Bírálat

Móricz Ágnes

Vékonyrétegkromatográfiás csatolások a növényi bioaktív vegyületek felfedezésében

című MTA doktori értekezéséről

Az értekezés felépítése és formai kivitele

Móricz Ágnes a HUN-REN ATK Növényvédelmi Intézetének kutatója értekezést nyújtott be az MTA doktora cím elnyeréséért, melyben az elmúlt 14 év kutatási eredményeit foglalta össze. A témához kapcsolódó saját eredményekből 27 közlemény született, melyekben a jelölt első, vagy utolsó szerző. A dolgozat ezeket foglalja össze és veti össze a hasonló irodalmi eredményekkel. A közlemények főként a tématerület vezető (D1, Q1) folyóirataiban (J. of Chromatogr., Anal. Chem.) jelentek meg.

Az irodalomjegyzék nélkül közel 30 oldalas rövid formátumú összefoglaló meglepően sok, több mint 200 hivatkozást feldolgozva mutatja be a növényi bioaktív vegyületek vizsgálatára alkalmazott saját és irodalmi módszereket. A rövid formátum azt eredményezte, hogy a bevezetés és irodalmi áttekintés elég tömény, öt oldalának szinte minden mondata tartalmaz hivatkozást, néha többet is. Ezen kívül az Eredmények alfejezeteinek elején is találunk az adott módszerre vonatkozó irodalmi előzményeket. A Célkitűzés és Vizsgálati módszerek fejezet a Tézisekkel megegyezik.

Tudományos eredmények összegzése

Az eredmények első fejezete azokat a munkákat foglalja össze melyek során kilenc mikroorganizmusra fejlesztettek ki új bioautográfiás alkalmazást. Ezek között, a kutatóhely profiljából adódóan, elsősorban növényi kártevő baktérium és gombatörzsek fordulnak elő, de a probiotikus *Lactobacillus plantarum* révén humán vonatkozású téma is előfordul. A kifejlesztett új módszerek a jelentősége abban rejlik, hogy lehetővé teszik az adott mikroorganizmusok gátlására kiválasztott nagyszámú anyag gyors szűrését. Különösen érdekes, és izgalmas eredménynek tartom a *P. syringae* pv. *maculicola* kromoszomálisan génmódosított lumineszcens törzs alkalmazását, ami kiküszöböli az egyébként szükséges előhívás lépését és annak esetleges hibáit. A fejezet végére két, enzim gátlások vizsgálatát lehetővé tevő módszer került, az egyik α-amiláz, a másik kolinészteráz enzim gátlószereinek azonosítására alkalmas.

Az eredmények második fejezetében a jelölt továbblép és a biológiai hatást mutató kivonatok komponenseinek jellemzésre, azonosítására tesz kísérletet. Itt aztán van lehetősége a HPTLC lehetőségeinek kihasználására és ezt meg is valósítja. A bodorrózsa kivonatok elválasztása és elemzése során láthatunk többféle kémiai reagenssel való előhívást (ami a reagensek specifitása miatt a fenolos vegyületek azonosítását is jelentette) és bioautográfiát két mikroorganizmussal. A biológiai aktvitást mutató frakciók 2D kromatográfiás elválasztása közötti hidrolízis lépés lehetővé tette a vegyületalkotó glükóz azonosítását, bár az aglikon frakcióban nem várnánk cukor jelenlétét. Az elválasztott komponensek fázisból való extrakciója lehetőséget biztosít más analitikai módszerek használatára, itt a HPLC-DAD-ESI-MS kapcsolt módszerrel történt

komponensek azonosítása. A 2D elválasztást stabilitásvizsgálatra is alkalmazták, illetve 2D kromatográfiás elválasztással kombinált származékképzéssel tudták a triterpének elválasztását megvalósítani több növényi kivonatból is (sárgabarack, zsálya fajok). Ennek a fejezetnek a legígéretesebb része az MS csatolásokkal kapott eredmények. A bioautográfiával aktívként azonosított komponensek, frakciók mélyebb elemzését teszi lehetővé az MS alkalmazása. Ugyanakkor az MS kapcsolást lehetővé tevő TLC-MS interfész arra is alkalmas, hogy további elválasztást iktassanak az MS elé. Ez lehet GC vagy HPLC is, a komponensek illékonyságától függően. Az interfész mellett a másik lehetőség a közvetlen TLC felületről történő ionizáció DART segítségével, ami eredményeik alapján alkalmas lehet az ESI-hez képest eltérő komponensek ionizálására és így elemzésére. Hosszú lenne felsorolni az összes azonosított komponenst, de az egyértelműen megállapítható, hogy a jelzett módszereket eredményesen alkalmazták számos bioaktív vegyület azonosításra.

A harmadik fejezet a Magyarországon kifejlesztett OPLC technika újabb alkalmazásait mutatja be, ily módon is tisztelegve a közel tíz éve elhunyt mentor, Prof. Dr. Tyihák Ernő, az „OPLC atyja" emléke előtt. Az OPLC eljárás a TLC és a HPLC között helyezkedik el, a TLC biztosította párhuzamos mintakezelés és széleskörű detektálási lehetőség megtartása mellett a kényszeráramlás biztosította nagyobb futási távolság és gyorsaság a legfőbb előnye. A módszert sikerrel alkalmazták kamilla virág metanolos extraktumából bioaktív komponensek elválasztására és izolálására. A komponensek elválasztásának OPLC eljárását kombinálták a fordított irányú áramlással megvalósított *in situ* mintaelőkészítéssel, és a rétegen elvégzett bioautográfiás detektálással. A bioaktív frakciók minor komponenseinek azonosítására további elválasztásokat és tömegspektrometriát használtak, így demonstrálva a módszer teljesítőképességét és rugalmasságát.

A negyedik fejezetben található véleményem szerint a legfontosabb része a jelölt eredményeinek. Ezt alátámasztja az is, hogy a dolgozatban összefoglalt 27 közleményből 13 eredményeit sorolta ebbe a fejezetbe. Tulajdonképpen az eddigi fejezetek módszereinek megfelelő kombinálását alkalmazták növényi eredetű bioaktív komponensek izolálására és azonosítására. A növények kiválasztása során egyik legfontosabb szempont volt a nagy biomassza tömeg, gondolva a későbbi mezőgazdasági hasznosításra. A gyógynövények mellett bevontak a vizsgálatokba idegenhonos özönnövényeket is. A vizsgált szamárbogáncs, napraforgó, mirigyes bálványfa, aranyvessző, fehér akác kivonatokból nagyszámú bioaktív frakciót izoláltak és ezekből számos vegyületet azonosítottak. A vegyületek egy része di- és triterpén, melyek antimikrobiális hatását több fajon igazolták. Izoláltak több antioxidáns hatású kávésav észtert a fehér akác kérgéből, melyek egy részét ebből a nemzettségből nem mutatták ki korábban.

A leíró részt összefoglalva: a jelölt a vékonyrétegkromatográfia különböző megvalósításait (TLC, HPTLC, OPLC) és a komponensek detektálásának változatos módjait (UV, származékképzések/színreakciók, MS) sikeresen alkalmazta növényvédelmi célra használható növényi komponensek felfedezésére és azonosítására. A dolgozat tömören, de érthetően fogalmazott, gondosan összeállított anyag. Szemléletes ábrákat tartalmaz, és jól prezentálja az elért eredményeket.

Észrevételek

Eredményeit az alkalmazott módszerek alapján rendezte fejezetekbe, és ez a szempont a tézisek megfogalmazásánál is megmaradt. Emiatt a hangsúly a módszerkidolgozásra helyeződött, melyek tudományos újdonságértéke véleményem szerint elmarad a módszerek alkalmazásával elért új antimikrobiális, és enzimgátló vegyületek felfedezéséhez képest, amely területen a jelölt meggyőző eredményeket tud felmutatni..

Átnézve például az 5.1. fejezethez kapcsolódó nyolc közleményt, két megállapítást tettem. Egyik, hogy a metodikák nagymértékben hasonlítanak egymásra, kis változtatások (bemerítés ideje, inkubációs idő, hőmérséklet) elegendőek voltak, az egyik mikroorganizmusra működő protokoll másikra való átviteléhez. Másrészt, hogy a hivatkozott saját közlemények témája nem az új mikroorganizmusra kidolgozott módszer leírása, hanem a segítségével elvégzett hatóanyag szűrés különböző növényi kivonatok (gilisztaűző varádics, aranyvessző, kamilla, szamárbogáncs, illóolajok) és komponenseik antimikrobiális hatására. Ez a megállapítás érvényes az enzimgátló hatások vizsgálatára is. A 15. oldal 2. bekezdését a következő mondat indítja: *„(HP)TLC–enzimgátló tesztek továbbfejlesztéséről is több közleményünk jelent meg[M9,M10]”.* Ezek a közlemények tartalmazzák ugyan a kidolgozott ill. módosított enzimgátló hatást vizsgáló teszteket, de nem erről szólnak, hanem a tesztek segítségével azonosított bioaktív komponensekről. Másrészt a kolinészteráz esetében, csak egy létező módszer kismértékű módosítása történt (a semlegesítés és szubsztrát felvitel összevonása egy lépésbe és bemerítés helyett permetezés az enzim oldattal), ezért ezt nem tudom elfogadni új tudományos eredményként. (3.2. tézispont)

Az 5.2. fejezetben *off line* és *on line* csatolásokkal megvalósított azonosításokat foglalt össze. Nem tudom megjegyzés nélkül hagyni egy mondatát ebből a részből. Azt írja *„Említést érdemel, hogy a molekulákban lévő redukáló cukrokat nem tudtuk kimutatni DPA (difenil-amin) és PABA (p-aminobenzoesav) reagensekkel (Maillard-reakción alapuló kimutatás)”(17.o.)*

Ez nem meglepő, mert a molekulákban nincs redukáló cukor, hiszen a cukor glikozidos hidroxil csoportja (ami redukálhatna) glikozidos kötésben van. A vegyület tehát egy kampferol-glikozid p-kumársav-észter. A kapcsolódó cikkben ugyanez:

„The coumaric acid bonded to the C6 atom of glucose probably blocks the ring opening of the sugar, which could explain inactivity of these compounds in the derivatization reaction with PABA.” Itt sem helyes a magyarázat, nem a kumársav a hibás, hanem a kampferol és glükóz közötti glikozidos kötés, ami a származékképzés körülményei között nem hidrolizál (erősebb sav, hosszabb idő szükséges a hidrolízishez, ahogy azt a 2D módszernél meg is valósították).

Azt is írja ugyanitt:

„A c1-c4 zónákban az előzetes várakozással szemben, a flavonoid aglikonoknál nagyobb tömegű komponenseket detektáltunk” .

Nyilván a nagyobb m/z értékű csúcsokra gondolt, nem a komponens mennyisége volt nagyobb.

„*Mindegyik tömegspektrumában jellemzően megjelent a molekulaion [M+1]+ mellett az [M–285]+ fragmension is, ami a szakirodalmi adatokat [132] is figyelembe véve, a bodorrózsából készített termékekben korábban leírt kaempferol-kumaroil-glükopiranozid (tilirozid, c1) és a kaempferol-di-kumaroil-glükopiranozid (c2-c4) izomerek jelenlétére utalt.”*

Az $[M+1]^+$ jelölés és a molekulaion elnevezés helytelen, ez nem molekulaion, hanem addukt ion, ebben az esetben protonált és az $[M+H]^+$ a helyes jelölés, ami a hivatkozott M11 közleményben jól szerepel. A 285 Da különbség arra utal, hogy kampferol található a molekulában, a többi következtetés a hivatkozott irodalom alapján vonható le, amiben a negatív módban felvett tömegspektrumban (Table 1.) valamennyi itt azonosított komponens megtalálható.

1. Miből gondolja, hogy a 455 Da és 309 Da-nál megjelenő csúcsok fragmentációval keletkeztek?

Szintén ebben a fejezetben található a következő mondat:

„a kaempferol-di-kumaroil-glükopiranozid izomerek valószínűleg a flavonoid aglikon frakció készítésekor keletkeztek, azaz műtermékek."

2. Mit gondol, hogyan, miből keletkezhettek, ha ezek valóban műtermékek? Nem lehetséges, hogy az eredeti kivonatban kimutatási határ alatt levő komponensek feldúsultak a frakcionálás során? A hivatkozott [132] közleményben szintén kimutatták a dikumaroil származékot a bodorrózsa kivonatból.

A biológiai aktivitást mutató anyagok között gyakran azonosítottak di- és triterpéneket és más apoláris vegyületeket. Ez nyilván a növényi minta extrakciója és a normál fázisú elválasztások, izolálások miatt van, ahol ezek az apolárisabb vegyületek mutatnak jó elválást. Az illóolaj komponensek, di- és triterpének antimikrobiális és enzimgátló hatása jól ismert, (pl. 10.1016/j.soilbio.2015.04.006, 10.1021/bk-2004-0887.ch004, 10.3390/molecules24142631), ugyanakkor növényvédőszerként való alkalmazásuk korlátozott oldékonyságuk miatt problémás lehet. Az M9 közleményben leírt enzimaktivitás meghatározások között sorrendbeli különbséget találtam. Az amiláz tesztnél először a szubsztrát, majd az enzim oldatot juttatták a lemezre, a kolinészteráz tesztnél fordítva történt.

3. Van ennek valamilyen racionális oka, vagy a lépések felcserélhetők?

4. Alkalmazhatók ezek a bioautográfiás mérések a gátlás hatásosságának (IC_{50}) becslésére?

*31. o. „A kanadai aranyvessző gyökérkivonatának két kromatográfiás zónájában (**a** és **b**) lévő komponensek minden vizsgált enzimet gátoltak (13. ábra) és antibakteriális hatást is mutattak B. subtilis és A. fischeri baktériumokkal szemben a HPTLC–direkt bioautográfia tesztben."*

Ez a megfigyelés nem specifikus gátlásra utal, ami nem feltétlenül kedvező a később felhasználás szempontjából. Másrészt felveti annak lehetőségét, hogy a lemezen nagy lokális koncentrációjú apoláris komponensek a fehérje denaturációjával érik el a gátló hatást.

5. Mi erről a véleménye?

Bár ahogy korábban jeleztem , a dolgozat gondosan szerkesztett, néhány apróbb formai megjegyzést mégis tennék, a teljesség igénye nélkül:

- A rövidítéseket a szövegben ki kellett volna írni az első említéskor. (HP)TLC, HPLC, OPLC, DAD
- A vékonyrétegkromatográfia magyar rövidítése a VRK, bár elterjedten használják az angol kifejezés alapján a TLC rövidítést is.

- Mi indokolja, hogy a HPTLC rövidítést (HP)TLC formában is használja?
- gátlóhatás, gátló hatás mindkettő előfordul, egy szövegben egységesen kellett volna használni
- végbemegy egy szó (18.o)
- publikálták le ? (21. o)
- Az irodalomjegyzék formátuma nem egységes néhány esetben 69,70,174,184.
- 9. o. „*nem csak a retencióval nem bíró, de a mintafelviteli pontban maradó komponens is detektálható és bevonható a biológiai vizsgálatba*."
  A retencióval nem bíró komponens a fronttal mozog, az elemzés főként retencióval bíró komponensekre alkalmazható. A mintafelviteli pontban maradó komponensek még azonos erősségű eluens esetén is különbözhetnek, attól függően, hogy mennyi ideig, milyen távolságra történik a kifejlesztés.

A következő pontokat fogadom el új tudományos ereményként:

1. Több mikroorganizmusra elsőként dolgoztak ki (HP)TLC–direkt bioautográfiás módszert.
2. Igazolták, hogy növényi kivonatok (HP)TLC csatolásokkal való vizsgálata alkalmas azok kémiai és biológiai profiljának meghatározására, valamint minőségi ellenőrzésre.
3. Módszereket dolgoztak ki a (HP)TLC oszlopkromatográfiás technikákkal való off-line és on-line csatolására.
4. Növénykivonatok HPTLC–TLC-MS interfész–ESI-MS és HPTLC–DART-MS vizsgálatával igazolták, hogy a két különböző ionizációs technikával végzett analízis egymást kiegészítik, így biztosítva az MS-sel analizálható vegyületek szélesebb körét.
5. Az OPLC flexibilitását kiaknázva különféle megoldásokat dolgoztak ki növényi kivonatok bioaktív komponenseinek elválasztására és frakcionálására.
6. Az általuk kidolgozott (HP)TLC/OPLC alapú bioaktivitás irányította munkamenetet, melyben derivatizálással, spektroszkópiával, és tömegspektrometriával kombinálták a normál és fordított fázisú frakcionálási és tisztítási lépéseket, alkalmazták számos növényi eredetű komponens elválasztására és izolálására, azonosítására és bioaktivitásának igazolására.

További kérdéseim:

6. Dolgozatában meggyőzően igazolta a VRK hasznosságát és teljesítőképességét a növényi kártevők elleni vegyületek felfedezésében. Mit gondol tapasztalataik átvihetők lennének-e humán gyógyászati célú kutatásokra?

7. Az OPLC alkalmazása lényegesen meggyorsította az elemzéseket és a csatolások is egyszerűbben kivitelezhetők. Teljesen búcsút kell mondanunk ennek a technikának, vagy van még működőképes készülék valahol?

8. Dolgozatában jelzi, hogy a fordított fázisú réteg nem megfelelő a bioautográfiás tesztekhez. Van információja más állófázisok (cellulóz, alumíniumoxid, ioncserélő…) alkalmazhatóságáról? Esetleg próbálkoztak már valamelyik alkalmazásával?

A megjegyzések és kérdések nem érintik a dolgozatban összefoglalt eredmények lényegét, és nem befolyásolják azt a véleményemet, hogy a jelölt meggyőzően igazolta eddigi tudományos tevékenységét. Az értekezés megfelel a „kémiai tudományok doktora" követeményeinek. Ezek alapján a művet nyilvános vitára alkalmasnak találom, és sikeres védés esetén a DSc cím odaítélését támogatom.

Debrecen, 2026. 10. 01.

.....

Dr. Gyémánt Gyöngyi
az MTA doktora