

Válasz Dr. Záray Gyula tanszékvezető egyetemi tanár bírálatára

Tisztelettel megköszönöm Dr. Záray Gyula tanszékvezető egyetemi tanár részletes bírálatát, valamint a kutatási terület és az eredményeim méltatását. Elfogadom és megszívlelem a jogos kritikai észrevételeket, különösen a helyenként pongyola fogalmazásra utaló megjegyzéseket. Ezekre a pontokra nem is térnék ki a válaszomban.

29. oldal 2.5.3.: Nem teljesen egységes a dolgozat szerkezete, jobb lett volna, ha ebben a fejezetben sem emelem ki külön a témakörhöz tartozó további kísérleteket.

44. oldal: A stabilitás javításának eredménye elsősorban az alapvonal szórásának csökkenésében, az alsó kimutatási határ javulásában mutatkozott meg. Ugyanakkor nőtt a dinamikus méréstartomány is.

45. oldal: A nedves szilanizálás alatt a vizes fázisban történő szilanizálást értettem. A szenzor szilanizált felszínét lehetőség szerint AFM mérésekkel ellenőriztük, a szenzor aktuális vastagságát valamint a félértékszélesség változását az OWLS műszerrel követtük nyomon. A leírásban említettem, hogy a vizes fázisban szilanizált szenzoron szigetek találhatóak. Az alábbi ábrák támasztják alá a fenti értékelést:

Az A ábra mutatja a vákuumszilanizált szenzorok felületi érdességét AFM módszerrel vizsgálva. A vákuumban történő szilanizálás egyenletes borítottságú bevonatot eredményezett a rácson.

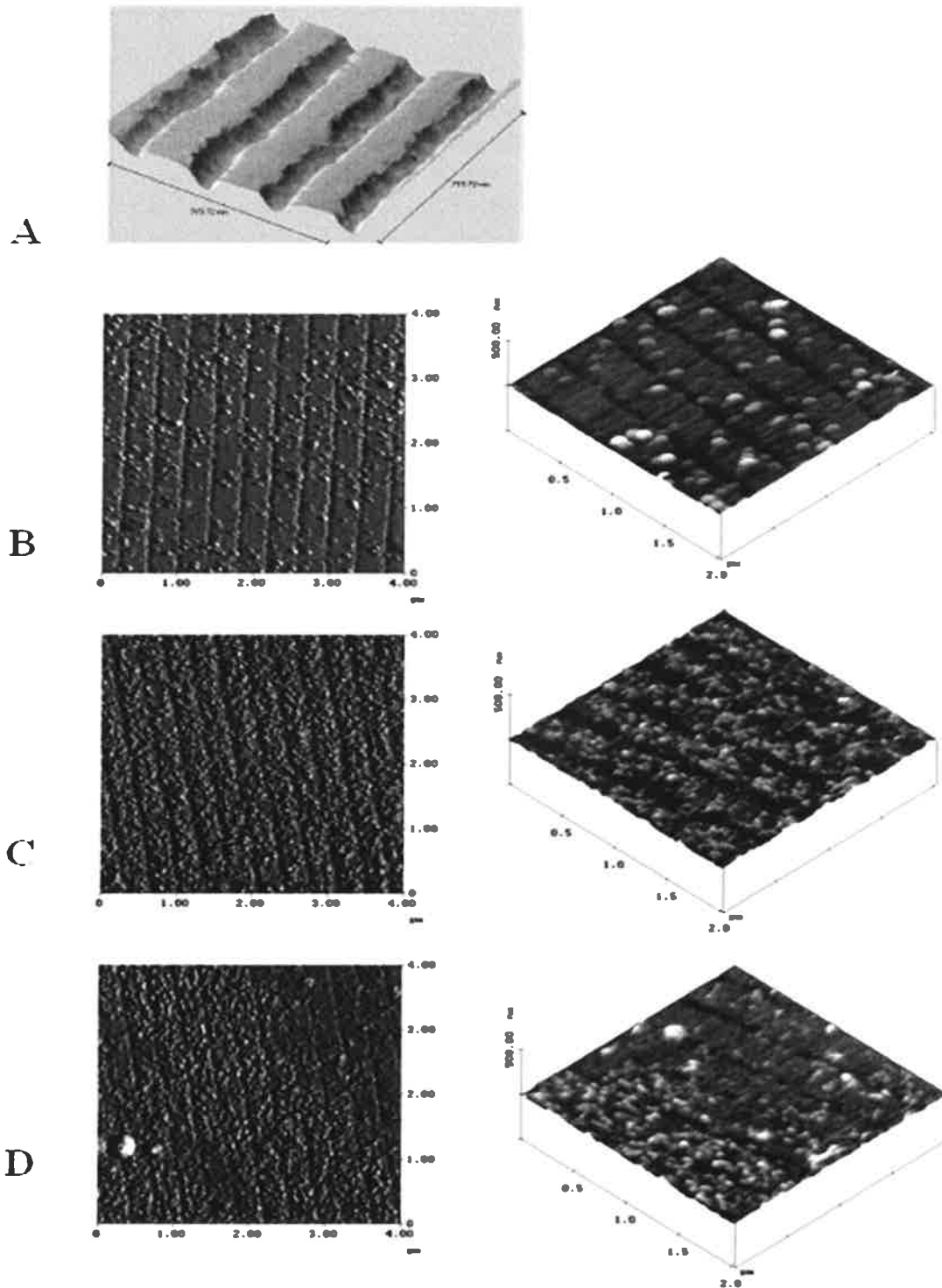
A B ábra az OWLS chip vizesfázisban szilanizált felületéről nyert AFM képet mutatja be két- és háromdimenziós ábrázolásban.

A C ábra a BSA-trifluralin konjugátum antigén rögzítése után készült.

A D ábra az antigén és a trifluralin-specifikus antitestek közötti immunkomplex kialakulását követően, kb. 20 minta mérése után készült. Megfigyelhető az immunkomplex jelentős deszorpciója, a felszíni borítottság a korábbi 50 nm átmérőjű foltok által alkotott, egyenletesnek mondható szintről jelentősen csökkent.

Az ábrák alapján megállapítható, hogy a vákuumszilanizált szenzorokkal tapasztalható egyenletes bevonathoz képest a vizes szilanizálással készített szenzorokon „szigetek” láthatóak. Átmérőjük a hullámvezető rács méreténél (1/2400 mm) lényegesen kisebb, a hullámvezető félérték szélessége nem változott számottevően, a szilanizált szenzorok vastagsága hasonló mértékben nőtt, mint a vákuumszilanizáláskor. A szenzorok további alkalmazását nem befolyásolta a szenzor felületének fent bemutatott egyenetlensége.

A szerves oldatba bemerítéssel szilanizált szenzorokon azonban már szemmel látható volt az egyenetlen réteg, a szenzorok vastagsága is lényegesen nőtt, ahogy azt a 5.1. táblázatban ismertettem.



1. ábra Különböző módon kezelt szenzorok vizsgálata AFM módszerrel
 A – vákuumszilanzált szenzor
 B – vizes oldatban szilanzált szenzor
 C – BSA-trifluralin konjugátum rögzítése
 D – mérősorozat végén

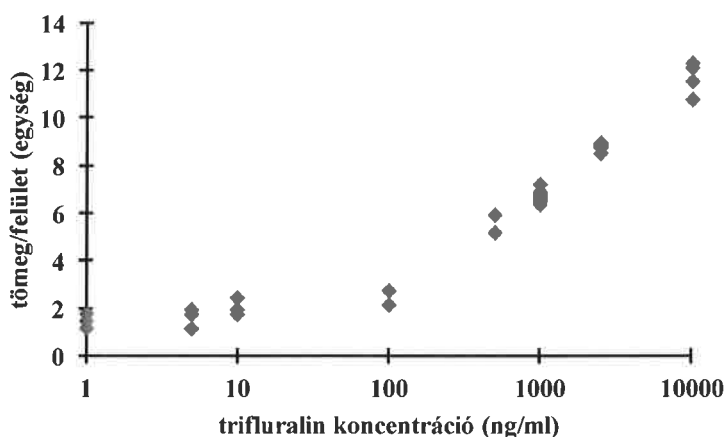
46. oldal: A szilanizáláshoz ugyanúgy az APTS 10%-os töménységű, pH 3,0-ra beállított vizes oldatát használtuk, mint a bemelegítés során. Hasonló vastagságú réteget kaptunk a gőztérben való szilanizálás során, azonban a kezelés lényegesen tovább tartott, így a bemelegítés mellett döntöttünk a laboratóriumban végzett szilanizáláshoz. Ugyanakkor ez a kísérlet bizonyította, hogy a szilánvegyületek gőze is alkalmas a szilanizálásra, lehetőséget teremtve a kisüzemi szilanizálás kifejlesztésére.

48. oldal: A vákuumban történt szilanizálás körülményei: a csökkentett nyomás a gőztérben: 1 mbar, a hőmérséklet szilanizálás alatt 120°C, hőkezelés 170°C, ciklus idő 4 óra.

52. oldal: A szilanizált szenzorok felülete a levegő nedvességtartalma és a szennyező anyagok miatt szennyeződhet, a pormentes tárolás azonban megfelelő védelmet nyújt.

Az 5.9. ábrán bemutatott összehasonlító vizsgálatok célja éppen a szilanizálási körülmények és az eltarthatóság összehasonlítása volt. A laboratóriumi körülmények között vizes fázisban szilanizált chipeket a szárítás után közvetlenül Eppendorf csövekben tároltuk, a vákuumszilanizált szenzorokat pedig pormentesen csomagolták. A dolgozatban a légmentes tárolás helyett a pormentes lett volna a megfelelő kifejezés, tehát a tárolási körülmények hasonlóak voltak. Így a két eljárás összehasonlítása helytálló volt.

59. oldal 5.15. ábra: Az eredeti mérést szélesebb méréstartományban végeztük, mint amit az ábrán feltüntettem. Az 1-100 ng/ml koncentráció tartományban nem kaptunk értékelhető jeleket. A dolgozatban a 100 ng/ml standardhoz tartozó pontok lemaradtak az ábráról.



2. ábra Trifluralin meghatározása direkt immunszenzorral

60. oldal: A 5.16. ábra értékelésénél elírás a szenzorhígítás. A szérumhígítás értékelését nem lehet csak e mérés alapján megtenni, vizsgálataink során a különböző szérumhígítással standardokat is mértünk és a megállapításokat ezen eredmények alapján tettük. A dolgozatban a terjedelempre való tekintettel nem tudtam minden részletre kitérni. A „szép görbe” nem szabatos megfogalmazás, jól reprodukálható, megfelelően kiértékelhető, de nem túl tömény oldat mérésével nyert görbét értettem alatta.

61. oldal A huminanyagok, amelyek a növényi anyagok lebomlása során keletkeznek, a természetes vizekben 0,5–5 mg/l koncentrációban lehet jelen. Hatását nem vizsgáltuk a trifluralin meghatározása során.

5.18. ábra: Az említett jelenséget több szerző is megemlíti az ELISA mérésekkel kapcsolatban. A tömény antitest vagy antigén alkalmazásakor gátló hatást alakul ki, kisebb értékeket kaptunk, aminek az ún. Hook-hatás lehet az oka. Instabil lesz a rendszer, a mért jel csökkenhet, a szórás nőhet.

63. oldal: Az 5.3. táblázatban átszámított relatív szórást az alábbiakban adom meg:

Trifluralin koncentráció (ng/ml)						
Bevitt (spike)	OWLS módszerrel mért		ELISA módszerrel mért		GC-MS módszerrel mért	
	átlag	rel. szórás	átlag	rel. szórás	átlag	rel. szórás
0	< 0,0001		< 0,02		< 0,01	
2,5	1.81	16.6	1.79	21.2	2.42	3.3
5	5.43	5.5	4.16	27.9	4.32	23.4
25,0	36.3	3.1	34.1	11.8	24.6	15.3
-- ^a	3.08	33.1	1.29	41.1	1.94	27.3

^a Trifluralintartalmú felszínvíz-minta (Keleti Főcsatorna, 2001. július 18. mintavétel)

5.3. táblázat Felszínvíz trifluralintartalmának meghatározása

A relatív szórás az immunszenzorral és az ELISA módszerrel mérve 3-40% körül mozog, a 30%-os relatív szórás az immunanalitikai vizsgálatoknál elfogadott.

Elfogadom, hogy a mátrixhatás vizsgálata fontos lenne a talajvizek vizsgálatánál.

Mintasám: A 61. oldalon, a szenzor statisztikai értékelésénél ismertettem, hogy kb. 20-30 mérés végezhető el egy szenzorral. A töményebb mintákkal csak ennek mintegy a fele, ami lényegesen csökkenti a mérés hatékonyságát.

64. oldal: A minták vizsgálata során valóban csökkent a dinamikus méréstartomány szélessége. Az említett két ábrát összevetve az dinamikus méréstartomány felső határa mindkét esetben közel azonos. A különbség a méréstartomány alsó szakaszánál látható, feltételezésem szerint a rendkívül alacsony koncentrációban adagolt antigén molekulák a mintaelőkészítésként alkalmazott szűrés során adszorbeálódtak.

71. oldal: A görbék kiértékelésekor az injektálás előtti 1 percben az alapvonal pontjait átlagolva vontuk ki a görbe injektálást követő 5-6. vagy 6-7. perc közötti mérési pontjainak átlagából. A szórás értékét az átlagolt görbepontok szórása adta. A kimutatási határ megállapítására a fentiek alapján határoztuk meg a vak minta közepes válaszijelét, és a vak minta válaszijel háromszoros tapasztalati szórását.

74 oldal: A megfelelő ábrákat a terjedelmi határok miatt nem tudtam ismertetni. Az eljárás elsősorban a sorozatmérésekre alkalmas, mikor nagyszámú, azonos típusú minta vizsgálatára van szükség. A minta hígításának beállításakor minden esetben figyelembe kell venni a vizsgálandó koncentrációtartományt, illetve a megengedett maximális koncentrációt, hiszen ez az a koncentrációtartomány, ahol lehetőleg gyorsan kell eldönteni, hogy a minta megfelel a követelményeknek, vagy nem. Ilyen alkalmazási terület lehet pl. a gabonaátvétel, tejátvétel, paprika malmok, stb. A minták lehetséges szennyezettségének ismeretében a határértéknél kisebb és nagyobb koncentrációjú standarddal szennyezett mintákat alkalmaztunk a dinamikus méréstartomány vizsgálatára. A kisebb arányú hígítás előnye, hogy nagyobb a mérendő anyag koncentrációja, ugyanakkor nagyobb a mátrixhatás is, míg a jobban hígított minták esetén a méréstartomány kisebb, azonban a mintákból adódó mátrixhatás is kisebb. Mivel a gabonák és a fűszerpaprika maximálisan megengedett aflatoxin B1 koncentrációja hasonló, így a méréseket is hasonlóan előkészített mintákkal végeztük.

76. oldal Az 5.9. táblázatban szórás lemaradt, az adatokat az alábbi táblázatban ismertetem.

Minta	Ochratoxin A ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	OWLS ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Visszanyerés (%)
Búza 1	0	0,11 \pm 0,08	-
Búza 2	1	0,77 \pm 0,13	77,3
Búza 3	3	2,61 \pm 0,25	87,1
Búza 4	5	4,20 \pm ,37	83,8
Búza 5	10	10,23 \pm ,87	102,3
Búza 6	25	27,37 \pm 1,73	109,5
Árpa 1	0	0,39 \pm ,013	-
Árpa 2	1	0,81 \pm 0,22	80,9
Árpa 3	3	2,67 \pm 0,43	88,9
Árpa 4	5	5,50 \pm 0,38	110,0
Árpa 5	10	10,90 \pm 1,21	109,0
Árpa 6	25	27,33 \pm 2,56	109,3

5.9. táblázat Gabonamintákhoz adott (*spike*) ochratoxin visszanyerésének meghatározása

Időigény: A mérésre előkészített rendszerrel a minta beérkezésétől – a mintaelőkészítést is beleszámítva – kb. 40 percen belül eredmény szolgáltatható. A mérés előkészítése reggel hosszabb folyamat, kb. 1 órát vesz igénybe, míg az alapvonal beáll, illetve a szükség szerinti antigén-konjugátum rögzítését elvégezzük.

77. oldal Az 5. 29. ábrán a bormintákat úgy választottuk, hogy egy könnyebb száraz, egy testesebb és egy édes vörösbor legyen. A minták egy nagyobb méréssorozatból származtak, a pontos eredetüket nem adhattuk meg.

81. oldal 5.11. táblázatban az 5 mg/kg DON-t tartalmazó mintából helyesen 4,7 mg/kg DON-t mértünk vissza.

Az összefoglalásban – bár nincs kellően kiemelve – szerepel, hogy búzaliszt mintákból határoztuk meg a DON szennyezettséget.

87. oldal Egyetértek, hogy a „szép görbe”, illetve a „jól értékelhető görbe” megfogalmazás nem szabatos kifejezések, azonban a módszerek kifejlesztése során feltétlenül szükséges volt ezen mérések elvégzése és értékelése. A szérumhígítás értékelésénél ez egy tájékoztató mérés, vizsgálataink során a különböző szérumhígítással standardokat mértünk és a megállapításokat ezen eredmények alapján tettük.

A szenzorok érzékenyítéséhez alkalmazott antigén, ill. antigén-konjugátum koncentrációjának megválasztása csak kísérleti úton határozható meg. A túl tömény oldat alkalmazásával ugyan jól definiált réteg jön létre, az antitest oldatok injektálása után is lényegesen nagyobb görbét kapunk, de éppen ezért kevésbé lesz érzékeny a mérés. Ugyanakkor a nagyon híg oldat injektálása nyomán nagyon kevés molekula rögzül, kicsi a tömeg, ill. a rétegvastagság növekedése. Ebben az esetben ugyan igen alacsony kimutatási határral lehetne mérni, azonban a mérés bizonytalansága, az eredmények szórása igen nagy lesz, a szenzor nem alkalmas a

sorozatmérésre. Így a közepes koncentrációkat tekinthetjük megfelelőnek, optimálisnak a vizsgált számos tényező szempontjából.

89. oldal A vitellogenin szintjének vizsgálata a hím egyedekből az ösztrogén agonista hatású szennyezések kimutatására tekinthető integrált indikátornak. Az ösztrogén antagonistá szennyezőkre a vizsgálat nem alkalmas, hiszen ott a nőstény egyedekben a vitellogenin szintjének csökkenését kellene vizsgálni, azonban az átlagos szint nem határozható meg.

99. oldal Sajnálom, hogy egy félreérthető mondat került az összefoglalásba, a mondat így lett volna helytálló: A különböző kémiai kezelések hatását tanulmányoztuk a LAB-sejtek szaporodására. A LAB-sejtek szaporodását, illetve annak gátlását EC-OWLS módszerrel, valamint referenciamódszerként mikro-assay eljárással vizsgáltuk, az eredményeket összehasonlítottuk.

103. oldal Az 5.57. ábra felirata hiányos, lemaradt a mérés körülményeit ismertető rész: (A – 4,8 µg/ml szilikatein enzim oldat injektálása, B – 50 mmol/l HCl-oldattal mosás után ismét 4,8 µg/ml szilikatein enzim oldat injektálása, C – a bioszilika-réteg kialakításához 0,9 mmol/l TEOS oldatot injektáltunk háromszor, 50 mmol/l HCl-oldattal mosás után ismét 4,8 µg/ml szilikatein enzim oldat injektálása)

Az 5.58. ábra címe helyesen: Bioszilika képződése a szenzor felületén folyamatosan áramló rendszerben (15 °C, 0,07 ml/perc áramlási sebesség, TRIS pufferben (pH=7,4), szilikatein enzim 2,4 µg/ml, TEOS 0,9 mmol/l)


105. oldal: Az 5.61. ábra felirata hiányos, lemaradtak a mérés körülményei: injektált térfogat 200 µl; 0,07 ml/perc áramlási sebesség; 15 °C: szilikatein enzim rögzítve, 15 °C-on mérve; 5°C: szilikatein enzim rögzítve, 5 °C-on mérve; BSA: BSA rögzítve, 15 °C-on mérve).

Elfogadom a tézispontok értékelését, miszerint az 5.1.8. pont utolsó mondata túlmutat a dolgozatban ismertetett eredményeken, a bemutatott eredmények nem igazolják kellő alapossággal, hogy a hím egyedekben mérhető Vtg-szint alapján monitorozni lehet a felszíni vizek, illetve vizes élőhelyek endokrin zavaró hatású szermaradványokkal való szennyezettségét. Ennek bizonyítására további komplex vizsgálatok szükségesek.

Az 5.2.3. tézispont megfogalmazása valóban nem szabatos, bár a mérési eredmények megfelelően alátámasztják a megállapítást. Helyesebben: A hőmérséklet jelentősen befolyásolta a polimerizációt és az immobilizációt, 25 °C-on a látszólagos K_M ($1,02 \times 10^{-11}$ mol/cm²) értéke kissé csökkent a 15 °C-on mért értékhez ($1,62 \times 10^{-11}$ mol/cm²) képest.

Ismét köszönöm Dr. Záray Gyula tanszékvezető egyetemi tanár részletes bírálatát, segítő szándékú megjegyzéseit, valamint a kedvező összegzést az értekezés elfogadására vonatkozóan.

Budapest, 2014. szeptember 6.


Adányiné Kisbocskói Nóra