

Bírálat

Bartók Tibor: Új fumonizin mikotoxinok azonosítása HPLC/MS módszerekkel – című akadémiai doktori értekezéséről

A dolgozat 152 oldalon tárgyalja a témát, melyből 3 oldal a rendkívül hasznos rövidítések jegyzéke, 3 oldal a bevezetés és célkitűzés, 46 oldal az irodalmi áttekintés, 9 oldal a felhasznált anyagok és módszerek jegyzéke, 68 oldal a kutatás eredményeinek megvitatása, 5 oldal az összefoglalás és 22 oldalon 285 irodalmi hivatkozás támasztja alá a jelölt felkészültségét a témakörben. A dolgozat arányai helyesek, a dolgozat gyakorlatilag sajtóhiba mentes, alig van benne magyartalan mondat, jól olvasható.

A témaválasztást a következők indokolják. Bár a növények penészgomba fertőzöttsége már régen ismert, elsősorban a műszeres analitika fejlettsége szabott gátat annak, hogy megismerjük, megfelelő csoportokba soroljuk a mikotoxinok közül a fumonizineket. Ennek fontosságát aláhúzza az áruk gát nélküli globalizációs terjedése és az utóbbi évek szélsőséges időjárása, mely kedves a gombabetegségek terjedésének.

A tudomány fejlődésének utóbbi évszázados egyik tendenciája az anyag egyre kisebb részeinek feltérképezése, osztályba sorolása, majd funkciójának megismerése. Ez utóbbi vagyis a mechanizmus megismerése nyilvánvalóan – minden társadalmi nyomás ellenére – sokkal lassúbb, tehát a talaj-növény-állat-humán toxikológia, a szinergikus és antagonisztikus hatások feltárása, a törvényi szabályozás (melyet még a politika is befolyásol), jóval lassúbb, mint az analitika, mely a penészgombák esetében persze biológia is, fermentáció is, hatásfokelemzés is, paraméter optimalás is, analitikai módszerek és technikák megválasztása és kapcsolása is és persze a megfelelő következtetések levonása.

A jelölt az irodalom feldolgozásánál főleg az elmúlt 20 év eredményeire támaszkodva – hisz a korábbi évek csak tapogatódzások voltak a területen – ismerteti a fumonizinek azonosítását, sztereokémiáját és a térszerkezet megállapításainak hiányosságait. A jelölt az irodalmi összefoglalóban részletezi a toxintermelést befolyásoló paraméterek fontosságát, azonban a dolgozat gyakorlati részében ezeket nem veszi figyelembe, vagy legalább is nem említi, ami jelentősen rontja a dolgozat tudományos értékét. Az irodalomban részletezett összefoglalás, mely a fumonizinek hatására bekövetkező szfingoid bázis felhalmozódásokat magyarázza, valamint a takarmányozással járó hatásokat és az élelmiszeripari feldolgozás során a magasabb hőmérsékleteken végbemenő fumonizin hőbomlását írja le, rendkívül alapos. Talán az egészségügyi határértékek ismertetésénél kellett volna bemutatni azokat a létező magyar szabványokat, melyek a fumonizin meghatározásokat szabványosítják, hisz a határértékek ilyen analitikai módszerekhez köthetők. Az irodalmi részben ismertetett fumonizin analitikai módszerek leírása –beleértve a minta előkészítést—alapos, bizonyítja a jelölt felkészültségét a területen.

Az „Anyagok és módszerek” fejezet minden természettudománnyal foglalkozó dolgozatban az a rész, amely a mérési paraméterek részletes ismertetésével vagy az irodalmi utalásokkal, az adott kísérleteket ismételhetővé és a méréstechnika alapegységeire visszavezethetővé teszi. Itt az is elvárható, hogy azok a paraméterek, amelyek optimalása vagy választása nem szerepel a dolgozatban, indoklással legyenek

ellátva, melyeket elsősorban a fermentációs eljárás leírásánál hiányolok, mely eljárások eredményeképpen létrejött termékekből komoly tudományos megállapításokat tesz a jelölt. Kritikám itt nem csak azért súlyos, mert magam is analitikus vagyok, hanem mert a kísérletekben felhasznált standardek, etalonok, anyagminták visszavezethetősége, tisztaságuk ismerete nélkül, a dolgozat összes kvantitatív megállapítása megkérdőjelezhető. Például az első tézispont szerinti a FB_{1-4} mennyiségi sorrendek megállapítása olyan alapokon nyugszik, ahol az FB_{1-2} eredete ismeretlen, míg az FB_{3-4} ajándék, minősége ismeretlen! Hasonlóan furcsa a minőségi megállapítások alapjául szolgáló „meredekebb” és „kevésbé meredek” grádiens elúció ismertetése. A paraméterek optimalása nélkül, úgy fest a szerző „vak tyúk” módszert használt, ami persze lehet sikeres, de nem biztos, hogy a minőségi azonosítás szempontjából minden komponenst feltár, pedig a csoportokba sorolás szempontjából ez lenne a célkitűzés.

A 4.1. fejezetben a jelölt a begyűjtött izolátumok *in vitro* fumonizin FB_{1-4} termelésével foglalkozik. Az eredményeket az 5. táblázatban foglalja össze, azonban a négy számjegy pontossággal megadott koncentrációk, úgy, hogy nem ismerjük a kinyerés hatásfokát, a felhasznált etalonok tisztaságát, a mérések reprodukálhatóságát, elég sok kétséget vetnek fel. A két bemutatott kromatogram szép, és amennyiben az összes mintánál azonos körülmények mellett születtek a kromatogramok, úgy azok alkalmasak az arányok megállapítására, míg az átlagszámítás nem szokásos és az eloszlás persze Gaussi. A fumonizin kemotípus elnevezéssel az eredmények alapján egyet lehet érteni.

A 4.2. fejezet a nagyobb felbontást eredményező módszer felhasználásával készült, ahol a jelölt fumonizin analóg csoportokat (FB , FA , FC , FD és FBX) azonosít a retenciós idők különbsége, az MS^2 spektrumok értelmezése, a fragmentációs mintázat alapján, és az esetek többségében megállapítja típusukat és valószínűsíti szerkezetüket, megemlítve, hogy a rendelkezésre álló módszerek nem adnak lehetőséget a teljes térszerkezet megállapítására. A fejezetben a jelölt konzekvens technikát követ az azonosítás során, az elméleti fragmentációs útvonalak és a molekulaionok és termékionok m/z értékeinek relatív intenzitásarányainak összehasonlításával azonosítja a csoportokban megjelenő komponenseket és fumonizin vázon megjelenő szerves csoportok alapján új azonosítást –azaz a trikarballil –csoport citrát ciklus eredetét –is igazolja.

A 4.3.1. ill. 4.3.2. fejezetben jelölt egy új RP oszloppal és a holttérfogat minimálisra való csökkentésével, valamint egy oszloptermosztát beiktatásával további felbontást ért el az fumonizinek elválasztásánál. A kiértékelő szoftver segítségével a TOFMS mérések alapján a pontos tömegekből izomereket azonosított és levezeti a fragmensionok alapján a kilépési reakciókat. Amíg csak kvalitatív megállapításokat tesz a jelölt, a fejezetek eredményei elfogadhatóak, tehát az FB_1 és FB_5 izomerek elválasztása elfogadható, az pedig, hogy más felbontást eredményező analitikai mérőrendszerekben további hasonló izomerek léteznek-e, erre a dolgozat nem ad választ. A mennyiségi eredményeket viszont $-18.27 \text{ mg/g } FB_1 \text{ toxin}$ –a dolgozatban semmilyen kalibráció sem igazolja.

A 4.3.3. fejezetben részletezett észterezett toxinok kimutatása érdekes új eredmény, bár a 34. ábra kromatogramjai a kinagyítottaknál (azonosítottaknál) feltehetően és szemmel láthatóan sokkal több komponenst tartalmaz. Érdekes lett volna, annak bemutatása, hogy a jelölt csak a megtalált 6 új komponenst azonosította fumonizin származékként és a többi komponens zaj vagy nem fumonizin, illetve azok a fragmentációs megfigyelések amelyeket észrevettek a spektrumok vizsgálata során,

milyen mértékben esnek egybe az MS általános fragmentációs szabályaival, akár megtanítható-e a szoftver a megfigyelések alapján az azonosításra?

A 4.3.4. fejezetben az FP analógok kimutatásával foglalkozik a szerző. A fejezet elején lévő irodalmi hivatkozás talán az irodalmi részbe illik jobban, azonban ennél fontosabb az, hogy a feltételezett toxinok szerkezetét, itt tényleg független módszerrel kellett volna igazolni, mondjuk NMR-el vagy más szerkezet-felderítésre alkalmas analitikai módszerrel. Ezen a 42. ábrán bemutatott elméletileg lehetséges fragmentációs útmintázat sem segít.

A 4.4 fejezet a mazsolák fumonizín meghatározásával foglalkozik, így igazi analitikai kémia, így is értékelem. Az izolátumok szekvenálása alapján készült törzsfá demonstratív, hasznos. Ami eztán következik a 114-es oldalon, az nehezen érthető. Honnan lett az FB₁ és FB₂ kalibrációs minta? Mi is az hogy kalibrációs minta? Az biztos hogy nem mazsola, hisz a szerző az első aki mazsolából fumonizint mér. Valószínű, hogy valamilyen tisztaságú toxin, melyekből kalibrációs oldatokat készít a jelölt és megállapítja, hogy a kalibrációs összefüggés 3 nagyságrenden keresztül lineáris (nagyon), amit mi még sosem tapasztaltunk. Eztán egy egy pontos „spikolással” megállapítódik az FB₁ és FB₂ 59.4%-os és 54.3% -os kinyerési értéke (minden bizonytalanság vagyis standard deviáció nélkül) és feltehetően ezekkel értékekkel korrigálva a másik nyolc komponens csúcs alatti területét - eltekintve a elúciós különbségektől és az ionizációs határfok különbségektől - kiszámítja a jelölt a fumonizín izomerek koncentrációját 6-7 számjegy biztonsággal. Mindezen közelítések csak akkor lehetségesek egy tudományos munkában, ha a szerző ezekre felhívja a figyelmet és nem von le utána kvantitatív következtetést. Hasonló, sebekől vérzik az izolátumok táptalajon történő fumonizín analitikájának az értékelése, azzal tetézve, hogy a 17.41 és 19695.64 µg/kg közötti teljes FB koncentrációkból 5160 –as átlagot számolni elég elrettentő. Ezzel szemben az a következtetés, hogy a fumonizinek már a szőlő szemen is megtalálhatók és az aszalás során növekszik a koncentráció, elfogadható.

A 4.5 fejezet a fumonizinek azonosításával foglalkozik vöröshagymában, és amint ez elvárható, egy jóval egyszerűbb mátrixban (alig van cukor és zsír) 90 % felettiek a kinyerések és a hagyma fumonizín mennyisége jóval a mazsola alatti. Az olyan megállapítások, mint például „ érdekes eredmény, hogy az A vöröshagyma mintában az 3-epi-FB₄ mennyisége meghaladta az FB₄ mennyiségét, ugyanakkor a mazsolamintákban ez fordítva” minden kvantitatív alapot nélkülöznek, egyszerű csúcsintenzitások összehasonlítása történik, melynek akár semmi köze sincs a mennyiségekhez. Az Aspergillus awamori fumonizín szintetizáló képessége feltehetően új ismeretekkel gyarapította a toxintermelési irodalmat.

Mivel az összefoglalás és a tézisfüzetben közölt új tudományos eredmények hasonlóak, azért csak a tézisfüzet eredményeit értékelem. Mivel a jelölt az eredményeket 9 pontban foglalta össze és kiemelte az alkalmazott módszerek leírásából a vastag betűvel szedett eredményeket, így ezek új és tudományos értékét értékelem.

1. tézispont A *Fusarium verticillioides* elterjedésének feltérképezését és a toxinprofilok alapján javasolt kemotípus elnevezést elfogadom. Feltehetően az, hogy hol történt a feltérképezés, nem tudományos eredmény.

2. tézispont Változtatás nélkül elfogadom

3.tézispont Elfogadom, hogy a hatékony analitikai módszerrel az FB₁ és FB₅ toxinok számos (28 illetve 22) izomerje elválasztható. Nem tudom új tudományos eredménynek elfogadni azt, hogy egy műszert –amit amúgy komponensek azonosítására gyártanak- a jelölt először alkalmazta komponensek azonosítására

4.-5 tézispontot változtatás nélkül elfogadom

A 6.és 7. tézispontot összevonva fogadom el új tudományos eredményként.

A 8. tézispont mint arra korábban rámutattam elég súlytalan, természetes minták komponenselválasztása, nem elég alap új tudományos tézisponthoz.

A 9. tézispontot elfogadom.

A dolgozatot 14 közleménnyel támasztja alá a szerző, melyek közül a megjelent hat impakt faktoros közlemény lefedi azt a követelményt, hogy a dolgozat főbb tudományos eredményei lektorált nemzetközi folyóiratban publikált.

Kérdéseimet, a bírálóban témaközelben megfogalmaztam, de most újra kiemelném:

1.Az alkalmazott gradiens elúciók programok optimálás eredményei? Lehet, hogy más elúciós paraméterekkel, további, más komponensek, esetleg további fumonizin analógokat is tartalmaznak a tenyészetek?

2.Mivel a dolgozat készítésekor nem állt a rendelkezésére hiteles anyagminta és az újonnan kimutatott toxinok a vegyszer előállítóknál nem kaphatók, mi lett volna a lehetséges legjobb mennyiségi „valódi” érték megközelítés?

3.Ahhoz, hogy törvényi előírások szülessenek, a maximális megengedhető fumonizin koncentrációkra, ahhoz milyen további feladatokat kell az analitikának megoldania?

Budapest, 2012. nov. 10.

Dr. Fodor Péter
Az MTA doktora