrel. Köszönöm James Evansnek és Kathy Colenak a technikai segítséget.

Köszönöm családomnak és barátaimnak, hogy a tudományos munkámban nagy szeretettel és megértéssel támogattak és bátorítottak.

A PhD munkámat az alábbi projektek támogatásával készítettem, amelyért ezúton mondok köszönetet: ECNIS (Environmental cancer risk, nutrition and individual susceptibility) EU FP6 K+F Network of Excellence (szerződés szám: 513943). ECNIS² (Towards ECNIS Centre for Research and Education on Cancer, Environment and Food) EU FP7 (szerződés szám: 266198). NewGeneris (Newborns and Genotoxic exposure risks: Development and application of biomarkers of dietary exposure to genotoxic and immunotoxic chemicals and of biomarkers of early effects, using mother-child birth cohorts and biobanks) EU FP6 K+F Integrated Projekt (szerződés szám: 016320-2).