

Válasz Prof. Dr. Galbács Gábornak, az MTA doktorának
„LÉZERES MINTABEVITELRE ÉPÜLŐ TÖMEGSPEKTROMETRIÁS
MÓDSZEREK FEJLESZTÉSE ÉS ALKALMAZÁSA BIOAKTÍV
VEGYÜLETEK VIZSGÁLATÁBAN” című MTA doktori értekezésemről készített
opponensi bírálatára

Szeretném megköszönni Galbács Gábor professzor úrnak, hogy elvállalta doktori munkám bírálatát, illetve időt és energiát áldozva elkészítette opponensi véleményét disszertációmról. Hálás vagyok, amiért a dolgozat gondos áttanulmányozása után felmerült megjegyzéseivel és kérdéseivel hozzájárul tudományos eredményeim jobb értelmezéséhez. Különösen köszönöm a méltató szavakat és tézispontjaim elfogadását.

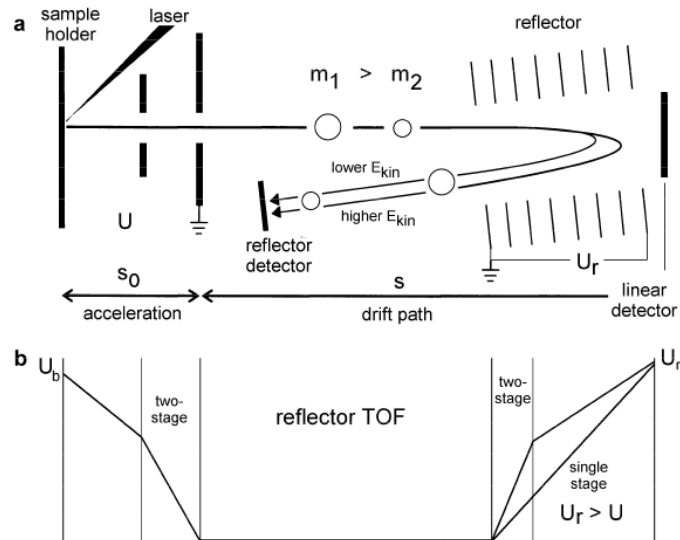
Az opponens megjegyzéseire és kérdéseire adott válaszaimat az alábbiakban foglalom össze:

Megjegyzések:

1. A disszertációmban előforduló nyelvtani és stilisztikai hibákért elnézését kérem. A jövőben igyekszem precízebben és gondosabban fogalmazni a félreérthető és pongyola kifejezések felszámolása érdekében.
2. Köszönöm, opponens úr megjegyzését! Egyetértek azzal, hogy célszerűbb lett volna a célkitűzések tömörebb ismertetése.
3. Az általunk fejlesztett porlasztóberendezés esetében az „ultrahangos atomizáló” tényleg pontatlan kifejezés. Ahogy opponens úr is említette, a helytelen elnevezés több gyártónál is előfordul, amelynek átvételével hibát követtem el.
4. Teljes mértékben elfogadom opponens úr észrevételét azzal kapcsolatban, hogy a szövegben nincs kellően elkülönítve a MALDI mátrix és a minta mátrix fogalma, így ez félrevezető lehet az olvasó számára. A jövőben erre több figyelmet fogok fordítani!
5. Figyelmetlenségem miatt a 104. ábráról lemaradt a méretek skála. A 105. ábra a) és e) panelén szerepel az 1 mm-t ábrázoló méretek skála, azonban az ábra feliratában elmaradt ennek említése.
6. A disszertációban a képkalkotási tömegspektrometria és az ionmobilitás tömegspektrometria rövidítései megegyeznek, ami zavaró és félrevezető. Mivel az ionmobilitás MS csak néhány alkalommal fordul elő a szövegben, ezt a kifejezést teljes formában, rövidítés nélkül lett volna célszerű használnom.
7. Köszönöm opponens úr megjegyzését, dolgozatomban valóban több helyen keveredik a reflektor és reflektrom kifejezés és előfordul a helytelen használat is.

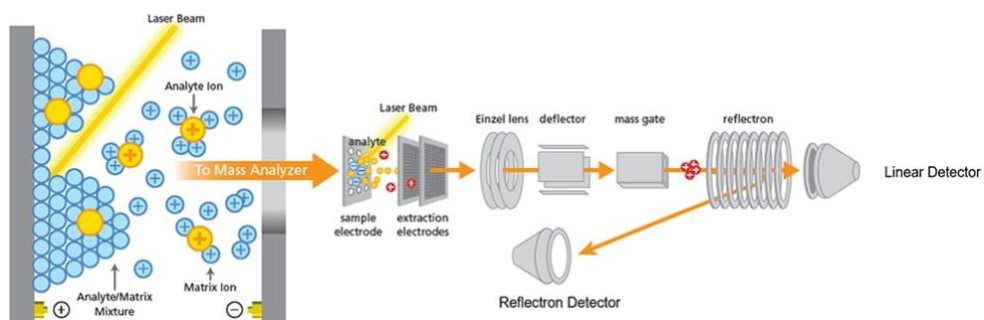
A reflektoron egy elektrosztatikus potenciálgradiens segítségével működő iontükör, amely az ionforrásban keletkezett ionok kinetikai energia-eloszlásának korrekcióját és főként a spektrális felbontás, valamint a tömegpontosság növelését célozza.

Sajnálatos módon, a reflektoron és reflektor (ionreflektor) kifejezések használata a tömegspektrometriás szakirodalomban némi következetlenséget mutat, amit az alábbi ábrákon is szemléltetnek.



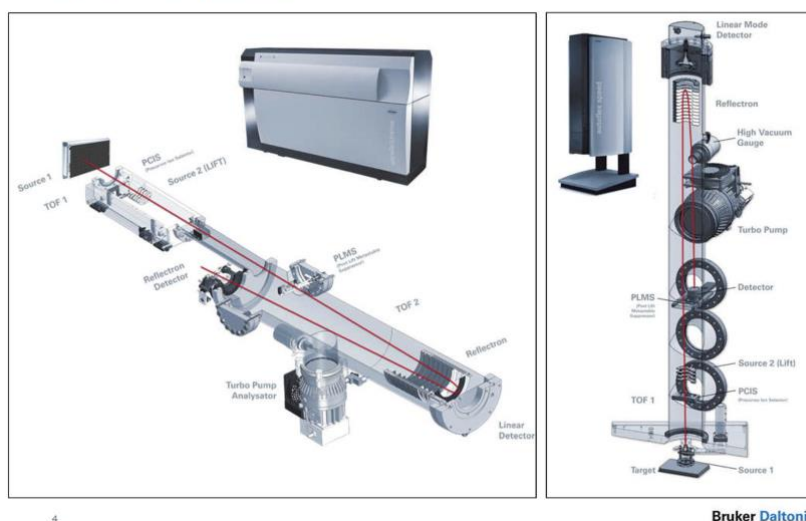
J. H. Gross, Mass Spectrometry A Textbook, 2 nd Ed. (2008)

A reflektoronnal ellátott TOF tömeganalizátor egységén belül az ionok reflektoron módban történő detektálását egy microchannel plate (MCP) detektor végzi, amelyet reflektoron vagy reflektor detektornak nevezünk, megkülönböztetve a lineáris elrendezésben alkalmazott ún. lineáris MCP detektortól. A szakirodalomban és a különböző tömegspektrométer-gyártók által használt terminológiában is megtalálhatjuk mindkét kifejezést, amit sajnálatos módon én is átvettem és következetlenül használtam.



Shimadzu MALDI TOF MS berendezés felépítése

<https://www.ssi.shimadzu.com/service-support/faq/maldi/maldi-basics/index.html>



Bruker MALDI készülékek felépítése.

<https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/mass-spectrometry/maldi-tof.html>

Kérdések:

1. Az 1. ábrán egy egéragy mintán szemléltetem az ablációs krátereket. Opponens úrnak maximálisan igaza van abban, hogy az ábrára hibás méretskála került. A méretskála helyesen, ahogy azt opponens úr is említette 1 mm nagyságú. A felvétel egy SMZ745T Nikon mikroszkóppal és Nikon D500 kamerával készült.
2. A fehérjék MALDI képképzési tömegspektrometriás vizsgálatainál a lipidek eltávolítása szükségzerű, hiszen erős ionszupresszív hatással rendelkeznek. A nem formalinnal fixált és paraffinba ágyazott kriosztatós szövetmetszetből a sók és a lipidek eltávolítását etanolos-vizes extrakciós sorral végeztem el. Az optimalizált és általam általánosan alkalmazott protokoll a következő:
 - karboxi-metil-cellulózba ágyazott szövetmetszet (15 μm) készítése kriosztáttal ITO bevonatos lemezre
 - a szövetmetszet mosása 30 másodpercig -20°C -os 70%-os etanolban
 - a szövetmetszet mosása 30 másodpercig -20°C -os 90%-os etanolban
 - a szövetmetszet szárítása szobahőmérsékleten N_2 gázzal (99,99%)
 - a szárítás után következik a MALDI mátrix depozíciója

A szakirodalomban hasonló lipidmentesítési módszereket ismertetnek (*Gustafsson 2011. Int J Mol Sci. 12(1):773-94., loro et al. 2022. Methods Mol Biol. 2420:177-190.*) A lipidmentesítési művelet optimalizálása során megvizsgáltuk, hogy milyen koncentrációjú etanol-víz elegyek a leghatékonyabbak a lipidek és sók eltávolítására a protein expressziók és lokális eloszlásuk megtartása mellett. Ehhez a szövetmetszetekből mikrodisszekcióval mintákat vettünk és HPLC-MS/MS vizsgálatokkal meghatároztuk az abundáns fehérjéket. A képképzési vizsgálatok mintaelőkészítésének optimalizálása során ezen jellemző fehérjék lokális eloszlására fókuszáltunk, keresve a legjobb jel/zaj viszony és térbeli felbontás paramétereit.

3. A 8. ábrán szereplő reprezentatív MALDI TOF MS spektrumok tiszta MALDI mátrix oldatok analiziséről készültek. A Na⁺ és K⁺ tartalom feltehetően az alkalmazott oldószerekből (acetonitril, víz, TFA) származhatnak.

4. A MALDI képképzési tömegspektrometria során az opponens úr által említett „carry-over” effektus nem jellemző. Valószínűleg ez az ionforrás különleges geometriájából, a lézernyaláb beesési szögéből, a lézerfluencia és a késleltetési idő optimalizálásából adódhat.

A MALDI ionforrás és az ablációs kamra elszennyeződése azonban jelentős problémaforrás, főként a képképzési applikációkban. Az ionforrás elszennyeződése jelentősen rontja a detektálási limitet és a jel/zaj viszonyt. Elkerülése érdekében az ionforrást fizikailag, izopropanollal minden vizsgálat előtt meg kell tisztítani. A modernebb készülékekben ugyan van beépített ionforrástisztító funkció, azonban használatát munkám során mellőztem. Ennek oka, hogy az ionforrás szennyeződéseit eltávolító lézer jelentősen felmelegíti az ablációs kamrát és a fókuszáló optikát, így az elpárologtatott szennyeződés a legközelebbi „hideg ponton” lerakódik, ami az ionforrás vákuumszűrőjének bemeneti pontja.

Ez mellett a szennyeződések minimalizálásának céljából a vizsgálatok megkezdése előtt az adott mintára optimalizáljuk a lézerfluenciát annak érdekében, hogy a lehető legalacsonyabb, de optimális mértékű ablációt/deszorpciót/ionizációt létrehozó energiát alkalmazzuk. Tapasztalataink alapján ezzel biztosítható, hogy a nagyobb szövetmetszetekből készített akár több tízezer pixelből származó spektrális információ a mérés elején és végén összehasonlítható legyen. Az ionforrás szennyeződésének csökkentése érdekében a hosszabb méréseknél a térbeli felbontást is optimalizáljuk, általában 50-80 µm-t állítunk be. A nagyobb felbontású vizsgálatok esetén pl. 5-10 mikrométer, a szövetmetszet egy adott, kisebb régióját és nem a teljes mintát jelöljük ki az analizisre.

Az egyetlen pontban végzett nagyszámú ismételt lézerpulzusok hatása a MALDI IMS során nem túlzottan jelentős. Tapasztalataink alapján akár 1000 feletti impulzus által létrehozott tömegspektrumot is egyesíthetünk úgy, hogy az első és az utolsó sorozat között ne legyen lényeges intenzitásbeli vagy legalább intenzitás-aránybeli különbség, amely a spektrumok normalizálása során korrigálható. Ennek fő oka abban keresendő, hogy a mátrix depozíció során a szabályozott extrakciós folyamatoknak köszönhetően a célvegyületek jelentős része a MALDI mátrixrétegbe kerül és a deszorpció/ionizáció erről a felületről valósul meg. Az UV lézerek alkalmazása során a mátrixszal bevont minta felületének mintegy 30-200 nm mélységű szeptét érinti az abláció (*Dreisewerd et al. 2014. Anal Bioanal Chem. 406(9-10):2261-78.*), amiből adódóan a szövetmetszetek mérése után jól megfigyelhető, hogy a szöveti struktúra teljesen intakt marad és akár hisztológiára megfesthető.

Végül, a MALDI IMS vizsgálatok által rögzített tömegspektrumokat a kiértékelés során a szoftver (Bruker FlexImaging), választható algoritmusok segítségével normalizálja és kalibrálja, amely ugyancsak hozzájárul ahhoz, hogy a mérés elején és végén felvett spektrumok összehasonlíthatóak legyenek.

5. A vizsgálatok előtt minden esetben optimalizáltam az alkalmazott lézerfluenciát, amelyet a térbeli felbontás, az alkalmazott mátrix, a vizsgálandó vegyületek és az ionizációs mód (pozitív, negatív) határozott meg. Az alkalmazott lézerfluencia mértéke

meghatározó jelentőségű. Túl alacsony energia mellett nem történik detektálható abláció/deszorpció/ionizáció, így nem kaphatunk értékelhető tömegspektrumot. Ezt követően az ionizációs küszöbértéket átlépve a lézerfluencia növelése egy ideig javítja a jel/zaj viszonyt, majd az erős fragmentáció miatt a spektrális háttér drasztikusan megnövekszik, amely rontja a mérés érzékenységét és spektrális felbontását, tömegpontosságát. A térbeli felbontással hasonló jelenséget tapasztaltunk. A nagy energia nagyobb ablációs krátert és így rosszabb térbeli felbontást eredményez. Mindenképpen kijelenthető, hogy a lézerfluencia optimalizálása elengedhetetlen a jó minőségű MALDI MS eredmények eléréséhez.

Az optimális lézerfluenciát jelentősen befolyásolja a lézerfolt nagysága is, hiszen kisebb pixelméretnél a felületi energiasűrűség nagyobb lesz.

A vizsgálatoknál alkalmazott Bruker Smartbeam II Nd:YAG lézertechnológia előnye, hogy nagyon alacsony energián (néhány $\mu\text{J}/\text{impulzus}$) is stabil, ami kritikus a nagyfelbontású képalkotási vizsgálatoknál. Tapasztalataim alapján a Bruker Autoflex Speed készülék esetében az optimált lézerfluencia 5-10 μm -es pixel méret esetében ca. 2-8 $\mu\text{J}/\text{impulzus}$, míg 50-80 μm -es pixel méretnél 40-60 $\mu\text{J}/\text{impulzus}$ között lehet.

6. A vizsgált célvegyületek kötéseinek, csoportjainak szelektív gerjesztésére alkalmas hangolható lézert nem alkalmaztunk. A MALDI IMS vizsgálatokhoz alkalmazott műszer egy Bruker Autoflex Speed készülék volt, amelyben egy frekvencia-háromszorozott Nd:YAG lézer működik 355 nm-en 3 ns impulzusidővel.

A szakirodalomban azonban számos megoldást találhatunk a nem UV tartományban emittáló vagy változtatható hullámhosszú lézerek MALDI MS alkalmazására. Egyrészt találkozzunk a közeli infravörös megoldásokkal (IR-MALDI MS), amelyeknek számos előnyös tulajdonsága van, mint például a nagyobb 0,5-10 μm -es lézer penetrációs mélység, valamint az instabil ionok vizsgálati lehetősége (*Dreisewerd et al. 2014. Anal Bioanal Chem. 406(9-10):2261-78.*). Ilyen körülmények között az anyag ablációja alacsonyabb hőmérsékleten következik be, így az IR-MALDI MS segítségével foszforilált peptidok, glikopeptidok, nem kovalens komplexek is nagyobb hatásfokkal vizsgálhatóak (*Sadeghi et al. 1997. Rapid Commun Mass Spectrom. 11(4):393-7., Hiraguchi et al. 2015. J Mass Spectrom. 50(1):65-70., Murray 2021. J Mass Spectrom. 56(6):e4664.*).

Többek között, Dybvik és munkatársai ortogonális IR-MALDI MS segítségével azonosítottak nem kovalens enzim-ligandum komplexeket (*Feldhaus et al. 2000 J Mass Spectrom. 35(11):1320-8., Burlingame et al. 1998 Anal Chem. 70(16):647R-716R., Pirkl 2012 Anal Chem. 84(13):5669-76., Dybvik 2011 Anal Chem. 83(11):4030-6.*).

Soltwisch és munkatársai 280 nm és 355 nm között hangolható hullámhosszú festék lézert és klórozott CHCA MALDI mátrixokat (CICCA, DiFCCA) alkalmazva megnövekedett érzékenységet tapasztaltak peptidok vizsgálata esetén (*Soltwisch et al. 2012 Anal Chem. 84(15):6567-76., Wiegmann et al. 2013 Anal Bioanal Chem. 405(22):6925-32.*).

Chen és munkatársai a MALDI események hullámhosszfüggését vizsgálták Ti:zafir lézer alkalmazásával 375 nm és 435 nm között, különös tekintettel a 337 nm és 355 nm értékekre. Eredményeik rávilágítottak a hagyományos MALDI mátrixként használt vegyületek (DHBA, CHCA) ionizációs hatásfokának hullámhosszfüggésére, így megalapozták a modern MALDI MS készülékek fejlesztését (*Chen et al. 1998 J Am Soc Mass Spectrom 9:885-891*).

7. A MALDI mintatartóra felvitt fullerén felület homogenitását mikroszkóppal, vizuálisan ellenőriztük. A bevonatról a MALDI MS vizsgálatokon (pl. 8. ábra d panel) kívül más analitikai elemzések nem készültek. Egyetértek opponens úr azon véleményével, hogy a fullerén réteg tulajdonságainak és a mintaoldal hatásainak részletes vizsgálata fontos eredményeket szolgáltatott volna, azonban erre a mérések idején, 2002-2008 között sajnos nem gondoltunk. Köszönöm opponens úr témaötletét, és a közeljövőben a jelenleg rendelkezésünkre álló multimodális technikák segítségével (Raman, Raman-mikroszkópia, FT-IR, MALDI MS, MALDI IMS, AFM stb.) meg fogom vizsgálni a felületi tulajdonságokat.

A fullerén mátrix felületének homogenitása, rétegvastagsága alapvetően befolyásolja a lézerfluencia elnyelésének és az abláció/deszorpció/ionizáció hatékonyságának mértékét. Az alkalmazás során két eltérő módszertani megközelítés van.

Elsőként a C_{60} vagy C_{70} fullerénoldat MALDI mátrixként történő alkalmazása jön szóba. Ebben az esetben a toluolos fullerénoldatot megfelelő arányban előre összekeverjük az ugyancsak szerves oldószerben oldott mintával és így visszük fel a mintatartóra majd beszárítjuk azt. Ez a koncepció megvalósítható úgy is, hogy a fullerén mátrixot a mintatartóra pipettázzuk, majd száradás után erre a felületre helyezük a szerves oldószerben oldott apoláris mintánkat (pl. a szteroid hormonok esetében). Ilyenkor a minta és a fullerén együtt kristályosodik ki, illetve átkristályosodik a hagyományos MALDI mátrixokhoz hasonlóan. Tapasztalataink szerint, ilyenkor a vizsgálatokhoz alacsonyabb lézerfluencia is elegendő, ami kevesebb fragmentációt eredményez. A szerves oldószer gyors párolgása miatt a mintatartón kis méretű kristályok keletkeznek homogén felületet alkotva. Ezt a tulajdonságot kihasználhatjuk kvantitatív vizsgálatok céljára. Vizsgálataink alapján a szteroid hormonok esetében deuterált belső standardokat használva a mennyiségi meghatározás pontossága 95% felettinek adódott (nem közölt eredmény).

A második esetben a beszárított fullerén rétegre visszük fel a vizes, poláris mintánkat, az oldószer elpárolgása és a minták kristályosodása után gyakorlatilag egy felület-segített lézer deszorpció/ionizáció (SALDI, SELDI) valósítható meg. Ezt a folyamatot fullerén-asszisztált lézer deszorpció/ionizációnak (FALDI) is nevezhetjük, hasonlóan a nanorészecske segített ionizációhoz (NALDI). Jellemzően a felület-segített technikákhoz, főként fullerén esetében magasabb lézer energia szükséges, ami az instabil ionok fragmentációját eredményezheti, azonban ezek a technikák a hagyományos MALDI-hoz képest sokkal jobb mennyiségi vizsgálatokat tesznek lehetővé. Vannak olyan speciális mintatartók forgalomban (pl. DIOS), amelyek homogén nanorészecske bevonatuk segítségével kvantitatív meghatározásra is alkalmasak.

8. Ahogy opponens úr is említette a szemikvantitatív MALDI MS mérések pontossága, precizitása, ismételhetősége jelentősen elmarad a hagyományos kvantitatív analitikai technikák (pl. HPLC-MS) mögött. Munkánk során a MALDI teljesítőképességének határait teszteltük és az ideális mérési paraméterek meghatározását végeztük el. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a MALDI MS technika alkalmas lehet-e egy olyan összetett keverék vizsgálatára, mint a bor. A 6. táblázatban szereplő relatív csúcsintenzitás adatok főként azt a célt szolgálják, hogy bemutassam a különböző MALDI mátrixok specifikus ionszupressziós hatásait és alkalmazásuk előnyeit és korlátait. Mint azt az előző válaszomban is részleteztem a fullerén mátrixként történő

alkalmazása számos ponton eltér a hagyományos vízdékony MALDI mátrixvegyületek használatától. A fullerén alkalmazása és a deszorpció/ionizáció mechanizmusa inkább hasonlít a SELDI, SALDI megoldásoknál tapasztaltakhoz, ami alapvetően reprodukálhatóbb kvantitatív eredményekkel párosul.

9. MALDI MS vizsgálatainkat a PACAP kvalitatív kimutatásának érdekében fejlesztettük ki és alkalmaztuk széleskörűen. Sajnálatos módon a PACAP kvantitatív vizsgálatára jelenleg nincs validált tömegspektrometriás módszer. Munkacsoportomban is számos technikát teszteltünk annak érdekében, hogy reprodukálható kvantitatív analitikai lehetőséget adjunk a kollégák kezébe. A közel egy évtizedes munka azonban sikertelennek bizonyult. Nem sikerült reprodukálható és kellően érzékeny módszert fejlesztenünk az összetett analitikai probléma megoldására.

A disszertációmban szereplő kvantitatív eredmények a PACAP vonatkozásában, mint azt a 65., 66., 67., 74. oldalakon is említettem radioimmunoassay (RIA) mérésekkel történtek, amelyek a PACAP-38-szerű immunreaktivitás meghatározásán alapultak. Mint ahogy azt a disszertációban is említettem, a RIA a PACAP vonatkozásában a nemzetközi szakirodalomban elfogadott, tudományosan elismert módszer, azonban jelentős hibákkal terhelt. Sajnálatos módon megbízhatóbb és érzékenyebb analitika hiányában azonban nem volt lehetőségünk más technikát alkalmazni.

10. A hagyományos LAESI elrendezésben a 2940 nm hullámhosszúságú lézer energiája a magas víztartalmú mintában, sejtben, szövetben abszorbeálódva termikus-mechanikai folyamatokat indukál. Ilyenkor a minta víztartalma pillanatszerűen felmelegszik és gőzzé válik, ami anyagkilökődést eredményez. Ezt követően ebben az ablációs felhőben hozzuk létre a célvegyületek ionizációját egy másodlagos ESI forrással. A 800 nm-es femtoszekundumos lézer kölcsönhatása az anyaggal jelentősen eltér ettől. Ebben az esetben nem lineáris folyamatok (pl. multifoton ionizáció) révén az elektronok közvetlenül az atomokból szakadnak ki a minta jelentős felmelegedése nélkül. A folyamat során az anyag elpárolog és plazmává alakul és mivel a folyamat gyorsabb, mint a hővezetés sebessége nem tapasztalható olvadás vagy szenesedés. Ebben az esetben tehát megtörténik a célvegyületek ionizációja, azonban az impulzusonkénti óriási energia jelentős fragmentációhoz vezethet. Ennek elkerülése érdekében a lézerfluencia csökkentésével és egy másodlagos elektroporlasztásos ionizációval ez a jelenség csökkenthető, amely nem csupán az ionizáció hatásfokát növeli, de ortogonális elrendezése miatt a tömegspektrométer analizátorterébe jutó ionok mennyiségét és így az érzékenységet is növelhetjük.

Köszönöm, hogy a dolgozat részletes és alapos kritikai értékelését követően elismerően nyilatkozik eddigi tudományos és innovációs eredményeimről.

Bízva válaszaim pozitív elbírálásában, tisztelettel:

Pécs, 2026. január 19.



Dr. Márk László