

Fürjes Péter
MTA Energiatudományi Kutatóközpont
Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézet
MEMS Laboratórium

Bírálat

Nádor Judit:

„Proteins, polymers and living cells
on titanium oxide-based nanostructured coatings:
exploitation of label-free optical sensing methods”

című Ph.D. értekezéséhez

A megisztelő felkérést megköszönve írok véleményyt Nádor Judit munkájáról:

Nádor Judit kutatói munkáját a Magyar Tudományos Akadémia Energiatudományi Kutatóközpontjában, a Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézetben végzi, kutatási területe felületek módosítása nanoszerkezetű bevonatokkal, illetve ezek alkalmazása bioanalitikai célú eszközökben, különös tekintettel a felületmódosítás biokompatibilitási, fehérje és sejtdhéziós hatásaira.

A jelölt bemutatott munkájához kapcsolódóan 3 referált nemzetközi folyóiratcikk jelent meg (2 esetén első szerző). Ezen túl 12 referált konferencia-kiadványban megjelent közleményt jegyez, amelyből 10 kapcsolódik közvetlenül a disszertációban összegzett munkához. Ebben a tekintetben a doktori szabályzatban megfogalmazott kritériumokat (2 referált folyóiratcikk) teljesíti.

Ph.D. dolgozatának témája titán-oxid alapú nanostrukturált vékonyrétegek kialakítása, és molekula és sejtdhézióra gyakorolt hatásainak vizsgálata, összehasonlítva az alap szubsztrát tulajdonságaival. A jelölt kifejezetten két rendszert vizsgált: a titán-oxid nanocső és nanorészecske alapú rétegszerkezeteket. A bevonatok optikai bioérzékelőkben (pl. OWLS) való alkalmazásának lehetőségét is elemzi, és ennek megfelelően részletesen vizsgálja a kialakított rétegek / rétegszerkezetek geometriai (laterális homogenitás, vastagság), optikai és biológiai tulajdonságait, illetve biológiai jellemzőit (pl. fehérje- és sejtdhézió). A rétegek tulajdonságainak vizsgálatához modern optikai módszereket (OWLS, ellipszometria, SPR segített ellipszometria) alkalmazott, amelyek akár későbbi bioanalitikai eszközök alapjait is jelenthetik.

A kutatás időszerűségéről:

- A sejtek nanostrukturált rétegeken tapasztalt viselkedését hosszú ideje vizsgálják pl. orvosi implantátumok esetén, ahol a sejtdhézió javítható az eszközök nanoskálás érdesítésével. Ennek ellenére a sejtdhézió és a felület nanoszerkezete közötti összefüggés pontos háttere nem mondható egyértelműen felderítettnek. Ugyanez mondható el a molekulaadhézió esetére is, ahogy az a dolgozatban feldolgozott irodalomból is kiderül. Ennek fényében a megfogalmazott kutatási célkitűzés mindenképpen aktuális – ráadásul még izgalmasnak is tűnik.

- A bioszenzorok – pl. diagnosztikai jelentőségű molekulák nagy érzékenységgű, jelölésmentes kimutatására irányuló – fejlesztése napjaink vezető kutatási területei közé tartozik. Az analitikai eszközök kimutatási határának csökkentése mindenképpen kritikus kérdése ezen kutatásoknak/fejlesztéseknek. A molekula-adszorpciót elősegítő nanostrukturált rétegek alkalmazásával is tehetünk egy lépést az analitikai eszközök érzékenységeinek növelése irányában.

Az értekezés kidolgozása és szerkezete

A dolgozat felépítése logikus, láthatóan a tudományos publikációk szerkezetét és formáját követte a szerző.

A dolgozat bevezetése 8 oldalon – ismeretterjesztő, címszavas jelleggel – mutatja be a tudományos munka – inkább alapismereteknek számító – preparációs és karakterizációs technikákat felvonultató hátterét.

A 2. (State of the art) fejezetben találkozhatunk a tématerület aktuális irodalmának feldolgozásával, mintegy 12 oldalon. Itt kerülnek bemutatásra azok a területek, amelyek a **state-of-the-art irodalom áttekintése után kutatási irányként kitzúzhatók**.

Ennek megfelelően a 3. fejezet 2 oldalban bemutatja a kutatás célkitűzéseit (megfogadva a korábbi bírálók tanácsait).

A 4. fejezet – egyébként a tudományos cikkek felépítésének megfelelően – bemutatja az alkalmazott (hagyományos és nem saját fejlesztésű) karakterizációs módszereket, mint a preparációs eljárásokat és a felhasznált nanoszerkezetű anyagokat (TNT, TNP) a kísérletek reprodukálhatósága érdekében. Kissé diffúz a felépítése, de tulajdonképpen követhető, egy összefoglaló táblázat a mérési kiértékelések során felhasznált állandókról (pl. egyes anyagok törésmutatói) hasznos lett volna.

A következő, 5. fejezet mutatja be a tudományos eredményeket.

Az ábrák kidolgozottsága változó, jellemzően a saját ábrák igényesebbek, mint a bevezető másolatai. Nagyon hasznos a rövidítések listája a dolgozat elején – nekem különösen a gyengém. Másik gyengém az összehasonlító táblázatok alkalmazása, amivel itt többször is találkozhatunk.

Megjegyzések:

- Nagyon hiányzik a dolgozat elejéről a kutatási célok megfogalmazása, ami a bevezetés szerkezetét alátámasztaná, ennek pótlása a 3. fejezetben történik meg.
- A dolgozat angolságát tekintve hagy némi kivetnivalót maga után. A tudományos eredményeket bemutató szakasz ebben a tekintetben elkülönül – gondolom a korábban megírt cikkeknek köszönhetően. Tudom, hogy a cikkek felhasználásával sok energiát lehet megspórolni, azonban így utólag a magyar nyelvvel jobban jártunk volna (ez egyébként általánosan a véleményem).
- Elvértve lehet fellelni csak helyesírási hibákat, elütéseket, fattyúsorokat a dolgozatban. A vége felé több helyen tapasztaltam ismétlést a mondatokban, valószínűleg a szoros időrend miatt.
- Az ábrák minősége egyes esetekben zavaró: érdemes lett volna a másolás helyett újra rajzolni őket (pl. 2.8. ábra).

A dolgozatban az irodalom feldolgozása két részre (fejezetre) oszlik. Az első fejezet inkább a tankönyvi alapokkal foglalkozik, míg a második az aktuális irodalom feldolgozását adja. Így a fejezeteket tekintve összesen 21 oldalnyi az elméleti áttekintés, ami a dolgozat negyedét teszi ki. Az első két fejezet láthatólag elkülönülten született (a korábbi vélemények alapján), akár egybe is lehetett volna gyúrni őket.

Mivel a kitűzött diszciplináris kutatási feladat elég sokrétű ismereteket igényel, ezért az első fejezetben címszerűen megemlítésre kerül a nanoszerkezetű anyagok, valamint a preparációs módszereik csoportosítása. A korábbi bírálók megjegyzéseivel egyetértve, ez a fejezet kissé elnagyolt, hiányérzetet kelt az olvasóban: a nanoszerkezetű anyagok alkalmazási lehetőségei, preparációs és vizsgálati módszerei megkívántak volna egy-egy bekezdést *(ennek pótlása a következő fejezetekben megtörténik)*.

A 2. fejezetben kerülnek bemutatásra – az elsőben csak említett – vizsgálati, analitikai módszerek, amelyek alkalmazását, illetve továbbfejlesztését célul tűzte ki a jelölt. Bár címszavakban, de kapunk néhány alkalmazási példát is a friss irodalomból, és ami a legfontosabb egy-egy fél mondat erejéig megvilágítja az aktuális tudományos eredmények hiányosságait is a **nanoszerkezetű rétegek szubsztrátként való alkalmazásának területén**. Illetve utal a szerző az egyes **analitikai módszerek kombinációiban** rejlő kiaknázatlan, vagy egyelőre kevésbé kiaknázott lehetőségekre. Szintén részletesebb értékelést kapunk az egyes mikro- és nanoszerkezetű felületek alkalmazási lehetőségeiről, kifejezetten biológiai vonatkozásokban: kiemelve a sejthéziót, illetve annak felületi érdekességtől való függését.

Mivel a saját kutatási eredmények megfelelő értékelése és elhelyezése csak az aktuális irodalom ismeretében lehetséges, azért ez a rész kifejezetten fontos a dolgozat szempontjából. Megjegyzem, hogy a dolgozat több, mint 230 irodalmi hivatkozást sorakoztat fel.

Megjegyzések, kérések:

- Mutassa be *előadásában* részletesebben a zéró / egy / két / három dimenziós nanoszerkezetek alkalmazásának lehetőségeit legalább egy-egy példán keresztül!
- Egyes analitikai módszerek bemutatását elnagyoltnak érzem (pl. QCM, QCM-D, GCI), habár ezek a dolgozat szempontjából egyébként nem relevánsak, hiszen a későbbiekben nem kerülnek alkalmazásra, mint vizsgálati módszerek. Szerencsésebb lett volna elhagyni őket (legalább a QCM-et).
- A 28. oldalon említi az aptamer receptorok alkalmazását [135]: mutassa be az aptamerek szerkezetét és az adott target molekulára történő szelekciójuk módszerét (SELEX)!
- Irodalmi háttér alapján vázolja a hidrofíl, biomimetikus felületek fehérje- és sejttaszítási mechanizmusának alapjait! [158-159] Lehet-e összefüggéseket a sejtek kitapadása és a felületek fehérje-adszorpciós tulajdonságok között?
- Miért tapasztalhatók kitüntetett karakterisztikus méretek (pl. 20nm-es felületi érdekesség) a sejtek adhéziós hajlandóságát vizsgálva [162] nanoszerkezetű felületeken?
- Mi az oka, hogy a rákos sejtek esetén előnytelen, fibroblastok esetén előnyös lehet megtapadási/adhéziós szempontból a megfelelő nanoszerkezetűség? [163-165]

Célkitűzések:

A 3. fejezetben ismerjük meg a jelölt témaválasztását és kutatási célkitűzéseit. Érdemes lett volna minden esetben az irodalomra hivatkozó magyarázatot adni a kitűzött cél háttéréhez: pl. mit várunk a nanoszerkezetű filmek alkalmazásától az OWLS mérési módszer

tekintetében: pl. érzékenységnövekedést a nagyobb felület, vagy a megnövekedett fehérje-adszorpció miatt? Ehelyett kicsit összefoglalás jellegű ez a fejezet: az elvégzett kutatómunkát mutatja be: ami a titanát nanocsövek (TNP) és nanorészecskék (TNP) hatásainak vizsgálata a felületek fehérje- és sejtdhéziós tulajdonságaira OWLS / mikroszkópia / HoloMonitor és ellipszométer alkalmazásával.

Megjegyzés:

- Hogyan értelmezi a célkitűzésekben is megemlített mikrométeres és milliméteres skálán definiált homogenitást a leválasztott nanostrukturált filmek esetén? Laterális homogenitást kell érteni ez alatt?

Témakidolgozás

A jelölt hozzávetőlegesen 42 oldalnyi terjedelemben (ide értve a „Materials and methods” fejezetet is), a 4 téziscsoport köré (ami inkább 3) csoportosítva mutatja be saját eredményeit. A dolgozat logikai sorrendjét követve a prezentált eredmények a következők:

- Nanostrukturált filmek kialakítása sík (bioszenzorokban jellemzően alkalmazott) felületeken, illetve ezek vastagságának, laterális homogenitásának vizsgálata OWLS és ellipszometriai módszerekkel.
- A kialakított TNT rétegszerkezetek esetén a jelölt vizsgálta a felületek fehérje és sejtdhéziós tulajdonságait OWLS módszerrel, fáziskontraszt és holografikus mikroszkópiával. Megállapította, hogy a nanostrukturált felületek adhéziós tulajdonságai felülmúlják az eredeti szubsztrátét.
- Felületi plazmon rezonanciás eljárással kombinált ellipszometriai módszer segítségével vizsgálta a TNP alapú rétegszerkezetek esetén a polielektrolit rétegek leválásának folyamatát, valamint a TNP rétegek fehérje és sejtdhéziós tulajdonságait. Hasonló eredménnyel, mint TNT esetén.

Analitikai vizsgálatok az egyes nanostrukturált rétegek esetén:

	AFM	ellipszó vastagság	OWLS vastagság	OWLS fehérje adhézió	OWLS sejt adhézió	ellipszó +SPR PE adhézió	ellipszó +SPR fehérje adhézió	ellipszó +SPR sejt adhézió	HoloM sejt adhézió
TNT	+	+	+	+(BSA)	+				+
TNP	+	+				+	+(FIB)	+	

A táblázat is mutatja, hogy az egyes rétegek vizsgálatokor más-más analitikai megoldásokat alkalmazott a jelölt. Érdekes lett volna a kutatás során szisztematikusabb, következetesebb utat járni, bár ez nem csökkenti az elért eredmények jelentőségét.

Több esetben a kísérleti eredmények bemutatása után elmarad a tapasztalatok részletesebb tárgyalása, illetve azok mélyebb fizikai/kémiai magyarázata. Ezekre jellemzően a tézisek kimondásakor kerül sor (ha akkor sem, akkor a védés válaszaiban).

Megjegyzések:

- A nanostrukturált felületeken tapasztalható megnövekedett fehérje-adszorpció magyarázata az utolsó oldalak egyikére került (fajlagos felület növekedése), aminek nagysága gömb szerkezetű nanorészecskék esetén elméletileg is alátámasztható. Érdekes lett volna ezt ábrával is szemléltetni.

Összefoglalás, tézisek értékelése:

A jelölt által bemutatott munka két elkülönülő részre bomlik a vizsgált nanoszekezetű anyagoknak (TNT, TNP) megfelelően, azonban a fehérje és sejtadhéziós vonatkozások egybefűzik ezeket. A jelölt (és témavezetői) izgalmas kutatási irányt választottak, amelynek orvosi és diagnosztikai jelentősége is lehet a későbbiekben. A vizsgálatokhoz alkalmazott módszerek naprakészek és megfelelően alátámasztják az eredményeket.

Kiemelt eredmények:

- lehetséges érzékenységnövelés nanostrukturált szubsztrátok alkalmazásával jelölésmentes molekulaérzékelésre alkalmas optikai bioszenzorok esetén,
- a felületi morfológiától függő sejtadhézió alapjainak megértése.

Megjegyzések:

- Az 1. tétel esetén a homogénnek tekinthető laterális terület nagysága érdekes lehet, mint konkrét adat, bár érzésem szerint a preparációs technológia és a szubsztrátméret is befolyásolhatja.
- A 2. tétel esetén a speciális küvetta-elrendezés alkalmazása véleményem szerint nem tekinthető új tudományos eredménynek, inkább innováció kategóriájába tartozik.
- A 4.a tétel esetén hiányos a rétegépülési sebességek pH-függésének magyarázata.
- A 4.b tétel akár két részre is bontható lenne: fehérje- és sejtadszorpció témakörök mentén. A tétel második felének megfogalmazása véleményem szerint elcsúszott és pongyola: "igazoltam, hogy a két különböző felszínen mért adatok jelentősen eltérnek egymástól" vagy "jól láthatóan több sejt maradt".
- A dolgozat egyes részei a szerző egyéb munkáinak szó és ábra szerinti másolata.

A téziseket a fenti megjegyzésekkel új tudományos eredményként elfogadom.

Kérdések:

1. tétel:

- Vizsgálta-e a nanostrukturált rétegek szerkezetének / vastagságának a nanorészecskéket (TNT, TNP) tartalmazó szuszpenziók minőségétől (pl. viszkozitás, koncentráció, oldószer), illetve a centrifugálási technika paramétereitől (szögsebesség, gyorsulás, idő, szárítási hőmérséklet / idő) való függését? Ha igen, mi a tapasztalata, hogyan optimalizálta a technológiát?
- Milyen fizikai képpel magyarázható az ellipszometriai rétegvastagság mérés során a felvitt TNT rétegre alkalmazott lineáris törésmutató-változás függvény? Tudja-e ezt igazolni?
- Mekkora a homogén rétegvastagsággal jellemezhető terület az OWLS chippek bevonata esetén, figyelembe véve a jellemzően mm²-es érzékelési területet? Mi befolyásolhatja ennek kiterjedését (pl. felviteli technológia paraméterei, mintaméret)?

2. tétel:

- Hogyan magyarázható a TNT réteggel fedett OWLS chippek esetén a majdnem duplájára növekedett BSA adszorpció: fajlagos felület, anyagtulajdonságok (fém/félvezető-oxid vs. TNT)? Feltételezhető-e ezen mérések alapján, hogy megfelelő receptor-molekulák alkalmazása esetén a specifikus bekötődés is hasonló módon növelhető, javítva ezzel az OWLS mérés érzékenységét (10pg/mm²)? Becsülhető-e a módosított OWLS chippek esetén tapasztalható érzékenységnövekedés?

- Mi a fizikai magyarázata az OWLS jel változásának a sejtdhéziós vizsgálatok esetén: a sejtek területe miatt egyre nagyobb térfogatuk kerül az evaneszcens mezőbe? Mi a fizikai magyarázata, hogy a TNT borított felület kedvezőbb a vizsgált sejtek kitapadása szempontjából? (Visszaautálnék az irodalom kapcsán feltett 3 összefüggő kérdésre.)

3. tézis:

- Hasonlítsa össze az SPR-rel kiegészített ellipszométer tömegérzékenysége adódott 40pg/mm^2 értéket a széleskörűen alkalmazott analitikai módszerekével, pl. SPR, OWLS, QCM, abszorpciós /fluoreszcens optikai spektroszkópia (plate-olvasó)? Mennyire érzékeny a módszer a mérési körülmények stabilitására?

4. tézis:

- Mi a kémiai magyarázata a polielektrolit rétegek szekvenciális leválása során tapasztalt rétegépülési sebesség pH-függésének? Vizsgálta-e a leválási sebesség koncentrációfüggését?

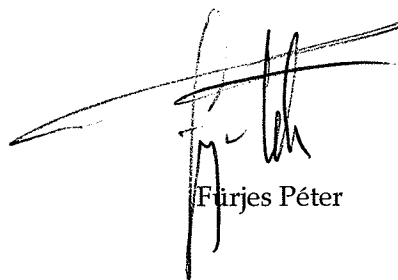
Összegzett vélemény

Nádor Judit a tudományos cikkeknek megfelelő stílusban, és szerkezetben mutatta be kutatómunkáját, amely során nanostrukturált (TNT, TNP) rétegek optikai és biológiai tulajdonságait vizsgálta, kiemelve itt a módosított felületek adhéziós jellemzőit fehérjék és sejtek esetén. Eredményeit a szakma elismert folyóirataiban publikálta.

A jelölt kutató munkára való alkalmasságát egy összetett, „multidiszciplináris” kísérleti feladat sikeres megoldásával bizonyította. Problémalátása megfelelő, analitikai módszerek alkalmazásában jártas, láthatóan képes tudományterületeket áthidaló feladatok megértésére és megoldására. Tapasztalataim alapján, a fenti kérdések megválaszolása esetén és megjegyzések figyelembevételével a Ph.D dolgozat nyilvános vitára bocsátást támogatom, és sikeres védelem esetén a Ph.D. cím odaítélését javaslom.

Budapest, 2016. szeptember 26.

Üdvözlettel,



Fűrjes Péter