

VÁLASZ

Dr. Bóta Attila, az MTA kémia tudományok doktorának

„Nemesfém- és biokolloid-alapú nanoszerkezetek tervezése orvosbiológiai és gyógyszerészeti célokra” című,

az MTA doktora fokozat elnyerésére benyújtott értekezésem bírálatára

Az értekezéssel kapcsolatban feltett kérdések megválaszolása előtt szeretném megköszönni Dr. Bóta Attila tudományos tanácsadónak az értekezésem alapos áttekintését és a bírálat elkészítését. Köszönöm és elfogadom a bírálónak a dolgozattal kapcsolatos kritikai megjegyzéseit. Ugyancsak szeretném megköszönni opponensemnek a dolgozatban szereplő eredmények elismerését.

A bírálatban megfogalmazott kérdésekre/megjegyzésekre azok sorrendjében válaszolok.

Megjegyzésekre adott válaszaim:

A 137 oldalas értekezés esztétikailag szép, igényesen összeállított mű. Kevés elütést tartalmaz, amelyek nem okoznak érthetőségi problémákat. (Egyedül, a 61. oldal alján nem derül ki, hogy a szám, vagy a szöveg a tévedés: “az α -hélix tartalom drasztikusan 1,7 %-ról 12,9 %-ra csökken.)

Köszönöm bírálóm észrevételét, valóban nem 1,7 %-ról csökken az α -hélix-tartalom 12,9 %-ra, hanem 51,7 %-ról. Az „5” gépelési hiba miatt lemaradt. A vonatkozó nemzetközi közleményben [P10] az adatok helyesen szerepelnek.

Az aurát ion fehérjéhez (vagy aminosavakhoz, kismolekulákhoz) viszonyított aránya háromféleképpen (tömegarány, annak reciproka, valamint molarány) van megadva.

Elfogadom bírálóm észrevételét. Ahogyan az értekezés 33. oldalán lévő 1. táblázatban feltüntettem, mindenhol molarányt adtam meg, de azon biomakromolekulák esetén, melyek már néhány tíz kD molekulatömeggel rendelkeznek (pl. LYZ, BSA, HSA) vagy éppen egy fehérje keverék (gamma-globulin) inkább a tömegarány értékeket tüntettem fel az 1. táblázatban. Talán célszerűbb lett volna mindkettő megadása az értékek összehasonlíthatósága érdekében.

valamint a PL életartam karakterisztikus ideje kétféleképpen van jelölve (τ és T, 65. old.), amit egységesíteni kell kezelni egy mű keretén belül.

Elfogadom bírálóm megjegyzését. Habár a kétféle jelölésre tettem utalást a szövegben (τ és T), de itt szeretném megjegyezni, hogy a 4. egyenlet helytelenül lett feltüntetve word/pdf konvertálási hiba miatt. A helyes egyenletet itt szeretném feltüntetni, mely az alábbi:

$$I(t) = \sum_{i=1}^n B_i e^{-\frac{t}{\tau}}$$

ahol $I(t)$ a NCs fluoreszcencia intenzitása, τ az egyes fluoreszcencia élettartam komponensek értékei, a B_i pedig az egyes komponensek teljes fluoreszcenciához való hozzájárulásának értékei. A lecsengési görbéket nem minden esetben illesztettük a fenn említett

háromexponenciális ($n = 3$) egyenlettel, hiszen volt olyan rendszer, ahol a kétkomponensű ($n = 2$) adta a legjobb illesztést.

A szórásvektor (abszolút) értékére "h" már nem használatos, "q"-t kell írni, a definíciót is ajánlott megadni, mert az Értekezésben többször előfordul a nagyszögű diffrakció, amelynek diffraktogramjainál szerepel a szórési szög. Így az elmélyültebb olvasó számára van összevetési lehetőség a SAXS és XRD között.

Elfogadom bírálóm kritikai megjegyzését. Valóban szerencsés lett volna az Értekezés vonatkozó fejezetében definiálni a szórési vektornak (q) és a szórési szögnek (θ) a szórás kísérlet geometriai elrendezése által meghatározott kapcsolatát. A szórési vektor és annak abszolút értéke az alábbi összefüggésekkel definiálható:

$$\vec{q} = \vec{k}_{2\theta} - \vec{k}_0; |\vec{q}| = \frac{4\pi \sin \Theta}{\lambda}$$

ahol λ a röntgen sugárzás hullámhossza. Mivel a fotonok szóródása a minta elektronjairól rugalmas szóródás, nem jár energiacserevel ezáltal a mintára irányuló nyalábot és szóródó nyalábot ugyanolyan hosszúságú irányvektorral (a hullámszámvektor hossza $2\pi/\lambda$) vesszük figyelembe. A szórési vektor tehát definíció szerint adott 2θ szórési szöghöz és a beeső nyaláb 0 szórési szögéhez rendelhető irányvektorok különbsége, fizikai jelentése pedig a foton rugalmas ütközésből származó lendülete ($p = h\lambda$). A forrás és a minta valamint a minta és detektor távolság figyelembevételével kis szögek esetében a szórési vektor jó közelítéssel a beeső röntgensugárra merőleges detektor síkjába esik.

A centrifugálás adatánál a fordulatszám (rpm) helyett a gyorsulást, "X g" értékét, tanácsos megadni.

Elfogadom bírálóm kritikai megjegyzését, valóban a „g” értékek összehasonlíthatóak és a kísérlet ilyen módon reprodukálhatóbb. Az Értekezésben bemutatott centrifugálás, mint tisztítási/elválasztási eljárás a vizsgált rendszerek sokfélesége miatt eltérő eszközökön és eltérő fordulatszámok alkalmazásával került kivitelezésre. Ezáltal valóban észszerűbb tehát fordulatszám helyett a „g” értékek megadása, de sok esetben olyan alacsony (1000 rpm alatti) fordulatszám tartomány jellemezte a preparatív munkát, ami konverziós táblázatokban nem is kerül feltüntetésre.

Az ábrákon a grafikonok kis méretei hátráltatják a megfigyelést (pl. 38. ábra).

Valóban néhány ábrafelirat apróra sikeredett, mert igyekeztem minél több információt megjelölni.

Az eltérő poliszacharid-alapú kolloid részecskéket markánsabb módon szükséges jelölni, mert nehézkes követni (pl. 39. ábra (A) és (B) valamint (D) és (E) részei).

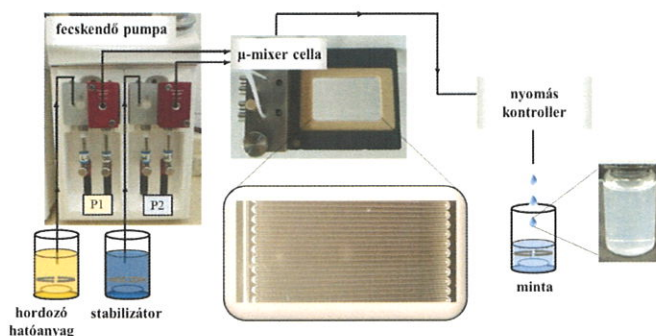
Igyekeztem kék és piros színnel különbséget tenni a két makromolekula között, talán ez nyomtatásban nem látszott megfelelően.

A 8. táblázat jobb oldali, felső ábrájához Arg-aurát (III), míg a szövegben más van említve.

Az említett 8. táblázatban Arg-[AuCl₄]⁻ szerepel, mint kiindulási rendszer. Itt csak ezt szerettem volna feltüntetni, nem pedig, hogy klaszterképződés vagy komplexképződés történik.

Az olvasó szívesen fogadott volna részleteket a folyamatos áramú, áramlásos technikáról, akár egy sematikus ábra bemutatásával.

Elfogadom bírálóm kritikai megjegyzését, de az értekezés terjedelmi korlátai miatt nem került hosszabb leírás az áramlásos elven működő berendezésről. Egy sematikus ábrát (V1. ábra) és a folyamatot itt részletezem.



V1. ábra: A PLGA50 kopolimer alapú koloid részecskék előállításához használt Syrris Asia Flow áramlásos rendszer sematikus ábrája.

Az áramlási technikák közül a mikroreaktorokkal kapcsolatos kutatások az elmúlt pár évben a hatóanyag hordozó rendszerek fejlesztése területen is egy dinamikus fejlődő területté alakult, ahol a mikro- és nanorészecskék előállítása az értekezésben is említett emulziós vagy éppen a nanoprecipitációs módszerek áramlásos rendszerbe történő beintegrálásával valósítható meg. A mikroreaktorok döntően három fő részből épülnek fel: mintaadagoló pumpából, mixer cellából és mintagyűjtő részből, ahogyan a mi egységünk is felépült (Syrris, Asia Flow). A pumpákkal folyamatos áramlási sebességet tudunk biztosítani. Az alkalmazott mixer cellák között megkülönböztetünk passzív és aktív cellákat. Passzív celláknál a turbulens áramlási profil és a minták összekeverése a csatornák geometriájával, míg utóbbi esetében külső behatással (pl. hőmérséklet, nyomás) érhető el. A mikroreaktor alapú folyamatos áramlási technikák alkalmazását nehezíti, hogy az optimális paraméterek (pl. áramlási sebesség, áramlási sebesség arányok, kezdeti koncentráció) ismerete nélkül a hatóanyag-tartalmú részecskék előállításakor a kapszulázás nem valósul meg és a cellák könnyen eltömődhetnek, így a kiindulási optimális koncentrációk előkísérletekben történő meghatározása döntő fontosságú.

Az 58. ábra (A) részében bemutatott DLS ábrán (és általában a többin sem az Értekezésben) nincs jelezve, hogy a gyakoriság (%) – d_{DLS} görbe mit jelent (a részecskék darab, tömeg(térfogat) vagy intenzitás szerinti sűrűségfüggvényét).

Elfogadom bírálóm megjegyzését, hogy minden mérés esetén nem tüntettem fel csak a Gyakoriság (%) kifejezést. Ez azért volt így, mert a Kísérleti körülmények fejezetnél (37. o) a DLS mérés technika rövid bemutatása során rögzítettem, hogy „Azon rendszerekben, ahol arra lehetőség volt ($d > 1$ nm), a részecskék átlagos hidrodinamikai átmérőjét és méreteloszlását dinamikus fényszórás (DLS) mérések révén határoztuk meg egy Malvern NanoZS fényszórásmérővel ($\lambda_{lézer} = 633$ nm, He-Ne lézer). A méréseket 25 °C-on végeztük és $5 - 5$ mérés átlagából számítottuk az átlagos (méret szerinti) hidrodinamikai átmérőt. Tehát ennek értelmében a részecskék darab szerinti sűrűségfüggvényét használtuk fel.

Hiányolom annak leírását, hogy a nanohordozók konkrétan milyen szöveti részt céloznak meg. A hordozók 200 – 300 nm-es mérettartományát tekintve (a definíció alapján szigorúan ezeket a részecskéket nem sorolhatjuk a nanorészecskék közé), a szájon át (ibuprofén esetében biztosan) de inhalációs és külső, bőrfelületi gyógyszeradagolást is szolgálhatnak.

Elfogadom bírálóm megjegyzését. Valóban a 200–300 nm-es részecskék nem tekinthetők nanorészecskéknek; de konzekvensen az értekezésemben a 100 nm feletti, de 500 nm alatti részecskékre a kolloid részecskék kifejezést használom. Doktori értekezésemben több ponton is említem, hogy kutatómunkám főként az adott rendszerek kolloidkémiai és fizikai-kémiai jellemzésére épült és kifejezett „gyógyszerészeti” alkalmazást nem érint. Természetesen a bíráló által említett gyógyszeradagolási módok kivitelezhetőek, ahol a szájon át történő adagolást preferáljuk inkább (egy gyomorvédő kapszula használata mellett), mely az eredményeket tartalmazó vonatkozó publikációban is olvasható [P29].

Az ibuprofén-tartalmú fehérje (BSA, HSA)-Hialuronsav alapú formuláció hatóanyagának kioldódása és permeabilitása kapcsán kritikusabb vagyok. A PAMPA assay alkalmazását a konkrét lipid-rendszer és a donor oldalon felkínált minden egyes komponenst és annak összességét tartalmazó rendszerek előzetes vizsgálata kell, hogy megelőzzön. Fel kell deríteni, hogy milyen nanoszerkezeti formák léphetnek fel, a komponensek (a vizet is beleszámolva) minőségi és mennyiségi összetételének függvényében. Mivel összetett liotrop rendszerrel van dolgunk, a hőmérséklet is további parameter, mert az az önszerveződő rendszert érzékenyen befolyásolja (a paraméterek sorát folytathatnánk: sók, pH hatásai). A 41. megjegyzéshez hozzáfűzöm, hogy a megkívánt feltétel nem biztosítható.

Elfogadom bírálóm kritikai megjegyzését. Az említett PAMPA assay alkalmazásával kivitelezett mérések egyetlen rendszer esetén szerepelnek a dolgozatban, mint modell mérések, s mely mérések együttműködés keretein belül kerültek kivitelezésre. Az értekezés 110. oldalán a 41. lábjegyzetben megemlítem én is a bíráló aggodalmait a mérés kivitelezését illetően: (*„41. A PAMPA permeabilitási mérések értelmezése során feltételeztük, hogy a membrán egy szabályos, homogén összetételű lipid kettősréteg. Fontos azonban megjegyezni, hogy több tanulmány mutat rá, hogy ez nem minden esetben van így, de a membrán nanoszerkezetének vizsgálatára nem tértünk ki.”*) Azért is nem tértünk ki ezen mérésekre, mert egyrészt a PAMPA mérések együttműködés keretein belül születtek, másrészt a csoportunk kutatási profilja és az aktuális pályázati témák nem a kioldódási vizsgálatok biomimetikus eszközeinek fejlesztésére fókuszáltak. Részünkről úgy tekintettünk ezen vizsgálatokra, mint a saját mérési technikainkat kiegészítő eljárásra, amely gyorsan és hatékonyan képes információt szolgáltatni további erőforrás átcsoportosítása nélkül. A mérések során 5-5 párhuzamos mérés készült, melyek eredményei konzekvensnek mutatkoztak, a kapott eredmények (ugyanazon kísérleti körülmények mellett kivitelezve) egymással összevethetőek voltak és jó egyezést mutattak más mérés technikák eredményével, így nem éreztem annak szükségességét, hogy részletes kritikával éljek a tématerületen szerzett, MTA doktora címmel rendelkező vezető kutató által alkalmazott és esetenként kidolgozott mérési eljárást illetően.

Az 1-6. Tézispontokat bizonyítottak látom és elfogadom. A 7. Tézispont 7.3 alpontjában leírt megállapítás kétséges, mert abban az áll, hogy “Az ibuprofén (IBU) bélben történő felszívódását megvalósítva igazoltuk, ...” és ilyen vizsgálatra az Értekezés alapján nem került sor.

Elfogadom bírálóm kritikai megjegyzését, melyet másik két bírálóm is megemlített. Természetesen itt egy szerencsétlen mondat megfogalmazás sikerült, hiszen ahogyan a vonatkozó közlemény [P29] is igazolja a „modellezés” szó kimaradt a mondatból. Nem történt közvetlen bélben történő felszívódás vizsgálata, hanem a vékonybélben történő hatóanyagleadást *modelleztük* az aktuális közeg laboratóriumi körülmények között történő beállítása/kialakítása (pH = 6,5 (0,9 % NaCl), PBS puffer) révén.

Kérdésekre adott válaszaim:

1. Dixon és munkatársai a BSA (HSA, egyéb fehérjék) és aurát (HAuCl_4) között kialakuló NC szerkezetét illetően, az elfogadott - fém-centrumból és a ligandum fehérjékkal kapcsolódó fémion-héjból álló - klaszterrel ellentétben, egy lazább szerkezetű, a fehérjével kölcsönhatásban lévő, fémionokból álló asszociátumot képzelnek el. (Dixon et al, JACS, 140, (2018),2265.; J. Phys. Chem. C, 123 (2019) 10094.; J. Phys. Chem. Lett. 11 (2020), 3345; Phys. Chem. Lett. 12 (2021), 2865. Elképzelésüket arra alapozzák, hogy az MS (MALDI) mérések körülményei erősen perturbálják a vizsgálandó rendszert. Továbbá az XPS, TEM felvételek is nagyvákuumban készülnek. Kérem, fejtse ki a véleményét evvel kapcsolatosan és hasonlítsa össze a kétféle értelmezést a PL élettartamra vonatkozó komponensek bevonásával!

A bíráló kérdésével kapcsolatban valóban kétféle elmélet/megközelítés létezik az aurát-ionok fehérjékkal (jelen esetben BSA) való kölcsönhatásának eredményeképpen lúgos (pH > 10,5) közegben. Az egyik értelmezés, amelyet saját tapasztalataink alapján valószínűsítünk, a BSA-t „statikus ketrecnek” feltételezi, amelyben az Au(III)ionok a fehérje Tyr alegységei ($pK_a = 10,5$) által redukálódnak és semleges Au_{25} nanoklaszter képződnek. A másik megközelítés értelmében, a Dickson és mtsai által vázolt folyamatban a BSA dinamikus jellegét tekintik meghatározónak. Ez utóbbira vonatkozóan kimutatták, hogy az Au(III)ionok a Cys-Cys diszulfidkötés helyén történő Langmuir-típusú kemiszorpcióval „kötődnek” és így nem az Au(0) nukleációja produkálja a képződő termékek vörös emisszióját (~ 650 nm). A bíráló kérte, hogy fejtsem ki véleményem az élettartam adatok bevonásával. Bírálóm által megjelölt 4, rangos amerikai folyóiratban megjelent közleményből egy esetében találhatóak (J. Phys. Chem. Lett., 2021) fluoreszcens élettartam adatok. A közleményben közölt és a saját munkánk során ill. mások által publikált, példaként kiválasztott élettartam adatokat az **VI. táblázatban** foglaltam össze a jobb összevethetőség érdekében.

V1. táblázat: A BSA-Au(III) és BSA-Au NCs esetén meghatározott élettartam értékek (példaként választott közlemények alapján, melyek doi száma szerepel a fejlécekben)

J. M. Dickson et. al., <i>Phys. Chem. Lett.</i> 2020, 11, 9, 3345–3349. (Hiv. 6)			
	τ_1	τ_2	τ_3
BSA-Au(III)	301,1 ns (93 %)	38,3 ns (5 %)	1,6 ns (2 %)
X. L. Guéve et. al., <i>J. Phys. Chem. C</i> 2011, 115, 22, 10955–10963. (Hiv. 354)			
BSA-Au NCs	1,78 μ s (46 %)	184 ns (54 %)	
Y. Xu et. al., <i>Nanoscale</i>, 2014, 6, 1515-1524. (Hiv. 218)			
BSA-Au NCs	1,871 μ s (70,6 %)	711 ns (29,4 %)	
S. Raut et. al., <i>Nanoscale</i>, 2013, 5, 3441-3446. (Hiv. 59)			
BSA-Au NCs	1,87 μ s (átlagos érték)		
Értekezésemben található adat			
BSA-Au NCs	1,20 μ s (átlagos érték)		

Összességében ugyanazon rendszerre meghatározott élettartam értékeket összehasonlítva - a saját rendszerünkre meghatározott értékeket is beleszámítva - mikroszekundumos átlagos értékek mérhetőek a BSA-Au NCs-et tartalmazó diszperzióra. Dickson és mtsai által egy inkább nanoszekundumos átlagos élettartam azonosítható, mely nem jellemző vörös emisszióval rendelkező NCs átlagos élettartam értékének, valóban inkább megfeleltethető komplexeket tartalmazó rendszernek (de ezek is széles skálán változnak).

Fontos megjegyezni, hogy a fehérjével-stabilizált Au NCs szintézis paramétereinek optimalizálása és a rendszer tisztítása kritikus. Dickson és mtsai által publikált közleményekben bár alkalmaznak megfelelő fehérje felesleget és a pH is azonos, hasonlóan a többi (fentebbi V1. táblázatban szereplő) közleményben alkalmazott kísérleti körülményhez, de mindösszesen 2 órán át kevertetik a rendszert (ezt csak két közleményben említik) és kifejezetten megjegyzik, hogy nincs tisztítási lépés. Saját munkánk során 24 óra szintézis időt tartunk és a reakció hőmérsékletét 37 °C-on tartjuk. 24 óra után a rendszert centrifugálással, majd dialízissel is tisztítjuk éppen az elreagáltalan fémion(ok) eltávolítása végett.

Ezáltal a Dickson és mtsai által publikált és az Értekezésben bemutatott eredmények között nincs ellentmondás, hiszen 2 óra reakcióidő után a rendszerben minden valószínűség szerint nagyobb mennyiségben található redukáltatlan fémion, mint az Au atomok önszerveződésével képződő apró klasztermagok. Munkánk során, ahogyan az értekezésben is említettem minden rendszer esetén, fontos paraméter a szintézis idő. Ennek megállapítása érdekében folyamatosan követjük a diszperzió fluoreszcencia intenzitás értékeinek a változását az idővel, s csak abban az esetben tekintjük a szintézist befejezettnek, ha az intenzitás már nem változik tovább, vagy csökkenő intenzitást nem kezd mutatni.

2. Az Értekezés Vizsgálati módszerek pontjában említésre került a Scherrer formula, viszont a formulával számolt értéket nem találtam. Hogyan viszonyulnak ezek az értékek a TEM, ill. DLS módszerrel meghatározott értékekhez? Mennyire tipikus a multidoménből álló nanorészecske? A szintézisek változtatásával lehetséges-e monodomén nanorészecske előállítás? Befolyásolja-e a monodomén vagy multidomén nanorészecske összetétel a nanorészecske plazmonikus tulajdonságát?

Elfogadom a bíráló kritikái megjegyzését, valóban nem szerepelnek részecskeméret adatok az értekezésben a Scherrer egyenlet alapján számolva. A dolgozat 37. oldalán említettem is, hogy

csak néhány esetben történt XRD mérések alapján részecskeméret meghatározás. A 2 nm alatti nanoklaszterek esetén az ultrakis méret miatt ez nem lehetséges, így ezek inkább a kétfémes katalizátorként funkcionáló részecskéket vonatkozásában szolgáltatnak információkat. Bár az értekezésben nem szerepelnek adatok, de a vonatkozó publikációban [P1] és [TP1] ezek megtalálhatóak. Példaként a [P1] közleményben szereplő XRD, TEM és DLS mérésekkel meghatározott átlagos átmérő értékek szerepelnek (V2. táblázat).

V2. táblázat: Au, Ag és Au/Ag kétfémes részecskék átlagos átmérő értékei XRD, TEM és DLS mérések eredményei alapján, valamint az egyes diszperziók karakterisztikus plazmon rezonancia maximumai.

minta	FWHM	d_{XRD} (nm)	d_{TEM} (nm)	d_{DLS} (nm)	PDI	λ_{max} (nm)
Ag	0,52	16	13,03 ± 2,1	17,2 ± 2,8	0,41	408
Au	0,57	18	14,95 ± 1,3	14,5 ± 2,1	0,22	525
Ag/Au 90:10	0,51	16	13,95 ± 1,4	26,5 ± 4,6	0,18	417
Ag/Au 80:20	0,70	12	13,01 ± 1,1	18,4 ± 3,4	0,23	425
Ag/Au 70:30	0,97	10	12,20 ± 1,2	16,3 ± 2,8	0,20	440

A bíráló kérdésére válaszolva a TEM és DLS mérésekkel meghatározott átlagos átmérő értékekkel ezen adatok trendben jó egyezést mutatnak, főként a TEM mérésekkel mutatnak nagyobb hasonlóságot. A DLS mérések révén meghatározott értékek hidrodinamikai átmérők, így a DLS némileg nagyobb értékeket szolgáltat a primer részecskeméret meghatározására irányuló XRD és TEM technikák által meghatározott méretekkal szemben.

A bíráló további kérdéseire vonatkozóan a „multidomén” szerkezet (melyet értekezésemben az Au/Pb kétfémes rendszerek esetén említék) nem feltétlen egyedi, kialakíthatósága az adott rendszer kísérleti körülményeinek és a részecskék méretének függvénye. Ezen Au/Pb kétfémes rendszerek esetén a „monodomén” szerkezet kialakítása nem lehetséges, figyelembe véve, hogy az ólom oxid formája is megjelenik, bár ez az arany tartalom növelésével csökkenthető. Plazmonikus tulajdonságú részecskék esetén (pl.: az Au kombinálása Ag-tel) a „monodomén” ill. „multidomén” szerkezetnek nincs különösebb hatása a plazmonikus tulajdonságra, ha a „domén” szót úgy értjük, hogy ultrakis méretű Au és Ag magok random váltakozása épít fel egy nagyobb nanorészecskét, mely a saját rendszerünk esetén is valószínűsíthető figyelembe véve a kidolgozott előállítási protokollt. Ha az egyik fajta elemből felépülő „domén” döntően a felületen található (pl.: az Ag feldúsul az Au mag felületén) és ez egységes héjat képez, akkor a karakterisztikus LSPR sáv a külső fémre jellemző hullámhossz értéknél detektálható.

A „monodomén” vagy „multidomén” szerkezetek közötti funkcionális különbség jellemzően a mágneses részecskék esetén domináns, de ilyen rendszerek tárgyalásra az Értekezés keretein belül nem kerül sor (pl: K. Roy et al., Mater. Adv., 2022, 3, 7425-7444.)

3. A nanoklaszterek fontos jellemzője a kvantum határfok. Kérem ismertesse, hogy hogyan határozták meg a kvantum határfokot!

A bíráló kérdésére válaszolva lentebb foglalom össze a mérés menetét részletesebben. Az értekezésben csak egy rövidebb bemutatás szerepel.

A fluoreszcencia kvantumhatárfok megállapításához szükséges tudni az alábbiakat: a mintára érkező gerjesztő fény fotonjainak száma és a minta által kibocsátott fluoreszcens fotonok száma. Ezeket az értékeket a minta (2) és a beérkező (gerjesztő) sugár spektrumok (1) csúcs

alatti területéből származtathatjuk. Az (1) esetben a mintatartó a gerjesztő fény útjába esik (IN pozíció), de a minta nincs bent a gömbben, míg a (2) esetben a minta is bent van, amit a fény direkt módon gerjeszt. A mintára érkező gerjesztő fény fotonjainak száma (ami arányos a minta által szórt gerjesztő fotonok számával) arányos az L_1 területtel az (1) spektrumon a gerjesztési hullámhossznál (λ_{ex}). A minta által szórt gerjesztési fotonok száma arányos az L_2 területtel a (2) spektrumon λ_{ex} értékénél. A minta által elnyelt gerjesztő fotonok száma arányos az (L_1-L_2) területtel. A minta által kibocsátott fluoreszcens fotonok száma arányos az E_2 területtel a (2) spektrumon az emissziós hullámhossznál (λ_{em}). Ezekből az értékekből kifejezhetők a mintára jellemző elnyelési együttható (A), külső (ϵ_{ex}) és belső kvantumhasznosítás (ϵ_{in}).

$$A = \frac{L_1-L_2}{L_1}$$

$$\epsilon_{ex} = \frac{E_2}{L_1}$$

$$\epsilon_{in} = \frac{E_2}{L_1-L_2} \text{ (ezen egyenlet szerepel az értekezés 35. oldalán (3. egyenlet))}$$

A mérés során a minta által szórt gerjesztő fotonok diffúz módon szóródnak az integráló gömbben, és újra gerjesztik a mintát (indirekt gerjesztés). Ha az A érték elég magas, akkor az indirekt gerjesztésből származó mintaemisszió elhanyagolható, azonban alacsony A értékeknél a minta spektrum nagymértékben tartalmaz indirekt gerjesztésből származó fluoreszcens fotonokat. Az indirekt emisszió kiküszöböléséhez szükséges egy indirekt gerjesztett minta spektrum (3) felvétele is. A mérés során olyan elrendezést alkalmazunk, ahol a mintát csak az integráló gömbben diffúz módon szóródó gerjesztési fotonok gerjesztik (OUT pozíció). Az L_2 terület a (2) spektrumon λ_{ex} értéknél tartalmazza a minta által el nem nyelt, direkt és indirekt gerjesztésből származó fotonokat is. Az L_3 terület a (3) spektrumon λ_{ex} értéknél viszont csak az indirekt gerjesztésből származó, minta által el nem nyelt fotonokat tartalmazza. Ez alapján a minta elnyelési együtthatója a következő:

$$A = \frac{L_3-L_2}{L_3}$$

A korrigált E_2'' értéket a következő módon számítjuk ki:

$$E_2'' = E_2 - \frac{L_2}{L_3}E_3$$

4. A különböző fehérje-arany (III) alapú nanoklasztereket sejtes vizsgálatokban nanojelzőként használhatjuk. Van-e evvel kapcsolatosan tapasztalata, ezek kvencselődése milyen mértékű, az elterjedt fluoreszcens festékekkel összehasonlítva?

A bíráló kérdésével kapcsolatban valóban érdemes kiemelni, hogy ezen változatos fluoreszcenciával rendelkező NCs-et előszeretettel kísérlük meg alkalmazni sejtek/szövetek fluoreszcens jelölésére. Egy potenciális fluoreszcens jelzőanyagoknak számos követelménynek kell megfelelniük, mint pl.: a megfelelő „fényesség” és oldhatóság, jó foto- és kémiai stabilitás, alacsony toxicitás, ill. a karakterisztikus abszorpció és az emisszió a vörös és a NIR tartományban (ún. biológiai ablak kritérium: ~ 600 – 900 nm) javasolt, hogy megjelenjen, ahol a biológiai objektumok ön-abszorpciója és ön-fluoreszcenciája elhanyagolható. A klasszikus festékekkel szemben (pl. cianin származékok) a fehérjével stabilizált Au NCs (pl. transferrin [Y. Wang et al., *Anal. Chem.* 2013, 85, 4, 2529–2535], lizozim [H. Wei et al., *Analyst*, 2010, 135, 1406-1410], pepszin [H. Kawasaki et al., *Adv. Funct. Mater.* 2011, 21,

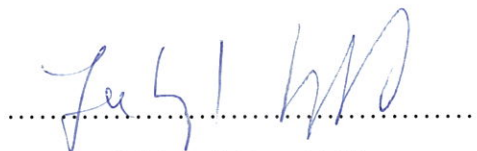
3508–3515], BSA [J. Xie et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 3, 888–889]) ezen kívánalmaknak jobban megfelelnek, ami nem a kioltás jelenségében keresendő. Mindkettő esetében történhet kioltás is. Ezen NCs endocitózissal képesek a sejtbe jutni és akkumulálódnak a citoplazmában, ahol az aggregáció-indukált emisszió (AIE) jelensége miatt inkább a fluoreszcencia erősítés a meghatározó a bíráló által említett kioltással ellentétben. Ez természetesen nem általánosítható, hiszen a fehérjével-stabilizált Au NCs biológiai kismolekulákkal való kölcsönhatása gyakran eredményez kioltást melyet pl. saját munkánk során is tapasztaltunk), mely egy másik alkalmazás a bioszenzorikai területen történő felhasználásuk egyik alapja.

5. Arany nanorészecskék, klaszterek szintézisében lehet-e arany(I)-et használni arany (III) helyett?

A bíráló kérdésére válaszolva az az általános megállapítás tehető – legjobb tudásom szerint –, hogy az esetek 99 %-ban arany(III)sókat használnak arany kolloidok előállítására. Sok száz közlemény áttekintése után összesen 1 releváns munkát (X. Lu et al., *Chem. Eur. J.* 2008, 14, 1584 – 1591) találtunk kutatómunkánk során, melyben AuCl-ot és AuBr-ot használtak arany nanorészecskék előállítására, ahol a szintézist nem vizes közegben, hanem kloroformban végezték és különböző alkilaminok jelenlétében. Ez a munka is rámutat arra, hogy az arany(I) sók vízoldhatósága és stabilitása is lényegesen rosszabb, mint a megfelelő gold(III) prekursorok ugyanezen sajátságai. Az AuCl pl. a hőmérséklet emelésével (de már szobahőmérsékleten is akár) diszproporcionálódik ($\text{Au}(0) + \text{Au}(\text{III})$), emellett irritatív sajátsággal is rendelkezik. Bár az említett munkában éppen ezen diszproporciós sajátságát használják ki, hiszen redukálószer hozzáadása nélkül képződnek Au atomok, melyek önszerveződése adja a részecskét. Emellett viszont a kitermelést rontja, hogy aranykomplexek is képződnek a stabilizátorként alkalmazott alkilaminokkal. Mindezek mellett a standardpotenciál értékekben is lényeges különbség mutatkozik: Au^+/Au^0 : +1,691 V, $\text{Au}^{3+}/\text{Au}^0$: +1,498, míg az $\text{AuCl}_4^-/\text{Au}^0$: +1,002 V. Ezen okok alapján meghatározó az arany(III) prekursor sók preferáltabb használata vizes közegben. A NCs esetén egyetlen közlemény sem található a szakirodalomban arany(I) prekursor felhasználásával történő NCs szintézisére.

Ezúton szeretném ismételtlen megköszönni bírálónak az értekezés alapos áttekintés, jobbitó szándékú megjegyzéseit, melyek nagyban segítik a jövőbeli kísérlettervezést.

Szeged, 2024. 06. 06.



Juhászné Csapó Edit

egyetemi adjunktus