

Válasz Tegze Miklósnak az MTA doktorának disszertációmról készített bírálatában feltett kérdéseire és megjegyzéseire

Tisztelt Bírálóm!

Megköszönöm hasznos, gondolatébresztő észrevételeit, kérdéseit. Válaszom a következő.

1. A biológiai modellrendszerek kisszögű röntgenszórás méréseinél okozott-e problémát a sugárkárosodás?

A biológiai modellrendszerek kisszögű röntgenszórás méréseinél a szerkezeti azonosításban nem okozott problémát a sugárkárosodás. Laboratóriumi sugárforrás (röntgenső) alkalmazásánál nem tapasztaltam olyan mértékű sugárkárosodást, amely a szórási kép változását okozta volna. A vizsgált rendszerek közül legérzékenyebbek a foszfolipideket tartalmazó rendszerek. Kezdetben kromatográfiával ellenőriztem a röntgenmérések után a kapillárisokból kivett minták összetételét és abban a foszfolipidek sugárkárosodása során képződhető származékokat (a módszerre jellemző határon felül) nem mutattam ki.

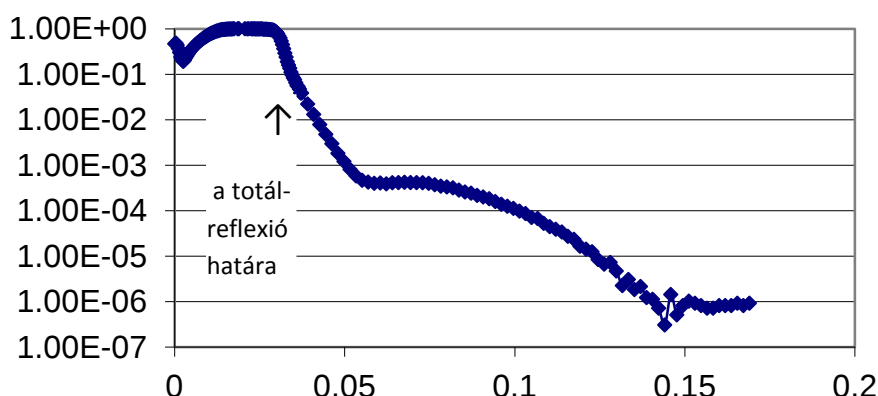
Szinkrotron forrásoknál sugárkárosodásra utaló jeleket gyakran tapasztaltam. Ebben az esetben a mérési idővel a szórási kép változik. A szórási kép változása a jól rendezett, diffrakciót mutató minták esetében a legmarkánsabb. Például a DPPC-víz (dipalmitin-lecitin – víz) alapú multilamellás vezikulák esetében a karakterisztikus Bragg csúcsok szélesedése, eltolódása egyértelműen mutatja a sugárzás káros hatását. A sugárkárosodás folyamán olyan komponensek jelennek meg a rendszerben, amelyek a szabályos rétegrendszert perturbálják, illetve nagyobb mennyiség (1 mol % -ot megközelítő vagy azt meghaladó lipid-összetétel változás) esetén nagyobb mértékben módosítják. Az alkalmazott nyaláb energiája is hatással van a sugárkárosodásra. (A nagyobb energiájú nyaláb, $E > 12$ keV kevésbé roncsolja a mintát, mint az alacsonyabb. A legkisebb energiájú nyaláb, amivel tapasztalatunk van, az 4 keV.)

Szinkrotron berendezéseknél két módszerrel minimalizáltam a sugárkárosodást. Legegyszerűbben a mérési program beállításával. Adott idejű mérés során rövid ciklusokat alkalmazunk, és azokat összehasonlítjuk. Addig a ciklusszámig megyünk, ameddig nincs változás a szórási képben (például fél óra mérés helyett, hatszor öt perc és minden ciklus eredményét összevetjük az előzővel és az első méréssel). Másik lehetőség, hogy rövid idejű méréseket friss mintákon végzünk (ami bonyolultabb és nem minden mérőhelyen van rá lehetőség). Például az ESRF D02-es mérőhelyén egy pumpa friss, még nem besugárzott mintát tol a megvilágítás helyére. Ezen a helyen tipikus mérési idő 50 és 100 ms, az előretolt mintatérfogat 10- 50 μL (mm^3) között változik, a megvilágított mintatérfogat 1 μL körüli, a nyaláb méretétől függően.

2. A reflexiós mérési elrendezésnél egészen kis szögeknél totálreflexió lép fel. Korlátozza-e a jelenség a mérési tartományt?

Igen, a totálreflexió korlátozza a mérési tartományt. A totálreflexiós tartomány kiterjedését az anyag törésmutatója (elektronsűrűsége) és a felület érdessége befolyásolja. A disszertációban, a műszerfejlesztés kapcsán bemutatott reflexiós mérés egy tenzid-agyagásvány keveréket tartalmazó mintáról készült. A minta felülete egyenetlen, és annak lokális anyagsűrűsége is változó. Egészen kis szögeknél a mintából kiálló kolloid szemcséken halad át a sugár (a transzmissziós méréshez hasonlóan). A minta felső rétegét tekintve, abban az elektronsűrűség a rétegnormális irányában folyamatosan (nem ugrásszerűen) változik. Ennek következtében nem lép fel totálreflexió. Sík

szilícium lapra, mint hordozóra felvitt egyrétegű foszfolipid rétegen az alábbi, totálreflexiót mutató görbét nyerjük. Ebben az esetben a hordozó anyagából és a felület simaságából adódóan a totálreflexió megfigyelhető, ami a mérést $q > 0,03 \text{ [1/\text{\AA}]}$ szórési változó tartományra korlátozza.



Szilícium lapra, mint hordozóra felvitt egyrétegű DPPC réteg reflexiója. A felvételt Bálint Szabolcs munkatársam (MTA TTK, MFI) készítette a disszertációban szereplő, kisszögű feltétellel ellátott X'pert röntgendiffrakciós berendezésen.

3. *Az aktívzenek szerkezetét a jelölt gömbökből álló kristallit halmazzal modellezi. Mennyire jól egyezik a modellből számolt és az aktívzeneken mért kisszögű szórési görbe a nagyobb szórési vektorok tartományában? Úgy tűnik, hogy a 46. ábra csak a kis szórési vektorok tartományát ábrázolja. (A „log q” skála számomra nem értelmezhető a q mértékegységének megadása nélkül.)*

A hozzávetőlegesen 1.5 nm átlagos átmérőjű gömbökből álló kristallit halmaz durva modell. (A viszonylag nagy egységméreten kívül, a gömbök konstans és homogén elektronsűrűségének feltételezése további korlátja a modellnek.) A számított szórési görbék csak közelítőleg írják le az aktívzenek kisszögű szórását. Az ésszerű számolási idő limitálja a modell finomságát. A modell leírással a kisszögű görbék alakjának (bizonyos szórásváltozó tartományban, a log – log ábrázolási módban megfigyelt lineáris szakasz meredekségének) értelmezése volt a célunk. Ezzel a megközelítéssel az aktívzén vázszerkezetének tagoltságát, adszorpciós tulajdonságaival összefüggő textúráját kívántam leírni. Az alapegység mérete miatt alkalmatlan a nagyobb szórési szögeknél tapasztalható reflexiók leírására. Ha a modellben a gömbök méretét a szénatomok méretére csökkentenénk, akkor akár a minták (hkl) reflexióit is modellezhetnénk. Ebben az esetben a grafitszerű (amorf grafit) szerkezeti formájának megfelelően kellene felépíteni a szerkezeti modellt. Ebben az esetben nyilvánvalóan a gömbök elhelyezésekor a szénatomok atomi léptékű rendezettségét/rendezetlenségét is figyelembe kellene venni. Bírálónak a nagyobb szórési szögek tartományára (a(hkl) reflexiókra utaló) kérdése nagyon hasznos. A nagyszögű tartományban megjelenő Bragg csúcsok, szénatomok alapján történő modellezését első lépésként alkalmazva, annak egy kisszögű tartományba átlagolt formáját lehetne elkészíteni, így egy univerzálisabb modell leíráshoz jutnánk.

A 46. ábrán a lemaradt dimenzió: $q \text{ [1/\text{\AA}]}$.

4. *A Synperonic A7 – víz rendszer kalorimetrikus vizsgálatánál a nyírásnak kitett rendszernél nem csak az átalakulási hő, hanem az átalakulási hőmérséklet is változott. Mi ennek az oka?*

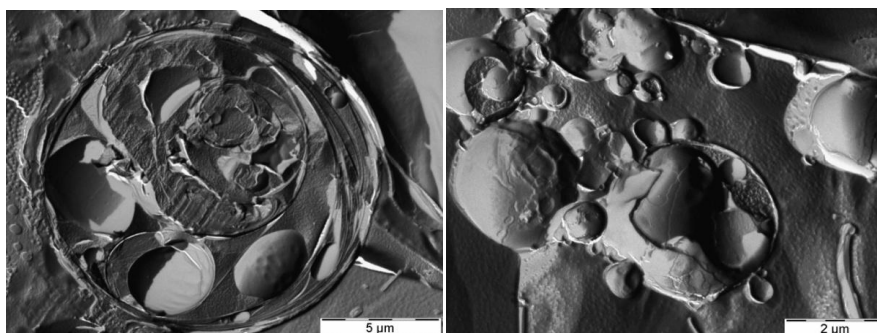
A Synperonic A7 – víz rendszer fázisdiagramján, a réteges és az inverz micellás fázisok egyensúlyi hőmérséklete a tenzid koncentrációjának növekedésével meredeken csökken (Disszertáció, 16. ábra). Különböző koncentrációjú rendszerek DSC görbéit meghatározva az alábbi értékeket nyertük: 75, 80 és 85 tömeg % tenzid tartalmú rendszerek olvadáspontja rendre: 66, 54 és 25 °C (Fetter, Szilágyi, Zrínyi, Bóta: Shear effect on the thermotropic behaviour of the SynperonicA7 – water system, J. of Thermal Analysis and Calorimetry, 2005 ; 85(2) 513-517. disszertációban idézett [193] irodalom). A disszertáció 65. ábráján felfűtésben ~6°C lehűtésben ~15°C a különbség a nyírt és a nyírás nélküli minták jellemző átalakulási hőmérsékletei között. A fenti értékek interpolációja alapján ezek az eltérések fűtésben kb. 81%-os, hűtésben kb. 82%-os összetételeknek felel meg. Tehát az átalakulási hőmérséklet változása az összetétel változásával értelmezhető.

A nyírt minta előlétele okozta a vízveszteséget (Az 1 %-os vízveszteség a minta nyírócellába való betöltése, kivétele, 1 órán át tartó nyírása során reálisnak tűnik.) A felfűtés véghőmérséklete (a DSC hőmérsékletprogramjának megfelelően) 80°C volt. Ezen felül a zárt mintatartó 1cm³-es térfogata a minta térfogatához képest végtelenül nagy, ami a lehűtésben tapasztalt további vízveszteséget magyarázza.

5. *A jelölt a polialmasav tartalmú vezikulák szórás képét különböző rétegszámú mono- és heterodiszperz, egy- és többrétegű vezikulák feltételezésével próbálja leírni. Arra a feltételezésre jut, hogy a méréseket a heterodiszperz, többségében egyrétegű, 10%-ban pedig kétrétegű eloszlással lehet a legjobban leírni. Lehetséges-e más leírás? Én például a 108. ábra alapján nem tartom kizártnak a több lipid kettősréteget tartalmazó heterodiszperz leírást. A középső ábrarészen látható finomszerkezet eltűnését más is okozhatja, mint a kiterjedt rétegszerkezet hiánya.*

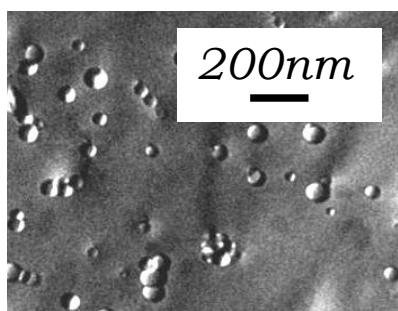
A 108. ábra középső része demonstrációs jellegű, azt kívánja bemutatni, hogy több kettősréteg szabályos pakolódása Bragg reflexiók megjelenéséhez vezet. Egyetértek bírálóm megjegyzésével, hogy ennek eltűnését más is okozhatja, mint a kiterjedt (azaz sok, akár 3, 4, 5 vagy ennél is több kettősréteget tartalmazó) rétegszerkezet hiánya. Nagyobb rétegszám esetén nagyobb mértékű rétegződési hibát kellene feltételeznünk (például az egyes rétegekre vonatkozóan különböző formafaktorokat és/vagy amorf formának megfelelő szerkezeti faktort kellene beírni a modellbe). A többségében egyrétegű és részben kétrétegű vezikulákból álló rendszer feltételezésének érvei:

Fagyasztvatöréssel nyert képi információk: A DPPC/polialmasav/víz rendszerről (egyszerű összekeverés után az alakzatok spontán módon alakulnak ki) fagyasztvatörés után készített TEM képeken különböző formájú vezikulák vehetők szemügyre. Nagyméretű (néhány mikrométer) és kisebb (általában 300 - 400 nm átmérőnél kisebb) méretű vezikulák láthatók. A nagyméretűek jellemzően néhány réteggel rendelkeznek. A fagyasztvatörés során félbetört vezikulák belsejében is további nagyobb méretű liposzómák vannak. A képződött kisebb méretű liposzómák (amelyeket a második képen figyelhetünk meg) keresztbe tört formái egyszeres kettősréteget mutatnak.



DPPC/polialmasav/víz rendszer fagyasztvatöréssel készített TEM képei

A rétegszám csökkenése és a kisméretű liposzómák jelenléte arra utal, hogy a polialmasav jelenléte a multiréteg kialakulását akadályozza. (A polialmasav DPPC-víz rendszerre kifejtett hatását és azok atomi szintű kölcsönhatásait részletesebben leírtuk, a [155] közleményben (Biochimica et Biophysica Acta 1828 (2013) 661-669.) A fenti képeken bemutatott rendszerhez koleszterint adva (a sztérikusan stabilizált vezikuláknál általánosan felhasznált komponens) és a rendszert pórusos szűrőrétegen átnyomva („extrudálva”) a vezikulák méretét 80 nm-re maximáltuk. A minta TEM képei nem mutatnak multiréteges vezikulákat (diszsertáció 105. ábrájának jobboldali képe).



A tanulmányozott és a kisszögű röntgenszórással jellemzett vezikula rendszer TEM képe

Az extrudálással maximált méret következményei: Az extrudálással a DPPC vagy HSPC alapú vezikulák a méretét a gyakorlati tapasztalatok alapján 50 nm alá nem lehet vinni. A 80 nm átmérőjű vezikulák nagyon kicsinek számítanak. Az extrudálás az unilamellás vezikulák előállításának elterjedt módszere, azaz többszörös kettősréteg kialakulása nem várható. Például, 3 kettősréteget feltételezve, közelítőleg 20 nm vastag réteg alakulna ki. Következésképpen a belső lipidréteg által alkotott gömb átmérője 40 nm lenne. Ez az érték nagy görbületet jelent a belső lipidréteg számára, aminek kialakulása energetikai okokból nem valószínű.

A modell egyszerűsítésének kényszere: Az illesztendő modellnek már így is túl sok paramétere van. Ésszerű okok alapján a paraméterek számát igyekeztem csökkenteni. Lényeges és elégséges információ a rendszerről, hogy az mennyi egyrétegű és nem egyrétegű vezikulákból áll. Ha a többszörös rétegek közötti korreláció mértékét is figyelembe venném, a modell tovább bonyolódna.

Tisztelettel és köszönettel:

Bóta Attila

Budapest, 2013. 10. 12.