

# Jelölésmentes optikai bioszenzorok alkalmazása xenobiotikumok toxikusságának feltárására

DOI:10.18136/PE.2020.760

*Doktori (PhD) értekezés*

## **Készítette:**

Farkas Enikő

## **Témavezető:**

Dr. Székács Inna  
(tudományos főmunkatárs)

Energiatudományi Kutatóközpont  
Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézet



Pannon Egyetem  
Vegyészmérnöki és Anyagtudományi Doktori Iskola  
(Molekuláris- és Nanotechnológiák Doktori Iskola)



Budapest, 2020



# Tartalomjegyzék

<b>PhD értekezés kivonata .....</b>	<b>6</b>
<b>Rövidítésjegyzék.....</b>	<b>12</b>
<b>Előszó .....</b>	<b>14</b>
<b>1. Bevezetés.....</b>	<b>15</b>
<b>2. Irodalmi áttekintés .....</b>	<b>17</b>
2.1. Xenobiotikumok.....	17
2.2. A méréseimhez használt teszt növényvédőszer-hatóanyag: a <i>glyphosate</i> .....	18
2.3. A sejtadhézió .....	22
2.3.1. Az integrinek.....	24
2.4. Sejttoxicitás .....	27
2.4.1. A sejthalál folyamata .....	27
2.4.2. Toxinok hatása a sejtadhézióra .....	29
2.4.3. Hagyományos sejttoxicitás-vizsgálatok.....	30
2.4.4. Valós idejű jelölésmentes bioszenzorok a sejttoxicitás kimutatására.....	34
2.5. Polielektrolitok és rétegenként építkezve (layer-by-layer) technika.....	37
<b>3. Célkitűzés .....</b>	<b>39</b>
<b>4. Anyagok és módszerek .....</b>	<b>40</b>
4.1. Alkalmazott vegyszerek .....	40
4.2. A vizsgált sejt kultúra.....	41
4.3. Alkalmazott műszerek és kísérleti eljárások .....	41
4.3.1. OWLS bioszenzor.....	41
4.3.2. Epic BT bioszenzor .....	46
4.3.3. HoloMonitor digitális holografikus mikroszkópia.....	47
4.3.4. Refraktométer .....	49
4.3.5. Muse citofluoriméter.....	49
4.3.6. Muse kaszpáz-3/7-teszt apoptózis detektálásához .....	51
4.3.7. Mikroszkópia .....	53
4.4. Kísérletek menete és kiértékelési módja .....	54
4.4.1. Polielektrolit multirétegek felépülésének mérése OWLS 210 és Epic BT bioszenzorral .....	54

4.4.2.	Xenobiotikumok hatásának vizsgálata letapadt sejteken Epic BT bioszenzorról ...	55
4.4.3.	Sejtadhézió vizsgálata RGD-hangolt felületeken Epic BT bioszenzorról .....	55
4.4.4.	A sejtadhézió vizsgálata a <i>glyphosate</i> molekulát tartalmazó felületen Epic BT bioszenzorról .....	56
4.4.5.	A <i>glyphosate</i> gátló hatásának vizsgálata a sejtadhézióra Epic BT bioszenzorról ...	56
4.4.6.	Kompetitív integrin kötési vizsgálat Epic BT bioszenzorról .....	57
4.4.7.	Kompetitív enzimes immunoszorbenses próba .....	57
4.4.8.	Statisztikai analízis.....	58
<b>5.</b>	<b>Eredmények és értékelésük.....</b>	<b>59</b>
5.1.	Epic bioszenzor felületi tömegérzékenységének meghatározása OWLS bioszenzorról párhuzamosan mért polielektrolit-rétegek segítségével.....	59
5.2.	Xenobiotikumok hatása letapadt sejtekre.....	61
5.2.1.	Jelölésmentes optikai bioszenzor alkalmazása xenobiotikumok letapadt sejtekre gyakorolt hatásának meghatározásához .....	62
5.2.2.	Xenobiotikumok hatásának vizsgálata fluoreszcens mikroszkópia alkalmazásával ..	65
5.2.3.	Sejtmorfológia tanulmányozása digitális holografikus mikroszkópiával .....	66
5.2.4.	Életképesség-vizsgálat kaszpáz-3/7-teszttel .....	69
5.3.	<i>Glyphosate</i> hatása MC3T3-E1 sejtek adhéziójára .....	71
5.3.1.	MC3T3-E1 sejtek RGD-sűrűség hangolásától függő adhéziója. Az integrin–RGD kötés disszociációs állandójának meghatározása.....	71
5.3.2.	A sejtadhézió vizsgálata <i>glyphosate</i> tartalmú felületeken .....	75
5.3.3.	Az MC3T3-E1 sejtadhézió gátlásának vizsgálata és az integrin– <i>glyphosate</i> kötésszociációs állandójának meghatározása.....	80
5.3.4.	A <i>glyphosate</i> sejtadhézióra gyakorolt hatásának értelmezése és a megfigyelt hatásokat magyarázó modell.....	82
5.3.5.	A <i>glyphosate</i> és az integrinek kapcsolatának értelmezése.....	84
5.3.6.	A <i>glyphosate</i> -molekula $\alpha\beta 3$ integrinhez történő kötődésének bizonyítása kompetitív ELISA módszerrel .....	87
<b>6.</b>	<b>Összefoglalás .....</b>	<b>89</b>
<b>7.</b>	<b>Új tudományos eredmények .....</b>	<b>92</b>
7.1.	Tézispontok .....	92
7.2.	Thesis points.....	94
<b>8.</b>	<b>Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>96</b>

<b>9. Saját publikációk jegyzéke .....</b>	<b>98</b>
9.1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk .....	98
9.2. A disszertációhoz közvetlenül nem kapcsolódó publikációk.....	98
9.3. Konferenciaszereplések, előadások.....	99
<b>10. Irodalomjegyzék .....</b>	<b>103</b>

## PhD értekezés kivonata

### Jelölésmentes optikai bioszenzorok alkalmazása xenobiotikumok toxikusságának feltárására

Egy xenobiotikum – adott használatra történő – engedélyeztetése előtt szükséges elvégezni az *in vitro* citotoxicitás-vizsgálatokat, amelyek nagyrészt biokémiai teszteken alapulnak. Ezek azonban számos hátránnyal rendelkezhetnek: időigényesek, jelölő anyagra van szükség a mérés kivitelezéséhez, alkalmazásuk korlátozott szérumos tápközegben. Az egyre fejlődő szenzortechnika képes lehet kiküszöbölni a hagyományos technikák hátrányait. Az optikai elven működő, jelölésmentes Epic BenchTop (BT) bioszenzor érzékeli a szenzorfelület feletti 100-200 nm vastag rétegben bekövetkező sejtmorfológiai és dinamikus tömegátrendeződési folyamatok által keltett összetett sejtválaszokat, melynek révén új lehetőséget nyit a xenobiotikumok citotoxicitásának gyors és hatékony meghatározásához.

Kutatásom célja, hogy egy új módszert fejlesszek ki xenobiotikumok citotoxicitás-vizsgálatához az Epic BT bioszenzor segítségével. Munkám során a világszerte használt Roundup Classic növényvédő szer és komponensei (hatóanyaga a *glyphosate*, formázó anyaga pedig a faggyúalapú polioxietilénamin (POEA)) által a csonteredetű (preoszteoblaszt, MC3T3-E1) sejtekre gyakorolt hatását vizsgáltam szérumot tartalmazó és szérummentes tápközegben. A bioszenzoros eredményekből sikeresen meghatároztam a reagensok sejtkitapadására gyakorolt koncentrációfüggő citotoxikus hatásait. Ezeket az eredményeket hagyományos jelöléses módszerekkel (fluoreszcens mikroszkópiával és citofluorimetriával), illetve holografikus mikroszkópiával is alátámasztottam. A munka megmutatta, hogy a Roundup készítmény közvetlen sejttotoxicitásáért döntően a POEA a felelős.

A formázó anyag toxicitásán túl a *glyphosate* hatóanyag saját, eddig nem ismert, sejtdhéziót módosító tulajdonságait is megfigyeltem. A kísérleteim során a *glyphosate* alacsony koncentrációban (0,1%, 4,38 mM) a szenzorfelületre monoréteggént adszorbeálódva elő tudja segíteni a sejtek adhézióját. Ez a folyamat az RGD-motívumhoz hasonlóan a *glyphosate* esetében is ligandumspecifikus kinetikát mutat, pedig méréseim szerint az RGD-motívum az integrinhez 58-szor erősebben köt a *glyphosate* hatóanyagnál (disszociációs állandó ( $K_d$ ) értéke alapján becsülve). Ugyanakkor a *glyphosate* sejtszuspenzióval inkubálva gátolja a sejtdhéziót. Mivel a

sejtadhezió a sejtmembránban lévő integrinek és az extracelluláris ligandumok kölcsönhatása révén jön létre, logikus következtetés volt, hogy a *glyphosate* – eddig ismeretlen módon – gátolja az integrineket. Ezt bizonyítani is tudtam: sejtmentes mérési eljárással igazoltam a *glyphosate* kötődését a rekombináns  $\alpha\beta3$ -integrinhez.

## **Application of label-free biosensor to reveal the toxicity of xenobiotics**

Authorization of a xenobiotic for a particular use requires the test of its *in vitro* cytotoxicity. The majority of present cytotoxicity assays are based on biochemical tests. These tests have many disadvantages, namely, they are time-consuming, require labeling material for the measurements, and their use is limited in serum-containing medium. Recent developments in sensor technology shows promise to eliminate these disadvantages of conventional techniques. The label-free optical Epic BenchTop (BT) biosensor detects integrated cellular responses about changes in cell morphology and dynamic mass redistribution of cellular contents at the 100–200 nm thick layer above the sensor surface, opening up new opportunities in rapid and powerful determination of possible cell toxicity of xenobiotics.

The aim of the present research was to develop a novel method for detecting cytotoxicity of xenobiotics by exploiting the Epic BT label-free biosensor. In my research, I studied the worldwide used herbicide Roundup Classic, its co-formulant tallow based polyoxyetilenamine (POEA), and its active ingredient glyphosate to determine their effects on bone-derived cells (preosteoblast, MC3T3-E1) in serum-free and serum-containing medium. Concentration-dependent cytotoxic effects of the reagents were successfully determined on cell adhesion by analyzing the biosensor data. These results were verified by conventional techniques (fluorescent microscopy and flow cytometry) and holographic microscopy (HoloMonitor). This work showed that the POEA is the main component responsible for the direct cytotoxicity of Roundup Classic.

Beyond the cytotoxicity of the co-formulant, unknown and novel cell adhesion modifying properties of glyphosate have been additionally observed. In my experiments, the glyphosate at low concentration (0.1%, 4,38 mM) could adsorb as a monolayer on the sensor surface to promote cell adhesion. This process shows ligand-specific kinetics for glyphosate similar to the RGD (arginine-glycine-aspartic acid) motif induced adhesion, although – according to my results - the RGD motif binds to integrin 58 times stronger than glyphosate (estimated based on the measured dissociation constant ( $K_d$ ) values). In contrast, when cells are incubated with glyphosate, the adhesion of living cells were inhibited. Because the cell adhesion occurs by interaction between integrins in the cell membrane and extracellular ligands, it was a logical conclusion, that the



glyphosate inhibits integrins in a previously unrevealed way. The binding of glyphosate to recombinant  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -integrin was confirmed by non cell based assay, too.

## Verwendung von nicht markierten optischen Biosensoren zum Nachweis der Toxizität von Xenobiotika

In-vitro-Teste auf Zytotoxizität, die größtenteils auf biochemischen Testen beruhen, sind erforderlich, bevor ein Xenobiotikum zur Verwendung zugelassen wird. Diese haben aber zahlreiche Nachteile: sie sind zeitaufwendig, für die Durchführung der Messungen sind Tracer notwendig, für die Verwendung stehen Serummedien nur in begrenzter Anzahl zur Verfügung. Die sich ständig weiterentwickelnde Sensortechnologie kann diese Nachteile herkömmlicher Techniken überwinden. Der unmarkierte Epic BenchTop (BT) Biosensor, der auf einem optischen Prinzip arbeitet, erkennt die komplexen zellulären Reaktionen, die durch zelluläre morphologische und dynamische Massenumlagerungen in der 100-200 nm-Schicht über der Sensoroberfläche hervorgerufen werden, und eröffnet so einen neuen Weg zur schnellen und effizienten Bestimmung der Zytotoxizität von Xenobiotika.

Ziel meiner Forschung ist es, eine neue Methode zur Untersuchung der Zytotoxizität von Xenobiotika unter Verwendung des Epic BT Biosensors zu entwickeln. Im Zuge meiner Arbeit untersuchte ich die Wirkung von Roundup Classic-Pestiziden und ihrer Komponenten (Wirkstoff: *Glyphosate* und sein Formmaterial: Talgbasis Polyoxyethylenamin (POEA)) auf Zellen, die von Knochen abstammen (Präosteoblasten, MC3T3-E1) in serumhaltigem und serumfreiem Medium. Die konzentrationsabhängigen zytotoxischen Wirkungen der Reagenzien wurden erfolgreich aus den biosensorischen Ergebnissen bestimmt. Diese Ergebnisse wurden auch durch herkömmliche Markierungsmethoden (Fluoreszenzmikroskopie und Zytofluorimetrie), sowie holographische Mikroskopie bestätigt. Die Arbeit zeigte, dass für die zelluläre Toxizität von Roundup-Mitteln hauptsächlich das POEA verantwortlich ist.

Zusätzlich zur Toxizität des Formungsmittels wurden auch die bisher unbekanntes intrazellulären haftungsmodifizierenden Eigenschaften des Wirkstoffs *Glyphosate* beobachtet. In den Experimenten kann *Glyphosate*, das in geringen Konzentrationen (0,1%, 4,38 mM) in der Monoschicht an der Oberfläche des Sensors adsorbiert ist, die Zelladhäsion zu fördern. Dieser Prozess zeigt, ähnlich wie das RGD-Motiv, für *Glyphosate* eine ligandenspezifische Kinetik, obwohl das RGD-Motiv 58-fach wirksamer an Integrin bindet, als das *Glyphosate* (geschätzt aufgrund des  $K_d$ -Werts). Allerdings hemmt das mit der Zellsuspension inkubierte *Glyphosate* die Zelladhäsion. Da die Zelladhäsion durch die Wechselwirkung von Integrinen in der Zellmembran

mit extrazellulären Liganden erfolgt, war es eine logische Schlussfolgerung, dass das *Glyphosate* - auf bisher unbekannte Weise - Integrine hemmt. Das konnte auch bewiesen werden: durch ein zellfreies Messverfahren wurde die Bindung von *Glyphosate* an rekombinantes  $\alpha\beta 3$ -Integrin bestätigt.

## Rövidítésjegyzék

$\alpha$ -MEM	$\alpha$ -modification of minimum essential medium	$\alpha$ -módosított minimális esszenciális médium
7-ADD	7-aminoactinomycin D	7-amino-aktinomycin D
AMPA	aminomethylphosphonic acid	amino-metil-foszfonsav
ATP	adenosine-5'-triphosphate	adenozin-5'-trifoszfát
BT	BenchTop	asztali
DAPI	4',6-diamino-2-phenylindole	4',6-diamino-2-fenilindol
DMR	dynamic mass redistribution	dinamikus tömegátrendeződés
DEVD-peptid	Asp-Glu-Val-Asp peptide	Asp-Glu-Val-Asp peptid
ECM	extracellular matrix	extracelluláris mátrix
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	etilén-diamin-tetraecetsav
ELISA	enzyme linked immunosorbent assays	enzimkapcsolt immunszorbens vizsgálat
FBS	fetal bovine serum	magzati borjúsérum
FITC	fluorescein isothiocyanate	fluoreszcein-izotiocianát
GM	genetically modified	géntechnológiával módosított
GM38	human fibroblast cell	emberi fibroblasztsejt
HBSS	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethansulfonic acid	4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etánszulfonsav
HEK293	embryonic kidney cell	embrionális vesesejt
HEPES	Hank's balanced salt solution	Hank-féle normalizált sóoldat
HepG2	human hepatoma cell	emberi hepatomasejt
Hep-2	human epithelial type 2 cell	emberi epiteliális 2-es típusú sejt
HRP	horseradish peroxidase	tormaperoxidáz
HT1080	human fibrosarcoma cell	emberi fibroszarkómasejt
<i>IC</i> <sub>50</sub>	half maximal inhibitory concentration	fél maximális gátló koncentráció
INT	iodonitrotetrazolium	jodo-nitro-tetrazólium
IPA	isopropylamine	izopropil-amin
JAr	human chorioplacental cell	emberi koriokarcinóma citotrofoblaszt sejt
JEG3	human epithelial keratinocyte cell, human choriocarcinoma	emberi epiteliális keratinocitasejt, emberi koriokarcinóma
LDH	lactate dehydrogenase	laktát dehidrogenáz
LDV	leucine-arginine-glycine	leucin-aszparaginsav-valin
MC3T3-E1	mouse preosteoblastic cell line	egérből származó preoszteoblaszt sejtvonala
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide	3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium bromid
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium	3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-5-(3-karboxi-metoxi-fenil)-2-(4-szulfo-fenil)-2H-tetrazólium
NAD	nicotinamide adenine dinucleotide	nikotinamid-adenin-dinukleotid

NADH	reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide	a nikotinamid-adenin-dinukleotid redukált alakja
NE-4C	murine stem cell-like neuroectodermal cell	egérből származó neuroektodermális őssejtípusú sejt
NK-sejtek	natural killer cells	természetes ölősejtek
OWLS	optical waveguide lightmode spectroscopy	optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia
PAH	poly-(allylamine-hydrochloride)	poli-(allil-amin-hidroklorid)
PEG	polyethylene glycol	poli-etilén-glikol
PGA	poly-(L-glutamic acid)	poliglutaminsav
POEA	tallow-based polyoxyethyleneamine	faggyúalapú polioxietilénamin
PP	poly-(L-lysine)-graft-poly(ethylene glycol)	poli-etilén-glikollal funkcionizált poli-L-lizin
PPR	RGD-funcionalized PLL-g-PEG	RGD-funkcionizált PLL-g-PEG
PSS	poly-(styrenesulfonate)	poli-(sztírol-szulfonát)
QCM	quartz crystal microbalance	kvarckristály mikromérleg
PBS	phosphate-buffered saline	foszfát pufferes sóoldat
RGD	arginine-glycine-asparatic acid	arginin-glicin-aszparaginsav
RWG	resonant waveguide grating	rezonáns rácsos hullámvezető
TE	transverse electric	transzverzális elektromos
TM	transverse magnetic	transzverzális mágneses
TRITC	tetramethylrodamine	tetrametilrodamin
VASP	vasodilator stimulated phosphoprotein	értágító hatást stimuláló foszfofehérje
WST-1	4-(3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolium)-1,3-benzene-disulfonate)	4-(3-(4-jodo-fenil)-2-(4-nitro-fenil)-2H-5-tetrazolium)-1,3-benzol-diszulfonát
WST-8	2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium,monosodium salt	2-(2-metoxi-4-nitro-fenil)-3-(4-nitro-fenil)-5-(2,4-diszulfo-fenil)-2H-tetrazólium nátriumsója
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide	2,3-bisz(2-metoxi-4-nitro-5-szulfo-fenil)-2H-tetrazólium-5-karboxanilid

## Előszó

PhD-tanulmányaimat a Pannon Egyetem Molekuláris- és Nanotechnológiák Doktori Iskolájában folytattam, kutatómunkámat Dr. Székács Inna vezetésével az Energiatudományi Kutatóközpont Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézetének Nanobioszenzorika Lendület Kutatócsoportjában végeztem. Kutatómunkám során a fő feladatomból az volt, hogy egy új, citotoxicitást meghatározó módszert fejlesszek ki az Epic BT jelölésmentes optikai bioszenzor kiaknázásával. Doktori disszertációmban az ebből a munkámból származó eredményeimet szeretném bemutatni.

Doktori éveim során részt vettem számos más kutatásban és együttműködésben is. Ezek közül kiemelendők a Dr. Pap József Sándorral létrehozott Cu-peptid-polielektrolit katalizátor nanokompozitrétegek, mely témából egy rangos publikáció is született<sup>1</sup>. Továbbá megemlítendőek a Professzor Vonderviszt Ferencsel tanulmányozott önszerveződő flagellin-polielektrolit nanokompozit rétegek is, amelyhez kapcsolódó eredményeket szintén jelentős folyóiratban publikáltuk<sup>2</sup>. Mindazonáltal e további két publikáció nem köthető szorosan a doktori disszertációmhoz, melyek bemutatására jelen dolgozat keretein belül nincs mód, ugyanakkor hasonló szakmai jelentőséggel bírnak, mint az itt ismertetett szűkebb kutatási eredményeim.

# 1. Bevezetés

A citotoxicitás-vizsgálat egyaránt nélkülözhetetlen egy adott vegyület használatának engedélyezéséhez a gyógyszeriparban<sup>3</sup>, a mezőgazdaságban<sup>4</sup> vagy az élelmiszeriparban<sup>5</sup>. Az *in vitro* citotoxicitás-vizsgálatokban napjainkban túlnyomórészt biokémiai módszereket (MTT és enzimikus tesztek) használnak<sup>6</sup>. Ezek a módszerek, bár jól alkalmazhatóak a sejtbiológiai vizsgálatoknál és a biokémiai gyakorlatban, sajnos számos hátránnyal rendelkezhetnek. Nevezetesen: időigényesek, jelölő anyagra van szükség a mérés kivitelezéséhez, valamint alkalmazásuk sérülékeny tápközegben korlátozott.

Az elmúlt pár évtizedben a bio- és kémiai szenzorok fejlődése ugrásszerűen növekedett, köszönhetően a modern eszközök által biztosított gyors, megbízható és valós idejű mérési módoknak. A fejlesztések képesek voltak követni a legújabb elvárásokat: az automatizáció megvalósítását, a miniaturizáció lehetőségét és az egyszerű, olcsó kialakíthatóságot<sup>7</sup>. A bioszenzorok sokoldalú analitikai eszközök. Főleg az orvosi biológiában, élelmiszeriparban, környezetvédelemben és hadiiparban használják őket<sup>8,9</sup>. A bioszenzorok fontos előnye, hogy nagy érzékenységgel, szelektív, valós idejű mérést tesznek lehetővé, akár jelölésmentesek is lehetnek és számos esetben rendkívül költséghatékonyak<sup>8</sup>. A mérés elv alapján csoportosíthatjuk optikai, piezoelektromos, elektrokémiai, termometrikus és mágneses bioszenzorokként<sup>9</sup>. Az evaneszcens hullám alapú érzékelést kiaknázó optikai bioszenzorok (pl. a Corning által gyártott Epic BenchTop (BT) műszer) érzéklni képesek a szenzorfelület feletti 100-200 nm vastag rétegben bekövetkező törésmutató változásokat. Ezen bioszenzorok segítségével tanulmányozni lehet a sejtadhéziós vagy akár a jelátviteli folyamatokat is<sup>10-12</sup>. E folyamatok nagyon fontos szerepet játszanak a sejtek életképességének és biológiai funkcióinak fenntartásában. Mindemellett, a jelölésmentes bioszenzoros technika kiküszöböli a hagyományos módszerek fent említett hátrányait, így új lehetőségeket nyit meg a citotoxicitás vizsgálatokban.

Doktori munkám célja volt egy új citotoxicitás-kimutatási módszer kidolgozása Epic BT bioszenzor felhasználásával. Aktuális és fontos probléma az ökotoxikológiában, hogy a formázott növényvédő szerek környezeti és toxikológiai hatásai gyakran eltérnek a hatóanyagának vagy más összetevőjének hatásától. Emiatt a vizsgálatokhoz egy világszerte használt Roundup Classic növényvédő szernek és komponenseinek (hatóanyaga a *glyphosate*, formázó anyaga pedig a faggyúalapú polioxietilénamin (POEA)) élettani hatását teszteltem csonteredetű (preoszteoblaszt,

MC3T3-E1) sejtek esetében szérumot tartalmazó és szérummentes tápközegben. Ennek a növényvédő szernek a biztonságos használatával kapcsolatban számos kérdés merült fel, és számos megbetegedéssel hozták kapcsolatba (pl.: a májat, vérképző-rendszert, csontvelőt, idegrendszert, magzatot valamint placentát érintő megbetegedésekkel)<sup>13-18</sup>. A megbetegedések között szerepet játszhat a csont és csontvelő betegségek (csonttritkulás, csontlágylás, csontfejlődési rendellenességek, rák) kialakulásában. Ugyanis a *glyphosate* a táplálékkal be tud kerülni szervezetbe és a  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  kelátot tud képezni<sup>19</sup>. Így könnyen be tud épülni a csontokba.

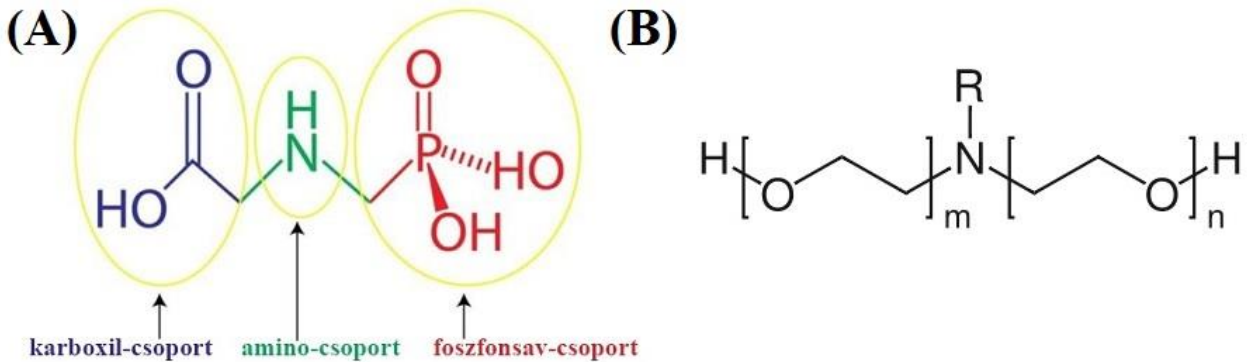
Továbbá, bioszenzoros mérések segítségével meghatároztam az RGD (arginin-glicin-aszparaginsav tripeptid motívum)-integrin és a *glyphosate*-integrin kötések disszociációs állandóját. Az ehhez kapcsolódó kísérletek során layer-by-layer (azaz rétegről rétegre építkezést megvalósító) technikát alkalmazva, polielektrolit-oldatok (PAH (poli-(allil-amin-hidroklorid)) és PSS (poli-(sztírol-szulfonát))) felhasználásával multirétegeket hoztam létre különböző bioszenzoros felületeken. A létrehozott referencia rendszer segítségével meghatároztam egy kalibrációs egyenletet. Ezzel az egyenlettel az Epic BT bioszenzor által közvetlenül mért hullámhossz-eltolódás értékéből ( $\Delta\lambda$  (pm)) meghatározható a felületegységre felvitt polielektrolit tömeg értéke. Ezt az egyenletet - refraktometriás mérések segítségével - *glyphosate* hatóanyagra is alkalmazhatóvá teszem.



## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. Xenobiotikumok

Xenobiotikumoknak nevezzük azokat a kémiai anyagokat, amelyek idegenek a biológiai rendszerektől<sup>20,21</sup>. A xenobiotikumok lehetnek – egyebek között – gyógyszerek, növényvédőszer és környezetszennyező anyagok is. A biológiailag aktív anyagok közül egyes növényvédőszer-hatóanyagok (pl.: *paraquat*, *atrazine*, *chlorpyrifos*, *amitraz*, *dichlorvos*, *glyphosate stb...*)<sup>22-27</sup> új toxikus tulajdonságait és mellékhatásait fedezték fel. Az engedélyeztetésben új toxicitásvizsgálati eljárásokat is előírtak a legújabb szabályozás óta, melyeket a korábban engedélyezett hatóanyagokra is vonatkoztattak<sup>28</sup>. Tehát ha egy régóta engedélyezett anyag toxikusnak bizonyul az új engedélyezési tesztben, akkor vissza kell vonni az engedélyét. Ugyanakkor gyakori probléma, hogy a toxikusnak talált hatóanyagok visszavonásához nem találnak megfelelő helyettesítő anyagot. Munkám során használt teszt növényvédő szerként az utóbbi években szakmai és társadalmi viták középpontjában álló *glyphosate* gyomirtószer-hatóanyagot és Roundup Classic nevű készítményét választottam. A Roundup Classic növényvédő szer *glyphosate* hatóanyagának és POEA formázó anyagának sejtekre gyakorolt biológiai hatásait vizsgáltam jelölésmentes bioszenzorral (1. ábra). A Roundup Classic növényvédő szert a mezőgazdasági használatban 1% és 2%-os hígításokban alkalmazzák, ezért méréseim során ebben a koncentrációtartományban alkalmaztam. A Roundup Classic növényvédő szert 16% POEA, 43% *glyphosate* és 41% víz alkotja. A kereskedelmi forgalomban kapható *glyphosate*-alapú növényvédő szerekből kb. 30-féle létezik, és ezekben az összetevők aránya is eltérő. A tudományos szakirodalomban azonban sajnos sokszor nem egyértelmű, hogy a növényvédő szerről vagy *glyphosate* hatóanyagról írnak.



1. ábra A Round Classic gyomirtószert alkotó (A) *glyphosate*<sup>29</sup> és (B) POEA képlete.

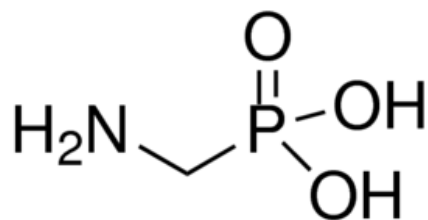
## 2.2. A méréseimhez használt teszt növényvédőszer-hatóanyag: a *glyphosate*

Először 1974-ben engedélyezték a *glyphosate* növényvédőszer-hatóanyagot (*N*-(foszfono-metil)-glicin), melyet azóta is mind szélesebb körben használnak a mezőgazdaságban: forgalma az elmúlt három évtizedben drasztikusan megnőtt, köszönhetően a *glyphosate*-rezisztens géntechnológiával módosított (GM) növények<sup>30,31</sup> megjelenésének, így a világ vezető növényvédőszer-hatóanyagává vált<sup>24</sup>. A mezőgazdaságban a *glyphosate* hatóanyagú gyomirtó szereket elsősorban szántóföldek (vetés előtti időszakban), másodrészen pedig gyümölcsösök, erdőrészek, tarlók (pl.: leggyakrabban parlagfű)<sup>32</sup> gyomirtására használják, emellett jelentős a használata nem mezőgazdasági területek (pl.: ipari épületek és vasúti sínek környéke)<sup>33</sup> gyomtalanításában, valamint az ún. betakarítás előtt állományszárítási technológiában (napraforgó, kukorica, repce, szója)<sup>32</sup>. A GM növényekként elsősorban haszonnövényekbe (pl.: szója, kukorica, gyapot) ültetik a *glyphosate* rezisztencia gént<sup>32</sup>.

A *glyphosate* hatását a növényekben a sikiminsav-anyagcsereút gátlásával fejtí ki, mivel hasonlít az 5-enol-piruvil-sikiminsav-3-foszfát-szintáz enzim szubsztátjára, a foszfoenol-piruvátra, így hozzá tud kötődni az enzimhez és működését akadályozni tudja. Ennek következtében az aromás aminosavak (triptofán, tirozin és fenilalanin) nem tudnak keletkezni, vagyis a fehérjeszintézis gátlódik, aminek eredményeként a növény gyors nekrozis után elpusztul<sup>24</sup>.

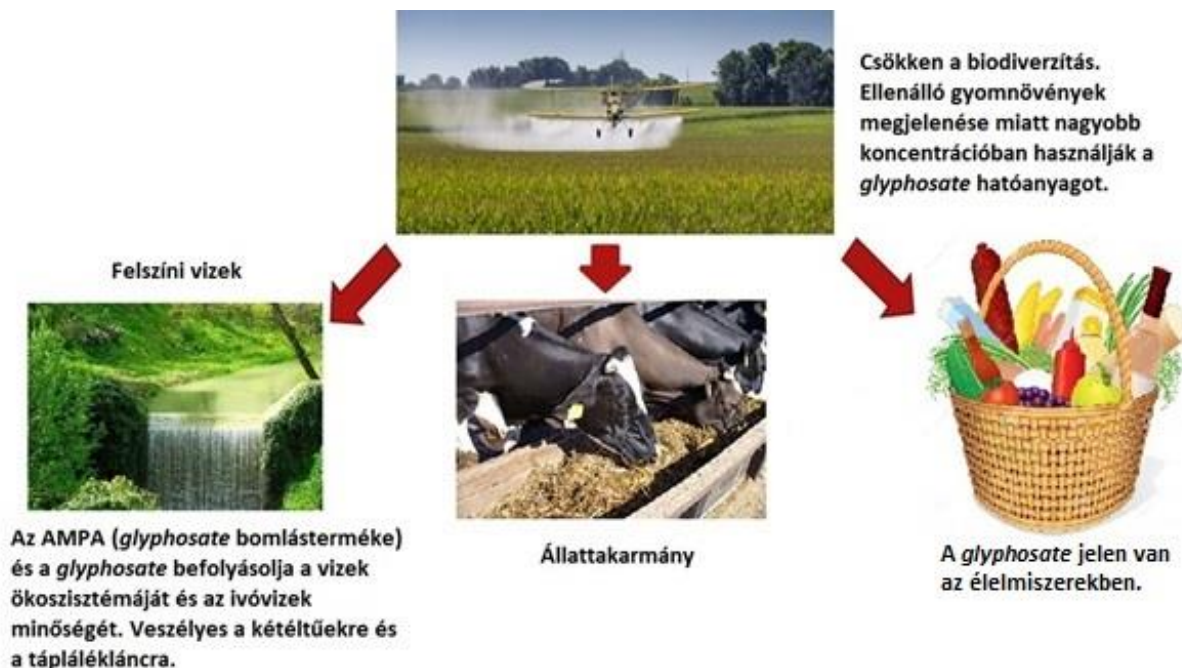
A *glyphosate* permetezés során a gyomirtószerből nemcsak a növényre, hanem a talajba is kerül. Innen a kiváló vízoldhatósága révén a talaj mélyebb rétegibe is beszívárog és beoldódik a talajvízbe, így eljuthat a felszíni vízforrásokba is. Silva és munkatársai tanulmányában európai

talajokban (Angliában, Dániában, Olaszországban, Görögországban, Spanyolországban, Magyarországon, Lengyelországban, Hollandiában, Franciaországban és Németországban) vizsgálta a *glyphosate* és egyik bomlástermékének, az amino-metil-foszfonsav (AMPA) (2. ábra) szennyezettségének mértékét. A tanulmány során kimutatták, hogy az Európai talajok 45% szennyezett (21%-ban *glyphosate*, 42%-ban AMPA és 18%-ban mindkettő anyag jelen volt). Sokszor 2 mg/kg értéknél magasabb *glyphosate* eredetű szennyezőanyagot mértek<sup>34</sup>. Ebben a koncentrációban használt *glyphosate* veszélyeztetheti a talajlakó élőlényeket, a puhatestűeket (pl.: földigiliszták<sup>35</sup>) és ízeltlábúakat<sup>36</sup>. Illetve megfigyelték, hogy Fuzáriumfajok szaporodnak el szója gyökerén. Ezek a Fuzáriumfajok nagyrésze mikotoxinokat termel és ezen fajok közül többféle növényi kórokozó tud megtelepedni a növények gyökerén, így csökkentve a növényellenállóképességét<sup>37</sup>. A *glyphosate* használata csökkenti a talaj lakó baktériumok számát, a *Pseudomonas* és *Rizobaktériumok*at, melynek következményeként csökken a gyökértömeg és a növénytömeg<sup>38</sup>.



2. ábra A *glyphosate* egyik bomlásterméke, az AMPA a szerkezeti képlete.

A *glyphosate*-alapú növényvédő szerek nagyfokú használata új *glyphosate*-ellenálló gyomfajok megjelenését és a biológiai sokféleség csökkenését okozza<sup>24,39,40</sup>. Ezenkívül, a rezisztens gyomnövények vagy a géntechnológiával módosított növények esetében a növekvő *glyphosate*-koncentrációk a kezelt növényeknél nagy mennyiségű *glyphosate*-maradványok felhalmozódását eredményezik, és az ilyen növényvédő szerekkel szennyezett növényeket állati takarmánnyként vagy élelmiszerekben is felhasználják (3. ábra). Az Európai Unió a következő maximális szermaradványértékek engedi meg a különböző növényekben: búzában 1,18 mg/kg, zöldségekben 0,05 mg/kg, almában 0,05 mg/kg, kukoricában 0,12 mg/kg, gyapotban 1,4 mg/kg, teában 0,23 mg/kg, kávéban 0,1 mg/kg és tejtermékekben 0,05 mg/kg<sup>41</sup>. Az emberek szervezetébe ivóvízzel és táplálékkal kerül be a *glyphosate* (3. ábra), ami vizelettel ki is ürül. Az emberek vizeletében kimutatták a *glyphosate*-maradványokat (0,45-233 ng/ml, USA, EU és Sri-Lanka).<sup>42</sup>



3. ábra A *glyphosate* hatása a környezetre.

Nemcsak talajban<sup>43</sup>, hanem a felszíni vizekben<sup>44</sup> is kimutatták a *glyphosate* hatóanyag jelenlétét, amely jól mutatja a környezetterhelő hatását. A felszíni vizekben USA-ban 700 µg/l, míg az EU-ban 0,1 µg/l vizekben megengedett határérték<sup>45</sup>. A *glyphosate* lágy és kemény vízben eltérő módon bomlik le: a felezési ideje normál vízben néhány hét, de kemény vízben évekig is eltarthat, mivel Ca<sup>2+</sup>-ionokkal kelátkomplexet tud képezni<sup>29</sup>. Mind a *glyphosate*, mind bomlásterméke, az amino-metil-foszfonsav (AMPA) veszélyezteti a vízi ökoszisztémát<sup>45</sup>.

A vízi ökoszisztéma élőlényei a kétéltűek érzékenyen reagálnak a *glyphosate* jelenlétére a vizekben. Megfigyelték, hogy a gyomirtószer jelenléte jelentős ebihal-pusztuláshoz vezethet<sup>46</sup>. Illetve szalamandrafajoknál a predációs viselkedést kis koncentrációjú *glyphosate* is megváltoztatja<sup>47</sup>. Emellett fejlődési rendelleneségeket okozhat több békafajnál<sup>48</sup> és a sejtciklus zavarát figyeltek meg tengeri sünbén is<sup>49</sup>.

Továbbá vízben élő ízeltlábúakat (pl.: árvaszúnyog<sup>50</sup>, piros mocsári rák<sup>51</sup>) veszélyezteti és halak esetében akut toxicitást okozhat<sup>52</sup>. Ezen kívül madaraknál és csirkeembriókon fejlődési rendellenességet is kialakulhat<sup>53,54</sup>, valamint a madarak táplálékául szolgáló rovarok mennyiségének megcsappanásával csökken a madarak száma is<sup>48</sup>.

Az előbbi példák rámutatnak arra, hogy a *glyphosate* intenzív használata veszélyeztetheti az ökoszisztéma stabilitását, mivel csökkentheti a fajok diverzitását és a táplálékláncban módosulásokat okozhat<sup>48</sup>.

A *glyphosate* hatóanyagok vagy a *glyphosate*-alapú növényvédő szereknek való hosszútávú kitettség egészségkárosodáshoz vezethet az emberi szervezetben is. Számos betegségről feltételezik, hogy a *glyphosate* vagy a *glyphosate*-alapú növényvédőszer-készítmények hozzájárulhatnak a kialakuláshoz, pl. veseelégtelenség<sup>55</sup>, autizmus<sup>55,56</sup>, cöliákia<sup>55,57</sup>, asztma<sup>58</sup>, allergia<sup>59</sup>, rák<sup>55,60</sup>, cukorbetegség<sup>55</sup>, endokrin zavaró hatás<sup>55,61</sup>, bélfertőzés<sup>55,62</sup> és egyéb rendellenességek<sup>53,55,63</sup>. Számos ilyen betegség vagy rendellenesség közvetlenül kapcsolódik a toxicitáshoz, ezért azon sejtvonalakon, amelyek a májból, vérképző rendszerből, csontból, idegrendszerből, magzatból valamint placentából származnak, a sejttoxicitás döntő fontosságú kérdés a *glyphosate* és *glyphosate*-alapú növényvédő szerek kockázatértékelésében<sup>13-18</sup>.

A *glyphosate* hatóanyagot és bomlás termékeit nehéz kimutatni analitikai módszerekkel. A *glyphosate* poláros jellege miatt, így csak minta-előkészítést követően lehet a növényvédő szert vizsgálni<sup>64</sup>. Sokszor extrakciós, hosszadalmas származékképzési eljárást kell a vizsgálat előtt elvégezni. Továbbá nehézkes a mintavétel, mivel a vegyület természetes körülmények között gyorsan lebomlik vagy talajban lévő fémionokkal komplexet képez, illetve jól oldódik vízben. A *glyphosate* növényvédőszer-hatóanyagot és maradványait tartalmazó mintákat főleg spektroszkópiai, kromatográfiai és immoassay (ELISA) módszerekkel vizsgálják függően a minta fizikai és kémiai állapotától<sup>65</sup>.

A gáz- és folyadékkromatográfiai módszerek segítségével is ki lehet mutatni a *glyphosate* jelenlétét. A gázkromatográfiai módszer előnye, hogy nagy érzékenységgű (pikomol és nanomol) és szelektivitású módszerek. Ezzel szemben hátránya, hogy a mintából a vizsgálathoz szükséges illékony és stabil *glyphosate* molekula létrehozásához hosszadalmas minta-előkészítési lépések (extrakció és származékképzés) szükségesek. Gyakran összekapcsolják lángfotometriás detektorral<sup>66</sup>, nitrogén–foszfor szelektív detektorral<sup>67</sup>, tömegspektrométerrel<sup>68</sup>, lángionizációs detektorral<sup>69</sup>, elektronbefogási detektorral<sup>65</sup>, hogy növeljék a módszer érzékenységét.

A folyadékkromatográfiai módszerek előnye a gázkromatográfiával szemben, hogy egyszerűbb minta-előkészítési lépéseket kell végrehajtani. Hasonlóan érzékeny és szelektív módszer, mint a gázkromatográfia. A folyadékkromatográfiai módszerek közül *glyphosate* detektálására a túlnyomórészt nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiát (HPLC)<sup>70</sup> és alternatív

módszerként ionkromatográfiát<sup>71</sup> is alkalmaznak, vagy gyakran kombinálják a folyadékkromatográfiás módszereket tömegspektrometriával<sup>72</sup> és UV/VIS detektorral is<sup>65,73</sup>.

A spektroszkópai módszerek pontosak és érzékenyek, azonban a vizsgálat hosszú és komplex. Spektroszkópai módszerek közé tartozik az atomabszorpciós, láng-atomabszorpciós, tömeg spektrometriás és fluorimetriás<sup>65,74,75</sup> eljárások.

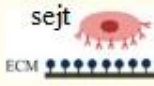
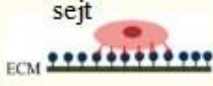
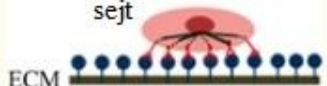



A *glyphosate* meghatározására az ELISA módszer is kiválóan alkalmazható, amellyel a *glyphosate* kvantitatívan kimérhető. Bár a módszer szintén költséges, de nagy előnye, hogy vizes fázisban közvetlenül alkalmazható a *glyphosate* szelektív és szenzitív meghatározásához<sup>76</sup>.

Alternatív módszerként kapilláris-elektroforézis technikát is használnak<sup>77-79</sup>. Illetve felületerősített Raman-spektroszkópiával nagy érzékenységgel attomol mennyiségű *glyphosate* hatóanyagot is ki lehet mutatni<sup>80</sup>. Ezen kívül mágneses magrezonancia (NMR) alkalmazásával képesek voltak azonosítani a *glyphosate* jelenlétét vér- és vizeletmintából is<sup>81</sup>.

### 2.3. A sejtadhézió

A sejtadhézió létfontosságú folyamat a szövetek fejlődésében, amely során a sejtek kapcsolatot alakítanak ki egymással vagy az extracelluláris mátrix elemeivel speciális fehérjekomplexek segítségével. A sejtadhézió fontos szerepet játszik a sejt migrációban, a sejtek differenciációjában és a sejtek közötti kommunikációban, valamint gyulladásszerű és rákos folyamatokban<sup>82</sup>. A sejtek membránjában található adhéziós molekulák felismerik a szubsztrátot vagy a másik sejt ligandumait, majd kötéseket alakítanak ki velük. A sejtadhéziós receptor molekulák lehetnek például kadherine, az immunoglobulin szupercsalád tagjai, szindekánok, integrinek és szelektinek<sup>83,84</sup>. A kadherine a sejt-sejt-kapcsolatok kialakításában játszanak szerepet<sup>83</sup>. Az integrinek az extracelluláris mátrix (ECM) elemeit ismerik fel<sup>83</sup>. A szindekánok a proteoglikánok közé tartoznak és kölcsönhatásba tudnak lépni számos oldhatatlan és oldható faktortal az extracelluláris mátrixban. Továbbá a szindekánok részt vesznek a sejt mátrixhoz történő adhézióban, szabályozzák a jelátviteli folyamatokat és a növekedési faktorok kötődését<sup>84</sup>. A szelektinek egy másik sejt felszínén lévő molekulákat (pl.: mucinok, szulfonált glikolipidek, glikozaminoglikánok) ismernek fel és kötődnek hozzájuk<sup>82,83</sup>. Az immunoglobulin Ig-domének Ca<sup>2+</sup>-független kötést tudnak létesíteni a másik sejt immunoglobulin-doménjével, illetve kölcsönhatnak integrinokkal és szénhidrátokkal is<sup>83,85</sup>.

A sejtadhézió folyamatát három részre oszthatjuk (1. táblázat). Az első fázisban az ülepedő sejtek a szubsztráthoz kapcsolódnak és elkezdődik a sejtek laposodása (terülése). A sejtadhézió második fázisában a sejt egyre laposodik, ugyanis specifikus integrin kötések alakulnak ki a sejt és a szubsztrát között és ezeknek a kötéseknek a száma egyre nő az idő előre haladtával<sup>86</sup>. A kötések kialakításában fontos szerepet játszanak a bivalens kationok ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ), mivel stabilizálják az integrinek aktív konformációját<sup>87</sup>. Az integrinkötések kémiai és mechanikai stabilizációjához emellett a sejtek felszínén lévő poliszacharidok (glikokálix) is hozzájárulnak<sup>88</sup>. A második fázis során a sejtek magassága csökken, miközben a sejtek kontakterülete nő. A harmadik fázisban az integrinek kötődése az ECM fehérjékhez beindítja a fokális adhéziónak kialakulását. A sejtterület eléri a maximális területét, az adhéziós erő egyre erősebbé válik, végül létrejön a stabil sejtadhézió<sup>86</sup>.

sejtadhézió fázisai	I. fázis	II. fázis	III. fázis
sematikus ábrázolása a sejtadhézióknak	sejt 	sejt 	sejt 
sematikus ábrázolása a sejtalak változásának	 kapcsolódás	 laposodás	 teljes kiterülés és szerkezeti szerveződés
sejtadhézió szabályozása	elektrosztatikus kölcsönhatás	integrin kötés	fokális kontaktus
sejtadhézió szakaszai	ülepedés	sejtkitapadás	sejtterület és stabil adhézió

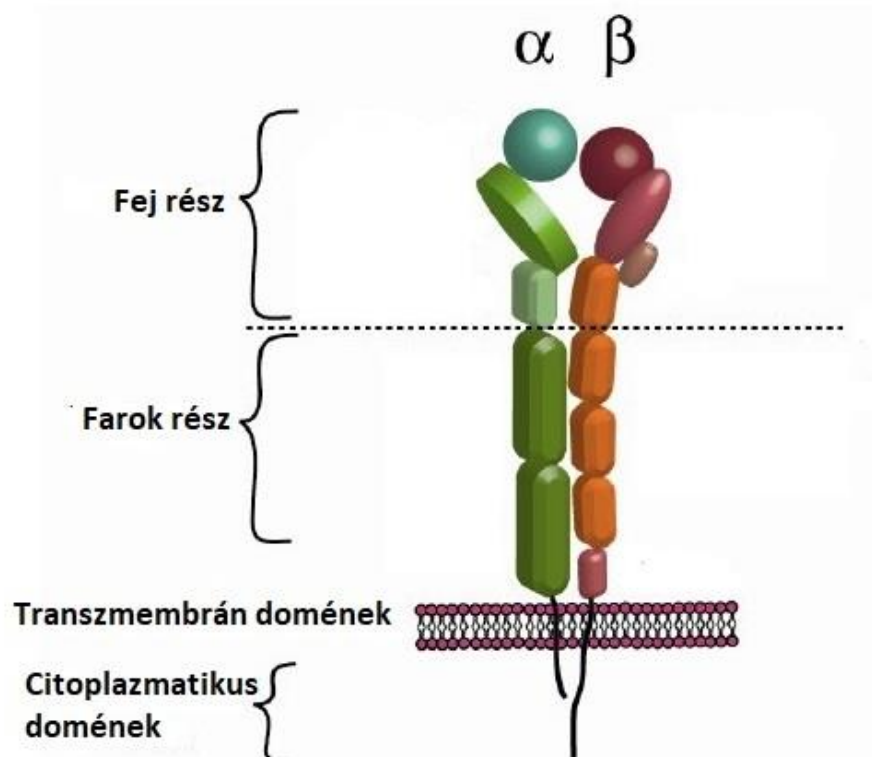
1. táblázat A sejtadhézió fázisai.<sup>86</sup>

### 2.3.1. Az integrinek

Az integrinek transzmembrán fehérjék. A sejtadhéziós receptorok közül az integrinek családját tanulmányozzák a legintenzívebben, ugyanis fontos szerepet játszanak a sejtek működésében, azon belül pedig a sejt–ECM kölcsönhatásokban. Az integrinek hatással vannak a sejt migrációjára, differenciációjára és a sejtek közötti jelátvitelre is<sup>89,90</sup>. Amennyiben a sejtek adhéziós képessége módosul, az gyakran utal kóros folyamatokra a szervezetben, mint pl.: a rosszindulatú daganatok kialakulása<sup>90</sup> vagy a véralvadás zavara<sup>90</sup>.

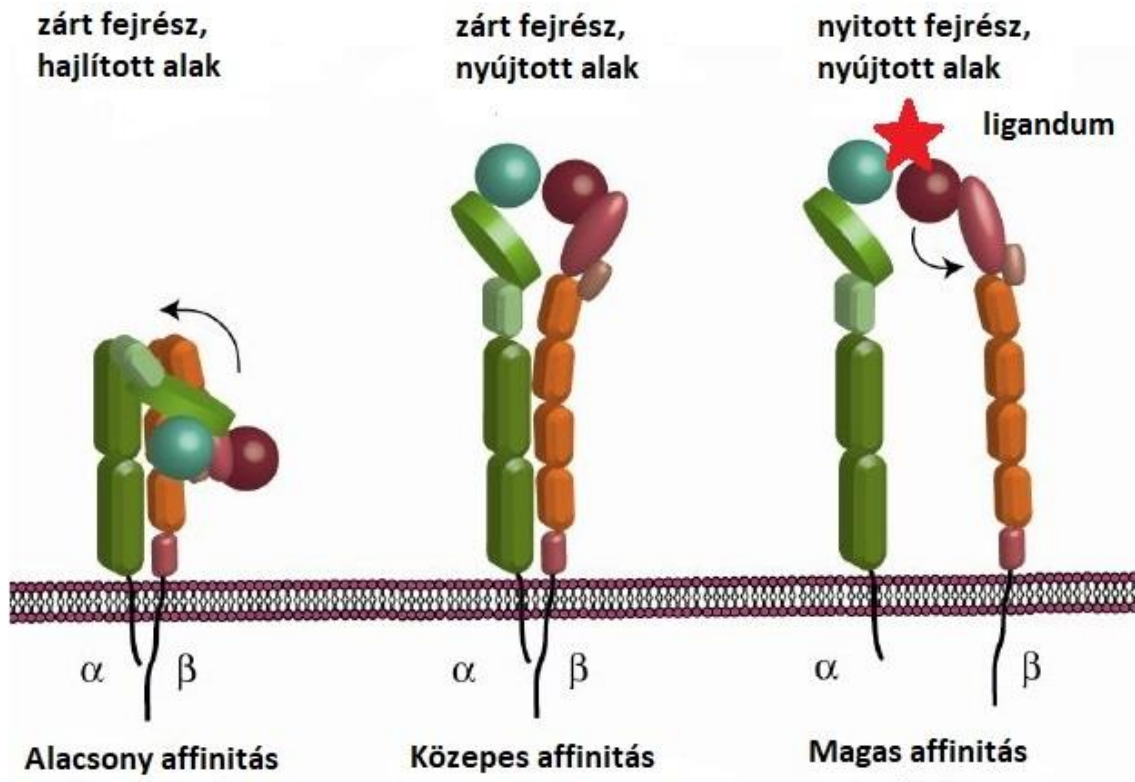
Az integrinek kétféle alegységgel rendelkeznek:  $\alpha$ - és  $\beta$ -lánc, amelyek kombinációjából alakul ki a 24-féle ismert integrin (4. ábra). Mint felismerő receptorok, az integrinek fontos szerepet töltenek be a sejtadhéziós folyamatok megindításában. Az integrinek adott ligandumkötő tulajdonsággal rendelkeznek, képesek specifikusan felismerni és megkötni egy-egy aminosav-szekvenciát<sup>89</sup>. Az integrinkötő molekulák lehetnek ECM vagy nem-ECM ligandumok (más sejtek felszínén találhatóak). ECM ligandum többek között a kollagén, laminin, fibronectin és a proteoglikánok, míg a nem-ECM ligandumok közé tartoznak a komplement-fragmentumok (diszintegrinek és metaloproteázok, vaszkuláris sejtadhéziós receptormolekulák, immunglobulin-típusú receptorok), plazmafehérjék (pl.: Von Willebrand faktor, fibrinogén, sejtadhéziós faktorok, citokinek és patogének (vírusok, baktériumok és toxinok)<sup>91,92</sup>. A molekuláris szerkezetük alapján az integrineket a következő négy csoportba lehet sorolni: RGD-motívum, LDV-motívum (leucin-aszparaginsav-valin), A-domén  $\beta$ 1 integrinek (laminin- és kollagénekötő receptorok) és nem- $\alpha$ 1-domént tartalmazó laminin kötő integrinek<sup>91</sup>.





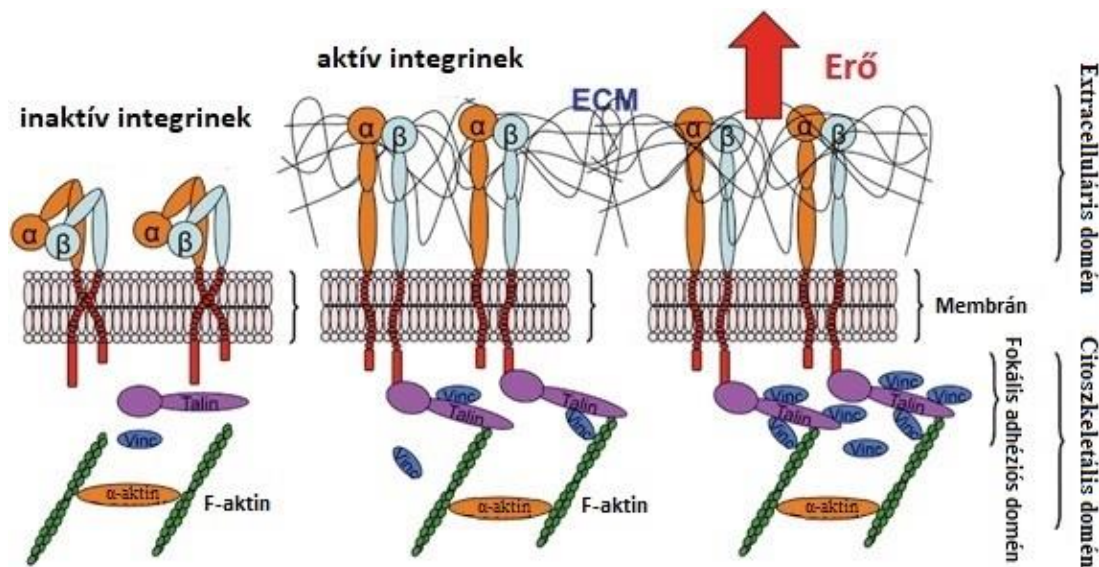
4. ábra Az integrinek felépítésének sematikus ábrázolása.<sup>93</sup>

Az integrinek háromféle konformációs állapotot vehetnek fel (5. ábra). Inaktív állapotukban az  $\alpha$ - és  $\beta$ -alegységek közel vannak egymáshoz, és globuláris ligandumkötő fejdomeinjek a sejtmembrán felé mutatnak, a ligandumok számára csak korlátozottan hozzáférhetőek. Aktiváció hatására az  $\alpha$ - és  $\beta$ -alegységek fejdomeinjek kiegyenesednek, de nem válnak szét, ezzel a konformációval nő az integrinek hozzáférhetősége és így affinitásuk is. Legnagyobb aktivitású konformációja az integrineknek, ha az  $\alpha$ - és  $\beta$ -alegységek nyújtott alakot vesznek fel és eltávolodnak egymástól. A magas affinitású konformációban a ligandumok képesek stabilan kötődni az integrinekhez.<sup>93</sup>



5. ábra Az integrinek különböző konformációinak sematikus ábrázolása.<sup>93</sup>

Az integrinek kötéseket alakítanak ki az ECM fehérjékkel, így elindítanak egy folyamatot, amely során fokális komplexek alakulnak ki. Ezzel párhuzamosan az integrin citoplazmatikus részén  $\alpha$ -aktinnal, vinkulinnal és talinnal kapcsolódik össze, és így jönnek létre a fokális adhéziók. A fokális adhéziós komplexek gyorsan összeszerveződnek (6. ábra), de gyorsan le is tudnak bomlani, így ez a folyamat biztosít a sejtnak egy folyamatos mozgást (amelyet a lamellopodium végez). Fontos megemlíteni, hogy az adhéziós struktúrák érése nagyban függ a helyi húzóerőtől, a szubsztrát merevségétől, és a Rho-aktivált kináz által szabályozott citoskeleton összehúzó hatástól is<sup>94</sup>.



6. ábra Az integrinek kapcsolódása a fokális adhéziós komplexekhez.<sup>95</sup>

## 2.4. Sejttöxicitás

### 2.4.1. A sejthalál folyamata

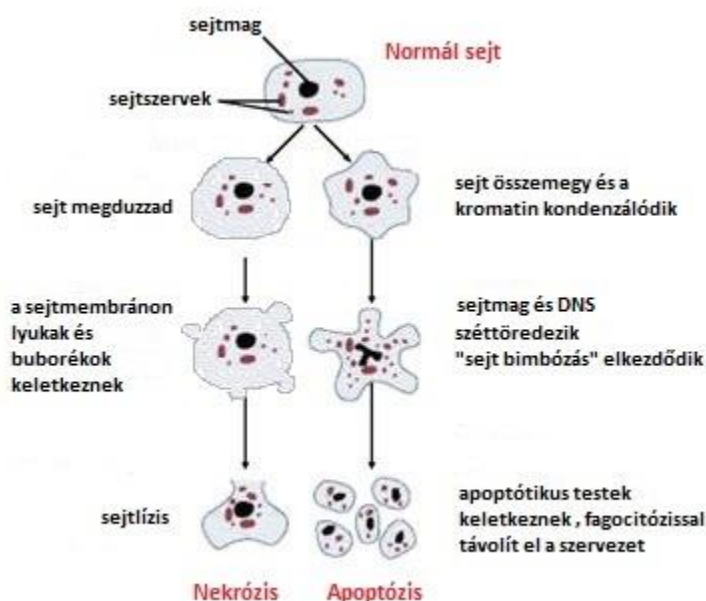
Az egyik leggyakoribb sejthalál típus az apoptózis, vagyis a programozott sejthalál. Állhat genetikai ellenőrzés alatt, ez esetben a sejt az elöregedése miatt pusztul el<sup>96</sup>. Sejthalál ugyanakkor külső behatásra is bekövetkezhet, ilyen hatások lehetnek például a hormonok<sup>97</sup>, citokinek<sup>98</sup>, természetes ölősejtek (natural killer (NK) sejtek)<sup>99</sup> vagy vírusok<sup>96,99</sup>. Egészen az apoptózis kezdetéig a letapadó sejtek (pl.:epitéliális és endoteliális sejtek) a sejtmatrixhoz kötődnek<sup>100</sup>. Az apoptózis folyamata a növekedési faktorok csökkenésével kezdődik, majd a kitapadási képességüket az adherens sejtek elvesztik (vagy hibásan kapcsolódnak a sejtmatrixhoz)<sup>100</sup>. Ezt az adhéziófüggő apoptózist anoikisznek hívják, ez hozzájárul a helyes sejtszám és szövetszerveződés fenntartásához<sup>100</sup>.

A kaspázok fontos szerepet játszanak az apoptózisban. A kaspázok (ciszteinfüggő aszpartát irányított proteáz) cisztein proteázok, amelyek aktív centrumában egy cisztein helyezkedik el, és a célfehérjét aszparaginsav mellett hasítják el. A kaspázok inaktív prokaspázok formájában keletkeznek és proteolitikus hasítás során aktíválódnak. Az aktivációs folyamatban szerepet játszanak az iniciátor és az effektor kaspázok (kaspáz-3 és -7). Az iniciátor kaspázok effektor kaspázokat hasítanak és aktíválnak. Az effektor kaspázok inaktív, proformáit

hasítják a sejtekben lévő célfehérjéknek, ezáltal aktiválják őket, így beindítják a kaspázkaszkádot, amelynek az eredménye apoptózis lesz<sup>101</sup>.

Az apoptózis alatt a sejt összezsugorodik<sup>96,102</sup>. A folyamat során a sejtmag kondenzálódik, majd fragmentumokra darabolódik szét a DNS<sup>96,102</sup>, az endoplazmatikus retikulum vezikulává alakul és beleolvad a citoplazmába<sup>96,102</sup>. Ezt követően a sejt apoptotikus testekké darabolódik szét, amelyek az ép sejtszerveket és a szét darabolódott DNS-t tartalmazzák. Az apoptotikus testeket a szervezet fagocitózissal távolítja el<sup>96,102</sup>.

A második leggyakoribb sejthaláltípus a nekrozis. Nekrozis során a sejt hirtelen pusztul el egy nem tervezett folyamat során. A nekrozist okozhatja fizikai vagy kémiai trauma, toxinok, tápanyaghiány<sup>103</sup>. A nekrozis lejátszódása gyorsabb folyamat, mint az apoptózisé, amely akár 12-24 óráig is eltarthat<sup>103</sup>. A nekrozis során a sejt citoplazmája és a sejtszervek megduzzadnak, darabokra esnek szét, és a sejt lizálódik<sup>102</sup>. Végül kiömlenek a sejt intracelluláris komponensei az extracelluláris térbe, ahol beindítják az immunválaszt (7.ábra)<sup>102</sup>.



7.ábra A sejthalál lezajlásának folyamata nekrozis és apoptózis esetén.<sup>104</sup>

A vakuolizáció egy sejtmorfológiai változás, amely gyakran hozzájárul a sejthalálhoz. Lehet átmeneti és visszafordíthatatlan. Az átmeneti vakuolizáció a sejtciklusra és migrációra van hatással. Az ozmotikus nyomás változása megzavarja az ionegyensúlyt és ennek hatására jön létre az átmeneti vakuolizáció, míg a visszafordíthatatlan vakuolizációt, a citotoxikus fehérjék

katalizálják. Ezek a hatások lehetnek vegyi anyagok, természetes és szintetikus vegyületek, vírusok és baktériumok. Az endoplazmatikus retikulumban, Golgi-készülékben és endoszómális-lizoszómális rendszerben keletkeznek vakuólumok. A vakuolizációban a kaszpáz-független sejtpusztulás, onkózis és nekroptózis játszik szerepet.<sup>105</sup>

#### 2.4.2. Toxinok hatása a sejtadhézióra

Az integrin–ligandum-kölcsönhatások számos jelentős jelátviteli utat aktiválhatnak, így kritikus szerepet játszanak a sejt folyamatok szabályozásában, beleértve a proliferációt, migrációt, differenciációt és túlélést, befolyásolásuk megzavarhatja a normál sejt funkciókat<sup>106</sup>.

A toxinok hatást gyakorolhatnak a sejt folyamatokra receptorokon, ioncsatornákon, enzimeken, kötőfehérjéken vagy a citoskeleton molekuláin keresztül, megváltoztatva a normál sejt működést. A különböző xenobiotikumok sokféle biológiai hatást előidézhetnek, akut toxicitást, immunológiai reakciókat, hormonális homeosztázis zavarát<sup>107,108</sup> és rákot<sup>109</sup>. Számos tanulmány kimutatta, hogy egyes xenobiotikumok hatással vannak a sejtek jelátvitelére, rugalmasságára, kitapadására és migrációjára<sup>110</sup>. A *glyphosate* mezőgazdasági és háztartási növényvédő szerként való egyre növekvő felhasználása miatt a toxicitási vizsgálatok középpontjába került. Számos tanulmány vizsgálta a *glyphosate* hatóanyagok és készítményeinek toxicitását különféle sejtekben és számos szervezetben, ökotoxikológiai indikátor organizmusoktól kezdve egészen az emberig. A legújabb vizsgálatok kimutatták a *glyphosate* sejttoxicitását különböző sejt vonalakon, beleértve az emberi fibroblaszt (GM38), fibrosarkóma (HT1080)<sup>111</sup>, epiteliális 2 típusú (Hep-2)<sup>112</sup>, embrionális vese (HEK293), hepatoma (HepG2)<sup>113</sup>, epiteliális keratinocita<sup>114</sup>, *choriocarcinoma* (JEG3)<sup>113,115</sup>, *choriocarcinoma cytotrophoblast* (JAR)<sup>116</sup>, hematopoietikus Raji (Epstein-Barr vírus transzformált humán limfociták)<sup>117</sup>, egérszövetű preosteoblaszt-sejtvonalat (MC3T3-E1)<sup>118</sup> és neuroektodermális őssejteket (NE-4C)<sup>119</sup>.

A patkány hippocampusz piramissejtjeinek 2-6 mg/ml koncentrációjú *glyphosate* hatóanyaggal való kezelése neuronális rendellenességeket okozott<sup>120,121</sup>. 0,09-1,7 mg/ml koncentrációjú *glyphosate* DNS-károsodást okozott és DNS-metilációt váltott ki humán perifériás vérből izolált mononukleáris sejteknél<sup>122</sup>. A *glyphosate* ezen kívül az aromatáz enzimet is gátolja,<sup>123</sup> amely a szteroid hormon bioszintézisének kulcseleme. Igazolták továbbá, hogy a *glyphosate* teratogén hatása a gerincesekben a retinsav jelátviteli úthoz köthető<sup>54,124</sup>. *Glyphosate*-

alapú gyomirtó szereknél még erősebb toxicitást mutattak ki, például a Roundup Transorb hím patkányokban okoz egyensúlyvesztést a pajzsmirigyhormon homeosztázisában<sup>125</sup>.

Mesagne és munkatársai szerint a POEA kritikus micellaképződési koncentrációban (0,03  $\mu\text{M}$ ) a sejtmembránt károsítja, amely hatás nekrozishoz vezet<sup>126</sup>.

### 2.4.3. Hagyományos sejttoxicitás-vizsgálatok

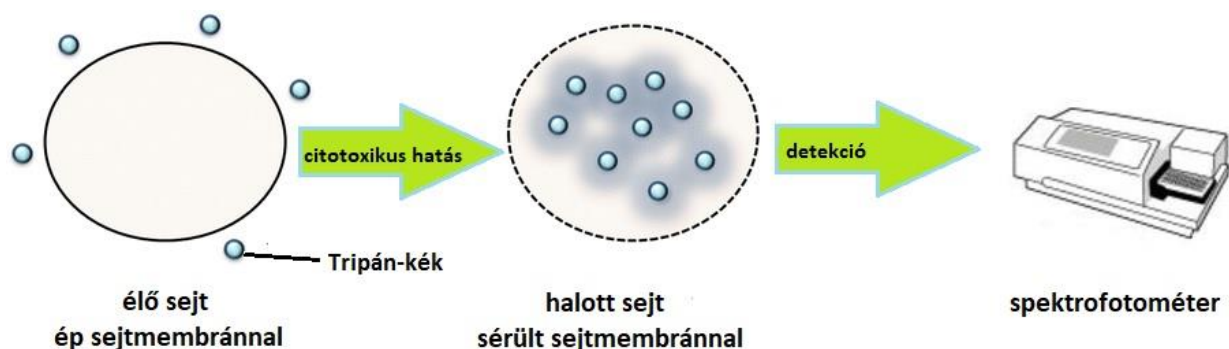
Ebben a fejezetben szeretném ismertetni az irodalomban megtalálható hagyományos sejttoxicitási vizsgálatokat, hogy későbbiekben össze tudjam hasonlítani az általam használt jelölésmentes technikával.

Egy vegyi anyag élőszervezetre kifejtett hatásának egyik fontos jellemzője a citotoxicitás. A sejt épségének fokmérői az életképesség és a szaporodási ráta, melyek fizikai vagy kémiai hatásra megváltozhatnak. Amennyiben egy anyag citotoxikus a sejtre, akkor hatással van a sejtmembrán épségére, gátolhatja a fehérjeszintézist, irreverzibilisen kötődhet a receptorokhoz (pl.: sejtadhézió gátlása), gátolja a polideoxinukleotidok meghosszabbodását és az enzimátikus reakciókat. A sejttoxicitás tesztek ezeket a változásokat érzékelik. A citotoxicitás-vizsgálatokat detektálási technikák szerint kolorimetriás, fluorimetriás és luminometriás módszerekre oszthatjuk<sup>6</sup>.

A kolorimetriás mérések biokémiai markerrel mutatják ki a sejt metabolikus aktivitását. A szín a sejt életképességével változik, és ezt a változást spektrofotometriás módszerrel lehet követni. A kolorimetriás mérés letapadt és szuszpenzióban lévő sejtekhez is alkalmazható (9. ábra)<sup>6,127</sup>.

A festékkizárásos módszerek a sejttoxicitás kimutatására használt kolorimetriás technikák közül a legegyszerűbb elven működnek. Ezen vizsgálatokban elegendő egy festéket a sejtekhez adni, hogy meghatározzuk életképességüket. Élő sejtek membránján a festék ugyanis nem tud átjutni, halott sejtek esetében azonban igen, mivel azok membránja már nem ép. Ilyen festékek lehetnek: eozin, Kongo-piros, eritrozin B és tripánkék (8. ábra)<sup>128,129</sup>. (Figyelembe kell venni azonban ennél a módszernél, hogy (1) a sejthalált okozó reagens hatása a sejtmembránban a kezelés után csak pár nappal jöhet létre, (2) a túlélő sejtek folytathatják a szaporodást, (3) nem festődnek meg azok a sérült sejtek, amelyek korai szétesésen mennek keresztül. A (2) és (3)

tényező figyelembe vételének hiánya okozhat jelentős eltérést az életképesség százalékos arányában<sup>130-132</sup>.)<sup>6</sup>



8. ábra A tripánkék festékkizárásos technika sematikus ábrája citotoxicitás meghatározásához<sup>133,134</sup>

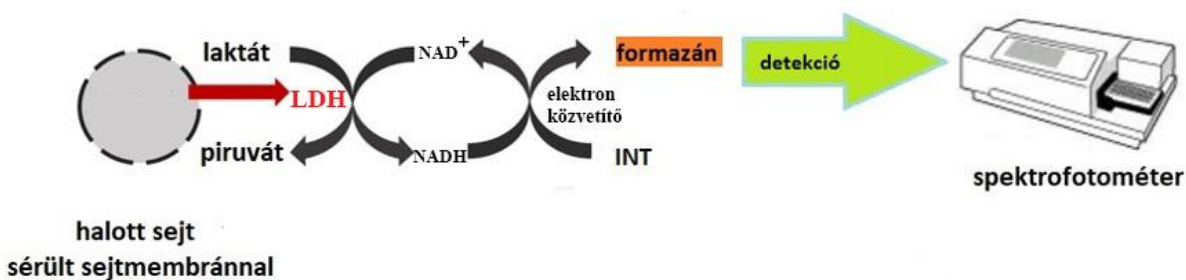
A tetrazóliumredukációs teszt (9. ábra) olyan kolorimetriás eljárás, amelynek során a sejtek életképességét és proliferációs képességét lehet meghatározni. Különböző tetrazóliumalapú tesztek léteznek, ilyen például a [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromid] (MTT)<sup>135-137</sup>, [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-5-(3-karboxi-metoxi-fenil)-2-(4-szulfo-fenil)-2H-tetrazolium] (MTS)<sup>138,139</sup>, [2,3-bisz-(2-metoxi-4-nitro-5-szulfo-fenil)-2H-tetrazólium-5-karboxanilid] (XTT)<sup>140</sup>, [4-(3-(4-jodo-fenil)-2-(4-nitro-fenil)-2H-5-tetrazolium)-1,3-benzol-diszulfonát] (WST-1)<sup>141</sup> és [2-(2-metoxi-4-nitro-fenil)-3-(4-nitro-fenil)-5-(2,4-diszulfo-fenil)-2H-tetrazólium nátriumsója] (WST-8)<sup>139</sup> teszt. Ezek közül a leggyakrabban használt az MTT teszt. A mérés egy oldható tetrazóliumsó (MTT) oldhatatlan formazáncsapadékának keletkezésén alapul. A szubsztrátot – a tetrazóliumot – a sejtek mitokondriumában található szukcinát-dehidrogenáz enzimek alakítják át oldhatatlan formazáncsá<sup>136</sup>, miközben a NAD<sup>+</sup> NADH alakká redukálódik. Abban az esetben, ha a sejtek életképesek, a reakció során a kristályos tetrazólium át tud alakulni színes formazáncsá. Ezt a színváltozást spektrofotometriás módszerrel meg lehet határozni, amelyből a sejtek állapotára lehet következtetni.<sup>6,137</sup>





9. ábra A kolorimetriás módszerek közül a WST-8-teszt sematikus ábrája citotoxicitás meghatározásához.<sup>134,142</sup>

Az enzimatikus kolorimetriás tesztek a laktát-dehidrogenáz enzimet (LDH) is használhatják (10. ábra), amely fiziológiás körülmények között a sejtek citoplazmájában található. Amennyiben a sejt károsodik, ez az enzim a sejtmembránon kívülre kerül. A teszthez hozzáadott tejsavat (laktátot) a károsodott sejtől felszabaduló LDH enzim piruváttá oxidálja, ezalatt pedig a  $\text{NAD}^+$   $\text{NADH}$  alakká redukálódik. Majd ez a redukált koenzim a sárga tetrazóliumsó (jodo-nitro-tetrazólium (INT)) vörös színű formazánna való redukálásakor regenerálódik. A vörös színű formazán ( $\lambda=490$  nm) által okozott színváltozás spektrofotométerrel már könnyen mérhető.<sup>6,143,144</sup>



10. ábra Az LDH kolorimetriás teszt sematikus ábrája citotoxicitás meghatározásához.<sup>134,145</sup>

A fluoreszcens próbák sokkal érzékenyebbek a kolorimetrikus vizsgálatoknál. Ilyen fluoreszcens próba a kaszpáz-3/7-es módszer is, amelyet a munkám során az általam fejlesztett citotoxicitás mérési módszer validálására fogok használni (11. ábra)<sup>6,146-149</sup>.

Az apoptózissal a sejtben a kaszpázkaskád beindul, amely során aktiválódik a kaszpáz-3 és a kaszpáz-7. Ezek az effektor kaszpáz enzimek képesek a sejtben található fehérjéket hasítani, amely folyamat végül sejthalálhoz vezet. Ezeknél a méréseknél az apoptózis során keletkező

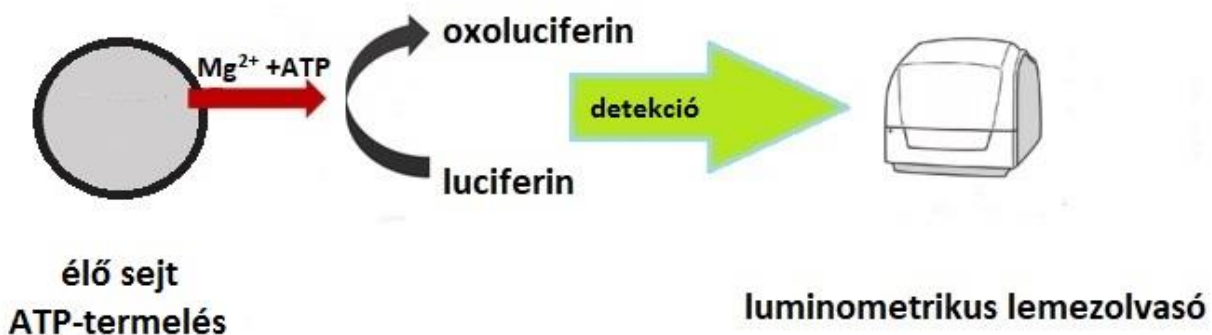


kaspáz hasítja a sejtekhez hozzáadott kaspáz szubsztrátot a specifikus aminosav-szekvenciánál, aminek hatására keletkezik a fluoreszcens termék, melynek a fluoreszcens jele kimérhető fluoreszcens mikroszkóppal, fluoriméterrel, fluoreszcens mikrolemez-olvasóval vagy áramlásos citométerrel. Fontos megemlíteni, hogy szuszpendált és letapadt sejteket is egyaránt lehet ezzel a technikával vizsgálni.<sup>6,101,146–149</sup>



11. ábra A fluoreszcens kaspáz-3/7-teszt sematikus ábrája citotoxicitás meghatározásához.<sup>134</sup>

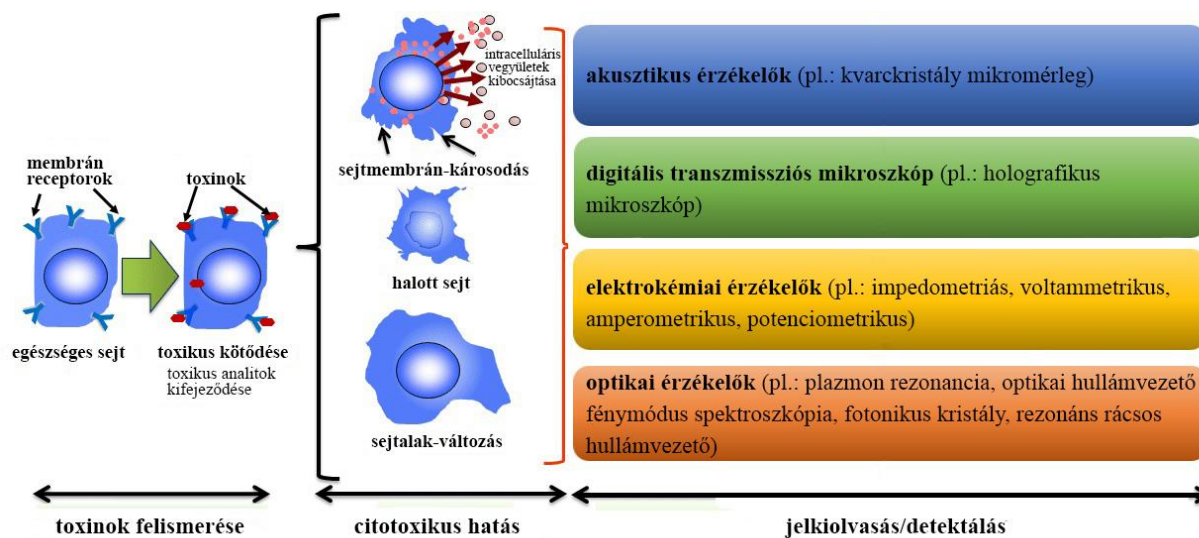
A sejtosztódás és citotoxicitás meghatározására kiválóan alkalmazhatóak a luminometriás módszerek is. A reakciót a biolumineszcens reagens hozzáadása után tartós fényjelenség kíséri, amelyet luminometrikus lemezolvasóval lehet mérni<sup>149–151</sup>. Ilyen luminometriás módszer pl. az ATP-próba, amely a sejt ATP-termelésén alapul. Az ATP az élő szervezet egyik legfontosabb energiatároló molekulája és energiaforrása. A sejthalál (elsősorban apoptózis) során az ATP-szint csökken, ezzel szemben a sejtosztódásnál növekszik<sup>149,152</sup>. A mintához luciferáz enzimet adunk, amely magnézium kofaktora és ATP szubsztrátja jelenlétében beindítja az enzim működését. Először egy oxiluciferin-luciferáz-AMP komplex jön létre, majd ez gyorsan lebomolva fényjelenség kíséretében oxoluciferinné alakul. Ezt a fényjelenséget luminometrikus lemezolvasóval lehet detektálni (12. ábra).<sup>6</sup>



12. ábra Az ATP-luminometriás próba sematikus ábrája citotoxicitás meghatározásához.<sup>134</sup>

## 2.4.4. Valós idejű jelölésmentes bioszenzorok a sejttoxicitás kimutatására

Napjainkban a bioszenzor technológiákat elterjedten használják az új generációs sejtalapú technikáknál, mivel gyors, olcsó és valós idejű mérést tesznek lehetővé. A bioszenzorok mind prokarióta (baktérium), mind eukarióta (élesztő, emlős) sejtek mérésére alkalmasak. A bioszenzorok segítségével a szerves és szervetlen környezeti szennyezők, beleértve a genotoxikus, ökotoxikus vagy endokrin-zavaró xenobiotikumok jelenléte is mérhető<sup>153–158</sup>. Bioszenzorokkal monitorozni lehet az adott vegyületre adott sejtválaszokat is (pl.: toxinok és receptorok közötti kölcsönhatásokat, sejtjelátviteli folyamatokat), ami segítségével információt lehet gyűjteni akár a felületre kitapadt sejtek állapotáról. Különböző elven működő bioszenzorok léteznek, amelyek képesek kimutatni az előbb felsorolt változásokat (13. ábra).



13. ábra Különböző jelölésmentes technikák a citotoxikus hatás kimutatására.<sup>155</sup>

A bioszenzorok egy széles körben elterjedt csoportja elektrokémiai mérési elvet valósít meg, ide tartoznak az impedometriás<sup>159–161</sup>, voltammetrikus<sup>162,163</sup>, amperometrikus<sup>164–166</sup> és potenciometrikus<sup>167,168</sup> bioszenzorok. Ezek az integrált eszközök elektrokémiai jelátalakítót alkalmaznak és ennek segítségével értékes analitikai információt szolgáltatnak a vizsgált biológiai eseményekről<sup>169</sup>.

Számos tanulmány demonstrálta, hogy az akusztikus elven alapuló szenzorok is alkalmasak a sejttes folyamatok nyomon követésére. Közülük a legismertebb a kvarckristály

mikromérleg (QCM), melyet már sikeresen alkalmaztak a gyógyszer-kutatásban<sup>170,171</sup>, klinikai diagnosztikában<sup>172,173</sup> toxicitási vizsgálatnál<sup>174</sup>, valamint biokémiai és sejtes folyamatok monitorozásában is<sup>175</sup>. A QCM működési elve a piezoelektromos kvarckristály rezonancia frekvenciáinak elhangolódásán alapul, amely arányos az érzékelő felületen bekövetkezett tömegváltozással. Egyszerűen leírva, ha a kristály tömege növekszik, az oszcilláció rezonancia frekvenciája az alacsonyabb értékek felé tolódik el. A QCM módszer fontos előnye, hogy valós idejű kinetikai információt szolgáltat anélkül, hogy bármiféle jelölést kellene alkalmazni. Ráadásul a módszer viszonylag olcsó és könnyen integrálható hordozható eszközökbe<sup>174</sup>.

Egy másik nem invazív technika a sejtoxicitás számszerűsítésére a digitális holografikus mikroszkópia. Ilyen elven működik pl a HoloMonitor (Phase Holographic Imaging AB, Lund, Svédország), amelynek fontos előnye, hogy egy rendkívül kisméretű eszköz, könnyen alkalmazható sejtenyésztő inkubátorokban is. Ez az új eszköz valós időben képes követni a sejtek morfológiájában bekövetkező változásokat, pl. az adhéziót, proliferációt, migrációt, differenciálódást és a sejthalált<sup>119,176</sup>. A HoloMonitor egy a mintán áteső és egy referencia lézernyaláb segítségével alkot háromdimenziós (3D) képet a sejtes mintáról. A lézernyaláb a mintán történő áthaladás következtében a minta különböző pontjain más-más fáziseltolódást szenved el. A referencia és a mintán áthaladó lézersugár a műszerben egyesül, létrehozva egy digitális hologramot. Ezen hologramból az egyes sejtek pozíciója és alakja visszaszámolható. A módszer lehetővé teszi az egyedi sejtek és sejtpopulációk 3D (térbeli) képének jelölésmentes és valós idejű rögzítését. A technika hátránya viszont az alacsony áteresztőképessége<sup>177,178</sup>.

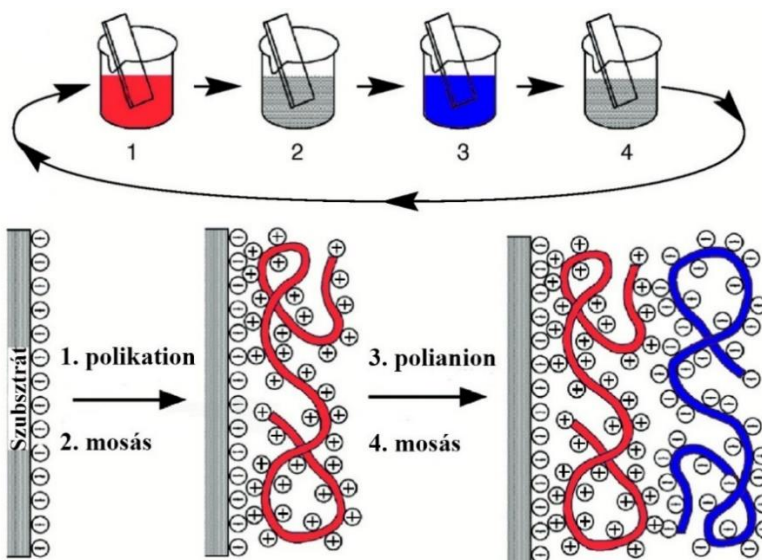
A xenobiotikumok toxicitásának vizsgálata elvégezhető felületi plazmonrezonancia<sup>179–183</sup>, OWLS (MicroVacuum Ltd., Budapest, Magyarország)<sup>184–186</sup>, fotonikus kristály bioszenzor<sup>187–190</sup> és rezonáns rácsos hullámvezető (RWG) technikával is<sup>191–194</sup>. Ezek a technikák evaneszcens elektromágneses hullámokat alkalmaznak. Lényegében a törésmutatóban bekövetkező változásokat képesek nagy érzékenységgel kimutatni az érzékelő felületük közvetlen környezetében. Mivel az alkalmazott evaneszcens hullám intenzitása a szenzor felülettől távolodva exponenciálisan lecseng, az ezen technikákkal végzett sejtalapú detektálás a felülettől számított 100-300 nm-es zónára korlátozódik. Ennek következtében csak a sejtek szenzorfelülethez közeli része érzékelhető, az egész sejt nem, ugyanakkor felületközeli érzékenységük kiemelkedő. Érdeemes itt megjegyezni, hogy léteznek olyan – eddig kereskedelmi forgalomban még nem

kapható – ún. inverz szimmetriájú hullámvezető konfigurációk is, melyek segítségével a fent említett vizsgálati mélység megnövelhető és hangolható<sup>195,196</sup>.

A kereskedelmi forgalomban kapható RWG optikai bioszenzor, a Corning cég Epic BT (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) műszere már bizonyítottan hatékony eszköz sejtdhéziós és jelátviteli folyamatok jelölésmentes tanulmányozására<sup>10-12,191,197</sup>. Ezzel az eszközzel valós idejű és kvantitatív mérés végezhető. Az RWG technológia új lehetőségeket nyit a sejttotoxicitás vizsgálatokban is. Ez a technika nem invazív és nagy áteresztőképességű, a műszerhez tartozó 96- vagy 384-lyukú szenzor lemezeken nagyszámú minta egyidejűleg mérhető<sup>198</sup>. Az Epic BT bioszenzort egyaránt használják sejtes és biokémiai mérésekben is<sup>198</sup>. A műszer képes monitorozni a sejtes folyamatokat közvetlenül a szenzor feletti 150 nm vastag zónában, ezáltal a szenzoron elhelyezkedő sejtek kontakterületének változásáról és a sejtek fehérjéinek dinamikus tömegátrendeződéséről (DMR) nyerhetünk értékes kinetikai információt<sup>191</sup>. Ez a sokoldalú bioszenzor részletes információt szolgáltat a vizsgált kötések affinitásáról<sup>11</sup>, a kölcsönhatások kinetikájáról<sup>10,12</sup> és a sejtek biológiai állapotáról (pl. sejtek életképessége, sejtsűrűsége és a sejtletpadás mértéke)<sup>198</sup>.

## 2.5. Polielektrolitok és rétegenként építkezve (layer-by-layer) technika

A polielektrolitok olyan polimerek, melyek ismétlődő alegységei ionos csoportokat tartalmaznak<sup>199</sup>. A polielektrolitok ionos csoportjaik szerint lehetnek pozitívan és negatívan töltött polimerek<sup>199</sup>. A rétegenként építkezve (layer-by-layer) technika segítségével polielektrolit-oldatokból kiindulva multirétegeket építhetünk fel egy adott szubsztrát felszínén<sup>200</sup>. Elsők között Gero Decher alkalmazta ezt a technikát, amely azon az eleven alapul, hogy a felület töltése szerint vonjuk be a felszínt váltakozva a felület töltésével ellentétes, illetve azzal azonos töltésű polielektrolittal (14. ábra)<sup>200</sup>. Egy, a 14. ábrán is részletezett egyszerű, elterjedt elrendezésben váltakozva mártjuk ellentétes töltésű polielektrolit-oldatba a szubsztrátot, és ezeket a lépéseket annyiszor ismétljük, ahány réteget fel kívánunk építeni (az első lépés során a felülettel ellentétes töltésű polielektrolitot alkalmazunk). Ezzel a „bottom-up” (alulról felfelé építkező) módszerrel<sup>201</sup> elméletileg akár végtelen számú réteg is építhető. A két ellentétes töltésű polielektrolit réteg felvitele között sok esetben egy mosási lépés is szerepel, hogy a felületre nem adszorbeálódott polielektrolit láncokat el tudjuk távolítani. A rétegek épülését az elektrosztatikus kölcsönhatások mellett hidrogénhid és van der Waals kötőerők is elősegíthetik<sup>202,203</sup>. Továbbá ismertek olyan polielektrolit rétegek, ahol kovalens kölcsönhatások is részt vesznek a felépülés folyamatában<sup>204</sup>.



14. ábra Sematikus ábrázolása a polielektrolit multiréteg felépülés folyamatának negatív töltéssel rendelkező szubsztrát felületen „rétegenként építkezve”. A polikationt pirossal, a polianiont kézzel és a mosási lépést szürkével jelöltem. <sup>205</sup>

Lineáris és exponenciális rétegépítési módot különböztetünk meg a polielektrolit multirétegek önszerveződése esetén. A lineáris rétegépítésre jellemző, hogy azonos nagyságú tömeg és vastagság rakódik a felszínre minden egyes adszorpciós ciklus során. Az adszorpciós lépések során a rétegek töltése túlkompenzálódik, emiatt az elektrosztatikus kölcsönhatás limitálja a láncok további kitapadását. Ez esetben csak a szomszédos rétegekbe tudnak behatolni az újonnan adszorbeálódott polielektrolit molekulák<sup>206-208</sup>. A lineáris építést mutató polielektrolit rétegek vastagsága jellemzően 1-10 nm között van.<sup>206,208</sup> A lineárisan növekvő polielektrolit rétegekre példa a PAH-PSS multiréteg.<sup>206</sup> A lineáris kinetikával ellentétben az exponenciális mechanizmusnál a polimerláncok ki és be tudnak diffundálni a már felépült teljes rétegbe. Az építés folyamán az új polimer komplexet alkot a már a rétegben lévő ellentétesen töltött molekulákkal. Lényegében az ellentétesen töltött polimer kidiffundál az alsó rétegekből a polielektrolit multiréteg tetejére, ahol kialakul a komplex<sup>206,209,210</sup>. A rétegek számával a felületre adszorbeált tömeg és rétegvastagság exponenciálisan, vagyis nagyobb mértékben növekszik, mint az adott adszorpciós lépésnél a lineárisan növekvő polielektrolit réteg esetében.<sup>207,208,211</sup> Az exponenciálisan növekvő rétegre egy közismert példa a PAH-PGA (PGA mint poliglutaminsav) multiréteg.<sup>206</sup>

### 3. Célkitűzés

Munkám fő célja egy új citotoxicitást meghatározó mérési módszer kidolgozása a jelölésmentes és nagy áteresztő képességű Epic BT bioszenzor felhasználásával. A hagyományos citotoxicitás mérési módszerek számos hátránnyal rendelkeznek: időigényesek, jelölő anyag szükséges a mérésekhez, alkalmazásuk korlátozott szérumos tápközegben, valamint csak végpontmérésre alkalmasak. Az Epic BT bioszenzorral a sejtválasz közvetlenül mérhető, valós időben, jelölésmentesen, szérumot tartalmazó és szérummentes tápközegben is, így potenciálisan használható lehet a xenobiotikumok citotoxicitásának első lépéses vizsgálatához.

Aktuális probléma az ökotoxikológiában, hogy a formázott növényvédő szerek környezeti és toxikológiai hatásai gyakran eltérnek magának a hatóanyagnak, vagy a szer más összetevőinek a hatásától. A disszertációmban a világszerte használt Roundup Classic növényvédő szerrel és komponenseivel tesztelem az Epic BT bioszenzor alkalmasságát a citotoxicitás-mérésekben. Ezen elterjedt növényvédő szernek a biztonságos használatával kapcsolatban számos kérdés merült fel, és megannyi megbetegedéssel hozták kapcsolatba (pl.: a májat, vérképző-rendszert, csontvelőt, idegrendszert, magzatot, valamint placentát érintő megbetegedéseivel). Célul tűztem ki doktori munkámban, hogy a Roundup Classic növényvédő szernek, a *glyphosate* hatóanyagának, és a POEA formázó komponensének koncentrációfüggő élettani hatását vizsgáljam. Modellrendszerként emlős preoszteoblaszt sejtvonalat (MC3T3-E1) tervezek alkalmazni. A konkrét vizsgálataimban a mezőgazdaságban használatos 1-2%-os és annál kisebb hígításokban fogom tanulmányozni a Roundup Classic növényvédő szert és komponenseit. A bioszenzoros mérések eredményeit hagyományos mérési módszerekkel (fluoreszcens mikroszkópiával, Muse Cell Analyser citofluoriméterrel) és digitális holografikus mikroszkópiával is igazolni kívánom.

A kvantitatív vizsgálatok érdekében további célul tűztem ki egy kalibrációs egyenlet meghatározását PAH-PSS polielektrolit oldatok (referencia rendszer) segítségével. Ezen egyenlet felhasználásával a bioszenzor által mért hullámhossz eltolódások felületi tömegsűrűségekkel konvertálhatóak lesznek. Ezt az egyenletet refraktometriás mérések segítségével *glyphosate* hatóanyagra is alkalmazhatóvá teszem.

## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1. Alkalmazott vegyszerek

#### *Alkalmazott növényvédő szer és komponensei*

*Glyphosate* (izopropilammonium só formájában) Pestanal analitikai standardot használtam, melyet a Riedel-de Haën (Seelze, Németország) cégtől rendeltünk. A Roundup Classic növényvédő szert nyilvános forrásból szereztük be, és a POEA formázószeret Lamberti SpA (Albizzate, Olaszország) cégtől kaptuk. A vizsgálatokban a Roundup Classic készítményt a mezőgazdasági használatban alkalmazott koncentrációin (1-2%) és annak hígításain (akár több nagyságrenddel alacsonyabb koncentrációkon) teszteltem. A glyphosate és POEA komponenseket is a megfelelő Roundup Classic-oldatban mérhető koncentrációin vizsgáltam, és ezek értékeit mindig Roundup Classic-oldattal egyenértékű koncentrációban adtam meg a könnyebb összehasonlíthatóság érdekében. A Roundup Classic, *glyphosate*, valamint POEA oldatokat frissen készítettem 20 mM-os 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin etánszulfonsav (HEPES, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Németország) és Hank-féle normalizált sóoldatban (HBSS, Sigma-Aldrich) vagy szérumot tartalmazó közegben. Az oldatok pH-ját 7,4-re állítottam be és az oldatokat leszűrtem egy 0,22  $\mu\text{m}$  szűrő segítségével.

#### *Bioszenzor felület előkészítése biomimetikus bevonattal sejtdhéziós vizsgálatokhoz*

A szintetikus kopolimereket, azaz a poli-(L-lizin)-g-poli-(etilén-glikol)-t (PLL-g-PEG,[PLL(20)-g (3.5)-PEG (2)]) (PP) és annak RGD-funkcionalizált változatát, a PLL-g-PEG(2)/PEG(3,4)-PEG/PEGGGGGYGRGDSP (PLL-g-PEG-RGD-12% RGD]) polimert (PPR) a SuSoS AG cégtől (Dübendorf, Svájc) rendeltük és felhasználásáig  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. Az 1,0 mg/ml PP és PPR törzsoldatokat 10 mM HEPES-ben oldva (pH 7,4) készítettem el és sterilen szűrtem. A PP és a PPR törzsoldatokat (PP:PPR) különböző arányban kevertem össze. A bioszenzor lemezt előnedvesítettem 10 mM HEPES pufferrel fél órán keresztül a kopolimeroldattal történő bevonás előtt. A puffer eltávolítása után a bevonatot a bioszenzor felületén úgy alakítottam ki, hogy 50  $\mu\text{l}$  (96-lyukú lemez esetén) vagy 30  $\mu\text{l}$  (384-lyukú lemez esetében) kopolimeroldatot pipettáztam a lyukakba, majd 30 percig, szobahőmérsékleten, rázógépen inkubáltam az oldatokat tartalmazó lemezt. Ezután a felületre nem kitapadt polimereket háromszor mostam le 20 mM HEPES-HBSS-sel (pH = 7,4).



## *Alkalmazott polielektrolit-oldatok*

A polielektrolit multirétegek építéséhez egy negatív töltésű polimert, a PSS (poli-(sztirol-szulfonát) és egy pozitív töltésű polimert, a PAH (poli-(allil-amin-hidroklorid) polielektrolitot használtam. A PSS átlagos molekulatömege 70 kDa (Sigma-Aldrich). A PAH (poli-(allil-amin-hidroklorid) polielektrolit átlagos molekulatömege 160 kDa (Alfa Aesar GmbH, Karlsruhe, Németország). A kísérleteimben 1 mg/ml koncentrációban alkalmaztam a PAH és PSS polielektrolitokat 10 mM HEPES pufferben (pH 7,4) oldva.

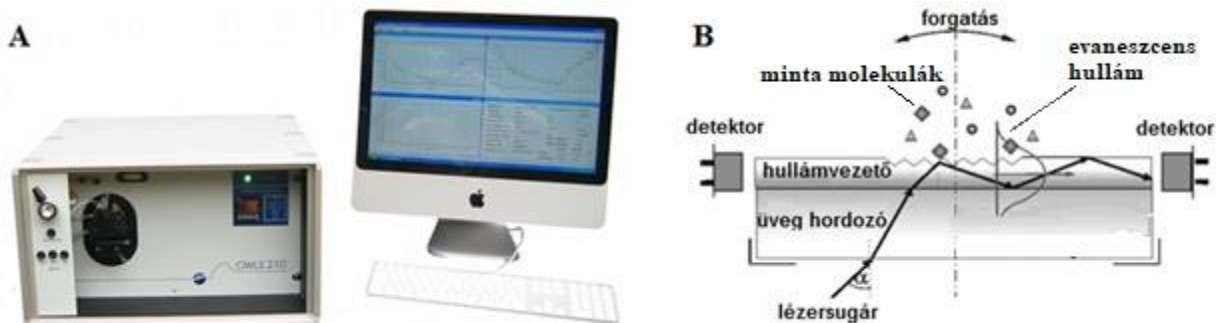
## **4.2. A vizsgált sejt kultúra**

A kísérleteimet MC3T3-E1 (99072810 Sigma-Aldrich) preoszteoblaszt sejtekkel végeztem, amelyek  $\alpha$ -módosított minimális esszenciális médiumban ( $\alpha$ -MEM) tenyésztettek. E tápoldatot kiegészítettük 10% borjú szérummal (FBS, Biowest SAS, France), 2 mM L-glutaminnal (Sigma-Aldrich), 100 U/ml penicílnel (Sigma-Aldrich), 100  $\mu$ g/ml sztreptomycinoldattal (Sigma-Aldrich) és 0,25  $\mu$ g/ml amphotericin B-vel (Sigma-Aldrich). A sejteket 37°C-on, párásított és 5% CO<sub>2</sub>-t tartalmazó körülmények között tartottuk fenn. 80%-os konfluenciát elérve a sejteket 3-4 naponta 0,05% tripszin/ 0,02% EDTA-oldattal szedtem fel. 20-nál nagyobb passzálási számot nem használtam.

## **4.3. Alkalmazott műszerek és kísérleti eljárások**

### **4.3.1. OWLS bioszenzor**

OWLS210 műszert (MicroVacuum Ltd., Budapest, Magyarország) használtam a PAH-PSS polielektrolit multirétegek felépülésének a követésére. Az OWLS egy felületérzékeny technika, mely működése optikai elven alapul (15. ábra).



15. ábra Az OWLS készülék (A) és a működési elve (B).<sup>212</sup>

A mérés egy sík optikai hullámvezető chipen zajlik. Ez a hullámvezető chip egy 8x16 mm üveghordozóból áll, amelyre TiO<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub> hullámvezető réteget vittek fel szol-gél technikával (ASI2400 μV, Mikrovacuum Ltd., Budapest), és egy 1 mm széles optikai rácst alakítottak ki ebben a hullámvezető rétegben a chip közepén, a hosszabbik éllel párhuzamosan. Az optikai chipen található rácst egy 632,8 nm hullámhosszúságú nyalábot kibocsátó He-Ne lézerrel világítjuk meg. A rácson keresztül, a hullámvezető rétegbe becsatolódott fény a hullámvezetőben teljes visszaverődések sorozatával, diszkrét módusokban terjed. Az OWLS evanescens elektromágneses teret használ az optikai hullámvezető közelében történő törésmutató-változások érzékelésére (behatolási mélység kb. 100 nm).<sup>213-215</sup> Az alkalmazott szenzor chipekben a 0. módusindexű transzverzális elektromos (TE<sub>0</sub>) és transzverzális mágneses módus (TM<sub>0</sub>) gerjeszhető. Az OWLS bioszenzor a chiptartó kivetta két végében elhelyezkedő detektor (fotódióda) segítségével méri a hullámvezetőbe becsatolt fény intenzitásait miközben változtatja a megvilágító lézer beesési szögét. A két lehetséges módus két éles csúcsként jelenik meg a mért intenzitás-szög adatokban. A csúcsok pozícióiból számolható a hullámvezető módusok effektív törésmutató értékei. A műszer rögzíteni tudja a TE<sub>0</sub> és a TM<sub>0</sub> hullámvezető módusok effektív törésmutatóit 13 másodperces időfelbontással.

Az effektív törésmutató a következő egyenletből számítható ki a mért becsatolási szög ismeretében<sup>213,216</sup>:

$$N = n \sin(\alpha) + \frac{k\lambda}{\Lambda} \quad (1)$$

$N$  a gerjesztett hullámvezető módus effektív törésmutatója,  $n$  a levegő törésmutatója,  $\alpha$  a becsatolás szöge,  $k$  a diffrakciós rend ( $k=1$  a használt OWLS hullámvezető chipek estén),  $\lambda$  a gerjesztő fény

hullámhossza és  $\Lambda$  a rácsállandó. Eltérő becsatolási szögekkel rendelkeznek az  $N_{TE}$  és  $N_{TM}$  polarizációjú módusok.

A felületre adszorbeált réteg törésmutatója ( $n_A$ ) és a rétegek vastagsága ( $d_A$ ) a következő ún. módusegyenletekből számolhatóak ki<sup>216</sup>.

$$\pi m = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{n_F^2 - N^2} (d_F + \Delta d_F) - \arctan \left[ \left( \frac{n_F}{n_s} \right)^{2\rho} \sqrt{\frac{N^2 - n_s^2}{n_F^2 - N^2}} \right] - \arctan \left[ \left( \frac{n_F}{n_C} \right)^{2\rho} \sqrt{\frac{N^2 - n_C^2}{n_F^2 - N^2}} \right] \quad (2)$$

$$\Delta d_F = d_A \frac{n_A^2 - n_C^2}{n_F^2 - n_C^2} \left( \frac{\left( \frac{N}{n_C} \right)^2 + \left( \frac{N}{n_A} \right)^2 - 1}{\left( \frac{N}{n_C} \right)^2 + \left( \frac{N}{n_F} \right)^2 - 1} \right)^\rho \quad (3)$$

Ahol  $m$  a gerjesztett módus rendje (jelen esetben 0),  $n_F$  a hullámvezető réteg törésmutatója,  $d_F$  a hullámvezető réteg vastagsága,  $n_s$  a szubsztrát törésmutatója,  $n_C$  a vizes fedő közeg törésmutatója. TM polarizáció esetében  $\rho=1$  és TE esetében  $\rho=0$ .

Fenti képletből számolhatóak a következő kifejezések, melyeket az OWLS program felhasznál a számítások során<sup>217</sup>.

$$n_A = \left( \frac{\frac{FM(N_{TM})}{A(N_{TM})} - d_F \left( \frac{1}{n_C^2} + \frac{1}{n_F^2} - \frac{1}{N_{TM}^2} \right) - \frac{1}{n_C^2} + \frac{1}{N_{TM}^2}}{\frac{FE(N_{TE})}{A(N_{TE})} - d_F} \right)^{-\frac{1}{2}} \quad (4)$$

$$d_A = \left( \frac{FE(N_{TE})}{A(N_{TE})} - d_F \right) \left( \frac{n_F^2 - n_C^2}{n_A^2 - n_C^2} \right) \quad (5)$$

Amely egyenletekben szereplő  $A(N)$ ,  $FM(N)$  és  $FE(N)$  értékek az alábbi módon lehet kiszámolni<sup>217</sup>:

$$A(N) = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{n_F^2 - N^2} \quad (6)$$

$$FM(N) = \arctan \left( \frac{n_F^2}{n_s^2} \sqrt{\frac{N^2 - n_s^2}{n_F^2 - N^2}} \right) + \arctan \left( \frac{n_F^2}{n_C^2} \sqrt{\frac{N^2 - n_C^2}{n_F^2 - N^2}} \right) \quad (7)$$

$$FE(N) = \arctan \left( \sqrt{\frac{N^2 - n_s^2}{n_F^2 - N^2}} \right) + \arctan \left( \sqrt{\frac{N^2 - n_C^2}{n_F^2 - N^2}} \right) \quad (8)$$

Ezekből az értékekből meghatározható az adszorbeált felületi tömegsűrűség a de Feijter képlet (9) szerint.<sup>218</sup>

$$M = d_A \frac{n_A - n_C}{dn/dc} \quad (9)$$

ahol  $M$  a réteg felületi tömegsűrűségét,  $n_A$  a réteg törésmutatóját és  $d_A$  a réteg vastagságát,  $dn/dc$  felületre adszorbeálódó molekulák oldatának törésmutató növekedési értékét, illetve az  $n_C$  a réteg feletti vizes közeg törésmutatóját jelöli.

Mérés során folyadékküvetta alkalmazásával közvetlenül a hullámvezető szenzor felületére juttatjuk az oldatokat a küvetta tetején lévő injekciós porton (szeptum port) keresztül. A küvetnában egy perisztaltikus pumpa segítségével is áramoltatjuk a folyadékokat, tipikusan 1  $\mu\text{l}$ /másodperc sebességgel.<sup>219</sup> Az OWLS210 berendezés műszaki paramétereit a 2. táblázatban foglaltam össze.

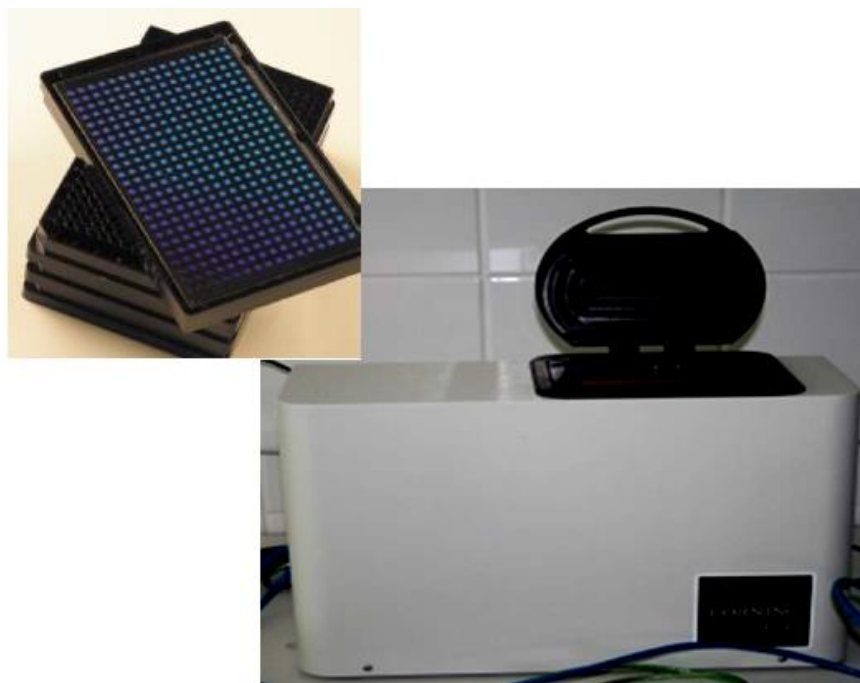
adatpont-kiolvasás	13 másodperc/adatpont
Fényforrás	He-Ne lézer, 632,8 nm
műszer érzékenysége	1 ng/cm <sup>2</sup>
hőmérséklet-szabályozás	fűthető és hűthető küvetta (Peltier-elemmel való hőmérséklet szabályozás) 20°C-80°C között, hűtés/fűtés gyorsasága ~8°C/perc
detektálás	2 db fotodióda
vizsgálati lehetőségek	kémiai és biokémiai kölcsönhatások vizsgálatára, elektrokémiai mérésekre is alkalmas (potenciosztát is kapcsolható hozzá)
küvetta-beinjektálható térfogat	20-500 µl
küvetta-ban a folyadékáramlás sebessége	0,1 µl/perc -30 ml/perc
OWLS chip, hullámvezető réteg vastagsága	170-220 nm
OWLS chip, hullámvezető réteg anyaga, törésmutatója	TiO <sub>2</sub> – SiO <sub>2</sub> szol-gél technikával kialakítva, törésmutatója: 1,77
OWLS chip, üveg szubsztrát: hossz x szélesség x vastagság	12 mm x 8 mm x 0,5 mm
OWLS chip, üveg szubsztrát törésmutatója	1,53
OWLS chip, rács domborzat mélysége	20 nm
OWLS chip, rács periódusa	2400 vonal/mm (0,4166 µm)
OWLS chip, rács területe	2 mm x 12 mm
OWLS chip, rács orientációja	a rács párhuzamosan fut a szenzorchip hosszabb oldalával

2. táblázat Az OWLS bioszenzor műszaki paramétereiről<sup>212</sup>.

Az OWLS kísérletekhez OWLS 2400 chipeket (Mikrovákuum Kft., Budapest) használtam. Mérések előtt minden esetben megtisztítottam az OWLS chipeket. A chipet 3 másodpercig krómkénsavban áztattam, majd Milli-Q (ultratiszta víz) vízzel leöblítettem. Ezt követően 0,5 M KOH-oldatba mártottam, amely lépést Milli-Q vizes öblítés követett. A chipet nyolcszor 5 percig Milli-Q vízben szonikáltam, és minden egyes ciklus után cseréltem a vizet a chip felett, majd a megtisztított szenzorokat nitrogénnel szárítottam meg. A száraz chipet egy éjszakán át hagytam állni abban a pufferben, amellyel a következő nap mértem.

#### 4.3.2. Epic BT bioszenzor

A méréseket 96- és 384-lyukú Epic cell assay lemezeken végeztem (Corning Incorporated, Corning, NY, USA). A lemez minden lyukában egy  $2 \times 2$  mm-es RWG érzékelő található (16. ábra). Minden egyes szenzor egy üveghordozóra felvitt nagy törésmutatójú  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  rétegből épül fel, mely réteg a fény be és kicsatolásának céljából egy optikai rácst is tartalmaz. A szenzort egy széles hullámhossz tartományban hangolható nyaláb világítja meg, melyből csak egy adott, ún. rezonáns hullámhossz csatolódik be az optikai rácson keresztül a hullámvezető rétegbe<sup>191</sup>.



16. ábra Az Epic BT bioszenzor és a hozzá tartozó lemezek (úgynevezett bioszenzor plate).

A becsatolt módus ugyanezen rácson keresztül ki is csatolódik az üveg szubsztrát irányába, tehát a rezonáns hullámhosszon a szenzor tükörként viselkedik. A becsatolásakor gerjesztett módus létrehoz egy, a felülettől távolodva exponenciálisan lecsengő intenzitású, elektromágneses teret (ún. evaneszcens hullám), melynek behatolási mélysége kb. 150 nm. A szenzor által detektált rezonáns hullámhossz eltolódik ( $\Delta\lambda = \lambda' - \lambda$ , ahol  $\lambda'$  új  $\lambda$  pedig az eredeti rezonáns hullámhossz), ha törésmutató-változás történik az érzékelő felület feletti 150 nm mélységű térrészben. A sejtes válaszoknál is jól megfigyelhető törésmutató-változás által okozott rezonáns hullámhossz eltolódás, ahol  $\Delta\lambda$  arányos a szubsztrát feletti sejt-tápközeg rendszer tényleges törésmutató változásával a szenzor felület közvetlen környezetében. A szenzorról visszavert rezonáns hullámhossz detektálását egy fém-oxid félvezető (CMOS CCD) kamera végzi<sup>191</sup>. Az Epic BT bioszenzor műszaki paramétereit az 3. táblázatban foglaltam össze.

adatpont kiolvasása	3 másodperc/adatpont
fényforrás hullámhossza	825-840 nm
műszer érzékenysége	0,78 ng/cm <sup>2</sup>
műszer működési hőmérséklete	37°C±3°C
detektálás	CCD kamera (fém-oxid félvezető kamera CMOS)
méréstípus	sejtalapú és biokémiai mérések
Epic lemezek lyukszám szerint	384- és 96-lyukú
Epic lemez sejtszám	5000-20000 sejt/lyuk
Epic lemez hullámvezető rétegének anyaga	Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Epic lemez rács	2x2 mm <sup>2</sup> egy lyuk közepén a rács

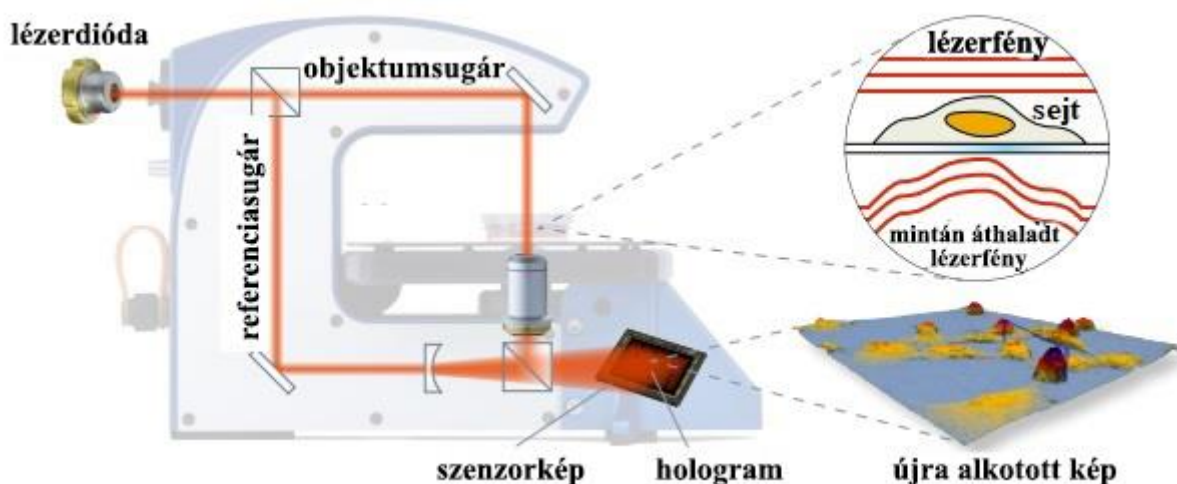
3. táblázat Az Epic BT bioszenzor műszaki paramétereit<sup>220</sup>.

#### 4.3.3. HoloMonitor digitális holografikus mikroszkópia

A MC3T3-E1 sejtek morfológiáját jelölésmentes HoloMonitor M4 digitális holografikus mikroszkópiával (Phase Holographic Imaging AB, Lund, Svédország) tanulmányoztam. A mérésekhez Ibidi  $\mu$ -Slide I ibi Treat (#80106) csatornát használtam. Az Ibidi csatornába 100  $\mu$ l

100000 sejtet tartalmazó sejtuszuspenziót (2,5 cm<sup>2</sup>) pipettáztam bele. A csatornába a sejtek növekedéséhez szükséges tápközeget adtam, és egy éjszakán keresztül (37°C-os párasított, 5% CO<sub>2</sub>-t tartalmazó) inkubátorban tartottam. A következő nap a tápközeget kicseréltem a Roundup készítményt, a POEA formázó anyagot vagy a *glyphosate* hatóanyagot tartalmazó tápközegre. Háromdimenziós képeket készítettem a kezelt sejtekről minden 5 percen.

A HoloMonitor egy jelölésmentes technika, amely a kitapadt sejtekről háromdimenziós képeket készít. A műszerben alkalmazott dióda lézer fénye egy referencia és egy objektum lézertárcsára kerül szétbontásra (17. ábra). Amint az objektum lézertárcsa áthalad a mintán, fáziseltolódást szenved. Az objektum és a referencia lézertárcsák újbóli egyesítése a műszerben interferencia-mintázatot, azaz hologramot hoz létre egy CCD kamerán. Ezt a hologramot a műszer rögzíti, majd a fázis numerikus rekonstrukciójával létrejön a fáziskép<sup>178</sup>. A fáziskép megjeleníti a fény fáziseltolódását, amelyet a minta okoz. Ezt a fáziseltolódási mintázatot használja fel a műszerhez tartozó szoftver, amely kiszámítja a sejt-morfológiai paramétereket. A HoloMonitor képes kimutatni a sejt-migrációs távolságot (sejt-útvonalának hosszúságából számolja, úgy hogy a xy koordináták kezdő és végpontja közötti távolságot veszi), migrációs irányt, sejt-morfológiát, mozgékonyt (távolság és gyorsaság), sejt-kerületet és területet, optikai sejt-térfogat (fáziseltolódás alapján számítja), optikai vastagság (sejt-térfogat és sejt-terület hányadosa), érdességet és domborúságot.<sup>221</sup> A HoloMonitor M4 műszaki paraméterei a 4. táblázatban láthatóak.



17. ábra A HoloMonitor M4 működési elvének sematikus ábrázolása, amely bemutatja, hogy hogyan alkot 3D képet a mintáról a műszer a minta és a referencia lézertárcsa segítségével.<sup>221</sup>



oldalsó és függőleges felbontás	1 $\mu\text{m}$
látómező	0,25 $\text{mm}^2$
autofókusz tartomány	1,5 mm
maximális képfelvételi sebesség	1 kép/másodperc
objektív	20x
fényforrás	külső lézer egység, 635 nm
minta megvilágítás	635 nm 0,2 $\text{mW}/\text{cm}^2$
kép felbontása	1024x1024 pixel
működési hőmérséklet	10-40°C
üzemi páratartalom	maximum: 95%
sejtkultúrák edények	T25, 6-lyukú lemez, Petri-csésze, Ibidi
sejtek	egyrétegű adherens sejtek

4. táblázat A HoloMonitor M4 műszaki paramétereiről<sup>222</sup>.

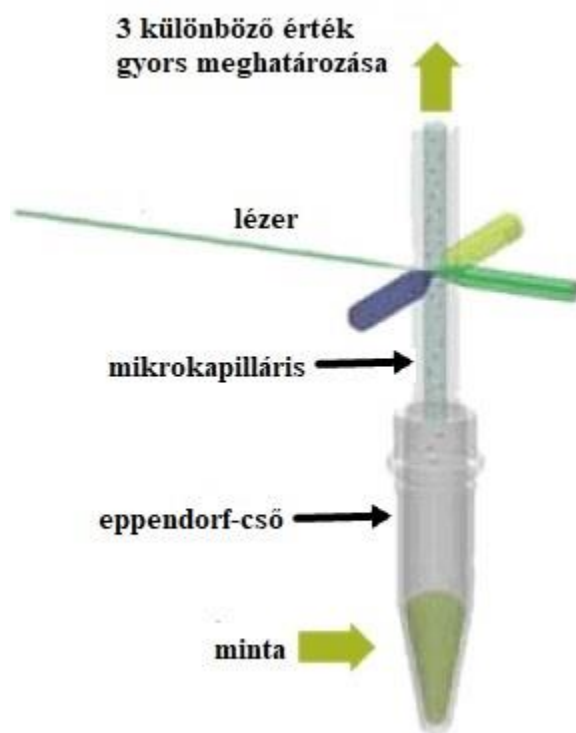
#### 4.3.4. Refraktométer

A felhasznált oldatok törésmutató értékeinek a megállapításához Rudolph J157 asztali refraktométert (Rudolph Research Analytical, Hackettstown, NJ, USA) használtam. Ezen refraktométer pontossága  $10^{-5}$  RIU (ahol a RIU törésmutató egységet jelent).

#### 4.3.5. Muse citofluoriméter

A Muse Cell Analyzer (Merck Millipore KGaA, Darmstadt, Németország) műszert választottam az általam fejlesztett citotoxicitás mérési módszer validálására, mivel ez egy olcsó, könnyen kezelhető eszköz, amely gyors mintapreparációt és mérést tesz lehetővé. A működési elve a citofluorimetriás mérések elvén alapszik. Ez egy olyan technika, amely méri az egyedi sejtek fizikai és kémiai jellemzőit (sejtméretet, membrán épségét, DNS/RNS tartalmat, különböző membrán kötött vagy intracelluláris fehérjéket) és ezekből a jellemzőkből következtet a sejtek állapotára<sup>223</sup>.

A mérés kezdetén a sejteket fluoreszcens reagenssel a gyártó protokollja szerint kezelni szükséges (a méréseim során Muse kaszpáz 3/7 reagenst használtam). A műszer a hatékony sejtanálízishez tartalmaz egy vékony mikropilláriszt és egy miniaturizált optikát. A mérés alatt a műszer felszívja a kapillárisba a fluoreszcens reagenssel kezelt sejteket tartalmazó mintát. A mintát tartalmazó kapilláriszt 532 nm hullámhosszúságú lézerfényvel világítja meg, amely segítségével detektálja a detektor a sejt méretet és a sejt állapotára utaló emittált fény hullámhosszát (576 nm és 680 nm) (18. ábra).



18. ábra A Muse Cell Analyzer kapilláris sematikus ábrázolása.<sup>223</sup>

A fotodetektor detektálja a jeleket, melyeket a számítógép feldolgoz és az eredményt kijelezi hisztogram vagy két dimenziós dot-plot diagram formájában. A műszer paramétereit az 5. táblázatban foglaltam össze<sup>223</sup>

<i>műszer fizikai paramétere</i>	
lézer	532 nm
elülső szórás detektorok	fotodióda
fluoreszcens detektorok	fotodiódák (576 nm és 680 nm hullámhosszt detektálnak)
<i>fluidika</i>	
kapilláris dimenziója	négyszögletes kapilláris (1,5 mm x 0,8 mm) 100- $\mu$ m kerek átmérővel
minta áramlási sebessége	7-36 $\mu$ l/perc
minta koncentrációja	végző részecske koncentráció $1 \times 10^4$ –től $5 \times 10^5$ részecske/ml-ig
minta szükséglet	minimum 2000 sejt/teszt; tipikusan 25000-100000 sejt/teszt, méréstől függően
számolási pontosság	$\pm 10\%$

5. táblázat A Muse Cell Analyzer műszaki paramétere<sup>223</sup>.

#### 4.3.6. Muse kaszpáz-3/7-teszt apoptózis detektálásához

A Merk Millipore cégtől vásárolt Muse citofluoriméterhez használható kaszpáz-3/7 tesztet az általam fejlesztett citotoxicitás mérési módszer validálására alkalmaztam. A készletben lévő kaszpáz-3/7 reagens a sejtmembránon keresztül át tud jutni, de nem toxikus a sejtre. Ez a reagens tartalmaz egy DNS-kötő festéket, amely hidrofilikus kaszpáz-specifikus Asp-Glu-Val-Asp (DEVD) peptidhez tud kötni. Amikor a DEVD peptidhez kötődik a festék, akkor nem képes DNS-t kötni. A sejtben történő kaszpáz-3/7 aktiválódásakor a festék felszabadul, átkerül a sejtmagba és megköti a DNS-t, így nagy fluoreszcens jelet kapunk. Kaszpázaktivitást korai és késői apoptotikus sejteknél láthatunk<sup>224</sup>.

A 7-ADD (7-amino-aktinomicin D) olyan festék, amely a sejtmembrán épségét és a sejt halálát mutatja ki. Egészséges és korai apoptotikus sejteknél nem jelez a festék, azonban késői apoptotikus és halott sejteknél képes DNS-hez kötni és jelezni<sup>224</sup>.

A műszer négyfajta sejtes állapotot képes elkülöníteni: az élő, korai és késői apoptotikus, illetve a halott állapotot. Az élő sejtek esetében a kaszpáz-3/7 és a 7-ADD inaktív. Az korai

apoptótikus sejteknél a kaszpáz-3/7 aktív és a 7-ADD inaktív. A késő apoptótikus sejteknél a kaszpáz-3/7 és a 7-ADD is aktív. Ezzel szemben halott sejteknél a kaszpáz-3/7 inaktív és a 7-ADD is aktív<sup>224</sup>.

A gyártó által rendelkezésemre bocsájtott protokoll szerint a következő módon jártam el<sup>225</sup>. Az MC3T3-E1 sejteket 24-lyukú lemezbe pipettáztam, és egy éjszakán keresztül inkubáltam. A következő nap a tápfolyadékot kicseréltem a vizsgált anyagokat (Roundup, *glyphosate* és POEA) tartalmazó tápközegre, amit 24 órán keresztül inkubáltam a sejtekkel. A toxikáns hatására a halott sejtek felúsznak, ezért összegyűjtöttem egy csőbe a lyukban lévő szérumos tápközeg, amelyben a halott sejtek voltak. Utána felszedtem a letapadva maradt sejteket a lemez felületéről tripszinnel. Ezt követően a tripszinnel felszedett sejtekhez hozzá adtam az összegyűjtött sejteket tartalmazó oldatot és felszuszpendáltam. Mivel az összegyűjtött sejtek szérumos tápközegben voltak oldva, így a tripszin aktivitását a szérum leállította. A sejteket tartalmazó szérumos tápközeg 300xg-n öt percig centrifugáltam, ezt követően a felülúszót eltávolítottam. Végül 1x assay pufferben szuszpendáltam fel a sejteket. Ezután, a sejteket megjelöltem Muse kaszpáz-3/7-készlet reagensivel (Merck Millipore)<sup>224</sup>.

A méréseim előtt a reagenseket a kaszpáz-3/7 és a 7-ADD oldatokat, illetve az 1x assay puffert és 1X PBS oldatot szobahőmérsékletre melegítettem. Először elkészítettem a kaszpáz-3/7-oldatot, amelyet 1:8 arányban hígítottam 1x foszfát puffer sóoldatban (PBS). Illetve 7-ADD-oldatot készítettem el, amelyet 1:75 arányban hígítottam 1x assay pufferben. (Kaspáz-3/7 és 7-ADD oldatokat még aznap fel kell használni, 2-8 °C-on vagy jégen, fénytől védve kell tárolni.). Ezt követően az 1x assay pufferben felszedett MC3T3-E1 sejtekből ( $1 \times 10^5$ - $5 \times 10^6$  sejt/ml) minden eppendorf csőbe 50  $\mu$ l sejtsuszpenziót raktam, amelyekből pozitív és negatív kontrollokat is készítettem. Utána minden egyes eppendorfba pipettáztam 5  $\mu$ l kaszpáz-3/7-oldatot. Az oldatot pipettával való felszuszpendálással vagy közepes sebességű 3-5 másodperces vortexeléssel homogenizáltam. A következő lépésben 30 percig inkubáltam a mintákat 37 °C-os inkubátorban 5% CO<sub>2</sub> atmoszférában. Az inkubáció után 150  $\mu$ l 7-ADD-oldatot tettem minden csőbe, majd az oldatot pipettával való felszuszpendálással vagy közepes sebességű vortexeléssel 3-5 másodpercig keverttem. Végül a mintákat 5 percig inkubáltam szobahőmérsékleten, fénytől védve<sup>224</sup>.

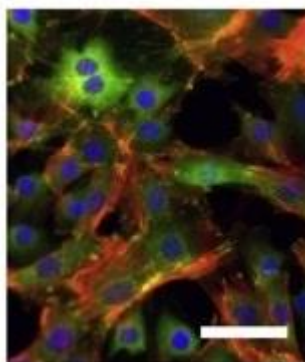
#### 4.3.7. Mikroszkópia

##### *Fáziskontraszt mikroszkópia*

Az Epic BT bioszenzoros mérések után a lemezekon lévő sejteket Zeiss Axio Observer.Z1 mikroszkóp (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Németország) segítségével vizsgáltam meg. A sejtek mikroszkópos felvételeit 20× objektívvel készítettem el, AxioVision szoftverrel (Carl Zeiss AG) rögzítettem és elemeztem ki.

##### *Fluoreszcens mikroszkópia*

Aktin citoszkeletonot, fokális adhéziót és sejtmagot jelölő készletet (Merck Millipore) használtam a sejtek fokális adhéziójában részt vevő fehérjék és a mag láthatóvá tételéhez<sup>225</sup>. A készlet tartalmaz tetrametilrodamin (TRITC)-konjugált falloidint (Merck Millipore, egy fiola 15 µg liofilizált anyagot tartalmaz, melyet 250 µl metanolba oldottunk fel és -20°C-on tároltuk), anti-vinkulin (Merck Millipore) és 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) festéket (Merck Millipore). Az anti-vinkulin (elsődleges antitest, egér, katalógus szám: FAK100) a fokális kontaktusokhoz tud kötődni, melyekhez kapcsolódik és fluoreszcensen jelöli a sejtet a FITC-konjugált másodlagos antitest (készlethez külön vásároltuk, kecske, Merck Millipore, katalógus szám: AP127F) (19. ábra)<sup>225</sup>. A DAPI a sejtmagot festi meg és a TRITC-konjugált falloidin az F-aktinokat tudja jelölni (19. ábra)<sup>225</sup>. A sejteket Zeiss Axio Observer.Z1 mikroszkóp fluoreszcens módjával tanulmányoztam 20x objektívvel.



19. ábra MC3T3-E1 sejteket citoszkeletonról és a fokális adhéziós komplexekről készült fluoreszcens képek. Kék szín: sejtmag (DAPI); piros szín: F-aktin (TRITC-konjugált falloidin); zöld szín: fokális kontaktusok (anti-vinculin elsődleges antitest, FITC-konjugált másodlagos antitest). Skála: 50 µm.

A sejtfixálást minden esetben egy sejtfixálási lépéssel kezdtem. A sejteket 1xPBS oldatban oldott 4%-os paraformaldehiddel (Sigma-Aldrich) 20 percen keresztül fixáltam. A paraformaldehid eltávolítása után a mintákat 50 µl PBS oldatban feloldott 0,05% Tween-20 mosó pufferrel kétszer mostam át. A sejteket fixálása után megfestettem a gyártó által rendelkezésemre bocsájtott protokoll szerint. A sejtfixálás előtt a PBS oldatban feloldott 0,1% Triton X-100 oldattal permeabilizáltam a sejteket 5 percig, szobahőmérsékleten. A Triton oldat eltávolítása után kétszer mostam 50 µl mosó pufferrel a mintákat. Ezután a mintákra 50 µl PBS oldatban feloldott 1% BSA oldatot (blokkoló oldat) pipettáztam, amely blokkolja a nem specifikus kötéseket. A blokkoló oldatot 30 percig hagytam a mintán. Az anti-vinkulinból (1:200 arányban hígítottam blokkoló oldatban oldva), amely egy elsődleges antitest, 30 µl-t pipettáztam minden mintára. Az anti-vinkulin eltávolítása után háromszor mostam 50 µl mosó pufferrel a mintákat. 30 µl FITC-konjugált másodlagos antitestet (1:50 arányban hígítottam PBS oldatban) és TRITC-konjugált falloidint (1:200 arányban hígítottam PBS oldatban) tartalmazó oldatot rápipettáztam a sejtekre, majd 1 órát vártam. A mintákat billegetőre tettem és letakartam fóliával (fénytől védeni kell a festékeket). Az oldat eltávolítása után háromszor mostam 50 µl mosó pufferrel a mintát. Majd 30 µl DAPI festéket (1:1000 arányban hígítottam PBS oldatban) pipettáztam a sejtekere és 2 percet vártam. Az oldat eltávolítása után a mintákat háromszor mostam 50 µl mosó pufferrel. Ezután háromszor mostam 50 µl PBS oldattal a mintákat. Ha hosszú ideig (több hónapig) tároltam a festett mintát, azidos PBS oldatot pipettáztam a mintára, parafilmmel lezártam és hűtőben tároltam annak érdekében, hogy ne száradjanak ki a sejtek<sup>225</sup>.

#### **4.4. Kísérletek menete és kiértékelési módja**

##### **4.4.1. Polielektrolit multirétegek felépülésének mérése OWLS 210 és Epic BT bioszenzorral**

Az OWLS mérés során 10 mM HEPES pufferrel vettem fel az alapvonalat (perisztaltikus pumpa segítségével 1 µl/s áramlási sebességet alkalmaztam). A stabil alapvonal beállta után a rétegek felépítését a pozitívan töltött PAH polielektrolittal kezdtem, mivel az OWLS chip (üvegszerű felület) negatívan töltött. A pumpán való áramoltatást kikapcsoltam és 200 µl PAH oldatot injektáltam egy fecskendővel a küvettába. Megvártam míg PAH polielektrolit hozzáadása után az OWLS jel stabilan beáll, majd 10 mM HEPES pufferrel mostam (pumpát bekapcsoltam). Ezután 200 µl PSS oldatot injektáltam a küvettába és megvártam, amíg beáll a stabil OWLS jel,

majd 10 mM HEPES pufferrel mostam (pumpát bekapcsoltam). Ezeket a lépéseket ötször megismételtem, amellyel öt rétegpárt sikerült felépítenem. Legalább két-három párhuzamos mérésre kapott választ átlagoltam és ezeket az adatokat korrigáltam a háttérrel.

Epic BT bioszenzorral hasonló módon végeztem el a mérést 96-lyukú bioszenzorlemezen, azzal a különbséggel, hogy nem áramoltattam az oldatokat, hanem az adott polielektrolitból/pufferből 50 µl-t pipettáztam a lyukakba. Illetve, mindenegyes lépésnél az előzőanyagot pipettával eltávolítottam a lyukakból és a mosási lépésnél háromszor mostam 100 µl pufferrel.

#### **4.4.2. Xenobiotikumok hatásának vizsgálata letapadt sejteken Epic BT bioszenzorral**

A sejteket egy éjszakán át hagytam a szenzor felületére kitapadni az inkubátorban, hogy egy összefüggő réteget alkossanak. Az inkubáció után Epic BT bioszenzoros mérést végeztem.

384-lyukú bioszenzorlemezen letapasztott sejtekről (8000 sejt/ml) a szérumot tartalmazó médiumot háromszor mostam le 20 mM HEPES-HBSS pufferrel. Ezt követően 25 µl 20 mM HEPES-HBSS pufferrel vagy szérumot tartalmazó médiummal felvettem az alapvonalat. A stabil bioszenzoros alapvonal beállta után 25 µl különböző koncentrációjú reagenst (Roundup Classic, *glyphosate*, POEA) pipettáztam a lyukakba, majd 1 óráig rögzítettem a bioszenzoros válaszjelet. Egy elektromos 16-csatornás pipettával (Finnpipette™ Novus, ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA) léptető módban a sejtszuszpenziót és a reagenseket adtam a lyukakhoz a kísérlet során. Mindegyik mérést legalább háromszor ismételt meg.

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).

#### **4.4.3. Sejtadhézió vizsgálata RGD-hangolt felületeken Epic BT bioszenzorral**

96-lyukú bioszenzorlemezt PP és PPR szintetikus kopolimer keverék (4.1. fejezetben leírtak szerint) oldatával vontam be. Ebből a keverékből különböző térfogatarányban (0-100 v/v% PPR) készítettem az oldatokat<sup>10</sup>. A felületmódosítás után a lyukakban stabil alapvonalakat vettem fel 50 µl 20 mM HEPES-HBSS pufferben. 100 µl MC3T3-E1 sejtszuszpenziót (8000 sejt/ml,

20 mM HEPES-HBSS pufferbe oldva) hozzáadtam a bioszenzor lyukakhoz. A kontroll mintáknál a polimerrel bevont lyukak pufferben mért értékeit mértem. Minden mérést legalább háromszor ismételt meg. Háttér korrekciónak használtam fel a PP felületeken mért sejtkitapadási jel átlagértékét (ezeken a felületeken a sejtek nem tapadnak ki jól).

#### **4.4.4. A sejtadhézió vizsgálata a *glyphosate* molekulát tartalmazó felületen Epic BT bioszenzorral**

384-lyukú bioszenzor lemez lyukaiba 25 µl különböző koncentrációjú HEPES-HBSS pufferben vagy szérumot tartalmazó tápközegben oldott *glyphosate* oldatot pipettáztam. Ezeket az oldatokat alkalmazva 1 órán át vettem fel bioszenzorral az alapvonal jelet. A stabil alapvonal beállta után 25 µl MC3T3-E1 sejtszuszpenziót (8000 sejt/ml) egy Novus pipettával pipettáztam a lyukakba. A bioszenzor által mért válaszokat 1 órán át mértem. Minden kezelést legalább háromszor ismételt meg. A sejteket nem tartalmazó kontroll lyukakban mért bioszenzor válaszokat átlagoltam, és a háttér korrekciójához alkalmaztam.

#### **4.4.5. A *glyphosate* gátló hatásának vizsgálata a sejtadhézióra Epic BT bioszenzorral**

A 384-lyukú bioszenzorlemez PP:PPR (1:1) bevonattal vontam be. 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. Az inkubálás után a kezelt sejteket a lyukakhoz adtam hozzá, amely 8000 sejt/lyuk végső sejtsűrűséget eredményezett. A *glyphosate* oldatot tartalmazó sejtszuszpenziót egy Novus pipettával adtam hozzá a lyukakhoz. A sejtek hozzáadása után bioszenzor válaszjeletet 1 órán át rögzítettem. Kísérleteim során a kezeletlen MC3T3-E1 sejteket negatív kontrollként alkalmaztam. Valamennyi mérést legalább háromszor ismételt meg. A sejtmentes oldatra kapott bioszenzorválaszokat átlagoltam, és háttér korrekcióhoz alkalmaztam.



#### 4.4.6. Kompetitív integrin kötési vizsgálat Epic BT bioszenzorral

Ennek a mérésnek a célja az volt, hogy megvizsgáljam, hogy a *glyphosate* kompetitív módon tudja-e gátolni a rekombináns  $\alpha_v\beta_3$  integrineket. A receptorkötési vizsgálatokat 384-lyukú bioszenzor lemezekon végeztem el. Az érzékelő felületét 250  $\mu\text{g/ml}$ , 10 mM HEPES pufferben oldott PP:PPR (1:1) polimer keverékkel vontam be. A bioszenzor lyukaiba 20  $\mu\text{l}$  *echistatin*, *glyphosate* és *tirofiban* oldatokat pipettáztam oly módon, hogy 20 és 40 nM *echistatin*, 1,1  $\mu\text{M}$ , 110  $\mu\text{M}$ , 11 mM és 22 mM *glyphosate* és 500 nM *tirofiban* legyen az egyes lyukakban a különböző anyagok végkoncentrációja. Miután az Epic BT bioszenzoron a stabil alapvonalak beálltak, minden lyukba 20  $\mu\text{l}$   $\alpha_v\beta_3$  integrin (R&D Systems, Minneapolis, MN, # 3050-AV) oldatot egy Novus pipettával pipettáztam oly módon, hogy 4  $\mu\text{g/ml}$  legyen a végkoncentráció és bioszenzor választ 1 órán keresztül mértem. Végül korrekciót hajtottam végre az eredményeken, mely során a kapott adatokból levontam a háttérrel (kontroll,  $\alpha_v\beta_3$  integrin nélküli mérések) és normáltam az integrin ligandumkötés átlagolt jelével (kontroll nélkül).

#### 4.4.7. Kompetitív enzimes immunoszorbenses próba

A vizsgálatot a NAIK AKK (Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ Agrár-környezettudományi Kutatóintézet) munkatársai végezték. Ennek a mérésnek a célja is az volt, hogy megvizsgáljam, hogy a *glyphosate* kompetitív módon tudja-e gátolni a rekombináns  $\alpha_v\beta_3$  integrineket. Az enzimkapcsolt immunszorbens vizsgálathoz (ELISA-hoz) 96-lyukú lemezt (Nunc, Roskilde, DK, # 442404) használtunk, amely lyukaiban 100  $\mu\text{l}$  250  $\mu\text{g/ml}$  PPR oldatot inkubáltunk egy éjszakán keresztül 4 ° C-on. Ezután a lyukakat háromszor mostuk PBS-Tween pufferrel (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,01% Tween 20, pH 7,4), majd 1 órán át szobahőmérsékleten 150  $\mu\text{l/lyuk}$  Tris-BSA pufferrel (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM  $\text{MnCl}_2$ , pH 7,5, 1% BSA) blokkoltunk. Ezt követően háromszor mostunk PBS-Tween pufferrel, majd 50  $\mu\text{l/lyuk}$  különböző koncentrációjú *glyphosate*, *echistatin* és *tirofiban* oldatokkal 2,0  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha_v\beta_3$  integrin Tris-BSA pufferben oldva inkubáltunk 1 órán át szobahőmérsékleten. A továbbiak során a lemezeket háromszor mostuk PBS-Tween pufferrel, majd lyukanként 100  $\mu\text{l}$  2  $\mu\text{g/ml}$  Tris-BSA pufferben beoldott elsődleges antitesttel (egér anti-humán CD51/CD61, BD Biosciences) 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltunk. A PBS-

Tween-nel történő háromszoros mosás után lyukanként 100 µl Tris-BSA pufferben oldott 1 µg/ml tormaperoxidázzal (HRP)-konjugált másodlagos antitestet (anti-egér IgG (egész molekula)-HRP, a4416, Sigma Aldrich) tettünk a lyukakba, és szobahőmérsékleten 1 órán át inkubáltuk. Ezután háromszor mostuk PBS-Tween-pufferrel, majd lyukanként 100 µl adtunk 1,2 mM hidrogén-peroxidból (szubsztrátként) és 1,2 mM 3,3', 5,5'-tetrametil-benzidinnél (kromofórként) 0,5 M citrát pufferben (pH 5,0) oldva. Elegendő színátalakulás után (10-60 perc elteltével) a HRP enzimreakciót 50 µl/lyuk 4 M kénsavval állítottuk le, és a lyukakban a színintenzitást 450 nm-en olvastuk be végpont jelzéssel SpectraMax iD3 többmódú lemez-olvasóval (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Végül korrekciót hajtottunk végre az eredményeken oly módon, hogy a kapott adatokból levontuk a háttérrel (kontroll) és normáltuk az integrin ligandumkötés átlagolt jelével.

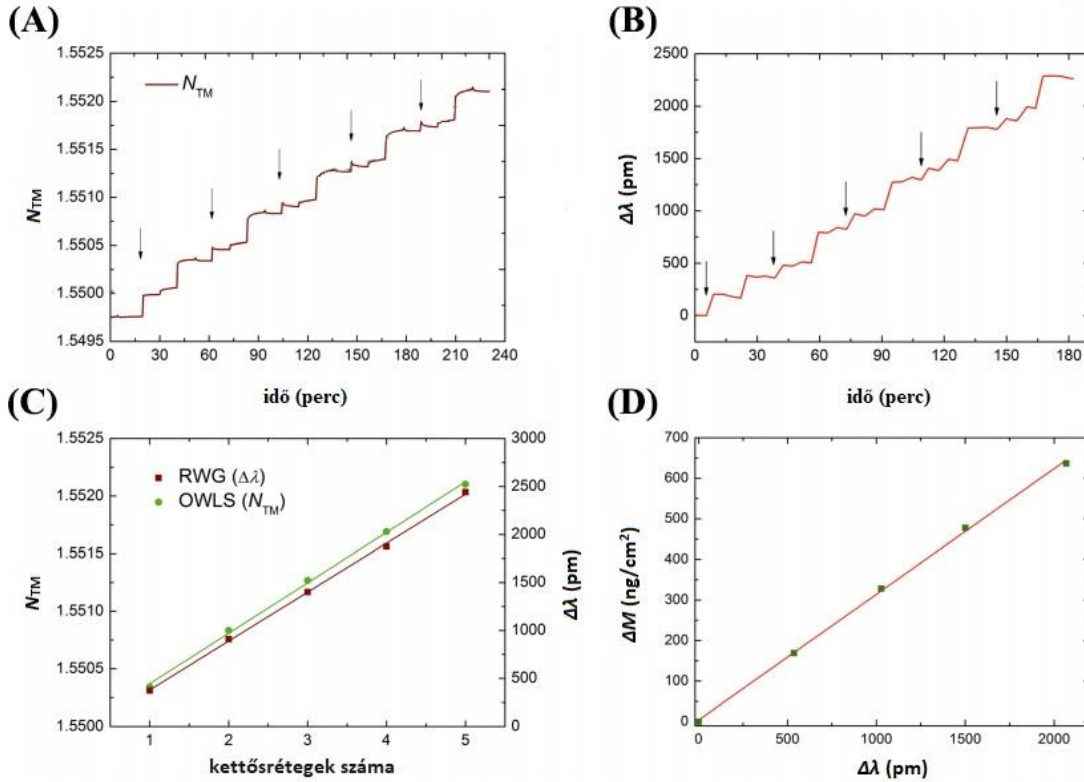
#### **4.4.8. Statisztikai analízis**

A rezonáns hullámhossz-eltolódást minden Epic BT bioszenzorral végzett kísérletben legalább három párhuzamos méréssel határoztam meg és ezen adatokat átlagoltam, majd az átlag  $\pm$  szórás értéket ábrázoltam. Statisztikai elemzéseket végeztem az összes kezelésre vonatkozóan az Epic BT bioszenzoron mért jelekre vagy az adott negatív kontroll értékére normálva. A kapott adatokat a GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) vagy az Origin 8.5 (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA) szoftverekkel értékeltem ki. A koncentrációfüggést szigmoid kalibrációs görbék illesztésével (nemlineáris illesztési módszert alkalmazva) értékeltem ki, amely négy paraméter logisztikus regressziós egyenletén alapul<sup>226</sup>. Az integrinkötés statisztikai szignifikanciáját egytényezős ANOVA-val, statisztikai szignifikancia-meghatározással  $p < 0,05$  értékre adtam meg.

## 5. Eredmények és értékelésük

### 5.1. Epic bioszenzor felületi tömegérzékenységének meghatározása OWLS bioszenzorral párhuzamosan mért polielektrolit-rétegek segítségével

Mielőtt a xenobiotikumok hatásait tanulmányoztam volna, kísérleteim arra irányultak, hogy az Epic BT bioszenzor által mért hullámhossz-eltolódást ( $\Delta\lambda$  (pm)) át tudjam váltani felületre adszorbeált tömegre ( $\text{ng}/\text{cm}^2$ ). Az Epic BT bioszenzor tömegkalibráláshoz két polielektrolit oldatot, a PSS és PAH 10 mM HEPES pufferes oldatát választottam, melyekkel a layer-by-layer technikát alkalmazva lineáris növekedési kinetikát követő polielektrolit multirétegeket építettem fel. A két polielektrolit oldat törésmutató értékeit refraktométerrel mértem. A polielektrolit oldatokra kapott törésmutatók a következő  $dn/dc$  értékeket adták,  $0,177\pm 0,003 \text{ cm}^3/\text{g}$  a PSS és  $0,214\pm 0,003 \text{ cm}^3/\text{g}$  a PAH esetében, szobahőmérsékleten. Ezek az eredmények nagyfokú egyezést mutatnak az irodalomban található fehérjék oldatára vonatkozó értékekkel ( $0,182 \text{ cm}^3/\text{g}$ ).<sup>218,227</sup> Ezután OWLS bioszenzorral nyomon követtem a layer-by-layer (PAH és PSS) rétegek épülésének folyamatát. A pufferes alapvonal felvétele után  $200 \mu\text{l}$  PAH oldatot injektáltam a küvettába. Megvártam a PAH polielektrolit oldat injektálásánál, amíg az OWLS jel eléri a maximumát és stabilizálódik, majd pufferes öblítéssel távolítottam el a nem adszorbeálódott polielektrolitokat a felszínről. Ezt követően  $200 \mu\text{l}$  PSS polielektrolitot injektáltam a küvettába, majd megvártam, amíg az OWLS jel eléri a maximumát, utána elkezdtem mosni a rétegeket. Ezeket a lépéseket megismétltem ötször, így sikerült ötrétegű PAH/PSS polielektrolit multiréteget létrehoznom. Ez a típusú polielektrolit réteg lineáris kinetikát mutat, vagyis azonos tömeg és vastagság adszorbeálódott a felületre, minden egyes lerakodási ciklusban. A PAH-PSS multirétegekre mért effektív törésmutató ( $N_{\text{TM}}$ ) is lépcsőzetesen növekednek (20A ábra).



20. ábra Öt rétegpár (PAH/PSS) polielektrolit multiréteg adszorpciójából származó OWLS (A) és RWG bioszenzor (B) jelek. A nyilak jelzik a PAH oldat beinjektálását a küvettába. (C) A PAH/PSS polielektrolit multirétegek lineárisan nőttek a hozzáadott kettős rétegek számával az OWLS (zöld pontok) és az RWG bioszenzorról mérve (piros pontok) (D) Az OWLS adatokból számított felületi tömegsűrűség korrelál (az adatokat pontként ábrázoltam) az RWG műszerrel mért értékekkel, amelyeket kalibrációs egyenletekből kaptam (vonall) ( $n=2-3$ ).

Ezután megismételtem az előbbi kísérletet Epic BT bioszenzorról, és ugyanúgy öt PAH–PSS polielektrolit multiréteget építettem fel. Mindegyik Epic lemez lyukba 50  $\mu$ l mennyiségű oldatot pipettáztam. Ugyanúgy látható volt PAH/PSS multirétegnél az Epic BT bioszenzorjelenben a lépcsőzetes növekedés (20B ábra). Az OWLS és az Epic BT bioszenzor alkalmazásával kapott válaszok bizonyítják, hogy a bioszenzor jelek lineáris kapcsolatban állnak a lerakódott kettős rétegek számával (a pontok lineáris illesztésével mindkét esetben  $R^2 > 0,998$ ) (20C ábra).

A továbbiakban megbecsültem az Epic BT bioszenzor felületérzékenységét az OWLS adatok alapján. Annak ellenére, hogy az OWLS és az Epic BT bioszenzor eltérő hullámvezető filmekkel ( $\text{Si}_{0.25}\text{Ti}_{0.75}\text{O}_2$ <sup>228</sup> és  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ <sup>191</sup>) rendelkezik, össze tudjuk hasonlítani a körülményeket, mivel az eredeti érzékelőfelületet az első polielektrolit réteg teljesen bevonja, a további rétegek felépülése független a hordozótól<sup>205,214</sup>. Az érzékelő felületek azonos polielektrolit réteggel történő

bevonása miatt a később adszorbeálódott rétegeket is azonosak és függetlennek tekinthetjük az eredeti bioszenzor felületétől, amit a 20C ábra is alátámaszt. Ezért kiszámíthatjuk a felületi tömegsűrűséget a lerakódott polielektrolit rétegekre kapott OWLS adatokból, és a PAH és a PSS törésmutató átlagolt törésmutató növekedési értékéből ( $dn/dc$  (polielektrolit)=0,1955 cm<sup>3</sup>/g) (20D ábra) az (9) egyenlet alapján. A 20D ábrán ábrázoltam a polielektrolit réteg pontjaira kapott felületi tömegsűrűség értékeket (OWLS bioszenzorról mérve, (9) egyenlet alapján számolva) a hullámhossz eltolódásra ( $\Delta\lambda$ ) mért eredmények (Epic BT bioszenzorról mérve) függvényében.

A 20D ábrán szereplő pontokra lineáris illesztéssel egyenest illesztettem. Az így kapott egyenletből határoztam meg a következő kalibrációs egyenletet polielektrolit filmek esetére:

$$\Delta M(\text{polielektrolit}) = 0,31 \frac{ng}{pm * cm^2} \Delta\lambda \quad (10)$$

Ezt az egyenletet *glyphosate* hatóanyagra a következő módon kiszámítottam<sup>12</sup>:

$$\Delta M(\text{glyphosate}) = \frac{dn/dc(\text{polielektrolit})}{dn/dc(\text{glyphosate})} \Delta M(\text{polielektrolit}) \quad (11)$$

ahol  $dn/dc$  *glyphosate* oldatra vonatkozó értéke 0,2051 cm<sup>3</sup>/g (refraktométerrel mérve).

$$\Delta M(\text{glyphosate}) = \frac{0,1955}{0,2051} 0,31 \frac{ng}{pm * cm^2} \Delta\lambda$$

A *glyphosate* adszorbeált tömeg kiszámítható az Epic BT bioszenzor adatokból a következő módosított kalibrációs egyenlet (12) segítségével:

$$\Delta M(\text{glyphosate}) = 0,296 \frac{ng}{pm * cm^2} \Delta\lambda \quad (12)$$

ahol  $\Delta M$  a felszínen adszorbeált *glyphosate* tömegét (ng/cm<sup>2</sup>) jelenti, és a  $\Delta\lambda$  a mért hullámhossz-eltolódást (pm-ben). Ezt a módosított kalibrációs egyenletet használtam a későbbi számolásaim során.

## 5.2. Xenobiotikumok hatása letapadt sejtekre

Ebben a fejezetben ismertetem az új citotoxicitási módszer fejlesztése során kapott eredményeimet. A Roundup Classic növényvédő szer és komponenseinek (hatóanyaga: *glyphosate* és formázó anyaga: POEA) élettani hatását vizsgáltam Epic BT bioszenzor lemezre kitapasztott MC3T3-E1 sejteken szérumos és szérummentes tápközegekben. Az Epic BT bioszenzoros mérésekre kapott értékeket hagyományos jelöléses technikákkal (fluoreszcens mikroszkópia és

citofluorimetriával), illetve digitális holografikus mikroszkópia eredményeivel is összehasonlítottam.

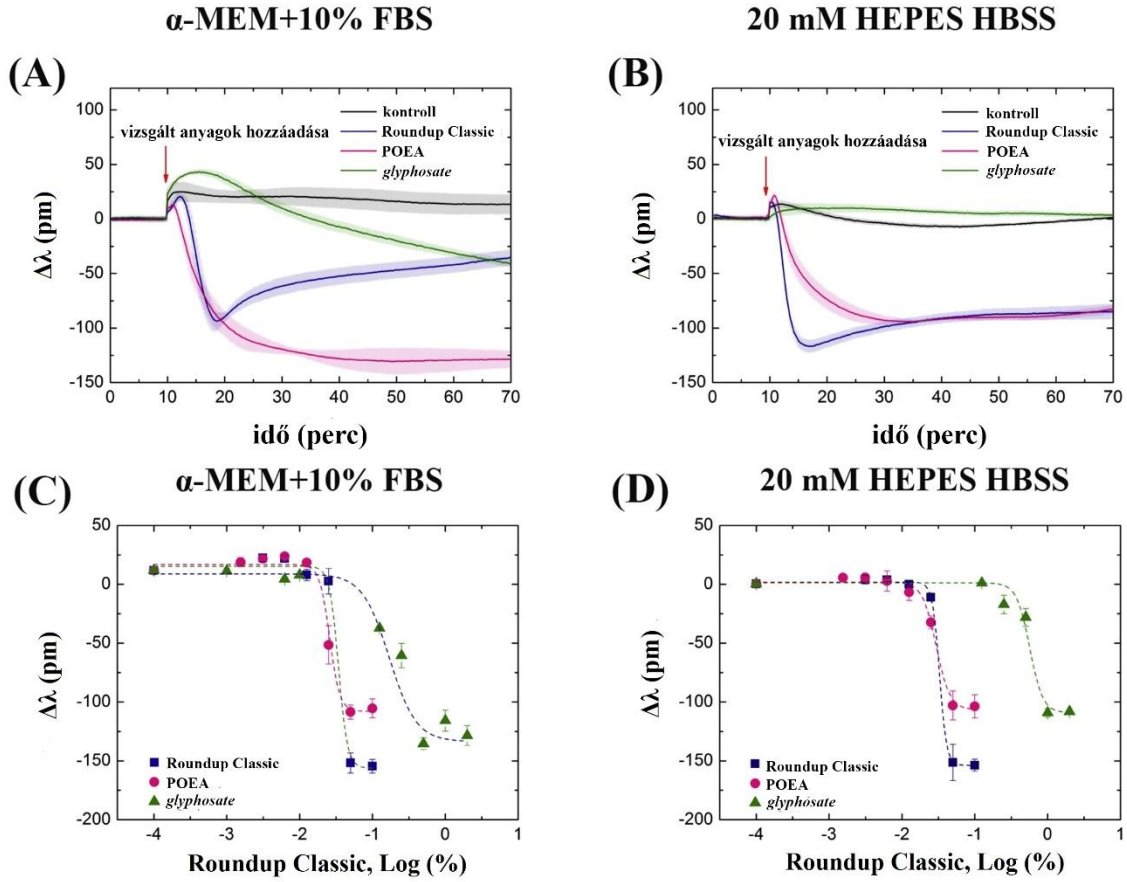
### **5.2.1. Jelölésmentes optikai bioszenzor alkalmazása xenobiotikumok letapadt sejtekre gyakorolt hatásának meghatározásához**

A növényvédő szerek toxikus hatásai passzív sejthalálhoz vagy aktív lezajlású apoptózishoz vezethetnek. Bár a citotoxikus hatásokat hatékonyan ki lehet mutatni biokémiai módszerekkel, ezek az eljárások azonban időigényesek lehetnek, gyakran jelölő anyag használata szükséges a mérésekhez és alkalmazásuk korlátozott szérumos tápközegben. Emellett a sejtek állapotváltozását (pl.: sejthalált, proliferációt) csak jóval bekövetkezése utáni időpontokban detektálja. A bioszenzor technika alkalmasnak bizonyult arra, hogy valós időben, a hagyományos technika hátrányait kiküszöbölve különböző növényvédő szerek hatásaira adott sejtválaszokat detektálja<sup>229</sup>. Ezért elkezdtem vizsgálni a mezőgazdaságban világszerte elterjedten használt Roundup Classic növényvédő szernek és összetevőinek (*glyphosate* és POEA) élettani hatását MC3T3-E1 sejtvonalon Epic BT bioszenzorral. Kísérleteimet szérummentes és szérumot tartalmazó tápközegben is elvégeztem, mivel a szérumot tartalmazó tápközeg összetevői (pl.: kiegészített sejt kultúrás médium, amely tartalmaz hozzáadott faktorokat, lipideket, sókat és fehérjéket) kölcsön tudnak hatni a reagensekkel.

A sejteket egy éjszakán át inkubátorban hagytam letapadni a szenzorfelületre, utána az alapvonalat felvettem Epic BT bioszenzorral a megfelelő tápközegben, majd a reagenseket különböző koncentrációban adtam a sejtekhez. A vizsgálatokban a Roundup Classic készítményt a mezőgazdasági használatban alkalmazott koncentrációin (1-2%) és annak hígításain (akár több nagyságrenddel alacsonyabb koncentrációkon) teszteltem. A *glyphosate* és POEA komponenseket is a megfelelő Roundup Classic-oldatban mérhető koncentrációin vizsgáltam, és ezek értékeit mindig Roundup Classic-oldattal egyenértékű koncentrációban adtam meg az összehasonlíthatóság érdekében.

Bioszenzorral egy órán keresztül figyeltem meg a reagensek hatását a letapadt sejtekre. Ez alatt az idő alatt, 0,1% Roundup Classic és 0,016% POEA (egyenértékű 0,1% Roundup Classic növényvédő szerrel) reagensek jelentős DMR jelcsökkenést idéztek elő a preoszteoblaszt sejtek kinetikájában mind szérumot tartalmazó, mind szérummentes tápközegben (21. ábra) a kezeletlen

kontroll sejtekhez képest. (A kontroll méréseknél az adott hatóanyag hozzáadásánál az adott tápközeget pipettáztam a sejtekhez.)



21. ábra MC3T3-E1 sejtek Epic BT bioszenzor által detektált válasza hatóanyag (0,1% Roundup Classic, 0,016% POEA és 0,042% *glyphosate* (egyenértékű 0,1%-os Roundup oldattal)) kezelésre és kontroll (adott tápközeget) hozzáadása esetén  $\alpha$ -MEM + 10% FBS (A) vagy 20 mM HEPES-HBSS puffer (B) közegben. A kapott koncentráció-hatás görbék az MC3T3-E1 sejteknél  $\alpha$ -MEM + 10% FBS (C) vagy 20 mM HEPES-HBSS puffer (D) közegben (n=3 (ahol n az ismételt (párhuzamos) mérések számát jelöli)).

Ez a jelcsökkenés a kezelést követően 10 perc alatt -150 pm értéknél éri el a jel minimumát. A jelentős jelcsökkenést a sejtsugorodás, az adhéziós erő meggyengülése és a szenzorfelületről történő sejtleválás is okozhatja<sup>188</sup>. A 150 pm változás a bioszenzor jelben 0,0013 egységnyi törésmutató-változásnak (RIU) felel meg<sup>230</sup>. A 0,1% Roundup Classic reagens hozzáadásánál, miután a szenzorjel eléri negatív maximumát, kis emelkedés látható a mért jelben. Ezt a jelenséget csak magas Roundup Classic koncentrációnál figyeltem meg, amelyet valószínűleg a sejtlízis

okozott. Az 21C ábrán látható, hogy a bioszenzor válasz a Roundup Classic készítménynél és a POEA formázó anyagnál egyenértékű koncentrációkban hasonló tendenciájú. Valószínűsíthető, hogy a két anyag a szenzor felületre letapasztott sejteken sejthalált, lízist és/vagy sejtleválását idézi elő. A szenzorjel nagysága koncentrációfüggő, vagyis minél magasabb koncentrációjú Roundup Classic vagy POEA oldatot alkalmaztam, annál nagyobb negatív értékű bioszenzor jelet kaptam. Ugyanakkor a letapadt sejtek 0,042%-os *glyphosate* (0,1%-os Roundup Classic készítménynek megfelelő) oldattal való kezelése (21A ábra) a bioszenzor jelben időben eltoltt választ vált ki. Ez a hatás ennél a *glyphosate* koncentrációnál csak szérumot tartalmazó tápközegben volt megfigyelhető, amelyet valószínűleg a citoszkeleton reakciója (sejtsugorodás, amit a citoszkeleton összeesése és a citoszkeletonális fehérjék lebomlása) okozott. Ugyanis 0,042% *glyphosate* koncentráció a letapadt sejteken szérummentes tápközegben nem okozott csökkenést a bioszenzor jelben (21B ábra). Minél magasabb *glyphosate* koncentrációt alkalmaztam, annál nagyobb szenzorjel csökkenést kaptam. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a Roundup Classic toxikus hatását valószínűleg a POEA okozza. A 21. ábra mutatja a MC3T3-E1 sejtek koncentrációfüggő válaszát Roundup Classic készítményre, *glyphosate* hatóanyagra és POEA formázó anyagra a szérummentes és szérumot tartalmazó oldatokban.

Összefoglaltam az 6. táblázatban az  $IC_{50}$  (fél maximális gátló koncentráció) értékeket, amelyeket Roundup Classic készítményre, POEA formázó anyagra és *glyphosate* hatóanyagra kaptam.

vizsgált anyagok	$\alpha$ -MEM + 10% FBS			20 mM HEPES-HBSS		
	koncentrációk		egyenértékű a hígított Roundup Classic oldattal (%)	koncentrációk		egyenértékű a hígított Roundup Classic oldattal (%)
	(%)	(mM)		(%)	(mM)	
<b>Roundup Classic</b>	0,024 ± 0,011	0,04 ± 0,02 (POEA); 0,44 ± 0,20 ( <i>glyphosate</i> )	0,024 ± 0,011	0,028 ± 0,012	0,05 ± 0,02 (POEA); 0,51 ± 0,22 ( <i>glyphosate</i> )	0,028 ± 0,012
<b>POEA</b>	0,003 ± 0,001	0,03 ± 0,01	0,021 ± 0,004	0,003 ± 0,002	0,03 ± 0,02	0,019 ± 0,010
<b><i>glyphosate</i></b>	0,068 ± 0,004	2,98 ± 0,18	0,163 ± 0,010	0,223 ± 0,022	9,77 ± 0,96	0,538 ± 0,052

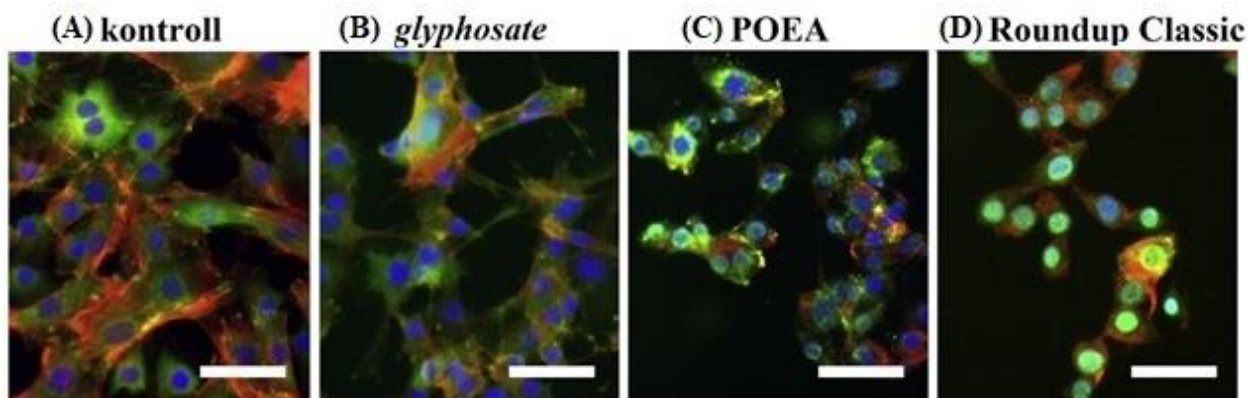
6. táblázat  $IC_{50}$  értékek a vizsgált anyagok 1 órás expozíciója után. A táblázatban szereplő átlag és szórás értékek tüntettem fel (n=3).



Az  $IC_{50}$  értékeket három mérés átlagára kapott bioszenzor jelekből számítottam ki. A három mérés azonos koncentrációira kapott szenzorjel válaszait átlagoltam, és az így kapott görbe logaritmusát vettem. Ezeknek a görbéknek az inflexiós pontjai adták meg az  $IC_{50}$  értékeket. A szérumot tartalmazó és szérummentes tápközegben nincs jelentős különbség a Roundup Classic és a POEA  $IC_{50}$  értékeiben. Ezzel ellentétben a *glyphosate*  $IC_{50}$  értéke szérumot tartalmazó tápközegben 0,068 % ( $\alpha$ -MEM+10% FBS), ami harmad érték, mint a szérummentes tápközegben kapott érték (0,223%). A várakozás az volna, hogy a szérumtartalmú tápközegben kisebb toxikus hatást vált ki a *glyphosate*, mint a szérummentes körülmények között, mivel a szérumot tartalmazó tápközegben nagy mennyiségben vannak jelen fehérjék, amelyek csökkenthetik a toxicitást<sup>231</sup>. Ezzel ellentétben a *glyphosate* toxikus hatása erősebb a szérumot tartalmazó tápközegben. Kizártam, hogy a pH változás okozza ezt a különbséget a szérum tartalmú tápközegben, mivel a közeg 1 órás mérés alatt ellenőrzött pH értéke nem változott<sup>184</sup>. Az általam kapott  $IC_{50}$  értékek a mezőgazdaságban használt 1-2%-os értéknél 50-100-szor kisebb értékek.

### 5.2.2. Xenobiotikumok hatásának vizsgálata fluoreszcens mikroszkópia alkalmazásával

A hagyományos technikák közül fluoreszcens mikroszkópiával is teszteltem az Epic BT bioszenzor alkalmazhatóságát. Az előbb bemutatott (5.2.1. fejezet) Epic mérés végén, közvetlenül a szenzor lemezre fixáltam a sejteket és megfestettem őket, hogy szemléltessem a morfológiai változásokat (22 ábra).

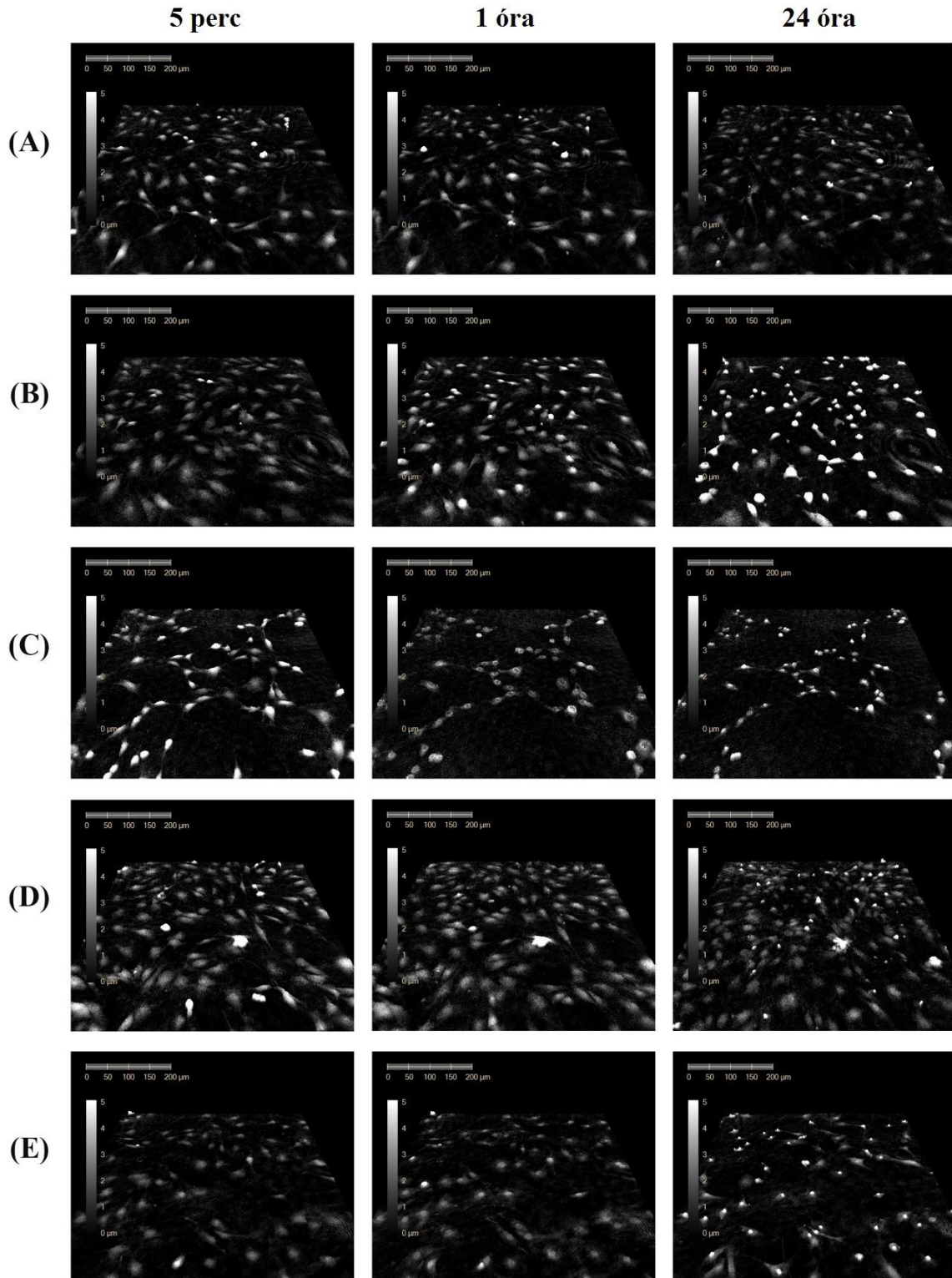


22. ábra Citoszkeletonról és a fokális adhíziós komplexekről készült fluoreszcens képek. (A) kezeletlen sejtek (kontroll), (B) 0,42% *glyphosate*, (C) 0,02% POEA és (D) 0,1% Roundup Classic. Kék szín: sejtmag; piros szín: F-aktin; zöld szín: vinkulin. Skála: 50  $\mu$ m.

Összehasonlítva a kontroll sejtekkel (22A ábra) a *glyphosate* hatóanyaggal kezelt sejtek alakja megnyúlt (22B ábra), és a kezelés csökkenést okozott az F-aktin eloszlásában. Ez arra utal, hogy a *glyphosate* befolyásolja a sejtadhéziót és a citoszkeleton morfológiáját. A *glyphosate* a foszfortartalmú ligandumok közé tartozik, amelyekről ismert, hogy erős affinitásuk van kétértékű fémionokhoz (pl.:  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{Mg}^{2+}$ )<sup>232</sup>. Nagy *glyphosate* koncentráció alkalmazása elősegíti a *glyphosate* kationokkal ( $\text{Ca}^{2+}$ ) való kelátkomplex képződését, amely hatással van a sejtadhézióra, citoszkeleton elhelyezkedésére és morfológiájára<sup>233,234</sup>. 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 cinket<sup>235</sup>. Mindazonáltal, a *glyphosate* relatíve gyenge  $\text{Ca}^{2+}$ - és  $\text{Mg}^{2+}$ -kationkelátor (harmad akkora hatékonyságú) az EDTA vegyülethez képest<sup>236</sup>. Ezáltal a magas *glyphosate*-koncentráció is csak kis affinitással tud  $\text{Ca}^{2+}$ - és  $\text{Mg}^{2+}$ -kationt kötni, így csak részlegesen tud sejtleválást és sejtmorfológiai változásokat előidézni. Ezzel ellentétben, a POEA (22C ábra) sejtplazmamembrán-permeabilizációt, a citoszkeleton összeomlását és nekrozist<sup>237</sup> okoz, illetve erősebb hatást vált ki, mint a Roundup Classic vagy a *glyphosate*. Hasonlóan a POEA formázó anyaghoz, a Roundup Classic is morfológiai változásokat okoz a sejtekben (22D ábra). Ez a hasonlóság megmutatja, hogy a POEA hatása dominál a Roundup Classic készítményben. Az Epic BT bioszenzoros mérés után tehát fluoreszcens mikroszkópiával készített képek is igazolták a bioszenzor segítségével kapott eredményeket.

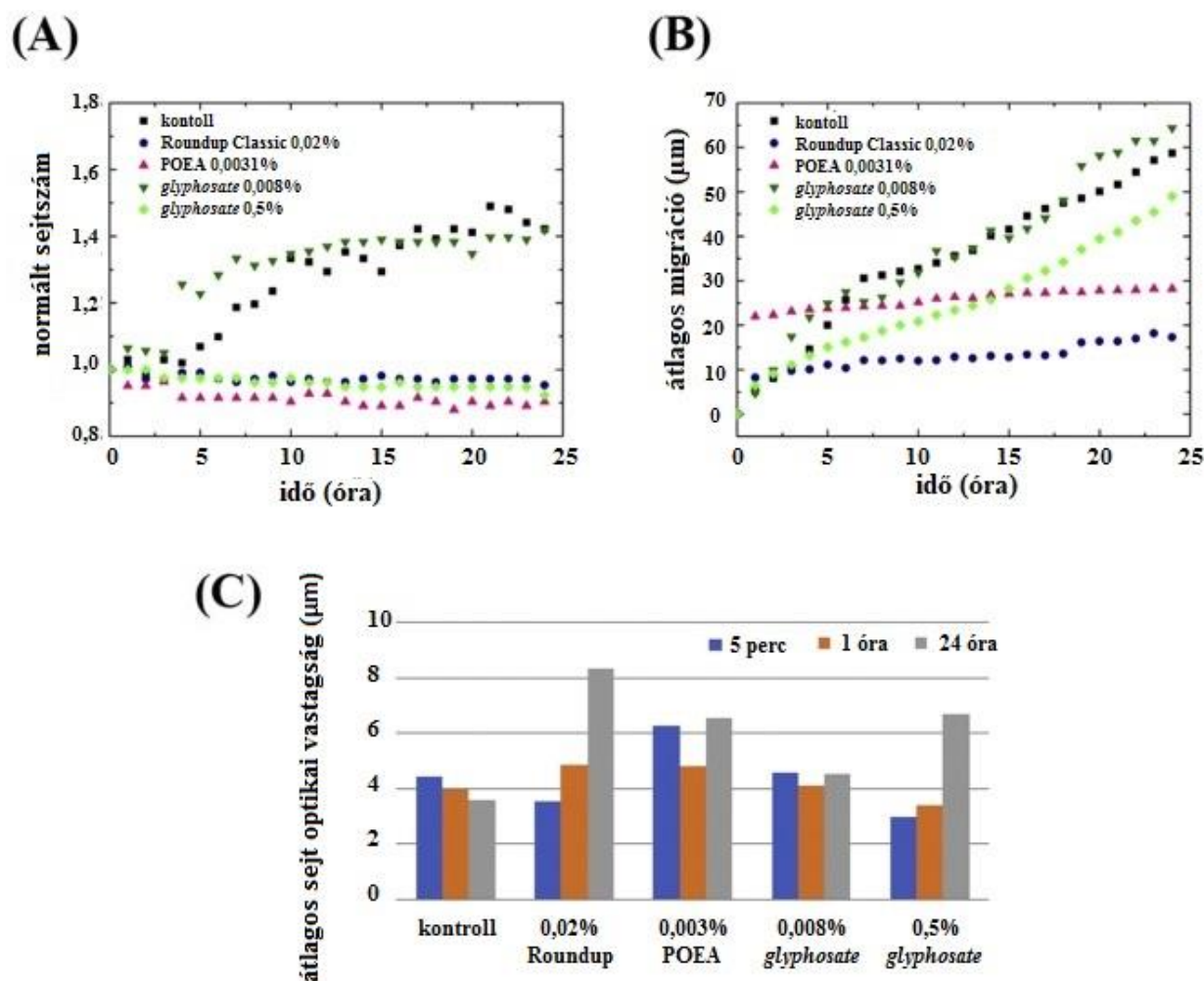
### 5.2.3. Sejtmorfológia tanulmányozása digitális holografikus mikroszkópiával

A HoloMonitor műszerrel végzett vizuális elvű sejttoxicitást meghatározó módszert már közöltek a szakirodalomban<sup>119,222</sup>. Ezen korábbi munkák jó támpontot adtak az Epic BT bioszenzoros eredményeim alátámasztásának céljából végzett HoloMonitoros kísérleteimhez. HoloMonitorral készített képekből kiválasztottam a kezelést követő 5 percben, 1 óra és 24 óra eltelte után készült képeket (23. ábra) és segítségével összehasonlítottam a vizsgált anyagok sejtek morfológiájára gyakorolt hatását.



23. ábra Holografikus mikroszkópiával készített képek a sejt morfológiai változásról az idő függvényében. (A) kezeletlen sejtek, (B) 0,02% Roundup Classic, (C) 0,003% POEA, (D) 0,008% *glyphosate* és (E) 0,5% *glyphosate*.

A felvételeken látható, hogy a kezeltlen kontroll sejtek laposak, megnyúlt alakúak (23. ábra). A képek analíziséből kapott adatokból az olvasható ki, hogy a kontroll sejtek folyamatosan szaporodnak (24A ábra), fenntartva a migrációs dinamikát (24B ábra) és a sejtpopuláció optikai vastagságának átlagát (24C ábra).



24. ábra Holografikus mikroszkóppal készített képek analízise. (A) MC3T3-E1 sejtek osztódásának, (B) migrációs dinamikájának és (C) optikai vastagságának változásai és xenobiotikumok hatására.

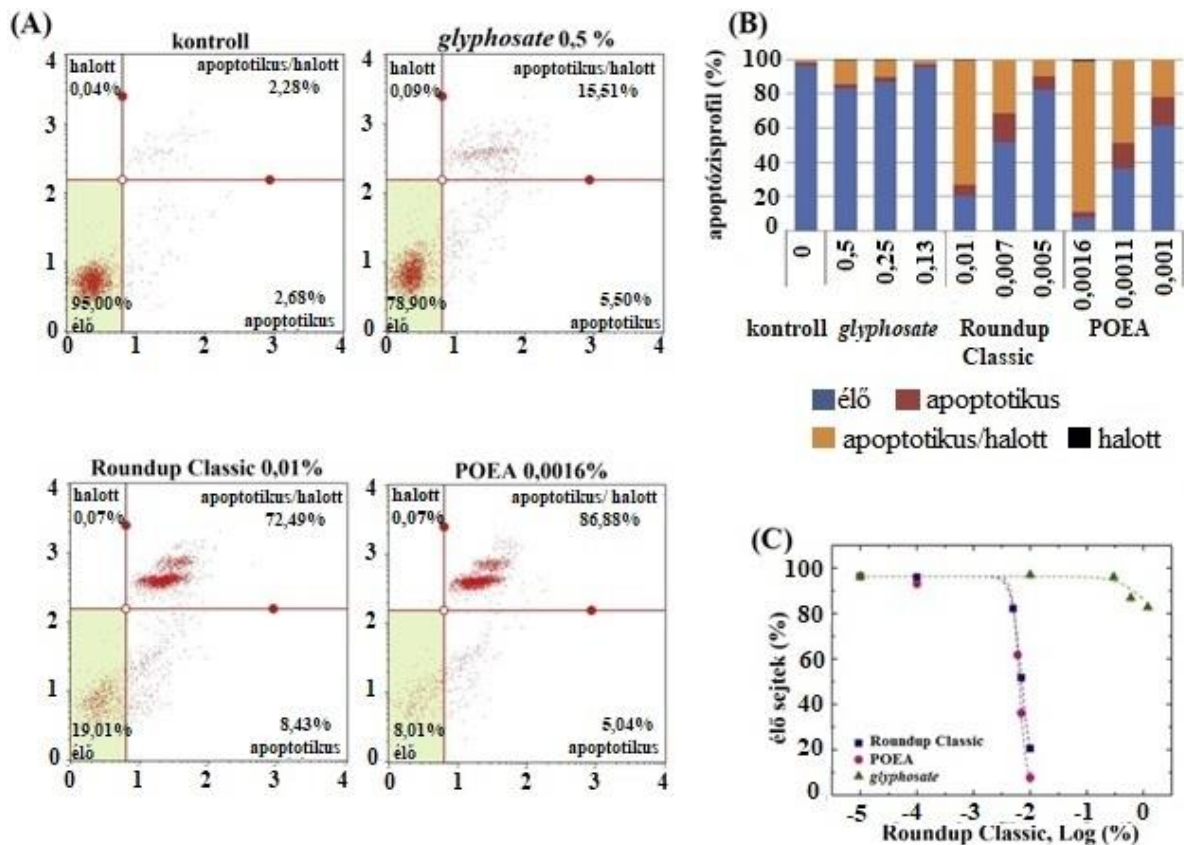
0,02%-os Roundup Classic készítménnyel történő kezelés során a sejtek osztódása leáll (24A ábra), majd a sejtek gömbszerű alakot vesznek fel (23B ábra). A sejtmorfológiai adatok elemzése során a 0,02%-os Roundup Classic készítménnyel történő kezelésnél a sejtpopuláció átlagos optikai vastagsága jelentősen nő 1 órás inkubáció után, amely apoptózis folyamatra utal (24C

ábra). 24 órás kezelés után ez az érték a kétszeresére nő, összehasonlítva a kiindulási állapottal. A POEA-val való kezelés (0,003%, egyenértékű 0,02% Roundup Classic oldattal) jelentős sejterület csökkenést okoz már 5 perc elteltével (23C ábra), és sejtnekrózis látható 1 órás inkubáció után. 0,008% *glyphosate* (0,02% Roundup Classic oldattal egyenértékű) hatóanyaggal a kezelés nem mutatott jelentős változást a sejtmorfológiában (23D és 24. ábra). Ezzel szemben 0,5% *glyphosate* lecsökkenti a sejt mozgékonyt, megnöveli a sejt magasságát (23 és 24E ábra), a sejtosztódást gátolja (24A ábra), azonban a sejtek még tartják a migrációs dinamikát (24B ábra). Vagyis 0,5% *glyphosate* kezelés hatására citosztikus változások következhetnek be a sejtekben. A HoloMonitorral készített képek is alátámasztják az Epic BT bioszenzorral mért eredményeket.

#### **5.2.4. Életképesség-vizsgálat kaszpáz-3/7-teszttel**

Az Epic BT bioszenzor alkalmazhatóságát a Muse kaszpáz-3/7 sejtleletképesség-teszttel is bizonyítottam. Ezzel a teszttel ki tudom mutatni az élő, korai és késői apoptotikus, illetve halott sejtek arányát. A Petri-csészéről felszedett kezelt sejtekhez a kaszpáz-3/7-készlet reagenseit adtam a protokoll szerint, majd az így kapott oldatokat Muse Cell Analyzer műszerrel mértem. A mérés beállításait és az apoptózis profilokat ábrázoltam a 25. ábrán mindegyik reagensre vonatkozóan.





25. ábra Xenobiotikumok hatása proeszteoblaszt sejtekre Muse Cell Analyzer citométerrel mérve. (A) Muse mérés beállításai, (B) kaszpáz-3/7 apoptózisprofil és (C) koncentráció-hatás-görbék.

A mérés során kapott eredmények azt mutatták, hogy az apoptotikus sejtek aránya magasabb a POEA formázó anyaggal és a Roundup Classic készítménnyel, mint a *glyphosate* hatóanyaggal kezelt sejteknél (ezek a koncentrációk egyenértékűek egymással) (25 A és B ábra). Ezek az eredmények jól korrelálnak az előző eredményekkel, melyek azt mutatják, hogy a *glyphosate* hatóanyaggal kezelt sejtek megtartják az életképességüket. A mérésekből látható, hogy a POEA már sokkal alacsonyabb koncentrációban sejtihalált idéz elő, mint a Roundup Classic. Számított  $IC_{50}$  értéke (24 órás kitétség esetén) Roundup Classic oldalra: 0,007% és a POEA formázó anyagra: 0,006% (Roundup Classic oldattal egyenértékű POEA oldat aktuális koncentrációjának értéke 0,001% vagy 0,011 mM, 25C ábra). Megjegyzendő, hogy a kaszpáz-3/7-aktivitást nem lehet meghatározni 0,01% Roundup Classic és POEA koncentráció felett, mivel eléri a halott sejtek aránya a maximális értéket. Ezzel ellentétben a *glyphosate*, amely egyenértékű 1,2% hígított Roundup Classic készítménnyel (amely 0,5%-os vagy átszámolva 21,9 mM aktuális *glyphosate*

koncentrációval egyenlő) csak 17%-os csökkenést okoz a kaszpáz-3/7-aktivitásban. A Muse Cell Analyzer által mért adatok is jó egyezést mutatnak az Epic BT bioszenzorral mért eredményekkel.

### **5.3. *Glyphosate* hatása MC3T3-E1 sejtek adhéziójára**

A növényvédő szerek mérgező hatásai passzív (nekrózis) vagy aktív (apoptózis) sejthalálhoz vezethetnek. Egy adott xenobiotikum által kiváltott sejtkárosító folyamatok könnyen érzékelhetőek az Epic BT bioszenzor technikával, melynek hatékonyságát fáziskontraszt, fluoreszcens és holografikus mikroszkopiával, illetve citofluorimetriával is igazoltam. Korábbi vizsgálataimból kiderült, hogy a *glyphosate* hozzáadása során 0,4% -os és ennél magasabb *glyphosate*-koncentrációk a MC3T3-E1 sejtek teljes leválását eredményezik az érzékelő felületről, míg az alacsonyabb koncentrációk a sejtek alakját változtatják meg. Ezek a változások hatást gyakorolnak a sejtletapadásra és sejtes kölcsönhatásokra a sejtadhéziós fehérjéken keresztül. Ezért ebben a fejezetben tovább fogom tanulmányozni a *glyphosate* sejtadhézióra gyakorolt hatásait. A sejtek adhézióját elsősorban különböző koncentrációjú *glyphosate* hatóanyaggal bevont felületeken vizsgálom.

A szakirodalomban még nem található adat arról, hogy a *glyphosate* integrin receptor ligandumként viselkedne. Ennek megerősítésére sejtadhézió gátlási vizsgálatot végeztem Epic BT bioszenzorral oly módon, hogy különböző *glyphosate*-koncentrációkkal összekevert sejtek adhézióját vizsgáltam meg RGD-motívumot tartalmazó polimerrel (amely jól ismert a sejtek kitapadásának elősegítésére) bevont felületeken.

#### **5.3.1. MC3T3-E1 sejtek RGD-sűrűség hangolásától függő adhéziója. Az integrin–RGD kötés disszociációs állandójának meghatározása**

A sejtek sejt felszíni receptoraikon keresztül tapadnak ki az adhéziós ligandumokat tartalmazó felületekre. A folyamat szempontjából fontos mennyiség a receptor–ligandum kötés erősségére jellemző disszociációs állandó ( $K_d$ ). Jelen esetben az MC3T3-E1 sejtek RGD-motívumot tartalmazó felületekre történő kitapadását vizsgáltam, melyhez tartozó eredményeket és számolásokat a *glyphosate* és integrinek közötti kölcsönhatások számításában fel fogok használni.

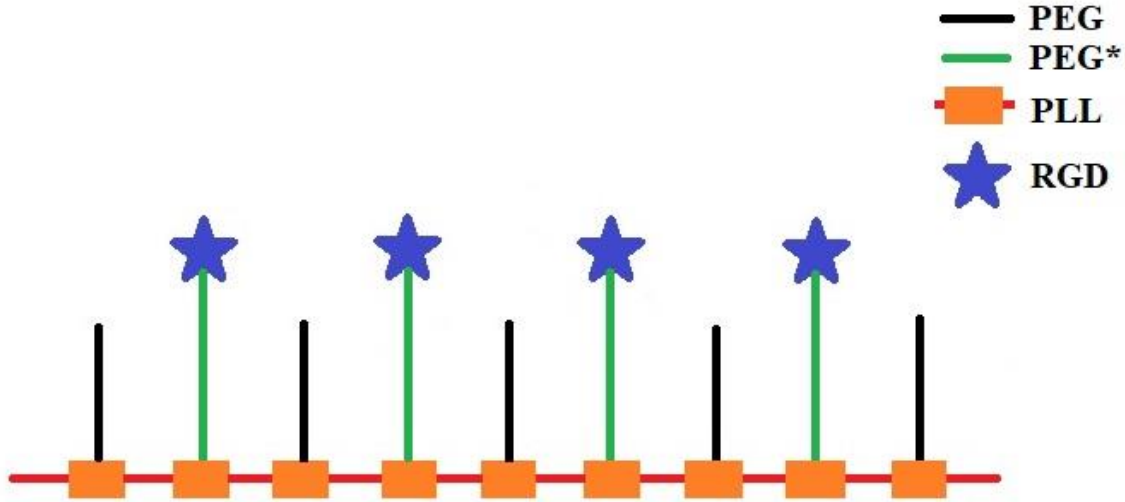
A 7. táblázat összefoglalja a RGD-hangoláshoz használt kopolimer keverék adatait, megbecsülve az RGD-ligandumok moláris felületi sűrűségét, ligandum–ligandum-távolságát és a ligandumok területegységre vonatkozó számát minden egyes készítményben. A 7. táblázatban szereplő értékeket ebben a fejezetben ismertetett egyenletekből számítottam a megfelelő polimer oldatbeli térfogatszázalékához.

Q (%)	$\rho_{\text{RGD}}$ (pmol cm <sup>-2</sup> )	$d_{\text{RGD-RGD}}$ (nm)	$v_{\text{RGD}}$ (μm <sup>-2</sup> )
0	0	∞	0
0,125	0,0086	150	52
0,25	0,0171	106	103
0,5	0,0343	75	206
1	0,0685	53	413
2	0,1371	37	825
4	0,2742	26	1651
10	0,6854	17	4127
25	1,7135	11	10319
50	3,4270	8	20637
100	6,8539	5	41274

7. táblázat Az első oszlop jelöli az 1 mg/ml PPR térfogatszázalékát a kevert kopolimeroldatokban (Q). A következő oszlopokban az adszorpciós rétegben az RGD-motívumok felületi sűrűsége ( $\rho_{\text{RGD}}$ ), ligandum–ligandum távolsága ( $d_{\text{RGD-RGD}}$ ), valamint a ligandumok területegységre vonatkoztatott száma ( $v_{\text{RGD}}$ ) szerepelnek.

Az RGD-részek arányát a felületen a PP-oldathoz hozzákevert PPR adja (7. táblázat). A PP:PPR kopolimeroldat több molekulából áll össze (26. ábra), amelyet a PLL polimerlánc ( $MW$ : 20 kDa), a nem funkcionális PEG oldallánc ( $MW$ : 2,3 kDa), a kissé nagyobb lánchosszúságú funkcionális PEG\* oldallánc ( $MW$ : 3,4 kDa) és RGD-motívumot ( $MW$ : 1,035 kDa) tartalmazó peptidek alkotnak<sup>238</sup>.





26. ábra A PP:PPR kopolimer sematikus ábrázolása, amely PLL polimerláncból, nem funkcionális PEG oldalláncból, a kissé nagyobb lánc hosszúságú funkcionális PEG\* oldalláncból és RGD-motívumból tevődik össze.

Ezen adatok alapján számoltam ki a kopolimer molekulatömegét ( $MW_{PP:PPR}$ ) a következő egyenlettel<sup>239</sup>:

$$MW_{PP:PPR} = MW_{PLL} + \frac{MW_{PLL}}{MW_{Lys}} \frac{1}{g} [(1 - P(\%))(MW_{PEG} + P(\%) * MW_{PPR})] \quad (13)$$

ahol,  $P = 12\%$  a funkcionális PEG láncok frakciója. Ez alapján a kopolimer molekula tömege 88,4 kDa-nak adódott. Az RGD-motívumok moláris felületi sűrűségét ( $\rho_{RGD}$ ) a következő képlettel számítottam<sup>10,240</sup>:

$$\rho_{RGD} = \frac{\Gamma}{MW_{PP:PPR}} \frac{Q}{100} \frac{N_{Lys}}{g} P \quad (14)$$

ahol  $\Gamma$  a  $Nb_2O_5$  bioszenzor felületére adszorbeált kopolimer felületi tömegsűrűsége (184 ng/cm<sup>2</sup>)<sup>238</sup>,  $Q$  (%) a PPR-csoportok térfogataránya a PP:PPR kopolimer vegyes oldatában,  $N_{Lys} = 96$  a lizin monomerek átlagos száma PLL lánconként, és  $g = 3,5$  kapcsolási arány (lizin egységek száma PEG-lánconként). A (14) egyenletben szereplő  $\Gamma$  a kopolimer keverék  $\Gamma_{PP}$  és  $\Gamma_{PPR}$  oldatok felületi tömegsűrűségéből tevődik össze, így  $\Gamma$  és  $Q$  szorzata adja meg, hogy milyen tömegarányban vannak RGD-funkcionális kopolimer az egész polimerben egységnyi méretű felületen. A  $\frac{P}{100} \frac{N_{Lys}}{g}$  tag a (14) egyenletben azon lizin egységek számát jelöli, amelyek RGD-funkcionális

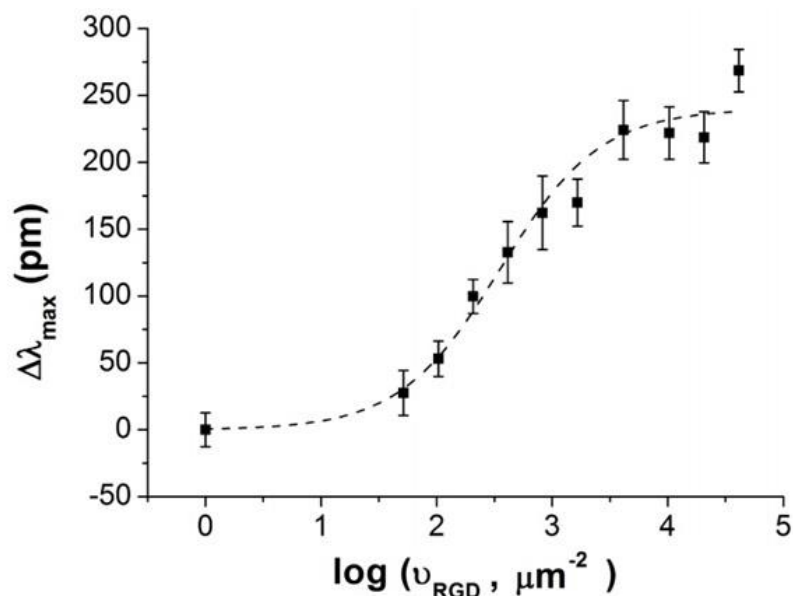
PP láncokat tartalmaznak. A becsült ligandum–ligandum távolságot  $d_{RGD-RGD}$  jelöli, feltételezve a ligandumok hatszögletű felszíni eloszlását sima felületen (15) képletből számolható<sup>240</sup>:

$$d_{RGD-RGD} = \sqrt{\frac{2}{\sqrt{3}} \frac{1}{\rho_{RGD} \cdot N_A}} \quad (15)$$

ahol az  $N_A = 6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$  az Avogadro-számot jelenti. A ligandumok egységnyi területre vonatkozó számát ( $v_{RGD}$ ) a ligandum felületi sűrűségéből ( $\rho_{RGD}$ ) számítottam ki, melyet megszoroztam az Avogadro-számmal.

A mért adatokból megállapítható, hogy az MC3T3-E1 sejtek kitapadása arányosan nőtt az RGD-motívum felületi sűrűségével ( $\rho_{RGD}$ ). Ugyanakkor a nem-adhezív PP felületre kismértékben ki tudnak tapadni a sejtek. A feltételezhetően fehérjetaszító PP felületen aspecifikus kitapadásról számoltak be többféle sejttypusnál (beleértve az preoszteoblaszt sejteket)<sup>240</sup>, ugyanis a PEG láncok kisebb hibái miatt a PP nem tudja lefedni a teljes felületet. Annak érdekében, hogy csak az integrin-specifikus kötéseket vegyem figyelembe a sejtadhéziós számolásoknál, levontam a bioszenzor válaszokból a PP kontrollra kapott nem-specifikus jelet.

Az integrin–RGD kötés kétdimenziós disszociációs állandóját ( ${}^{2D}K_d$ ) úgy kaptam meg, hogy ábrázoltam a bioszenzor jel telítettséget elérő pontjait ( $\Delta\lambda_{max}$ ) az egységnyi területre jutó ligandumok átlagos számának ( $v_{RGD}$ ) függvényében. Ezen pontokra logisztikus egyenlet illesztésével megkaptam a  ${}^{2D}K_d$ -t (PPR), melynek értéke  $359,6 \pm 62,1 \mu\text{m}^{-2}$  lett ( $R^2=0,972$ ) (27. ábra). A  ${}^{2D}K_d$  érték számításánál feltételeztem, hogy egy adott integrin–ligandum kötődésnél egyetlen integrinkötőhelyre köt be a ligandum, akárcsak egy ekvimoláris folyamatnál, és nem áll fenn kooperativitás a ligandumkötéssel szemben<sup>10,241</sup>.



27. ábra A bioszenzorjel válaszáinak ligandumkoncentráció-függése. Minden adatpont egy kísérletből származik. A mérések átlagát és szórását ábrázoltam (n=3).

A  ${}^{2D}K_d$  segítségével meghatározható az egységnyi felülethez kötött ligandumok száma. Ez a mennyiség könnyen átalakítható oldatokra vonatkozó háromdimenziós disszociációs állandóvá ( ${}^{3D}K_d$ )<sup>242</sup>:

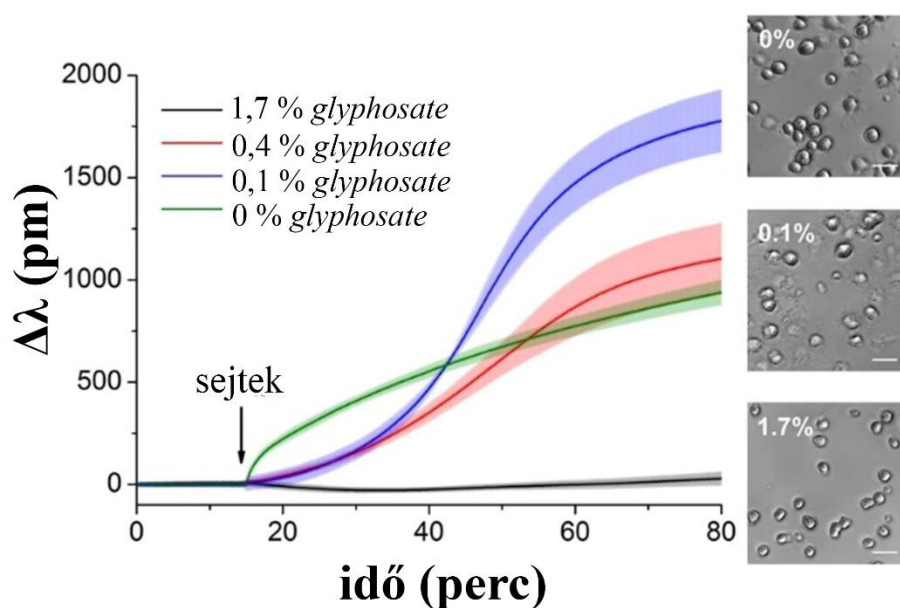
$${}^{3D}K_d = \frac{{}^{2D}K_d}{h} \quad (16)$$

A (16) egyenletben  $h$  a szeparációs távolságot (jelen esetben a sejt-szubsztrát kontaktus távolságot) jelöli<sup>243</sup>, amely erre a rendszerre vonatkoztatva 100 nm<sup>10</sup>. A  ${}^{3D}K_d$  (PPR) becült értékére 5,97 μM-t határoztam meg, melyet a teljes MC3T3-E1 sejtekben lévő RGD-specifikus integrinek RGD-motívumokhoz kapcsolódó affinitására utal. Az előbbi értékből megállapítható, hogy az MC3T3-E1 sejtekben lévő RGD-specifikus integrinek az RGD-motívumokra nézve 5-ször nagyobb affinitással rendelkeznek, mint a HeLa sejtekben lévők<sup>10</sup>. Megállapításom szerint ez a különbség összefüggésben van a két sejtípus által kifejezett integrintípusokkal, ugyanis az integrintípusok sokkal változatosabbak az preoszteoblaszt-populációban<sup>244–246</sup>.

### 5.3.2. A sejtadhézió vizsgálata *glyphosate* tartalmú felületeken

Megvizsgáltam a *glyphosate* MC3T3-E1 sejtek adhéziójára gyakorolt hatását szérumentes tápközegben. Az Epic BT bioszenzor lemez lyukaiba különböző koncentrációjú (0,1–1,7%) *glyphosate* oldatot, illetve kontroll lyukakba HEPES-HBSS puffert pipettáztam, majd MC3T3-E1

sejteket adtam hozzá az alapvonal beállta után. Az így kapott Epic BT szenzorjelből látható, hogy szérumentes közegben a kontroll mintánál egy nem specifikus folyamat figyelhető meg, mely az adszorpciós kinetikához hasonló (28. ábra, zöld görbe). Ez a jelenség korábbi tanulmányokból már ismert.<sup>12</sup> Alacsony *glyphosate* koncentrációk (0,1-0,4%) esetében ugyanakkor szigmoid jellegű kinetikai görbét kaptam, és a 0,1% *glyphosate* hatóanyaggal előzetesen exponált szenzor felületeken a sejtadhézió fokozódott a kontroll sejtekhez képest (28. ábra). Ez a szigmoid jellegű kinetika egy receptor által közvetített sejtadhéziós folyamat tipikus jellemzője<sup>10,197</sup>. A mikroszkópos képek megerősítik, hogy a *glyphosate* hatóanyaggal kezelt felületeken a kitapadt sejtek alakja szétterültebb, mint a bevonat nélküli felületen lévő kontroll sejteké (28. ábra). A kontroll sejteknél normál morfológia volt megfigyelhető fáziskontraszt mikroszkóppal. Továbbá, a *glyphosate* tartalmú felületen kitapadt sejtekben szignifikáns vakuolizáció volt látható.



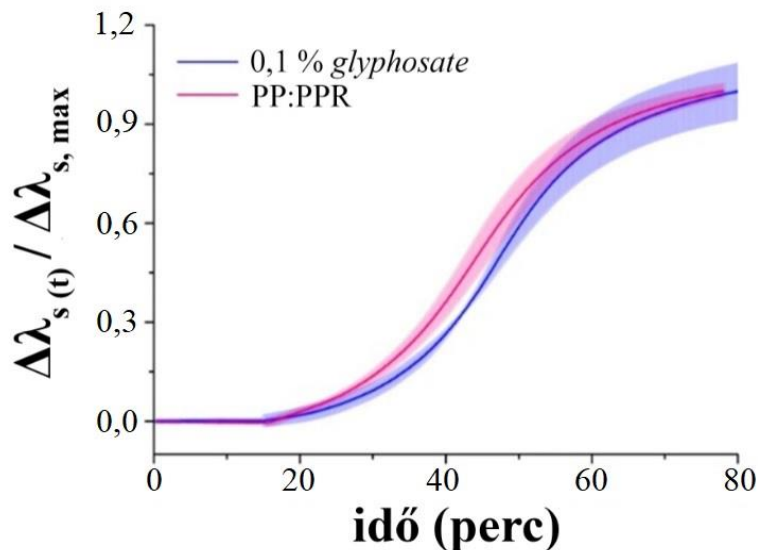
28. ábra A MC3T3-E1 sejtek kitapadása különböző koncentrációjú *glyphosate* oldatot tartalmazó felszínen és 20 mM HEPES-HBSS pufferben. A mérések szórását és átlagát ábrázoltam (n = 3). Fáziskontraszt-mikroszkópos képek az Epic BT bioszenzoros kísérleteket követően (skála: 50  $\mu$ m).

A kísérletek igazolták, hogy magasabb *glyphosate* koncentráció (0,2-1,7%) fokozatosan csökkenti a sejtadhéziót (28. ábra, vörös és szürke görbék), ami szigmoid görbe alakjának csillapításában nyilvánul meg. Ez a jelenség azzal magyarázható, hogy az érzékelő felület *glyphosate* hatóanyaggal való telítettsége következtében megnő a vegyület oldatban lévő

mennyisége, ami a sejtadhézió blokkolásához vezet. Az 1,7% -os *glyphosate* koncentrációnál már nem látható sejtadhéziós jel (28. ábra, fekete görbe).

Ezen adatok alapján azt feltételezem, hogy a felületre adszorbeált *glyphosate* biomimetikus felületet alakít ki és fokozza a sejtek kitapadását. (OWLS kísérlettel kimértem, hogy a *glyphosate* képes a szenzor felületére adszorbeálódni). Mindazonáltal a *glyphosate* molekulák az oldatban hatékonyan blokkolják a sejtek integrin receptorait és csökkentik a sejtadhéziós képességet. Hipotézisem igazolására következő kísérleteimben (i) a felületre ráadszorbeált *glyphosate* és az ismert RGD-motívum sejtadhézióra gyakorolt hatásait vizsgáltam; (ii) teszteltem a *glyphosate* molekulák kikötődését a szenzorfelületen; és (iii) megvizsgáltam a *glyphosate* oldattal összekevert sejtek adhézióját RGD motívumot tartalmazó polimerrel bevont felületeken.

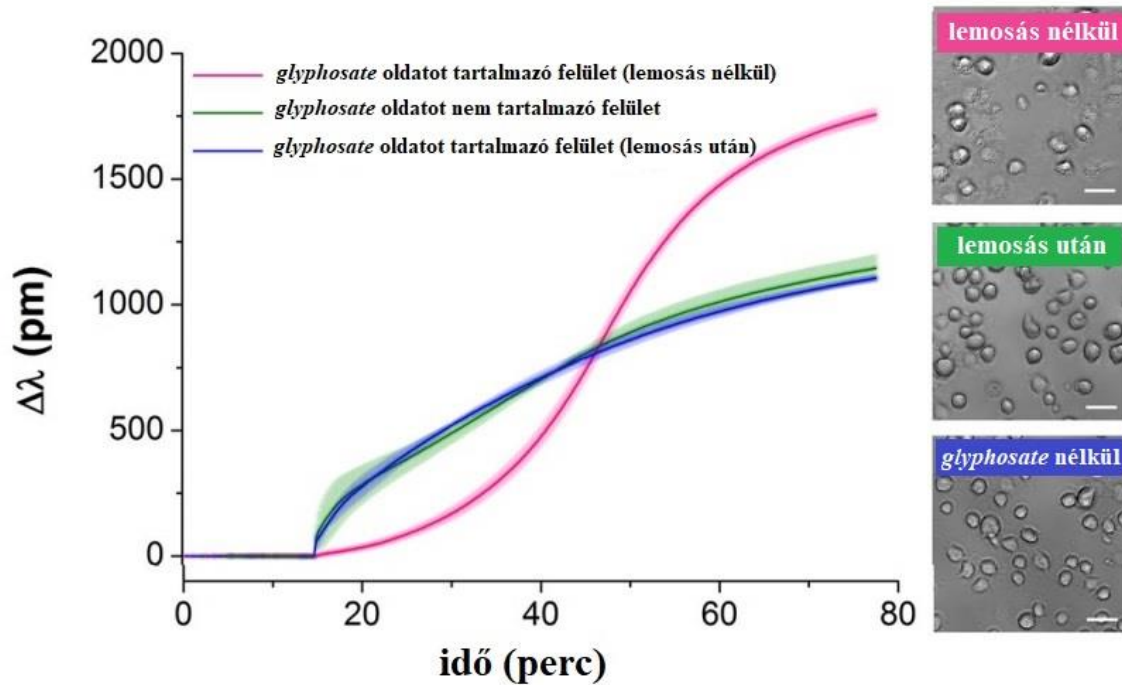
Először a szenzorfelületen lévő 0,1% *glyphosate* oldatból képzett rétegen mért sejtadhéziós kinetikát hasonlítottam össze RGD-motívummal bevont felületen mért adhéziós görbékkel, Az RGD-motívumról köztudott, hogy sejtadhéziót indukál és ezen motívumot tartalmazó felületeken a sejtek adhéziós kinetikája szigmoid jellegű. Az eredmények azt mutatták, hogy az RGD-motívummal és 0,1% *glyphosate* oldattal bevont felületek sejtadhéziós kinetikája nagyon hasonló (29. ábra). A bioszenzor válaszokat a kapott jel maximumára normáltam az adott felületre vonatkozóan:  $\Delta\lambda_s(t) / \Delta\lambda_{s,max}$ , ahol  $\Delta\lambda_s(t)$  jelzi az aktuális változást a hullámvezető rezonancia hullámhosszában, amit a sejtadhézió hoz létre az adott szubsztrát (módosított (PP-PPR-rel) bevont felület) felszínén ( $s$ ) és az adott időpontban ( $t$ ).  $\Delta\lambda_{s,max}$  mutatja a maximális hullámhossz-eltolódást sejtadhézió esetében az adott szubsztráttal rendelkező bioszenzor felületen. Ez az eredmény is utal arra, miszerint a *glyphosate* funkcionálhat integrin ligandumként, amely elősegíti a sejtek kitapadását a vele bevont felületen.



29. ábra Az MC3T3-E1 sejtek adhézión kinetikája 0,1% *glyphosate* oldattal (kék) és PP:PPR polimerrel (rózsaszín) bevont szenzorfelületen.

Megállapítottam, hogy a *glyphosate* és RGD-motívumok (PP:PPR bevonattal ellátott Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bioszenzor felületén) kötési affinitása az integrinhez hasonló. Az optimalizált felületmódosítási eljárás alapján 500 µg/ml PP:PPR polimerrel vontam be a felszínt, amely az RGD-motívumok moláris felületi tömegsűrűségére 3,4270 pmol/cm<sup>2</sup>-t és egységnyi területre jutó ligandumok átlagos számára 20637 ligandum/µm<sup>2</sup>-t eredményez (7. táblázat). A sejtadhézió 0,1%-os koncentrációjú *glyphosate* oldattal kezelt bioszenzor felületen hasonló szigmoid görbét eredményez, mint az 500 µg/ml PP:PPR kopolimer oldattal kezelt felszínen. Ez a *glyphosate* koncentráció mosás nélkül 4 ng/cm<sup>2</sup> felületi tömeget ad, amely 17,53 pmol/cm<sup>2</sup> moláris felületi sűrűségnek és 105180 ligandum/µm<sup>2</sup>-nek felel meg. Ezen eredmények alapján az átlagos intermolekuláris távolság a *glyphosate* molekulák között 3,3 nm. Ez a felületi sűrűség jó összhangban van a fenti hipotézissel, mely szerint az átlagos RGD–RGD távolság 10 nm alatt jellegzetes szigmoid alakú sejtadhéziós kinetikát ad. A MC3T3-E1 sejtek adhéziójához szükséges maximális ligandum távolságnak<sup>10,240</sup> 70 nm körül kell lennie<sup>247</sup>. Ráadásul feltételezhetően a bioszenzor felülete elősegítheti a *glyphosate* molekulák funkcionális orientációját és a kation kötődést is, így a *glyphosate* molekulát a sejtadhézióhoz legelőnyösebb pozíciójában stabilizálhatja.

Ezenkívül megvizsgáltam, hogy az adszorbeált *glyphosate* lemosható-e a felületről. Az Epic BT bioszenzor érzékelő felületet 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltam *glyphosate* hatóanyaggal, majd a felületet háromszor öblítettem 20 mM HEPES-HBSS pufferrel. A HEPES-HBSS pufferrel felvett alapvonal után sejteket pipettáztam a lyukakba. Ennél a mérésnél adszorpciószerű sejt adhéziós kinetikát figyeltem meg és mikroszkópos képek alapján látható, hogy a sejtek nem tapadnak ki a felületre (30. ábra, kék görbe).



30. ábra Az MC3T3-E1 sejtek kitapadásának kinetikája bevonat nélküli (zöld); pufferrel leöblített 0,2% *glyphosate* hatóanyagot tartalmazó szenzor felületen (kék); 0,1% *glyphosate* bevonaton (rózsaszín) (n = 3). Fáziskontraszt mikroszkópos képek az Epic BT bioszenzoros kísérleteket követően (skála: 50  $\mu$ m).

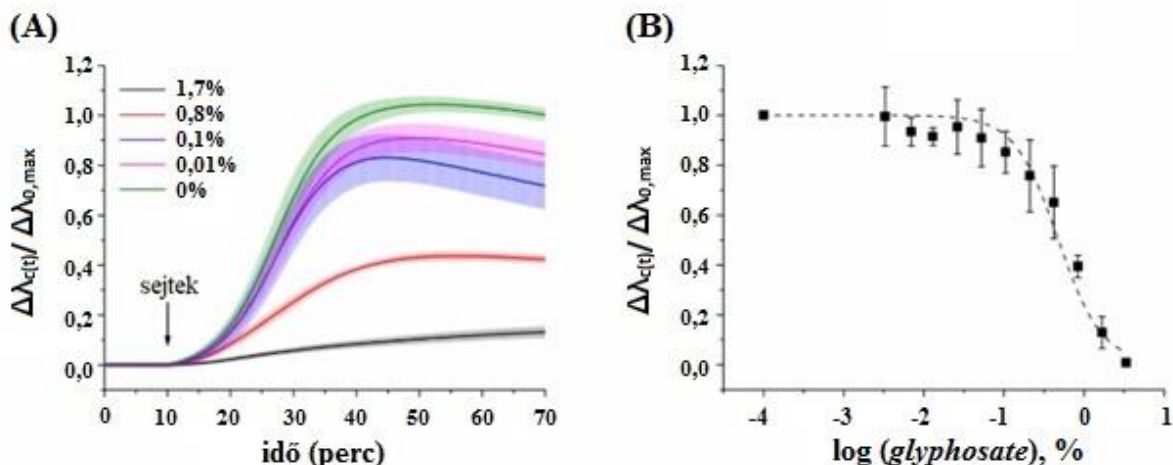
Emellett készítettem két kontroll felületet is. Az egyik kontroll felületről nem mostam le a *glyphosate* hatóanyagot és utána adtam hozzá a HEPES-HBSS pufferben szuszpendált sejteket. A *glyphosate* hatóanyagot tartalmazó felületen a sejtkitapadás szigmoid kinetikát mutat és a mikroszkópos képen látható, hogy a sejtek letapadnak a felületre (30. ábra, rózsaszín görbe). A másik kontroll felület nem tartalmazott *glyphosate* hatóanyagot, amelyen HEPES-HBSS pufferrel felvettem az alapvonalat, majd sejteket pipettáztam a lyukakba. Ennél a mérésnél adszorpciószerű adhéziós kinetikát figyeltem meg és a vonatkozó mikroszkópos képek alapján látható, hogy a sejtek nem tapadnak ki a felületre (30. ábra, zöld görbe). Összegezve a méréseket, azt figyeltem

meg, hogy a *glyphosate* hatóanyagot nem tartalmazó (30. ábra, zöld görbe) és a lemosott felület (30. ábra, kék görbe) esetében a sejtkiterülés szinte azonos adhéziós kinetikát mutat. Ez azt jelenti, hogy a *glyphosate* hatóanyagot intenzív öblítéssel túlnyomórészt le lehet mosni az érzékelő felületéről.

### **5.3.3. Az MC3T3-E1 sejtadhézió gátlásának vizsgálata és az integrin–*glyphosate* kötődisszociációs állandójának meghatározása**

Az Epic BT bioszenzorral végzett mérések adataiból számítható a ligandumok affinitása a sejtmembránban található sejtadhéziós receptorokhoz<sup>10</sup>. Ezt korábban az *echistatin*  $IC_{50}$  értékének meghatározásánál láthattuk Székács és munkatársai tanulmányában<sup>248</sup>. Itt is ezt a kidolgozott módszert alkalmaztam, hogy meghatározzam a *glyphosate* hatását a sejtadhéziós folyamatra, hogy az 5.3.2. fejezetben ismertetett hipotézist igazoljam. Először az érzékelő felületet RGD-motívumot tartalmazó (1:1) PP:PPR polimerrel vontam be. Ezután inkubáltam az MC3T3-E1 sejteket különböző koncentrációjú *glyphosate* oldatokkal, majd ezeket a szuszpenziókat a szenzorfelületekre pipettáztam, és a sejtadhéziót Epic BT bioszenzorral követtem nyomon. Minden bioszenzorválaszt a negatív kontroll maximális jelére normáltam ( $\Delta\lambda_c(t) / \Delta\lambda_{0,max}$ , ahol  $\Delta\lambda_c(t)$ , mutatja a tényleges változást a rezonáns hullámhosszon, ( $c$ ) az adott *glyphosate* koncentrációt, ( $t$ ) az időt és a  $\Delta\lambda_{0,max}$  az aktuális változást a vezetett fényben, amely a *glyphosate*-mentes oldathoz (0% koncentrációhoz) tartozik ( $t > 60$  percig tartó sejtadhézió). A sejtek *glyphosate*-oldattal történő kezelése a *glyphosate* koncentráció függvényében csökkentette az adhéziójukat RGD-motívumot tartalmazó felülethez (31. ábra). Inhibitor jelenlétében a sejtadhézió csökken az integrinek blokkolása miatt<sup>248</sup>, ami a maximális bioszenzorjel csökkenését okozza (31A ábra). A teljes maximális jel blokkolását az MC3T3-E1 sejtek 1,7%-os *glyphosate*-oldattal történő inkubálása váltja ki, és a kapott bioszenzorjelen a görbe kisimulását eredményezi. A bioszenzor válaszána koncentrációfüggését a 31B ábrán vettem fel, és a *glyphosate*  $IC_{50}$  értékeként  $0,47 \pm 0,07\%$ -ot (20,6 mM) határoztam meg MC3T3-E1 sejtek adhéziójának gátlására vonatkoztatva. Négy egymástól független kísérlet értékeit vettem alapul<sup>249</sup> és az Epic BT szenzorválaszokat normáltam a negatív kontroll maximális értékével.





31. ábra (A) Különböző koncentrációjú *glyphosate* hatóanyaggal inkubált MC3T3-E1 sejtek adhéziójára kapott kinetikai görbék PP:PPR polimerrel bevont felületen Epic BT bioszenzorral vizsgálva. (B) A bioszenzor válasz koncentrációfüggése, amely megmutatja a *glyphosate*  $IC_{50}$  értékét az adhézió gátlására vonatkoztatva. A mérések szórását és átlagát ábrázoltam (n=12).

Az oldatban lévő *glyphosate* az RGD-motívumhoz nem tud kötődni az inert PEG-láncok miatt, így az oldatban tudja kifejteni hatását. Az oldatban lévő *glyphosate* be tud kötni az integrin receptorok kötőhelyeire, így meggátolva a további kötődésüket a felszínen lévő RGD-motívumokhoz. Cheng és a Prusoff<sup>249</sup> (17) egyenlete alapján meghatároztam a  ${}^3DK_d$  értékét a *glyphosate*-integrin kötésre:

$${}^3DK_d(\text{glyphosate}) = \frac{IC_{50}}{1 + [RGD]/{}^3DK_d(\text{PPR})} \quad (17)$$

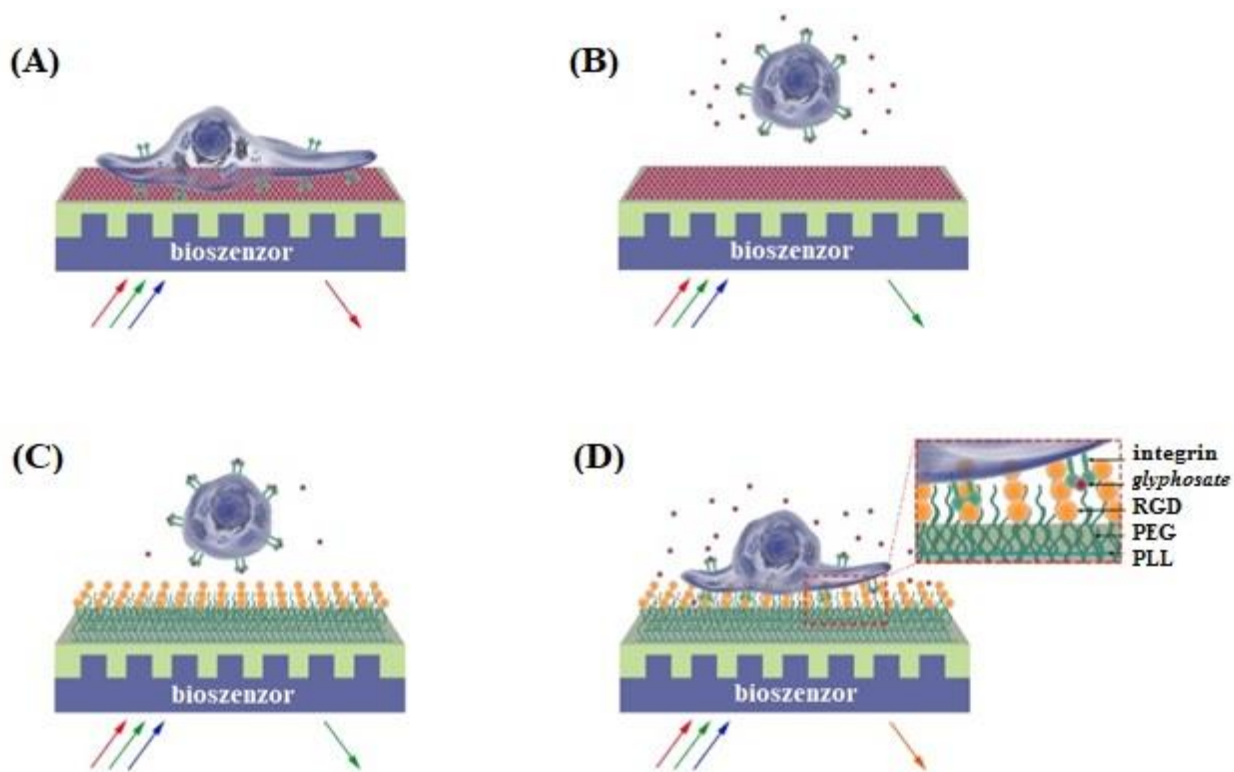
ahol a *glyphosate*  $IC_{50}$  értéke 20,6 mM, az  $[RGD]$  az RGD koncentrációját jelenti a szenzor felületén ( $[RGD] = 0,343$  mM, azt feltételezve, hogy az RGD molekulák által bezárt hossz 100 nm) és a  ${}^3DK_d$  (PPR) mutatja a disszociációs állandót az oldatban a PPR és a sejtmembránban lévő RGD-specifikus integrinek közötti kötésre vonatkozóan. Az MC3T3-E1 sejtekre kapott  ${}^3DK_d$  értéke  $5,97 \times 10^{-3}$  mM (lásd a (15) egyenletet). Így a *glyphosate*-integrin kötés  ${}^3DK_d$  értéke 352  $\mu\text{M}$ -nak adódik. Összehasonlítva a *glyphosate*-integrin és RGD-integrin  ${}^3DK_d$  értékét megállapítható, hogy 58-szor nagyobb értéket kapunk RGD-motívumra, mint *glyphosate* hatóanyagra. Ez azt mutatja, hogy 58-szor erősebben kötik az integrinek az RGD motívumot, mint a *glyphosate* hatóanyagot. Ez azt jelenti, hogy hasonló sejtadhéziós kinetikát tud kiváltani adott felületen

17,53 pmol/cm<sup>2</sup> moláris felületi sűrűségű *glyphosate*, mint 0,3 pmol/cm<sup>2</sup> RGD-motívum (körülbelül ez egyenértékű 26 nm RGD–RGD-távolsággal).

A (17) egyenlet alapján meghatározott disszociációs állandó ( ${}^3D K_{d(\textit{glyphosate})} = 352 \mu\text{M}$ ) nagyságrendileg összehasonlítható a különböző integrin ligandumok disszociációs állandóinak szakirodalomban található értékeivel. Kapp és munkatársai<sup>250</sup> összegyűjtötték a legjellegzetesebb integrin ligandumokat és a különböző (tisztított) integrintípusokhoz tartozó IC<sub>50</sub> értékeket, illetve ismertették az izolált integrinokkal való mérés előnyeit és hátrányait is. A Kapp és munkatársai által feltüntetett integrin ligandumok és a különböző integrintípusokhoz tartozó IC<sub>50</sub> közül 10 μM-nál nagyobb értékek alacsony affinitásra utalnak az integrinek és a ligandumaik között<sup>250</sup>. A kötéserősségek biológiai jelentőséggel bírnak. Sanders és munkatársai számításai<sup>241</sup> szerint a kötés kinetikai paramétereit figyelembe véve a *glyphosate*  $k_{off}$  értéke 10<sup>3</sup>-10<sup>5</sup>s<sup>-1</sup> és a hozzátartozó  $k_{on}$  10<sup>6</sup>-10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>.

#### **5.3.4. A *glyphosate* sejtadhézióra gyakorolt hatásának értelmezése és a megfigyelt hatásokat magyarázó modell**

5.3.2. és 5.3.3. fejezetben bemutatott eredményeim alapján látható, hogy a *glyphosate* alkalmazott koncentrációjának függvényében különböző hatást gyakorolt a sejtadhézióra. A megfigyelt jelenségek magyarázatára szolgáló koncepciót a 32. ábrán sematikusán ábrázoltam.



32. ábra A sejtalapú bioszenzor működési elve és a *glyphosate* sejtadhézióra gyakorolt koncentrációfüggő hatása. (A) MC3T3-E1 sejtek kiterülése 0,1% *glyphosate* oldattal kezelt bioszenzor felületen. (B) 0,2-1,7% *glyphosate* oldat MC3T3-E1 sejtekre gyakorolt sejtadhézió gátló hatása (teljes blokkolás 1,7% *glyphosate* koncentrációnál). (C) 0,47% *glyphosate* oldattal inkubált MC3T3-E1 sejtek kitapadása gátolt a PP:PPR-rel bevont felületen. (D) 0,9% *glyphosate* oldat felszedi a PP:PPR polimerre kitapadt sejteket a felületről.

A 0,1% (4,38 mM) *glyphosate* koncentráció alkalmazásakor MC3T3-E1 sejtek esetében szigmoid-jellegű sejtátlépési görbét kaptam (29 ábra). Ennél a koncentrációnál a *glyphosate* molekulák telítik a felszínt és elősegítik a sejtek kitapadását (32A ábra), viszont az oldatban lévő alacsony koncentrációjú *glyphosate* még nem képes hatékonyan blokkolni a sejtek kitapadását (32A ábra). Magasabb koncentrációban (0,2-1,7%, 8,76 mM-74,46 mM) ugyanakkor a többlet *glyphosate* molekulák az oldatba maradnak, és versengve a sejt felszínén lévő integrinek kötőhelyeiért, csökkenteni tudják a sejtadhézió mértékét (32B ábra). Méghozzá hasonló koncentrációban ( $IC_{50} = 9,77$  mM) a *glyphosate* már képes felszedni letapadt MC3T3-E1 sejteket a bevonat nélküli szenzorfelületről<sup>118</sup>. Amennyiben a sejteket inkubáljuk közel ötször magasabb koncentrációjú *glyphosate* oldattal ( $IC_{50} = 20,6$  mM (0,47%)), mint ami elősegítené a sejtadhéziót (4,38 mM (0,1%)), akkor gátolni tudja a sejtek kitapadását az adhéziót elősegítő felületen

(PP:PPR-bevonat) (32C ábra). Az előzőnél kétszer nagyobb koncentrációjú *glyphosate* (kb. 40 mM, ezeket az adatokat nem ábrázoltam) képes volt felszedni a PP:PPR polimerrel módosított felületen kitapadt sejteket (32D ábra). A *glyphosate* sejtadhéziót gátló tulajdonságát azzal lehet magyarázni, hogy a *glyphosate* molekulák a PEG inertisége miatt nem tudnak a felületen lévő PP:PPR polimerhez kötni, így csak az oldatban tudják kifejteni hatásukat. A *glyphosate* molekulák az oldatban hozzá tudnak kötődni az integrin receptorokhoz, így azok az integrinek már nem képesek további RGD-motívumhoz kapcsolódni. Az így fellépő kompetíció által tehát a *glyphosate* gátolja a sejtek kitapadását a közismert *echistatin* diszintegrinnel végzett kísérlethez hasonlóan<sup>248</sup>

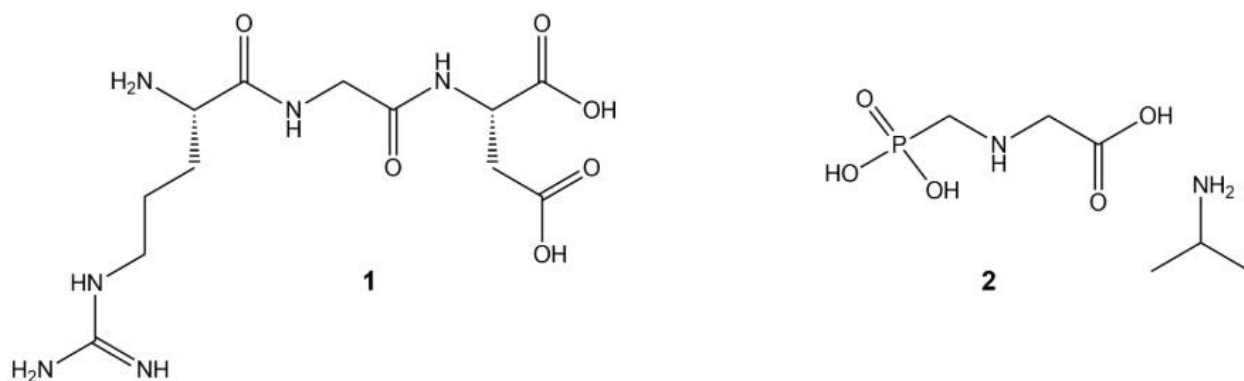
Nemcsak a *glyphosate* hatóanyagánál látható ilyen koncentrációfüggő kettős hatás a sejtkitapadás folyamatában, hanem számos más sejtadhéziós fehérje is képes a saját funkciójuk specifikus inhibitoraivá válni, ha a sejt receptorokhoz feleslegben kötődnek<sup>251</sup>. Ilyen koncentrációfüggő sejtadhéziót elősegítő és gátló hatás az integrinekhez kötődő glikoproteinek esetében is (fibronektin, vitronektin) megfigyelhető. 3 µg/ml-s (7 nM) fibronektin oldattal történő felületmódosítás elősegíti a sejtek kitapadását, míg 3300-szor nagyobb koncentrációban már (10 mg/ml (23 µM)) gátolja a sejtadhéziót<sup>251</sup>.

### 5.3.5. A *glyphosate* és az integrinek kapcsolatának értelmezése

Az integrinek olyan adhéziós receptorok, amelyek különböző extracelluláris ligandumokkal, tipikusan az extracelluláris mátrixot alkotó a sejtkitapadást elősegítő fehérjékkel lépnek kölcsönhatásba. Az MC3T3-E1 sejtek többféle integrint expresszálnak, ilyenek lehetnek az  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_1$  és  $\alpha_v\beta_3$ <sup>246</sup>. Néhány integrin specifikus az RGD tripeptid szekvenciájára. Az RGD szekvencia számos sejtadhézív extracelluláris mátrix fehérje aktív része. Az RGD-motívumról ismert, hogy az ezzel a molekulával bevont felület elősegíti a sejtek kitapadását, míg oldatban blokkoló hatása van a sejtkitapadásra<sup>252,253</sup>. Az RGD peptidet tartalmazó fehérjék affinitása az integrinekhez azonban eltérő lehet az azokat körülvevő aminosavak különböző szerkezetének és jellegének köszönhetően. Ez az affinitás érték jelentősen kisebb (akár ezrede) is lehet az RGD-peptideknél, mint azoknál a fehérjéknél, amelyek RGD szekvenciát hordoznak<sup>254</sup>.

Az integrinek fontos szerepet töltenek be az apoptózis szabályozásában is<sup>255</sup>. Amennyiben az oldott RGD-alapú peptidok közvetlenül a sejthez jutnak, akkor gátolni tudják az integrin–ligandum kölcsönhatásokat és közvetlen kaszpáz-3-aktiválással is apoptózist indukálhatnak<sup>256</sup>. A programozott sejthalálnak ugyanakkor más típusa is létezik, pl.: az anoikisz, amely sejtek kitapadásának akadályozása révén vezet apoptózishoz<sup>257–259</sup>.

A sejtheadhézióban részt vevő heterodimer felépítésű integrinek működésükhöz bivalens kationokat igényelnek. A megkötött kétértékű kationok befolyásolhatják az integrinek funkcióját<sup>260</sup>, ugyanis az integrinokban a ligandumkötő hely egy bivalens kation kötőhelyénél vagy annak közelében van. Az RGD-motívummal ligált  $\alpha_v\beta_3$  kristályszerkezetei azt mutatták, hogy a kétértékű kationok a híd szerepét töltik be a ligandumok és a heterodimer integrinek között<sup>254</sup>, míg a glicincsoportok egy hidrofób kapcsolatot létesítenek  $\alpha_v$  integrinalegységgel<sup>261</sup>. Az RGD aszparaginsava az egyik koordinációs helyet biztosítja a kétértékű kationok kötéséhez<sup>262</sup>. Habár a *glyphosate* (glicinszármazéként) nem mutat közvetlen szerkezeti hasonlóságot az RGD-molekulával (33. ábra), azonban egyaránt tud a  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , valamint sok más kétértékű és háromértékű fémkationnal kelátot képezni<sup>19,263,264</sup>, így képes lehet sejtheadhéziót indukáló hatás kifejtésére.

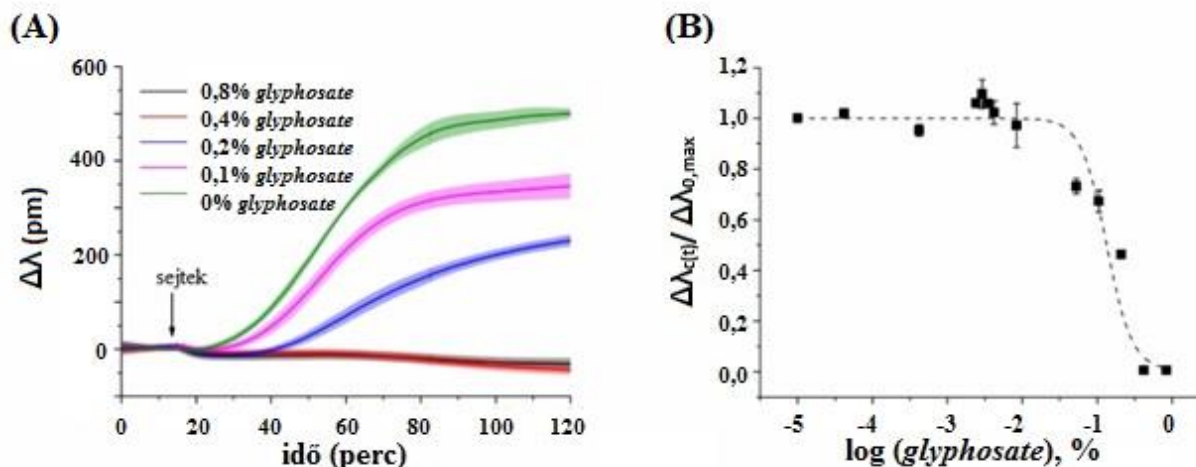


33. ábra RGD (1) és *glyphosate*-izopropil-amin (*glyphosate*-IPA) só (2) kémiai szerkezetei.

Feltételezem azonban, hogy a *glyphosate* láncvégi karboxil-csoportja utánozza az RGD-motívumban található aszparaginsavat, így az integrin és a *glyphosate* meg tudja osztani a kationt.

Másfelől a *glyphosate* molekulában található glicin molekularészlet hidrofób kölcsönhatással kapcsolódik az integrinnel. Külön kísérleteimben kiderítettem, hogy egyedül a glicin 12,5, 25 és 50 mM koncentrációban nem tudta blokkolni az integrinreceptorokat vagy a sejtek adhézióját (ezeket az adatokat nem tüntettem fel). Loomis és munkatársai megfigyelték, hogy a glicin 50 mM-nál nagyobb koncentrációban nem integrinspecifikus mechanizmuson keresztül tudja blokkolni a *Dictyostelium* sejtadhézióját<sup>265</sup>. Ugyanakkor meg kell említeni, hogy a *Dictyostelium*-sejtek nem képesek integrin által indukált fokális adhéziókat kialakítani, mint az emlőssejtek, ahol az ilyen kölcsönhatások sokkal erősebb kitapadást idéznek elő az ECM-en<sup>265</sup>.

Eredményeim azt bizonyítják, hogy a *glyphosate* bizonyos körülmények között az integrinek blokkolását eredményezi, a szérumot tartalmazó és szérummentes körülmények között eltérő aktivitással. A letapadt sejteken végzett méréseim során a *glyphosate*  $IC_{50}$  értéke szérum tartalmú tápközeg esetében 2,98 mM volt, ezzel szemben 9,77 mM-t kaptam szérummentes körülmények között (pufferben)<sup>118</sup>. A *glyphosate* sejtadhézió gátlására vonatkozó  $IC_{50}$  értéke szérumtartalmú tápközegben 5,7 mM ( $0,13 \pm 0,04\%$ ) (34. ábra), míg szérummentes körülmények között a gátló hatás 20,6 mM értéknél jelentkezett.



34. ábra (A) Különböző *glyphosate* koncentrációival inkubált MC3T3-E1 sejtek adhéziójára kapott kinetikai görbék szérumtartalmú tápközegben Epic BT bioszenzor felületen. (B) A bioszenzor válaszjel koncentrációfüggésének ábrázolása, amely megmutatja a *glyphosate* sejtadhézióra vonatkozó  $IC_{50}$  értékét szérumtartalmú tápközegben. A mérések szórását és átlagát ábrázoltam ( $n=6$ ).

Ez az eredmény a megfigyelésekkel ellentétesnek bizonyult, mivel egy mérgező anyagtól az lenne várható, hogy kevésbé fejti ki hatását a szérumot tartalmazó tápközegben a szérum

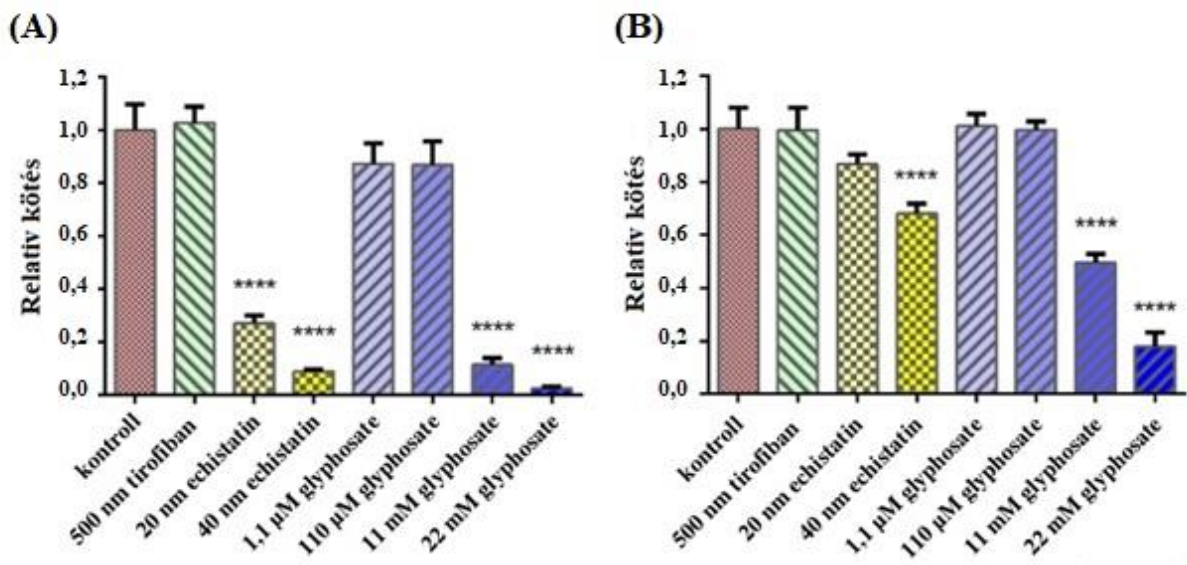
fehérjetartalmának köszönhetően<sup>231</sup>. Ugyanis az eredményeim alapján a *glyphosate* molekulának fokozott sejtadhézió gátló hatása van szérumban, mint szérummentes körülmények között. Ez azzal magyarázható, hogy a szérumban számos fehérjét is tartalmaz, melyek képesek kölcsönhatni a sejtfeszínén lévő (nemcsak RGD specifikus) integrinokkal (például 220 µg/ml fibronectin<sup>266</sup> és 200-300 µg/ml vitronektin<sup>267</sup>). A szérumban tartalmazó médiumban lévő fehérjék hatása önmagában csekély (10% FBS szérumban tartalmazó tápközegben), azonban a *glyphosate* gátló hatása hozzáadódik, így képes erőteljesebb gátlást kifejteni még alacsonyabb koncentrációknál is, mint a szérummentes körülmények között. A tudományos szakirodalomban hatalmas mennyiségű adat található arról, hogy a különböző szintetikus és természetes peptideknek eltérő hatásai vannak a sejtadhézióra szérumban tartalmazó és szérummentes tápközegben<sup>248,251,274–276,252,259,268–273</sup>. Az alkalmazott inhibitorok megfelelő, nano- és millimoláris tartományba eső koncentrációjának kiválasztásánál nemcsak a sejtípust (és az expresszált integrinokat), a felületi bevonatot, az inkubációs időt és az inhibitorok különböző affinitását kell figyelembe venni, hanem a tápközeg is (szérumban tartalmazó vagy szérummentes).

### **5.3.6. A *glyphosate*-molekula $\alpha_v\beta_3$ integrinhez történő kötődésének bizonyítása kompetitív ELISA módszerrel**

A *glyphosate* integrinkötő tulajdonságait ELISA technikával és Epic BT bioszenzorral végzett sejtmentes mérésekkel ellenőriztük. Ezekkel a kísérletekkel azt a kérdést vizsgáltuk, hogy a *glyphosate* kompetitív módon tudja-e gátolni a rekombináns  $\alpha_v\beta_3$  integrinokat, mégpedig azok az RGD-motívumokhoz való kötődését. Az  $\alpha_v\beta_3$  integrin a vitronektin receptora, ugyanakkor több másik RGD-tartalmú ECM fehérjét képes különböző fokú specifitással felismerni. A kígyóméregben található diszintegrin hatású *echistatin* nagy affinitással kötődik az  $\alpha_v\beta_3$  integrinhoz, ezért ezt választottuk pozitív kontrollnak. Ezzel szemben a *tirofiban* nem fejt ki blokkoló hatást az  $\alpha_v\beta_3$  integrinra, emiatt ezt a vegyületet negatív kontrollként alkalmaztuk.

Az ELISA és Epic BT mérések által kapott adatok alapján (35. ábra) megállapíthatjuk, hogy míg a *glyphosate* és az *echistatin* motívumai kompetitív inhibícióval befolyásolják az  $\alpha_v\beta_3$  integrinok kötődését az immobilizált RGD-motívumhoz, azonban a *tirofiban* hatóanyagának nem volt szignifikáns hatása.





35. ábra Kompetitív  $\alpha\beta_3$  integrin kötési vizsgálat eredménye (A) ELISA méréssel (B) Epic BT bioszenzorral. A diagramokon az integrinek felszíni RGD-motívumokhoz való kötődése látható a vizsgált anyagok (*glyphosate*, *echistatin*, *tirofiban*) jelenléte esetében. A mérések szórását és átlagát ábrázoltam (n = 3-6). A csillagok szignifikáns különbséget mutatnak a kontrollhoz képest (p < 0,0001).

Mindkét technika bizonyította a *glyphosate* integrin-blokkoló hatását. A *glyphosate*  $\alpha\beta_3$  integrin gátló hatását 11 mM-os, illetve annál nagyobb koncentrációban fejtte ki. Az ELISA mérés érzékenyebbnek bizonyult, mivel a *glyphosate* molekulával a teljes integrin inhibíciót 11 mM értéknél figyeltük meg, és az *echistatin* 20 nM koncentrációnál fejtette ki gátló hatását. Ez annak köszönhető, hogy az összes el nem reagált komponens az ELISA lemezről kimostuk, miközben az Epic BT bioszenzoros vizsgálatban hozzájárult az analitikai jelhez az evaneszcens térben lévő nem kötődött anyag. Ezt az Epic BT bioszenzoros mérések során jelentkező látszólagos felületi tömegnövekményt a módszerrel mért hasonló eredmények kompenzálják. A bioszenzoros technika jelentős előnye, hogy nem igényeli az immunoreagens/jelölés használatát a kimutatáshoz, és a mérés egyszerűen kivitelezhető.



## 6. Összefoglalás

PhD munkám során kifejlesztettem egy új és gyors citotoxicitást meghatározó módszert a nagy áteresztőképességű Epic BT optikai bioszenzor segítségével. E technika előnye, hogy a biokémiai és sejtes folyamatok valós időben és jelölésmentesen követhetők. Ezt a bioszenzort alkalmaztam a világszerte használt Roundup Classic növényvédő szernek, valamint e szer *glyphosate* hatóanyagának és POEA formázó anyagának élettani hatásainak vizsgálatára felületre letapadt preoszteoblaszt sejteken. A kísérleteket szérumot tartalmazó és szérummentes tápközégekben végeztem, és meghatároztam az anyagok  $IC_{50}$  értékét, ami igazolta az Epic BT technika szűrőmódszerként való kiváló alkalmazhatóságát. Ez az új citotoxicitást meghatározó módszer nagymértékben lerövidíti a vizsgálati időt, és lehetővé teszi a sejtfiziológiai változásainak vizsgálatát még közvetlenül a sejthalál bekövetkezése előtt. Ezek az előnyök teszik a bioszenzoros módszert alkalmassá az alternatív toxikológiai szűrővizsgálatokhoz, és a hagyományos módszerek kiegészítéséhez.

A PAH-PSS polielektrolit oldatok segítségével sikerült meghatározni azt a kalibrációs egyenletet, amellyel az Epic BT bioszenzor által mért hullámhossz-eltolódás jel fizikailag jól interpretálható felületre adszorbeált tömeg adattá konvertálható. Ezt az egyenletet refraktometriás mérések segítségével *glyphosate* hatóanyagra is alkalmazhatóvá tettem.

A vizsgálatokban a Roundup Classic készítményt a mezőgazdasági használatban alkalmazott koncentrációin (1-2%) és annak hígításain (akár több nagyságrenddel alacsonyabb koncentrációkon) teszteltem. A *glyphosate* és POEA komponenseket is a megfelelő Roundup Classic-oldatban mérhető koncentrációin vizsgáltam, és ezek értékeit mindig Roundup-Classic-oldattal egyenértékű koncentrációban adtam meg az összehasonlíthatóság érdekében. Az eredmények világosan megmutatták, hogy a Roundup Classic citotoxicitását döntően a POEA okozza, és a *glyphosate* a mezőgazdasági alkalmazás koncentrációján citotoxikus a preoszteoblaszt sejtekre *in vitro* körülmények között.

Az Epic BT bioszenzorról kapott eredményeket más módszerekkel (fáziskontraszt, fluoreszcens és holografikus mikroszkopiával, illetve citofluorimetriával) is alátámasztottam. A mikroszkópos képek alapján azt tapasztaltam, hogy a POEA erősen befolyásolja a sejtek morfológiáját és integritását, illetve nekrozist és apoptozist válthat ki. Ezek a hatások sokkal erősebbek a POEA estében, mint magánál a Roundup Classic növényvédő szernél vagy a

*glyphosate* hatóanyagánál. Megállapítottam, hogy a *glyphosate* a sejtadhéziót és a citoszkeleton morfológiáját is befolyásolja. A Roundup Classic hasonlóan a POEA formázóanyaghoz a sejtek morfológiájára gyakorol hatást és apoptózist okoz, amely rámutat arra, hogy a növényvédő szerben a POEA hatása dominál. Hasonló következtetésre vezettek a citofluorimetriás kísérleteim is. A Roundup Classic- és POEA-kezelés a vizsgált koncentrációkban itt is apoptózist eredményezett, miközben a *glyphosate* hatóanyag csak nagyobb mennyiségben (0,25%) idézett elő sejthalált.

Holografikus mikroszkópiás vizsgálatokkal kimutattam, hogy a sejtekre gyakorolt hatását tekintve a *glyphosate* a Roundup Classic készítménnyel egyenértékű, vagy kissé alacsonyabb koncentrációban befolyásolja a sejtosztódást, a motilitást, a sejt morfológiát (a sejtek hosszúak alakúak lesznek), és sejtek felületről való leválását okozza (bár lassabb, mint a POEA és a Roundup Classic által okozott hatás). Fontos hangsúlyozni, hogy a Roundup Classic-ot a mezőgazdasági használatban 1% és 2%-os hígításokban alkalmazzák, melyek két nagyságrenddel nagyobb koncentrációk, mint a kísérleteimben kapott toxikus koncentrációk.

A kísérleteim során a *glyphosate* eddig nem ismert tulajdonságait figyeltem meg. A *glyphosate* egyik érdekes tulajdonsága, hogy a szenzorfelületre adszorbeálódva serkenti a MC3T3-E1 sejtek kitapadását. Eredményeim alapján a *glyphosate* az integrin ligandumaként viselkedik és sejtek adhéziója *glyphosate*-tal borított felszínen az RGD-motívummal funkcionális felületen mért sejtadhézióhoz hasonló kinetikát mutat. Ezt az is alátámasztotta, hogy a 0,01%-os *glyphosate* hatóanyagot tartalmazó felszínhez tartozó sejtadhéziós kinetika hasonló lefutású, mint a PP:PPR (1:1) polimerrel bevonaté. További bioszenzoros mérésekkel kimutattam, hogy a *glyphosate* monoréteget képez a felületen, és intenzív mosással teljesen eltávolítható, illetve a sejtadhézió kinetikája megegyezik az üres szenzorfelületen mért kitapadással.

A *glyphosate* másik kutatómunkám során feltárt tulajdonsága, hogy nagy koncentrációban (0,47%) gátolja a sejtek kitapadását az RGD-motívummal bevont felületeken. Minél nagyobb koncentrációjú *glyphosate*-oldattal inkubáljuk a sejteket, annál kevesebb sejt képes kitapadni az RGD-motívummal bevont felületekre. Mivel a sejtadhézió a sejtmembránban lévő integrinek és az extracelluláris ligandumok kölcsönhatása révén jön létre, a *glyphosate* – eddig ismeretlen módon – gátolja az integrineket.

A *glyphosate* integrin ligandumként való viselkedése mögött feltételezhetően az áll, hogy a *glyphosate* láncvégi karboxil-csoportja utánozza az RGD-motívumban található aszparaginsavat, így az integrin és a *glyphosate* meg tudja osztani a kationt. A *glyphosate* nem mutat szerkezeti

hasonlóságot az RGD molekulával, ennek ellenére glicin-származékként  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , valamint sok más két- és háromértékű fémkation kelátképzője. Másfelől feltételezem, hogy a glicin *glyphosate* hatóanyagban hidrofób kölcsönhatással kapcsolódik az integrinnel. Mindazonáltal a glicin önmagában 12,5, 25 és 50 mM koncentrációban sem tudta ténylegesen blokkolni az integrin receptorokat, illetve a sejtek adhézióját.

Összehasonlítva a *glyphosate*–integrin és az RGD–integrin komplexekre meghatározott  ${}^{3D}K_d$  disszociációs állandókat megállapítható, hogy ez az érték körülbelül 58-ad része, mint az RGD-motívum esetében, vagyis az RGD-motívum 58-szor erősebben köt az integrinekhez, mint a *glyphosate*. Ez azt jelenti, hogy hasonló sejtadhéziós kinetikát tud kiváltani adott felületen 17,53 pmol/cm<sup>2</sup> moláris felületi sűrűségű *glyphosate*, mint 0,3 pmol/cm<sup>2</sup> RGD-motívum (körülbelül ez egyenértékű 26 nm RGD–RGD-távolsággal).

A *glyphosate* integringátló hatását bizonyítottuk sejtmentes vizsgálatokkal is, ahol rekombináns  $\alpha\beta_3$  integrin kötési méréseket végeztünk mind ELISA, mind Epic módszerrel.

A *glyphosate* élettani hatása vitatott téma a tudományos irodalomban. Számos szakcikk állítja, hogy a *glyphosate* citotoxikus hatását az oxidatív stressz (reaktív oxigéngyökök keletkezése) által okozott apoptózis váltja ki. Kutatómunkám eredményeként megállapítottam, hogy a *glyphosate* hatóanyagnak sejtadhézió blokkoló tulajdonsága van, mivel integrin ligandumként tud viselkedni. Eredményeim alapján feltételezhető, hogy a *glyphosate* a sejtadhéziós folyamatok gátlásával anoikiszt (az apoptózis egyik speciális formáját) idézhet elő. Ilyen kölcsönhatások élettani változásokhoz vezethetnek, mint például immunfunkciók romlása, oszteoporózis, szövet- vagy szervfejlődési rendellenességet, és ezenkívül anomáliákat okozhatnak olyan folyamatokban, ahol a sejtkitapadás fontos szerepet játszik.

## 7. Új tudományos eredmények

### 7.1. Tézispontok

1. Rétegenként építkezve (layer-by-layer technikával) (poli-(allil-amin-hidroklórid))-poli-(szirol-szulfonát)) (PAH-PSS) polielektrolit multirétegeket alakítottam ki optikai hullámvezető fénymódus spectroscópia (OWLS) és rezonáns rácsos hullámvezető (RWG) Epic BT bioszenzor felületeken. Kihhasználva 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. (T1, T3)

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 szérumentes és szérumot is tartalmazó közegekben. Megmutattam, hogy főképp a POEA felelős a Roundup Classic citotoxicitásáért, ugyanakkor a *glyphosate* jelentősen befolyásolja a sejt morfológiát és a sejtadhéziót. A jelölésmentes bioszenzorral kapott eredményeimet egyéb módszerekkel (holografikus, fáziskontraszt és fluoreszcens mikroszkópiával, valamint citofluorimetriával) is igazoltam. (T2)

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. (T3)

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*. (T3)

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 méréseket végeztem rezonáns rácsos hullámvezető (RWG) Epic BT bioszenzorral. Megállapítottam, hogy a *glyphosate* kompetitívan gátolja az  $\alpha\beta 3$  integrin immobilizált RGD-motívumokhoz történő kötődését. (T3)

## 7.2. Thesis points

1. The layer-by-layer (LbL) technique was applied to create (poly-(allyl-amine hydrochloride)-(poly-(styrene sulfonate)) (PAH-PSS) polyelectrolyte multilayers on optical waveguide lightmode spectroscopy (OWLS) and resonant waveguide grating (RWG), Epic BT, biosensor surfaces. Utilizing the high reproducibility of the applied system thickness and surface mass density, a calibration equation was determined by comparing the measured signals, which can be used to convert the Epic BT measured wavelength shift into surface mass density. Furthermore, I also determined the mentioned above equation for glyphosate.
2. I developed a real-time and label-free cytotoxicity assay on adhered cells by using the resonant waveguide grating (RWG), the Epic BT, biosensor. I determined the dose-dependent effect of Roundup Classic and its components in serum-free and serum-containing media on preosteoblast (MC3T3-E1) cell adhesion. I showed that the tallow-based polyoxyethylenamine (POEA) co-formulant is responsible for the cytotoxicity of Roundup Classic, and its active ingredient glyphosate influences the cell morphology and cell adhesion kinetics. These data from the label-free biosensor were validated with other techniques (holographic, phasecontrast and fluorescent microscopy, as well as flow cytometry).
3. I demonstrated that MC3T3-E1 preosteoblast cells can adhere to the sensor surface coated with glyphosate. I confirmed that cell adhesion shows ligand-specific adhesion kinetics (sigmoidal cell adhesion curve). The measured adhesion kinetic curves showed a high degree of similarity to those measured on surfaces displaying the arginine-glycine-aspartic acid (RGD) motif.
4. I measured the adhesion of preosteoblast (MC3T3-E1) cells on arginine-glycine-aspartic acid (RGD) motif displaying and glyphosate-adsorbed surfaces, where I calculated the dissociation constant for RGD–integrin and glyphosate–integrin binding. By determining the dissociation constant I demonstrated that the RGD motif binds 58 times stronger to integrin than glyphosate.
5. I revealed that soluble glyphosate significantly reduces the preosteoblast (MC3T3-E1) cell adhesion to arginine-glycine-aspartic acid (RGD)-displaying surfaces. I measured the dose-dependent effect of soluble glyphosate for integrin blocking. I also proved the integrin inhibiting effect of glyphosate with non-cell based assays, where recombinant  $\alpha_v\beta_3$  integrin binding measurements were performed with resonant waveguide grating (RWG), Epic BT, biosensor. I

determined, that glyphosate influences binding  $\alpha_v\beta_3$  integrin to immobilized RGD motifs by competitive inhibition.

## 8. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani elsősorban témavezetőmnek Dr. Székács Innának, a rengeteg segítségért, hasznos szakmai tanácsért és magyarázatért. Illetve, hogy támogatta a konferenciákon való részvételeimet. Továbbá biztosította a feladatom elvégzéséhez szükséges sejteket és egyéb vegyszereket.

Köszönöm Dr. Horváth Róbertnek, hogy biztosította számomra a megfelelő eszközöket és körülményeket, ahhoz hogy a munkámat legjobb módon tudjam végezni. Szeretném megköszönni, hogy megismerhettem az újfajta műszereket (pl.: FluidFM). Továbbá köszönöm, hogy támogatta a konferencia és külföldi tanulmányútjaimat, amellyel hasznos tapasztalatra tettem szert. Illetve, hogy hasznos szakmai tanácsokkal látott el a munkám során.

Köszönettel tartozom Professzor Vonderviszt Ferencnek, aki biztosította számomra konferencia részvételeket, segítséget nyújtott a tanulmányaimban. Köszönöm továbbá, hogy munkámat figyelemmel kísérte és hasznos észrevételeivel segítette, és biztosította számomra kutatásomhoz a szükséges anyagokat (pl.: flagellin).

Szeretnék köszönetet mondani Professzor Székács Andrásnak a szakmai segítségért és *glyphosate*-minták biztosításáért. Köszönöm a közös munkát Oláh Mariannának a citotoxicitás-vizsgálatokban, valamint Gémes Borbálának és Dr. Takács Eszternek az ELISA-tesztekben.

A Nanobioszenzorika Lendület Kutatócsoport munkatársainak és tagjainak; Orgován Norbertnek, Dr. Patkó Dánielnek, Dr. Saftics Andrásnak, Gerecsei Tamásnak, Nagy Ágoston Gábornak, Dr. Ungai-Salánki Ritának, Kliment Kristófnak, Dr. Kovács Boglárkának, Dr. Nádor Jutkának szeretném megköszönni a munkámban nyújtott segítségüket. Köszönettel tartozom Dr. Kurunczi Sándornak az AFM mérésekben, kémiai felületkezelésekben nyújtott szakmai segítségéért és disszertációm lektorálásáért. Külön köszönöm Dr. Péter Beatrixnak a disszertációm nyelvi lektorálását, illetve a PhD éveim során tőle kapott sok segítséget. Továbbá köszönöm Dr. Saftics Andrásnak és Dr. Szittner Zoltánnak a disszertációm nyelvi lektorálását.

Köszönöm Dr. Pap József Sándornak, hogy részt vehettem kutatásaiban és eredményes együttműködés jött létre a csoportjaink között. Illetve, hogy támogatta a konferencia részvételeimet és hasznos szakmai tanácsokkal látott el.



Szeretnék köszönetet mondani az MTA EK MFA intézetben dolgozó kollégáknak a segítségért. Különösen köszönöm Dr. Nguyen Quoc Khanh-nak az AFM mérésekben betanítását, Hámori Andrásnak az OWLS elméletben nyújtott segítségét, Szuja Annának a kísérletekhez szükséges oldatok előkészítését.

Szeretném megköszönni a Bio-nanorendszerek kutatólaboratórium munkatársainak: Dr. Jankovics Hajnalkának, Klein Ágnesnek és Dr. Tóth Balázsnak a flagellin minták preparálását.

Köszönöm az együttműködést Dr. Kurucz Isvtánnak és Dr. Prechl Józsefnek.

Szintén köszönöm Professzor Kristóf Jánosnak (Vegyésszmérnöki és Anyagtudományi Doktori Iskola vezetőjének), Professzor Bársony Istvánnak (Műszaki és Anyagtudományi Kutatóintézet régi igazgatója), Dr. Pécz Bélának (Műszaki és Anyagtudományi Kutatóintézet igazgatója) és Dr. Horváth Ákosnak (Energiatudományi Kutatóintézet főigazgatójának), hogy helyszínt és háttérrel biztosítottak a doktori tanulmányaimhoz és kutatásaimhoz. Illetve köszönöm Dr. Jankovics Hajnalkának és Vereskuti Zitának a doktori ügyeim intézését.

Továbbá köszönöm a családomnak és barátaimnak a támogatást és a biztatást.

## 9. Saját publikációk jegyzéke

### 9.1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

- (T1) Orgovan, N.; Kovacs, B.; **Farkas, E.**; Szabó, B.; Zaytseva, N.; Fang, Y.; Horvath, R. Bulk and surface sensitivity of a resonant waveguide grating imager. *Appl. Phys. Lett.* **2014**, *104*, 083506. [https://doi.org/ 10.1063/1.4866460](https://doi.org/10.1063/1.4866460), Impakt faktor: 3,302
- (T2) **Farkas, E.**; Szekacs, A.; Kovacs, B.; Olah, M.; Horvath, R.; Szekacs, I. Label-free optical biosensor for real-time monitoring the cytotoxicity of xenobiotics: A proof of principle study on *glyphosate*. *J. Hazard. Mater.* **2018**, *351*, 80-89. [https://doi.org/ 10.1016/j.jhazmat.2018.02.045](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.02.045), Impakt faktor: 6.065
- (T3) Szekacs, I.; **Farkas, E.**; Gemes, B. L.; Takacs, E.; Szekacs, A.; Horvath, R. Integrin targeting of *glyphosate* and its cell adhesion modulation effects on osteoblastic MC3T3-E1 cells revealed by label-free optical biosensing. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 17401. [https://doi.org/ 10.1038/s41598-018-36081-0](https://doi.org/10.1038/s41598-018-36081-0), Impakt faktor: 4.259

### 9.2. A disszertációhoz közvetlenül nem kapcsolódó publikációk

- (1) **Farkas, E.**; Patko, D.; Khanh, N. Q.; Toth, E.; Vonderviszt, F.; Horvath, R. Self-assembly and structure of flagellin–polyelectrolyte composite layers: polyelectrolyte induced flagellar filament formation during the alternating deposition process, *RSC Advances*, **2016**, *6*, 92159-92167. [https://doi.org/ 10.1039/C6RA19010C](https://doi.org/10.1039/C6RA19010C), Impakt faktor: 3.108
- (2) **Farkas, E.**; Srankó, D.; Kerner, Zs.; Setner, B.; Szewczuk, Z.; Malinka, W.; Horvath, R.; Szyrwił, Ł.; Pap J. S. Self-assembled, nanostructured coatings for water oxidation by alternating deposition of Cu-branched peptide electrocatalysts and polyelectrolytes. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 5249-5259. <https://doi.org/10.1039/C6SC00595K>, Impakt faktor: 9.211
- (3) Peter, B.; **Farkas, E.**; Forgacs, E.; Saftics, A.; Kovacs, B.; Kurunczi, S.; Szekacs, I.; Csampai, A.; Bosze, Sz.; Horvath, R. Green tea polyphenol tailors cell adhesivity of RGD

displaying surfaces: multicomponent models monitored optically. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 42220. [https://doi.org/ 10.1038/srep42220](https://doi.org/10.1038/srep42220), Impakt faktor: 4.259

### 9.3. Konferenciaszereplések, előadások

- (1) **Farkas, E.** A *glyphosate* gyomirtószer-hatóanyag élettani hatása MC3T3-E1 sejtek adhéziójára. *A Magyar Biofizikai Társaság XXVII. Kongresszusa 2019*, Debrecen, előadás
- (2) **Farkas, E.;** Székács, I. Jelölésmentes optikai bioszenzorok alkalmazása xenobiotikumok sejtekre gyakorolt toxikus hatásának meghatározásához. *MKE előadói ülés 2019: Az MKE Elektroanalitikai és Szenzorikai szakcsoport szervezésében 2019*, Budapest, előadás
- (3) **Farkas, E.;** Székács, A.; Kovács, B.; Oláh, M.; Horváth, R.; Székács, I. Xenobiotikumok hatásának tanulmányozása MC3T3-E1 sejtvonalon jelölésmentes bioszenzorral. *Tavaszi Szél konferencia 2018*, Győr, előadás
- (4) **Farkas, E.;** Székács, A.; Kovács, B.; Oláh, M.; Horváth, R.; Székács, I. Jelölésmentes optikai bioszenzor alkalmazása xenobiotikumok letapadt sejtekre gyakorolt hatásának meghatározásához. *48. Membrán-transzport konferencia 2018*, Sümeg, poszter
- (5) Péter, B.; **Farkas, E.;** Forgács, E.; Saftics, A.; Kovács, B.; Kurunczi, S.; Székács, I.; Csámpai, A.; Bősze, Sz.; Horváth, R. A zöld tea polifenol hatása a sejtadhéziós mátrixra és a sejtadhézióra: vizsgálatok jelölésmentes optikai bioszenzorokkal. *48. Membrán-transzport konferencia 2018*, Sümeg, poszter
- (6) Péter, B.; **Farkas, E.;** Forgács, E.; Saftics, A.; Kovács, B.; Kurunczi, S.; Székács, I.; Csámpai, A.; Bősze, Sz.; Horváth, R. A zöld tea polifenol hatása a sejtadhéziós mátrixra és a sejtadhézióra: vizsgálatok jelölésmentes optikai bioszenzorokkal. *Analitikai Napok 2018 Az MKE Analitikai Szakosztály szervezésében „Új utakon az analitikában” 2018*, Balatonszemes, előadás

- (7) Kliment, K.; Mácsik-Valent, B.; Nagy, K.; Péter, B.; **Farkas, E.**; Székács, I.; Horváth, R.; Erdei, A.; Kurucz, I. Real-time Monitoring of Integrated Cellular Responses of Primary B Cells upon Simultaneous Receptor Engagement. *Magyar Immunológiai Társaság vándorgyűlése 2018*, Bükkfürdő, poszter
- (8) Székács, I.; **Farkas, E.**; Kovács, B.; Székács, A.; Horváth, R. A label-free high-throughput detection and quantification of cytotoxicity by the Epic BT optical biosensor. *Biosensor conference 2018*, Miami, előadás
- (9) **Farkas, E.**; Szekacs, A.; Kovacs, B.; Horvath, R.; Szekacs, I. Study of the effects of xenobiotics on attached mammalian cell line by label free biosensor. *ICONAN conference 2017*, Barcelona, előadás
- (10) Peter, B.; **Farkas, E.**; Forgacs, E.; Saftics, A.; Kovacs, B.; Kurunczi, S.; Szekacs, I.; Csampai, A.; Bosze, Sz.; Horvath, R. Zöld tea polifenol (EGCg) és a sejtadhéziós mátrix kölcsönhatásainak vizsgálata jelölésmentes optikai bioszenzorokkal. *MKE előadói ülés 2017: Az MKE Elektroanalitikai és Szenzorikai szakcsoport szervezésében. 2017*, Budapest, előadás
- (11) **Farkas, E.**; Székács, A.; Horváth, R.; Székács, I. Real-time label-free monitoring of cytotoxicity of xenobiotics. *PhD Summer School: Micro- and Nano Sensors 2017*, Koppenhága, előadás
- (12) Péter, B.; **Farkas, E.**; Forgács, E.; Saftics, A.; Kovács, B.; Kurunczi, S.; Székács, I.; Csámpai, A.; Bősze, Sz.; Horváth, R. Zöld tea polifenol (EGCg) és a sejtadhéziós mátrix kölcsönhatásainak vizsgálata jelölésmentes optikai bioszenzorokkal. *A Magyar Biofizikai Társaság XXVI. Kongresszusa 2017*, Szeged, előadás
- (13) **Farkas, E.**; Srankó, D.; Kerner, Zs.; Setner, B.; Szewczuk, Z.; Malinka, W.; Horváth, R.; Szyrwił, Ł.; Pap, J. S. A Layer-By-Layer technika alkalmazása heterogén katalizátor

- rétegek építésére vízoxidációra képes, elágazó láncú Cu-peptid/polielektrolit párokból.  
*Tavaszi Szél konferencia 2017*, Miskolc, előadás
- (14) Kliment, K.; Mácsik-Valent, B.; Péter, B.; **Farkas, E.**; Székács, I.; Horváth, R.; Erdei, A.; Kurucz, I. Label-free Real-time Monitoring of the Integrated Cellular Response in Primary B Cells. *46 Annual Meeting of the Hungarian Society for Immunology 2017*, Velence, poszter
- (15) **Farkas, E.** The layer-by-layer method and its prospective applications in catalysis. *Seminar Talks 2016*, Budapest, előadás
- (16) **Farkas, E.** Layer-by-layer assembly of functional nanocomposites. *Műszaki kémiai napok 2016*, Veszprém, előadás
- (17) Pap, J. S.; Kerner, Zs.; Srankó, D.; Szyrwił, Ł.; Szczukowski, Ł.; Setner, B.; Szewczuk, Z.; Malinka, W.; **Farkas, E.**; Gál, G.; Horvát, R. Cu complex with branched peptides in solution and anchored to electrode surface – redox properties and routes to water oxidation. *2nd Molecules for artificial photosynthesis conference 2016*, Cancun, Mexico, előadás
- (18) Pap, J. S.; Szyrwił, Ł.; Malinka, W.; Setner, B.; Szewczuk, Z.; Srankó, D.; **Farkas, E.**; Horvath, R. Cu-peptid komplexek felületen rögzítve és oldatban – redox sajátosságok és vízoxidáció. *MTA Katalízis Munkabizottság 2015*, Szeged, előadás
- (19) Pap, J. S.; Szyrwił, Ł.; Szczukowski, Ł.; Kerner, Zs.; Setner, B.; Szewczuk, Z.; Malinka, W.; **Farkas, E.**; Horváth, R. Elágazó láncú peptidek rézkomplexei - elektrokémiai víz oxidáció. *49. Komplex kémiai Kollokvium 2015*, Siófok, előadás
- (20) **Farkas, E.** Polielektrolit rétegek önszerveződésének in-situ vizsgálata optikai szenzorral. *Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar, TDK előadás 2011*, Budapest, előadás

- (21) Székács, I.; **Farkas, E.**; Székács, A.; Horváth, R. Nagy áteresztő képességű optikai bioszenzor sejttotoxicitás jelölésmentes vizsgálataihoz. *Magyar Biofizikai Társaság XXVI. Kongresszusa 2017*, Szeged, poszter
- (22) Székács, I.; **Farkas, E.**; Székács, A.; Horváth, R. A Label-free high-throughput optical biosensor for cytotoxicity studies. *FEBS Workshop Biological Surfaces and Interfaces, Interface dynamics conference 2017*, Sant Felin de Guixols, poszter
- (23) Kliment, K.; Macsik-Valent, B.; Peter, B.; **Farkas, E.**; Szekacs, I.; Horvath, R.; Erdei, A.; Kurucz, I. Label-free Real-time Monitoring of the Integrated Cellular Response in Primary B Cells. *Magyar Immunológiai Társaság vándorgyűlése 2017*, Velence, poszter
- (24) **Farkas, E.**; Székács, A.; Horváth, R.; Székács, I. Real-time label-free monitoring of cytotoxicity of xenobiotics. *PhD Summer School: Micro- and Nano Sensors 2017*, Koppenhága, poszter
- (25) Pap, J. S.; Szyrwił, Ł.; Setner, B.; Szewczuk, Z.; Malinka, W.; Kerner, Zs.; Srankó, D.; **Farkas, E.**; Horvath, R. Water Oxidation by Cu(II) Complexes with Branched Peptides. *17. International Symposium on Relations between Homogeneous and Heterogeneous Catalysis 2015*, Utrecht, poszter
- (26) **Farkas, E.**; Kovács, B.; Klein, Á.; Patkó, D.; Vonderviszt, F.; Horváth, R. Önszerveződő flagellin-polielektrolit rétegek. *Magyar Biofizikai Társaság XXIV. Kongresszusa 2013*, Veszprém, poszter
- (27) Kovács, B; **Farkas, E.**; Patkó, D.; Klein, Á.; Szemesné, Á.; Vonderviszt, F.; Horváth, R. Baktériumok felületi adhéziójának tanulmányozása OWLS-sel. *Magyar Biofizikai Társaság XXIV. Kongresszusa 2013*, Veszprém, poszter

## 10. Irodalomjegyzék

- (1) Farkas, E.; Srankó, D.; Kerner, Z.; Setner, B.; Szewczuk, Z.; Malinka, W.; Horvath, R.; Szyrwił, Ł.; Pap, J. S. Self-Assembled, Nanostructured Coatings for Water Oxidation by Alternating Deposition of Cu-Branched Peptide Electrocatalysts and Polyelectrolytes. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 5249–5259. <https://doi.org/10.1039/c6sc00595k>.
- (2) Farkas, E.; Patko, D.; Khanh, N. Q.; Toth, E.; Vonderviszt, F.; Horvath, R. Self-Assembly and Structure of Flagellin-Polyelectrolyte Composite Layers: Polyelectrolyte Induced Flagellar Filament Formation during the Alternating Deposition Process. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 92159–92167. <https://doi.org/10.1039/c6ra19010c>.
- (3) Xu, J. J.; Diaz, D.; O'Brien, P. J. Applications of Cytotoxicity Assays and Pre-Lethal Mechanistic Assays for Assessment of Human Hepatotoxicity Potential. *Chem. Biol. Interact.* **2004**, *150*, 115–128. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2004.09.011>.
- (4) Rosculete, C. A.; Bonciu, E.; Rosculete, E.; Olaru, L. A. Determination of the Environmental Pollution Potential of Some Herbicides by the Assessment of Cytotoxic and Genotoxic Effects on *Allium Cepa*. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2019**, *16*, 1–10. <https://doi.org/10.3390/ijerph16010075>.
- (5) Di Nunzio, M.; Valli, V.; Tomás-Cobos, L.; Tomás-Chisbert, T.; Murgui-Bosch, L.; Danesi, F.; Bordoni, A. Is Cytotoxicity a Determinant of the Different in Vitro and in Vivo Effects of Bioactives? *BMC Complement. Altern. Med.* **2017**, *17*, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1962-2>.
- (6) Aslantürk, Ö. S. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. In *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*; 2018. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71923>.
- (7) Tóth, K.; Gyurcsányi, R. E. Szenzorok Az Analitikai Kémiában. *Magy. Tudomány* **2002**, *12*, 1614–1623.
- (8) da Costa Silva, L. M.; dos Santos, V. P. S.; Salgado, A. M.; Pereira, K. S. Biosensors for Contaminants Monitoring in Food and Environment for Human and Environmental Health. In *State of the Art in Biosensors - Environmental and Medical Applications*; 2013. <https://doi.org/10.5772/55617>.
- (9) Mehrotra, P. Biosensors and Their Applications - A Review. *J. Oral Biol. Craniofac. Res.* **2016**, *6*, 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002>.
- (10) Orgovan, N.; Peter, B.; Bósze, Sz.; Ramsden, J. J.; Szabó, B.; Horvath, R. Dependence of Cancer Cell Adhesion Kinetics on Integrin Ligand Surface Density Measured by a High-Throughput Label-Free Resonant Waveguide Grating Biosensor. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 4034. <https://doi.org/10.1038/srep04034>.
- (11) Kurucz, I.; Peter, B.; Prosz, A.; Szekacs, I.; Horvath, R.; Erdei, A. Label-Free Optical Biosensor for on-Line Monitoring the Integrated Response of Human B Cells upon the Engagement of Stimulatory and Inhibitory Immune Receptors. *Sensors Actuators B.*

- Chem.* **2017**, *240*, 528–535. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.09.015>.
- (12) Peter, B.; Farkas, E.; Forgacs, E.; Saftics, A.; Kovacs, B.; Kurunczi, S.; Szekacs, I.; Csampai, A.; Bosze, S.; Horvath, R. Green Tea Polyphenol Tailors Cell Adhesivity of RGD Displaying Surfaces: Multicomponent Models Monitored Optically. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42220. <https://doi.org/10.1038/srep42220>.
  - (13) Monroy, C. M.; Cortés, A. C.; Sicard, D. M.; de Restrepo, M. G. [Cytotoxicity and Genotoxicity of Human Cells Exposed in Vitro to Glyphosate]. *Biomédica* **2005**, *25*, 335–345. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v25i3.1358>.
  - (14) Bolognesi, C.; Bonatti, S.; Degan, P.; Gallerani, E.; Peluso, M.; Rabboni, R.; Roggieri, P.; Abbondandolo, A. Genotoxic Activity of Glyphosate and Its Technical Formulation Roundup. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1957–1962. <https://doi.org/10.1021/jf9606518>.
  - (15) Prasad, S.; Srivastava, S.; Singh, M.; Shukla, Y. Clastogenic Effects of Glyphosate in Bone Marrow Cells of Swiss Albino Mice. *J. Toxicol.* **2009**, *2009*, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2009/308985>.
  - (16) Mesnage, R.; Defarge, N.; de Vendômois, J. S.; Séralini, G.-E. Major Pesticides Are More Toxic to Human Cells Than Their Declared Active Principles. *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/179691>.
  - (17) US Environmental Protection Agency. *Glyphosate Issue Paper : Evaluation of Carcinogenic Potential EPA 's Office of Pesticide Programs*; 2016.
  - (18) IARC. Some Organophosphate Insecticides and Herbicides. *IARC Monogr. Identif. Carcinog. Hazards to Humans* **2017**, *112*, 1–464.
  - (19) 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<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Cr<sup>3+</sup>, and Al<sup>3+</sup>. *Int. J. Quantum Chem.* **2012**, *112*, 2752–2762. <https://doi.org/10.1002/qua.23222>.
  - (20) Iovdijová, A.; Bencko, V. Potential Risk of Exposure to Selected Xenobiotic Residues and Their Fate in the Food Chain-Part I: Classification of Xenobiotics. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2010**, *17*, 183–192.
  - (21) Moltmann, J.F.; Rawson, D. M. *Applied Ecotoxicology*; CRC press, 1995.
  - (22) Ramel, C.; Drake, J.; Sugimura, T. An Evaluation of the Genetic Toxicity of Dichlorvos. *Mutat. Res. Genet. Toxicol.* **1980**, *76*, 297–309. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(80\)90021-4](https://doi.org/10.1016/0165-1110(80)90021-4).
  - (23) Proudfoot, A. T. Poisoning with Amitraz. *Toxicol. Rev.* **2003**, *22*, 71–74. <https://doi.org/10.2165/00139709-200322020-00001>.
  - (24) András Székács, B. D. Forty Years with Glyphosate. In *Herbicides-Properties, Synthesis and Control of Weeds*; 2012; 247–284.
  - (25) Gawarammana, I. B.; Buckley, N. A. Medical Management of Paraquat Ingestion. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2011**, *72*, 745–757. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2011.04026.x>.



- (26) Pathak, R. K.; Dikshit, A. K. Atrazine and Human Health. *Int. J. Ecosyst.* **2011**, *1*, 14–23. <https://doi.org/10.5923/j.ije.20110101.03>.
- (27) Li, J.; Ren, F.; Li, Y.; Luo, J.; Pang, G. Chlorpyrifos Induces Metabolic Disruption by Altering Levels of Reproductive Hormones. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 10553–10562. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03602>.
- (28) Reeves, W. R.; McGuire, M. K.; Stokes, M.; Vicini, J. L. Assessing the Safety of Pesticides in Food: How Current Regulations Protect Human Health. *Adv. Nutr.* **2019**, *10*, 80–88. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy061>.
- (29) Jayasumana, C.; Gunatilake, S.; Senanayake, P. Glyphosate , Hard Water and Nephrotoxic Metals : Are They the Culprits Behind the Epidemic of Chronic Kidney Disease of Unknown Etiology in Sri Lanka ? *Int. J. Environ. Res. Public Heal.* **2014**, *11*, 2125–2147. <https://doi.org/10.3390/ijerph110202125>.
- (30) Duke, S. O.; Powles, S. B. Glyphosate-Resistant Crops and Weeds : Now and in the Future. *AgBioForum* **2009**, *12*, 346–357.
- (31) Wolfenbarger, L. L.; Phifer, P. R. The Ecological Risks and Benefits Of. *Science.* **2000**, *290*, 2088–2094. <https://doi.org/10.1126/science.290.5499.2088>.
- (32) Monsanto. *ROUNDUP ® a Különleges Gyomirtószer.*
- (33) Benbrook, C. M. Trends in Glyphosate Herbicide Use in the United States and Globally. *Environ. Sci. Eur.* **2016**, *28*, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0>.
- (34) Silva, V.; Montanarella, L.; Jones, A.; Fernández-Ugalde, O.; Mol, H. G. J.; Ritsema, C. J.; Geissen, V. Distribution of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid (AMPA) in Agricultural Topsoils of the European Union. *Sci. Total Environ.* **2018**, *621*, 1352–1359. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.093>.
- (35) Gaupp-Berghausen, M.; Hofer, M.; Rewald, B.; Zaller, J. G. Glyphosate-Based Herbicides Reduce the Activity and Reproduction of Earthworms and Lead to Increased Soil Nutrient Concentrations. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep12886>.
- (36) AL-Daikh, E.B.; EL-Mabrouk, A.; EL Roby, A. S. M. H. Effect of Glyphosate Herbicide on the Behavior of Soil Arthropods in Non-Organic Tomato System. *Adv. Agric. Biol.* **2016**, *5*, 14–19. <https://doi.org/10.15192/pscp.aab.2016.5.1.1419>.
- (37) Johal, G. S.; Huber, D. M. Glyphosate Effects on Diseases of Plants. *Eur. J. Agron.* **2009**, *31*, 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2009.04.004>.
- (38) Zobiole, L. H. S.; Kremer, R. J.; Oliveira, R. S. J.; Constantin, J. Glyphosate Affects Micro-Organisms in Rhizospheres of Glyphosate-Resistant Soybeans. *J. Appl. Microbiol.* **2011**, *110*, 118–127. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04864.x>.
- (39) Schütte, G.; Eckerstorfer, M.; Rastelli, V.; Reichenbecher, W.; Restrepo-Vassalli, S.; Ruohonen-Lehto, M.; Saucy, A. G. W.; Mertens, M. Herbicide Resistance and Biodiversity: Agronomic and Environmental Aspects of Genetically Modified Herbicide-Resistant Plants. *Environ. Sci. Eur.* **2017**, *29*, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0100-y>.

- (40) Relyea, R. A. The Impact of Insecticides and Herbicides on the Biodiversity and Productivity of Aquatic Communities. *Ecol. Appl.* **2005**, *15*, 618–627. <https://doi.org/10.1890/03-5342>.
- (41) Stephenson, C. L.; Harris, C. A. An Assessment of Dietary Exposure to Glyphosate Using Refined Deterministic and Probabilistic Methods. *Food Chem. Toxicol.* **2016**, *95*, 28–41. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.06.026>.
- (42) Niemann, L.; Sieke, C.; Pfeil, R.; Solecki, R. A Critical Review of Glyphosate Findings in Human Urine Samples and Comparison with the Exposure of Operators and Consumers. *J. Consum. Prot. Food Saf.* **2015**, *10*, 3–12. <https://doi.org/10.1007/s00003-014-0927-3>.
- (43) Weaver, M. A.; Krutz, L. J.; Zablotowicz, R. M.; Reddy, K. N. Effects of Glyphosate on Soil Microbial Communities and Its Mineralization in a Mississippi Soil. *Pest Manag. Sci.* **2007**, *393*, 388–393. <https://doi.org/10.1002/ps>.
- (44) Reno, U.; Regaldo, L.; Vidal, E.; Mariani, M.; Zalazar, C.; Gagnetten, A. M. Water Polluted with Glyphosate Formulations : Effectiveness of a Decontamination Process Using *Chlorella Vulgaris* Growing as Bioindicator. *J. Appl. Phycol* **2016**, *28*, 2279–2286. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0755-6>.
- (45) Romero-Natale, A.; Palchetti, I.; Avelar, M.; González-Vergara, E.; Garate-Morales, J. L.; Torres, E. Spectrophotometric Detection of Glyphosate in Water by Complex Formation between Bis 5-Phenyldipyrinate of Nickel (II) and Glyphosate. *Water (Switzerland)* **2019**, *11*, 719. <https://doi.org/10.3390/w11040719>.
- (46) Relyea, R. A. The Lethal Impacts of Roundup and Predatory Stress on Six Species of North American Tadpoles. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2005**, *48*, 351–357. <https://doi.org/10.1007/s00244-004-0086-0>.
- (47) Gandhi, J. S.; Cecala, K. K. Interactive Effects of Temperature and Glyphosate on the Behavior of Blue Ridge Two-Lined Salamanders (*Eurycea Wilderae*). *Environ. Toxicol. Chem.* **2016**, *9999*, 1–7. <https://doi.org/10.1002/etc.3398>.
- (48) Gonçalves, B. B.; Giaquinto, P.C.; dos Santos Silva, D.; de Melo e Silva Neto, C.; de Lima, A. A.; Darosci, A. A. B.; Portinho, J. L.; Carvalho, W.F.; Rocha, T. L. Ecotoxicology of Glyphosate-Based Herbicides on Aquatic Environment. In *Organic Pollutants*; 2012; 1–24. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85157>.
- (49) Marc, J.; Mulner-lorillon, O. ; Bellé, R. Glyphosate-Based Pesticides Affect Cell Cycle Regulation. *Biol. Cell* **2004**, *96*, 245–249. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.11.010>.
- (50) Buhl, K. J.; Faerber, N. L. Acute Toxicity of Selected Herbicides and Surfactants to Larvae of the Midge *Chironomus Riparius*. *Arch. Environ. Contain. Toxicol.* **1989**, *18*, 530–536. <https://doi.org/10.1007/BF01055019>.
- (51) Frontera, J. L.; Gillette, N.; Hull, B.; Korang, J.; Amorim, C.; Vatnick, I.; Rodríguez, E. M. Effects of Glyphosate and Polyoxyethylene Amine on Metabolic Rate and Energy Reserves of *Procambarus Clarkii* Juveniles. *Open Environ. Sci.* **2014**, *8*, 49–53. <https://doi.org/10.2174/1876325101408010049>.
- (52) Antón, F. A.; Laborda, E.; de Ariz, M. Acute Toxicity of the Herbicide Glyphosate to

- Fish. *Chemosphere* **1994**, 28, 745–753. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(94\)90228-3](https://doi.org/10.1016/0045-6535(94)90228-3).
- (53) Antoniou, M.; Habib, M. E. M.; Howard, C. V.; Jennings, R. C.; Leifert, C.; Nodari, R. O.; Robinson, C. J.; Fagan, J. Teratogenic Effects of Glyphosate-Based Herbicides : Divergence of Regulatory Decisions from Scientific Evidence. *J. Environ. Anal. Toxicol.* **2012**, *S4*, 1–13. <https://doi.org/10.4172/2161-0525.S4-006>.
- (54) Paganelli, A.; Gnazzo, V.; Acosta, H.; López, S. L.; Carrasco, A. E. Glyphosate-Based Herbicides Produce Teratogenic Effects on Vertebrates by Impairing Retinoic Acid Signaling. *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 1586–1595. <https://doi.org/10.1021/tx1001749>.
- (55) Swanson, N. L.; Leu, A.; Abrahamson, J.; Wallet, B. Genetically Engineered Crops , Glyphosate and the Deterioration of Health in the United States of America. *J. Org. Syst.* **2014**, *9*, 6–37.
- (56) Beecham, J. E.; Seneff, S. Is There a Link between Autism and Glyphosate-Formulated Herbicides ? *J. Autism* **2016**, *3*, 1–13. <https://doi.org/10.7243/2054-992X-3-1>.
- (57) Samsel, A.; Seneff, S. Glyphosate , Pathways to Modern Diseases II : Celiac Sprue and Gluten Intolerance. *Interdiscip. Toxicol.* **2013**, *6*, 159–184. <https://doi.org/10.2478/intox-2013-0026>.
- (58) Henneberger, P. K.; Liang, X.; London, S. J.; Umbach, D. M.; Sandler, D.P.; Hoppin, J. A. Exacerbation of Symptoms in Agricultural Pesticide Applicators with Asthma. *Int Arch Occup Env. Heal.* **2014**, *87*, 423–432. <https://doi.org/10.1007/s00420-013-0881-x>.
- (59) Sten, E.; Skov, P. S.; Andersen, S. B.; Torp, A. M.; Olesen, A.; Bindslev-Jensen, U.; Poulsen, L. K.; Bindslev-Jensen, C. A Comparative Study of the Allergenic Potency of Wild-Type and Glyphosate-Tolerant Gene-Modified Soybean Cultivars. *APMIS* **2004**, *112*, 21–28. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2004.apm1120104.x>.
- (60) Mink, P. J.; Mandel, J. S.; Scurman, B. K.; Lundin, J. I. Epidemiologic Studies of Glyphosate and Cancer : A Review. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2012**, *63*, 440–452. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.05.012>.
- (61) Richard, S.; Moslemi, S.; Sipahutar, H.; Benachour, N.; Seralini, G.-E. Differential Effects of Glyphosate and Roundup on Human Placental Cells and Aromatase. *Environ. Heal. Perspect.* **2005**, *113*, 716–720. <https://doi.org/10.1289/ehp.7728>.
- (62) Krüger, M.; Shehata, A. A.; Schrödl, W.; Rodloff, A. Glyphosate Suppresses the Antagonistic Effect of Enterococcus Spp . on Clostridium Botulinum. *Anaerobe* **2013**, *20*, 74–78. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.01.005>.
- (63) Mesnage, R.; Defarge, N.; Spiroux de Vendomois, J.; Seralini, G.-E. Potential Toxic Effects of Glyphosate and Its Commercial Formulations below Regulatory Limits. *Food Chem. Toxicol.* **2015**, *84*, 133–153. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.08.012>.
- (64) Mallat, E.; Barceló, D. Analysis and Degradation Study of Glyphosate and of Aminomethylphosphonic Acid in Natural Waters by Means of Polymeric and Ion-Exchange Solid-Phase Extraction Columns Followed by Ion Chromatography-Post-Column Derivatization with Fluorescence Detection. *J. Chromatogr. A* **1998**, *823*, 129–136. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00362-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00362-8).

- (65) Valle, A. L.; Mello, F. C. C.; Alves-Balvedi, R. P.; Rodrigues, L. P.; Goulart, L. R. Glyphosate Detection: Methods, Needs and Challenges. *Environ. Chem. Lett.* **2018**, *17*, 291–317. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0789-5>.
- (66) Kataoka, H.; Horii, K.; Makita, M. Determination of the Herbicide Glyphosate and Its Metabolite (Aminomethyl)Phosphonic Acid by Gas Chromatography with Flame Photometric Detection. *Agric. Biol. Chem.* **1991**, *55*, 195–198. <https://doi.org/10.1080/00021369.1991.10870519>.
- (67) Hu, J.-Y.; Chen, C.-L.; Li, J.-Z. A Simple Method for the Determination of Glyphosate Residues in Soil by Capillary Gas Chromatography with Nitrogen Phosphorus. *J. Anal. Chem.* **2008**, *63*, 371–375. <https://doi.org/10.1134/s1061934808040102>.
- (68) Royer, A.; Beguin, S.; Tabet, J. C.; Hulot, S.; Reding, M. A.; Communal, P. Y. Determination of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid Residues in Water by Gas Chromatography with Tandem Mass Spectrometry after Exchange Ion Resin Purification and Derivatization. Application on Vegetable Matrixes. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3826–3832. <https://doi.org/10.1021/ac000041d>.
- (69) Kudzin, Z. H.; Gralak, D. K.; Drabowicz, J.; Łuczak, J. Novel Approach for the Simultaneous Analysis of Glyphosate and Its Metabolites. *J. Chromatogr. A* **2002**, *947*, 129–141. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01603-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01603-X).
- (70) Wang, S.; Liu, B.; Yuan, D.; Ma, J. A Simple Method for the Determination of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid in Seawater Matrix with High Performance Liquid Chromatography and Fluorescence Detection. *Talanta* **2016**, *161*, 700–706. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.09.023>.
- (71) Guo, Z.-X.; Cai, Q.; Yang, Z. Ion Chromatography/Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for Simultaneous Determination of Glyphosate, Glufosinate, Fosamine and Ethephon at Nanogram Levels in Water. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 1606–1612. <https://doi.org/10.1002/rcm.3003>.
- (72) Liao, Y.; Berthion, J.-M.; Colet, I.; Merlo, M.; Nougadère, A.; Hu, R. Validation and Application of Analytical Method for Glyphosate and Glufosinate in Foods by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2018**, *1549*, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.03.036>.
- (73) Khrolenko, M. V.; Wiczorek, P. P. Determination of Glyphosate and Its Metabolite Aminomethylphosphonic Acid in Fruit Juices Using Supported-Liquid Membrane Preconcentration Method with High-Performance Liquid Chromatography and UV Detection after Derivatization with p-Toluenesulphonyl Chl. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1093*, 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.07.062>.
- (74) Jan, M. R.; Shah, J.; Muhammad, M.; Ara, B. Glyphosate Herbicide Residue Determination in Samples of Environmental Importance Using Spectrophotometric Method. *J. Hazard. Mater.* **2009**, *169*, 742–745. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.04.003>.
- (75) Lee, H. U.; Shin, H. Y.; Lee, J. Y. .; Song, Y. S.; Park, C.; Kim, S. W. Quantitative Detection of Glyphosate by Simultaneous Analysis of UV Spectroscopy and Fluorescence

- Using DNA-Labeled Gold Nanoparticles. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 12096–12100. <https://doi.org/10.1021/jf102784t>.
- (76) Mörtl, M.; Németh, G.; Juracsek, J.; Darvas, B.; Kamp, L.; Rubio, F.; Székács, A. Determination of Glyphosate Residues in Hungarian Water Samples by Immunoassay. *Microchem. J.* **2013**, *107*, 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.05.021>.
- (77) Cikalo, M. G.; Goodall, D. M.; Matthews, W. Analysis of Glyphosate Using Capillary Electrophoresis with Indirect Detection. *J. Chromatogr. A* **1996**, *745*, 189–200. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(96\)00265-8](https://doi.org/10.1016/0021-9673(96)00265-8).
- (78) Chang, S. Y.; Liao, C.-H. Analysis of Glyphosate, Glufosinate and Aminomethylphosphonic Acid by Capillary Electrophoresis with Indirect Fluorescence Detection. *J. Chromatogr. A* **2002**, *959*, 309–315. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00453-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00453-3).
- (79) Goodwin, L.; Startin, J. R.; Keely, B. J.; Goodall, D. M. Analysis of Glyphosate and Glufosinate by Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry Utilising a Sheathless Microelectrospray Interface. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1004*, 107–119. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00572-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00572-7).
- (80) Torul, H.; Boyaci, I. H.; Tamer, U. Attomole Detection of Glyphosate by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Using Gold Nanorods. *Fabad J. Pharm. Sci.* **2010**, *35*, 179–184.
- (81) Dickson, S. J.; Meinhold, R. H.; Beer, I. D.; Koelmeyer, T. D. Rapid Determination of Glyphosate in Postmortem Specimens Using <sup>31</sup>P NMR. *J. Anal. Toxicol.* **1988**, *12*, 284–286. <https://doi.org/10.1093/jat/12.5.284>.
- (82) Bendas, G. ; Borsig, L. Cancer Cell Adhesion and Metastasis: Selectins, Integrins, and the Inhibitory Potential of Heparins. *Int. J. Cell Biol.* **2012**, *2012*, 676731. <https://doi.org/10.1155/2012/676731>.
- (83) Juliano, R. L. Signal Transduction by Cell Adhesion Receptors and the Cytoskeleton: Functions of Integrins, Cadherins, Selectins, and Immunoglobulin-Superfamily Members. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2002**, *42*, 283–323. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.42.090401.151133>.
- (84) Kwon, M. J.; Jang, B.; Yi, J. Y.; Han, I. O.; Oh, E. S. Syndecans Play Dual Roles as Cell Adhesion Receptors and Docking Receptors. *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 2207–2211. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.05.037>.
- (85) Wai Wong, C.; Dye, D. E.; Coombe, D. R. The Role of Immunoglobulin Superfamily Cell Adhesion Molecules in Cancer Metastasis. *Int. J. Cell Biol.* **2012**, *2012*. <https://doi.org/10.1155/2012/340296>.
- (86) Khalili, A. A.; Ahmad, M. R. A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 18149–18184. <https://doi.org/10.3390/ijms160818149>.
- (87) Zhang, K.; Chen, J. The Regulation of Integrin Function by Divalent Cations. *Cell Adh. Migr.* **2012**, *6*, 20–29. <https://doi.org/10.4161/cam.18702>.

- (88) Marsico, G.; Russo, L.; Quondamatteo, F.; Pandit, A. . Glycosylation and Integrin Regulation in Cancer. *Trends Cancer*. **2018**, *4*, 537–552. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2018.05.009>.
- (89) Barczyk, M.; Carracedo, S.; Gullberg, D. Integrins. *Cell Tissue Res*. **2010**, *339*, 269–280. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0834-6>.
- (90) García, A. J. Get a Grip: Integrins in Cell-Biomaterial Interactions. *Biomaterials* **2005**, *26*, 7525–7529. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.05.029>.
- (91) Anderson, L. R.; Owens, T. W.; Naylor, M. J. Structural and Mechanical Functions of Integrins. *Biophys. Rev*. **2014**, *6*, 203–213. <https://doi.org/10.1007/s12551-013-0124-0>.
- (92) Danen, E. H. J. Integrins : An Overview of Structural and Functional Aspects. In *Madame Curie Bioscience Database*.
- (93) Nevo, J. *Novel Players in the Integrin Signaling Orchestra : Tcptp and Mdgi*; 2010.
- (94) Pampusheva, E.; Heisenberg, C. P. Spatial Organization of Adhesion: Force-Dependent Regulation and Function in Tissue Morphogenesis. *EMBO J*. **2010**, *29*, 2753–2768. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.182>.
- (95) Honarmandi, P.; Lee, H.; Lang, M. J.; Kamm, R. D. A Microfluidic System with Optical Laser Tweezers to Study Mechanotransduction and Focal Adhesion Recruitment. *Lab Chip* **2011**, *11*, 684–694. <https://doi.org/10.1039/c0lc00487a>.
- (96) Haanen, C.; Vermes, I. Apoptosis and Inflammation. *Mediators Inflamm*. **1995**, *4*, 5–15. <https://doi.org/10.1155/S0962935195000020>.
- (97) Kiess, W.; Gallaher, B. Hormonal Control of Programmed Cell Death/Apoptosis. *Eur. J. Endocrinol*. **1998**, *138*, 482–491. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1380482>.
- (98) Danial, N. N.; Korsmeyer, S. J. Cell Death: Critical Control Points. *Cell* **2004**, *116*, 205–219. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00046-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00046-7).
- (99) Brandstadter, J. D.; Yang, Y. Natural Killer Cell Responses to Viral Infection. *J. Innate Immun*. **2011**, *3*, 274–279. <https://doi.org/10.1159/000324176>.
- (100) Frisch, S. M.; Screaton, R. A. Anoikis Mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol*. **2001**, *13*, 555–562. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00251-9](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00251-9).
- (101) McIlwain, D. R.; Berger, T.; Mak, T. W. Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. **2013**, *5*, 1–28. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008656>.
- (102) Kim-Campbell, N.; Gomez, H.; Bayir, H. Cell Death Pathways: Apoptosis and Regulated Necrosis. In *Critical Care Nephrology: Third Edition*; 2017; 1–11. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44942-7.00020-0>.
- (103) Majno, G.; Joris, I. Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. An Overview of Cell Death. *Am. J. Pathol*. **1995**, *146*, 3–15.
- (104) Goodlet, C. R.; Horn, K. H. Mechanisms of Alcohol- Induced Damage to the Developing

- Nervous System. *Alcohol Res. Heal.* **2001**, *25*, 175–184.
- (105) Shubin, A. V.; Demidyuk, I. V.; Komissarov, A. A.; Rafieva, L. M.; Kostrov, S. V. Cytoplasmic Vacuolization in Cell Death and Survival. *Oncotarget* **2016**, *7*, 55863–55889. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10150>.
- (106) Meredith, J. E. J.; Schwartz, M. A. Integrins, Adhesion and Apoptosis. *Trends Cell Biol.* **1997**, *7*, 146–150. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(97\)01002-7](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(97)01002-7).
- (107) Omiecinski, C. J.; Vanden Heuvel, J. P.; Perdew, G. H.; Peters, J. M. Xenobiotic Metabolism, Disposition, and Regulation by Receptors: From Biochemical Phenomenon to Predictors of Major Toxicities. *Toxicol. Sci.* **2011**, *120*, S49–S75. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq338>.
- (108) Henkler, F.; Luch, A. Adverse Health Effects of Environmental Chemical Agents through Non-Genotoxic Mechanisms. *J. Epidemiol. Community Health* **2011**, *65*, 1–3. <https://doi.org/10.1136/jech.2008.083881>.
- (109) Penning, T. M. Chemical Carcinogenesis. *Springer* **2011**, *274*, 1–446.
- (110) Barouki, R.; Coumoul, X. Cell Migration and Metastasis Markers as Targets of Environmental Pollutants and the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Cell Adhes. Migr.* **2010**, *4*, 72–76. <https://doi.org/10.4161/cam.4.1.10313>.
- (111) Monroy, C. M.; Cortés, A. C.; Sicard, D. M.; de Restrepo, H. G. Citotoxicidad y Genotoxicidad En Células Humanas Expuestas in Vitro a Glifosato. *Biomédica* **2005**, *25*, 335–345. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v25i3.1358>.
- (112) Mañas, F.; Peralta, L.; Raviolo, J.; Ovando, H. G.; Weyers, A.; Ugnia, L.; Cid, M. G.; Larripa, I.; Gorla, N. Genotoxicity of Glyphosate Assessed by the Comet Assay and Cytogenetic Tests. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2009**, *28*, 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.02.001>.
- (113) Benachour, N.; Séralini, G.-E. Glyphosate Formulations Induce Apoptosis and Necrosis in Human Umbilical, Embryonic, and Placental Cells. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 97–105. <https://doi.org/10.1021/tx800218n>.
- (114) Heu, C.; Elie-Caille, C.; Mougey, V.; Launay, S.; Nicod, L. A Step Further toward Glyphosate-Induced Epidermal Cell Death: Involvement of Mitochondrial and Oxidative Mechanisms. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2012**, *34*, 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.02.010>.
- (115) Mesnage, R.; Phedonos, A.; Biserni, M.; Arno, M.; Balu, S.; Corton, J. C.; Ugarte, R.; Antoniou, M. N. Evaluation of Estrogen Receptor Alpha Activation by Glyphosate-Based Herbicide Constituents. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *108*, 30–42. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.07.025>.
- (116) Young, F.; Ho, D.; Glynn, D.; Edwards, V. Endocrine Disruption and Cytotoxicity of Glyphosate and Roundup in Human JAr Cells in Vitro. *Integr. Pharmacol. Toxicol. Genotoxicol.* **2015**, *1*, 70–76. <https://doi.org/10.15761/iptg.1000114>.
- (117) Townsend, M.; Peck, C.; Meng, W.; Heaton, M.; Robison, R.; O’Neill, K. Evaluation of

- Various Glyphosate Concentrations on DNA Damage in Human Raji Cells and Its Impact on Cytotoxicity. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2017**, *85*, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.02.002>.
- (118) Farkas, E.; Szekacs, A.; Kovacs, B.; Olah, M.; Horvath, R.; Szekacs, I. Label-Free Optical Biosensor for Real-Time Monitoring the Cytotoxicity of Xenobiotics: A Proof of Principle Study on Glyphosate. *J. Hazard. Mater.* **2018**, *351*, 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.02.045>
- (119) Székács, I.; Fejes, Á.; Klátyik, S.; Takács, E.; Patkó, D.; Pomóthy, J.; Mörtl, M.; Horváth, R.; Madarász, E.; Darvas, B.; Székács, A. Environmental and Toxicological Impacts of Glyphosate with Its Formulating Adjuvant. *Int. J. Biol. Vet.* **2014**, *8*, 213–218.
- (120) Coullery, R. P.; Ferrari, M. E.; Rosso, S. B. Neuronal Development and Axon Growth Are Altered by Glyphosate through a WNT Non-Canonical Signaling Pathway. *Neurotoxicology* **2016**, *52*, 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.12.004>.
- (121) Xu, J.; Li, G.; Wang, Z.; Si, L.; He, S.; Cai, J.; Huang, J.; Donovan, M. D. The Role of L-Type Amino Acid Transporters in the Uptake of Glyphosate across Mammalian Epithelial Tissues. *Chemosphere* **2016**, *145*, 487–494. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.11.062>.
- (122) Kwiatkowska, M.; Jarosiewicz, P.; Michałowicz, J.; Koter-Michalak, M.; Huras, B.; Bukowska, B. The Impact of Glyphosate, Its Metabolites and Impurities on Viability, ATP Level and Morphological Changes in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *PLoS One* **2016**, *11*, e0156946. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156946>.
- (123) Defarge, N.; Takács, E.; Lozano, V. L.; Mesnage, R.; Spiroux de Vendômois, J.; Séralini, G.-E.; Székács, A. Co-Formulants in Glyphosate-Based Herbicides Disrupt Aromatase Activity in Human Cells below Toxic Levels. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2016**, *13*, 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijerph13030264>.
- (124) Lajmanovich, R. C.; Sandoval, M. T.; Peltzer, P. M. Induction of Mortality and Malformation in *Scinax Nasicus* Tadpoles Exposed to Glyphosate Formulations. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2003**, *70*, 612–618. <https://doi.org/10.1007/s00128-003-0029-x>.
- (125) de Souza, J. S.; Kizys, M. M. L.; da Conceição, R. R.; Glebocki, G.; Romano, R. M.; Ortiga-Carvalho, T. M.; Giannocco, G.; da Silva, I. D. C. G.; Dias da Silva, M. R.; Romano, M. A.; Chiamolera, M. I. Perinatal Exposure to Glyphosate-Based Herbicide Alters the Thyrotrophic Axis and Causes Thyroid Hormone Homeostasis Imbalance in Male Rats. *Toxicology* **2016**, *377*, 25–37. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.11.005>.
- (126) Mesnage, R.; Bernay, B.; Séralini, G.-E. Ethoxylated Adjuvants of Glyphosate-Based Herbicides Are Active Principles of Human Cell Toxicity. *Toxicology* **2013**, *313*, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.09.006>.
- (127) Präbst, K.; Engelhardt, H.; Ringgeler, S.; Hübner, H. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. In *Methods in Molecular Biology*; 2017; 1601, 1–17. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_1).



- (128) Bhuyan, B. K.; Loughman, B. E.; Fraser, T. J.; Day, K. J. Comparison of Different Methods of Determining Cell Viability after Exposure to Cytotoxic Compounds. *Exp. Cell Res.* **1976**, *97*, 275–280. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(76\)90617-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(76)90617-0).
- (129) Krause, A. W.; Carley, W. W.; Webb, W. W. Fluorescent Erythrosin B Is Preferable to Trypan Blue as a Vital Exclusion Dye for Mammalian Cells in Monolayer Culture. *J. Histochem. Cytochem.* **1984**, *32*, 1084–1090. <https://doi.org/10.1177/32.10.6090533>.
- (130) Weisenthal, L.M.; Dill, P.L.; Kurnick, N.B.; Lippman, M. E. Comparison of Dye Exclusion Assays with a Clonogenic Assay in the Determination of Drug-Induced Cytotoxicity. *Cancer Res.* **1983**, *43*, 258–264.
- (131) Son, Y.-O.; Kim, J.; Lim, J.-C.; Chung, Y.; Chung, G.-H.; Lee, J.-C. Ripe Fruits of *Solanum Nigrum* L. Inhibits Cell Growth and Induces Apoptosis in MCF-7 Cells. *Food Chem. Toxicol.* **2003**, *41*, 1421–1428. [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(03\)00161-3](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(03)00161-3).
- (132) Lee, J. C.; Lee, K. Y.; Son, Y. O.; Choi, K. C.; Kim, J.; Truong, T. T.; Jang, Y. S. Plant-Originated Glycoprotein, G-120, Inhibits the Growth of MCF-7 Cells and Induces Their Apoptosis. *Food Chem. Toxicol.* **2005**, *43*, 961–968. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.02.002>.
- (133) Acharya, S.; Kuppili, R. R.; Chaganti, L. K.; Bose, K. *Proteases in Apoptosis: Protocols and Methods*; 2015. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-19497-4\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-19497-4_5).
- (134) King, A. AlamarBlue™ Cell Viability Assay Reagent. *Thermo Sci.* **2012**, *0747*, 1–7.
- (135) Gerlier, D.; Thomasset, N. Use of MTT Colorimetric Assay to Measure Cell Activation. *J. Immunol. Methods* **1986**, *94*, 57–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90215-2](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90215-2).
- (136) Supino, R. MTT Assays. In *In Vitro Toxicity Testing Protocols*; 2009; *43*, 137–149. <https://doi.org/10.1385/0-89603-282-5:137>.
- (137) Riss, T. L.; Moravec, R. A.; Niles, A. L.; Duellman, S.; Benink, H. A.; Worzella, T. J.; Minor, L. Cell Viability Assays. *Eli Lilly Co. Natl. Cent. Adv. Transl. Sci.* **2016**, *2004*, 1–31.
- (138) Berg, K.; Zhai, L.; Chen, M.; Kharazmi, A.; Owen, T. C. The Use of a Water-Soluble Formazan Complex to Quantitate the Cell Number and Mitochondrial Function of *Leishmania Major* Promastigotes. *Parasitol. Res.* **1994**, *80*, 235–239. <https://doi.org/10.1007/BF00932680>.
- (139) Tominaga, H.; Ishiyama, M.; Ohseto, F.; Sasamoto, K.; Hamamoto, T.; Suzuki, K.; Watanabe, M. A Water-Soluble Tetrazolium Salt Useful for Colorimetric Cell Viability Assay. *Anal. Commun.* **1999**, *36*, 47–50. <https://doi.org/10.1039/a809656b>.
- (140) Scudiero, D. A.; Shoemaker, R. H.; Paull, K. D.; Monks, A.; Tierney, S.; Nofziger, T. H.; Currens, M. J.; Seniff, D.; Boyd, M. R. Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. *Cancer Res.* **1988**, *48*, 4827–4833.
- (141) Ngamwongsatit, P.; Banada, P. P.; Panbangred, W.; Bhunia, A. K. WST-1-Based Cell Cytotoxicity Assay as a Substitute for MTT-Based Assay for Rapid Detection of

- Toxigenic Bacillus Species Using CHO Cell Line. *J. Microbiol. Methods* **2008**, *73*, 211–215. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.03.002>.
- (142) <https://www.vitascientific.com/colorimetric-cell-proliferation-and-cytotoxicity-assay-cell-counting-kit-8-cck-8-various-kit-sizes.html>.
- (143) Decker, T.; Lohmann-Matthes, M. L. A Quick and Simple Method for the Quantitation of Lactate Dehydrogenase Release in Measurements of Cellular Cytotoxicity and Tumor Necrosis Factor (TNF) Activity. *J. Immunol. Methods* **1988**, *115*, 61–69. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(88\)90310-9](https://doi.org/10.1016/0022-1759(88)90310-9).
- (144) Lappalainen, K.; Jääskeläinen, I.; Syrjänen, K.; Urtti, A.; Syrjänen, S. Comparison of Cell Proliferation and Toxicity Assays Using Two Cationic Liposomes. *Pharm. Res.* **1994**, *11*, 1127–1131. <https://doi.org/10.1023/A:1018932714745>.
- (145) [Http://www.Enzolifesciences.Com/Science-Center/Technotes/2018/August/Cell-Based-Assay-or-Biochemical-Assay-Now-That-s-the-Question/](http://www.Enzolifesciences.Com/Science-Center/Technotes/2018/August/Cell-Based-Assay-or-Biochemical-Assay-Now-That-s-the-Question/). 2018.
- (146) Butterick, T. A.; Duffy, C. M.; Lee, R. E.; Billington, C. J.; Kotz, C. M.; Nixon, J. P. Use of a Caspase Multiplexing Assay to Determine Apoptosis in a Hypothalamic Cell Model. *J. Vis. Exp.* **2014**, *86*, 1–6. <https://doi.org/10.3791/51305>.
- (147) Page, B.; Page, M.; Noel, C. A New Fluorometric Assay for Cytotoxicity Measurements in Vitro. *Int. J. Oncol.* **1993**, *3*, 473–476. <https://doi.org/10.3892/ijo.3.3.473>.
- (148) O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue (Resazurin) Fluorescent Dye for the Assessment of Mammalian Cell Cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5421–5426. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>.
- (149) Sittampalam, G.; Coussens, N.; Arkin, M.; Auld, D.; Austin, C.; Bejcek, B.; Glicksman, M.; Inglese, J.; Iversen, P.; Mcgee, J.; et al. *Assay Guidance Manual*; Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2016.
- (150) Duellman, S. J.; Zhou, W.; Meisenheimer, P.; Vidugiris, G.; Cali, J. J.; Gautam, P.; Wennerberg, K.; Vidugiriene, J. Bioluminescent, Nonlytic, Real-Time Cell Viability Assay and Use in Inhibitor Screening. *Assay Drug Dev. Technol.* **2015**, *13*, 456–465. <https://doi.org/10.1089/adt.2015.669>.
- (151) Mueller, H.; Kassack, M. U.; Wiese, M. Comparison of the Usefulness of the MTT, ATP, and Calcein Assays to Predict the Potency of Cytotoxic Agents in Various Human Cancer Cell Lines. *J. Biomol. Screen.* **2004**, *9*, 506–515. <https://doi.org/10.1177/1087057104265386>.
- (152) García, O.; Massieu, L. Glutamate Uptake Inhibitor L-Trans-Pyrrolidine 2,4-Dicarboxylate Becomes Neurotoxic in the Presence of Subthreshold Concentrations of Mitochondrial Toxin 3-Nitropropionate: Involvement of Mitochondrial Reducing Activity and ATP Production. *J. Neurosci. Res.* **2003**, *74*, 956–966. <https://doi.org/10.1002/jnr.10825>.
- (153) Bhardwaj, V.; Mcgoron, A. J. Biosensor Technology for Chemical and Biological Toxins: Progress and Prospects. *Phot. J. Biomed. Eng.* **2014**, *112*, 380–392.

- (154) Perumal, V.; Hashim, U. Advances in Biosensors : Principle , Architecture and Applications. *J. Appl. Biomed.* **2014**, *12*, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jab.2013.02.001>.
- (155) Banerjee, P.; Kintzios, S.; Prabhakarapandian, B. Biotxin Detection Using Cell-Based Sensors. *Toxins (Basel)*. **2013**, *5*, 2366–2383. <https://doi.org/10.3390/toxins5122366>.
- (156) Hollis, R. P.; Killham, K.; Glover, L. A. Design and Application of a Biosensor for Monitoring Toxicity of Compounds to Eukaryotes. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 1676–1679. <https://doi.org/10.1128/aem.66.4.1676-1679.2000>.
- (157) Zhao, G.; Wang, H.; Liu, G. Advances in Biosensor-Based Instruments for Pesticide Residues Rapid Detection. *Int. J. Electrochem Sci.* **2015**, *10*, 9790–9807.
- (158) Székács, I.; Horvath, R.; Székács, A. Label-Free Optical Biosensors for Monitoring Cellular Processes and Cytotoxic Agents at Interfaces Using Guided Modes and Advanced Phase-Contrast Imaging Techniques. In *Biosensors for Security and Bioterrorism Applications*; 2016; 443–468. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-28926-7\\_21](https://doi.org/10.1007/978-3-319-28926-7_21).
- (159) Xiao, C.; Luong, J. H. T. Assessment of Cytotoxicity by Emerging Impedance Spectroscopy. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *206*, 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.10.025>.
- (160) Siddiquei, H. R.; Nordin, A. N.; Ibrahimy, M. I.; Arifin, M. A.; Sulong, N. H.; Mel, M.; Voiculescu, I. Electrical Cell-Substrate Impedance Sensing ( ECIS ) Based Biosensor for Characterization of DF-1 Cells. *IEEE Xplore* **2010**, *6*, 1–4. <https://doi.org/10.1109/ICCCE.2010.5556772>.
- (161) Primiceri, E.; Chiriaco, M. S.; D’Amone, E.; Urso, E.; Ionescu, R. E.; Rizzello, A.; Maffia, M.; Cingolani, R.; Rinaldi, R.; Maruccio, G. Real-Time Monitoring of Copper Ions-Induced Cytotoxicity by EIS Cell Chips. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 2711–2716. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.04.032>.
- (162) Alpat, S.; Alpat, S. K.; Cadirci, B. H.; Yasa, I.; Telefoncu, A. A Novel Microbial Biosensor Based on *C. Ircinella* Sp . Modified Carbon Paste Electrode and Its Voltammetric Application. *Sensors Actuators B Chem.* **2008**, *134*, 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2008.04.044>.
- (163) Zhu, X.; Wu, G.; Lu, N.; Yuan, X.; Li, B. A Miniaturized Electrochemical Toxicity Biosensor Based on Graphene Oxide Quantum Dots / Carboxylated Carbon Nanotubes for Assessment of Priority Pollutants. *J. Hazard. Mater.* **2017**, *324*, 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.10.057>.
- (164) Y. Lei, P. Mulchandani, J. Wang, W. Chen, A. M. Highly Sensitive and Selective Amperometric Microbial Biosensor for Direct Determination of p -Nitrophenyl-Substituted Organophosphate Nerve Agents. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 8853–8857. <https://doi.org/10.1021/es050720b>.
- (165) Wang, X.; Liu, M.; Wang, X.; Wu, Z.; Yang, L.; Xia, S.; Chen, L.; Zhao, J. P-Benzoquinone-Mediated Amperometric Biosensor Developed with *Psychrobacter* Sp. for Toxicity Testing of Heavy Metals. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *41*, 557–562. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.09.020>.

- (166) Hughes, G.; Pemberton, R. M.; Fielden, P. R.; Hart, J. P. A Novel Reagentless Glutamate Microband Biosensor for Real-Time Cell Toxicity Monitoring. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *933*, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.06.005>.
- (167) Wang, Y.; Chen, Q.; Zeng, X. Potentiometric Biosensor for Studying Hydroquinone Cytotoxicity in Vitro. *Biosens Bioelectron* **2009**, *25*, 1356–1362. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.10.027>.
- (168) May, K. M.; Wang, Y.; Bachas, L. G.; Anderson, K. W. Development of a Whole-Cell-Based Biosensor for Detecting Histamine as a Model Toxin. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4156–4161. <https://doi.org/10.1021/ac049810+>.
- (169) Grieshaber, D.; MacKenzie, R.; Vörös, J.; Reimhult, E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors* **2008**, *8*, 1400–1458. <https://doi.org/10.3390/580314000>.
- (170) Marx, K. A.; Zhou, T.; Montrone, A.; Schulze, H.; Braunhut, S. J. A Quartz Crystal Microbalance Cell Biosensor : Detection of Microtubule Alterations in Living Cells at NM Nocodazole Concentrations. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 773–782. [https://doi.org/10.1016/s0956-5663\(01\)00219-6](https://doi.org/10.1016/s0956-5663(01)00219-6).
- (171) Zhang, S.; Bai, H.; Pi, J.; Yang, P.; Cai, J. Label-Free Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring of Resveratrol Effect on Mechanical Changes and Folate Receptor Expression Levels of Living MCF-7 Cells: A Model for Screening of Drugs. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 4797–4805. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00083>.
- (172) Chisti, M. M.; Tan, L.; Klamerus, J. F.; Lin, P.; Jaiyesimi, I.; Rehman, A.; Zeng, X. Quartz Crystal Microbalance ( QCM ) Piezo-Immunosensors : A Novel Technique to Study CD20 Antigen Interaction with Rituximab and Its Clinical Implications Quartz Crystal Microbalance ( QCM ) Piezo-Immunosensors : A Novel Technique to Study CD20 Antigen In. *Blood J.* **2014**, *124*, 4807. <https://doi.org/10.1182/blood.v124.21.4807.4807>.
- (173) Maglio, O.; Costanzo, S.; Cercola, R.; Zambrano, G.; Mauro, M.; Battaglia, R.; Ferrini, G.; Nastri, F.; Pavone, V.; Lombardi, A. A Quartz Crystal Microbalance Immunosensor for Stem Cell Selection and Extraction. *Sensors* **2017**, *17*, 1–14. <https://doi.org/10.3390/s17122747>.
- (174) Wang, G.; Dewilde, A. H.; Zhang, J.; Pal, A.; Vashist, M.; Bello, D.; Marx, K. A.; Braunhut, S. J.; Therrien, J. M. A Living Cell Quartz Crystal Microbalance Biosensor for Continuous Monitoring of Cytotoxic Responses of Macrophages to Single-Walled Carbon Nanotubes. *Part. Fibre Toxicol* **2011**, *8*, 1–17. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-8-4>.
- (175) Chen, J. Y.; Penn, L. S.; Xi, J. Quartz Crystal Microbalance : Sensing Cell-Substrate Adhesion and Beyond. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *99*, 593–602. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.08.032>.
- (176) Peter, B.; Nador J.; Juhasz, K.; Dobos, A.; Körösi, L.; Székács, I.; Patko, D.; Horvath, R. Incubator Proof Miniaturized Holomonitor to in Situ Monitor Cancer Cells Exposed to Green Tea Polyphenol and Preosteoblast Cells Adhering on Nanostructured Titanate Surfaces: Validity of the Measured Parameters and Their Corrections. *J. Biomed. Opt.* **2015**, *20*, 067002. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.6.067002>.

- (177) Kühn, J.; Shaffer, E.; Mena, J.; Breton, B.; Parent, J.; Rappaz, B.; Chambon, M.; Emery, Y.; Magistretti, P.; Depeursinge, C.; Marquet, P.; Turcatti, G. Label-Free Cytotoxicity Screening Assay by Digital Holographic Microscopy. *Assay Drug Dev. Technol.* **2013**, *11*, 101–107. <https://doi.org/10.1089/adt.2012.476>.
- (178) Mölder, A.; Sebesta, M.; Gustafsson, M.; Gisselson, L.; Wingren, A. G.; Alm, K. Non-Invasive , Label-Free Cell Counting and Quantitative Analysis of Adherent Cells Using Digital Holography. *J. Microsc.* **2008**, *232*, 240–247. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2818.2008.02095.x>.
- (179) Choi, J.-W.; Park, K.-W.; Lee, D.-B.; Lee, W.; Lee, W. H. Cell Immobilization Using Self-Assembled Synthetic Oligopeptide and Its Application to Biological Toxicity Detection Using Surface Plasmon Resonance. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2300–2305. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.11.019>.
- (180) Chabot, V.; Cuerrier, C. M.; Escher, E.; Aimez, V.; Grandbois, M.; Charette, P. G. Biosensing Based on Surface Plasmon Resonance and Living Cells. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 1667–1673. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.08.025>.
- (181) Andersson, H.; Kågedal, B.; Mandenius, C.-F. Monitoring of Troponin Release from Cardiomyocytes during Exposure to Toxic Substances Using Surface Plasmon Resonance Biosensing. *Anal Bioanal Chem* **2010**, *398*, 1395–1402. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4041-9>.
- (182) Chabot, V.; Miron, Y.; Grandbois, M.; Charette, P. G. Long Range Surface Plasmon Resonance for Increased Sensitivity in Living Cell Biosensing through Greater Probing Depth. *Sensors Actuators B. Chem.* **2012**, *174*, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.08.028>.
- (183) Wang, Y.; Zhang, S.; Zhang, C.; Zhao, Z.; Zheng, X.; Xue, L.; Liu, J.; Yuan, X.-C. Investigation of an SPR Biosensor for Determining the in Fl Uence of Connexin 43 Expression on the Cytotoxicity of Cisplatin. *Analyst* **2016**, *141*, 3411–3420. <https://doi.org/10.1039/c6an00264a>.
- (184) Vörös, J.; Graf, R.; Kenausis, G.L.; Bruinink, A.; Mayer, J.; Textor, M.; Wintermantel, E.; Spencer, N. D. Feasibility Study of an Online Toxicological Sensor Based on the Optical Waveguide Technique. *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15*, 423–429. [https://doi.org/10.1016/s0956-5663\(00\)00102-0](https://doi.org/10.1016/s0956-5663(00)00102-0).
- (185) Hug, T. S.; Prenosil, J. E.; Morbidelli, M. Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy as a New Method to Study Adhesion of Anchorage-Dependent Cells as an Indicator of Metabolic State. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 865–874. [https://doi.org/10.1016/s0956-5663\(01\)00204-4](https://doi.org/10.1016/s0956-5663(01)00204-4).
- (186) Hug, T. S.; Prenosil, J. E.; Maier, P.; Morbidelli, M. On-Line Monitoring of Adhesion and Proliferation of Cultured Hepatoma Cells Using Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy ( OWLS ). *Biotechnol. Prog.* **2002**, *18*, 1408–1413. <https://doi.org/10.1021/bp025554f>.
- (187) Chan, L. L.; Gosangari, S. L.; Watkin, K. L.; Cunningham, B. T. High Throughput Cytotoxicity Screening Using Photonic Crystal Biosensors. In *IEEE Xplore*; 2007; 799–

802. <https://doi.org/10.1109/sensor.2007.4300251>.
- (188) Shamah, S. M.; Cunningham, B. T. Label-Free Cell-Based Assays Using Photonic Crystal Optical Biosensors. *Analyst* **2011**, *136*, 1090–1102. <https://doi.org/10.1039/c0an00899k>.
- (189) Chan, L. L.; Gosangari, S. L.; Watkin, K. L.; Cunningham, B. T. A Label-Free Photonic Crystal Biosensor Imaging Method for Detection of Cancer Cell Cytotoxicity and Proliferation. *Apoptosis* **2007**, *12*, 1061–1068. <https://doi.org/10.1007/s10495-006-0031-y>.
- (190) George, S.; Bhalerao, S. V.; Lidstone, E. A.; Ahmad, I. S.; Abbasi, A.; Cunningham, B. T.; Watkin, K. L. Cytotoxicity Screening of Bangladeshi Medicinal Plant Extracts on Pancreatic Cancer Cells. *BMC Complement. Altern. Med.* **2010**, *10*, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-10-52>.
- (191) Fang, Y.; Ferrie, A. M.; Fontaine, N. H.; Mauro, J.; Balakrishnan, J. Resonant Waveguide Grating Biosensor for Living Cell Sensing. *Biophys. J.* **2006**, *91*, 1925–1940. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.077818>.
- (192) Li, G.; Lai, F.; Fang, Y. Modulating Cell-Cell Communication with a High-Throughput Label-Free Cell Assay. *J. Lab. Autom.* **2012**, *17*, 6–15. <https://doi.org/10.1177/2211068211424548>.
- (193) Nazirizadeh, Y.; Behrends, V.; Prószy, A.; Orgovan, N.; Horvath, R.; Ferrie, A. M.; Fang, Y.; Selhuber-Unkel, C.; Gerken, M. Intensity Interrogation near Cutoff Resonance for Label-Free Cellular Profiling. *Sci. Rep.* **2016**, 1–6. <https://doi.org/10.1038/srep24685>.
- (194) Song, H.-P.; Wang, H.; Zhao, X.; He, L.; Zhong, H.; Wu, S.-Q.; Li, P.; Yang, H. Label-Free Pharmacological Profiling Based on Dynamic Mass Redistribution for Characterization and Authentication of Hazardous Natural Products. *J. Hazard. Matter.* **2017**, *333*, 265–274. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.03.025>.
- (195) Horvath, R.; Pedersen, H. C.; Skivesen, N.; Svanberg, C.; Larsen, N. B. Fabrication of Reverse Symmetry Polymer Waveguide Sensor Chips on Nanoporous Substrates Using Dip-Floating. *J. micromechanics microengineering* **2005**, *15*, 1260–1264. <https://doi.org/10.1088/0960-1317/15/6/017>.
- (196) Horvath, R.; Cottier, K.; Pedersen, H. C.; Ramsden, J. J. Multidepth Screening of Living Cells Using Optical Waveguides. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *24*, 805–810. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.06.059>.
- (197) N. Orgovan, R. Ungai-Salánki, S. Lukácsi, N. Sándor, Z. Bajtay, A. Erdei, B. Szabó, R.; Horvath. Adhesion Kinetics of Human Primary Monocytes, Dendritic Cells, and Macrophages: Dynamic Cell Adhesion Measurements with a Label-Free Optical Biosensor and Their Comparison with End-Point Assays. *Biointerphases* **2016**, *11*, 1–11. <https://doi.org/10.1116/1.4954789>.
- (198) Fang, Y. Label-Free Cell-Based Assays with Optical Biosensors in Drug Discovery. *Assay Drug Dev. Technol.* **2006**, *4*, 583–595. <https://doi.org/10.1089/adt.2006.4.583>.
- (199) Dobrynin, A. V.; Rubinstein, M. Theory of Polyelectrolytes in Solutions and at Surfaces. *Prog. Polym. Sci.* **2005**, *30*, 1049–1118. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2005.07.006>.

- (200) Decher, G.; Hong, J. D.; Schmitt, J. Buildup of Ultrathin Multilayer Films by a Self-Assembly Process: III. Consecutively Alternating Adsorption of Anionic and Cationic Polyelectrolytes on Charged Surfaces. *Thin Solid Films* **1992**, *210/211*, 831–835. [https://doi.org/10.1016/0040-6090\(92\)90417-A](https://doi.org/10.1016/0040-6090(92)90417-A).
- (201) Zhang, S. Building from the Bottom Up. *Mater. Today* **2003**, *6*, 20–27. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(03\)00530-3](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(03)00530-3).
- (202) Stockton, W. B.; Rubner, M. F. Molecular-Level Processing of Conjugated Polymers. 4. Layer-by-Layer Manipulation of Polyaniline via Hydrogen-Bonding Interactions. *Macromolecules* **1997**, *30*, 2717–2725. <https://doi.org/10.1021/ma9700486>.
- (203) Seo, J.; Lutkenhaus, J. L.; Kim, J.; Hammond, P. T.; Char, K. Effect of the Layer-by-Layer (LbL) Deposition Method on the Surface Morphology and Wetting Behavior of Hydrophobically Modified PEO and PAA LbL Films. *Langmuir* **2008**, *24*, 7995–8000. <https://doi.org/10.1021/la800906x>.
- (204) Seo, J.; Schattling, P.; Lang, T.; Jochum, F.; Nilles, K.; Theato, P.; Char, K. Covalently Bonded Layer-by-Layer Assembly of Multifunctional Thin Films Based on Activated Esters. *Langmuir* **2010**, *26*, 1830–1836. <https://doi.org/10.1021/la902574z>.
- (205) Decher, G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* **1997**, *277*, 1232–1237. <https://doi.org/10.1126/science.277.5330.1232>.
- (206) Porcel, C.; Lavallo, P.; Ball, V.; Decher, G.; Senger, B.; Voegel, J. C.; Schaaf, P. From Exponential to Linear Growth in Polyelectrolyte Multilayers. *Langmuir* **2006**, *22*, 4376–4383. <https://doi.org/10.1021/la053218d>.
- (207) Garza, J. M.; Schaaf, P.; Muller, S.; Ball, V.; Stoltz, J.-F.; Voegel, J.-C.; Lavallo, P. Multicompartment Films Made of Alternate Polyelectrolyte Multilayers of Exponential and Linear Growth. *Langmuir* **2004**, *20*, 7298–7302. <https://doi.org/10.1021/la049106o>.
- (208) Hübsch, E.; Ball, V.; Senger, B.; Pecher, G.; Voegel, J.-C.; Schaaf, P. Controlling the Growth Regime of Polyelectrolyte Multilayer Films: Changing from Exponential to Linear Growth by Adjusting the Composition of Polyelectrolyte Mixtures. *Langmuir* **2004**, *20*, 1980–1985. <https://doi.org/10.1021/la0361870>.
- (209) Lavallo, P.; Picart, C.; Mutterer, J.; Gergely, C.; Reiss, H.; Voegel, J.-C.; Senger, B.; Schaaf, P. Modeling the Buildup of Polyelectrolyte Multilayer Films Having Exponential Growth. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 635–648. <https://doi.org/10.1021/jp035740j>.
- (210) Boulmedais, F.; Ball, V.; Schwinte, P.; Frisch, B.; Schaaf, P.; Voegel, J.-C. Buildup of Exponentially Growing Multilayer Polypeptide Films with Internal Secondary Structure. *Langmuir* **2003**, *19*, 440–445. <https://doi.org/10.1021/la0264522>.
- (211) Nirschl, M.; Schreiter, M.; Vörös, J. Comparison of FBAR and QCM-D Sensitivity Dependence on Adlayer Thickness and Viscosity. *Sensors Actuators A Phys.* **2011**, *165*, 415–421. <https://doi.org/10.1016/j.sna.2010.11.003>.
- (212) <http://www.owls-sensors.com/owls-system>.
- (213) Vörös, J.; Ramsden, J.J.; Csúcs, G.; Szendrő, I.; De Paul, S.M.; Textor, M.; Spencer, N. D.

- Optical Grating Coupler Biosensors. *Biomaterials* **2002**, *23*, 3699–3710.  
[https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00103-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00103-5).
- (214) Ramsden, J. J.; Lvov, Y. M.; Decher, G. Determination of Optical Constants of Molecular Films Assembled via Alternate Polyion Adsorption. *Thin Solid Films* **1995**, *254*, 246–251.  
[https://doi.org/10.1016/0040-6090\(94\)0262-J](https://doi.org/10.1016/0040-6090(94)0262-J).
- (215) Horvath, R.; Ramsden, J. J. Quasi-Isotropic Analysis of Anisotropic Thin Films on Optical Waveguides. *Langmuir* **2007**, *23*, 9330–9334. <https://doi.org/10.1021/la701405n>.
- (216) Tiefenthaler, K.; Lukosz, W. Sensitivity of Grating Couplers as Integrated-Optical Chemical Sensors. *J. Opt. Soc. Am. B* **1989**, *6*, 209–220.  
<https://doi.org/10.1364/josab.6.000209>.
- (217) MicroVacuum, L. *Manual\_OWLS210\_BioSense 2.6.0 Software*; 2009.
- (218) 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>.
- (219) Orgovan, N.; Patko, D.; Hos, C.; Kurunczi, S.; Szabó, B.; Ramsden, J. J.; Horvath, R. Sample Handling in Surface Sensitive Chemical and Biological Sensing: A Practical Review of Basic Fluidics and Analyte Transport. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2014**, *211*, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.03.011>.
- (220) [www.corning.com](http://www.corning.com).
- (221) El-Schich, Z.; Kamlund, S.; Janicke, B.; Alm, K.; Wingren, A. G. Holography: The Usefulness of Digital Holographic Microscopy for Clinical Diagnostics. In *Holographic Materials and Optical Systems*; 2016; *2*, 319–333. <https://doi.org/10.5772/66042>.
- (222) HoloMonitor Application Note on Label-Free Toxicology, (n.d.).  
[Http://www.Phiab.Se/Reports/2014/ToxicologyAppNotePHI-140919.Pdf](http://www.Phiab.Se/Reports/2014/ToxicologyAppNotePHI-140919.Pdf) (Accessed July 21, 2017). **2017**, 140919.
- (223) <https://www.luminexcorp.com/muse-cell-analyzer/>.
- (224) Millipore, M. Muse™ Caspase-3/7 Kit User’s Guide. 2013.
- (225) Merk Millipore. Actin Cytoskeleton and Focal Adhesion Staining Kit. 2000, 0–7.
- (226) Motulsky, H.; Christopoulos, A. *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression*; 2004. <https://doi.org/10.1002/pst.167>.
- (227) Barer, R.; Joseph, S. Refractometry of Living Cells. *Q. J. Microsc. Sci.* **1954**, *95*, 399–423.
- (228) Horváth, R.; Lindvold, L. R.; Larsen, N. B. Reverse-Symmetry Waveguides: Theory and Fabrication. *Appl. Phys. B Lasers Opt.* **2002**, *74*, 383–393.  
<https://doi.org/10.1007/s003400200823>.
- (229) Kustermann, S.; Boess, F.; Bunes, A.; Schmitz, M.; Watzele, M.; Weiser, T.; Singer, T.; Suter, L.; Roth, A. A Label-Free, Impedance-Based Real Time Assay to Identify Drug-



- Induced Toxicities and Differentiate Cytostatic from Cytotoxic Effects. *Toxicol. Vitro*. **2013**, *27*, 1589–1595. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.08.019>.
- (230) Orgovan, N.; Kovacs, B.; Farkas, E.; Szabó, B.; Zaytseva, N.; Fang, Y.; Horvath, R. Bulk and Surface Sensitivity of a Resonant Waveguide Grating Imager. *Appl. Phys. Lett.* **2014**, *104*, 1–5. <https://doi.org/10.1063/1.4866460>.
- (231) Seibert, H.; Mörchel, S.; Gülden, M. Factors Influencing Nominal Effective Concentrations of Chemical Compounds in Vitro: Medium Protein Concentration. *Toxicol. Vitro*. **2002**, *16*, 289–297. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(02\)00014-0](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(02)00014-0).
- (232) Bollinger, M.; Manzenrieder, F.; Kolb, R.; Bochen, A.; Neubauer, S.; Marinelli, L.; Limongelli, V.; Novellino, E.; Moessmer, G.; Pell, R.; Lindner, W.; Fanous, J.; Hoffman, A.; Kessler, H. Tailoring of Integrin Ligands: Probing the Charge Capability of the Metal Ion-Dependent Adhesion Site. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 871–882. <https://doi.org/10.1021/jm2013826>.
- (233) Hedberg, D.; Wallin, M. Effects of Roundup and Glyphosate Formulations on Intracellular Transport, Microtubules and Actin Filaments in *Xenopus Laevis* Melanophores. *Toxicol. Vitro*. **2010**, *24*, 795–802. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.12.020>.
- (234) Gourlay, C. W.; Ayscough, K. R. . The Actin Cytoskeleton : A Key Regulator of Apoptosis and Ageing ? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 583–589. <https://doi.org/10.1038/nrm1682>.
- (235) Toy, A. D. F.; Uhing, E. H. Aminomethylenephosphonic Acids, Salts Thereof, and Process for Their Production, <Http://Patents.Google.Com/Patent/US3160632A/En>. **1964**, 1964.
- (236) Duke, S. O.; Lydon, J.; Koskinen, W. C.; Moorman, T. B.; Chaney, R. L.; Hammerschmidt, R. Glyphosate Effects on Plant Mineral Nutrition, Crop Rhizosphere Microbiota, and Plant Disease in Glyphosate-Resistant Crops. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 10375–10397. <https://doi.org/10.1021/jf302436u>.
- (237) Benachour, N.; Séralini, G.-E. Glyphosate Formulations Induce Apoptosis and Necrosis in Human Umbilical, Embryonic, and Placental Cells. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 97–105. <https://doi.org/10.1021/+x800218n>.
- (238) VandeVondele, S.; Vörös, J.; Hubbell, J. A. RGD-Grafted Poly-L-Lysine-Graft-(Polyethylene Glycol) Copolymers Block Non-Specific Protein Adsorption While Promoting Cell Adhesion. *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *82*, 784–790. <https://doi.org/10.1002/bit.10625>.
- (239) Tosatti, S.; de Paul, S. M.; Askendal, A.; VandeVondele, S.; Hubbell, J. A.; Tengvall, P.; Textor, M. Peptide Functionalized Poly(L-Lysine)-g-Poly(Ethylene Glycol) on Titanium: Resistance to Protein Adsorption in Full Heparinized Human Blood Plasma. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4949–4958. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00420-4](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00420-4).
- (240) Schuler, M.; Owen, G. R.; Hamilton, D. W.; de Wild, M.; Textor, M.; Brunette, D. M.; Tosatti, S. G. P. Biomimetic Modification of Titanium Dental Implant Model Surfaces Using the RGDSP-Peptide Sequence: A Cell Morphology Study. *Biomaterials* **2006**, *27*,

- 4003–4015. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.03.009>.
- (241) Sanders, C. R. *Biomolecular Ligand-Receptor Binding Studies: Theory, Practice, and Analysis*; 2010.
- (242) Wu, Y.; Vendome, J.; Shapiro, L.; Ben-shaul, A.; Honig, B.; Biophysics, M.; Avenue, N. Transforming Binding Affinities from 3D to 2D with Application to Cadherin Clustering. *Nature* **2011**, *475*, 510–513. <https://doi.org/10.1038/nature10183>.
- (243) Bell, G. I.; Dembo, M.; Bongrand, P. Cell Adhesion Competition between Nonspecific Repulsion and Specific Bonding. *Biophys. J.* **1984**, *45*, 1051–1064. [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(84\)84252-6](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(84)84252-6).
- (244) Riikonen, T., Vihinen, P., Potila, M., Rettig, W. & Heino, J. Antibody against Human Alpha 1 Beta 1 Integrin Inhibits HeLa Cell Adhesion to Laminin and to Type I, IV, and V Collagens. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *209*, 205–212. <https://doi.org/10.1016/bbrc.1995.1490>.
- (245) Oba, M.; Fukushima, S.; Kanayama, N.; Aoyagi, K.; Nishiyama, N.; Koyama, H.; Kataoka, K. Cyclic RGD Peptide-Conjugated Polyplex Micelles as a Targetable Gene Delivery System Directed to Cells Possessing Alpha v Beta 3 and Alpha v Beta 5 Integrins. *Bioconjug. Chem.* **2007**, *18*, 1415–1423. <https://doi.org/10.1021/bc0700133>.
- (246) Keselowsky, B. G.; Collard, D. M.; Garcia, A. J. Integrin Binding Specificity Regulates Biomaterial Surface Chemistry Effects on Cell Differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102*, 5953–5957. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407356102>.
- (247) Arnold, M.; Cavalcanti-Adam, E. A.; Glass, R.; Blümmel, J.; Eck, W.; Kantele, M.; Kessler, H.; Spatz, J. P. Activation of Integrin Function by Nanopatterned Adhesive Interfaces. *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 383–388. <https://doi.org/10.1002/cphc.200301014>.
- (248) 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>.
- (249) Cheng, Y.-C.; Prusoff, W. H. Relationship between the Inhibition Constant (KI) and the Concentration of Inhibitor Which Causes 50 per Cent Inhibition (I50) of an Enzymatic Reaction. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099–3108. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(73\)90196-2](https://doi.org/10.1016/0006-2952(73)90196-2).
- (250) 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>.
- (251) Yamada, K. M.; Kennedy, D. W. Dualistic Nature of Adhesive Protein Function: Fibronectin and Its Biologically Active Peptide Fragments Can Autoinhibit Fibronectin Function. *J. Cell Biol.* **1984**, *99*, 29–36. <https://doi.org/10.1083/jcb.99.1.29>.
- (252) Hayman, E. G.; Pierschbacher, M. D.; Ruoslahti, E. Detachment of Cells from Culture

- Substrate by Soluble Fibronectin Peptides. *J. Cell Biol.* **1985**, *100*, 1948–1954. <https://doi.org/10.1083/jcb.100.6.1948>.
- (253) Lee, M. H.; Adams, C. S.; Boettiger, D.; DeGrado, W. F.; Shapiro, I. M.; Composto, R. J.; Ducheyne, P. Adhesion of MC3T3-E1 Cells to RGD Peptides of Different Flanking Residues: Detachment Strength and Correlation with Long-Term Cellular Function. *J. Biomed Mater. Res. A* **2007**, *81*, 150–160. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31065>.
- (254) Ruoslahti, E. Rgd and Other Recognition Sequences for Integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1996**, *12*, 697–715. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.12.1.697>.
- (255) Hynes, R. O. A Reevaluation of Integrins as Regulators of Angiogenesis. *Nat. Med.* **2002**, *8*, 918–921. <https://doi.org/10.1038/nm0902-918>.
- (256) Buckley, C. D.; Pilling, D.; Henriquez, N. V.; Parsonage, G.; Threlfall, K.; Scheel-Toellner, D.; Simmons, D. L.; Akarf, A. N.; Lord, J. M.; Salmon, M. RGD Peptides Induce Apoptosis by Direct Caspase-3 Activation. *Nature* **1999**, *397*, 534–539. <https://doi.org/10.1038/17409>.
- (257) Frisch, S. M.; Francis, H. Disruption of Epithelial Cell-Matrix Interactions Induces Apoptosis. *J. Cell Biol.* **1994**, *124*, 619–626. <https://doi.org/10.1083/jcb.124.4.619>.
- (258) Maltese, W. A.; Overmeyer, J. H. Nonapoptotic Cell Death Associated with Vacuolization of Macropinosome and Endosome Compartments. *Am. J. Pathol.* **2014**, *184*, 1630–1642. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.02.028>.
- (259) Russo, M. A.; Paolillo, M.; Sanchez-Hernandez, Y.; Curti, D.; Ciusani, E.; Serra, M.; Colombo, L.; Schinelli, S. A Small-Molecule RGD-Integrin Antagonist Inhibits Cell Adhesion, Cell Migration and Induces Anoikis in Glioblastoma Cells. *Int. J. Oncol.* **2013**, *42*, 83–92. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1708>.
- (260) Plow, E. F.; Haas, T. A.; Zhang, L.; Loftus, J.; Smith, J. W. Ligand Binding to Integrins. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21785–21788. <https://doi.org/10.1074/jbc.R000003200>.
- (261) Xiong, J. P.; Stehle, T.; Zhang, R.; Joachimiak, A.; Frech, M.; Goodman, S. L.; Arnaout, M. A. Crystal Structure of the Extracellular Segment of Integrin Alpha V Beta 3 in Complex with an Arg-Gly-Asp Ligand. *Science*. **2002**, *296*, 151–155. <https://doi.org/10.1126/science.1069040>.
- (262) D'Souza, S. E.; Haas, T. A.; Piotrowicz, R. S.; Byers-Ward, V.; McGrath, D. E.; Soule, H. R.; Cierniewski, C.; Plow, E. F.; Smith, J. W. Ligand and Cation Binding Are Dual Functions of a Discrete Segment of the Integrin Beta 3 Subunit: Cation Displacement Is Involved in Ligand Binding. *Cell* **1994**, *79*, 659–667. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90551-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90551-7).
- (263) Madsen, H. E. L.; Christensen, H. H.; Gottlieb-Petersen, C. Stability Constants of Copper(II), Zinc, Manganese(II), Calcium, and Magnesium Complexes of N-(Phosphonomethyl)Glycine (Glyphosate). *Acta Chem. Scand. A* **1978**, *32*, 79–83. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.32a-0079>.
- (264) Subramaniam, V.; Hoggard, P. E. Metal Complexes of Glyphosate. *J. Agric. Food Chem.* **1988**, *36*, 1326–1329. <https://doi.org/10.1021/jf00084a050>.

- (265) Loomis, W. F. .; Fuller, D.; Gutierrez, E.; Groisman, A.; Rappel, W.-J. Innate Non-Specific Cell Substratum Adhesion. *PLoS One* **2012**, *7*, e42033. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042033>.
- (266) McCafferty, M. H.; Lepow, M.; Saba, T. M.; Cho, E.; Meuwissen, H.; White, J.; Zuckerbrod, S. F. Normal Fibronectin Levels as a Function of Age in the Pediatric Population. *Pediatr. Res.* **1983**, *17*, 482–485. <https://doi.org/10.1203/00006450-198306000-00012>.
- (267) Hayman, E. G.; Pierschbacher, M. D.; Suzuki, S.; Ruoslahti, E. Vitronectin-A Major Cell Attachment-Promoting Protein in Fetal Bovine Serum. *Exp. Cell Res.* **1985**, *160*, 245–258. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(85\)90173-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(85)90173-9).
- (268) Maynard, H. D., Okada, S. Y. & Grubbs, R. H. Inhibition of Cell Adhesion to Fibronectin by Oligopeptide-Substituted Polynorbornenes. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1275–1279.
- (269) Calvete, J. J.; Fox, J. W.; Agelan, A.; Niewiarowski, S.; Marcinkiewicz, C. The Presence of the WGD Motif in CC8 Heterodimeric Disintegrin Increases Its Inhibitory Effect on Alpha Iib Beta 3, Alpha v Beta 3, and Alpha 5 Beta 1 Integrins. *Biochemistry* **2002**, *41*, 2014–2021. <https://doi.org/10.1021/bi015627o>.
- (270) Amann, K.; Haas, C. S.; Schüssler, J.; Daniel, C.; Hartner, A.; Schöcklmann, H. O. Beneficial Effects of Integrin Alpha v Beta 3-Blocking RGD Peptides in Early but Not Late Phase of Experimental Glomerulonephritis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2012**, *27*, 1755–1768. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr603>.
- (271) Pierschbacher, M. D.; Ruoslahti, E. Cell Attachment Activity of Fibronectin Can Be Duplicated by Small Synthetic Fragments of the Molecule. *Nature* **1984**, *309*, 237–242. <https://doi.org/10.1021/ja003305m>.
- (272) Yamada, K. M.; Kennedy, D. W. Peptide Inhibitors of Fibronectin, Laminin, and Other Adhesion Molecules: Unique and Shared Features. *J. Cell. Physiol.* **1987**, *130*, 21–28. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041300105>.
- (273) Knudsen, K. A.; Tuszynski, G. P.; Huang, T. F.; Niewiarowski, S. Trigramin, an RGD-Containing Peptide from Snake Venom, Inhibits Cell-Substratum Adhesion of Human Melanoma Cells. *Exp. Cell Res.* **1988**, *179*, 42–49. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90346-1](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90346-1).
- (274) Gullberg, D.; Terracio, L.; Borg, T. K.; Rubin, K. Identification of Integrin-like Matrix Receptors with Affinity for Interstitial Collagens. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 12686–12694.
- (275) Ylänne, J. RGD Peptides May Only Temporarily Inhibit Cell Adhesion to Fibronectin. *FEBS Lett.* **1990**, *267*, 43–45. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80283-O](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80283-O).
- (276) Kumar, C. C.; Nie, H.; Rogers, C. P.; Malkowski, M.; Maxwell, E. .; Catino, J. J.; Armstrong, L. Biochemical Characterization of the Binding of Echistatin to Integrin Alpha v Beta 3 Receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997**, *283*, 843–853.