

Válasz
doktori (Ph.D.) értekezés bírálatára

szerző:

Eck-Varanka Bettina Mária

Dolgozat címe:

**A kagyló mikronukleusz teszt alkalmazhatóságának vizsgálata vízszennyező
komponensek genotoxicitás minősítésében**

Bíráló:

Prof. G.-Tóth László DSc

Tisztelettel köszönöm bírálómnak Prof. G.-Tóth Lászlónak értékes megjegyzéseit és hozzászólásait, valamint a bírálat elkészítésébe fektetett lelkiismeretes munkáját. Köszönöm a bírálónak dolgozatom részletes áttanulmányozására szánt idejét, javaslatait a dolgozat javításának lehetőségeire és eddigi eredményeim elismerését.

A dolgozatom kapcsán feltett kérdésekre a következő választ kívánom adni:

1. „Tudvalévő, hogy az eukariota sejek mitokondriumai evolúciós eredet szempontjából ősi szimbionta baktériumok, amelyek saját genetikai állománnyal rendelkeznek. A mitokondriumok a sejt energiaigényének megfelelően roppant dinamikus és gyorsan képesek lamelláikat többszörözni, 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?”**

Nem találtam mitokondriális mikronukleuszra való utalást a vonatkozó szakirodalomban, de ha kialakulhatnak ilyenek, akkor az általam is használt Giemsa oldat valószínűleg ugyanúgy festené, mint a sejtmag eredet mikronukleuszokat. Ugyanakkor a mikronukleuszok azonosítását a Bolognesi és Fenech (2012) által leírt szempontok alapján végeztem, aminek két pontja szerintem csak a sejtmag eredetű mikronukleuszokra érvényes: a sejtmag közelében jelennek meg és mérete a sejtmag méretének 1/3-a és 1/16-a között van (a mitokondriális mikronukleuszok ennél valószínűleg kisebbek lennének). A genotoxikus hatás és a mitokondriális mikronukleuszok képződése közötti esetleges összefüggés feltárására kifejezetten erre irányuló kísérletekre lenne szükség.

2. „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 esetleg mitokondriumokból kivált fragmentumokat is?**”

Az előző kérdésre adott válasz alapján a mitokondriális eredetű mikronukleuszok jelenléte ugyan nem zárható ki, de a kísérlet eredményeinek kiértékelésében nem volt szerepük.

3. „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, sejtmagvukat és mitokondriumaikat levestették, és nem osztódnak. és gondolom, ezáltal genetikai állományuk legalábbis már inaktív. Jól gondolom-e?”

A vörösvérsejtek sejtmagjának elvesztése nem általános, a gerincesek közül csak az emlősök, egy szalamandra nemzetség (*Batrachoseps*) tagjai és a sugarasúszójú halakon belüli *Maurolicus* nemzetség egyedeinek vörösvérsejtjei magnélküliek. Ezekben az esetekben ugyanakkor lehetőség van más szövet sejtjeinek vizsgálatára pl. gerincvelő vagy petesejt.

4. „**Pontosabban milyen funkciójú hemolimfa sejteken detektált a jelölt a kagylókra ható genotoxikus hatásokat?**”

A mikronukleuszok azonosításának szempontjai között szerepelt, hogy csak agranulocitákat vizsgálunk. Mivel a hemolimfa sejtek kb. 80%-a agranulocita, így ez egyébként is célravezető volt. Két típusa a monocita és a limfocita sejtek, amelyeknek a szervezet védekezőképességében van jelentős szerepük.

5. „**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?**”

A szakirodalomban több munka is található, amely az egyes baktérium tesztek érzékenységét veti össze egymással, ugyanakkor olyan, amely a mikronukleusz tesztet is vizsgálja viszonylag kevés. Az alkalmazott tesztekkel különböző hatásmechanizmusú genotoxicitást lehet kimutatni, ezek eredményei között nincs ismert összefüggés. Az összehasonlító tesztek ugyanakkor a szabványokban és a gyakorlati alkalmazásban legelterjedtebb módszerek a genotoxikus hatás kimutatására, így a kiválasztás során ezt a szempontot vettem alapul.

6. „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 fejlődött. **Lehet-e tudni a néhány alapvető adatot a vizsgálatokra kiválasztott szennyvizekben előforduló vegyületek természetéről és nagyságrendi koncentrációjáról?**”

A gyógyszergyár nem adott információt a szennyvizükben előfordulható vegyületekről, és mivel a minták vizsgálatát a kommunális szennyvíztisztító kérelmezte, nem végeztünk analitikai méréseket.

7. „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?**”

Részletes vizsgálatok nélkül nem lehet biztosat mondani, de a legvalószínűbb, hogy a kagylók, amennyiben valamilyen káros hatást észlelnek egyszerűen csökkentik az átszűrt víz mennyiségét, így kevesebb szennyezőanyag jut a szervetükbe. A MN teszt szempontjából ehhez még hozzájárul, hogy a képződött MN-ok 3-4 nap alatt elbomlanak, így tartós szennyezés esetén sem emelkedik folyamatosan a számuk, hanem beáll egy szintre.

8. „A 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?**”

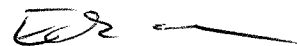
Mint sok más esetben, itt is elmondható, hogy kis mértékben gyógyszer, nagy mértékben mérgező. A gyógynövény készítmények gyártói gyakran feltüntetnek ajánlott mennyiséget, valamint, hogy annál többet ne fogyasszunk. Ugyanakkor ezek a növények szabadon gyűjthetők és felhasználhatóak függetlenül attól, hogy milyen szabályozás vagy fogyasztási javaslat vonatkozik rájuk.

9. „A jelölt a disszertáció vége felé 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?**”

Egy egysejtű élőlényen talán egyértelműbb a genotoxikus anyag által kifejtett káros hatás, de magasabb rendű élőlények esetében is hasonlóan megy végbe. Ebben az esetben a genotoxikus anyaggal közvetlenül érintkező szövet sejtjei lesznek a legvalószínűbb hatásviselők, nem pedig a szervezet egésze.

Végezetül még egyszer köszönöm Prof. G.-Tóth László munkáját és tisztelettel kérem válaszaim elfogadását.

Veszprém, 2019. november 11.



Eck-Varanka Bettina Mária