

Farkas Enikő:

**Jelölésmentes optikai bioszenzorok alkalmazása xenobiotikumok
toxikusságának feltárására c. PhD értekezésének
bírálata**

Farkas Enikő a Pannon Egyetem Vegyészmérnöki és Anyagtudományi Doktori Iskolához tartozóan a PhD munkáját az Energiatudományi Kutatóközpont Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézet Nanobioszenzorika Lendület Kutatócsoportjában végezte Dr. Székács Inna témavezetésével.

A témaválasztás aktuális, egyre nagyobb figyelmet kapnak nemzetközi és hazai szinten is a környezetvédelemhez kapcsolódó problémákra rávilágító és az esetleges megoldási javaslatokra irányuló tanulmányok. Napjainkban elkerülhetetlen, hogy a tudomány magas szinten foglalkozzon a szintetikus anyagok környezetbe jutását követő hatásokkal, különös tekintettel az élő szervezetekben bekövetkező változásokra. A dolgozat a számtalan vegyületet magába foglaló xenobiotikumok közül egy növényvédő szerre (Roundup Classic-ra) és annak komponenseire (hatóanyagára a glifozátra és formázó anyagára) fókuszált, azok hatásait, toxikusságát vizsgálva jelölésmentes optikai bioszenzorokat felhasználva. Az értekezés a szenzorok alkalmazásán keresztül jól ötvözi a fizikai-kémiai és biokémiai ismerteket.

Farkas Enikő célul tűzött ki egy új és gyors citotoxicitás-kimutatói módszer kidolgozását Epic BenchTop bioszenzor felhasználásával. Ehhez kalibrációs egyenletet határozott meg polielektrolit oldatokkal, melynek eredménye, hogy a választott bioszenzorral mért hullámhossz-eltolódás jelből meghatározható a felületre adszorbeált tömeg. A jelölésmentes bioszenzorral az előzőekben említett növényvédő szerrel és összetevőivel végzett citotoxicitási vizsgálatokat, melyeket igazolt többek között a hagyományos technikának számító fluoreszcens mikroszkópiával, a sejtmorfológiát tanulmányozó digitális holografikus mikroszkópiával is. Részletesen vizsgálta a glifozát hatását MC3T3-E1 sejtek adhézióra.

Az értekezés arányos felépítésű, a „Bevezetés” és az „Irodalmi áttekintés” világosan mutatja be a feldolgozott téma alapvető fogalmait és részletesen az eddig a szakirodalomban publikált eredményeit. A „Célkitűzés” egyértelmű, szinte türelmetlenül várja az olvasó a



dolgozatban a módszerek és eredmények ismertetését. Kiemelendő, hogy az egész írásműben a letisztult, lényegre koncentráló ábrák nagyban segítik a megértést, ami a téma multidiszciplináris jellegéből adódóan nem egyértelműen könnyű feladat, azonban Farkas Enikő ezt kiválóan oldotta meg

A dolgozat végén hosszú irodalomjegyzéket találunk 276 hivatkozással, az itt feltüntetett cikkek átolvasása és feldolgozása tekintélyes feladat lehetett.

Dicséretes, hogy alaposan tanulmányozta a kiválasztott szintetikus anyagok hatását preoszteoblaszt sejtekkel való kísérletekben különböző felületeken és különböző körülmények között.

A hatalmas munka eredményeit Farkas Enikő öt tézispontban foglalta össze, az értekezéséből idézve:

1. Rétegenként építkezve (layer-by-layer technikával) (poli-(allil-amin-hidroklóridd))-poli-(sztirolszulfonát)) (PAH-PSS) polielektrolit multirétegeket alakítottam ki optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia (OWLS) és rezonáns rácsos hullámvezető (RWG) Epic BT bioszenzor felületeken. Kihasználva a felvitt rendszer vastagságának és felületi tömegsűrűségének nagyfokú reprodukálhatóságát, a mért jelek összehasonlításának a segítségével egy kalibrációs egyenletet határoztam meg, amely alkalmazásával az Epic BT által mért hullámhossz eltolódás felületi tömegsűrűséggé számolható át. Továbbá meghatároztam a fenti egyenletet a glyphosate hatóanyagra is.
2. Valós idejű és jelölésmentes citotoxicitási vizsgálatot dolgoztam ki letapadt sejteken a rezonáns rácsos hullámvezető (RWG) Epic BT bioszenzor felhasználásával. Meghatároztam a Roundup Classic készítménynek, illetve glyphosate ható- és faggyúalapú polioxietilénamin (POEA) formázó anyagának koncentrációfüggő hatását preoszteoblaszt (MC3T3-E1) sejteken szérumban és szérumban tartalmazó közegekben. Megmutattam, hogy főképp a POEA felelős a Roundup Classic citotoxicitásáért, ugyanakkor a glyphosate jelentősen befolyásolja a sejtmorfológiát és a sejtadhéziót. A jelölésmentes bioszenzorral kapott

eredményeimet egyéb módszerekkel (holografikus, fáziskontraszt és fluoreszcens mikroszkopiával, valamint citofluorimetriával) is igazoltam.

3. Megállapítottam, hogy a preoszteoblaszt (MC3T3-E1) sejtek képesek a szenzor felületére adszorbeált glyphosate rétegen kitapadni. Igazoltam, hogy a sejtek kitapadása ligandumspecifikus kinetikát mutat (szigmoid sejtadhéziós görbe). A mért kinetikai görbék nagyfokú hasonlóságot mutattak az arginin-glicin-aszparaginsav (RGD) motívumot tartalmazó felületeken mért sejtadhéziós görbékkel.
4. A preoszteoblaszt (MC3T3-E1) sejtek adhézióját az arginin-glicin-aszparaginsav (RGD) peptidmotívumot tartalmazó polimer felületeken, illetve adszorpcióval előállított glyphosate felületeken is megmértem. A kapott adhéziós jelek segítségével meghatároztam a glyphosate–integrin és az RGD–integrin kötések disszociációs állandóját. A meghatározott disszociációs állandók értékei alapján megállapítottam, hogy az RGD-motívum 58-szor erősebben köt, mint a glyphosate.
5. Kimutattam, hogy az oldatban jelen lévő glyphosate jelentősen csökkenti a preoszteoblaszt (MC3T3-E1) sejtek adhézióját az arginin-glicin-aszparaginsav (RGD) motívummal bevont felületeken. Megmértem az oldott glyphosate integrinek blokkolására kifejtett koncentrációfüggő hatását. A glyphosate integringátló hatását sejtmentes vizsgálatokkal is bizonyítottam, ahol rekombináns $\alpha\beta 3$ integrinkötési mérésüket végeztem rezonáns rácsos hullámvezető (RWG) Epic BT bioszenzorral. Megállapítottam, hogy a glyphosate kompetitívan gátolja az $\alpha\beta 3$ integrin immobilizált RGD-motívumokhoz történő kötődését.

Az előbírálát során is megjegyeztem, hogy magyar nyelvű dolgozat esetén érdemes a kémiai anyagok magyar neveit használni, gondolok itt a glifozátra. Bár néhány tudományos cikkben az angol név fordul elő, azonban ez egy olyan magyar nyelven íródott értekezés, amely egy széles körben használt és még a nem tudományos életben is vitákat kiváltó növényvédőszer hatásaival foglalkozik, így véleményem szerint érdemes a magyar elnevezést alkalmazni.

A dolgozattal kapcsolatos további megjegyzéseim a következőkben sorolom fel, azonban ezek az észrevételek egyáltalán nem vonnak le az értekezés értékéből:

- a 85. oldalon feltüntetett „glifozát – izopropil-amin só” szerkezeti képletében az ionos képlet lenne a helyes, hiszen sóról van szó,
- a dolgozatban néhány magyartalan kifejezés található, a ragok hiánya néha zavaró és pár helyesírási hiba is sajnos előfordul az értekezésben,
- elegendő az első használatnál megadni a későbbi rövidítést (AMPA: 19. és 20. old. vagy PAH: 41. old.)
- a vegyületek megfelelő elnevezésére és helyes magyar írásmódjára érdemes figyelmet fordítani: „4-(3-(4-jodo-fenil)-... (13. old.), „tertazólium és tetrazolium (13. old.), „izopropilammonium só” (40. old.), poli-(allil-amin-hidroklorid)” (16. és 92. old.).

Az értekezés olvasása közben a következő kérdések merültek fel a bírálóban:

1. A *layer by layer* technikával kialakított felületek közötti mosási fázisban a nem kötődött láncokat távolították el. Mérték-e, hogy milyen arányban kötődik a polielektrolit a felülethez (hány százalék kötődik, illetve hány százalék távozik a mosásnál)?
2. A 66. oldalon található: „A *glyphosate* a foszfortartalmú ligandumok közé tartozik, amelyekről ismert, hogy erős affinitásuk van kétértékű fémionokhoz (pl.: Ca^{2+} és Mg^{2+})²³². Nagy *glyphosate* koncentráció alkalmazása elősegíti a *glyphosate* kationokkal (Ca^{2+}) való kelátkomplex képződését, amely hatással van a sejtadhézióra, citoszkeleton elhelyezkedésére és morfológiájára^{233,234}. Ráadásul a *glyphosate* hatóanyagot és származékait, pl.: AMPA vegyületet 1964-ben szabadalmaztatták kémiai kelátorként, mivel megköti és eltávolítja az ásványokat, mint például a kalciumot, a magnéziumot, a mangánt, a rezet és a cinket²³⁵. Mindazonáltal, a *glyphosate* relatíve gyenge Ca^{2+} - és Mg^{2+} -kationkelátor (harmad akkora hatékonyságú) az EDTA vegyülethez képest²³⁶. Ezáltal a magas *glyphosate*-koncentráció is csak kis affinitással tud Ca^{2+} - és Mg^{2+} -kationt kötni, így csak részlegesen tud sejtleválást és sejtmorfológiai változásokat előidézni.”

Mely hatás tekinthető befolyásoló tényezőnek nagy glifozát koncentráció esetén?

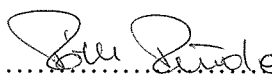
3. A valós idejű, jelölésmentes citotoxicitási vizsgálatok kimutatták, hogy a formázóanyag (a polioxietylénamin származék) felelős a növényvédő szer citotoxicitásáért. Mit gondol a glifozát tartalmú, azonban más segédanyagot tartalmazó készítmények használatáról?
4. A glifozát MC3T3-E1 sejtek adhéziójára gyakorolt hatását vizsgálva (5.3.2. fejezet) mely hatóanyag-koncentráció tekinthető a határnak a 0,4% és az 1,7% között, ahol a sejtadhézió már blokkolt?
5. A sejtek adhézióját egyértelműen befolyásolja a glifozát koncentrációja. Milyen körülmények növelhetik vagy csökkenthetik ezen kívül a sejtek kitapadását?

A tézispontokban megfogalmazott eredményeket magas impakt faktoral rendelkező folyóiratokban publikálták. Az irásmű egy kiváló kutatócsoportban végzett, Farkas Enikő színvonalas, önálló kutatásra képes munkájáról árulkodik.

Összefoglalva: Farkas Enikő PhD értekezése kiemelkedően értékes dolgozat. Alapos, lelkiismeretes, sokrétű kutatómunkát, a témához kapcsolódó szakirodalom részletes ismeretét bizonyítja. A tézispontokat új kutatási eredményként elfogadom és elfogadásra javaslom.

A fentiekben leírtaknak megfelelően javaslom az értekezés nyilvános vitára bocsájtását és sikeres védelem esetén Farkas Enikő számára a PhD fokozat odaítélését messzemenően támogatom.

Budapest, 2020. október 2.



Dr. Tóth Tünde

laboratóriumvezető, tud. főmunkatárs,
Energiatudományi Kutatóközpont, Sugárkémiai Laboratórium
egyetemi docens
BME, Szerves Kémia és Technológia Tanszék