

Válasz Adányiné Dr. Kisbocskói Nóra bírálatára

Köszönöm Adányiné Dr. Kisbocskói Nórának dolgozatom alapos átolvasását és részletes bírálatát. Köszönöm az észrevételeit és kérdéseit, amelyekre az alábbiakban válaszolok:

1, 15. oldal „hogya a formázott növényvédő szerek környezeti és toxikológiai hatásai gyakran eltérnek a hatóanyagának vagy más összetevőjének hatásától.” – A megfogalmazás elég furcsa, mert az összhatás nem tér el az egyes összetevők hatásától, legfeljebb nem erre számítottak.

Valóban, az összhatás az esetek többségében nem tér el az egyes összetevők hatásától. Kivéve akkor, ha szinergens vagy antagonisták kölcsönhatások lépnek fel – erre kívánt célozni az érintett mondat. A méréseink kezdetén, arra is kerestük a választ, hogy a POEA formázó szer a *glyphosate* hatóanyaggal együtt (Roundup Classic növényvédő szerben) szinergikus hatást fejt-e ki a preoszteoblaszt-sejtekre. Ugyanis előfordulhat, hogy a komponensek összhatása sokkal erősebb, mint a növényvédő szert alkotó anyagok külön-külön bevizsgált egyedi hatásai.

2, 15-16. oldal A bevezetésben a faggyúamin-származékok (POEA) már ismert tulajdonságait is meg kellett volna említeni a *glyphosate* mellett.

Köszönöm Opponensem megjegyzését. A POEA vegyülettípus nem pontosan meghatározott, egyedi molekulát, hanem anyagkeveréket jelöl (nem úgy, mint a hatóanyag), ezért nem írtam le a kérdéses tulajdonságokat. Bírálnom azonban igaza van, valóban célszerű lett volna a POEA ismert tulajdonságait is leírni. Sajnos a szakirodalomban gyakran nem különül el egyértelműen a formázó anyag és a növényvédőszer-hatóanyag hatása.

3, 19. oldal „mikrotoxinokat”

Köszönöm a Bíráló észrevételét, mikotoxinokat akartam írni.

4, A 3. ábra nem tudományos dolgozatba való, inkább reklámanyagba.

Köszönöm a Bíráló észrevételét. Ezt a képet illusztratív magyarázó ábraként szántam a disszertációmba.

5, 21. oldal „A *glyphosate* poláros jellege miatt, így csak minta-előkészítést követően lehet a növényvédő szert vizsgálni.”

Köszönöm a Bíráló észrevételét. A mondat helyesen: „A *glyphosate* poláros jellege miatt csak minta-előkészítést követően lehet a növényvédő szert vizsgálni.”

6, „Gyakran összekapcsolják lángfotometriás detektorral, „ – nem világos, mit mivel kapcsolnak, de a lángfotometriás detektort általában nem erre alkalmazzák. Érthetőbb lett volna, ha megemlíti, hogy több lépcsőben végül Cu mérésén keresztül határozzák meg a *glyphosate* koncentrációját. Azonban ez nem tartozik a legfontosabb mérési eljárások közé, inkább csak egy különleges összeállítás.

Köszönöm Bírálom megjegyzését.

7, 22. oldal „láng-atomabszorpciós” – láng-fotometriás technikáról beszélünk.

A Bíráló megjegyzését elfogadom.

8, A xenobiotikum 2.3 és 2.4 fejezetben talán a xenobiotikumok már ismert hatását kellett volna összefoglalni az általános ismeretek helyett/mellett.

Az Opponensem megjegyzését elfogadom.

9, 2.4.3. fejezetben lévő sematikus ábrák (9-12) ismét nem adnak részletes tájékoztatást, ilyen formában fölöslegesek.

A Bíráló megjegyzését elfogadom. Ezeket a képeket illusztratív magyarázó ábraként szántam a disszertációmba.

10, 33. oldal „A mintához luciferáz enzimet adunk, amely magnézium kofaktora és ATP szubsztrátja jelenlétében beindítja az enzim működését.” – nem értelmezhető a mondat.

Köszönöm a Bíráló megjegyzését. A mondat pontosabb megfogalmazása: A mintához adott luciferáz enzim működéséhez magnézium (az enzim kofaktora) és ATP (az enzim szubsztrátja) szükséges.

11, 34. oldal „A bioszenzorok egy széles körben elterjed csoportja elektrokémiai mérési elvet valósít meg, ide tartoznak az **impedometriás, voltammetrikus, amperometrikus és potenciometrikus** bioszenzorok.” impedimetriás, voltammetriás, amperometriás, potenciometriás...

Köszönöm a Bíráló javítását.

12, „Ezek az integrált eszközök elektrokémiai jelátalakítót alkalmaznak és ennek segítségével értékes analitikai információt szolgáltatnak a vizsgált biológiai eseményekről.”–Ezek elektrokémiai detektorok, amelyek az elektrokémiai jeleket különböző mérési elven mérik.

Köszönöm a bíráló észrevételét.

13, 35. oldal OWLS első említésénél ki kell írni a teljes nevet.

Köszönöm Opponensem észrevételét.

14, „alkalmazott evanescens hullám”–az a besugárzás hatására keletkezik, furcsa, hogy alkalmazott-ként kerül említésre.

A Bírálónak igaza van nem „alkalmazott”, hanem a besugárzás hatására keletkezett.

15, 37. oldal „Polielektrolitok és rétegenként építkezve (layer-by-layer) technika”– inkább rétegről rétegre építkezési technika.

Köszönöm Opponensem javaslatát.

16, A 2.5 fejezet egészen másról szól, mint a korábbiak, a bevezetésben indokolnia kellett volna ezt a váltást.

Egyetérttek a Bírálóval valóban indokolni kellett volna a váltást. A polielektrolit-rétegeket (referenciarendszer), arra használtam fel, hogy meghatározzam, azt a kalibrációs egyenletet, amellyel az Epic BT bioszenzor által közvetlenül mért hullámhossz-eltolódás értékéből meghatározható a felületegységre felvitt tömeg értéke. A meghatározott kalibrációs egyenletet a *glyphosate* felületre kitapadt tömegének számításához használtam fel.

17, 41. oldal Miért ezeket a sejteket választotta a kísérlethez? Meg kellene indokolni a választást.

Preoszteoblaszt sejtekkel (MC3T3-E1, *Mus musculus* (egér) kalvariából származó oszteoblaszt prekursor sejtvonal) dolgoztam a méréseim során.

A *glyphosate* növényvédő szert a csont és csontvelő megbetegedéseivel hozzák kapcsolatba. Ugyanis a *glyphosate* a táplálékkal be tud kerülni szervezetbe és a Ca^{2+} -, Mg^{2+} -, Zn^{2+} -, Fe^{2+} -kelátot tud képezni¹. Így könnyen be tud épülni a csontokba. Emiatt érdekes, hogy a csontvelőeredetű sejtvonal mennyire érzékeny a *glyphosate*-ra és készítményeire.

Dallaggrave és munkatársai vemhes Wistar-patkányok *glyphosate* növényvédő szeres itatásos kísérletük során a csontrendszeret érintő torz fejlődésről számolnak be (fontosabb csontok rövidülését, hiányát és deformitását figyelték meg)². Prasad és munkatársai citotoxikus hatásról és csontvelőt érintő károsodásról írnak³.

Ezen kívül ennek a sejtvonalnak a citotoxikus hatásokkal szembeni érzékenysége jól tanulmányozott, ezért a munkám során ideálisnak bizonyult a *glyphosate* növényvédő szer tesztelésére.

(1)-Caetano, M. S. ; Ramalho, T. C. ; Botrel, D. F. ; da Cunha, E. F. F. ; de Mello, W. C. Understanding the Inactivation Process of Organophosphorus Herbicides: A DFT Study of Glyphosate Metallic Complexes with Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Co^{3+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} , and Al^{3+} . *Int. J. Quantum Chem.* 2012, 112, 2752–2762. <https://doi.org/10.1002/qua.23222>.

(2)-Dallaggrave, E.; DiGiorgio Mantesea, F.; Soares Coelhoa, R. S.; Drawans Pereiraa, J.; Dalsenterb, P. R.; Langeloha, A. The teratogenic potential of the herbicide *glyphosate*-Roundup in Wistar rats. *Toxicol. Lett.*, 2003, 142: 45–52.

(3)-Prasad, S.; Srivastava, S.; Singh, M.; Shukla, Y. Clastogenic effects of *glyphosate* in bone marrow cells of swiss albino mice. *J. Toxicol.*, 2009, Epubl. <http://www.hindawi.com/journals/jt/2009/308985/>

18, 4.3.1. fejezetben ismerteti az OWLS technika működését, a 15. ábrán a készülék fotója és a működési elve látható. Az idézett honlapon a gyártó cég nem mutatja be a B ábrát, az eredetét meg kellett volna jelölni.

Valóban a honlapon nincs már fenn a kép. Elismerem rosszul jártam el, és meg kellett volna hivatkozni az eredeti kép forrását. A kép forrása: Székács, A.; Adányi, N.; Székács, I.; Majer-Baranyi, K.; Szendrő, I. Optical waveguide light-mode spectroscopy immunosensors for environmental monitoring, *Appl. Opt.* 2009, 48, B151-8

19, 42. oldal „Az optikai chipen található rácsot egy 632,8 nm hullámhosszúságú nyalábot kibocsájtó He-Ne lézerrel világítjuk meg.” Majd: „Az alkalmazott szenzor chipekben a 0. módusindexű transzverzális elektromos (TE0) és transzverzális mágneses módus (TM0) gerjeszthető.”- Szabatosabb lenne „chipen található optikai rácsot” Honnan van a két módus?

Köszönöm, egyetértek a „chipen található optikai rácst” megfogalmazással. A két módus a hullámvezető struktúra eredménye. Hullámvezető rétegvastagsága és törésmutatója egyértelműen meghatározza hány darab módus és hullámvezető módus képes kialakulni. Ennél a hullámvezetőnél két módus alakul ki. Vastagítva a hullámvezető réteget, akár több módus is képes hordozni.

20, 43. oldal Nem biztos, hogy felhasználói szinten ismerni kell a meglehetősen bonyolult levezetést, különösen akkor, amikor elsősorban nem is ezzel a készülékkel dolgozik a Jelölt. Ha néhány egyenlettel mégis bemutatja a levezetést, akkor meg kell határozni a perem feltételeket, milyen modellre, illetve hány rétegű modellre vonatkoznak az egyenletek.

A Bírálónak igaza van, valóban meg kellett volna határoznom a peremfeltételeket. Az ismertett egyenlet linearizált négyréteges modellre érvényes. A 4 réteg: az üvegszubsztrát, a hullámvezető film, az adszorbeált réteg és a fedő vizes közeg. A számításokban felteszik, hogy adszorbeált réteg vastagsága jóval hullámhossz alatti.⁴

(4)-Ramsden, J. J. (1994). Experimental methods for investigating protein adsorption kinetics at surfaces. Quarterly Reviews of Biophysics, 1994, 27, 41. doi:10.1017/s0033583500002900

21, Mit jelentenek az egyenletekben szereplő $A(N)$, $FM(N)$ és $FE(N)$ értékek?

Ezek a paraméterek a módusegyenlet egyes tagjait jelölik. Az $A(N)$ a hullámvezető rétegben való terjedéssel kapcsolatba hozható effektív tag (függenek N -től (effektív törésmutatótól)). Az $FE(N)$ és $FM(N)$ film–szubsztrát–határfelületeken létrejövő fázistolásokkal kapcsolatos effektív tagok (függenek N -től (effektív törésmutatótól)). Az FE az elektromos módusra, az FM a mágneses módusra vonatkozik.

22, 55. oldal „Egy elektromos 16-csatornás pipettával (FinnpipetteTM Novus, ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA) léptető módban a sejtszuspenziót és a reagenseket adtam a lyukakhoz a kísérlet során.” Ez már túlzottan részletes leírás.

Egyetértek a Bíráló megjegyzésével. Az eszköz használatát azért hangsúlyoztam, mert a kísérletben különösen fontos volt a párhuzamos kísérletek (lyukak) egyidejű kezelése.

23, „A koncentráció-hatás görbék számolásánál a kinetikák minimum értékeit vettem és ezekből a jelekből levonatom az anyagkontrollok értékeit (, hogy korrigáljam a fizikai hatásokból eredő hibákat pl.: hőmérsékletet és hígítást).”– Ezt a leírást egy ábrával kellene érthetővé tenni, de lehet hogy erre csak a kísérletek eredményeinek ismertetésénél kellett volna kitérni.

Köszönöm a Bíráló észrevételét.

24, „Sejtdhézió vizsgálata RGD-hangolt felületeken Epic BT bioszenzorral” – mit jelent a RGD-hangolt kifejezés? Röviden ismertetni kellene.

Az RGD-hangolt felület különböző koncentrációjú RGD motívummal bevont felszínt jelent. Valamint RGD hangolással különböző RGD-RGD távolságokat tudok elérni. Az RGD-hangolt felülethez kétféle polimert kevertem össze különböző koncentrációban; sejt- és fehérjetaszító

tasztító tulajdonságú PLL-g-PEG és sejtkitapadást elősegítő a PLL-g-PEG-RGD polimert. A különböző RGD koncentrációt tartalmazó felszínen különböző mértékben tudnak szétterülni a sejtek.

25, 56. oldal „Az összes lyuknál stabil alapvonalat rögzítettem 20 mM HEPES-HBSS pufferrel, majd a különböző koncentrációjú *glyphosate* oldattal kevert MC3T3-E1 sejteket és öt percig inkubáltam.” – értelmetlen mondat.

Köszönöm az Opponensem észrevételét. A következőként pontosítanám a mondatot: Az összes lyuknál stabil bioszenzoros alapvonalat vettem fel 20 mM HEPES-HBSS pufferben, majd a különböző koncentrációjú *glyphosate*-oldattal inkubált (5 percig) MC3T3-E1 sejteket adtam hozzá.

26, 57. oldal „*echistatin*, *glyphosate* és *tirofiban* oldatokat pipettáztam” – az *echistatin* és *tirofiban* alkalmazására miért került sor? Nem szerepelnek a felhasznált vegyületek között sem.

Köszönöm észrevételét. Valóban kimaradt a felhasznált vegyületek leírásából az *echistatin* és a *tirofiban*, és a dolgozatom elején ismertetnem kellett volna e két kontroll alkalmazását. Az *echistatin* vegyületet pozitív kontrollként használtam a méréseimben, mivel bizonyítottan sejtdhézió-gátló vegyület, és képes $\alpha\beta3$ integrineket nagy affinitással kötni.⁵ Ezzel szemben negatív kontrollként a *tirofiban* használtam, mert nem tud az integrinekhez kötődni.⁶

tirofiban (≥ 98.5 % tisztaság, Sigma, katalógusszám: 30165)

echisatin *Echis carinatus* fajból származik (Sigma, katalógusszám: E1518)

(5)-Szekacs, I.; Orgovan, N.; Peter, B.; Kovacs, B.; Horvath, R. Receptor Specific Adhesion Assay for the Quantification of Integrin–Ligand Interactions in Intact Cells Using a Microplate Based, Label-Free Optical Biosensor. *Sensors Actuators, B Chem.* 2018, 256, 729–734. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.09.208>.

(6)-Kapp, T. G.; Rechenmacher, F.; Neubauer, S.; Maltsev, O. V.; Cavalcanti-Adam, E. A.; Zarka, R.; Reuning, U.; Notni, J.; Wester, H.-J.; Mas-Moruno, C.; Spatz, J.; Geiger, B. ; Kessler, H. A Comprehensive Evaluation of the Activity and Selectivity Profile of Ligands for RGD-Binding Integrins. *Sci. Rep.* 2017, 7, 39805. <https://doi.org/10.1038/srep39805>.

27, 4.4.7. pont Ha nem a Jelölt végezet a kísérleteket, akkor miért első szám egyes személyben írja le a kísérleteket? Jelen volt a méréseknél?

Nem, nem voltam jelen az ELISA mérésél. Valóban belekerült egy mondat, amelyet többes számba kellett volna írni: “Ennek a mérésnek a célja is az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy a *glyphosate* kompetitív módon tudja-e gátolni a rekombináns $\alpha\beta3$ integrineket.”

Viszont a kísérlet leírását nem írtam egyes szám első személyben. Illetve a disszertációban ki is hangsúlyoztam, hogy a vizsgálatot a NAIK AKK (Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ Agrár-környezettudományi Kutatóintézet) munkatársai végezték.

28, 59. oldal „A pufferes alapvonal felvétele után 200 μ l PAH oldatot injektáltam a küvettába.” A rétegek építésének módját már a 4.4.1. pontban ismertette, nem szükséges ismét leírni, elég visszahivatkozni.

Köszönöm a Bíráló észrevételét.

29, 61. oldal Érdekes lenne látni, hogy az OWLS műszer által számított ΔM (polielektrolit), hogy felel meg a számításoknak. Összehasonlították az értékeket?

Az OWLS műszer által számított ΔM az anyagok dn/dc értékétől függenek, amit refraktométerrel mértünk ki. Ezért a refraktométer érzékenységtől függenek az értékek, ami $RUI \cdot 10^{-8}$. Az OWLS által számolt de Feijter-formula ellipszometriával többszörösen igazolt egyenlet.⁷

(7) De Feijter, J. A.; Benjamins, J.; Veer, F. A. Ellipsometry as a Tool to Study the Adsorption Behavior of Synthetic and Biopolymers at the Air-Water Interface. *Biopolymers* 1978, 17, 1759–1801. <https://doi.org/10.1002/bip.1978.360170711>

30, 62. oldal 5.2.1. fejezet hosszasan ismételi korábban már leírt anyagot.

Elfogadom a Bíráló észrevételét.

31, 64. oldal “fél maximális gátló koncentráció”–50%-os gátló hatás

Köszönöm a Bírálónak a javítását.

32, 79. oldal 30. ábra “kinetikája bevonat nélküli (zöld); pufferrel leöblített 0,2% *glyphosate* hatóanyagot tartalmazó szenzor felületén (kék)”–az ábra alapján fordítva van.

Köszönöm a bíráló észrevételét. Valóban, a magyar változat készítésekor véletlenül felcseréltem a mikroszkópos képeken a “*glyphosate* lemosás után” és “*glyphosate* nélkül” feliratokat. Az eredeti közleményben (*Sci. Rep.*) helyesen jelent meg.

33, 83. ábra A 32. ábra magyarázza a sejtkitapadás kinetikájának változását, de érdekes lenne a mérési görbéket is látni hozzá. A kísérletek alapján látszik (30. ábra), hogy a *glyphosate* nem rögzül a szenzor felületén, szinte teljesen kimosható, ahogy ábrázolja is. Ennek ellenére hatással van a kitapadásra. Adódik a kérdés, hogy ha a hatóanyagot előbb a sejtekkel keveri össze, és utána adja a nem kezelt szenzorra, akkor hogy alakulnak a jelek? Volt ilyen összehasonlító kísérlet?

Elvégeztük ezt a mérést. A *glyphosate* hatóanyaggal előinkubált sejtek üres lemezre történő kötésének vizsgálata során nem kaptunk szigmoid görbét a sejtek kitapadására. Vagyis a *glyphosate* gátolja az integrineket és ezzel a sejtek kitapadását.

A kérdéssel kapcsolatban megemlítem, hogy a *glyphosate* kis koncentrációjú oldatából a vegyület felületre történő adszorpciója az OWLS mérés technikával kimérhető, illetve az is látszik, hogy az adszorbeálódott *glyphosate* a lemosás során nem távolítható el teljes mértékben a felszínről.

Még egyszer szeretném megköszönni bírálóm dolgozatomra adott értékelését. Bízom abban, hogy kielégítően sikerült megválaszolni a feltett kérdéseket.

Budapest, 2020.11.12.

Farkas Enikő

Farkas Enikő