

**Márk László „LÉZERES MINTABEVITELRE ÉPÜLŐ TÖMEGSPEKTROMETRIÁS
MÓDSZEREK FEJLESZTÉSE ÉS ALKALMAZÁSA BIOAKTÍV
VEGYÜLETEK VIZSGÁLATÁBAN” című MTA doktori értekezésének bírálata**

Az MTA Doktori Tanácshoz benyújtott disszertáció átfogó, részletes és magas tudományos színvonalú összefoglalását adja Dr. Márk László több évtizedes, tömegspektrometriára épülő kutatómunkájának. A Jelölt disszertációjában a tömegspektrometria széles körű módszertani fejlesztéseit és alkalmazásait foglalja össze, különös tekintettel a kis molekulatömegű vegyületek, peptidek, fehérjék, lipidek, valamint komplex biológiai és klinikai minták vizsgálatára vonatkozóan. A dolgozat felépítése és tudományos igényessége megfelel az MTA doktori szabályzatban rögzített követelményeknek. A Jelölt a disszertációban bemutatott eredményeit logikusan felépített fejezetekbe rendezve, világosan és következetesen tárgyalja.

A disszertáció egyik központi témája a MALDI-alapú analitikai módszerek fejlesztése kis molekulatömegű vegyületek vizsgálatára. A Jelölt disszertációjában részletesen elemzi a mátrix okozta spektrális interferencia és az ionelnyomás (ionsuppresszió) problémáját, amelyek e vegyületek tömegspektrometriás analizisének legfőbb korlátjai. Munkája során hagyományos mátrix anyagokat és mátrix nélküli ionizációs megközelítéseket is vizsgált. Elsőként dolgozott ki eljárást fullerének MALDI mátrixként történő alkalmazására összetett biológiai minták bioaktív komponenseinek kimutatására. Különösen a C₇₀ fullerén bizonyult hatékonynak, amely alkalmazásával jelentősen csökkent az alacsony tömegtartományban jelentkező mátrixinterferencia és lehetővé vált apoláris vegyületek vizsgálata is.

Módszertani fejlesztésekre építve a Jelölt új, származék-képzés nélküli analitikai eljárást dolgozott ki szteroid hormonok MALDI-TOF MS vizsgálatára. A módszerrel sikeresen detektálta többek között az ösztrol, ösztadiol, ösztrol, progeszteron és tesztoszteron addukt ionjait alacsony koncentrációtartományban. Az eljárás alkalmazhatóságát szteránvázas vegyületeken és biológiai mintákon is igazolta, valamint további lehetősége nyílt egyéb vegyületek szerkezetének gyors, mintaelőkészítést nem igénylő vizsgálatára. A kidolgozott módszert természetes vizek hormon-szennyezettségének tanulmányozására is alkalmazta, eredményeit kvantitatív LC-MS mérésekkel egészítette ki.

A dolgozat jelentős részét képezik a növényi eredetű bioaktív komponensek vizsgálatai. Fitoösztrogének, polifenolok és antocianinok elemzése során a Jelölt elsőként igazolta a transz-veratrol fotoizomerizációja során keletkező új vegyület jelenlétét. Megvizsgálta a mátrix nélküli lézerdeszorpciós ionizáció fragmentációs sajátosságait, valamint PSD MALDI-TOF tömegspektrumok alapján részletesen elemezte a lehetséges fragmentációs folyamatokat. Eredményei alapján megállapította, hogy a MALDI-TOF MS a mátrix megfelelő kiválasztásával alkalmas (vörös)borok és szőlőhéj kivonatok gyors, nagyátersztőképességű analizisére és ujjlenyomat-alapú vizsgálatára.

A disszertáció következő részében a bioaktív peptidek és fehérjék MALDI-TOF MS vizsgálatával foglalkozik. A Jelölt klinikai vonatkozású minták széles körét elemezte és elsőként dolgozta ki a PACAP neuropeptid különböző formáinak tömegspektrometriás detektálására vonatkozó módszert. A módszer optimalizálása során sikeresen oldotta meg a peptid fiziológiai stabilitásából és adszorpciós tulajdonságaiból fakadó analitikai problémákat.

Tandem MS mérésekkel azonosította a PACAP-38-at és a PACAP-27-et különböző biológiai közegekben.

A Jelölt kimutatta a PACAP szerepét több élettani folyamatban, beleértve a reprodukciót, a könnytermelést és az idegrendszeri működést. A PACAP génkiütött állatokon végzett fehérjeanalitikai vizsgálatok rámutattak a peptid stresszválaszban és az öregedési folyamatokban betöltött jelentőségére. A neuropeptidkutatás keretében évszakfüggő ciklikusságot mutató peptideket is azonosított, valamint egy új, aktivitásfüggő neuropeptidet írt le.

A dolgozat további fejezetei daganatos betegségekhez kapcsolódó biomarker-kutatásokkal foglalkoznak. A Jelölt módszert dolgozott ki fej-nyaki laphámkarcinómában expresszálandó fehérjék nyálmintákból történő kimutatására és több olyan fehérjét azonosított, amelyek diagnosztikai szempontból kiemelkedő jelentőségűek. Vizsgálatai kiterjedtek anyagcsere-betegségekhez kapcsolódó korai kockázati állapotok elemzésére is.

A disszertáció utolsó fejezete a képkalkotási tömegspektrometria alkalmazásait mutatja be. A Jelölt úttörő szerepet játszott ezen technika hazai meghonosításában, saját fejlesztésű, mátrixréteg kialakítására szolgáló eszközt alkalmazva. Feltérképezte daganatos szövetek fehérje- és lipidheterogenitását, valamint humán és állati mintákban a lipidek és neuropeptidek sejtszintű eloszlását. A bemutatott eredmények jól szemléltetik a képkalkotási tömegspektrometria diagnosztikai és alapkutatási potenciálját.

A Jelölt kiemelkedő innovációs tevékenységgel járult hozzá a lézeres mintabevitelre épülő tömegspektrometriás módszerek ipari, klinikai, agrár- és élelmiszeripari alkalmazásához is. Kutatásai során a MALDI-alapú eljárások adaptációját szolgáló fejlesztéseket valósított meg, amelyek közül több közvetlenül hasznosult a gyakorlatban. Analitikai és klinikai eredményeire alapozva új, megnövelt biológiai hasznosulású szőlőmagörlemény-készítmények fejlesztését és ipari bevezetését irányította, a terméktervezéstől a gyártóüzem megvalósításáig. A proteomikai kutatásokat támogató, moduláris és automatizálható mintaelőkészítő berendezést alkotott, továbbá nyálproteomikai vizsgálatai alapján egy szabadalmaztatott célkészüléket hozott létre fej-nyaki daganatos elváltozások detektálására. Eljárást dolgozott ki részecskék elválasztására és „omika-kompatibilis” mintaelőkészítésére. Az állattenyésztés területén egy új koncepciójú embrionális tápoldat fejlesztésével jelentősen növelte az IVF-eljárások sikerességét, majd erre építve egy komplex, automatizálható rendszert hozott létre az ivarsejtek minőségi szelekciójától a blasztociszta előállításán és kriotárolásán át a beültetésig. A felsorolt innovációk bizonyítják és a Jelölt gyakorlati hasznosítás iránti elkötelezettségét.

Elismerve a Jelölt színvonalas munkáját, néhány megjegyzést, illetve kérdést teszek fel, amelyek nem érintik a dolgozatról kialakított pozitív véleményemet.

Megjegyzések:

1. A Jelölt olvasmányos, tömören és szakszerűen tárgyalt irodalmi áttekintésben mutatja be a lézer ablációs technikákat és alkalmazási területeit
2. Néhány esetben a molekulaion, vagy hasonló kifejezés használata helytelen pl. „Tömegspektrometriás vizsgálatánál nagyon gyakran a kálium- vagy nátrium-adduktok intenzívebb jelet produkálnak, mint a molekulaionok” (16. oldal), vagy „A mintákból sikeresen detektáltuk a polipeptidre jellemző m/z 4535 értéknél megjelenő molekulaion csúcsot” (63. oldal), illetve „protonált kvázimolekuláris ioncsúcs” (74. oldal)
3. „magas felbontás” helyett „nagy felbontás” (23. oldal)
4. „reflektor” helyett „reflektron” (83. oldal)
5. A 25. -27. ábrákon különböző vegyületekre bemutatott fragmentációs folyamatokban nem látszik, hogy a töltés melyik fragmenszen marad?
6. A MALDI (MS/MS) a Jelölt által jelzett 800 Da-nál nagyobb molekulák (< 2000 Da) szerkezetének azonosítására is alkalmas!
7. Hiányzik a nanoDESI Orbitrap leírása a kísérleti részből!
8. „A prekursor jelek ütközési energiáit automatikusan változtattuk...” helyesebben a „a prekuzorionok ütközési energiáit ...”
9. A biológiai háttér leírása több esetben a kémikus számára túl részletes, lényegre törőbben kellett volna áttekinteni az ezzel kapcsolatos ismeretanyagot pl. patológiás spermatogenezis mechanizmusának leírásánál!

Kérdések:

1. Mi a magyarázata annak, hogy IMS alkalmazásakor nem számolunk „tangencionális” diffúzióval/konvekcióval és így a célmolekula az „eredeti helyén” detektálható az extrakció után is?
2. Nem okozott-e kiértékelési nehézséget, hogy a képzési tömegspektrometriában a lipidek többféle addukt formában ($[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$) is megjelentek?
3. A ösztrön, b-ösztradiol és ösztriol esetében negatív, míg a progeszteron és tesztoszteron esetében pozitív ionmód eredményez jobb jel/zaj arányt. Ennek oka az lehet, hogy ösztrön, b-ösztradiol és ösztriol fenolos, könnyen deprotonálható –OH csoportot tartalmaz. Helytálló ez magyarázat?
4. Miből (mitől) erednek a 10-15. ábrán a célvegyület (kivéve a 12. ábrát) mellett megjelenő csúcsok?
5. A 3. táblázat (36. oldal) adatait elemezve két kérdés merül fel: mi az oka a jelentős tömegeltérésnek a mért és a számított között (~1Da)? Mi a különbség a két kimutatási határ között?
6. A C₇₀ mátrix alkalmazásának előnye kizárólag a C₆₀-hoz képest 120 Da-nál nagyobb, kvázi mátrixion-mentes tömegtartományban nyilvánul meg?

7. A 35. ábrán bemutatott, különböző évjáratú Vranek borokról készült MALDI-TOF MS eredmények mennyire reprodukálhatók, hogy levonhassuk azt a következtetést, hogy az antocián tartalom az évjárat mellett, ami egyébként logikus is, a borkészítési technológiától is függ?
8. Hogyan határozta meg a PACAP-38 koncentrációját MALDI-TOF MS módszerrel? Mennyi volt a kvantitálási és detektálási határ ebben az esetben? Lát-e lehetőséget és jelentőséget az anyatej PACAP 38 koncentrációjának vizsgálatára?
9. „Patkány vérplazma mintában sikeresen detektáltuk a PACAP-38 molekulaionjait (m/z 4535), azonban nagy mennyiségben mutattuk ki a PACAP-38 Na⁺-ionhoz kötődő adduktját is (m/z 4558)” (71. oldal) Kérdésem ezzel kapcsolatban: Mi bizonyítja, hogy a Na⁺-addukt az oldatban már eleve jelen van és nem a MALDI-ionizáció során képződik?
10. Milyen mechanizmusokon keresztül befolyásolja a PACAP jelenléte vagy hiánya az antioxidáns védekező rendszert és az oxidatív stressz markereit fiatal és idős állatokban, különös tekintettel a glutationszintre, a szuperoxid-dizmutáz aktivitására és a hősokkfehérjék expressziójára?
11. Hogyan bizonyította be, hogy pl. az agyi homogenizátumban lévő 79 db csúcsmindenegyike peptid/polipeptid-től ered? (88. oldal), míg az egészséges és daganatos szövetrészekből 300 db lipidet azonosított „lipidomika” felhasználásával?

A Jelölt tudományos munkásságát hat, jól körülhatárolt tézispontban foglalta össze. Ezek a tézisek átfogó képet adnak kutatási eredményeinek jelentőségéről, módszertani megalapozottságáról és gyakorlati hasznosíthatóságáról. A bemutatott eredmények megfelelően alátámasztottak és egyértelműen igazolják a jelölt önálló, innovatív hozzájárulását a szakterülethez. A tézispontokban megfogalmazott megállapításokat megalapozottnak tartom és azokat elfogadom.

Összességében a disszertáció magas tudományos színvonalú munka, amely jelentős módszertani fejlesztéseket és széleskörű alkalmazási eredményeket mutat be. A Jelölt munkája érdemben hozzájárul a tömegspektrometria és annak orvos-biológiai alkalmazásainak fejlődéséhez. A fentiek alapján javaslom az MTA Doktori Tanácsának, hogy Márk László doktori munkáját bocsássa nyilvános vitára és részére sikeres védekezés esetén az MTA doktora címet ítélje oda.

Debrecen, 2025. december 29.



Kéki Sándor
MTA doktora