

Opponensi vélemény

Kakasi Balázs (MSc): „Komplex környezeti minták geno- és citotoxikológiai vizsgálata”
című doktori (PhD) értekezéséről

(Pannon Egyetem, Mérnöki Kar, Kémiai és Környezettudományi Doktori Iskola, Veszprém)

A kémiai környezetszennyezés és az ebből következő kémiai expozíciók káros hatásainak összefüggése a jövő fenntarthatóságával mára gyakran közhellyé sülyed, ami hajlamossá teheti a közvéleményt, és ezen keresztül akár a döntéshozókat is arra, hogy ne kezeljék ezt a kérdés érdeme szerint. Besegít ebbe az a körülmény is, hogy a legszélesebb körben értelmezett vegyipar, ami nagyon jelentős tömegeknek biztosít ugyanakkor megélhetést, a káros kémiai hatásokat gyakran negligálni, vagy minimalizálni kívánja, saját profitja, illetve a munkahelyek fenntartása érdekében. Ugyanakkor nyilvánvaló, hogy ezeket a hatásokat meg kell ismerni, és azokat lehetőség szerint ki kell védeni, meg kell előzni. Az Európai Unió számos kémiai biztonsági rendelete, köztük kiemelten a REACH (1907/2006/EK rendelet), illetve Magyarországon a 2000. évi XXV. törvény (világ első átfogó kémiai biztonsági törvénye) ezt a célt szolgálják.

Jelölt tárgyi doktori (PhD) értekezése (a továbbiakban: Értekezés) napjaink egészség- és környezetvédelmének talán legfontosabb problémakörével foglalkozik, nevezetesen azon, kémiai ágensek által kiváltott hatások kimutatásának lehetőségeivel, amik a nem-fertőző krónikus megbetegedések kiemelt kóroki tényezői. Minthogy korunk legnagyobb népegészségügyi (és ezen keresztül az egyik legsúlyosabb társadalmi) problémáját ezen betegségek, minden erőfeszítés ellenére folyamatosan növekvő incidenciája és prevalenciája jelentik. Köztük is elsődlegesen a rosszindulatú daganatos, szív- és érrendszeri, neuro-endokrin és anyagcsere, valamint immunológiai betegségek, amik mögött elsősorban a környezetszennyezés és a hiányos ismereteken alapuló emberi felhasználás miatti kémiai expozíciók állnak. Ezért minden kutatás, ami ezek kimutatására szolgál, egyértelműen a fenntartható jövő szolgálatában áll!

Ezek között is kiemelkedő jelentőségűek a fenti betegség csoportok iniciátorai, a testi, illetve ivari sejtek örökítő állományát, az abban kódolt genetikai információt megváltoztató mutagén, illetve szélesebb körű megnevezéssel, genotoxikus hatások. Ezek mellett, az *in vitro* toxikológia folyamatos fejlődése következtében megnövekedett toxikológiai ismeretanyag tekintetével, mind nagyobb figyelmet kell fordítani a klasszikus (azaz az LD50, LC50 alapú, állatkísérletes) toxikológiai vizsgálatok mellett, az azok által nem észlelhető, sejtszinten, és kis dózisok hatására bekövetkezett elváltozásokat is kimutatni képes, citotoxikológiai vizsgálatokra. Az arzén citotoxikológiai vizsgálata során nyert eredmények szolgáltatják talán a legkiválóbb példát arra, hogy a környezeti expozíció következtében, sejtszinten, igen alacsony koncentrációkban már bekövetkeznek olyan genetikai és epigenetikai, valamint a fehérjék működését érintő térszerkezeti elváltozások, amik késői toxikus hatásokként, krónikus nem-fertőző megbetegedések iniciátorai lehetnek, olyan kis koncentrációkban, amik sok nagyságrenddel vannak az LD50 / LC50 értékek alatt.

Kiemelt genotoxikológiai probléma a környezeti hatásokra a különösen jól védett hím és női ivarsejtekben bekövetkező genetikai és epigenetikai változások kimutatása, minthogy ezek egyrészt közvetlenül jelentkezhetnek az utódban, mint újonnan szerzett genetikai betegségek, másrészt alapját képezhetik egy adott megbetegedés kialakulásának is. Ugyanakkor, éppen

ezen sejtek vizsgálatának nehézségei, valamint a testi sejtekhez képes lényegesen alacsonyabb „érzékenységük” miatt a genotoxikológiai kutatások, az ezen hatásokat kimutató metodikák és azok fejlesztése inkább a testi sejtekre koncentrálnak.

Mindezeknek megfelelően, Jelölt **célkitűzései** szakirodalmilag megalapozottak, helyesek, fontosak, azok megvalósítása elősegíti a genotoxikológiai módszertani paletta, és az ezekkel nyert ismeretek kívánatos fejlődését.

Jelölt, itt tárgyalt vizsgálataihoz kommunális, illetve gyógyszeripari és kórházi szennyvizek, természetes vizekből nyert üledékek, valamint Diesel üzemű személy- és tehergépkocsik kipufogó gázaiából származó aeroszolk, továbbá a bio-diesel és a triklozán megfelelő módon vett, és előkészített mintáit használta. Opponens számára külön érdekességgel bírt a triklozán bevonása a vizsgált anyagok körébe, minthogy ez, a kozmetikumokban is használt, szerkezeti képlete alapján gyaníthatóan a pajzsmirigy hormon háztartást megzavaró vegyület hatásainak tisztázása alapvető fontosságú.

Az Értekezésben alkalmazott **módszerek** korszerűek, adekvátak és szabatosan leírtak, azok alapján, az elvégzett kísérletek reprodukálhatónak tűnnek. Jelölt dolgozatában összehasonlító módon, két korszerű módszerrel, a bakteriális, un. SOS-Chromo teszttel és az általa Flow-citometriára adaptált disznó kansperma toxicitási teszttel vizsgálja a környezeti hatásokra a baktériumokban, illetve a hím ivarsejtekben bekövetkező citotoxikus, illetve genotoxikus elváltozásokat. Ez a megközelítés korszerű, és megfelel a genotoxikológiában követett megközelítési módoknak. A bakteriális tesztek jól definiáltak, azok végrehajtását metodikailag OECD guide-ok és az Európai Unió, vonatkozó rendelete (440/2008/EU) és annak módosításai írják elő. Munkája során, Jelölt is ezeket az előírásokat követte.

Nem teljesen ez a helyzet a spermium tesztek esetében, ahol tér nyílik a módszertani fejlesztésekre. Jelölt kihasználja ezt a lehetőséget, és dolgozatában bemutat egy általa kifejlesztett, a Flow-citometriás eljárásokon alapuló módszert, ami egyfelől megkönnyíti és standardizálja az értékelést, másfelől lehetőséget ad az automatizálásra is. Ma, mind a standardizálhatóság, mind az automatizálhatóság alapkövetelménye egy széles körben alkalmazható, megbízható kimutatási eljárásnak.

Jelölt ezen munkája során a következő **eredményeket** éri el, amelyeket Opponens, a vonatkozó publikációk, valamint a jelen Értekezés alapján, Jelölt **saját, új eredményeinek** ismer el:

1. Sikeresen adaptálta flow citométerre a sertés kansperma mutagenitási tesztet, illetve annak citotoxicitást, illetve genotoxicitást kimutató variánsait.
2. A bakteriális teszttel mutagén hatást igazolt különböző Diesel kipufogó gáz aeroszol mintákban.
3. A citometriára adaptált eljárásokkal Jelölt sikeresen igazolt mind citotoxikus, mind genotoxikus hatásokat egyes vizsgált minták esetében.
4. Megkezdte a citometriás eljárás automatizálását is.

Az alkalmazható módszerek között, Jelölt röviden ismerteti a mikronukleusz tesztet is, mint ajánlott és megbízható eljárást, amit alkalmaz is, azonban ennek során negatív eredményeket kap. Opponens saját tapasztalata ennek az ellenkezője, minthogy a teszt (speciális nukleusz festés nélkül), a kromoszóma fragmentek mellett kimutatja az un. késő (lagging) kromoszómákat is (tehát nem csak a mutációkat), emellett, ráadásul, lényegesen kevésbé

érzékeny, mint a „klasszikus” kromoszóma aberráció analízis. Ezért Opponens nincs meglepve, hogy a kagyló hemolimfa mikronukleusz teszt minden, Jelölt által vizsgált esetben negatívnak bizonyult.

Opponens itt megragadja az alkalmat, és kifejezetten javasolja, hogy – folytatva az Egyetemen az ezzel kapcsolatos kutatásokat – a kifejlesztett Flow-citometriás eljárás a jusszon el az OECD által guide-ban elismert, a vegyi anyagok káros hatásainak értékeléséhez nemzetközileg felhasználható, standard módszerek szintjéig! Nagyon nagy szükség van ugyanis az ehhez hasonló, viszonylag egyszerű és automatizálható vizsgáló eljárásokra a kémiai biztonság primer prevenciók céljainak eléréséhez.

Jelölt a kapott eredményeket a szakirodalommal összhangban, helyesen **értékeli**, amikor megállapítja, hogy az alkalmazott eljárásokkal a kansperma teszt érzékenyebb a citotoxicitásra, mint a genotoxicitásra, és ennek okát a spermiumok genotoxikus hatásokkal szemben, a testi sejtekhez képest fokozott védelmével magyarázza. Jelölt röviden érinti a DNS repair mechanizmusokat is, mint a keletkezett genetikai hibák kijavításának lehetőségét, majd jelzi, hogy ennek ellenére a hibák egy része állandósulhat. Itt utal az apoptózisra is, mint a genetikailag károsodott sejtek eliminációjának egy fontos lehetőségére.

Jelölt a felsorolt eredményeket 9, megfelelő helyen elhelyezett publikációban közölte, amik közül 5 esetben első szerző. Ez a publikációs tevékenység Opponens véleménye szerint **megfelel** a doktori (PhD) fokozat megszerzéséhez, az Egyetem, vonatkozó szabályzatában támasztott követelményeknek. Komoly segítségére volt Opponens munkájának, a Jelölt által külön kigyűjtött, a témával kapcsolatos saját közlemények listája.

Jelölt hagyományos szerkezeti felépítést követő, jól szerkesztett Értekezése összesen 124 oldal terjedelmű, 21 ábrát, magyar és angol nyelvű összefoglalást, és összesen 217 hivatkozást felsoroló irodalomjegyzéket tartalmaz. Az irodalmi hivatkozások szorosan csatlakoznak az Értekezés tárgyához, a hivatkozott szakirodalom korszerű, adekvát, Jelölt ezek felhasználásával jól mutatja be kutatásai fontosabb tudományos előzményeit, és kritikai megközelítéssel alkalmazza a szakirodalmat eredményei megvitatása során is.

Jelölt mondani valóját szabatos mondatokban adja elő, stílusa élvezetes, maga az Értekezés megfelelő külső megjelenésű. Látszik rajta a gondos kontroll is, Opponens nem talált értelemzavaró elírást, nyelvtani hibát. Az Értekezésben megjelenő ábrák szükségesek, és jól segítik a mondanivaló megértését, a rövidítések jegyzéke informatív.

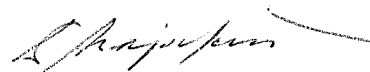
Az Értekezés olvasása során Opponensben a következő **kérdések** merültek fel:

1. Mi volt a konkrét, a vizsgálatba bevont gyógyszeripari (tehát nem a kórházi) szennyvizek kiválasztásának alapja, miért éppen ezek a minták lettek vizsgálva?
2. Természetes körülmények között, milyen élettani/toxikológiai mechanizmus útján hathat egy aeroszolban levő vegyület a spermiumokra?
3. Milyen mechanizmus állhat a trikloán membránkárosító hatása mögött?

A fentiek alapján Opponensben az, a határozott meggyőződés alakult ki, hogy a jelen Értekezés, az abban foglalt célkitűzések, módszerek, az elért eredmények és azok értékelése, illetve publikálása alapján, **minden tekintetben megfelel** a doktori (PhD) fokozat megszerzéséhez támasztott követelményeknek.

Opponens a jelen Értekezést **summa cum laude** minősítésre javasolja, és **sikeres védés esetén**, az Egyetem felé **javasolja Jelölt részére a doktori (PhD) fokozat odaítélését.**

Budapest, 2019. május 22.



Major Jenő, PhD
opponens