

Magyar Agrár- és  
Élettudományi Egyetem

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Oláh Marianna**

**Gödöllő**

**2025**





# **TOXIKUS HATÁSÚ GYOMIRTÓSZER-KÉSZÍTMÉNY ÉS ÖSSZETEVŐINEK VIZSGÁLATA *IN VITRO* KÍSÉRLETI RENDSZEREKBEN**

DOI: 10.54598/006750

DOKTORI (*PhD*) ÉRTEKEZÉS

**Oláh Marianna**

Gödöllő  
2025

## **A doktori iskola**

**Megnevezése:** Környezettudományi Doktori Iskola

**Tudományága:** Környezettudomány

**Vezetője:** Csákiné Prof. Dr. Michéli Erika  
egyetemi tanár, intézetigazgató,  
Magyar Agrár és- Élettudományi Egyetem  
Környezettudományi Intézet

**Témavezető:** Prof. Dr. Székács András  
egyetemi tanár, kutatóközpont-vezető, intézetigazgató-helyettes,  
Magyar Agrár és- Élettudományi Egyetem  
Környezettudományi Intézet,  
Agrár-környezettudományi Kutatóközpont

.....

Az iskolavezető jóváhagyása

.....

A témavezető jóváhagyása



“Information is not knowledge. The only source of knowledge is experience.

Az információ nem tudás. A tudás egyetlen forrása a tapasztalat.”

– Albert Einstein

*Szüleimnek*

## TARTALOMJEGYZÉK

|                                                                                                                  |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....</b>                                                                      | <b>III</b> |
| <b>1. BEVEZETÉS .....</b>                                                                                        | <b>1</b>   |
| <b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....</b>                                                                               | <b>5</b>   |
| 2.1. A NÖVÉNYVÉDELEMRŐL ÁLTALÁBAN .....                                                                          | 5          |
| 2.2. A GYOMIRTÓ SZEREKRŐL ÁLTALÁBAN.....                                                                         | 7          |
| 2.3. A GLY TÖRTÉNETE .....                                                                                       | 9          |
| 2.4. A GLY FIZIKAI- KÉMIAI JELLEMZŐI ÉS HATÁSAI.....                                                             | 11         |
| 2.5. A GLY KOCKÁZATBECSLÉSE .....                                                                                | 14         |
| 2.6. POE-15 JELLEMZÉSE.....                                                                                      | 16         |
| 2.7. A ROUNDUP CLASSIC JELLEMZÉSE .....                                                                          | 18         |
| 2.8. NEM CÉLSZERVEZETEKRE GYAKOROLT TOXIKUS HATÁSOK.....                                                         | 19         |
| 2.9. <i>IN VITRO</i> VIZSGÁLATI RENDSZEREK TOXIKOLÓGIAI<br>ALKALMAZHATÓSÁGA .....                                | 21         |
| 2.10. <i>IN VITRO</i> VIZSGÁLATI MÓDSZEREK- ÉS SEJTVONAL-VÁLASZTÁS<br>TUDOMÁNYOS ALAPJAI .....                   | 22         |
| <b>3. ANYAG ÉS MÓDSZER .....</b>                                                                                 | <b>26</b>  |
| 3.1. SEJTVONALAKON VÉGZETT <i>IN VITRO</i> TESZTEK ELŐKÉSZÍTÉSE .....                                            | 26         |
| 3.2. A SEJTKULTÚRÁK FENNTARTÁSA .....                                                                            | 28         |
| 3.2.1. <i>MEGFELELŐ TÁPKÖZEGKÉSZÍTÉS FELTÉTELEI</i> .....                                                        | 28         |
| 3.3. A VIZSGÁLATAINKNÁL HASZNÁLT VEGYSZEREK.....                                                                 | 29         |
| 3.4. A VIZSGÁLATAINKNÁL HASZNÁLT SEJTKULTÚRÁK .....                                                              | 30         |
| 3.5. MTT-REDUKCIÓS TESZT .....                                                                                   | 31         |
| 3.6. COMET-TESZT .....                                                                                           | 32         |
| 3.7. ÁRAMLÁSI CITOMETRIA .....                                                                                   | 35         |
| 3.7.1. <i>A SEJTEK ÉLETKÉPESSÉGÉNEK MEGHATÁROZÁSA ÁRAMLÁSI<br/>                CITOMETRIÁVAL .....</i>           | <i>36</i>  |
| 3.7.2. <i>A SEJTEK DNS-KÁROSODÁSNAK MEGHATÁROZÁSA ÁRAMLÁSI<br/>                CITOMETRIÁVAL .....</i>           | <i>38</i>  |
| 3.7.3. <i>APOPTÓZIS- ÉS KASZPÁZ 3/7-AKTIVITÁS MEGHATÁROZÁSA ÁRAMLÁSI<br/>                CITOMETRIÁVAL .....</i> | <i>39</i>  |
| 3.7.4. <i>A SEJTCIKLUS MEGHATÁROZÁSA ÁRAMLÁSI CITOMETRIÁVAL .....</i>                                            | <i>41</i>  |
| 3.8. STATISZTIKAI ELEMZÉS.....                                                                                   | 43         |
| <b>4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK.....</b>                                                                        | <b>44</b>  |

|                                                                                                                                     |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.1. A SEJTEK ÉLETKÉPESSÉGE.....                                                                                                    | 44         |
| 4.1.1. MTT-VIZSGÁLAT .....                                                                                                          | 44         |
| 4.1.2. ÁRAMLÁSI CITOMETRIÁS SEJTÉLETKÉPESSÉGI VIZSGÁLAT.....                                                                        | 44         |
| 4.2. DNS-KÁROSODÁS .....                                                                                                            | 47         |
| 4.2.1. COMET-TESZT.....                                                                                                             | 47         |
| 4.2.2. ÁRAMLÁSI CITOMETRIÁS VIZSGÁLAT KETTŐS SZÁLÚ DNS-TÖRÉSEK<br>KIMUTATÁSÁRA.....                                                 | 48         |
| 4.3. ÁRAMLÁSI CITOMETRIAI VIZSGÁLATOK APOPTÓZIS- ÉS A KASZPÁZ 3/7-<br>AKTIVITÁS MEGHATÁROZÁSÁRA .....                               | 50         |
| 4.4. ÁRAMLÁSI CITOMETRIAI VIZSGÁLAT A SEJTCIKLUS ELEMZÉSÉHEZ .....                                                                  | 57         |
| 4.5. A GLY GENOTOXICITÁSÁNAK ÉRTÉKELÉSE A GYAKORI GENOTOXIKUS<br>ÉLELMISZER-SZENNYEZŐ ANYAGOKKAL SZEMBEN .....                      | 63         |
| 4.6. A KIMUTATOTT CITO- ÉS GENOTOXIKUS, ILLETVE SEJTCIKLUS-<br>BEFOLYÁSOLÓ HATÁSOK ÁLTALÁNOS ÖKOTOXIKOLÓGIAI<br>KÖVETKEZMÉNYEI..... | 65         |
| <b>5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....</b>                                                                                             | <b>70</b>  |
| <b>6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK.....</b>                                                                                        | <b>73</b>  |
| <b>7. ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>                                                                                                       | <b>78</b>  |
| <b>8. SUMMARY.....</b>                                                                                                              | <b>79</b>  |
| <b>9. MELLÉKLET: .....</b>                                                                                                          | <b>80</b>  |
| IRODALOMJEGYZÉK .....                                                                                                               | 80         |
| TÁBLÁZATOK ÉS BIZTONSÁGI ADATLAPOK .....                                                                                            | 103        |
| PUBLIKÁCIÓS LISTA .....                                                                                                             | 127        |
| <b>KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS.....</b>                                                                                                     | <b>132</b> |

## JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

|                  |                                                                                                                   |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $\alpha$ -MEM    | $\alpha$ -módosított minimállesszenciális tápközeg                                                                |
| AGG              | <i>Glyphosate</i> -értékelő Csoport (Assessment Group on Glyphosate)                                              |
| CAK              | ciklinfüggő kinázokot aktiváló protein kináz enzimek                                                              |
| Cdk              | ciklinfüggő protein kináz enzimek, a sejtciklus szabályozásában szerepet játszó fehérjefoszforiláló enzimek       |
| CLP              | az Európai Unió egyik fő szabályozása a vegyi anyagok osztályozására, címkézésére és csomagolására vonatkozóan    |
| CYP              | a citokróm P450 rendszer az emberi és alacsonyabb rendű szervezetekben univerzálisan előforduló enzimszupercsalád |
| DMSO             | dimetil-szulfoxid                                                                                                 |
| ECHA             | Európai Vegyianyag-ügynökség                                                                                      |
| EDTA             | etilén-diamin-tetraecetsav                                                                                        |
| EFSA             | Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság                                                                              |
| EU               | Európai Unió                                                                                                      |
| FAO              | Élelmészügyi és Mezőgazdasági Világszervezet                                                                      |
| FBS              | magzati borjúvérszérum                                                                                            |
| FCS              | magzati csikóvérszérum                                                                                            |
| GBH              | <i>glyphosate</i> hatóanyagot tartalmazó gyomirtó szer                                                            |
| GLY              | <i>glyphosate</i>                                                                                                 |
| GLY-IPA          | <i>glyphosate</i> -izopropilaminsó                                                                                |
| GM               | géntechnológiai úton módosított                                                                                   |
| IC <sub>50</sub> | gátlási középérték (adott vegyület azon koncentrációja, ahol a gátló hatása 50%-os mértékű)                       |
| IARC             | Nemzetközi Rákkutató Ügynökség                                                                                    |
| ISO              | Nemzetközi Szabványügyi Szervezet                                                                                 |
| JMPR             | a FAO/WHO Növényvédőszermaradék-szakértői Értekezlete                                                             |
| LGD              | legalacsonyabb genotoxikus dózis                                                                                  |
| LMA              | alacsony olvadáspontú agarózgél                                                                                   |
| MEM              | minimállesszenciális tápközeg                                                                                     |
| MC3T3-E1         | egérkoponyacsontból származó preosteoblast-sejtvonal (csontszövet-előalak)                                        |
| MRL              | maximálisan megengedett szermaradék                                                                               |
| MTT              | 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium-bromid                                                        |

|        |                                                                                                                                                                                                          |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| NE-4C  | egéragysejt-tenyészetből származó őssejtvonal (9-napos transzgenikus egérembriók agyának középső vezikuláiból készített primer sejtvonal, melyből hiányzik a funkcionális p53 tumorszuppresszor fehérje) |
| NHL    | non-Hodgkin-limfóma                                                                                                                                                                                      |
| NMA    | normál olvadáspontú agarózgél                                                                                                                                                                            |
| PBS    | foszfátpufferelt sóoldat                                                                                                                                                                                 |
| PI     | propídium-jodid                                                                                                                                                                                          |
| POE-15 | polietoxilált faggyúamin (a Roundup Classic készítményben korábban alkalmazott felületaktívanyag)                                                                                                        |
| R      | Roundup Classic gyomirtószer-készítmény                                                                                                                                                                  |
| RAC    | Kockázatértékelési Bizottság (ECHA)                                                                                                                                                                      |
| RC     | citotoxicitási maradékérték                                                                                                                                                                              |
| REACH  | az Európai Parlament és a Tanács 1907/2006/EK rendelete a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról                                                              |
| SCGE   | egysejtes gélelektroforézis (comet-teszt)                                                                                                                                                                |
| ToC    | citotoxicitási küszöbérték                                                                                                                                                                               |
| WHO    | Egészségügyi Világszervezet                                                                                                                                                                              |

## 1. BEVEZETÉS

Az elmúlt évtizedekben az ipar és a mezőgazdaság fejlődésével és a megnövekvő ipari és fogyasztói igények kielégítésére egyre nagyobb számban és mennyiségben állítanak elő különféle vegyi anyagokat. A nyilvántartott új szintetikus vegyületek száma 2002 és 2023 között 20 millióról 204 millióra nőtt, ami az időszakban átlagosan napi 15.000 új vegyi anyag bejegyzését jelenti (WANG *et al.*, 2024). Az élő szervezetek számára idegen anyagok (xenobiotikumok) rohamosan bővülő köre mind fokozottabb mértékű kémiai környezetterhelést jelent, s a vegyületek toxikus hatást gyakorolhatnak nem célzott szervezetekre is (ESCHER *et al.*, 2020). A kémiai szennyezést mostanra az egyik "bolygósztű határtényezőként" (bolygónk olyan környezeti korlátja, amelyet túllépve az emberiség nem tud biztonságosan fennmaradni) ismerték el (ROCKSTRÖM *et al.*, 2009, STEFFEN *et al.*, 2015, WANG *et al.*, 2020), mely kedvezőtlen hatással van más határtényezőkre, mint például az éghajlatváltozásra és a bioszféra integritására is.

A mezőgazdaság fejlődésével párhuzamosan egyre több növényvédő szer is megjelent, amelyeknek szerepe, hogy a kártevők visszaszorításával működésben tartsák az iparszerű mezőgazdasági technológiákat, s ezzel a növekvő népesség élelmiszerrel való kiszolgáltatását. A növényvédő szerek a növényvédelmi feladatok kivitelezésére alkalmas készítmények, amelyek egy vagy több hatóanyagot és egyéb adalékanyagokat (pl. felületaktív anyag, oldódásfokozó, stabilizátor stb.) tartalmaznak. Ezen vegyületek a környezetbe kerülésük következtében, hosszabb-rövidebb ideig bekerülhetnek a környezeti mátrixokba, ahol kölcsönhatásba léphetnek az ott élő szervezetekkel, akkumulálódhatnak, magnifikálódhatnak. A növényvédő szerek alkalmazása többféle lehet, így a mezőgazdaságon túl közegészségügyben, állategészségügyben, háztartásokban is használt károsítókat elpusztító, általában széles körben használt készítmények is ide tartoznak. A bővülő használat nyomán tudományos vizsgálatok sora igazolta, hogy biokémiai, élettani vagy ökológiai hatásai nem célzott szervezeteken is megnyilvánulnak. Egy-egy toxikus hatás bebizonyítására nem kell élő szervezeteket használnunk, hiszen léteznek *in vitro*-vizsgálatok, melyeket általában elkülönített sejteken, szöveteken vagy szerveken végeznek el. Az ilyen vizsgálati módszerrel elvégzett kísérleteket nemzetközi szinten is elfogadják, ha megfelelően validáltak vagy – még a hivatalos elfogadás előtt – a hitelesítés fázisában vannak. Az Európai Parlament és a Tanács 1907/2006/EK rendelete a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH) előírja, amennyiben lehetséges, *in vitro* módszereket kell alkalmazni az állatokon végzett vizsgálatok elkerülése érdekében, így valósult meg a 3 R stratégia, amely tartalmazza az állatokon végzett vizsgálatok helyettesítését, csökkentését, finomítását és ezen módszerek népszerűsítését.

A doktori kutatásom kulcsvegyületei a *glyphosate* (GLY) gyomirtószer-hatóanyag, valamint annak formulált készítménye, segédanyaga voltak. A GLY a világon legszélesebb körben és legnagyobb mennyiségben használt totális gyomirtószer-hatóanyag. A GLY –t Európában a hetvenes évektől kezdték széles körben alkalmazni, és azóta számos tudományos eredmény látott napvilágot a hatóanyag környezet- és potenciális egészségkárosító hatásáról. A világ GLY-gyártása évi 1,1 millió tonnára tehető, ebből a globális kereslet 2014-ben 826.000 tonna volt, de ez évről évre növekvő tendenciát mutat, az előrejelzések szerint 2024-re eléri a 12,54 milliárd USD értéket (MORDOR INTELLIGENCE LTD, GLYPHOSATE HERBICIDE MARKET 2020). Világviszonylatban több mint 750 kereskedelmi forgalmazású, GLY hatóanyagot tartalmazó gyomirtó szer (GBH) van forgalomban, és a hatóanyag forgalmazása főleg a GLY-toleráns transzgenikus növények megjelenését követően mutatott kiugró globális piacbővülést (TRANSPARENCY MARKET RESEARCH 2016, SZÉKÁCS & DARVAS, 2018). A GLY engedélyezése óta nem alakult ki egységes állásfoglalás a toxicitását illetően, ellenben felhasználása erőteljesen növekvő tendenciát követ.

A GLY fitotoxikus hatásának alapja, hogy a növényekben lezajló sikimisav-anyagcsereút gátlásával megakadályozza az aromás aminosavak (Phe, Tyr, Trp) bioszintézisét a kloropalsztiszban, s ezen hatás következtében leáll a sejtek fehérjeszintézise, a sikimisav koncentrációja toxikus szintre növekszik, ez gátolja a növény fotoszintézisét, s ennek következtében a növény nekrotizálódik, elszárad. (LACROIX & KURRASCH 2023) A csak növényekben megtalálható sikimisav útvonal szelektív gátlása miatt a vegyületet sokáig környezetkímélőnek tartották, ám később toxikus mellékhatásait találták humán embrionális és placentális sejtekben. Összefüggésbe hozták az emlősökben lévő citokróm P450 és az aromáz enzimek gátlásával, valamint – vélhetően a retinsavas jelátadási útvonalon keresztül kifejtett – genotoxikus hatásokkal (STEINRÜCKEN & AMRHEIN, 1980).

A növényvédő szerek – így a GLY is – maradványai megtalálhatóak a nyugati étrend fő élelmiszereiben, valamint a felszíni vizekben és az ivóvízben. Ezáltal a fogyasztók lényegében – ha alacsony mértékben is – folyamatos kitettséget szenvednek el a GLY szermaradékainak. A metabolikus folyamatokban kulcsszerepet betöltő citokróm P450 enzimszupercsalád (CYP enzimek) döntő szerepet játszik a xenobiotikumok méregtelenítése során. Ezen enzimek gátlásával a GLY felerősítheti más élelmiszerekben található szermaradékok és környezeti toxinok káros hatásait is. A szervezetre gyakorolt negatív hatásai lassan alakulnak ki, gyulladásos folyamatok (például a CYP enzimek gátlása) révén (IZUMI *et al.*, 2024), amely kihat a bélbaktériumok általi bioszintézisére, tehát annak zavarát okozza. Ennek következményeként a GLY hatóanyagot összefüggésbe hozták a nyugati étrend által okozott gyomor-bélrendszeri betegségekkel, a melanogenezis gátlásával, elhízással, cukorbetegséggel, szívbetegségekkel, depresszióval,

meddőséggel, rákkal, Alzheimer-kórral és autizmussal, mely kérdést jelenleg is viták övezik (SAMSEL & SENEFF, 2013; MYERS *et al.*, 2016, MESNAGE & ANTONIOU, 2017; RUEDA-RUZAFÁ *et al.*, 2019; BARNETT & GIBSON, 2020; MADANI & CARPENTER, 2022; MESNAGE *et al.*, 2022a, WINSTONE *et al.*, 2022; HSIAO *et al.*, 2023; BERG & BERG, 2023; SENEFF *et al.*, 2024, IZUMI *et al.*, 2024).

Minden növényvédelmi technológia alkalmazása során fontos a megfelelő, a hatóanyagok hatásának kimutatására alkalmas vizsgálati módszert alkalmazni. Környezetbiztonsági érdek a növényvédelemben, a szóbanforgó hatóanyagok vizsgálata, eloszlása, megfelelő környezeti felmérése és nem célszervezetre gyakorolt hatásainak kutatása. Doktori munkám során a Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ Agrár-környezettudományi Kutatóintézet [2021. február 1-től Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (MATE) Környezettudományi Intézet (KÖTI), Agrár-környezettudományi Kutatóközpont (AKK)] Környezetanalitikai Osztályának kutatócsoportjához csatlakoztam, amely jelentős, hazai és nemzetközi viszonylatban is elismert környezetanalitikai és ökotoxikológiai tudományos műhely. A dolgozatban a hatóanyagneveket a nemzetközi engedélyezés szerint elfogadott alakban közlöm, az EU Növényvédőszer-adatbázisában (*EU Pesticides Database*) (EC, 2021), a *Pesticide Manual* kézikönyvben (TURNER, 2021) és az angol nyelvű engedélyokiratokban rögzített alakban tüntetem fel. Ennek oka az, hogy a növényvédőszer-hatóanyagok engedélyezése az EU tagországaiban nem nemzeti, hanem EU-szinten történik, illetve az egyes hatóanyagok neveinek fonetikus átírataiban gyakorta mutatkozik eltérés, ami félreértésekre adhat okot. Emiatt kutatóhelyem, a MATE KÖTI AKK a nemzetközi engedélyezés szerinti alakra hivatkozik.

Vizsgálataim során különböző sejtvonalakon vizsgáltam a GLY hatóanyag, egy GBH készítmény és a benne található felületaktív anyag életképességre, DNS-károsodásra, apoptózisra és sejtciklusra gyakorolt hatásait. Munkám során olyan teszteket választottam, melyek széleskörben elterjedtek és a megbízhatóak az egész világon. A sejtleletképességi vizsgálatot áramlási citométerrel és 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium-bromid (MTT) szubsztrátumot alkalmazó teszttel (MTT-teszt) végeztem, míg a genotoxicitást áramlási citométerrel és comet-teszt módszerrel vizsgáltam, majd a vizsgálatokat össze is hasonlítottam egymással. Az apoptózisra és a sejtciklusra gyakorolt hatások vizsgálatát áramlási citometriás módszerrel végeztem. Ezen vizsgálatokat a Magyar Tudományos Akadémia, Energiatudományi Kutatóközpont, NanoBioSzenzorika Lendület Kutatócsoportjában végezhettem el.

Doktori kutatási munkám célkitűzései a következők voltak:

- A *GLY*, a kiszerelt gyomirtószer-készítmény és az ebben alkalmazott adjuváns adalékanyag citotoxikus és genotoxikus hatásainak vizsgálata két sejtvonalon (MTT-teszt, comet-teszt).
- A *GLY*, a kiszerelt gyomirtószer-készítmény és az ebben alkalmazott adjuváns adalékanyag toxikus hatásainak vizsgálata két sejtvonalon áramlási citometria alkalmazásával (citotoxicitás, genotoxicitás, apoptózis, sejtciklus).
- A két sejtvonalon elvégzett vizsgálatok összehasonlítása, azonos vizsgálatokban neuroektodermális (NE-4C) és preoszteoblaszt (MC3T3-E1) sejtvonalakon.
- Vizsgálati módszerek összehasonlítása/bemutatása azonos sejtvonalon (életképesség áramlási citometriával és MTT-teszt, DNS-károsodás áramlási citometriával és comet-teszttel).
- A kereskedelmi forgalomban kapható áramlási citométerhez kapható vizsgálati készletek (kitek) alkalmazhatóságának felmérése.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. A NÖVÉNYVÉDELEMRŐL ÁLTALÁBAN

Növényvédő szernek minősül minden olyan készítmény, amely alkalmas haszonnövények/termények és dísnövények károsodásának gátlására úgy, hogy a károsító szervezetet (gyomnövények, kórokozók, állati kártevők) távol tartja, elriasztja, növekedésében gátolja, elpusztítja vagy hormonálisan gátolja a szaporodásukat. A növényvédő szer a gyakorlati növényvédelmi feladatok ellátására szolgáló hatóanyag és a benne található egyéb anyagok összessége. A növényvédő szerek legfontosabb tulajdonsága, hogy alkalmasak a károsítók szabályozására. Ennek megfelelően, a károsítók biológiai hovatartozása szerint a növényvédő szereket döntően 3 fő osztályba soroljuk: készítmények az állati kártevők ellen (pl. rovarirtó szerek / inszekticidek), készítmények a kórokozók és mikroszkopikus gombák ellen (gomba- és mikrobaölő szerek / fungicidek), készítmények a gyomok ellen (gyomirtó szerek / herbicidek). Ezek mellett vagy ezen kategóriákon belül számtalan altípust különböztetünk meg (rovar-, csiga- vagy atkaölő, gomba- és baktériumölő stb). A növényvédő szerek hatóanyagai lehetnek természetes eredetűek, kémiai, biológiai vagy biotechnológiai úton előállított anyagok, valamint élő szervezetek is. A növényvédő szerek teljes lebomlásukig jelen vannak a környezetben, és hatással lehetnek az ott megnyilvánuló biotikus és abiotikus tényezőkre is (MAGYAR KÖZTÁRSASÁG 2000).

Az iparszerű, döntően monokultúras növénytermesztés során a mérsékelt éghajlati övben a termés 20-40%-a vagy esetenként még ennél is nagyobb hányada is elveszhet növényvédő szerek használata nélkül. A termőterületeken jelentkező kártevőkkel, például gyomokkal szemben védekezni kell, ezt a XX. század közepéig, vagyis a szintetikus kémiai növényvédő szerek szisztematikus megjelenéséig fizikai munkával kellett elvégezni. A növényvédőszer-ipar – a vegyipar részeként – már a század húszas éveiben megjelent, de a növényvédő szerek felhasználása a II. világháborút követően, a vegyipar talpra állásával és dinamikus bővülésével vált általánossá. A vegyszeres kártevőirtás mindhárom növényvédő szer osztály esetében gyors ütemben bővült, de globálisan a legjelentősebb elterjedést a rovarkártevők elleni klórozott szénhidrogének alkalmazása eredményezte (DAVIS, 2014). Hasonló expanzió a növényvédő szerek másik két osztályában is megtörtént, és a 90-es évekre a világon már 860 körüli kémiai hatóanyagra alapozva 21 ezernél is több készítményt, valamint biológiai ágenszt használtak (DARVAS, 2001). A növényvédőszer-készítmények legnagyobb hányada gyomirtó szer volt, és az Amerikai Egyesült Államok gyomirtószer-felhasználása a világpiac egyharmadát tette ki (US EPA, 1994).

Kezdetben a kémiai növényvédelem a növényvédőszer-hatóanyagok és -készítmények másodlagos hatásait nem vizsgálták kellő mélységben. Ezzel magyarázható, hogy rendkívül toxikus vegyületek is alkalmazhatók voltak növényvédő szerekként, például arzénvegyületek (BENCKO & FOONG, 2017) vagy a mitokondriális sejtlégzést gátló nitrofenolok (ATSDR, 2023) a növényvédő szerek mindhárom osztályában. A klórozott szénhidrogének – túlzott stabilitásuk nyomán bekövetkező környezeti perzisztenciájuk miatti – kudarcai ébresztették rá a szakembereket, hogy olyan növényvédő szerekre van szükség, amelyek felhasználásuk után meghatározott idő után maradéktalanul képesek lebomlani, nagymértékben szelektívek, bomlás során sem keletkeznek belőlük más toxikus vegyületek, emberre nem veszélyesek, csak a kártevőket/kórokozókat/gyomokat irtják, s hogy a növényvédő szerek fejlesztésénél ezek a szempontok a legfontosabbak. A kártevőnépességekben kialakuló ellenállóképesség (rezisztencia) kialakulása is ösztönözte a vegyipart, hogy minél változatosabb szerkezetű szereket fejlesszenek ki (DARVAS, 2000). Az itt felsoroltak alapján környezetvédelmi szempontból inert szerről, amely minden mellékhatástól mentes lenne, nincsen tudomásunk. Így a növényvédő szerek engedélyezése nem azt hivatott garantálni, hogy a szer nem kelthet veszélyt (a növényvédőszer-hatóanyagok jogilag veszélyes anyagoknak minősülnek), hanem azt, hogy nem okoznak kockázatot, vagyis kockázatelemzésük – bizonyos peremfeltételek mellett – nemcsak a veszély létét, hanem annak bekövetkezési valószínűségét is tekintetbe veszi (EFSA, 2024).

A növényvédő szerek, s ezen belül a gyomirtó szerek is potenciális veszélyt jelentenek a talajra, a felszíni- és felszín alatti vizekre, és ezeken keresztül veszélyeztethetik az élővilágot is. Fontos alapelv, hogy figyelembe kell venni a talaj összetételét, tulajdonságait, és a talajban lejátszódó folyamatok szerint kell meghatározni a megfelelő dózis kiszámítását az adott növényvédő szerből (BAJEER *et al.*, 2012). A növényvédő szerek helyes alkalmazásához a megfelelő szaktudás elengedhetetlen, mind biológiai, mind talajtani ismereteket kell hozzá elsajátítani (GYŐRI, 1997). A növényvédő szerek engedélyezése és felhasználása egyre többet foglalkozik az utókövetéssel, hogy a későbbiekben az esetleges negatív hatásokat a környezet és az emberi egészség védelmében fel tudják ismerni, ki tudják küszöbölni. A növényvédő szerek használata további kérdéseket vet fel a megengedett szermaradékokat (*maximum residue level* – MRL) illetően, hiszen a növényi és állati eredetű élelmiszerekben és takarmányokban, illetve azok felületén található szermaradék határértékét az Európai Parlament és a Tanács 396/2005/EK rendeletének II. és III. melléklete szabályozza, melyet újabb ismeretek birtokában bővítenek. A rendelet mellékletében szereplő MRL értékeket az EU területén belül egységesen 2008. szeptember 1. óta kell alkalmazni (EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL, 2005).

## 2.2. A GYOMIRTÓ SZEREKRŐL ÁLTALÁBAN

A gyomirtó szerek használatával főleg fizikai munkát lehet megtakarítani, ellenben a gyomirtó szerek okozta környezeti terhelés, szennyezés a legnagyobb mértékű a növényvédő szereken belül, hiszen a növényvédelemben világszerte a legnagyobb mennyiségben alkalmazott szerek. A hatásuk kifejtésének módja szerint megkülönböztetünk fotoszintézis-, növekedés- és bioszintézisgátló gyomirtó szereket (SZÉKÁCS, 2021). A gyomirtó szerek körülbelül fele a fotoszintézis gátlásán keresztül fejt ki hatását (BLACK, 2018). A gyomirtó szereknél megkülönböztetünk preemergens (kelés előtt alkalmazott) és posztemergens (kelés utána alkalmazott) szereket (BAGALE, 2023). Hatásmechanizmusuk típusa szerint megkülönböztetünk általános sejtmérgeket, hormonális hatású növényvédő szereket, valamint olyan hatóanyagokat, amelyek az auxintranszportot, a zsírsav- és viaszképződést, az aminosav- vagy a cellulóz-bioszintézist gátolják. Emellett ide tartoznak a kloroplasztiszok működését akadályozó vegyületek, valamint a fényindukált szabadgyökképzők is. A vízben kevésbé oldódó talajgyomirtó szerek a talajban könnyen perzisztenssé válhatnak. A gyomirtó szerek felezési ideje talajban függ a hatásmechanizmusuktól, – a kijutatott megfelelő dózis mellett – a nedvességtartalomtól, az oxigénellátottságtól, a talaj típusától és a benne található mikrobiális élettől (HUNYADI *et al.*, 2011) A növényvédő szerek hatásmechanizmusa alapvető szempont a növényvédő szerek fejlesztésénél, de a gyomok esetében kialakuló gyomrezisztencia kezelésében is. A korábban bevezetett vegyületek káros mellékhatásainak elkerülése és a kártevők rezisztenciájának kialakulásának megelőzése vagy a kialakult ellenállóság elkerülése érdekében az újszerű hatások elengedhetetlenek. A környezetbarát szerek kutatása a kezdetek óta élvonalban van. A növényvédő szerek kézikönyve, a *The Pesticide Manual* (TURNER, 2021) az egyik legfontosabb referenciakönyv, melyben főbb fizikai-kémiai, biológiai és környezeti jellemzőket sorol fel, meghatározza az egyes hatóanyagok kémiai besorolását, ezen kívül összefoglalja a növényvédő szerek tulajdonságait, az EU engedélyezés státuszáról szóló nyilvános adatbázisokat, az adott időszakban a fejlesztéssel, felhasználással és következményekkel kapcsolatos jelenlegi információkat.

Az engedélyezett növényvédőszer-hatóanyagok száma világszerte folyamatos növekedést mutatott az elmúlt évtizedekben: míg az 1950-es évek végén körülbelül 100, addig az 1990-es évek végén már mintegy 500, a 2010-es évek végére pedig 600 feletti volt az engedélyezett hatóanyagok száma a világpiacon (MCDUGALL, 2018). A globális trendet az új hatóanyagok engedélyezése erősíti, akár egy már bevezetett vegyületcsalád bővítése révén, akár új hatásmechanizmusok felfedezése által. Ugyanakkor a szigorodó szabályozások és hatóanyag-visszavonások csökkentő tényezőként hatnak. A globális tendencia mellett jelentős regionális

különbségek is megfigyelhetők: míg a világ számos térségében az egészségügyi és környezetvédelmi elvárások szigorodása miatt számos hatóanyag engedélyét nem újítják meg, addig az Egyesült Államokban (USA) – bár itt is szigorodnak az előírások – a szabályozás kevésbé korlátozó. Az összehasonlítás alapján a négy legnagyobb mezőgazdasági térség közül (USA, EU, Brazília, Kína) az USA-ban még mindig forgalmazhatóak azok a hatóanyagok, amelyek a másik három térség közül legalább kettőben már betiltásra kerültek, ami megmutatkozik az engedélyezett hatóanyagok számában és forgalmában is (DONLEY, 2019).

Az EU 2012 óta drasztikusan csökkentette a megújított engedéllyel rendelkező hatóanyagok számát: az 1995-2009 közötti időszakban 700 hatóanyagot vontak vissza (PETHŐ & SOMOGYINÉ PÁLOS, 2010; SZÉKÁCS, 2021), 2011-2013 között 22 hatóanyagot (TÓKÉS, 2020), majd 2014 és 2021 között további 94 hatóanyag helyettesítését javasolták (ROBIN & MARCHAND, 2021). Egy másik forrás szerint az EU 2019-2021 között összesen 102 hatóanyag engedélyét nem újította meg, és 59 esetében csökkentette a megengedett határértékeket (CROP LIFE INTERNATIONAL, 2022). Az EU Zöld Megállapodása (European Green Deal) célként tűzte ki, hogy 2030-ig 50%-kal csökkentik a „veszélyesebb” hatóanyagok használatát, harmonizált kockázati indikátorokat vezettek be, amelyek szerint az engedélyezett növényvédő szerek kockázati indikátora 22%-kal csökkent a 2011-2013 közötti alaphoz képest (EC, 2019). Ezzel szemben a szükséghelyzeti engedélyek alapján forgalmazott szerek kockázati indikátora 38%-kal nőtt ugyanebben az időszakban, ami azt jelzi, hogy az EU tagországai szükséghelyzeti engedélyek révén tartják forgalomban az elavult hatóanyagokat. A növekvő kutatási és fejlesztési költségek miatt az új növényvédőszer-hatóanyagok fejlesztési költsége jelentősen emelkedett: míg 1995-ben ez 152 millió USD volt, addig a 2010-2014 időszakban már 286 millió USD-ra nőtt (NISHIMOTO, 2019; MCDUGALL, 2018). Ez a növekvő költségvetés jelentős tőkekoncentrációt eredményezett, és a fejlesztések egyre inkább a géntechnológiai úton módosított (GM) növények felé fordultak. A fejlesztési költségek növekedése mellett a hatósági vizsgálatok követelményei is szigorodtak, különösen a nem célzott szervezetekre és a környezetre gyakorolt mellékhatások tekintetében, ami szintén tovább növeli a befektetési igényt.

A gyomirtó szerek kiemelt szerepet kaptak a növényvédő szerek fejlesztésén belül, kifejlesztésük biokémiai nehézségei, környezeti hatásai, valamint a gyomnövények rezisztenciaproblémái miatt. Az utóbbi nehézség leküzdése érdekében az 1990-es évekig 3 évente 1-1 új hatásmóddal rendelkező növényvédőszer-hatóanyag jelent meg (DUKE, 2012), ám az utolsó új hatásmechanizmusú hatóanyagot, az *isoxaflutol*-t 1992-ben vezették be (HEAP & DUKE, 2018). A Bayer 2020-ban jelentette be, hogy hamarosan egy új hatásmechanizmussal rendelkező aktív hatóanyagú gyomirtószert vezet be (GULICKSON, 2021; SZÉKÁCS, 2021), ám ez mindezekig még nem történt meg. Összességében a bejelentett gyomirtó szerek (nem új

hatásmechanizmusokkal) 1980-2000 között évente 5,5, 2010-ig évente 4, 2018-ig pedig évente 2 volt és ez a csökkenő tendencia folytatódik (SZÉKÁCS, 2021, MCDUGALL, 2018). Ez két tényező miatt lehetséges: az egyik a növekvő regisztrációs költségek, a másik pedig a gyomirtószer-toleranciával rendelkező GM-növények térnyerése. Mindez komoly kihívást jelent a gyomrezisztencia kezelésében (SZÉKÁCS 2021).

### 2.3. A GLY TÖRTÉNETE

A GLY hatóanyagot először 1950-ben egy svájci vegyész, Henri Martin szintetizálta a Cilag nevű gyógyszercégnél, és bár gyógyszerészeti aktivitást mutatott, e hatásait tovább nem vizsgálták. A Cilag később csődbe ment, és vegyi anyagait egy vegyszerellátó vállalat, az Aldrich Corp. vásárolta meg. 20 évvel később a Monsanto Corp. cég megvásárolta az Aldrich-től a GLY mintáját (több száz más vegyszerrel együtt), és bevonta a vízlágyító szerek fejlesztésére indított kutatásába. Bár vízlágyítóként nem működött, számos más hatást is teszteltek, és így fedezték fel egyedülálló gyomirtó aktivitását. Emiatt a Monsanto Corp. vegyésze, John Franz újrashintetizálta a GLY-ot, és a vállalat 1970-ben nagyon gyorsan szabadalmaztatta gyomirtószer-hatóanyagként (a szabadalmat megadták, és a gyomirtó szert 1974-ben vezették be az amerikai piacra) (MOLIN, 1998). A GLY hatalmas piaci sikert hozott a Monsanto számára, hiszen világpiaci forgalma töretlenül, sőt egyre fokozódó mértékben nőtt, s ez 1991-ig, a nemzetközi szabadalom érvényességi ideje alatt egyre nagyobb nyereséget jelentett (SINGH *et al.*, 2024). A szabadalmi oltalom után generikus gyomirtó vegyületté vált, lehetővé téve, hogy Kína licencegyezmény nélkül gyártsa, jelentősen növelve a GLY előállítási kapacitását. Ennek eredményeként ma már a világpiaci keresletet meghaladó mennyiségben képes termelni (SZÉKÁCS & DARVAS, 2012; SZÉKÁCS & DARVAS 2018). A növényvédő szerek intenzív használatához és az ebből következő emberi expozícióhoz számos toxikus hatás társult, beleértve a rákkeltő-és a neurotoxikus hatásokat is (KRIEGER, 2010, ALAVANJA *et al.*, 2013, TABREZ *et al.*, 2014, AGOSTINI *et al.*, 2020, BLOEM *et al.*, 2024, CHAVES-REYES *et al.*, 2024). Jelenleg a világon a legnagyobb mennyiségben alkalmazott gyomirtószer-hatóanyag a GLY, amelyet engedélyezése (1974) óta az Egyesült Államokban és a világ minden táján egyre nagyobb mennyiségben használnak, és 2016-ban elérte az 1 milliárd tonna feletti éves felhasználást (TRANSPARENCY MARKET RESEARCH 2016). A hatalmas forgalombővülésben nagymértékben közrejátszott az újonnan kifejlesztett GLY-toleráns GM-növények bevezetése, melyek által a GLY használata a 15-szörösére nőtt a GM növények 1996-os bevezetése óta. (BAYLIS, 2000, DILL *et al.*, 2010, SZÉKÁCS & DARVAS, 2012, BENBROOK, 2016). 2014-2015-ben a GLY felhasználása a kukorica 26% -át, a gyapot 45% -át és a szójabab gyomirtó szerek alkalmazásának 43% -át tette ki (KNISS, 2017). Európában a 2017-ben eladott gyomirtó szer mennyiség 33%-át adta ki a GLY (ANTIER *et al.*, 2020).

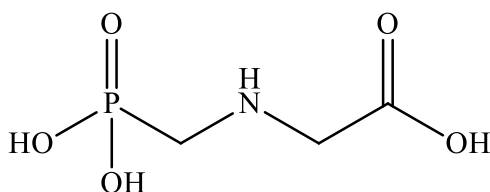
Az Európai Zöld Megállapodás értelmében a kémiai növényvédő szerek mezőgazdasági alkalmazása hozzájárul a talaj, a víz és a levegő szennyezéséhez, a biológiai sokféleség csökkenéséhez, valamint károsíthatja a nem célzott növényeket, rovarokat, madarakat, emlősöket és kétéltűeket (EC, 2019, KANATAS *et al.*, 2022). Az Európai Bizottság már létrehozott egy harmonizált kockázati mutatót, amely a növényvédő szerekhez kapcsolódó kockázatok csökkentésének mértékét számszerűsíti. Ez a mutató azt jelzi, hogy az elmúlt öt évben a növényvédő szerek használatából eredő kockázat 20%-kal csökkent. A Bizottság további intézkedéseket tervez annak érdekében, hogy 2030-ig a kémiai növényvédő szerek általános felhasználása és kockázata, valamint a magas kockázatú növényvédő szerek használata 50%-kal csökkenjen (EC, 2019). A GLY-piac értéke 2022-ben 9,86 milliárd USD volt, és várhatóan 2029-re eléri a 15,64 milliárd USD-t, a biztonságával és a környezeti hatásával kapcsolatos folyamatos viták ellenére a GLY továbbra is a modern mezőgazdaság egyik legfontosabb gyomirtószer-hatóanyaga (MAXIMIZE MARKET RESEARCH, 2023). Különböző kontinenseken a GLY felhasználása, elfogadása vagy éppen ellenzése más-más megítélés alá esik (FINGER *et al.*, 2023). Az Egyesült Államokban 1974 óta több mint 1,6 milliárd kg GLY-t alkalmaztak, ami a GLY becsült globális felhasználásának 19%-át teszi ki. Egyes tanulmányok szerint a GLY és bizonyos rákos megbetegedések között kapcsolat áll fenn, míg mások szerint használata nem károsítja a felhasználókat (BENBROOK, 2016, BOFFETTA *et al.*, 2021). Évek óta vita tárgyát képezi az EU-ban, de betiltására nem került sor. Az EU egyes országai lépéseket tettek a használatának korlátozására: Franciaország, Hollandia és Belgium betiltotta a GLY lakossági felhasználását. Németország, a Bayer vegyipari óriáscég (amely 2018-ban felvásárolta a Monsanto-t) anyasországa, betiltotta a GLY-használatot a közterületeken. Ausztria és Luxemburg megpróbálta betiltani a GLY-t, de nem jártak sikerrel. Dél-Amerikában El Salvador eredetileg betiltotta a GLY-t, de később hatályon kívül helyezte a döntést. Mexikó vállalta, hogy 2024 márciusáig betiltja a GLY használatát, ám ez nem járt sikerrel, s a mexikói helyzet összhangban van a globális trendekkel, például az Európai Unió 2023-as döntésével, amely tíz évvel meghosszabbította a GLY engedélyezését, bizonyos feltételekkel (ALCÁNTARA-DE LA CRUZ *et al.*, 2021). Ázsiában Vietnám az egyetlen olyan ország, amely teljes mértékben betiltotta a GLY használatát (PHONG & THONG, 2020). Srí Lanka 2015-ben megkísérelte betiltani a GLY-t, de a döntést 2021-ben tudományos bizonyítékokra hivatkozva hatályon kívül helyezte, tekintettel arra, hogy az ország súlyos élelmiszerhiánnyal küzdött (MARAMBE & HERATH, 2020).

A betiltására tett kísérletek nem befolyásolják jelentősen a GLY és annak készítményei széles körben való használatát világszerte, holott egyre több kutatás mutat rá ezeknek a vegyületeknek a szárazföldi ökoszisztémákra gyakorolt káros hatásaira (KLÁTYIK *et al.*, 2023).

A GLY engedélyének 10 éves meghosszabbítását az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (EFSA) értékelése alátámasztotta, amely során nem állapítottak meg kritikus biztonsági kockázatokat a GLY használatával kapcsolatban. Ez a javaslat hosszú viták és vizsgálatok után született, melyek során különösen a vegyület rákkeltő hatását vizsgálták, mivel korábban aggályok merültek fel a potenciális egészségügyi kockázatokkal kapcsolatban (ÁLVAREZ *et al.*, 2023). 2017-ben 5 évre szóló engedélyt kapott a GLY, amit 2022-ben meghosszabbítottak további 12 hónappal, hogy a hatóságok kiértékelhessék a még folyamatban lévő vizsgálatokat. Az új, 2023. évi engedélyezés időtartama 10 év, ami ugyan rövidebb, mint a maximum (15 év), de a leggyakrabban alkalmazott engedélyezési időtartam, amit a Glyphosate Renewal Group, köztük olyan nagyvállalatok, mint a Bayer és a Syngenta, kértek. Az engedély meghosszabbításának eredményeként a GLY 2033. december 15-ig engedélyezett az EU-ban (EC, 2023). Mindazonáltal az Európai Bizottság, figyelembe véve a folyamatos kutatásokat, készen áll az újabb tudományos eredmények alapján ismételten értékelni a vegyület biztonságosságát.

#### 2.4. A GLY FIZIKAI- KÉMIAI JELLEMZŐI ÉS HATÁSAI

A GLY [N-(foszfonometil)-glicin] fizikai tulajdonságai alapján kristályos, fehér, szagtalan, szilárd halmazállapotú vegyület, kémiai jellemzőit tekintve gyenge szerves sav, karboxil és foszfát funkcionális csoportja hidrogéndonor és -akceptor szerepet is betölthet, s ezáltal ikerionos szerkezete révén kiválóan oldódik vízben (12 g/l 25°C-on) (1. ábra) (DILL *et al.*, 2010). Felezési ideje természetes vizekben 1-92 nap, míg talajban 2-197 nap (TURNER, 2021). A talajban a hatása perzisztens, hiszen egyszeri kipermetezése több vegetációs ciklust érinthet (SUWARDJI & SUDANTA, 2021). A GLY környezeti metabolitja az AMPA (amino-metil-foszfonsav), mely talajban mobilisabb, mint maga hatóanyag (JAYASUMANA *et al.*, 2014).



1. ábra Az N-(foszfonometil)-glicin (GLY) szabad savas alakjának képlete

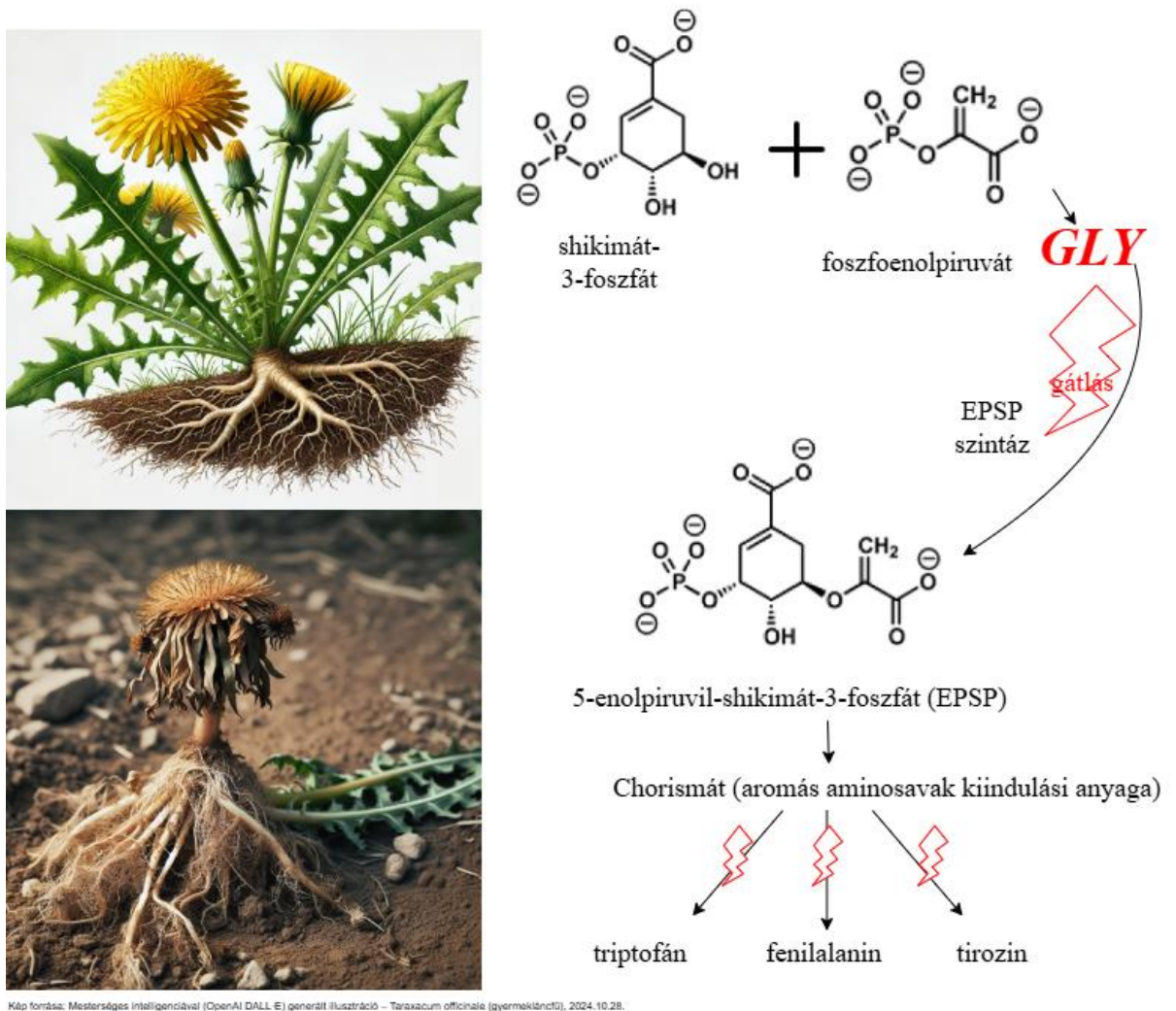
Fémekkel erős komplexeket képez (Al, Fe, Mn, Zn) (VERECKEN, 2005), a GLY/AMPA–fém-komplexet a máj nem képes metabolizálni, ezért a kiválasztás nagyrészt a vesén keresztül zajlik (JAYASUMANA *et al.*, 2014). Míg korábban úgy vélték, hogy a GLY gyorsan lebomló, s így környezetkímélő hatóanyag, a műszeres analitikai módszerek fejlődésével kiderült, hogy kis (0,07-40 mg/kg) koncentrációban gyakori, egyes állaspontok szerint ubikviter jellegű

környezetszennyező, illetve, hogy a bomlásterméke, az AMPA talajban perzisztens jelleget mutat (AHUJA *et al.*, 2024, OSTEN *et al.*, 2025).

A *GLY* hatásmechanizmusát tekintve gátolja az aromás aminosavak (tirozin, triptofán és fenilalanin) bioszintézisét, mivel gátolja a növényekben lezajló sikimisav-anyagcsereutat. A sikimát-3-foszfát és a foszfoenolpiruvát az EPSP szintáz enzim hatására reagálnak egymással, ennek eredményeként 5-enolpiruvil-sikimát-3-foszfát (EPSP) keletkezik. Az EPSP további átalakulások során chorismáttá alakul, amely az aromás aminosavak bioszintézisének kiindulási anyaga (SAMMONS *et al.*, 1995). A *GLY* a központi intermedier kialakulását katalizáló enzim, az 5-enol-piruvilsikimisav-3-foszfát-szintáz (EPSPS) működését gátolja meg úgy, hogy az enzim szubsztrátumaként kötődik a foszfoenol-piruvát analógiaként annak helyére (BO *et al.*, 2017). Így ez a kötődés blokkolja az enzim aktivitását és a sikimát-3-foszfát nem tud átalakulni EPSP-vé, ezzel megszakítja a sikimisav útvonalat (2. ábra).

Az esszenciális aminosavak bekövetkező hiánya miatt leáll a fehérjeszintézis, melynek hatására az öregedés jelei figyelhetők meg a növényeken, és igen gyorsan nekrotikus állapot lép fel, így a növény elpusztul (GEIGER *et al.*, 1986, SZÉKÁCS & DARVAS, 2012). A *GLY* a magasabb rendű növényekben megtalálható metabolikus útvonalakat is gátolja, így az alkalmazása során nem szelektív módon a szárazföldi és vízi növényi szervezetek elhalását eredményezi (BOOCOOCK & COGGINS, 1983). Mivel a sikimisav bioszintetikus útvonal számos prokariótában és gombában is megtalálható, ezáltal a *GLY* széleskörű használata hatással lehet a mikrobiális közösségek sokféleségére és összetételére, beleértve az emberi bélmikrobiomot is. Leino és munkatársai eredményeiből származó konzervatív becslés szerint az emberi bélmikrobiomban található fajok 54%-a érzékeny a *GLY*-ra (LEINO *et al.*, 2021).

## GLY hatásmechanizmusa növényekben



2.ábra A GLY hatásmechanizmusa növényekben

A GLY-sóinak vízoldhatósága a legjobban oldódhatótól indulva a következő: GLY – trimetil-szulfóniumsó, -IPA-só, -káliumsó, -nátriumsó, -ammóniumsó és GLY szabad sav (TSUI & CHU, 2003, SZÉKÁCS & DARVAS, 2018). A gyártók aktív hatóanyagként a GLY sóit (pl. GLY-izopropilammónium-só, GLY-IPA; -diammóniumsó; -trimetil-szulfóniumsó) használják fel a készítményeikben, főleg a vízben való oldódásuk fokozása érdekében, oly módon, hogy gyomirtó hatásuk ne csökkenjen (SZÉKÁCS, 2006, DEFARGE *et al.*, 2016, TRAVLOS *et al.*, 2017). A növekvő használat következtében a GLY környezeti szennyezővé vált (vízben) és további környezeti szennyeződést okozott (SZÉKÁCS *et al.*, 2015). A magyarországi felszíni és felszín alatti vizeiben magas koncentrációban találtak GLY-ot (0,54–0,76 µg/l), az ivóvizekben maximálisan elfogadható határérték 0,1 µg/l, melyet az Európai Bizottság 98/83/EC ivóvíz irányelvében határozták meg (MÖRTL *et al.*, 2013, LUTRI *et al.*, 2020, MAC LOUGHLIN *et al.*, 2020). Portugália szárazföldi területén 2019 és 2021 között végzett vizsgálat során 103

talajvízmintában elemezték a GLY jelenlétét, és azt a minták 14%-ában mutatták ki. A minták 10%-ában a GLY koncentrációja meghaladta a 0,1 µg/l-es határértéket, de egyik esetben sem lépte túl a 8,67 µg/l-es környezeti minőségi küszöböt (SANTOS *et al.*, 2024). A New York államban végzett vizsgálatok szerint a GLY permetezése után 3–13 nappal, esőzések hatására megjelent a vegyület a mezőgazdasági területek kifolyó vizeiben (lefolyás és sekély drénvíz). A mért GLY-koncentráció több ponton is elérte a 90 µg/l értéket (RICHARDS *et al.*, 2018). Egy másik, Mexikóban végzett vizsgálat célja a GLY és fő bomlásterméke, az AMPA koncentrációinak meghatározása volt különböző mezőgazdasági kultúrákhoz kapcsolódó, felszíni és felszín alatti vizek mintáiban. A felszín alatti víz mintáiban a legnagyobb koncentrációkat a tök- (GLY: 3,53 µg/l; AMPA: 4,32 µg/l) és kukoricatermesztéshez kapcsolódó területeken (GLY: 3,99 µg/l; AMPA: 4,80 µg/l) detektálták (OSTEN *et al.*, 2025). Székács és Darvas egy átfogó tanulmányban összegezték a GLY-kezeléseket követően felszíni és felszín alatti vizekben mért koncentrációkra vonatkozó adatokat. A munka jelentősége abban rejlik, hogy megalapozza a GLY környezeti expozíciójának tudományos értékelését és a kockázatbecslési folyamatokat (SZÉKÁCS & DARVAS, 2018.)

## 2.5. A GLY KOCKÁZATBECSLÉSE

A növényvédő szerek engedélyezésének alapja a tudományos bizonyítékokon alapuló kockázatbecslés, melynek alapvető tényezői a veszély azonosítása, a dózis-válasz értékelése, a kitettség (expozíció) becslése és a kockázat jellemzése. A kockázatbecslés feladata a veszélyes anyagnak való kitettség következményeként jelentkező, egészséget és környezetet károsító hatás megvalósulási valószínűségének meghatározása és a tudományos ismeretek bővülésével időszakos újraértékelése (WHO, 2004). A kockázatbecslés eredményeire támaszkodik az azzal folyamatos visszacsatolásban működő döntéshozatali eljárás, a kockázatkezelés, illetve a kockázati kommunikáció az érdekcsoportok, így a hatóságok, a szakmai civil szervezetek és a lakosság, valamint az ipari képviselők felé (EFSA, 2024). Az engedélyezési folyamatok azonban csak az aktív hatóanyagra vonatkozó teljes kockázatelemzést írták elő, a különböző adalékanyagok egyedi vizsgálatára vonatkozó előírások lényegesen enyhébbek voltak 2021-ig, a növényvédő szerek jóváhagyására vonatkozó rendelet (1107/2009/EC) új végrehajtási utasításának életbe lépéséig (EC, 2020). A növényvédő szerek engedélyezésének ilyen irányú szigorítását éppen a GLY-készítményekkel kapcsolatban felismert súlyos toxikológiai anomáliák (lásd alább) felismerése serkentette (EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL, 2018). Mindezek ellenére számos alulértékelt kockázati tényező maradt (BRÜHL & ZALLER, 2022). A vizsgált vegyületek humán- és a környezet-egészségügyre gyakorolt hatásának tartalmaznia kell a

veszély és a kockázat mértékét, a vegyület közvetlen káros hatását, a formázószereket tartalmazó keverék hatását. Növényvédőszer-hatóanyagok esetében a kockázatbecslést és kezelés eredményeként a kockázatcsökkenést – az EU tagállamaiban 2008 óta egységes – maximálisan megengedett szermaradék-szintek megállapításával érik el, mind a takarmányok, mind az élelmiszerek esetében (EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL, 2005).

A GLY gyomirtószer-hatóanyagra toleráns GM növények megjelenése óta a hatóanyag világszintű felhasználása jelentősen növekedett, ennek következményeként határértékét számos termékre módosították: lencse esetében 2012-ben 100-szor, szójára 1999-ben 200-szor magasabb értéket állapítottak meg. A GLY citotoxikus, genotoxikus, mutagén és hormonmoduláns hatását 1974. évi engedélyezése óta számos tudományos tanulmány vizsgálta, ezeken belül saját kísérleteink is igazolták a hatóanyag, de még inkább formázó szereit citotoxikus hatását különböző sejtvonalakon. Ennek tudatában erőteljes kritikát fogalmaztak meg a GLY (és a Roundup) tervezett uniós újraértékelését illetően, melyet 2012-ben 2015-re halasztottak, majd ismét elhalasztották. Zyoud és munkatársai 2016-ban összesen 3735 GLY publikációt találtak relevánsnak, amelyek 1973-2015 között jelentek meg (ZYOUN *et al.*, 2017). Az új eredmények hatására a GLY újraértékelésénél 2015-ben a Nemzetközi Rákkutató Ügynökség (IARC), valószínűleg rákkeltő az emberre kategóriába sorolta (2A csoport), az emberi kísérletek „korlátozott bizonyítéka” és az állatkísérletek „elegendő bizonyítéka” alapján (IARC, 2015, IARC 2017). Ennek ellenére az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (EFSA 2016), a FAO/WHO növényvédőszer-szermaradványokkal foglalkozó ülésén (JMPR, 2016) az Európai Vegyi anyag-ügynökség (ECHA, 2017) nem erősítette meg az IARC következtetését, és a GLY újra engedélyeztetését javasolta, a már meglévő bizonyítékokon alapuló tudományos kockázatértékelések alapján. Az ECHA kockázatértékelési bizottsága (RAC) arra a következtetésre jutott, hogy a rákkeltő hatás besorolását illetően, a CLP-rendelet alapján indokolt, és a súlyos szemkárosodás és a vízi élővilágra mérgező osztályozást fenn kell tartani (BURTSCHER *et al.*, 2017). Az IARC és az EFSA álláspontja közötti ellentmondás az volt, hogy a két ügynökség a GLY karcinogenitását emberben eltérően értelmezte. Ennek eredményeként az IARC a GLY és a non-Hodgkin-limfóma közötti összefüggést „embereknél korlátozottan bizonyított” státuszúnak tekintette; míg következtetésében az ECHA a bizonyítékokat „nagyon korlátozottnak” tartotta. Az EFSA és az IARC közötti nézeteltérést részletesen kifejtették, és megvitatták az állításaik közötti különbségeket (PORTIER *et al.*, 2016, TARAZONA *et al.*, 2017, PORTIER & CLAUSING, 2017). Az IARC, EFSA, ECHA és JMPR közötti nyilvánvaló ellentmondás fényében, a bizonyítékokon alapuló kockázatértékelés a GLY és készítményei szempontjából döntő értékűek az engedélyezéséhez és szabályozásához, a már meglévő cito- és genotoxicitási vizsgálatoknak az eredményei is nagyon fontosak a megfelelő következtetések levonására. Az Európai Bizottság

viszont újra jóváhagyta a *GLY* engedélyezését 2017-ben 5 évre (2022. december 15-ig engedélyezte) és létrehozta a *GLY* újraértékelő csoportot [*GLY* Assessment Group (AGG)] amit az eddigiektől eltérően nem egy tagállam végzett el, hanem négy (Franciaország, Magyarország, Hollandia, Svédország), amelyek együttesen jártak el a *GLY* következő értékelésénél. Az AGG tagállamai megvizsgálták az összes olyan bizonyítékot, amelyeket a megújított engedélyt kérelmező vállalatok nyújtottak be a hatóanyag készítményeinek forgalmazására az EU-ban. 2021. június 15-én Helsinkiben az AGG átadta a *GLY* értékelés kb. 11 000 oldalra kiterjedő tervezetét az ECHA és az EFSA EU-ügynökségeknek, és az Európai Bizottság jogi kötelezettségének megfelelően 2022. december 2-án végrehajtási rendeletet fogadott el, amelyben a *GLY* engedélyét 2023. december 15-ig meghosszabbította. Az Európai Bizottság 2023. november 16-i ülésén, nem jutott döntésre az engedély meghosszabbításáról, közleményük szerint a tagállamok által leadott szavazatok nem érték el a *GLY* megújításához vagy elutasításához szükséges minősített többséget, ezért az ügyben a Bizottság saját hatáskörben jogosult döntésre, s végrehajtási rendeletet hoztak, mely szerint a *GLY* hatóanyagnak az EU-n belüli használati engedélyét (és így a *GBH*-k engedélyezésének lehetőségét) bizonyos új feltételek és korlátozások mellett 10 évvel meghosszabbították. Ezen korlátozásokat az ECHA, az EFSA és az EU-tagállamok által végzett átfogó biztonsági értékelés alapján határozták meg. A nemzeti engedélyezésért a tagállamok felelősek, ahol korlátozhatják a *GLY* használatát, nemzeti és regionális szinten, ha a kockázatértékelés alapján ezt szükségesnek ítélik. Jelenleg a *GLY* 2033. december 15-ig engedélyezett az EU-ban (EP, 2023).

## 2.6. *POE-15* JELLEMZÉSE

A *POE-15* leggyakrabban 15 etilén-oxid egységet tartalmazó zsíraminszármazék, amely bár technológiai szempontból rendkívül hatékony adalékanyag, későbbi vizsgálatok kimutatták, hogy jelentős citotoxikus, genotoxikus és környezetkárosító hatásokat fejthet ki (BRUSCH & SMITH, 2007). Ennek következtében az Európai Unió 2016 és 2017 között felszólította az EU-tagországokat, hogy vonják ki a *POE-15*-tartalmú *GLY*-készítményeket, köztük a Roundup Classic eredeti változatát is. Ezt a döntést az Európai Bizottság a 2016. augusztus 1-jén kiadott 2016/1313 számú végrehajtási rendeletében rögzítette, amely módosította a *GLY* jóváhagyási feltételeit. A rendelet kimondja, hogy a tagállamoknak biztosítaniuk kell, hogy a *GLY* tartalmazó növényvédő szerek ne tartalmazzanak *POE-15*-öt. Ez a lépés a *POE-15* toxikológiai kockázatai miatt történt, mivel az EFSA megállapította, hogy a *POE-15* minden vizsgált végponton jelentős toxicitást mutatott a *GLY*-hoz képest (EC, 2016).

A *POE-15* a Roundup Classic gyomirtószerben a legfontosabb adalékanyagként szerepelt: amfipatikus szerkezete révén elősegíti a *GLY* felszívódását a növények viaszréteggel borított kutikuláján keresztül, fokozza a hatóanyag levélfelülethez való tapadását és felszívódását, ezáltal növeli a készítmény gyomirtó hatékonyságát, különösen a nehezen irtható gyomfajok esetén (MESNAGE *et al.*, 2022b). A *POE-15* koncentrációja a Roundup Classic formulációban 15% (*POE-15 SDS*, 2019) volt.

Tush és Meyer vizsgálata elsőként elemezte a *POE-15* talajhoz való kötődését és előfordulását különböző amerikai mezőgazdasági területeken. Eredményeik szerint a *POE-15* szignifikánsan erősebben adszorbeálódik a talajhoz, mint a *GLY*, különösen savas pH-jú közegben és kalcium-klorid jelenlétében, ami fokozza az adalékanyag környezeti perzisztenciáját. A kutatás újdonsága, hogy több amerikai állam talajmintáiban kimutatták a *POE-15* jelenlétét, ráadásul nemcsak az adott kezelési évben, hanem a következő vegetációs időszakban is, ami a *POE-15* hosszú távú környezeti jelenlétére utal (TUSH & MEYER, 2016).

Egy másik tanulmány három különböző összetételű *POE-15*-formuláció (5:1, 10:1, 15:1 oxid:faggyúamin-arány) akut toxicitását vizsgálta a *Thamnocephalus platyurus* nevű vízi rákfajnál. Mindhárom változat rendkívül toxikusnak bizonyult: a 48-órás LC<sub>50</sub>-értékek akár 2,01 µg/l-re is lecsökkentek a 15:1 arányú formuláció esetén. A vizsgálat alapján a faggyúaminlánc rövidülése növeli a toxicitást, míg az oxidlánc hosszának hatása enyhébb volt. Ez arra utal, hogy a *POE-15* jelentős veszélyt jelenthet a vízi ökoszisztémákra, ahol a készítmény használata elterjedt (BRUSCH & SMITH, 2007).

Laboratóriumi vizsgálatok során a *Drosophila melanogaster* nőtényeinél megfigyelték, hogy a *POE-15* önmagában is jelentősen csökkentette az egyedek élettartamát, rontotta a mozgásképeséget, és gátolta a szaporodóképességet, míg a *GLY* önmagában nem váltott ki ilyen hatásokat. *In vitro* kísérletek során a nőtény ivarszerveiből származó OSS (ovarian stem sheath cells) sejtvonalakon a *POE-15* már alacsony koncentrációban is kifejezett citotoxikus hatást okozott, míg a *GLY* toxicitása ezekben a modellekben jóval enyhébbnek bizonyult. A megfigyelések arra utalnak, hogy a Roundup formulációk toxikus hatásai nagyrészt a *POE-15* jelenlétéhez köthetők, nem pedig a *GLY* hatóanyaghoz (BEDNÁŘOVÁ *et al.*, 2020). A *POE-15* önmagában is fokozhatja a sejthártya permeabilitását, oxidatív stresszt idézhet elő, valamint mitokondriális károsodást okozhat, ami fokozza a *GLY* toxikus hatásait (STRILBYTSKA *et al.*, 2022).

Hasonló megállapításokat tettek a *Dendropsophus minutus*, azaz a kis levelibéka ebihalain végzett vizsgálatok is, ahol a *POE-15* már alacsony, 5 µg/l koncentráció mellett is jelentősen megnövelte a genomkárosodás és a mikronukleusz-képződés arányát. A 10 µg/l koncentráció minden esetben elhulláshoz vezetett. A vérsejtek morfológiai vizsgálata során a *POE-15*-nek kitett

egyedeknél gyakoriak voltak a lebenyes sejtmagok, míg a *GLY*-expozíció inkább binukleált sejteket eredményezett. A májszövetekben mindkét vegyület kifejezett kóros elváltozásokat okozott, ám a *POE-15* esetében a hepatotoxikus hatás erőteljesebb volt. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a *POE-15* nemcsak genotoxikus és mutagén, hanem súlyos májkárosodást is kiválthat, különösen érzékeny fejlődési szakaszban lévő kételtűeknél, ami hosszú távon veszélyeztetheti ezen fajok természetes populációit (LOPES *et al.*, 2021).

Azóta új, *POE-15*-mentes formulációk kerültek kereskedelmi forgalomba, ezek pontos összetétele sok esetben nem transzparens. A *POE-15* példája világosan mutatja, hogy a növényvédő szerek segédanyagai – a korábbi feltételezésekkel ellentétben – nem feltétlenül tekinthetők toxikológiai szempontból hatástalannak vagy „inertnek”. Épp ellenkezőleg, esetenként döntő szerepet játszhatnak a készítmények környezeti és biológiai hatásaiban. A vizsgálati anyagok összetételét és jellemzését a Mellékletben található 1. táblázat ismerteti részletesen.

## 2.7. A ROUNDUP CLASSIC JELLEMZÉSE

A Roundup Classic gyomirtó készítmény hatóanyaga a *glyphosate* izopropilaminsója (*GLY-IPA*), amely jellemzően 360 g/l koncentrációban található meg az oldatban. A készítmény emellett segédanyagokat, elsősorban felületaktív szereket is tartalmaz a hatóanyag biológiai hozzáférhetőségének növelése érdekében. A biztonsági adatlap továbbá víz, stabilizátorok, pH-szabályozók, valamint egyéb oldószerként funkcionáló összetevők jelenlétét is jelzi, azonban ezek pontos kémiai azonosítását gyakran nem nyilvános, ipari titokként kezelik (MONSANTO, 2015). A készítmény biztonsági adatlapja alapján (Mellékletben csatolva) a *GLY-IPA* besorolása nem jelöl akut egészségkárosító hatást a REACH és CLP szerinti szabályozás értelmében, ugyanakkor a *POE-15* súlyos szem- és bőrirritációt, valamint hosszú távon a vízi szervezetekre mérgező hatást fejthet ki (H318, H411) (*POE-15 SDS*, 2019). Fontos megjegyezni, hogy a formuláció toxikológiai hatását elsősorban nem a hatóanyag, hanem a segédanyagok határozzák meg, amelyekre vonatkozóan számos *in vitro* tanulmány mutatott citotoxikus, genotoxikus és apoptotikus hatásokat emlős eredetű sejtvonalakon (STRILBYTSKA *et al.*, 2022, YOUNG, 2015, NI *et al.*, 2024). Az *in vitro* vizsgálatokban a Roundup-formulációk szignifikánsan toxikusabbnak bizonyultak, mint azonos koncentrációjú tiszta *GLY*: a 24-órás  $EC_{50}$ -érték *GLY* esetén 16 mM, míg a R esetében mindössze 0,008 mM volt (YOUNG, 2015). Emellett egy másik vizsgálat kimutatta, hogy a R genotoxikus hatást is kifejt: az *Escherichia coli* SOS chromotest alapján a *GLY*-tartalmú R DNS-károsító aktivitást mutatott, továbbá a *Daphnia magna* vízibolhákön végzett toxicitási tesztekben már 0,2 g/l koncentráció esetén 50%-os mortalitás ( $LD_{50}$ ) volt tapasztalható, 0,25–0,5

g/l koncentráció pedig teljes elhullást okozott (LD<sub>100</sub>). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a R toxikus és genotoxikus tulajdonságai jelentősen meghaladják a GLY hatását (RAISPULIS *et al.*, 2009). Egy másik tanulmány bebizonyította, hogy a R már a mezőgazdaságban ajánlott dózisok mellett is károsítja a szarvasmarha preimplantált embrióinak fejlődését *in vitro*, illetve dóziszfüggő fejlődési leállást, valamint sejthalált okoz. Már rendkívül alacsony koncentrációban (0,9 ppm) is kimutathatóan rontotta az embriók életképességét. A kezelés hatására megnőtt az intracelluláris kalciumszint, fokozódott az oxidatív stressz, és emelkedett az apoptózis aránya (CAI *et al.*, 2020).

A POE-15-tartalmú GLY-készítmények forgalmazása 2016–2017-ben megszűnt az Európai Unióban, mivel az EFSA és más hatóságok aggodalmukat fejezték ki e segédanyag biztonságosságával kapcsolatban. Ez egyúttal a R-készítmény kivonását is jelentette a piacról, legalábbis az eredeti összetételben. A Roundup márkanév azonban azóta is létezik, más összetételű termékekkel, például POE-15 nélküli formulációkkal. A Roundup Classic és más, POE-15-tartalmú készítmények *in vitro* vizsgálatokban jelentős citotoxikus, genotoxikus és apoptotikus hatásokat mutattak különböző sejttípusokon, sokszor már alacsony koncentrációk mellett is (DAL' BÓ *et al.*, 2022).

Környezeti szempontból fontos, hogy a GLY és annak fő metabolitja, az AMPA hosszan fennmaradhat talajban és felszíni vizekben, és kimutatható lehet mezőgazdasági területek közelében az ivóvízben, üledékben, illetve élelmiszermaradványként is (MÖRTL *et al.*, 2013). A fenti tények rámutatnak, hogy a GLY-készítmények hatásait nem elegendő csupán a hatóanyag alapján megítélni. A segédanyagok és formulációk önálló és kombinált vizsgálata kulcsfontosságú a tényleges kockázatok megértéséhez, különösen a valós expozíciós körülmények figyelembevételével. A jelen dolgozat célja e komplex hatások vizsgálata, különös tekintettel a Roundup Classic, a POE-15 és a GLY egyedi és együttes hatásmechanizmusaira. A vizsgálati anyagok összetételét és jellemzését a Mellékletben található 1. táblázat ismerteti részletesen.

## 2.8. NEM CÉLSZERVEZETEKRE GYAKOROLT TOXIKUS HATÁSOK

A GLY-t sokáig környezetkímélőnek tartották, mivel a hatásmechanizmusa a kizárólag növényekben előforduló sikimisav-útvonal gátlásán alapul, amely az állatokban nem található meg. Később toxikus mellékhatásait fedezték fel a humán sejtekben, ahol a citokróm P450 és aromataz enzimek gátlásával fejtik ki genotoxikus hatásukat.

Az elmúlt évtizedek alatt kiderült, hogy a GBH-k nem csak célszervezetekre képesek hatást kifejteni, kételtűeknél és patkányokon végzett vizsgálatok alapján teratogén hatást okoz, mivel megzavarja a retinsavas jelátviteli útvonalat (LOPES *et al.*, 2021, PAGANELLI *et al.*, 2010, GUERRERO SCHIMPF *et al.*, 2017, ROMANO *et al.*, 2012). Több tanulmány is bizonyította,

hogy a *GBH* citotoxikus hatású placenta- és az embrionális eredetű sejtvonalakon, melyet az aromázok gátlásán keresztül a szteroidhormon-bioszintézisében fejt ki (BENACHOUR & SÉRALINI, 2009, GASNIER *et al.*, 2009). Tóth és munkatársai a *GLY*, *AMPA*, *POE-15*, valamint 13 különböző *GLY*-alapú gyomirtó szer (*GBH*) akut és krónikus citotoxicitását vizsgálták *Aliivibrio fischeri* biolumineszcencia-tesztel, illetve hormonális aktivitásukat is elemezték. Eredményeik szerint a toxicitás főként a segédanyagokhoz – különösen a *POE-15*-höz – köthető, nem magához a hatóanyaghoz (TÓTH *et al.*, 2020). A Háhn és munkatársai kimutatták, hogy a *GLY* és egyes *GLY*-alapú gyomirtók csökkenthetik a *Pseudomonas aeruginosa* baktérium érzékenységét az imipenem antibiotikummal szemben, ami hozzájárulhat az antibiotikum-rezisztencia kialakulásához. Mivel ezek a vegyületek gyakran együtt fordulnak elő a környezetben, kölcsönhatásaik befolyásolhatják a mikrobiális közösségek összetételét és működését (HÁHN *et al.*, 2022).

A *GLY* és a *GBH*-k *in vitro* citotoxikus hatására a sejtvonalak különbözően reagálnak, vannak sejtvonalak, melyeknek válasza érzékenyebb, ilyen a humán emberi hepatopietikus Epstein-Barr-vírussal transzformált limfocita Raji-sejtek, a humán hámsejtek HaCaT keratinocitasejtek és az NE-4C egér-neuroektodermális őssejtvonal (TOWNSEND *et al.*, 2017, QIN *et al* 2017, SZÉKÁCS *et al.*, 2014). Szakirodalmi adatok alapján számos alkalommal vizsgálták a *GLY*, *GBH* (Roundup), illetve egy *GLY*-metabolit (*AMPA*) genotoxikus, citotoxikus, mutagén és hormonkárosító hatását. Szakirodalmi adatokban a sejtproliferációs tesztben (MTT-teszt) a *GLY* nyolc humán sejtvonalban gátolta a sejtnövekedést, de két immortalizált normál prosztata-sejtvonalban nem (YOU *et al.*, 2013). Több tanulmány beszámolt a *GBH* készítmények apoptotikus hatásáról HepG2 sejtvonalon, míg a *GLY* önmagában általában nem mutatott toxikus hatást, vagy csak lényegesen magasabb koncentrációban. Ez azt mutatja, hogy a formulációk apoptotikus hatása nagyobb, mint a *GLY*-é önmagában (GASNIER *et al.*, 2009, MESNAGE *et al.*, 2013.). *In vitro* vizsgálatokban a *GBH*-k MCF7 sejtvonalon erőteljes sejtnövekedést indukálnak (THONGPRAKAISANG *et al.*, 2013).

A fent említett eredmények miatt fokozott figyelmet fordítottak a növényvédő szerek előállításához használt segédanyagok toxicitására és lehetséges mellékhatásaira is. A *GLY*-ot általában poliglükózidokkal és polietoxilezett anyagokkal adjuvánsként formulázzák (MESNAGE *et al.*, 2019). A faggyúalapú polioxietilénamin (*POE-15*) a Roundup Classic gyomirtó szer fő felületaktív anyaga, a *GLY* (hatóanyag) tapadását elősegítő anyagként működik, segítve a növények felszínén történő adszorpcióját és a növények általi felvételét, valamint megkönnyíti a sejtekbe történő bejutást. A *POE-15* a *GLY*-hoz viszonyított fokozott citotoxikus és genotoxikus hatását dokumentálták a tudományos szakirodalomban (BENACHOUR & SÉRALINI, 2009, MESNAGE *et al.*, 2012, BENACHOUR *et al.*, 2007, MLADINIC *et al.*, 2009, GASNIER *et al.*,

2009, SZÉKÁCS *et al.*, 2014, TOWNSEND *et al.*, 2017). Az Európai Bizottság határozata (EC, 2017) alapján a tagállamok a POE-15-öt tartalmazó GBH-ket betiltották.

Az *in vivo* mikronukleusz-, az *in vitro* kromoszómaaberráció- és a comet-tesztvizsgálatokból megállapították, hogy a GLY/Roundup/AMPA vegyületcsoportnak genotoxikus hatás tulajdonítható (KIER *et al.*, 2013, MANAS *et al.*, 2009a, SANTOVITO *et al.*, 2024). Több különböző GLY-tartalmú gyomirtó szer citotoxikus hatásának vizsgálatánál a sejtvitalitás dózisfüggő volt, míg magánál a hatóanyagnál kis mértékben volt tapasztalható sejtpusztulás (GASNIER *et al.*, 2009). A Roundup nem klasztogén az *in vivo* mikronukleusz-tesztben, ellenben az Ames-tesztben gyenge mutagén hatása mutatkozik (RANK *et al.*, 1993). Séralini és munkatársai két éven át végeztek hosszú távú etetési patkánykísérleteket a Monsanto által kifejlesztett NK603 GM kukoricával, valamint a vele együtt is alkalmazott Roundup készítménnyel. A vizsgált koncentrációknál már a legkisebb mennyiségű GBH 0,1 ppb, melyet az ivóvizükhöz kevertek, is elegendő volt a kezelt állatok élettartamának megrövidüléséhez (a kontrollhoz képest) és betegségtünetek kialakulásához. Nemenként változott a hatás, a nőstényeknél emlőtumorok, míg a hímeknél máj- és vese-rendellenességek, valamint bőrtumorok voltak kimutathatóak (SÉRALINI *et al.*, 2012). Ezen vizsgálatok eredményei is jól tükrözik, hogy a növényvédő szerek kockázatértékelésében nagyon fontos a veszélyek azonosítása és az expozíció becslése (GILDEN *et al.*, 2010, TAN *et al.*, 2012).

## 2.9. IN VITRO VIZSGÁLATI RENDSZEREK TOXIKOLÓGIAI ALKALMAZHATÓSÁGA

Az elmúlt évtizedekben a toxikológiai, farmakológiai és környezetanalitikai kutatásokban egyre nagyobb hangsúlyt kaptak az *in vitro* modellek, amelyek a sejtszintű vizsgálatok megbízható és etikai szempontból elfogadható alternatíváját jelentik az *in vivo* állatkísérletekkel szemben. E modellek alkalmazása nem csupán a 3R-elv (Replacement, Reduction, Refinement; helyettesítés, csökkentés, finomítás) gyakorlati megvalósítását segíti elő, hanem több metodikai, tudományos és gazdasági előnnyel is jár.

Az egyik legfontosabb előny az *in vitro* rendszerek esetében a kontrollálhatóság. A sejttényészetekben végzett vizsgálatok lehetővé teszik a vizsgálati paraméterek (pl. vegyületkoncentrációk, expozíciós idő, tápközeg összetétele) pontos beállítását és reprodukálását, ami hozzájárul az adatok konzisztenciájához és az eredmények megbízhatóságához. Ezzel szemben az *in vivo* környezet komplexitása gyakran megnehezíti az egyes változók izolált vizsgálatát, mivel a szervezetben párhuzamosan zajló biológiai folyamatok kölcsönhatásai elfedhetik vagy módosíthatják az eredeti hatásmechanizmusokat (SOULEYMANE *et al.*, 2025).

Egy másik jelentős előny az *in vitro* rendszerek esetében a csökkentett etikai terhelés. Az Európai Unió jogszabályi környezete – különösen a REACH rendelet és az állatvédelmi irányelvek – előírják az állatkísérletek számának csökkentését és azok helyettesítését, ahol ez lehetséges (EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL, 2006). Az *in vitro* módszerek, különösen validált tesztek esetében, kielégítik ezt az elvárást, és lehetővé teszik a biológiai hatásvizsgálatok elvégzését élő állatok felhasználása nélkül.

Az *in vitro* rendszerek alkalmasak továbbá a specifikus hatásmechanizmusok célzott vizsgálatára is. Egy adott sejttípus – például idegi, máj-, vagy csonteredetű sejtvonal – lehetővé teszi, hogy az adott szövet- vagy szervspecifikus toxicitást, például neurotoxikus vagy hepatotoxikus hatásokat, pontosabban tanulmányozzuk, mint egy *in vivo* modell komplex szervezetében, ahol az egyes szervrendszerek közötti interakciók torzíthatják az eredményeket (SOLDATOW *et al.*, 2013, ALLEN *et al.*, 2005, HALKS-MILLER *et al.*, 1991). Emellett modern *in vitro* technológiák, például 3D sejtenyészetek bevezetésével a biológiai realitás is egyre inkább közelíthető az élő szervezethez (MORALES *et al.*, 2016).

Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy az *in vitro* rendszerek elsősorban a mechanisztikus és sejtszintű hatásvizsgálatokra alkalmasak, és nem képesek a teljes szervezeti válasz (pl. metabolizmus, immunreakció, farmakokinetika) komplexitásának modellezésére. Ennek ellenére a kezdeti szűrővizsgálatok, a dózis–hatás-összefüggések, illetve a célzott sejttípusokra gyakorolt hatások vizsgálatára az *in vitro* rendszerek elsődlegesen alkalmazhatóak.

Végezetül elmondható, hogy az *in vitro* modellek nem csupán etikai és gyakorlati alternatívát kínálnak az *in vivo* kísérletekkel szemben, hanem tudományos szempontból is előnyösek azáltal, hogy lehetővé teszik a precíz, gyors és költséghatékony toxicitási vizsgálatokat, amelyek egyre nagyobb szerepet kapnak a környezetbiztonsági és egészségvédelmi kockázatbecslésben.

## 2.10. *IN VITRO* VIZSGÁLATI MÓDSZEREK- ÉS SEJTVONAL-VÁLASZTÁS TUDOMÁNYOS ALAPJAI

A dolgozatomban alkalmazott módszerek kiválasztását alapvetően az a cél vezérelte, hogy a vizsgált hatások – elsősorban a citotoxicitás, genotoxicitás, apoptózis és sejtciklus-megoszlás – minél átfogóbban és érzékenyebben legyenek kimutathatók. E megfontolások alapján több, különböző elven alapuló eljárás került alkalmazásra, majd ezek eredményei összehasonlításra.

A sejtek életképességének meghatározására két különböző módszert használtunk: az MTT-tesztet, valamint az áramlási citometriás eljárást (*Muse™ Count and Viability Kit*). Az MTT-teszt a világon legelterjedtebb vizsgálati módszer a sejtek életképességének, illetve proliferációjának

meghatározására. Vizsgálataimat az ISO 10993-5:2009 (ISO, 2009) alapján végeztem el. Az MTT törzsoldatát 1 mg/ml koncentrációban PBS-ben (Sigma-Aldrich) készítettem el frissen, majd az oldatot 0,22  $\mu$ m pórusméretű szűrőn átszűrtem, és 1:100 arányban szérumentes közeggel hígítottam. Az MTT halványsárga szubsztrátum (Sigma-Aldrich, MTT -CAS 298-93-1-Calbiochem), melyet élő sejtekkel inkubálva sötétkék formazán terméket hoz létre. A vizsgálat során az adott vizsgálati anyagra már reagált sejtek, amelyek még metabolikusan aktívak (nem állt még be a sejthalál a vizsgálati anyag hatására) felveszik a tetrazólium-bromid festékmolekulákat, és – főleg a NAD(P)H-függő oxidoreduktáz enzimeik révén a tertazóliumgyűrű N–N-kötésének felhasításával – kék/lila formazánkristályokká redukálják azokat. A gyűrűfelnyílás után a formazánlanc végén NH-aminocsoport alakul ki, amely azonban deprotonálódás és a lánc konjugált kettős kötéseinek átrendeződésével olyan szerkezetet is felvehet, amelyben az NH-csoport a lánc másik végén jön létre. A két láncvég oda-vissza-átrendeződése révén létrejövő rezonanciaszerkezet egyrészt stabilizálja a formazánlancot, másrészt a stabil konjugált kettős kötési rendszer miatt fényelnyelési tulajdonságai megváltoznak (a tetrazóliumállapothoz képest), és abszorbanciája spektrofotométerrel 570 nm hullámhosszon mérhető (HUMPAGE *et al.*, 2005). A tetrazóliumgyűrű az aktívan működő mitokondriumban hasad fel, így a reakció, mely különböző mitokondriális dehidrogenáz enzimek aktivitását méri, csak az életképes sejtekben megy végbe. Az MTT-teszt előnye az egyszerű kivitelezhetőség és az alacsony költség, hátránya viszont, hogy kevésbé alkalmas a gyors sejtszintű dinamikák, például az apoptotikus sejthalál időbeli követésére (MOSSMAN, 1983). Ezzel szemben az áramlási citometria lehetővé teszi az élő, elhalt és apoptotikus sejtek szimultán és gyors elkülönítését fluoreszcens festékek segítségével, valamint nagyszámú sejt párhuzamos mérését, így statisztikailag is robusztusabb eredmények nyerhetők (CUI *et al.*, 2016).

A genotoxicitás mérésére két eljárást választottunk: az egysejtes gélelektroforézisen (SCGE) alapuló úgynevezett comet-tesztet, valamint a DNS-károsodás áramlási citometriás detektálását (OLIVE *et al.*, 1990). A comet-tesztnél a kezelt sejteket vékony agarózgélben szuszpendáltam mikroszkópos tárgylemezen, majd a lízis és az elektroforézis után a gél fluoreszcens DNS-kötő festékkel (etídium-bromid) festettem meg (KOLLER *et al.*, 2012, SPEIT & HARTMANN, 1999, THIEL *et al.*, 2024). Ha a sejtekben DNS-károsodás következik be, a kromoszómális DNS és károsodott fragmentumainak az elektroforézis során bekövetkező vándorlása a sejtmagból nem egységes sávban, hanem elnyúlt formában, üstökös alakban jelenik meg, és minél intenzívebb a DNS-károsodás, általában annál hosszabb lesz az üstökös. A comet-teszt módszertanát Ostling és Johanson dolgozták ki 1984-ben (OSTLING & JOHANSON, 1984). A comet-teszt előnye, hogy közvetlen vizuális képet ad a DNS integritásáról, a sejtenkénti károsodás mértékéről, és az alkalikus változata különösen érzékeny az egyszálú DNS-törések

kimutatására. Ugyanakkor időigényes, manuális értékelést igényel, és az eredmények szubjektivitása is problémás lehet, melyet mi a LUCIA software segítségével számszerűsíteni tudunk és nem arbitrális egységeket alkalmaztunk, ezáltal objektíven tudtuk vizsgálni az eredményeinket. Ezzel szemben az áramlási citometria lehetővé teszi a kettős szálú DNS-törések kvantitatív, automatizált kimutatását nagy sejtszámon. A két módszer kiegészíti egymást: a comet-teszt érzékenyebb az egyszálú törésekre, míg az áramlási citometria specifikusabb a komolyabb, kettős szálú törésekre.

Az apoptózis vizsgálatára és a kaszpáz 3/7 enzimek aktivitásának detektálására kizárólag áramlási citometriás megközelítést alkalmaztunk, mivel ez a módszer a legalkalmasabb a gyors és pontos apoptózis-meghatározásra. Az Annexin V és halott sejtek vizsgálati készletben jól elkülöníthetők az élő, korai apoptotikus és késői apoptotikus/nekrotikus sejtek, míg a kaszpáz-aktivitás kimutatása lehetőséget ad a programozott sejthalál biokémiai úton történő megerősítésére is. E módszerek kombinált alkalmazása lehetővé tette a citotoxicitás és genotoxicitás hatásmechanizmusainak pontosabb feltérképezését (KHAN *et al.*, 2012).

A sejtciklus vizsgálatot a *Muse™ Cell Cycle Assay Kit* (MCH100106, Merck Millipore, Budapest, Magyarország) segítségével detektáltuk. Fontos megjegyezni, hogy a sejtciklus az eukarióta sejtek osztódási ciklusában pontos időrendben lejátszódó és szigorúan szabályozott folyamat jellemzi, melynek következménye, hogy osztódással két, genetikailag azonos sejt jön létre. Ezek a folyamatok visszafordíthatatlan változásokat tudnak generálni a ciklusban lévő sejtekben. A sejt anyagainak megkettőződése az interfázisban történik, amelyben a G<sub>1</sub>, S és G<sub>2</sub> szakaszokat különítünk el. Az M-fázisban a kromoszómák osztódnak ketté a mitózisban, amit a citokinézis követ, ezt a két szakaszt együttesen nevezik mitózissnak. A sejtciklusban egy bonyolult vezérlő rendszer működik, melynek alapvető komponensei a ciklinfüggő protein kinázok (Cdk). Nevüket az aktivitásukhoz szükséges ciklinekről kapták, ez alapján lehetnek Cdk-aktiváló és -gátló kinázok, amelyek a Cdk-kat foszforilálják (DARVAS & LÁSZLÓ 2005).

A megfelelő vizsgálati módszerek kiválasztása a lehető legátfogóbb toxikológiai profil felállítását tette lehetővé, különösen az adalékanyagok, mint például a *POE-15* vizsgálata során, amelyekről korábban kevesebb figyelem irányult. A különböző módszerek együttes alkalmazása segítette az eredmények megbízhatóbb értékelését, ami nélkülözhetetlen a növényvédő szerek biztonságos használatának megítélésében.

A doktori kutatásomban alkalmazott sejtvonalak – NE-4C és MC3T3-E1 – kiválasztását több szempont határozta meg, melyek egymást kiegészítve biztosították, hogy a vizsgálatok során megbízható, összehasonlítható, és biológiailag releváns eredmények szülessenek a *GLY-IPA*, a Roundup Classic formuláció (R), valamint a *POE-15* formázószer hatásainak értékeléséhez.

Elsődleges szempontként a sejtvonalak érzékenysége szerepelt: célom az volt, hogy olyan modellrendszereket alkalmazzak, amelyek képesek kis koncentrációjú vegyszerek hatásait is kimutatni. A NE-4C idegi őssejtvonal rendkívül érzékenynek bizonyult, mivel neuroektodermális eredetű, hiányzik belőle a funkcionális p53 tumorszupresszor fehérje, valamint képes idegi irányú differenciációra retinsav hatására (KUMARASAMY *et al.*, 2022, SCHLETT *et al.*, 1997). Ez a kombináció egyedülállóan érzékennyé teszi különféle környezeti toxikus anyagokkal, így a növényvédő szerekkel szemben is, különösen a sejthalálhoz vezető folyamatok, mint az oxidatív stressz, mitokondriális diszfunkció és apoptózis tekintetében.

A másik alkalmazott sejtvonal, az MC3T3-E1, egér koponyacsontból származó preoszteoblaszt sejtvonal, amely ugyan kevésbé érzékeny, de különösen fontos a csontképzés korai fázisainak modellezésére. Kiválasztása részben azzal indokolható, hogy megfigyelések alapján kimutattuk, hogy a *GLY* gátolja ezeknek a sejteknek a felülethez való tapadását – ez a hatás végül a *GLY* specifikus integringátló tulajdonságának felismeréséhez vezetett (SZÉKÁCS *et al.*, 2018).

További szempontként jelentkezett a vizsgált sejtvonalak szakirodalmi reprezentáltsága, amely mindkét sejt esetében alacsonynak bizonyult. Ennek következtében, ezeknek a sejtvonalak alkalmazása lehetőséget teremtett arra, hogy a *GLY-IPA*, *R* és *POE-15 in vitro* citotoxicitási és genotoxicitási hatásairól új, eddig nem dokumentált adatokkal egészítsem ki a nemzetközi tudományos ismeretanyagot.

Az NE-4C és MC3T3-E1 sejtvonalakat tudatosan választottam ki a kutatásomhoz, figyelembe véve azok nagyfokú érzékenységét, biológiai sajátosságaikat, a vizsgálni kívánt jelátviteli utakhoz való kapcsolódásukat, valamint azt a törekvést, hogy a már meglévő toxikológiai adatokat új, kevésbé vizsgált modellrendszerekkel egészítsem ki.

### 3. ANYAG ÉS MÓDSZER

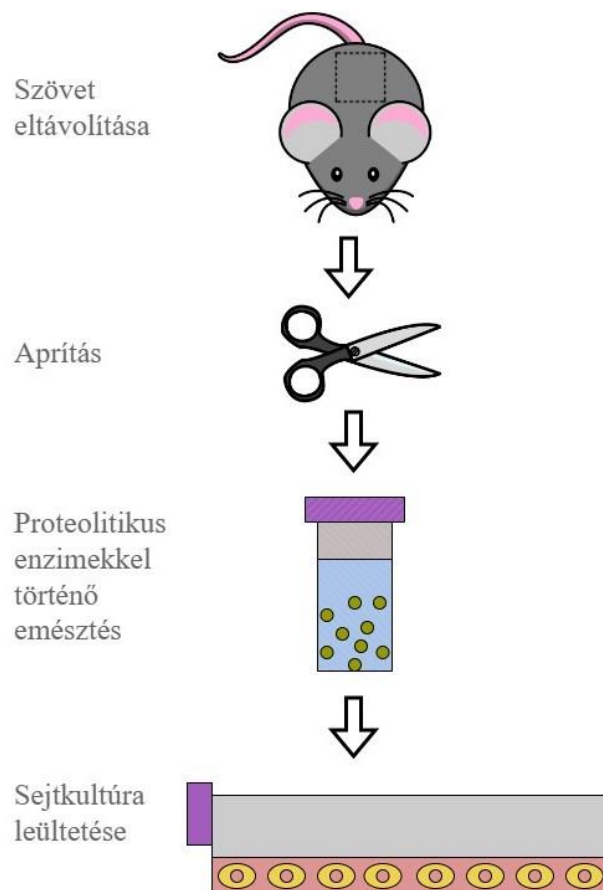
#### 3.1. SEJTVONALAKON VÉGZETT *IN VITRO* TESZTEK ELŐKÉSZÍTÉSE

A környezetbe kerülő lehetséges citotoxikus, mutagén, genotoxikus és hormonkárosító anyagokra régebben gerinceseken végzett bioteszteket alkalmaztak, melyekben főleg különféle rágcsálókat és halakat használtak tesztszervezetként. Ezek a vizsgálatok nem csak drágák, de időigényesek is voltak, és szemben álltak az EU direktívájával is, melyben a gerincesek használatát helyettesítés, csökkentés és finomítás révén oldják meg (EUROPEAN COUNCIL DIRECTIVE, 1986). A gerinces állatokon végzett legtöbb vizsgálatok jelenleg állatetikai engedélyhez kötöttek, melynél meglehetősen hosszadalmas dokumentációt kell benyújtani a vizsgálni kívánt anyag más módon történő vizsgálatával kapcsolatban, és ha megoldható a helyettesítés, akkor az élő gerinces tesztszervezet használata nem engedélyezhető. A különféle vegyi anyagok toxikus hatásai sejtvonalakon végzett vizsgálatokkal is megállapíthatók, és ezen a tesztek nemcsak gyorsak és egyszerűek, de költséghatékonyak is.

A sejtkultúrák *in vitro* tenyésztése nemzetközi protokollok részét képezi. Egyrészt az állatvédelmi kritériumoknak is megfelel, illetve a segítségével a tesztelés körülményei jobban optimalizálhatók. A sejtek tenyésztése és fenntartása több szempontból is előnyös:

- Míg a legtöbb állati és növényi szerv/szövet több különböző sejttypusból épül fel, addig az *in vitro* sejtkultúrában lehetőség nyílik egyes specifikus sejttypjait elkülönített tenyésztésére, tulajdonságait tekintve sokkal homogénebb rendszert eredményezve.
- *In vitro* sejtkultúrák esetében a kísérleti körülmények jobban szabályozhatók, hiszen a sejtek növekedéséhez optimális körülményeket hozunk létre, ezáltal kísérleteink során a tapasztalt változás a vizsgálati anyag hatásának tudható be. *In vitro* modellekkel az extracelluláris környezet mesterségesen előállítható.
- A szervekben/szövetekben nehéz elkülöníteni a sejtek tulajdonságait, hiszen a sejtek között jelenlévő kölcsönhatások hatnak rájuk, sejtkultúrák esetében ez a gond nem jelenik meg.
- Genetikailag homogén sejtpopuláció akár egyetlen sejtől is könnyen létrehozható.
- Szervek és szövetek is tenyészthetők *in vitro* körülmények között, ilyenkor szerv- és szövetkultúráról beszélünk.

Megkülönböztetünk primer (elsődleges), illetve szekunder (másodlagos) kultúrákat. Az elsőnél az eredeti szervből/szövetből közvetlenül kinyert sejtek egyszeri átoltása történik (3. ábra).



3. ábra Primer (elsődleges) sejtkultúra előállításának lépései

A szekunder sejtkultúránál a sejtek a primer kultúrából származnak és passzáltak. Minden sejtkultúra esetén létezik oszthatósági határ (lehetséges passzálások száma), amelyet túllépve a sejtkultúrában már apoptózis következik be. Érdeemes megemlíteni, hogy minden szövet szaporítható, bár az izom- és idegsejtek kevésbé. Jól szaporíthatók viszont a fibroblaszt- és epitheliális sejtek. A fibroblaszt - (más néven kötőszöveti) sejtek generációs ideje kicsi, felületeken gyorsan nőnek, és képesek túlnőni az egyéb szöveteket. Az epitheliális sejtek (más néven hámsejtek) között sok specializálódott sejt van, ilyenek például a májsejtek, vesesejtek, tüdősejtek, melyeknek közös jellemzője, hogy jó regenerációs képességekkel bírnak. Tapadás tekintetében kétféle sejtkultúra létezik, az egyik szuszpenzióban tartható (úszó sejtek), a másik tenyészedény falára kitapadva (letapadó/adherens). Vizsgálataink során az utóbbi, letapadó sejtekkel végeztünk vizsgálatokat, melyek esetében a sejtek fehérjemátrixot választanak ki, s ennek segítségével képeznek réteget (monolayer) a tenyészedény falán. A tenyészedényben a sejtek növekedése kezdetben exponenciális, majd lelassul, amíg el nem éri a konfluens összefüggő állapotot (MASTERS, 2000).

### 3.2. A SEJTKULTÚRÁK FENNTARTÁSA

*In vitro* körülmények között a sejteknek optimális feltételeket kell biztosítani a növekedéshez és osztódáshoz. Ilyen a megfelelően kiegészített pufferoldat, pl. foszfátpufferelt sóoldat (PBS), a tápoldat, valamint a 37°C-os, léghőmérsékletben 5% CO<sub>2</sub>-tartalmú és 95% relatív páratartalmú inkubátor. A sejtek számára korlátozott mennyiségű szérumszerű növekedési faktor áll rendelkezésre, mert a sejteknek adott, a tenyésztőedény mérete által meghatározott nagyságú felület áll rendelkezésre az osztódáshoz. Ezt nevezik sűrűségfüggő sejtosztódásgátlásnak, amit régebben kontakt gátlásnak is neveztek. A sejtek osztódása adott sejtsűrűséggel indul, egy ideig (sejtkultúráként változó) exponenciális növekedésnek indulnak, majd elérnek egy telítési szakaszt, ahol már nem osztódnak tovább, tehát minden sejt G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-fázisba jut. Ebben az állapotban szükséges a sejtek passzálása, vagyis áthelyezésük új tenyészedénybe, friss tápfolyadékba és kisebb koncentrációban, hogy az osztódás újra meginduljon. Ehhez azonban a sejteket kelátképző anyagok és proteáz enzimek segítségével le kell oldani a tenyészedény faláról, és szuszpenzióba kell vinni. A proteázok használatával a sejtek közötti kötéseket bontjuk, hogy a sejtek egyesével legyenek szuszpenzióba vihetők. Vizsgálatainkban az egyik leggyakoribb proteáz enzimet a tripszint használtuk, valamint Ca-kelátor tulajdonságú etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA), melyekkel a sejtek könnyen szuszpenzióba vihetők voltak. Hosszú ideig vagy nagy dózisban alkalmazva a tripszin-EDTA károsítja a sejtmembránt, és sejthalálhoz vezet, mely hatás azonban friss tápfolyadékkal leállítható (MASTERS, 2000, MASTERS & STACEY, 2007).

#### 3.2.1. MEGFELELŐ TÁPKÖZEGKÉSZÍTÉS FELTÉTELEI

A vizsgálatainkban használt tápoldatok már tartalmaznak alapösszetevőket, más összetevőket a hosszabb eltarthatóság érdekében utólag szükséges hozzáadni. Az alapösszetevőket már tartalmazó tápoldat használatának előnye, hogy olcsóbb, állandó az összetétele, és kisebb a fertőzés lehetősége, mintha a teljes tápoldatot magunk készítenénk (MEM, Sigma-Aldrich 1,  $\alpha$ -MEM, Sigma-Aldrich 2).

A tápfolyadékok állandó összetevői általában a következő fő komponenseket foglalják magukba, melyek arányai gyártónként eltérőek (MASTERS, 2000). Ezek közé tartoznak az alapvető ionokat tartalmazó sóoldatok (például Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>), nyomelemek (Fe, Cu, Zn), amelyek sejtek általi felvétele általában fehérjékhez kötött formában történik, valamint fehérjejellegű összetevők, mint a peptidek, növekedési faktorok, hormonok és szállítófehérjék. Emellett a sejtek energiaellátásához glükózt, továbbá a megfelelő működéshez szükséges vitaminokat (például kolin, folsav, tiamin, biotin) és esszenciális aminosavakat (például lizin, valin, treonin)

tartalmazznak. A pH stabil fenntartásához pufferrendszert alkalmaznak, amely tipikusan 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinil-etánszulfonsavat (HEPES) vagy más hasonló puffer anyagot foglal magában. Opcionálisan indikátor komponensek (pl. fenol-vörös) is jelen lehetnek a pH változásának jelzésére. A kész tápfolyadékok részletes összetétele a gyártók hivatalos dokumentációiban minden esetben elérhető.

A sejtenyésztés során kétféle tápfolyadékot alkalmaztunk, amelyeket a szükséges komponensekkel kiegészítve használtunk fel. Az Sigma-Aldrich MEM tápfolyadékot 4 mM *L*-glutammal, 5% foetális borjúsérummal (FBS; Biowest SAS, Franciaország), 100 U/ml penicillinnel, 100 µg/ml streptomocinnel, valamint 0,25 µg/ml amfotericin B-vel egészítettük ki. A Sigma-Aldrich  $\alpha$ -módosított MEM tápfolyadékot ( $\alpha$ -MEM) 10% FBS-sel, 2 mM *L*-glutammal, 100 U/ml penicillinnel, 100 µg/ml streptomocinnel és 0,25 µg/ml amfotericin B-vel egészítettük ki. Az utólag hozzáadott komponensek befolyásolják a tápközeg mikrobiológiai stabilitását és eltarthatóságát, ezért a kész tápoldatokat legfeljebb 30 napon belül használtuk fel.

### 3.3 A VIZSGÁLATAINKNÁL HASZNÁLT VEGYSZEREK

A tenyésztőközegekhez szükséges szilárd reagenseket a Reanal Laborvegyszer Kereskedelmi Kft-től (Magyarország, Budapest) vásároltuk meg. Minden más reagens a Sigma-Aldrich Co. LLC-től (St. Louis, MO, USA) került beszerzésre, hacsak a szöveg másképpen nem jelzi. A vizsgálati anyagok közül a *GLY-IPA*-sót (IPA, CAS No: 386411-94-0) szintén a Sigma-Aldrich Co. LLC-től szereztük be, mint a *GBH*-k aktív hatóanyagát. A formulált készítményt helyi forgalmazóktól szereztük be a kereskedelemben kapható kiszerelésben, Roundup Classic (R, MON2139, Monsanto, Hungary, engedélyszám 02.5/915/2/2010), míg a formázóanyagot faggyúalapú polioxietilénamint, más néven *POE-15* faggyúamint (EMULSON AG GPE 3SS) a gyártó (Lamberti S.p.A., Albizzate, Olaszország) bocsátotta rendelkezésünkre. A *GLY-IPA*, R és *POE-15* törzssoldait frissen készítettük el a megfelelő sejtenyésztő tápfolyadékban a kezelés előtt (pH 7,4).

A *GLY* és a *POE-15* vizsgálatokban alkalmazott koncentrációi többféle alakban is megadhatók: az adott reagens tömegkoncentrációjában (pl. g/l), százalékos koncentrációban (pl. g/100 ml), moláris anyagmennyiség-koncentrációban (pl. mol/l, M), illetve a R azon hígításában/koncentrációjában, amelyben az adott összetevő az adott koncentrációban van jelen (ez utóbbit neveztem a Roundup Classic készítmányre vonatkoztatott ekvivalens koncentrációnak, más néven Roundup-ekvivalens koncentrációnak). A Roundup Classic készítmény koncentrációja megadható tömegkoncentrációjában (pl. g/l) vagy százalékos koncentrációban (térfogat%, ml/100 ml), de moláris anyagmennyiség-koncentrációban (pl. mol/l, M) értelemszerűen nem. A

legcélszerűbb tehát a Roundup-ekvivalens koncentráció alkalmazása volt, amely mindhárom anyagféleségre értelmezhető, és amelyet a dolgozatban minden esetben térfogat% (ml/100 ml) értékben szerepeltetnek. Az egyértelműsítés kedvéért szerepeljen itt néhány koncentrációmegfeleltetés a *GLY* és a *POE-15* vegyületekre, azok tömeg-, moláris és Roundup-ekvivalens koncentrációi között. Hígítatlan formában a Roundup Classic (100% Roundup-ekvivalens koncentráció) 486 g/l vagy 2,13 M *GLY* és 180 g/l vagy 193 mM *POE-15* vegyületet tartalmaz. A mezőgazdasági kijuttatáshoz hígított formában a Roundup Classic (2% Roundup-ekvivalens koncentráció) 9,72 g/l vagy 42,6 mM *GLY* és 3,6 g/l vagy 3,87 mM *POE-15* vegyületet tartalmaz. A vizsgált koncentrációtartomány alsó határán a Roundup Classic (0,0001% Roundup-ekvivalens koncentráció) 48,6 mg/l vagy 213  $\mu$ M *GLY* és 18,0 mg/l vagy 19,3  $\mu$ M *POE-15* vegyületet tartalmaz.

### 3.4. A VIZSGÁLATAINKNÁL HASZNÁLT SEJTKULTÚRÁK

Szakirodalmi adatok igazolták, hogy a *GLY* hatást gyakorol különféle emlőssejtvonalakra, ezért mi olyan, emlősekből származó sejtvonalakon kívántuk vizsgálni a *GLY*, R és *POE-15* hatását, amelyeket az eddigi szakirodalom nem, vagy csak kevésszer említ. Választásunk két egyedi, egérezetű sejtvonalra esett. Nagyfokú érzékenysége miatt választottuk a neuroektodermális NE-4C idegi őssejtvonalat, melynek egyedi sajátossága, hogy hiányzik belőle a funkcionális p53 tumorszupresszor fehérje és idegi differenciációját a retinsav jelentős mértékben indukálja (SCHLETT & MADARÁSZ, 1997, SCHLETT *et al.*, 1997, HEBERTH *et al.*, 2005). Utóbbi jellegzetesség érdekesnek mutatkozott, hiszen a *GLY* hatóanyagot kapcsolatba hozták a retinsavas jelátadási mechanizmussal. Másik emlőssejtvonalként az előbbinél valamivel kevésbé érzékeny MC3T3-E1 sejtvonalat választottuk, részint mert ez a sejtvonal is összefüggésbe hozható a retinsavas jelátadási mechanizmussal (NAKAYAMA *et al.*, 1990, NAGASAWA *et al.*, 2005), részint pedig, mert előzetes megfigyeléseink szerint a *GLY* hatékonyan gátolta ennek a spontán transzformáció útján képződött csontképző prekursor (preoszteoblaszt) sejtnak (TOWLER & ST. ARNAUD, 2002) a felületre történő letapadási képességét, mely végül elvezetett a *GLY* specifikus integringátló hatásának felismeréséhez (SZÉKÁCS *et al.*, 2018).

A 9-napos transzgenikus egérembrió elő- és középagyi vezikuláiból készített, primer agyi sejtkultúrákból származó NE-4C sejtvonalat Dr. Madarász Emília (MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet, Budapest) bocsájtotta a rendelkezésünkre. A sejteket minimum esszenciális tápfolyadékban (MEM) tenyésztettük, amely 4 mM glutamin, 5% FBS (Biowest SAS,

Franciaország), 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin és 0,25 µg/ml amfotericin B összetevőket tartalmazott.

A C57BL/6 egérkoponyából származó MC3T3-E1 sejtvonalat kereskedelmi forgalomból (99072810 Sigma-Aldrich) szereztük be. A sejteket  $\alpha$ -módosított MEM ( $\alpha$ -MEM) folyadékban tenyésztettük, amelyet 10% FBS, 2 mM *L*-glutamin, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin és 0,25 µg/ml amfotericin B összetevőkkel egészítettük ki.

A sejtvonalakat a 37°C-os, léghőmérsékletben 5% CO<sub>2</sub>-tartalmú és 95% relatív páratartalmú inkubátorban tenyésztettük. A 80%-os konfluencia elérésekor a sejteket 0,05% (w/v) tripszin és 0,02% (w/v) EDTA reagenseket tartalmazó oldattal passzáltuk.

### 3.5. MTT-REDUKCIÓS TESZT

Az MTT-ből keletkező formazán mennyisége egyenesen arányos a sejtszámmal (MOSSMAN, 1983). A szukcinát-dehidrogenázok gátlásának dózis–válasz-kapcsolatát a vizsgált anyagok sorozatos hígításával jellemeztem, melyből a gátlási középértékeket (IC<sub>50</sub>, adott vegyület azon koncentrációja, ahol a gátló hatása 50%-os mértékű) nemlineáris regresszióval számoltam ki, Rodbard logisztikus (szimmetrikus szigmoid görbét feltételező, 4-paraméteres) egyenletének (RODBARD, 1981) felhasználásával.

Az NE-4C és MC3T3-E1 sejteket 5×10<sup>4</sup> sejt/ml koncentrációban 96-lyukú sejtenyésző edénybe (Thermofisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) ültettem. A 24-órás előinkubációs fázist követően a sejteket további 24 órán keresztül kezeltem a vizsgálati anyagokkal (*GLY-IPA*, *R* és *POE-15*), 200 µl/lyuk mennyiségben. A negatív kontrollkezelésnél a sejteket tápfolyadékkal kezeltem, és a sejteket ugyanolyan körülmények között ültettem le, mint a vizsgálati anyaggal kezelteteket.

Az NE-4C és MC3T3-E1 sejtvonalak kezelése során alkalmazott koncentrációk minden esetben Roundup-ekvivalens értékek alapján kerültek meghatározásra. Az NE-4C sejtvonalon vizsgált koncentrációk *GLY-IPA* esetében 0,0184%, 0,0441%, 0,1058%, 0,181%, 0,254% és 0,85%, *R*-egyenértékű oldatnak feleltek meg, amelyek a hatóanyag szempontjából 89,42 µg/ml, 214,33 µg/ml, 514,19 µg/ml, 879,66 µg/ml, 1234,44 µg/ml, 4131 µg/ml *GLY-IPA*-koncentrációnak felelnek meg. A *R*-kezelésnél alkalmazott koncentrációk sorrendben 0,0009%, 0,0013%, 0,0018%, 0,0026%, 0,0036%. A *POE-15*-kezelések esetében a vizsgálat során alkalmazott *R*-ekvivalens koncentrációk sorrendben a következők voltak; 0,000194%, 0,000338%, 0,000775%, 0,00155% és 0,00387%. Ezek a koncentrációk a *POE-15*-tartalom szempontjából 0,35 µg/ml, 0,61 µg/ml, 1,40 µg/ml, 2,81 µg/ml, valamint 7,02 µg/ml *POE-15*-koncentrációnak felelnek meg.

Az MC3T3-E1 sejtvonalon vizsgált koncentrációk *GLY-IPA* esetében a 0,22%, 0,31%, 0,43%, 0,61%, 0,85% R-egyenértékű oldatnak feleltek meg, amelyek a hatóanyag szempontjából 1075,52 µg/ml, 1505,63 µg/ml, 2107,78 µg/ml, 2950,51 µg/ml és 4131,00 µg/ml *GLY-IPA*-koncentrációnak felelnek meg. A R-kezelésnél alkalmazott koncentrációk sorrendben 0,00185%, 0,0023%, 0,005%, 0,007%, 0,01%. A *POE-15*-kezelések esetében a vizsgálat során alkalmazott R-ekvivalens koncentrációk sorrendben a következők voltak; 0,0019%, 0,0026%, 0,0037%, 0,0052%, 0,0072%, és 0,0101%. Ezek a koncentrációk a *POE-15*-tartalom szempontjából 3,39 µg/ml, 4,68 µg/ml, 6,68 µg/ml, 9,37 µg/ml, 13,12 µg/ml valamint 18,39 µg/ml *POE-15*-koncentrációnak felelnek meg.

A kezelést követően a tápfolyadékot eltávolítottam, a lemezeket PBS pufferrel (Sigma-Aldrich) mostam, majd minden lyukba az MTT-oldatból lyukanként 100 µl mennyiséget adagoltam, és 3 órán át 37 °C-on inkubáltam. Az inkubációt követően a felülúszókat eltávolítottam, 100 µl/lyuk DMSO-t adtam az elegyekhez, és a lemezt 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltam. Az optikai sűrűséget SpectraMax iD3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) segítségével határoztam meg 570 nm hullámhosszon és 620 nm referencia-hullámhosszon. A sejtek életképességét a kezeletlen kontroll relatív százalékából számoltam ki (HORIUCHI *et al.*, 1988). A kísérleteinkben 3 független kezelést végeztem el 6 koncentrációban a sejtek életképességének meghatározására. (MOSSMAN, 1983, VIRAG *et al.*, 1995).

### 3.6. COMET-TEST

A comet-teszt egysejtes gélelektroforézis (SCGE), amely nagyon érzékeny és gyors fluoreszcens mikroszkópos módszer a DNS károsodásának az egyedi sejt szintjén történő kimutatására. Többféle variációt alakítottak ki, az egyszálú és a kettős szálú DNS-törések kimutatására, oxidatív DNS-károsodások észlelésére és a DNS-javító rendszer helyes/sérült működésének detektálására. Főbb típusai közül a legelterjedtebb az egyszálú DNS-törések kimutatására szolgáló alkalikus comet-teszt, ahol a pH-tartomány 13 felett van. Az alkalikus comet-teszt esetén egy enzimspecifikus verziót is kidolgoztak, ahol a pH-t 12,1 értékre kell beállítani. A kettős szálú DNS-törések kimutatására a neutrális comet-teszt elfogadott, ahol a pH értéke 8, és ezt követően 300 mM-os NaOH adagolásával az egyszálú DNS-törések is a mérhetővé válnak.

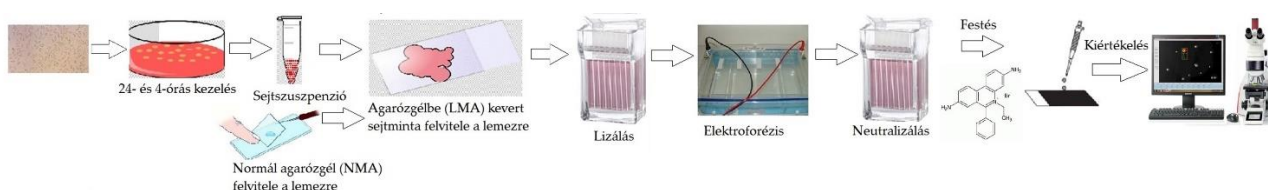
A DNS-károsodások speciális eseteinek kimutatását a comet-teszt esetén a különböző DNS-javító enzimek teszik lehetővé, mint például a bázisspecifikus glikoláz (Fpg) vagy az endonukleáz (EndoIII) enzimek használata. A jelenlegi vizsgálatban a comet-teszt alkalikus lízis

változatát használtam (OLIVE *et al.*, 1990), és a lízist elektroforézis is követte enyhén lúgos körülmények között (pH 12,1). A sejteket 6-lyukú sejttenyésztő lemezekre (Thermofisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)  $1,5 \times 10^5$  sejt/lyuk sűrűséggel ültettem le, 24 órán keresztül inkubáltam, majd elvégeztem a különböző koncentrációjú GLY-IPA-, R- vagy POE-15-kezelést MEM, illetve  $\alpha$ -MEM tápközegben. Az NE-4C sejtvonalon vizsgált koncentrációk GLY-IPA esetében 0,015%, 0,032%, 0,072%, 0,133%, 0,241%, 0,436% R-egyenértékű oldatnak feleltek meg, amelyek a hatóanyag szempontjából 72,90  $\mu\text{g/ml}$ , 155,52  $\mu\text{g/ml}$ , 351,31  $\mu\text{g/ml}$ , 644,08  $\mu\text{g/ml}$ , 1171,05  $\mu\text{g/ml}$ , 2119,60  $\mu\text{g/ml}$  GLY-IPA-koncentrációnak felelnek meg. A R-kezelésnél alkalmazott koncentrációk sorrendben 0,00011%, 0,00019%, 0,00035%, 0,00065%. A POE-15-kezelések esetében a vizsgálat során alkalmazott R-ekvivalens koncentrációk sorrendben a következők voltak; 0,000004%, 0,000009%, 0,000036%, 0,00005%, 0,00008%, 0,00011%. Ezek a koncentrációk a POE-15-tartalom szempontjából 0,02  $\mu\text{g/ml}$ , 0,04  $\mu\text{g/ml}$ , 0,17  $\mu\text{g/ml}$ , 0,24  $\mu\text{g/ml}$ , 0,39  $\mu\text{g/ml}$  valamint 0,53  $\mu\text{g/ml}$  POE-15-koncentrációnak felelnek meg.

Az MC3T3-E1 sejtvonalon vizsgált koncentrációk GLY-IPA esetében a 0,0722%, 0,1189%, 0,1784%, 0,2676%, 0,4013% R-egyenértékű oldatnak feleltek meg, amelyek a hatóanyag szempontjából 351,03  $\mu\text{g/ml}$ , 578,13  $\mu\text{g/ml}$ , 867,22  $\mu\text{g/ml}$ , 1300,85  $\mu\text{g/ml}$ , 1951,23  $\mu\text{g/ml}$  GLY-IPA-koncentrációnak felelnek meg. A R-kezelésnél alkalmazott koncentrációk sorrendben 0,00131%, 0,00184%, 0,00257%, 0,0036%, 0,005%. A POE-15-kezelések esetében a vizsgálat során alkalmazott R-ekvivalens koncentrációk sorrendben a következők voltak; 0,0018%, 0,0038%, 0,005%, 0,007%, 0,01%, 0,014%. Ezek a koncentrációk a POE-15-tartalom szempontjából 3,27  $\mu\text{g/ml}$ , 6,90  $\mu\text{g/ml}$ , 9,08  $\mu\text{g/ml}$ , 12,71  $\mu\text{g/ml}$ , 18,16  $\mu\text{g/ml}$  valamint 25,42  $\mu\text{g/ml}$  POE-15-koncentrációnak felelnek meg.

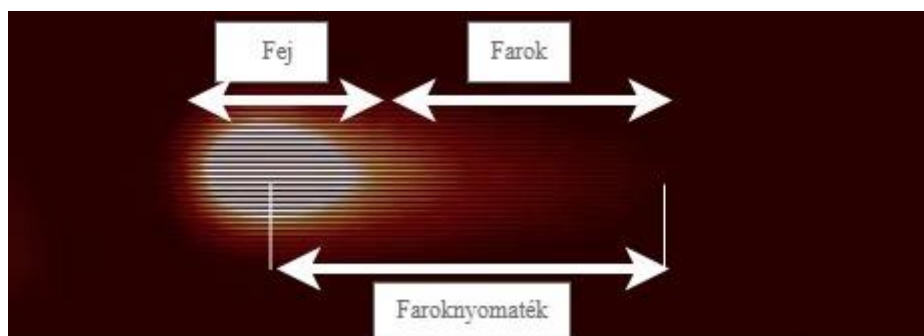
A 24-órás kezelést követően a sejteket Eppendorf-csövekbe (Thermofisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) tettem. A kezelt és kezeletlen sejteket (30  $\mu\text{l}$ ) 120  $\mu\text{l}$  PBS-ben (Sigma-Aldrich) szuszpendáltam a csövekben. Az alacsony olvadáspontú agarózt (LMA, 150  $\mu\text{l}$  1%, Sigma, St. Louis, MO, USA) 55 °C-ra melegítettem, 37 °C-os vízfürdőben tartottam, majd a sejtekkel összekeverve a szuszpenziót mikroszkópos tárgylemezre pipettáztam (normál olvadáspontú agarózzal előkezelve, NMA). A negatív és pozitív kontrollok a MEM tápfolyadék és 0,01% hidrogén-peroxid voltak. A pozitív kontroll készítése során 20  $\mu\text{l}$  0,01%-os hidrogén-peroxidot és 30  $\mu\text{l}$  kezeletlen sejteket tartalmazó tápfolyadékot 100  $\mu\text{l}$  PBS-ben szuszpendáltam, és 20 percig 4°C hőmérsékleten sötétben tartottam. A lízist 1 órán keresztül 4 °C-on végeztem lízispufferben, amely NaCl, EDTA, Tris és NaOH összetevőket 146,4, 37,2, 1,2, illetve 8 g/l koncentrációban tartalmazott, és közvetlenül a felhasználás előtt 1,1% (v/v) koncentrációban Triton X-100 adalékot adtam hozzá. 1 óra elteltével a tárgylemezeket 40 percre áttettem a frissen készített és hideg elektroforézis pufferbe (1 mM vizes EDTA-oldat, amely 30 mM NaOH-t

tartalmazott pH=12,1 mellett), majd 15 percre friss öblítő pufferbe helyeztem az elektroforéziskamrába 25 V feszültség alatt. Ezt követően a tárgylemezeket kiemeltem a pufferből, és 15 percre semlegesítő pufferbe (48,5 g/l koncentrációjú Tris, 3% (v/v) HCl-t tartalmazó desztillált vízben) helyeztem. A comet-teszt lépéseit követően a mintákat végül 50 µl, 20 µg/ml etídium-bromiddal festettem meg sötétben, szobahőmérsékleten, és meghatároztam a comet-teszt fő mérhető egységeit (faroknyomaték, a farokban és a fejben lévő DNS százalékos aránya) fluoreszcens mikroszkóppal (Nikon Eclipse E600 vagy Olympus IX73) a LUCIA™ Comet Assay 3.5 szoftver (Laboratory Imaging, s.r.o., Prága, Cseh Köztársaság) segítségével mértem (4. ábra). A szoftver használata különösen a különböző paraméterek (fej-DNS (%), farok-DNS (%), farokhossz, faroknyomaték, olivanyomaték, fejfelület, farokfelület) sorát is biztosítja, amelyek segítenek a DNS-károsodás mértékének meghatározásához. Ezeket a paramétereket előnyben részesítjük a kézi pontozási módszerrel szemben, mivel a statisztikai elemzések során az numerikus adatok könnyebben értelmezhetők a diszkrét pontértékeknél. Kísérleteinkben a DNS-károsodás leírására a faroknyomatéket használtuk, mert az a sérült DNS-komplex értékét írja le, de a farok DNS százalékos aránya is megbízható paraméter.



4. ábra A comet-teszt folyamata

Kísérleteimben 3 független kezelést végeztem (egy tárgylemezen 50 sejtet mértem) a DNS-károsodás mértékének meghatározásához. A vizsgált paramétereket az 5. ábra mutatja be.

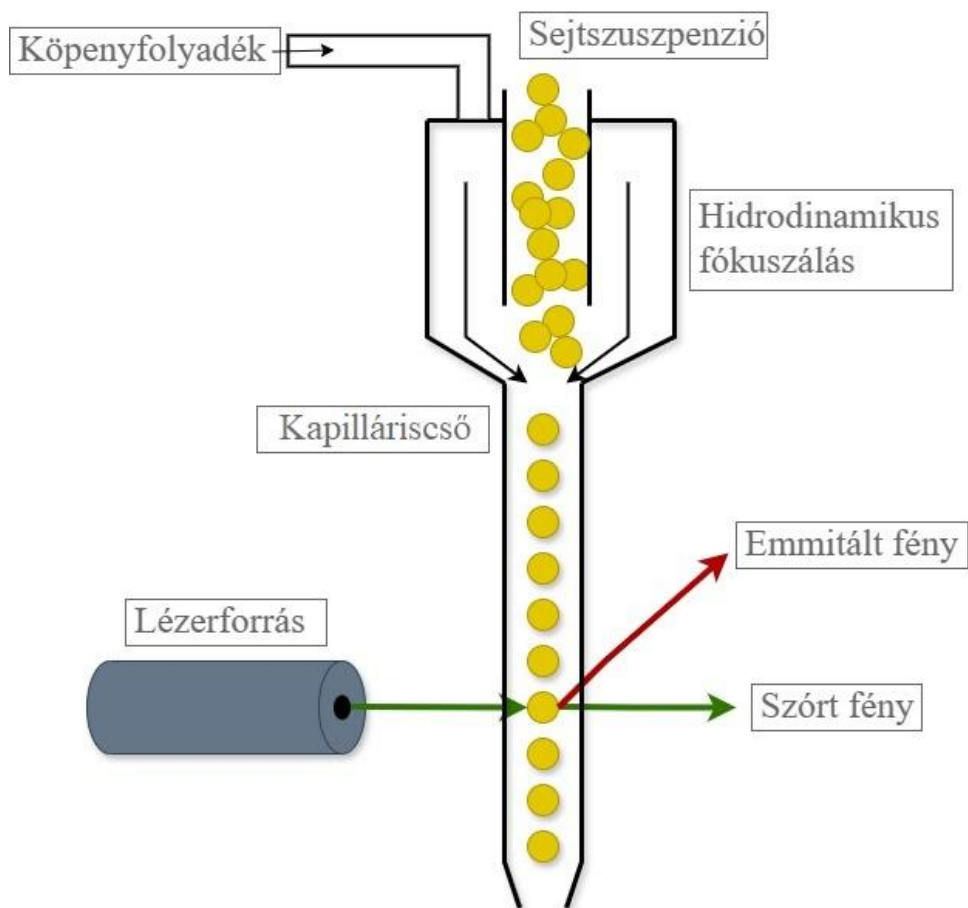


5. ábra A comet-teszt képalkotása a kezelt sejtről, illetve a vizsgált paraméterek bemutatása.

### 3.7. ÁRAMLÁSI CITOMETRIA

A *Muse™ Cell Analyzer* (Merck Millipore, Budapest, Magyarország) az egysejtes elemzéshez fluoreszcens detektorral felszerelt mikropillaris-citometriás készülék. Nagy sejtmennyiség gyors, többparaméteres vizsgálatát teszi lehetővé, rövid időn belül sok sejtet vizsgál, egyetlen vizsgált sejtről egyidejűleg több paramétert képes megadni. A folyadékokban lévő sejtek mikropillaris cső segítségével egyesével haladnak el a lézer előtt. A detektorok meghatározzák a sejt méretét, illetve a lézer gerjeszteni képes a fluoreszcens molekulákat, amik a rájuk jellemző hullámhosszúságokon nyelik el, illetve emittálják a fényt. A kibocsátott fluoreszcens fényt optikai szűrőkkel vagy dikroikus tükrökkel terelik a megfelelő detektorhoz. A sejtek, melyek folyadékban vannak egy „köpenyfolyadék” (általában PBS) által rendeződnek sorba, ezáltal a sejtek egymás után, egyesével haladnak a kapillárisban, és a lézerfény erre a kapillárisban sorban haladó sejtekre fókuszál (6. ábra).

A *Muse™ Cell Analyzer* az általunk használt vizsgálati tesztrendszerekben az eredményeket „Dot plot” (pontdiagram) alakban ábrázolta, mely az áramlási citometriás vizsgálatok egyik jellegzetes megjelenítési formája. Az ábrázolás kéttengelyű koordináta-rendszerben a vizsgált sejteket a beállított két paraméter függvényében helyezi el. Ebben a koordináta-rendszerben minden egyes megjelenített pont egy-egy sejtnak felel meg. Az azonos sejtcsoportba tartozó sejtek nagyobb halmazokat, sejtpopulációt alkotnak. Az egyes sejtpopulációk ezt követően kiválaszthatók (ezt nevezik „kapuzásnak”), és külön-külön vizsgálhatók más paraméterekre. Az általunk választott vizsgálati tesztek mérésénél a DNS- és RNS-tartalom mérése volt az elsődleges szempont, hiszen így állapítottuk meg a DNS-károsodás és az apoptózis mértékét, illetve a sejtciklusok alakulását is. Az életképességi vizsgálatban használt tesztrendszerben, melyet áramlási citometriával végeztünk el, a használt festék a propidium-jodid (PI) volt, amely – szerkezeti analógiájához, az etídium-bromidhoz hasonlóan, ám annál lényegesen erősebb DNS-kötődési affinitással rendelkezik (CHOU *et al.*, 1987), ugyanakkor enyhébb mutagenitást, de 20-30-szor erősebb fluoreszcenciát mutat – olyan, a DNS-hez kötődni képes fluoreszcens molekula, amely az élő sejtek membránján nem jut át (MCCOY, 2002, DARZYNKIEWICZ *et al.*, 2010.).



6. ábra Az áramlási citométer működési elve

A készüléket a gyártó számos, az adott sejtjellemzőkre – többek között az életképességre, az apoptózisra és a DNS-károsodásra, valamint a sejtek jelátvitelére – specifikus fluoreszcens reagenseket használó vizsgálati készletével használtuk. A sejteket az egyes vizsgálati típusokhoz hasonlóan előkezeltük. Így az NE-4C és MC3T3-E1 sejteket 24-lyukú sejtenyészőlemezekre ültettük le  $5 \times 10^4$  sejt/lyuk sűrűséggel, majd 24-órás előinkubációt végeztünk  $\text{CO}_2$ -inkubátorban. Ezt követően a sejteket 24 órán át különböző koncentrációjú vizsgálati vegyületekkel kezeltük, majd a megfelelő vizsgálati készletet alkalmaztunk a gyártó utasításai szerint, és a mintákat a megfelelő szoftvermodul segítségével elemeztük. Kísérleteinkben 3 független kezelést végeztünk az áramlási citometriával.

### 3.7.1. A SEJTEK ÉLETKEPESÉGÉNEK MEGHATÁROZÁSA ÁRAMLÁSI CITOMETRIÁVAL

A vizsgálati anyagokkal való 24-órás inkubációt követően a sejteket Eppendorf-csövekbe (Thermofisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) gyűjtöttük. A *Muse™ Count and Viability Kit* (MCH100102, Merck Millipore, Budapest, Magyarország) segítségével áramlási

citometriának vetettük alá, minden kezelésnél 532 nm hullámhosszon detektáltuk az optikai sűrűséget, és a *Muse™ Count and Viability* szoftvermodul segítségével kiszámítottuk az életképes sejtek számát (sejt/ml), az összes sejt számát (sejt/ml) és a minták %-os életképességét. A *Muse™ Count and Viability Kit* két kulcsfontosságú paramétert detektál; a sejtszámot és az életképességet, az előbbinél a készlet lehetővé teszi a sejtek teljes számának gyors és pontos meghatározását a mintában. A vizsgálati készlet fluoreszcens festéket tartalmaz, amely specifikusan kötődik a sejtekhez, így azok könnyen detektálhatók és megszámlálhatók a *Muse™ Cell Analyzer* segítségével. Az életképességnél a készlet érzékeli a sejtek életképességét azáltal, hogy különbséget tesz az élő és az elhalt sejtek között. Ez két különböző fluoreszcens festék kombinációjával történik;

- propidium-jodid (PI), amely csak a membránintegritását elvesztett sejtekbe tud bejutni, tehát csak az elhalt vagy sérült sejtek magját festi meg. Mivel a PI nagy, pozitív töltésű molekula, az ép sejtmembránon nem képes áthaladni, ezért a festék a sérült vagy elhalt sejtek DNS-éhez kötődve fluoreszcens jelzést ad.

AO (Acridin Orange/Akridin narancs), amely bejut az összes sejtbe, függetlenül attól, hogy élők vagy elhaltak, és interkalálódik a sejtmag DNS-ébe, fluoreszcens jelzést adva. Az AO főként az élő sejtek detektálására szolgál, mivel az élő sejtek membránja ép, és a festék megfelelően kötődik a DNS-hez (*Muse™ Count and Viability Kit User Guide*).

A sejteket 6-lyukú sejtenyésző lemezekre (Thermofisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)  $1,5 \times 10^5$  sejt/lyuk sűrűséggel ültettem le, 24 órán keresztül inkubáltam, majd elvégeztem a különböző koncentrációjú GLY-IPA-, R- vagy POE-15-kezelést MEM, illetve  $\alpha$ -MEM tápközegben. Az NE-4C sejtvonalon vizsgált koncentrációk GLY-IPA esetében 0,0184%, 0,0441%, 0,1058%, 0,181%, 0,254%, 0,85% R-egyenértékű oldatnak feleltek meg, amelyek a hatóanyag szempontjából 89,42  $\mu\text{g/ml}$ , 214,33  $\mu\text{g/ml}$ , 514,19  $\mu\text{g/ml}$ , 879,66  $\mu\text{g/ml}$ , 1234,44  $\mu\text{g/ml}$ , 4131  $\mu\text{g/ml}$  GLY-IPA-koncentrációnak felelnek meg. A R-kezelésnél alkalmazott koncentrációk sorrendben 0,0009%, 0,0013%, 0,0018%, 0,0026%, 0,0036%. A POE-15-kezelések esetében a vizsgálat során alkalmazott R-ekvivalens koncentrációk sorrendben a következők voltak; 0,000011%, 0,0000155%, 0,000194%, 0,000338%, 0,000775%, 0,00155%. Ezek a koncentrációk a POE-15-tartalom szempontjából 0,020  $\mu\text{g/ml}$ , 0,028  $\mu\text{g/ml}$ , 0,353  $\mu\text{g/ml}$ , 0,614  $\mu\text{g/ml}$ , 1,408  $\mu\text{g/ml}$ , 2,817  $\mu\text{g/ml}$  POE-15-koncentrációnak felelnek meg.

Az MC3T3-E1 sejtvonalon vizsgált koncentrációk GLY-IPA esetében a 0,2213%, 0,3098%, 0,4337%, 0,6071%, 0,85%, 1,3% R-egyenértékű oldatnak feleltek meg, amelyek a hatóanyag szempontjából 1075,52  $\mu\text{g/ml}$ , 1505,63  $\mu\text{g/ml}$ , 2107,78  $\mu\text{g/ml}$ , 2950,51  $\mu\text{g/ml}$ , 4131  $\mu\text{g/ml}$ , 6318  $\mu\text{g/ml}$  GLY-IPA-koncentrációnak felelnek meg. A R-kezelésnél alkalmazott

koncentrációk sorrendben 0,00185%, 0,0023%, 0,005%, 0,007%, 0,01%. A *POE-15*-kezelések esetében a vizsgálat során alkalmazott R-ekvivalens koncentrációk sorrendben a következők voltak; 0,0019%, 0,0026%, 0,0037%, 0,0052%, 0,0072%, 0,0101%. Ezek a koncentrációk a *POE-15*-tartalom szempontjából 3,39 µg/ml, 4,68 µg/ml, 6,68 µg/ml, 9,37 µg/ml, 13,12 µg/ml, 18,39 µg/ml *POE-15*-koncentrációnak felelnek meg. Az eredményeinket a negatív kontrollhoz képest százalékban fejeztük ki.

### 3.7.2. A SEJTEK DNS-KÁROSODÁSNAK MEGHATÁROZÁSA ÁRAMLÁSI CITOMETRIÁVAL

A sejteket a *Muse™ Multi-colour DNA-Damage Kit* (MCH200107, Merck Millipore, Budapest, Magyarország) használati utasításának leírása szerint készítettük elő. A *Muse™ Multi-Colour DNA-Damage Kit* speciális festékkészletet tartalmaz, amely a sejtekben bekövetkezett DNS-károsodást detektálja és kvantifikálja, több paraméter egyidejű mérésére is alkalmas. A készlet specifikusan a H2A.X foszforilációját (p-H2A.X) és a p53 fehérje stabilizálódását és foszforilációját detektálja a következőképpen;

- H2A.X foszforiláció (p-H2A.X): Ez egy jól ismert marker a kettős szálú DNS-törések (DSBs) jelenlétére. Amikor a sejt DNS-károsodást szenved el, a H2A.X fehérje egy speciális formájának, a foszforilált H2A.X-nek a szintje megemelkedik. Ez a marker a DNS-törések felismerésére szolgál.
- p53 fehérje stabilizálódása és foszforilációja: A p53 tumorszuppresszor fehérje, amely szintén részt vesz a DNS-károsodásra adott válaszban. A DNS-károsodás hatására a p53 stabilizálódik, foszforilálódik, és ennek következtében szintje megemelkedik a sejtben.

A *Muse™ Multi-Colour DNA-Damage Kit* tehát két fontos biomarkert detektál, amelyek a sejtekben bekövetkezett DNS-károsodásra utalnak. A detektált jelek alapján meg lehet határozni, hogy a sejtek milyen mértékben szenvedtek el DNS-károsodást, ami fontos információ lehet a sejtciklus, a sejthalál vizsgálatában (*Muse™ Multi-Colour DNA-Damage Kit* User Guide).

A sejteket 6-lyukú sejttenyésztő lemezekre (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)  $1,5 \times 10^5$  sejt/lyuk sűrűséggel ültettem le, 24 órán keresztül inkubáltam, majd elvégeztem a különböző koncentrációjú *GLY-IPA*-, R- vagy *POE-15*-kezelést MEM, illetve  $\alpha$ -MEM tápközegben. Az NE-4C sejtvonalon vizsgált koncentrációk *GLY-IPA* esetében 0,015%, 0,092%, 0,101%, 0,114%, 0,129%, 0,146% R-egyenértékű oldatnak feleltek meg, amelyek a hatóanyag szempontjából 72,83 µg/ml, 446,66 µg/ml, 490,36 µg/ml, 553,48 µg/ml, 626,30 µg/ml, 708,84 µg/ml *GLY-IPA*-koncentrációnak felelnek meg. A R-kezelésnél alkalmazott koncentrációk sorrendben 0,0013%, 0,0016%, 0,0018%, 0,002%, 0,0023%. A *POE-15*-kezelések esetében a

vizsgálat során alkalmazott R-ekvivalens koncentrációk sorrendben a következők voltak; 0,00005%, 0,00008%, 0,00011%, 0,00015%, 0,00021%, 0,0003%. Ezek a koncentrációk a *POE-15*-tartalom szempontjából 0,09 µg/ml, 0,15 µg/ml, 0,20 µg/ml, 0,27 µg/ml, 0,38 µg/ml, 0,55 µg/ml *POE-15*-koncentrációnak felelnek meg.

Az MC3T3-E1 sejtvonalon vizsgált koncentrációk *GLY-IPA* esetében a 0,0325%, 0,0722%, 0,1189%, 0,1784%, 0,2676% R-egyenértékű oldatnak feleltek meg, amelyek a hatóanyag szempontjából 157,86 µg/ml, 350,70 µg/ml, 577,59 µg/ml, 866,40 µg/ml, 1299,63 µg/ml *GLY-IPA*-koncentrációnak felelnek meg. A R-kezelésnél alkalmazott koncentrációk sorrendben 0,00131%, 0,00184%, 0,00257%, 0,0036%, 0,005%. A *POE-15*-kezelések esetében a vizsgálat során alkalmazott R-ekvivalens koncentrációk sorrendben a következők voltak; 0,000005%, 0,00005%, 0,0038%, 0,005%, 0,007%, 0,01%. Ezek a koncentrációk a *POE-15*-tartalom szempontjából 0,01 µg/ml, 0,09 µg/ml, 6,91 µg/ml, 9,09 µg/ml, 12,73 µg/ml, 18,18 µg/ml *POE-15*-koncentrációnak felelnek meg.

### 3.7.3. APOPTÓZIS- ÉS KASZPÁZ 3/7-AKTIVITÁS MEGHATÁROZÁSA ÁRAMLÁSI CITOMETRIÁVAL

A sejtek apoptózis-státuszának elemzését a *Muse™ Annexin V and Dead Cell Kit* és a *Muse™ Caspase 3/7 Assay Kit* (MCH100105 és MCH100108, Merck Millipore, Budapest, Magyarország) segítségével végeztük.

A sejteket 6-lyukú sejtenyésző lemezekre (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)  $1,5 \times 10^5$  sejt/lyuk sűrűséggel ültettem le, 24 órán keresztül inkubáltam, majd elvégeztem a különböző koncentrációjú *GLY-IPA*-, R- vagy *POE-15*-kezelést MEM, illetve  $\alpha$ -MEM tápközegben. *Muse™ Annexin V and Dead Cell Kit* vizsgálatnál az NE-4C sejtvonalon vizsgált koncentrációk *GLY-IPA* esetében 0,0077%, 0,0184%, 0,0441%, 0,1058%, 0,254% R-egyenértékű oldatnak feleltek meg, amelyek a hatóanyag szempontjából 37,42 µg/ml, 89,42 µg/ml, 214,33 µg/ml, 514,19 µg/ml, 1234,44 µg/ml *GLY-IPA*-koncentrációnak felelnek meg. A R-kezelésnél alkalmazott koncentrációk sorrendben 0,0009%, 0,0013%, 0,0018%, 0,0026%, 0,0036%. A *POE-15*-kezelések esetében a vizsgálat során alkalmazott R-ekvivalens koncentrációk sorrendben a következők voltak; 0,000194%, 0,000388%, 0,000775%, 0,00155%. Ezek a koncentrációk a *POE-15*-tartalom szempontjából 0,35 µg/ml, 0,70 µg/ml, 1,41 µg/ml, 2,81 µg/ml *POE-15*-koncentrációnak felelnek meg.

Az MC3T3-E1 sejtvonalon vizsgált koncentrációk *GLY-IPA* esetében a 0,0185%, 0,044%, 0,106%, 0,254%, 0,31%, 0,61% R-egyenértékű oldatnak feleltek meg, amelyek a hatóanyag szempontjából 89,91 µg/ml, 213,84 µg/ml, 515,16 µg/ml, 1234,44 µg/ml, 1506,60 µg/ml, 2964,61

$\mu\text{g/ml}$  GLY-IPA-koncentrációnak felelnek meg. A R-kezelésnél alkalmazott koncentrációk sorrendben 0,0013%, 0,0018%, 0,0026%, 0,0036%, 0,005%, 0,007%. A POE-15-kezelések esetében a vizsgálat során alkalmazott R-ekvivalens koncentrációk sorrendben a következők voltak; 0,00007%, 0,0001%, 0,00645%, 0,01%, 0,02%. Ezek a koncentrációk a POE-15-tartalom szempontjából 0,13  $\mu\text{g/ml}$ , 0,18  $\mu\text{g/ml}$ , 11,71  $\mu\text{g/ml}$ , 18,15  $\mu\text{g/ml}$ , 36,30  $\mu\text{g/ml}$  POE-15-koncentrációnak felelnek meg.

A vizsgált anyagokkal kezelt sejtek általános apoptotikus állapotát a *Muse™ Annexin V and Dead Cell Kit* segítségével követtük nyomon, amely 4 sejtpopulációt különböztet meg egymástól; az élő sejteket, korai apoptotikus sejteket, késői apoptotikus sejteket és halott sejteket, illetve a korai- és a késői apoptotikus sejtek összegét, melyet összes apoptikus sejtnek mutat be szintén %-os arányban. Vizsgálatunkban az „összes apoptotikus sejtek” változót vettük figyelembe az AnnexinV és halott sejt vizsgálati készletben, és ezzel végeztük el az  $\text{IC}_{50}$ -értékek számítását is.

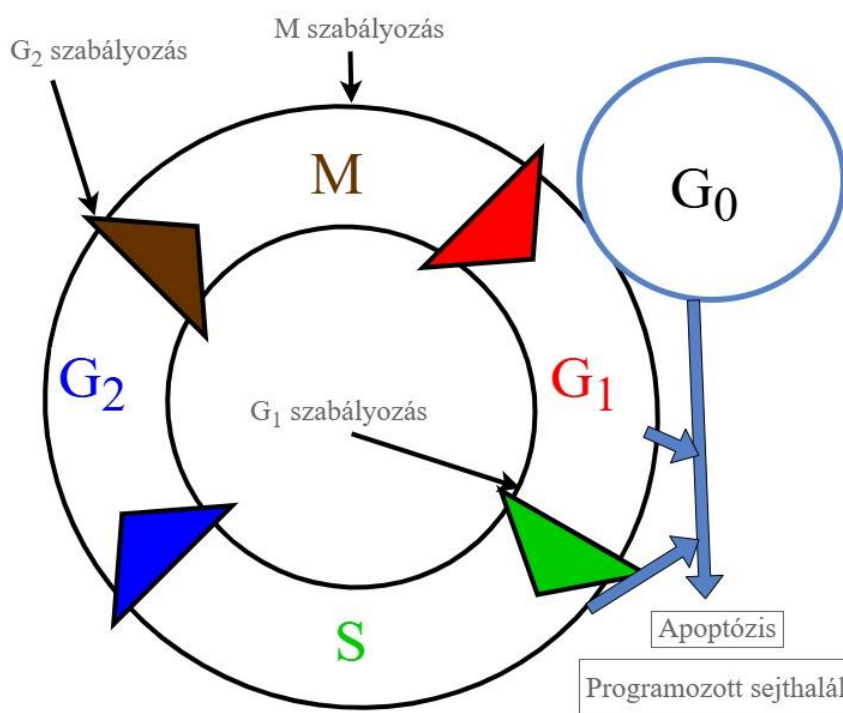
*Muse™ Caspase 3/7 Assay Kit* vizsgálatánál az NE-4C sejtvonalon vizsgált koncentrációk GLY-IPA esetében 0,092%, 0,1296%, 0,181%, 0,254%, 0,625% R-egyenértékű oldatnak feleltek meg, amelyek a hatóanyag szempontjából 447,12  $\mu\text{g/ml}$ , 629,86  $\mu\text{g/ml}$ , 879,66  $\mu\text{g/ml}$ , 1234,44  $\mu\text{g/ml}$ , 3037,50  $\mu\text{g/ml}$  GLY-IPA-koncentrációnak felelnek meg. A R-kezelésnél alkalmazott koncentrációk sorrendben 0,0009%, 0,0013%, 0,0018%, 0,0026%, 0,0036 %. A POE-15-kezelések esetében a vizsgálat során alkalmazott R-ekvivalens koncentrációk sorrendben a következők voltak; 0,000155%, 0,000194%, 0,000388%, 0,000775%, 0,00155%. Ezek a koncentrációk a POE-15-tartalom szempontjából 0,28  $\mu\text{g/ml}$ , 0,35  $\mu\text{g/ml}$ , 0,71  $\mu\text{g/ml}$ , 1,41  $\mu\text{g/ml}$ , 2,82  $\mu\text{g/ml}$  POE-15-koncentrációnak felelnek meg.

Az MC3T3-E1 sejtvonalon vizsgált koncentrációk GLY-IPA esetében a 0,181%, 0,254%, 0,31%, 0,60%, 1,20 % R-egyenértékű oldatnak feleltek meg, amelyek a hatóanyag szempontjából 879,66  $\mu\text{g/ml}$ , 1234,44  $\mu\text{g/ml}$ , 1506,60  $\mu\text{g/ml}$ , 2916  $\mu\text{g/ml}$ , 5832  $\mu\text{g/ml}$  GLY-IPA-koncentrációnak felelnek meg. A R-kezelésnél alkalmazott koncentrációk sorrendben 0,003%, 0,005%, 0,007%, 0,01%. A POE-15-kezelések esetében a vizsgálat során alkalmazott R-ekvivalens koncentrációk sorrendben a következők voltak; 0,003%, 0,006%, 0,007%, 0,01%. Ezek a koncentrációk a POE-15-tartalom szempontjából 5,45  $\mu\text{g/ml}$ , 10,89  $\mu\text{g/ml}$ , 12,71  $\mu\text{g/ml}$ , 18,15  $\mu\text{g/ml}$  POE-15-koncentrációnak felelnek meg. A *Muse™ Caspase 3/7 Kit* által detektált sejtek alpopulációit a kaszpáz 3/7 enzimek aktivitása alapján detektálja, ezek a konzervált cisztein-proteázok a programozott sejthalált hajtják végre szubsztrátfehérjéik hasításával. A módszer lehetővé teszi szintén 4 sejtpopuláció megkülönböztetését; az élő sejteket; apoptotikus sejteket, melyek kaszpáz 3/7-aktivitást mutatnak; késői apoptotikus/halott sejteket; nekrotikus sejteket. Vizsgálatunkban a

késői apoptotikus/halott sejtek változót vettük figyelembe a kaszpáz 3/7 vizsgálati készletben, és ezzel végeztük el az  $IC_{50}$ -értékek számítását is.

#### 3.7.4. A SEJTCIKLUS MEGHATÁROZÁSA ÁRAMLÁSI CITOMETRIÁVAL

A sejtciklus szakaszai nem cserélhetők fel, szigorú sorrendben követik egymást, és az ellenőrzési pontokon derül ki, hogy tovább tudnak-e lépni a sejtek az egyik szakaszból a másikba. Az osztódás során 3 ponton történik az ellenőrzés. Az első a  $G_1$ -fázis végén következik be, ez az úgynevezett Start ellenőrzési pont, itt a DNS épségét ellenőrzi a rendszer. A második a  $G_2$ -fázis végén van, ez a  $G_2$  ellenőrzési pont, ahol szintén a DNS épségét és a megkettőződés hibátlanágát ellenőrzi a rendszer. A harmadik az M ellenőrzési pont, ahol azt ellenőrzi a rendszer, hogy pontosan rendeződtek-e a kromoszómák az egyenlítői síkban, tehát, hogy pontos lesz-e a kromatidok szétválása (7 ábra) (DARVAS & LÁSZLÓ 2005).



7. ábra A sejtciklus fázisai ( $G_0$ ,  $G_1$ , S,  $G_2$ , M) és ellenőrzési pontjai ( $G_1$ ,  $G_2$ , M). A vezérlő rendszer csak akkor viszi tovább a sejtciklust a következő fázisba, ha az ellenőrzési pontot megelőző szakasz hibátlanul, hiánytalanul lezajlott.

A  $G_0$  szakaszban található a sejtek nagy része, ahol se osztódás, sokszor még növekedés sem következik be, hiszen ezekben a sejtekben nincs aktív Cdk. Ahhoz, hogy a sejtek belépjenek a  $G_1$  szakaszba, növekedési faktorokra van szükségük, *in vitro* rendszerekben kimutatták, hogy a szérumban igen kis mennyiségben található növekedési faktorok elegendők ehhez. A sejtek számára korlátozott mennyiségi növekedési faktor áll rendelkezésre, mert a sejteknek meghatározott felület jut az osztódáshoz, ezt nevezik sűrűségfüggő sejtosztódás-gátlásnak. *In vitro* körülmények között is limitált a sejtek osztódása, mely több tényezőtől is függ. Különféle exogén hatásokra a sejtek nem képesek belépni a  $G_1$ -fázisba, hiába tartalmaz növekedési faktort az adott médium. Jelen kísérletünkben azt is megfigyeltük, hogy vajon a GLY-IPA képes-e ilyen hatást kifejteni.

A sejtpopuláción belül a sejtek eloszlása a sejtproliferációs ciklus különböző fázisaiban informatív mutatója annak, hogy a vizsgált sejtpopuláció sejtosztódását befolyásolta-e a vizsgált anyagokkal való kezelés. A sejtek arányát a kezdődő DNS-replikációs (S), sejtosztódási ( $G_2/M$ ) és növekedési ( $G_0/G_1$ ) fázisokban a *Muse™ Cell Cycle Assay Kit* (MCH100106, Merck Millipore, Budapest, Magyarország) segítségével detektáltuk.

A sejteket 6-lyukú sejtenyésző lemezekre (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)  $1,5 \times 10^5$  sejt/lyuk sűrűséggel ültettem le, 24 órán keresztül inkubáltam, majd elvégeztem a különböző koncentrációjú GLY-IPA-, R- vagy POE-15-kezelést MEM, illetve  $\alpha$ -MEM tápközegben. Az NE-4C sejtvonalon vizsgált koncentrációk GLY-IPA esetében 0,41%, 0,29%, 0,21% R-egyenértékű oldatnak feleltek meg, amelyek a hatóanyag szempontjából 1992,60  $\mu\text{g/ml}$ , 1409,40  $\mu\text{g/ml}$ , 1020,60  $\mu\text{g/ml}$  GLY-IPA-koncentrációnak felelnek meg. A R-kezelésnél alkalmazott koncentrációk sorrendben 0,0026%, 0,0018%, 0,0013%. A POE-15-kezelések esetében a vizsgálat során alkalmazott R-ekvivalens koncentrációk sorrendben a következők voltak; 0,0013%, 0,001%, 0,0007%. Ezek a koncentrációk a POE-15-tartalom szempontjából 2,36  $\mu\text{g/ml}$ , 1,82  $\mu\text{g/ml}$ , 1,27  $\mu\text{g/ml}$  POE-15-koncentrációnak felelnek meg.

Az MC3T3-E1 sejtvonalon vizsgált koncentrációk GLY-IPA esetében a 0,2075%, 0,415%, 0,83% R-egyenértékű oldatnak feleltek meg, amelyek a hatóanyag szempontjából 1008,45  $\mu\text{g/ml}$ , 2016,90  $\mu\text{g/ml}$ , 4033,80  $\mu\text{g/ml}$  GLY-IPA-koncentrációnak felelnek meg. A R-kezelésnél alkalmazott koncentrációk sorrendben 0,0025%, 0,005%, 0,01%. A POE-15-kezelések esetében a vizsgálat során alkalmazott R-ekvivalens koncentrációk sorrendben a következők voltak; 0,00039%, 0,00079%, 0,00157%. Ezek a koncentrációk a POE-15-tartalom szempontjából 0,71  $\mu\text{g/ml}$ , 1,44  $\mu\text{g/ml}$ , 2,85  $\mu\text{g/ml}$  POE-15-koncentrációnak felelnek meg.

A *Muse™ Cell Cycle Assay Kit* DNS-kötő festéket használ, amely a sejtek DNS-éhez kötődik, és fluoreszcenciával jelzi a DNS tartalmát. A különböző sejtciklus-fázisokban a sejtek eltérő mennyiségű DNS-t tartalmaznak;  $G_0/G_1$ -fázisban, normál, diploid DNS mennyiség ( $2n$ ), S-

fázisban a DNS-tartalom növekszik, mivel a DNS megduplázódik, G<sub>2</sub>/M-fázisban a DNS megduplázódott, tehát a sejtnak tetraploid DNS mennyisége van (4n). A *Muse™ Cell Analyzer* ezeket a különböző fluoreszcencia intenzitásokat méri, és ez alapján megállapítja, hogy a sejtek hány százaléka található az egyes fázisokban. A mérés a festést követően a DNS-replikáció során jellegzetes növekedést, majd a sejtmérethez viszonyított csökkenést is kimutatta, amint az a DNS-tartalom indexen és a hisztogramon, valamint a vizsgálat által meghatározott sejtméret indexen látható (*Muse™ Cell Cycle Assay Kit User Guide*).

### 3.8. STATISZTIKAI ELEMZÉS

Az IC<sub>50</sub>-értékeket minden vizsgálatban az OriginPro v.7.0 adatelemző és grafikus szoftverrendszer (Origin(Pro), Version 7.0, OriginLab Corp., Northampton, MA, USA) segítségével számoltam ki. Az eredményeket átlag ± szórás (SD) határoztam meg. Az eredményeket nemlineáris regresszióval elemeztem, szigmoid dóziszválasz alkalmazásával, a ≤0,05 p értékeket statisztikailag szignifikánsnak tekintve. A sejtciklusteszthez a statisztikai elemzéseket az R 3.5.1 statisztikai programmal végeztem (R Development Core Team, 2018).

## 4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

### 4.1. A SEJTEK ÉLETKÉPESSÉGE

Vizsgálatainkban a sejtek életképességét MTT-vizsgálattal és áramlási citometriával is meghatároztuk, az élő és az elhalt sejtek megkülönböztetésére. Az alkalmazott festékek az ép és a sérült sejtmembránt eltérően festették meg, melyet kolorimetriásan mértünk. Az MTT-vizsgálatnál MTT festéket alkalmaztam, míg az áramlási citometriás tesztrendszerrel PI festéket, ami a vizsgálati készlet része volt. Az így kapott eredményeket összehasonlítottuk és értékeltük a mérési módszereket.

#### 4.1.1. MTT-VIZSGÁLAT

A sejtek életképességének mérésére biokémiai (enzimes) vizsgálatban végeztem el az MTT-vizsgálatot minden egyes anyag, *GLY-IPA*, *POE-15* és R esetében. A kapott adatok azt mutatják, hogy a vizsgált koncentrációtartományban minden vizsgált vegyület jól kimutatható gátló hatást fejt ki a sejtek életképességére (8A. és 8B. ábrák), ám különböző mértékben. A R 0,0032% feletti koncentrációban jelentősen csökkentette a neuroektodermális NE-4C sejtek életképességét. A 24-órás vizsgálatot követően meghatározott  $IC_{50}$ -értékek az NE-4C esetében  $0,652 \pm 0,006\%$ ,  $0,00995 \pm 0,00010\%$  és  $0,00315 \pm 0,00007\%$  volt a *GLY-IPA*, a R és a *POE-15* esetében (8A. ábra). A NE-4C sejtvonalon végzett 24-órás kezelést követően a *POE-15* citotoxicitása körülbelül 200-szor nagyobb, mint a *GLY-IPA* esetében. Tehát a felületaktív anyag több mint két nagyságrenddel erősebb arányban gátolta a sejtek életképességét, mint a hatóanyag.

Az MC3T3-E1 preoszteoblasztsejteken a 24-órás  $IC_{50}$ -értékek a fentiekhez hasonlóan meghatározva  $0,7256 \pm 0,0068\%$ ,  $0,0101 \pm 0,0004\%$  és  $0,00639 \pm 0,00003\%$  voltak a *GLY-IPA*, R és *POE-15* esetében (8B. ábra). A citotoxicitás a *POE-15* vizsgálatánál 110-szer nagyobb, mint a *GLY-IPA* esetében 24-órás kezelést követően. A *GLY-IPA*, *POE-15* és a R esetében meghatározott citotoxicitásra és egyéb biológiai hatásokra meghatározott  $IC_{50}$ - és LGD-értékeket a Mellékletben található 2. táblázat foglalja össze.

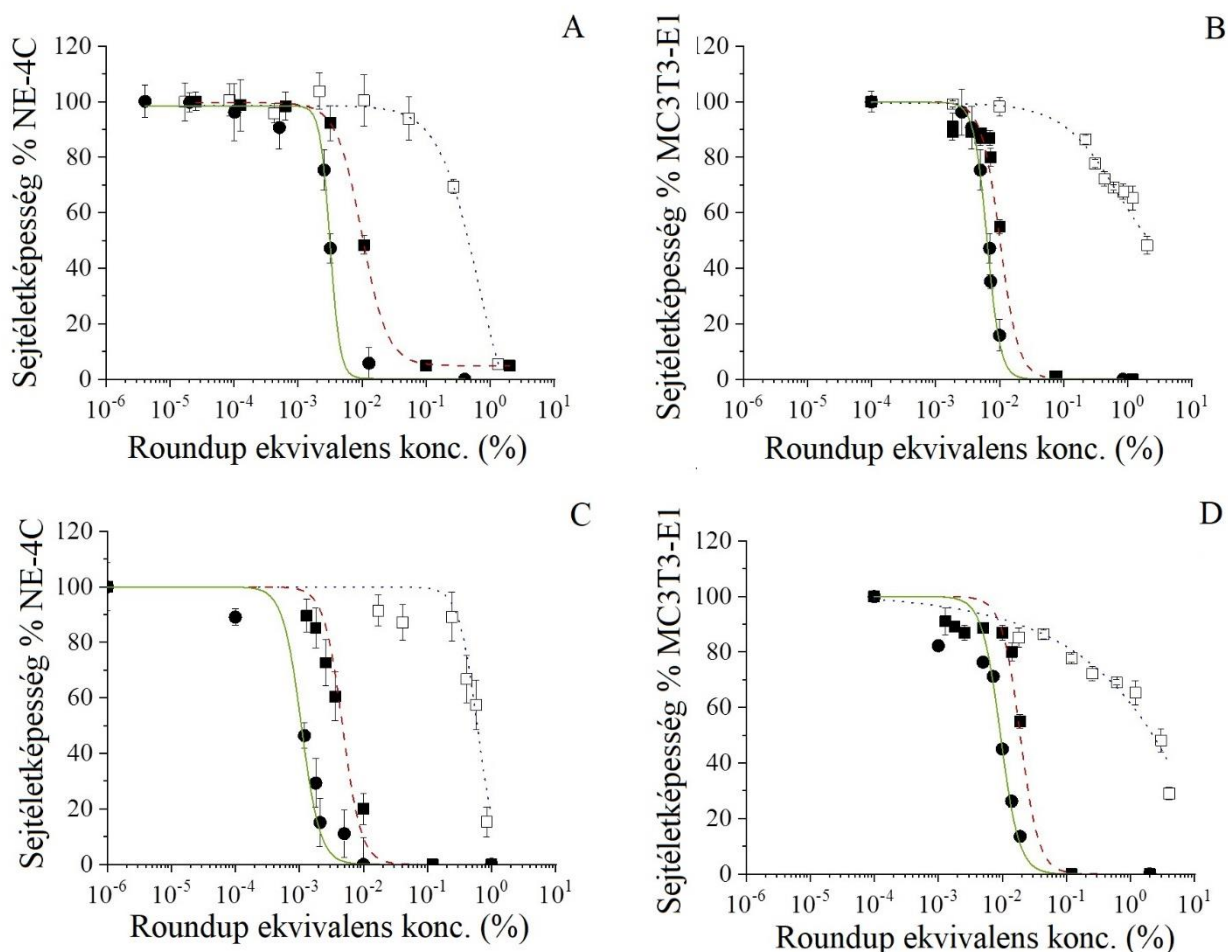
#### 4.1.2. ÁRAMLÁSI CITOMETRIÁS SEJTÉLETKÉPESSÉGI VIZSGÁLAT

24-órás expozíció után az NE-4C sejteket MEM tápfolyadékkal mostam, majd *Muse™ Cell Analyzer* műszer segítségével elemeztem a gyártó általi használati utasításban megfelelően. A *GLY-IPA* esetében 4-szer alacsonyabb koncentrációt határoztunk meg, mint a mezőgazdasági

alkalmazásokban használt koncentráció (*GLY-IPA* tartalom a 2%-os Roundup oldatban). A *GLY-IPA* esetében alkalmazott koncentrációkat szakirodalmi adatok alapján számoltuk ki. A *POE-15* és a R esetében nagyfokú, a *GLY-IPA* -nál körülbelül 500-szor nagyobb citotoxicitást mutattak ki karcinomasejtekhez képest (SZÉKÁCS *et al.*, 2014).

Az NE-4C sejtek a 24-órás kezelésnél mért  $IC_{50}$ -értékek (8C. ábra) a *GLY-IPA*, R és *POE-15* esetében  $0,595 \pm 0,009\%$ ,  $0,00469 \pm 0,00008\%$ , illetve  $0,00115 \pm 0,00007\%$  voltak a Roundup Classic-ra vonatkoztatott ekvivalens koncentráció esetében. Tehát a tudományos szakirodalomban közölt értékekhez (SZÉKÁCS *et al.*, 2014, KOLLER *et al.*, 2012, NAGY *et al.*, 2021) hasonlóan, a jelen vizsgálatban megfigyelt eredmények megerősítették, hogy a R és a *POE-15* nagyon nagy hígításban, lényegesen a várható mezőgazdasági expozíciók alatt, citotoxikus hatást fejtett ki az NE-4C sejtekre. A citotoxicitás 24-órás kezeléseket után a *POE-15* esetében körülbelül 495-ször nagyobb volt a sejtleletkéesség-csökkenés, mint a *GLY-IPA* esetében.

Az MC3T3-E1 sejteket nem esszenciális aminosavakkal módosított MEM ( $\alpha$ -MEM) pufferrel mostuk, és a NE-4C sejtekhez hasonlóan kezeltük és elemeztük. A *GLY-IPA* lényegesen kisebb mértékű gátlást okozott a sejtek életképességében, mint a R vagy a *POE-15*. A 24-órás kezelést követően az MC3T3-E1 preoszteoblasztikus sejtekre a fentiekhez hasonlóan meghatározott  $IC_{50}$  értékek (8D. ábra)  $1,2495 \pm 0,0024\%$ ,  $0,0187 \pm 0,0007\%$ ,  $0,00936 \pm 0,00085\%$  voltak a *GLY-IPA*, R és *POE-15* esetében. Az  $IC_{50}$ -értékek azt jelzik, hogy ez a vizsgálati tesztrendszer az NE-4C sejtek értékelésére érzékenyebbnek tűnik az MTT-vizsgálatnál.



8. ábra Koncentrációfüggő hatások a sejtek életképességére 24-órás *GLY-IPA* (□), *R* (■) és *POE-15* (●) anyagokkal végzett kezelés után. Életképesség meghatározása MTT-tesztel NE-4C (A) és MC3T3-E1 (B) sejtvonalakon, illetve a *Muse™ Count and Cell Viability* vizsgálati készlet segítségével NE-4C (C) és MC3T3-E1 (D) sejtvonalakon. Az adatokat átlag ±SD értékben tüntettük fel.

Életképességi vizsgálatainkban minden vizsgált anyag, hatást gyakorolt az NE-4C és az MC3T3-E1 sejtekre egyaránt. Az NE-4C sejtvonalat mindkét életképességi vizsgálatban (*Muse™ Count and Cell Viability* vizsgálati készlet, MTT-vizsgálat) 1,1-2-szer érzékenyebbnek találtuk az összes vizsgálati anyagra, mint az MC3T3-E1 sejteket. Ez az NE-4C sejtek érzékenységből fakad, hiszen neuroektodermális őssejt típusú sejtvonal, tehát mint idegsejt, különösen érzékeny a kémiai anyagok, köztük a növényvédő szerek iránt. Így az ilyen sejtek a gyenge toxicitás legérzékenyebb mutatói, hiszen kisebb dózisoknál hamarabb jelentkeznek a hatások, mint a könnyű károsodást követő egyéb tünetek.

A korábbi eredményekkel összhangban vizsgálataink is egyértelműen kimutatták a *POE-15* kifejezett citotoxicitását, amelyet más vizsgálatokban a *R* készítménnyel egyenértékű

koncentrációban 0,00155% és 0,0097% között hatással volt (BENACHOUR & SÉRALINI, 2009, MESNAGE *et al.*, 2013).

A *GLY* és a *GBH*-k citotoxicitására vonatkozó *in vitro* adatok azt mutatták, hogy a legérzékenyebb sejtvonalak a következők: humán hepatopoetikus Epstein-Barr-vírussal transzformált limfocita Raji-sejtek (TOWNSEND *et al.*, 2017), a humán perifériás fehérvérsejtek (NAGY *et al.*, 2021), a mandzsu csík (*Misgurnus anguillicaudatus*) regeneratív uszonysejtvonalai (QIN *et al.*, 2017), a humán epiteliális HaCaT keratinocitasejtek (HEU *et al.*, 2012) és az egér neuroektodermális őssejtszerű NE-4C sejtvonal (SZÉKÁCS *et al.*, 2014). Ezzel szemben a JEG3, MC3T3-E1 egérpreosteoblaszt-sejtek (FARKAS *et al.*, 2018), humán embrionális vesesejtek (HEK293) (BENACHOUR *et al.*, 2007, BENACHOUR & SÉRALINI, 2009, GASNIER *et al.*, 2009, ROMANO *et al.*, 2010, SZÉKÁCS & DARVAS, 2018, WILLIAMS *et al.*, 2012) alacsonyabb érzékenységgű sejtípusok voltak.

## 4.2. DNS-KÁROSODÁS

A DNS-károsodást comet-teszt és áramlási citometria módszerével értékeltük. Az előbbi eljárás a fragmentált DNS elektroforetikus elválasztásán és vizualizálásán alapul (SCGE), míg az utóbbival a kettős szálú DNS töréseinek specifikus festése detektálható. Vizsgálati eredményeinkben bevezettük a legalacsonyabb genotoxikus dózis (LGD) értéket (KAWAGUCHI *et al.*, 2010), tekintettel arra, hogy a genotoxicitási vizsgálatoknál nem tudunk IC<sub>50</sub>-értéket megállapítani. Az LGD-érték azt a legalacsonyabb dózist jelenti, amelynél a vizsgált anyag pozitív választ indukál a genotoxicitási vizsgálatban (OLÁH *et al.*, 2022).

### 4.2.1. COMET-TEST

A faroknyomatékok (a DNS-fragmentáció sebességét) fluoreszcens mikroszkóppal tettem láthatóvá, és a *LUCIA™ Comet Assay* 3.5 szoftverrel automatikusan számítottam. A faroknyomaték a farok DNS-tartalmának és a farokban való átlagos vándorlási távolságnak a szorzata. Az NE-4C sejtek faroknyomatéka 21,9 és 104,6 µm között volt a vizsgált anyagok esetében, míg a farok intenzitása és a farok hossza 42,8% és 63,8 µm között, illetve 43,6 % és 114,1 µm között volt. Az MC3T3-E1 esetében a faroknyomaték értéke 2,15 és 38,1 µm között volt a vizsgált anyagoknál, míg a farok intenzitása és a farok hossza 7,12% és 28,6 % és 6,64–45,9 µm között volt. A 9A. ábrához hasonlóan meghatároztam az LGD-értékét, ami 0,0259%, 0,00002% és 0,0000089% volt a *GLY-IPA*, R és *POE-15* esetében a Roundup Classic ekvivalens

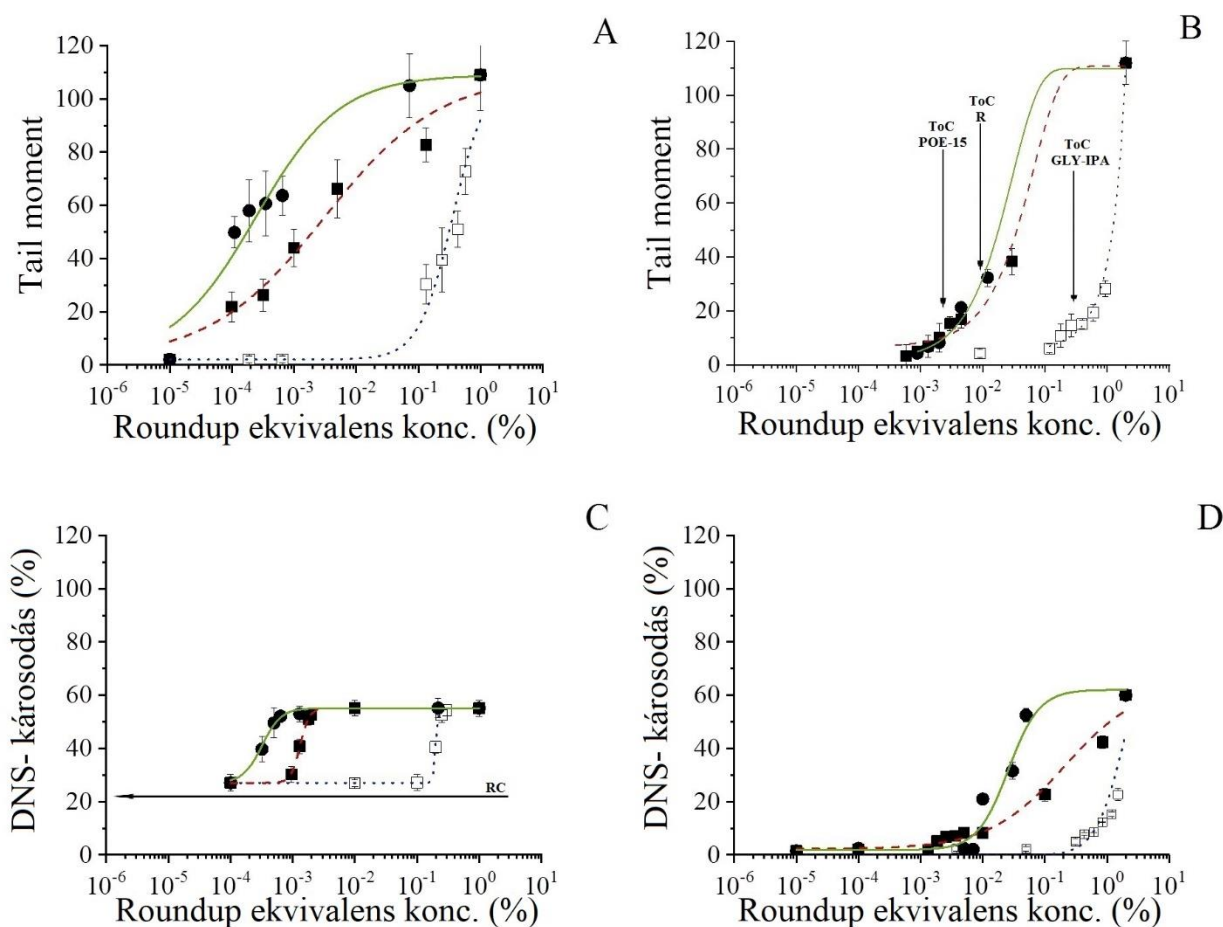
koncentrációban meghatározva. A comet-teszt nagy érzékenységet mutatott a *GLY-IPA*, a R és a *POE-15* potenciális genotoxicitásának kezdeti szűrésére (MLADINIC *et al.*, 2009, TOWNSEND *et al.*, 2017). A *POE-15* esetében magas szintű DNS-migrációt mutattam ki, körülbelül 2910-szeresét és 2247-szeresét, mint a *GLY-IPA* és a R esetében. *GLY-IPA* és R MC3T3-E1 sejteken a fentiekhez hasonlóan került meghatározásra, és a 9B. ábrán látható 24-órás LGD-értéke 0,0835%, 0,00224%, 0,0024125% voltak a *GLY-IPA*, R és *POE-15* esetében. A R ekvivalens koncentrációban magas szintű DNS-migrációt észleltem a *POE-15* esetében, ami 34-szer magasabbak, mint a *GLY-IPA* esetében. Az NE-4C és MC3T3-E1 sejtekben végzett DNS-migráció során kapott eredmények összehasonlítása azt mutatja, hogy az NE-4C sejtek érzékenyebbek a DNS-károsító hatásokra, mint az MC3T3-E1 sejtek, így a *POE-15*, R és *GLY-IPA* 24-órás LGD-értékei 271, 120 és 3,2-szer magasabbak az MC3T3-E1 esetében, mint az NE-4C sejteknél. A genotoxicitás és a *GLY-IPA*, *POE-15* és a R esetében meghatározott egyéb biológiai hatások LGD-értékeit az 2. táblázat foglalja össze, amely a mellékletben található. Az eredmények egyértelműen bizonyítják, hogy a *POE-15* 1300-szor alacsonyabb koncentrációban már hatást gyakorol DNS-re a comet-tesztben, mint amilyen koncentrációban ezt a felületaktív anyagot tartalmazzák a GBH-k a mezőgazdasági alkalmazása során (2% R).

#### 4.2.2. ÁRAMLÁSI CITOMETRIÁS VIZSGÁLAT KETTŐS SZÁLÚ DNS-TÖRÉSEK KIMUTATÁSÁRA

A hiszton H2X.A és az ATM fehérje kináz együttesen írja le a DNS-re gyakorolt hatást, mely főleg kettős szálú töréseket indukál. A Muse™ Multi-colour DNA-Damage Kit százalékos arányban képes leírni a DNS-károsodás mértékét. Az NE-4C sejteken 24-órás expozíció után a 9C. ábrán a fentiekhez hasonlóan határoztam meg az LGD-értéket, melyek a következők: 0,0376%, 0,00117% és 0,000295% a *GLY-IPA*, R, *POE-15* esetében. Magas szintű DNS-migrációt észleltem a *POE-15*-tel való 24-órás kezelést követően, amely 127-szer magasabb, mint a *GLY-IPA* esetében, és 3,9-szer magasabb, mint a R-nél.

Az eredményekben 55% feletti DNS-károsodást nem tudtam kimutatni, mert előlött sejthalált tapasztaltam. Vizsgálataim folyamán a kontroll kezelésben is DNS-károsodást figyeltem meg, mely magyarázható az NE-4C sejtek tulajdonságával, hiszen ebből a sejtvonalból hiányzik a p53 tumorszupresszor fehérje, melynek hatása az áramlási citométerrel végzett vizsgálatok eredményeiben jobban megmutatkozott, mint a comet-tesztben. Az NE-4C sejtek esetében a comet-teszt érzékenyebb, mint az áramlási citometriás kettős szálú DNS-törésvizsgálat. A vizsgálati készlettel vizsgált MC3T3-E1 sejtek LGD-értékét a fentiekhez hasonlóan határoztuk meg, és 0,0375%, 0,000786%, 0,0000935% értéket mértünk a *GLY-IPA*, R, *POE-15* esetében (9D.

ábra). Magas szintű DNS-károsodás volt kimutatható a *POE-15* esetében, amely 401-szer nagyobb, mint a *GLY-IPA* esetében, és 8,4-szer nagyobb, mint a R esetében.



9. ábra. Koncentrációfüggő hatások a sejtek DNS-károsodására 24-órás *GLY-IPA* ( $\square$ ), R ( $\blacksquare$ ) és *POE-15* ( $\bullet$ ) expozíció után, meghatározva comet-tesztel NE-4C (A) és MC3T3-E1 (B) sejteken, illetve a *Muse*™ *Multi-colour DNS-Damage Kit* segítségével NE-4C (C) és MC3T3-E1 (D) sejteken. Az adatokat átlag  $\pm$  SD értékkel tüntettük fel. A ToC érték a citotoxicitási küszöbértéket jelöli, mely felett a citotoxicitás akadályozza a faroknyomaték meghatározását (ToC R, ToC *POE-15* és ToC *GLY-IPA*). Az RC érték jelöli a megfigyelt DNS-károsodást a negatív kontrollban, hiszen az NE-4C sejtvonalban nincs p53 tumorszupresszor fehérje.

Eredményeink szerint a DNS-károsodás mértéke (a faroknyomaték értékét vizsgálva) comet-tesztben jelentős volt 24-órás kitettség mellett. Eredményeink korrelálnak a szakirodalmi adatokkal, ahol más sejtvonalakat vizsgáltak *GBH*-összetevő vegyületeket comet-tesztel (MLADINIC *et.al.*, 2009, TOWNSEND *et al.*, 2017, MANAS *et al.*, 2009a). A két DNS-károsodási vizsgálat eredményei közötti különbség annak a ténynek tudható be, hogy a comet-

teszt az egyszálú DNS, míg az áramlási citometriai vizsgálat a kettős szálú DNS töréseit mutatja ki. Az egyszálú DNS-törések gyakrabban fordulnak elő, mint a kettős szálúak, ami megmutatkozik az LGD-értékekben a két vizsgálati módszer között. Mindazonáltal a célunk az volt, hogy bemutassuk a megfigyelt DNS-károsodás mértékét, illetve hogy összehasonlítsuk a két módszert egymással.

#### 4.3. ÁRAMLÁSI CITOMETRIAI VIZSGÁLATOK APOPTÓZIS- ÉS A KASZPÁZ 3/7-AKTIVITÁS MEGHATÁROZÁSÁRA

Az apoptózis kiemelten fontos sejtfolyamat a szervezetek életében. Az apoptózis és a programozott sejthalál a sejtek elhalásához vezető jelenség, ám a két folyamat nem teljesen azonos. Programozott sejthalálról akkor beszélünk, amikor a sejtek differenciálódásuk végén, lényegében természetes folyamatban elpusztulnak. Az apoptózis ellenben azon morfológiai változások összességét jelenti, amelyek a sejt halálához vezetnek, de nemcsak természetes, hanem exogén hatások is kiválthatják. Nagyon nehéz a két folyamatot megkülönböztetni egymástól, különösen kísérleti feltételek között. A sejtek nemcsak apoptózissal halhatnak meg, hanem nekrozissal is, mely két folyamat nagyban különbözik egymástól. Az apoptózis energiát igénylő, genetikailag meghatározott, aktív folyamat, amely új gének expressziójával jár együtt, míg a nekrozis passzív, energiabefektetést nem igénylő folyamat. Az apoptózis általában vízvesztéssel kezdődik, ennek következtében a sejtek formája megváltozik, zsugorodni kezdenek, majd a plazmamembrán fodrossá válik, így tartalmuk nem jut ki az extracelluláris térbe. A nekrozist a sejt váratlan fizikai vagy kémiai sérülése váltja ki, ebben az esetben a sejtek – általában több egymás melletti sejtet is érintően – lizálódnak, ami a sejtiszövetben gyulladásos reakciót vált ki.

Az apoptózisban kulcsszerepet játszó legfontosabb enzimek a kaspázok. Magasabb rendű szervezetekben a kaspáz enzimcsaládnak eddig 11 tagját mutatták ki. A kaspázok lényegében sajátos specifikitású proteázok: mindig aszparaginsav után hasítanak, és ők maguk is rendelkeznek ilyen hasító helyekkel, ezért képesek autoaktivációra, tehát saját magukat aktiválják vagy más kaspázok által aktiválhatók. Az apoptózisban részt vevő kaspázokat is két csoportra lehet osztani, iniciátorokra (melyek a kaskád sor elején állnak, kaspáz-2, -8, -9 és -10) és effektorokra (melyek a kaskád sor végén állnak, kaspáz-3, -6 és -7), együttesen az úgynevezett végrehajtó kaspázok. Jelen vizsgálatban a végrehajtó kaspázokkal foglalkoztunk. Az apoptózis regulációja sok ponton kapcsolódik a sejtciklus szabályozásához, melyet az 7. ábra is mutat, hiszen a két folyamatnak mindig egyensúlyban kell lennie egymással (DARVAS & LÁSZLÓ 2005).

A programozott sejthalál és az apoptózis mértékét áramlási citometriával értékeltük a kezelt sejt kultúrákban meghatározott annexinszint és kaspázaktivitás alapján. A programozott

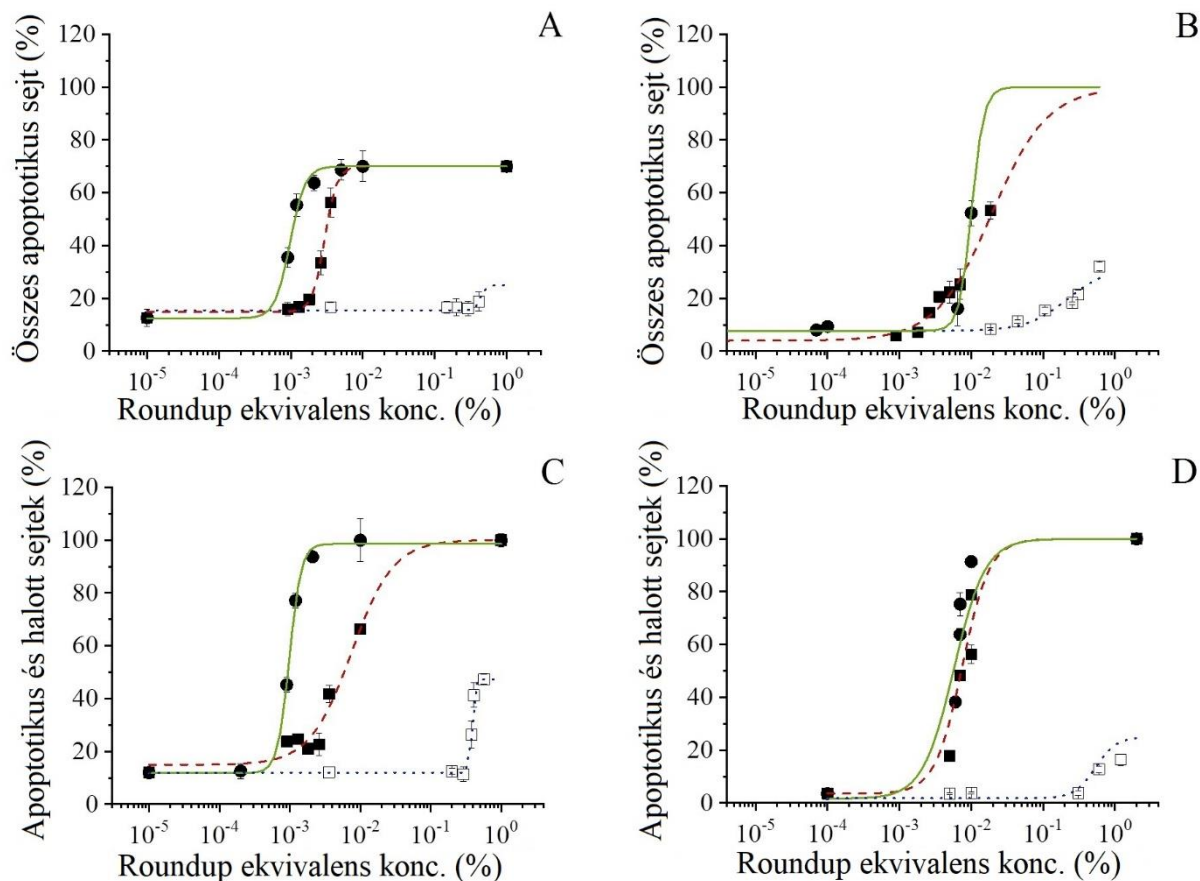
sejthalál a sejtnövekedés és -burjánzás fontos szabályozási útvonala. A kaszpázok fontos szabályozó elemei a proapoptotikus jelekre adott programozott sejthalálnak, mivel a kaszpáz 3 és a kaszpáz 7 enzimek az apoptózis végrehajtói (NICHOLSON & THORNBERRY, 1997, LAVRIK, 2005, FARKAS *et al.*, 2018).

A Muse™ Annexin V halott sejtek vizsgálati készletet használtuk az összes apoptotikus sejtek arányának meghatározására, 24-órás expozíció után. Az útmutató szerint jártunk el, amint az összes áramlási citometriás vizsgálat folyamán. Az NE-4C esetében meghatározott, és a 10A. ábrán bemutatott IC<sub>50</sub>-értékek a következők voltak a *GLY-IPA*, R, *POE-15* esetében, Roundup Classic ekvivalens koncentrációban mérve:  $0,246 \pm 0,0134\%$ ,  $0,00238 \pm 0,00003\%$  és  $0,00092 \pm 0,00005\%$  volt a. A *POE-15* esetében az apoptotikus sejtek magas szintjét mutattuk ki az áramlási citometriás Muse™ Annexin V halott sejtek kit segítségével; 273-szoros és 2,6-szoros arányban magasabbat, mint a *GLY-IPA* és a R esetében. Ezek az eredmények korreláltak a korábbi vizsgálati készletek eredményeivel, ami azt jelzi, hogy a *GLY-IPA* alacsonyabb toxicitást fejt ki, mint a R vagy a *POE-15*. Az eredmények azt is kimutatták, hogy a *POE-15* alacsonyabb koncentrációban indukál apoptózist, mint a R. Az Annexin V és a halott sejtek vizsgálati készlet esetében az MC3T3-E1 sejtvonalon az IC<sub>50</sub>-értékek  $0,2731 \pm 0,0045\%$ ,  $0,0167 \pm 0,0013\%$  és  $0,01169 \pm 0,00048\%$  voltak a *GLY-IPA*, R, *POE-15* esetében Roundup Classic ekvivalens koncentrációban (10B. ábra). A *POE-15* esetében az apoptotikus sejtek magas szintjét mutattuk ki, amely 24-szer, illetve 1,4-szer magasabb volt, mint a *GLY-IPA* és a R esetében, az áramlási citometriás Muse™ Annexin V halott sejtek vizsgálati készlet segítségével. Az eredmények azt mutatják, hogy a 24-órás kezelések után az életképes sejtek száma csökkent, az elhalt sejtek aránya pedig dózisfüggő módon nőtt.

A Kaszpáz 3/7 vizsgálati készletet használtuk az apoptotikus és elhalt sejtek arányának meghatározására. 24-órás expozíció után, a fentiekhez hasonlóan meghatározva és a 10C. ábrán bemutattva, az IC<sub>50</sub>-értékek az NE-4C sejteken  $0,568 \pm 0,043\%$ ,  $0,00748 \pm 0,00012\%$  és  $0,00099 \pm 0,00002\%$  voltak a *GLY-IPA*, R, *POE-15*, illetve a Roundup Classic egyenértékekben. A *POE-15* esetében az apoptotikus és elhalt sejtek magas szintjét mutatták ki, amely 573-szoros és 7,5-szer magasabb, mint a *GLY-IPA* és a R esetében.

A Kaszpáz 3/7-vizsgálati készletben a Roundup Classic ekvivalens koncentrációban kifejezett IC<sub>50</sub>-értékek MC3T3-E1 sejtvonalon a következők voltak;  $0,6412 \pm 0,0339\%$ ,  $0,0073 \pm 0,0001\%$  és  $0,00649 \pm 0,00012\%$ , a *GLY-IPA*, R, *POE-15* esetében. Az apoptotikus és elhalt sejtek magas szintjét mutatták ki a *POE-15* esetében, 99-szeres és 1,1-szeres arányban magasabbat, mint a *GLY-IPA* és a R esetében, az áramlási citometriás kaszpáz 3/7 vizsgálati készlet segítségével. Az apoptózis értékelésére szolgáló két módszer, az annexin vizsgálati készlet és a kaszpáz 3/7 vizsgálati készlet eredményei között jelentős különbség mutatkozik. Ez azzal

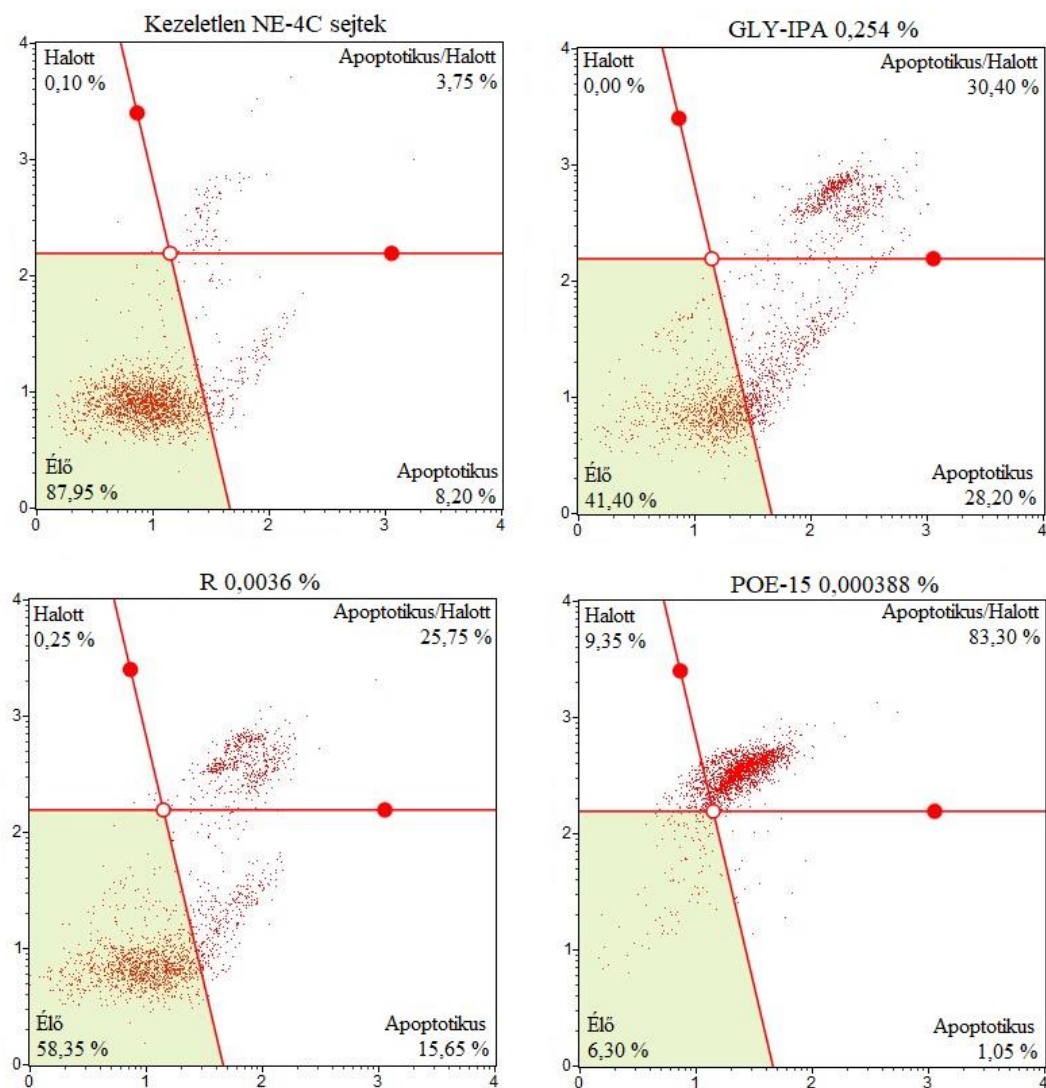
magyarázható, hogy az előbbi külön-külön mutatja az összes apoptotikus sejt szintjét az elhalt sejtekkel együtt, míg az utóbbi csak a kaszpázaktivált apoptotikus sejtek és az elhalt sejtek együttes szintjét jelzi.



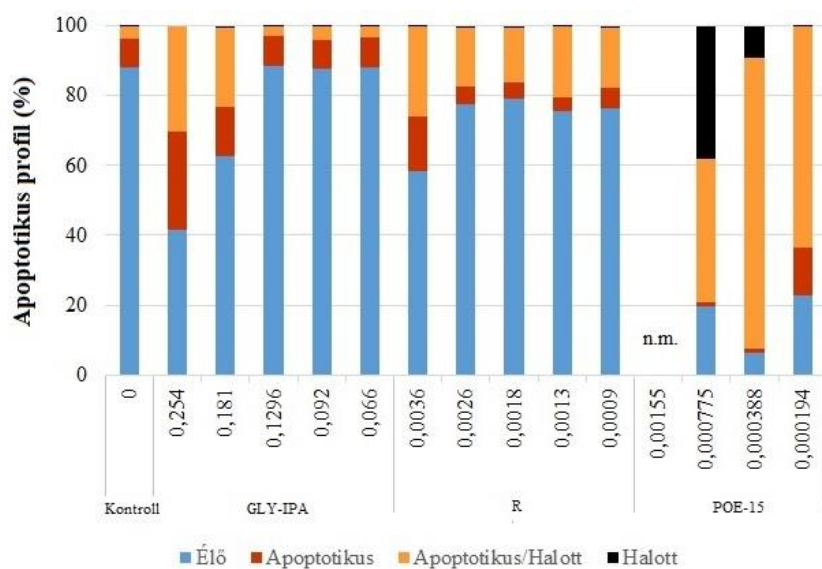
10. ábra Koncentrációfüggő hatások a sejtek apoptózisra 24-órás GLY-IPA (□), R (■) és POE-15 (●) expozíció után, meghatározva Muse™ Annexin V and Dead Cell Kit segítségével NE-4C (A) és MC3T3-E1 (B) sejteken, illetve Muse™ Caspase 3/7 Kit segítségével NE-4C (C) és MC3T3-E1 (D) sejteken. Az adatokat átlag  $\pm$  SD értékben tüntettük fel.

Méréseink során csak az apoptotikus sejtek teljes számát használtuk, mivel ez mutatja a késői apoptotikus és az elhalt sejtek arányát az Annexin V halott sejt vizsgálati készletben. A sejtek maximális apoptikus száma 60-70%-ot tudtam detektálni az NE-4C sejteknél (11.A, B, C ábra).

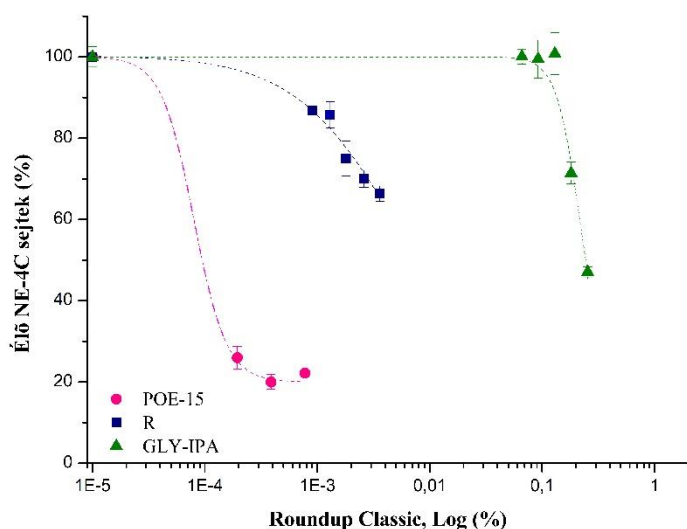
(A)



(B)



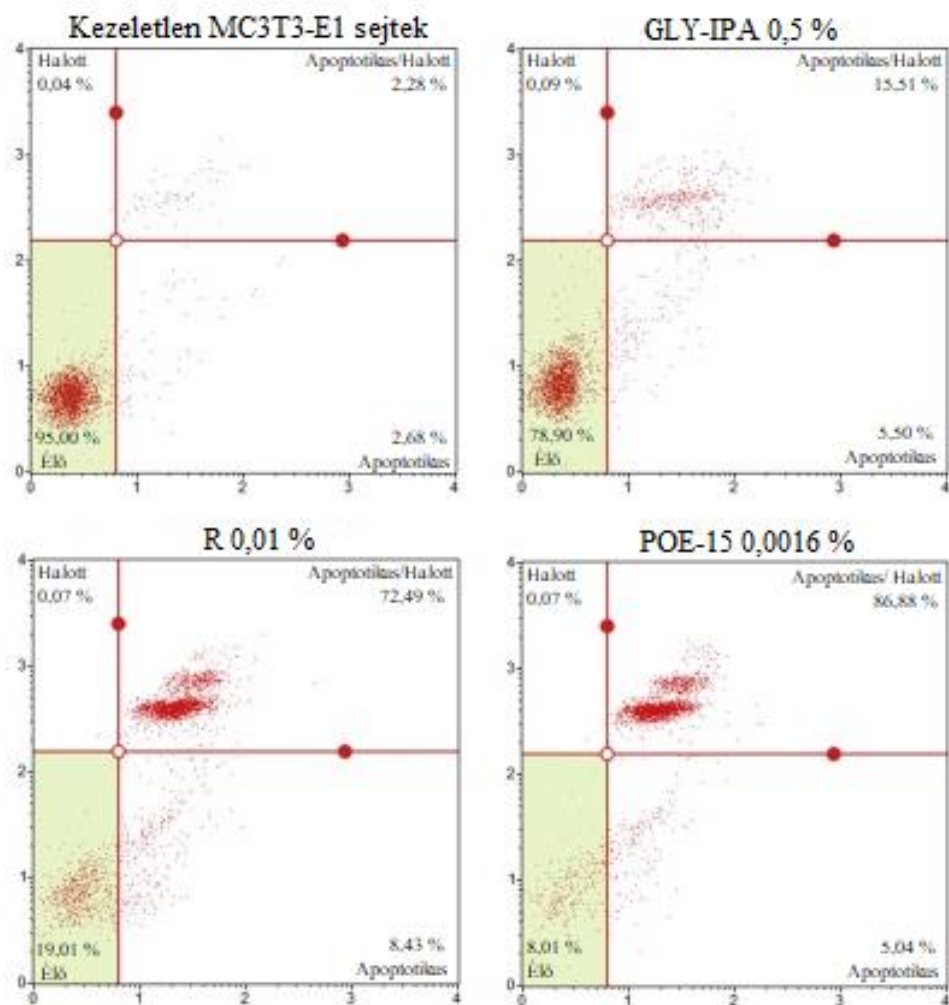
(C)



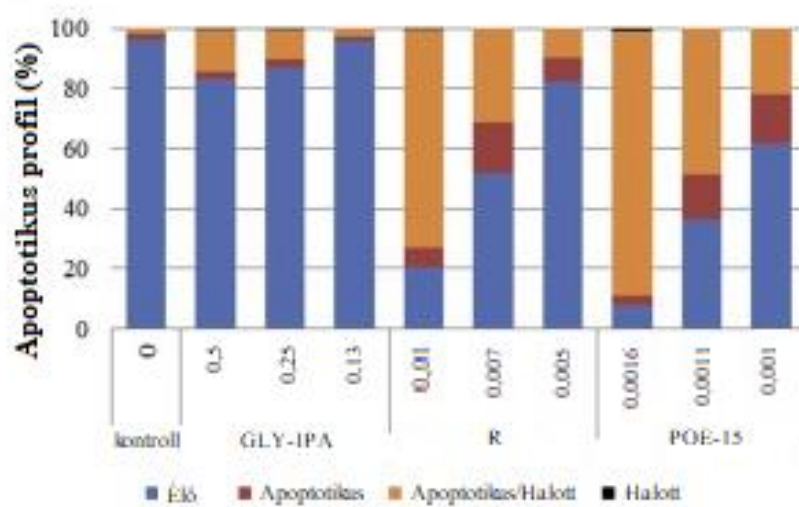
11. ábra. Az NE-4C sejtekben *GLY-IPA*, R és *POE-15* által indukált apoptózis. (A) Merck Muse áramlási citométert által generált pontdiagram, (B) kaszpáz 3/7 apoptózisprofil, a sejtek eloszlása az adott vizsgálati koncentrációk esetében és (C) dózis–válasz-görbék az élő sejtek arányában.

Az NE-4C sejteknél a *POE-15* expozíciónál körülbelül 2,15 nagyságrendnyi különbség, mint a *GLY-IPA*, és 2,5-szer magasabb, mint a R. Az MC3T3-E1 sejteknél magasabb apoptotikus szintet figyeltünk meg (80-100%). Az MC3T3-E1 sejtvonalon az apoptotikus és halott sejtek mértéke a *POE-15* esetében, ami körülbelül 2,5 nagyságrendnyi különbség, mint a *GLY-IPA*, és 7,5-szer magasabb, mint a R áramlási citometria kaszpáz 3/7 vizsgálati készlet segítségével. Hasonlóan emelkedett szinteket figyeltünk meg mindkét áramlási citometriás vizsgálatban az MC3T3-E1 sejtvonala esetében is (12. ábra A, B, C).

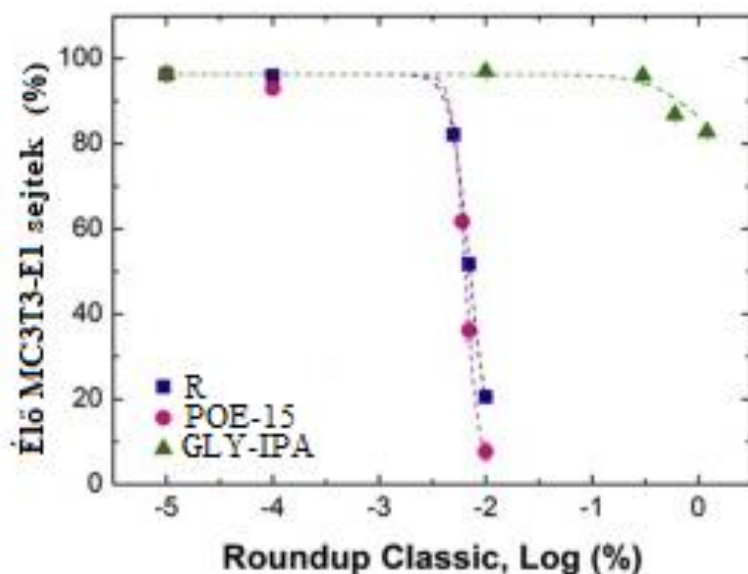
(A)



(B)



(C)



12. ábra. Az MC3T3-E1 sejtekben *GLY-IPA*, R és *POE-15* által indukált apoptózis. (A) Merck Muse áramlási citométert által generált pontdiagram, (B) kaszpáz 3/7 apoptózisprofil, a sejtek eloszlása az adott vizsgálati koncentrációk esetében és (C) dózis-válasz görbék az élő sejtek arányában.

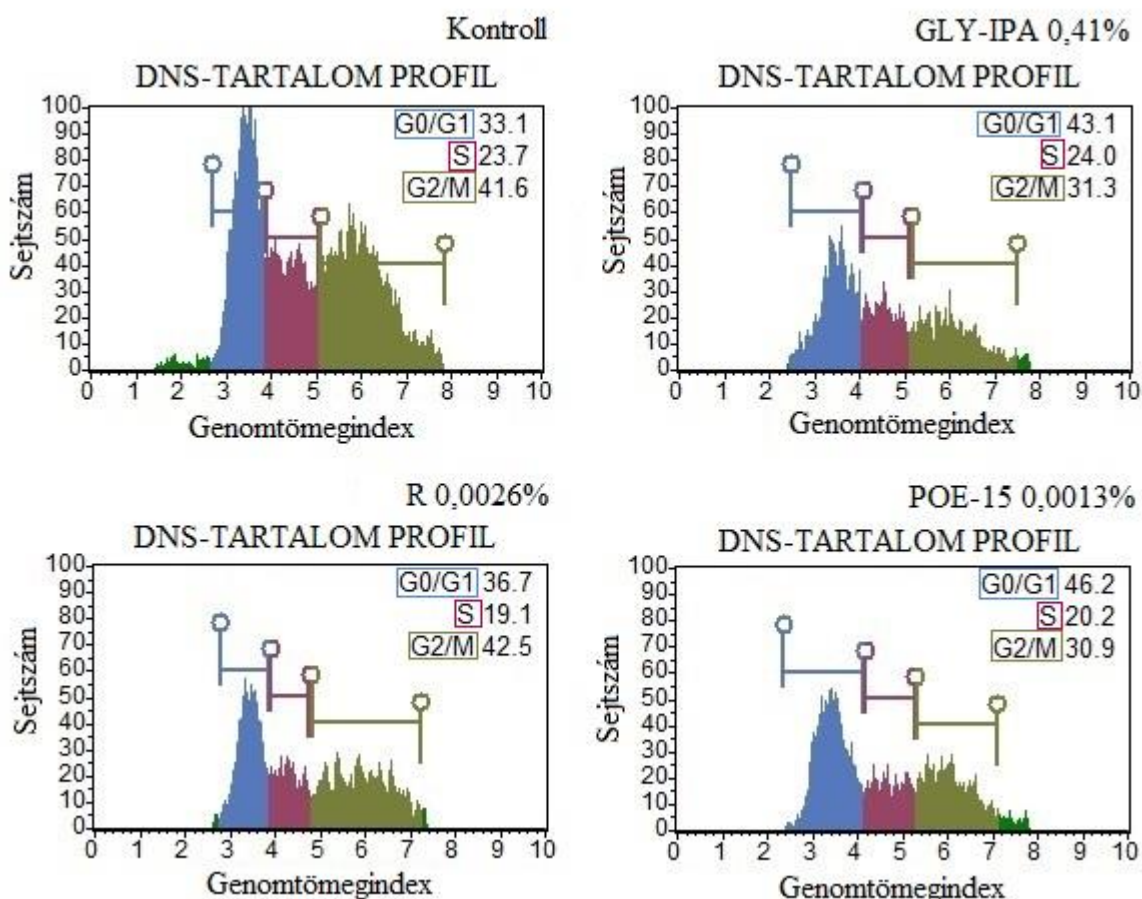
Az MC3T3-E1 sejvonál esetében a kaszpáz 3/7-aktivitást nem lehetett meghatározni adott koncentrációk felett (R esetében 0,01 % és *POE-15* 0,0016 %), mivel ezek a szintek már teljes sejthalált okoztak (12. ábra A, B, C). Ezzel szemben a *GLY-IPA* csak 17% csökkenést okozott a kaszpáz 3/7-aktivitásban 1,2%-os R-ekvivalens koncentrációban tartalmazó *GLY-IPA* mennyiségben. A sejtmorfológiai megfigyelések a R készítményben található *GLY-IPA* és *POE-15* között bizonyos szinergia fedezhető fel. Fontos hangsúlyozni, hogy R készítményt mezőgazdasági felhasználását illetően 1-2%-os hígításban használják, ami legalább 2 nagyságrenddel magasabb koncentráció, mint amiket a vizsgálatunkban használtunk.

#### 4.4. ÁRAMLÁSI CITOMETRIAI VIZSGÁLAT A SEJTCIKLUS ELEMZÉSÉHEZ

A sejtciklus-elemzést áramlási citometriás módszerrel végeztük PI-festést követően. A *Muse™ Cell Cycle Assay Kit* alkalmazásakor előre elkészített reagenssel dolgoztunk.

A sejtciklus szabályozása nagyon összetett rendszer, amely ciklinfüggő fehérjekinázokon alapul. A sejtciklus fázisai nem felcserélhetők, szigorú sorrendben követik egymást. A folyamat 3 ellenőrző pontján dől el, hogy a sejt az aktuális szakaszból át tud-e lépni a következőbe (MERRITT *et al.*, 1997). Az első ilyen ellenőrzési pont, az úgynevezett restrikciós pont, amely a DNS épségét ellenőrzi, a G<sub>1</sub>-fázis végén következik be. A második pont, a G<sub>2</sub> ellenőrző pont a G<sub>2</sub>-fázis végén jelenik meg, mely a DNS duplikációjának integritását biztosítja. Végül az M ellenőrző pont az osztódás metafázisában található, amely azt vizsgálja, hogy a kromoszómák síkba rendeződtek-e, és hogy a kromatidák szétválasztása pontosan zajlott-e le. A PI a sejtciklus különböző szakaszaiban lévő sejteket eltérő DNS-tartalmuk miatt másképpen festi meg, ezért lehetővé teszi a fázisok közötti megkülönböztetést. A DNS-festés specificitását az RNS jelenléte felerősíti. Az NE-4C és az MC3T3-E1 sejteket 24 órán keresztül kezeltük GLY-IPA, R és POE-15 megfelelő koncentrációival, majd áramlási citométerrel elemeztük a Muse™ sejtciklus-vizsgálati készlet segítségével.

A negatív kontrollban a NE-4C sejtvonal DNS-károsodását figyeltük meg, mivel ezekből a sejtekből hiányzik a p53 tumorsupresszor gén, emiatt nem képesek a véletlen mutációk javítására (JÁDY *et al.*, 2016). A sejtciklus-elemzéshez a kezelési koncentrációkat a genotoxicitási vizsgálatok eredményei alapján választottuk ki, hogy elkerüljük a túlzott genotoxicitásból eredő sejtciklus-változásokat. Ennek ellenére az NE-4C sejtek 24-órás expozíciója 0,82% Roundup Classic-ekvivalens GLY-IPA-val és a 0,0026% R ekvivalens POE-15-tel végzett kezelések során nyilvánvaló toxicitás lépett fel, ami miatt a sejtciklus meghatározása ebben a két esetben nem volt megfelelő. A 13. ábra a sejtek különböző fázisokban való eloszlását mutatja a sejtszám és a genomtömegindex függvényében. Az eukarióta sejtvonalak diploidok, és az eukarióta sejtek teljes genomtömege körülbelül 7 pg. Ezért a 13. ábrán a DNS-tartalomindexeket a 0-7 pg tartományban ábrázoltuk.

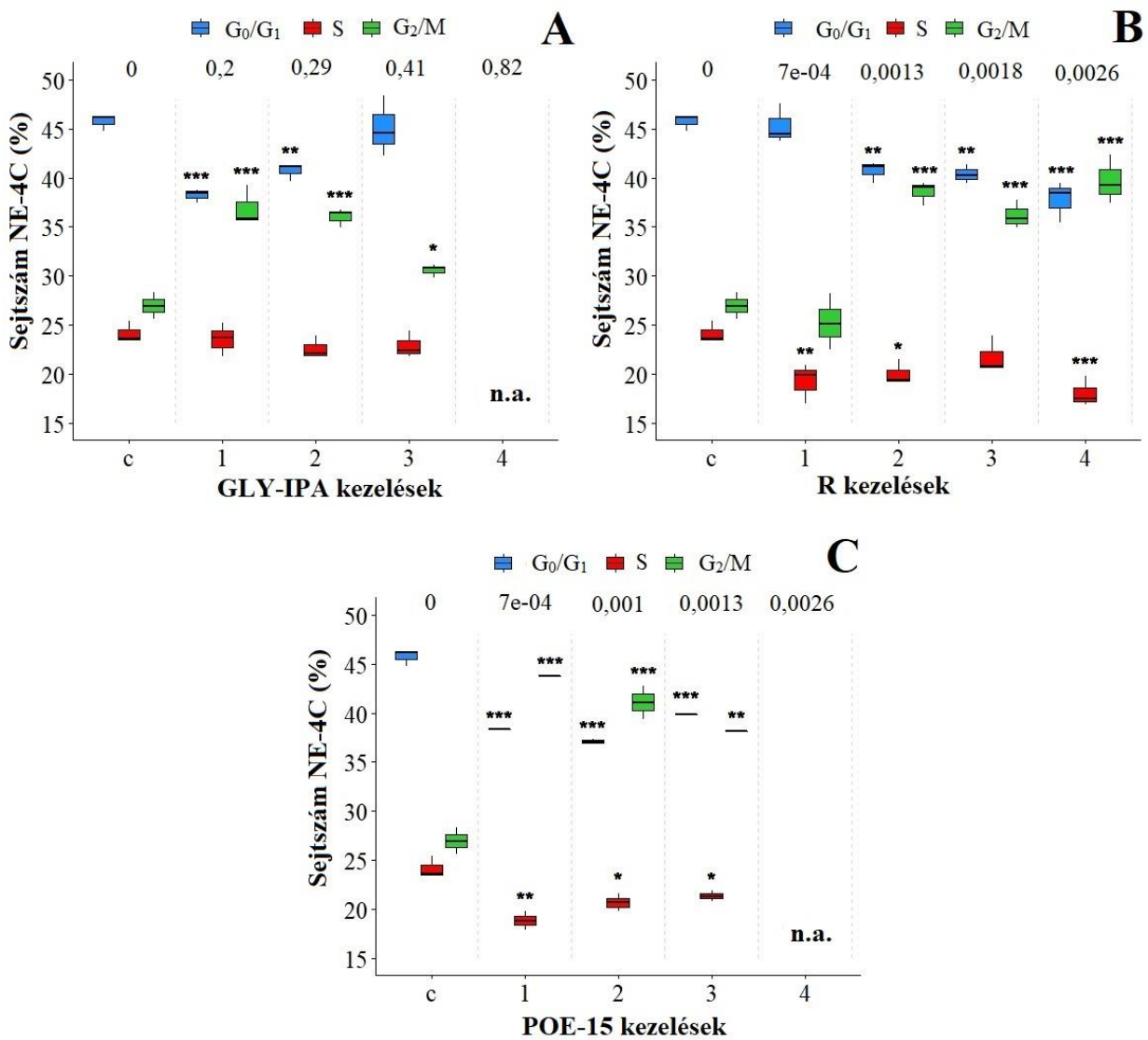


13. ábra Koncentrációfüggő hatások az NE-4C sejtek sejtciklusára 24-órás *GLY-IPA*-, *R*- és *POE-15*-expozió után, a *Muse™ Cell Cycle* vizsgálati készlet segítségével meghatározva. Fent: kontroll kezelés 24 óra elteltével, *GLY-IPA* (0,41% Roundup Classic egyenértékű) 24 óra elteltével. Lent: Roundup (0,0026%) 24 óra után, *POE-15* (0,013% Roundup Classic egyenértékű) 24 óra után.

24 óra elteltével a NE-4C sejtek negatív (kezeletlen) kontrollja azt mutatja, hogy a sejtek ~46% a G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-fázisban van (13. ábra). Úgy tűnik, hogy ezeknek a sejteknek az aránya csökken a *GLY-IPA*-, *R*- és *POE-15*-kezelés hatására (14. ábra). Ez a csökkenés monoton dózisfüggést mutat a *R* és a *POE-15* esetében a 0,0007-0,0026% Roundup Classic egyenértéktartományban, míg a *GLY-IPA* hatása érdekes módon a legalacsonyabb alkalmazott koncentrációnál (0,2% Roundup Classic egyenérték) a legerősebb, és magasabb koncentrációknál (0,29-0,41% Roundup Classic ekvivalens) fokozatosan közelít a kontrollszinthez. Az S-fázisban lévő sejtek arányát nem befolyásolja a *GLY-IPA*-kitettség (0,2-0,41% Roundup Classic ekvivalens), de csökkenti a kezelés a *R* vagy *POE-15* anyagokkal (0,0007-0,0026% Roundup Classic ekvivalens). Ezzel szemben a G<sub>2</sub>/M-fázisban lévő sejtek aránya a kezelések hatására nőtt, a *R* és a *POE-15* esetében koncentrációfüggő módon, de a *GLY-IPA*-val való expozió esetén a legalacsonyabb

koncentrációnál (0,2% Roundup Classic ekvivalens) volt a legnagyobb növekedés, és a magasabb koncentrációknál (0,29-0,41% Roundup Classic ekvivalens) fokozatosan csökkent (14. ábra). Az NE-4C sejtek a  $G_0/G_1$ -fázisban próbálnak növekedni, amíg a körülmények optimálisak nem lesznek a megkettőződéshez és a későbbi mitózishoz.

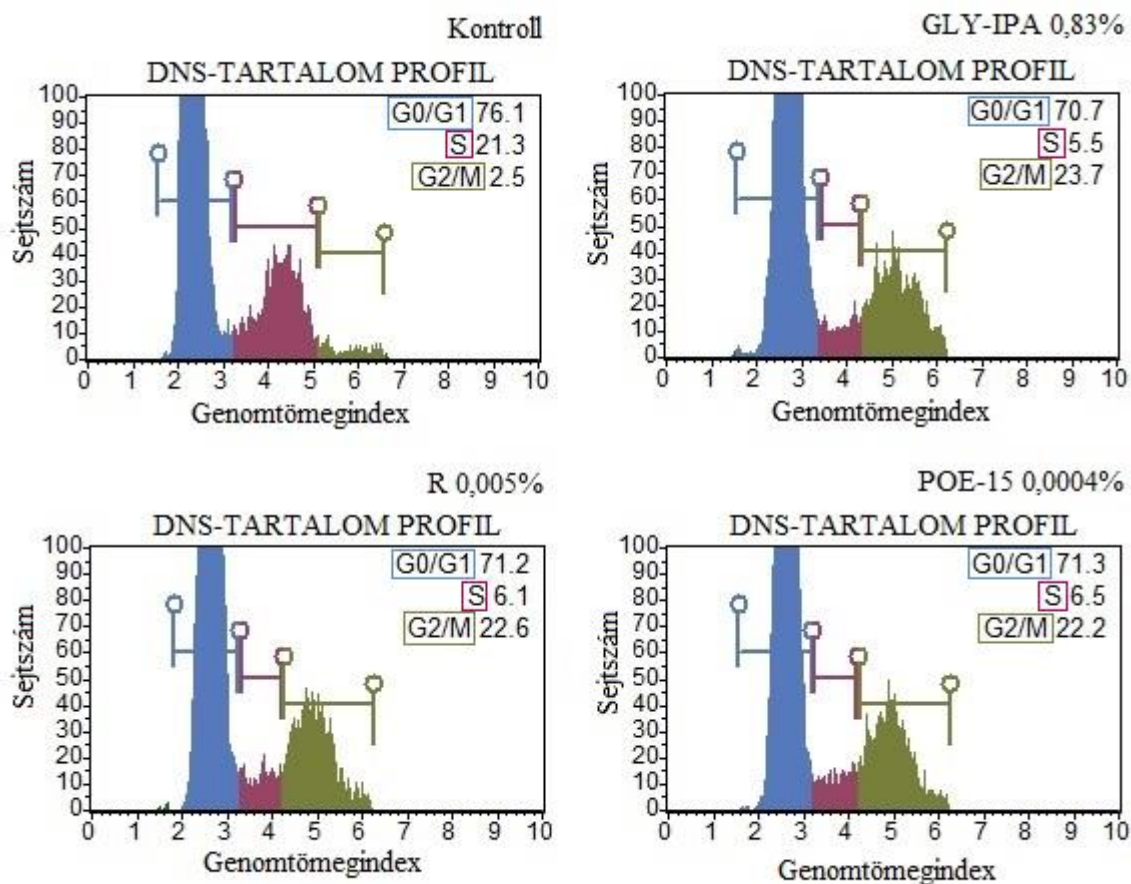
Ezért a *GLY-IPA* esetében a sejtek aránya (%) a dózis növekedésével nő: a sejtek nem érzékelnek optimális állapotot (mivel ez nem valósul meg), így a  $G_0/G_1$ -fázisban leállítják a sejtciklust, és  $G_0$ -fázisban maradnak. A sejtciklusban csak kevés sejt jut át az ellenőrző ponton az S-fázisba, majd később a  $G_2/M$ -fázisba, amit a 14. ábra is mutat, tekintve, hogy a sejtek aránya ezekben a fázisokban alacsonyabb, mint a kontrollban.



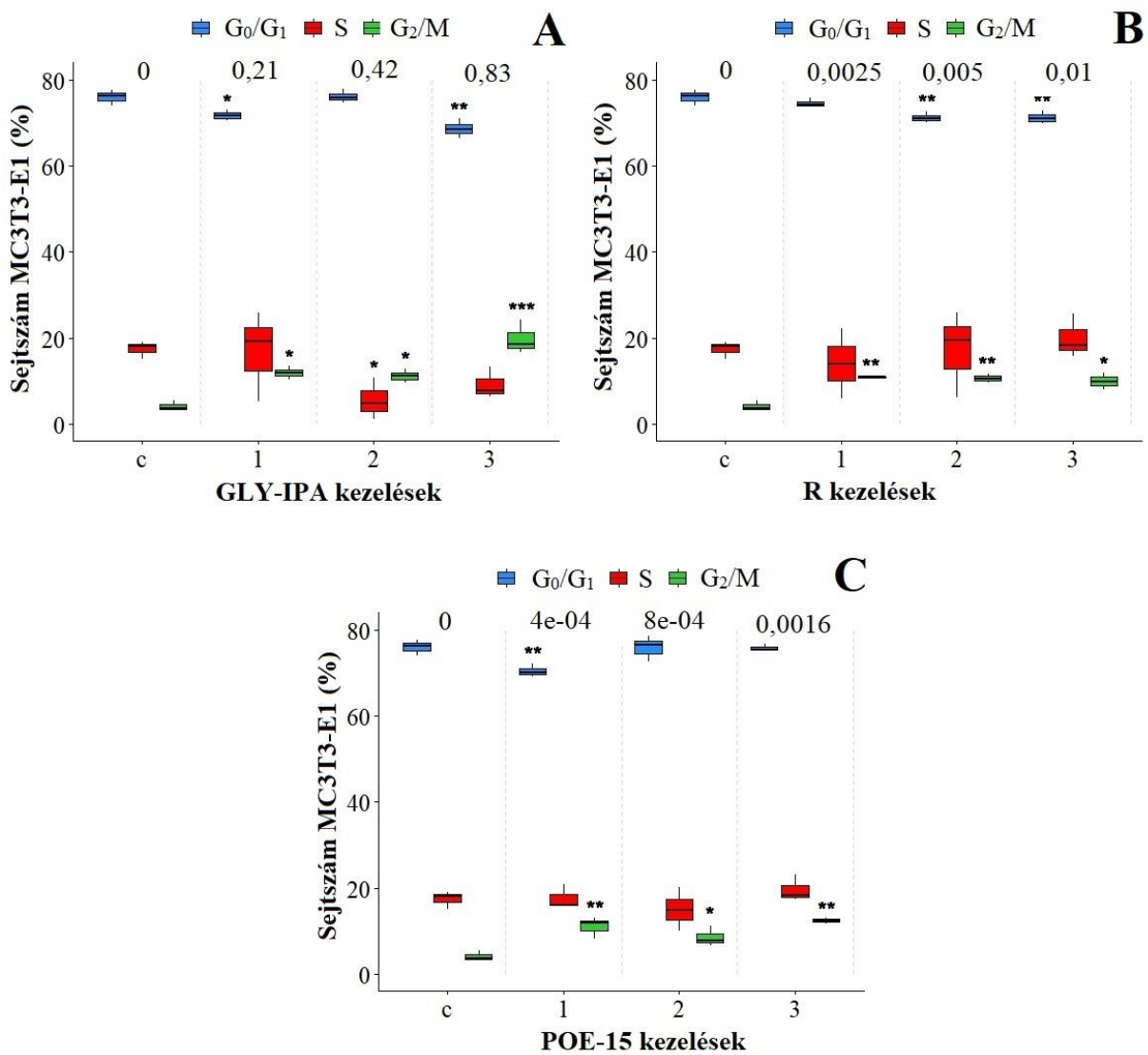
14. ábra Koncentrációfüggő hatások az NE-4C sejtek sejtciklusára 24-órás *GLY-IPA* (A), *R* (B) és *POE-15* (C) expozíció után, *Muse™ Cell Cycle Assay kit* segítségével meghatározva. Kontroll kezelés (c), *GLY-IPA* (0,2-0,82% Roundup Classic ekvivalens konc.[1,2,3,4]), *R* (0,0007-0,0026%[1,2,3,4]), *POE-15* (0,0007-0,013% Roundup Classic ekvivalens koncentráció [1,2,3,4]), az adatokat átlag ± SD értékkel feltüntetve. A statisztikai elemzéseket az R statisztikai program v.4.0.0. (R Development Core Team, 2020) alkalmazásával végeztem. A csillagok a kontrolltól való szignifikáns különbségek szintjeit jelzik (\*:p < 0,05, \*\*:p < 0,01, \*\*\*:p < 0,001). n.a. a túlzott sejtpusztulás miatt nem mérhető adatokat jelzi.

A negatív (kezeletlen) kontroll MC3T3-E1 sejtek 24 óra elteltével még magasabb (~80%) sejttszámot mutatott G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-fázisban, mint az NE-4C sejtek esetében (15. ábra). A nyugalmi (G<sub>0</sub>) és a G<sub>1</sub>-fázisban lévő sejtek ilyen magas relatív aránya az MC3T3-E1 sejtek egyedi jellemzője (HUANG *et al.*, 2019, LI *et al.*, 2012, LIU *et al.*, 2018). Ez az arány (G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>) szinte minden esetben következetesen csökken *R* (0,0025-0,01%) és *POE-15* (0,0004-0,0016% Roundup Classic

ekvivalens koncentrációjánál) hatására (16. ábra). Ezzel szemben az S-fázisban lévő sejtek arányát a kezelések láthatóan nem befolyásolják, míg a G<sub>2</sub>/M-fázisban lévő sejtek aránya következetesen növekszik 24-órás expozíció után.



15. ábra. Koncentrációfüggő hatások az MC3T3-E1 sejt vonal sejt ciklusára 24-órás GLY-IPA-, R- és POE-15-expozíciót követően, a Muse™ Cell Cycle Assay vizsgálati készlet segítségével meghatározva. Fent: kontroll kezelés, GLY-IPA (0,83%-os Roundup Classic ekvivalens koncentráció). Lent: R (0,005%), POE-15 (0,0004% Roundup Classic ekvivalens koncentráció).



16. ábra. Koncentrációfüggő hatások az MC3T3-E1 sejtvonal sejtciklusára 24-órás *GLY-IPA* (A), *R* (B) és *POE-15* (C) expozíciót követően, *Muse™ Cell Cycle Assay kit* segítségével meghatározva. Kontroll kezelés, *GLY-IPA* (0,21-0,83% Roundup Classic ekvivalens koncentráció.[1,2,3,4]), *R* (0,0025-0,001%, [1,2,3,4]), *POE-15* (0,0004-0,0016% Roundup Classic ekvivalens koncentráció.[1,2,3,4]), az adatokat átlag  $\pm$  SD értékekkel feltüntetve. A statisztikai elemzéseket az R statisztikai program v.4.0.0. (R Development Core Team, 2020) alkalmazásával végeztem. A csillagok a kontrolltól való szignifikáns különbségek szintjeit jelzik (\*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

#### 4.5. A GLY GENOTOXICITÁSÁNAK ÉRTÉKELÉSE A GYAKORI GENOTOXIKUS ÉLELMISZER-SZENNYEZŐ ANYAGOKKAL SZEMBEN

A GLY és az élelmiszeripari adalékanyagok, illetve élelmiszer-szennyezőként ismert genotoxikus anyagok közötti kapcsolat új megközelítésben mutatja be a felhalmozódott szermaradékokat, különösen az élelmiszerbiztonság és a közegészség szempontjából. Bár a GLY elsősorban gyomirtó szerként használják, jelenléte a mezőgazdasági termékekben és élelmiszerekben aggodalomra adhat okot, mivel a maradványai potenciálisan bekerülhetnek az élelmiszerláncba. Mohammadi és munkatársai kifejlesztettek egy módszert, hogy az élelmiszerekben található GLY szermaradékokat bioszenzor segítségével ki tudják mutatni. Ez a bioszenzor kiemelkedő hatékonysággal képes a GLY kimutatására élelmiszer- és vízmintákban, ami hozzájárulhat az egészségesebb és jobb minőségű mezőgazdasági termékek előállításához és forgalmazásához. Ez a megközelítés hozzájárul az emberi egészség védelméhez azáltal, hogy csökkenti a potenciálisan káros anyagok jelenlétét az élelmiszerekben és vízforrásokban. (MOHAMMADI *et al.*, 2024).

Mind a GLY, mind számos élelmiszer-adalékanyag vagy élelmiszer-szennyező anyag (például akrilamid, benzoésav és citromsav) genotoxikus hatásokkal bírnak, amelyek közé tartozik a DNS károsodása és a kromoszómaaberráció. A genotoxikus anyagok által kiváltott DNS-károsodás hozzájárulhat a sejtek rosszindulatú átalakulásához, így ezek az anyagok potenciális rákkeltők lehetnek. Tudományos vizsgálatok kimutatták, hogy a GLY okozhat DNS-szálltöréseket, amelyeket különféle sejtvonalakon, például HepG2, GM38 és HT1080 sejtvonalakon mutattak ki. Mladinic és munkatársai 4-órás comet-tesztet végeztek S9 májhomogenizátum hozzáadásával, és az eredmények szerint magasabb koncentrációnál (580 µg/ml) szignifikánsan megnőtt a DNS-károsodás mértéke, míg S9 jelenlétében ez a növekedés minden vizsgált koncentrációnál kimutatható volt (MLADINIC *et al.*, 2009). Monroy és munkatársai vizsgálták a GLY citotoxikus és genotoxikus hatásait normál humán GM38 sejtekben és humán fibroszarkóma HT1080 sejtekben. Genotoxikus hatásokat 4,0–6,5 mM (GM38) és 4,75–5,75 mM (HT1080) GLY-koncentrációnál mutattak ki (MONROY *et al.*, 2005). Az ilyen típusú károsodások hosszú távon növelhetik a rák kockázatát. Az akrilamid, amely a magas hőmérsékleten feldolgozott élelmiszerekben (pl. sült krumpli, kenyér) keletkezik, genotoxikus és rákkeltő hatással bír. A comet-tesztek alapján az akrilamidról megállapították, hogy jelentős DNS-károsodást okoz, ezért IARC 2A (emberre valószínűleg rákkeltő) kategóriába sorolta (NABIH *et al.*, 2021). A benzoésav, mint élelmiszer-tartósítószer, genotoxikus hatásokat mutat, bár ezek mértéke alacsonyabb, mint az akrilamidé vagy GLY-é, de érzékeny sejtvonalakon, még mindig kimutatható.

Az MRL a mezőgazdasági vegyi anyagok, például a *GLY*, illetve az élelmiszer-adalékanyagok megengedett maradékszintjét jelzi az élelmiszerekben. Az olyan anyagok esetében, mint a *GLY*, szigorú szabályozás vonatkozik az MRL-re, hogy a fogyasztók biztonságban legyenek a lehetséges toxikus hatásoktól. Az EU-ban és más országokban meghatározott MRL-szintek biztosítják, hogy a mezőgazdasági termékekben található *GLY*-maradványok a megengedett határokon belül maradjanak. Ugyanakkor a *GLY* genotoxikus potenciálját többek között a WHO és az IARC is vizsgálta, és 2A kategóriájú rákkeltőnek sorolta be, ami „valószínűleg rákkeltő hatású az emberre”. A legtöbb élelmiszer-adalékanyagra, mint például a citromsavra, nincsen MRL érték, mivel ezek biztonságosnak minősülnek a megengedett fogyasztási szinteken belül. Azonban egyes adalékanyagokról, például a benzoesavról bebizonyosodott, hogy genotoxikus hatású lehet.

A *GLY* elsősorban mezőgazdasági növényekről kerülhet az élelmiszerekbe, míg az adalékanyagok, mint például a benzoesav és a citromsav, közvetlenül az élelmiszer-feldolgozás során kerülnek az élelmiszerekbe. A humán expozíció szintje befolyásolja a kockázat mértékét. Bár a *GLY* jelenléte az élelmiszerben alacsony szinten is kérdéseket vet fel a hosszú távú egészségügyi hatásokkal kapcsolatban (BOU-MITRI *et al.*, 2025), az adalékanyagokat és szennyező anyagokat szigorú szabályozás alatt tartják, hogy minimalizálják a kockázatokat.

Az előző alfejezet toxicitási eredményeiből is látható, a *POE-15* formázóanyag minden elvégzett toxicitási vizsgálatban toxikusabbnak bizonyult, mint a *GLY-IPA* önmagában. Minden egyes vizsgálatban a legalacsonyabb toxikus hatás *GLY-IPA*-nak, a legmagasabb pedig a *POE-15*-nek tulajdonítható. Érdekes módon azonban a *GLY-IPA* és a *POE-15* közötti toxicitás aránya az MC3T3-E1 sejtvonalon végzett genotoxicitási vizsgálatokban volt a legalacsonyabb: itt a *POE-15* „csak” 13-szor és 73-szor toxikusabbnak bizonyult a *GLY-IPA*-nál. E megállapítás jelentőségének értékeléséhez ezeket a genotoxicitási értékeket (a comet-teszttel és a Muse™ DNS-károsító vizsgálati készlet segítségével meghatározva) összehasonlítottam az élelmiszeriparban adalékanyagként használt és élelmiszer-szennyezőként bejelentett ismert genotoxikus anyagok megfelelő értékeivel. A genotoxicitás értékeléséhez az összehasonlítások alapjául a genotoxicitásra általánosan alkalmazott LGD-értéket (KAWAGUCHI *et al.*, 2010) használtam. A jelen vizsgálatban a comet-tesztben a *GLY-IPA* meghatározott LGD-értéke az NE-4C sejtvonal esetében 3,2-szer alacsonyabbak volt, mint az MC3T3-E1 sejtvonal esetében. Ez azt jelzi, hogy az NE-4C sejtvonal a genotoxikus hatások tekintetében érzékenyebb a *GLY-IPA* hatóanyagra, mint az MC3T3-E1 sejtek (hasonlóan a többi alkalmazott vizsgálati típushoz). Az ebben a vizsgálatban eredményül kapott genotoxicitási értékeket és a tudományos szakirodalomban közölt genotoxicitási értékeket a Mellékletben található 3. táblázat tartalmazza.

A *GLY*-ről szóló IARC-monográfia tartalmazza az összes releváns a DNS-károsodásra, valamint a sejtproliferációra és az apoptózisra gyakorolt hatásokra vonatkozó toxikológiai tanulmányokat. A *GLY* által kiváltott DNS-változásokat a tudományos szakirodalomban különböző sejtvonalakon kimutatták, pl. a DNS-szálszakadások humán epiteliális HepG2 sejtekben és indukált kromoszómaaberrációk a limfocitákban (MLADINIC *et al.*, 2009, MANAS *et al.*, 2009b). valamint a GM38 fibroblasztokban. Genotoxicitási vizsgálatunk (comet-teszt) azt mutatja, hogy a *GLY* genotoxikusabbnak tűnik az NE-4C sejtekre, mint a bórsav, és csak valamivel kevésbé genotoxikusabb az akrilamidnál HepG2 sejteken. A benzoésav élelmiszerekben, például gyümölcslevekben, lekvárokból és savanyúságokban általánosan elterjedt tartósítószer, az NE-4C sejtekre háromszor olyan genotoxikus, míg az MC3T3-E1 sejtekre valamivel kevésbé genotoxikus, mint a *GLY*. Úgy tűnik, hogy a *GLY* hasonló genotoxicitással rendelkezik az NE-4C sejtekre, mint a citromsav az HSP sejtvonalra. Ugyanakkor igaz, hogy a *GLY* utóbbi besorolása nem kizárólag az általunk is alkalmazott genotoxicitási teszteken alapul. Például az akrilamidot, amelyet 4,5- és 1,5-ször genotoxikusabbnak találtak, mint mi a *GLY*-ot az NE-4C és az MC3T3-E1 sejtvonalakon, az IARC szintén a 2A rákkeltő kategóriába sorolta.

A *GLY* és az élelmiszer-adalékanyagok közötti kapcsolat rávilágít arra, hogy a mezőgazdasági vegyszerek és élelmiszer-adalékanyagok maradványainak jelenléte az élelmiszerekben milyen potenciális egészségügyi kockázatokat jelenthet. Az ilyen anyagok genotoxikus hatásai hosszú távon hozzájárulhatnak a rák kockázatának növekedéséhez, és ezért fontos a szigorú szabályozás és a folyamatos kutatás ezekre vonatkozóan. Az expozíció minimalizálása érdekében mind a mezőgazdasági gyakorlatokat, mind az élelmiszer-feldolgozási folyamatokat optimalizálni kell, hogy a fogyasztók egészségét megóvják.

#### 4.6. A KIMUTATOTT CITO- ÉS GENOTOXIKUS, ILLETVE SEJTCIKLUS-BEFOLYÁSOLÓ HATÁSOK ÁLTALÁNOS ÖKOTOXIKOLÓGIAI KÖVETKEZMÉNYEI

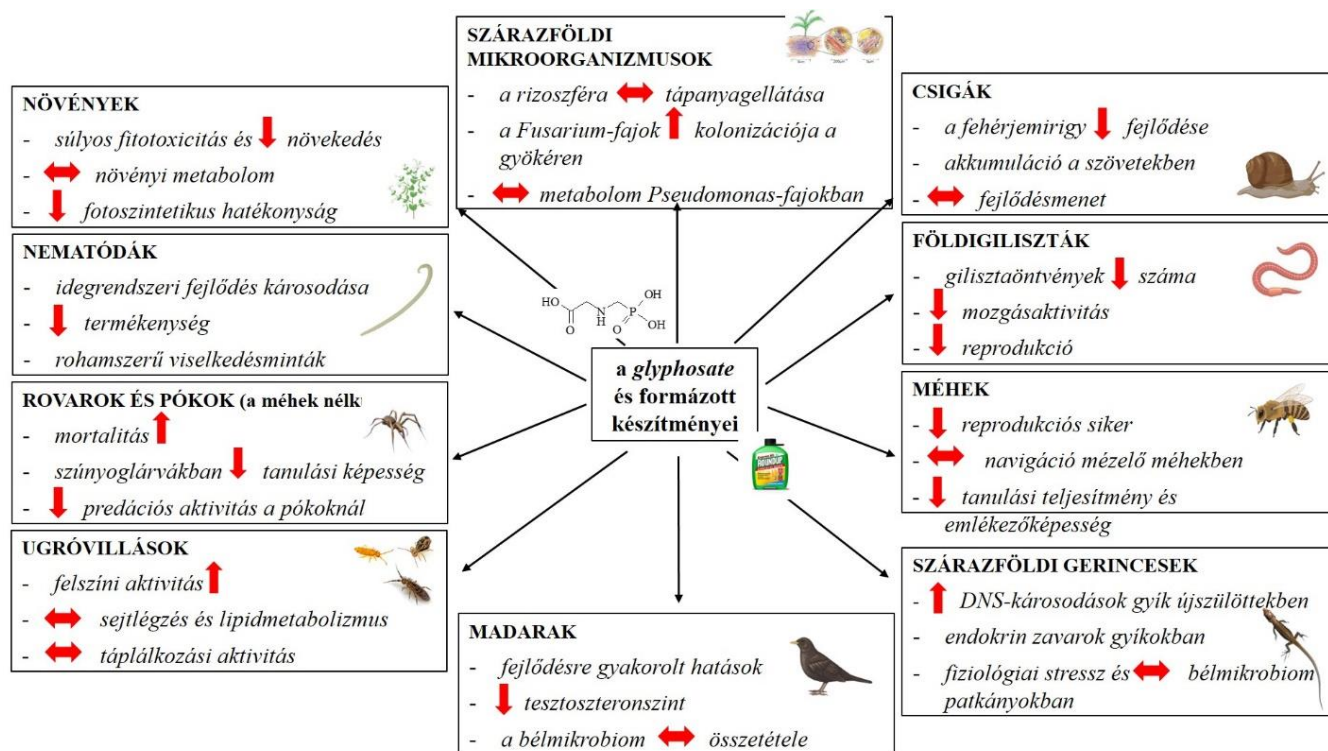
Az ökotoxikológiai vizsgálatok gyakorta elsősorban a hatóanyagokra összpontosítanak, miközben az élő szervezetek valós körülmények között összetett növényvédőszerkészítményeknek vannak kitéve. A nem célszervezetekre gyakorolt hatások széleskörűek, ami ellentétben áll azzal a feltételezéssel, hogy a gyomirtó szerek specifikusak és csak a célnövényekre hatnak. Mind a *GLY*, mind a *GBH*-k nem szándékolt mellékhatásokkal járnak számos szárazföldi és vízi fajokra, ilyenek a nem célzott növények, mikroorganizmusok, rovarok, pókok, földigiliszták, különböző vízi gerinctelenek és nem utolsósorban a gerincesek. E negatív hatások; főként az oxidatív stressz, egészségi és egészségkárosító hatású folyamatok megváltozásáról számoltak be, ahol a genotoxikus és citotoxikus hatás is fellelhető. Az esetek túlnyomó

többségében a *GBH*-k toxicitása meghaladja – esetenként messze meghaladja – a *GLY* toxicitását, ami azt bizonyítja, hogy az inertnek tartott segédanyagok vagy önmagukban is mérgezőek, vagy kölcsönhatásba lépnek egymással, és fokozhatják az aktív hatóanyag toxicitását. A célzott gyomokon túl akár szántóföldi növényeket is érinthet a *GLY*-szennyezés. A *GLY* fitotoxikus hatást fejt ki a szántóföldi növényekre (köztük a *Capsicum*-fajokra is), tehát kelés után (posztemergens módon) nem lehet kijuttatni, csak kelés előtt (preemergens módon). A gyökérkolonizáció miatt a talajgombák által fitotoxikus hatás figyelhető meg a sikimisavszint nyomonkövetésével, ahol a *Capsicum annuum* (közönséges paprika) bioindikátorként viselkedik: bebizonyosodott, hogy a *GLY* jelenléte – a rizoszférán keresztüli felvétele nyomán – paprikanövényből kimutatható (RONCO *et al.*, 2008). A *GLY* mikorrhizagombákra gyakorolt hatásán keresztül akár a teljes talajökoszisztémát képes befolyásolni. (KLÁTYIK *et al.*, 2017).

A 2010 és 2023-2025 között gyűjtött adatok alapján Klátyik és munkatársai összefoglalták a *GLY*, készítményei és formulációi szárazföldi- és vízi ökoszisztémákra, valamint a környezet- és emberi egészségre gyakorolt hatásait (KLÁTYIK *et al.*, 2023, KLÁTYIK *et al.*, 2024, KLÁTYIK *et al.*, 2025). A *GLY* csökkentheti a talajban élő gombák és baktériumok sokféleségét és populációját, ami hosszú távon talajdegradációhoz vezethet. Ezen kívül a formázószerek, amelyeket gyakran nem vizsgálnak olyan szigorúan, mint a fő hatóanyagokat, szintén komoly kockázatot jelentenek. Ezek az anyagok toxikusabbak lehetnek a *GLY*-nál. A beporzó rovarok, a méhek, különösen érzékenyek a *GLY* és formázószerek együttes hatására, ami hozzájárulhat a globális beporzási válsághoz. A *GLY* hatása az élőlényekre nem mindig azonnal nyilvánvaló, és hosszabb távú hatások is előfordulhatnak, mint például a szubletális hatások, amelyek befolyásolhatják az állatok szaporodási képességeit (KLÁTYIK *et al.*, 2023). A vízi ökoszisztémákra gyakorolt toxikus hatást fejthetnek ki a halakra, kétéltűekre, rákokra és algákra, amelyek kulcsfontosságúak a vízi táplálékláncban. Különösen aggasztó, hogy a *GLY* alacsony koncentrációban is hormonális zavarokat okozhat a halakban, ami befolyásolja azok növekedését és szaporodási képességeit. Azt is kimutattuk, hogy a *GLY*-készítményei még toxikusabbak lehetnek, mint maga a hatóanyag, főleg a szufaktánsok jelenléte miatt. Hangsúlyoztuk, hogy a formázó szerek nem megfelelő szabályozása komoly veszélyt jelenthet a vízi ökoszisztémákra, mivel ezek az anyagok jelentősen növelhetik a *GLY* környezeti perzisztenciáját és bioakkumulációs potenciálját (KLÁTYIK *et al.*, 2024, TAJNAIOVÁ *et al.*, 2020). Mindkét tanulmányban egyértelműen jelezzük, hogy a *GLY* széles körű használata és a formázó szerek toxikológiai profiljának hiányos értékelése jelentős ökológiai kockázatot jelent.

Áttekintésünkben nemcsak az ökototoxicitás és az ökotoxicitási tényezők bemutatásával foglalkozunk, hanem összefoglaltuk a *GLY* és a *GBH*-k szárazföldi, biológiai és ökológiai

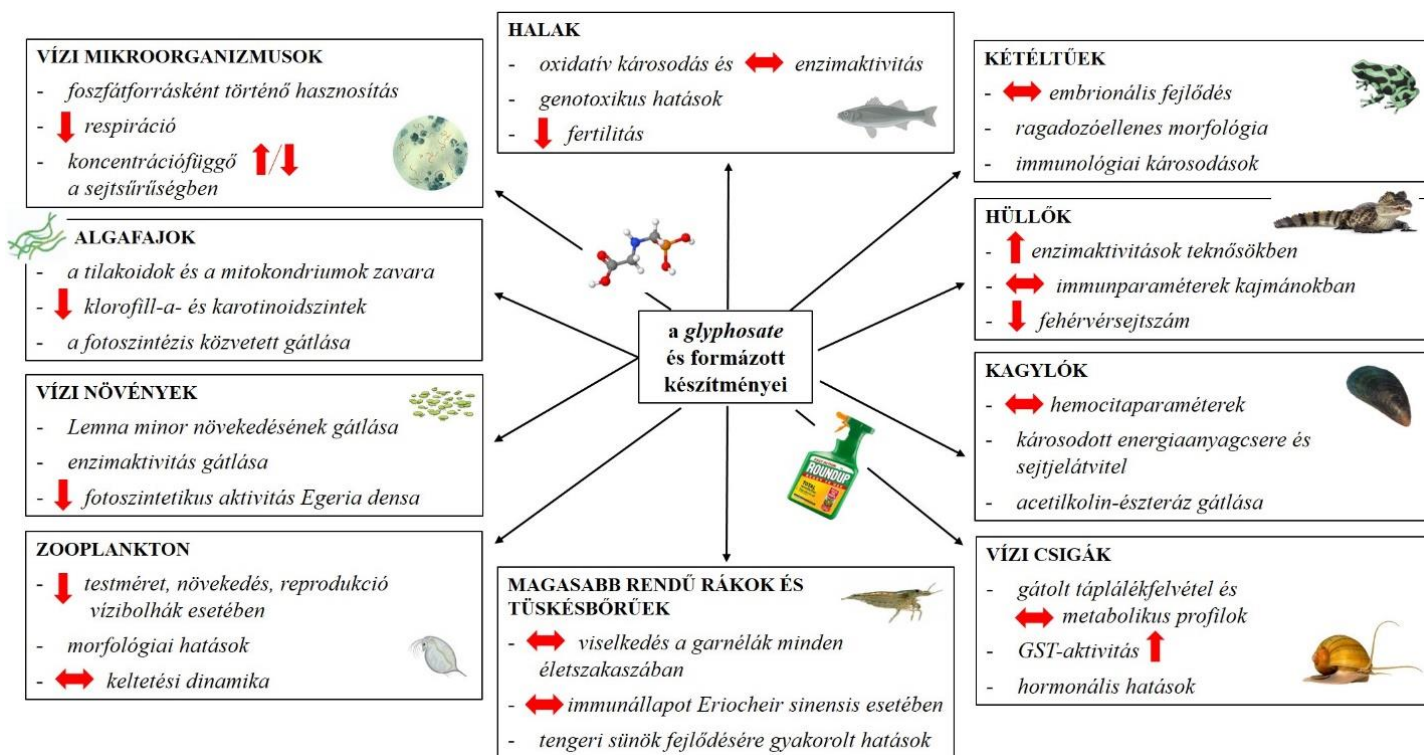
ökoszisztémákra, valamint a nem célszervezetekre gyakorolt hatását is, különös tekintettel olyan specifikus indikátorfajokra, mint a méhek és a madarak (17. ábra).



17 ábra. A GLY hatóanyagú gyomirtószer és kereskedelmi készítményeinek főbb ökotoxikológiai hatásai talajlakó nem célszervezetekre. (Piros nyilak mutatják felfelé: növekedés; lefelé: csökkenés; kétirányú: változás).(KLÁTYIK *et al.*, 2023).

Ide tartozik a GLY és a GBH-k más kémiai vegyületekkel, hatóanyagokkal, segédanyagokkal, nehézfémekkel, mikroműanyagokkal vagy kórokozókkal való kombinált hatásának bemutatása is. A GLY különböző talajszervezetekre gyakorolt hatásáról rendelkezésre álló adatok vegyesek, és a talajra gyakorolt hatásuk összetett, az eredmények néha ellentmondásosak. Ez a megfigyelt hatásokat befolyásoló számos tényezőnek köszönhető. A legfontosabb tényezők, amelyek befolyásolják a környezeti sorsot (pl. mobilitás, kioldódás), a biológiai hozzáférhetőséget, valamint a talaj nem célszervezeteire gyakorolt hatásokat, a talaj jellemzői, például a víztartalom és a különböző talajok összetétele, ideértve a mikrobiális közösségeket is.

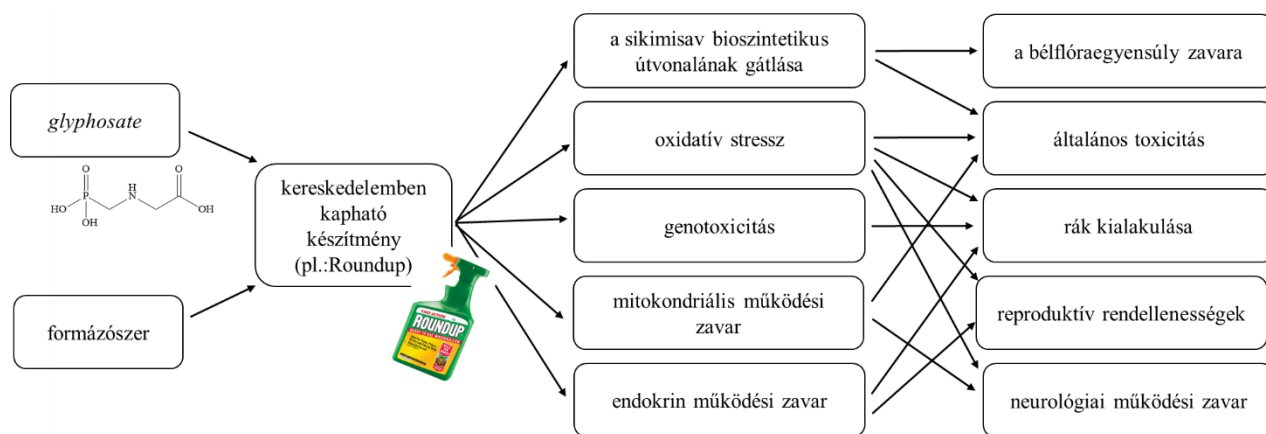
A vízi élőlények jelentős mértékben ki vannak téve a szennyező anyagok hatásainak, mivel a xenobiotikumokkal való érintkezés a vizekben elkerülhetetlen. A GLY és a GBH ökotoxicitását számos vízi organizmuson vizsgálták, beleértve különböző algafajokat, apró (*Daphnia magna*) vizibolhákat, puhatestűeket, halakat és kételtűeket (18. ábra).



18. ábra. A GLY hatóanyagú gyomirtószer és kereskedelmi készítményeinek főbb ökotoxikológiai hatásai vízi nem célszervezetekre. (Piros nyilak mutatják felfelé: növekedés; lefelé: csökkenés; kétirányú: változás). (KLÁTYIK *et al.*, 2024).

Az ECHA a GLY hosszútávú toxikus hatásai miatt a vegyületet toxikusnak minősítette a vízi élővilágra. Bár a GBH-k alkalmazását vízi környezetben ritkán engedélyezik, a GLY és annak metabolitja, az AMPA, valamint a GBH-készítmények világszerte gyakran kimutathatók a felszíni vizekben. Ez egyértelműen rámutat arra, hogy a vízi szennyezőanyagok fokozott jelenléte miatt megnövekszik a vízi szennyező anyagnak való fokozott kitettség valószínűsége.

Az intenzív használat miatt a GLY széles körben megtalálható a környezetben, és néha károsítja a nem célzott élőlényeket, melyet fentebb hangsúlyoztam, ugyankor bekerül az ivóvízbe és az élelmiszerláncba. Az embereknél több egészségügyi problémával, például rákkal és hormonális zavarokkal hozták összefüggésbe, de az egészségügyi hatások mértéke vitatott. A kutatások tovább folytatódnak, miközben javasolt a GLY használatának mérséklése és biztonságosabb alkalmazási szabályok bevezetése (19. ábra).



19. ábra A GLY, a GLY-tartalmú készítmények és formázószeres mellékhatásait okozó hatásmechanizmusok, valamint ezekhez kapcsolódó lehetséges élettani rendellenességek.

Széles körben elfogadott nézet, különösen a szabályozó hatóságok körében, hogy a GLY és annak kereskedelmi készítményei célzottan csak a meghatározott növényfajokra vannak hatással. Azonban az ebben az áttekintésben bemutatott számos bizonyíték arra utal, hogy a GLY/GBH-k jelentős hatással lehetnek a talajlakó és vízi ökoszisztémák nem célzott szervezeteire is. A GLY fizikai-kémiai tulajdonságai miatt könnyen bejuthat a vízi környezetbe. Hasonlóan, a GLY és a GBH-k többféle hatásai a szárazföldi ökoszisztémákra szintén egyértelműen bizonyítást nyertek. A növényi és állati vízi szervezetek esetében bemutatott eredmények alapján, úgy tűnik a GBH-k esetében az oxidatív stressz az egyik fő kiváltó ok, ami erősen kapcsolódik a vizsgálatainkban tárgyalt apoptózis, DNS-károsodás és citotoxikus hatásokhoz is. Ezek a folyamatok sejtszinten is végbe mennek, ezért is nagyon fontosak az *in vitro* vizsgálatok. A GLY-IPA, R és POE-15 sejttoxikus hatásainak részletes feltárását követően áttekintettük a GLY hatóanyag, a formázott GBH növényvédőszer-készítmény és a formázó anyag ökotoxikus hatásait a vízi és szárazföldi szervezetekre és életközösségekre. A részletes áttekintés alapján kitűnt, hogy bizonyos ökotoxikológiai jelenségek közvetlen összefüggésben állhatnak az általunk feltárt cito- és genotoxikus, illetve sejtciklus-befolyásoló hatásokkal, ilyen például a szárazföldi és vízi szervezetekre jellemző oxidatív stressz (KLÁTYIK *et al.*, 2023, KLÁTYIK *et al.*, 2024).

## 5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Doktori kutatásom során vizsgáltam a Roundup Classic készítményt a benne található hatóanyagot és a benne alkalmazott formázószert hagyományos sejtbiológiai módszerekkel és áramlási citométerrel is. Vizsgálataim során megismertem a vizsgálati anyagok életképességre, DNS-károsodásra, apoptózisra és sejtciklusra gyakorolt hatásait két egér sejtvonalon (NE-4C, MC3T3-E1). A sejtleletképességi vizsgálatot két módszerrel, áramlási citométerrel és 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium-bromid (MTT) szubsztrátumot alkalmazó teszttel (MTT-teszt) végeztem, míg a DNS-károsodást comet-teszttel és áramlási citométerrel vizsgáltam. Az apoptózisvizsgálatokat és a sejtciklusra gyakorolt hatások vizsgálatát áramlási citometriás módszerrel végeztem. Az így kapott eredményeket össze is hasonlítottam egymással. Az alábbi tézispontokban az egyes koncentrációkat csupán a Roundup Classic-ekvivalens% koncentrációértékekben adom meg, de a dolgozat természetesen az ezekhez tartozó abszolút koncentrációértékeket ( $\mu\text{g/ml}$ ) is tartalmazza.

Új tudományos eredményeimet az alábbi tézisekben összegzem:

1. A sejtleletképességi vizsgálatokban az NE-4C sejtvonalon az MTT-tesztben a következő  $\text{IC}_{50}$ -értékeket állapítottam meg:  $0,652\% \pm 0,006\%$ ,  $0,00315\% \pm 0,00007\%$  és  $0,00995\% \pm 0,00010\%$  GLY-IPA, POE-15 és R vizsgálati anyagok esetében (Roundup Classic-ekvivalens koncentrációban). Az MC3T3-E1 sejtvonalon MTT-tesztben a következő  $\text{IC}_{50}$ -értékeket állapítottam meg:  $0,7256\% \pm 0,0068\%$ ,  $0,00639\% \pm 0,00003\%$  és  $0,0101\% \pm 0,0004\%$  GLY-IPA, POE-15 és R vizsgálati anyagok esetében (Roundup Classic-ekvivalens koncentrációban). Az NE-4C sejtvonalon áramlási citométerrel mért sejtleletképességi vizsgálatban a következő  $\text{IC}_{50}$ -értékeket állapítottam meg:  $0,595\% \pm 0,009\%$ ,  $0,00115\% \pm 0,00007\%$  és  $0,00469\% \pm 0,00008\%$  GLY-IPA, POE-15 és R vizsgálati anyagok esetében (Roundup Classic-ekvivalens koncentrációban). Az MC3T3-E1 sejtvonalon áramlási citométerrel mért sejtleletképességi vizsgálatban a következő  $\text{IC}_{50}$ -értékeket állapítottam meg  $1,2495\% \pm 0,0024\%$ ,  $0,00936\% \pm 0,00085\%$  és  $0,0187\% \pm 0,0007\%$  GLY-IPA, POE-15 és R vizsgálati anyagok esetében (Roundup Classic-ekvivalens koncentrációban). A három vizsgálati anyagra vonatkozóan mindkét módszernél hasonló nagyságrendű arányokat, de az MC3T3-E1 sejtvonal esetében magasabb értékeket mértem, mint az NE-4C sejtvonallal. Ugyanakkor megállapítottam, hogy az NE-4C sejtvonal érzékenyebbnek mutatkozott az áramlási citométeres vizsgálatban, hiszen az MTT-teszt eredményei 91%, 36% és 47%-kal (átlagosan  $58\% \pm 29\%$ -kal) magasabbak, mint az áramlási citométerrel mért értékek. Az MC3T3-E1 sejtvonal esetében fordított összefüggést állapítottam

meg, hiszen a sejtvonal az MTT tesztben bizonyult érzékenyebbnek 58%, 68% és 54%-kal (átlagosan  $60\% \pm 7\%$ -kal) az áramlási citométerrel mért értékeknél.

2. A DNS-károsodási vizsgálatokban az NE-4C sejtvonalon a comet-tesztben a következő LGD-értékeket állapítottam meg: 0,0259%, 0,0000089% és 0,00002% *GLY-IPA*, *POE-15* és R vizsgálati anyagok esetében (Roundup Classic-ekvivalens koncentrációban). Az MC3T3-E1 sejtvonalon a comet-tesztben a következő LGD-értékeket állapítottam meg: 0,0835%, 0,0024125% és 0,00224% *GLY-IPA*, *POE-15* és R vizsgálati anyagok esetében (Roundup Classic-ekvivalens koncentrációban). Az NE-4C sejtvonalon áramlási citométerrel mért DNS-károsodási vizsgálatban a következő LGD-értékeket állapítottam meg: 0,0376%, 0,000295% és 0,00117% *GLY-IPA*, *POE-15* és R vizsgálati anyagok esetében (Roundup Classic-ekvivalens koncentrációban). Az MC3T3-E1 sejtvonalon áramlási citométerrel mért DNS-károsodási vizsgálatban a következő LGD-értékeket állapítottam meg: 0,0375%, 0,0000935% és 0,000786% *GLY-IPA*, *POE-15* és R vizsgálati anyagok esetében (Roundup Classic-ekvivalens koncentrációban). Az LGD-értékei alapján az NE-4C sejtvonal átlagosan két nagyságrenddel érzékenyebbnek bizonyult a comet-tesztben az MC3T3-E1 sejtvonalnál, mely egyértelműen a p53 tumorszupresszor fehérje és ezáltal a DNS-károsodásokat javító mechanizmusok hiányából ered az előbbi sejtvonalban. Az MC3T3-E1 sejtvonal esetében a DNS-károsodást vizsgáló áramlási citometriás vizsgálati készlet eredményezett érzékenyebb kimutatást, ahol az az LGD-értékek 44%, 3% és 35%-át (átlagosan  $27\% \pm 22\%$ -kal) voltak alacsonyabbak a comet-teszthez képest.

3 Az NE-4C sejtvonalon az apoptózis vizsgálatot áramlási citométerrel végeztem el, melynél a következő  $IC_{50}$ -értéket kaptam,  $0,246 \pm 0,134\%$ ,  $0,00092 \pm 0,000005\%$  és  $0,00238 \pm 0,00003\%$  *GLY-IPA*, *POE-15* és R vizsgálati anyag esetében (Roundup Classic-ekvivalens koncentrációban). Az MC3T3-E1 sejtvonalon az apoptózis tesztrel a következő  $IC_{50}$ -értékeket kaptam,  $0,2731 \pm 0,0045\%$ ,  $0,01169 \pm 0,00048\%$  és  $0,0167 \pm 0,0013\%$  *GLY-IPA*, *POE-15* és R vizsgálati anyag esetében (Roundup Classic-ekvivalens koncentrációban). Az NE-4C sejtvonalon áramlási citométerrel mért kaszpáz 3/7 aktiviásnál a következő  $IC_{50}$ -értékeket kaptam,  $0,568 \pm 0,043\%$ ,  $0,00099 \pm 0,00002\%$  és  $0,00748 \pm 0,00012\%$  *GLY-IPA*, *POE-15* és R vizsgálati anyag esetében (Roundup Classic-ekvivalens koncentrációban). Az MC3T3-E1 sejtvonalon áramlási citométerrel mért kaszpáz 3/7 aktiviásnál a következő  $IC_{50}$ -értékeket kaptam,  $0,6412 \pm 0,0339\%$ ,  $0,00649 \pm 0,00012\%$  és  $0,0073 \pm 0,0001\%$  *GLY-IPA*, *POE-15* és R vizsgálati anyag esetében (Roundup Classic-ekvivalens koncentrációban). NE-4C esetében átlagban 55%-kal érzékenyebb volt, az apoptózis vizsgálat, mely az összes apoptotikus sejtet határozta meg, a kaszpáz 3/7 vizsgálati készlethez képest, mely az apoptotikus és halott sejteket detektálta. Vizsgálatomból

megállapítható, hogy az NE-4C sejtvonal a *POE-15* esetében átlagban 9-szer érzékenyebben reagált mindkét apoptózis vizsgálatra az MC3T3-E1 sejtvonalhoz képest.

4 Az NE-4C sejtek sejtciklus vizsgálata során a *GLY-IPA* kezelés hatására, a sejtek a  $G_0/G_1$ -fázisban maradnak, hiszen nem érzékelnek optimális körülményeket a növekedéshez és el sem érik az első restrikciós pontot, meglepő módon a legalacsonyabb koncentrációnál a legmagasabb a  $G_0/G_1$ -fázisban lévő sejtek aránya, ahol szignifikáns különbséget mutattunk ki a kontroll kezeléshez képest ( $p < 0,05$ ). R- és a *POE-15*-kezelés hatására a  $G_0/G_1$ -fázisban lévő sejtek aránya csökken monoton dózisfüggő módon 0,0007-0,0026% (Roundup Classic-ekvivalens koncentrációban). A R-kezelésnél a legkisebb koncentráció kivételével és a *POE-15*-kezelésnél szignifikáns különbséget ( $p < 0,001$ ) mutattam ki az S és a  $G_2/M$ -fázisban a kontrollhoz képest. MC3T3-E1 sejtek sejtciklus vizsgálata során a kontrollban a  $G_0/G_1$ -fázisban tartozkodó sejtek aránya átlagban 57 %-kal magasabb, mint az NE-4C esetében, ez az arány a kezelések hatására csökken. Az S-fázisban lévő sejtek arányát nem befolyásolta a kezelés, míg a  $G_2/M$ -fázisban lévő sejtek aránya növekszik a 24-órás kezelést követően.

## 6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A vizsgálatok során szerzett adatokból világosan kirajzolódott, hogy a különböző módszerek különböző érzékenységgel és információtartalommal bírnak. Az MTT-teszt az általános sejtműködés, míg az áramlási citometria a részletesebb sejtfiziológiai paraméterek vizsgálatára alkalmas. A comet-teszt előnye a vizuális információ, az áramlási citometriás DNS-vizsgálat pedig a kvantitatív és objektív adatszerzés. A kombinált vizsgálatok azt is megmutatták, hogy egyes sejtvonalak eltérő érzékenységgel reagálnak ugyanazon vegyületekre. Ez különösen fontos volt a *POE-15* toxikus hatásainak vizsgálatakor, mivel az eredmények azt mutatták, hogy ez a vegyület önmagában is nagyságrendekkel toxikusabb, mint a *GLY-IPA* önmagában.

Általánosságban a dolgozatomban felhasznált vizsgálati anyagokról (*GLY-IPA*, R és *POE-15*) elmondható, hogy mindegyik vizsgálatban gátló hatást mutattak a kontroll kezelésekhez képest, ezek mértéke eltérő volt, melyet az eredményekben ki is fejtettem. Vizsgálatainkban a legnagyobb gátló hatást a *POE-15* idézett elő, ez egyáltalán nem meglepő, hiszen 2016-ban azokat a *GLY*-tartalmú készítményeket betiltották az EU-ban, amelyek *POE-15* formázószert tartalmaztak, ami jelentős lépés volt a növényvédő szerek biztonságosabbá tétele érdekében. A *POE-15* egy felületaktív anyag, amelyet a *GLY* hatékonyságának növelésére használtak, mivel segíti a *GLY* gyorsabb felszívódását a növények levelein keresztül, a hatóanyag bejutását javítja és fokozott levéltapadást idéz elő. A *POE-15* betiltását megelőzően a toxikológiai hatásai miatt nőtt az aggodalom, különösen a humán és környezeti egészségre gyakorolt potenciális veszélyek miatt. A döntés alapja az volt, hogy a *POE-15* potenciálisan káros hatással van a környezetre, különösen a vízi élővilágra, és egészségügyi kockázatokat is jelenthet az emberekre nézve. Az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (EFSA) felhívta a figyelmet arra, hogy a *POE-15* jelenléte fokozhatja a *GLY* toxicitását, ezért javasolták a felületaktív anyag kivonását a piacról. A *POE-15* részletes toxikológiai problémái, melyeket a saját vizsgálataimmal is bizonyítottam. Humán toxikológia tekintetében, citotoxicitást mutattak ki *in vitro* kísérletekben, ahol a *POE-15* jelentős mértékben károsítja az emberi sejteket, különösen a bőrt, a tüdőt és a májat érintő sejteket. Az emberi sejtvonalakon végzett vizsgálatokban (pl. HEK293 vesesejtek) azt tapasztalták, hogy a *POE-15* sejthalált okoz, még alacsony koncentrációkban is (SUN *et al.*, 2024, MESNAGE *et al.*, 2013). Genotoxikus hatásait a comet-teszt és más genotoxicitási tesztek kimutatták, hogy a *POE-15* DNS-károsodást okoz, ami növeli a rákkeltő kockázatot és más hosszú távú egészségügyi problémákat. *In vitro* és *in vivo* vizsgálatok is kimutatták, hogy a *POE-15* oxidatív stresszt okozhat a sejtekben, ami hozzájárulhat a sejthalálhoz és más toxikus hatásokhoz is. Ezen tényszerű következtetéseket a saját vizsgálataimból is megállapítottam, és bebizonyítottam parallel az irodalmi adatokkal. Környezettoxikológiai szempontból a *POE-15* szintén jelentős környezeti

kockázatot jelent, különösen a vízi ökoszisztémákban. A *POE-15* mérgezőnek bizonyult számos vízi organizmusra, például halakra és kételtűekre, ami az ökológiai egyensúlyt fenyegeti (KLÁTYIK *et al.*, 2023, KLÁTYIK *et al.*, 2024). Az EFSA és az ECHA, arra a következtetésre jutottak, hogy a *POE-15* használata elfogadhatatlan kockázatokat jelent az emberi egészségre és a környezetre nézve. Összességében a *POE-15* betiltása fontos mérőföldkő volt a *GLY*-tartalmú készítmények biztonságosabbá tétele érdekében, és rávilágított arra, hogy a segédanyagoknak ugyanolyan figyelmet kell szentelni a toxikológiai vizsgálatok során, mint magának a hatóanyagnak, jelen esetben a *GLY*-nak.

A *GLY* miatt bekövetkezett betegségek kialakulása egy érdekes kérdéskört vet fel, hiszen az egészségügyi szervezetek sem tudnak konszenzusra jutni ezügyben. Több tanulmány foglalkozott gazdálkodók vizeletében felhalmozódott *GLY*-tal (ACQUAVELLA *et al.*, 2004, CHANG *et al.*, 2024, CONNOLLY *et al.*, 2020), több szempontot figyelembe véve, hogy használtak kesztyűt, hosszúujjas ruhát viseltek-e, amikor hígították a *GLY*-t, illetve nem mezőgazdasági munkásokat használtak kontrollnak. Következtetésként levonható ebből a tanulmányból, hogy mind a gazdálkodók, mind a nem mezőgazdasági munkát végzők ki vannak téve a *GLY* hatásainak, és a foglalkozásszerű *GLY*-használat a vizelet *GLY*-koncentrációjának legmeghatározóbb tényezője, ezért is szükséges a *GLY* folyamatos biomonitorozása különböző környezetekben (CHANG *et al.*, 2024).

A *GLY* és a non-Hodgkin limfóma (NHL) közötti kapcsolat az egyik legvitatottabb kérdés a *GLY* biztonságosságával kapcsolatban (INSERM, 2021). Az évek során számos tanulmány vizsgálta ezt a lehetséges összefüggést, és míg néhány kutatás azt sugallja, hogy a *GLY* expozíció növelheti a non-Hodgkin limfóma kockázatát, más tanulmányok nem találtak erre meggyőző bizonyítékot. A non-Hodgkin limfóma egy olyan kórképet foglal magába, amely a nyirokrendszer sejtjeit érinti. Ez a betegség különbözik a Hodgkin-limfómától, mivel eltérő típusú limfocitákból indul ki, és más klinikai jellemzőkkel rendelkezik. Az NHL több típust foglal magában, és változó súlyosságú lehet, a lassan fejlődő formáktól a gyorsan progresszáló, agresszív típusokig. A *GLY* tekintetében 2015-ben az IARC és a WHO 2A csoportba sorolta, ezen besorolást többek között a non-Hodgkin limfómával kapcsolatos epidemiológiai vizsgálatok eredményeire alapozva állapították meg. Az állatkísérletek bizonyos rákos megbetegedésekre utaló bizonyítékokat szolgáltatottak. Az emberi epidemiológiai vizsgálatok néhány esete kapcsolatot mutatott a *GLY* expozíció és a non-Hodgkin limfóma kockázatának növekedése között. Az IARC különösen hangsúlyozta, hogy a mezőgazdasági munkások körében nagyobb a kockázat, mivel ők hosszú távon és nagyobb mennyiségben vannak kitéve a vegyszernek (GALLI *et al.*, 2024). Számos epidemiológiai tanulmány vizsgálata a *GLY* expozíció és az NHL kialakulása közötti összefüggést (PAHWA *et al.*, 2019), De Roos és munkatársai a mezőgazdasági dolgozók körében végeztek

felméréseket és *GLY* expozíció esetében megnövekedett az NHL kockázata (DE ROOS *et al.*, 2003). Egy másik tanulmányban készült egy metaanalízis, amely több tanulmány adatait újraértékelte és arra következtetésre jutott, hogy a *GLY* akár 41%-kal is növelheti az NHL kockázatát a legnagyobb expozíciós szintű emberek (mezőgazdasági munkások) esetében (ZHANG *et al.*, 2019).

Az Egyesült Államokban az elmúlt években több ezer mezőgazdasági munkás és kertész indított pert a *GLY* gyártó Monsanto (a vállalatot később felvásárolta a Bayer) ellen, azt állítva, hogy a *GLY* használata okozta náluk a NHL-t. Az első három nagy perben a bíróságok több százmillió dolláros kártérítést ítélt meg az áldozatok javára. A perek középpontjában az állt, hogy a *GLY* gyártója nem tájékoztatta megfelelően a felhasználókat a termék lehetséges rákkeltő hatásairól. Az IARC besorolása ellenére más egészségügyi és szabályozó szervezetek nem találták elegendő bizonyítéknak arra, hogy a *GLY* rákkeltő lenne: A *GLY* és a non-Hodgkin limfóma közötti kapcsolat továbbra is vitatott téma a tudományos körökben. A kutatások folytatódnak annak megértésére, hogy milyen tényezők (pl. expozíció időtartama, dózis, egyéni genetikai hajlam) befolyásolhatják a kockázatot. Míg egyes tanulmányok statisztikailag jelentős kapcsolatot mutattak ki a *GLY* expozíció és az NHL között, mások nem találtak ilyen egyértelmű összefüggést, tehát a tudományos közösségek nem érték el a konszenzust.

Ezeknek a fényében a bemutatott vizsgálataimból több megállapítás is levonható, a R és a *POE-15* toxikusabb, mint a *GLY-IPA* mindkét vizsgált egérsajtvonala, a neuroektodermális, összejtípusú NE-4C sejtekre és az MC3T3-E1 preoszteoblaszt sejtekre egyaránt. A két sejtvonal minden kísérletünkben jellegzetes különbségeket mutatott, mivel vizsgálataimban az NE-4C sejtek legalább 2,5-szer érzékenyebbnak bizonyultak a vizsgált anyagokkal szemben.

Az NE-4C sejtvonal különösen érzékeny a neurotoxikus anyagokkal, illetve hosszútávú környezeti szennyezőkkel szemben mivel embrionális neuroektodermális eredetűek, ami lehetővé teszi, hogy *in vitro* modellekben jól tükrözzék az idegsejtek toxikológiai válaszait, képesek az idegsejt-differenciációra, így alkalmasak az idegrendszerre gyakorolt káros hatások vizsgálatára. Neurotoxikus anyagokkal szembeni érzékenységük különösen abban nyilvánul meg, hogy gyorsan reagálnak oxidatív stresszre, mitokondriális diszfunkciókra és apoptotikus folyamatokra, amelyek a sejthalálhoz vezethetnek. Az NE-4C nagyfokú érzékenysége is erre vezethető vissza, a meghatározott  $IC_{50}$ -értékek következtében azt jelezték, hogy a célvegyületek gátló hatásának sorrendje egyértelműen  $POE-15 > R > GLY-IPA$  mindkét sejtvonal esetében. Ez nem azt jelenti, hogy a hatóanyag gátló hatása csekély a formázószerhez és a R-hoz képest, hiszen megállapítottam, hogy a *GLY* is gátolta a sejtek funkcióit mezőgazdasági kijuttatási koncentrációban (1-2%). Ez a következtetés összhangban áll a tudományos szakirodalom korábbi megállapításaival, ahol *GBH*-kat és a *GLY*-t vizsgáltak.

A genotoxicitási vizsgálatokban a legalacsonyabb hatást az MC3T3-E1 sejtekénél a *GLY-IPA* esetében mértük, összehasonlítva más vizsgált anyagokkal, az LGD-érték a comet-vizsgálatokban a R és *GLY-IPA* közötti különbség 5,5-szeres, és a DNS-károsodási vizsgálati készlet esetében 9-szeres. A többi mérésnél az IC<sub>50</sub>-érték (életképesség, apoptózis) több mint 25-szörös a R és a *GLY-IPA* között. A szakirodalmi adatok eredményei alapján, vizsgálataink is egyértelműen kimutatták a *POE-15* citotoxicitását, amelyet más vizsgálatokban a sejtlégzésre és a membrán integritásra gyakoroltak 0,00155% és 0,0097% közötti Roundup Classic ekvivalens koncentrációval. Vizsgálatunkban a faroknyomaték nagysága a comet-tesztben korrelál a szakirodalmi adatokban fellelhető eredményekkel, amik 24-órás kitettség mellett, *GLY-IPA*-, R- és *POE-15*-kezeléssel végeztek.

Eredményeink bebizonyították, hogy további genotoxikus veszélyt jelentenek az emberi egészségre és az ökoszisztémára. A jelen vizsgálatban megfigyelt eredmények egyértelműen megállapították hogy fokozott cito- és genotoxikus hatást fejt ki a R és a *POE-15*. Eredményeink azt is kimutatták, hogy a legnagyobb genotoxikus hatást a *POE-15* érte el, mind a Muse DNS-károsító vizsgálati készlet, mind a comet-teszt segítségével. A legalacsonyabb LGD-értékeket a *POE-15* esetében az NE-4C sejtvonalon mértük a genotoxicitási vizsgálatokban, ami szintén bizonyítja a *POE-15* DNS-károsító hatását.

Végezetül, vizsgálataink eredményeképpen a következő megállapításokat tettük: a sejtciklust befolyásoló hatásra vonatkozó eredményeink az általunk vizsgált sejtvonalakon korrelálnak a tudományos szakirodalomban más sejtvonalakon közöltekhez képest. Kísérleteinkben a sejtciklus-vizsgálati készlettel a G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-fázisban lévő sejtek magas arányát mutattuk ki (a kontrollhoz képest), mind az NE-4C, mind az MC3T3-E1 sejtek esetében a vizsgálati anyagok káros hatásai miatt, melyek gátolták a sejtek S-fázisba történő progresszióját, így kevesebb sejt tudott továbbhaladni az S-fázisba. A citotoxicitásra vonatkozó ismereteink bővítésén túlmenően a célanyagokkal kapcsolatban, e vizsgálat eredményei további bizonyítékkal szolgálnak a *GLY*-tartalmú készítmények értékelésénél.

A *GLY* és az élelmiszer-adalékanyagok közötti összefüggés rávilágít arra, hogy a mezőgazdasági vegyszerek és az élelmiszer-adalékanyagok maradványainak jelenléte az élelmiszerekben jelentős egészségügyi kockázatot hordozhat. Ezen anyagok genotoxikus hatása hozzájárulhat a daganatos megbetegedések kialakulásának kockázatához, így elengedhetetlen a szigorú szabályozás és a folyamatos kutatási tevékenység. Az expozíció csökkentése érdekében nemcsak a mezőgazdasági gyakorlatoknak kell változniuk, hanem az élelmiszer-feldolgozási folyamatokat optimalizálni kell, úgy, hogy a fogyasztók egészsége is védve legyen.

Az utóbbi években egyre több tanulmány vizsgálja a *GLY* és más adalékanyagok esetleges káros hatásait az emberi szervezetre. Ezek az anyagok akkumulálódhatnak a szervezetben, ami

különösen a hosszú távú expozíció esetén jelenthet nagy kockázatot. Az egyre növekvő számú bizonyítékok alapján sürgető, hogy a mezőgazdaságban használt vegyszerek szabályozása szigorúbb legyen, mivel a jelenlegi normák nem minden esetben nyújtanak elegendő védelmet. A megfelelő tájékoztatás és tudatosság növelése szintén kulcsfontosságú lehet, hogy a fogyasztók tisztában legyenek az élelmiszereikben lévő vegyi anyagok lehetséges hatásaival.

A kutatások arra is rámutattak, hogy a különböző élelmiszer-adalékanyagok szinergista hatással lehetnek a *GLY*-re, ami még nagyobb egészségügyi problémákat okozhat. A modern élelmiszeriparban alkalmazott technológiák szintén hozzájárulhatnak az ilyen anyagok jelenlétéhez, ezért a gyártási folyamatok újraértékelése is szükséges lehet. Az élelmiszerbiztonság terén dolgozó szakemberek egyetértenek abban, hogy a fogyasztók hosszú távú egészségének védelme érdekében a szabályozásnak lépést kell tartania a tudományos felfedezésekkel. Fontos szempont, hogy alternatív megoldások is rendelkezésre álljanak, mint például a biogazdálkodás elterjedése, amely csökkentheti a vegyi anyagok használatát. Összességében a *GLY* és az élelmiszer-adalékanyagok kérdése globális probléma, amely alapos vizsgálatot és hatékony intézkedéseket igényel. A fogyasztók tudatosabb döntései, a fenntartható mezőgazdasági gyakorlatok elterjedése és a folyamatos kutatási eredmények segíthetnek minimalizálni a kockázatokat. A dolgozatomban elvégzett vizsgálatokkal és leírt eredményekkel is ehhez szeretnék hozzájárulni.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

A piacvezető, széles spektrumú, totális gyomirtószer, a Roundup Classic, hatóanyagának, a GLY (izopropilamin (IPA) só formájában) és a készítmény felületaktív anyagának, a polietoxilált faggyúaminok (POE-15) citotoxikus hatását két egérsajtvonalon, egy neuroektodermális őssejtszerű (NE-4C) és egy magas alkalikus foszfatáz-aktivitású, csontvelőprekursor-sejtvonalon (MC3T3-E1) határoztuk meg. A vizsgálati anyagaink a GLY-IPA, R és POE-15 citotoxikus, genotoxikus, és a sejtciklusokra gyakorolt hatását öt áramlási citometriás vizsgálati készlettel vizsgáltuk, amelyek közül a két előbbit összehasonlítottuk az MTT-tesztel és az egysejtes gélelektroforézis (comet-teszt) eredményeivel. Valamennyi vizsgálat azt mutatta, hogy a NE-4C sejtek érzékenyebbek a célvegyületekkel végzett kezelésekre, mint az MC3T3-E1 sejtvonal. Az áramlási citometriával végzett életképességi vizsgálatban nagyobb érzékenységi különbségeket észleltünk (7-9-szer), mint az MTT vizsgálatnál (1,5-3-szor) a két sejtvonal között. Ez a tendencia érvényes a comet-tesztben (3,5-403-szor), és a DNS-károsodási vizsgálatban is (9,3-158-szor). Az apoptózis vizsgálatnál az Annexin V halott sejtek vizsgálati készletnél szintén az NE-4C sejt volt (1,1-12,7-szeres) érzékenyebb és ez igaz a kaszpáz 3/7 vizsgálati készlet esetében is (1-6,5-szeres). A sejtciklusvizsgálatok az MC3T3-E1 sejtek esetében a G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-fázisban lévő sejtek magas számát ~70% mutatta a vizsgálati készlet, míg az NE-4C sejteknél ez ~40% volt 24 óra elteltével. A célvegyületek gátló hatásának sorrendje egyértelműen a következő volt: POE-15 > Roundup Classic > > GLY-IPA. Ez nem azt bizonyítja, hogy maga a hatóanyag nem bír toxikus hatással, hanem a formázóanyag és a készítményben fellelhető egyéb anyagokkal együtt erősebb toxicitást mutat, mint maga a hatóanyag. E megállapítás jelentőségének értékeléséhez a mért genotoxicitási értékeket (a comet-tesztel és a Muse™ DNS-károsító vizsgálati készlet segítségével meghatározva) összehasonlítottuk az élelmiszeriparban adalékanyagként használt és élelmiszer-szennyezőként bejelentett ismert genotoxikus anyagok genotoxicitási értékeivel. Az értékeléséhez az összehasonlítások alapjául a genotoxicitásra általánosan alkalmazott értéként a legalacsonyabb genotoxikus dózisokat használtuk. A GLY genotoxikusabb a bórsavnál, és a benzoésav (általános tartósítószer) 3-szor, genotoxikusabb, mint a GLY. A citromsav genotoxicitása HSP sejtvonalon hasonló értéket mutat, mint a GLY az NE-4C sejtvonalon, ebből a szempontból nem egyértelmű, hogy a citromsavra miért nem határoztak meg MRL-értéket. Az akrilamid 4,5- és 1,5-ször genotoxikusabb, mint a GLY az általunk vizsgálat két sejtvonalon, ugyanakkor az akrilamidot szintén 2A IARC rákkeltő kategóriába sorolták, mint a GLY-t. A vizsgálatainkban hiába volt a GLY a legkevébé genotoxikus anyag, más mindennapi élelmiszer-adalékokkal összehasonlítva kiderül, hogy nem veszélytelen. Ezen vizsgálataink segítséget nyújthatnak, további bizonyítékkal szolgálhatnak a GLY-tartalmú készítmények értékelésénél.

## 8. SUMMARY

Cytotoxic effects of the market leading broad-spectrum, synthetic herbicide product Roundup Classic (R), its active ingredient *glyphosate* (in a form of its isopropylamine (IPA) salt) (*GLY-IPA*) and its formulating surfactant polyethoxylated tallowamine (*POE-15*) were determined on two murine cell lines, a neuroectodermal stem cell-like (NE-4C) and a high alkaline phosphatase activity osteoblastic cell line (MC3T3-E1). Cytotoxicity, genotoxicity, effects on cell viability and cell cycles were examined in five flow cytometry tests, the two former of which were compared by the enzymatic assay and the alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assay. All of the tests indicated the NE-4C cells being more sensitive, than the MC3T3-E1 cell line to the treatments with the target compounds. Higher sensitivity differences were detected in the viability test by flow cytometry (7–9-fold), than by the MTT assay (1.5–3-fold); in the genotoxicity test by the comet assay (3.5–403-fold), than by the DNA-damage test (9.3–158-fold); and in the apoptosis test by the Annexin V dead cell kit (1.1–12.7-fold), than by the Caspase 3/7 kit (1–6.5-fold). Cell cycle assays indicated higher counts of cells (~70%) in the G0/G1 phase for MC3T3-E1 cells, than in NE-4C cell (~40%) after 24 h. The order of the inhibitory potency of the target substances has unequivocally been *POE-15* > Roundup Classic > > *GLY-IPA* salt. This does not prove that the active ingredient has no toxic effect, but rather suggests that the formulation, in combination with other substances, may have a higher toxicity (level) than the active ingredient itself. This significance of the finding, the measured genotoxicity values (determined using the comet test and the Muse™ DNA damage assay kit) were compared with the lowest genotoxicity doses (LGD) of known genotoxic substances used as additives in the food industry and reported as food contaminants. The genotoxicity assessment we used the lowest genotoxic dose, which is a commonly used value for genotoxicity, this was the basis for the comparison. *GLY* is 3 times more genotoxic, than boric acid. Benzoic acid (commonly used preservative) is 3 times more genotoxic, than *GLY*. The genotoxicity of citric acid on the HSP cell line is similar to *GLY* on the NE-4C cell line, so it cannot be interpreted, why no MRL value was set for citric acid. Acrylamide is 4.5- and 1.5-fold more genotoxic than *GLY* in the two cell lines we tested, while acrylamide is also classified as a 2A IARC carcinogen. In our studies, although *GLY* was the least genotoxic substance, it was found to be not harmless compared to other common food additives. These studies may provide further evidence for the evaluation of products containing *GLY*.

## 9. MELLÉKLET:

### IRODALOMJEGYZÉK

- ACQUAVELLA, J. F., ALEXANDER, B. H., MANDEL, J. S., GUSTIN, C., BAKER, B., CHAPMAN, P., BLEEKE, M. (2004). Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: results from the Farm Family Exposure Study. *Environmental Health Perspectives*, 112(3), 321–326. doi:10.1289/ehp.6667
- AGOSTINI, L. P., DETTOGNI, R. S., DOS REIS, R. S., STUR, E., DOS SANTOS, E. V. W., VENTORIM, D. P., GARCIA, F. M., CARDOSO, R. C., GRACELI, J. B., LOURO, I. D. (2020). Effects of glyphosate exposure on human health: Insights from epidemiological and in vitro studies. *Science of The Total Environment*, 705, 135808. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.135808
- AHUJA, M., KUMAR, L., KUMAR, K., SHINGATGERI, V. M., KUMAR, S. (2024). Glyphosate: a review on its widespread prevalence and occurrence across various systems. *Environmental Science: Advances*, 3(7), 1030–1038. doi:10.1039/D4VA00085D
- ALAVANJA, M. C. R., ROSS, M. K., BONNER, M. R. (2013). Increased cancer burden among pesticide applicators and others due to pesticide exposure. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 63(2), 120–142. doi:10.3322/caac.21170
- ALCÁNTARA-DE LA CRUZ, R., CRUZ-HIPOLITO, H. E., DOMÍNGUEZ-VALENZUELA, J. A., DE PRADO, R. (2021). Glyphosate ban in Mexico: Potential impacts on agriculture and weed management. *Pest Management Science*, 77(9), 3820–3831. doi:10.1002/ps.6362
- ALLEN, D. D., CAVIEDES, R., CÁRDENAS, A. M., SHIMAHARA, T., SEGURA-AGUILAR, J., CAVIEDES, P. A. (2005). Cell lines as *in vitro* models for drug screening and toxicity studies. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 31(8), 757–768. doi:10.1080/03639040500216246
- ÁLVAREZ, F., ARENA, M., AUTERI, D., BINAGLIA, M., CASTOLDI, A. F., CHIUSOLO, A., CRIVELLENTI, F., EGSMOSE, M., FAIT, G., FERILLI, F., GOULIARMOU, V., NOGAREDA, L. H., IPPOLITO, A., ISTACE, F., JARRAH, S., KARDASSI, D., KIENZLER, A., LANZONI, A., LAVA, R., VILLAMAR-BOUZA, L. (2023). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA Journal*, 21(7). doi:10.2903/j.efsa.2023.8164
- ANTIER, C., KUDSK, P., REBOUD, X., ULBER, L., BARET, P. V., MESSÉAN, A. (2020). Glyphosate use in the European agricultural sector and a framework for its further monitoring. *Sustainability*, 12(14), 5682. DOI: 10.3390/su12145682

- ATSDR (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY) (Mérgező Anyagok és Betegségek Nyilvántartási Ügynöksége (2023). Toxicological Profile for Nitrophenols. ASTDR, Washington, DC, USA, April 2023.
- BAGALE, S. (2023). Modes of herbicide action. In *New Insights in Herbicide Science. IntechOpen*. doi:10.5772/intechopen.105356
- BAJEER, M. A., NIZAMANI, S. M., SHERAZI, S. T. H., BHANGER, M. I. (2012). Adsorption and leaching potential of imidacloprid pesticide through alluvial soil. *American Journal of Analytical Chemistry*, 03(08), 604–611. doi:10.4236/ajac.2012.38079
- BARNETT, J. A., GIBSON, D. L. (2020). Separating the empirical wheat from the pseudoscientific chaff: a critical review of the literature surrounding glyphosate, dysbiosis and wheat-sensitivity. *Frontiers in Microbiology*, 11. doi:10.3389/fmicb.2020.556729
- BAYER CROPSCIENCE, Safety Data Sheet – Roundup Classic, 2016. ???
- BAYLIS, A. D. (2000). Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *Pest Management Science*, 56(4), 299–308. doi:10.1002/(SICI)1526-4998(200004)56:4<299::AID-PS144>3.0.CO;2-K
- BEDNÁŘOVÁ, A., KROPF, M., KRISHNAN, N. (2020). The surfactant polyethoxylated tallowamine (POEA) reduces lifespan and inhibits fecundity in *Drosophila melanogaster*- In vivo and in vitro study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 188, 109883. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.109883
- BENACHOUR, N., SÉRALINI, G.-E. (2009). Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chemical Research in Toxicology*, 22(1), 97–105. doi:10.1021/tx800218n
- BENACHOUR, N., SIPAHUTAR, H., MOSLEMI, S., GASNIER, C., TRAVERT, C., SÉRALINI, G. E. (2007). Time- and dose-dependent effects of roundup on human embryonic and placental cells. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 53(1), 126–133. doi:10.1007/s00244-006-0154-8
- BENBROOK, C. M. (2016). Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe*, 28(1), 3. doi: 10.1186/s12302-016-0070-0
- BENCKO, V., YAN LI FOONG, F. (2017). The history of arsenical pesticides and health risks related to the use of Agent Blue. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 24(2), 312–316. doi:10.26444/aaem/74715
- BERG, S. Z., BERG, J. (2023). Melanin: a unifying theory of disease as exemplified by Parkinson's, Alzheimer's, and Lewy body dementia. *Frontiers in Immunology*, 14. doi:10.3389/fimmu.2023.1228530

- BLACK, C. C. (2018). Effects of herbicides on photosynthesis. in book : *Weed physiology*, chapter 1, 1–36. CRC Press. doi: 10.1201/9781351077736-1
- BLOEM, B. R., BOONSTRA, T. A., ELBAZ, A., VERMEULEN, R. C. H. (2024). Glyphosate and neurotoxicity — a call for scientific renewal. *Nature Reviews Neurology*, 20(3), 131–132. doi:10.1038/s41582-023-00919-7
- BO, A.B., WON, O.J., SIN, H.T., LEE, J.J., PARK, K.W.,(2017). Mechanisms of herbicide resistance in weeds. *Korean Journal of Agricultural Science* 44(1), 1- 15. doi: 10.7744/kjoas.20170001
- BOFFETTA, P., CIOCAN, C., ZUNARELLI, C., PIRA, E. (2021). Exposure to glyphosate and risk of non-Hodgkin lymphoma: an updated meta-analysis. *La Medicina Del Lavoro*, 112(3), 194–199. doi:10.23749/mdl.v112i3.11123
- BONY, S., CARCELEN, M., OLIVIER, L., DEVAUX, A. (2006). Genotoxicity assessment of deoxynivalenol in the Caco-2 cell line model using the Comet assay. *Toxicology Letters*, 166(1), 67–76. doi:10.1016/j.toxlet.2006.04.010
- BOOCOCK, M. R., COGGINS, J. R. (1983). Kinetics of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase inhibition by glyphosate. *FEBS Letters*, 154(1), 127–133. doi:10.1016/0014-5793(83)80888-6
- DOI: 10.1016/0014-5793(83)80888-6
- BOU-MITRI, C., DAGHER, S., MAKKAWI, A., KHREYSS, Z., HASSAN, H. F. (2025). Glyphosate in food: A narrative review. *Journal of Agriculture and Food Research*, 19, 101643. doi:10.1016/j.jafr.2025.101643
- BRÜHL, C., ZALLER, J. (2022). Approval procedures: underestimated risks. Heinrich Böll Stiftung, Brussels, Belgium. (<https://eu.boell.org/en/PesticideAtlas-approval>)
- BRAUSCH, J. M., SMITH, P. N. (2007). Toxicity of three polyethoxylated tallowamine surfactant formulations to laboratory and field collected fairy shrimp, *Thamnocephalus platyurus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 52(2), 217–221. doi:10.1007/s00244-006-0151-y
- BURTSCHER, H., CLAUSING, P., ROBINSON, C. (2017). Global 2000’s report on glyphosate. ECHA, Helsinki, 1-17, [https://echa.europa.eu/documents/10162/0/global\\_2000\\_glyphosate\\_echa\\_response\\_final\\_en.pdf/92487f17-ea44-0bae-56d4-a7616862c65ahttps://echa.europa.eu/documents/10162/0/global\\_2000\\_glyphosate\\_echa\\_response\\_final\\_en.pdf/92487f17-ea44-0bae-56d4-a7616862c65a](https://echa.europa.eu/documents/10162/0/global_2000_glyphosate_echa_response_final_en.pdf/92487f17-ea44-0bae-56d4-a7616862c65ahttps://echa.europa.eu/documents/10162/0/global_2000_glyphosate_echa_response_final_en.pdf/92487f17-ea44-0bae-56d4-a7616862c65a)
- CAI, W., YANG, X., LI, X., LI, H., WANG, S., WU, Z., YU, M., MA, S., TANG, S. (2020). Low-dose Roundup induces developmental toxicity in bovine preimplantation embryos in vitro.

- Environmental Science and Pollution Research*, 27(14), 16451–16459. doi:10.1007/s11356-020-08183-8
- CHANG, V. C., OSPINA, M., XIE, S., ANDREOTTI, G., PARKS, C. G., LIU, D., MADRIGAL, J. M., WARD, M. H., ROTHMAN, N., SILVERMAN, D. T., SANDLER, D. P., FRIESEN, M. C., BEANE FREEMAN, L. E., CALAFAT, A. M., HOFMANN, J. N. (2024). Urinary biomonitoring of glyphosate exposure among male farmers and nonfarmers in the Biomarkers of Exposure and Effect in Agriculture (BEEA) study. *Environment International*, 187, 108644. doi:10.1016/j.envint.2024.108644
- CHÁVEZ-REYES, J., GUTIÉRREZ-REYES, C. D., HERNÁNDEZ-CUELLAR, E., MARICHAL-CANCINO, B. A. (2024). Neurotoxicity of glyphosate: Focus on molecular mechanisms probably associated with alterations in cognition and behavior. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 106, 104381. doi:10.1016/j.etap.2024.104381
- CHOU, W. Y., MARKY, L. A., ZAUNCZKOWSKI, D., BRESLAUER, K. J. (1987). The Thermodynamics of drug-DNA interactions: Ethidium bromide and propidium iodide. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 5(2), 345–359. doi: 10.1080/07391102.1987.10506399
- CONNOLLY, A., COGGINS, M. A., KOCH, H. M. (2020). Human Biomonitoring of Glyphosate Exposures: State-of-the-Art and Future Research Challenges. *Toxics*, 8(3), 60. doi:10.3390/toxics8030060
- CROP LIFE INTERNATIONAL (2022). EU Pesticide Renewal Monitor. *Crop Life International*, 2022. aug. 31.
- CUI, L., KINNUNEN, T., BOLTZE, J., NYSTEDT, J., JOLKKONEN, J. (2016). Clumping and viability of bone marrow derived mesenchymal stromal cells under different preparation procedures: a flow cytometry-based *in vitro* study. *Stem Cells International*, 2016(1). doi:10.1155/2016/1764938
- DAL' BÓ, I. F., TEIXEIRA, E. S., RABI, L. T., PERES, K. C., NASCIMENTO, M., CHIAMOLERA, M. I., MÁXIMO, V., BUFALO, N. E., WARD, L. S. (2022). Alternation between toxic and proliferative effects of Roundup® on human thyroid cells at different concentrations. *Frontiers in Endocrinology*, 13. doi:10.3389/fendo.2022.904437
- DARVAS, B. (2000). Virágot Oikosnak – Kísértések kémiai és genetikai biztonságunk ürügyén. Budapest: L'Harmattan Kiadó. Elérhető: <https://mek.oszk.hu/09800/09886/>
- DARVAS, B. (2001). A critical ecotoxicological perspective on pesticides used in Hungary. <https://www.researchgate.net/publication/228506002>
- DARVAS, ZS., LÁSZLÓ, V. (2005). Sejtbiológia. Semmelweis Kiadó, Budapest,. 169-233. ISBN:963 39214 79 5

- DARZYNKIEWICZ, Z., HALICKA, H. D., ZHAO, H. (2010). Analysis of cellular DNA content by flow and laser scanning cytometry. Book section 137–147. doi: 10.1007/978-1-4419-6199-0\_9
- DAVIS, F. R. (2014). *Banned: a history of pesticides and the science of toxicology*. New Haven, Yale University Press. 288. doi: 10.2307/j.ctt13x1tbs
- DEFARGE, N., TAKÁCS, E., LOZANO, V., MESNAGE, R., SPIROUX DE VENDÔMOIS, J., SÉRALINI, G.-E., SZÉKÁCS, A. (2016). Co-formulants in glyphosate-based herbicides disrupt aromatase activity in human cells below toxic levels. *International Journal of Environmental Research and Health*, 13(3), 264. doi: 10.3390/ijerph13030264
- DE ROOS, A. J., ZAHM, S. H., CANTOR, K. P., WEISENBURGER, D. D., HOLMES, F. F., BURMEISTER, L. F., BLAIR, A. (2003). Integrative assessment of multiple pesticides as risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men. *Occupational and Environmental Medicine*, 60(9), e11. doi:10.1136/oem.60.9.e11
- DILL, G. M., SAMMONS, R. D., FENG, P. C. C., KOHN, F., KRETZMER, K., MEHRSHAIKH, A., BLEEKE, M., HONEGGER, J. L., FARMER, D., WRIGHT, D., HAUPFEAR, E. A. (2010). Glyphosate: discovery, development, applications, and properties. In: Nandula VK, editor. *Glyphosate Resistance in Crops and Weeds*. Hoboken (NJ): Wiley, 1–33. doi: 10.1002/9780470634394.ch1
- DONLEY, N. (2019). The USA lags behind other agricultural nations in banning harmful pesticides. *Environmental Health*, 18(1), 44. doi:10.1186/s12940-019-0488-0
- DUKE, S. O. (2012). Why have no new modes of action appeared in recent years? *Pest Management Science*, 68(4), 505–512. doi: 10.1002/ps.2333
- ESCHER, B. I., STAPLETON, H. M., SCHYMANSKI, E. L. (2020). Tracking complex mixtures of chemicals in our changing environment. *Science*, 367(6476), 388–392. doi:10.1126/science.aay6636
- EC (EUROPEAN COMMISSION) (EURÓPAI BIZOTTSÁG) (2016). Commission Implementing Regulation (EU) 2016/1313 of 1 August 2016 amending Implementation Regulation (EU) No 540/2011 as regards the conditions of approval of the active substance glyphosate. *Official Journal of the European Union*, L208, 1–3. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:32016R1313>
- EC (EUROPEAN COMMISSION) (EURÓPAI BIZOTTSÁG) (2017). Commission Implementing Regulation (EU) 2017/2324 of 12 December 2017 renewing the approval of the active substance glyphosate in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market, and amending the Annex to Commission Implementing Regulation (EU) No

- 540/2011. *Official Journal of the European Union*, L333, 10–16. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32017R2324>
- EC (EUROPEAN COMMISSION), (EURÓPAI BIZOTTSÁG) (2019). Communication from the Commission to the European Parliament, the European Council, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions, The European Green Deal, COM /2019/ 640 final. European Commission (EC), Brussels, Belgium. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A52019DC0640>
- EC (EUROPEAN COMMISSION) (EURÓPAI BIZOTTSÁG) (2020). Commission Implementing Regulation (EU) 2020/1740 of 20 November 2020 setting out the provisions necessary for the implementation of the renewal procedure for active substances, as provided for in Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council, and repealing Commission Implementing Regulation (EU) No 844/2012, *Official Journal of the European Union*, L392, 20–31. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32020R1740>
- EC (EUROPEAN COMMISSION), (EURÓPAI BIZOTTSÁG) (2021). EU Pesticides database. European Commission (EC), Brussels, Belgium. [https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/eu-pesticides-database\\_en](https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en)
- EC (EUROPEAN COMMISSION) (EURÓPAI BIZOTTSÁG) (2023). COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) 2023/2660 of 28 November 2023 renewing the approval of the active substance glyphosate in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council and amending Commission Implementing Regulation (EU) No 540/2011, *Official Journal of the European Union*, L2023/2660, 1-14. [https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=OJ:L\\_202302660](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=OJ:L_202302660)
- EFSA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY) (2024). Pesticide evaluations. European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy. <https://www.efsa.europa.eu/en/applications/pesticides>
- EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL (2005). of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC. *Official Journal of the European Union*, L309/1. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/?uri=celex%3A32005R0396>
- EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL (2006). REGULATION (EC) No 1907/2006 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 18 December 2006 L 396/1 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive

- 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC, *Official Journal of the European Union*, L396, 232. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R1907>
- EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL (2018). Regulation (EU) 2018/848 of the European Parliament and of the Council of 30 May 2018 on organic production and labelling of organic products and repealing Council Regulation (EC) No 834/2007, *Official Journal of the European Union*, L150, 23-40. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32018R0848>
- ECHA (EUROPEAN CHEMICALS AGENCY) EURÓPAI VEGYIANYAG-ÜGYNÖKSÉG, (2017). Glyphosate not classified as a carcinogen by ECHA. ECHA/PR/17/06, ECHA, Helsinki, Finland, Glyphosate-not-classified-as-a-carcinogen-by-ECHA-All-news-ECHA.pdf
- EUROPEAN COUNCIL DIRECTIVE (1986). 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes, *Official Journal of the European Union* L358, 1–28. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX:31986L0609>
- FARKAS, E., SZEKACS, A., KOVACS, B., OLAH, M., HORVATH, R., SZEKACS, I. (2018). Label-free optical biosensor for real-time monitoring the cytotoxicity of xenobiotics: A proof of principle study on glyphosate. *Journal of Hazardous Materials*, 351. doi:10.1016/j.jhazmat.2018.02.045
- FINGER, R., MÖHRING, N., KUDSK, P. (2023). Glyphosate ban will have economic impacts on European agriculture but effects are heterogenous and uncertain. *Communications Earth & Environment*, 4(1), 286. doi:10.1038/s43247-023-00951-x
- GALLI, F. S., MOLLARI, M., TASSINARI, V., ALIMONTI, C., UBALDI, A., CUVA, C., MARCOCCIA, D. (2024). Overview of human health effects related to glyphosate exposure. *Frontiers in Toxicology*, 6. doi:10.3389/ftox.2024.1474792
- GASNIER, C., DUMONT, C., BENACHOUR, N., CLAIR, E., CHAGNON, M.-C., SÉRALINI, G.-E. (2009). Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology*, 262(3), 184–191. doi:10.1016/j.tox.2009.06.006
- GEIGER, D. R., KAPITAN, S. W., TUCCI, M. A. (1986). *Glyphosate* inhibits photosynthesis and allocation of carbon to starch in sugar beet leaves. *Plant Physiology*, 82(2), 468–472. doi:10.1104/pp.82.2.468

- GILDEN, R. C., HUFFLING, K., SATTTLER, B. (2010). Pesticides and health risks. *Journal of Obstetric, Gynecologic Neonatal Nursing*, 39(1), 103–110. doi:10.1111/j.1552-6909.2009.01092.x
- GUERRERO SCHIMPF, M., MILESI, M. M., INGARAMO, P. I., LUQUE, E. H., VARAYOUD, J. (2017). Neonatal exposure to a glyphosate based herbicide alters the development of the rat uterus. *Toxicology*, 376, 2–14. doi: 10.1016/j.tox.2016.06.004
- GULICKSON, G. (2022). New Bayer crop herbicide with new mode of action coming by 2030. *Successful Farming* (2022 Febr. 17.) <https://www.agriculture.com/news/technology/new-bayer-row-crop-herbicide-with-new-mode-of-action-coming-by-2030-0>
- GYŐRI D. (1997). A talaj és a környezet. Veszprémi Egyetemi Kiadó, Veszprém, 1997.
- HÁHN, J., KRISZT, B., TÓTH, G., JIANG, D., FEKE-TE, M., SZABÓ, I., GÖBÖLÖS, B., URBÁNYI, B., SZOBOSZLAY, S., KASZAB, E. (2022). Glyphosate and glyphosate-based herbicides (GBHs) induce phenotypic imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 12, 18258. doi: 10.1038/s41598-022-23117-9
- HALKS-MILLER, M., FEDOR, V., TYSON, C. A. (1991). Overview of approaches to *in vitro* neurotoxicity testing. *Journal of the American College of Toxicology*, 10(6), 727–736. doi:10.3109/10915819109078665
- HEAP, I., DUKE, S. O. (2018). Overview of glyphosate-resistant weeds worldwide. *Pest Management Science*, 74(5), 1040–1049. doi:10.1002/ps.4760
- HERBERTH, B., MINKÓ, K., CSILLAG, A., JAFFREDO, T., MADARÁSZ, E. (2005). SCL, GATA-2 and Lmo2 expression in neurogenesis. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 23, 449–463. doi:10.1016/j.ijdevneu.2005.05.008
- HEU, C., BERQUAND, A., ELIE-CAILLE, C., NICOD, L. (2012). Glyphosate-induced stiffening of HaCaT keratinocytes, a Peak Force Tapping study on living cells, *Journal of Structural Biology*, 178 (1), 1–7. doi:10.1016/j.jsb.2012.02.007
- HORIUCHI, N., NAKAGAVA, K., SASAKI, Y., MINATO, K., FUJIWARA, Y., NEZU, K., OHE, Y., SAJIO, N., (1988). In vitro antitumor activity of mitomycin C derivative (RM-49) and new anticancer antibiotics (FK973) against lung cancer cell lines determined by tetrazolium dye (MTT) assay, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 22(3), 246–250. doi:10.1007/BF00273419
- HSIAO, C. C., YANG, A.-M., WANG, C., LIN, C.-Y. (2023). Association between glyphosate exposure and cognitive function, depression, and neurological diseases in a representative sample of US adults: NHANES 2013–2014 analysis. *Environmental Research*, 237, 116860. doi:10.1016/j.envres.2023.116860

- HUANG, K.-C., HUANG, T.-W., CHUANG, P.-Y., YANG, T.-Y., CHANG, S.-F. (2019). Zoledronate induces cell cycle arrest and differentiation by upregulating p21 in mouse MC3T3-E1 preosteoblasts. *International Journal of Medical Sciences*, 16(5), 751–756. doi:10.7150/ijms.32612
- HUMPAGE, A. R., FONTAINE, F., FROSCIO, S., BURCHAM, P., FALCONER, I. R. (2005). Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: role of cytochrome p-450 and oxidative stress. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 68(9), 739–753. doi: 10.1080/15287390590925465
- HUNYADI, K., BÉRES, I., KAZINCZY, G.(szerk) (2011). Gyomnövények, gyombiológia, gyomirtás, Mezőgazda Kiadó, ISBN: 963923978X
- IARC (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER)(NEMZETKÖZI RÁKKUTATÓ ÜGYNÖKSÉG) (2015). Some organophosphate insecticides and herbicides IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, IARC. Lyon,, France, 2015, 1–92. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol112/mono112-10.pdf>
- IARC (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER)(NEMZETKÖZI RÁKKUTATÓ ÜGYNÖKSÉG) (2017). Some organophosphate insecticides and herbicides IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, in: Glyphosate, 112, IARC, Lyon, France, 2017.321–412.
- INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (FRANCIAORSZÁG NEMZETI EGÉSZSÉGÜGYI ÉS ORVOSTUDOMÁNYI KUTATÓINTÉZETE) (2021). Glyphosate and glyphosate-based herbicides. Extract from «Pesticides and health effects: New data.» Collection Expertise collective. 22-26. <https://www.inserm.fr/wp-content/uploads/inserm-expertiscollective-pesticides2021-glyphosate-en.pdf>
- ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION) (NEMZETKÖZI SZABVÁNYÜGYI SZERVEZET) (2009). ISO 10993-5:2009 Biological evaluation of medical devices, Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, International Organization For Standardization, Geneva, Switzerland.
- IZUMI, Y., O'DELL, K. A., ZORUMSKI, C. F. (2024). Glyphosate as a direct or indirect activator of pro-inflammatory signaling and cognitive impairment. *Neural Regeneration Research*, 19 (10), 2212–2218. doi: 10.4103/1673-5374.391331
- JÁDY, A. GY., NAGY, Á. M., KÓHIDI, T., FERENCZI, S., TRETTER, L., MADARÁSZ, E. (2016). Differentiation-dependent energy production and metabolite utilization: a comparative study on neural stem cells, neurons, and astrocytes. *Stem Cells and Development*, 25(13), 995–1005. doi:10.1089/scd.2015.0388

- JAYASUMANA, C., GUNATILAKE, S., SENANAYAKE, P. (2014). *Glyphosate, hard water and nephrotoxic metals: are they the culprits behind the epidemic of chronic kidney disease of unknown etiology in Sri Lanka?* *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(2), 2125–2147. doi:10.3390/ijerph110202125
- JIANG, L., CAO, J., AN, Y., GENG, C., QU, S., JIANG, L., ZHONG, L. (2007). Genotoxicity of acrylamide in human hepatoma G2 (HepG2) cells. *Toxicology in Vitro*, 21(8), 1486–1492. doi:10.1016/j.tiv.2007.06.011
- KANATAS, P., TRAVLOS, I., GAZOULIS, I., ANTONOPOULOS, N., TATARIDAS, A., MPECHLIOULI, N., PETRAKI, D. (2022). Biostimulants and herbicides: a promising approach towards Green Deal implementation. *Agronomy*, 12(12), 3205. doi:10.3390/agronomy12123205
- KAWAGUCHI, S., NAKAMURA, T., YAMAMOTO, A., HONDA, G., SASAKI, Y. F. (2010). Is the comet assay a sensitive procedure for detecting genotoxicity? *Journal of Nucleic Acids*, 1–8. doi:10.4061/2010/541050
- KHAN, A., GILLIS, K., CLOR, J., TYAGARAJAN, K. (2012). Simplified evaluation of apoptosis using the Muse cell analyzer. *Postepy Biochemii*, 58(4), 492–496. PMID: 23662443
- KIER, L. D., KIRKLAND, D. J. (2013). Review of genotoxicity studies of glyphosate and glyphosate-based formulations. *Critical Reviews in Toxicology*, 43(4), 283–315. doi: 10.3109/10408444.2013.770820
- KLÁTYIK, S., DARVAS, B., OLÁH, M., MÖRTL, M., TAKÁCS, E., SZÉKÁCS, A. (2017). Pesticide residues in spice paprika and their effects on environmental and food safety. *Journal of Food and Nutrition Research*, 56(3), 201218, <https://www.vup.sk/en/index.php?mainID=2&navID=34&version=2&volume=56&article=2063>
- KLÁTYIK, S., SIMON, G., OLÁH, M., MESNAGE, R., ANTONIOU, M. N., ZALLER, J. G., SZÉKÁCS, A. (2023). Terrestrial ecotoxicity of glyphosate, its formulations, and co-formulants: evidence from 2010–2023. *Environmental Sciences Europe*, 35(1) doi: 10.1186/s12302-023-00758-9
- KLÁTYIK, S., SIMON, G., OLÁH, M., TAKÁCS, E., MESNAGE, R., ANTONIOU, M. N., ZALLER, J. G., SZÉKÁCS, A. (2024). Aquatic ecotoxicity of glyphosate, its formulations, and co-formulants: evidence from 2010 to 2023. *Environmental Sciences Europe*, 36(1), 22. doi:10.1186/s12302-024-00849-1
- KLÁTYIK, S., SIMON, G., TAKÁCS, E., OLÁH, M., ZALLER, J. G., ANTONIOU, M. N., BENBROOK, C., MESNAGE, R., SZÉKÁCS, A. (2025). Toxicological concerns regarding glyphosate, its formulations, and co-formulants as environmental pollutants: a review of

- published studies from 2010 to 2025. *Archives of Toxicology*. online first. doi:10.1007/s00204-025-04076-2
- KNISS, A. R. (2017). Long-term trends in the intensity and relative toxicity of herbicide use. *Nature Communications*, 8(1), 14865. doi:10.1038/ncomms14865
- KOLLER, V. J., FÜRHACKER, M., NERSESYAN, A., MIŠÍK, M., EISENBAUER, M., KNASMUELLER, S. (2012). Cytotoxic and DNA-damaging properties of glyphosate and Roundup in human-derived buccal epithelial cells. *Archives of Toxicology*, 86(5), 805–813. doi:10.1007/s00204-012-0804-8
- KRIEGER, R. (2010). Hayes of referencing Handbook of Pesticide Toxicology, Third Edition, volume 1, 2, 525 B street, Suite 1800, San Diego, CA 92101-4495, USA.
- KUMARASAMY, M., TRAN, N., PATARROYO, J., MISHRA, S., MONOPOLI, M., MADARASZ, E., PUNTES, V. (2022). The effects of silver nanoparticle shape on protein adsorption and neural stem cell viability. *ChemistrySelect*, 7(39). doi:10.1002/slct.202201917
- LACROIX, R., KURRASCH, D. M. (2023). Glyphosate toxicity: *in vivo*, *in vitro*, and epidemiological evidence. *Toxicological Sciences*, 192(2), 131–140. doi:10.1093/toxsci/kfad018
- LAVRIK, I. N. (2005). Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *Journal of Clinical Investigation*, 115(10), 2665–2672. doi:10.1172/JCI26252
- LEINO, L., TALL, T., HELANDER, M., SALONIEMI, I., SAIKKONEN, K., RUUSKANEN, S., PUIGBÒ, P. (2021). Classification of the glyphosate target enzyme (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) for assessing sensitivity of organisms to the herbicide. *Journal of Hazardous Materials*, 408, 124556. doi:10.1016/j.jhazmat.2020.124556
- LI, H., QIAN, W., WENG, X., WU, Z., LI, H., ZHUANG, Q., FENG, B., BIAN, Y. (2012). Glucocorticoid receptor and sequential p53 activation by dexamethasone mediates apoptosis and cell cycle arrest of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *PLoS ONE*, 7(6), e37030. doi:10.1371/journal.pone.0037030
- LIU, M., FAN, F., SHI, P., TU, M., YU, C., YU, C., DU, M. (2018). Lactoferrin promotes MC3T3-E1 osteoblast cells proliferation via MAPK signaling pathways. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 137–143. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.08.151
- LOPES, A., BENVINDO-SOUZA, M., CARVALHO, W. F., NUNES, H. F., DE LIMA, P. N., COSTA, M. S., BENETTI, E. J., GUERRA, V., SABOIA-MORAIS, S. M. T., SANTOS, C. E., SIMÕES, K., BASTOS, R. P., DE MELO E SILVA, D. (2021). Evaluation of the genotoxic, mutagenic, and histopathological hepatic effects of polyoxyethylene amine (POEA) and glyphosate on *Dendropsophus minutus* tadpoles. *Environmental Pollution*, 289, 117911. doi:10.1016/j.envpol.2021.117911

- LUTRI, V. F., MATTEODA, E., BLARASIN, M., APARICIO, V., GIACOBONE, D., MALDONADO, L., BECHER QUINODOZ, F., CABRERA, A., GIULIANO ALBO, J. (2020). Hydrogeological features affecting spatial distribution of glyphosate and AMPA in groundwater and surface water in an agroecosystem. Córdoba, Argentina. *Science of The Total Environment*, 711, 134557 DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.134557
- MAC LOUGHLIN, T. M., PELUSO, M. L., APARICIO, V. C., MARINO, D. J. G. (2020). Contribution of soluble and particulate-matter fractions to the total glyphosate and AMPA load in water bodies associated with horticulture. *Science of The Total Environment*, 703, 134717. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.134717
- MADANI, N. A., CARPENTER, D. O. (2022). Effects of glyphosate and glyphosate-based herbicides like Roundup™ on the mammalian nervous system: A review. *Environmental Research*, 214, 113933. DOI: 10.1016/j.envres.2022.113933
- MAGYAR KÖZTÁRSASÁG (2000). 2000. évi XXXV. Törvény a növényvédelemről, 3§, 3 és 18. bekezdés. <https://mkogy.jogtar.hu/jogszabaly?docid=a0000035.TV>
- MANAS, F., PERALTA, L., RAVIOLO, J., OVANDO, H. G., WEYERS, A., UGNIA, L., GONZALEZ, M., LARRIPA, I., GORLA, N. (2009a). Genotoxicity of AMPA, the environmental metabolite of glyphosate, assessed by the Comet assay and cytogenetic tests, *Ecotoxicology and Environmental safety*, 72, 834-837. doi:10.1016/j.ecoenv.2008.09.019
- MANAS, F., PERALTA, L., RAVIOLO, J., OVANDO, H. G., WEYERS, A., UGNIA, L., CID, M. G., LARRIPA, I., GORLA, N. (2009b). Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28(1), 37–41. DOI: 10.1016/j.etap.2009.02.001
- MARAMBE, B., HERATH, S. (2020). Banning of herbicides and the impact on agriculture: the case of glyphosate in Sri Lanka. *Weed Science*, 68(3), 246–252. doi:10.1017/wsc.2019.71
- MASTERS, J. R. W. (ed.). (2000). *Animal Cell Culture* (J. R. W. Masters, Ed.). Oxford University PressOxford. doi:10.1093/oso/9780199637973.001.0001
- MASTERS, J. R., STACEY, G. N. (2007). Changing medium and passaging cell lines. *Nature Protocols*, 2(9), 2276–2284. doi:10.1038/nprot.2007.319
- MAXIMIZE MARKET RESEARCH, (2023). (Glyphosate Market: Global Analysis and Forecast 2029 (maximizemarketresearch.com))
- MCCOY, J. P. (2002). Basic principles of flow cytometry. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 16(2), 229–243. doi:10.1016/S0889-8588(01)00015-6
- MCDUGALL P. (2018). Evolution of the Crop Protection Industry since 1960. Phillips McDougall, Pathead, Scotland, UK. 1 17.

- MERRITT, A. J., ALLEN, T. D., POTTEN, C. S., HICKMAN, J. A. (1997). Apoptosis in small intestinal epithelia from p53-null mice: evidence for a delayed, p53-independent G2/M-associated cell death after  $\gamma$ -irradiation. *Oncogene*, 14(23), 2759–2766. doi:10.1038/sj.onc.1201126
- MESNAGE, R., MOESCH, C., GRAND, R. L. G., LAUTHIER, G., VENDÔMOIS, J. S. DE, GRESS, S., SÉRALINI, G.-E. (2012). Glyphosate exposure in a farmer's family. *Journal of Environmental Protection*, 03(09), 1001–1003. doi:10.4236/jep.2012.39115
- MESNAGE, R., BERNAY, B., SERALINI, G.E., (2013). Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity, *Toxicology* 313 122–128. doi:10.1016/j.tox.2012.09.006.
- MESNAGE, R., ANTONIOU, M. N. (2017). Facts and fallacies in the debate on glyphosate toxicity. *Frontiers in Public Health*, 5. doi:10.3389/fpubh.2017.00316
- MESNAGE, R., BENBROOK, C., ANTONIOU, M. N. (2019). Insight into the confusion over surfactant co-formulants in glyphosate-based herbicides. *Food and Chemical Toxicology*, 128, 137–145. doi:10.1016/j.fct.2019.03.053
- MESNAGE, R., IBRAGIM, M., MANDRIOLI, D., FALCIONI, L., TIBALDI, E., BELPOGGI, F., BRANDSMA, I., BOURNE, E., SAVAGE, E., MEIN, C. A., ANTONIOU, M. N. (2022a). Comparative toxicogenomics of glyphosate and roundup herbicides by mammalian stem cell-based genotoxicity assays and molecular profiling in Sprague-Dawley rats. *Toxicological Sciences*, 186 (1), 83–101. doi:10.1093/toxsci/kfab143
- MESNAGE, R., FERGUSON, S., BRANDSMA, I., MOELIJKER, N., ZHANG, G., MAZZACUVA, F., CALDWELL, A., HALKET, J., ANTONIOU, M. N. (2022b). The surfactant co-formulant POEA in the glyphosate-based herbicide RangerPro but not glyphosate alone causes necrosis in Caco-2 and HepG2 human cell lines and ER stress in the ToxTracker assay. *Food and Chemical Toxicology*, 168, 113380. doi:10.1016/j.fct.2022.113380
- MLADINIC, M., BEREND, S., VRDOLJAK, A. L., KOPJAR, N., RADIC, B., ZELJEZIC, D. (2009). Evaluation of genome damage and its relation to oxidative stress induced by glyphosate in human lymphocytes in vitro. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 50(9), 800–807. doi:10.1002/em.20495
- MOHAMMADI, Z., RAHAIE, M., MORADIFAR, F. (2024). A novel approach for colorimetric detection of glyphosate in food based on a split aptamer nanostructure and DNAzyme activity. *Journal of Fluorescence*. doi:10.1007/s10895-024-03998-x

- MOLIN, W. T. (1998). *Glyphosate*, a unique global herbicide. J. E. Franz, M. K. Mao, and J. A. Sikorski, ACS Monograph 189, 653 *Weed Technology*, 12(3), 564–565. doi:10.1017/S0890037X0004433X
- MONROY, C. M., CORTÉS, A. C., SICARD, D. M., DE RESTREPO, H. G. (2005). Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato. *Biomédica*, 25(3), 335. doi:10.7705/biomedica.v25i3.1358
- MONSANTO EUROPE S.A. (2015): Biztonsági adatlap – Roundup Classic: Antwerp: Monsanto Europe S.A./ N.V
- MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
- MORALES, M., PÉREZ, D., CORREA, L., RESTREPO, L. (2016). Evaluation of fibrin-based dermal-epidermal organotypic cultures for in vitro skin corrosion and irritation testing of chemicals according to OECD TG 431 and 439. *Toxicology in vitro*, 36, 89–96. doi:10.1016/j.tiv.2016.07.010
- MORDOR INTELLIGENCE LTD, GLYPHOSATE HERBICIDE MARKET (2020). Hyderabad, India, <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/glyphosate-herbicide-market>
- MÖRTL, M., NÉMETH, G., JURACSEK, J., DARVAS, B., KAMP, L., RUBIO, F., SZÉKÁCS, A. (2013). Determination of glyphosate residues in Hungarian water samples by immunoassay. *Microchemical Journal*, 107, 143–151. doi: 10.1016/j.microc.2012.05.021
- MYERS, J. P., Antoniou, M. N., Blumberg, B., Carroll, L., Colborn, T., Everett, L. G., Hansen, M., Landrigan, P. J., Lanphear, B. P., Mesnage, R., Vandenberg, L. N., vom Saal, F. S., Welshons, W. V., Benbrook, C. B. (2016). Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environmental Health*, 15, 19. doi: 10.1186/s12940-016-0117-0
- NABIH, H. K. (2021). Risk assessment of human carcinogenicity of acrylamide in food: way to reduce the predicted mitogenic side effects through mitigation strategy. In: Food Security and Safety, Springer International Publishing, 855–868. doi:10.1007/978-3-030-50672-8\_42
- NAGASAWA, H., TAKAHASHI, S., KOBAYASHI, A., TAZAWA, H., TASHIMA, Y., SATO, K. (2005). Effect of retinoic acid on murine preosteoblastic MC3T3-E1 cells. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 51(5), 311–318. doi:10.3177/jnsv.51.311
- NAGY, K., ARGAW TESSEMA, R., SZASZ, I., SMEIRAT, T., AL RAJO, A., ADAM, B. (2021). Micronucleus formation induced by glyphosate and glyphosate-based herbicides in human peripheral white blood cells. *Frontiers in Public Health*, 9 639143. doi:10.3389/fpubh.2021.639143.

- NAKAYAMA, Y., TAKAHASHI, K., NOJI, S., MUTO, K., NISHIJIMA, K., TANIGUCHI, S. (1990). Functional modes of retinoic acid in mouse osteoblastic clone MC3T3-E1, proved as a target cell for retinoic acid. *FEBS Letters*, 261(1), 93–96. doi:10.1016/0014-5793(90)80644-x
- NI, H., HU, X., YANG, N., LIU, X., CAI, W., ZHONG, R., WANG, T., YU, M., TANG, S. (2024). Roundup® induces premature senescence of mouse granulosa cells via mitochondrial ROS-triggered NLRP3 inflammasome activation. *Toxicological Research*, 40(3), 377–387. doi:10.1007/s43188-024-00229-0
- NICHOLSON, D. W., THORNBERRY, N. A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends in Biochemical Sciences*, 22(8), 299–306. doi: 10.1016/S0968-0004(97)01085-2
- NISHIMOTO, R. (2019). Global trends in the crop protection industry. *Journal of Pesticide Science*, 44(3), 141–147. doi:10.1584/jpestics.D19-101
- OLÁH, M., FARKAS, E., SZÉKÁCS, I., HORVATH, R., SZÉKÁCS, A. (2022). Cytotoxic effects of Roundup Classic and its components on NE-4C and MC3T3-E1 cell lines determined by biochemical and flow cytometric assays. *Toxicology Reports*, 9, 914–926. doi:10.1016/j.toxrep.2022.04.014
- OLIVE, P. L., BANÁTH, J. P., DURAND, R. E. (1990). Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay. *Radiation Research*, 122(1), 86. doi:10.2307/3577587
- OSTEN, J. R., BORGES-RAMÍREZ, M. M., RUIZ-VELAZCO, N. G., HELGUERA, E., ARELLANO-AGUILAR, O., PEREGRINA-LUCANO, A. A., LOZANO-KASTEN, F. (2025). Glyphosate and ampa in groundwater, surface water, and soils related to different types of crops in mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 114(3), 44. doi: 10.1007/s00128-025-04022-z
- OSTLING, O., JOHANSON, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123(1), 291–298. doi:10.1016/0006-291X(84)90411-X
- PAHWA, M., BEANE FREEMAN, L. E., SPINELLI, J. J., BLAIR, A., MCLAUGHLIN, J. R., ZAHM, S. H., CANTOR, K. P., WEISENBURGER, D. D., PUNAM PAHWA, P. P., DOSMAN, J. A., DEMERS, P. A., HARRIS, S. A. (2019). Glyphosate use and associations with non-Hodgkin lymphoma major histological sub-types: findings from the North American Pooled Project. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 45(6), 600–609. doi:10.5271/sjweh.3830

- PAGANELLI, A., GNAZZO, V., ACOSTA, H., LÓPEZ, S. L., CARRASCO, A. E. (2010). Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *Chemical Research in Toxicology*, 23(10), 1586–1595. doi: 10.1021/tx1001749
- PANDIR, D. (2014). DNA damage in human germ cell exposed to the some food additives in vitro. *Cytotechnology*, 68(4), 725–733. doi:10.1007/s10616-014-9824-y
- PETHŐ, Á., SOMOGYINÉ PÁLOS, É. (2010). Az Európai Közösségben használt növényvédő szer-hatóanyagok felülvizsgálati programja (1993-2009). *Növényvédelem*, 46 (7), 289 336.
- PHONG, L.T., THONG, T.A., Highly hazardous pesticides in Vietnam: a situational analysis. *International Pollutants Elimination Network (IPEN)*, 2020. doi:10.13140/RG.2.2.35174.45124
- POE-15 SDS (2019) Biztonsági adatlap [https://assets.lgcstandards.com/system/master/pdfs/hae/h17/10143593299998/SDS\\_DRE-C17136000\\_ST-WB-MSDS-2997514-1-1-1.PDF](https://assets.lgcstandards.com/system/master/pdfs/hae/h17/10143593299998/SDS_DRE-C17136000_ST-WB-MSDS-2997514-1-1-1.PDF)
- PORTIER, C. J., CLAUSING, P. (2017). Re: Tarazona et al., (2017). Glyphosate toxicity and carcinogenicity: a review of the scientific basis of the European Union assessment and its differences with IARC. *Archives of Toxicology*, 91(9), 3195–3197. doi:10.1007/s00204-017-2009-7
- PORTIER, C. J., ARMSTRONG, B. K., BAGULEY, B. C., BAUR, X., BELYAEV, I., BELLÉ, R., BELPOGGI, F., BIGGERI, A., BOSLAND, M. C., BRUZZI, P., BUDNIK, L. T., BUGGE, M. D., BURNS, K., CALAF, G. M., CARPENTER, D. O., CARPENTER, H. M., LÓPEZ-CARRILLO, L., CLAPP, R., COCCO, P., ZHOU, S.-F. (2016). Differences in the carcinogenic evaluation of glyphosate between the International Agency for Research on Cancer (IARC) and the European Food Safety Authority (EFSA). *Journal of Epidemiology and Community Health*, 70(8), 741–745. doi:10.1136/jech-2015-207005
- QIN, Y., LI, X., XIANG, Y., WU, D., BAI, L., LI, Z., LIANG, Y. (2017). Toxic effects of glyphosate on diploid and triploid fin cell lines from *Misgurnus anguillicaudatus*. *Chemosphere*, 180, 356–364. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.03.098
- RAIPULIS, J., TOMA, M., BALODE, M. (2009). Toxicity and genotoxicity testing of Roundup. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences.*, 63(1–2), 29–32. doi:10.2478/v10046-009-0009-6
- RANK, J., JENSEN, A.-G., SKOV, B., PEDERSEN, L. H., JENSEN, K. (1993). Genotoxicity testing of the Herbicide Roundup and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test, Salmonella mutagenicity test, and Allium anaphase-telophase test. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 300(1), 29–36. doi: 10.1016/0165-1218(93)90136-2

- RICHARDS, B. K., PACENKA, S., MEYER, M. T., DIETZE, J. E., SCHATZ, A. L., TEUFFER, K., ARISTILDE, L., STEENHUIS, T. S. (2018). Antecedent and post-application rain events trigger glyphosate transport from runoff-prone soils. *Environmental Science & Technology Letters*, 5(5), 249–254. doi:10.1021/acs.estlett.8b00085
- ROBIN, D.C., MARCHAND, P.A. (2021). The slow decrease of active substance candidates for substitution in the framework of the European Pesticide Regulation (EC) No 1107/2009. *European journal of risk regulation*, online first.
- ROCKSTRÖM, J., STEFFEN, W., NOONE, K., PERSSON, Å., CHAPIN, F. S., III, LAMBIN, E. F., LENTON, T. M., SCHEFFER, M., FOLKE, C., SCHELLNHUBER, H. J., NYKVIST, B., DE WIT, C. A., HUGHES, T., VAN DER LEEUW, S., RODHE, H., SÖRLIN, S., SNYDER, P. K., COSTANZA, R., SVEDIN, U., FALKENMARK, M., KARLBERG, L., CORELL, R. W., FABRY, V. J., HANSEN, J., WALKER, B., LIVERMAN, D., RICHARDSON, K., CRUTZEN, P., FOLEY, J. A. (2009). A safe operating space for humanity. *Nature*, 461, 472–475. doi: 10.1038/461472a
- RODBARD, D. (1981). Mathematics and statistics of ligand assays: an illustrated guide, in: J. Langan, J.J. Clapp (Eds.), *Ligand Assay: Analysis of International Developments on Isotopic and Nonisotopic Immunoassay*, Masson Publishing, New York, 45–99.
- ROMANO, M. A., ROMANO, R. M., SANTOS, L. D., WISNIEWSKI, P., CAMPOS, D. A., DE SOUZA, P. B., VIAU, P., BERNARDI, M. M., NUNES, M. T., DE OLIVEIRA, C. A. (2012). Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. *Archives of Toxicology*, 86(4), 663–673. doi: 10.1007/s00204-011-0788-9
- RONCO, M. G., RUSCITTI, M. F., ARANGO, M. C., BELTRANO, J. (2008). Glyphosate and mycorrhization induce changes in plant growth and in root morphology and architecture in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 83(4), 497–505. doi:10.1080/14620316.2008.11512413
- RUEDA-RUZAFÁ, L., CRUZ, F., ROMAN, P., CARDONA, D. (2019). Gut microbiota and neurological effects of glyphosate. *NeuroToxicology*, 75, 1–8. doi:10.1016/j.neuro.2019.08.006
- SAMMONS, R. D., GRUYS, K. J., ANDERSON, K. S., JOHNSON, K. A., SIKORSKI, J. A. (1995). Reevaluating glyphosate as a transition-state inhibitor of epsp synthase: identification of an epsp synthase.cntdot.EPSP.cntdot.glyphosate ternary complex. *Biochemistry*, 34(19), 6433–6440. doi: 10.1021/bi00019a024
- SAMSEL, A., SENEFF, S. (2013). Glyphosate's suppression of cytochrome p450 enzymes and amino acid biosynthesis by the gut microbiome: pathways to modern diseases. *Entropy*, 15(12), 1416–1463. doi: 10.3390/e15041416

- SANTOS, I., LOPES, A., SILVA, E. (2024). Environmental risk assessment of *glyphosate* and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in portuguese groundwater ecosystems. *Environments*, 11(11), 258. doi:10.3390/environments11110258
- SANTOVITO, A., NOTA, A., PASTORINO, P., GENDUSA, C., MIRONE, E., PREARO, M., SCHLEICHEROVÁ, D. (2024). *In vitro* genomic damage caused by glyphosate and its metabolite AMPA. *Chemosphere*, 363, 142888. doi:10.1016/j.chemosphere.2024.142888
- SCHLETT, K., HERBERTH, B., MADARÁSZ, E. (1997). *In vitro* pattern formation during neurogenesis in neuroectodermal progenitor cells immortalized by p53-deficiency. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 15, 795–804. doi:10.1016/s0736-5748(97)00015-4
- SCHLETT, K., MADARÁSZ, E. (1997). Retinoic acid induced neural differentiation in a neuroectodermal cell line immortalized by p53 deficiency. *Journal of Neuroscience Research*, 47(4), 405–415. doi: 10.1002/(SICI)1097-4547(19970215)47:4%3c405::AID-JNR6%3e3.0.CO;2-I
- SENEFF, S., KYRIAKOPOULOS, A. M., NIGH, G. (2024). Is autism a PIN1 deficiency syndrome? A proposed etiological role for glyphosate. *Journal of Neurochemistry*, 168(9), 2124-2146. doi:10.1111/jnc.16140
- SÉRALINI, G.-E., CLAIR, E., MESNAGE, R., GRESS, S., DEFARGE, N., MALATESTA, M., HENNEQUIN, D., DE VENDÔMOIS, J. S. (2012). RETRACTED: Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. *Food and Chemical Toxicology*, 50(11), 4221–4231. doi:10.1016/j.fct.2012.08.005
- SIGMA-ALDRICH 1, MEM Medium, Sigma-Aldrich product datasheet, <https://www.sigmaaldrich.com/HU/hu/product/sigma/m0643>
- SIGMA-ALDRICH 2, Alpha MEM Medium, Sigma-Aldrich datasheet, <https://www.sigmaaldrich.com/HU/hu/product/sigma/m0894>
- SINGH, R., SHUKLA, A., KAUR, G., GIRDHAR, M., MALIK, T., MOHAN, A. (2024). Systemic analysis of *glyphosate* impact on environment and human health. *ACS Omega*, 9(6), 6165–6183. doi:10.1021/acsomega.3c08080
- SOLDATOW, V. Y., LECLUYSE, E. L., GRIFFITH, L. G., RUSYN, I. (2013). *In vitro* models for liver toxicity testing. *Toxicology Research*, 2(1), 23–39. doi:10.1039/C2TX20051A
- SOULEYMANE ABDOUL-AZIZE, RACHID ZOUBAIRI, OLIVIER BOYER. (2025). Opposing calcium-dependent effects of GsMTx4 in acute lymphoblastic leukemia: *in vitro* proliferation vs. *in vivo* survival advantage. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(10),4822. doi: 10.3390/ijms26104822

- SPEIT, G., HARTMANN, A. (1999). The Comet Assay (Single-Cell Gel Test): A sensitive genotoxicity test for the detection of dna damage and repair. *DNA Repair Protocols*, 113, 203-12. doi:10.1385/1-59259-675-4:203
- STEINRÜCKEN, H. C., AMRHEIN, N. (1980). The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 94(4), 1207–1212. doi: 10.1016/0006-291X(80)90547-1
- STEFFEN, W., RICHARDSON, K., ROCKSTRÖM, J., CORNELL, S. E., FETZER, I., BENNETT, E. M., BIGGS, R., CARPENTER, S. R., DE VRIES, W., DE WIT, C. A., FOLKE, C., GERTEN, D., HEINKE, J., MACE, G. M., PERSSON, L. M., RAMANATHAN, V., REYERS, B., SÖRLIN, S. (2015). Planetary boundaries: guiding human development on a changing planet. *Science*, 347, 1259855. doi: 10.1126/science.1259855
- SUWARDJI, S., SUDANTHA, I. M. (2021). The fate of glyphosate in soil and water: A Review. *Jurnal Penelitian Pendidikan IPA*, 7(Special Issue), 389–399. doi:10.29303/jppipa.v7iSpecialIssue.971
- SUN, H., HE, Z., GAO, Y., YANG, Y., WANG, Y., GU, A., XU, J., QUAN, Y. YANG, Y. (2024). Polyoxyethylene tallow amine and glyphosate exert different developmental toxicities on human pluripotent stem cells-derived heart organoid model. *Science of The Total Environment*, 918, 170675. doi:10.1016/j.scitotenv.2024.170675
- SZÉKÁCS A. (2006). Gyomirtó szerek. In: Darvas B. Székács A. (szerk.): Mezőgazdasági ökotoxikológia. l'Harmattan, Budapest 95-112.
- SZÉKÁCS, A., DARVAS, B. (2012). Forty years with glyphosate. In: *Herbicides –Properties, Synthesis and Control of Weeds* (Hasaneen, M. N. A. E.-G., Ed.), InTech, Rijeka, Croatia, 247-284. doi:10.5772/32491
- SZÉKÁCS, A., DARVAS, B. (2018). Re-registration challenges of glyphosate in the european union. *Frontiers in Environmental Science*, 6. doi:10.3389/fenvs.2018.00078
- SZÉKÁCS, A., MÖRTL, M., DARVAS, B. (2015). Monitoring pesticide residues in surface and ground water in Hungary: surveys in 1990–2015. *Journal of Chemistry*, 1–15. doi: 10.1155/2015/717948
- SZÉKÁCS, A. (2021). Herbicide mode of action. In: *Herbicides. Chemistry, Efficacy, Toxicology and Environmental Impacts* (Mesnage, R., Zaller, J. G., Eds.), Elsevier. Amsterdam, Netherlands, 41-86. ISBN 978-0-12-823674-1
- SZEKACS, I., FARKAS, E., GEMES, B.L., TAKACS, E., SZEKACS, A., HORVATH, R. (2018). Integrin targeting of glyphosate and its cell adhesion modulation effects on osteoblastic MC3T3-E1 cells revealed by label-free optical biosensing. *Scientific Reports*, 8, 17401. doi:10.1038/s41598-018-36081-0

- SZÉKÁCS, I., FEJES, Á., KLÁTYIK S., TAKÁCS, E., PATKÓ, D., POMÓTHY, J., MÖRTL, M., HORVÁTH, R., MADARÁSZ, E., DARVAS, B., SZÉKÁCS, A. (2014). Environmental and toxicological impacts of glyphosate with its formulating adjuvant. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 8(3), 213-218. Available online at: <https://waset.org/publications/9997659/environmentaland-toxicological-impactsof-glyphosate-with-its-formulating-adjuvant>.
- TABREZ, S., PRIYADARSHINI, M., PRIYAMVADA, S., KHAN, M. S., NA, A., ZAIDI, S. K. (2014). Gene–environment interactions in heavy metal and pesticide carcinogenesis. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 760, 1–9. doi:10.1016/j.mrgentox.2013.11.002
- TAJNAIOVÁ, L., VURM, R., KHOLOMYEVA, M., KOBERA, M., KOČÍ, V. (2020). Determination of the ecotoxicity of herbicides roundup® classic pro and garlon new in aquatic and terrestrial environments. *Plants*, 9(9), 1203. doi:10.3390/plants9091203
- TAN, Y.-M., SOBUS, J., CHANG, D., TORNERO-VELEZ, R., GOLDSMITH, M., PLEIL, J., DARY, C. (2012). Reconstructing human exposures using biomarkers and other “clues.” *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 15(1), 22–38. doi:10.1080/10937404.2012.632360
- TARAZONA, J. V., COURT-MARQUES, D., TIRAMANI, M., REICH, H., PFEIL, R., ISTACE, F., CRIVELLENTI, F. (2017). Response to the reply by C. J. Portier and P. Clausen, concerning our review “Glyphosate toxicity and carcinogenicity: a review of the scientific basis of the European Union assessment and its differences with IARC.” *Archives of Toxicology*, 91(9), 3199–3203. doi:10.1007/s00204-017-2032-8
- THIEL, K. L., DA SILVA, J., WOLFARTH, M., VANINI, J., HENRIQUES, J. A. P., DE OLIVEIRA, I. M., DA SILVA, F. R. (2024). Assessment of cytotoxic and genotoxic effects of glyphosate-based herbicide on glioblastoma cell lines: Role of p53 in cellular response and network analysis. *Toxicology*, 508, 153902. doi:10.1016/j.tox.2024.153902
- THONGPRAKAISANG, S., THIAANTANAWAT, A., RANGKADILOK, N., SURIYO, T., SATAYAVIVAD, J. (2013). Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 129–136. DOI: 10.1016/j.fct.2013.05.057
- TÓKÉS, G. (2020). Csökken-e a növényvédő szer hatóanyagok száma? *Növényvédelem* 56(3), 134-138.
- TOMBULOGLU, A., COPOGLU, H., AYDIN-SON, Y., GURAY, N. T. (2020). In vitro effects of boric acid on human liver hepatoma cell line (HepG2) at the half-maximal inhibitory

- concentration. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 62, 126573. doi:10.1016/j.jtemb.2020.126573
- TÓTH, G., HÁHN, J., RADÓ, J., SZALAI, D.A., KRISZT, B., SZOBOSZLAY, S. (2020): Cytotoxicity and hormonal activity of glyphosate-based herbicides. *Environmental Pollution*, 265, 115027. doi:10.1016/j.envpol.2020.115027
- TOWLER, D., ST. ARNAUD, R. (2002). Use of cultured osteoblastic cells to identify and characterize transcriptomal regulatory complexes. In: *Principles of Bone Biology*, BILEZIKIAN, J. P., RAISZ, L. G., RODAN, G. A., Eds., Academic Press, San Diego, CA, USA, 1506–1507. doi:10.1016/B978-012098652-1.50190-6
- TOWNSEND, M., PECK, C., MENG, W., HEATON, M., ROBISON, R., O'NEILL, K. (2017). Evaluation of various glyphosate concentrations on DNA damage in human Raji cells and its impact on cytotoxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 85, 79–85. doi:10.1016/j.yrtph.2017.02.002
- TRANSPARENCY MARKET RESEARCH, (2016). Global glyphosate market to reach US\$ 8.79 bn by 2019 propelled by increasing adoption of genetically modified crops. Transparency Market Research Pvt. Ltd., Albany, USA. <http://www.transparencymarketresearch.com/pressrelease/glyphosate-market.htm>.
- TRAVLOS, I., CHEIMONA, N., BILALIS, D. (2017). Glyphosate efficacy of different salt formulations and adjuvant additives on various weeds. *Agronomy*, 7(3), 60. doi:10.3390/agronomy7030060
- TSUI, M. T. K., CHU, L. M. (2003). Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, 52(7), 1189–1197. doi: 10.1016/S0045-6535(03)00306-0
- TURNER, J. A. (2021): *The Pesticide Manual*. 19th ed. British Crop Production Council, Brighton, UK.
- TUSH, D., MEYER, M. T. (2016). Polyoxyethylene tallow amine, a glyphosate formulation adjuvant: soil adsorption characteristics, degradation profile, and occurrence on selected soils from agricultural fields in Iowa, Illinois, Indiana, Kansas, Mississippi, and Missouri. *Environmental Science & Technology*, 50(11), 5781–5789. doi:10.1021/acs.est.6b00965
- US EPA (AMERIKAI KÖRNYEZETVÉDELMI HIVATAL ) (1994). United States Environmental Protection Agency: Pesticides industry sales and usage, 1992 and 1993 market estimates by Arnold L. Aspelin, Washington DC, USA: Office of Pesticide Programs, Office of prevention, pesticides and toxic substances
- VERECKEN, H. (2005). Mobility and leaching of glyphosate: a review. *Pest Management Science*, 61(12), 1139–1151. doi:10.1002/ps.1122

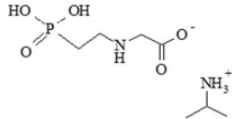
- VIRÁG, L., KERÉKGYÁRTÓ, C., FACHET, J. (1995). A simple, rapid and sensitive fluorimetric assay for the measurement of cell-mediated cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, 185(2), 199–208. doi: 10.1016/0022-1759(95)00115-Q
- WANG, F., XIANG, L., SZE-YIN LEUNG, K., ELSNER, M., ZHANG, Y., GUO, Y., PAN, B., SUN, H., AN, T., YING, G., BROOKS, B. W., HOU, D., HELBLING, D. E., SUN, J., QIU, H., VOGEL, T. M., ZHANG, W., GAO, Y., SIMPSON, M. J., TIEDJE, J. M. (2024). Emerging contaminants: A One Health perspective. *The Innovation*, 5(4), 100612. doi:10.1016/j.xinn.2024.100612
- WANG, Z., WALKER, G. W., MUIR, D. C. G., NAGATANI-YOSHIDA, K. (2020). Toward a global understanding of chemical pollution: A first comprehensive analysis of national and regional chemical inventories. *Environmental Science & Technology Journal.*, 54, 2575–2584. doi: 10.1021/acs.est.9b06379
- WHO (World Health Organization) (2004). A vegyi anyagok kockázatának értékelése: harmonizált módszertan. Egészségügyi Világszervezet, Genf. Elérhető: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42908/9241562676\\_hun.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42908/9241562676_hun.pdf)
- WILLIAMS, A. L., WATSON, R. E., DESESSO, J. M. (2012). Developmental and reproductive outcomes in humans and animals after glyphosate exposure: a critical analysis. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 15(1), 39–96. doi: 10.1080/10937404.2012.632361
- WINSTONE, J. K., PATHAK, K. V., WINSLOW, W., PIRAS, I. S., WHITE, J., SHARMA, R., HUENTELMAN, M. J., PIRROTTE, P., VELAZQUEZ, R. (2022). Glyphosate infiltrates the brain and increases pro-inflammatory cytokine TNF $\alpha$ : implications for neurodegenerative disorders. *Journal of Neuroinflammation*, 19(1), 193. doi:10.1186/s12974-022-02544-5
- WOZNIAK, K., ARABSKI, M., MAŁECKA-PANAS, E., DRZEWOSKI, J., BŁASIAK, J. (2004). DNA damage in human colonic mucosa cells induced by bleomycin and the protective action of vitamin E, *Cellular & Molecular Biology Letters*, 9 (1) 31–45. [http://www.cmbl.org.pl/pdf/Vol9\\_p031.pdf](http://www.cmbl.org.pl/pdf/Vol9_p031.pdf) .
- YOU, Z., LI, LAMBRECHTS, ZHANG, LIU, GE, YIN, XI, M. (2013). Glyphosate and AMPA inhibit cancer cell growth through inhibiting intracellular glycine synthesis. *Drug Design, Development and Therapy*, 635. doi: 10.2147/DDDT.S49197
- YOUNG, F. (2015) Endocrine disruption and cytotoxicity of Glyphosate and Roundup in human JAr cells in vitro. *Integrative Pharmacology, Toxicology and Genotoxicology*, 1(2). doi:10.15761/IPTG.1000114
- ZHANG, L., RANA, I., SHAFFER, R. M., TAIOLI, E., & SHEPPARD, L. (2019). Exposure to glyphosate-based herbicides and risk for non-Hodgkin lymphoma: A meta-analysis and

supporting evidence. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 781, 186–206.  
doi:10.1016/j.mrrev.2019.02.001

ZYOD, S., WARING, W., AL-JABI, S., SWEILEH, W. (2017). Global research production in glyphosate intoxication from 1978 to 2015: A bibliometric analysis. *Human Experimental Toxicology*, 36(10), 997–1006. doi: 10.1177/0960327116678299

## TÁBLÁZATOK ÉS BIZTONSÁGI ADATLAPOK

### 1. táblázat A vizsgált GLY hatóanyag és GLY-tartalmú növényvédőszer-, valamint formázószer összetétele és jellemzői

| Hatóanyag megnevezése                 | CAS szám                   | Aktív hatóanyag koncentrációja    | Szerkezeti képlet                                                                     | Adalékanyag koncentrációja | Fizikai megjelenés                |
|---------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|
| glyphosate-izopropilammónium-só       | 38641-94-0                 | 62%                               |    | —                          | vízoldható emulzió                |
| (GLY-IPA-só)                          |                            | (486 g/l GLY                      |                                                                                       |                            |                                   |
|                                       |                            | szabad sav)                       |                                                                                       |                            |                                   |
| Növényvédőszer-készítmény megnevezése | Aktív hatóanyag            | Az aktív hatóanyag koncentrációja | Adalékanyagok                                                                         | Adalékanyag koncentrációja | Formuláció típusa                 |
| Roundup Classic                       | GLY-IPA-só                 | 41,5% (360 g/l GLY szabad sav)    | polietoxilált faggyúaminok keveréke (POE-15)                                          | 15,50%                     | folyékony vízoldható koncentrátum |
| Formázóanyag megnevezése              | CAS szám                   | A formázóanyag koncentrációja     | A formázóanyag szerkezeti képlete                                                     | Adalékanyag koncentrációja | Formuláció típusa                 |
| Emulson AG GPE 3SS                    | POE-15<br>(CAS 61791-26-2) | 100%                              |  | —                          | vízoldható emulzió                |

2. táblázat A GLY, a polietoxilált faggyúamin (POE-15) és a Roundup Classic esetében meghatározott 50%-os gátló koncentráció (IC<sub>50</sub>) a citotoxicitás és az apoptózis, valamint a legalacsonyabb genotoxikus dózis (LGD)\* értékei a genotoxicitási vizsgálatok esetében, az NE-4C és MC3T3-E1 sejtvonalon.

IC<sub>50</sub>-és LGD-értékek (Roundup Classic-kal ekvivalens koncentrációban (%)) és µg/ml értékben kifejezve)<sup>a</sup>

NE-4C <sup>b</sup>

| GLY-IPA                                 |             |         | POE-15          |         | R <sup>c</sup>  |                 |                |
|-----------------------------------------|-------------|---------|-----------------|---------|-----------------|-----------------|----------------|
|                                         | (%)         | (µg/ml) | (%)             | (µg/ml) | (%)             | GLY-IPA (µg/ml) | POE-15 (µg/ml) |
| <b>Sejt életképesség</b>                |             |         |                 |         |                 |                 |                |
| MTT-teszt                               | 0,652±0,006 | 3168,72 | 0,00315±0,00007 | 5,72    | 0,00995±0,00010 | 48,36           | 18,06          |
| Életképesség vizsgálati készlet (Muse)  | 0,595±0,009 | 2891,7  | 0,00115±0,00007 | 2,09    | 0,00469±0,00008 | 22,79           | 8,51           |
| <b>DNS károsodás</b>                    |             |         |                 |         |                 |                 |                |
| Comet-teszt                             | 0,0259      | 125,87  | 0,0000089       | 0,043   | 0,00002         | 0,09            | 0,03           |
| DNS károsodás vizsgálati készlet (Muse) | 0,0376      | 182,55  | 0,000295        | 0,54    | 0,00117         | 5,68            | 2,12           |
| <b>Programozott sejthalál</b>           |             |         |                 |         |                 |                 |                |
| Apoptózis vizsgálati készlet (Muse)     | 0,246±0,134 | 1195,56 | 0,00092±0,00005 | 1,67    | 0,00238±0,00003 | 11,57           | 4,32           |
| Kaspáz 3/7 vizsgálati készlet (Muse)    | 0,568±0,043 | 2760,48 | 0,00099±0,00002 | 1,8     | 0,00748±0,00012 | 36,35           | 13,58          |

**MC3T3-E1<sup>b</sup>**

|                                         | <b>GLY-IPA</b> |         | <b>POE-15</b>   |         | <b>R<sup>c</sup></b> |                 |                |
|-----------------------------------------|----------------|---------|-----------------|---------|----------------------|-----------------|----------------|
|                                         | (%)            | (µg/ml) | (%)             | (µg/ml) | (%)                  | GLY-IPA (µg/ml) | POE-15 (µg/ml) |
| <b>Sejt életképesség</b>                |                |         |                 |         |                      |                 |                |
| MTT-teszt                               | 0.7256±0.0068  | 3526,42 | 0.00639±0.00003 | 11,60   | 0.0101±0.0004        | 49,09           | 18,33          |
| Életképesség vizsgálati készlet (Muse)  | 1.2495±0.0024  | 6072,57 | 0.00936±0.00085 | 16,99   | 0.0187±0.0007        | 90,88           | 33,94          |
| <b>DNS károsodás</b>                    |                |         |                 |         |                      |                 |                |
| Comet-teszt                             | 1.2624±0.0604  | 6135,26 | 0.09686±0.00102 | 175,82  | 0.2307±0.0083        | 1121,20         | 418,76         |
| DNS károsodás vizsgálati készlet (Muse) | 1.8864±0.1121  | 9167,90 | 0.02576±0.00047 | 46,76   | 0.2091±0.0034        | 1016,23         | 379,55         |
| <b>Programozott sejthalál</b>           |                |         |                 |         |                      |                 |                |
| Apoptózis vizsgálati készlet (Muse)     | 0.2731±0.0045  | 1327,27 | 0.01169±0.00048 | 21,22   | 0.0167±0.0013        | 81,16           | 30,31          |
| Kaspáz 3/7 vizsgálati készlet (Muse)    | 0.6412±0.0339  | 3116,23 | 0.00649±0.00012 | 11,78   | 0.0073±0.0001        | 35,48           | 13,25          |

\* Az LGD-érték az a koncentráció, ahol a genotoxikus hatás megfigyelhető a kontrollkezeléshez képest.

<sup>a</sup> A vizsgálati anyagok megfelelő koncentrációját tartalmazó hígított Roundup Classic tömegszázalékos koncentrációja.

<sup>b</sup> Sejtvonalak - NE-4C: egy neuroektodermális őssejtvonal, amit egy 9-napos egér embrió agyi vezikulumából izoláltak, melyből hiányzik a funkcionális p53 gén; MC3T3-E1: Mus musculus (egér) koponyából származó csontvelő prekursor sejtvonal.

<sup>c</sup> A Roundup Classic-ban a GLY hatóanyag és a formázószer POE-15 százalékos koncentrációi, valamint a hatóanyag és a formázószer tényleges koncentrációi az adott tömeg/térfogat koncentrációban vannak feltüntetve.

3. táblázat *GLY* és az élelmiszer-adalékanyagok genotoxikus hatásainak (megfigyelt genotoxiciási érték mM-ban meghatározva) összehasonlítása comet-tesztel.

| Vegyület                       | Genotoxiciási<br>teszt típus | Sejtvonal <sup>a</sup> | LGD-érték <sup>b</sup> ,<br>megfigyelt<br>genotoxitás<br>(mM) | Hivatkozás                       |
|--------------------------------|------------------------------|------------------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| bleomicin                      | Comet                        | HCM                    | 0,0000706                                                     | WOZNIAK <i>et al.</i> , 2004.    |
| brilliantkék                   | Comet                        | HSP                    | 0,252                                                         | PANDIR, 2014.                    |
| sunset yellow<br>/narancssárga | Comet                        | HSP                    | 0,442                                                         | PANDIR, 2014.                    |
| dezoxinivalenol<br>(DON)       | Comet                        | Caco-2                 | 0.0005 <sup>c</sup>                                           | BONY <i>et al.</i> , 2006.       |
| Citromsav                      | Comet                        | HSP                    | 0,52                                                          | PANDIR, 2014.                    |
| <i>GLY</i>                     | Comet/ DNS<br>károsodás      | NE-4C                  | 0,552<br>(~0.80) <sup>d</sup>                                 | saját vizsgálat                  |
| benzoesav                      | Comet                        | HSP                    | 1,637                                                         | PANDIR, 2014.                    |
| <i>GLY</i>                     | Comet/ DNS<br>károsodás      | MC3T3-E1               | 1,779<br>-0,798                                               | saját vizsgálat                  |
| Akrilamid                      | Comet                        | HepG2                  | 2,5                                                           | JIANG <i>et al.</i> , 2007.      |
| Bórsav                         | Comet                        | HepG2                  | 24 <sup>e</sup>                                               | TOMBULOGLU <i>et al.</i> , 2020. |

<sup>a</sup>A szakirodalomban vizsgált sejtvonalak: - HCM: humán vastagbélnyálkahártya sejtek; HSP: humán spermium sejtek; Caco-2: humán kolorektális adenokarcinóma sejtek; NE-4C: 9-napos egérembriók egér embriók agyának középső vezikuláiból létrehozott sejtek, amelyekből hiányzik a funkcionális p53 gén; MC3T3-E1: oszteoblaszt prekursor (preoszteoblaszt), *Mus musculus* (egér) koponyából származó sejtvonal; HepG2: humán hepatokarcinóma sejtvonal.

<sup>b</sup>A legalacsonyabb genotoxikus dózis (LGD) érték azt a legalacsonyabb dózist jelenti, amelynél a vizsgált anyag pozitív választ okoz a genotoxiciási vizsgálatban.

<sup>c</sup>IC<sub>10</sub> gátlási koncentráció érték

<sup>d</sup>Jelentős DNS-károsodást figyeltek meg a negatív kontrollban is, mivel a p53 tumorszupresszor gén elnémult az NE-4 C sejtvonalban, ezért a sejtek nem képesek javítani a látszólagos DNS-töréseket.

<sup>e</sup>A genotoxiciási szintet a citotoxicitás szintjén (IC<sub>50</sub>) mértük.

## MONSANTO Europe S.A./N.V.

Biztonsági adatlap  
Kereskedelmi termék

### 1. TERMÉK ÉS VÁLLALAT AZONOSÍTÁS

- 1.1. Termék azonosító**  
**Roundup® Classic**
- 1.1.1. Vegyi elnevezés**  
A keverékre nem alkalmazható.
- 1.1.2. Szinonimák**  
Nincs
- 1.1.3. CLP VI. függelék, indexszám**  
Nem alkalmazható.
- 1.1.4. C&L azonosítószám**  
Nem érhető el.
- 1.1.5. EC szám**  
A keverékre nem alkalmazható.
- 1.1.6. REACH reg. szám**  
A keverékre nem alkalmazható.
- 1.1.7. CAS szám**  
A keverékre nem alkalmazható.
- 1.2. A termék használata**  
Gyomirtó szer
- 1.3. Vállalat/(kereskedés)**  
MONSANTO Europe S.A./N.V.  
Haven 627, Scheldelaan 460, B-2040  
Antwerp, Belgium  
**Telefon:** +32 (0)3 568 51 11  
**Fax:** +32 (0)3 568 50 90  
**E-mail:**  
safety.datasheet@monsanto.com
- 1.4. Vészhelyzeti telefonszámok**  
**Telefon:** Belgium +32 (0)3 568 51 23

### 2. VESZÉLYEK AZONOSÍTÁSA

- 2.1. Osztályozás**
- 2.1.1. Osztályozás az EK 1272/2008-as [CLP] rendeletének megfelelően (gyártói önosztályozás)**  
Szemkárosodás - 1. kategória  
H318 Súlyos szemkárosodást okoz
- 2.1.2. Nemzeti osztályozás - Magyarország**  
Szemkárosodás - 1. kategória  
H318 Súlyos szemkárosodást okoz
- EU-címke (gyártói önosztályozás)** - Osztályozás/címkézés az EU 1999/45/EK veszélyes készítmények irányelve alapján.
- |                                        |                                                                                     |
|----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Xi - irritatív, N - környezeti veszély |                                                                                     |
| R36                                    | Irritálja a szemet.                                                                 |
| R51/53                                 | Mérgező a vízi szervezetekre, a vízi környezetben hosszan tartó károsodást okozhat. |
| S26                                    | Ha szembe jut, bő vízzel azonnal ki kell mosni és orvoshoz kell fordulni            |
| S35                                    | Az anyagot és az edényzetét megfelelő módon ártalmatlanítani kell                   |
| S39                                    | Viseljen szem-/arcvédő eszközöket.                                                  |

S57 A környezetszennyezés elkerülése érdekében megfelelő edényzetet kell használni

**Nemzeti osztályozás/címkézés - Magyarország**

Xi - irritatív, N - környezeti veszély  
R41 Súlyos szemkárosodást okozhat  
R51/53 Mérgező a vízi szervezetekre, a vízi környezetben hosszan tartó károsodást okozhat.  
S2 Gyermkek kezébe nem kerülhet  
S13 Élelmiszertől, italtól és takarmánytól távol tartandó  
S20/21 A használat közben enni, inni és dohányozni nem szabad  
S24/25 Kerülni kell a bőrrel való érintkezést és a szembe jutást.  
S26 Ha szembe jut, bő vízzel azonnal ki kell mosni és orvoshoz kell fordulni  
S35 Az anyagot és az edényzetét megfelelő módon ártalmatlanítani kell  
S37/39 Megfelelő védőkesztyűt és arc-/ szemvédőt kell viselni.  
S57 A környezetszennyezés elkerülése érdekében megfelelő edényzetet kell használni

**2.2. Címkézési elemek**

Címkézés az EK 1272/2008-as [CLP] rendeletének megfelelően

**2.2.1. Veszélyt jelző piktogramok**



**2.2.2. Figyelmeztetés**

Veszély

**2.2.3. Veszélyjelek, megállapítások**

H318 Súlyos szemkárosodást okoz

**2.2.4. Óvintézkedésre vonatkozó mondatok**

P280 Védőkesztyű, szemvédő használata kötelező.  
P305+351+338 SZEMBE KERÜLÉS esetén: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása.  
P310 Azonnal forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ/ orvoshoz.

**2.2.5. Kiegészítő veszélyességi információ**

EUH401 Az emberi egészség és a környezet veszélyeztetésének elkerülése érdekében be kell tartani a használati utasítás előírásait.

**2.2.6. Veszélyt jelző piktogramok Magyarország**



**2.2.7. Figyelmeztetés Magyarország**

Veszély

**2.2.8. Veszélyjelek, megállapítások Magyarország**

H318 Súlyos szemkárosodást okoz

**2.2.9. Óvintézkedésre vonatkozó mondatok Magyarország**

P102 Gyermkektől elzárva tartandó.  
P270 A termék használata közben tilos enni, inni vagy dohányozni.  
P280 Védőkesztyű, szemvédő használata kötelező.  
P305+351+338 SZEMBE KERÜLÉS esetén: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel.

P310 Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható.  
Az öblítés folytatása.  
P391 Azonnal forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ/orvoshoz.  
P501 A kiömlött anyagot össze kell gyűjteni.  
A tartalom/edény elhelyezése hulladékként: veszélyes hulladéklerakóba szállítás szükséges.

## 2.3. Egyéb veszélyek

0A keverék 0%-ban tartalmaz ismeretlen heveny toxicitású összetevőket  
0A keverék 0%-a olyan összetevőből/összetevőkből áll amely/amelyek veszélyessége vízi szervezetekre nem ismert.

### 2.3.1. Potenciális környezeti hatások

A javasolt felhasználási útmutató betartása esetén nem várható jelentős káros hatás.  
Nem perzisztens, bioakkumulációra nem hajlamos és nem toxikus (PBT), továbbá nem nagyon perzisztens, és bioakkumulációra nem nagyon hajlamos (vPvB) keverék.

## 2.4. Megjelenés és szag (szín/forma/szag):

Halványborsostyán-Halványbarna /Folyadék / Enyhé, aminok

A toxikológiai információkért tekintse meg a 11. fejezetet, a környezeti információkért pedig a 12. fejezetet.

## 3. AZ ALKOTÓRÉSZEK ÖSSZETEVŐI/INFORMÁCIÓI

### Hatóanyag

Isopropylamine salt of N-(phosphonomethyl)glycine; {Isopropylamine salt of glyphosate}

### Összetétel

| Összetevők                | CAS szám   | EC szám   | EU indexszám /<br>REACH reg. szám /<br>C&L azonosítószám | % tömeg<br>alapján<br>(hozzávetőlege<br>s) | Osztályozás                                                    |
|---------------------------|------------|-----------|----------------------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| glifozát izopropilamin só | 38641-94-0 | 933-426-9 | 015-184-00-8 /<br>- /<br>02-2119693876-15-<br>0000       | 41,5                                       | Vízi krónikus - 2. kategória;<br>H411; { c}<br>N; R51/53; { b} |
| etoxilált zsíramin        | 61791-26-2 | 500-153-8 | - /<br>- /<br>-                                          | 15,5                                       | Xn, Xi, N; R22, 41, 51/53; {<br>a}                             |
| víz                       | 7732-18-5  | 231-791-2 | - /<br>- /<br>-                                          | 43                                         | Nincs veszélyesként<br>osztályozva.;                           |

Az osztályozási kód teljes szövege: Lásd a 16. részt.

## 4. ELSŐSEGÉLYNYÚJTÁSI ELŐÍRÁSOK

Használja a 8. fejezetben javasolt személyi védelmi eszközöket.

### 4.1. Az elsősegélynyújtás leírása

#### 4.1.1. Szembejutás

Azonnal mossa le bő vízzel. Folytassa legalább 15 percig. Amennyiben könnyen megteheti, vegye ki a kontaktlencséket. Ha a tünetek nem szűnnek, forduljon orvoshoz.

#### 4.1.2. Bőrrel való érintkezés

Vegye le a szennyezett ruházatot, karórát és ékszereket. Az érintett bőrt területet mossa le bő vízzel. Az ismételt használat előtt mossa ki a ruhákat és tisztítsa meg a cipőket.

#### 4.1.3. Belélegzés

Vigye az érintett személyt szabad levegőre.

#### 4.1.4. Lenyelés

Azonnal itasson vizet. Soha ne adjon be semmit szájon át eszméletlen személynek. NE idézzon elő hányást, kivéve, ha arra orvosi személyzet utasítja. Tünetek esetén forduljon orvoshoz.

### 4.2. A legfontosabb akut és késleltetett tünetek, hatások

- 4.2.1. Potenciális egészségügyi hatások**  
**Valószínű expozíciós utak:** Bőrrel való érintkezés, szembejutás, belélegzés, ingestion  
**Szembejutás, rövid távú:** Súlyos szemkárosodást okoz  
**Bőrrel való érintkezés, rövid távú:** A javasolt felhasználási útmutató betartása esetén nem várható jelentős káros hatás.  
**Belélegzés, rövid távú:** A javasolt felhasználási útmutató betartása esetén nem várható jelentős káros hatás.  
**Egyszeri lenyelés:** A javasolt felhasználási útmutató betartása esetén nem várható jelentős káros hatás.
- 4.3. Az azonnali orvosi ellátásra és különleges kezelésre vonatkozó előírások**  
**4.3.1. Tanács orvosok számára**  
Ez a termék nem kolinészteráz-gátló.  
**4.3.2. Ellenanyag**  
Atropinnal és oximokkal folytatott kezelés nem javallott.

---

## 5. TŰZVÉDELMI ÓVINTÉZKEDÉSEK

- 5.1. Oltóanyag**  
**5.1.1.** Javasolt: -Víz, hab, száraz vegyi anyag, széndioxid (CO<sub>2</sub>)
- 5.2. Különleges veszélyek**  
**5.2.1. Szokatlan tűz- és robbanásveszélyek**  
A környezetszennyezés elkerülése érdekében minimalizálja a vízhasználatot.  
Környezetvédelmi óvintézkedések: lásd 6. rész.  
**5.2.2. Veszélyes égéstermékek**  
Szénmonoxid (CO), foszfor-oxid (P<sub>x</sub>O<sub>y</sub>), nitrogén-oxid (NO<sub>x</sub>)
- 5.3. Tűzoltóberendezés**  
Zárt rendszerű légzőkészülék A használat után a berendezést alaposan fertőtleníteni kell.
- 5.4. Lobbanáspont**  
Nem lobban

---

## 6. ÓVINTÉZKEDÉSEK VÉLETLENSZERŰ KIBOCSÁTÁS ESETÉN

Használja a 7. fejezet kezeléssel kapcsolatos javaslatait, valamint a 8. fejezet személyi védelemmel kapcsolatos javaslatait.

- 6.1. Környezetvédelmi óvintézkedések**  
Minimalizálja a kiömlést. Tartsa távol a vízelvezetőktől, a szennyvízcsatornáktól és a természetes vizektől. Értse a hatóságokat.
- 6.2. Tisztítási módszerek**  
Földdel, homokkal vagy abszorbens anyaggal itassa fel. Ássa fel az erősen szennyezett talajt.  
Ártalmatlanításhoz tartályokban gyűjtse össze. A tartálytípusokkal kapcsolatosan tekintse meg a 7. fejezetet. A környezetszennyezés elkerülése érdekében minimalizálja a vízhasználatot. NE öblítse le vízzel.

A kiömlött anyag ártalmatlanításával kapcsolatosan tekintse meg a 13. fejezetet.

---

## 7. KEZELÉS ÉS TÁROLÁS

A kezelésben és a személyi higiéniában helyes ipari gyakorlatot kell követni.

- 7.1. A biztonságos kezelésre vonatkozó óvórendszabályok**  
Kerülje a szemmel való érintkezést.  
A használat közben enni, inni és dohányozni nem szabad

Az anyag kezelése vagy a vele való érintkezés után alaposan mosson kezét.  
A használat után alaposan tisztítsa meg a berendezést.  
A berendezés öblítővizének ártalmatlanításakor ne szennyezze a vízelvezetőket, a szennyvízsztornákat és a természetes vizeket.  
A kiürített tartályok gőzt és termékmaradványt tartalmaznak.  
A CÍMKÉKEN TALÁLHATÓ FIGYELMEZTETÉSEKET A TARTÁLY KIÜRÍTÉSÉT KÖVETŐEN IS TARTSA BE.

#### 7.2. A biztonságos tárolás feltételei

Legalacsonyabb tárolási hőmérséklet: -15 °C  
Legmagasabb tárolási hőmérséklet: 50 °C  
Kompatibilis tárolási anyagok: rozsdamentes acél, üvegszál, műanyag, üveg béléssű műanyag  
Gyermekek kezébe nem kerülhet  
Tartsa távol az élelmiszerektől, az italoktól és az állateledelektől.  
Az eredeti tartályban tárolja.  
A minimális tárolási hőmérséklet alatti hosszú ideig tartó tárolás esetén részleges kristályosodás jöhet létre.  
Ha megfagyott, vigye meleg helyiségbe, és rázza fel gyakran a visszahelyezéshez az oldatba.  
Minimális eltarthatóság: 5 év.  
A környezetszennyezés elkerülése érdekében megfelelő edényzetet kell használni  
Ez a formuláció változás nélkül, 2-3 héttig tárolható -20 °C fok alatti hőmérsékleten. Amennyiben a -20 °C fok alatti hőmérséklet ennél hosszabb ideig fennmarad, akkor a formulációban lévő víz megfagyhat. Abban az esetben, ha ez bekövetkezik, hagyni kell a terméket felmelegedni és ezzel visszanyeri a homogén állapotát. Azt javasoljuk, hogy a felhasználó kövesse a tipikus felhasználási utasítást és a kiöntést megelőzően alaposan mozgassa meg a csomagolóeszközt.

## 8. EXPOZÍCIÓS HATÁRTÉRTÉKEK ÉS SZEMÉLYI VÉDELEM

### 8.1. Légúti expozíciós határértékek

| Összetevők                | Expozíciós határértékek                                           |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| glifozát izopropilamin só | Nem határoztak meg bizonyos foglalkozási expozíciós határértéket. |
| etoxilált zsíramin        | Nem határoztak meg bizonyos foglalkozási expozíciós határértéket. |
| víz                       | Nem határoztak meg bizonyos foglalkozási expozíciós határértéket. |

### 8.2. Technológiai ellenőrzések

Azonnal álljanak rendelkezésre szemkimosó eszközök azokon a helyszíneken, ahol a termék szemmel érintkezhet.

### 8.3. Személyi védőeszközökre vonatkozó előírások

#### 8.3.1. Szemvédelem:

Amennyiben fennáll a termékkel való érintkezés lehetősége: Viseljen vegyvédelmi szemüveget.

#### 8.3.2. Bőrvédelem:

Ismétlődő vagy hosszú időn át tartó érintkezés esetén:

Viseljen vegyálló kesztyűt.

A vegyszerálló kesztyű a következő vízhatlan anyagokból készített kesztyű: nitril, butil, neoprén, polivinil-klorid (PVC), természetes gumi és/vagy védőlaminátum.

#### 8.3.3. Légzésvédelem:

Az előírt módon történő használat esetén nincs különleges követelmény.

Ha javasolt, egy adott alkalmazáshoz szükséges megfelelő típusú berendezés kiválasztásához tanácsokért forduljon a személyi védőfelszerelés gyártójához.

## 9. FIZIKAI ÉS KÉMIAI JELLEMZŐK

Ezek a fizikai adatok a tesztelt anyagra vonatkozó jellemző értékek, amelyek azonban mintánként eltérők lehetnek. A jellemző értékek nem jelentenek biztosítékot egy adott készlet elemzésének garantált eredményére, vagy egy termék tulajdonságaira vonatkozóan.

|                                                    |                                              |
|----------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Szín/színtartomány:                                | Halványborostyán - Halványbarna              |
| Szag:                                              | Enyhe, aminok                                |
| Formuláció:                                        | Folyadék                                     |
| Fizikai állapot változások (olvadás, forrás stb.): |                                              |
| Olvadáspont:                                       | Nem alkalmazható.                            |
| Forráspont:                                        | Nincs adat                                   |
| Lobbanáspont:                                      | Nem lobban                                   |
| Robbanásveszélyes tulajdonságok:                   | Nincs robbanásveszélyes tulajdonság          |
| Öngyulladás hőmérséklet:                           | 443 °C                                       |
| Öngyorsuló bomlási hőmérséklet (SADT):             | Nincs adat                                   |
| Oxidáló tulajdonságok:                             | Nincs adat                                   |
| Fajsúly:                                           | 1,172 @ 20 °C / 4 °C                         |
| Gőznyomás:                                         | Nincs jelentős illanékonyosság; vizes oldat. |
| Párasűrűség:                                       | Nem alkalmazható.                            |
| Párolgási sebesség:                                | Nincs adat                                   |
| Dinamikus viszkozitás:                             | 73,2 mPa·s                                   |
| Kinematikus viszkozitás:                           | 62,47 cSt @ 20 °C                            |
| Sűrűség:                                           | 1,172 g/cm <sup>3</sup> @ 20 °C              |
| Oldhatóság:                                        | -Víz: Teljesen keveredő                      |
| pH:                                                | 4,4 - 4,9 @ 80 g/l                           |
|                                                    | 5,1 @ 10 g/l                                 |
| Megoszlatási hányados:                             | log Pow: < -3,2 @ 25 °C (glifozát)           |

## 10. STABILITÁS ÉS REAKCIÓKÉPESSÉG

- 10.1. Reakció képesség**  
Galvanizált acéllal vagy bevonatlan lágyacéllal reagál, és hidrogén képződik, amely egy fokozottan tűzveszélyes gáz, amely robbanást okozhat.
- 10.2. Stabilitás**  
Normál tárolási és használati körülmények között stabil.
- 10.3. Veszélyes reakciók lehetősége**  
Galvanizált acéllal vagy bevonatlan lágyacéllal reagál, és hidrogén képződik, amely egy fokozottan tűzveszélyes gáz, amely robbanást okozhat.
- 10.4. Inkompatibilis anyagok**  
Inkompatibilis tárolási anyagok: galvanizált acélt, bevonatlan lágyacélt  
Lásd a tárolás szempontjából kompatibilis anyagokat, 7.2. fejezet
- 10.5. Veszélyes lebomlás**  
Hőbomlás: Veszélyes égéstermékek: lásd 5. rész.

## 11. TOXIKOLÓGIAI INFORMÁCIÓ

Ez a rész toxikológusok és egyéb egészségügyi szakemberek általi használatra készült.

**Valószínű expozíciós utak:** Bőrrel való érintkezés, szembejutás, belélegzés, ingestion

A termékről és összetevőkről nyert adatok összefoglalása az alábbiakban található meg.

**Akut toxicitás, szájon át**

**Patkány, LD50:** 5.000 mg/kg testsúly

**Akut dermális toxicitás**

**Nyúl, LD50 (határérték-vizsgálat):** > 5.000 mg/kg testsúly

Nincs mortalitás

**Akut inhalációs toxicitás**

**Patkány, LC50 (határérték-vizsgálat), 4 óra, aeroszol:** 3,18 mg/l

A permetezési műveletek során szokásosan létrejövő aeroszol részecske mérete (< 10 mikron) sokkal alacsonyabb, mint a cseppméret (> 100 mikron). Ez a termék a kezelés vagy használat során nem aeroszolizálódik, ezért az 1999/45/EK veszélyes készítményekre vonatkozó irányelv értelmében nem rendelkezik veszélyes besorolással. Ez a termék nem válik ködszerűvé a kezelés folyamán, ezért nem került veszélyesként besorolásra a 1272/2008/EK CLP rendelet szerint.

**Bőrirritáció**

**Nyúl, 6 állat, OECD 404 teszt:**

Pir, közeparányos EU pontszámok: 0,64

Duzzanat, közeparányos EU pontszámok: 0,03

Gyógyuláshoz szükséges napok: 3

**Szemirritáció**

**Nyúl, 6 állat, OECD 405 teszt:**

Kötőhártya-pirosság, közeparányos EU pontszámok: 1,17

Kötőhártya-duzzadás, közeparányos EU pontszámok: 1,60

Szaruhártya-homályosság, közeparányos EU pontszám: 0,57

Szívárványhártya-károsodás, közeparányos EU pontszám: 0,50

Gyógyuláshoz szükséges napok: > 28

Egyéb hatások: pannus, szemfelületi fekély (szaruhártya fekély)

**Bőrzérkenység**

**Tengerimalac, 9-indukciós Buchler teszt:**

Pozitív előfordulás: 0 %

**EMBERI EXPOZÍCIÓ ESETE:**

**Lenyelés, túlzott, szándékos rossz felhasználás:**

**Légzésre gyakorolt hatás:** pneumonitis (aspiráció)

**Gastrointestinalis hatások:** hányinger/hányás, hasmenés, hasi fájdalom, vérhányás (haematemesis)

**Szív- és érrendszeri hatások:** rendellenes szívritmus (szívritmuszavar), csökkent szívpumpa-funkció (szívizom károsodás)

**Általános/szisztémás hatások:** a folyadék- és elektrolit-szabályozás zavara, rendellenesen lecsökkent vértérfogat (hypovolemia), emelkedett szérum amiláz, folyadékvesztés (hemokoncentráció), nincs kolinészteráz gátlás

**Laboratóriumi hatások - vérkémia:** emelkedett szérum transzaminázok, enyhe acidózis

**Szembejutás, rövid távú, epidemiológiai:**

**Megjegyzés:** Az ezekkel a készítményekkel való szemkontaktussal kapcsolatos kiterjedt epidemiológiai felmérés esetén a glifozát-készítményeknek nem tulajdonítható a szemre gyakorolt maradandó hatás.

**N-(foszfonometil)glicin; glifozát**

**Mutagenitás**

Nem mutagén.

**Ismétlődő dózisú toxicitás**

**Nyúl, dermális, 21 nap:**

NOAEL-toxicitás: > 5.000 mg/kg testsúly/nap

Célszervezetek/rendszerek: nincs

Egyéb hatások: nincs

**Patkány, oral, 3 hónap:**

NOAEL-toxicitás: > 20.000 mg/kg étrend

Célszervezetek/rendszerek: nincs

Egyéb hatások: nincs

**Krónikus hatások/karcinogenitás**

**Patkány, oral, 24 hónap:**

NOAEL-toxicitás: ~ 8.000 mg/kg étrend  
Célszervezetek/rendszerek: szemek  
Egyéb hatások: testsúlygyarapodás csökkenése, szövetségi hatások  
NOEL-daganat: > 20.000 ppm  
Tumork: nincs

**Reprodukciós/termékenységi toxicitás**

**Patkány, oral, 2 generáció:**

NOAEL-toxicitás: 10.000 ppm  
NOAEL-reprodukció: > 30.000 mg/kg étrend  
Célszervezetek/rendszerek a szülőknél: nincs  
Egyéb hatások a szülőkre: testsúlygyarapodás csökkenése  
Célszervezetek/rendszerek a kölyköknél: nincs  
Egyéb hatások a kölykökre: testsúlygyarapodás csökkenése  
Az utódokra gyakorolt hatás csak anyai toxicitás esetén tapasztalható.

**Fejlesztési toxicitás/teratogenicitás**

**Patkány, oral, 6 - 19 vemhességi nap:**

NOAEL-toxicitás: 1.000 mg/kg testsúly  
NOAEL-fejlesztés: 1.000 mg/kg testsúly  
Egyéb hatások az anyaállatra: testsúlygyarapodás csökkenése, a fennmaradási idő csökkentése  
Fejlesztési hatások: súlycsökkenés, posztimplantációs veszteség, késleltetett csontképződés  
Az utódokra gyakorolt hatás csak anyai toxicitás esetén tapasztalható.

**Nyúl, oral, 6 - 27 vemhességi nap:**

NOAEL-toxicitás: 175 mg/kg testsúly  
NOAEL-fejlesztés: 175 mg/kg testsúly  
Célszervezetek/rendszerek az anyaállatban: nincs  
Egyéb hatások az anyaállatra: a fennmaradási idő csökkentése  
Fejlesztési hatások: nincs

---

## 12. ÖKOLÓGIAI INFORMÁCIÓK

Ez a rész ökotoxikológusok és egyéb környezetvédelmi szakemberek általi használatra készült.

A termékről és összetevőkről nyert adatok összefoglalása az alábbiakban található meg.

**Vízi toxicitás, halak**

**Kékkopoltyús naphal (*Lepomis macrochirus*):**

Akut toxicitás, 96 óra, átlátlás, LC50: 5,8 mg/l

**Szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*):**

Akut toxicitás, 96 óra, átlátlás, LC50: 8,2 mg/l

**Szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*):**

Hosszú ideig tartó expozíció esetén mérgező, 21 nap, átlátlás, NOEC: 2,4 mg/l

**Vízi toxicitás, gerinctelenek**

**Vízi bolha (*Daphnia magna*):**

Akut toxicitás, 48 óra, statikus, EC50: 11 mg/l

**Vízi bolha (*Daphnia magna*):**

Életciklus/reprodukciós vizsgálat, 21 nap, félstatikus, NOEC: 3,2 mg/l

**Vízi toxicitás, algák/vízinövények**

**Zöld alga (*Selenastrum capricornutum*):**

Akut toxicitás, 72 óra, statikus, ErC50 (növekedési ütem): 8,0 mg/l

**Zöld alga (*Selenastrum capricornutum*):**

Akut toxicitás, 72 óra, statikus, NOEC (növekedési ütem): 1,5 mg/l

**Madarakra gyakorolt toxicitás**

**Virginiai fűj (*Colinus virginianus*):**

Táplálkozási toxicitás, 5 nap, LC50: > 5.620 mg/kg étrend

**Vadkacsa (*Anas platyrhynchos*):**

Táplálkozási toxicitás, 5 nap, LC50: > 5.620 mg/kg étrend

**Ízeltlábúakra gyakorolt toxicitás**

**Háziméh (*Apis mellifera*):**

Szájon át, 48 óra, LD50: > 395 µg/méh

**Háziméh (*Apis mellifera*):**

Kontakt, 48 óra, LD50: > 338 µg/méh

**Talajbéli szervezetek toxicitása, gerinctelenek**

**Földigilisza (Eisenia foetida):**

Akut toxicitás, 14 nap, LC50: > 5.000 mg/kg száraz talaj

**Talajbéli szervezetek toxicitása, mikroorganizmusok**

**Nitrogén transzformációs teszt:**

24,45 kg/ha, 28 nap: Nincs hatással a nitrogén transzformációs tesztre. Nincs hatással a talajlakó mikroorganizmusokra.

**N-(foszfonometil)glicin; glifozát**

**Bioakkumuláció**

**Kékpoltyús naphal (Lepomis macrochirus):**

Egész hal: BCF: < 1

Nem várható jelentős bioakkumuláció.

**disszipáció**

**Talaj, mező:**

Felezési idő: 2 - 174 nap

Koc: 884 - 60.000 L/kg

A talajon erősen megkötődik

**-Víz, aerob:**

Felezési idő: < 7 nap

**ctoxilált zsíramin**

**disszipáció**

**Víz/üledék, aerob, 30 °C:**

Felezési idő: < 4 hetek

**Talaj, aerob:**

Felezési idő: 1 - 7 nap

---

## **13. HULLADÉKKEZELÉSI RENDELKEZÉSEK**

### **13.1. Hulladék kezelési módszerek**

#### **13.1.1. Termék**

Tartsa távol a vízelvezetőktől, a szennyvízcsatornáktól és a természetes vizektől. Az ártalmatlanításakor tartson be minden helyi / regionális / nemzeti / nemzetközi a hulladék ártalmatlanításra vonatkozó szabályozást. Kövesse a következő hatályos jogszabályok rendelkezéseit: Az általános hulladékok kezelésével, veszélyes hulladékok égetésével kapcsolatos irányelv; az Unió hulladék lista és a Hulladék szállítási rendelet. A veszélyes hulladék ártalmatlanítása csak hatóságilag jóváhagyott veszélyes hulladék égetőműben történhet. Az ártalmatlanítás a keletkező energiát hasznosító ipari hulladék égetőműben javasolt.

#### **13.1.2. Csomagolóeszköz**

Kövesse az összes helyi/regionális/nemzeti/nemzetközi szabályozást a hulladék és csomagolóanyag kezelésre, elhelyezésre vonatkozóan. Kövesse a következő hatályos jogszabályok rendelkezéseit: Az általános hulladékok kezelésével, veszélyes hulladékok égetésével kapcsolatos irányelv; az Unió hulladék lista és a Hulladék szállítási rendelet. NE használja újra a tartályokat. Az üres tartályokat háromszor vagy magas nyomáson öblítse ki. Öntse az öblítővizet a permeterző tartályba. A megfelelően kiöblített edény elhelyezhető, mint nem veszélyes ipari hulladék. A csomagolóeszközök veszélyes hulladékként kezelendők, ha megfelelő öblítésük NEM történt meg. Tárolja mindaddig, amíg a jóváhagyott hulladékfeldolgozó el nem szállítja. Hasznosítsa újra, ha rendelkezésre állnak a megfelelő feltételek/berendezések. Csak abban az esetben hasznosítsa újra a nem veszélyes tároló edényeket, ha az újra hasznosított műanyag végfelhasználásának ellenőrzése biztosított. Csak ipari szintű újrahasznosításra alkalmas. NE hasznosítson újra olyan műanyagot amely emberrel vagy élelmiszerrel kerülhet érintkezésbe az újrahasznosítást követően. Ez a csomagolóanyag az energiaként történő hasznosítás követelményeinek megfelel. Elhelyezése égetőműben energianyerésre javasolt. A veszélyes hulladék ártalmatlanítása csak hatóságilag jóváhagyott veszélyes hulladék égetőműben történhet.

Használja a 7. fejezet kezeléssel kapcsolatos javaslatait, valamint a 8. fejezet személyi védelemmel kapcsolatos javaslatait.

## 14. SZÁLLÍTÁSI INFORMÁCIÓ

Az ebben a részben felsorolt információk csak tájékoztató jellegűek. A szállítmány megfelelő szállítási osztályozásához kérjük, alkalmazza a megfelelő szabályozásokat.

Az ADR/RID, IMO vagy IATA/ICAO esetén szállítása nem szabályozott.

## 15. SZABÁLYOZÁSI INFORMÁCIÓK

### 15.1. Egyéb engedélyezési információ

SP1 A növényvédő szerrel vagy annak csomagolóeszközével ne szennyezze a vizeket! (A berendezést vagy annak részeit ne tisztítsa felszíni vizek közelében! Kerülje a gazdaságban vagy az utakon levő vízvezetőkön keresztül való szennyeződést!).

Spe3 A vízi szervezetek védelme érdekében a felszíni vizektől 5 m (hidastraktossal végzett kezelés esetén 25 m, légi kezelés esetén 50 m) távolságban tartson meg egy kezeletlen biztonsági övezetet.

A nem cél-növények védelme érdekében a nem mezőgazdasági földterülettől 5 m (hidastraktossal végzett kezelés esetén 25 m, légi kezelés esetén 50 m), más mezőgazdasági kultúráktól 10 m (hidastraktossal végzett kezelés esetén 50 m, légi kezelés esetén 100 m) távolságban tartson meg egy kezeletlen biztonsági övezetet!

### 15.2. Kémiai biztonsági értékelés

Az EK 1907/2006-os szabályozásának megfelelő kémiai biztonsági értékelés elvégzése nem szükséges, azért nem került rá sor.

A 91/414/EK irányelv értelmében Kockázatfelmérés végrehajtására került sor.

## 16. EGYÉB INFORMÁCIÓK

Az itt megadott információ nem feltétlenül kimerítő, viszont tartalmazza a megfelelő, megbízható adatokat.

Kövesse az összes helyi/regionális/nemzeti/nemzetközi szabályozást.

Ha további információkra van szüksége, kérjük, vegye fel a kapcsolatot a forgalmazóval.

® Bejegyzett védjegy.

|| Jelentős változások az előző kiadáshoz képest.

Ez a biztonsági adatlap a legutóbb az EK 453/2010-es rendelettel módosított EK 1907/2006-os (II. melléklet) szabályozása alapján készült.

A biztonsági adatlapban közölt adatok a termékre vonatkoznak, amennyiben nincs ettől eltérő jelzés.

### Összetevők osztályozása

| Összetevők                | Osztályozás                                                                                                                                                                                                             |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| glifozát izopropilamin só | Vízi krónikus - 2. kategória<br>H411 Mérgező a vízi élővilágra, hosszan tartó károsodást okoz.<br>N - környezeti veszély<br>R51/53 Mérgező a vízi szervezetekre, a vízi környezetben hosszan tartó károsodást okozhat.  |
| etoxilált zsíramin        | Xn - Ártalmas<br>Xi - irritatív<br>N - környezeti veszély<br>R22 Lenyelve ártalmas.<br>R41 Súlyos szemkárosodást okozhat.<br>R51/53 Mérgező a vízi szervezetekre, a vízi környezetben hosszan tartó károsodást okozhat. |
| víz                       | Nincs veszélyesként osztályozva.                                                                                                                                                                                        |

Végjegyzetek:

- { a } EU-címke (gyártói önosztályozás)
- { b } EU-címke (I. függelék)
- { c } EU CLP osztályozás (VI. függelék)
- { d } EU CLP (gyártói önosztályozás)

A leggyakrabban használt rövidítések teljes megnevezése BCF (Bioconcentration Factor – Biokoncentrációs Faktor), BOD (Biochemical Oxygen Demand - Biológiai Oxigénigény), COD (Chemical Oxygen Demand – Kémiai Oxigénigény), EC50 (50% effect concentration -

közepes effektív koncentráció), ED50 (50% effect dose - közepes effektív dózis), I.M. (intramuscular - intramuszkuláris), I.P. (intraperitoneal - intraperitoneális), I.V. (intravenous - intravénás), Koc (Soil adsorption coefficient - Talaj adszorpció együttható), LC50 (50% lethality concentration - Letális koncentráció a populáció 50 %-ára.), LD50 (50% lethality dose - Letális dózis a populáció 50 %-ára), LDLo (Lowerlimit of lethal dosage - Letális dózis alsó határa), LEL (Lower Explosion Limit - Alsó explóziós határ), LOAEC (Lowest Observed Adverse Effect Concentration - észlelt kedvezőtlen hatás legalacsonyabb koncentráció), LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level - észlelt kedvezőtlen hatás legalacsonyabb szintje), LOEC (Lowest Observed Effect Concentration - észlelt kedvezőtlen hatás legalacsonyabb koncentrációja), LOEL (Lowest Observed Effect Level - észlelt hatás legalacsonyabb szintje), MEL (Maximum Exposure limit - Maximális behatási határ), MTD (Maximum Tolerated Dose - Maximális tolerált dózis), NOAEC (No Observed Adverse Effect Concentration - Terhelési küszöb, melynél a káros hatás még nem figyelhető meg), NOAEL (No Observed Adverse Effect Level - Terhelési küszöb, melynél a káros hatás még nem figyelhető meg), NOEC (No Observed Effect Concentration - "nincs megfigyelhető hatás" koncentráció), NOEL (No Observed Effect Level - "nincs megfigyelhető hatás" szint), OEL (Occupational Exposure Limit - Foglalkozási behatási határ), PEL (Permissible Exposure Limit - Megengedhető behatási határ), PII (Primary Irritation Index - Kezdeti Irritációs Mutató), Pow (Partition coefficient n-octanol/water - koncentrációarány n-octanol/víz), S.C. (subcutaneous - szubkután/bőr alatti), STEL (Short-Term Exposure Limit - Rövid - idejű behatási határ), TLV-C (Threshold Limit Value-Ceiling - Küszöb határérték felső értéke), TLV-TWA (Threshold Limit Value - Time Weighted Average, Küszöbérték - Idő súlyozott átlag), UEL (Upper Explosion Limit - Felső explóziós határ)

Bár a jelen dokumentumban szereplő információk és ajánlások (a továbbiakban "Információk") kiadása jóhiszeműen, a kiadásakor rendelkezésünkre álló adatok és legjobb tudásunk szerint történt, a MONSANTO Vállalat vagy bármely leányvállalata nem vállal garanciát azok teljességére vagy pontosságára vonatkozóan. Az itt szereplő Információkat azzal a feltétellel bocsátjuk rendelkezésre, hogy használat előtt az átvévo személyek saját maguk is megvizsgálják azok megadott célra való alkalmasságát. A MONSANTO Vállalat vagy bármely leányvállalata semmilyen körülmények között nem vállal felelősséget olyan károkért, amelyek az itt szereplő információk használatából, vagy azokra való támaszkodásból keletkeztek. JELEN BIZTONSÁGTECHNIKAI ADATLAP NEM TARTALMAZ SEMMILYEN KIFEJEZETT VAGY VÉLELEMEZETT ÁRUKÉPESSÉGI, ADOTT CÉLRA VALÓ ALKALMAZHATÓSÁGI, VAGY BÁRMELY MÁS TERMÉSZETŰ TÉNYÁLLÍTÁST VAGY GARANCIÁT AZ ITT SZEREPLŐ INFORMÁCIÓKRA, ILLETVE AZON TERMÉKEKRE VONATKOZÓAN, MELYEKRE AZ INFORMÁCIÓK HIVATKOZNAK.

## Biztonsági adatlap (SDS) függelék

Kémiai biztonsági jelentés:

Olvassa el és kövesse a címke utasításait.



**Safety data sheet**  
according to 1907/2006/EC, Article 31

Printing date 16.10.2019

Version number 1

Revision: 16.10.2019

**SECTION 1: Identification of the substance/mixture and of the company/undertaking**

· **1.1 Product identifier**

· **Product name:** Tallowamine polyethoxylated

· **Part number:** DRE-C17136000

· **CAS Number:**  
61791-26-2

· **NLP Number:**  
500-153-8

· **1.2 Relevant identified uses of the substance or mixture and uses advised against**

No further relevant information available.

· **Application of the substance / the mixture** Reference material for laboratory use only

· **1.3 Details of the supplier of the safety data sheet**

· **Manufacturer/Supplier:**

LGC Limited  
Queens Road  
Teddington  
Middlesex TW11 0LY  
UNITED KINGDOM

Tel : +44 (0) 20 8943 7000  
Fax : +44 (0) 20 8943 2767  
eMail : gb@lgcstandards.com  
Web : www.lgcstandards.com

· **Further information obtainable from:**

Product safety department  
eMail : sds-request@lgcgroup.com

· **1.4 Emergency telephone number:** +44 (0) 20 8943 7000 (Monday - Friday : 8am - 5pm)

**SECTION 2: Hazards identification**

· **2.1 Classification of the substance or mixture**

· **Classification according to Regulation (EC) No 1272/2008**



GHS05 corrosion

Eye Dam. 1      H318 Causes serious eye damage.



GHS09 environment

Aquatic Chronic 2   H411 Toxic to aquatic life with long lasting effects.



GHS07

Acute Tox. 4      H302 Harmful if swallowed.

Skin Irrit. 2      H315 Causes skin irritation.

· **2.2 Label elements**

· **Labelling according to Regulation (EC) No 1272/2008**

The substance is classified and labelled according to the CLP regulation.

(Contd. on page 2)

GB



**Safety data sheet**  
according to 1907/2006/EC, Article 31

Printing date 16.10.2019

Version number 1

Revision: 16.10.2019

**Product name: Tallowamine polyethoxylated****· Hazard pictograms**

(Contd. from page 1)

**· Signal word** *Danger***· Hazard statements***H302 Harmful if swallowed.**H315 Causes skin irritation.**H318 Causes serious eye damage.**H411 Toxic to aquatic life with long lasting effects.***· Precautionary statements***P280 Wear protective gloves / eye protection / face protection.**P301+P312 IF SWALLOWED: Call a POISON CENTER/doctor if you feel unwell.**P305+P351+P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.**P310 Immediately call a POISON CENTER/doctor.**P321 Specific treatment (see on this label).**P501 Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.***· 2.3 Other hazards****· Results of PBT and vPvB assessment****· PBT:** Not applicable.**· vPvB:** Not applicable.**SECTION 3: Composition/information on ingredients****· 3.1 Chemical characterisation: Substances****· CAS No. Description***61791-26-2 Tallowamine polyethoxylated***· Identification number(s)** *None***· NLP Number:** *500-153-8***· RTECS:** *WW3150000***· Additional information:** *For the wording of the listed hazard phrases refer to section 16.***SECTION 4: First aid measures****· 4.1 Description of first aid measures****· General information:***Symptoms of poisoning may occur even after several hours; therefore medical observation for at least 48 hours after the accident is recommended.***· After inhalation:** *Supply fresh air; consult doctor in case of complaints.***· After skin contact:***Immediately wash with water and soap and rinse thoroughly.*

(Contd. on page 3)

GB



**Safety data sheet**  
**according to 1907/2006/EC, Article 31**

Printing date 16.10.2019

Version number 1

Revision: 16.10.2019

**Product name: Tallowamine polyethoxylated**

(Contd. from page 2)

- If skin irritation continues, consult a doctor.*
- **After eye contact:** Rinse opened eye for several minutes under running water. Then consult a doctor.
- **After swallowing:**  
Rinse mouth. Do not induce vomiting.  
Seek medical treatment.
- **4.2 Most important symptoms and effects, both acute and delayed** No further relevant information available.
- **4.3 Indication of any immediate medical attention and special treatment needed**  
No further relevant information available.

**SECTION 5: Firefighting measures**

- **5.1 Extinguishing media**
- **Suitable extinguishing agents:** Use fire extinguishing methods suitable for surrounding conditions.
- **5.2 Special hazards arising from the substance or mixture**  
Formation of toxic gases is possible during heating or in case of fire.
- **5.3 Advice for firefighters**
- **Protective equipment:** Wear self-contained respiratory protective device.

**SECTION 6: Accidental release measures**

- **6.1 Personal precautions, protective equipment and emergency procedures**  
Wear protective equipment. Keep unprotected persons away.
- **6.2 Environmental precautions:**  
Inform respective authorities in case of seepage into water course or sewage system.  
Do not allow to enter sewers/ surface or ground water.
- **6.3 Methods and material for containment and cleaning up:**  
Absorb with liquid-binding material (sand, diatomite, acid binders, universal binders, sawdust).  
Use neutralising agent.  
Dispose of contaminated material as waste according to item 13.
- **6.4 Reference to other sections**  
See Section 7 for information on safe handling.  
See Section 8 for information on personal protection equipment.  
See Section 13 for disposal information.

**SECTION 7: Handling and storage**

- **7.1 Precautions for safe handling** Store in cool, dry place in tightly closed receptacles.
- **Information about fire - and explosion protection:** No special measures required.
- **7.2 Conditions for safe storage, including any incompatibilities**
- **Storage:**
- **Requirements to be met by storerooms and receptacles:**  
Please refer to the manufacturer's certificate for specific storage and transport temperature conditions.  
Store only in the original receptacle unless other advice is given on the CoA.  
Keep container in a well-ventilated place. Keep away from sources of ignition and heat.
- **Information about storage in one common storage facility:** Store away from foodstuffs.

(Contd. on page 4)

GB



**Safety data sheet**  
**according to 1907/2006/EC, Article 31**

Printing date 16.10.2019

Version number 1

Revision: 16.10.2019

**Product name: Tallowamine polyethoxylated**

(Contd. from page 3)

- **Further information about storage conditions:** Keep container tightly sealed.
- **7.3 Specific end use(s)** No further relevant information available.

**SECTION 8: Exposure controls/personal protection**

- **Additional information about design of technical facilities:** No further data; see item 7.
- **8.1 Control parameters**
- **Ingredients with limit values that require monitoring at the workplace:** Not required.
- **Additional information:** Lists used were valid at the time of SDS preparation.
- **8.2 Exposure controls**
- **Personal protective equipment:**
- **General protective and hygienic measures:**
  - Keep away from foodstuffs, beverages and feed.
  - Immediately remove all soiled and contaminated clothing
  - Wash hands before breaks and at the end of work.
  - Avoid contact with the skin.
  - Avoid contact with the eyes and skin.
- **Respiratory protection:**
  - Not required.
  - Use suitable respiratory protective device in case of insufficient ventilation.
- **Protection of hands:**
  - The glove material has to be impermeable and resistant to the product/ the substance/ the preparation.
  - Selection of the glove material on consideration of the penetration times, rates of diffusion and the degradation
  - The protective gloves to be used must comply with the specifications of EC Directive 89/686/EEC and the related standard EN374



Protective gloves

- **Material of gloves** Butyl rubber, BR
- **Penetration time of glove material**
  - The exact break through time has to be found out by the manufacturer of the protective gloves and has to be observed.
- **Eye protection:**



Tightly sealed goggles

GB

(Contd. on page 5)



**Safety data sheet**  
according to 1907/2006/EC, Article 31

Printing date 16.10.2019

Version number 1

Revision: 16.10.2019

**Product name: Tallowamine polyethoxylated**

(Contd. from page 4)

**SECTION 9: Physical and chemical properties****· 9.1 Information on basic physical and chemical properties****· General Information****· Appearance:**

|                  |                 |
|------------------|-----------------|
| Form:            | Liquid          |
| Colour:          | Amber coloured  |
| Odour:           | Odourless       |
| Odour threshold: | Not determined. |

**· pH-value:** Not determined.**· Change in condition**

|                                          |                 |
|------------------------------------------|-----------------|
| Melting point/freezing point:            | Not determined. |
| Initial boiling point and boiling range: | Not determined. |

**· Flash point:** Not applicable.**· Flammability (solid, gas):** Not determined.**· Ignition temperature:** Not determined.**· Decomposition temperature:** Not determined.**· Auto-ignition temperature:** Not determined.**· Explosive properties:** Not determined.**· Explosion limits:**

|        |                 |
|--------|-----------------|
| Lower: | Not determined. |
| Upper: | Not determined. |

**· Vapour pressure:** Not determined.**· Density:** Not determined.**· Relative density** Not determined.**· Vapour density** Not determined.**· Evaporation rate** Not determined.**· Solubility in / Miscibility with water:** Not determined.**· Partition coefficient: n-octanol/water:** Not determined.**· Viscosity:**

|            |                 |
|------------|-----------------|
| Dynamic:   | Not determined. |
| Kinematic: | Not determined. |

**· 9.2 Other information** No further relevant information available.

GB

(Contd. on page 6)



**Safety data sheet**  
according to 1907/2006/EC, Article 31

Printing date 16.10.2019

Version number 1

Revision: 16.10.2019

**Product name: Tallowamine polyethoxylated**

(Contd. from page 5)

**SECTION 10: Stability and reactivity**

- **10.1 Reactivity**  
Stable under normal conditions.  
No further relevant information available.
- **10.2 Chemical stability** Stable under normal conditions.
- **Thermal decomposition / conditions to be avoided:**  
Formation of toxic gases is possible during heating or in case of fire.
- **10.3 Possibility of hazardous reactions** No dangerous reactions known.
- **10.4 Conditions to avoid** Heat.
- **10.5 Incompatible materials:** Strong oxidizing agents.
- **10.6 Hazardous decomposition products:**  
Formation of toxic gases is possible during heating or in case of fire.

**SECTION 11: Toxicological information**

- **11.1 Information on toxicological effects**
- **Acute toxicity**  
Harmful if swallowed.
- **LD/LC50 values relevant for classification:**

|        |      |                     |
|--------|------|---------------------|
| Oral   | LD50 | 620 mg/kg (rat)     |
| Dermal | LD50 | >10,000 mg/kg (rat) |
- **Primary irritant effect:**
- **Skin corrosion/irritation**  
Causes skin irritation.
- **Serious eye damage/irritation**  
Causes serious eye damage.
- **Respiratory or skin sensitisation** Based on available data, the classification criteria are not met.
- **CMR effects (carcinogenicity, mutagenicity and toxicity for reproduction)**
- **Germ cell mutagenicity** Based on available data, the classification criteria are not met.
- **Carcinogenicity** Based on available data, the classification criteria are not met.
- **Reproductive toxicity** Based on available data, the classification criteria are not met.
- **STOT-single exposure** Based on available data, the classification criteria are not met.
- **STOT-repeated exposure** Based on available data, the classification criteria are not met.
- **Aspiration hazard** Based on available data, the classification criteria are not met.

**SECTION 12: Ecological information**

- **12.1 Toxicity**
- **Aquatic toxicity:**

|           |                     |
|-----------|---------------------|
| EC50/48 h | 2.35 mg/l (daphnia) |
| LC50/96 h | 1.3 mg/l (fish)     |
- **12.2 Persistence and degradability** No further relevant information available.
- **12.3 Bioaccumulative potential** No further relevant information available.

(Contd. on page 7)

GB



**Safety data sheet**  
**according to 1907/2006/EC, Article 31**

Printing date 16.10.2019

Version number 1

Revision: 16.10.2019

**Product name: Tallowamine polyethoxylated**

(Contd. from page 6)

- **12.4 Mobility in soil** No further relevant information available.
- **Ecotoxicological effects:**
- **Remark:** Toxic for fish
- **Additional ecological information:**
- **General notes:**
  - Water hazard class 2 (German Regulation) (Assessment by list): hazardous for water
  - Do not allow product to reach ground water, water course or sewage system.
  - Must not reach sewage water or drainage ditch undiluted or unneutralised.
  - Danger to drinking water if even small quantities leak into the ground.
  - Also poisonous for fish and plankton in water bodies.
  - Toxic for aquatic organisms
- **12.5 Results of PBT and vPvB assessment**
- **PBT:** Not applicable.
- **vPvB:** Not applicable.
- **12.6 Other adverse effects** No further relevant information available.

**SECTION 13: Disposal considerations**

- **13.1 Waste treatment methods**
- **Recommendation**
  - Must not be disposed of together with household garbage. Do not allow product to reach sewage system.
- **European waste catalogue**
  - Waste disposal key numbers from EWC have to be assigned depending on origin and processing.
- **Uncleaned packaging:**
- **Recommendation:** Dispose of in accordance with national regulations.

**SECTION 14: Transport information**

- |                          |                                                                                                     |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| · <b>14.1 UN-Number</b>  | UN3082                                                                                              |
| · <b>ADR, IMDG, IATA</b> | 3082 ENVIRONMENTALLY HAZARDOUS SUBSTANCE, LIQUID, N.O.S. (Tallowamine polyethoxylated)              |
| · <b>ADR</b>             | ENVIRONMENTALLY HAZARDOUS SUBSTANCE, LIQUID, N.O.S. (Tallowamine polyethoxylated), MARINE POLLUTANT |
| · <b>IMDG</b>            |                                                                                                     |
| · <b>IATA</b>            | ENVIRONMENTALLY HAZARDOUS SUBSTANCE, LIQUID, N.O.S. (Tallowamine polyethoxylated)                   |

(Contd. on page 8)

GB



**Safety data sheet**  
according to 1907/2006/EC, Article 31

Printing date 16.10.2019

Version number 1

Revision: 16.10.2019

**Product name: Tallowamine polyethoxylated**

(Contd. from page 7)

**· 14.3 Transport hazard class(es)****· ADR, IMDG, IATA**

**· Class** 9 Miscellaneous dangerous substances and articles.  
**· Label** 9

**· 14.4 Packing group****· ADR, IMDG, IATA** III**· 14.5 Environmental hazards:**

**· Marine pollutant:** Symbol (fish and tree)  
**· Special marking (ADR):** Symbol (fish and tree)  
**· Special marking (IATA):** Symbol (fish and tree)

**· 14.6 Special precautions for user** Warning: Miscellaneous dangerous substances and articles.

**· Danger code (Kemler):** 90  
**· EMS Number:** F-A,S-F  
**· Stowage Category** A

**· 14.7 Transport in bulk according to Annex II of Marpol and the IBC Code** Not applicable.

**· Transport/Additional information:**

**· ADR**  
**· Limited quantities (LQ)** 5L  
**· Excepted quantities (EQ)** Code: E1  
Maximum net quantity per inner packaging: 30 ml  
Maximum net quantity per outer packaging: 1000 ml  
**· Transport category** 3  
**· Tunnel restriction code** E

**· UN "Model Regulation":** UN 3082 ENVIRONMENTALLY HAZARDOUS SUBSTANCE, LIQUID, N.O.S. (TALLOWAMINE POLYETHOXYLATED), 9, III

**SECTION 15: Regulatory information****· 15.1 Safety, health and environmental regulations/legislation specific for the substance or mixture**

- Directive 2012/18/EU
- Named dangerous substances - ANNEX I Substance is not listed.
- Seveso category E2 Hazardous to the Aquatic Environment
- Qualifying quantity (tonnes) for the application of lower-tier requirements 200 t

(Contd. on page 9)

GB



**Safety data sheet**  
**according to 1907/2006/EC, Article 31**

Printing date 16.10.2019

Version number 1

Revision: 16.10.2019

**Product name: Tallowamine polyethoxylated**

(Contd. from page 8)

- **Qualifying quantity (tonnes) for the application of upper-tier requirements** 500 t
- **REGULATION (EC) No 1907/2006 ANNEX XVII Conditions of restriction:** 3
- **15.2 Chemical safety assessment:** A Chemical Safety Assessment has not been carried out.

**SECTION 16: Other information**

The information in this safety data sheet (SDS) has been prepared with due care and is true and accurate to the best of our knowledge. The user must determine the suitability of the information for its particular purpose, ensure compliance with existing laws and regulations, and be aware that other or additional safety or performance considerations may arise when using, handling and/ or storing the material. The information in this SDS does not purport to be all inclusive or a guarantee as to the properties of the material supplied, and should be used only as a guide. LGC makes no warranties or representations as to the accuracy and completeness of the information contained herein, shall not be held responsible for the suitability of this information for the user's intended purposes or the consequences of such use, and shall not be liable for any damage or loss, howsoever arising, direct or otherwise.

**Abbreviations and acronyms:**

ADR: Accord européen sur le transport des marchandises dangereuses par Route (European Agreement concerning the International Carriage of Dangerous Goods by Road)  
IMDG: International Maritime Code for Dangerous Goods  
IATA: International Air Transport Association  
GHS: Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals  
EINECS: European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances  
CAS: Chemical Abstracts Service (division of the American Chemical Society)  
LC50: Lethal concentration, 50 percent  
LD50: Lethal dose, 50 percent  
PBT: Persistent, Bioaccumulative and Toxic  
vPvB: very Persistent and very Bioaccumulative  
Acute Tox. 4: Acute toxicity – Category 4  
Skin Irrit. 2: Skin corrosion/irritation – Category 2  
Eye Dam. 1: Serious eye damage/eye irritation – Category 1  
Aquatic Chronic 2: Hazardous to the aquatic environment - long-term aquatic hazard – Category 2

**Sources**

Tables 3.1 and 3.2 from Annex 6 of EC 1272/2008, EC 1907/2006, EH40/2005 as amended 2011, Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS), The Dictionary of Substances and their Effects, 1st Edition, IUCLID.

- **Data compared to the previous version altered.** All sections have been updated.

GB

Az értekezés témakörében megjelent publikációk

**Idegen nyelvű, lektorált tudományos folyóiratban megjelent**

- Klátyik, S., Simon, G., Takács, E., **Oláh, M.**, Zaller, J. G., Antoniou, M. N., Benbrook, C., Mesnage, R., Székács, A. (2025). Toxicological concerns regarding glyphosate, its formulations, and co-formulants as environmental pollutants: a review of published studies from 2010 to 2025. *Archives of Toxicology*. doi:10.1007/s00204-025-04076-2, D1, IF: 4,8
- Najam, M., Javaid, S., Iram, S., Pasertsakoun, K., **Oláh, M.**, Székács, A., Aleksza, L. (2025). Microbial biodegradation of synthetic polyethylene and polyurethane polymers by pedospheric microbes: towards sustainable environmental management. *Polymers*, 17(2), 169. doi:10.3390/polym17020169, Q1, IF: 4,1
- Klátyik, Sz., Simon, G., **Oláh, M.**, Mesnage, R., Antoniou, M. N., Zaller, J. G., Székács, A. (2024) Aquatic ecotoxicity of glyphosate, its formulations, and co-formulants: evidence from 2010-2023. *Environmental Sciences Europe*, 36: 22. doi: 10.1186/s12302-024-00849-1 Q1, IF: 5,481
- Klátyik, Sz., Simon, G., **Oláh, M.**, Mesnage, R., Antoniou, M. N., Zaller, J. G., Székács, A. (2023) Terrestrial ecotoxicity of glyphosate, its formulations, and co-formulants: evidence from 2010–2023. *Environmental Sciences Europe*, 35: 51. doi: 10.1186/s12302-023-00758-9 Q1, IF: 5,481
- Oláh, M.**, Farkas, E., Székács, I., Horvath, R., Székács, A. (2022) Cytotoxic effects of Roundup Classic and its components on NE-4C and MC3T3-E1 cell lines determined by biochemical and flow cytometric assays. *Toxicology Reports*, 9: 914-926. doi:10.1016/j.toxrep.2022.04.014, Q2
- Farkas, E., Szekacs, A., Kovacs, B., **Olah, M.**, Horvath, R., Szekacs, I. (2018) Label-free optical biosensor for real-time monitoring the cytotoxicity of xenobiotics: a proof of principle study on glyphosate. *Journal of Hazardous Materials*, 351: 80-89. doi:10.1016/j.jhazmat.2018.02.045, D1, IF:6,7
- Klátyik, Sz., Darvas, B., **Oláh, M.**, Mörtl, M., Takács, E., Székács, A. (2017) Pesticide residues in spice paprika and their effects on environmental and food safety. *Journal of Food and Nutrition Research*, 56 (3): 201-218. (ISSN 1336-8672), Q3, IF: 0,687

- **Magyar nyelvű, lektorált tudományos folyóiratban megjelent**

**Oláh, M.**, Farkas, E., Székács, I., Horvath, R., Klátyik, Sz., Székács, A. (2022) A Roundup Classic gyomirtó szer és összetevőinek citotoxikus hatásainak vizsgálata *Ökotoxikológia* **4**. (3-4.): 54-60.

Gémes, B., Klátyik, Sz., **Oláh, M.**, Takács, E., Gyurcsó, G., Krifaton, Cs., Darvas, B., Székács, A. (2022), Összegző áttekintés a glyphosate biokémiai és ökotoxikológiai hatásainak kimutatására végzett in vitro és in vivo vizsgálatainkról. *Ökotoxikológia* **4** (3-4): 67-74.

**Oláh, M.**, Farkas, E., Székács, I., Horvath, R., Székács, A. (2021) A Roundup Classic és összetevőinek citotoxikus és genotoxikus hatásai NE-4C és MC3T3-E1 sejtvonalakon *Ökotoxikológia* **3** (2): 18-19.

Darvas, B., Varga, Cs., Gyurcsó, G., Takács, E., Klátyik, Sz., **Oláh, M.**, Mörtl, M. és Székács, A. (2017) Hormonmodulánsok a környezetünkben. *bioKontroll* **8** (2): 4-34

- **Idegen nyelvű konferenciakiadványban megjelent összefoglalók**

**Oláh, M.**, Farkas, E., Székács, I., Horvath, R., Székács, A. (2022) Detailed cytotoxicity assessment of the formulated herbicide Roundup classic and its constituents. *Proceedings of the 28th International Symposium on Analytical and Environmental Problems* (Szeged, Hungary), 269-273.

Gémes, B., Klátyik, Sz., **Oláh, M.**, Takács, E., Krifaton, Cs., Székács, A. (2022) *In vivo* and *In vitro* tests for the detection of biochemical and ecotoxicological effects of the herbicide active ingredient glyphosate. *Proceedings of the 28th International Symposium on Analytical and Environmental Problems* (Szeged, Hungary), 152-156.

Kotlan, B., Liskay, G., Csuka, O., Tóth, J., **Oláh, M.**, Kasler, M., Székács, A., (2017) Reduced tumor-associated glycosphingolipids in cell membrane lipid rafts and a diminished proliferation rate in mammary breast carcinoma cultures after incubation with glyphosate-based formulations, In: Society, for Immunotherapy of Cancer (szerk.) SITC 2017 Abstract Book, 238-239.

**Ottucsák, M.**, Klátyik, Sz., Gyurcsó, G., Mörtl, M., Darvas, B., Székács, A. (2015) Environmental monitoring of glyphosate and assessment of its combined cytotoxicity with adjuvants. *Proceedings of the 21st International Symposium on Analytical and Environmental Problems* (Szeged, Hungary), 64-67.

- **Magyar nyelvű konferenciakiadványban megjelent összefoglalók**

- Klátyik, Sz. Simon, G., **Oláh, M.**, Takács, E., Robin, M., Michael, A., Johann, G. Z., Székács A. (2023) A *glyphosate* ökotoxikológiai megítélése az elmúlt évtized eredményei alapján. *XIII. Ökotoxikológiai Konferencia* (Darvas B. szerk.), 63-64.
- Oláh, M.**, Farkas, E., Székács, I., Horvath, R., Klátyik, Sz., Székács, A. (2022) A Roundup Classic gyomirtó szer és összetevői citotoxikus hatásainak vizsgálata, *XII. Ökotoxikológiai Konferencia* (Darvas B. szerk.), 54-60.
- Oláh, M.**, Takács, E., Kocsis, Zs., Darvas, B., Székács, A. (2017) *Glyphosate*-tartalmú készítmények hatása sejtvonalakon. *Abs. VII. Ökotoxikológiai Konferencia* (Darvas B. szerk.), 29-30.
- Ottucsák, M.**, Kocsis, Zs., Bíró, A., Tolnai, Á., Darvas, B., Székács, A. (2016) A comet-assay alkalmazhatósága növényvédőszer-hatóanyag, -készítmény és formázó anyag toxicitásvizsgálatában. *Abs. VI. Ökotoxikológiai Konferencia* (Darvas B. szerk.), 27-28.
- Ottucsák, M.**, Takács, E., Klátyik, Sz., Darvas, B., Székács, A. (2015) A környezet- és élelmiszer-biztonsági kockázatok súlyozása a *glyphosate* gyomirtó-hatóanyag és adjuvánsai példáján, *Abs. V. Ökotoxikológiai Konferencia* (Darvas B. szerk.), 28-29.

### Az értekezés témájához nem kapcsolódó publikációk

#### Idegen nyelvű, lektorált tudományos folyóiratban megjelent

- Najam, M., Javaid, S., Iram, S., Pasertsakoun, K., **Oláh, M.**, Székács, A., Aleksza, L. (2025). Microbial Biodegradation of Synthetic Polyethylene and Polyurethane Polymers by Pedospheric Microbes: Towards Sustainable Environmental Management. *Polymers*, **17** (2), 169.
- Kónya, É., Szabó, E., Bata-Vidács, I., Deák, T., **Ottucsák, M.**, Adányi, N., Székács, A. (2016) Quality management in spice paprika production as a synergy of internal and external quality measures *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, **10** (3): 160-166.
- Klátyik, Sz., Darvas, B., Mörtl, M., **Ottucsák, M.**, Takács, E., Bánáti, H., Simon, L., Gyurcsó, G., Székács, A. (2016) Food safety aspects of pesticide residues in spice paprika. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, **10** (3): 156-159.

- **Magyar nyelvű, lektorált tudományos folyóiratban megjelent**

- Oláh, M.,** Mörtl, M., Székács, A., Darvas, B., (2016) A DDT rovarirtószer-hatóanyag és bomlástermékeinek kimutatása a Budapesti Vegyiművek (BVM) környékéről származó talaj-, fakéreg- és földigiliszta-mintából, *bioKontroll* 7 (1): 11-16.
- Ottucsák, M.,** Kocsis, Zs., Tarnóczai, T., Marcsek, Z., Major, J. (2015) Ösztrogénreceptorra ható vegyületek vizsgálata in vitro rendszerben, *Egészségtudomány*, **LIX.** (2): 92.
- Ottucsák, M.,** Kocsis, Zs., Tarnóczai, T., Kelemen, K., Marcsek, Z., Major, J. (2014) Ösztrogén receptor transzkripció aktivációs vizsgálat a HeLa9903 sejtvonalon, az OECD TG 455 alapján, GLP rendszerben *bioKontroll*, 5 (2): 75-76.
- Ottucsák, M.,** Varga, G., Bakonyi, G. (2013) Települési szennyvíz tisztítása során keletkezett rácsszemétkomposzt akut toxicitási vizsgálata trágyagiliszta (*Eisenia fetida*) tesztorganizmokkal, *Állattani közlemények*, **98** (1-2): 81-88.

- **Magyar nyelvű konferenciakiadványban megjelent összefoglalók**

- Gyurcsó, G., Simon, L., Bohus, P., Mörtl, M., Takács, E., **Oláh, M.,** Fejes, Á., Székács, A., Darvas, B. (2017) *Glyphosate* és formázó anyagainak hatása a *Danio rerio* embrionális fejlődésére. Abs. VII. Ökotoxikológiai Konferencia (Darvas B. szerk.), 15-16.
- Ottucsák, M.,** Mörtl, M., Székács, A., Darvas, B. (2016) Ökológiai termesztésű és vegyszeres növényvédelmet alkalmazó paprikatermesztési területekről származó termény- és környezeti minták vizsgálata. Abs. VI. Ökotoxikológiai Konferencia (Darvas B. szerk.), 28-29.

- **Idegen nyelvű konferencia kiadványban megjelent összefoglalók**

- Oláh, M.,** Mörtl, M., Darvas, B., Székács, A., (2020) Determination of DDT and its metabolites in soil, tree bark and earthworm samples near the Budapest Chemical Works, *Proceedings of the 26th International Symposium on Analytical and Environmental Problems* (Szeged, Hungary), 274-278.
- Ottucsák, M.,** Klátyik, Sz., Mörtl, M., Székács, A. (2016) Pesticide residues in environmental and produce samples from ecological and conventional paprika cultivation fields. *Proceedings of the 22nd International Symposium on Analytical and Environmental Problems* (Szeged, Hungary), 380-384.

**Ottucsák, M.,** Mörtl, M., Székács, A. (2016) Comparative chemical analysis of environmental and cultivated paprika samples from ecological and conventional paprika crop fields In: SPICED Symposium Spices and Herbs: A Risk-Free Taste Experience? Abstracts Konferencia helye, ideje: Berlin, Németország 2016.06.01. - 2016.06.02. Berlin: Bundesinstitut für Risikobewertung, 99-100.

## KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretném megköszönni témavezetőmnek, Prof. Székács Andrásnak a munkám során nyújtott szakmai irányítást, a rengeteg tanítást és feltétlen támogatást, amelyek nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre.

Köszönettel tartozom a MATE-KÖTI-AKK összes munkatársainak, kiemelve Dr. Takács Esztert és Dr. Klátyik Szendrát, akik mindenben nagy segítségemre voltak, szakmai és adminisztratív témákban is. A munkám nem lehetne teljes HUN-REN EK MFA-ban végzett vizsgálatok nélkül, szeretném megköszönni Dr. Székács Innának, a vizsgálatok során nyújtott segítségét.

Köszönet illeti Dr. Bohus Pétert, aki biztosította számunkra a *glyphosate* hatóanyag formázása során alkalmazott polietoxilált faggyúamint (*POE-15*) a kísérletek során.

Szeretnék köszönetet mondani az NNGYK, Közegészségügyi laboratóriumi és módszertani főosztály, Toxikológiai laboratóriumi osztályán dolgozó Tolnai Ágostonnak, aki nagy segítségemre volt a comet teszt végrehajtásában.

Szeretnék köszönetet mondani Férjemnek a mérhetetlen türelméért és a családjáért tett áldozatos munkájáért, nélküle ez a doktori munka nem készülhetett volna el. Köszönöm két fiamnak türelmüket, megértésüket, és a szeretetüket.

Köszönetet mondanék Bátyámnak és családjának, hogy hittek bennem és támogattak ezen a rögös úton. Végül, de nem utolsó sorban köszönöm Szüleimnek, hogy minden lehetőséget megadtak nekem, hogy addig tanulhassak, ameddig csak szeretnék, és tudom, hogy nagyon büszkék rám. Munkámat Édesapám emlékének ajánlom.

Doktori munkámat az alábbi kutatások pályázat támogatták:

– OTKA K109865 – „Állatgyógyászati és mezőgazdasági felületaktív anyagok mechanizmusfüggő teratogén, hormonmoduláns és egyéb toxikus hatásai”

– TKP2021-NVA-22 – „Az agrár- és élelmiszergazdaság létfontosságú rendszerelemei és kritikus infrastruktúrái megerősítésének kutatása”

– A Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem „Mezőgazdasági szennyezők környezeti sorsa és ökotoxikus hatásai” Kiemelt Kutatócsoportok Programja