

**Biodízel előállítás alapanyagainak és melléktermékeinek
vizsgálata állatkísérletekben**

DOKTORI (PhD) - ÉRTEKEZÉS

Dr. Szele Eszter

B-149 Daganatok molekuláris epidemiológiája

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Komoly Sámuel

Program és témavezető: Prof. Dr. Ember István †

Prof. Dr. Kiss István

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

2013.

Tartalomjegyzék

I. Bevezetés	5
I.1. A bioüzemanyagok jelentősége	5
I.2. Biodízel előállítása.....	7
I.2.1. Biodízel előállítása nyers növényi olajból	8
I.2.2. Biodízel előállítása állati zsiradékból vagy használt növényi olajból	9
I.3. Nyers növényi olajból történő biodízelgyártás melléktermékeként keletkezett glicerinnel végzett vizsgálatok, irodalmi áttekintés	10
I.4. Nyers növényi olajból előállított biodízel melléktermékeivel, továbbá a biodízelgyártásra szánt egyéb anyagokkal végzett vizsgálatok.....	11
I.4.1. Biodízel-glicerin.....	11
I.4.2. Szappanos víz.....	12
I.4.3. Kukoricaolaj és sárgazsír	13
I.5. Molekuláris epidemiológiai vizsgálatok a növényi alapú biodízelgyártás melléktermékeivel és biodízelgyártás egyéb alapanyagaival.....	14
I.5.1. Apoptózis/antiapoptózis szabályozása	15
I.5.2. A sejtben zajló biotranszformáció szabályozása.....	16
I.5.3. Onkogének és tumorszuppresszor gének.....	17
I.5.4. A miRNS-ek	17
I.5.5. Vizsgált gének	20
I.6. Állatkísérletek.....	21
II. Célkitűzések	22
II.1. Biodízel-glicerin hatásának vizsgálata	22
II.2. Szappanos víz hatásának vizsgálata	22
II.3. Kukoricaolaj és sárgazsír hatásának vizsgálata.....	23
III. Anyagok és módszerek	25

III.1. Kísérleti állatok	25
III.2. Vizsgált anyagok.....	26
III.3. Expozíció	28
III.4. Kísérleti csoportok (A1, A2, A3, B, C).....	28
III.5. Génexpresszió vizsgálata	31
III.5.1. Az A1 és az A2 kísérletben alkalmazott módszerek.....	31
III.5.2. Az A3 és a C kísérletben alkalmazott módszerek	32
III.5.3. A B kísérletben alkalmazott módszerek.....	34
III.5.4. A vizsgált gének primerei.....	35
III.6. Eredmények értékelésének statisztikai módszerei	36
IV. Eredmények	38
IV.1. Biodízel-glicerinnel végzett vizsgálatok eredményei	38
IV.1.1. Az apoptózis/antiapoptózis folyamatára gyakorolt hatás biodízel-glicerinnel történt expozíciót követően (A1 kísérlet)	38
IV.1.2. A biotranszformációra gyakorolt hatás biodízel-glicerinnel fogyasztását követően (A2 kísérlet).....	42
IV.1.3. Az onkogén és tumorszuppresszor miRNS-ek és mRNS-ek kifejeződésére gyakorolt hatás biodízel-glicerinnel fogyasztását követően (A3 kísérlet).....	43
IV.2. Szappanos vízzel kezelt talajon termelt búzával történt expozíció hatása az apoptózis/antiapoptózis szabályozására, az onkogén és tumorszuppresszor miRNS-ek kifejeződésére és a biotranszformációra (B kísérlet)	46
IV.3. Kukoricaolaj és sárgaszója expozíció hatása az apoptózis/antiapoptózis szabályozására, az onkogén és tumorszuppresszor miRNS-ek és a K-ras onkogén kifejeződésére (C kísérlet)	50
V. Megbeszélés	53
V.1. Az apoptózis/antiapoptózis szabályozása.....	53
V.1.1. A biodízel-glicerinnel hatása az apoptózis folyamatára.....	54
V.1.2. A szappanos vízzel kezelt talajon termelt búza hatása az apoptózis folyamatára	55
V.1.3. A kukoricaolaj és a sárgaszója hatása az apoptózis folyamatára.....	56

V.2. A biotranszformáció szabályozása	56
V.2.1. A biodízel-glicerin hatása a biotranszformációra	56
V.2.2. A szappanos vízzel kezelt talajon termelt búza hatása a biotranszformációra.....	57
V.3. A K-ras onkogén kifejeződésére gyakorolt hatás.....	57
V.3.1. A biodízel-glicerin hatása a K-ras onkogén kifejeződésére.....	58
V.3.2. A kukoricaolaj és a sárgaszír hatása a K-ras onkogén kifejeződésre.....	58
V.4. Az onkogén és tumorszuppresszor miRNS-ekre gyakorolt hatás	58
V.4.1. A biodízel-glicerin hatása a miRNS-ek kifejeződésére	60
V.4.2. A szappanos vízzel kezelt talajon termelt búza hatása a miRNS-ek kifejeződésére ..	61
V.4.3. A kukoricaolaj és a sárgaszír hatása a miRNS-ek kifejeződésére	62
VI. Összefoglalás	63
VI.1. A biodízel-glicerinnel végzett vizsgálatok új eredményei	63
VI.2. A biodízelgyártás szappanos víz melléktermékével végzett vizsgálatok új eredményei	64
VI.3. A kukoricaolajjal és a sárgaszírral végzett vizsgálatok új eredményei.....	65
VII. Rövidítések jegyzéke	67
VIII. Irodalomjegyzék.....	70
IX. Értekezés alapjául szolgáló közlemények és kongresszusi összefoglalók jegyzéke.....	78
X. Megjegyzés	88
XI. Köszönetnyilvánítás.....	89

I. Bevezetés

I.1. A bioüzemanyagok jelentősége

A Földön jelenleg folyamatban lévő ipari fejlődéssel párhuzamosan növekszik az emberek energiaigénye, míg a ma használatos fosszilis energiaforrások mennyisége csökken, ezért az alternatív energiaforrások felkutatása elengedhetetlen a fenntartható fejlődés érdekében. A fosszilis energiahordozók használatából eredő üvegházhatású gázok kibocsátása a klímaváltozás előidézésében is nagy szerepet játszik, ily módon mennyiségének exponenciális növekedése környezeti katasztrófához is vezethet.

A fenntartható jövőt megalapozó gazdasági modellben az energiatakarékosság, az energiahatékonyság, a megújuló energiaforrások felhasználása meghatározó jelentőséggel bírnak (1).

A megújuló energiaforrás olyan közeg, természeti jelenség, melyből oly módon nyerhető energia, hogy az különösebb emberi beavatkozás nélkül, legfeljebb néhány éven belül újratermelődik. A megújuló energiaforrások, szemben a nem megújuló energiaforrásokkal, nem okoznak olyan halmozódó káros hatásokat, mint az üvegházhatás, a levegőszennyezés vagy a vízszennyezés. A megújuló- vagy más néven zöld energia forrása négy nagy csoportra bontható: biomassza, geotermikus-, víz- és szélenergia.

A fejlett országok egy részében, ahol az energiaigény nagy részét az üzemanyag teszi ki, a fosszilis energiahordozóktól való elhatárolódás érdekében már néhány évtizede állítanak elő bioüzemanyagot a biomasszából.

A biomassza, mint energiaforrás alapvetően különbözik a széntől független megújuló energiaforrásoktól, mivel a belőle nyert energia és a kibocsátott gázok jellege hasonló a fosszilis energiahordozók alkalmazásánál megszokotthoz, azonban a biológiai körforgásból adódóan a kibocsátott gázok semlegesítése is megtörténik. A növényi eredetű üzemanyagok égetésekor gyakorlatilag annyi széndioxid termelődik, mint amennyit a növény az olaj előállításához felhasznált (2, 3).

A biomassza élelemforrásként, takarmány alapanyagként és ipari nyersanyagként való felhasználása szintén lényeges szempont, melyet megfelelő súllyal kell figyelembe

venni az energiacélú hasznosításnál, hogy az összhangban maradjon a fenntarthatóság elveivel.

Az úgynevezett elsőgenerációs bioüzemanyagokat elsősorban az erre a célra termesztett növényekből állítják elő. A második generációs bioüzemanyagok alapanyaga lehet a mezőgazdaságból, erdőgazdálkodásból és a kapcsolódó iparágakból (pl. halászat) származó biológiai eredetű termék, melléktermék, vagy akár a települési hulladék még biológiailag lebontható része. A benzinmotorokban használható bioetanol gyártása lényegében az alkoholerjesztés évezredes technológiáján alapul, míg a dízelmotorokba szánt biodízel növényi olajból, használt sütőolajból vagy állati zsiradékból állítható elő (2, 4).

A bioüzemanyagok tisztán vagy hagyományos üzemanyagokhoz keverve kerülhetnek a forgalomba. Az előállítás és felhasználás gyakorlata kialakult, de folyamatosan zajlanak azok a fejlesztések, kutatások, melyek az előállítás környezettudatosságát, gazdaságosságát hivatottak vizsgálni. Az élelmezési célra is felhasználható alapanyagokból előállítható elsőgenerációs bioüzemanyagok termelése nemcsak kockázatosá vált, hanem mennyiségileg is behatárolt. A bioüzemanyaggyártás növekvő alapanyagigénye miatt a termőföldek egyre nagyobb arányú bevonása az üzemanyag előállításba jelentősen csökkenthetné az élelmiszergyártásra használható termékek mennyiségét. Ennek elkerülése érdekében szükséges volt szabályozni, hogy a termőföldek milyen arányban vonhatók be az üzemanyag-előállításba, illetve szükséges olyan alapanyagok felkutatása, melyek felhasználása az élelmiszeriparból nem von el forrásokat.

Az Európai Unió a megújuló energiaforrásból előállított energia felhasználásának növelését már több, mint egy évtizede célul tűzte ki, az energiahatékonyság fokozásával és az üvegházhatású gázok kibocsátásának csökkentésével egyidejűleg. Az *Európai Parlament és Tanács a megújuló energiaforrásból előállított energia támogatásáról, valamint a 2001/77/EK és 2003/30/EK irányelv módosításáról és azt követő hatályon kívül helyezéséről* szóló 2009. április 23-ai 2009/28/EK irányelvében szabályozza a bioüzemanyagokra és folyékony bio-energiahordozókra (biomasszából előállított, a közlekedéstől eltérő célokra energiaforrásként használt folyékony üzemanyagok, pl. villamos energia, fűtés, hűtés) vonatkozó fenntarthatósági kritériumokat. Az irányelv amellet, hogy pontosan meghatározza mely földterületeken állítható elő bioüzemanyag

előírja azt is, hogy 2017-re a bioüzemanyagok és folyékony bioenergia-hordozók használatából eredő üvegházhatású gázkibocsátás-megtakarítás legalább 35% kell, hogy legyen (5).

Magyarországon a bioüzemanyagok előállításával és felhasználásával kapcsolatos kérdéseket *a megújuló energia közlekedési célú felhasználásának előmozdításáról és a közlekedésben felhasznált energia üvegházhatású gázkibocsátásának csökkentéséről szóló 2010. évi CXVII. törvény* valamint *a fenntartható bioüzemanyag-termelés követelményeiről és igazolásáról szóló 343/2010. (XII.28.) Korm. rendelet* szabályozza az Európai Unió irányelv mellett (6, 7).

A hazai szabályozás az Európai Unió elvárásoknak megfelelően a bioüzemanyagok előállítását ösztönzi, a fenntarthatósági kritériumok meghatározása mellett.

A *2010. évi CXVII. törvény* értelmében 2020. december 31-éig 6%-kal kell csökkenteni az üzemanyagokból és más közlekedési célú energiatermékből származó energiaegységre számított üvegházhatású gázkibocsátást. A *343/2010. (XII.28) Korm. rendelet* értelmében pedig a dízelgázolaj esetében az energiatartalom 4,9%-át bioüzemanyaggal kell biztosítani 2014. január 1. és 2015. december 31. közötti időszakban.

A Nemzeti Fejlesztési Minisztérium 2010-ben kiadott, „Magyarország Megújuló Energia Hasznosítási Cselekvési Terve 2010-2020” című dokumentumában foglaltak szerint az első generációs bioüzemanyagokból – az élelmezési és takarmányozási célok biztosításával egyidejűleg – 2020. évi becsült felhasználás 10%-ot meghaladó mennyiség is előállítható, a második generációs bioüzemanyagok megjelenése – az alapanyagkör bővülésével – ezt a volument a mezőgazdasági termékmennyiség szezonálisának függvényében tovább növelheti (8).

I.2. Biodízel előállítása

A fejlődő országokban az étkezési célra nem használható növényi olajok energiacélú használata sokkal elterjedtebb a használt étolajok ilyen jellegű alkalmazásánál.

A nem étkezési célú termények nem befolyásolják az élelmiszerpiaci keresletet és kínálatot, azonban a fejlődő országokban a különböző fák által termelt olaj (pálma,

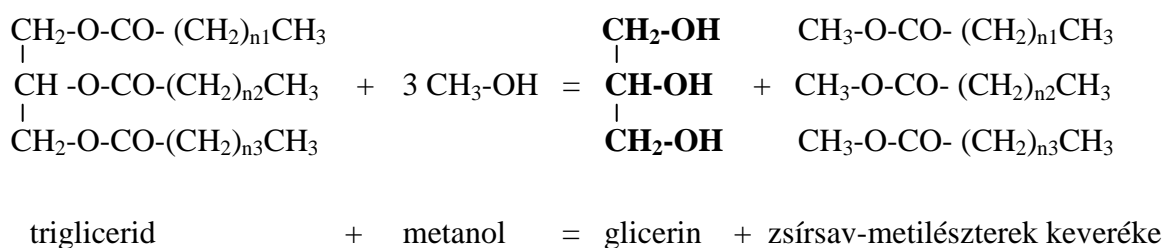
kókusz, makadámdió) versenyt gerjeszt az élelmiszeripar és a bioüzemanyag-piac között, és ez emeli a növényi olajok árát.

1.2.1. Biodízel előállítása nyers növényi olajból

Magyarország természeti adottságai kiválóan alkalmasak a növénytermesztésre és a stagnáló népességszámnak köszönhetően az élelmiszeripar igénye évek óta állandó. A jelenleg kihasználatlan földterületek bevonása a biodízel alapanyagú növénytermelésébe nem befolyásolja negatívan az élelmiszeripari igényeket, továbbá nemcsak energetikai szempontból lehet kedvező, de munkahelyteremtéssel a lakosság életszínvonalát közvetlenül is növeli (2, 9).

A növényi olaj triglicerid, azaz 3 azonos vagy különböző zsírsavnak glicerinnel alkotott észtere, nyers formában is használható lenne üzemanyagként, azonban magas trigliceridtartalma számos motortechnikai és tárolási problémát okoz. A növényi olajokból átészterezéssel a hagyományos motorokban is használható biodízel állítható elő (2, 10, 11).

A gyártás a növények olajos magjának tisztításával, héjtalanításával kezdődik, majd óvatos préselés során nyerik ki a nyers növényi olajt. Az ezt követő észterezést katalizátor jelenlétében alkohollal, ára miatt elsősorban metanollal végzik. A triglicerid metanollal zajló reakciója során a glicerin felszabadulása mellett zsírsav-metilészter képződik, mely a biodízel nyers alapja (1.ábra).



1. ábra: Biodízel előállítása nyers növényi olajból

A biodízel előállítás költséghatékonyságát növeli az előállítás során keletkezett melléktermékek további felhasználása, mely nemcsak a biodízel fogyasztói árának csökkenését eredményezi, hanem a környezettudatosságot is növeli, hiszen így a melléktermékek is visszakerülnek a biológiai körforgásba.

A melléktermékek élelmiszeriparban történő felhasználását megelőzően azonban szükséges kizárni egészségkárosító hatásukat.

1.2.2. Biodízel előállítása állati zsiradékból vagy használt növényi olajból

A biodízel állati zsiradékból, használt étkezési olajokból is előállítható (12). Az egészséges életmódra törekvés napjainkban egyre nagyobb mennyiségben szabadít fel állati zsiradékot ipari hasznosításra. A húsfeldolgozás során keletkezett állati zsiradék az elsődleges állati zsiradék, míg a konyhatechnológiai műveletek melléktermékeként, hulladékként keletkező zsír a másodlagos állati zsiradék. Az állati zsiradék felhasználását megelőzően azokat el kell választani az állati testből származó egyéb szövetektől, vértől illetve a szennyező anyagoktól.

A használt olajban, zsiradékban a sütött anyagból származó elszenesedett részecskék, az ízesítésre hozzáadott fűszerek, és azok lebontási termékei változó mennyiségben maradnak vissza. Ebből adódóan összetételük folyamatosan változik, ami nehezíti az üzemanyag előállítását.

A bonyolult tisztítási műveletek ellenére - a gazdaságos működés kényszere miatt - a biodízel üzemek jelentős részét alkalmassá tették az éttermi olajok, zsiradékok feldolgozására, tekintettel arra, hogy ezen alapanyagok sok esetben térítésmentesen állnak rendelkezésre.

A hulladékgazdálkodásról szóló 2000. évi XLIII. törvény 32. § (5) bekezdése szerint „a háztartásban, illetőleg intézményi fogyasztásból, felhasználásból vagy szolgáltatásból keletkezett veszélyes hulladékot a termelő köteles a 20. § (3) bekezdésnek megfelelően elkülönítve, a környezet szennyezését vagy károsítását kizáró módon gyűjteni és az annak begyűjtésére és szállítására, illetőleg ártalmatlanítására engedéllyel rendelkező hulladékkezelő részére átadni, valamint a szolgáltatásért járó díjat megfizetni”. Azaz a hazai éttermek még fizetnek is a hulladéknak számító használt sütőolaj, zsiradék elszállításáért (2, 13).

Mindezek alapján fontos azon termékek felkutatása melyek élelmiszeripari felhasználása környezet-egészségügyi szempontból nem biztonságos, így biodízel alapanyagként történő alkalmazásuk direkt és indirekt módon is csökkenti a környezetszennyezést, tekintettel arra, hogy nem válnak hulladékká, és energia célú felhasználásuk csökkenti a felhasznált fosszilis energiahordozók mennyiségét.

I.3. Nyers növényi olajból történő biodízelgyártás melléktermékeként keletkezett glicerinnel végzett vizsgálatok, irodalmi áttekintés

A nyers biodízel és a glicerin (G-fázis) elválasztása ülepítéssel történik. A glicerin nagyobb fajlagos tömegének köszönhetően a gravitáció hatására az olaj alá ülepszik, így módon könnyedén elválaszthatóak egymástól. A nyers biodízel és az ülepített glicerin azonban szennyezett maradhat az észterezés során használt katalizátorokkal, sókkal, metanollal, illetve a reakció során keletkezett szappanokkal (2).

A G-fázis tisztítása savakkal és desztillációval történik, melynek eredményeként akár 80-90%-os tisztaságú biodízel-glicerin is nyerhető.

A tiszta glicerin színtelen, szagtalan, viszkozus anyag, íze édeskés, a lipidek vázát adja. Élelmiszerekben E422 néven találkozhatunk vele, a víztartalom megőrzésére, oldószerként, édesítőszerként alkalmazzák. A gyógyszer- és a kozmetikaiipar is alkalmazza termékeik stabilizálására, állagjavításra, azonban a biodízel előállítás során keletkező nagy mennyiséget ezen iparágak már nem győzik felhasználni. Becslések szerint 1 liter biodízel előállítása során 80-100 gramm glicerin keletkezik (14).

A glicerin értékes, energiadús anyag, így felmerült, hogy akár állati takarmány dúsítására is alkalmas lehet. Az állatok energiaellátottságuktól függően a glicerint glükóz előállítására vagy zsírtermelésre, illetve energiatermelésre egyaránt felhasználhatják.

Több tanulmány igazolta, hogy a biodízel-glicerinnel dúsított állati takarmány növeli az állatok húshozamát. *Cerrate* és munkatársai 2, 5 és 10%-ban biodízel-glicerinnel dúsított táppal csirkéket etettek 52 napon át. Vizsgálatuk során azt figyelték meg, hogy az 5%-ban alkalmazott glicerin nem befolyásolta az állatok súlyát, táplálékfogyasztását, illetve megbetegedési vagy halálozási mutatóit, növelte azonban húshozamukat. A 10%-ban dúsított táppal történő esetet 35. napjától azonban az állatok testsúlya a kontrollhoz képest csökkenést mutatott. A testsúlycsökkenés okaként feltételezik, hogy a glicerin telítette az állatokat, így csökkent a táplálékfelvételük (15).

Lammers és munkatársai hasonló vizsgálataikat disznókkal végezték. Szójaolajból származó 86,95%-os tisztasági fokú biodízel-glicerinnel dúsították az állatok takarmányát 5, 10 és 20%-ban. Eredményeik hasonlóan azt igazolták, hogy a magasabb koncentrációban alkalmazott glicerin nem növeli a várt mértékben a húshozamot (16).

A biodízel-glicerin környezet-egészségügyi kockázatának vizsgálatára irányuló tanulmányok mindezidáig nem történtek.

I.4. Nyers növényi olajból előállított biodízel melléktermékeivel, továbbá a biodízelgyártásra szánt egyéb anyagokkal végzett vizsgálatok

I.4.1. Biodízel-glicerin

A Nyugat-magyarországi Egyetem, Mezőgazdasági és Élelmiszer-tudományi Kar, Állattudományi Intézetének munkatársai takarmányozási vizsgálatokat végeztek a kukorica alapú biodízelgyártás során keletkezett glicerinnel. A vizsgálat során a standard takarmány kísérletenként meghatározott kukoricahányadát helyettesítették glicerinnel. Eredményeik szerint a takarmányozási minőségű (glicerin tartalom: 86,3%) glicerin emészthetősége jó, a nyersfehérje, a nyerszsír, a nyersrost és a N-mentes kivonható anyagok emészthetőségére nem volt hatással, nem befolyásolja továbbá a sertések N-visszatartását. Vizsgálatuk szerint a sertések súlygyarapodása és takarmányhasznosítása nem tért el szignifikánsan a standard takarmányt fogyasztó állatokétól, a sertészsír zsírsavösszetétele pedig csak minimálisan változott, egy-egy zsírsav mennyisége ugyan nőtt, de a főbb zsírsavcsoportok aránya nem változott. Összességében a hizlalási eredmények alapján megállapították, hogy a vágott áru minősége nem romlik, ha a kukoricát 5%-ban glicerinnel helyettesítik a hízósertések takarmányában (17).

A hízósertések mellett vizsgálták a biodízel-glicerin hatását a pecsenyecsirke súlygyarapodására, takarmány-, energia- és fehérjehasznosítására. A csirkék tápjának kukoricahányadát 5, 10 illetve 15%-ban helyettesítették glicerinnel. Eredményeik szerint az 5 és 10%-ban dúsított táp a 42 napos kísérlet végére szignifikánsan növelte az állatok hizlalási súlyát a kontroll, standard tápot fogyasztó csirkékhez képest. A 15%-ban glicerinnel dúsított csirkék súlya az etetési időszak elején (első 3 hét) szintén súlygyarapodást mutatott, azonban ezt követően súlynövekedésük oly mértékben lassult, hogy a kísérlet befejezésekor súlyuk a kontroll állatokénál is alacsonyabb volt. Ennek oka, hogy kisebb volt a takarmányfogyasztásuk, illetve a 15%-os

glicerintartalmú tápból a glicerin már nem hasznosult teljes mértékben. A takarmány-, energia és fehérjehasználás tekintetében az 5%-os glicerintartalmú tápot fogyasztó csirkék mutatták a legjobb eredményeket. A glicerin a csirkék esetében sem volt hatással a nyersfehérje, a nyerszsír, a nyersrost emészthetőségére, a N-mentes kivonható anyagok emészthetősége pedig javult. Összességében tehát a 86,3% tisztaságú G-fázis takarmány-komponensként történő alkalmazása a csirkék húshozamára nincs negatív hatással (18).

A Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Orvosi Népegészségtan Intézetében (továbbiakban: Intézet) a biodízel-glicerin genotoxikus és mutagén hatásának felderítésére irányuló tesztek végzésével kezdődtek meg a környezetegészségügyi vizsgálatok. Szendi és munkatársai rövidtávú kísérletük során nőstény és hím Long Evans patkányok részére 2000 mg/ttkg biodízel-glicerint adagoltak gyomorszondán keresztül, egyszeri alkalommal. Az expozíciót követően 24 óras vizeletgyűjtést végeztek. A vizeletmintában Salmonella Ames teszttel a mutagén hatást, míg a 24. órában vett vérmintával végzett üstökös elektroforézissel a genotoxikus hatást zárták ki mindkét nemből (19).

A genotoxicitás vizsgálatára irányuló szubkrónikus vizsgálatokat Gerencsér és munkatársai *a veszélyes anyagok és a veszélyes készítmények tulajdonságainak vizsgálati módszereiről és vizsgálatok eredményeinek értékeléséről* szóló 54/2003. (IX.1.) ESZCSM-KvVM-BM együttes rendeletben előírtak szerint végezték, nőstény és hím Long-Evans patkányokkal. A biodízel-glicerint hetente egy alkalommal adagolták gyomorszondán keresztül a vizsgálatba bevont állatoknak, 2000 mg/ttkg mennyiségben. A 90. napon az állatok túlaltatását követő boncolása során a patkányok szervein makroszkópos eltérést nem észleltek, az elvégzett Ames teszt, és az üstökös elektroforézis mutagén vagy genotoxikus hatást szintén nem igazolt (20, 21).

1.4.2. Szappanos víz

A nyers biodízel tisztítása vizes és száraz mosással történhet. A vizes mosás során, a vízben jól oldódó alkohol, nátrium- és káliumsók távolíthatók el. Amennyiben a mosást enyhén savas, lágyított meleg vízzel végezzük, úgy a szappanok kicsapódása is elkerülhető és a kalcium-, illetve magnéziumszennyezés eltávolítható. Így keletkezik a gyártás úgynevezett „szappanos víz” mellékterméke, mely tartalmazhat glicerint, zsírsavakat, zsírsav- metilésztert, valamint különböző sókat.

A szappanos víz összetétele révén fontos nyomelemeket szolgáltathat a talajban élő mikroorganizmusok részére, így felmerült, hogy talajminőség javító anyagként hasznosítható újra. A szappanos víz zsírsav és sótartalma ugyan alacsony, de magasabb a hagyományos öntözővízénél, így elsősorban a műtrágyázás hatásának fokozására lehet alkalmas, amennyiben kizárható a növény és állatvilágra kifejtett környezet-egészségügyi kockázata. A talajban élő mikroorganizmusok képesek a metanol bontására, illetve mivel a metanol erősen illékony anyag, a szappanos vízben esetlegesen maradó metanol jelentős része el is párolog, még a biológiai bontás előtt. *Mikola* és munkatársai által végzett gázkromatográfiás vizsgálatok eredményei alapján szappanos vízzel kezelt talaj metanol tartalma 1 óra alatt több, mint 40%-kal csökken, így feltételezhető, hogy néhány óra elteltével a párolgás és biológiai bomlás következtében már nem is mérhető a talajban (22).

Gerencsér és munkatársai a talajhoz különböző koncentrációban kevert szappanos víz ökotoxikológiai hatását vizsgálták két különböző tesztrendszerben. Elsőként az akut toxicitás kizárása céljából fehér mustár (*Sinapis alba*) gyökérnövekedési tesztet alkalmaztak, mely során a kicsírázott magok száma, és a képződött gyökerek hosszának tekintetében a szappanos vízzel kezelt talajon mért értékek egyik vizsgált koncentrációban sem mutatottak eltérést a kontroll talajban mérthez képest. Krónikus vizsgálat *Eisenia* teszttel történt, mely során trágyagilisztákat telepítettek a vizsgált talajra. A vizsgált talajokon ugyanolyan mértékű állatelhullást tapasztaltak, mint a szappanos vízzel kezelt talajon, így ökotoxikus hatást nem igazoltak (23).

Tekintettel arra, hogy a szappanos vízzel kezelt talajon termelt növények közvetlenül, vagy közvetve emberi fogyasztásra is kerülnek, alkalmazásának megkezdését megelőzően a karcinogenezisre gyakorolt hatás vizsgálata elengedhetetlen.

1.4.3. Kukoricaolaj és sárgazsír

A biodízel előállítás technológiájának fejlesztése során vizsgáltuk a használt kukoricaolaj (továbbiakban: kukoricaolaj) illetve a használt sütőolaj, vagy más néven sárgazsír alapanyagként történő alkalmazásának környezeti és gazdasági hatásait.

Szendi és munkatársai mutagenitási és ökológiai tesztekkel mérték, hogy a hulladéknak számító alapanyagok mutatnak-e mutagén vagy ökotoxikus hatást. Ames teszttel egyik anyagnál sem igazolódott mutagén hatás, míg a fehér mustár gyökérnövekedési teszt a két anyag ökotoxikus hatását igazolta, feltehetően magas olajtartalmuk miatt. A

munkacsoport vizsgálata alapján ezen termékek nem alkalmazhatók talaj minőségének javítására, takarmánykomponensként történő felhasználásuk azonban mutagenitási szempontból nem zárható ki (24).

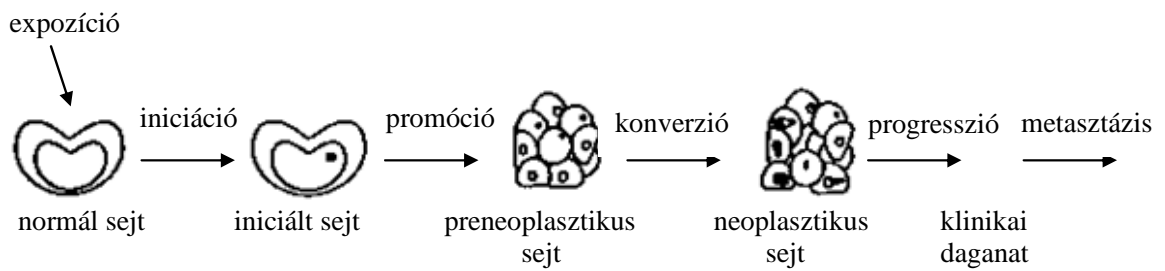
I.5. Molekuláris epidemiológiai vizsgálatok a növényi alapú biodízelgyártás melléktermékeivel és biodízelgyártás egyéb alapanyagaival

A növényi olajból előállított biodízel melléktermékeinek és a biodízel alapanyagának szánt kukoricaolaj és sárgazsír biotranszformációra, karcinogenezisre kifejtett hatásának mérésére irányuló vizsgálatok mindezidáig nem történtek.

A molekuláris epidemiológia az utóbbi évek egyik legdinamikusabban fejlődő tudományága. A betegségek kialakulásához és terjedéséhez vezető okok felderítése az epidemiológia tudományterületébe tartozik. A molekuláris biológiai módszerek alkalmazása az epidemiológiai kutatások területén lehetőséget teremtett a betegségek genetikai/genomikai mechanizmusának megismerésére, és ily módon a primer prevenció eszközök szélesítésére.

A betegségek kialakulása általában nem egyetlen ok következménye, hanem számos tényező együttes hatásának eredménye. A genetikai tényezők mellett a környezeti hatásoknak tulajdonítható a legnagyobb szerep. A környezeti expozícióra a genetikai tényezők szinte minden esetben reagálnak valamilyen módon, azaz kölcsönhatásban vannak egymással (25).

A károsodott sejtek túlélése, szaporodása, azaz a daganatsejtek progressziója a sejtben bekövetkezett változások következménye. A karcinogenezis első lépcsője az expozíció, melynek során a prokarcinogének, vagy direkt karcinogének a szervezetbe kerülnek. Az iniciáció során az ezekből kialakult végső karcinogének változást okoznak a DNS-ben, majd az iniciált sejt a promóció során preneoplasztikus sejtté alakul. A preneoplasztikus sejt invázió során alakítja ki a tumoros szövetet, melynek progressziója vezet a klinikailag is felismerhető daganat kialakulásához (2. ábra).



2. ábra: A karcinogenezis többlépcsős folyamata (25)

A karcinogenezis többlépcsős folyamatában szerepet játszó környezeti hatások felderítése napjainkban a tudományos kutatások középpontjába került. A környezeti károsító anyagok feltárása mellett számos kutatás irányul a daganatképződés korai fázisát jelző sejtszintű változások megismerésére. A klasszikus tumormarkerek a betegség diagnosztizálására alkalmasak, azaz kizárólag a szekunder vagy a terciér prevenció eszközei lehetnek (26).

A molekuláris epidemiológiai vizsgálatok egyik célja az egészséges sejtek károsodását legkorábban jelző, ún. korai biomarkerek felderítése, melyek expresszióváltozásukkal a primer prevenció eszközeként még az invazív daganatok kialakulását megelőzően jelzik a megváltozott állapotot (27).

1.5.1. Apoptózis/antiapoptózis szabályozása

A korai biomarkerek közé tartoznak a jelátviteli folyamatok szabályozásában szerepet játszó gének. A kémiai hatások stressz reakciót váltanak ki a sejtben, melynek következtében különböző jelátviteli folyamatok indulnak be. A jelátviteli folyamatban részt vevő fehérjék egy kaspázrendszer proteolitikus fehérjéit aktiválják vagy inaktíválják célfehérjék hasításával. Az apoptózis során a jelátviteli folyamatok között kialakuló egyensúly következtében dől el, hogy adott hatást követően a sejt életben marad-e vagy elpusztul. A genetikailag megváltozott, károsodott sejtek a kaspázrendszer aktiválódását követő folyamatok végeredményeként olyan irreverzibilis változásokon mennek keresztül (citoplazmavesztés, kromatinkondenzáció, stb), melyek következtében elhalnak (28).

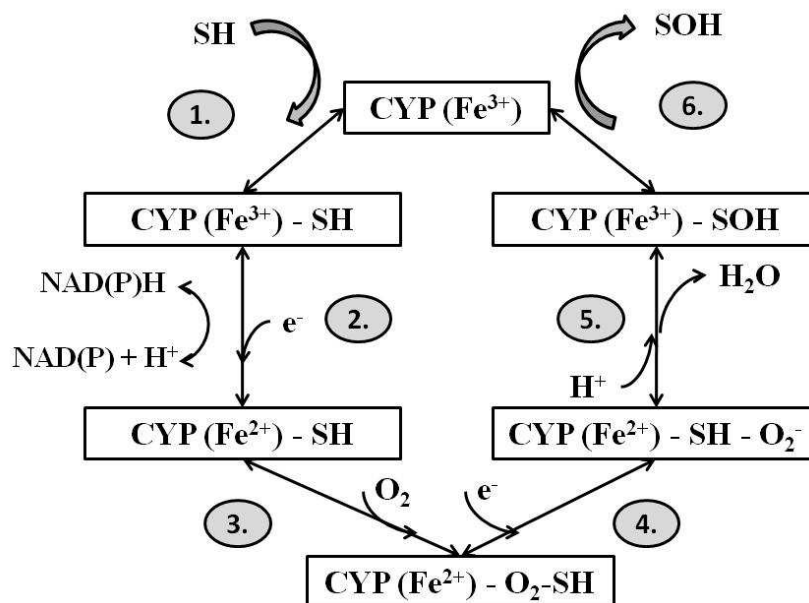
A jelátviteli folyamatok szabályozásában szerepet játszó gének megváltozott kifejeződéséből következtetni lehet a külső ágens sejtülésre, vagy sejtciklusra gyakorolt hatására.

I.5.2. A sejtben zajló biotranszformáció szabályozása

A környezeti expozíció hatása a sejtekben zajló biotranszformációban bekövetkezett változásban is megfigyelhető. A biotranszformációban szerepet játszó enzimeink két nagy csoportba bonthatók, I-es és II. fázisú metabolizáló enzimek. Az I-es fázisú metabolizáló enzimek a szervezetbe került káros anyagokhoz funkciós csoportot kötnek. Ezt a reakciót elsősorban a citokróm P450 enzimszisztéma tagjai végzik. A II-es fázisú metabolizáló enzimek ezen vegyületeket konjugáció során vízoldékonyvá teszik, így elősegítve kiválasztásukat.

A metabolizáló enzimeknek kiemelkedő szerepük van a daganatok kialakulásában. A szervezetbe került prokarcinogének az I-es fázisú enzimek hatására karcinogénné válhatnak, míg a II-es fázisú enzimek semlegesítik őket. A metabolizáló enzimek aktivitásának változása a korai biológiai hatás jele lehet (26).

A citokróm P450 enzimszisztéma közel 100 enzimének leggyakoribb szubsztrátjai a xenobiotikumok, a lipid peroxidáció termékei, a policiklusos aromás szénvegyületek és a reaktív oxigénradikálok. A biotranszformáció első lépése a család minden tagjában ugyanúgy megy végbe. A szubsztrát megkötését követően az enzim aktív helyén lévő vas-trioxid (Fe(III)) redukálódik (3. ábra).



3. ábra: A citokrómok hatásmechanizmusa (1. szubsztrát kötődés, 2. redukció, 3. oxigén kötés, 4. elektron transzfer, 5. hidrogén atom transzfer, 6. transzformáció, S: szubsztrát) (30)

A redukció során a nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidaseről (NADPH) az elektronok a NADPH- citokróm P450 reduktázon keresztül jutnak el a citokróm

P450-hez. A redukáló enzim két koenzimet tartalmaz: flavin adenine mononucleotid (FMN) és flavin adenine dinucleotid (FAD). A redukált vas dioxidot (Fe(II)) tartalmazó citokróm enzim képes megkötni a molekuláris oxigént és egy újabb elektron felvételével stabilizálódik. Az elektron két enzimtől is származhat: NADPH-citokróm P450 reduktáztól és a NADH-citokróm B5 reduktáztól. A keletkezett komplex oxigén-oxigén kötése felhasad, egy molekula víz kilépésével aktív intermedier jön létre, amely elvégzi a szubsztrát oxidációját. Végül az oxidált metabolit disszociál az enzimről (29, 30, 31).

1.5.3. Onkogének és tumorszuppresszor gének

Az onkogének a humán genom proto-onkogénjeiből funkciónyeréssel járó mutációk következtében kialakuló gének. A mutáció hatására alakulnak ki a daganatsejtek legjellemzőbb tulajdonságai, mint a szabályozástól függetlenné vált sejtszaporodás, a halhatatlanság, a gátolt differenciálódás, új erek képzése, szöveti invázió és áttétképződés, valamint az apoptózis elkerülése. Az onkogének mellett a tumorszuppresszor gének funkcióvesztéssel járó mutációk révén vesznek részt a daganatképződésben (32).

Az onkogének és tumorszuppresszor gének expresszióváltozásai szintén a korai biomarkerek közé tartoznak.

Korábban úgy gondoltuk, hogy a daganatképződést kizárólag az onkogének és a tumorszuppresszor gének képesek közvetlenül befolyásolni. Megváltozott kifejeződésük valóban még az invazív daganat kialakulását megelőzően jelzi a sejtkárosodást, azonban a napjainkban zajló kutatások bizonyították, hogy az onkogének és tumorszuppresszor gének kifejeződését is befolyásolhatják a molekuláris epidemiológiai kutatások fókuszába került, a DNS fehérjét nem kódoló szakaszairól átíródó mikroRNS-ek (miRNS).

1.5.4. A miRNS-ek

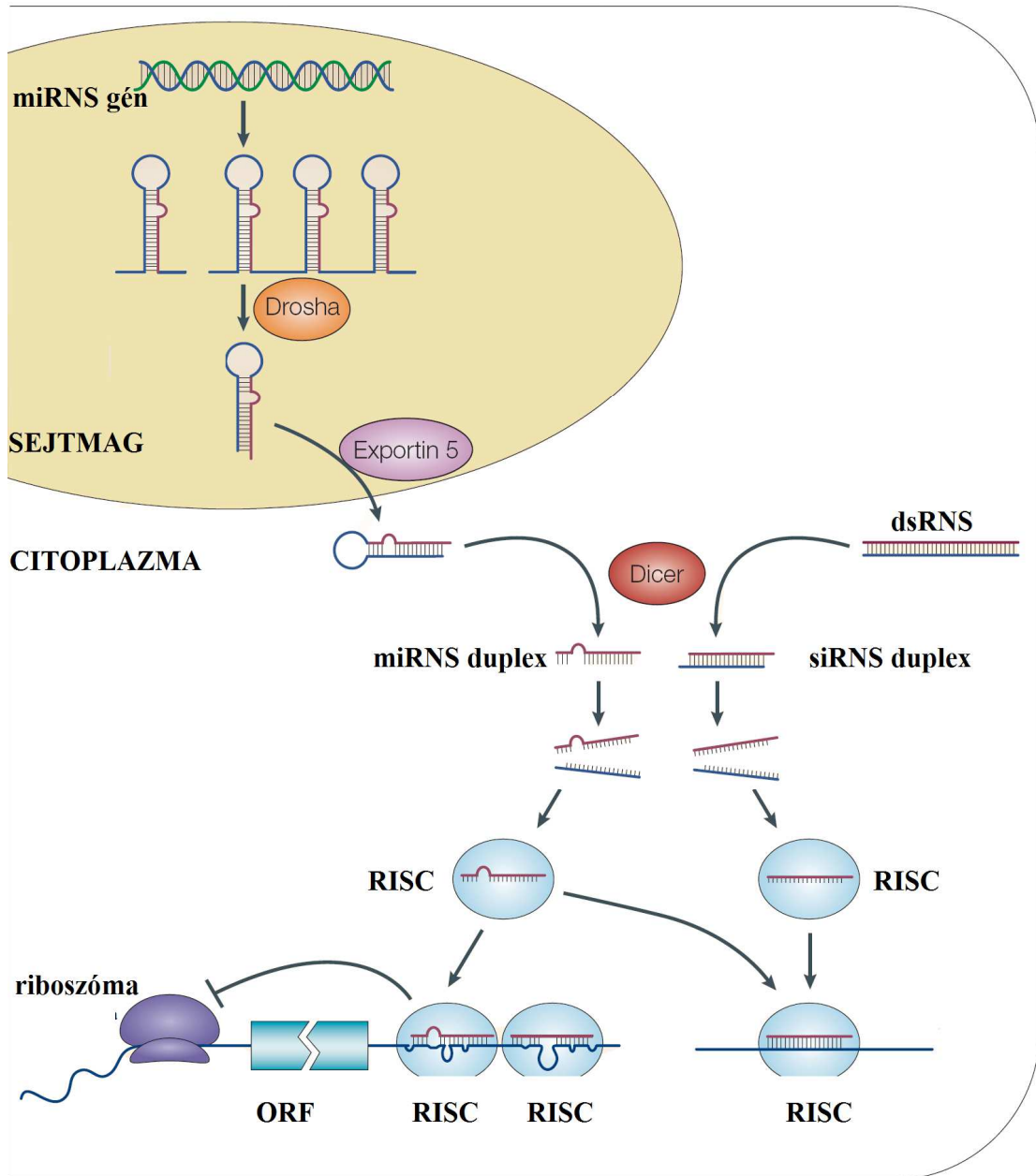
A miRNS-ek az RNS alapú génregulációban játszanak szerepet. A környezeti karcinogenezis korai biomarkereinek, a környezeti expozíció hatásának becslésében, előrejelzésében lehet szerepük. A miRNS-eket nyilvántartó adatbázis jelenleg is több

mint 24 500 miRNS-t számol, melyből közel 4 500 humán eredetű. Nemcsak a szövetekben, hanem a szérumban és a testnedvekben is megtalálhatók. A miRNS-ek száma az organizmus fejlettségi szintjével párhuzamosan nő (33-36).

Feltételezések szerint a gének kifejeződését exogén miRNS-ek is befolyásolhatják. *Zhang* és munkatársai igazolták, hogy a rizsben nagy mennyiségben jelen lévő növényi eredetű *miR-168* felfedezhető a kínai emberek szérumában is. Következtetéseik szerint, mint exogén miRNS a táplálékkal kerül a szervezetbe, ahol - *in vitro* és *in vivo* vizsgálataik alapján - kötődik a humán/egér low-density lipoprotein receptor adapter protein 1 (LDLRAP1) mRNS-éhez, és gátolja annak kifejeződését a májban, ezzel csökkenti a plazma LDL szintjét. (37).

Az egyes szövetekben eltérő miRNS expressziós profil mérhető, illetve ugyanazon miRNS különböző szövetekben eltérő viselkedést mutathat. Az expressziós mintázat változását tapasztalták a fiziológiás állapot változása kapcsán, pl. terhesség, illetve fertőző vagy nem fertőző akut és krónikus betegségben. Így nemcsak a daganatkutatás középpontjába kerülhetnek a miRNS-ek, hanem a szérumszint eltérések alkalmasak lehetnek gyulladási folyamatok, a cukorbetegség vagy pl. a szívinfarktus korai diagnosztizálására. A miRNS-ek és a különböző megbetegedések közötti összefüggéseket a Human miRNA-associated disease database (HMDD) elnevezésű adatbázis rögzíti (38). A szérumban található miRNS-ek ellenállóbbnak bizonyultak, mint a szöveti miRNS-ek a hőmérséklet, a hosszú tárolás, a többszöri fagyasztás-olvasztási ciklus és az endogén RNáz aktivitás ellen, de a szöveti miRNS-ek ugyanúgy alkalmasak a betegségek azonosítására, szövetspecifikus expressziós mintázatuk alapján (39, 40).

A miRNS-ek rövid, 18-29 nukleotidból álló RNS-ek. Mennyiségük jelentősen befolyásolja a különböző fehérjéket kódoló messengerRNS-ek (mRNS) mennyiségét. A DNS önálló transzkripciósi egységéről, vagy a gének fehérjét nem kódoló intronjáról (mirtron) íródnak át, de előfordul, hogy néhány miRNS szekvencia 1-5 kb távolságon belül található - ezeket miRNS klaszternek nevezzük - és egy polycisztronos transzkriptummá íródnak át. A miRNS gének több mint fele olyan kromoszóma régióban van, melyek daganatok esetében érintettek: fragilis lókuszon, gyakori törésponton, deléciós, amplifikációs régióban (41).



4. ábra: A miRNS-ek képződése (42)

A miRNS transzkripciót az RNS polimeráz III enzim végzi. A transzkripció során egy több száztól ezer bázispárig terjedő pri-miRNS jön létre. A pri-miRNS modifikációját a sejtmagban a DROSHA vagy az RNáz III enzim végzi, melynek eredményeként egy 70-100 nukleotid hosszúságú pre-miRNS-sé alakul. A sejtplazmába történő transzport az exportin 5- RAS-like nuclear protein - guanosine triphosphanon (RAN-GTP) keresztül történik, ahol a Dicer ribonukleáz hasítása során egy 19-23 nukleotid hosszúságú kettős

szálú termék keletkezik. A szálak szeparációját követően a vezető szál a RNA induced silencing complexbe (RISC) inkorporálódik, ahol argonauta és egyéb fehérjékkel alkot komplexet. A target mRNS komplementer, általában 3' untranslated region (3'UTR) szakaszához kötődik, és hatását a mRNS transláció teljes vagy részleges gátlásával fejeje ki. Ily módon a fehérjeszintézist poszttranszkripciós szinten befolyásolja. A gátláshoz elegendő részleges komplementaritás is, így ugyanazon miRNS számos mRNS-hez kapcsolódhat (4. ábra).

Normál és tumoros szövetek vizsgálata során a miRNS-ek patogenetikai szerepét számos daganatos elváltozásban igazolták, viselkedhetnek onkogénként (onkomir) vagy tumorszuppresszor génként egyaránt. A különböző szövetekben, vagy ugyanazon szövetben más-más expozíció hatására ezen tulajdonság is eltérő lehet. A miRNS expressziója alapján nemcsak a daganatképződés, de a kiújulás, a terjedés és az áttétképződés tendenciái is jósolhatók (41, 43, 44).

1.5.5. Vizsgált gének

A biodízel alapanyagokkal és melléktermékekkel végzett vizsgálataink során a sejtciklus szabályozásában szerepet játszó gének közül a nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells 1 (*Nfkb1*), a growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45 alpha (*Gadd45a*) és a mitogen-activated protein kinase 8 (*Mapk8*, *JNK1*) expresszióváltozását mértük.

A sejt stressz válaszána egyik leggyakoribb transzkripciós fehérjéje az NFKB komplex. A komplex *Nfkb1(p50)* alegysége elsősorban proapoptotikus szereppel bír, a *Gadd45a* indukálásával a mitogen-activated protein kinase kinase 4/ c-Jun NH(2)-terminal kinase (MKK4/JNK) kaszkádon keresztül a JNK jelátviteli útvonalat aktiválja, így módon a daganatos sejtek elpusztulását fokozza (45, 46).

Vizsgálataink során a biotranszformációra gyakorolt hatást, a cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1 (*Cyp1a1*), és a cytochrome P450, family 2, subfamily e, polypeptide 1 (*Cyp2e1*) gének kifejeződésének mérésével végeztük.

A v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (*K-ras*) mint klasszikus onkogén jelzi a daganatos elfajulás kezdetét, ezért választottuk a vizsgált gének közé.

A miRNS expresszióváltozását májban vizsgáltuk, 8 onkogénként (*miR-21*, *miR-27a*, *miR-93*, *miR-148a*, *miR-155*, *miR-196a*, *miR-205*, *miR-221*) és 5 tumorszuppresszorként

(*miR-34a*, *miR-143*, *miR-146a*, *miR-203*, *miR-223*) viselkedő gén expressziójának mérésével.

I.6. Állatkísérletek

A kísérletes daganatkutatásban elsősorban emlősöket, és ezen belül főleg rágcsálókat alkalmaznak, általában beltenyésztett (inbred) törzseket, melyek legalább húsz egymást követő nemzedéken át történő édestestvér pároztatással jöttek létre. Az így kialakult törzsek hajlamot mutatnak a spontán daganatképződésre (pl.: AKR/J, BALB/c, CBA/Ca).

Az állatkísérletek alkalmasak arra, hogy különböző kémiai anyagok karcinogenezisben betöltött szerepét vizsgáljuk. A kísérleti anyagok bejuttatása az állat szervezetébe többféle módon történhet, leggyakrabban az állatok ivóvizébe, vagy pedig táplálékukba adagoljuk megfelelő koncentrációban (47).

Intézetünkben alkalmazott egyedülálló rövidtávú állatkísérletes tesztrendszer került kidolgozásra, mely számos kémiai karcinogén esetében nagyon korai fázisban jelezte a karcinogén hatást (48).

II. Célkitűzések

Célunk a kukorica alapú biodízelgyártás melléktermékeinek és a biodízel alapanyagának szánt kukoricaolaj és sárgaszója karcinogenezisre gyakorolt hatásának vizsgálata az Intézetben alkalmazott rövidtávú állatkísérletes modellben.

II.1. Biodízel-glicerinnel hatásának vizsgálata

Célunk a biodízel-glicerinnel környezet-egészségügyi kockázatának felmérése:

- 60%-os tisztaságú biodízel-glicerinnel apoptózis folyamatára gyakorolt hatásának gén szintű vizsgálatával,
- 86,3%-os tisztaságú biodízel-glicerinnel apoptózis folyamatára gyakorolt hatásának gén szintű vizsgálatával,
- 86,3%-os tisztaságú biodízel-glicerinnel biotranszformációra gyakorolt hatásának gén szintű vizsgálatával,
- 86,3%-os tisztaságú biodízel-glicerinnel *K-ras* onkogén kifejeződésére gyakorolt hatásának gén szintű vizsgálatával,
- 86,3%-os tisztaságú biodízel-glicerinnel miRNS-ek kifejeződésére gyakorolt hatásának gén szintű vizsgálatával.

II.2. Szappanos víz hatásának vizsgálata

Célunk a szappanos vízzel különböző koncentrációban kezelt talajról betakarított búza környezet-egészségügyi kockázatának felmérése:

- 1000 l/ha szappanos vízzel kezelt talajról betakarított búza apoptózis folyamatára gyakorolt hatásának gén szintű vizsgálatával,
- 1000 l/ha szappanos vízzel kezelt talajról betakarított búza biotranszformációra gyakorolt hatásának gén szintű vizsgálatával,
- 1000 l/ha szappanos vízzel kezelt talajról betakarított búza miRNS-ek kifejeződésére gyakorolt hatásának gén szintű vizsgálatával,
- 500 l/ha szappanos vízzel kezelt talajról betakarított búza apoptózis folyamatára gyakorolt hatásának gén szintű vizsgálatával,

- 500 l/ha szappanos vízzel kezelt talajról betakarított búza biotranszformációra gyakorolt hatásának gén szintű vizsgálatával,
- 500 l/ha szappanos vízzel kezelt talajról betakarított búza miRNS-ek kifejeződésére gyakorolt hatásának gén szintű vizsgálatával,
- 250 l/ha szappanos vízzel kezelt talajról betakarított búza apoptózis folyamatára gyakorolt hatásának gén szintű vizsgálatával,
- 250 l/ha szappanos vízzel kezelt talajról betakarított búza biotranszformációra gyakorolt hatásának gén szintű vizsgálatával,
- 250 l/ha szappanos vízzel kezelt talajról betakarított búza miRNS-ek kifejeződésére gyakorolt hatásának gén szintű vizsgálatával,
- 125 l/ha szappanos vízzel kezelt talajról betakarított búza apoptózis folyamatára gyakorolt hatásának gén szintű vizsgálatával,
- 125 l/ha szappanos vízzel kezelt talajról betakarított búza biotranszformációra gyakorolt hatásának gén szintű vizsgálatával,
- 125 l/ha szappanos vízzel kezelt talajról betakarított búza miRNS-ek kifejeződésére gyakorolt hatásának gén szintű vizsgálatával.

II.3. Kukoricaolaj és sárgaszója hatásának vizsgálata

Célunk a biodízel alapanyagának szánt kukoricaolaj és sárgaszója környezet-egészségügyi kockázatának felmérése

- a kukoricaolaj apoptózis folyamatára gyakorolt hatásának gén szintű vizsgálatával,
- a kukoricaolaj *K-ras* onkogén kifejeződésére gyakorolt hatásának gén szintű vizsgálatával,
- a kukoricaolaj miRNS-ek kifejeződésére gyakorolt hatásának gén szintű vizsgálatával,
- a sárgaszója apoptózis folyamatára gyakorolt hatásának gén szintű vizsgálatával,
- a sárgaszója *K-ras* onkogén kifejeződésére gyakorolt hatásának gén szintű vizsgálatával,
- a sárgaszója miRNS-ek kifejeződésére gyakorolt hatásának gén szintű vizsgálatával.

A kukorica alapú biodízelgyártás melléktermékeként keletkezett, különböző tisztasági fokú, állati takarmány kiegészítésére szánt glicerín frakciók állati takarmánykomponensként, szerves anyagokban és zsírsavakban dús szappanos víz talajjavítóként történő alkalmazását megelőzően a környezet-egészségügyi hatásának vizsgálata élelmiszerbiztonsági szempontból szükséges.

A kukoricaolaj és sárgazsír karcinogenezisre gyakorolt hatása alapján kívánjuk meghatározni, hogy biodízel alapanyagként való felhasználásuk megfelelő módja-e környezettudatosság fokozásának, illetve összetételük alapján biztonságosan alkalmazhatóak-e az élelmiszerláncban, az állati takarmány dúsítására vagy talajjavító komponensként.

A biodízel alapanyagok, melléktermékek újrahasznosításával kapcsolatos vizsgálatok népegészségügyi szempontból elengedhetetlenek, tekintettel arra, hogy a biodízel-glicerint fogyasztó, illetve szappanos vízzel kezelt talajról származó búzával hizlalt állatok emberi fogyasztásra kerülhetnek.

A karcinogén hatás vizsgálata az Intézetben kidolgozott rövidtávú állatkísérletes modellben történt, mely a hosszú távú vizsgálatokat váltja ki (49).

III. Anyagok és módszerek

III.1. Kísérleti állatok

A vizsgálatainkat egy konzorcium tagjaként végeztük. A konzorcium célja volt, hogy a biodízelgyártás melléktermékeiből - a vegyipari műveleti, állattenyésztési, közegészségügyi és technológiai kutatási feladatokat összehangolva - alakítson ki olyan anyagokat melyek biztonsággal újrahasznosíthatóak. Ezen multi-diszplináris projektben Intézetünk feladata a környezetegészségügyi vizsgálatok elvégzése volt.

Kísérleteinket közel 4 év alatt folytattuk le, az Intézetben kifejlesztett állatkísérletes modellben *az állatok védelméről és kíméletéről szóló 1998. évi XXVIII. törvény* rendelkezései, a Pécsi Tudományegyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottságának etikai kódexe és az Intézet vonatkozó engedélye alapján, engedély száma: BA02/2000-24/2006 (50).

Munkacsoportunk a konzorcium által előállított anyagokkal végzett kísérletekbe az adott évben Intézetünkben rendelkezésre álló beltenyésztett egértörzset vonta be. A 4 év alatt összesen három különböző egértörzssel dolgoztunk: CBA/Ca, BALB/c és AKR/J.

A CBA/Ca egértörzsek hajlamot mutatnak a különböző szarkómák, rabdioszarkóma és epidermoid karcinoma kialakulására. Számos vizsgálat igazolta, hogy mind a nőstény mind a hím egerekben jóindulatú hepatoma alakul ki a kor előrehaladtával. A BALB/c egerekben, első alkalommal az ásványi olajjal történő kezelést követően kialakuló plazmocitómát figyelték meg, később igazolódott, hogy ebben az egértörzsből számos egyéb tumor indukálható környezeti ágensekkel, és spontán tumorképződési hajlamuk is magas. Az AKR/J egerek széles körben használatosak a daganatkutatásban, akut T-sejtes leukemiára magas a hajlamuk, de számos egyéb tumor is indukálható a szerveikben (51).

Az alkalmazott három egértörzs mindegyike fokozott hajlamot mutat a daganatképződésre, a különböző karcinogén hatásokra gyakorlatilag egyformán érzékenyek, így az eredményeket az alkalmazott egértörzsek közötti különbség nem befolyásolja. A különböző egértípusokban más-más anyag hatását mértük. Egyedül a magasabb tisztasági fokú biodízel-glicerinnel esetében végeztük el a méréseinket két

különböző egértípusban is, itt az eredmények összevethetősége céljából, egyes gének expresszióját mindkét egértípus esetében meghatároztuk.

A kísérleti állatok az expozíció idejében 6 hetesek voltak, súlyuk 20-24 g között volt, a kísérlet során humánus bánásmódban részesültek.

III.2. Vizsgált anyagok

A vizsgált anyagokat Intézetünk részére a KUKK K+F Kft. (Budapest) biztosította. Az exponált állatok esetében az egerek a vizsgált anyagot, vagy a vizsgált anyaggal dúsított standard rágcsálótápot fogyasztották 3, 6 vagy 24 órán keresztül. A standard táp összetétele az I. táblázatban látható.

I. táblázat: A standard rágcsálótáp összetétele (Forrás: Szinbád Kft, Gödöllő, Eu reg. szám: HU13100039)

Energia	11MJ/kg
száraz anyag	86%
tiszta fehérje	20%
enzim fehérje	18,2%
lizin	0,97%
metionin	0,30%
cisztein	0,64%
tiszta zsír	4%
rostanyag	4,30%
kalcium	1,08%
foszfor	0,85%
nátrium	0,20%
A-vitamin	18000 NE/kg
D-vitamin	1000 NE/kg
E-vitamin	75 mg/kg

Kísérleteinket két különböző tisztasági fokú biodízel-glicerinnel kezdtük. Az összetételre vonatkozó méréseket a Solum Zrt. végezte (II. táblázat). Az első vizsgálat eredményei alapján a további kísérleteket csak a magasabb tisztasági fokú biodízel-glicerinnel végeztük.

II. táblázat: Biodízel-glicerin összetétele (Forrás: KUKK K&F Kft., Budapest)

	alacsony glicerintartalmú biodízel-glicerin	magas glicerintartalmú biodízel-glicerin
glicerin	60%	86,3%
növényi olaj	20%	5%
foszfor	4%	2%
nátrium	1%	1%
kálium	5%	2%
metanol	0,04%	0,04%
Víz, egyéb ásványi anyagok	9,96%	3,66%

A biodízel melléktermékek közül a talajkezelésre szánt szappanos víz összetétele III. táblázatban látható. A szappanos víz hatását a szappanos vízzel különböző koncentrációban kezelt talajról származó búzával végzett expozíciót követően mértük.

III. táblázat: A szappanos víz összetétele (Forrás: KUKK K&F Kft.)

glicerin	< 0,06 m/m%
zsírsav-metilészterek (palmitinsav-, sztearinsav-, olajsav-, linolsav-metilészter)	<0,1 m/m%
klorid	36,7 mg/l
foszfát	71,7 mg/l
szulfát	38,5 mg/l
nitrit	0,3 mg/l
nitrát	29,2 mg/l

A biodízel alapanyagként szánt sárgazsír és kukoricaolaj összetétele folyamatosan változik, vizsgálatainkhoz az anyagokat a QS Biodízel Kft. biztosította (Newton, USA).

III.3. Expozíció

Az expozíció minden esetben az egerek tápanyagbevitelével történt. A vizsgált anyagokat (biodízel-glicerín, kukoricaolaj, sárgaszója) 10%-ban kevertük az összetört standard rágcsálótáphoz, melyet manuálisan újrapréseltünk az etetést megelőzően. A szappanos vízzel kezelt talajról származó búzával történt kísérlet során az egerek 100%-ban a búzát fogyasztották.

A kísérletet megelőző 6 órában a standard tápot az állatoktól megvontuk, hogy a rövidtávú expozíció során megfelelő mennyiségben fogyasszák az expozíciós anyagot. Az egerek tápanyagbevitelét 3g/24 óra mennyiségben határoztuk meg, a tápfogyasztásában szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk (52). A rövid expozíciós időre tekintettel az állatok súlyváltozását nem regisztráltuk. A szilárd táp mellett az egerek csapvizet fogyasztottak.

Az expozíciót követően valamennyi vizsgált állat életben maradt. Az állatokat nyaki diszlokációval öltük el, boncolás során eltávolításra került májuk, lépük, csontvelőjük, tüdejük és mindkét veséjük. Az eltávolított szervekből az izoláláshoz szükséges mennyiséget metszettünk. A szervek többi részét -80 °C-on lefagyasztottuk.

III.4. Kísérleti csoportok (A1, A2, A3, B, C)

Az egyes vizsgálati anyagokkal végzett kísérleteinket három fő csoportra bontottuk A, B és C, az A csoporton belül 3 alcsoportot hoztunk létre A1, A2, A3.

Az A és C kísérlet során a kontroll csoportba tartozó egerek a standard rágcsálótápot fogyasztották, a B kísérlet során szappanos vizes kezelésben nem részesült talajról származó búzát.

Az A1 kísérlet során a biodízel-glicerín karcinogenezisre gyakorolt hatását vizsgáltuk két mRNS (*Nfkb1*, *Gadd45a*) génexpresszió-változásának mérésével CBA/Ca egerekben. Az expozíciós anyag és az expozíció ideje alapján 14 csoportot különítettünk el, 7 csoport nőstény és 7 csoport hím egerekből tevődött össze. Az exponált csoportok 3, 6 vagy 24 órán keresztül fogyasztották az alacsony vagy a magasabb glicerín tartalmú G-fázissal 10%-ban dúsított standard tápot. Az expozíciót követően a vizsgált gének expresszióját a májban, a lépben és a csontvelőben mértük.

Az A1 kísérletben kapott eredmények alapján az „A” kísérletsorozatot a 86,3%-os tisztaságú biodízel-glicerinnel folytattuk, és a továbbiakban a vizsgált gének expresszióját csak a májban mértük (lásd IV.1.1 és V.1.1.).

Az A2 kísérletben a 86,3%-os tisztaságú biodízel-glicerinnel történő 3, 6 és 24 órás expozíciót követően mértük a biotranszformációban szerepet játszó két gén, a *Cyp1a1* és a *Cyp2e1* kifejeződését szintén CBA/Ca egerek májában.

Az A3 kísérletben az A1 és A2 kísérletben kapott eredmények alapján a vizsgált szövet szűkítésén túl az expozíciós idő tekintetében is csökkentettük a vizsgálati csoportok számát, és csak 24 órás etetést követően mértük a karcinogenezisben szerepet játszó gének expresszióját a májban, úgy mint: *Nfkb1*, *Gadd45a*, *K-ras*, *miR-21*, *miR-27a*, *miR-34a*, *miR-93*, *miR-143*, *miR-146a*, *miR-148a*, *miR-155*, *miR-196a*, *miR-203*, *miR-205*, *miR-221*. Az A3 kísérlet BALB/c egérrel végeztük, ezért a korábban CBA/Ca egerekben vizsgált gének közül az *Nfkb1* gén expresszióváltozásának mérését ismételtelen elvégeztük (lásd IV.1.2.).

A B kísérlet során a biodízelgyártás szappanos víz melléktermékének karcinogenezisre gyakorolt hatását mértük AKR/J egértörzsben. Az egerek 8 csoportja a szappanos vízzel különböző koncentrációban kezelt talajról betakarított búzát fogyasztotta 24 órán keresztül, míg a két kontroll csoport (nőstény, hím) kezeletlen talajról származó búzát kapott ugyanennyi időn keresztül. Az expozíció hatását a májban 11 gén (*Nfkb1*, *Mapk8*, *Gadd45a*, *Cyp1a1*, *Cyp2e1*, *miR-21*, *miR-27a*, *miR-146a*, *miR-221*, *miR-223*) kifejeződésének elemzésével mértük.

A harmadik, C kísérletsorozatot BALB/c egerekkel végeztük, és mivel az egértörzs és a vizsgált gének megegyeztek az A3 kísérlet során vizsgáltakkal, így külön kontroll csoportot nem alakítottunk ki. Egy hím és egy nőstény csoport expozíciója 10%-ban sárgazsírral dúsított táppal történt, míg a másik két csoport 10%-ban kukoricaolajjal dúsított tápot fogyasztott 24 órán keresztül. A vizsgált gének (*Nfkb1*, *Gadd45a*, *K-ras*, *miR-21*, *miR-27a*, *miR-34a*, *miR-93*, *miR-143*, *miR-146a*, *miR-148a*, *miR-155*, *miR-196a*, *miR-203*, *miR-205*, *miR-221*) expresszióját szintén májban határoztuk meg.

Az egyes kísérleti csoportokban használt egértörzsekre, az expozíciós anyagra, az expozíciós időre, a vizsgált szövetekre és génekre vonatkozó részletes adatokat a IV. táblázat tartalmazza.

IV. táblázat: Kísérleti csoportok

Vizsgálati csoportok	A1		A2		A3		B		C
Exponált állatok	CBA/Ca	60%-os G-fázis	CBA/Ca	86,3%-os G-fázis	Balb/c	86,3%-os G-fázis	AKR/J	Balb/c	
Expozíciós anyagok	86,3%-os G-fázis						búza 1: kezeletlen, búza 2: 1000 l/ha, búza 3: 500 l/ha, búza 4: 250 l/ha, búza 5: 125 l/ha szappanos vízzel kezelt talajról	kukoricaolaj sárgaszir	
Expozíciós idő	3, 6 és 24 óra (ó)		3, 6 és 24 óra (ó)		24 óra		24 óra	24 óra	
Vizsgált csoportok									
nőstény (n)	1. kontroll (15)	1. kontroll (60)	1. kontroll (60)	1. kontroll (30)	1. kontroll (30)	1. kontroll (30)	1. búza 1 (10)	kontroll: A/3	
	2. 60%-os G-fázis, 3 ó (15)	2. 86,3%-os G-fázis, 3 ó (60)	2. 86,3%-os G-fázis, 3 ó (60)	2. 86,3%-os G-fázis (30)	2. 86,3%-os G-fázis (30)	2. 86,3%-os G-fázis (30)	2. búza 2 (10)	1. kukoricaolaj (24)	
	3. 60%-os G-fázis, 6 ó (15)	3. 86,3%-os G-fázis, 6 ó (60)	3. 86,3%-os G-fázis, 6 ó (60)	3. 86,3%-os G-fázis (30)	3. 86,3%-os G-fázis (30)	3. 86,3%-os G-fázis (30)	3. búza 3 (10)	2. sárgaszir (24)	
	4. 60%-os G-fázis, 24 ó (15)	4. 86,3%-os G-fázis, 24 ó (60)	4. 86,3%-os G-fázis, 24 ó (60)	4. 86,3%-os G-fázis (30)	4. 86,3%-os G-fázis (30)	4. 86,3%-os G-fázis (30)	4. búza 4 (10)		
	5. 86,3%-os G-fázis, 3 ó (15)			5. kontroll (60)	5. kontroll (60)	5. kontroll (60)	5. búza 5 (10)		
	6. 86,3%-os G-fázis, 6 ó (15)								
	7. 86,3%-os G-fázis, 24 ó (15)								
hím (n)	8. kontroll (15)						6. búza 1 (10)	kontroll: A/3	
	9. 60%-os G-fázis, 3 ó (15)	6. 86,3%-os G-fázis, 3 ó (60)	6. 86,3%-os G-fázis, 3 ó (60)	6. 86,3%-os G-fázis (30)	6. 86,3%-os G-fázis (30)	6. 86,3%-os G-fázis (30)	7. búza 2 (10)	3. kukoricaolaj (24)	
	10. 60%-os G-fázis, 6 ó (15)	7. 86,3%-os G-fázis, 6 ó (60)	7. 86,3%-os G-fázis, 6 ó (60)	7. 86,3%-os G-fázis (30)	7. 86,3%-os G-fázis (30)	7. 86,3%-os G-fázis (30)	8. búza 3 (10)	4. sárgaszir (24)	
	11. 60%-os G-fázis, 24 ó (15)	8. 86,3%-os G-fázis, 24 ó (60)	8. 86,3%-os G-fázis, 24 ó (60)	8. 86,3%-os G-fázis (30)	8. 86,3%-os G-fázis (30)	8. 86,3%-os G-fázis (30)	9. búza 4 (10)		
	12. 86,3%-os G-fázis, 3 ó (15)						10. búza 5 (10)		
	13. 86,3%-os G-fázis, 6 ó (15)								
	14. 86,3%-os G-fázis, 24 ó (15)								
Vizsgált szervek	máj, lép, csontvelő	máj	máj	máj	máj	máj	máj	máj	
Vizsgált gének	<i>Gadd45a</i> , <i>Nfkb1</i>	<i>Cyp11a1</i> , <i>Cyp2e1</i>	<i>Cyp11a1</i> , <i>Cyp2e1</i>	<i>Cyp11a1</i> , <i>Cyp2e1</i>	<i>Cyp11a1</i> , <i>Cyp2e1</i>	<i>Nfkb1</i> , <i>Mapk8</i> , <i>K-ras</i> , <i>miR-21</i> , <i>miR-27a</i> , <i>miR-34a</i> , <i>miR-93</i> , <i>miR-143</i> , <i>miR-146a</i> , <i>miR-148a</i> , <i>miR-155</i> , <i>miR-196a</i> , <i>miR-203</i> , <i>miR-205</i> , <i>miR-221</i>	<i>Nfkb1</i> , <i>Mapk8</i> , <i>K-ras</i> , <i>miR-21</i> , <i>miR-27a</i> , <i>miR-34a</i> , <i>miR-93</i> , <i>miR-143</i> , <i>miR-146a</i> , <i>miR-148a</i> , <i>miR-155</i> , <i>miR-196a</i> , <i>miR-203</i> , <i>miR-205</i> , <i>miR-221</i>		
Belső kontroll	<i>Hprt</i>	<i>Hprt</i>	<i>Hprt</i>	<i>Hprt</i>	<i>Hprt</i> , 5S RNS	<i>Hprt</i> , 5S RNS	<i>Hprt</i> , 5S RNS	<i>Hprt</i> , 5S RNS	

III.5. Génexpresszió vizsgálata

A génexpresszió meghatározása során a Roche (Berlin, Németország) cég által biztosított berendezéseket és kitéket használtuk. A vizsgált gének kiválasztása az adott évben Intézetünkben rendelkezésre álló mRNS és miRNS primerekből történt.

A vizsgált szervekből kimetszett szövetdarabokat homogenizáltuk. Teljes RNS izolálást nukleinsav izoláló automata (Magna Pure Compact System) segítségével végeztük el.

Az izolált RNS mennyiségét és minőségét mind a miRNS, mind a mRNS esetében abszorpciós fotometriával ellenőriztük 260/280 nm-en, az $A_{260}/A_{280} > 1,9$ mintákat használtuk a további vizsgálathoz.

Az így nyert RNS-t reverz transzkripció során DNS-re írtuk át, majd polimeráz láncreakció (PCR) során a vizsgált DNS szakasz sokszorozását végeztük el, LightCycler 2.0 PCR Carousel alapú, vagy a LightCycler 480 PCR készülékben.

A mRNS-ek génexpresszióját hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (*Hprt*), a miRNS-ekét az 5S RNS alegységhez, mint belső kontrollhoz viszonyítva határoztuk meg.

A génexpresszió szintjét a belső kontrollra normalizált értékek alapján határoztuk meg relatív kvantifikációval, $2^{-\Delta C_p}$ számításával, Exor 4 szoftver segítségével.

III.5.1. Az A1 és az A2 kísérletben alkalmazott módszerek

A 60% és 86,3%-os biodízel-glicerinnel végzett első két kísérletünk során (A1 és A2) ugyanazon kitéket alkalmaztunk, ugyanazon PCR beállításokkal.

A teljes RNS izoláláshoz Magna Pure Compact Nucleid Acid Isolation Kitet alkalmaztunk. A vizsgált szövet 100 μ l-éhez pipetázással 300 μ l MagNa Pure LC DNA Isolation-Kit-Lysis/Binding Buffer Refil oldatot kevertünk. A mintát az izoláló automatába helyeztük, a 12 lyukú reakciós patronnal a protokoll szerint végeztük az RNS izolálást.

Ezt követően LightCycler RNA Amplification Kit SYBR Green I használatával egy lépésben végeztük a reverz transzkripciót és a PCR amplifikációt, mely a vizsgálat megbízhatóságát nagymértékben növelte.

A felhasználói útmutató szerint 1 μ l minta RNS-hez 2 μ l primer mixet (forward és reverz) kevertünk, a PCR reakciós elegy további összetétele: LightCycler RT-PCR

Reaction Mix SYBR Green: 4 µl; LightCycler RT-PCR Enzyme Mix: 0,4 µl; Resolution solution: 3 µl; MgCl₂: 1,6 µl; víz: 8 µl.

A PCR reakció LightCycler Carousel-alapú rendszerben, üvegcapillárisokban történt, az alábbi beállításokkal:

1. Reverz transzkripció: 1 ciklus, 55°C, 10 perc
2. Denaturáció: 1 ciklus 95°C, 30 másodperc
 - Amplifikáció: 45 ciklusdenaturáció: 95°C, 10 másodperc
 - annealing: 55°C, 15 másodperc
 - extenzió: 72°C, 4 másodperc, egycsatornás detektálási mód
3. Olvadási görbék: 1 ciklus
 - denaturáció: 95°C
 - annealing: 65°C, 30 másodperc
 - olvadás: 95°C, folyamatos detektálási mód

A detektálás a SYBR Green fluoreszcens nukleotid jelölőanyaghoz igazítva 530 nm-en történt.

III.5.2. Az A3 és a C kísérletben alkalmazott módszerek

A 86,3%-os biodízel-glicerinnel, a kukoricaolajjal és a sárgaszírral történt expozíciót követően a miRNS-ek és a velük párhuzamosan vizsgált mRNS-ek izolálása során ugyanazt a protokollt követtük.

A MagNa Pure Compact nukleinsav izoláló rendszerben két kit segítségével a teljes RNS izolálást követően a cDNS-re történő átírás is megtörtént.

A High Pure miRNA Isolation Kit segítségével 150 µl Binding Bufferrel és Binding Enhancerrel lizált mintából többszöri mosás, centrifugálást követően Elution Bufferrel teljes RNS-t izoláltunk, a kit „egy elúciós oszlopos protokollra” vonatkozó útmutatója szerint. A cDNA Synthesis System AMV reverz transzkriptázának segítségével a teljes RNS-t cDNS-re írtuk át.

A PCR reakciót a miRNS-ek génexpresszió mérése során LightCycler 480 PCR rendszerben, 96 lyukú pannellel végeztük. Az izolálás során 5 µl minta cDNS-hez 1 µl forward és 1 µl reverz primert adtunk, az elegy tartalmazott továbbá 10 µl LightCycler

480 SYBR Green I Master Mixet és 3 µl vizet. A PCR beállításai a minta és a primerek érzékenységéhez igazodva az alábbiak voltak:

1. Preinkubáció: 1 ciklus 95°C, 10 perc
2. Amplifikáció: 65 ciklus
 - denaturáció: 95°C, 10 másodperc
 - annealing: 52°C, 20 másodperc
 - extenzió: 72°C, 15 másodperc, egycsatornás detektálási mód
3. Olvadási görbék: 1 ciklus
 - denaturáció: 95°C, 5 másodperc
 - annealing: 65°C, 30 másodperc
 - olvadás: 97°C, folyamatos detektálási mód

Az *Nfkb1*, *Mapk8* és *K-ras* gének expresszióját LightCycler Carousel-alapú rendszerben, üvegapillárisokban végzett PCR reakció során mértük.

A PCR reakciós elegyben 5 µl minta cDNS-t, 1 µl forward és 1 µl reverz primert, 1 µl UPL próbát és 4 µl LightCycler 480 SYBR Green I Master Mixet kevertünk össze 9 µl vízzel.

A PCR beállításai a következők voltak:

1. Preinkubáció: 1 ciklus 95°C, 10 perc
2. Amplifikáció: 45 ciklus
 - denaturáció: 95°C, 10 másodperc
 - annealing: 55°C, 40 másodperc
 - extenzió: 72°C, 1 másodperc, egycsatornás detektálási mód
3. Olvadási görbék: 1 ciklus
 - denaturáció: 95°C, 1 másodperc
 - annealing: 65°C, 30 másodperc
 - olvadás: 97°C, folyamatos detektálási mód

A detektálás a miRNS-ek és mRNS-ek esetében is SYBR Green fluoreszcens nukleotid jelölőanyaggal történt, 530 nm hullámhosszon.

III.5.3. A B kísérletben alkalmazott módszerek

A búzával végzett kísérleteink során az RNS izolálása az előzőekben írtakhoz hasonlóan High Pure miRNA Isolation Kit egy oszlopos protokollja szerint történt, a cDNS-re íráshoz a Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kitet használtuk, melyben az átírtást a transkriptor reverz transzkriptáz nevű enzim végezte.

Ebben a kísérletsorozatban a miRNS és a mRNS génexpressziós profilját is LightCycler 480 PCR rendszerben végzett PCR reakció segítségével határoztuk meg, a reakciós elegy összetétele megegyezett, csak a PCR beállítás paramétereiben voltak eltérések.

A reakciós elegyben az 5 µl minta cDNS és a 2 µl primer mix (forward és reverz) mellett 10 µl LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix és 3 µl víz volt.

A PCR beállításai az alábbiak voltak a miRNS gének vizsgálata során:

1. Preinkubáció: 1 ciklus 95°C, 10 perc
2. Amplifikáció: 45 ciklus
 - denaturáció: 95°C, 10 másodperc
 - annealing: 60°C, 1 perc
 - extenzió: 72°C, 1 másodperc, egycsatornás detektálási mód
3. Olvadási görbék: 1 ciklus
 - denaturáció: 95°C, 5 másodperc
 - annealing: 65°C, 30 másodperc
 - olvadás: 97°C, 30 másodperc, folyamatos detektálási mód

A PCR beállítások néhány hőfok tekintetében az *Nfkb1*, *Mapk8* és *Gadd45a* gének expressziós profil meghatározása során eltértek:

1. Preinkubáció: 1 ciklus 95°C, 10 perc
2. Amplifikáció: 45 ciklus
 - denaturáció: 95°C, 10 másodperc
 - annealing: 55°C, 20 másodperc
 - extenzió: 72°C, 1 másodperc, egycsatornás detektálási mód
3. Olvadási görbék: 1 ciklus
 - denaturáció: 95°C, 5 másodperc
 - annealing: 65°C, 30 másodperc
 - olvadás: 95°C, 30 másodperc, folyamatos detektálási mód

A detektálás itt is 530 nm hullámhosszon történt, SYBR Green fluoreszcens nukleotid jelölőanyaggal.

III.5.4. A vizsgált gének primerei

A mRNS izoláláshoz felhasznált próbák és primerek a Roche adatbázis (www.applied-science.roche.com) alapján illetve a TIB Molbiol, ADR Logistics, Roche Warehouse (Budapest) adatai alapján a következők voltak:

<i>Cyp11a1</i>	forward:	5'-CTACAGGACATTTGAGAAGGGC-3'	
	reverz:	5'-AGGTCCAAAACAATCGTGATGAC-3'	
<i>Cyp2e1</i>	forward:	5'-CGTTGCCTTGCTTGTCTGGA-3'	
	reverz:	5'-AAGAAAGGAATTGGGAAAGGTCC-3'	
<i>Gadd45a</i>	forward:	5'-CTGCCTCCTGGTCACGAA-3'	
	reverz:	5'-TTGCCTCTGCTCTCTTCACA-3'	
<i>Hprt</i>	forward:	5'-TCCTCCTCAGACCGCTTTT-3'	
	reverz:	5'-CCTGGTTCATCATCGCTAATC-3'	Upl 95
<i>K-ras</i>	forward:	5'-TGTGGATGAGTATGACCCTACG-3'	
	reverz:	5'-CCCTCATTGCACTGTACTCCT-3'	Upl 62
<i>Mapk8</i>	forward:	5'-AACTGTTCCCCGATGTGCT-3'	
	reverz:	5'-TCTCTTGCTGACTGGCTTT-3'	Upl 33
<i>Nfkb1</i>	forward:	5'-CACTGCTCAGGTCCACTGTC-3'	
	reverz:	5'-CTGTCACTATCCCGGAGT-3'	Upl 10
<i>miR-21</i>	forward:	5'-GCTTATCAGACTGATGTTGACTG-3'	
	reverz:	5'-CAGCCCATCGACTGGTG-3'	
<i>miR-27a</i>	forward:	5'-GCAGGGCTTAGCTGCTTG-3'	
	reverz:	5'-GGCGGAACTTAGCCACTGT-3'	
<i>miR-34a</i>	forward:	5'-TGGCAGTGTCTTAGCTGGTTG-3'	
	reverz:	5'-GGCAGTATACTTGCTGATTGCTT-3'	
<i>miR-93</i>	forward:	5'-AAGTGCTGTTTCGTGCAGGT-3'	
	reverz:	5'-CTCGGGAAGTGCTAGCTCA-3'	
<i>miR-143</i>	forward:	5'-TGAGGTGCAGTGCTGCATC-3'	
	reverz:	5'-GCTACAGTGCTTCATCTCAGACTC-3'	

<i>miR-146a</i>	forward:	5'-TTGAGAACTGAATTCCATGG-3'
	reverz:	5'-GCTGAAGAACTGAATTCAGAG-3'
<i>miR-148a</i>	forward:	5'-GAGGAAGACAGCACGTTTGGT-3'
	reverz:	5'-AAAGGCGCAGCGACGT-3'
<i>miR-155</i>	forward:	5'-TTAATGCTAATCGTGATAGGG-3'
	reverz:	5'-GCTAATATGTAGGAGTCAGTTGGA-3'
<i>miR-196a</i>	forward:	5'-TAGGTAGTTTCATGTTGTTGGG-3'
	reverz:	5'-ATCGGGTGGTTTAATGTTG-3'
<i>miR-203</i>	forward:	5'-TCCAGTGGTTCTTAACAGTTCA-3'
	reverz:	5'-GGTCTAGTGGTCCTAACATTTTC-3'
<i>miR-205</i>	forward:	5'-CCTTCATTCCACCGGAGT-3'
	reverz:	5'-GAACTTCACTCCACTGAAATCTG-3'
<i>miR-221</i>	forward:	5'-CCTGGCATAACAATGTAGATTTCTG-3'
	reverz:	5'-AAACCCAGCAGACAATGTAGCT-3'
<i>miR-223</i>	forward:	5'-CCGTGTATTTGACAAGCTGAGT-3'
	reverz:	5'-TGGGGTATTTGACAACTGACA-3'

III.6. Eredmények értékelésének statisztikai módszerei

Minden PCR reakciót három külön futási ciklusban végeztünk el, az így kapott technikai replikátumokat átlagoltuk.

A statisztikai vizsgálatokat STATA IC 11 szoftver segítségével, ANOVA analízissel, vagy két mintás t-próbával végeztük, szignifikancia szintet minden esetben: $p < 0,05$ -ben határoztuk meg.

A miRNS expresszió mérések eredményének interpretálása során, a fals pozitív eredmények elkerülése érdekében a kutatók különböző módszereket alkalmaznak. Egyesek küszöbszintet határoznak meg, melyet a miRNS expresszióknak el kell érnie ahhoz, hogy az adott vizsgálatban figyelembevételre kerüljön, míg mások a mért kópiaszámhoz meghatározott egység hozzáadásával küszöbölik ki az alacsony expressziós értékkel végzett statisztikai vizsgálatból adódó esetleges fals eredményt (53). A már jól ismert onkomirek, tumorszupresszor miRNS-ek esetében a normál és tumoros szövetek között többszörös expresszió különbségeket írtak le. Ez egyes

miRNS-ek esetében csak kétszeres, de sok esetben akár több tízszeres eltérést jelent (54-57).

A fals pozitív eredmények elkerülése érdekében vizsgálatainkban a miRNS-ek esetében $p < 0,05$ szignifikancia szintet mutató eltérések közül a legalább háromszoros expresszióváltozást értékeltük a karcinogenezisre gyakorolt jelentős hatásként.

IV. Eredmények

IV.1. Biodízel-glicerinnel végzett vizsgálatok eredményei

IV.1.1. Az apoptózis/antiapoptózis folyamatára gyakorolt hatás biodízel-glicerinnel történt expozíciót követően (A1 kísérlet)

Különböző tisztasági fokú glicerín frakciók fogyasztását követően az apoptózis szabályozásában részt vevő gének expressziója a vizsgált csoportokban számos esetben mutatott eltérést a kontroll állatokban mért értékekhez képest (5. és 6. ábra).

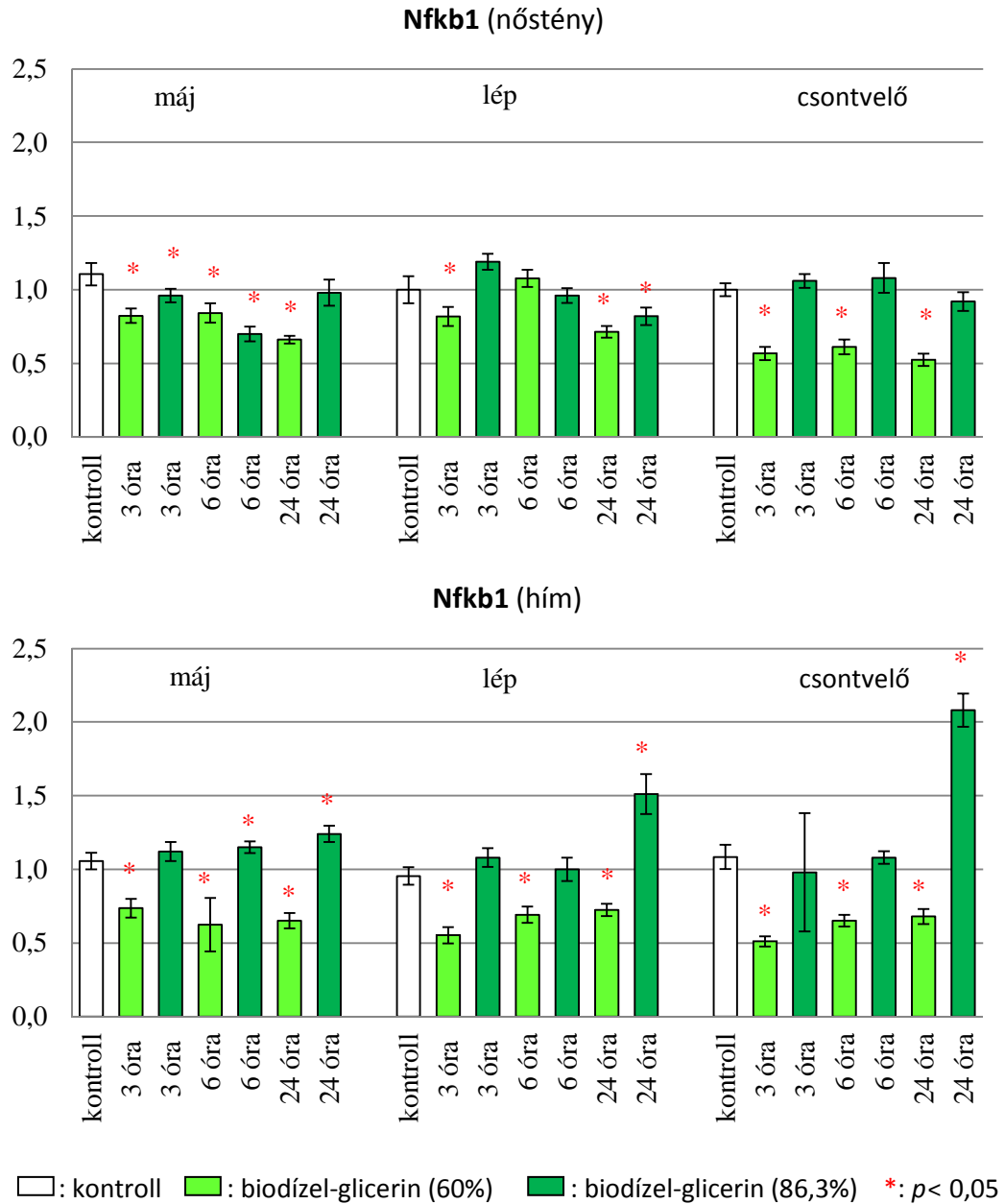
A folyamatosan standard rágcsálótápot fogyasztó egerekben mért expresszióhoz képest a 60% glicerín tartalmú biodízel-glicerinnel dúsított tápot fogyasztó nőstény egereknél az *Nfkb1* szignifikáns expressziócsökkenését tapasztaltunk a májban és a csontvelőben 3, 6 és 24 órás expozíciót követően, míg a lépben a 6 órás időpontban mért expresszió eltérés nem bizonyult szignifikánsnak, de a 3 és 24 órás etetést követően itt is csökkent expressziót mértünk. A hím egerekben az *Nfkb1* szintje valamennyi szövetben csökkent expressziót mutatott, valamennyi expozíciós időt követően.

A *Gadd45a* nőstény egereknél kevesebb esetben mutatott expressziócsökkenést 60%-os biodízel-glicerín diéta után, mint az *Nfkb1*: a lépben kifejeződése nem tért el szignifikánsan a kontroll csoportban mérthez képest, a májban csak 24 órás expozíció után mértünk csökkent expressziót. A csontvelőben az *Nfkb1*-el párhuzamosan a *Gadd45a* szintje is alacsonyabb volt minden expozíciós időt követően.

Hímekben a *Gadd45a* szintje - az *Nfkb1* expressziójával megegyezően - csökkent valamennyi vizsgált szövetben, egyetlen különbség mutatkozott 60%-os biodízel-glicerinnel dúsított táp fogyasztását követően: a lépben 6 órás etetést követően a génextpresszió a *Gadd45a* esetében nem mutatott eltérést a kontrollhoz viszonyítva, míg az *Nfkb1* szintje itt is szignifikánsan csökkent.

A 86,3%-os tisztaságú biodízel-glicerinnel dúsított tápot fogyasztó egércsoportokban már nemcsak csökkent expressziót figyelhettünk meg a két vizsgált gén tekintetében, hanem egy-egy esetben szintjük növekedett is. Az *Nfkb1* szintje csökkent expressziót mutatott nőstények májában 3 és 6 órás, lépében 24 órás expozíciót követően. A *Gadd45a* szintje szignifikánsan csökkent a kontrollhoz képest a csontvelőben

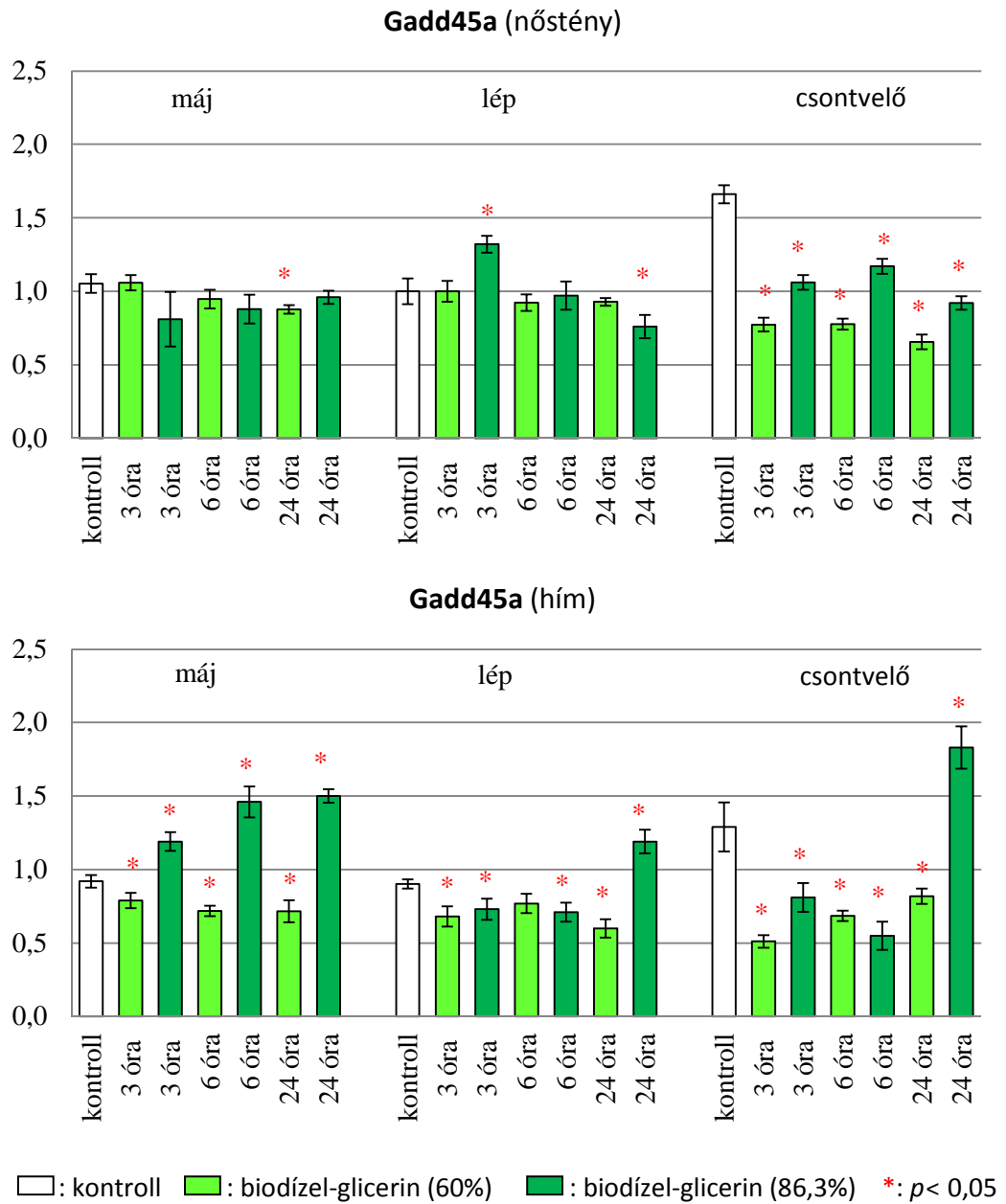
valamennyi időpontban és a lépben 24 órás etetést követően, míg 3 órás expozíció után a lépben fokozott expressziót mutatott.



5. ábra: Nfkb1 gén kifejeződése nőstény és hím egerek különböző szerveiben, Hprt belső kontrollhoz viszonyítva két különböző tisztasági fokú biodízel-glicerinnel dúsított táppal végzett 3, 6 illetve 24 órás expozíció követően.

Hím egerekben az *Nfkb1* mennyisége növekedett a lépben és a csontvelőben 24 órás, a májban 6 és 24 órás expozíció követően. A *Gadd45a* szintje csökkent a lépben és a

csontvelőben 3 és 6 órás expozíciót követően, míg 24 óra elteltével ugyanezen szövetekben fokozott expressziót mutatott. A májban minden időpontban fokozott expressziót találtunk.



6. ábra: *Gadd45a* gén kifejeződése nőstény és hím egerek különböző szerveiben, *Hprt* belső kontrollhoz viszonyítva két különböző tisztasági fokú biodízel-glicerinnel dúsított táppal végzett 3, 6 illetve 24 órás expozíciót követően.

Eredményeink szerint a hím és a nőstény egerek májában és lépében a 60%-os biodízel-glicerinnel történő fogyasztását követően különbségek voltak a *Gadd45a* expressziójának változásában. Hímek májában valamennyi vizsgált időpontban csökkent a szintje, míg nőstényeknél csak 24 órás expozíciót követően figyeltünk meg csökkent expressziót.

Nőstények lépében nem változott a *Gadd45a* kifejeződése, míg hímeknél 3 és 24 órás expozíciót követően is csökkent.

A 86,3%-os biodízel-glicerinnel történő fogyasztását követően a két nemben ennél jóval több eltérés mutatkozott. Az *Nfkb1* nőstények májában és lépében expressziócsökkenést mutatott, hímeknél kifejeződése nőtt a hosszabb expozíciós időt követően mindkét szervben. A *Gadd45a* szintje nőstények lépében rövidebb expozíció után emelkedett, majd a kontroll állatokban mért szintre esett vissza 6 órás expozíciót követően, 24 órás etetés után szintje szignifikánsan csökkent, míg hímeknél 3 és 6 óra után csökkent és 24 óra elteltével fokozott expressziót mutatott. A csontvelőben 24 órás etetés után mutatott eltérést a *Gadd45a* expressziója a nemek között, nőstényekben csökkent, hímegekben nőtt a szintje.

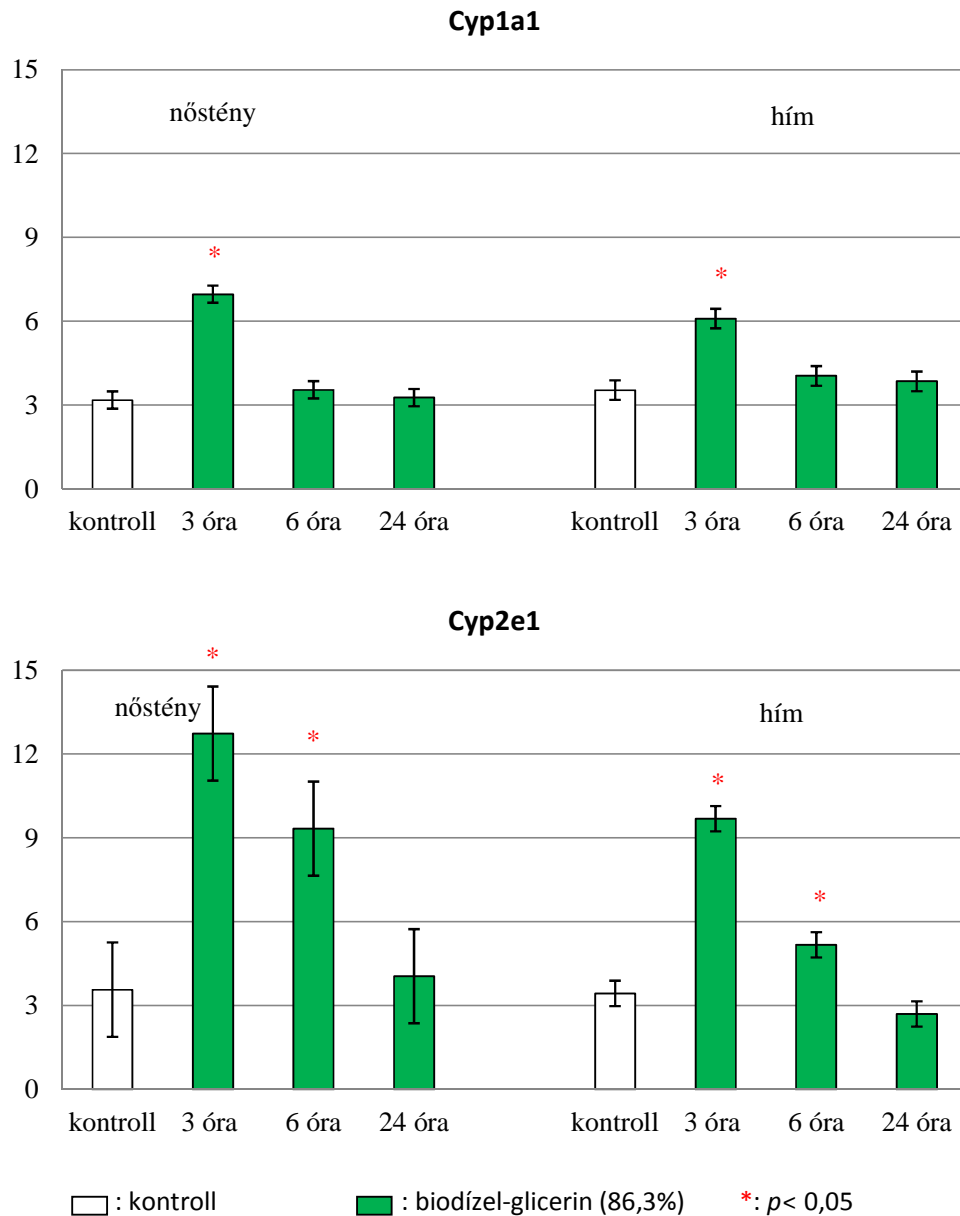
Az *Nfkb1* és a *Gadd45a* expresszióváltozása párhuzamosságot mutatott a 60%-os biodízel-glicerinnel történő fogyasztását követően nőstények csontvelőjében, és a hímek valamennyi szövetében. A 86,3%-os biodízel-glicerinnel dúsított táp fogyasztását követően a génexpresszió-változásában a párhuzamosság már csak a hímegekben volt megfigyelhető.

Az A1 vizsgálat során kapott eredményeink alapján a 60%-os biodízel-glicerinnel nem folytattunk további vizsgálatot, mivel káros hatását nem tudtuk kizárni. A dolgozat további részében amennyiben külön jelölése nem történik, biodízel-glicerinnel a magasabb tisztasági fokú G-fázis értendő.

Az első kísérletsorozatban kapott eredmények alapján a gének expressziójának változása a májat jellemezte leginkább, így további kísérleteinkben a génexpresszió méréseket a májban végeztük el, mint a metanol metabolizmusában legfontosabb szerepet játszó szervben (58).

IV.1.2. A biotranszformációra gyakorolt hatás biodízel-glicerinnel fogyasztását követően (A2 kísérlet)

A biodízel-glicerinnel dúsított tápot fogyasztó egerek májában mind a *Cyp1a1*, mind a *Cyp2e1* gén expressziója szignifikánsan emelkedett mindkét nemben 3 órás expozíciót követően a kontroll egerekben mért értékekhez képest.



8. ábra: *Cyp1a1* és *Cyp2e1* gének kifejeződése nőstény és hím egerek májában, *Hprt* belső kontrollhoz viszonyítva, biodízel-glicerinnel dúsított táppal végzett 3, 6 illetve 24 órás expozíciót követően.

A *Cyp2e1* expresszió fokozódás jelentősebb volt mindkét nemben, négyszeres emelkedést mértünk nőstény egerekben, és háromszoros emelkedést a hímeknél. A 6 órás expozíciót követően a *Cyp1a1* kifejeződése megegyezett a kontroll állatokban mérttel, a *Cyp2e1* kifejeződése is csökkenő tendenciát mutatott, de még mindig szignifikáns expresszió fokozódás volt látható mind a nőstény, mind a hím egerekben.

Ahogy az a 8. ábrán is látható a gének kifejeződése 24 óra után nem tért el a standard rágsálótápot fogyasztó egerektől. A biotranszformációban szerepet játszó gének expressziója párhuzamosan változott, bár különböző érzékenységet mutattak, a nemek között nem figyeltünk meg különbséget.

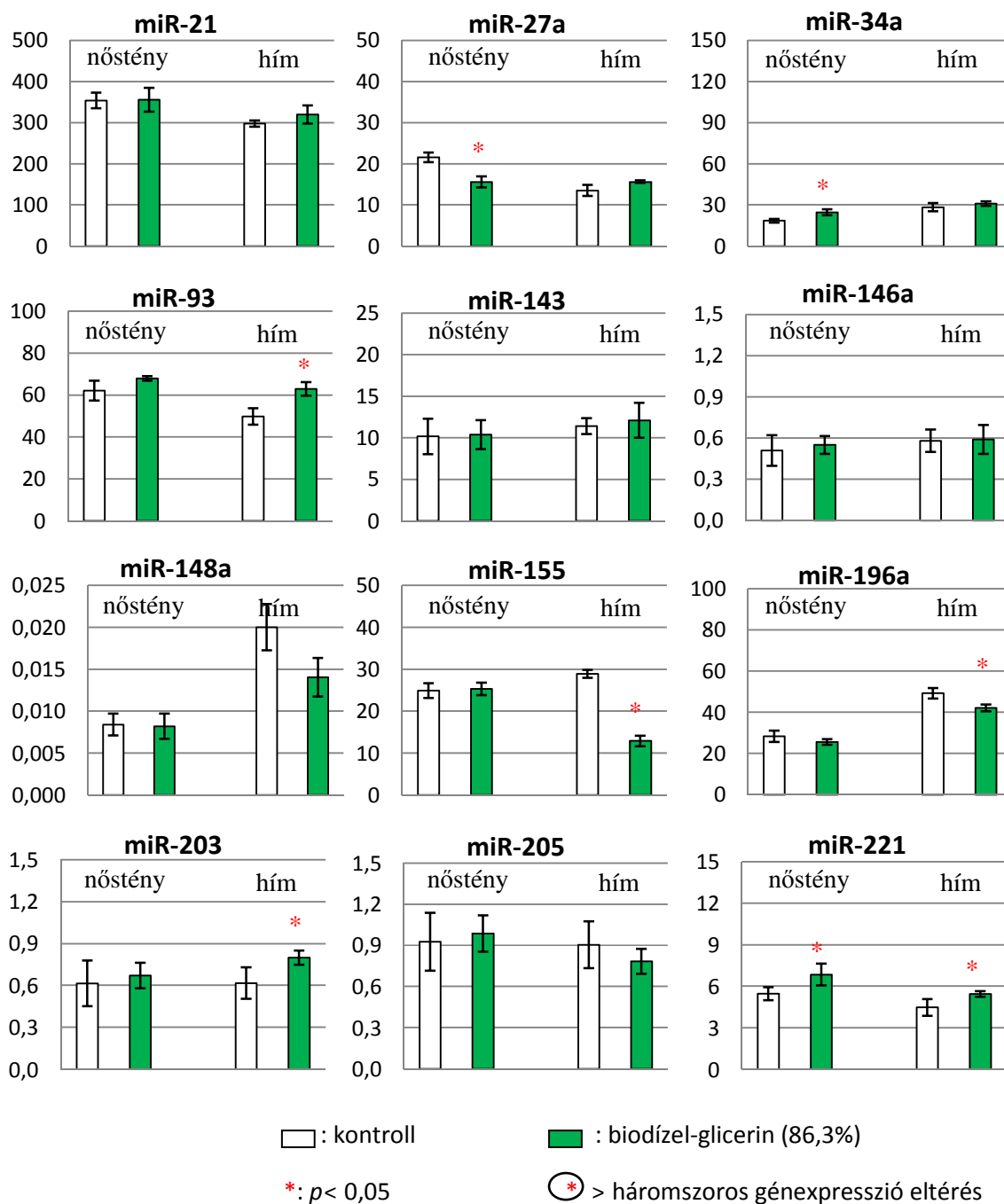
Az expozíciós idő szempontjából az A1 és A2 kísérletben kapott eredmények alapján a vizsgálati csoportok számát csökkentettük. Kísérleteink szerint a kontroll és az exponált állatokban a génexpresszió eltérés 24 órás expozíciót követően nem volt észlelhető, így feltételezhető, hogy a 3 és 6 órás expozíciót követően mért génexpresszió-eltérések az anyag biotranszformációra gyakorolt átmeneti hatásának tulajdoníthatóak. Az anyag tartós expozíciót követő hatása tehát a 24 órás eredményekkel korellál, ezért 3 és 6 órás expozíciós csoportokat a továbbiakban nem alakítottunk ki.

IV.1.3. Az onkogén és tumorszuppresszor miRNS-ek és mRNS-ek kifejeződésére gyakorolt hatás biodízel-glicerinnel történő fogyasztását követően (A3 kísérlet)

Az A2 kísérletben kapott eredmények más oldalról történő megerősítése céljából - a munkacsoport technológiai fejlődése során - további vizsgálatok elvégzését tartottuk szükségesnek, ezért a molekuláris epidemiológiai kutatások fókuszpontjában lévő miRNS-ek vizsgálatát végeztük el.

A miRNS-ek kifejeződését a mRNS-ek kifejeződésével kívántuk összehasonlítani, ezért az expozíciót követően az *Nfkb1* expresszióját megmértük ezen kísérletben alkalmazott egerek májában is. Az ismételt mérés célja továbbá annak vizsgálata is volt, hogy expressziójuk a különböző egértörzsekben ugyanazon expozíciót követően mutat-e eltérést. A kísérletbe bevontunk egy onkogént (*K-ras*) is, az eredmények alátámasztása érdekében.

A biodízel-glicerinnel dúsított tápot fogyasztó egerekben vizsgált 12 miRNS tekintetében az expresszióváltozások nemenként eltérőek voltak (9. ábra).



9. ábra: miRNS-ek kifejeződése hím és nőstény egerek májában, 5S RNS belső kontrollhoz viszonyítva, biodízel-glicerinnel dúsított táppal végzett 24 órás expozíciót követően.

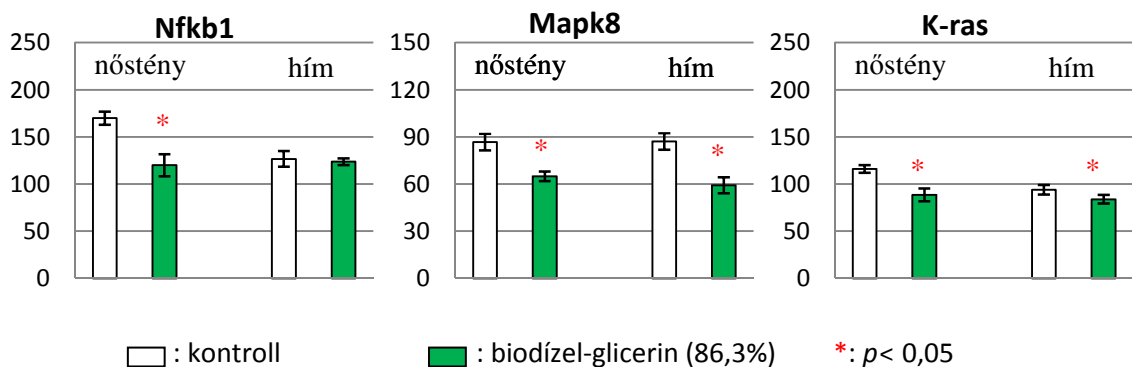
A nőstényeknél a *miR-27a* csökkent, a *miR-34a* és a *miR-221* emelkedett kifejeződést mutatott. A *miR-221* expressziója hím egerekben szintén fokozott volt, a nőstényeknél változó expressziót mutató másik két miRNS tekintetében azonban hímeiknél nem

mértünk szignifikáns eltérést a kontroll egerekben mértekhez képest. Nőtt azonban a *miR-93* és a *miR-203* mennyisége, míg csökkent a *miR-155* és a *miR-196a* szintje hím egerekben a 24 órás expozíció után.

Egyik nemben sem észleltünk szignifikáns expresszió eltérést a *miR-21*, a *miR-143*, a *miR-146a*, a *miR-148a* és a *miR-205* expressziójában a kontroll és az exponált csoportok között. A miRNS-ek expressziós mintázata így a vizsgált gének felében volt eltérő valamelyik nemben.

Az expressziócsökkenés vagy növekedés a miRNS-ek tekintetében azonban egyik nemben sem érte el a háromszoros szintet, egyik gén esetében sem.

A mRNS-ek tekintetében a nemek között egyedül az *Nfkb1* esetében tapasztaltunk eltérő expresszióváltozást. A hím egerekben nem tért el az expressziós szintje a kontrollhoz képest, nőstényekben viszont szignifikánsan csökkent. A *Mapk8* és a *K-ras* expressziója mindkét nemben csökkent a biodízel-glicerinnel dúsított táp fogyasztását követően (10. ábra).



10. ábra: *Nfkb1*, *Mapk8*, *K-ras* gének kifejeződése nőstény és hím egerek májában, *Hprt* belső kontrollhoz viszonyítva, biodízel-glicerinnel dúsított táppal végzett 24 órás expozíció követően.

Az *Nfkb1* nőstényekben párhuzamos expresszióváltozást mutatott a *Mapk8* és a *K-ras* génekkel és a *miR-27a* változásával, míg a *miR-34a* és a *miR-221* az *Nfkb1* csökkent kifejeződésével ellentétesen növekvő expressziót mutatott.

A hímelekben az *Nfkb1* szintje ugyan nem változott, de a *Mapk8* és a *K-ras* csökkent expressziójával a *miR-155* és *miR-196a* szintje párhuzamosan csökkent, míg a *miR-93*, a *miR-203* és a *miR-221* szintje ellentétesen nőtt.

IV.2. Szappanos vízzel kezelt talajon termelt búzával történt expozíció hatása az apoptózis/antiapoptózis szabályozására, az onkogén és tumorszuppresszor miRNS-ek kifejeződésére és a biotranszformációra (B kísérlet)

A biodízel szappanos víz melléktermékével végzett vizsgálatok során az esetleges szennyezőként visszamaradt metanol apoptózisra, biotranszformációra gyakorolt hatását kívántuk meghatározni a választott mRNS-ek és miRNS-ek expresszió eltérése alapján.

A szappanos vízzel különböző koncentrációban kezelt talajról betakarított búza 24 órás fogyasztását követően nőstény és hím egerek májában a vizsgált miRNS-ek és mRNS-ek expressziója csak néhány esetben mutatott eltérést a kontroll állatokban mérthez képest (11. és 12. ábra).

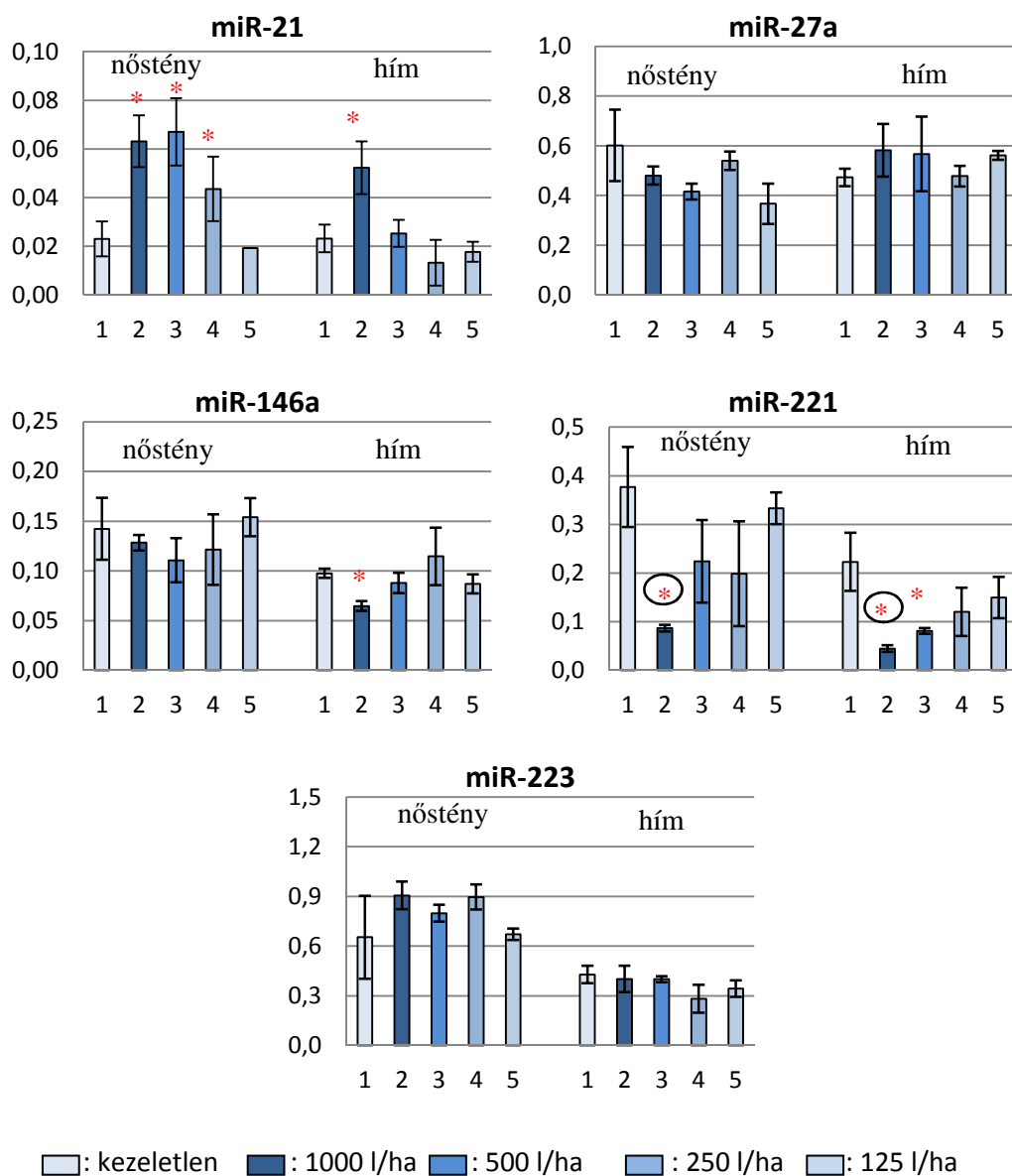
A kezeletlen talajról származó búzát fogyasztó egerekhez képest azon egerekben figyelhettük meg a legtöbb expresszióváltozást, melyek az 1000 l/ha (liter/hektár) szappanos vízzel kezelt talajon termelt búzát fogyasztották. Itt a vizsgált öt miRNS-ből három mutatott eltérést.

Hímekben szignifikáns növekedést mutatott a *miR-21* kifejeződése, azonban az expresszióváltozás nem érte el a háromszoros szintet, a *miR-146a* szignifikáns expressziócsökkenést mutatott, de a csökkenés kevesebb, mint 50%-os volt. A *miR-221* szintje azonban több mint harmadára csökkent mindkét nemben. Nem változott szignifikánsan a *miR-27a* és a *miR-223* expressziós mintázata egyik nemben sem.

Az 500 l/ha szappanos vízzel történt talajkezelést követően a miRNS-ek kifejeződésében a *miR-221* szintje hímekben szignifikánsan csökkent, de a csökkenés alig 60%-os volt.

A *miR-21* szintje szignifikánsan emelkedett volt nőstényekben 500 l/ha és 250 l/ha szappanos vízzel történt talajkezelést követően is, az emelkedés nem érte el a háromszoros szintet.

A miRNS-ek szintje nem tért el egy esetben sem szignifikánsan a 125 l/ha koncentrációban kezelt talajról származó búzával történt expozíciót követően a kezeletlen talajról származó búza fogyasztását követően mértetekhez képest.



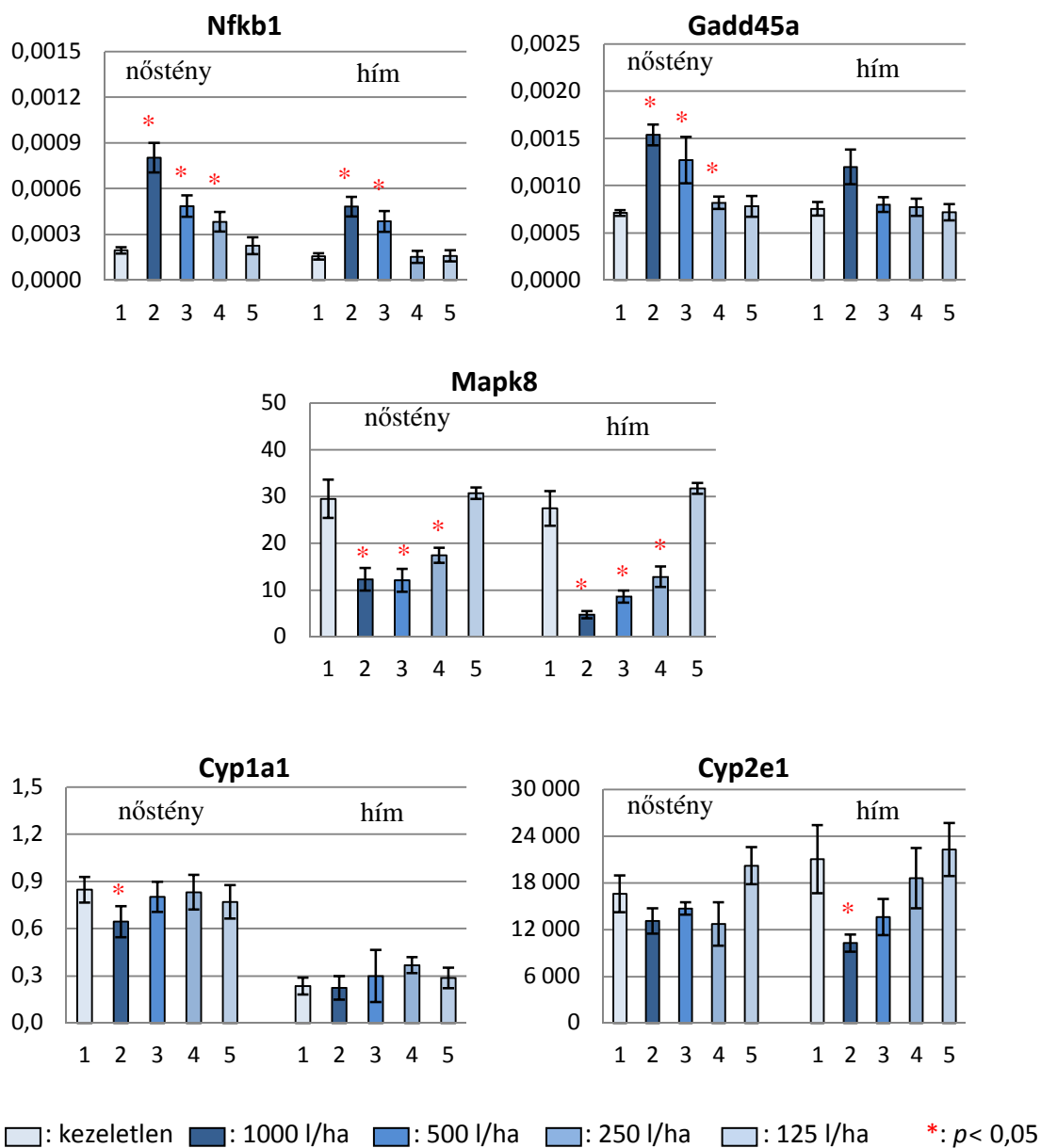
□: kezeletlen ■: 1000 l/ha ■: 500 l/ha ■: 250 l/ha ■: 125 l/ha

*: $p < 0,05$

⊙* > háromszoros géneexpresszió eltérés

11. ábra: miRNS-ek kifejeződése nőstény és hím egerek májában, 5S RNS belső kontrollhoz viszonyítva, különböző mennyiségű szappanos vízzel kezelt talajról származó búzával végzett 24 órás expozíciót követően.

A jelátviteli folyamatokat szabályozó mRNS-ek több eltérést mutattak, mint a miRNS-ek. Az *Nfkb1* kifejezett expressziónövekedése volt megfigyelhető 1000 l/ha és 500 l/ha szappanos vizes talajkezelést követően mindkét nemben, a nőstényeknél még 250 l/ha koncentráció esetében is.



12. ábra: *Nfkb1*, *Gadd45a*, *Mapk8*, *Cyp1a1*, *Cyp2e1* gének kifejeződése nőstény és hím egerek májában, *Hprt* belső kontrollhoz viszonyítva, különböző mennyiségű szappanos vízzel kezelt talajról származó búzával végzett 24 órás expozíció követően.

A *Gadd45a* expresszió csak nőstényekben mutatott szignifikáns eltérést, az 1000 l/ha, az 500 l/ha és a 250 l/ha szappanos vízzel kezelt talajról származó búza is szignifikánsan emelte a szintjét.

A *Mapk8* mind nőstény, mind hím egerek májában csökkent expressziót mutatott 1000 l/ha, 500 l/h és 250 l/ha szappanos vízzel történt talajjavítást követően.

Az *Nfkb1* expresszió eltérés nőstényekben párhuzamosságot mutatott a *Gadd45a*-val és mindkét nemben a *miR-21*-el, ellentétesen változott a *Mapk8*-al. A *miR-221* nőstényekben az *Nfkb1* fokozott expressziójával szemben csökkent kifejeződést mutatott, hímekben a *miR-146a* viselkedett az *Nfkb1*-el ellentétesen.

A biotranszformációban szerepet játszó *Cyp1a1* szintje nőstényekben, míg a *Cyp2e1* szintje hímekben csökkent 1000 l/ha szappanos víz adagolását követően.

IV.3. Kukoricaolaj és sárgazsír expozíció hatása az apoptózis/antiapoptózis szabályozására, az onkogén és tumorszuppresszor miRNS-ek és a K-ras onkogén kifejeződésére (C kísérlet)

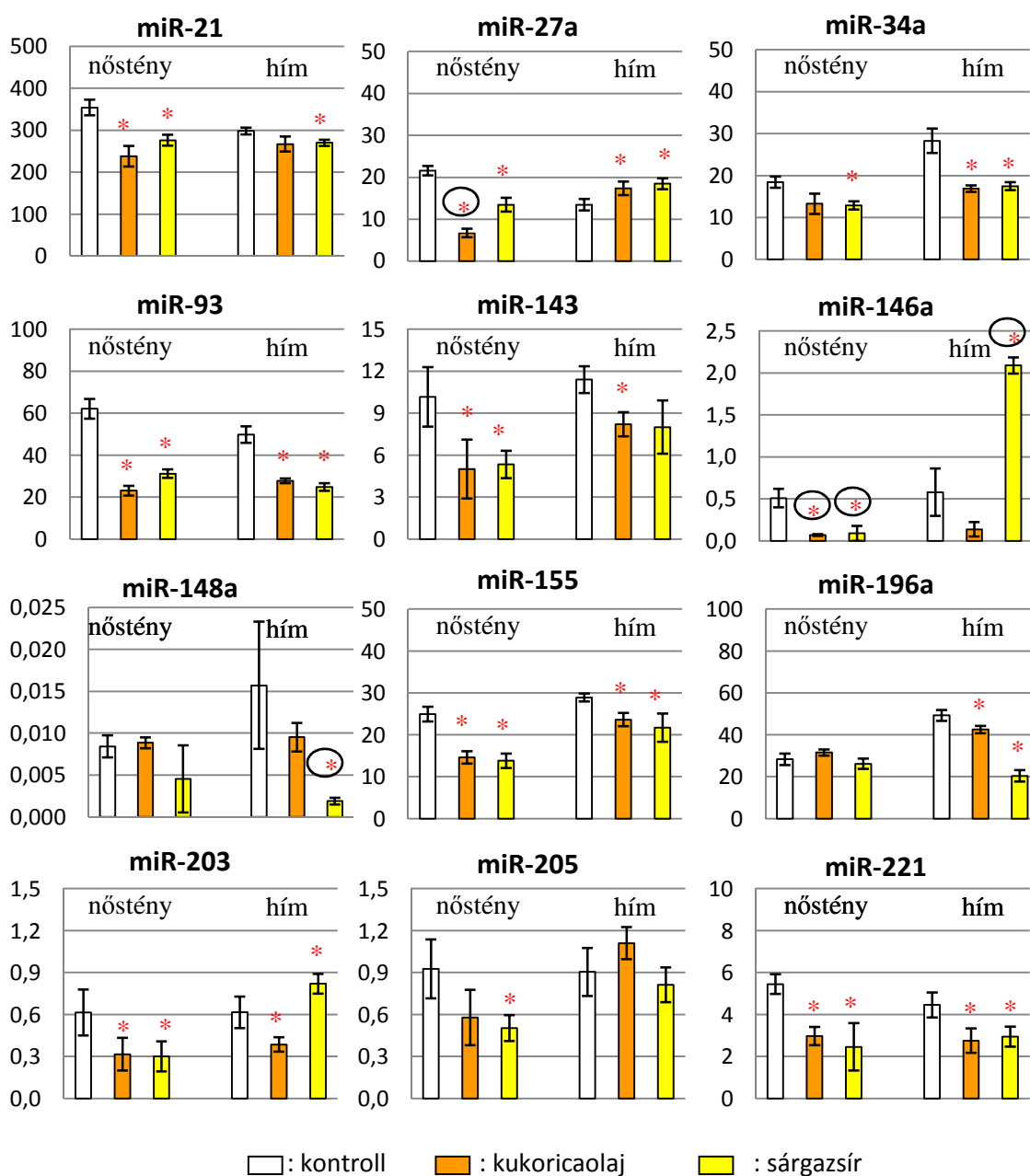
A használt kukoricaolaj és a sárgazsír takarmányként történő felhasználásának kockázatelemzése során a már bizonyítottan takarmánykompozícióra alkalmas biodízelglicerinnel hatását mérő expressziós vizsgálatainkat kívántuk megismételni. Mivel a vizsgálat időpontjában BALB/c egerek álltak rendelkezésre, az A3 kísérletben alkalmazott gének expresszió mérése mellett döntöttünk, elkerülve ezzel újabb kontroll egerek vizsgálatba történő bevonását, a biotranszformációban is szerepet játszó gének expressziójának mérését a kapott eredményektől tettük függővé.

Mind a kukoricaolajjal, mind a sárgazsírral végzett expozíciót követően számos génextpresszió eltérést tapasztaltunk (13. és 14. ábra).

A kukoricaolajjal dúsított táp fogyasztását követően nőstény egerekben csökkent a miRNS-ek közül a *miR-21*, a *miR-27a*, a *miR-93*, a *miR-143*, a *miR-146a*, a *miR-155*, a *miR-203* és a *miR-221* szintje, azonban csak a *miR-27a* és a *miR-146a* esetében csökkent a kifejeződésük legalább a harmadára. Nem mutatott szignifikáns változást a *miR-34a*, a *miR-148a*, a *miR-196a* és a *miR-205* expressziója.

A hímek májában hat miRNS-nél - *miR-93*, *miR-143*, *miR-146a*, *miR-155*, *miR-203*, *miR-221* - a nőstényekkel megegyezően génextpresszió-csökkenést tapasztaltunk, ebből a *miR-146a* szintje csökkent harmadára.

A nőstényekkel ellentétesen a *miR-27a* szintje hímekben fokozódott, a *miR-34a* és a *miR-196a* szintje a hímekben csökkent kifejeződést mutatott, az eltérések azonban nem érték el a háromszoros szintet. A *miR-21* szintje nem változott szignifikánsan hímeknél és emellett két miRNS nem mutatott szignifikáns expresszió eltérést a nőstényekkel megegyezően: a *miR-148a* és a *miR-205*.

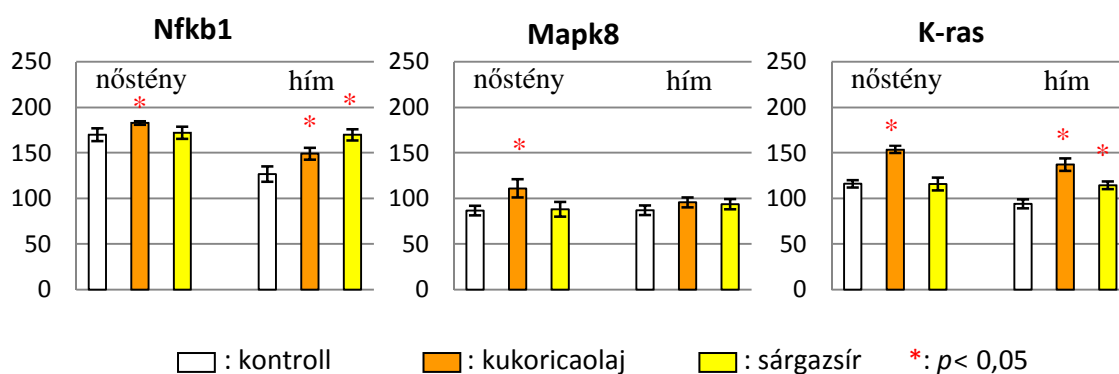


*: $p < 0,05$

⊙* > háromszoros génextpresszió eltérés

13. ábra: miRNS-ek kifejeződése nőstény és hím egerek májában, 5S RNS belső kontrollhoz viszonyítva, kukoricaolajjal vagy sárgaszírral végzett 24 órás expozíció követően.

A vizsgált mRNS-ek expresszió fokozódást mutattak, az *Nfkb1* és a *K-ras* esetében mindkét nemben, míg a *Mapk8* esetében csak nőstény egerekben.



14. ábra: *Nfkb1*, *Mapk8* és *K-ras* gének kifejeződése nőstény és hím egerek májában, *Hprt* belső kontrollhoz viszonyítva, kukoricaolajjal vagy sárgazsírral végzett 24 órás expozíciót követően.

A sárgazsírral történt expozíciót követően szinte valamennyi miRNS expressziója változott.

A *miR-21*, a *miR-27a*, a *miR-34a*, a *miR-93*, a *miR-155* és a *miR-221* mindkét nemben csökkent expressziót mutatott. A *miR-143* és a *miR-205* nőstényekben, a *miR-148a* és a *miR-196a* hímegekben mutatott csökkent expressziót. Két miRNS kifejeződése fokozódott hím egerek májában, a *miR-146a* és a *miR-203*. A *miR-146a* expressziója nőstényekben ötödére csökkent, míg hímegekben négyszeresére nőtt.

A sárgazsír a mRNS-ek expressziójára gyakorolt kisebb hatást. Nőstény egereknél egyáltalán nem tapasztaltunk szignifikáns expresszió eltérést, a *Mapk8* szintje hímeknél sem változott. Az *Nfkb1* és a *K-ras* kifejeződése nőtt a hím egerek májában.

V. Megbeszélés

A biodízel előállításához szükséges metanol és a különböző katalizátorként használt anyagok a gyártás melléktermékeit is szennyezhetik, így felhasználásukat megelőzően elengedhetetlen a karcinogenezisben betöltött szerepük vizsgálata.

A biodízel alapanyagként felmerült kukoricaolaj és sárgaszója keletkezésük okán feltételezhető, hogy élelmiszeripari felhasználásra nem alkalmasak, azonban ennek bizonyítása eddig nem történt meg.

V.1. Az apoptózis/antiapoptózis szabályozása

Az NF κ B egy olyan protein komplex, mely transzkripciós faktorként szerepet játszik a sejt szaporodás-, sejt túlélés folyamatában, szabályozza más gének kifejeződését, illetve a gyulladásos folyamatok egyik fő mediátora. Gyakorlatilag minden sejtben megtalálható, homo- és heterodimerekből épül fel, 5 alegységre bontható: p50 (Nf κ b1), p52 (Nf κ b2), p65 (RelA), c-Rel és Rel B.

Különböző külső hatásokra apoptózis indukálásában és gátlásában is szerepet játszik a jelátviteli útvonalon keresztül. „Klasszikus útvonal” az apoptózis gátlása, mivel eredetileg antiapoptotikus fehérjének gondolták, azonban igazolódott, hogy bizonyos körülmények között az apoptózis indukálásának is kulcsszereplője lehet. *Shih* és munkatársainak irodalmi áttekintése alapján ez a két útvonal nem különül el olyan markánsan egymástól, ahogyan azt korábban feltételezték, számos átfedés igazolódott a két útvonal aktivációjában, deaktivációjában (59).

Nemcsak az expozíció típusától, de az exponált sejtípustól is függ, hogy a sejttúlélés szabályozásában az adott szervben milyen hatást fejt ki az NF κ B indukálta kaskádrendszer.

Az NF κ B a sejt citoplazmájában inhibitorához, az inhibitor of nuclear factor kappa-B-hez (IKB) kötve található meg, az inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase kinase (IKK) hasítását követően aktiválódik. A gátlás alól felszabadult NF κ B antiapoptotikus hatás kifejtése során a sejtmagba jutva az apoptózisban szerepet játszó gének átíródását gátolja. Ennek egyik módja, hogy a GADD45a/b szupresszállásával gátolja aMKK/JNKK1 útvonalon keresztüli sejtpusztulást.

Proapoptotikus hatás érvényesülése esetén az NF κ B az antiapoptotikus gének promoter régiójának deacetylálásával gátolja azok átíródását, illetve a tumorszuppresszor eagr-related protein 1 (*Erg-1*) gén aktiválásán keresztül a *Gadd45a* szintjét emelve segíti elő *Mapk8* aktiválta sejtpusztulást (60).

Song és munkatársai arzénal végzett kísérleteik során az arzén mennyiségétől függően eltérő hatást tapasztaltak az *Nfkb* expressziójára. Kis mennyiségű (1,25-5 μ l) arzénal végzett vizsgálatuk során azt tapasztalták, hogy az IKK-NF κ B útvonal a cyclin D1 aktiválásán keresztül a sejttúlélést indukálta. Nagyobb mennyiségű arzén (20 μ l) az IKKb-NF κ B1 útvonalon a *Gadd45a*-MKK4-JNK jelátviteli folyamat beindításával a sejtek programozott elhalását eredményezte. Későbbiekben igazolták, hogy a *Gadd45a* útvonalon keresztüli sejtpusztulásban az arzén indukálta activator protein 1 (AP-1) transzaktivációnak van szerepe (61).

Zerbini és munkatársai az NF κ B protein *Gadd45a* és *Gadd46g* gének gátlásán keresztül kifejtett antiapoptotikus hatását igazolták (45).

Perez és munkatársainak eredménye szerint a *Mapk8* az *Nfkb* antiapoptotikus hatásának gátlásával fokozza a károsodott sejtek elpusztulását (62).

V.1.1. A biodízel-glicerín hatása az apoptózis folyamatára

Kísérleteink során a 60%-os tisztaságú biodízel-glicerinnel dúsított tápot fogyasztó egerekben az *Nfkb1* szintje szignifikánsan csökkent szinte valamennyi vizsgált szövetben, mindkét nembben, majdnem minden expozíciós időt követően. A *Gadd45a* szintje is csökkenő tendenciát mutatott, és az eltérés hímeknél valamennyi szervben, nőstényeknél a csontvelőben szignifikánsnak bizonyult. A *Gadd45a* csökkent szintje a károsodott sejtek túlélését okozhatja, tehát az expresszióváltozások miatt a vizsgált anyag káros hatása feltételezhető.

Ezen expresszióváltozások alapján a 60%-os biodízel-glicerín takarmánykompozícióként történő alkalmazását munkacsoportunk nem tartja biztonságosnak, ezért további génexpressziós vizsgálatokat az anyaggal nem folytattunk.

A 86,3%-os tisztaságú biodízel-glicerín etetését követően a *Gadd45a* hím egerek májában valamennyi expozíciós idő után, illetve a lépben és a csontvelőben 24 órás etetést követően mért expresszióemelkedése alapján a vizsgált anyag apoptotikus hatására következtethetünk.

Az *Nfkb1* expresszió szignifikáns eltérését a nagyobb tisztasági fokú biodízel-glicerinnel történő fogyasztását követően a lépében és a csontvelőjében 3 és 6 órás expozíció után egyik nemből sem figyeltük meg, a *Gadd45a* pedig ellentétes viselkedést mutatott, mint 24 órás etetést követően. Ezen eredmények alapján további vizsgálatainkban a vizsgált szerveket, és az expozíciós időt szűkítettük, továbbiakban génexpresszió méréseket – a metanol hatásának mérésére legalkalmasabb szervben, - a májban végeztük, 24 órás etetést követően (58).

A *Mapk8* 24 órás expozíciót követő BALB/c egerek májban mért alulexpresszáltasága mellett az *Nfkb1* csökkent kifejeződést mutatott nőstény BALB/c egerekben, nem változott CBA/Ca egerekben, míg hímeknél a BALB/c egerekben szignifikáns elérést nem mutatott, CBA/Ca hímegekben expressziója fokozódott.

A *Mapk8* és az *Nfkb1* gének expresszió eltérése alapján önmagában egyértelműen nem határozható meg, hogy a vizsgált anyag az apoptózisra serkentő vagy gátló hatást gyakorol-e.

Az *Nfkb1* expresszió eltérésekben észlelt különbség a különböző egértípusokban azok eltérő érzékenységének tulajdonítható.

Eredményeink nem mutatnak arra, hogy a magasabb tisztasági fokú, 86,3%-glicerinnel tartalmú biodízel-glicerinnel a jelátviteli folyamatban szerepet játszó gének expresszióját kedvezőtlenül befolyásolja.

V.1.2. A szappanos vízzel kezelt talajról termelt búza hatása az apoptózis folyamatára

A szappanos vízzel kezelt talajról származó búza 24 órás fogyasztását követően a *Mapk8* csökkent expressziójával ellentétesen az *Nfkb1* fokozott expresszióját figyeltük meg az egerek májában. Emellett a *Gadd45a* is fokozott expressziót mutatott mindkét nemből a magas koncentrációjú kezelést követően, míg nem mutatott szignifikáns eltérést alacsonyabb koncentráció esetén.

Az 1000 l/ha, az 500 l/ha és a 250 l/ha szappanos vízzel kezelt talajról betakarított búza vizsgálataink alapján 24 órás expozíció után a *Gadd45a* expressziójának fokozásával apoptotikus hatást fejtett ki, és apoptotikus hatása feltételezhető az *Nfkb1*-nek is, melyre a *Mapk8* - csökkent expressziója alapján - nem fejtett ki gátló hatást. A 125 l/ha szappanos vízzel kezelt talajról származó búza egyik gén expressziót sem befolyásolta, egyik nemből sem.

Eredményeink alapján a szappanos vízzel kezelt talajon termelt búza káros hatása nem igazolódott.

V.1.3. A kukoricaolaj és a sárgazsír hatása az apoptózis folyamatára

A kukoricaolajjal végzett kísérleteink során mindkét nemből nőtt az *Nfkb1* gén expressziója, emellett a *Mapk8* szintje is nőtt a nőstény egerek májában.

A biodízel alapanyagának szánt sárgazsír 24 órás fogyasztását követően a *Mapk8* expressziója nem mutatott szignifikáns változást, az *Nfkb1* szintje hím egerek májában nőtt a kontroll egerekben mértekhez képest.

A kukoricaolaj mindkét gén expresszióját megváltoztatta, legalább az egyik nemből, így nem jelenthető ki, hogy a sejtekben zajló folyamatokra nem volt hatással.

A sárgazsír csak a hímekben okozott génexpresszió eltérést, nőstény egerekben szignifikáns eltérést egyik gén sem mutatott, mely alapján nőstények májára gyakorolt káros hatása nem igazolódott.

V.2. A biotranszformáció szabályozása

A *Cyp1a1* a sejt endoplazmatikus retikulumának egyik fehérjéjét kódolja, endogén szubsztrátjai a szteroidok, zsírsavak, de részt vesz a koffein, fetidin, fenacetin és a policiklusos aromás szénhidrogének metabolizmusában is. A *Cyp2e1* szintén az endoplazmatikus retikulumban található, endogén szubsztrátjai: az aceton és az acetol, exogén szubsztrátjai többek között: az acetaminofén, a halotán, az izoflurán, a paracetamol, a benzol, az anilin, a nitrozamin, az etanol és a metanol (63). Rágcsálók alkohol dehidrogenációja inkább a *Cyp2e1*-hez kötött, mint az alkohol dehidrogenáz enzimhez (64). *Lu* és munkatársai rágcsáló máj *in vivo* vizsgálata során bizonyították a *Cyp2e1* emelkedett szintjének szerepét a zsírsavak kiváltotta oxidatív stressz kialakulásában, mely zsírmáj kialakulásához vezet (65).

V.2.1. A biodízel-glicerol hatása a biotranszformációra

A tisztított biodízel G-fázis biológiai és biotranszformációra gyakorolt hatása szoros összefüggést mutat a G-fázisban visszamaradt szennyező anyagokkal, telített és telítetlen zsírsavakkal és metanollal. Komplex szűrési és tisztítási eljárásokkal lehet a

glicerín frakciót mentesíteni a lipidperoxidációs termékektől vagy a reaktív oxigéngyök szubsztrátoktól. Vizsgálatunk a szűrés hatékonyságának bizonyítására irányult.

Az eredményeink szerint a vizsgált két monooxidáz enzim, a *Cyp11a1* és a *Cyp2e1* expressziója emelkedett a kísérleti állatokban, miután diétájukat biodízel-glicerinnel dúsítottuk, köszönhetően a vizsgált frakció lipidösszetételének, valamint a metanoltartalomnak. Ez az expressziófokozódás gyorsan lecsengett, amiből arra következtethetünk, hogy az biodízel-glicerín csak átmeneti hatást gyakorolt az állatok biotranszformációs folyamataira. Hosszabb diéta után már nem volt megfigyelhető expresszió eltérés a kontroll állatokhoz képest.

A vizsgált citokróm gének expresszióváltozása nem igazolta alapján a 86,3% tisztaságú biodízel-glicerín állati takarmánykomponensként való alkalmazásának közegészségügyi kockázatát.

V.2.2. A szappanos vízzel kezelt talajon termelt búza hatása a biotranszformációra

A metabolizáló enzimek esetében az 1000 l/ha szappanos vízzel kezelt talajról származó búzával történt expozíciót követően észleltünk szignifikáns génexpresszió-csökkenést a citokróm gének esetében, a *Cyp11a1* szintje csökkent nőstény egerekben, míg a *Cyp2e1* szintje a hímekben.

A szappanos vízzel kezelt talajon termelt búza eredményeink szerint alacsonyabb koncentrációjú kezelést követően egyáltalán nem befolyásolta a vizsgált gének kifejeződését az egerek májában. Magasabb koncentrációban nem zárható ki, hogy a még jelen lévő metanol által okozott metabolikus terhelés következtében figyelhattunk meg emelkedett expressziót, ezért magas koncentrációban talajkezelőként történő alkalmazása nem javasolt.

A génexpresszió-változásban a citokrómoknál is megfigyelt nemi különbségek abból adódnak, hogy a hím egerek monooxidáz aktivitása alacsonyabb, köszönhetően a hormonális eltéréseknek (66).

V.3. A *K-ras* onkogén kifejeződésére gyakorolt hatás

A vizsgált anyagok egy részében azok hatásának további megismerése céljából mértük a *K-ras* onkogén kifejeződésének változását.

A rat sarcoma virus onkogén (RAS) fehérjéket eredetileg retrovirális onkogénként fedezték fel, mint kis GTP-ázok. Számos humán tumorban figyelhető meg a *Ras*-gén mutációja, melyek a karcinogenezis folyamatát indítják be. A legújabb kutatások azonban igazolták, hogy önmagában a *Ras* gén mutációja nem vezet daganatképződéshez, sokkal inkább a normál szövetekben mért expresszióhoz képest emelkedett *Ras* gén expresszió játszik kulcsszerepet a daganatképződésben (67).

V.3.1. A biodízel-glicerín hatása a *K-ras* onkogén kifejeződésére

A 86,3%-os tisztasági fokú biodízel-glicerín fogyasztását követően a *K-ras* expressziója szignifikáns csökkenést mutatott mindkét nem májában, mely alapján protektív hatású lehet, így takarmánykomponensként alkalmazása előnyös.

V.3.2. A kukoricaolaj és a sárgazsír hatása a *K-ras* onkogén kifejeződésre

A kukoricaolaj fogyasztását követően nőstény és hím egerek májában egyaránt, míg sárgazsír fogyasztását követően hím egerekben nőtt a *K-ras* kifejeződése. Mindezek alapján a sárgazsír és a kukoricaolaj karcinogén hatása feltételezhető, így takarmánykomponensként, vagy talajjavításra nem javasoljuk.

V.4. Az onkogén és tumorszuppresszor miRNS-ekre gyakorolt hatás

A sejtciklust szabályozó kaszkádok tagjainak, az onkogén és tumorszuppresszor géneknek a kifejeződését a miRNS-ek befolyásolják.

A miRNS mintázat eltér az alkoholos eredetű és a nem alkoholos eredetű zsírmájban, illetve eltérő lehet a különböző sejttípusokban pl. hepatocita, billiáris sejt, endotél sejt, csillagsejt, Kupffer-sejt, „pit” sejt. Mivel a májszövet nagy részét a parenhimális hepatociták teszik ki, így a homogenizált májban mért expressziós mintázat a hepatocitákra jellemző képet mutat (68-70).

A májhoz hasonlóan a többi szerv és szövet is eltérő sejtekből épül fel, az expozíciós ágensek általában nem egyedül egy sejtben fejtik ki génexpresszió-változásra gyakorolt hatásukat, hanem a sejttípusok egységén, azaz a szöveten, ezért alkalmasak a homogenizált szövetek hatásuk mérésére (58).

A *miR-21* majdnem minden szövetben onkogénként viselkedik, a sejt proliferációját, migrációját és túlélését promotálja. A májban mért expressziója elsősorban a hepatocitákból származik, a máj regenerációja során, illetve a daganatos elfajulásban nő

a kifejeződése (60). Ng és munkatársai részleges májeltávolítást követően vizsgálták a *miR-21* hatását a sejtciklus szabályozásában. Eredményeik szerint a *miR-21* a cyclinD1 transzlációjának fokozásával a regenerálódó májsejtek G₁ fázisból S fázisba lépését indukálta (71). A *miR-21* a RAS/MAPK/extracellular signal-regulated kinase (ERK) útvonalon keresztül végbemenő apoptózis negatív szabályozóit is gátolja. Hatley és munkatársai vizsgálatukban bizonyították, hogy a tüdő tumoros szövetekben észlelt magasabb *miR-21* nem következmény, hanem a *miR-21* maga játszik szerepet a daganat kialakulásában a RAS kaszkád aktiválásával (72).

Huang és munkatársainak vizsgálata szerint a *miR-23a-miR-27a-miR-24* klaszter fokozott expressziója csökkenti a transforming growth factor-beta (*Tgf-β*) tumorszuppresszor hatását májtumorokban, és antiapoptotikus valamint sejtproliferációt serkentő hatást fejt ki a májban (73). Talcott és munkatársainak vizsgálata szerint a *miR-27a* a zinc finger and BTB domain containing 10 (*Zbtb10*) és myelin transcription factor 1 (*Myt-1*) tumorszuppresszorok gátlásán keresztül elősegíti a sejtek G₂-M fázisba lépését, így a sejtciklusra gyakorolt pozitív hatásával fokozza a tumorok növekedését (74).

A *miR-34a* tumorszuppresszorként a sejtciklus G₁ fázisba lépését aktiváló gének gátlásán keresztül fejt ki hatását májban. Li és munkatársai májtumorban csökkent *miR-34a* expressziót mértek a normál májban kapott értékekhez képest. Vizsgálataik szerint a *miR-34a* a tumor sejt migrációt és inváziót a met proto-onkogén (*c-Met*) kifejeződésére gyakorolt negatív hatásával gátolja (75).

A *miR-93* onkogénnek bizonyult, az integrin-béta-8 (*Itgb8*) expressziójának gátlásán keresztül fokozza a sejt túlélést, a tumor növekedést és az angiogenezist (76). Du és munkatársainak vizsgálata szerint hatását kifejti továbbá a fused in sarcoma 1 (*Fus1*) tumorszuppresszor gén kifejeződésének gátlásával (77).

A *miR-143* targetje a *K-ras* onkogén. A *miR-143* és a *K-ras* expressziója közötti inverz eltérés látható, mely összefüggés bizonyítása *miR-143* inhibitor adásával történt. A *miR-143* inhibitor adását követően a *K-ras* szintje egyértelműen nőtt (78, 79).

A *miR-146a* gátolja az interleukin 1 (IL-1) és a toll like receptor (TLR) mediálta jelátviteli útvonalon keresztül az *Nfκb* kifejeződését, melynek eredményeként a tumoros szövet metasztatikus potenciálja csökken, azaz a májban tumorszuppresszorként

viselkedik (80). Megfigyelték azonban, hogy a *miR-146a* polimorfizmusa befolyásolja a hepatocelluláris karcinoma kialakulásának kockázatát (81).

A *miR-148a* gátlását követően májban a phosphatase and tensin homolog (PTEN) protein szintje emelkedett, mely alapján szintén onkogénnek bizonyult, vizsgálatok szerint fokozott expressziója agresszív tumor megjelenése esetén észlelhető, azaz növeli a metasztatikus potenciált (82).

Wang és munkatársainak C57BL/6 beltenyésztett egerekben végzett kísérletének eredménye szerint a *miR-155* onkomirnek bizonyult speciális diétával kiváltott, nem alkoholos májtumorokban (83).

A *miR-196a* szintén onkomirnek bizonyult. Gyomortumoros szövetekben vizsgálták, hogy emelkedett expressziójával ellentétesen csökken a *p27* tumor szupresszor expressziója. A *p27* csökkent kifejeződésének következtében a sejtek a G_1 -S fázisba lépésére gyakorolt gátló hatását nem tudja kifejtteni (84, 85).

Futura és munkatársai májtumoros szövetekben csökkent *miR-203* szintet igazoltak a normál májban mérthez képest, vizsgálatuk szerint az ATP-binding cassette, sub-family E (OABP), member 1 (*Abce1*) lehet az egyik célpontja a miRNS-nek, ami egy ATP-hez kötött transzporter és kifejeződése emelkedett tumoros szövetekben (86).

A *miR-205* elsősorban onkogénként viselkedik különböző tumorokban, targetje többek között a *K-ras* onkogén (87).

Pineau és munkatársai a *miR-221* cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKN), *p27*-re gyakorolt hatását bizonyították májban, melynek következtében megnövekedett expressziója kóros sejtszaporulathoz vezetett, azaz viselkedése alapján szintén onkomir (88).

Karakatsanis és munkatársai a *miR-21* és a *miR-221* onkogén hatása mellett a *miR-146a*, *miR-223* tumorszupresszor hatását figyelte meg (89).

A *miR-223* tumorszupresszor hatását az insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1R) gátlásán keresztül fejt ki (90, 91).

V.4.1. A biodízel-glicerinnel történő expozíció hatására a miRNS-ek kifejeződésére

A biodízel-glicerinnel történt expozíció követően vizsgált 12 miRNS-ből a májban két onkogénként viselkedő miRNS szintje nőtt, míg 3 onkomir kifejeződése csökkent, a

tumorszuppresszorok közül két gén mutatott szignifikáns expressziós emelkedést a kontroll állatokban mérthez képest.

Az apoptózis szabályozásában szerepet játszó *miR-21* szintje nem változott, ahogyan a *K-ras* kifejeződésével fordítottan arányos *miR-143* szintje sem.

Megnőtt az onkogén *miR-221* expressziója nőstényekben, míg a szintén onkogén *miR-27a* szintje csökkent, és a tumorszuppresszor *miR-34a* szintje nőtt. A hímeknél két onkogén mutatott fokozott expressziót a *miR-93* és a *miR-221*, míg a szintén onkogén *miR-155* és a *miR-196a* szintje csökkent és a tumorszuppresszor *miR-203* szintje nőtt.

Nem változott a nőstényeknél 6 onkogén és 3 tumorszuppresszor kifejeződése, hímeknél 4 onkogén és 3 tumorszuppresszor kifejeződése nem tért el szignifikánsan a kontroll állatokhoz képest.

A miRNS-ek kifejeződésében mért expresszióváltozások egyetlen esetben sem érték el a háromszoros szintet, illetve nem csökkent a mennyiségük a harmadára, így a biodizelglicerinnel vizsgált miRNS-ekre gyakorolt hatás szempontjából semlegesnek tekinthető.

V.4.2. A szappanos vízzel kezelt talajon termelt búza hatása a miRNS-ek kifejeződésére

A búzával történt expozíciót követően 5 miRNS (3 onkogén és 2 tumorszuppresszor) expressziós profiljának meghatározására került sor az egerek májában. A 125 l/ha szappanos vízzel kezelt talajról betakarított búzával végzett expozíció egyik miRNS expressziójában sem okozott változást. A 250 l/ha koncentrációban alkalmazott kezelés a *miR-21* szintjét emelte a nőstények májában. Az 500 l/ha szappanos víz nemenként 1-1 expresszió eltérést váltott ki, nőstényeknél az onkogén *miR-21* szintje emelkedett, míg hímeknél az onkogén *miR-221* csökkent. A legmagasabb koncentrációjú, 1000 l/ha talajkezelést követően a hímeknél egy onkogén és egy tumorszuppresszor gén csökkent expressziója volt megfigyelhető, míg nőstényeknél az onkogén *miR-21* kifejeződése nőtt.

A szappanos vízzel kezelt talajról származó búza fogyasztását követően háromszoros expresszió emelkedést nem tapasztaltunk, míg az onkogén *miR-221* szintje mindkét nemből harmadára csökkent az 1000 l/ha szappanos vizes talajkezelést követően, mely alapján az anyagnak akár protektív hatása feltételezhető.

V.4.3. A kukoricaolaj és a sárgazsír hatása a miRNS-ek kifejeződésére

A biodízel alapanyagok fogyasztását követően vizsgált 12 miRNS kifejeződésének változása csak néhány esetben érte el a módszerekben meghatározott szignifikancia szintet, 9 miRNS kifejeződésének változását elhanyagolhatónak tekintettük.

A kukoricaolaj fogyasztását követően nőstényeknél egy onkogén (*miR-27a*) és egy tumorszuppresszor gén (*miR-146a*) expressziója csökkent több mint harmadára.

A sárgazsírral történt expozíció hatására a tumorszuppresszor *miR-146a* expressziója nőstény egerek májában több mint harmadára csökkent, míg hímelekben több mint négyszeresére nőtt. Hímelekben emellett körülbelül nyolcadára csökkent az onkogén *miR-148a* expressziója.

A miRNS-ek kifejeződésében nemek között mért különbségek a nemek eltérő metabolizáló képességére, és expozíciós érzékenységére mutatnak rá, mindkét exponált anyag esetében tapasztaltunk eltérő, gyakran ellentétes expressziós profilt a vizsgált miRNS-ek tekintetében.

Egyértelmű karcinogén hatás nem igazolódott a miRNS expresszió eltérések alapján sem a kukoricaolajjal, sem a sárgazsírral dúsított táp fogyasztását követően.

VI. Összefoglalás

A biodízel üzemeket elsősorban a nyers, kisajtott növényi olaj feldolgozásra tervezték, de a gazdaságossági követelmények miatt az üzemeket használt növényi olajok és állati zsiradék feldolgozására is célszerű alkalmassá tenni. A használt növényi olajok és zsírok a biodízelgyártás olcsóbb alapanyagai, mint a nyers növényi olajok.

Az Intézetünkben alkalmazott, CBA/Ca, BALB/c és AKR/J egerekkel végzett rövidtávú állatkísérletes modellben elsőként a biodízelgyártás alapanyagainak és újrahasznosítható melléktermékeinek a karcinogenezisre és a biotranszformációra gyakorolt hatását vizsgáltuk, a molekuláris epidemiológiai módszerek legújabb lehetőségeinek felhasználásával, a legmodernebb és legmegbízhatóbb technológiákkal.

Az egészséget befolyásoló tényezők között a táplálkozás és a genetikai tényezők egyaránt kiemelkedő szerepet játszanak, így az ételmiszernek szánt anyagok karcinogén hatásának vizsgálata elengedhetetlen a táplálékláncba történő bekerülésüket megelőzően.

Irodalmi adatok hasonló vizsgálatokról nem állnak rendelkezésre, így vizsgálataink minden szempontból egyedülállóak, valamennyi eredményünk a témában elért új eredménynek tekintendő.

VI.1. A biodízel-glicerinnel végzett vizsgálatok új eredményei

- A 60%-os tisztaságú biodízel-glicerinnel a vizsgált gének expresszióváltozása alapján antiapoptotikus ágensnek tekintendő.
- A 86,3%-os tisztaságú biodízel-glicerinnel a vizsgált gének expresszióváltozása alapján az apoptózis folyamatára negatív hatást nem gyakorolt.
- A 86,3%-os tisztaságú biodízel-glicerinnel a vizsgált gének expresszióváltozása alapján a biotranszformációra átmeneti hatást gyakorolt, 24 órás expozíciót követően a kontrollhoz képest expresszió eltérés nem volt igazolható.
- A 86,3%-os tisztaságú biodízel-glicerinnel a vizsgált *K-ras* onkogén expresszióváltozása alapján protektív hatása feltételezhető.

- A 86,3%-os tisztaságú biodízel-glicerin a vizsgált miRNS-ek kifejeződését nem befolyásolta jelentős mértékben.

A 60%-os tisztaságú biodízel-glicerinnel végzett első vizsgálatunk antiapoptotikus hatást igazolt, így véleményünk szerint takarmánykomponensként történő alkalmazása nem biztonságos.

A vizsgált gének expressziója alapján a 86,3%-os biodízel-glicerin a biotranszformációra átmeneti hatást gyakorolt, az apoptózis/antiapoptózis folyamata egyensúlyban maradt, összességében az onkomir és tumorsuppresszor miRNS-ek kifejeződése nem változott jelentős mértékben, a klasszikus *K-ras* onkogén gátlása alapján az anyag akár protektív hatású is lehet.

Összességében nem igazolódott olyan káros hatás, mely alapján a 86,3%-os biodízel-glicerin állati takarmánykomponensként való alkalmazása környezet-egészségügyi szempontból nem lenne megengedhető.

VI.2. A biodízelgyártás szappanos víz melléktermékével végzett vizsgálatok új eredményei

- Az 1000 l/ha szappanos vízzel kezelt talajról betakarított búza a vizsgált gének expresszióváltozása alapján az apoptózis folyamatát serkenti.
- Az 1000 l/ha szappanos vízzel kezelt talajról betakarított búza a vizsgált gének expresszióváltozása alapján a májban metabolikus terhelést jelent.
- Az 1000 l/ha szappanos vízzel kezelt talajról betakarított búzának, a vizsgált miRNS-ek közül az onkogén miRNS kifejeződésének gátlása alapján, protektív hatása feltételezhető.
- Az 500 l/ha szappanos vízzel kezelt talajról betakarított búza a vizsgált gének expresszióváltozása alapján az apoptózis folyamatát serkenti.
- Az 500 l/ha szappanos vízzel kezelt talajról betakarított búza a vizsgált gének expresszióváltozása alapján a biotranszformációra nem gyakorolt hatást.
- Az 500 l/ha szappanos vízzel kezelt talajról betakarított búza a vizsgált miRNS-ek kifejeződésére nem gyakorolt hatást.

- A 250 l/ha szappanos vízzel kezelt talajról betakarított búza a vizsgált gének expresszióváltozása alapján az apoptózis folyamatát serkenti.
- A 250 l/ha szappanos vízzel kezelt talajról betakarított búza a vizsgált gének expresszióváltozása alapján a biotranszformációra nem gyakorolt hatást.
- A 250 l/ha szappanos vízzel kezelt talajról betakarított búza a vizsgált miRNS-ek kifejeződésére nem gyakorolt hatást.
- A 125 l/ha szappanos vízzel kezelt talajról betakarított búza a vizsgált gének expresszióváltozása alapján az apoptózis/antiapoptózis folyamatára nem gyakorolt hatást.
- A 125 l/ha szappanos vízzel kezelt talajról betakarított búza a vizsgált gének expresszióváltozása alapján a biotranszformációra nem gyakorolt hatást.
- A 125 l/ha szappanos vízzel kezelt talajról betakarított búza a vizsgált miRNS-ek kifejeződésére nem gyakorolt hatást.

Az 1000 l/ha szappanos vízzel kezelt talajról származó búza a citokróm gének expresszióját fokozta, mely alapján metabolikus terhelésre lehet következtetni, így alkalmazása nem tekinthető teljes mértékben biztonságosnak.

A vizsgált gének expressziója alapján a szappanos víz alacsony koncentrációban nem befolyásolta az apoptózis folyamatát, a biotranszformációt és a karcinogenezist sem, sőt az 500 l/ha és a 250 l/ha koncentrációban kezelt talajról származó búza fogyasztását követően az apoptotikus folyamatok kedvező irányú változása valószínűsíthető.

A szappanos víz 500 l/ha vagy az alatti koncentrációban talajjavítóként történő alkalmazásának egészségügyi kockázatát eredményeink nem igazolták.

VI.3. A kukoricaolajjal és a sárgazsírral végzett vizsgálatok új eredményei

- A kukoricaolaj a vizsgált gének expresszióváltozása alapján az apoptózis folyamatára pozitív hatást gyakorolt.
- A kukoricaolaj a vizsgált *K-ras* onkogén kifejeződését fokozta.
- A kukoricaolaj a vizsgált miRNS-ek kifejeződésére gyakorolt hatása alapján nem tekinthető egyértelműen karcinogénnek, de az nem is zárható ki.

- A sárgaszója a vizsgált gének expresszióváltozása alapján az apoptózis folyamatára pozitív hatást gyakorolt nőstény egerekben, míg hímekben semlegesnek bizonyult.
- A sárgaszója a vizsgált *K-ras* onkogén kifejeződésére negatív hatást gyakorolt nőstény egerekben, hímekben semlegesnek bizonyult.
- A sárgaszója miRNS-ek kifejeződésére gyakorolt hatása alapján nem tekinthető egyértelműen karcinogénnek, de az nem is zárható ki.

A kukoricaolaj a *K-ras* onkogénre gyakorolt aktiváló hatása alapján takarmánykomponensként biztonsággal nem alkalmazható.

A sárgaszója a *K-ras* onkogénre gyakorolt aktiváló hatása alapján takarmánykomponensként biztonsággal nem alkalmazható.

Összességében, kísérleteink alapján a megfelelő tisztaságú, 86,3% glicerin tartalmú biodízel-glicerin állati takarmánykomponensként, a szappanos víz, 500 l/ha alatti koncentrációban, talajjavítóként történő újrahasznosítása környezet-egészségügyi szempontból nem jelent kockázatot.

A kukoricaolaj és sárgaszója biodízel alapanyagként történő hasznosítása növeli a költséghatékonyságot, tekintettel arra, hogy összetételük alapján az élelmiszer körforgásba visszakerülésük nem biztonságos. Üzemyagként történő újrahasznosításuk során nem vonnak el értékes forrást az élelmiszeripartól.

A bioüzemanyag előállítás további optimalizálásának céljából célszerű a nyersanyag termelési helyének közelébe telepíteni az üzemyag előállító gyárat, hogy a szállítás okozta környezeti szennyezést ezzel is a minimálisra csökkentsük. Az optimalizálás további fokozására a melléktermékeket hasznosító üzemek közelbe telepítése is javasolt.

VII. Rövidítések jegyzéke

<u>Rövidítés</u>	<u>Teljes elnevezés</u>
Abce1	ATP-binding cassette, sub-family E (OABP), member 1
ANOVA	ANalysis Of VAriance
Ap-1	activator protein 1
ATP	adenosin triphosphate
CDKN	cyclin-dependent kinase inhibitor
c-Met	met proto-oncogen
Cyp1a1	cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1
Cyp2e1	cytochrome P450, family 2, subfamily e, polypeptide 1
DNS	dezoxiribonukleinsav
Erg-1	eag-related protein 1
Erk	extracellular signal-regulated kinase (MAPK1)
FAD	flavin adenine dinucleotid
FAM	flavin adenine mononucleotid
Fe(II)	vas (II)-oxid
Fe(III)	vas (III)-oxid
Fus1	fused in sarcoma 1
G ₁	a sejtciklus G ₁ fázisa, start vagy restrikciós pont
G ₂	a sejtciklus G ₂ fázisa, a DNS replikáció és a magosztódás között
Gadd45a	growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45 alpha
G-fázis	biodízelgyártás során visszamaradt glicerin frakció
GTP	guanosine triphosphate
HMDD	Human miRNA-associated disease database
Hprt	hypoxanthine guanine phosphoribosyl transzferase

IGF1R	insulin-like growth factor-1 receptor
IKB	inhibitor of nuclear factor kappa-B
IKK	inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase
IL-1	interleukin1
Itgb8	integrin-béta-8
JNK	c-Jun NH(2)-terminal kinase
JNKK	c-Jun NH(2)-terminal kinase kinase
K-ras	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
l/ha	liter/ hektár
LDL	low-density lipoprotein
LDLRAP1	low-density lipoprotein receptor adapter protein 1
M	a sejtciklus M-fázisa, magosztódás
MAP	mitogen-activated protein
MAPK	mitogen-activated protein kinase
miRNS	mikro RNS
MKK	mitogen-activated protein kinase kinase
MKK4	mitogen-activated protein kinase kinase 4
mRNS	messenger RNS
Myt-1	myelin transcription factor I
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidáz
NFKB1	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells 1
N-mentes	nitrogén mentes
PCR	polimeráz láncreakció
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RAN	ras-like nuclear protein
RAS	rat sarcoma virus onkogén

RISC	RNA induced silencing complex
RNS	ribonukleinsav
S	a sejtciklus S-fázisa, DNS replikáció
Tgfb	transforming growth factor-beta
TLR	toll like receptor
ttkg	testtömeg kilogramm
UTR	untranslated region
Zbtb10	zinc finger and BTB domain containing 10

VIII. Irodalomjegyzék

1. Rio P, Burguillo M: An empirical analysis of the impact of renewable energy deployment on local sustainability *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13: 1314–1325, 2008.
2. Kovács A: Biodízel Technológia. Balatonalmádi, Nádasy Nyomda és Kiadó Kft: 2003.
3. Németh Á és Sevelle B: Kutatások a biodízel melléktermékek hasznosítására. *Magyar Kémiai Folyóirat* 113(2): 58- 61, 2007.
4. Szulmanne Binet M: Folyékony bioüzemanyagok (bioethanol, biodízel)- A műszaki és iparjogvédelmi háttér áttekintése. *Iparvédelmi és Szerzői Jogi Szemle* 2(5): 5-30, 2007.
5. Az Európai Parlament és Tanács 2009. április 23-ai 2009/28/EK irányelve a megújuló energiaforrásból előállított energia támogatásáról, valamint a 2001/77/EK és 2003/30/EK irányelv módosításáról és azt követő hatályon kívül helyezéséről
6. A megújuló energia közlekedési célú felhasználásának előmozdításáról és a közlekedésben felhasznált energia üvegházhatású gázkibocsátásának csökkentéséről szóló 2010.évi CXVII. törvény
7. A fenntartható bioüzemanyag-termelés követelményeiről és igazolásáról szóló 343/2010. (XII.28.) Kormány Rendelet
8. Magyarország Megújuló Energia Hasznosítási Cselekvési Terve 2010-2020
9. Hingyi H, Kürthy Gy és Kocsis TR: Hungary Biofuel Market. *Studies in Agricultural Economics* 106: 105-124, 2007.
10. Shi H and Bao Z: Direct preparation of biodiesel from rapeseed oil leached by two-phase solvent extraction. *Bioresour Technol* 99(18): 9025- 9028, 2008.
11. Jeong GT, Park DH, Kang CH, Lee WT, Sunwoo CS, Yoon CH, Choi BC, Kim HS, Kim SW and Lee T: Production of biodiesel fuel by transesterification of rapeseed oil. *Appl Biochem Biotechnol* 113-116: 747- 758, 2004.
12. Stout R: Biodiesel from Used Oil. *J Chem Educ* 84(11): 1765, 2007.
13. A hulladékgazdálkodásról szóló 2000. évi XLIII. törvény
14. Thompson JC and He BB: Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. *Appl Eng Agric* 22: 261-265, 2006.

15. Cerrate S, Yan F, Wang Z, Coto C, Sacakli P and Waldroup PW: Evaluation of Glycerine from Biodiesel Production as a Feed Ingredient for Broilers. *Int J of Poultry Science* 5(11): 1001-1007, 2006.
16. Lammers PJ, Kerr BJ, Weber TE, Bregendahl K, Lonergan SM, Prusa KJ, Ahn DU, Stoffregen WC, Dozier WA and Honeyman MS: Growth performance, carcass characteristics, meat quality, and tissue histology of growing pigs fed crude glycerinsupplemented diets. *J Anim Sci* 86: 2962–2970, 2008.
17. Kovács P, Zsédely E és Schmidt J: Glicerín felhasználása a monogasztrikus állatok takarmányozásában 1. Glicerín a hízósertések takarmányozásában. *Állattenyésztés és takarmányozás* 59(5–6): 441–455, 2010.
18. Schmidt J és Zsédely E: Glicerín felhasználása a monogasztrikus állatok takarmányozásában 2. Glicerín a pecsenyecsirke hizlalásban. *Állattenyésztés és takarmányozás* 59(5–6): 457-469, 2010.
19. Szendi K, Gerencsér G, Kovács A és Varga Cs: Biodízel előállításakor képződött glicerín fázis melléktermék vizsgálata in vivo genotoxikológiai tesztekben. *Magyar Epidemiologia* 8: 21-26, 2011.
20. A veszélyes készítmények tulajdonságainak vizsgálati módszereiről és vizsgálatok eredményeinek értékeléséről” szülő 54/2003. (IX.1.) ESZCSM-KvVM-BM együttes rendelete
21. Gerencsér G, Szendi K és Varga Cs: Biodízelgyártás során keletkező glicerines mellékfázis vizsgálata szubkrónikus toxicitási tesztkben. *Magyar Epidemiológia* 8: 27-31, 2011.
22. Mikola VG: Biodízelgyártási termékeinek meghatározása talajból. Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, szakdolgozat, 2011.
23. Gerencsér G, Szendi K, Kovács A és Ember I: Biodízelgyártása során keletkező melléktermékekkel kezelt talajok ökotoxikológiai vizsgálata. *Magyar Epidemiológia* 9: 209-214, 2012.
24. Szendi K, Gerencsér G, Kovács A és Ember I: Talajjavító és szelektív növényvédőszer komponensek genotoxikológiai és ökotoxikológiai vizsgálata. *Magyar Epidemiológia* 9: 215-224, 2012.
25. Gombos K és Ember I: Molekuláris Közegészségtan. In Népegészségügyi orvostan (szerk.: Ember I, Kiss I, Cseh K; Dialóg Campus): 99-110, 2013.

26. Gócze K, Marek E, Gombos K, Prantner I, Szele E, Ember I: A betegségmegelőzés általános alapjai. In Népegészségügyi orvostan (szerk.: Ember I, Kiss I, Cseh K; Dialóg Campus): 125-127, 2013.
27. Ember I: Biomarkerek: Új koncepció a megelőzésben. In Népegészségügyi orvostan (szerk.: Ember I, Kiss I, Cseh K; Dialóg Campus): 140-145, 2013.
28. Szeberényi J: Molekuláris sejtbiológia. Dialóg Campus, Pécs, 2004.
29. Guengerich FP and Isin EM: Mechanism of cytochrome P450 reactions. *Acta Chim* 55: 7-19, 2008.
30. Ioannides C and Lewis DF: Cytochromes P450 in the bioactivation of chemicals. *Curr Top Med Chem* 4(16): 1767-1788, 2004.
31. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M and Telser: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39(1): 44-84, 2007.
32. Oláh E: Molekularis onkogenetika. In: Az Onkológia alapjai (szerk.: Kásler M, Medicina Könyvkiadó.): 49-68, 2011.
33. <http://www.mirbase.org>
34. Alvarez-Garcia I and Miska EA: MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development* 132(21): 4653-4662, 2005.
35. Maatouk D and Harfe B: MicroRNAs in development. *ScientificWorld J* 6: 1828-1840, 2006.
36. Gócze K, Gombos K, Pajkos G, Magda I, Ember Á, Juhász K, Patczai B és Ember I: Mikro-RNS-ek jelentősége a molekuláris epidemiológiában. *Orvosi Hetilap* 152(16): 633-641, 2011.
37. Zhang L, Hou D, Chen X, Li D, Zhu L, Zhang Y, Li J, Bian Z, Liang X, Cai X, Yin Y, Wang C, Zhang T, Zhu D, Zhang D, Xu J, Chen Q, Ba Y, Liu J, Wang Q, Chen J, Wang J, Wang M, Zhang Q, Zhang J, Zen K and Zhang CY: Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Res* 22(1): 107-126, 2012.
38. Lu M, Zhang Q, Deng M, Miao J, Guo Y, Gao W and Cui Q: An analysis of human microRNA and disease associations. *PLoS ONE*, 3(10) ID e3420, 2008.
39. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogossova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher

- CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB and Tewari M: Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(30): 10513-10518, 2008.
40. Gőcze K, Gombos K, Juhász K és Ember I: Környezeti karcinogének korai hatásainak mikroRNS-alapú molekuláris epidemiológiai biomarkerekkel történő monitorizálása (Új utak a primer prevencióban) *Magyar Epidemiologia* 8: 83-95, 2011.
 41. Zhang B, Pan X, Cobb GP and Anderson TA: miRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology* 302: 1–12, 2007.
 42. <http://www.microna.ic.cz/mirna4.html>
 43. Cho WCs: miRNAs: Potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 42(8): 1273-81, 2010.
 44. Budhu A, Jia HL, Forgues M, Liu CG, Goldstein D, Lam A, Zanetti KA, Ye QH, Qin LX, Croce CM, Tang ZY and Wang XW: Identification of metastasis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 47(3): 897-907, 2008.
 45. Zerbini LF, Wang Y, Czibere A, Correa RG, CHO JY, Ijiri K, Wei W, Joseph M, Gu X, Grall F and Goldring MB: NF- κ B-mediated repression of growth arrest- and DNA-damage-inducible proteins 45a and y is essential for cancer cell survival. *PNAS* 101: 13618-13623, 2004.
 46. Song L, Li J, Zhang D, Liu ZG, Ye J, Zhan Q, Shen HM, Whiteman M and Huang CH: IKK β programs to turn on the GADD45 α -MKK4-JNK apoptotic cascade specifically via p50 NF- κ B in arsenite response. *J Cell Biol*: 175(4): 607–617, 2006.
 47. Ember I: Állatkísérletes módszerek a kísérletes daganatkutatásban. Egyetemi jegyzet: <https://www.pote.hu/pubhealth/hun.html>
 48. Ember I, Kiss I, Gombkötő G, Müller E and Szeremi M: Oncogene and suppressor gene expression as a biomarker for ethylene oxide exposure. *Cancer Detect Prev*: 22(3): 241-245, 1998.
 49. Ember I: Onko és szuppresszorgének expressziójának vizsgálata in vivo állatmodellben és humán populációban, MTA doktori értekezés, 2003.
 50. az állatok védelméről és kíméletéről szóló 1998. évi XXVIII. törvény
 51. JAX[®] Mice Database: <https://www.jaxmice.org>

52. Bachmanov AA, Reed DR, Beauchamp GK and Tordoff MG: Food intake, water intake, and drinking spout side preference of 28 mouse strains. *Behav Genet* 32(6): 435-443, 2002.
53. Chad JC, Jeffrey GR and Preethi HG: Expression profiling of microRNAs by deep sequencing. *Brief Bioinform* 10(5): 490-497, 2009.
54. Farazi TA, Hoell JI, Morozov P, and Tuschl T: microRNAs in Human Cancer. *Adv Exp Med Biol* 774: 1–20, 2013.
55. Li X, Zhang Y, Zhang H, Liu X, Gong T, Li M, Sun L, Ji G, Shi Y, Han Z, Han S, Nie Y, Chen X, Zhao Q, Ding J, Wu K and Daiming F: miRNA-223 promotes gastric cancer invasion and metastasis by targeting tumor suppressor EPB41L3. *Mol Cancer Res* 9(7): 824-833, 2011.
56. Ryu JK, Hong SM, Karikari CA, Hruban RH, Goggins MG and Maitra A: Aberrant MicroRNA-155 expression is an early event in the multistep progression of pancreatic adenocarcinoma. *Pancreatology* 10(1): 66-73, 2010.
57. Vriens MR, Weng J, Suh I, Huynh N, Guerrero MA, Shen WT, Duh QY, Clark OH and Kebebew E: MicroRNA expression profiling is a potential diagnostic tool for thyroid cancer. *Cancer* 118(13): 3426-3432, 2012.
58. Kraut JA and Kurtz I: Toxic alcohol ingestions: clinical features, diagnosis, and management. *Clin J Am Soc Nephrol* 3(1): 208-225, 2008.
59. Shih VFS, Tsui R, Caldwell A and Hoffmann A: A single NF κ B system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell Research* 21(1): 86-102, 2011.
60. Song G, Sharma AD, Roll GR, Ng R, Lee AY, Blelloch RH, Frandsen NM and Willenbring H: MicroRNAs control hepatocyte proliferation during liver regeneration. *Hepatology* 51(5): 1735–1743, 2010.
61. Song L, Li J, Hu M, and Huang C: Both IKK- α and IKK- β are implicated in the arsenite-induced AP-1 transactivation correlating with cell apoptosis through NF- κ B activity-independent manner. *Exp Cell Res* 314(11-12): 2187–2198, 2008.
62. Sanchez- Perez I, Benitah SA, Martinez-Gomariz M, Lacal JC and Perona R: Cell Stress and MEKK1-mediated c-Jun Activation Modulate NF-KB Activity and Cell Viability. *Molecular Biology of the Cell* 13: 2933–2945, 2002.
63. Tomaszewski P, Tomaszewska GK and Pachecka J: Cytochrome P450 Polymorphism – Molecular, Metabolic and Pharmatogenetic Aspects. II.

- Participation of CYP Isoenzymes in the Metabolism of Endogenous Substances and Drugs. *Acta Pol Pharm* 65(3): 307-318, 2008.
64. Kishimoto R, Ueda M, Yoshinaga H, Goda K and Park SS: Combined effects of ethanol and garlic on hepatic ethanol metabolism in mice. *J Nutr Sci Vitaminol* 45(3): 275-286, 1999.
 65. Lu Y, Zhuge J, Wang X, Bai J and Cederbaum AI: Cytochrome P450 2E1 Contributes to Ethanol-Induced Fatty Liver in Mice. *Hepatology* 47(5): 1483-1494, 2008.
 66. Kishimoto R, Ogishi Y, Ueda M, Matsusaki M, Amako K, Goda K and Park SS: Gender-related differences in mouse hepatic ethanol metabolism. *J Nutr Sci Vitaminol* 48(3): 216-224, 2002.
 67. Rajalingam K, Schreck R, Rapp UR and Albert S: Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochim Biophys Acta* 1773(8): 1177-1195, 2007.
 68. Chen XM: MicroRNA signatures in liver diseases. *World J Gastroenterol* 15(14): 1665-1672, 2009.
 69. Bala S, Marcos M and Szabo G: Emerging role of microRNAs in liver diseases. *World J Gastroenterol* 15(45): 5633-5640, 2009.
 70. Ji J and Wang XW: New kids on the block: diagnostic and prognostic microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther* 8(18): 1686-1693, 2009.
 71. Ng R, Song G, Roll GR, Frandsen NM, and Willenbring H: A microRNA-21 surge facilitates rapid cyclin D1 translation and cell cycle progression in mouse liver regeneration. *J Clin Invest* 122(3): 1097-1108, 2012.
 72. Hatley ME, Patrick DM, Garcia MR, Richardson JA, Bassel-Duby R, Rooij E and Olson EN: Modulation of K-Ras-Dependent Lung Tumorigenesis by MicroRNA-21. *Cancer Cell* 18: 282-293, 2010.
 73. Huang S, He X, Ding J, Liang L, Zhao Y, Zhang Z, Yao X, Pan Z, Zhang P, Li J, Wan D and Gu J: Upregulation of miR-23a approximately 27a approximately 24 decreases transforming growth factor-beta-induced tumor-suppressive activities in human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer* 123(4): 972-978, 2008.
 74. Mertens-Talcott SU, Chintharlapalli S, Li X and Safe S: The Oncogenic microRNA-27a Targets Genes That Regulate Specificity Protein Transcription

- Factors and the G2-M Checkpoint in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Cancer Res* 67: 11001-11011, 2007.
75. Li N, Fu H, Tie Y, Hu Z, Kong W, Wu Y and Zheng X: miR-34a inhibits migration and invasion by down-regulation of c-Met expression in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett* 275(1): 44-53, 2009.
 76. Fang L, Deng Z, Shatseva T, Yang J, Peng C, Du WW, Yee AJ, Ang LC, He C, Shan SW and Yang BB: MicroRNA miR-93 promotes tumor growth and angiogenesis by targeting integrin- β 8. *Oncogene* 30(7): 806-821, 2011.
 77. Du L, Schageman JJ, Subauste MC, Saber B, Hammond SM, Prudkin L, Wistuba II, Ji L, Roth JA, Minna JD and Pertsemlidis A: miR-93, miR-98 and miR-197 regulate expression of tumor suppressor gene *FUS1*. *Mol Cancer Res* 7(8): 1234–1243, 2009.
 78. Chen X, Guo X, Zhang H, Xiang Y, Chen J, Yin Y, Cai X, Wang K, Wang G, Ba Y, Zhu L, Wang J, Yang R, Zhang Y, Ren Z, Zen K, Zhang J and Zhang CY: Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis. *Oncogene* 28: 1385–1392, 2009.
 79. Gao JS, Zhang Y, Tang X, Tucker LD, Tarwater PM, Quesenberry PJ, Rigoutsos I, and Ramratnam B: The Evi1, microRNA-143, K-Ras axis in colon cancer. *FEBS Letters* 585 (4): 693-699, 2011.
 80. Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, Patil CK, Campisi J and Benz CC: Expression of microRNA-146 suppresses NF- κ B activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells. *Oncogene* 27(42): 5643–5647, 2008.
 81. Xu T , Zhu Y1, Wei QK, Yuan Y, Zhou F, Ge YY, Yang JR, Su H and Zhuang SM: A functional polymorphism in the miR-146a gene is associated with the risk for hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 29(11): 2126–2131, 2008.
 82. Yuan K, Lian Z, Sun B, Clayton MM, Ng IOL and Feitelson MA: Role of miR-148a in Hepatitis B Associated Hepatocellular Carcinoma: *PLoS One Epub* 7(4): e35331, 2012
 83. Wang B, Majumder S, Nuovo G, Kutay H, Volinia S, Patel T, Schmittgen TD, Croce CD, Ghoshal K and Jacob ST: Role of miR-155 at early stages of hepatocarcinogenesis induced by choline-deficient and amino acid defined diet in C57BL/6 mice. *Hepatology* 50(4): 1152–1161, 2009.

84. Tsai KW, Liao YL, Wu CW, Hu LY, Li SC, Chan WC, Ho MR, Lai CH, Kao HW, Fang WL, Huang KH and Lin WC: Aberrant expression of miR-196a in gastric cancers and correlation with recurrence. *Genes Chromosomes Cancer* 51(4): 394-401, 2012.
85. Sun M, Liu XH, Li JH, Yang JS, Zhang EB, Yin DD, Liu ZL, Zhou J, Ding Y, Li SQ, Wang ZX, Cao XF and De W: MiR-196a is upregulated in gastric cancer and promotes cell proliferation by downregulating p27(kip1). *Mol Cancer Ther* 11(4):842-852, 2012.
86. Furuta M, Kozaki K, Tanaka S, Arai S, Imoto I and Inazawa J: miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 31(5): 766–776, 2010.
87. Barh D, Parida S, Parida BP and Viswanathan G: Let-7, miR-125, miR-205, and miR-296 are prospective therapeutic agents in breast cancer molecular medicine. *Gene Ther Mol Biol* 12: 189-206, 2008.
88. Pineau P, Volinia S, McJunkin K, Marchio A, Battiston C, Terris B, Mazzaferro V, Lowe SW, Croce CM and Dejean A: miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *PNAS* 107(1): 264- 269, 2010.
89. Karakatsanis A, Papaconstantinou I, Gazouli M, Lyberopoulou A, Polymeneas G and Voros D: Expression of microRNAs, miR-21, miR-31, miR-122, miR-145, miR-146a, miR-200c, miR-221, miR-222, and miR-223 in patients with hepatocellular carcinoma or intrahepatic cholangiocarcinoma and its prognostic significance. *Mol Carcinog Epub* PMID 22213236, 2011.
90. Wong QW, Lung RW, Law PT, Lai PB, Chan KY, To KF and Wong N: MicroRNA-223 is commonly repressed in hepatocellular carcinoma and potentiates expression of Stathmin1. *Gastroenterology* 35(1): 257-69, 2008.
91. Jia CY, Li HH, Zhu XC, Dong YW, Fu D, Zhao QL, Wu W and Wu XZ: MiR-223 Suppresses Cell Proliferation by Targeting IGF-1R. *PLoS ONE* 6(11): e27008, 2011.

IX. Értekezés alapjául szolgáló közlemények és kongresszusi összefoglalók jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló idegen nyelvű közlemények

1. Szele E, Gombos K, Kovács A, Ember I: Feeding purified glycerol from biodiesel to CBA/CA mice: effects on Gadd45 α and Nfkb1 expressions. In Vivo 24(3): 303-307, 2010. **imp.f.: 1,159**
2. Szele E, Gombos K, Kovács A, Ember I: Effects of purified glycerol from biodiesel on Cyp1a1 and Cyp2e1 expressions in CBA/CA mice. In Vivo 25(2): 237-240, 2011. **imp.f.: 1,264**
3. Szele E, Gombos K, Juhász K, Wohler V, Kovács A, Ember I: Effects of purified glycerol from biodiesel on miRNAs compared to the expression profile of selected mRNAs in BALB/c mice. In Vivo 27(1): 107-111, 2013. **imp. f.: 1,264**
4. Kádár B, Gombos K, Szele E, Beregi A, Varga Zs, Sebestyén A, Ember I: Effects of Isoflurane Exposure on Oncogene and Tumour Suppressor Gene Expressions in Vital Organs of CBA/CA Mice. In Vivo 21(5): 861-865, 2007. **imp. f.: 1,143**
5. Szanyi I, Lujber L, Gerlinger I, Pytel J, Bauer M, Csejtei A, Szele E, Gombos K, Kiss I, Seredenin S, Yarkova M, Ember I: In vivo effects of Afobazole (2-Mercaptobenzimidazole Derivate) on the 7,12-Dimethylbenz [a] anthracene-induced oncogene and suppressor gene expression. In Vivo 21(6): 1059-1063, 2007. **imp. f.: 1,143**
6. Gombos K, Szele E, Kiss I, Varjas T, Puskás L, Kozma L, Juhász F, Kovács E, Szanyi I, Ember I: Characterization of microarray gene expression profiles of early stage thyroid tumours. Cancer Genomics and Proteomics 4(6): 403-409, 2007.
7. Göbel GY, Gombos K, Szele E, Kálmán E, Budán F, Gerlinger I, Fiscina F, Szanyi I, Ember Á, Németh Á, Ember I: Retrospective analysis of malignant salivary gland tumors in Hungarian population between 1987-2006. European Journal of Oncology, 14(4): 209-215, 2009. **imp.f.: 0,325**

8. Kádár B, Gombos K, Szele E, Ember I, Iványi JL, Csejtei A, Pajkos G: Effects of Isoflurane on *Nfkb p65*, *Gadd45a* and *Jnk1* expression in the vital organs of CBA/CA mice. *In Vivo* 25(2): 241- 244, 2011. **imp.f.: 1,264**

Az értekezés alapjául szolgáló magyar nyelvű közlemények

1. Szele E, Gombos K, Ember I: Biodízel előállítás során a glicerín-fázis melléktermékek állati takarmánykompozícióként való alkalmazásának vizsgálata – Az SZME2 hatása az NFkB1 és GADD45 α expresszióra. *Magyar Epidemiológia* 6(1): 21-26, 2009.
2. Szele E, Gombos K, Juhász K, Wohler V, Kovács A, Ember I: Biodízel előállításra felhasznált kukoricaolaj és sárgazsír karcinogenezisben betöltött szerepének állatkísérletes vizsgálata különböző mRNS-ek és miRNS-ek kifejeződésének mérésével. *Magyar Epidemiológia* 9(3): 173-182, 2012.
3. Szele E, Gombos K, Juhász K, Kovács A, Ember I: Biodízelgyártás során visszamaradt szappanos vízzel kezelt talajon termesztett búza metabolizmusra és karcinogenezisre gyakorolt hatásának vizsgálata állatkísérletes modellben. *Magyar Epidemiológia* 9(3): 183-192, 2012.
4. Kádár B, Gombos K, Szele E, Göbel Gy, Szanyi I, Ember I: Az Isoflurane in vivo hatástani vizsgálata. *Magyar Epidemiológia* 5(3-4): 181-190, 2008.
5. Ember I, Gombos K, Prantner I, Szele E: A betegségmegelőzés általános alapjai. Népegészségügyi orvostan (szerk.: Ember I.) Dialóg Campus, Pécs, 2007.
6. Ember I, Gombos K, Szele E: Genetika/genomika a népegészségügyben, genomikai epidemiológia. Népegészségügyi orvostan (szerk.: Ember I.) Dialóg Campus, Pécs, 2007.
7. Fehér K, Prantner I, Szele E, Németh Á, Berényi K, Huszár A, Iványi JL, Csejtei A, Sebestyén A, Ember I: A rosszindulatú daganatok megelőzése-prevenációs modell a háziórvostól a molekuláris epidemiológiáig. *Magyar Epidemiológia* 8(3): 145-161, 2011.
8. Gőcze K, Marek E, Gombos K, Prantner I, Szele E és Ember I: A betegségmegelőzés általános alapjai. Népegészségügyi Orvostan 2. kiadás (szerk.: Ember I, Kiss I, Cseh K; Dialóg Campus): 125-127, 2013.

9. Kiss I, Orsós Zs, Gombos K, Prantner I, Szele E, Ember I: Szűrés, szűrővizsgálatok. Népegészségügyi Orvostan 2. kiadás (szerk.: Ember I, Kiss I, Cseh K; Dialóg Campus): 128-132, 2013.

Az értekezés témájában készült idegen nyelvű konferencia absztraktok

1. Szele E, Gombos K, Kovács A, Ember I: Feeding purified glycerol from Biodiesel to CBA/CA mice: effects on single strand DNA damage inducible GADD45 α and NF κ B expressions. Anticancer Research 28: 3297, 2008. **imp. f: 1,39**
2. Gombos K, Szele E, Puskás L, Kozma L, Juhász F, Göbel Gy, Szanyi I, Ember I: Analysis of the connections between signal transduction mechanisms in early stage thyroid tumours. Anticancer Research 28: 3296, 2008. **imp. f: 1,39**
3. Kádár B, Gombos K, Szele E, Göbel Gy, Szanyi I, Ember I: Effects of Isoflurane on NF κ B1, GADD45 α JNK1 expressions in the vital organs of CBA/CA mice. Anticancer Research 28: 3296, 2008. **imp. f: 1,39**

Az értekezés témájában készült magyar nyelvű konferencia absztraktok

1. Szele E, Gombos K, Varjas T, Puskás L, Kozma L, Juhász F, Ember I: Microarray módszer alkalmazása a pajzsmirigy daganatok korai felismerésében. Magyar Epidemiológia Supplementum 5: 95-96, 2008.
2. Szele E, Gombos K, Ember I: Az SZME2 biodízel előállítás során nyert tisztított glicerin frakció NF κ B, JNK és GADD45A génekre gyakorolt hatásának vizsgálata állatkísérletes modellben. Magyar Epidemiológia Supplementum 5(2): 174, 2008
3. Szele E, Gombos K, Ember I: Biodízel előállítása során nyert tisztított glicerin frakció apoptikus génekre gyakorolt hatásának vizsgálata állatkísérletes modellben. Magyar Epidemiológia Supplementum 6: 104, 2009.
4. Gombos K, Szele E, Herceg M, Brunner Zs, Szanyi I, Molnár K, Gergely P, Mucsi Gy, Varga Zs, Ember I: A VitaCalen® krónikus fogyasztása során észlelt eredményeink állatkísérletes modellben. Magyar Epidemiológia Supplementum 3: 41, 2006.

5. Gombos K, Szele E, Varjas T, Tetinger A, Molnár K, Varga Zs, Sebestyén A, Tibold A, Ember I: A VitaCalen® nevű étrendkiegészítő hatása onko- és tumorszuppresszor gén expressziókra. Magyar Epidemiológia Supplementum 3: 42, 2006.
6. Gombos K, Szele E, Varjas T, Puskás L, Kozma L, Juhász F, Ember I: Jelátviteli mechanizmusok összefüggéseinek vizsgálata pajzsmirigy daganatokban. Magyar Epidemiológia Supplementum 5: 44, 2008.
7. Kádár B, Gombos K, Szele E, Beregi A, Varga Zs, Sebestyén A, Ember I: Az izoflurán onko- és tumorszuppresszor génekre kifejtett hatásának vizsgálata CBA/Ca egerekben. Magyar Epidemiológia Supplementum 5: 55, 2008.
8. Kádár B, Gombos K, Szele E, Göbel Gy, Szanyi I, Ember I: Az Isoflurane hatása az NFkB1, JNK1 és GADD45 α gének expressziós mintázatára. Magyar Epidemiológia Supplementum 5(2): 150, 2008.
9. Göbel Gy, Gerlinger I, Pytel J, Szanyi I, Szele E, Gombos K, Ember I: A Malignus nyálmirigy daganatok retrospektív vizsgálata az 1986-2006-os időtartamban. Magyar Epidemiológia Supplementum 5(2): 145, 2008 .
10. Gombos K, Szele E, Göbel Gy, Puskás L, Kozma L, Juhász F, Ember I: Pajzsmirigy daganatok génexpressziós profiljának meghatározása cDNS microarray módszerrel. Magyar Epidemiológia Supplementum 6: 42-43, 2009.
11. Göbel Gy, Gerlinger I, Pytel J, Szanyi I, Szele E, Gombos K, Ember I: Malignus nyálmirigy daganatok epidemiológiai sajátosságai. Magyar Epidemiológia Supplementum 6: 44, 2009.
12. Kádár B, Gombos K, Szele E, Göbel Gy, Szanyi I, Ember I: Az Isoflurane hatása apoptikus jelátviteli gének expressziójára. Magyar Epidemiológia Supplementum 6: 53-54, 2009.

Az értekezés témájában tartott idegen nyelvű előadások

1. Szele E, Gombos K, Ember I: Effects of biodiesel glycerol on DNA damage inducible and apoptotic genes.
Népegészségügyi Tudományos Társaság XVII. Nemzetközi Kongresszusa, 2009. április 17-18., Marosvásárhely

2. Szele E, Gombos K, Ember I: Effects of Purified Glycerol from Biodiesel on Cyp1a1 and Cyp2e1 Expressions in CBA/CA Mice
International Conference of Preventive Medicine and Public Health, Pécs, 2010. november 19-20., Pécs
3. Szele E, Gombos K, Ember I: 2011. április: Feeding Animals with Biodiesel Glycerol. Effect of Biodiesel G- fractions on Genes Regulating Microsomal Metabolism,
BIT's 1st Annual World Congress of Bioenergy, 2011. április 25-29., Dalain, China,
4. Gombos K, Szele E, Göbel Gy, Puskás L, Kozma L, Juhász F, Ember I: Pajzsmirigy daganatok génexpressziós profiljának meghatározása cDNS microarray módszerrel
Népegészségügyi Tudományos Társaság XVII. Nemzetközi Kongresszusa, 2009. április 17-18., Marosvásárhely
5. Kádár B, Gombos K, Szele E, Göbel Gy, Szanyi I, Ember I: Az Isoflurane hatása apoptotikus jelátviteli gének expressziójára
Népegészségügyi Tudományos Társaság XVII. Nemzetközi Kongresszusa, 2009. április 17-18., Marosvásárhely

Az értekezés témájában tartott magyar nyelvű előadások

1. Szele E, Gombos K, Ember I: Biodízel előállítás során nyert tisztított glicerin frakció apoptotikus génekre gyakorolt hatásának vizsgálata állatkísérletes modellben
Fiatal Higiénikusok V. Fóruma, 2009. május 14-16., Eger
2. Szele E, Gombos K, Ember I: Biodízel előállítás során nyert különböző tisztaságú glicerin frakciók apoptotikus génekre gyakorolt hatásának összehasonlítása állatkísérletes modellben
Magyar Higiénikusok Társasága XXXIX, 2009. október 6-8., Balatonvilágos
3. Szele E, Gombos K, Ember I: Biodízel előállítás során visszamaradt glicerin frakció hatásának vizsgálata a metabolizmusban kulcsszerepet játszó citokróm gének kifejeződésére
Magyar Higiénikusok Társasága IX. Nemzeti Kongresszusa, 2010. október 5-7., Balatonvilágos
4. Szele E, Gombos K, Ember I: A biodízel-glicerin hatásának vizsgálata jelátviteli folyamatokban és metabolizmusban kulcsszerepet játszó gének kifejeződésére CBA/CA egerekben
A glicerin takarmányozási hasznosítása, 2011. május 6., Mosonmagyaróvár
5. Szele E, Gombos K, Juhász K, Wolher V, Kovács A, Ember I: Biodízelgyártás során keletkezett anyagok hatása a sejttúlélésben kulcsszerepet játszó microRNS-ek és messenger RNS-ek kifejeződésére BALB/c egerekkel végzett rövidtávú állatkísérletes modellben
Fiatal Higiénikusok VI. Fóruma, 2012. május 10-11., Esztergom
6. Szele E, Gombos K, Juhász K, Wolher V, Ember I: Biodízelgyártás során melléktermékként keletkezett „szappanos vízzel” kezelt talajon termesztett búza hatásának vizsgálata daganatképződésben és metabolizmusban kulcsszerepet játszó miRNS-ek és mRNS-ek génexpressziójának mérésével
Magyar Higiénikusok Társasága XLI. vándorgyűlése, 2012. október 3-5., Esztergom
7. Gombos K, Szele E, Varjas T, Puskás L, Kozma L, Juhász F, Ember I: Budapest: Microarray módszer alkalmazása pajzsmirigydaganatok korai felismerésében

Magyar Onkológusok Társaságának XXVII. Jubileumi Kongresszusa, 2007.
november 8-10., Budapest

8. Gombos K, Szele E, Varjas T, Puskás L, Kozma L, Juhász F, Ember I: Microarray módszer alkalmazása pajzsmirigy daganatok korai felismerésében
Fiatal Higiénikusok Fóruma, 2008. május 29-31., Győr
9. Göbel Gy, Gerlinger I, Pytel J, Szanyi I, Szele E, Gombos K, Ember I: A Malignus nyálmirigy daganatok retrospektív vizsgálata az 1986-2006-os időtartamban
Magyar Epidemiológiai Társaság IV. Nemzetközi Kongresszusa, 2008.
november 25-26., Pécs

Az értekezés témájában készült idegen nyelvű posztterek

1. Szele E, Gombos K, Kovács A, Ember I: Feeding purified glycerol from Biodiesel to CBA/CA mice: effects on single strand DNA damage inducible GADD45 α and NF κ B expressions
Eighth International Conference of Anticancer Research, 2008. október 17-22.,
Kos, Görögország
2. Ember I, Gombos K, Varjas T, Kiss I, Szele E, Puskás L, Kozma L, Juhász F, Varga Zs, Ember Á: Characterization of microarray gene expression profiles of thyroid tumours
Dubai International Oncology Conference, 2007. február 19-27., Al Ain,
Egyesült Arab Emírségek
3. Kádár B, Gombos K, Szele E, Göbel Gy, Szanyi I, Ember I: Effects of Isoflurane on NF κ B1, GADD45 α JNK1 expressions in the vital organs of CBA/CA mice
Eighth International Conference of Anticancer Research, 2008. október 17-22.,
Kos, Görögország
4. Gombos K, Szele E, Puskás L, Kozma L, Juhász F, Göbel Gy, Szanyi I, Ember I: Analysis of the connections between signal transduction mechanisms in early stage thyroid tumours
Eighth International Conference of Anticancer Research, 2008. október 17-22.,
Kos, Görögország

5. Göbel Gy, Gerlinger I, Pytel J, Szanyi I, Szele E, Gombos K, Ember I: Malignus nyálmirigy daganatok epidemiológiai sajátosságai
Népegészségügyi Tudományos Társaság XVII. Nemzetközi Kongresszusa,
2009. április 17-18., Marosvásárhely

Az értekezés témájában készült magyar nyelvű poszterek

1. Szele E, Gombos K, Varjas T, Puskás L, Kozma L, Juhász F, Ember I: Microarray módszer alkalmazása a pajzsmirigy daganatok korai felismerésében
Népegészségügyi Tudományos Társaság XVI. Nemzetközi Kongresszusa, 2008. április 17-19., Pécs
2. Szele E, Gombos K, Ember I: Az SZME2 biodízel előállítás során nyert tisztított glicerín frakció NFKB, JNK és GADD45A génekre gyakorolt hatásának vizsgálata állatkísérletes modellben
Magyar Epidemiológiai Társaság IV. Nemzetközi Kongresszusa, 2008. november 28-29., Pécs
3. Szele E, Gombos K, Kovács A, Ember I: Biodízel-glicerín hatása a sejttúlélésben kulcsszerepet játszó microRNS-ek és messenger RNS-ek kifejeződésére BALB/c egerekkel végzett rövidtávú állatkísérletes modellben
Magyar Epidemiológiai Társaság VI. Nemzetközi Kongresszusa, 2011. november 25-26., Pécs
4. Gombos K, Szele E, Herczeg M., Brunner Zs, Szanyi I, Molnár K, Gergely P, Mucsi Gy, Varga Zs, Ember I: Effects of VitaCalen consumption on the survival of CBA/CA mice
Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság Kongresszusa, 2006. november 3-5., Pécs
5. Gombos K, Szele E, Varjas T, Puskás L, Kozma L, Juhász F, Ember I: Jelátviteli mechanizmusok összefüggéseinek vizsgálata pajzsmirigy daganatokban
Kertai emlékülés, 2007. június, Pécs
6. Gombos K, Szele E, Varjas T, Puskás L, Kozma L, Juhász F, Ember I: Jelátviteli mechanizmusok összefüggéseinek vizsgálata pajzsmirigy daganatokban
Népegészségügyi Tudományos Társaság XVI. Nemzetközi Kongresszusa, 2008. április 17-19., Pécs
7. Kádár B, Gombos K, Szele E, Beregi A, Varga Zs, Sebestyén A, Ember I: Az izoflurán onko- és tumorszuppresszor génekre kifejtett hatásának vizsgálata CBA/Ca egerekben
Népegészségügyi Tudományos Társaság XVI. Nemzetközi Kongresszusa, 2008. április 17-19., Pécs

8. Kádár B, Gombos K, Szele E, Göbel Gy, Szanyi I, Ember I: Az Isoflurane hatása az NFkB1, JNK1 és GADD45 α gének expressziós mintázatára
Magyar Epidemiológiai Társaság IV. Nemzetközi Kongresszusa, 2008. november 28-29., Pécs
9. Göbel Gy, Gerlinger I, Pytel J, Szanyi I, Szele E, Gombos K, Ember I: A Malignus nyálmirigy daganatok retrospektív vizsgálata az 1986-2006-os időtartamban
Magyar Epidemiológiai Társaság IV. Nemzetközi Kongresszusa, 2008. november 28-29., Pécs
10. Gombos K, Szele E, Göbel Gy, Puskás L, Kozma L, Juhász F, Ember I: Pajzsmirigy daganatok génexpressziós profiljának meghatározása cDNS microarray módszerrel. Magyar Epidemiológiai Társaság IV. Nemzetközi Kongresszusa, 2008. november 28-29., Pécs

X. Megjegyzés

A dízel motorokban használatos biodízel előállításával kapcsolatos vizsgálatok végzésére a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Orvosi Népegészségtan Intézete egy konzorcium tagjaként a Nemzeti Kutatási és Technológiai Hivatal (korábban: Nemzeti Kutatási és Fejlesztési Programok) Jedlik Ányos Program keretében meghirdetett pályázatainak keretében két alkalommal kapott támogatást.

Első alkalommal *„Technológia és állati takarmány kompozíciók biodízel G-fázis melléktermék hasznosításával”* címen (azonosító: NFKP07-aAGROÖK07) nyert támogatást a kukorica eredetű biodízel melléktermékekkel kapcsolatos vizsgálatok végzésére.

Második alkalommal *„Fenntartható biodízel technológia és hozzáadott értékű melléktermékek”* címmel (azonosító: TECH-09-A4-2009-0133, BDREVAM2) 2009-ben kapott támogatást interdiszciplináris projektjére.

Dolgozatomban ismertetett vizsgálatainkat fenti két pályázat keretében végeztük.

XI. Köszönetnyilvánítás

A primer prevencióval, daganatkutatással és a molekuláris epidemiológiával kapcsolatos érdeklődésemet - hatalmas szakmai tapasztalatával, elhivatottságával és nem utolsósorban személyisével - Prof. Dr. Ember István keltette fel. Professzor Úr tanítványaként sajátítottam el valamennyi, értekezésem témájához kapcsolódó ismeretemet. Tudományos munkám a kezdeti lépésektől dolgozatom elkészültéig nyomon követte, tanácsai, építő jellegű kritikái segítettek folyamatos fejlődésem. Nem csupán értekezésem létrejöttéhez nyújtott tanításáért és támogatásáért tartozom Professzor Úr emlékének köszönettel, hanem tudományos lelkesedésre való szeretetteljes neveléséért. Köszönöm továbbá, Prof. Dr. Kiss István témavezetőm szakmai tanítását és támogatását.

Köszönöm Dr. Kovács András közreműködését a pályázat kezelésében és a vizsgálati anyagok rendelkezésre bocsátásában.

Köszönöm Dr. Gombos Katalinnak valamennyi vizsgálatomban történt közreműködését és szakmai segítségét.

Köszönöm a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Orvosi Népegészségtan Intézet valamennyi munkatársának a vizsgálataink végzésében és kongresszusi részvételek szervezésében nyújtott adminisztratív segítségét.

Köszönöm munkahelyi vezetőim és munkatársaim támogatását.

Köszönöm családomnak szeretetüket, türelmüket, figyelmességüket és gondoskodásukat, mellyel dolgozatom összeállítása során segítettek és lehetővé tették, hogy otthonomban munkámra összpontosíthassak.