

**Válasz Dr. Várnai Péter, az MTA doktora**  
**opponensi bírálatára**

Köszönöm Dr. Várnai Péternek dolgozatom bírálatát, az értekezésről alkotott elismerő véleményét. Köszönöm a dolgozat összeállításával kapcsolatos kritikai észrevételeit, a lézeres konfokális pásztázó mikroszkópiával kapcsolatos további kísérletek tervezését stimuláló kérdéseit. Megjegyzéseire, kérdéseire az alábbiakban válaszolok.

A kritikai megjegyzésekre adott válaszaim:

*Szívesen olvastam volna pár sort az endogén porfirinekről, illetve a hozzájuk köthető porfiriákról, másrészt hiányérzetem volt azzal kapcsolatban, hogy a porfirineken kívül milyen más molekulák jönnek szóba az említett fotodinamikus hatások kiváltására.*

Megértem a Bíráló hiányérzetét a delta-aminolevulinsav (ALA) indukcióra épülő terápiás lehetőségekkel kapcsolatban. Az ALA az endogén porfirinek (uroporfirin, koproporfirin, protoporfirin IX) prekuzora, aminek bioszintézisét a PPIX-ből a vasion beépülése révén keletkező hem negatív visszacsatolással szabályozza. Ha az ALA-koncentráció megnő, akár a reguláció hibája miatt, akár azért mert külső forrásból delta-aminolevulinsavat vesz fel a sejt, az endogén porfirinek koncentrációja, különös tekintettel a PPIX-re, a fiziológiás érték többszörösére emelkedhet. A porfirin koncentráció növekedésével arányosan nő a sejt fényérzékenysége.

Az ALA-indukcióra épülő fotodinamikus reakciót a daganatterápián, valamint egyes bőrgyógyászati kórképek kezelésén túl fel lehet használni sejtasszociált vírusok inaktivációjára (Phoenix, D.A. et al. (2014) Photodynamic antimicrobial chemotherapy in Novel Antimicrobial Agents and Strategies pp. 295-330). Különösen ez utóbbi alkalmazás alapján feltétlenül helye lett volna a dolgozat irodalmi háttérét bemutató részben.

A dolgozatban, a második generációs fényérzékenyítők között porfirin származékokon kívül megemlítsre kerülnek a klorinok és a ftalocianinok. A fotodinamikus vírusinaktivációra alkalmas vegyületek közül példaként, részletes tárgyalás nélkül, szerepel a merocianin, a hipericin és a hipokrellin A. Nem jelennek meg olyan, kétségtelenül fontos fényérzékenyítő vegyületek, mint például a pszoralén, a kurkumin, a rose bengál, a klorofill származékok vagy a riboflavin, hogy csak olyanokat említsünk, amelyeknek a vírusinaktiváció területén is szerepük lehet. Erre a hiányosságra nem mentség, legfeljebb magyarázat az egyes fejezetek terjedelmi egyensúlyára való törekvés a dolgozat összeállításakor.

*Bár az Eredmények és a Megbeszélés fejezet önmagában egyaránt jól felépített, az egymáshoz való viszonyuk viszonylag nehezen áttekinthető. Különösen, ha ehhez még a 9 egységre tagolt téziseket is hozzávesszük.*

Elnézést kérek, ha kényelmetlenséget okozott a dolgozat szerkezete. Az eredmények bemutatásától elkülönülő diszkusszió fejezet beiktatására azért került sor, mert a különböző módszerekkel kapott, különböző fejezetekben tárgyalt eredmények több esetben kiegészítik, alátámasztják egymást. Érdeemesnek láttam ezeket az eredményeket összefüggésükben tárgyalni, és az összefüggések alapján levonni a végső következtetéseket.

A feltett kérdésekre adott válaszaim:

1. Az eredmények fejezetben számos ábrán az értékek szórás nélkül lettek feltüntetve, illetve, ahol van átlag és szórás, jellemzően ott sem található az elemszám és a szórás típusa. Az egyes módszerek leírásánál ugyan volt utalás arra, hogy végeztek statisztikai vizsgálatokat, de ennek ellenére kérem, hogy foglalja össze, hogy az alkalmazott mérések esetén milyen szempontok alapján történt az adatok statisztikai analízise.

Megalapozott a Bírálónak a statisztikai elemzések bemutatásának hiányosságaira vonatkozó kritikája. Röviden összefoglalva.

A spektrumfelbontások hibáját a

$$\chi^2 = \frac{\sum_{\lambda=390}^{480} [A(\lambda)_{\text{measured}} - A(\lambda)_{\text{calculated}}]^2}{\sum_{\lambda=390}^{480} A(\lambda)_{\text{measured}}}$$

összefüggéssel számítottuk ki.

A spektroszkópia módszerekkel végzett kísérletek során, valamint a lipidek szénhidrogén láncainak konformációváltozásával kapcsolatos fázisátalakulás paramétereinek meghatározásakor legalább három független mérést végeztünk. A bemutatott adatok a párhuzamos kísérletek eredményeinek átlagát mutatják. Minden esetben kiszámítottuk a párhuzamos mérések eredményeinek korrigált empirikus szórását (az átlagtól való átlagos eltérést), valamint az átlag hibáját. A táblázatokban feltüntetett értékek az adott eredmények szórását mutatják.

A fáginaktivációs vizsgálatok során legalább három független kísérletsorozatot végeztünk. Az egyes kísérletekben pedig mindig három-három, azonos körülmények között kezelt mintát elemeztünk. Az utóbbiak átlagát tekintettük a független mérés eredményének. Kiszámítottuk a párhuzamos mérések eredményeinek korrigált empirikus, valamint az átlag hibáját.

Az inaktivációs görbék lineáris szakaszaira lineáris regresszióval egyenest illesztettünk. Meghatároztuk a legjobban illeszkedő egyenes paramétereit és az illeszkedésre jellemző Pearson-féle korrelációs együttható értékét.

2. A porfirin származékok sejten belüli lokalizációjának konfokális vizsgálatokor hogyan történt a nagymértékű spektrális átfedést mutató LysoTracker Green és BMPCP-4P2 fluorofórok elkülönítése, azaz a csatornák közötti átbeszélés kizárása?

Sajnos a dolgozatban konzekvensen felcserélve szerepel két gerjesztési/detektálási hullámhossz, amiért elnézést kérek. A LysoTracker Green festéket  $\lambda=488$  nm-en gerjesztettük, az emisszió detektálása pedig  $\lambda=510$  nm-en történt. A porfirin és a LysoTracker Green gerjesztésének hullámhossza egymással megegyezett, a detektálás pedig a  $\lambda=650-750$  nm tartományban történt. Így a detektáláskor nem volt átfedés a két csatorna között.

3. Történt-e a kolokalizáció mértékének kvantitatív meghatározása, és ha nem, akkor miért nem, illetve milyen módszerrel lehetett volna ezt elvégezni?

A mikroszkópos felvételek elkészítésével elsősorban arra kerestük a választ, hogy a kationos porfirin származékok kimutathatók-e a sejtmagban? A felvételekhez kapcsolódóan kvantitatív vizsgálatok nem történtek.

Kvantitatív kolokalizáció meghatározásra lehetőséget teremthet a Förster-féle rezonancia energia transzfer feltételeinek megteremtése, amennyiben a szereplő kromofórok alkalmas megválasztásával létrehozhatók megfelelő donor-akceptor párok. Sajnos a porfirin származékok és a SYBR Green/ LysoTracker Green/ Mito Tracker Deep Red párok spektrális tulajdonságaik alapján nem alkalmasak ilyen kísérletekre.

Felmerülhet még a porfirin mennyiségének közvetlen meghatározása az egyes kompartmentekben. A megfelelő pixelekhez rendelt fluoreszcencia intenzitás meghatározható a felvételek készítésére is használt konfokális mikroszkóppal. Ugyanakkor nem ismert a különböző molekuláris környezetben (pl. lizoszóma és mitokondrium) elhelyezkedő porfirin származék fluoreszcencia kvantumhatásfoka. Modellrendszereken végzett kísérletek alapján feltételezhetjük, hogy a kationos porfirinek kvantumhatásfoka függ a közeg PH értékétől, polaritásától, továbbá megváltozhat például a DNS-hez való kötődés következtében, tehát a fluoreszcencia intenzitás értékek nemcsak a koncentrációval összefüggésben változhatnak.

Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópiával (FCS) a kvantumhatásfoktól független módon meghatározható a kromofór koncentrációja. Ezért FCS felhasználásával kísérletet tettünk porfirin származékok sejten belüli eloszlásának kvantitatív meghatározására FCS felhasználásával. A Soret-sávban történő intenzív gerjesztés azonban a minta azonnali kiterjedt fotokémia destrukciójához vezetett.

Tisztelettel kérem a válaszaim elfogadását.

Budapest, 2021. január 25.



dr. Csik Gabriella