

BÍRÁLAT

Farkas Enikő

„Jelölésmentes optikai bioszenzorok alkalmazása xenobiotikumok toxikusságának feltárására” című Ph.D. értekezéséről

Az elmúlt évtizedekben a glyphosate alapú Roundup Classic gyomirtószerként, állományszárításra alkalmazva, illetve totális hatású szerként vált híressé / hírhedtté az egész világban. Egyre több kutatócsoport vizsgálja a biológiai hatását, különösen mivel a GM növények körében előszeretettel használják.

Farkas Enikő a kísérleteit az Energiatudományi Kutatóközpont Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézetében végezte, ahol a nagy hagyományokkal bíró jelölésmentes érzékelők, bioszenzorok, valamint az elektrokémiai mikroszkóp fejlesztésével foglalkozó munkacsoport munkájába kapcsolódhatott be. A kiváló kutatócsoport más intézettel közösen kezdte meg a már említett, az egyik leggyakrabban használt növényvédőszer, a glyphosate alapú Roundup Classic hatásmechanizmusának tanulmányozását és ért el igen fontos eredményeket a szer egyes összetevőjének egyedi vizsgálatával a citotoxicitás területén.

A Jelölt a kutatási eredményeit az Irodalomjegyzékkel együtt 124 oldalas disszertációban, 7 fejezetben foglalta össze, kiegészítve a Köszönetnyilvánítás valamint a publikációs illetve irodalom jegyzékkel. A dolgozat a szerkezetét, összeállítását tekintve megfelel a feltételeknek, az egyes fejezeteket ismertetve megemlítem azonban a legfontosabb észrevételeimet is.

A Rövidítésjegyzéket és az Előszót követi az igencsak rövid Bevezetés. Az előszóban megemlíti a Jelölt a közvetlenül a PhD témájához nem tartozó kutatási eredményekről szóló cikkeket, bár ez szerintem nem tartozik ide.

Másfél oldalas Bevezetés mutatja be a választott téma szenzorikai és ökotoxikológiai hátterét, a tématerület aktuális kihívásait, a munka célját.

- 15. oldal „hogya a formázott növényvédő szerek környezeti és toxikológiai hatásai gyakran eltérnek a hatóanyagának vagy más összetevőjének hatásától” – A megfogalmazás elég furcsa, mert az összhatás nem tér el az egyes összetevők hatásától, legfeljebb nem erre számítottak.
- 15-16. oldal A bevezetésben a faggyúamin-származékok (POEA) már ismert tulajdonságait is meg kellett volna említeni a glyphosate mellett.

A második fejezet az „Irodalmi áttekintés”, ahol 20 oldalban ismerteti a Jelölt a szakirodalom ide vonatkozó legfontosabb megállapításait, a kapcsolódó tudományos eredményeket. A Jelölt az egész dolgozatot tekintve 276 tudományos publikációt feldolgozva ismerteti a korábbi nemzetközi és hazai kutatási eredményeket. Részletezi a glyphosate hatóanyag tudományos irodalmát, a sejtdhézis, sejtoxicitás folyamatát, ezen belül a különböző mérési, vizsgálati

eljárásokat, valamint polielektrolit filmek filmépítési módját. Nagyon hiányolom, hogy ez a fejezet sem ad részletes ismertetést a POEA eddig ismert tulajdonságairól.

Az irodalmi összefoglalóban számos pontatlanságot, helyesírási hibát, félreérthető megfogalmazást találunk, talán egy végső alapos átolvasással kiküszöbölhető lett volna ezek nagy része.

- 19. oldal „**mikrotoxinokat**”
- A 3. ábra nem tudományos dolgozatba való, inkább reklámanyagba.
- 21. oldal „A *glyphosate* poláros jellege miatt, így csak minta-előkészítést követően lehet a növényvédő szert vizsgálni.”
- „Gyakran összekapcsolják lángfotometriás detektorral,” – nem világos, mit mivel kapcsolnak, de a lángfotometriás detektort általában nem erre alkalmazzák. Érthetőbb lett volna, ha megemlíti, hogy több lépcsőben végül Cu mérésén keresztül határozzák meg a *glyphosate* koncentrációját. Azonban ez nem tartozik a legfontosabb mérési eljárások közé, inkább csak egy különleges összeállítás.
- 22. oldal „láng-atomabszorpció” – láng-fotometriás technikáról beszélünk.
- A 2.3 és a 2.4 fejezetben talán a xenobiotikumok már ismert hatását kellett volna összefoglalni az általános ismeretek helyett / mellett.
- 2.4.3. fejezetben lévő sematikus ábrák (9-12) ismét nem adnak részletes tájékoztatást, ilyen formában fölöslegesek.
- 33. oldal „A mintához luciferáz enzimet adunk, amely magnézium kofaktora és ATP szubsztrátja jelenlétében beindítja az enzim működését.” – nem értelmezhető a mondat.
- 34. oldal „A bioszenzorok egy széles körben elterjedt csoportja elektrokémiai mérési elvet valósít meg, ide tartoznak az **impedometriás, voltammetrikus, amperometrikus és potenciometrikus** bioszenzorok.” impedimetriás, voltammetriás, amperometriás, potenciometriás...
- „Ezek az integrált eszközök elektrokémiai jelátalakítót alkalmaznak és ennek segítségével értékes analitikai információt szolgáltatnak a vizsgált biológiai eseményekről.” – Ezek elektrokémiai detektorok, amelyek az elektrokémiai jeleket különböző mérési elven mérik.
- 35. oldal OWLS első említésnél ki kell írni a teljes nevet.
- „alkalmazott evaneszcens hullám” – az a besugárzás hatására keletkezik, furcsa, hogy alkalmazott-ként kerül említésre.
- 37. oldal „Polielektrolitok és rétegenként építkezve (layer-by-layer) technika” – inkább rétegről rétegre építési technika.
- A 2.5. fejezet egészen másról szól, mint a korábbiak, a bevezetésben indokolni kellett volna ezt a váltást.

A harmadik fejezetben ismerteti Jelölt a célkitűzéseit.

A negyedik fejezetben kapunk tájékoztatást a kutatás során alkalmazott anyagokról és módszerekről. Ismerteti a Jelölt a vizsgálatokhoz szükséges felület előkészítési módokat, az

alkalmazott sejtkultúrát valamint az alkalmazott műszereket és eljárásokat. A mérési eljárások leírásánál általános gondnak tartom, hogy nem a mérések tudományos elvének rövid ismertetésére került sor sematikus ábrákkal alátámasztva, hanem műszerkönyvekből és a gyártók anyagából került beemelésre sok ábra és táblázat (pl. 15., 16. ábra, 2-5 táblázat).

Többször találkozunk a 4.3. fejezetben részletes mérési leírásokkal, holott a 4.4. Kísérletek menete és kiértékelési módja című fejezetbe tartoznának (ld. 48. 52. ill. 54. oldal).

- 41. oldal Mért ezeket a sejteket választotta a kísérletekhez? Meg kellene indokolni a választást.
- 4.3.1. fejezetben ismerteti az OWLS technika működését, a 15. ábrán a készülék fotója és a működési elve látható. Az idézett honlapon a gyártó cég nem mutatja be a B ábrát, az eredetét meg kellett volna jelölni.
- 42. oldal „Az optikai chipen található rácsot egy 632,8 nm hullámhosszúságú nyalábot kibocsátó He-Ne lézerrel világítjuk meg.” Majd: „Az alkalmazott szenzor chipekben a 0. módusindexű transzverzális elektromos (TE₀) és transzverzális mágneses módus (TM₀) gerjeszthető.” – Szabatosabb lenne „chipen található optikai rácsot” Honnan van a két módus?
- 43. oldal Nem biztos, hogy felhasználói szinten ismerni kell a meglehetősen bonyolult levezetést, különösen akkor, amikor elsősorban nem is ezzel a készülékkel dolgozik a Jelölt. Ha néhány egyenlettel mégis bemutatja a levezetést, akkor meg kell határozni a perem feltételeket, milyen modellre, illetve hány rétegű modellre vonatkoznak az egyenletek.
- Mit jelentenek az egyenletekben szereplő A(N), FM(N) és FE(N) értékek?
- 55. oldal „Egy elektromos 16-csatornás pipettával (Finnpipette™ Novus, ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA) léptető módban a sejtszuszenziót és a reagenseket adtam a lyukakhoz a kísérlet során.” Ez már túlzottan részletes leírás.
- „A koncentráció-hatás görbék számolásánál a kinetikák minimum értékeit vettem és ezekből a jelekből **levonatam** az anyagkontrollok értékeit (, hogy korrigáljam a fizikai hatásokból eredő hibákat pl.: hőmérsékletet és hígítást).” – Ezt a leírást egy ábrával kellene érthetővé tenni, de lehet hogy erre csak a kísérletek eredményeinek ismertetésénél kellett volna kitérni.
- „Sejtdhézio vizsgálata RGD-hangolt felületeken Epic BT bioszenzorral” – mit jelent a RGD-hangolt kifejezés? Röviden ismertetni kellene.
- 56. oldal „Az összes lyuknál stabil alapvonalat rögzítettem 20 mM HEPES-HBSS pufferrel, majd a különböző koncentrációjú *glyphosate* oldattal kevert MC3T3-E1 sejteket és öt percig inkubáltam.” – értelmetlen a mondat.
- 57. oldal „*echistatin*, *glyphosate* és *tirofiban* oldatokat pipettáztam” – az *echistatin* és *tirofiban* alkalmazására miért került sor? Nem szerepelnek a felhasznált vegyületek között sem.
- 4.4.7. pont Ha nem a Jelölt végezte a kísérleteket, akkor miért első szám egyes személyben írja le a kísérletet? Jelen volt a méréseknél?

A ötödik fejezet tartalmazza az Eredményeket és azok értékelését. A 30 oldalas anyagban kapunk képet az elvégzett kísérletekről és azok eredményéről. Ezen belül bemutatja a PAH-PSS polielektrolit oldatok segítségével felállított kalibrációs egyenletet, amelynek segítségével az Epic BT bioszenzor által mért hullámhossz-eltolódás felületre adszorbeált tömegadattá konvertálható. Szérumot tartalmazó és szérummentes tápközegekben meghatározta a vizsgált anyagok IC_{50} értékét, igazolva az eljárás szűrőmódszerként való alkalmazhatóságát. A Roundup Classic készítmény, valamint a *glyphosate* és a POEA vizsgálata alapján megállapította, hogy a Roundup Classic citotoxicitását döntően a POEA okozza, és a *glyphosate* az adott koncentrációban *in vitro* körülmények között citotoxikus a preoszteoblaszt sejtekre. Az Epic BT bioszenzorral kapott eredményeket fáziskontraszt, fluoreszcens és holografikus mikroszkópiával, valamint citofluorimetriával is alátámasztotta. A kiegészítő eredmények alapján megállapította, hogy a POEA erősen befolyásolja a sejtek morfológiáját és integritását, nekrozist és apoptózist válthat ki, míg a *glyphosate* a sejtadhéziót és a citoszkeleton morfológiáját befolyásolja. A kísérletek leírása megfelelően részletes, átgondolt kutatómunkára utal. Az eredmények szemléltetése a beillesztett ábrákkal megfelelő, jól követhető. Ugyanakkor néhány megjegyzésem, felvetésem lenne, mind a szerkesztéssel, mind a szakmai kérdésekkel kapcsolatban.

- 59. oldal „A pufferes alapvonal felvétele után 200 µl PAH oldatot injektáltam a küvettába.” A rétegek építésének módját már a 4.4.1. pontban ismertette, nem szükséges ismét leírni, elég visszahivatkozni.
- 61. oldal Érdekes lenne látni, hogy az OWLS műszer által számított ΔM (polielektrolit) hogy felel meg a számításoknak. Összehasonlították az értékeket?
- 62. oldal 5.2.1. fejezet hosszan ismételt korábban már leírt anyagot.
- 64. oldal „fél maximális gátló koncentráció” – 50%-os gátló hatás
- 79. oldal 30. ábra „kinetikája bevonat nélküli (zöld); pufferral leöblített 0,2% *glyphosate* hatóanyagot tartalmazó szenzor felületen (kék)” – az ábra alapján fordítva van.
- 83. ábra A 32. ábra magyarázza a sejtkitapadás kinetikájának változását, de érdekes lenne a mérési görbéket is látni hozzá. A kísérletek alapján látszik (30. ábra), hogy a *glyphosate* nem rögzül a szenzor felületén, szinte teljesen kimosható, ahogy ábrázolja is. Ennek ellenére hatással van a kitapadásra. Adódik a kérdés, hogy ha a hatóanyagot előbb a sejtekkel keveri össze, és utána adja a nem kezelt szenzorra, akkor hogy alakulnak a jelek? Volt ilyen összehasonlító kísérlet?

A hatodik fejezet tartalmazza az Összefoglalást 3 oldalban, majd ezt a hetedik fejezet követi a Tézispontokkal 2 oldalban. Az 5 db tézispontot elfogadom.

A nyolcadik fejezet a Köszönetnyilvánítás, majd a kilencedik fejezet a Jelölt saját publikációs jegyzékét tartalmazza, a dolgozat a tizedik fejezetben található irodalomjegyzékkel zárul.

A dolgozat egészét áttekintve megállapítható, hogy a Jelölt értékes kutatási eredményeket ért el a szenzorikai és ökotoxikológiai kutatási területén. A publikációs tevékenysége megfelelő, a dolgozat témakörébe tartozó 3 cikkből egy elsőszerzős, az összes impakt faktor 13,63. A további, nem közvetlenül a disszertáció témakörébe tartozó publikációkkal együtt az összes impakt faktor 30,20. Az eredmények ismertetése

megfelelően részletes, ami a Jelölt szakmai teljesítményét bizonyítja. A dolgozattal és a tézispontokkal kapcsolatos megjegyzéseim nem vonnak le azok elfogadhatóságából.

Összefoglalva, Farkas Enikő munkája során a kutatás és a gyakorlati alkalmazás szempontjából egyaránt fontos eredményeket ért el az Epic BT bioszenzorral kialakított mérési eljárással, valamint a Roundup Classic készítmény, a glyphosate és a POEA vizsgálata területén. A tézispontok elfogadhatóak. Az eredményeket nemzetközi és hazai fórumokon ismertette, a dolgozat témakörébe tartozó 3 cikkből egy elsőszerzős, az összes impakt faktor 13,63. A bírálatomban szereplő kifogásoktól függetlenül a dolgozat nyilvános vitára bocsátható, sikeres védelem esetén a PhD fokozat odaítélését javaslom.

Budapest, 2020. október 30.



Adányiné Dr. Kisbocskói Nóra, DSc
tudományos tanácsadó, intézetigazgató
NAIK ÉKI

