

Márk László MTA doktori értekezésének bírálata

Márk László értekezésének tágabb témája új analitikai módszerek fejlesztése és kidolgozása orvosi, biokémiai és élelmiszerkémiai jelentőséggel bíró vegyületek és mintatípusok vizsgálatára. A kutatómunka fókuszában a lézeres mintabevitelre alapuló tömegspektrometriás módszerek, elsősorban a MALDI MS módszer áll. A mintegy két évtizedes kutatómunkán alapuló eredmények túlnyomó részben a Márk László által vezetett kutatócsoportban, a Pécsi Tudományegyetemen, kisebb részben pedig a csoport nemzetközi (amerikai) együttműködésének keretében születtek.

A kutatások során alkalmazott módszerek nagyon korszerűek, hiszen a lézeres abláció/deszorpció/ionizáció és a hozzájuk kapcsolt különböző spektroszkópiai módszerek, legfőképpen a tömegspektroszkópia, által kínált nagy térbeli felbontású és érzékenységgű kémiai térképezés jelentős analitikai potenciállal bírnak. Az utóbbi kb. két évtizedben ezek a kísérleti megközelítések nagyon fontos laboratóriumi eljárássá nőttek ki magukat az élettudományban, és egyre több mintatípusnál alkalmazzák azokat sikeresen. Az értekezésben vizsgált bioaktív vegyületek (pl. polifenolok, hormonok, peptidek vagy fehérjék), valamint biológiai és klinikai mintatípusok (pl. sejtek, szövetek, testfolyadékok) analízise is vitathatatlanul nagy jelentőségű és modern kutatási terület. Az eredmények újszerűségét és gyakorlati használhatóságát már önmagában jól tükrözi az a tény, hogy Márk Lászlónak 8 db szabadalma és mintaoltalma is kapcsolódik az értekezés anyagához.

Az értekezés teljes hosszúságú, hagyományosnak nevezhető felépítésű mű. Teljes érdemi terjedelme kb. 160 oldal, ami a szokásos méretnél jelentősen nagyobb. El kell ugyanakkor mondani, hogy a terjedelem túlnyomó, mintegy 120 oldalnyi része az érdemi eredmények bemutatásával foglalkozik (5.1., 5.2. és 5.3. fejezetek). A terjedelem meghatározó részét tehát nem pl. az irodalmi áttekintés vagy a műszerek és anyagok leírása teszi ki, hanem a saját tudományos eredmények diszkussziója. Egy tömör, kb. 15 oldalas, irodalmi áttekintés is található a műben, de ebben csak arányos, kb. egynegyedét használja fel a teljes irodalomjegyzéknek (436 tétel), míg a többi referencia feldolgozása az érdemi eredményeket tárgyaló fejezetekben történik meg. Ez jelzi, hogy Márk László alapos munkát végzett a terület irodalmának feldolgozásával és az eredmények kontextusba helyezésével kapcsolatban.

A munka jellegéhez illeszkedően nagyszámú (116 db), túlnyomórészt színes ábra és 17 db táblázat illusztrálja az elért eredményeket és más vonatkozó információkat. Az illusztrációk tartalma és a szöveg is jól érhető, áttekinthető, általában megfelelően szabatosan megfogalmazott/feliratozott, de helyenként szebb formázást, tördelést is kaphattak volna. Az értekezés alapjául 25 db nemzetközi folyóiratközlemény, 2 db összefoglaló cikk és 5 db könyvfejezet szolgál.

Az érdemi szakmai tartalomra vonatkozó értékelés előtt meg kell jegyeznem, hogy a saját szakterületem határait természetesen nem tudom átlépni, ezért a biokémiai vagy orvosi vonatkozású eredmények újszerűségét nem tudom vizsgálni. Alábbi észrevételeim, kérdéseim mindezek miatt az értekezés analitikai kémiai vonatkozású részeire koncentrálnak.

Megjegyzések, észrevételek:

1. Kisebb gépelési hibák és helyesírási, stilisztikai problémák (pl. egybeírás, mondatok kötőszavakkal való kezdése, ragozás, stb.) előfordulnak a szövegben. Csekély számban pongyola szakmai kifejezések is fellelhetők (ezekre az alábbiakban néhány konkrét példát is hozok). Ezek előfordulását gondos átnézéssel csökkenteni lehetett volna.
2. A kutatás számára kitűzött célok (3. fejezet) felsorolása túl specifikus és részletes. Sokkal életszerűbb lett volna csokorba szedve, összefoglalóan bemutatni a célokat.
3. A 23. oldalon és a 6. ábrán mutatja be a kifejlesztett mátrixporlasztó berendezést. Ennek működési leírásában szerepel a kifejezés: „...ultrahangos atomizáló által generált ... cseppeket...”. Ez tudományos szempontból pontatlan (bár azt sajnos az élettudományi készülékeket gyártó cégek is előszeretettel alkalmazzák), hiszen valójában a porlasztók cseppeket (nedves aeroszolt) állítanak elő, nem pedig szabad atomokat.
4. Fontos lett volna a szövegben egyértelműen megkülönböztetni a MALDI mátrixot és a minta mátrixát, nem csak egyszerűen „mátrix”-ként hivatkozni azokra, hiszen ezek között lényegi különbség van, de hatásuk egyes esetekben hasonló.
5. A 104. és 105. ábrákról lemaradt a méretskála.
6. Az IMS (imaging MS) és IMS MS (ion mobility spectrometry MS) elnevezéseket jobb lett volna az értekezésben különválasztani, mivel azok jelentése eltérő (az értekezés mindkettőt egyformán IMS-nek nevezi). Ez némi keveredést okoz az 5.3.5. fejezetbeli eredmények tárgyalásakor (főként a 145-146. oldalakon).
7. Több helyen előfordul a „reflektron detektor” kifejezés, ami szintén pontatlan. A reflektoron a TOF tömeganalizátor egy típusát azonosítja, az ionok detektálását az elrendezésen belül egy külön eszköz (pl. microchannel plate, Faraday-csészék, secondary emission multiplier, stb.) végzi.

Kérdések:

1. Az 1. ábrán egy agyszövet felvétele látható lézer ablációs kráter sorozatokkal a felszínén. Ezzel az ábrával kapcsolatban, főként annak skálabeosztására való tekintettel, az olvasóban kérdések merülnek fel. Milyen képalkotó módszerrel készült a felvétel? A kráterek mérete kb. 100 nm nagyságrendűnek tűnik a skála alapján, ami nagyon nehezen elérhető, főleg a megjelölt, 3 mikrométeres hullámhosszúságú lézer forrással. Később, a 144. oldalon közölt információk alapján (150 μm lézer fókuszolt méret) azt gondolom, hogy az 1. ábra méretskála hibás, az valószínűleg 1 mm és nem 1 μm . Mi a valódi magyarázat?
2. Hangsúlyozza (pl. a 24. oldalon), hogy szöveti minták komponenseinek kémiai képalkotó vizsgálata előtt (pl. fehérjék) fontos mintaelőkészítési művelet a lipidek eltávolítása a tömegspektrumok érzékenyítése és könnyebb értelmezhetősége érdekében. Ennek végrehajtási módja nyilván fontos, hiszen egy túl agresszív (pl. lúgos) kezelés esetleg a sejtmembránok strukturális változásait okozhatná, míg egy túl enyhe kezelés csökkent érzékenységet eredményez. Hogyan lehet ezt a műveletet optimalizálni? Létezik-e erre kivizsgált, részletesen leírt, általánosan alkalmazható protokoll a szakirodalomban? Később, az 5.1. tézispontban röviden említi egy ilyen eljárás kifejlesztését eredményként, azonban nem találtam ennek részleteivel foglalkozó fejezetet az értekezésben; ezért is kérném a részletes kifejtést!

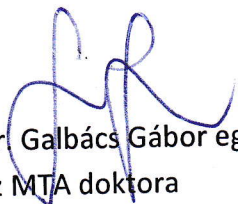
3. A 30. oldal tetején és az itt található 8. ábrával összefüggésben arra hivatkozik, hogy a MALDI mátrix nem csak protonált, hanem Na- és K-adduktokat is képezhet a vizsgált vegyületekkel, és hogy ennek megakadályozására speciális adalékokat és felviteli módokat lehet alkalmazni. Ez természetesen igaz, azonban a példaként bemutatott esetekben a MALDI mátrixok éppen nem sójellegűek voltak (pl. ciano-hidroxi-fahéjsav, mustársav) így nem tartalmaztak nátriumot vagy káliumot, a bemutatott 8a és 8c spektrumok egyes csúcsai mégis Na- és K-adduktként vannak asszignálva. Nem lehetséges, hogy itt éppen a minta mátrixának sótartalma okozta az adduktok képződését?
4. Az LA kémiai térképezések során általános megfigyelés, hogy a mintából származó törmelékek egy része visszahullik a kráter környékén a mintafelszínre, emiatt térképezéskor jelentős „carry-over” effektus tapasztalható, és ez jelentősen lerontja a tényleges térbeli felbontást, valamint az ablációs kamra ablaka is elszennyeződhet, ami pedig technikai problémákat okoz. Milyen stratégiával minimalizálta ezeket a hatásokat az esetenként több ezer pontból álló térképezések során, illetve az egyetlen pontban történő, nagyszámú ismételt lézerimpulzusok alkalmazása során?
5. Végzett-e optimalizálást a lézer ablációs/deszorpciós műveletek során alkalmazott impulzusenergiára vagy fluenciára vonatkozóan, akár az elérhető térbeli felbontással, akár az MS mérések érzékenységeivel való összefüggésben? Ha igen, sikerült-e ezekből általánosítható következtetéseket levonni?
6. Egy ismert lehetőség vegyületek egyes csoportjainak, kötéseinek szelektív gerjesztése alkalmas hullámhosszúságú lézer fényével, pl. szintézis reakciók irányítása céljából. A MALDI MS vizsgálatok során nem merült-e fel hasonló megoldás alkalmazása a mérés érzékenységének fokozására (pl. hangolható lézer forrás felhasználásával)? Ismer-e esetleg szakirodalmi eseteket erre vonatkozóan?
7. Új megoldásként C₇₀ fullerén oldatának beszárításával alakított ki vékony MALDI mátrix réteget a hordozón, amelyet sikerrel alkalmazott többféle analit vizsgálatára is. Az értekezésből és a vonatkozó közleményekből is hiányoltam a kialakuló fullerén réteg tulajdonságainak, illetve a rácseppentett mintaoldatok oldószerének erre gyakorolt hatásának vizsgálatát. Történtek-e ilyen vizsgálatok? Ha történtek, ezek milyen eredményeket hoztak, ha pedig nem, akkor hogyan látja ezen potenciális hatások analitikai relevanciáját a MALDI MS mérésekre nézve?
8. Borok polifenolos komponenseinek vizsgálatára vonatkozóan félkvantitatív MALDI MS eredményeket is bemutatott (6. táblázat); ezek azonban valójában relatív antocianin csúcsintenzitás-arány adatok. Általában ismert, hogy a MALDI MS egyes kvantitatív képességei (pl. pontosság, precizitás, ismételhetőség) szerények és rosszabbak a „hagyományos” (pl. HPLC-MS) mérésekénél. Milyen módon jellemezné a kvantitatív MALDI MS mérések pontosságát a kis molekulatömegű vegyületek esetében? Van-e különbség ebben a tekintetben a fullerén és más MALDI mátrixok alkalmazása között?
9. A kvantitatív eredményekkel összefüggésben felmerülő másik kérdés, hogy hogyan biztosította a PACAP-38 peptid humán vér és anyatej mintákban történő kvantitatív mérésének körülményeit (pl. kalibráció, precizitás, validáció)? Ezt nem részletezte az értekezésben, pedig fontos, hiszen *a.)* kvantitatív állításokat fogalmaz meg ezen eredményekkel összefüggésben a 3.1. tézispontban, és *b.)* leírja, hogy a peptid fiziológiás életideje 3-5 perc és hajlamos az irreverzibilis adszorpcióra a mintaelőkészítés során (61. oldal).

10. A „hagyományos” LAESI eljárás központi eleme a 2940 nm hullámhosszúságú, nanoszekundumos lézerimpulzus alkalmazása, ami az OH csoport szelektív gerjesztése révén segíti szövetek vagy sejtek kémiai térképezését. Az új eredményként bemutatott, fs LAESI elrendezés sokkal alacsonyabb (800 nm) hullámhosszúságon és nagyobb sávszélességgel (több tíz nm) működik, ezért a mintakomponensek gerjesztése is másképpen kell, hogy történjen. Mit lehet tudni itt a lézer-anyag kölcsönhatás mechanizmusára vonatkozóan?

Az eredmények 6 db tézisben és ezen belül összesen 20 db alpontban kerültek összefoglalásra. A tézisek megfogalmazása alapvetően megfelel az elvárásoknak és azok tartalmát az értekezésben leírtak, de főként a tézisekhez kapcsolódó közlemények megfelelően megalapozzák. Mindazonáltal a tézispontok részletessége, kidolgozottsága kissé hullámzó, a vonatkozó eredmények tárgyalási terjedelme az értekezésben egyes esetekben aránytalanul kicsi. Így például a 6. tézis 6.2, 6.3. és 6.4. alpontjainak alátámasztására mindössze kb. egy-egy oldalnyi szöveg jutott az értekezésben. Hasonlóképpen hiányoltam a szövetminták lipidmentesítésére általánosan kidolgozott eljárás részletes ismertetését is az értekezésből, amire az 5.1. tézispont egy részében utal (ezzel kapcsolatos volt az egyik korábbi kérdésem is). Nekem az 5. és 6. tézisek tartalma összevonhatónak tűnik, hiszen lényegében mindkettő a biológiai szövetminták képzési tömegspektrometriájával foglalkozik, részben MALDI, részben LAESI metodológia alkalmazásával (de most a két tézis nem a metodológia alapján határolódik el!). Véleményem szerint érdemes lett volna a C₇₀ fullerén MALDI mátrixszal kapcsolatos eredményeket is egy közös tézisbe gyűjteni, nem pedig szétosztani az 1. és 2. tézisek alpontjai között, amelyekben most ráadásul keverednek az LDI (2.2.) és MALDI (minden más alpont az 1. és 2. tézisekben) eredmények is.

A tézispontok tagolása, csoportosítása tehát általában véve lehetett volna következetesebb, ugyanakkor ezek a kritikai megjegyzések nem vonnak le a Márk László által elért eredmények értékéből, jelentőségéből, mennyiségéből. Az elért analitikai eredmények hitelesek és a tézisek új tudományos eredményként fogadhatók el a szakterület elvárásai alapján. A jelölt a kidolgozott módszerek működőképességét és teljesítőképességét nagyszámú, különféle mintatípus és vegyület mérése révén demonstrálta és azok ipari alkalmazásának irányába is sikeres lépéseket tett.

Mindezek alapján a benyújtott értekezés eredményeit elegendőnek tartom az MTA doktora cím megszerzéséhez és a nyilvános védés kitűzését javaslom.



Dr. Galbács Gábor egyetemi tanár
az MTA doktora

SZTE TTIK Molekuláris és Analitikai Kémiai Tanszék

Szeged, 2026. január 5.