

**Opponensi vélemény Eck-Varanka Bettina Mária okleveles
környezetmérnök „A kagyló mikronukleusz teszt alkalmazhatóságának
vizsgálata vízszennyező komponensek genotoxitás minősítésében”- c. PhD-
értekezéséről, amelyet a Pannon Egyetem Kémiai és Környezettudományi
Doktori Iskolájában készített.**

Általános formai követelmények teljesülése

A Pannon Egyetem Kémiai és Környezettudományi Doktori Iskolája felkért, hogy Eck-Varanka Bettina Mária PhD disszertációját már a házi védelem előtti formában is véleményezzem. Ezt elvállalva akkor a disszertáció felépítésének jelentős, legalább 50%-os átszerkesztését javasoltam, mert az eredeti kéziratban meglehetősen összefolytak a célkitűzések, módszertannal, az eredményekkel és az azok értékelésével. Akkori tanácsaimat a jelölt megfogadta.

A benyújtott, végső formájú értekezésben a bevezetés, a célkitűzések, az anyagok és módszerek, és az eredmények és kiértékelésük fejezetek máá koherensen következnek egymásból, azaz, a módszerek a célkitűzéseknek megfelelően, az eredmények az alkalmazott módszerekből fakadóan, jól elkülönítve a saját eredményeket a bemutatott más eredményekkel, és tapasztalatokkal, dacára annak, hogy a jelölt az eredményeket és értékelésüket egy fejezetbe vonta össze.

Az értekezés 94 oldal terjedelmű. Szerkezeti felépítése és tagoltsága megfelelő. Az eredményeket 26 ábra és 5 táblázat részletezi, illetve szemlélteti. Az ábrák egy része kifejezetten ügyes és a fényképek hasznosak és relevánsak, és nem pusztán dekoratív célúak. Az ábrák címei, illetve aláírásai azonban sajnos sok esetben nem teljes. Sokszor csak a szövegből világos, hogy a különböző, egymást kontrolláló geno- és citotoxikus tesztek a kagylók, prokariota baktériumok, vagy éppen házisertés spermáján detektált válaszokon alapulnak, mert az ábrák címeiben, illetve aláírásaiban ez nincs megadva. Véleményem szerint az ábrák és a táblázatok címeinek/aláírásainak következetesen teljesnek kell lennie.

A disszertáció irodalomjegyzékében 183 releváns hivatkozás szerepel, és megelégedéssel állapítottam meg, hogy a munkahelyi elővédésre benyújtott előző változathoz képest a véglegesben a jelölt referált jónéhány hazai, illetve korábbi balatoni toxikológiai eredményt is. Az irodalomjegyzékben a referált publikációk szabályosan szerkesztettek és formailag következetesek.

A disszertáció szöveges részében sajnos sok elütési hiba maradt, és fogalmazási szempontból is érdemes lett volna még egyszer átolvasni a véglegesítés előtt. Mert elég sok helyen zsurnalisztikai megfogalmazást használ a jelölt és nem tudományos írásműbe valót, és időnként olyan rutin szavakat használ sablonosan, amelyek számomra az állított dolog lényegével ellentétes értelműek.

Az általam nyelvíleg kifogásolt szövegrészek a következők:

Egy helyen ez olvasható „Az édevízi biodiverzitás indikátorai - a fajszám, a populációk sűrűsége, megújulási ideje - az elmúlt évtizedek során egyre nagyobb mértékű csökkenést mutatnak.” Nos, a fajszám és a populáció sűrűség csökkenése valóban egyértelműen mutatják,

hogy degradálódik a biológiai sokféleség. De a megújulási idő csökkenését én annak rövidülésével, azaz, a magának a megújulásnak a gyorsulásával azonosítom, ami pozitív a populáció szempontjából.

Más helyen ez olvasható: „Figyelembe véve, hogy a gazda szervezet elsődleges védelmi vonalát a hemociták képezik...” Ugyanakkor nincs szó a szövegkörnyezetben semmiféle olyan általános, vagy időszakos kooperációról, ahol lenne egy gazdaszervezet (egyébként így, egybe kell írni) és egy vele szimbiózisban élő, vagy őt parazitáló másik. Itt a pályázó gazdaszervezet alatt egyszerűen az a szervezetet érti, amelynek a hemolimfájából mintát vesz majd.

Más helyen ez olvasható: „A fiatal egyedek intenzívebb szűrőképesége alkalmassá teszi őket természetvédelmi felhasználásra is.” A „természetvédelmi felhasználás” olyan általánosított kifejezés, hogy már nem is mond semmit. Pedig nyilván a kagylók víztisztítási funkciójáról, azaz, a víz zavarosságát okozó különféle lebegőanyagok kiszűréséről, a víz átlátszóbbá tételéről van szó.

Más helyen ez olvasható: „több kagylófaj... glochidium lárváinak érzékenységét vetették össze réz-szulfátra, viszont nem tapasztaltak eltérést a fajok toxicitása között.” Itt nyilván a fajok érzékenységéről van szó és nem toxicitásáról, mert a réz-szulfátnak lehet toxicitása.

Más helyen ez olvasható: „A legelterjedtebben alkalmazott viselkedési végpontja a kagyló teszteknek a filtráció”. A filtráció annyira monoton és automatikus, hogy én nem használnám rá a „viselkedés” szót.

Más helyen ez olvasható: „Az egyes biomarkerek külön-külön nem tükrözik a szervezet egészségi állapotát.” Itt az „egészségi állapot” túl tág fogalmazás számomra, mert az mégis egy bonyolult holisztikus rendszer eredője.

Más helyen ez olvasható: „Fontos, hogy a ...kagylók állapota jól ismert legyen...lehetőleg ellenőrzött gazdálkodásból...származzanak.” Itt a „gazdálkodás” hangzik furcsán, helyette a „tenyészet” lenne jobb szó.

Más helyen a DNS károsodás „fajtáiról” értekeznek a jelölt, de a „fajta” a biológiai szaknyelvben taxonómiai vonatkozású – háziasított fajok domesztikált változatait nevezzük fajtáknak – én a DNS károsodás típusairól beszélnék.

Más helyen a jelölt minden előzmény nélkül a flow citométerre adaptált „kansperma” tesztről ír egy mondatot, ráadásul hivatkozás nélkül, és jóval később derül csak ki, hogy sertésről spermáról van szó.

Más helyen így ír a jelölt „A kezelés kezdetén átválogattam a kagylókat, hogy csak egy meghatározott mérettartományba eső egyedeket használjam. Ez nagyjából a 6 – 8 cm hosszú kagylókat jelenti”. Ez a mondat a módszertani fejezetben inkább szakácskönyvek és étel receptek stílusa és nem tudományos.

Nem értettem ezt mondatot: „A kiértékeléshez a genotoxikus hatásra az összes párhuzamos kút közül pozitív színreakciót adó kutak százalékos arányát kell megadni.” Mi az a „kút” ebben a kontextusban?

Más helyen így fogalmaz a jelölt: „Ezután 30 percig hagytam – mármint a rázatott mintát – pihenni.” A „pihenni” szó az analitikai kémiában elfogadott kifejezés?

Más helyen ez szerepel: „A mérés során ...4,6 illetve 8 nap elteltével...” . Szerintem a „mérés” helyett az „inkubáció” a helyes kifejezés, hiszen a jelölt időben zajló folyamatot vizsgált.

Több helyen következetlen a „Khinégyzet”, χ^2 használata, hol kiírva, hol görög betűt alkalmazva;

A fajnevekből a genuszra vonatkozó név sok helyen az első előfordulás után is ki van írva, más helyen csak a kezdőbetűvel jelezve. A genusz nevet az első előfordulás után már csak a kezdőbetűvel kell említeni.

Ezek voltak a számomra feltűnő fogalmazásbeli, illetve stílusbeli hibák amelyekhez hasonlóak elkerülésére a pályázónak további kutatói pályafutása során érdemes majd önmagát dresszíroznia.

A dolgozat külső megjelenése jó.

Tartalmi észrevételek:

Az értekezés témája újszerű, aktuális, és korunk egyik globális problémájának, élővízeink és ivóvíz bázisaink növekvő környezeti szennyezőkkel való terhelése kimutatásának módszertani bővítésével nagy közegészségügyi és társadalmi jelentőséggel bír;

A szakirodalom feldolgozásának színvonala megfelelő;

A feldolgozás tartalmazza a témával összefüggő fontosabb tudományos előzményeket;

A jelölt elemző módon, kritikailag dolgozza fel a téma irodalmát;

A jelölt a célok megfogalmazásakor támaszkodott a már ismert tudományos eredményekre;

A célokkal és az alkalmazott módszerekkel kapcsolatban az alábbiakat állapítottam meg.

- A jelölt a mikronukleusz teszt megbízhatóságát kívánta – nagyon helyesen – sokoldalúan bizonyítani különféle tesztobjektumokon, elsősorban édesvízi kagylókon, változatos természetes és antropogén eredetű potenciálisan genotoxikus környezeti anyagokra. A jelölt vizsgálta, hogy a mikronukleusz teszt alkalmas-e, és milyen határok alkalmasak között erre? Vizsgálta, hogy az édesvízi kagylófajok között van-e érzékenységbeli különbség, amennyiben a mikronukleuszt teszt esetükben működik? Ehhez a jelöltnak ellenőriznie kellett, hogy a különféle alkalmazott környezeti anyagok valóban rendelkeznek-e genotoxikus, azaz, a gének, kromoszómák, vagy a teljes genom mutációjával járó olyan hatással, amelyet egyenes következménye a mikronukleusz képződés, amely kvantifikálható? Azaz, hogy egy kromoszóma darab a sejtosztódás során nem jut be az utódsejbe, hanem saját sejtmaghártyával körbevéve a sejtmag mellett jelenik meg, ez vizualizálható, és mennyisége összefüggésbe hozható a genotoxikus hatás erősségével. Továbbá, a jelölt igyekezett számos kísérleti körülményt kinetikailag optimalizálni (a tesztorganizmusok kora, mérete, hatásgörbék felvétele az inkubációs időkre vonatkozóan, stb. Azaz, úgy optimalizálni a mikronukleusz tesztet, hogy az később esetleg újtára bocsátható legyen az általánosan elfogadott, nemzetközi

teszteljárások körébe! Nem ez volt ugyan a disszertáció célkitűzése, csupán a mikronukleusz teszt alkalmazhatóságának vizsgálata a vízszennyező komponensek genotoxicitás minősítésében, de ez lenne a téma későbbi legfőbb értéke!

- A kutatási megközelítések és módszerek a célkitűzések teljesítéséhez teljesek. A téma abszolút releváns a Pannon Egyetem Kémiai és Környezettudományi Doktori Iskola feladataihoz.
- A jelölt által alkalmazott módszerekkel kapcsolatban az alábbi kérdéseket teszem fel:

- Tudvalévő, hogy az eukariota sejtek mitokondriumai evolúciós eredet szempontjából ősi szimbionta baktériumok, amelyek saját genetikai állománnyal rendelkeznek. A mitokondriumok a sejt energiaigényének megfelelően roppant dinamikus és gyorsan képesek lamelláikat megtöbbszörözni, és sejten belül szaporodni. Képződhetnek-e mitokondriális „mikronukleuszok”, és ha igen, akkor az alkalmazott festési módszer alkalmas volt-e ezek a megkülönböztetése az igazi sejtmagok körül képződő membránnal határolt mikronukleuszoktól? További kérdésem, hogy van-e már erre vonatkozó irodalom. Mert, ha nincs, akkor ez a kérdés az eukariota sejtre ható genotoxicitás sokkal szélesebb értelmű megközelítését kínáló új tudományos irányzat lenne. Lehetne-e a genotoxicitást a mitokondriális örökítő anyagra is külön értelmezni, „sejtorvosi” szempontból, lehet-e ilyen diagnózist kimutatására alkalmas differenciált rutinmódszert kidolgozni?

- Ehhez kapcsolódó kérdésem, hogy a Giemsa oldat, amely a metilénkék, az azúr és az eozin keveréke, hagyományosan a DNS foszfát csoportjait festi meg, de alapvetően megfesti az összes többi adenin-timin kötéseket is, és így a fentemlített más sejtalkotókat is. A kérdésem nem kritikai, csak kíváncsi vagyok, hogy a mikronukleusz tesztben egyértelműen sejtmag-eredetű mikronukleuszok vizualizálhatók-e, vagy esetlek mitokondriumokból kivált fragmentumokat is?

- A jelölt az irodalomból idézi, hogy a tesztet halak veséjéből és uszonyából gyűjtött vörösvértestek vizsgálatára is alkalmazzák, gondolom genotoxicitással bíró környezeti hatások detektálására. De ismereteim szerint a vörösvértestek már csak végtermékek, sejtmagvuk és mitokondriaikat elvesztették, és nem osztódnak. és gondolom, ezáltal genetikai állományuk legalábbis már inaktív. Jól gondolom-e?

- Pontosabban milyen funkciójú hemolimfa sejteken detektált a a jelölt a kagylókra ható genotoxikus hatásokat?

- Van-e már valamiféle korábban megállapított megbízható összefüggés az összehasonlító tesztek (SOS Chromoteszt *Escherichia coli*-n, AMES-teszt *Salmonella typhimurium*-on, flow citométeres sertés sperma teszt) által kimutatott genotoxikus (citotoxikus?) hatások és a mikronukleusz teszt által detektálhatóak között? E tesztekkel ugyanis a jelölt azt ellenőrizte, hogy valóban genotoxikusak-e a változatos szennyezőforrások, amelyek felhasználásával a jelölt a kagyló mikronukleuszt tesztet optimalizálta?

- Roppant izgalmasnak és társadalmi szempontból is fontosnak tartom a kétféle szennyvíz próbatesztelését genotoxikus hatásra. Annál is inkább, mert a gyógyszermaradványok

eltávolítása a szennyvíztisztításban még megoldhatatlan. Továbbá, mert a szennyvíziszapok elhelyezése krónikus probléma, miközben a háttérben ezek „kereskedelme” egész üzletággá felődlött. Lehet-e tudni a néhány alapvető adatot a vizsgálatokra kiválasztott szennyvizekben előforduló vegyületek természetéről és nagyságrendi koncentrációjáról?

- Úgy a jelölt eredményei, mint nemzetközi tapasztalatok szerint a kagylók DNS károsodása genotoxikus hatásra az inkubációk első néhány napján fokozódott, majd fokozatosan lecsökkent a kontrollok szintjére. A jelölt adaptív válasza hivatkozik, amelyek mechanizmusa nem ismert. De mégis, mit gondol a jelölt, milyen természetű lehet az adaptív válasz, a védekező mechanizmus?

- Az tesztelt allelopatikus és gyógynövények hatóanyagainak egy része ősi természetes gyógyszer, más része kifejezett élvezeti szer (élénkítő és méregtelenítő teák stb.). De kiderült, hogy a teáknak is lehetnek geno- és citotoxikus hatása. Lehet ez olyan erősségű, hogy megváltoztathatja hozzáállásunkat egyik- másik gyógyhatásának ismert főzet iránt?

- A jelölt a disszertáció végefelé a balatoni vizsgálatoknál megjegyzi, hogy „...a genotoxikus anyagoknak nincs küszöbértékük (DNS károsodás bármilyen is mennyiség hatására létrejöhet).” Kérdésem, hogy ez egyformán igaz-e a prokariota baktériumokra, amelyeket közvetlenül körbevesz a genotoxikus anyagot tartalmazó víz, és a nagy és differenciált testtel, szervekkel, szövetekkel rendelkező élőlényekre?

A jelölt disszertációja végeredményeit hat tézispontban foglalta össze. Ezeket a tudomány számára újak tartom, mind a hatot elfogadom, a disszertációt alkalmasnak találom és javaslom a disszertáció nyilvános vitára bocsájtását, a disszertációt elfogadhatónak tartom, mint a doktori fokozat megadásának alapját!

Tihany, 2019. szeptember 5,

B. G-Tóth László

Prof. G.-Tóth László DsSc, tudományos tanácsadó,
egyetemi tanár, opponens