

Válasz Dr. Major Jenő opponensi véleményére

Először is hálásan köszönöm, hogy elvállalta az opponensi vélemény elkészítését és azt is, hogy értékes észrevételeivel, megjegyzéseivel és kérdéseivel elősegítette, hogy színvonalasabb dolgozat készülhessen.

Észrevételek és megjegyzések

- 1. Javasolja, hogy a kifejlesztett Flow-citometriás eljárás jusson el az OECD által guide-ban elismert, a vegyi anyagok káros hatásainak értékeléséhez nemzetközileg felhasználható, standard módszerek szintjéig.**

Köszönöm a javaslatát, én is úgy gondolom az elért eredmények alapján, hogy valóban megfontolandó lenne a módszer magasabb szintre emelése. Sajnos én időközben más tématerületen kezdtem el dolgozni és Dr. Nagy Szabolcs kutatólaborjában (ahol a flow citométeres méréseket végeztem) sem toxikológiai vonalon folynak a kutatások. A finn munkatársaink akiknek a munkájára alapoztam a kansperma teszt flow citométerre adaptálását azonban még jelenleg is foglalkoznak hasonló kutatásokkal, illetve ők korábban több sperma alapú teszt módszert is fejlesztettek, melyek közül volt amelyet európai szinten sikerült is akkreditálniuk. Felveszem velük a kapcsolatot ez ügyben, hátha őket érdekli és tudnak foglalkozni a módszer standardizálásával.

- 2. Az alkalmazható módszerek között, a 24. oldalon, Jelölt röviden ismerteti a mikronukleusz tesztet is, mint megbízható eljárást, amit alkalmaz is. 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 azonban 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.**

A munkám során alkalmazott mikronukleusz tesztet kagyló hemolimfán végeztük. A kagyló hemolimfa nem letális módon gyűjthető, és a megfelelő szenzitivitását több szakirodalmi cikk is alátámasztja. A kagylók és a belőlük származó hemolimfán végzett vizsgálatok reprezentatívak a vízi ökoszisztémákra vonatkozóan így ökológiai hatások értékelésére és kockázatbecslésre is alkalmazhatóak.

A kutatócsoportunk több alkalommal is sikeresen használta a kagyló hemolimfán a mikronukleusz tesztet. Többek között az értekezésben bemutatott biodízel minták vizsgálatakor is képesek voltunk koncentráció függően szignifikáns genotoxikus hatásokat detektálni vele.

Mindemellett a kagyló hemolimfán végzett mikronukleusz tesztre vonatkozóan egyelőre nem létezik standard eljárás, a mérések során alkalmazott vizsgálati protokollt olyan szakirodalomból merítettük, amelyet kifejezetten kagyló hemolimfára írtak le (Woźnicki et al., 2004).

Az említett protokoll alapján a vizsgálatokhoz 5% Giemsa festést alkalmaztunk, amely ugyan DNS specifikus festék, de való igaz, hogy a szenzitivitása alul maradhat más, specifikusabb (fluoreszcens) festékekkel szemben. Ennek ellenére valamennyi mikronukleusz tesztre vonatkozó OECD irányelvben szerepel a Giemsa festék, mint a fluoreszcens DNS festékek mellett alkalmazható festék.

A mikronukleusz teszt és a kromoszóma aberráció analízis módszerek a szolgáltatott eredmények tekintetében nagyon hasonlóak egymáshoz, de nem feltétlenül azonosak egymással. Hayashi (2016) szerint a két módszer nem csupán a módszertani okok miatt, hanem a mérésről szolgáltatott információtartalom különbségei alapján is független eljárásként kezelendő.

Mindezek tükrében köszönöm a megjegyzést és hogy felhívta rá a figyelmet, hogy speciális DNS festékek alkalmazásával még érzékenyebbé tehető a vizsgálat. A kollégáimnak mindenképpen javasolni fogom, hogy jövőbeni vizsgálatok során a Giemsa festés mellett más DNS specifikus festékek alkalmazhatóságát is vizsgálják a kagyló hemolimfán végzett mikronukleusz tesztek esetén.

Kérdések

1. Mi volt a konkrét, a vizsgálatba bevont gyógyszeripari (tehát nem a kórházi) szennyvizek kiválasztásának alapja, miért éppen ezek a minták lettek vizsgálva?

Ismert, hogy a kórházi szennyvizek mellett a gyógyszeripari szennyvizek is tartalmazhatnak bizonyos toxikus vegyületeket. Egy felkérésnek köszönhetően lehetőségünk nyílt, hogy megvizsgáljunk két mintát, melyeket egy hazai üzem kifolyójából gyűjtöttek. Mivel a vizsgált gyógyszeripari szennyvíz tisztítás után folyik a kommunális szennyvíz tisztítóba, ez jó lehetőségnek kínálkozott, hogy megvizsgáljuk, hogy vajon milyen mértékben járulhat hozzá annak toxicitásához, illetve van-e rá reális esély, hogy a többszörös tisztítás ellenére toxikus vegyületek kerülhetnek a kifolyókba. Sajnos a kommunális szennyvíztisztító befolyójából nem kaptunk mintát ezért sajnos nem állt módunkban meghatározni, hogy a mért toxicitási értékekhez pontosan milyen mértékben járul hozzá a kommunális szennyvíz. Ennek ellenére mindkét vizsgált mintában bizonyos fokú toxicitást tudtunk kimutatni.

2. Természetes körülmények között, milyen élettani/toxikológiai mechanizmus útján hathat egy aeroszolban levő vegyület a spermiumokra?

A munkám során elsősorban a vizsgált minták potenciális geno- és citotoxikológiai hatásainak kimutatása volt a célom, melyhez a spermiumokat, mint eukarióta modell sejteket alkalmaztam. Az élettani és reprodukzív toxikológiai hatásmechanizmusokkal jellemzően nem foglalkoztam. Azonban abból kiindulva, hogy léteznek olyan vegyületek, melyek képesek áthatolni a vér-agy gáton (Almeida et al., 2012), valószínűleg léteznek olyanok is, melyek átjuthatnak a vér-here gáton is, bár nem teljesen biztos (Ji et al., 2010)

Az aeroszolok eredetük, összetételük és fizikai-kémiai tulajdonságaik tekintetében is igen széles keretek között változhatnak. Az aeroszolok spermiumokra vonatkozó toxikus hatásait azok kémiai tulajdonságai határozzák meg. A hatásokat okozhatja közvetlenül az aeroszol részecske anyaga, de okozhatja az aeroszol részecskék felületén adszorbeálódott valamilyen más vegyület is.

Ezek közt gyakoriak a sók és ásványok, átmenetifémek (vas, nikkel, réz), különböző ionok (szulfát, nitrát, savas karakterű ionok), illékony- félig illékony

szerves vegyületek (PAH-ok, nitro-PAH-ok, kinonok), különböző szabad gyökök, reaktív gázok (ózon, peroxidok, aldehidek), biológiai eredetű vegyületek (endotoxinok, baktériumok, vírusok). Ezeken belül az aeroszolokhoz köthető legjellemzőbb toxikus vegyületek és vegyület csoportok közé a különböző poliaromás szénhidrogének (PAH)-ok és PAH származékok, poliklórozott-bifenilek (PCBk), halogénezett szénhidrogének, peszticidek, dioxinok, különböző égéstermékek és egyéb perzisztens szerves szennyezők tartoznak. Az aeroszolok hatásainak vizsgálatakor nem elhanyagolható az a tény sem, hogy nem csupán egyes részecskék, hanem ezek keverékeinek a hatásait vizsgáljuk, ezáltal a toxikus hatásuk is ennek megfelelően alakulhat.

Többféle hatásmechanizmus révén fejthetik ki toxikus hatásaikat. A citotoxikus hatások jelentős részét és a genotoxikus hatások egy részét is oxidatív stressz okozhatja, a különböző reaktív oxigénszármazékok és szabadgyökök képződése által, melyek közvetlenül, vagy kaszkád folyamatokat indukálva vezethetnek a lipidek, enzimek- és fehérjék, vagy akár a DNS oxidatív károsodásaihoz, de szinte minden sejtalkotóra nézve káros hatást fejthetnek ki.

A reaktív vegyületek reakcióba léphetnek és károsíthatják a sejtmembrán fehérjéit, lipidjeit, ezzel módosítva az ozmoregulációt, kalcium transzportot, vagy egyéb anyagcsere folyamatokat. A PAH vegyületek és nitro-PAH vegyületek sok esetben DNS adduktokat képeznek, illetve oxidatív DNS károsodásokat ezzel genotoxikus hatást kiváltva. Egyes átmeneti fémek biológiai hozzáférhetőségük és redox tulajdonságaik miatt okozhatnak toxikus hatásokat és összefüggésbe hozhatóak az oxidatív károsodások kialakulásával is, hiszen elősegíthetik szabadgyökök keletkezését. Számos égéstermék tartalmaz széntartalmú perzisztens gyököket (pl. kinoinszármazékokat), melyek reakcióba lépnek sejtben található tiol csoportokkal (-SH), vagy oxidatív potenciáljuk és redoxreakciók révén okozhatnak sejt szintű károsodásokat. Ezek mellett léteznek olyan vegyületek is, melyek a sejtekben zajló folyamatokat, vagy sejtszervek működését gátolva fejtik ki toxikus hatásaikat (pl. mitokondriotoxinok).

3. Milyen mechanizmus állhat a triklozán membránkárosító hatása mögött?

Az előző kérdéssel kapcsolatban már említettem, hogy alapvetően a toxikus hatások kimutatására fókuszáltam, a pontos hatásmechanizmusok magyarázása viszont nem tartozott az elsődleges céljaim közé, sőt a komplex környezeti minták esetében

pontos analitikai mérések hiányában ez többnyire nem is volt lehetséges. A triklozán esetében, a pontos vegyület ismeretében azonban vannak elképzeléseink a hatásmechanizmust illetően.

A triklozán hatására a motilitás csökkenése tapasztalható, valamint citoplazmát, mitokondriumokat károsító hatásai is vannak. Ezek a káros hatások elsősorban a triklozán ioncsatornák működését megzavaró hatásainak tulajdoníthatóak.

Magasabb triklozán koncentrációk esetén a hiperpolarizáció az akroszómában és a farok disztális régióiban jelentkezik, ezek akkor hiperpolarizálódnak, mikor a mitokondriumok már depolarizálódtak.

A sertés spermiumok két izomorf glikolitikus enzim készlettel rendelkeznek (szomatikus és spermium specifikus), ezek a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) és a piruvát kináz (PK). A spermium specifikus enzimek a spermiumokon az akroszómában és a farok disztális végén helyezkednek el, míg a szomatikus izomorfok a mitokondriumokban a spermium középrészében.

A triklozán hatására gátolódik a mitokondriumok oxidatív foszforilációja és ez által az ATP szintézis, a GAPDH és PK aktivitása gyengül, mely NADPH miatt hiperpolarizációként jelentkezik, miközben csökken az ATP szint, ami a motilitás csökkenését okozza. Ha a triklozánt kis koncentrációban vizsgáljuk, ahol a mitokondriumok már depolarizálódnak, de a sejtmembrán még nem, ez azért van, mert ez nem befolyásolja spermium specifikus enzim izomorfok glikolitikus ATP termelését.

A Ca^{2+} háztartásnak fontos szerepe van a spermiumok kapacitációjában, a kemotaxisban és az akroszóma exocitózisban. A spermiumokban a CatSper Ca^{2+} ioncsatorna felelős ennek fenntartásáért, és valószínűsíthető, hogy a triklozán ennek a működését is megzavarja, ami szintén közrejátszik az akroszóma hiperpolarizációjaában, illetve a motilitás csökkenésében is. Emellett megfigyelhető a K^{+} ionok kiáramlása is, tehát valószínűleg a K^{+} ioncsatornák működésére is negatív hatással van.

Almeida, J.R., Gravato, C., Guilhermino, L., 2012. Challenges in assessing the toxic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons to marine organisms: A case study on the acute toxicity of pyrene to the European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). Chemosphere 86,

926–937. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.10.059

Hayashi, M., 2016. The micronucleus test-most widely used in vivo genotoxicity test. *Genes Environ.* 38, 18. doi:10.1186/s41021-016-0044-x

Ji, G., Gu, A., Zhou, Y., Shi, X., Xia, Y., Long, Y., Song, L., Wang, S., Wang, X., 2010. Interactions between exposure to environmental polycyclic aromatic hydrocarbons and DNA repair gene polymorphisms on bulky DNA adducts in human sperm. *PLoS One* 5. doi:10.1371/journal.pone.0013145

Woźnicki, P., C., Lewandowska, R., Brzuzan, P., Ziomek, E., Bardega, R., 2004. The level of DNA damage and the frequency of micronuclei in haemolymph of freshwater mussels *Anodonta woodiana* exposed to benzo[a]pyrene, *Acta Toxicologica*.

Veszprém, 2019.05.29.

V. R.