

Tumorpromócióban szerepet játszó gének expresszió-változásainak vizsgálata tartósítószer expozíció hatására

Soltész Dorottya¹, Raposa L. Bence¹, Szijártó György Ágoston¹,
Gubicskóné Kisbenedek Andrea², Varjas Tímea¹

¹Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar,
Orvosi Népegészségtani Intézet

²Pécsi Tudományegyetem Egészségtudományi Kar, Fizioterápiás és
Táplálkozástudományi Intézet, Táplálkozástudományi Tanszék

Összefoglalás

Az adalékanyagok alkalmazása az élelmiszeriparban rendkívül gyorsan elterjedt a világon. Szinte minden élelmiszercsoportban alkalmazzák, az évek során folyamatosan növekvő számban és mennyiségben. Az élelmiszeradalékok legfontosabb csoportját képezik a tartósítószer. Fogyasztásuk terhelheti a májat, túlérzékenységet okozhat, kihat a gyermekek esetében a viselkedésre, kockázati tényezőként szerepelhet krónikus betegségek kialakulásában. Munkánk során intézetünkben kidolgozott állatkísérletes tesztrendszerben vizsgáltuk két széles körben elterjedt tartósítószer, a Na-benzoát* (E211) és a K-szorbát† (E202) génexpresszióra gyakorolt hatását. A kísérleti csoportok 6-6 db 6 hetes CD1 egeret tartalmaztak, melyek 3 héten keresztül speciális oldatot kaptak. Az oldat fogyasztása során 0,5-szörös, illetve 5-szörös ADI (humán ekvivalens) dózisnak voltak kitéve az állatok. A 21. napon cervicalis dislocacio után az egereket felboncoltuk; szerveiket kiemeltük, májukból, veséjükől RNS-t izoláltunk. Kvantitatív Real Time PCR-rel határoztuk meg az NFκB, MAPK8, GADD45α génexpressziós mintázatokat mRNS szinten. Eredményeink azt mutatják, hogy mindkét tartósítószer hatással van daganatok kialakulásában szerepet játszó vizsgált gének expressziós mintázatára, szignifikáns különbségeket tapasztaltunk mindkét szerv esetén. A K-szorbát és a Na-benzoát génexpresszió módosító hatása arra enged következtetni, hogy e tartósítószer folyamatos fogyasztása megemelhetheti a daganatok kialakulásának kockázatát valamint hogy ezen szerek a génaktivációs folyamatokat befolyásolhatják.

Kulcsszavak: karcinogenezis, génexpresszió, Na-benzoát, K-szorbát

The examination of changes on the impact of preservatives in the expression of the genes which play role in tumor promotion

Summary

The food industrial usage of additives were rapidly spread around the world. Almost in all food groups use them and steadily increasing their number and quantity. The most important group of food additives are the preservatives. Our consumption interfere with the liver, may cause hypersensitivity, as risk factor can affect children's behavior and may play role in induction of chronic disease. In our study we examined two widely used preservatives: sodium benzoate (E211) and potassium sorbate (E202) gene expressional effect in animal test system. (The examination protocol developed in our institute). Each examined group were included six week old, type CD1 mice, which trough 3 weeks consumpt special solution. The treated groups exposed with 0,5x and 5x acceptable daily intake (based on human equivalent dose). At the 21st day, after the cervical dislocation, during the autopsy we had taken samples from the livers and kidneys then we isolated RNA with Trizol protocol. The gene expressions (NFκB, GADD45α, MAPK8) were determined with Quantitative Real Time PCR in GeneAmp® 5700 Sequence Detection System appliance (Applied Biosystems). Our results representate that each preservatives had effect on tumour promotion. We find significant differences at both of organ. This preservative's gene expression modificational effect suggest that the continous consumption of the examined additives can increase the risk of tumour.

Keywords: carcinogenesis, gene expression, sodium benzoate, potassium sorbate

*Na-benzoát = Nátrium benzoát

† K-szorbát = Kálium szorbát

Bevezetés

A 21. századra jellemző civilizációs betegségek okai egyre több kutatási eredmény bi-
zonyítja a helytelen táplálkozás szerepét.
Egyre változnak az élelmiszeripari eljárások,
a felhasznált nyersanyagok és a hozzájuk
adott segédanyagok mennyisége és minősé-
ge is. Rendkívül gyorsan elterjedt a világon
az élelmiszer adalékanyagok használata [1].
Ezen komponensek nagy csoportját képví-
selik a tartósítószer, melyekkel megővít-
jük a romlástól például a margarinokat, gyü-
mölcsleveket, konzerveket, borokat, pékáru-
kat, kenyelmi termékeket (szósok, félkész-
készletek, öntetek, ételporok) [2, 3]. A tar-
tósítószereknek számos kockázata lehet az
emberi szervezetre. Fogyasztásuk terhelteti
a májat, túlerékennyiséget okozhatnak, kihat-
hat gyermekesetben a viselkedésre is, nem
utolsó sorban a daganatos megbetegedések
okozói lehetnek, s még számos negatív ha-
tásról jelentek meg tanulmányok [4, 5]. Nap-
jaink vezető halálokaik közé tartoznak a da-
ganasz megbetegedések A WHO jelen-
tesében közölte, hogy a világ összhálalozási
okai között a tumoros megbetegedések a
második helyet foglalják el [6].
A tartósítószer, például a nátrium-benzoát és
a kálium-szorbát található meg szinte majd-
nem minden élelmiszerben [7, 8]. Ezáltal a
lakosság fokozott expozíciónak van kitéve.
Számos tanulmány jelent meg a témával kap-
csolatban. Közülük is A Bouchard-Mercier,
valamint szerzőtársai közleményben arról
adnak igazolást, hogy a táplálkozási szoká-
sok hatással vannak a gének expresszió-
ra, Ha a daganatos kialakulására [9]. Ha a
gyakran alkalmazott adalékoknak igazolha-
tán betegségkeltő szerepük van, népegész-
ségügyi problémával állhatunk szemben.

alakulásában szerepet játszó gének expresszi-
ós sajátosságait figyeltük meg. Az általunk
kiválasztott gének az NFkB (nuclear factor
kappa-light-chain-enhancer of activated
B-cells), a GADD45α (growth arrest and
DNA damage inducible gene) és a MAPK8
(Mitogen-activated protein kinase 8), me-
lyek sejtproliferációban betöltött és anti-
apoptotikus szerepe jelentős [10].
Az NFkB egy Toll-like receptorokon, TNFα
receptoron, Tirozin kináz receptoron és ad-
héziós receptorokon (pl. T-sejt receptorok)
keresztül aktiválódó transzkriptációs faktor,
amely elsősorban a sejttúlélést és sejtprolifera-
ciót segíti elő. Széleskörű receptorális akti-
vációja miatt számos fizikai és biológiai ha-
tás képes aktiválni (bakteriális, virális antige-
nek, UV, lymphotoxin, TNFα, szabadgyö-
kök stb). Aktivációjakor a sejt túléléséhez
szükséges antiapoptotikus folyamatokat elő-
segítő és az apoptotikus folyamatokat gátló
fehérjék átíródását serkenti [11].
A GADD45α egy magfőhártya, mely normál
szövetekben leginkább nyugalmi fázisban
lévő sejtekben expresszálódik. Mennyisége
a G1 sejtciklusban a legmagasabb, és az S fá-
zisban a leginkább csökkent. A gének stresszvá-
laszok szabályozásában vesz részt, külső ha-
tásokra (UV fény, röntgen és gamma sugár-
zás, genotoxikus és toxikus kémiai anyagok)
indukálódik, így szerepet játszik a daganat-
os kialakulásában [11].
A MAP kinázok különböző regulációs me-
chanizmuson keresztül fejtik ki szabályozó
hatásukat. Három regulációs szinten mű-
ködnek, transzkriptcionális, transzlációs és
poszttranszlációs szinten, több sejtfunkció-
ban szerepet játszanak, mint például a
proliferációban, differenciálódásban, transz-
zkriptációs szabályozásban. Különböző celluláris
stresszfolyamatok (TNF-alfa) és sejt-kü-
li stimulációk (UV sugárzás, xenobioti-
kumok) hatására aktiválódnak, a gének korai
gének expresszióval reagál a sejtet ért ingerek-
re, így gének expressziójának detektálása
biomarkerként is alkalmazható. MAP 8 részt
vesz, az UV sugárzás által kiváltott apop-
tózisban, kapcsolatban áll a citokrom-C által
közvetített sejt-halál útvonallal [12].

Anyag és módszer

Molekuláris epidemiológiai vizsgálatunkat kontrollcsoport mellett, állatkísérletes tesztrendszerben végeztük. A mintaválasztás eredményeként csoportonként 6-6 db, 6 hetes nőstény CD1 egereket (42 db) alkalmaztunk, génexpressziós sajátosságai miatt. Vizsgálatainkhoz felhasználtuk a kiválasztott tartósítószeret, célcsoportonként különböző dózisokban, a humán ekvivalens dózist figyelembe véve. A csoportbeosztást az 1. táblázat foglalja össze. A kísérlet ideje alatt az állatok tartósítószerrel kevert ivóvizet kaptak. A vizsgált anyagok molekula specifikációit tekintve a nátrium-benzoát kémiai úton a nátrium-hidroxid és a benzoésav reakciója során keletkezik, nem öli meg a baktériumokat és a gombákat, a szaporodásukat teszi szinte lehetetlenné (bacteriostaticum). Hatását csak erősen savas pH esetén ($<3,6$) tudja kifejezni [Nátrium-benzoát granulátum, Uniken Kft., azonosító sz.: B-001764]. A kálium-szorbátot többlépcsős kémiai reakcióval szorbinsavból szintetizálják, gátolja az élesztők, a penészgombák és néhány baktérium növekedését. Nincs csíraölő hatása, ezért csak higiéniailag kifogástalan termékek eltarthatóságát hosszabbítja meg. Hatékonysága savas közegben ($\text{pH} < 6,5$) a legnagyobb [Kálium-szorbát, Kerttrade Kft., OÉTI eng.sz.:

1294./1994. OÉTI]. Cervicalis dislocatiót követően az egereket felboncoltuk, májukat és veséjükét kiemeltük. Az így nyert szövetből Trizol protokoll alapján total RNS-t izoláltunk. A génexpressziókat ($\text{NF}\kappa\text{B}$, $\text{GADD45}\alpha$, MAPk8) kvantitatív RT-PCR-rel határoztuk meg, SYBR Green protokoll szerint, ROSCHE LightCycler 480 készülék segítségével. A gép rendelkezik egy beépített normál PCR géppel és egy CCD kamerával. Az emittált fluoreszcens jeleket 500-600 nm között detektálja. Az eredményként kapott fluoreszcens extinciót egy AD-konverteren keresztül számítógépes program segítségével értékeltük ki. A primereket a Primer ExpressTM Software-rel (Applied Biosystems) terveztük, az Integrated DNA Technologies szintetizálta. A hőprogramot a kit protokolljában leírtak szerint programoztuk be, a plate felépítése az 1. ábrán látható. A relatív génexpressziókat „comparative CT method”-dal határoztuk meg és egy belső, ún. „housekeeping” (*HPRT1-Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase*) génhez viszonyított értékeket számoltunk. A statisztikai elemzéseinkhez SPSS 21 szoftvert alkalmaztunk. Eredményeink kiértékeléséhez ANOVA tesztet majd post-hoc elemzéseket végeztünk. A szórás és a megoszlás megállapításához Kolmogorov-Smirnov tesztet használtunk.

1. csoport	Na-benzoát 0,5x expozíció
2. csoport	K-szorbát 0,5x expozíció
3. csoport	Na-benzoát 5x expozíció
4. csoport	K-szorbát 5x expozíció
5. csoport	Na-benzoát+K-szorbát 0,5x expozíció (mix)
6. csoport	Na-benzoát+K-szorbát 5x expozíció (mix)
7. csoport	Kontroll csoport (nem adagoltunk nekik tartósítószer)

1. táblázat
A CD1 egerek csoportbeosztása

‡ADI = Acceptable Daily Intake (Ajánlott napi beviteli mennyiség)

Eredmények

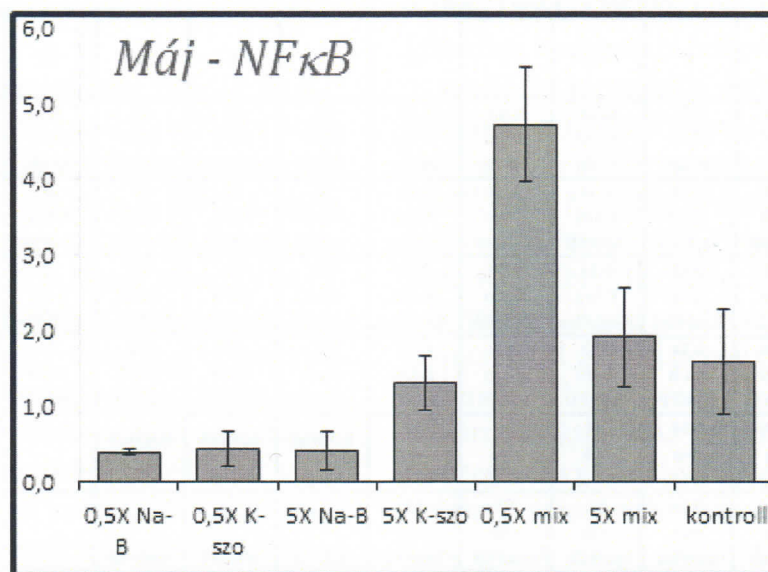
Vizsgálatunkban három, a dagاناتok kialakításában szerepet játszó gén expressziós mintázatait figyeltük meg a HPRT1-hez, mint belső kontroll génhez viszonyítva.

Az NFkB esetében a kontroll csoporthoz képest mind a kálium-szorbát mind a nátrium-benzoát 0,5-szeres ADI* mennyiségével kezelt csoport egyedeinek májában mért mRNS szint szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontroll csoportban mért mRNS szint. Hasonló képet mutatott az 5-szörös ADI-t fogyasztó egerek májában detektálható gén-expresszió, az 5-szörös ADI kálium-szorbát expozíciónak kitett egerekben azonban nem volt szignifikáns overexpresszió. Megfigyeltük azonban, hogy a két vegyület együttes adagolása 0,5-szeres ‡ADI expozíció esetén szignifikáns (majdnem háromszoros) emelkedést okozott az NFkB expresszióban a

kontroll csoporthoz képest. A két tartósítószert együttesen tartalmazó oldatot fogyasztó csoportok esetében a 0,5-szeres ADI dózis kapó egyedek májában NFkB expresszió változása jelentős overexpressziót (két és fél-szeres) mutat az 5-szörös ADI dózist fogyasztó csoporthoz képest (2. ábra). A GAD45α esetében a 0,5-szeres ADI expozícióval kezelt egerek csoportjánál se a nátrium-benzoát, se a kálium-szorbát esetén nem igazolódott overexpresszió a kontroll csoporthoz képest. Hasonlóan nem okozott szignifikáns eltérést egyik tartósítószer 5-szörös engedelylezett napi beviteli mennyiség fogyasztása sem. Megfigyelhető azonban, hogy mindkét tartósítószer 0,5-szeres ADI mennyiségben tartalmazó oldatot fogyasztó egerek májában szignifikáns, 3,85-szoros génextpresszió növekedés volt a kontroll csoporthoz képest (3. ábra).

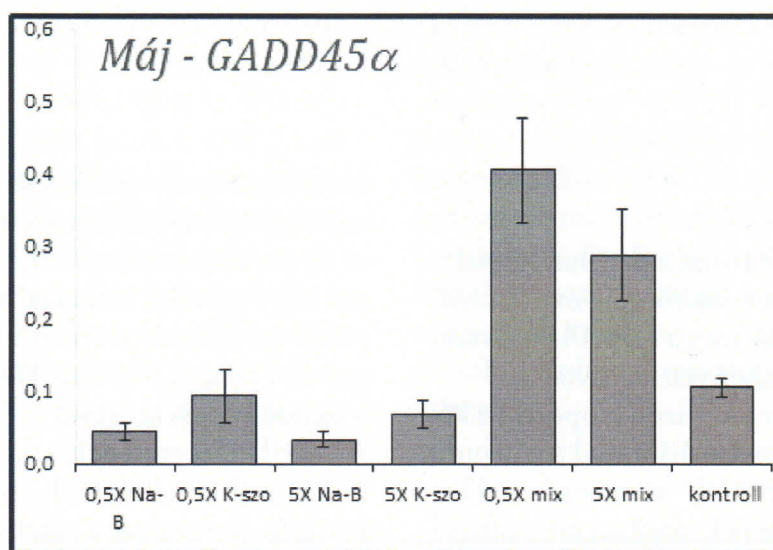
1. ábra
A PCR plate összeállítás

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
H	0.5X HPRT1	0.5X GAD45α	0.5X GAD45α	0.5X GAD45α	0.5X GAD45α	0.5X GAD45α	0.5X GAD45α	0.5X GAD45α	0.5X GAD45α	0.5X GAD45α	0.5X GAD45α	0.5X GAD45α
G	0.5X MAPK8	0.5X MAPK8	0.5X MAPK8	0.5X MAPK8	0.5X MAPK8	0.5X MAPK8	0.5X MAPK8	0.5X MAPK8	0.5X MAPK8	0.5X MAPK8	0.5X MAPK8	0.5X MAPK8
F	0.5X NFkB	0.5X NFkB	0.5X NFkB	0.5X NFkB	0.5X NFkB	0.5X NFkB	0.5X NFkB	0.5X NFkB	0.5X NFkB	0.5X NFkB	0.5X NFkB	0.5X NFkB
E	0.5X HPRT1	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B
D	0.5X GAD45α	0.5X GAD45α	0.5X GAD45α	0.5X GAD45α	0.5X GAD45α	0.5X GAD45α	0.5X GAD45α	0.5X GAD45α	0.5X GAD45α	0.5X GAD45α	0.5X GAD45α	0.5X GAD45α
C	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B
B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B
A	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B	0.5X Na-B



2. ábra

A CD1 egerek májában detektált NFκB mRNS expressziós változásai



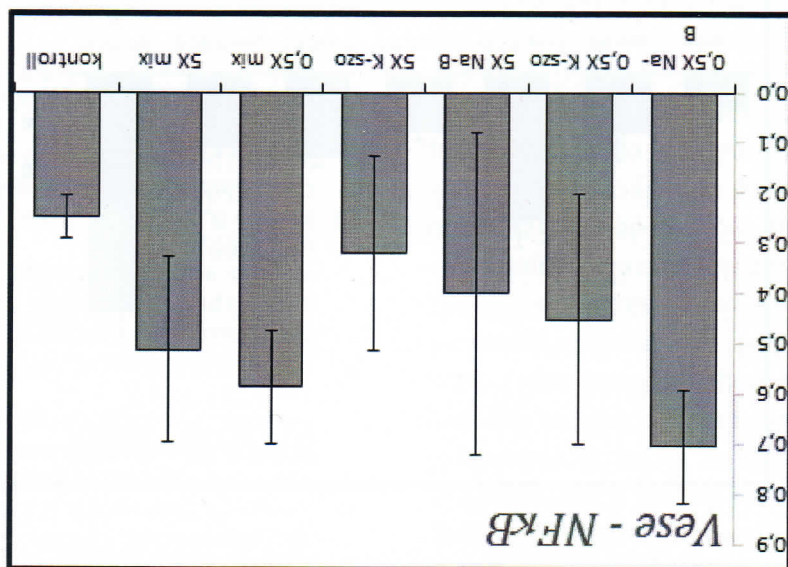
3. ábra

A CD1 egerek májában detektált GADD45α mRNS expressziós változásai

A MAPK8 gén 5-szörös ADI K-szorbát fogyasztás hatására szignifikáns overexpressziót mutatott a kontroll csoporthoz képest (1,9-szeres), a 0,5-szeres ADI K-szorbátot fogyasztó egerek májában szignifikánsan alacsonyabb volt a mRNS szint, mint a kontroll csoport egyedeinek májában (kevesebb, mint fele). A 40 napos 0,5-szeres ADI Na-benzoát expozíció hatására is szignifikánsan alacso-

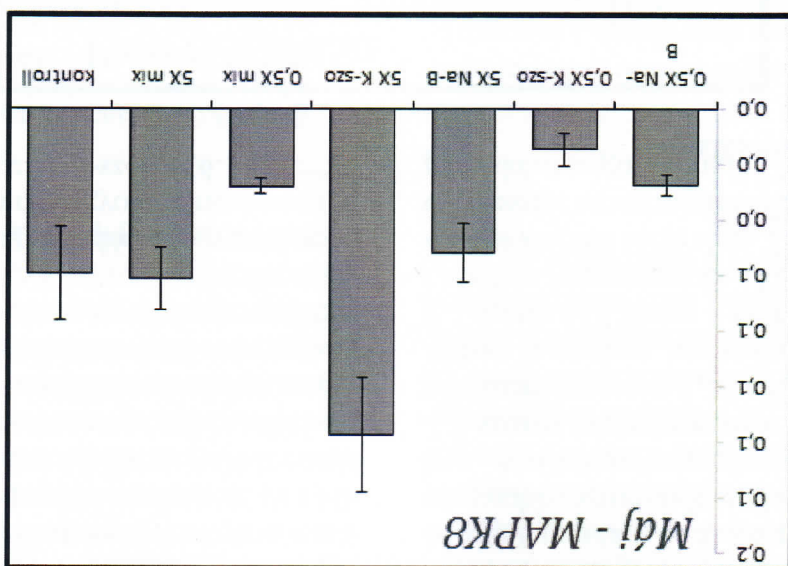
nyabb MAPK8-mRNS szintet detektáltunk, míg a nagyobb dózis fogyasztására a kontroll csoporttal megegyező szintet mértünk. Hasonlóan a mindkét tartósítószerből 0,5-szeres ADI-t fogyasztó egerek májából izolált RNS szignifikánsan alacsonyabb expressziót mutatott, a nagyobb dózis a kontroll csoporthoz hasonló expresszióval rendelkezik (4. ábra).

5. ábra
A CD1 egerék veséjében detektált NFκB mRNS expressziós változásai



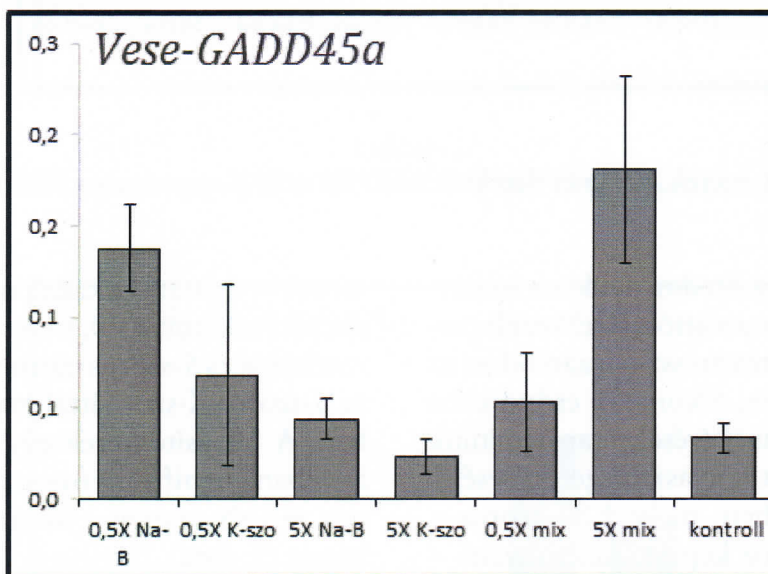
A vese esetében az eredmények azt mutatják, hogy minden tartósítószerrel kezelt csoport esetében overexpresszió igazolódott az NFκB génre nézve, a kontroll csoporthoz képest. Szignifikáns eltéréseket tapasztaltunk a 0,5-szeres ADI-t fogyasztó egerék veséjéből izolált RNS-ben, mely 2,83-szorosa a kontrollcsoporthoz képest. Alacsonyabb – 1,81-szorosa és 1,61-szorosa valamint 1,28-szorosa –, de statisztikailag nem szignifikáns eltérést találtunk a 0,5-szeres ADI kálium-szorbáttal és 5-szörös nátrium-benzoáttal és az 5-szörös K-szorbáttal exponált csoportban. A tartósítószeres együttes adagolása azonban szignifikáns overexpressziót mutatott mRNS szinten a kontroll csoporthoz képest (5. ábra).

4. ábra
A CD1 egerék májában detektált MAPK8 mRNS expressziós változásai



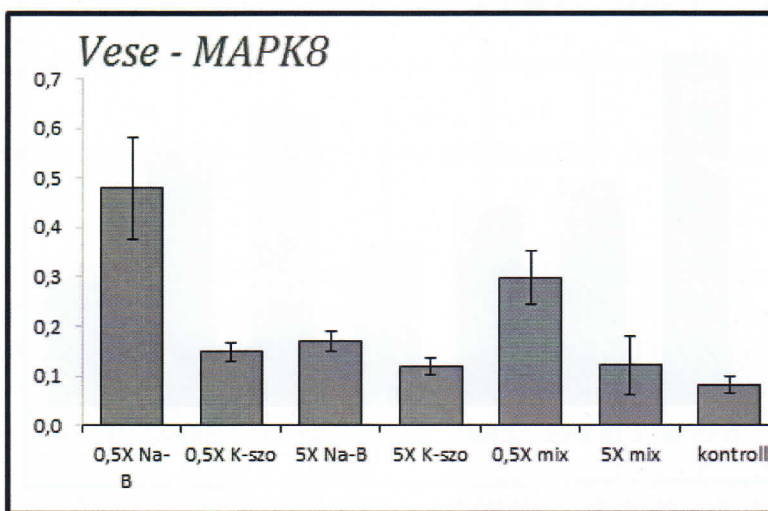
A nátrium-benzoát alacsonyabb dózisú expozíciója 3,12-szeres expressziót okozott a magasabb dózisú expozícióhoz képest, ez a különbség szignifikáns. A kálium-szorbát esetén is közelítőleg háromszoros értéket mértünk, azonban ez nem szignifikáns. Érdekes megfigyelés, hogy a mindkét tartósítószeret egyidejűleg fogyasztó csoport egyedeinek veséjében a GADD45 α mRNS expresszió fordított képet mutatott, a nagyobb dózist fogyasztó egyedekben detektáltunk nagyobb génexpressziót, értékét tekintve ez 3,38-szoros (6. ábra).

Hasonlóan a fentebb elemzett génekhez, a MAPK8 esetén is az alacsonyabb expozíció magasabb expressziót eredményezett a vesében. A nátrium-benzoát esetén több mint 2,8-szoros overexpressziót mértünk, a kálium-szorbát esetén 1,25-szörös ez az érték. Abban az esetben, amikor a kísérleti állatok 0,5-szeres ADI illetve 5-szörös ADI koncentrációban fogyasztották a két vegyület keverékét a kísérlet ideje alatt, 2,46-szoros overexpressziót tapasztaltunk. Ezen különbségek páronként szignifikánsak (7. ábra).



6. ábra

A CD1 egerek veséjében detektált GADD45 α expressziós változásai



7. ábra

A CD1 egerek veséjében detektált MAPK8 mRNS expressziós változásai

miszereket egészségünk megőrzése érdekében. Kísérleteink rávilágítottak a kockázatokra és alapot adhatnak a génexpressziós folyamatok további vizsgálatához. A daganatkeeltő hatás bizonyításához, ugyanakkor további vizsgálatok szükségesek. Ennek érdekében a jövőben eredményeinket bővítenő olyan kutatást tervezünk, mely több generáción keresztül vizsgálja az adott vegyületek génexpresszió módosító, esetleges epigenetikus hatását.

Irodalom

1. Tompa A.: A dagamatos betegségek előfordulása, a hazai és a nemzetközi helyzet ismertetése. Magyar Tudomány, 2011, 06, 1333–1345.
2. http://www.oeti.hu/download/elelmiszeradalok_es_biztonsagosaguk.pdf
3. Ma KM, Chan CM, Chung SW, Ho YY, et al.: Dietary exposure of secondary school students in Hong Kong to benzoic acid in prepackaged non-alcoholic beverages. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, (2009), 26(1):12–16.
4. Ember I.: Molekuláris és prediktív epidemiológia: Kockázatbecslés, kockázatkezelés. szerk.: Fehér K, Németh K, Prantner I, Népegészségügyi orvostan; Dialóg-Campus Kiadó, 2009, Budapest–Pécs, 182–190.
5. <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodContaminants/Adulteration/ChemicalContaminants/Benzene/ucm055815.htm> [Pécs, 2013.05.20.]
6. http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/en/index.html [Pécs, 2013.04.11.]
7. Figler M., Polyák E., Mester K., Szabó Sz.: Elemiszer-ipari adalékanyagok által kiváltott allergiás reakciók. Új-Diéta, 2007, 06; 01: 2–3.
8. Zeng N, Yüzbaşıoğlu D, Unal F, Yilmaz S, et al.: The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: Sodium benzoate and potassium benzoate. Food and Chemical Toxicology, 2013, 49; 4:763–769.
9. A. Bouchard-Mercier, A. Paradis, I. Rudkowska, et al.: Associations between dietary patterns and gene expression profiles of healthy men and women: a cross-sectional study. Nutrition Journal, 2009, 12; 24.
10. Miotto B, Struhl K.: JNK1 phosphorylation of Cdt1 inhibits recruitment of HBO1 histone acetylase and blocks replication licensing in response to stress; Mol Cell, 2011, 7; 44(1):62–71
11. Gilmore T.D.: "Introduction to NFκB: players, pathways, perspectives". Oncogene, 2006, 25 (51): 6680–4.
12. Miotto B, Struhl K.: JNK1 phosphorylation of Cdt1 inhibits recruitment of HBO1 histone acetylase and blocks replication licensing in response to stress; Mol Cell, 2011, 7; 44(1):62–71.

Megbeszélés, konklúzió

Több esetben az anyagok együttes használata kisebb expozícióban (0,5X mix) nagyobb expresszió-változást okozott, mint nagyobb dózisban adva (5X mix) a máj és a vese esetében egyaránt. Ezen hatás az anyagok egymásra gyakorolt hatásadaddikcióival illetve élő szervezetben történő metabolizációs sajátosságával magyarázható, mely esetünkben nem fokozódást, hanem a dózis-hatás fordított arányosságot mutat.

Az elvégzett molekuláris epidemiológiai vizsgálatunkban kísérleti egerek génexpressziós mintázatait hasonlítottuk össze. Eredményeink alapján elmondható, hogy a májból és veséből vett mintákból génexpresszió módosító hatását detektáltuk, GADD45α, MAPK8 és NFκB gének expressziója tekintetében, ezáltal karcinogén hatásra utaló jeleket találtunk. A több alkalommal is előforduló szignifikáns eltérések felhívják a fogyasztók figyelmét arra, hogy az élelmiszeradalékok, köztük a tartósítószeres krónikus fogyasztása, az esetleges megengedhető napi beviteli értékek felett (ADI) megemelhethet egyes krónikus betegségek kialakulásának kockázatát. A bemutatott vizsgálat tükrében kijelenthető, hogy a közeljövőben érdemes figyelni az élelmiszerbiztonsági szabályozásokat és módosításukat. Tanulmányok egyre több anyag DNS károsító hatásáról számolnak be, a hatóságok egyre szigorúbban ellenőrzik a szalagok betartását az egészségügyi hatáértékre nézve. A fogyasztók tekintetében előnyösebb az állásfoglalás, miszerint kerüljék el a tartósítószeresekkel készült, finomított élel-