

Válasz Prof. Dr. Máthé Imre, az MTA Doktora bírálataira

Mindenekelőtt szeretném megköszönni Dr. Máthé Imre professzor úrnak disszertációm alapos és részletes bírálatát, bírálatának pozitív hangnemet.

Az alábbiakban a félkövér szedéssel idézett megjegyzésekhez fűzött kiegészítések, majd a kérdésekre adott válaszok következnek.

Az ábrák méretével kapcsolatos megjegyzés.

Két bíráló is kifogásolta a disszertációban szereplő egyes ábrák méretét, utólag úgy tűnik nagyobb méretű ábrákat lett volna érdemes szerkeszteni.

Irodalmi adatokra hivatkozva írja Jelölt a *Prymnesium parvum* fejlődésének leírásakor, hogy a vízvirágzáshoz B12 és B1 vitamint is igényel az alga (p.45). Ez hogyan értelmezendő?

A faj mixotróf anyagcserét folytató szervezetként szervesanyagok jelenlétében is képes fejlődni, a fejlődéséhez szükséges B₁₂ és B₁ vitamin-igényét elsősorban az alga nevelésekor érdemes figyelembe venni.

Az 5. ábrán az R1, R2, R3 csoportok hogyan kapcsolódnak a molekulavázhoz? A jelölések peroxid kötésekre utalnak.

Az 5. ábrán szerepeltetett molekulaváz illetve a feltüntetett csoportok ábrázolása a hivatalosan megjelentetett publikáció alapján történt. Bírálóm észrevétele alapján, áttekintve az irodalmat érdekes eredményre jutottam. Az eredeti leírás (Igarashi et al.1996. *J Am Chem Soc* 118, 479-480) a csoportok kapcsolódását (peroxid kötés) rosszul tünteti fel, „errátumot” ezzel kapcsolatosan ugyan nem találtam, de a leíró későbbi publikációiban már helyesen tünteti fel azok kapcsolódását (glikozid kötés). Érdekes módon későbbi kísérletes, illetve áttekintő jellegű munkákban egyaránt több szerző szinte minden esetben a helytelenül leírt eredeti molekula ábrázolását tünteti fel.

Válaszom egyértelműen az, hogy glikozid kötésről van szó. Köszönöm az észrevételt.

A *Prymnesium* toxinok hatását irodalmi adatok felhasználásával ismerteti a Jelölt. Egy 1953-as hivatkozásra utalva (47 oldal) írja, hogy „a szabad ammónia és nem az ammónium ionok a felelősek a lízisért”. Ezt hogyan lehet elképzelni? Vizes közegben az ammónia ammónium ion formájában lehet jelen.

A vízben a szabad ammónia és az ammónium-ion koncentrációjának arányát a víz pH-értéke, illetve a víz hőmérséklete szabja meg. Ez fontos tényező, mert a szabad ammónia erős sejtméreg és a pH növekedésével aránya növekszik. 7-es pH alatt ammónium keletkezik, de 9-

es pH-n 25, 10-es pH-n már 78%-ban szabad ammónia lehet jelen a vízben. Ilyen pH viszonyok fotoszintetizáló sejttömeg jelenlétében gyakran mondhatóak.

Az olvasóban kérdésként vetődik fel, hogy az egyéb toxinokat is tartalmazó algának miért "csak" ezen toxinok (proteázok) köre került vizsgátra, mi a helyzet az egyéb toxinokkal?

A *Prymnesium parvum* toxinja nem egyetlen molekula, hanem több vegyület keveréke, hemolizin és ichthyotoxin komponensekből áll. Mérgező anyagcseretermékei által széles spektrumú toxicitással rendelkezik: ichthyotoxikus, citotoxikus, hemolitikus, hepatotoxikus, neurotoxikus, antibakteriális, allelopatikus hatásait ismerjük.

A szervezetből a már tárgyalt primnezineket írták le, amelyekről elmondható, hogy kémiaiailag jól karakterizált és megfelelő szerkezeti analízissel rendelkezünk a molekulákat illetően. Ugyanakkor a molekula rendkívül instabil, az algavirágzás feltételei, környezeti kondíciói között csupán néhány óráig kimutathatóak a víztérből. A vizsgált vizekből a prymnesin-1 illetve prymnesin-2 molekulát folyadékkromatográfiával illetve MALDI-TOF tömegspektrometriás analízissel sikerült azonosítani saját munkánkban, azonban megfelelő mennyiségi meghatározásuk csak indirekt módon, hemolitikus aktivitás mérésével történt.

A faj tömeges megjelenéseinek hazai bemutatása, illetve a proteolitikus komponensek jellemzése mellett kétségtelenül ezen információknak is érdemes lett volna helyet adnom, még akkor is, ha ezeket az eredményeket a hivatalosan megjelent publikációban nem szerepeltettem.

A változó pH esettén kimutatott „összetétel különbségek” kapcsán kérdésként vetődhet fel, hogy magában a sejtekben meglévő, és/vagy csak külső hatásra átalakuló anyagokról van-e szó?

A proteolitikus hatású fehérjék extracellulárisan is detektálhatók voltak, pH optimumuk egybeesett a vízvirágzaskor mért terepi adatokkal, ami felvetette, hogy hozzájárulhatnak a toxinok mérgezőképességéhez és/vagy az áldozatok fehérjéinek lebontásában, bekebelezhetővé tételében játszanak fontos szerepet.

A savas proteázok száma 5, míg semleges és bázikus tartományban legalább 17-18 proteáz működése volt detektálható, emelkedő aktivitással. A bázikus tartományban megjelenő proteázok feltételezhetően *de novo* szintézisnek köszönhetőek, ugyanakkor 20-70 kDa relatív molekulatömegű tartományba eső komponensek esetében joggal merül fel annak a lehetősége, hogy proteolitikus aktivitással rendelkező alegységekről van szó.

A kapilláris elektroforézis alkalmazását sikeresen valósította meg, s alkalmazta a toxinok analízisére. E kifejezetten módszertani fejezet mellett az értekezés végén is szerepel egy módszertani összeállítás. Ezeket lehetett volna együtt tárgyalni, s más értekezésekhez hasonlóan az eredmények bemutatása előtt!

Köszönöm bírálóm felvetését. A kapilláris elektroforézis alkalmazásával kapcsolatos eredményeket fontosnak tartottam külön fejezetben kifejteni, mert ugyan egy általánosan

használt metodikai megközelítés volt több eredményünk ismertetése esetében is, ugyanakkor több önálló, a megjelenés időszakában unikálisnak mondható fejlesztés volt. Ezzel a módszerrel minimálisra csökkentettük a mintaelőkészítést, ami lehetővé teszi komplex mátrixok vizsgálatát, ugyanakkor a szokványos normál, illetve fordított fázisú rendszerekhez képest lehetővé teszi több toxin szimultán kvantitatív meghatározását.

Egy a tápanyagelvonás mentén vizsgált jelenség, egy korábbi megállapítással hogyan van összefüggésben, azzal, hogy pl. a csökkent N koncentrációs közegben nő meg a toxicitás (p. 71), itt Jelölt az ellenkezőjét tapasztalta. Ez hogyan magyarázható?

Az azonos fajok által előidézett algavirágzások eltérő toxicitása, toxintartalmának változatossága régóta foglalkoztatja a szakembereket. Az elsősorban egyszerű megfigyeléseken alapuló kezdeti leírások arról számoltak be, hogy az algavirágzások toxintermelését környezeti faktorok befolyásolják, melyek hatására a kevésbé optimális körülmények közé került sejtömeg aktív toxintermelésbe kezd és mérgezővé válik. Ismerve a toxinok sokféleségét, a toxintermelő fajok változatos fiziológiáját és környezeti igényeit, e kezdeti megfigyeléseket mindenképpen óvatosan kell kezelni, még akkor is, ha egyes fajok toxintermelésére igazak is lehetnek ezek az ismeretek.

Elsősorban a már részletesen tárgyalt tengeri mixotróf algafajok esetében írtak le olyan jellegű mechanizmusokat, melyek során a tápanyaghiányos állapotba került sejtömeg erősen mérgezővé vált miközben azok autotrófól heterotróf anyagcserére váltottak. Az erősödő toxintermelés következtében elhullott élőlények potenciális tápanyag-forrássá válva biztosíthatják az elszaporodott algák életműködéséhez szükséges táplálékot.

Az eukarióta mixotróf anyagcserét folytató toxintermelőktől jelentősen különböznek mind anatómiai, mind fiziológiai értelemben a cianobaktériumok, amelyek elsősorban az édesvizekben felelősek a mérgező vízvirágzásokért. Az eukarióta algavirágzásokért felelős szervezetekkel szemben a cianobaktériumoknál a toxintermelés (toxin-tartalom) sokkal ellentmondásosabbnak tűnik mind az azonos, mind az eltérő szerkezetű toxinok esetében. A bíráló által felvetett leírás mikrocisztinekre vonatkozik, míg a mi eredményeink az alkaloid típusú cilindropermopszinnal kapcsolatosak. Ettől függetlenül a felvetés teljesen jogos, hiszen ismerünk adatokat azzal kapcsolatosan, hogy ugyanazon toxin esetében is, a toxintartalom eltérően változik éhezésre, több cianobaktérium fajnál is.

Az 5. táblázat (p. 104) a mikrocisztin koncentrációt az IC50 értékeket és a kimutatott mikrocisztin formákat szerepelteti. Kérdésként vetődik fel, hogy a toxikusság értékét mire vonatkoztatja a Jelölt? Amennyiben csak csíranövényeken mérték a toxicitást, akkor hogyan lehet az IC50 értéket meghatározni? Ezek más élőlényekre mennyire vonatkoztathatók?

A mustár csíranövényteszt az ökotoxikológiában már régóta alkalmazott közkedvelt bioteszt, ami elsősorban a növény gyors csírázásának, magméretéből adódó jó kezelhetőségének és egyes mikroszennyezőkkel szembeni érzékenységének köszönhető. Összevetve a hagyományos biotesztekkel (pl. guppi, egér, patkány, tengerimalac stb.), illetve a modern sejt és szövetkultúrákon alapuló *in vivo* illetve *in vitro* rendszerekkel, kifejezetten olcsónak is

mondható. Ebből adódóan rutin tesztként környezet-analitikai, környezet-egészségügyi laboratóriumokban, illetve egyes fejlődő országokban, ahol az algatoxinanalitika kritikus humán-egészségügyi probléma, egyaránt hatékonyan használható.

Teljesen jogos volt a felvetés, hogy az említett teszt érzékeny-e egyes algatoxinokra. Kós és mtsai. (*Anal. Biochem.* 1995, 225.49-53.) bizonyították a ciklikus peptid típusú mikrocisztinekre való érzékenységet, Vasas és mtsai (*Anal. Biochem.* 2002, 302. 95-103.) az alkaloid típusú cilindropermopszinekre bizonyította ugyanezt (a jelölt saját eredménye, ugyanakkor phd dolgozatában szerepeltette ezeket az eredményeket, ezért MTA doktori értekezésében értelemszerűen nem hangsúlyozta). Ezen toxinok ismereteink szerint interferálnak a növényi anyagcserével. Fontos megjegyezni, hogy hagyományosan ugyan hepatotoxinokról beszélünk, de részletes hatásmechanizmusuk alapján érdemes (és a tudományos szakirodalomban elterjedtebb is) inkább proteinfoszfataz-gátlóknak (mikrocisztinek) illetve fehérjeszintézis gátlóknak (cilindropermopszin) nevezni őket. Az említett alapanyagcsere-folyamatok növényi rendszerekben is jelen vannak, értelemszerűen ezért fejtenek ki gátló hatást (növekedés szinten is!) a növényekben. A kezelt növények növekedését 72 h elteltével a kontroll (toxinmentes kivonat illetve vízminta) növények növekedéséhez (hosszúság mm-ben) viszonyítva, viszonylag egyszerűen tudunk IC_{50} értéket számolni, amely az adott toxinról, toxin tartalmú kivonatról, vízmintáról illetve azok toxicitásáról érdemi információt szolgáltat. Nem mellesleg, ezek az eredmények egybevetethetők a jóval drágább egérteszt szolgáltatása LD_{50} értékekkel.

Érdekes jelenség a neurotoxinok kérdése. Az anatoxin-a, acetilkolin-receptor blokkolóként növekedésgátlást ugyan nem okoz a növényekben, de határozottan kimérhető oxidatív stresszt indukál. Ugyanakkor fontos hangsúlyozni, hogy a neurotoxikus anatoxin és szaxitoxin származékokat rutin növénytesztel nem lehet detektálni.

A mustár csíranövényteszt tehát egyes toxinok detektálására (toxinok egyes környezeti mintákban való jelenlétére) alkalmas, de önmagában ennek az egyetlen tesztnek a segítségével a toxin élőlényekre, élőlényközösségekre való hatására következtetni nem szabad.

A *Cylindropermopsis raciborskii* toxintermelésének sajátosságai fejezetben 11 *Cylindropermopsis raciborskii* törzset vizsgáltak cilindropermopszin tartalomra. Ellentétben a külföldi törzsek mintáival, a hazaiak nem tartalmazták ezt a toxint. Kérdésként vetődik fel, hogy ez minden időben, minden hazai víztérre igaz lehet?

A valamennyi kontinensen az elmúlt évtizedekben megjelenő *Cylindropermopsis raciborskii* nitrogénfixáló szervezetet hazánkban kifejezetten az algavirágzást okozó fajok közé lehet sorolni. A nálunk előforduló kemotípusra a jól ismert alkaloid típusú toxin, a cilindropermopszin termelése nem jellemző, jelenlétét az eddig vizsgált egyetlen hazai populációból sem sikerült minden kétséget kizáró módon bizonyítani. Ez az eredmény összecseng más európai országbeli eredményekkel, ahol is szorványosan cilindropermopszin jelenlété igazolták, de az nem a *C. raciborskii*hoz köthető. A hazai tömeges megjelenések mentén egy alkalommal emlősök elpusztulásával párhuzamosan neurotoxikus hatást sikerült a fajhoz kötni. Ezen neurotoxikus kemotípus előfordulásának gyakoriságát a továbbiakban

vizsgálni érdemes (Szerbiából az elmúlt évben kaptam információt, ahol szintén ezen faj elszaporodása mentén lovak pusztultak el).

Mennyire látja általánosíthatónak a dolgozatban tált vizsgálatok eredményeit más hazai algavirágzások eseteire?

A dolgozatban ismertetett vizsgálatok eredményei alapján a következőket gondolom megjegyezni, amelyek a hazai vizek kapcsán általánosnak mondhatóak:

- A hazai vizekben, különösen a nyári időszakban elsősorban a cianobaktériumok felelősek az ilyen jellegű tömeges megjelenésekért.
- A viszonylag ritkábban előforduló eukarióta algák tömeges előfordulásai során kiemelendő a *Prymnesium parvum* előfordulása és tömeges megjelenése, amelyhez mérgezések, elsősorban halak tömeges elhullása egyértelműen hozzárendelhető. A faj hazai megjelenései elszigesülő területek vizeiben, jellemzően agyagbánya-tavakban fordulhatnak elő. A faj tömeges megjelenéseire jellemző, hogy kb. 40 millió egyedszám/literes előfordulás esetén mérgezések szinte minden esetben jellemzőek.
- A cianobaktériumok esetében a ciklikus (és lineáris) peptid típusú toxinok megjelenése jellemző elsősorban a *Microcystis* és *Planktothrix* fajok elszaporodásakor. Ezek a toxinok pl. a leggyakoribb mikrocisztin variánsok leginkább hosszabbtávú hatásaival számolhatunk bioakkumulációjuk kiemelendő.
- A termelő szervezetek változatos toxintermelő-képességgel rendelkeznek, viszonylag kisebb mértékű toxintermelő képességtől egészen a fokozottabb termelésre hajlamos genotípusok jelenléte is jellemző. A leggyakrabban előforduló mikrocisztin variánsok a MC-LR, -RR és -YR.
- Hazánkban a neurotoxikus cianobaktériumok jelenléte kevésbé jellemző (összevetve néhány más területtel, pl. Ausztráliában, Skandináv területeken gyakoribbak ezek a megjelenések és az ilyen jellegű mérgezéses esetek).

Kimutathatók-e a nitrogén és foszfor környezetszennyezőkön kívül más szennyezők hatása a vízvirágzásokra, melyek pl. a mezőgazdasági művelésből adódnak?

A szerves anyagterhelés során kétségkívül a nitrogén illetve foszforformák kapták a legnagyobb visszhangot mind a mai napig, ugyanakkor az elmúlt években egyre erőteljesebben kerül elő a vas szerepe. A felszíni vizekben az algaszaporodást leggyakrabban a foszfor és a nitrogén kínálat szabályozza. A nitrogén hiányát azonban a mérsékelt és a meleg égövön tenyésző nitrogénkötő kéalgák a légköri molekuláris nitrogén megkötésével kompenzálni tudják, ezért úgy tűnik, a foszfor az, amelynek túlkínálata nemkívánatos algásodáshoz vezethet. Ismert egyébként az tény is, hogy a világóceánok egyharmadán nem a nitrogén, nem a foszfor, hanem az oldott vas korlátozza az algák szaporodását.

Ezzel kapcsolatosan újabb és újabb publikációk jelennek meg egyes édesvízi vizekkel kapcsolatosan is, hasonlóan bizonyítva a vas szerepét.

A szerves anyagokon túl érdemes szólni a jelenkor szerves mikro-szennyezői közül pl. egyes gyógyszerszármazékok hatásairól, amivel kapcsolatosan éppen most fejeztünk be egy nagyobb-szabású laboratóriumi és terepi kísérletsorozatot, amiben a Növényzeti Tanszék és a

Hidrobiológiai Tanszék munkatársai nem szteroid típusú gyulladáscsökkentők hatásait vizsgálatuk planktonikus szervezetekre és az algavirágzást okozó cianobaktériumok erre a szennyező csoportra kevésbé voltak érzékenyek.

A kémiai ágensek ismerete mennyire vehető figyelembe s milyen taxonómiai szinten a nagymértékben változékony cianobaktériumok osztályozásánál?

Az algák anyagcseretermékeinek változatossága, a magasabb szerveződési szinten lévő növények ilyen jellegű variabilitásához mérhető. A speciális anyagcseretermékeik közül szénhidrátok, lipidek, terpenoidok, alkaloidok és fenoloidok éppen úgy megtalálhatóak, mint a növényekben.

A toxinok estében, amelyek önmagukban is igen változatos kémiai szerkezeteket jelentenek, taxonómiai markerként csak nagyon hozzávetőlegesen beszélhetünk. Vannak egyes fajok melyek toxintermelése valószínűsíthető, potenciálisan toxintermelőként beszélhetünk róluk (pl. *Microcystis*, *Cylindrospermopsis* fajok) de ezek valós toxicitását a toxintermelésért felelős génklaszter jelenléte, hiánya vagy annak megfelelő működése határozza meg. A jelenlegi ismereteink szerint csupán küllemi tulajdonságok alapján a toxintermelés nem igazolható. Egy adott faj egyes populációi toxintermelőek, míg mások nem.

Tovább bonyolítja a képet, hogy egy adott toxint több faj is termelhet (pl mikrocisztin esetében az említett *Microcystis* genuszon kívül *Anabaena*, *Planktothrix*, *Aphanizomenon*) amelyek taxonómiai, filogenetikai értelemben egymástól távol álló cianobakteriális taxonok. Még szélsőséesebb példa, hogy a szaxitoxin-származékokat egyes dinoflagelláta fajok illetve prokarióta cianobaktérium fajok egyaránt képesek termelni.

Ugyanakkor kétségtelen, hogy az elmúlt években egyes potenciális *cylindrospermopsis*zin termelőként leírt genuszok a legújabb rendszerezésekben egymáshoz közelebb kerültek. Valamint egyes lineáris peptid toxinok majd minden esetben határozottan egyes *Microcystis* fajokhoz köthetőek.

Végezetül köszönöm bírálóm építő jellegű kritikai észrevételeit, részletekbe menő javításait, támogató véleményét és tisztelettel kérem válaszaim elfogadását.

Debrecen, 2015. február 22.



Dr. Vasas Gábor