

BÍRÁLAT

Péter Beatrix Éva doktorjelölt „Élő sejtek és kopolimer bevonatok kezelése zöld tea polifenollal (EGCg): dinamikai vizsgálatok jelölésmentes bioszenzorokkal” című PhD értekezéséről

A jelölt értekezésében a zöld tea egyik hatóanyagának, az epigallokatekin-gallátnak (továbbiakban EGCg) a sejtekre valamint kopolimer bevonatokra gyakorolt hatását vizsgálja elsősorban jelölésmentes optikai bioérzékelőkkel. A választott téma egyaránt fontos és időszerű: az EGCg számos már ismert és leírt egészségre gyakorolt pozitív tulajdonsága mellett perspektivikusnak tűnik a rák kialakulási, ill. terjedési valószínűségének csökkentésére, így érthetően a tudományos érdeklődés egyik fókuszpontjában van a helye. Az alkalmazott vizsgálati eljárások (jelölésmentes optikai bioérzékelők és képalkotó technikák) önmaguk is újszerű és modern módszereknek számítanak a biológiai alapkutatókban, és a klasszikus eljárásokhoz képest számost előnnyel rendelkeznek (pl. valószerű kinetikai információk, kiemelkedő érzékenység stb.).

A teljes dolgozat 107 oldal terjedelmű. Az első fejezet a Bevezetés (Introduction) alpontjaiban magába foglalja a szakirodalmi áttekintést is, összesen körülbelül 33 oldalon. A jelölt bemutatja az EGCg fontosabb tulajdonságait, a sejtekre gyakorolt hatásaival kapcsolatos korábbi vizsgálatok eredményeit, valamint az általa használt vizsgálati technikák elméleti hátterét. Az elméleti áttekintő logikus felépítésű, a jelölt által felvetett és megoldott problémák megértéséhez szükséges és elégséges információt tartalmaz. A fejezetet – és általánosságban az egész dolgozatot – gördülékeny és érthető fogalmazási stílus jellemzi, minimális elütéssel vagy nyelvtani hibával. A későbbi, önálló munkát bemutató részben sajnos továbbra is lehet találni apró hibákat, elütéseket, annak ellenére, hogy jelölt kijavította a házi védés során felé jelzett, megtalált hibákat. Észrevehetően sok fogalmazásbeli hiba, elütés található a dolgozatba újonnan bekerült részekbe, ami talán sietségből adódhatott. (Pár példa: 82. oldal: „In the future, nanoparticle clusters may be used for delivery of EGCg, and probably it can be created these types of clusters in solution as well.”; tézispontokban: „samle”, „inmotility”, „fot”, „carachterizing” stb.)

A szakirodalmi áttekintő után a jelölt egy fél oldalon összefoglalja a kitűzött céljait (Motivation and Objectives), majd a kísérleti módszerek és a felhasznált anyagok bemutatása következik (Materials and Methods), 10 oldalon. A dolgozat korábbi verziójához képest a módosítások után a fejezet tartalmazza a mérések szempontjából összes relevánsnak tekinthető paramétert, valamint összevetve a Bevezetés fejezettel redundancia mentes.

A jelölt saját vizsgálatait és azok eredményeit egy kb. 30 oldalas fejezetben (Results and Discussion) ismerteti. Általánosságban elmondható, hogy a jelölt logikai gondolatmenete jó, az elvégzett kísérletek szakmailag igényesen lettek kiértékelve és prezentálva, a levont következtetések a bemutatott adatokkal alá vannak támasztva. Eredményeit négy nagy alfejezetre bontva mutatja be.

A 4.1. alfejezetben Holomonitor M4 berendezés segítségével megmutatta, hogy az EGCg 500 µg/ml-es oldatának hatására a HeLa méhnyakrák sejtek motilitási sebessége 35%-kal,

motilitása 25%-kal, migrációs hajlandósága pedig közel 100 %-al csökkent. Érezhető, hogy a jelölt megfogadta a bírálók javaslatait, a módosítások után a fejezet állításai sokkal precízebbek.

A 4.2. alfejezetben a jelölt az EGCg, valamint oxidált formájának kopolimer bevonatokhoz (PLL-g-PEG, valamint PLL-g-PEG-RGD) történő kötődését, valamint ezek sejtadhézióra gyakorolt hatását vizsgálta OWLS és Epic BT műszerek segítségével. Az eredmények ismertetésénél és az ezekből származtatott tézisek megfogalmazásánál érezhető, hogy a jelölt itt is törekedett – a bíráló javaslatainak megfelelően – a pontos mértékek szerepeltetésére. Sajnos ennek kapcsán pár pontatlanság is bekerült a megfogalmazott tézisekbe. A 2.b pontban a jelölt kijelenti: „...az EGCg oxidált formája...háromszor nagyobb mennyiségben kötődik a bevonatokra, mint az EGCg molekulák a frissen készített EGCg oldatból.” Ezt az OWLS műszerrel mért adatokra alapozza, 500 ug/ml koncentrációra (4.6. ábra), és ezeket a részleteket a tézispontban nem említi meg. A későbbi Epic BT műszerrel, több koncentrációra elvégzett mérésből (4.8, 4.9 ábrák, valamint 4.1, 4.2 táblázatok) kiderül, hogy a bekötődés mértékének aránya az EGCg friss és oxidált formájára egyrészt koncentráció függő (kis koncentrációnál (5 ug/ml) pl. a friss forma kötődött be nagyobb mértékben), amit az eredmények ismertetésénél sem tárgyal. Továbbá az Epic BT-vel 500 ug/ml mellett mért értékek kb. kétszeres bekötődést mutatnak az oxidált forma javára, ahogy azt a 2.c tézis alpontban molekuláregegre kifejezve ki is jelenti. Így jelen formájukban a 2.b és 2.c tézispontok véleményem szerint túl általánosan vannak megfogalmazva, ráadásul ellentmondást tartalmaznak. A többi tézis alpont tartalmával és megfogalmazásával egyetértek.

A 4.3 alfejezetben A HeLa sejtek életképességét vizsgálja Epic BT műszerrel valamint klasszikus MTT tesztekkel. Megállapítja, hogy a sejtek életképessége 20-30 ug/ml EGCg koncentráció körül kezd el csökkenni, valamint megmutatja, hogy Epic BT kinetikai görbéi szintén alkalmasak egy alternatív, jelölésmentes sejt életképesség-vizsgálatra. A saját módszer bemutatását és az eredmények ismertetését a módosítások után kellően precíznek vélem, a tézis megfogalmazásával is egyetértek.

A 4.4 alfejezetben OWLS és AFM eljárásokkal vizsgálja ellentétesen töltött arany nanorészecskék klaszterekké rendeződését az OWLS chip felületén. A módosítások és az újonnan bekerült 4.19 ábra jelentősen hozzájárul a korábban felmerült kételyek eloszlatásához azzal kapcsolatban, hogy alakíthatnak-e ki a részecskék homogén réteget a szenzorelem felületén.

A jelölt tézisei jól összefoglalják a főbb tudományos eredményeket, megfogalmazásuk általában kellően precíz (a fentebb említett 2.b és 2.c altéziseknél említett kifogásom mellett). A téziseket a jelölt önálló munkájának és új tudományos eredményeknek ismerem el. Sajnálatos, hogy a talán a sietségnek betudhatóan a tézisek angol nyelvű újrafogalmazása közben feltűnően sok elütés és hiba került be a dolgozat végleges változatába (pl. csak az első tézispont három hibát is tartalmaz).

További kérdéseim a jelölthöz:

- 1) A jelölt az 1.5 alfejezet szakirodalmi bevezetőjében ismertetett példánál nem említi meg, hogy milyen felületkémiával lehetséges az EGCg-t arany nanorészecskékhez/klaszterekhez kötni úgy, hogy az ne veszítse el funkcionalitását.

- Erre milyen lehetőségek vannak, és a jelölt milyen felületkémiát használna erre a célra, az arany nanoklaszterekkel kapcsolatos munkája folytatásaként?
- 2) Mit gondol az EGCg és oxidált formájának kopolimer bevonatokhoz történő kötődésének koncentráció függéséről? Mi lehet az oka annak, hogy kisebb koncentrációknál a friss EGCg, nagyobb koncentrációknál az oxidált forma köt a mérési eredmények alapján (4.1, 4.2 táblázatok) nagyobb mértékben?
 - 3) A 74. oldalon a jelölt az Epic BT és az MTT tesztek összevetésénél kicserélte a citotoxikus aktivitásra történő utalását a citosztatikus aktivitást bemutató ábrára, a dolgozat korábbi verziójához képest: „The calculated transition concentration is compatible with the MTT assay, because this is the point, where the fitted cytostatic activity curve starts to increase as well”. A 4.13 és 4.14 ábrákat összevetve azonban az üzenet (vagyis az átmenet 20-30 ug/ml koncentrációnál) jobban látszik a 4.13 ábra citotoxikus aktivitás görbéjén (a citosztatikus aktivitás görbe éles jellege miatt a váltás kb. 100 ug/ml koncentrációnál van, nem 20-30 ug/ml-nél). Mi a csere oka?
 - 4) A 80. oldalon a jelölt az AFM-es képek alapján kijelenti, hogy a felületen mért nanorészecskék átmérője kb. 5 nm, a magasságuk pedig kb. 30 nm. Ez részben ellentmond a 3. fejezetben ismertetett kísérleti paramétereknek, ahol 5.5 nm átlagos átmérőt ad meg a feltételezem gömbszerű nanorészecskékre. Mérési hibáról van szó (pl. AFM műtermékről) vagy klaszterekre gondolt a jelölt a 80. oldalon, esetleg másról van szó?

A tézisek publikáltságáról. A jelölt a téziseit eddig három darab, egyenként is rangos nemzetközi, lektorált folyóiratban publikálta, első szerzőként. További két első szerzős, tézisekhez köthető cikke van benyújtás előtti állapotban, érdeklődnék, hogy a dolgozat végső verziójának elkészülte óta ezek be lettek-e nyújtva bírálatra. A tézisekhez köthető cikkeken túlmenően további öt már megjelent publikáció társszerzője, valamint 12 felsorolt konferencia részvételt is jegyez. A jelölt publikációs tevékenysége dicséretes, a fokozatszerzés követelményeit túlteljesíti.

Összességében Péter Beatrix értekezését egy igényes, értékes tudományos eredményeket tartalmazó munkának tartom. Javaslom az értekezés nyilvános vitára bocsátását, sikeres védelem esetén pedig a PhD fokozat odaítélését.

Budapest, 2016. szeptember 5.



Dr. Bonyár Attila
adjunktus
BME-ETT