

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**NEMESFÉM- ÉS BIKOLLOID-ALAPÚ
NANOSZERKEZETEK TERVEZÉSE
ORVOSBIOLÓGIAI ÉS GYÓGYSZERÉSZETI
CÉLOKRA**

Juhászné Csapó Edit

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék



Szeged

2023

tidecs2000_121_23

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	1
A dolgozatban használt rövidítések	3
1. Bevezetés	5
2. Irodalmi áttekintés	6
2.1. A nanoszerkezetű anyagok általános jellemzése	6
2.2. Egy- és kétfémes arany-tartalmú NPs	7
2.2.1. Előállítási lehetőségeik vizes közegben.....	7
2.2.2. Optikai tulajdonságaik	9
2.2.3. Alkalmazási területek	11
2.3. Egy- és kétfémes arany-tartalmú NCs	12
2.3.1. Előállítási lehetőségeik vizes közegben.....	12
2.3.2. Szerkezeti és optikai jellemzésük	16
2.3.3. Felhasználási területek.....	19
2.4. Fehérje-, poliszacharid-, és polimer-alapú kolloid részecskék	21
2.4.1. Polimer-alapú kolloidális részecskék általános előállítási lehetőségei	21
2.4.2. A tanulmányozott kopolimerek, poliszacharidok és fehérjék szerkezeti és funkcionális jellemzése	24
3. Célkitűzések	29
4. Kísérleti rész	31
4.1. A tanulmányozott nanoszerkezetű rendszerek előállítási körülményei	31
4.1.1. Szférikus morfológiájú Au és Ag kolloidok előállítása	31
4.1.2. Szférikus morfológiájú, Au-tartalmú kétfémes kolloidok előállítása	31
4.1.3. Fluoreszcens sajátsággal rendelkező egy- és kétfémes NCs előállítása.....	32
4.1.4. Polimer- és poliszacharid-tartalmú kolloid részecskék előállítása	34
4.2. Vizsgálati módszerek	36
4.2.1. A nemesfém-tartalmú rendszerek karakterizálásához alkalmazott műszerek	36
4.2.2. A gyógyszerhordozó részecskék karakterizálásához alkalmazott műszerek.....	39
5. Eredmények és értékelésük	42
5.1. Arany-tartalmú kétfémes NPs	42
5.1.1. Au/Ag kétfémes részecskék jellemzése	42
5.1.2. Au/Sn kétfémes részecskék jellemzése.....	45
5.1.3. Au/Pb kétfémes részecskék jellemzése.....	48
5.2. Ciszteinnel felületmódosított nemesfém kolloidok jellemzése vizes diszperziókban	50
5.3. Fehérjékkel stabilizált egy- és kétfémes NCs	56
5.3.1. Lizozimmal felületmódosított egy- és kétfémes NCs.....	57

5.3.2. Egy- és kétfémes fehérjével (BSA, LYZ) felületmódosított NCs kölcsönhatása biokolloidokkal: fluoreszcens jelölőként történő alkalmazási lehetőségeik	62
5.3.3. γ -globulin immunfehérjével stabilizált Au NCs	64
5.3.4. γ -globulin immunfehérjével stabilizált Au NCs szenzorikai lehetőségei	66
5.3.5. Fehérjékkel felületmódosított Au NCs citotoxicitási vizsgálatai	68
5.4. Aminosavakkal stabilizált fluoreszcens arany és ezüst nanoszerkezetek	69
5.4.1. Tiolesoportot tartalmazó aminosavak és kispeptidek kölcsönhatása aurát(III)ionokkal.	70
5.4.2. Aromás oldalláncú aminosavak kölcsönhatása aurát(III)- és ezüst(I)ionokkal	73
5.4.3. Alifás-N donoresoportot tartalmazó aminosavak kölcsönhatása aurát(III)- és ezüst(I)ionokkal	78
5.5. Kismolekulákkal redukált és stabilizált egy- és kétfémes nemesfém NCs	79
5.5.1. AMP-tal stabilizált Au NCs előállítása és szenzorikai lehetőségeik	79
5.5.2. AMP-tal stabilizált Au/Ag kétfémes NCs előállítása és szenzorikai lehetőségeik	82
5.5.3. HisHA stabilizált Au NCs előállítása és szenzorikai lehetőségeik	86
5.6. PLGA- alapú biokolloidok, mint hatóanyag szállító részecskék	91
5.6.1. A PLGA kopolimerek jellemzése	92
5.6.2. Hatóanyag-nélküli PLGA kolloid részecskék jellemzése	92
5.6.3. Hatóanyag-tartalmú PLGA kolloid részecskék általános jellemzése	93
5.6.3.1. <i>Tokoferol-tartalmú PLGA részecskék tervezése: hangolható hatóanyag-tartalom és szabályozott kioldódás</i>	95
5.6.3.2. <i>Ketoprofen-tartalmú PLGA részecskék tervezése: hangolható hatóanyag-tartalom és szabályozott kioldódás</i>	98
5.7. HyA-alapú hatóanyag hordozó részecskék jellemzése	100
5.7.1. Keresztkötött-HyA és CTAB-HyA komplex hatóanyag hordozó részecskék szerkezeti jellemzése és alkalmazásuk ketoprofen formulázására	100
5.7.2. HyA/Chit vegyes összetételű kolloid részecskék szerkezeti jellemzése	103
5.7.3. HyA/szérum fehérje alapú kolloid részecskék kialakítása, szerkezeti jellemzésük és felhasználásuk ibuprofen formulázására	106
6. Összefoglalás	112
7. Az eredmények várható alkalmazása	118
8. Felhasznált irodalom	119
9. Az értekezés alapját szolgáló publikációk adatai	131
9.1. Az értekezés alapját képező közlemények	131
9.2. Az értekezés témaköréhez kapcsolódó további fontosabb közlemények	131
9.3. Az értekezés anyagából nemzetközi konferenciákon tartott előadások	136
10. Köszönetnyilvánítás	137

A dolgozatban használt rövidítések

(Az értekezésben említésre kerülő, a szintézisekhez használt reagensek, oldószerek, savak, lúgok stb. képletéhez tartozó elnevezéseket a Felhasznált anyagok fejezet foglalja össze.)

aCSF	(agyi) cerebrospinális folyadék
AIE	aggregáció-indukált emisszió
Ag NPs	ezüst nanorészecskék
AMP	adenozin-5'-monofoszfát dinátrium só (eredeti jelölés: 5'-AMP-Na ₂)
Arg	L-arginin
Au NCs	arany nanoklaszterek
Au NPs	arany nanorészecskék
Au _x (SR) _y	alkil- vagy ariltiollal funkcionizált arany nanorészecskék
bcc	tércentráltságú rácsszerkezet
BSA	marha szérum albumin
cac	kritikus aggregációs koncentráció
CD	cirkuláris dikroizmus
Chit	kitozán
cl-HyA	keresztkötött hialuronsav
cmc	kritikus micella (képződési) koncentráció
COLO-720 L	humán normál B limfocita sejtvonal
CP	koordinációs polimer
Cu NPs	réz nanorészecskék
Cys	L-cisztein
DL%	hatóanyag töltöttség (%)
DLS	dinamikus fényszórás
DNS	deoxiribonukleinsav
DSC	differenciális pásztázó kalorimetria
DTA	differenciális termoanalitika
EDX	energiadisziperz röntgenspektroszkópia
EE%	kapszulázási hatékonyság (%)
EME	elektromotoros erő
ESI-MS	elektrospray ionizációs tömegspektrometria
fcc	lapcentráltságú köbös rácsszerkezet
FR	fluoreszcens jelzőanyagként funkcionáló anyag (<i>fluorescent reporter</i>)
FT-IR	Fourier-transzformációs infravörös
FWHM	félérték szélesség
Gln	L-glutamin
GSH	glutathion (redukált forma)
γG	gamma globulin (immunfehérje)
hcp	hexagonális rácsszerkezet
H-HyA	nagy molekulatömegű hialuronsav
His	L-hisztidin
HisHA	hisztidinhidroxámsav
HL-60	humán leukémia sejtvonal
HRTEM	nagyfelbontású transzmissziós elektronmikroszkóp
HSA	humán szérum albumin
HUT-78	humán bőr limfocita sejtvonal
HyA	hialuronsav
IBU	ibuprofen nátrium só

ICP-MS	induktívan csatolt plazma-tömegspektrometria
i.e.p	izoelektromos pont
IRF	műszer válaszfüggvény
ITC	izoterm titrációs kalorimetria
KP	ketoprofen
Kyn	kinurenin
LDH	laktát-dehidrogenáz
LMCT	ligandum-fém töltéstranszfer
LMMCT	ligandum-fém-fém töltéstranszfer
LSPR	lokalizált felületi plazmon rezonancia
LYZ	lizozim (fehérje)
MALDI-MS	atmoszférikus nyomáson működő, lézerdeszorpciós ionizációs tömegspektrometria
M-Chit	közepes molekulatömegű kitozán
Met	<i>L</i> -metionin
M-HyA	közepes molekulatömegű hialuronsav
MWCO	membránszűrő vágási értéke (Da) (<i>molecular weight cut-off</i>)
Na ₃ -cit	trinátrium-citrát ¹
NCs	nanoklaszterek
NIR	közeli infravörös
NPs	nanorészecskék
PAA	poliakrilsav
PBS	foszfát pufferes sóoldat (pH = 7,4 (0,9 % (m/m) NaCl tartalommal)
PCL	polikaprolakton
PDI	polidiszperzitási index
PEC	polielektrolit komplex
Phe	<i>L</i> -fenilalanin
PL	fluoreszcencia
PLA	poli(tejsav)
PLGA	poli(laktid-ko-glikolid)
Pro	<i>L</i> -prolin
PTFE	poli(tetrafluoretilén)
PVP	polivinil-pirrolidon
QCM	kvarckristály mikromérleg
RMS	illesztési jóság adat a CD mérések esetén
ROP	gyűrűfelnyitós polimerizációs eljárás
SANP	szérum albumin nanorészecske
SPR	felületi plazmon rezonancia
TCSPC	időkorrelált egy-foton számlálás
TEM	transzmissziós elektronmikroszkóp
TG	termogravimetria
TOABr	tetraoktil-ammónium-bromid
TP	(±)- <i>α</i> -tokoferol
TPGS	<i>D-α</i> -tokoferol-polietilén-glikol-1000-szukcinát
Trp	<i>L</i> -triptofán
Tyr	<i>L</i> -tirozin
UV-Vis	ultraibolya-látható (spektrum/spektrofotometria)
XPS	röntgenfotoelektron spektroszkópia
XRD	röntgendiffrakció

¹ Az értekezésben a Na₃-cit minden esetben csak „citrát” megnevezéssel van ellátva.

1. Bevezetés

Korszerű nanotechnológiai fejlesztések létfontosságú alapelemei a szervetlen, szerves ill. „hibrid”-alapú nanorészecskék (*nanoparticles*, NPs)² és nanostrukturált rendszerek, melyek szabályozható összetétellel és funkcióval rendelkeznek és anyagtudományi kutatások mellett egyre meghatározóbb szerepet töltenek be élettudományi területeken is. A nemesfém NPs és a szub-nanométeres mérettartománnyal rendelkező, így molekuláris tulajdonságokat mutató, nanoklaszterek (*nanoclusters*, NCs) a méretükkel, morfológiájukkal és összetételükkel hangolható, optikai, elektromos és katalitikus tulajdonsággal rendelkeznek. A méretben vagy a morfológiában bekövetkező kismértékű változás már jelentős mértékben képes módosítani ezen egyedi sajátságokat, így szabályozható mérettel, méreteloszlással és szerkezettel rendelkező NPs/NCs reprodukálhatóan kivitelezhető szintéziseinek kidolgozására folyamatos igény mutatkozik. Az orvosbiológiai alkalmazások megkövetelik olyan új nanoszerkezetek fejlesztését, melyek lehetőség szerint „zöldkémiai” folyamatok révén állíthatóak elő, kerülve a szerves oldószerek, erős redukáló ágensek és egyéb, irritatív, toxikus vagy akár karcinogén vegyületek felhasználását. A felhasználás szempontjából kulcsfontosságú ezen nanoszerkezeteket tartalmazó vizes diszperziók fiziológias körülmények közötti jellemzése az optikai tulajdonságok mellett a stabilitás, a részecskeméret és méreteloszlás tekintetében is.

Kutatócsoportunk több mint 13 éve foglalkozik nemesfém-tartalmú nanoszerkezetek előállítási lehetőségeinek a feltérképezésével, s azok szerkezetfüggő optikai sajátságainak a tanulmányozásával. Munkánk egyik fő célja új, főként egylépéses „zöldkémiai” szintézisutak kidolgozása biokompatibilis, egy- és kétfémes fluoreszcens nemesfém nanoszerkezetek előállítására. Átfogó képet kívánunk nyújtani arról, hogy a legfőbb kísérleti körülmények változtatása milyen hatást gyakorol a nanoszerkezetek optikai és szerkezeti tulajdonságaira. Felhasználási lehetőségeiket főként orvosbiológiai területeken (pl.: (bio)szenzorok és fluoreszcens jelzőanyagok tervezése) vizsgáljuk. Külön kutatási irányt képvisel az elektrokatalizátorként alkalmazható nemesfém-tartalmú, kétfémes NPs reprodukálható módon történő szintéziseinek kidolgozása is a részecskeméret és szerkezet hangolhatósága szempontjából. Az elmúlt öt évben, kutatási területünket szélesítve, biokolloid-alapú potenciális gyógyszerhatóanyag szállító nanoszerkezetű részecskék gyógyszerészeti célokra történő előállításával, valamint azok kolloidkémiai és funkcionális jellemzésével is intenzíven foglalkozunk. Vizsgálataink során biokompatibilis makromolekulák új típusú hordozóként történő felhasználási lehetőségeit térképezzük fel.

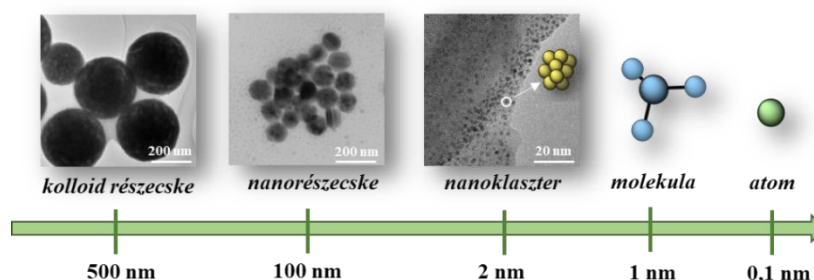
Jelen doktori értekezésemben számos új, egy- és kétfémes nemesfém-tartalmú kolloid részecske és fluoreszcens nanoklaszter újonnan kidolgozott előállítási folyamatát kívánom bemutatni, mely magában foglalja ezen nanostrukturák részletes optikai- és szerkezetvizsgálatát – kiemelve a rengeteg kísérleti adat legmeghatározóbb következtetéseit –, továbbá anyag- és élettudományi területeken elért alkalmazási lehetőségeiket reprezentáló eredmények összegzését. A dolgozatban külön fejezetben szeretném összefoglalni a fém nem tartalmazó, tisztán makromolekulás kolloidok alkotta gyógyszerhatóanyag hordozó részecskék előállítását, valamint fiziko-kémiai, kolloidkémiai és funkcionális jellemzésük során elért új eredmények főbb megállapításait.

² A NPs és NCs rövidítéseket az angol *nanoparticles* és *nanoclusters* szavaknak megfelelően használom.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A nanoszerkezetű anyagok általános jellemzése

Anyagi minőségüktől függően a nanoszerkezetű anyagok (melyeket úgy is definiálhatunk, hogy a nanométeres méretskálán belül ismétlődő szerkezeti periodicitásokat tartalmazó anyagok) egyedülálló tulajdonságokkal rendelkezhetnek. Ilyenek pl.: a kiemelkedően nagy fajlagos felület, stabilitás, inertség, felületi funkcionálizálhatóság, valamint számos esetben újszerű optikai, elektromos, katalitikus és mágneses karakterük, mely révén egyre fontosabb szerepet játszanak a legkülönbözőbb területeken, többek között a kémiában, fizikában, biológiában, élelmiszeriparban, (opto)elektronikában, szenzorikában, valamint orvostudományi területeken is [1]. Ezeket a nanoszerkezeteket számos szempont szerint osztályozhatjuk (pl.: anyagi minőség, méret, morfológia, összetétel, szerkezet stb.), de talán a leggyakrabban használt csoportosítási szempont az anyagi minőség [2]. Ezek alapján megkülönböztetünk szerves- és szervetlen- alapú nanoszerkezeteket. Nevezetesen, a mezopórusos szilícium-dioxid, a szén nanocsövek, kvantumpontok (*kvantumdotok*) és döntően a fém-alapú nanoszerkezetek a szervetlen nano-objektumok csoportját alkotják, míg a polimer nanokapszulák, polimer micellák, liposzómák, dendrimerek vagy a fehérjék alkotta biokolloidok a szerves-alapú rendszerek fő képviselői. Míg az előbbi rendszerek domináns szerepet játszanak akár anyagtudományi, akár orvosbiológiai kutatásokban is, addig az utóbbi csoport egyre nagyobb jelentőséggel bír kiemelten gyógyszeripari alkalmazásokban, mint potenciális hatóanyagleadó nanoméretű rendszerek. A kétféle anyagi minőség „ötvözése” révén egyre inkább az ún. „hibrid” struktúráknak jut meghatározó szerep szinte minden tudományterületen. A fém-tartalmú nanohibrid rendszerek definiálására többféle megközelítés is olvasható a szakirodalomban [3], de jelen értekezés keretein belül azokat a szerkezeteket azonosítjuk „nanohibrid” rendszereknek, amelyekben a szervetlen komponens (pl. fém nanorészecske/nanoklaszter „mag”, periodikusan ismétlődő fém atomokat/fémionokat tartalmazó struktúra) és a hozzájuk kapcsolódó valamilyen szerves molekula (pl.: fehérje, polimer, kismolekula) között közvetlen kémia kötés (pl.: kovalens, koordinatív stb.) létesül. Az említett nanohibrid rendszerek – melyek meghatározó részét képezik jelen munkának – bővebb szerkezeti jellemzése a későbbi alfejezetekben kerül bemutatásra. A nanoszerkezetek mérete alapján is több csoportot különböztethetünk meg: NCs (átmérő (d) < 2 nm vagy szub-nanométerű), NPs ($d = 1 - 100$ nm), kolloid részecskék ($d = 1 - 500$ nm) és szub-mikro méretű részecskék ($d \sim 500 - 1000$ nm), ahogyan azt az **1. ábra** is szemlélteti.



1. ábra: Reprezentatív (nem méretarányos) méretskála a NPs, NCs és (bio)kolloid részecskék átlagos méretének szemléltetésére.

2.2. Egy- és kétfémes arany-tartalmú NPs

Munkánk középpontjában egyrészt nemesfém- (meghatározóan arany (Au) és ezüst (Ag)) tartalmú NPs reprodukív módon történő előállítási folyamatainak a megvalósítása – ezáltal új nanoszerkezetek tervezése és szerkezeti jellemzése – állt, mely kutatási munka meghatározóan két eltérő területre fókuszált. Az egyik új összetételű, arany-tartalmú, kétfémes NPs preparálási protokolljainak a kidolgozására összpontosított. Arra kerestük a választ, hogy az Au más fémekkel (a szakirodalomban korábban nem tanulmányozott p vagy d mező elemei) történő ötvözése révén milyen struktúrák alakíthatóak ki és hogy ezen szerkezetek létrehozása hogyan szabályozható a szintézishez kidolgozott eljárások kísérleti körülményeinek a szisztematikus változtatásával. Mindemellett a részecskék szerkezetének, felületi elemösszetételének és méretének meghatározására is külön fókuszáltunk, hiszen ezen említett tulajdonságok jelentős befolyással bírnak a részecskék katalitikus funkciójára. A másik úton egyfémű Au és Ag kolloidok kismolekulákkal (pl.: aminosavak, oligopeptidek) történő szelektív felületmódosítása állt, monomolekuláris réteg kialakítása által, ahol feltérképezni kívántuk, hogy a felületmódosítás hatására bekövetkező szerkezeti változások milyen hatást gyakorolnak az egyes rendszerek egyedi optikai tulajdonságára és hogy ezen felületmódosított NPs milyen kolloid stabilitással rendelkeznek eltérő kémhatású vizes közegekben. A következő alfejezetekben a tématerület sokrétűsége miatt kizárólag az Au, Ag, ill. Au-tartalmú kétfémes NPs jellemzésére fókuszálunk.

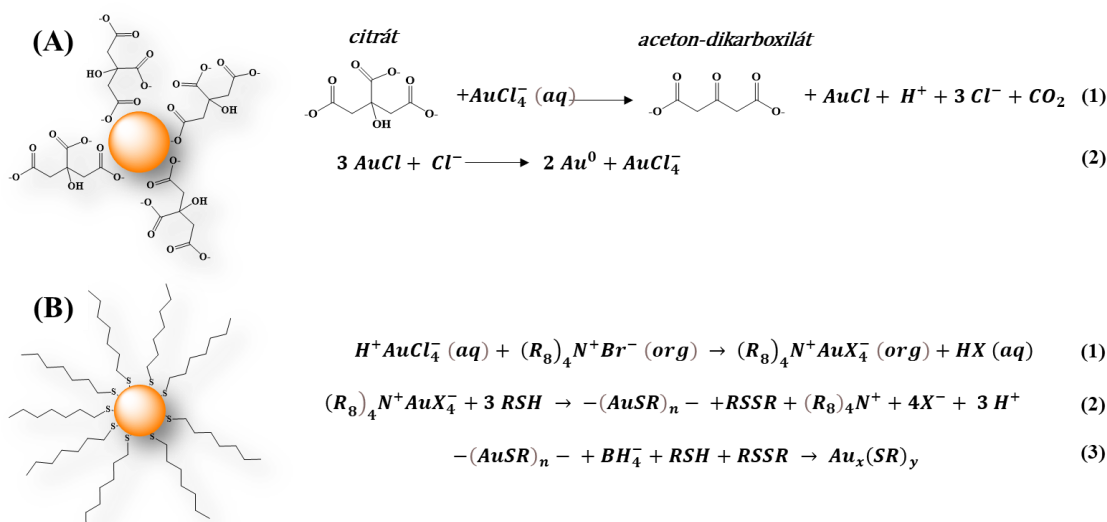
2.2.1. Előállítási lehetőségeik vizes közegben

Au és Ag kolloidok előállítására számos fizikai [4–6] és kémiai eljárás [7] ismeretes mind vizes, mind organikus közegben, melyek közül néhány fontosabb kémiai eljárást emelnék ki, hiszen az elmúlt 13 éves kutatómunkám során kizárólag vizes közegű, új kémiai redukciós eljárások fejlesztésén dolgoztunk. Au NPs szintézisére, habár létezésük egészen az ókorig nyúlik vissza, a legelső meghatározó publikáció 1857-ben született M. Faraday munkája által [8]. Az előállított Au szolok mai napig is megtekinthetők a British Múzeumban. Gömbi morfológiájú Au NPs vizes közegben történő előállítására a legáltalánosabban alkalmazott eljárás az 1951-ben Turkevich által kidolgozott szintézis [9], mely hidrogén-tetrakloro-aurát (HAuCl_4) trinátrium-citrát ($\text{Na}_3\text{-cit}$) molekulákkal történő redukcióját foglalja magában intenzív forralás mellett. Frens ezt a protokollt tovább finomította, s igazolta, hogy az aurát(III)³-citrát molarány (1:1 – 1:50) változtatásával a részecskeméret szabályozható [10]. Ezen protokollt széles körben alkalmazzák mérsékelt stabil, $d = 10 - 100$ nm-es gömb alakú Au kolloidok előállítására. A redukálószerként alkalmazott citrát molekulák az Au kolloidok elektrosztatikus stabilizálásában is meghatározóak (**2. ábra (A)**). A Turkevich szintézis elfogadott mechanizmusát⁴ a **2. ábra** mutatja [11].

³ Az értekezés során említett aurát(III) minden esetben a hidrogén-tetrakloro-aurátot, a citrát a $\text{Na}_3\text{-cit}$ -ot jelenti a Kísérleti körülmények fejezetben (31. oldal) feltüntetett tisztaságok mellett.

⁴ Az aurát(III) redukciójával párhuzamosan a citrát molekulák oxidálódnak és a **2. ábra (A)** részén látható aceton-dikarboxilát képződik, mely enol formája is képes az Au felület stabilizálásában szerepet játszani. Az általunk alkalmazott reakcióban a citrát sokszoros (3 – 5×) feleslegben van, így döntően a nem oxidálódott, feleslegben lévő citrát molekulák stabilizálják az Au felületet, de az enol jelenléte is valószínűsíthető. Már semleges körülmények között viszont az aceton-dikarboxilát acetontra, szén-dioxidra és hidroxid-ionra bomlik.

Egy másik meghatározó eljárás lényeges kisebb átlagos átmérővel ($d \sim 1 - 3$ nm) rendelkező Au kolloidok szintézisére az 1994-ben Mathias Brust és mtsai. által publikált szintézis organikus közegben [12]. A folyamat során első lépésben az aurát(III) vizes oldatát tetraoktilammónium-bromid (TOABr) toluolos oldatával kevertetik intenzíven 10 – 15 perct, ahol a TOABr felületaktív anyag fázistranszfer ágensként funkcionál, azaz feladata a fémion „átjuttatása” a vizes fázisból a szerves fázisba egy arany(I)-TOABr komplex képződésén keresztül (**2. ábra (B) (1) egyenlet**). Második lépésben a toluolos fázisban feldúsuló arany(I)-TOABr komplexhez nátrium-borohidrid (NaBH_4) redukálószer adnak, majd a reakcióelegyet 3 órán keresztül intenzíven kevertetik szobahőmérsékleten. A szintézis eredményeképpen a szerves fázisban megjelenő, alkil- vagy ariltiollal funkcionizált Au NPs jönnek létre ($\text{Au}_x(\text{SR})_y$ (**2. ábra (B) (3) egyenlet**). A funkcionizáló molekula toluolos oldatát a redukálószer hozzáadása előtt injektálják a reakcióelegybe (**2. ábra (B) (2) egyenlet**). Ezen eljárással már a képződő Au kolloid részecskék felületi funkcionizálása is megtörténik, és a tiolcsoporttal rendelkező ligandumok Au-S kovalens kötésen keresztül kapcsolódnak az Au felülethez (**2. ábra (B)**).

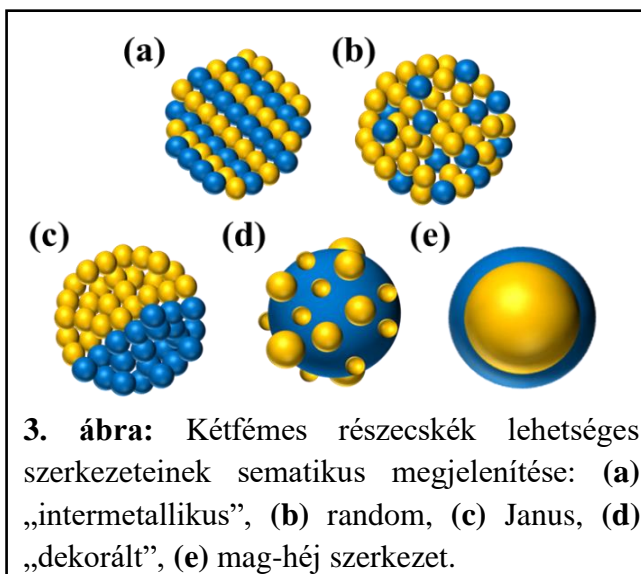


2. ábra: Citráttal redukált és stabilizált **(A)** valamint tiolcsoportot-tartalmazó ligandumokkal felületmódosított **(B)** Au kolloidok sematikus, nem méretarányos, ábrája (balra) és az előállítási folyamatok elfogadott mechanizmusainak egyenletei (jobbra) [11–13].

Az elmúlt közel 3 évtizedben számtalan eljárás került publikálásra, ahol a legváltozatosabb ligandumok (pl.: hidrazin [14], aminok [15], polielektrolitok [16] ill. növényi extraktumok [17], baktériumok [18] stb.) alkalmazhatóságát igazolták Au és Ag kolloidok előállítására a méret mellett a morfológia (pl.: rúd [19], prizma [20], kocka [21] stb.) és a szerkezet szabályozására vonatkozóan is. Munkánk során kizárólag a Turkevich-féle szintézist használtuk Au kolloidok előállítására, így további eljárásokat, terjedelmi korlátok miatt is, nem részletezek ezen alfejezetben.

Az egyfémű nemesfém kolloidok mellett egyre nagyobb hangsúllyal jelentek meg kétfémű részecskék előállíthatóságára is eltérő protokollok, hiszen sok esetben a fémek kombinálása előnyösebb tulajdonságokkal ruházza fel a részecskéket (pl.: növelt katalitikus

hatás, hangolható optikai tulajdonság stb.). Általánosságban mind az ún. *bottom-up* (lentől felfelé történő építkezés) és *top-down* (fentről lefelé történő, méretcsökkenéssel járó folyamat) eljárások ismeretesek kétfémes nemesfém NPs előállítására [22]. A *bottom-up* szintézisek során a NPs szerkezete erősen szabályozható az eljárások közül leginkább alkalmazott kémiai



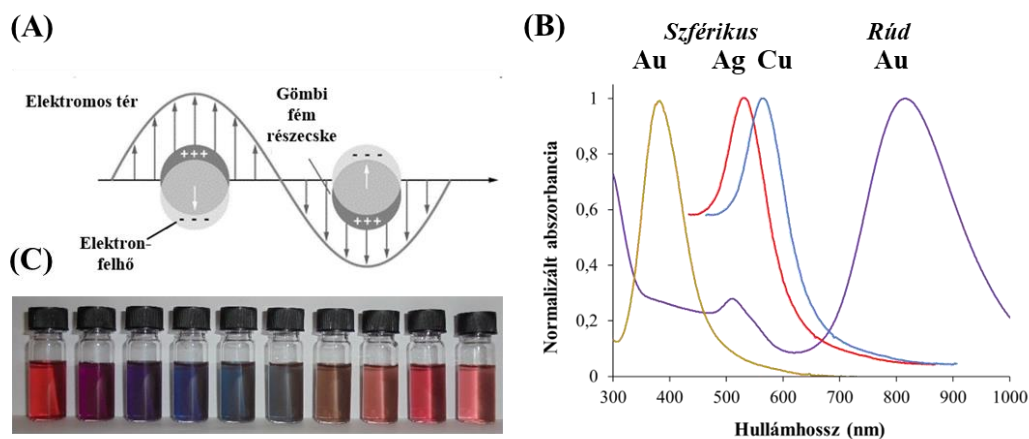
redukciós folyamat kivitelezése révén. Meghatározóan a fémionok szimultán (együttes) redukciója olyan kétfémes részecskék kialakulását eredményezheti, melyben az atomok homogén eloszlásban, random módon, lehetnek jelen, de kialakulhatnak új, ún. „intermetallikus” fázisok vagy akár Janus részecskék is [22]. Ezzel szemben mag-héj szerkezetű részecskék képződése akkor preferált, ha egy előzetesen előállított fémmag felületére redukáljuk a másik fém ionjait [22]. Néhány ilyen kétfémes szerkezet

sematikus ábráját a **3. ábra** foglalja össze. A kémiai redukciós eljárások mellett a szol-gél, ill. a kémiai gőzfázisú leválasztás is elterjedt technikák. Jelen doktori értekezésem keretében kizárólag új összetételű, Au-tartalmú kétfémes részecskék előállítási protokolljait dolgoztuk ki vizes közegben kémiai redukciós eljárások révén, így a következőkben ezen rendszerek irodalmi előzményeinek összefoglalására fókuszálok röviden. Az Au-tartalmú kétfémes részecskék vonatkozásában számos közleményt találhatunk Au/Ag [23–25], Au/Pt [26–28], Au/Cu [29–31], Au/Pd [32,33] rendszerekre változatos összetételek és szerkezetek kialakítása kapcsán, ahol meghatározóan a fémionok együttes redukciója révén alakítanak ki kétfémes részecskéket. Ahogyan a fentebb említett közleményekben megtalálható fémek anyagi minőségét nézzük, úgy döntően az látszik, hogy az Au más nemesfémekkel való ötvözésére találhatunk lényegesen sok közleményt. Emellett szinte elhanyagolható azon munkák száma, melyek a p- vagy d-mező egyéb elemeinek arannyal való ötvözésére irányulnának (1-1 közlemény olvasható csak Au/In [34], Au/Ni [35], Au/Co [36] összetételekre), így munkánk során ez volt az egyik fő motiváció az új összetételű kétfémes rendszerek előállítási protokolljainak kidolgozása során. Az irodalomban fellelhető korlátozott számú publikációk alapján megállapítható, hogy az Au egy nem-nemesfémrel történő ötvözésének eredményeképpen vagy Au/fém-oxid részecske aggregátumok vagy Au maggal és fém-oxid héjjal rendelkező mag-héj szerkezetek alakíthatóak ki [34–36]. Példaként emelem ki, hogy az Au/Ni ötvözet kialakítása során Au-NiO aggregátumok megjelenése igazolható NiO részecskékhez kapcsolódó Au részecskék formájában [35].

2.2.2. Optikai tulajdonságaik

A nemesfém-alapú kolloid részecskék egyik legmeghatározóbb tulajdonsága egyedi optikai sajátságuk, mely a lokalizált felületi plazmon rezonancia (*localized surface plasmon resonance*, *LSPR*) jelenségből származik (**4. ábra (A)**). A jelenség során a nemesfém kolloidokat alkotó

atomok vezetési sávjában lévő elektronok kollektív oszcillációja következik be, ha a részecskék a látható fény fotonjaival intenzív kölcsönhatásba lépnek, mely oszcilláció rezonánssá válik, ha az a besugárzó fény elektromágneses terének frekvenciájával megegyezik. Az így detektálható LSPR sávok, amelyek egy abszorpciós és egy szórási tagra bonthatók, értékes információval szolgálnak nemcsak a nemesfém NPs összetételéről, de méretéről és alakjáról is. A gömb alakú Au és Ag kolloidok karakterisztikus LSPR sávja $\lambda_{\max, \text{Au}} = 500 - 550 \text{ nm}$ [21] és $\lambda_{\max, \text{Ag}} = 380 - 410 \text{ nm}$ [21] tartományban detektálható (4. ábra (B)).

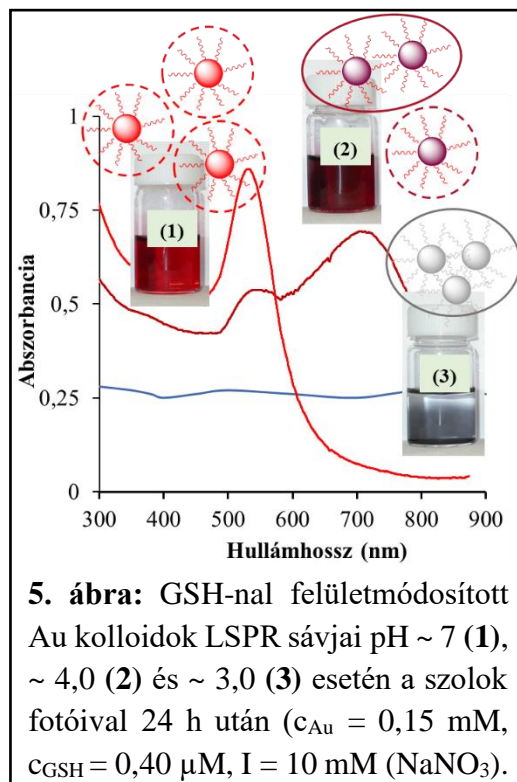


4. ábra: A LSPR jelenség sematikus megjelenítése (A) és gömb alakú Au, Ag és Cu, valamint rúd alakú Au kolloidok vizes diszperzióinak látható (normált) spektrumai (B). Au-tartalmú, eltérő hossz/szélesség arányú rúd alakú részecskéket tartalmazó szolok fotói (C).

A Cu NPs esetén ez a sáv egy szélesebb tartományban ($\lambda_{\max, \text{Cu}} = 550 - 700 \text{ nm}$) figyelhető meg, melyet számos szerkezeti és külső körülmény (oldószer, pH stb.) szabályoz [37]. Az egyfémű részecskék esetén a gömbtől eltérő, ún. anizometrikus alak esetén, mint az Au nanorudak, a szerkezetből adódó transzverzális és longitudinális oszcillációk is fellépnek, mely révén az abszorbancia spektrumában két jól definiált LSPR sáv megjelenése azonosítható, ahogyan azt a 4. ábra (B) is mutatja. A 2. sáv hullámhossza és sáv szélessége a rudak hossz/szélesség arányával szisztematikusan hangolható a látható és a közeli infravörös (NIR) tartományban [7], ezáltal a rúd alakú Au részecskéket tartalmazó szolok változatos színnel rendelkezhetnek (4. ábra (C)).

Kétfémű Au/Ag ötvözet NPs esetében a plazmon módus $\lambda_{\max} = 390 - 550 \text{ nm}$ tartományban, közel lineárisan hangolható, meghatározóan az összetétel szisztematikus változtatásával, míg mag-héj szerkezetű részecskék esetén, ha a héj egységes és elég vékony (néhány nm) akkor a külső nemesfémre jellemző LSPR sáv detektálható a látható tartományban [21]. Az Au kolloidok rézzel való ötvözése révén az LSPR sáv döntő többségében vörös eltolódást szenved és sáv szélesség növekedés is megfigyelhető [31]. Mindezek mellett az Au/Cu részecskék méretének és morfológiájának is meghatározó szerepe van a karakterisztikus LSPR sáv megjelenésére [31]. Ezen egy- és kétfémű nemesfém kolloidok felületmódosítása (pl.: kisebb molekulákkal, peptidokkal) lényegesen nem

változtatja meg a szabad részecskékre jellemző LSPR sáv hullámhosszát [38]⁵, de a felületmódosított részecskék között kialakuló (akár elektrosztatikus) kölcsönhatások révén bekövetkező részleges vagy teljes aggregáció hatására a látható spektrumban lényeges változás figyelhető meg. Részleges aggregáció esetén a gömbi morfológiára jellemző plazmon maximum intenzitása lényegesen lecsökken, de nem tűnik el és egy másik új maximum megjelenése is igazolható (**5. ábra (2)**), míg teljes aggregáció esetén a gömbi alakra jellemző karakterisztikus plazmon sáv teljesen eltűnhet (**5. ábra (3)**). Példaként az **5. ábra** a glutationnal (GSH) felületmódosított Au kolloidok plazmon sávjait szemlélteti pH = 7,4 (**1**), pH = 4,0 (**2**) és pH = 3,0 (**3**) esetén a felületmódosítás után 24 h elteltével⁶. Fontos megjegyezni, hogy Au NPs önszerveződésének tanulmányozásával hazai viszonylatban Deák András és kutatócsoportja foglalkozik meghatározóan főként az optikai sajátosságok feltérképezése és megértése kapcsán [39]. Dolgozatomban ezen területtel csak érintőlegesen foglalkoztam, így részletesebb jellemzésére nem térek ki.



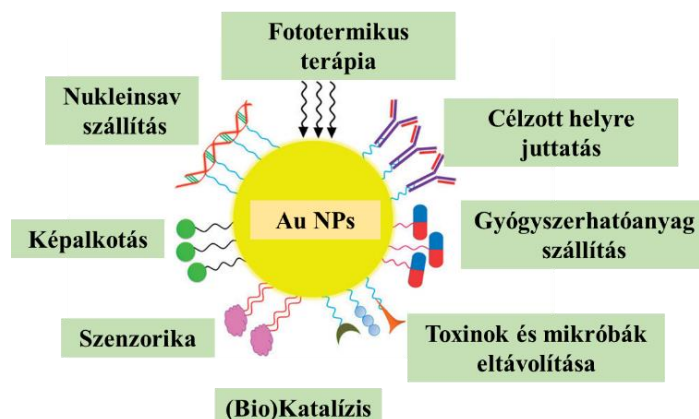
2.2.3. Alkalmazási területek

Változatos szerkezeti és optikai tulajdonságaik miatt a nemesfém NPs-et manapság számtalan tudományterületen kísérlik meg felhasználni, mint a katalízis, elektronika, szenzorika, diagnosztika, képalkotás, terápia stb., ahogyan azt a **6. ábra** is összegzi [40]. Jelen dolgozat keretein belül az Au-tartalmú NPs vonatkozásában a katalitikus tulajdonság kiaknázása volt kiemelt cél a CO₂ elektrokémiai úton történő szabályozott átalakítására vonatkozóan. Az egyfémű NPs-et széles körben tanulmányozzák elektrokémiai CO₂ redukciós folyamatokban mint potenciális elektrokatalizátorok [41,42]. Katalitikus szempontból az egyfémű részecskéken túl a kétfémű NPs még inkább ideális platformot biztosítanak, hiszen a méret és a morfológia mellett a változatos felületi összetételnek is irányító hatása van [43–45]. Megfelelő szintézis eljárások kidolgozása révén a fémek kombinációinak széles skálája vizsgálható, melyek közül néhányat a **3. ábra** mutatott. A második elem jelenléte egy részecskén belül különböző módokon hangolhatja a katalitikus teljesítményt: (i) a CO₂ redukció esetében szinergikusan hathat ill. (ii) a felületi szerkezet módosítása révén az intermedierek kötési energiája szabályozható, valamint (iii) az aktív centrumokat kialakító változatos atomi összetétel kiemelt hatást gyakorol a redukció végbemenetele során. Ezen tények alapján folyamatos igény van új összetételek kialakítására és azok tanulmányozására.

⁵ Az esetek nagy többségében 1 – 3 nm-es kék eltolódás figyelhető meg.

⁶ Saját, nem publikált eredmény.

Az értekezés keretein belül kizárólag a kétfémes NPs preparatív részét ismertetem, mint saját eredményt, így a katalitikus tulajdonságok részletesebb bemutatására nem térek ki, azokat a vonatkozó közlemények (P2-P4) tartalmazzák.



6. ábra: Az Au NPs néhány lehetséges alkalmazási területe [40]⁷.

2.3. Egy- és kétfémes arany-tartalmú NCs

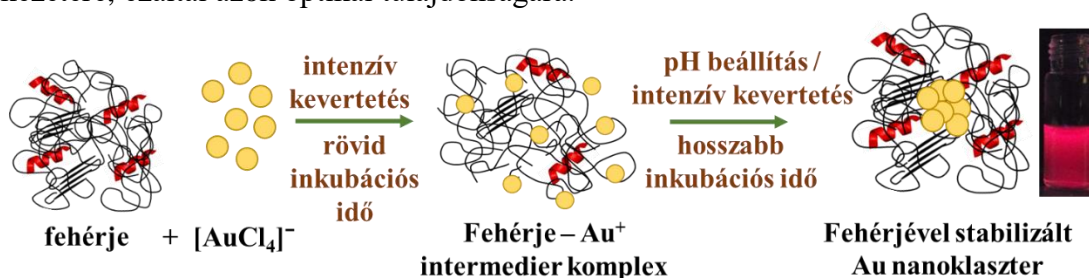
A 2.2. fejezetben ismertetett egy- és kétfémes Au-tartalmú koloid részecskék mellett jelen értekezés meghatározó részét a nemesfém klaszterekkel kapcsolatos kutatómunka tette ki, mellyel 2016 óta foglalkozom, s melyet 2021-től a MTA Lendület programja is támogat. Dolgozatomban számos, közel 25 új egy- és kétfémes Au nanoklaszter „zöldkémiai” úton megvalósuló előállítási protokollját dolgoztuk ki elsőként a szakirodalomban (néhány esetben a szintézis utak lehetőségeit, korlátait is azonosítottuk) kizárólag vizes közegben fehérjék, oligopeptidek és meghatározóan kismolekulák felhasználásával, melyekre az irodalomban nem találhatóak megelőző adatok. Az újonnan szintetizált nanoszerkezetek részletes szerkezet és optikai jellemzése mellett főként szenzorikai alkalmazásokban kíséreltük meg felhasználásuk lehetőségeit bemutatni. A következő alfejezetekben ezen, kiemelten az Au NCs, szerkezeti és optikai jellemzésére térek ki (melyre részletes magyar nyelvű szakirodalom nem található értekezésem megírásának idejében) és bemutatom az előállításukra (vizes közegben) az irodalomban megtalálható protokollok főbb általános aspektusait.

2.3.1. Előállítási lehetőségeik vizes közegben

A szakirodalomban a nemesfém NCs-vel kapcsolatos kutatási eredmények megjelenése meghatározóan a 2000-es évektől indulóan kezdett intenzív növekedést mutatni. A kezdeti években (1996 – 1999) főként a ~ 10 nm alatti mérettel rendelkező tiolcsoportot-tartalmazó ligandumokkal funkcionizált NPs-et tekintették NCs-nek, [46] de ezek nem teljesen azonosíthatóak NCs-nek a ma elfogadott definíció alapján. Az első meghatározó összefoglaló közlemény 2011-ben jelent meg Nienhaus és mtsai. munkája révén [47], ahol már a NCs, méretbeli és szerkezeti jellemzőik mellett, azok karakterisztikus fluoreszcencia (PL) sajátosságainak aspektusait is említik. Ezen összefoglaló közleményben már több olyan *bottom-up* kémiai redukációs eljárást ismertetnek előállításukra vonatkozóan, ahol a prekursor

⁷ Saját szerkesztett ábra a megjelölt forrás alapján.

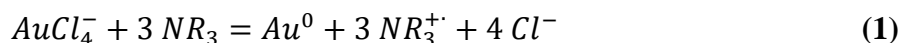
aurát(III)ionok redukciója tiolok, dendrimerek, polimerek, dezoxiribonukleinsav (DNS) oligonukleotidok valamint nagyobb peptidek vagy fehérjék felhasználásával történik [47]. Ezen reakciókat a szakirodalom ún. „templátos” eljárásként (*template-assisted synthesis*) azonosítja, ahol a fentebb említett, főként makromolekulák, szolgálnak templátként. A redukció során, a fémion anyagmennyiségéhez képest, sokszoros feleslegben alkalmazzák ezen molekulákat, így a nukleáció utáni gócnövekedést sztérikusan gátolják és a képződő fémmagok mérete kellően kicsit marad ($d < 2$ nm). Mindezek mellett ezek a molekulák a klaszter mag sztérikus ill. elektrosztatikus stabilizálásában is szerepet játszanak, de a fémmag felületi funkcionálizálása is ilyen módon biztosított. Reprezentatív példaként a **7. ábra** fehérjével stabilizált Au NCs általánosan elfogadott képződési mechanizmusát foglalja össze a templátos eljárás alapján [48], ahol látható, hogy a klaszterek képződése egy Au(I)-fehérje intermedier komplex kialakulásán keresztül történik. A fehérjék alkalmazásával történő templátos eljárás során a NCs sikeres szintéziséhez elengedhetetlen a korábban említett fehérje megfelelő feleslege, a 37 °C-os hőmérséklet és a lúgos (pH ~ 12) közeg. Az aurát(III)ionok redukciója Au⁰-vá egy kétlépcsős folyamat során történik. Első lépésben az aurát(III)ionok részleges redukciója történik meg Au(I)-ionokká a fehérje Trp és Tyr aminosavakról történő elektronátadási folyamata révén. Egy ún. „láncvándorlást” (*chain migration*) követően a képződő arany(I)ionokat a kéntartalmú molekulák (pl. Cys) koordinálják, ahol a további redukciót (Au(I) → Au⁰) a közeli vagy éppen szomszédos aminosavak biztosítják. Az alkalmazott extrém bázikus körülmények egyrészt a Tyr és Trp aminosavak redukciós képességének javítását szolgálják. Másrészt a lúgos közeg alkalmazása a fehérjelánc kitekeredéséhez is erősen hozzájárul, ami megkönnyíti a részben redukált fémionok „láncvándorlását” a fehérjelánc mentén [49], hiszen a fehérje kitekeredett állapotában az egyes aminosavak oldalláncai jobban hozzáférhetőek. A kísérleti körülmények közül a fémion/fehérje moláris vagy tömegaránya, a fémion kiindulási analitikai koncentrációja, a fehérje helyett alkalmazott egyéb ligandum anyagi minősége, ill. a hőmérséklet és a reakcióidő mind-mind domináns hatással van a képződő klaszter(ek), szerkezetére, ezáltal azok optikai tulajdonságára.



7. ábra: Fehérjével stabilizált Au NCs templátos eljárással történő előállításának sematikus megjelenítése [48] egy vörös emisszióval rendelkező, fehérjével felületmódosított Au NCs-et tartalmazó vizes diszperzió UV-lámpa alatti fotójával (jobb szélén).

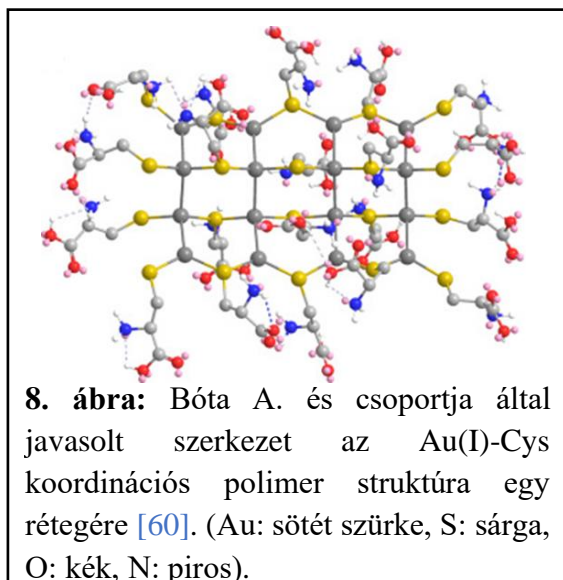
A fehérjék azért is alkalmasak Au NCs templátos eljárással történő előállítására vizes közegben, mert változatos aminosav szekvenciával rendelkeznek, és korábbi, Au NPs-kel kapcsolatos kutatásokból igazolást nyert, hogy egy fehérje/peptid redukciós képessége az őket felépítő aminosav(ak) oldalláncainak kémiai minőségétől erősen függ, s amelyek aktivitását a szomszédos oldallánccok is szabályozhatják [50]. Egy másik fontos meghatározó tényező a

fehérje/peptid nettó töltése, melynek szintén irányító hatása van az Au NPs nukleációjára és növekedésére [50]. Kutatási munkánk középpontjában éppen ezen templátos reakció állt, ahol feltérképezni kívántuk, hogy a NCs előállítására ezen eljárást alkalmazva az egyszerű aminosavak milyen szereppel bírnak. Alkalmas-e egy szimpla aminosav Au NCs szintézisére és hogy az egyedi aminosavak oldalláncainak kémiai minősége milyen irányító hatással rendelkezik? Rendszerenként néhány szakirodalmi hivatkozás fellelhető főként *L*-triptofán (Trp), *L*-hisztidin (His), *L*-tirozin (Tyr), *L*-prolin (Pro) ill. a *L*-cisztein (Cys) és a *L*-metionin (Met) alkalmazhatóságára vonatkozóan Au NCs előállítására, mely eredményekből, saját új eredményeinkkel együtt, 2019-ben egy review közleményt is összeállítottunk [51]. A tiol- és tioéter-oldalláncokkal rendelkező Cys és Met kivételével kéken emittáló, Au₃-Au₁₀ (3 – 10 Au atom alkotta) NCs szintéziseiről számoltak be az [AuCl₄]⁻ ionok His, Tyr, Pro és Trp ligandumokkal való kölcsönhatása révén a hőmérséklettől valamint a reakciópartnerek arányától függően [51]. Több kutatócsoport is szintetizált pl. His-nel stabilizált Au₁₀ NCs-et [52–54] korábban – közel azonos kísérleti körülmények alkalmazása mellett ([AuCl₄]⁻:His/1:30 molarány, pH ~ 1, 24 h, szobahőmérséklet –, ahol a kéken emittáló klasztereket GSH [54] ill. jodid-ionok [52] detektálására, valamint rákos sejtek képződésére [54] használták fel. H. Chen és mtsai. által javasolt mechanizmus alapján [53] az aurát(III)ionok redukciója a His oxidációja révén savas közegben valósulhat meg preferáltabban, ahol gyök kationos polimerizáció révén His oligomerek kialakulása igazolható a mintákban, mely generálja a klaszterek képződését. A javasolt mechanizmust a **1. egyenlet** foglalja össze. Az **1. egyenletben** a His egy amin általános képletével (NR₃) van jelölve és a folyamat a gyök kation képződést mutatja.



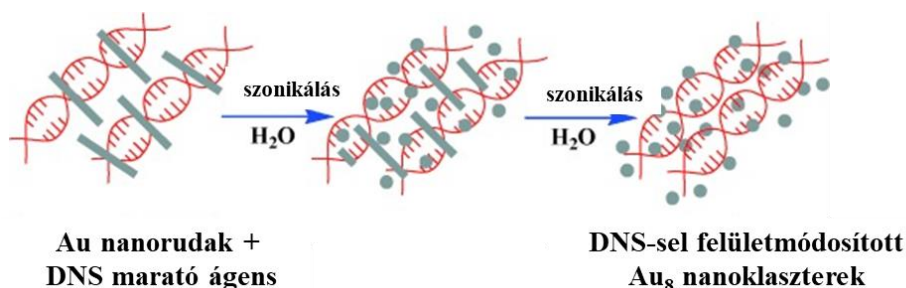
A Tyr esetében, az elérhető 1 – 2 közlemény alapján, nincs szükség nagy ligandum feleslegre (fémion:Tyr/1:2), de szobahőmérsékleten a Tyr kölcsönhatása az [AuCl₄]⁻ ionokkal nem eredményezi Tyr-nal redukált Au NCs képződését; c_{aurát(III)} = 0,07 mM kiindulási fémion koncentráció alkalmazása mellett a közel 100 °C beállítása elengedhetetlen [55], de nagyobb koncentrációknál (c_{aurát(III)} = 2,50 mM) a reakció 37 °C-on már kivitelezhető [56]. A Pro esetében, amely nem tartalmaz aromás csoportot az oldalláncban, az extrém nagy ligandum felesleg (több mint 100-szoros) és forralás alkalmazása eredményezi a néhány atomos, kéken emittáló NCs képződését [57]. A Trp vonatkozásában F. Gan és csoportja 100 °C beállítása mellett tudott Trp-nal redukált Au NCs-et előállítani az aurát(III)ionok mennyiségéhez közel háromszoros ligandum felesleg alkalmazása mellett [58], ahol a NCs-et a Fe(III)ionok szelektív detektálására alkalmazták. A Met és Cys aminosavak esetében, amelyek oldalláncában tiol- és tioéter donorcsoportok találhatóak, a jellegzetes PL emissziós sávok nagyobb hullámhosszon detektálhatók (λ_{em} = 520 – 630 nm). A Met esetében Au⁰ manggal rendelkező Au NCs képződését igazolták 37 °C-on [59], de a Cys és az [AuCl₄]⁻ kölcsönhatása (egyéb redukálószer felhasználása nélkül) nem eredményez klasztereket; a reakció az alkil- és ariltiolok alkalmazása mellett előállítható rendszerekkel mutat hasonlóságot. Bóta Attila és mtsai. egy Au(I)-tartalmú koordinációs polimer (CP) struktúra jelenlétét azonosították pH = 3,0 beállítása mellett, melyet a **8. ábra** mutat [60]. Ezen nanohibrid rendszer egy periodikusan ismétlődő, (-S-Au(I)-S-Au(I)-S-)_n általános képlettel leírható, lamellás (többrétegű)

szerkezettel rendelkeznek, ahol röntgenszórásos mérés technikával a rétegek közötti térnek 1,3 nm távolságot határoztak meg [60]. Az alkil- és ariltiolokkal redukált Au nanoszerkezetek hatalmas irodalommal rendelkeznek [51], de mivel jelen értekezésben kiemelten a *N*-donorokkal rendelkező kismolekulák alkalmazhatóságát vizsgáltuk nemzetközi szinten is új területként, így erre hosszasan nem térünk ki ez Irodalmi áttekintésben. A templátos eljárás



mellett a fémionok redukciójának elősegítésére egyéb külső besugárzást is alkalmazhatunk (pl.: mikrohullám, ultrahang, UV-fény), melynek eredményeképpen további lehetőségek nyílnak a klaszterek költséghatékony és környezetbarát előállítására [61–63]. A *bottom-up* eljárások mellett a *top-down*, ún. maratásos (*etching*) folyamat is kiválóan alkalmas nemesfém NCs előállítására; a legtöbb közlemény tiol-tartalmú ligandumok és *N*-donoratomot tartalmazó vegyületek (pl.: aminosavak, oligopeptidek (pl. GSH)) felhasználása mellett mutatja be a NCs képződési lehetőségeit a lényegesen nagyobb Au NPs-ből kiindulva [64]. H. Chen és mtsai. tanulmányozták Au NPs-ből történő NCs

képződési folyamatot His-t, GSH-t és DNS-t alkalmazva, mint marató ágensek [65]. Az általuk feltételezett mechanizmus szerint, melynek sematikus ábráját – a DNS alkalmazása esetén – a **9. ábra** szemlélteti, megállapították, hogy elsőként az amino- vagy tiolcsoportok (a ligandum anyagi minőségétől függően)⁸ kötődnek az Au felülethez lezorítva pl. az elektrosztatikus stabilitást biztosító O-donoratommal rendelkező citrát molekulákat. Ennek eredményeképpen a részecskék felületi Au atomjainak első rétege szonikálással gyengíthető. Második lépésben a „meggyengített” arany atomok erős hajlamot mutatnak arra, hogy új konfigurációjú „termékké” rendeződjenek át, amelyek már képesek ellenállni a további folyamatos szonikáció és a nitrogén- vagy tiol-tartalmú ligandumok maratásból származó külső hatásoknak. Harmadik lépésben az Au NCs a nanokristályok felületéről a diszperziós közegbe kerülnek és a felületen kötött, marató ágensként alkalmazott, ligandumok jelenléte biztosítja a megfelelő stabilitást.

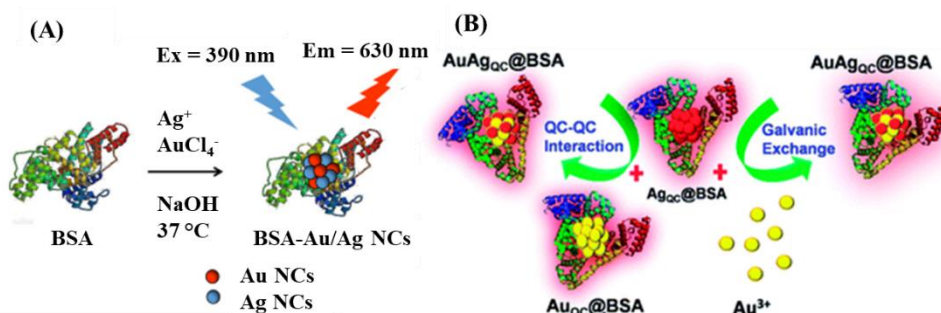


9. ábra: DNS-sel felületmódosított Au NCs sematikus képződési mechanizmusa Au nanorudak DNS-sel történő maratásos (*etching*) reakciója során [65].

⁸ A His vagy DNS esetén a *N*-donorok, míg a GSH esetén a tiolcsoport kötődése a preferált.

A mechanizmus két folyamatot foglal magában, (i) az arany nanokristályok maradását és (ii) az aranyatomok új klaszterekké történő átrendeződését. A két lépés ismételtén végbe mehet, amíg a teljes eredeti arany nanokristályok maradásával és átrendeződésével új, stabil Au₈ klaszterek alakulnak ki. Az ún. maratásos folyamat egy másik elfogadott értelmezése során a tiol-tartalmú ligandum(ok) elektront ad(nak) át az Au részecskéknek, mely egy elektromos feszültséget hozhat létre a nagyobb atomszámú részecskékben. Ennek hatására instabillá válik szerkezetük. E feszültség enyhítése érdekében a nagyobb atomszámú részecskék méretcsökkentésen mennek keresztül a fellépő Coulomb-erőhatás révén [64]. Jelen értekezés keretein belül kizárólag a templátos eljárással (*bottom-up*) foglalkoztunk, így egyéb folyamatok bemutatására nem térek ki az értekezés terjedelmi korlátai miatt.

Ahogy a NPs esetén is kivitelezhető, a NCs vonatkozásában is előállíthatóak kétfémes NCs, döntően a fémionok szimultán redukciója révén, de ezen kétfémes NCs megjelenése a 2010-es évekre nyúlik csak vissza, tehát egészen új területnek számít. Találhatunk több-kevesebb közleményt Au/Pt [66], Au/Cu [67], Au/Mo [68], Au/Cd [69] kétfémes NCs előállításának megvalósítására, de talán az Au/Ag [70–73] rendszerekre érhető el a legtöbb publikáció. Ezen munkákban a fémionok együttes redukciója révén állítanak elő NCs-et szérum fehérjék felhasználásával [71,72]. A **10. ábra (A)** K. Huang és mtsai. által szintetizált Au/Ag NCs szintézis protokollját mutatja BSA felhasználása mellett 37 °C-on [71]. Kétfémes NCs előállítása úgy is megvalósítható, hogy egyfémű BSA-nal stabilizált Au és Ag NCs megfelelő mennyiségeit elegyítik és néhány órán át kevertetik a diszperziót [73]. Egy másik lehetséges módot is publikáltak, mely során előre szintetizált Ag NCs diszperziójához különböző mennyiségű aurát(III)ionokat adnak, és 8 órán keresztül a mintákat kevertették (**10. ábra (B)**). A felületen kialakuló lokális galváncella következtében az Ag(I)-ionok oldatba mennek, míg helyüket a klaszter magban az Au atomok foglalják el.

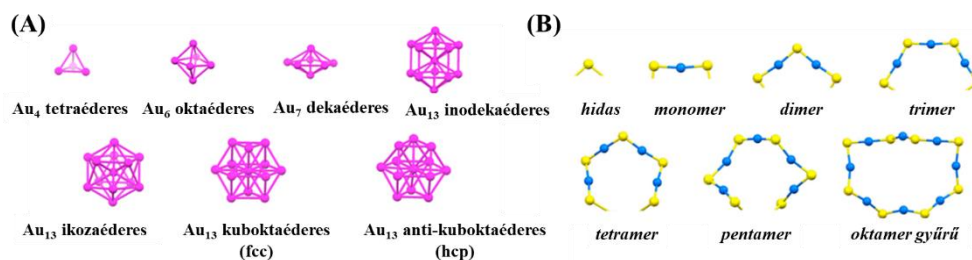


10. ábra: BSA-nal stabilizált Au/Ag kétfémes NCs lehetséges előállítási protokolljai (**A:** fémek együttes redukció BSA jelenlétében lúgos közegben [71], **B:** egyfémű Au és Ag NCs diszperzióinak elegyítése (balra) vagy aurát(III)ionok beépítése az előzetesen előállított Ag NCs szerkezetébe [73] (jobbra)).

2.3.2. Szerkezeti és optikai jellemzésük

Mára a nemesfém NCs általánosan elfogadott definíciója olyan nanoszerkezeteket takar, amelyek átlagos átmérője nem haladja meg a $d \sim 2$ nm-t, és optikai tulajdonságuk teljes mértékben eltér a klasszikus nemesfém kolloidok sajátosságaitól. Ennek megfelelően a LSPR sáv nem detektálható az abszorbancia spektrum látható tartományában, így ezek a diszperziók nem színesek. **Szerkezetüket**, ezáltal méretüket tekintve az Au NCs néhánytól néhány tíz db

arany atomból épülnek fel, így tulajdonságaik alapján átmenetet képeznek a molekulák és a NPs között, ahogyan azt az **1. ábra** is szemléltette. Tiol-tartalmú ligandumokkal stabilizált Au NCs esetén a lehetségesen megvalósuló alap szerkezeteket a **11. ábra** foglalja össze [74]. A lapcentrált köbös rácsszerkezettől (fcc) indulóan, a tércentrált (bcc) és a hexagonális (hcp) szerkezetig számos példát találhatunk az irodalomban, de az ikozaéderez vagy a dekaéderez struktúra is kialakulhat. Az alap vázszerkezetek kombinálására (egymásba épülése) révén nagyobb atomszámú klaszterek képződése is preferált.

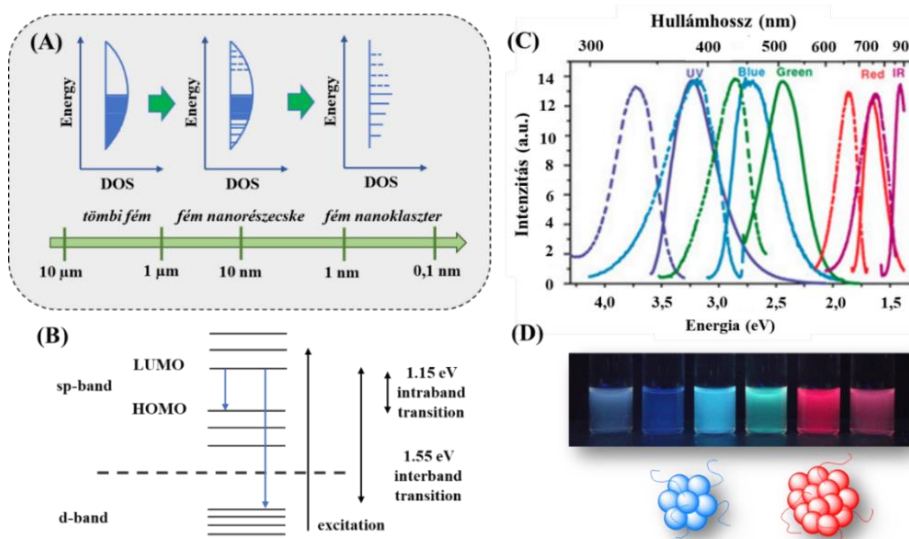


11. ábra: Au_x(SR)_y összetételű Au NCs néhány lehetséges vázszerkezete (A) és a klaszterekben lévő Au⁰/Au⁺ és a S-donoratomok lehetséges kötémódjai (B) (Au = kék, S = sárga) [74].

A NCs kellően kevés számú atomból épülnek fel, így a plazmonikus tulajdonság helyett a PL lesz a meghatározó **optikai sajátosság**. Az Au-tartalmú NCs PL-ájának eredete sokáig vitatott kérdés volt az irodalomban, de talán mára ez a kérdés már részben tisztázott [75]. Az Au NCs karakterisztikus fluoreszcenciájának alapja az egyik értelmezés szerint az ún. „*pure metal confinement effect*”⁹, mely úgy értelmezhető, hogy ha a NCs mérete elegendően kicsi (d ~0,5 – 1,0 nm), és összemérhetővé válik az arany atom elektronjainak Fermi-energiaszintjéből számolható hullámhosszal (< 1 nm), akkor a folytonos vezetési sáv(ok) diszkrét energiaszintekre hasad(nak) fel és így a NCs inkább mutatnak molekuláris viselkedést, mintsem plazmonikus tulajdonságot (**12. ábra (A)**). Ebben az esetben a PL jól leírható az ún. szabad elektron (*Jellium*-) modell segítségével is, amely alapján az emisszió alapvetően az *sp-sp* és *sp-d* átmenetektől származtatható (**12. ábra (B)**) [75,76]. A másik értelmezés az ún. „*charge transfer*” (töltésátviteli folyamat) a fém klaszterek felületén kötődő (bio)ligandumok és a fémmag közötti kölcsönhatás (e⁻-átmenet) következtében, ami lehet ún. *ligand-to-metal charge transfer* (LMCT, ligandum-fém töltéstranszfer) ill. *ligand-to-metal-metal charge transfer* (LMMCT, ligandum-fém-fém töltéstranszfer). Mára ezt a kétféle értelmezést együtt kezelik, hiszen mindkettőnek meghatározó hozzájárulása van a karakterisztikus fluoreszcenciához. Mindkét értelmezés arra utal, hogy a fém NCs sávon belüli (*sp-sp*, *intra-band*) és sávok közötti (*sp-d* *inter-band*) átmenetei valószínűleg egy köztes állapotot (vagy sötét állapot) jelentenek, amely meghatározza az elektrontranszportot. A PL-át számos egyéb tényező is befolyásolja, úgy, mint a klasztert alkotó atomok száma, az elektronban gazdag donorcsoportok (S, N, P) jelenléte a fémmag felületén, a fém oxidációs állapota (Au⁰, Au⁺), de az oldószer, a pH és a hőmérséklet is [75]. Számos publikáció igazolja, hogy a néhány atomot tartalmazó klaszterek (pl.: Au₃-Au₈) esetén intenzív kék emisszió

⁹ Konzekvensen elfogadott magyar megfelelő nem nagyon található a magyar nyelvű szakirodalomban.

($\lambda_{em} = 450 - 480$ nm) figyelhető meg, míg, ha a klasztert már több atom alkotja (pl. 10 – 13 db) akkor az emisszió a zöld hullámhossz tartományban ($\lambda_{em} = 490 - 510$) jelentkezik.



12. ábra: A tömbi fém, a fém nanorészecske ill. a fém nanoklaszter energiaszintjeinek sematikus megjelenítése (A)¹⁰ és az sp-sp és sp-d átmenetek szemléltetése (B). Eltérő fluoreszcens sajátsággal rendelkező Au NCs gerjesztési (szaggatott vonal) és emissziós spektrumai (C) és néhány Au NCs vizes diszperziójának UV-lámpa alatti fotója (D) ill. kék és vörös emisszióval rendelkező Au klasztereket felépítő Au atomok számának reprezentatív jelölésével [75].

Ahogy a **12. ábra (C)** is mutatja, növelve a klasztert alkotó atomok számát (> 25 db) vörös emisszióval rendelkező NCs is előállíthatóak [77,78]. Néhány eltérő méretű Au NCs-et tartalmazó vizes diszperzió UV-lámpa alatti fotóját a **12. ábra (D)** reprezentálja, ahol a fotó alatt egy kéken és egy vörösen emittáló Au NCs sematikus ábrája is látható szemléltetve egy klasztert felépítő Au atomok számát. A klaszterekben az Au atomok oxidációs száma általában 0, de gyakorta a +1-es állapot is igazolható a fémmag felületén, ami sok esetben elősegíti a PL intenzitás növekedését. Fontos azonban megjegyezni, hogy a fémmag elektropozitivitásának növelése, azaz a fémek nagyobb töltésállapota (0 helyett +1) is elősegítheti a felületi ligandumok és a fémmag között kialakuló kölcsönhatásokat, ami nem zárhatja ki teljesen a ligandum összetétel szerepét a PL emisszió hangolásában. A PL élettartam vonatkozásában általános megállapítások nem tehetőek, de az Au NCs esetén kijelenthető, hogy a néhány atomos NCs nanoszekundumos átlagos élettartalommal rendelkeznek, míg a nagyobb, vörös emisszióval rendelkező NCs mikroszekundumos élettartama a jellemző érték, mely átlagos élettartam értékek több komponensre bonthatóak a fentebb említett LCMT és LCMMT átmenetek alapján. Az élettartalom mellett a kvantumhatásfok (QY(%)) is meghatározó paraméter; Au NCs vonatkozásában a 8 – 10 % már kiemelkedő értéknek számít. Az optikai tulajdonságok vonatkozásában még egy főbb jelenséget érdemes megemlíteni, ami az aggregáció-indukált emisszió (AIE) jelensége (**13. ábra**) [67]. Számos fém nanoklaszter

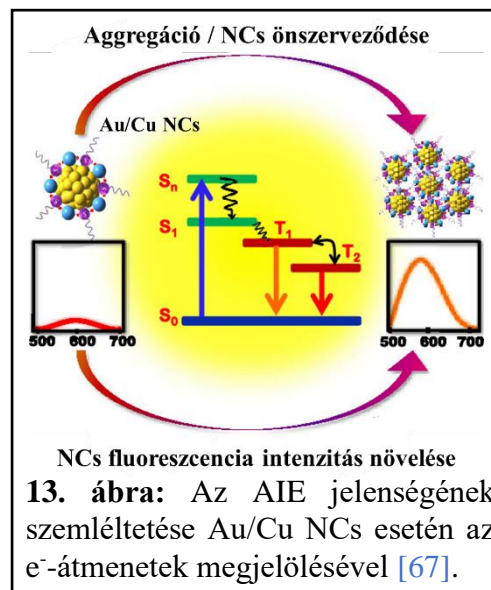
¹⁰ DOS = density of state (állapotsűrűség)

csak alacsony intenzitású PL tulajdonsággal rendelkezik, vagy ezen jellegzetes sajátság alacsony hőmérsékleten vagy speciális oldószerben figyelhető csak meg, ami korlátozza alkalmazásukat. Az AIE jelensége [79] kiváló lehetőség ezen klaszterek PL tulajdonságának fokozására, de néhány esetben kioltás is előfordulhat ezen NCs együttesek aggregációja miatt. A jelenséget kiválthatja a pH, a hőmérséklet vagy az oldószer változása, vagy egy reagens hozzáadása [67] (pl.: biomolekula, ion vagy kolloid részecske). Ezen jelenség általában (bio)szenzorikai alkalmazásoknál figyelhető meg.

2.3.3. Felhasználási területek

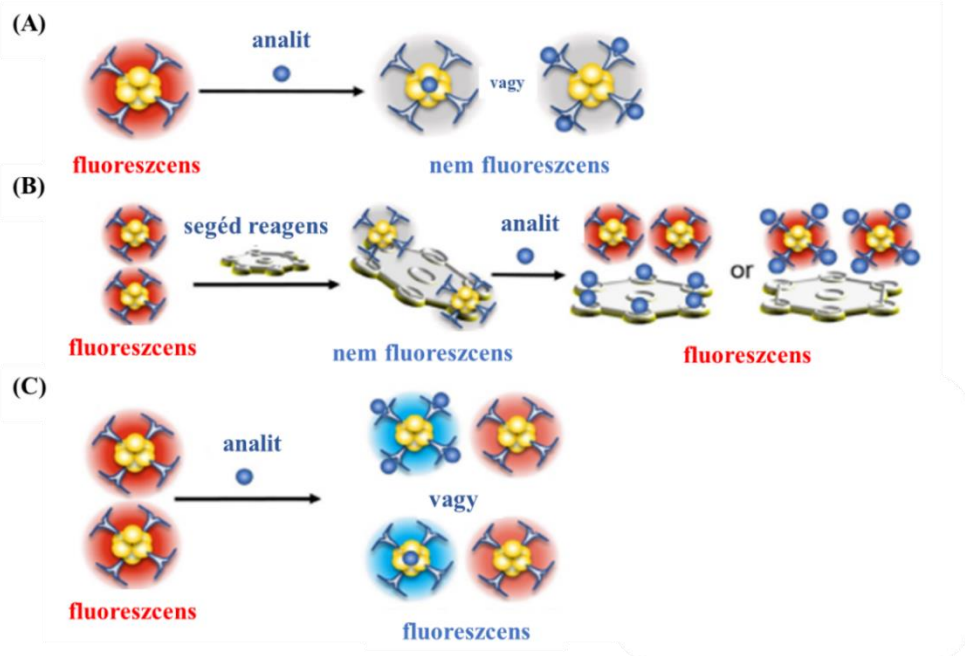
Egyedülálló fizikai-kémiai és szerkezeti tulajdonságaik miatt, mint pl.: ultrakicsi méretük, könnyű funkcionálizálhatóságuk, kiemelkedő biokompatibilitásuk és kiváló fotostabilitásuk, a nemesfém NCs egyre fontosabb szerepet játszanak a biokatalízis [80,81] területén és orvosi biológiai alkalmazásokban. Utóbbi esetében ilyen pl.: a fluoreszcens képalkotás [82], ill. jelölés [83,84], valamint a diagnosztika [85], terápia (gén-, immun-, fotodinamikus- és rákterápia területeken) [85], és hatóanyag szállítás [86], de talán az egyik leginkább kutatott terület potenciális felhasználásuk szenzorikai alkalmazásokban [82,87]. Értekezésemben főként a szenzorikai területet érintem, így ezen alkalmazás főbb aspektusait foglalom össze.

Ahhoz, hogy egy fém nanoklaszter optikai érzékelőként kiválóan működjék, legalább három fontos kritériumnak kell megfelelnie: nagy érzékenység, szelektivitás és gyors válasz. A szelektivitást egyrészt a fémmag különböző ligandumokkal történő célzott felületi módosítása(i) biztosítják. Másrészt kiemelten fontos, hogy az optikai jel megváltoztatása egyszerűen detektálható legyen. A fém NCs szenzorikai alkalmazhatósága azon alapszik, hogy rendkívül érzékenyek a külső kémiai környezet megváltozására, ezáltal karakterisztikus PL tulajdonságuk is változik: jellegzetes fluoreszcenciájuk vagy kioltódik (*PL quenching*), vagy erősödik (*PL enhancement*) vagy akár szisztematikusan eltolódik a detektálandó analittal való közvetlen vagy közvetett kölcsönhatás eredményeképpen, ahogyan azt a **14. ábra** is szemlélteti [87]. A kioltáson alapuló szenzorikai folyamatok esetén a kioltás vagy sztatikus [88], vagy dinamikus [89] folyamatként értelmezhető, de a kettő mechanizmus kombinációja is gyakorta előfordul. Sztatikus kioltás során a fluorofór (fém NCs) és a kioltó (analit) között még alapállapotban, a gerjesztés előtt jön létre egy ún. nem fluoreszkáló (sötét) komplex. Ebben az esetben a kiértékeléshez gyakorta alkalmazott Stern-Volmer egyenletből¹¹ meghatározható K_{SV} ezen sötét komplex képződési folyamatára jellemző asszociációs



¹¹ A Stern-Volmer egyenlet $I_0/I = 1 + K_{SV}[Q]$ széles körben elterjedt a fluoreszcencia-kioltási folyamatok értelmezésére, melynek háttérben sztatikus vagy dinamikus kioltás állhat (I_0 és I a mért PL intenzitás a kioltó jelenléte nélkül és jelenlétében, K_{SV} a Stern-Volmer állandó, $[Q]$ a kioltó egyensúlyi koncentrációja). Ha nem minden fluorofór férhető hozzá a kioltó számára (pl. egy részük szterikusan gátolt helyzetben van), a sztatikus kioltás kiértékeléséhez a módosított Stern-Volmer egyenlet használatos $I_0/I = 1/f_a + 1/f_a K_a * [Q]^{-1}$ (ahol f_a a kioltó által hozzáférhető helyzetben lévő fluorofór mennyisége, K_a pedig az asszociációs állandó).

állandóként (K_a) is kezelhető. A sztatikus kioltásra jellemző továbbá, hogy a fluorofór élettartama a kioltó jelenlétében sem változik meg jelentősen, hiszen a komplexképződés által a gerjesztett állapotban lévő részecskék száma csökken. Mindezek felül a hőmérséklet csökkenésével a K_{SV} értéke növekvő tendenciát mutat, hiszen a hőmérséklet emelése kedvez a kialakuló sötét komplex disszociációjának.



14. ábra: A nemesfém NCs lehetséges működésének alapesetei szenzorikai alkalmazásokban [87] ((A) kioltáson alapuló folyamat, (B) egy segéd reagens hatására a NCs fluoreszcenciája kioltódik, de az analit hatására újra fluoreszcenssé válik, (C) a PL jelleg eltolódik).

A másik előforduló kioltás a dinamikus vagy ütközéses kioltás. Ezen mechanizmus esetén a kioltó közel kerül a gerjesztett fluorofórhoz, majd a két reaktáns ütközése révén a fluorofór elveszíti többletenergiáját. A dinamikus kioltást tehát a fluorofór hozzáférhetősége mellett a reaktánsok diffúziója is korlátozza. A tisztán sztatikus kioltással ellentétben a dinamikus kioltási folyamatoknál a fluorofór fluoreszcencia élettartama (τ) megváltozik a kioltó jelenlétében, hiszen ebben az esetben nem a fluoreszcens részecskék száma, hanem a gerjesztett állapotban töltött idő csökken le az ütközések révén. A dinamikus kioltás jellemzője tehát a fluoreszcencia élettartam csökkenésén túl, a K_{SV} értékének növekedése a hőmérséklettel, hiszen a nagyobb hőmérséklet által a reaktánsok nagyobb kinetikus energiával fognak rendelkezni, melynek hatására megnő a hatáson ütközések száma is. A PL kioltás mellett a NCs szenzorikai alkalmazása olyan módon is megvalósulhat, hogy az analittal való kölcsönhatás eredményeképpen karakterisztikus fluoreszcenciájuk erősítést szenved. Y. Wu és mtsai. marha szérum albuminnal (BSA) stabilizált Au_{16} NCs-et ($\lambda_{em} = 604$ nm) szintetizáltak és tanulmányozták Ag(I)-ionokkal való kölcsönhatását, ahol igazolták, hogy a fémion hozzáadására a karakterisztikus PL $\lambda_{em} = 604$ nm-ről $\lambda_{em} = 567$ nm-re tolódik és a PL intenzitás közel háromszorosára nő [90]. A folyamat mechanizmusaként igazolták, hogy az erősítés és az eltolódás azért következik be, mert az Ag(I)-ionok, XPS mérésekkel igazoltan, beépülnek a NCs magba. A szenzorikai lehetőségek széles skálája közül kiemelkedik a

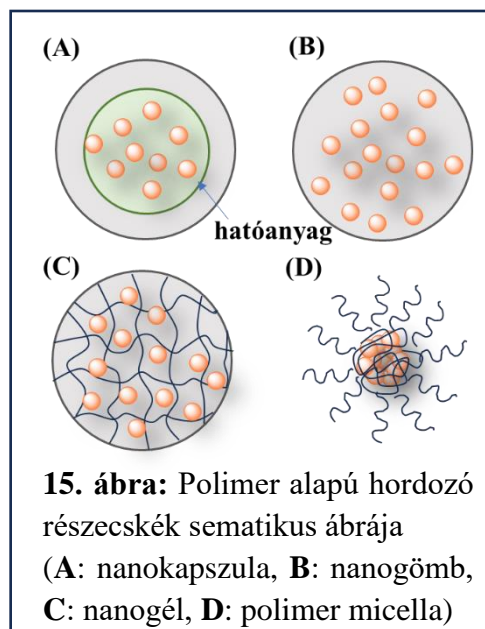
nehézfémionok, szerves anionok (pl. CN^-), kis (pl.: glükóz, tripszin, aminosavak, H_2O_2 , dopamin, szerotonin) és nagy (pl. fehérjék) biomolekulák vagy nukleinsavak szelektív kimutatására irányuló kutatási munkák száma, melyek közül közel 100 meghatározó közlemény főbb eredményeit egy könyvfejezetben foglaltam össze 2023-ban [91].

2.4. Fehérje-, poliszacharid-, és polimer-alapú kolloid részecskék

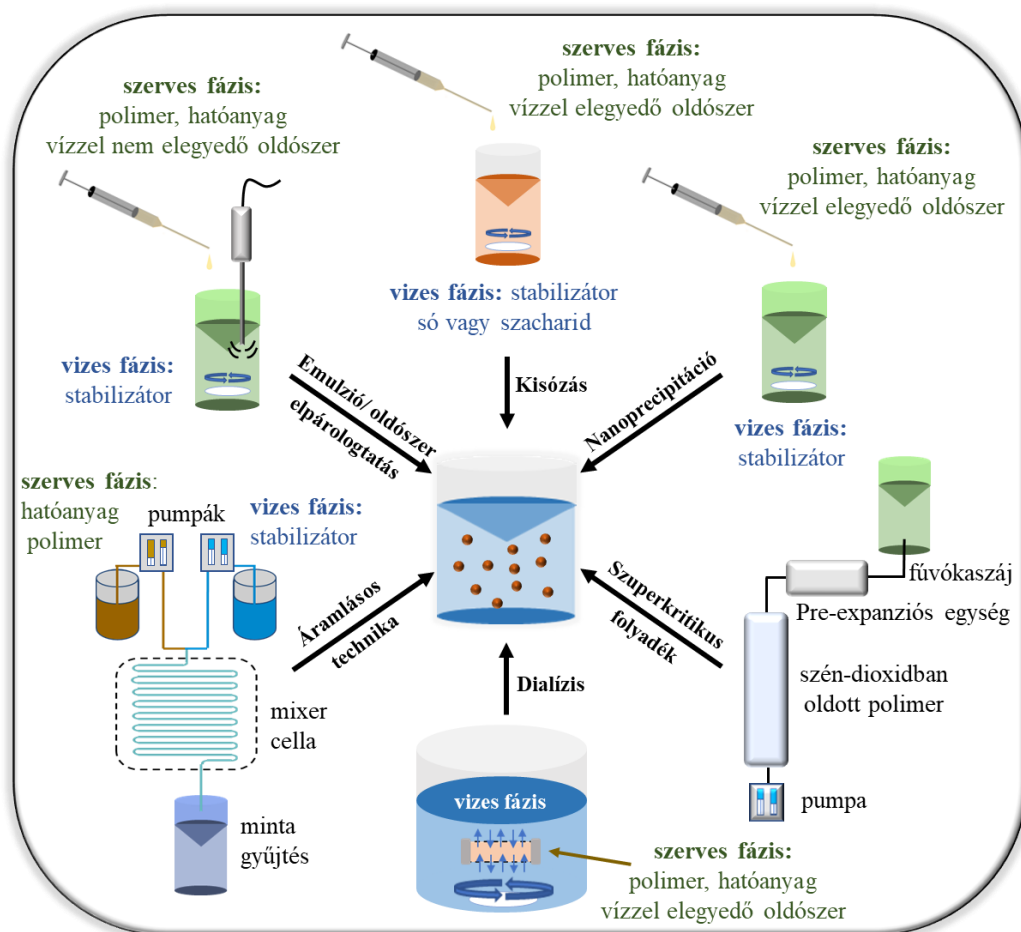
A doktori értekezés 2.2 és 2.3 fejezeteiben bemutatott egy- és kétfémes arany-tartalmú NPs és NCs mellett a doktori munka kisebb részét képezte az említett szerves ill. hibrid nanoszerkezetek vizsgálatán túl tisztán szerves-alapú, makromolekulás kolloidok és fehérjék alkotta új összetételű (preferáltan mag-héj szerkezettel rendelkező) (bio)kolloid részecskék kialakíthatósága és tanulmányozása, mint potenciális gyógyszerhatóanyag leadó rendszerek. Kolloidális gyógyszerhatóanyag hordozó és leadó rendszerek fejlesztése egy dinamikus növekvő kutatási terület [92–94], hiszen alkalmazásukkal meghosszabbíthatjuk vagy akár növelhetjük bizonyos gyógyszermolekulák hatékonyságát, továbbá lehetőség nyílik olyan terápiás vegyületek, vagy akár vitaminok szervezetbe vitelére is, amelyek célzott helyre juttatását jelentősen nehezítik a célmolekula specifikus tulajdonságai (pl.: korlátozott oldhatóság, instabilitás (pl.: hőmérséklet vagy fényérzékenység) stb.) A következő alfejezetben a doktori munka során felhasznált polimerek, poliszacharidok és/vagy fehérjék alkotta komplex biokolloid részecskék kialakítási és felhasználási lehetőségeinek főbb aspektusait kívánom bemutatni röviden.

2.4.1. Polimer-alapú kolloidális részecskék általános előállítási lehetőségei

A polimerek végtelen nagy csoportján tekintve, biokompatibilitásuk és könnyű kezelhetőségük következtében, kiemelt funkció jut az ún. biopolimereknek (pl: polikaprolakton (PCL) [95], poli(tejsav) (PLA) [96], poli(laktid-ko-glikolid) (PLGA)[97]) és poliszacharidoknak (pl: hialuronsav (HyA) [98], kitozán (Chit) [99]) főként orvosbiológiai és gyógyszerészeti területeken. Alkalmazásuk egyik meghatározó feltétele, hogy a szervezetbe jutásuk után – a formulázott hatóanyag felszabadulását követően – olyan degradációs folyamat menjen végbe, hogy a keletkező monomer végterméke(ke)t a humán szervezetben lejátszódó anyagcsere folyamatok le tudják bontani [92–94]. A polimer-alapú hordozóknál a hatóanyag egyaránt elhelyezkedhet a részecskék felületén, a részecskékben homogén mértékben eloszlva vagy egy központi magban csoportosulva. Ennek függvényében a részecskék szerkezete alapján megkülönböztethetünk nanokapszulákat, nano-gömböket vagy polimer micellákat, melyek sematikus ábráit a **15. ábra** mutatja [92–94]. Míg nanokapszulák esetén a hatóanyag a magban található és azt egy polimer héj borítja (**15. ábra (A)**), addig a nanogömbök vonatkozásában



a hatóanyag a polimer (**15. ábra (B)**) vagy a nanogél mátrixban (**15. ábra (C)**) homogénean oszlik el. Ezeknek a struktúráknak a kialakulását a részecskék előállításához használt módszerek kísérleti paramétereivel szabályozni lehet. Makromolekuláris kolloidokból felépülő NPs/kolloid részecskék előállítására a szakirodalomban már számos technikát olvashatunk [100]. A módszerek csoportosítása szerint a részecskéket előállíthatjuk monomeregységekből főként polimerizációval, ill. kereskedelmi forgalomban kapható, előre szintetizált kész (ko)polimerekből kiindulva. Ha a (ko)polimerek már rendelkezésre állnak akkor a leggyakrabban alkalmazott eljárásokat a **16. ábra** foglalja össze, melyek: (i) emulziós/oldószer elpárolgatásos, (ii) nanoprecipitációs,¹² (iii) az ún. gélesedési, (iv) „kiszósás”, (v) dialízis és (vi) a szuperkritikus technikák [100].

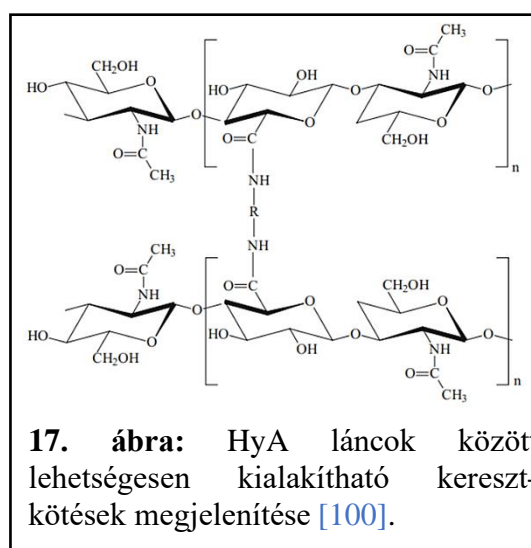


16. ábra: Polimer-alapú hordozó rendszerek főbb előállítási lehetőségei makromolekulákból.

Kutatómunkánk középpontjában, kizárólag a polimerek esetén, a nanoprecipitációs technika állt, így – a dolgozat terjedelmi korlátai miatt is – csak ezen eljárás főbb jellemzőit foglalom össze. Az eljárást H. Fessi és mtsai. alkalmazták elsőként nem-szteroid gyulladáscsökkentő indometacin-tartalmú PLA nanokapszulák előállításához [100]. A nanoprecipitáció során, melyet oldószer kiszorításos eljárásnak is nevezhetünk, a vizsgálni kívánt *hidrofób karakterű polimert* és a hatóanyagot, amennyiben az hidrofób sajátsággal

¹² A „nanoprecipitáció” kifejezést az angol nyelvű szakirodalom alapján használom jelen értekezésben, melyet oldószer kiszorításos eljárásnak is nevezhetünk.

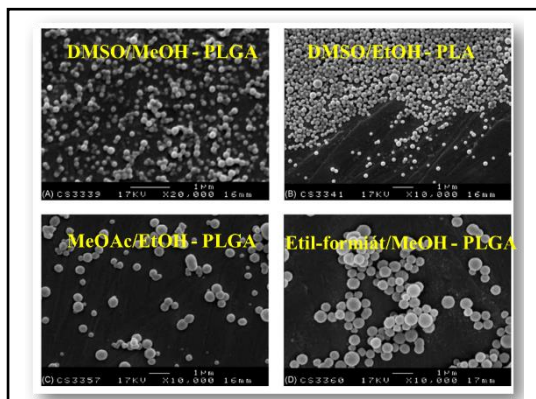
rendelkezik, egy vízzel jól elegyedő szerves oldószerben oldják fel és az így kapott oldatot egy stabilizátort is tartalmazó vizes közegbe csepegtetik adott sebességgel. A szerves oldószer elpárolgásával párhuzamosan a polimer kicsapódik a vizes közegből, ami kolloid mérettartományú vagy szub-mikrométeres részecskék képződését is eredményezheti. A polimer-alapú kolloid részecskék kialakulása az oldószer cseréjekor a vizes és szerves fázis felületén kialakuló határfelületi turbulenciához köthető, mely alapján az adott folyamatokat az ún. Marangoni effektus szabályozza. A vizes fázishoz adagolt polimer-tartalmú szerves fázisról nanoméretű cseppek szakadnak le, amiket a stabilizátor funkcióját betöltő felületaktív anyag stabilizál, míg a szerves fázis gyors diffúziója és a polimer oldatból történő kicsapódása bekövetkezik. Gyakorta használnak acetont, etanolt, dioxánt, dimetil-szulfoxidot stb., mint szerves oldószert, mivel korlátlanul elegyednek vízzel. Ha a hatóanyag inkább hidrofíl karakterű akkor azt a vizes fázis tartalmazza a stabilizátorral együtt. Ezen módszer egyik hátránya, hogy döntően hidrofób sajátosságú polimer (nano)részecskék előállítására alkalmazható, így a *hidrofíl karakterű polimereknél* egyéb technikák alkalmazása javasolt. A hidrofíl tulajdonságú poliszacharidokból (pl. az értekezésben is tanulmányozott HyA) elsőrendű vagy gyengébb másodrendű kölcsönhatásokon alapuló ún. gélesítési módszerekkel lehet komplex hordozó részecskéket létrehozni [101]. A kémiai térhálósításon alapuló gélesítési eljárásoknál a poliszacharid láncok között kovalens kötással keresztkötő ágenseket (pl. diaminokkal történő keresztkötések kialakítása [102,103]) hoznak létre (17. ábra). A kialakuló keresztkötött poliszacharid gombolyagokból megfelelő kezdeti paraméterek mellett (nano)részecskék állíthatók elő. A módszer hátránya, hogy a szintéziskor használt keresztkötő reagensek toxikusak lehetnek, így a részecskéket felhasználásuk előtt alaposan meg kell tisztítani. A gélesedési eljárás mellett, pl. a poliszacharid láncok polielektrolittal történő komplexképződésnél nincs szükség reagensre a reverzibilis kölcsönhatások kialakításához [104]. Ebben az esetben a felhasznált poliszacharidot a töltésének megfelelően semleges vagy enyhén savas közegben oldják, majd ezen oldatot egy ellentétes töltésű komponenst (pl.: felületaktív anyagot, ellentétes töltésű polimert/polielektrolitot) tartalmazó oldatba csepegtetik. A töltés kompenzálása során kialakuló polielektrolit komplex (PEC) rendszerek NPs formájában kicsapódnak az oldatokból. Az ellentétes töltéssel rendelkező polimer/poliszacharid láncok önszerveződése lehet intramolekuláris vagy intermolekuláris jellegű. Az intramolekulárisan önszerveződő molekulák gyakran összetett polimerek, amelyek képesek véletlenszerű random konformációból (ún. *random coil*) jól meghatározott másodlagos és harmadlagos szerkezetekké összeállni. A *protein folding* (fehérjék hajtogatása) az intramolekuláris önszerveződés egyik példája.



2.4.2. A tanulmányozott kopolimerek, poliszacharidok és fehérjék szerkezeti és funkcionális jellemzése

Kutatómunkánk középpontjában a PLA, PLGA polimerek, valamint a HyA és Chit poliszacharidok és a szérum fehérjék (marha szérum (BSA) és humán szérum (HSA) albumin) álltak, így ezen fejezetben az említett makromolekulák rövid jellemzését és lehetséges alkalmazásukat, mint gyógyszerhatóanyag szállító kolloidális részecskék foglalom össze. A **PLA** egy olyan kiemelkedő biokompatibilitással rendelkező alifás poliészter, melynek monomeregysége a tejsav (2-hidroxi-propionsav) [96]. Az elmúlt néhány évtizedben az élelmiszer-csomagolás technikától a nanomedicináig szinte minden területen alkalmazásba került biodegradálható és komposztálható tulajdonságának köszönhetően Elsőként T.-J. Pelouze szintetizált PLA polimert a tejsav polikondenzációs reakciójával, majd 1932-ben W. H. Carothers fejlesztette ki a PLA előállítását laktidből (tejsav ciklikus dimerje) polimerizációs folyamat révén, mely eljárást 1954-ben a DuPont amerikai vállalat szabadalmaztatta [105]. A PLA makromolekula egyik fontos előnye, hogy biokompatibilitása, degradációs sajátsága és főként hidrophil karaktere nagyban szabályozható legyen az kopolimerizációs (polikondenzációs) reakcióval, azeotróp dehidratációs eljárással, vagy éppen gyűrűfelnitások polimerizációs (ROP) eljárással előállítva. A PLA kopolimerjei közül a legelterjedtebb a glikolsav mellett szintetizált poli(tejsav-ko-glikolsav, **PLGA**) [97]. A láncban lévő tejsav - glikolsav arányának változtatásával (a glikolsav mennyiségét növelve) a kopolimer hidrophilitása és degradációs sebessége is jelentősen növelhető, mely kiemelten fontos tulajdonság kolloidális hordozó részecskéként történő funkciójának ellátásához. Ilyen módon a hordozó részecske tulajdonságait hangolni lehet a formulázandó hatóanyag oldhatóságához ill. annak felszabadulása is kontrollálható. Hidrolízise során tejsav és glikolsav monomeregységek képződnek, ami metabolikus úton a Krebs-ciklus révén bomlanak. Ennek köszönhetően a PLGA kopolimerek elhanyagolható toxicitást mutatnak, így hatóanyag hordozó rendszerként való felhasználásukban meghatározó potenciál rejlik. Számos közlemény olvasható a szakirodalomban PLGA-alapú hordozó részecskék kialakítására és jellemzésére vonatkozóan eltérő aspektusok alapján [106–108]. A **16. ábra** által bemutatott eljárások közül szinte mindegyikre találhatunk példát, de ezek közül csak néhányat emelek ki. Huang és mtsai. [109] nanoprecipitációs módszerrel előállított PLGA részecskék méret szabályozhatóságát tanulmányozták és igazolták, hogy a megfelelő szerves fázis kiválasztásával, a polimer koncentráció és a vizes fázis ionerősségének csökkentésével, ill. a hőmérséklet növelésével az előállított részecskék mérete lényegesen csökkenthető [109]. U. Bilati és munkatársai [110] megállapították, hogy főként hidrophil vegyületek formulázására alkalmazható nanoprecipitációs technikánál a vizes/szerves fázis arányának és a polimerek koncentrációjának domináns hatása van a képződő részecskék méretére, mérteloszlására (kb. ~ 85 – 560 nm tartományban). A részecskék kicsapására használt közeg tulajdonságainak vizsgálata során igazolták, hogy metanol < etanol < propanol sorrendben a Poloxamer-407 stabilizátorral stabilizált részecskék átmérője folyamatosan nő ~ 100 – 400 nm tartományban, ahogyan azt a **18. ábra** is szemlélteti [110]. A hatóanyag kapszulázását, a fent említett paraméterek mellett, a gyógyszerészarmazékok és a polimerek hidrophilitása is befolyásolja. J. M. Baricello és mtsai. munkájuk során – hidrophil és hidrophób hatóanyagok kapszulázhatóságát vizsgálva – rámutattak arra, hogy a nanoprecipitációs módszerrel előállított, átlagosan

160 - 170 nm átmérőjű részecskéknél a kevésbé vízdékony hatóanyagok formulázása eredményesebb $M_w = 10000$ Da molekulatömegű PLGA75 (laktid:glikolid arány 75:25) kopolimer esetén, stabilizátorként Pluronic F68-at használva [111].



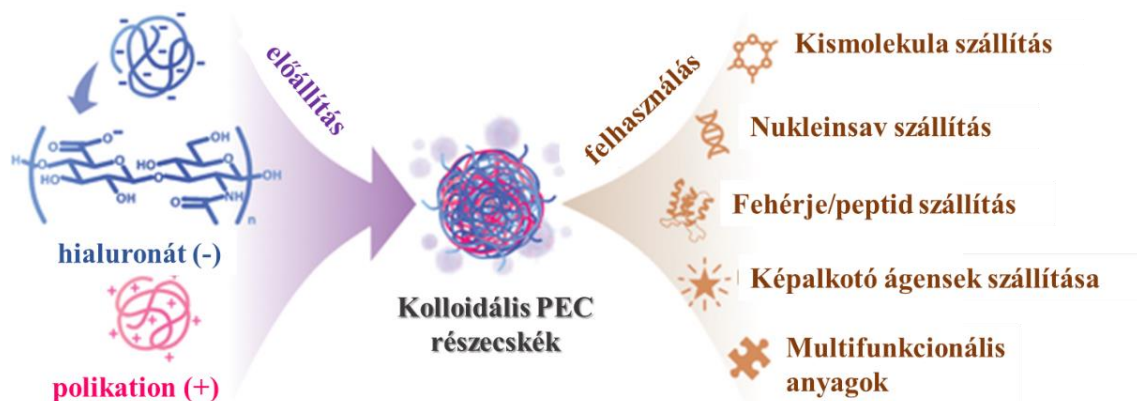
18. ábra: Bilati és csoportja által előállított PLA/PLGA részecskék reprezentatív pásztázó elektronmikroszkópos képei eltérő oldószer-kicsapószer párok használatánál [110].

A példaként bemutatott publikációk főbb eredményeit összegezve megállapítható, hogy a kísérleti körülmények alkalmas megválasztása nagyban szabályozza a részecskék méretét, szerkezetét és stabilitását, de hatóanyagként a formulázási tulajdonságokat is (kapszulázási hatékonyság (EE%), hatóanyag tartalom (DL%)). Az oldószerek kémiai minősége, a csepegtetés sebessége, a hőmérséklet, a stabilizátor főbb szerkezeti tulajdonságai stb. mind-mind olyan körülmény, melyek együttes hatásának vizsgálatára egy konkrét hatóanyag vagy hatóanyag család kapszulázási lehetőségeinek a feltérképezésénél figyelni kell. Ezekre átfogó közlemények alig olvashatóak. Ennek köszönhető, hogy a rendszerek karakterizálásával

kapcsolatos kutatások kiemelkedő fontosságúak, mely munkánk középpontjában is állt.

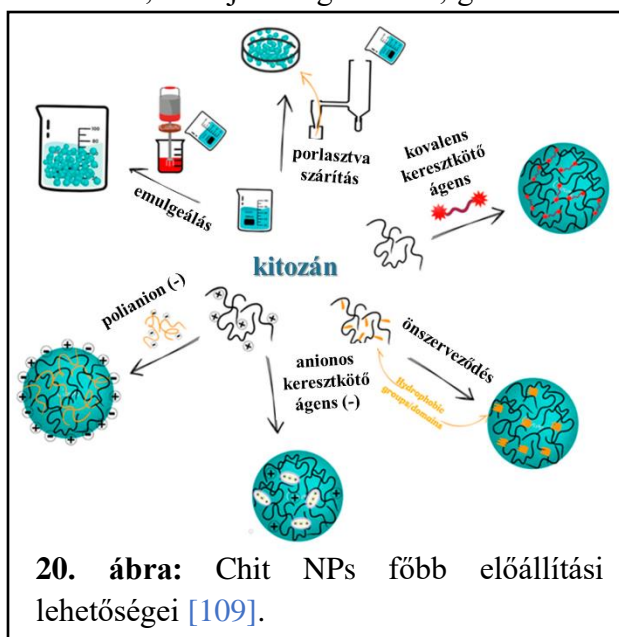
Az említett kopolimerek mellett értekezésem egy meghatározó részében poliszacharid-alapú formulációk kialakítási lehetőségeinek a vizsgálatával is foglalkoztunk. A hialuronsav (HyA) egy β -(1 \rightarrow 4) kapcsolt *D*-glükuronsav és β -(1 \rightarrow 3) kapcsolt *N*-acetyl-*D*-glükózamin egységekből felépülő mukopoliszacharid [98,112], az extracelluláris mátrix egyik fő összetevője, mely az emlősök kötőszöveteiben és ízületi folyadékaiban is megtalálható hialuronát só formájában. Elsőként K. Meyer és J. Palmer izolálta marhák szem üvegtestében. Kiváló biokompatibilitásának és viszkozitási tulajdonságainak köszönhetően orvosi biológiai alkalmazásokban (pl.: hatóanyagszállítás, szemészet) és kozmetikában is egyaránt alkalmazzák [98]. Kiemelkedő vízdékonysággal rendelkezik, mely a polimerlánc tengelyétől ekvatoriálisan elhelyezkedő hidroxil-, karboxil- és acetamidocsoportok jelenlétének köszönhető, s melynek eredményeként így hidrogénkötések kialakítására képes. A HyA monomeregységében megtalálható karboxilcsoport alacsony proton disszociációs állandóval (pK_s) ($pK_s \sim 2,9$) [113] rendelkezik, így fiziológiás körülmények között negatív töltést hordoz. Ennek eredményeképpen pozitív töltést hordozó komponensekkel (pl.: polielektrolit(ok) (19. ábra), kationos felületaktív anyagok stb.) elektrosztatikus kölcsönhatások kialakítására képes, mely hatóanyag hordozóként betöltött szerepét tovább erősíti [114]. Ezen negatív töltése révén elektrosztatikusan kötött héj szerkezet kialakítására is képes a hordozóként alkalmazni kívánt részecskék felületén [114]. A HyA részecskék előállítására a korábban már említett kovalens keresztkötésen vagy gyengébb elektrosztatikus kölcsönhatásokon alapuló gélesítési technikák is felhasználhatóak. Keresztkötött HyA származékok (pl. adipinsav-dihidraziddal módosított és poli(etilén-glikol)-lal keresztkötött HyA, α,β -poli(aszpartil-hidrazid)-dal keresztkötött HyA) közül a gyakran alkalmazzák a karbodiimides technikát, ahol a polimer láncon lévő karboxilcsoportokat diaminos

keresztkötő ágenssel kapcsolják össze kovalens kötések kialakítva, melyet korábban a **17. ábra** is bemutatott [102,103]. A módszer során stabil részecskék előállítása is lehetséges. M. Bodnár és munkatársai diaminos keresztkötési technikával keresztkötött HyA (továbbiakban cl-HyA) NPs-et állítottak elő. A vizsgálataik során 4350 kDa molekulatömegű poliszacharid 70 °C -on degradált 980 kDa (3 óra), 660 kDa (6 óra) és 350 kDa (9 óra) molekulatömegű fragmenseivel dolgoztak. A 25-, 50- és 100 %-os térhálósítás mellett előállított NPs jelentős polidiszperzitást mutattak; $d = 50 - 110$ nm és $d = 210 - 500$ nm hidrodinamikai átmérőket sikerült kialakítaniuk [102,103].



19. ábra: Hialuronát-alapú polielektrolit komplex (PEC) részecskék sematikus szerkezete és néhány lehetséges alkalmazásuk, mint hatóanyag szállító kolloidális részecskék [114].

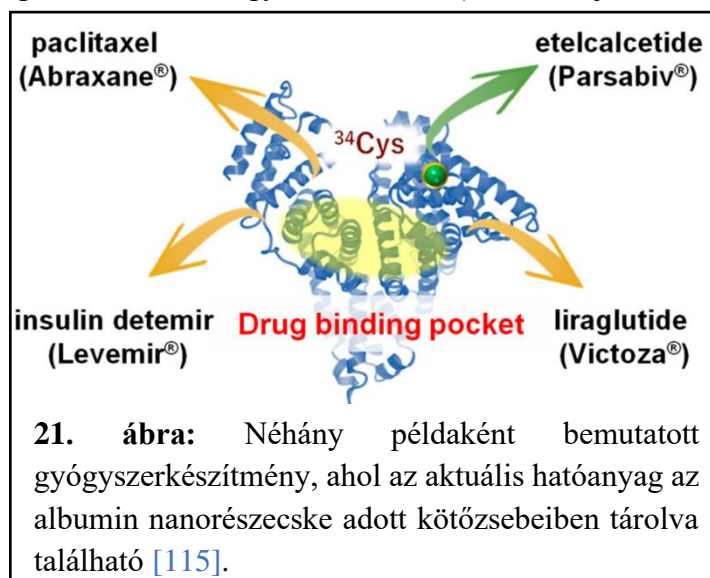
A HyA mellett a **kitozánt** (Chit) is olyan biopolimerként tartják számon, amely számos gyógyszerészeti és orvosbiológiai alkalmazással rendelkezik [99]. Számos biológiai aktivitást mutat, mint pl.: gombaellenes, antioxidáns, daganatellenes és sebgyógyító tulajdonságok. Biokompatibilitása, biológiai lebonthatósága, nem-toxikus jellege és mukoadhezív karaktere kiváló alapanyaggá teszi biopolimer-alapú szabályozott gyógyszerleadó rendszerek fejlesztésére, de alkalmas implantátumok kialakítására, fehérjék megkötésére, génszállításra és sebgyógyításra is [115]. Alacsony oldhatósága és gyenge mechanikai tulajdonságai miatt viszont közvetlenül nem alkalmazható hatóanyag hordozó részecskék kialakítására; szerkezeti módosítások révén viszont igen. Néhány lehetséges előállítási technikát Chit-alapú hordozó részecskékre a **20. ábra** foglal össze [116]. Szerkezetét tekintve a Chit egy olyan lineáris poliszacharid, mely alap monomerje β -(1→4) D-glükózamin (deacetilezett monomer) és váltakozva N-acetil-D-glükózamin (acetilezett monomer) egységeket is tartalmaz. A láncban található protonált



20. ábra: Chit NPs főbb előállítási lehetőségei [109].

aminocsoportnak (ammóniumcsoport) köszönhetően ($pK_s = 6,17 - 6,51$) $pH < 5,0$ alatt pozitív töltéssel rendelkezik, így enyhén savas közegben ($pH = 4 - 4,5$ (acetát puffer)) kiválóan alkalmas a pl. HyA-val PEC-szerű részecskék kialakítására. A Chit-tartalmú PEC részecskék kialakulásuk folyamatában – a töltésemlegesítés miatt – hajlamosak aggregálódni, ezért az aggregáció elkerülése és a NPs sikeres előállítása érdekében legalább két feltételnek teljesülni kell: a polielektrolit oldatokat hígítani kell, és az egyik poliionnak megfelelő feleslegben kell lennie, hogy a töltésarány $(n_+/n_-) \neq 1$ feleljen meg.

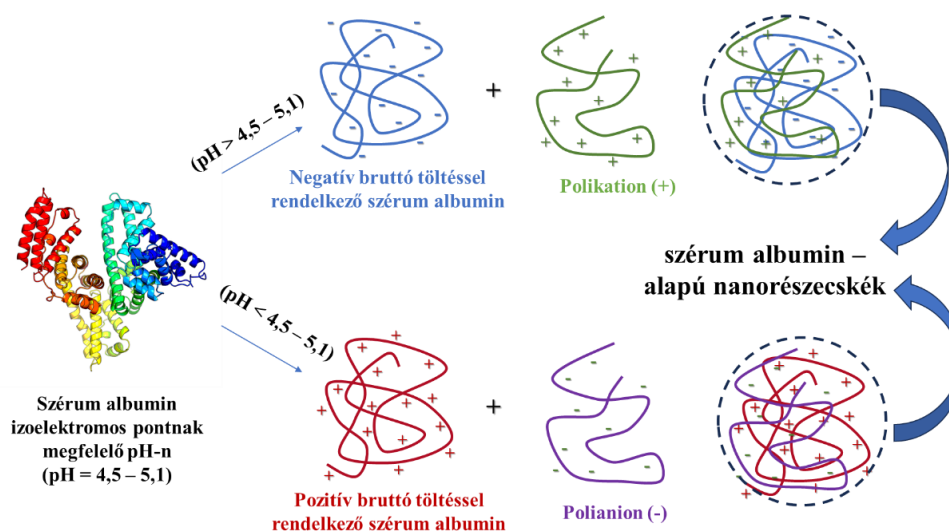
A poliszacharidok mellett a szérumból kialakítható biokolloidok is alkalmasak gyógyszerhordozó funkció betöltésére. Az albumin, mint hordozófehérje a különböző betegségek – elsősorban rákos megbetegedések, a reumás ízületi gyulladás, a cukorbetegség, valamint a hepatitis – kezelésében, bizonyította potenciálját [117,118]. Az Abraxane® egy szérumból albumin-alapú nanorészecske (SANP)-tartalmú gyógyszerkészítmény, amely csak 2012-ben több mint 600 millió dolláros forgalmat bonyolított le, és 2013-ban 52 %-os forgalomnövekedést ért el a piacon [119]. Az Abraxane®-t a szakértők a közeljövőben többféle ráktípus kezelésében kiemelt készítménynek tartják [120,121]. Jól ismert, hogy az albumin a szervezetben számos fontos szerepet tölt be: a zsírsavak és számos endogén molekula (többek között vitaminok (C, D), folsav és szteroid hormonok) és ásványi anyagok (pl.: réz, cink vagy kalcium stb.) hordozójaként működik és számos exogén vegyület



transzport fehérjeje is. Az albumin fontos szerepet játszik továbbá a vér pH értékének stabilizálásában, és egyedül felelős a plazma ozmotikus nyomásának több mint 80 %-áért. Előnyös tulajdonságai közé tartozik a különböző ligandumok számára kialakított kötőhelyei (Sudlow-helyek), mely révén eltérő, mind hidrofil, mind hidrofób gyógyszerhatóanyagok formulálására kiválóan alkalmas, melyet sematikusan a **21. ábra** mutat néhány gyógyszerkészítmény

esetén (az említett kötőhelyek az ábrán nincsenek feltüntetve) [122]. Az albuminok nagy családján belül a szérumból albuminok mutatnak nagy potenciált funkcionális SANPs kialakítására [123]. Alapvetően kétféle megközelítés létezik az albumin hatóanyag-hordozó rendszerek előállítására: (i) a gyógyszer-molekulák kémiai kapcsolása egyetlen albumin molekulához albumin-gyógyszer konjugátumok kialakítása révén ill. (ii) a gyógyszerek kapszulázása több albuminból kialakított nanorészecskében [116], ahol a hatóanyag a fehérje adott kötőhelyeihez kapcsolódik vagy a fehérje részecskén felületén adszorbeálódva található meg [123]. Az utóbbi vonatkozásában, mely kutatómunkánk alapját is képezte, számos eljárás ismeretes, mint a fehérjék önszerveződése [124], emulgeálás [125], gélesítésen alapuló, porlasztva szárítás ill. az ún. deszolvációs (kicsapásos) [126] eljárások. Kutatócsoportunk korábban BSA-alapú NPs-et állított elő deszolvációs/kicsapásos eljárással, mely révén

neuroaktív hatással rendelkező kinurénsav vér-agy-gáton való transzportját sikerült megvalósítani, ugyanis a nevezett vegyület önmagában – hordozó nélkül – nem képes a központi idegrendszer szöveti terét a vértől elválasztó védőgáton átjutni. A kifejlesztett, kb. 100 nm-es átlagos átmérővel rendelkező BSA-alapú formuláció [126] elfogadott magyar (HU1500356) és nemzetközi szabadalommal (US10857236B2) is rendelkezik. A BSA és a HSA szérum fehérjék is alkalmasak PEC-szerű komplex hordozó részecskék kialakítására, attól függően, hogy milyen pH-n szeretnénk a komplex részecskék létrehozását. Izoelektromos pontjuk alatt döntően pozitív, míg izoelektromos pontjuk felett negatív felületi töltéssel rendelkeznek, így előbbi esetben polikationnal (pl. Chit), míg utóbbi esetben polianionnal (pl. HyA) elektrosztatikus kölcsönhatás és hidrofób kölcsönhatások révén komplex részecskék alakíthatóak ki (**22. ábra**) [116]. Munkánk középpontjában is ezen **22. ábra** alapján feltüntetett folyamat tanulmányozása állt új fehérje-tartalmú részecskék előállítására vonatkozóan. Olyan új összetételek kialakítását kívántuk elvégezni, melyekre az irodalomban nem találunk utalást ill. részletes fizikai-kémiai és kolloidkémiai jellemzés sem állt rendelkezésre. A poliszacharid-fehérje konjugátumok új dimenziót képviselhetnek a hatóanyagleadó rendszerek tervezésében. Ezen konjugátumok alkalmazása révén a részecskék kolloid stabilitása, biokompatibilitása növelhető, ill. a formulázott gyógyszerek toxicitása is csökkenthető. Ezen sajátságok jellemzésére találhatunk publikációkat pl.: BSA/Chit [127], ovalbumin/Chit [128], protamin/HyA [129] vagy LYZ/alginát [130] nanohordozók esetében.

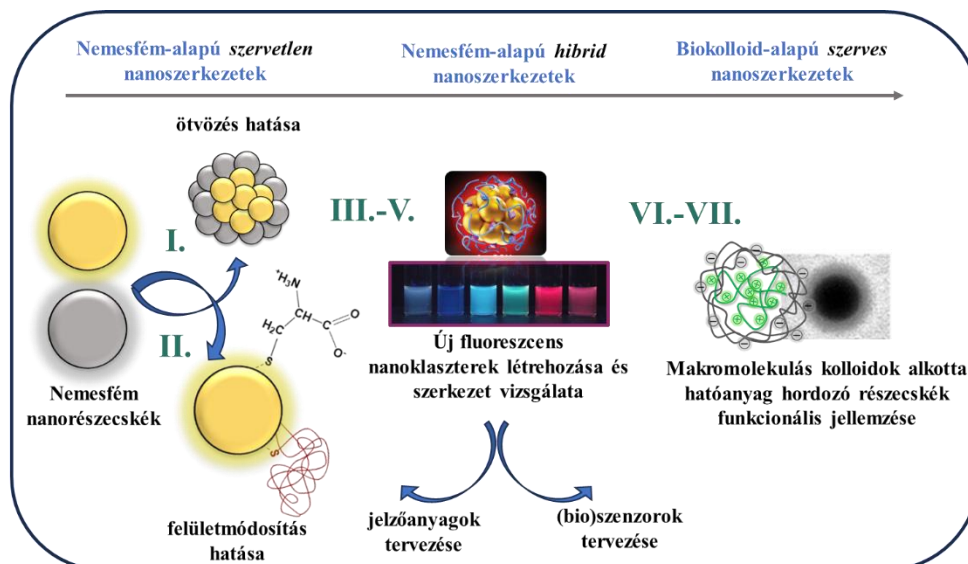


22. ábra: SANPs önszerveződésel történő előállítási lehetőségei a fehérje oldat pH értékétől függően [116]. Az ábrán szereplő fehérje struktúra csak szemléltetés céllal van feltüntetve.

A poliszacharid-fehérje nanokonjugátumokat általában elektrosztatikus komplexképzéssel vagy gyakorta kémiai konjugációval állítják elő [127–130]. A kémiai konjugációs eljárás során keresztkötő anyagokat használnak, mint pl.: glutaraldehyd vagy tripolifoszfát, de ezen komponenseket nehéz eltávolítani a tisztítási folyamat során. Egyes esetekben a Maillard-reakciót is alkalmazzák, de a reakció hosszan tartó hevítést igényel (60 °C; legalább 3 óra keresztül), ami kifejezetten kedvezőtlen a hőérzékeny gyógyszerek számára. Mindezek alapján nagy szükség van hatékony, hangolható méretű poliszacharid-fehérje nanokonjugátumok fejlesztésére, ahol a hosszú távú melegítés és a nehezen eltávolítható térhálósítószer és felületaktív anyagok felhasználása nem történik meg.

3. Célkitűzések

Disszertációm célkitűzéseit nagyban meghatározta, hogy 2009-ben, a Prof. Dr. Szántó Ferenc által alapított, majd később Prof. Dr. Dékány Imre által vezetett, rangos kolloidkémiai kutatócsoportban kezdhettem el kezdő posztdoktori kutatómunkám. A klasszikus egyfém nemesfém kolloidok után a többalkotós NPs kerültek a nemzetközi kutatások fényébe, így ennek megfelelően válogattam és rendszereztem eredményeimet. Disszertációm első részében a ma is korszerűnek számító többfémű szervetlen NPs előállítását mutatom be. A kémiai szintézis mellett kiemelt szempontként kezelem a sokrétű fiziko-kémiai jellemzések ismeretét, ugyanis ezek összehangolása vezetett sok preparálási, stabilizálási és egyéb fizikai tulajdonság felismeréséhez. Vizsgálataink során kerestem a választ, hogy az egyes preparálási technikák kísérleti körülményeinek szisztematikus változtatása milyen hatással van a képződő nanoszerkezetek (legyen az nemesfém nanorészecske, nemesfém nanoklaszter vagy éppen biokolloid részecske) sajátosságaira. Nevezetesen azok struktúrájára, méretére, méreteloszlására és szerkezetfüggő egyedi optikai (plazmonikus vagy fluoreszcens) tulajdonságára, valamint funkciójára, függetlenül attól, hogy katalizátor részecskéről, optikai (bio)szenzorról, fluoreszcens jelzőanyagról vagy szabályozott hatóanyag leadó kolloid részecskéről legyen szó. A szisztematikus vizsgálatok vezettek ahhoz a felismeréshez, hogy a „hibrid” nanoszerkezetek, ill. a szerves-alapú, makromolekulás kolloidok alkotta rendszerek az alkalmazás szempontjából milyen előnyökhöz vezetnek. Ezen felül, magának az előállítás módjának környezetvédelmi szempontjai követelik meg az ún. „zöldkémiai” úton történő előállítási protokollok kidolgozását. Az I. – VII. pontba foglalt eredményekkel kapcsolatos célkitűzéseket szemantikusan a **23. ábra** foglalja össze.



23. ábra: Az értekezés főbb célkitűzéseinek grafikus összefoglalása az eredmények bemutatásának sorrendjében (I. – VII.).

Az értekezésem eredményeit bemutató első fejezet az elektrokatalizátor részecskékként funkcionáló szervetlen-alapú, Au-tartalmú kétfémű NPs preparálási protokolljainak a bemutatására összpontosít (I.), mint alap kiindulási terület. Ezen fejlesztés

során azt kívántuk megválaszolni, hogy az Au más, eddig még nem vizsgált, fémekkel (p mező elemei közül az Sn és Pb) történő ötvözése révén milyen struktúrák (ötvözet, mag-héj szerkezet, „intermetallikus” fázis, stb.) alakíthatók ki és hogy ezen nanoszerkezetek létrehozása hogyan szabályozható a szintézishez kidolgozott eljárások kísérleti körülményeinek (pl.: fémionok koncentrációra, fémion(ok)/redukálószer moláris aránya, hőmérséklet, oldószer típusa, pH stb.) szisztematikus változtatásával (*P1-P4 közlemények*). Au/Ag kétfémes NPs esetében egy olyan előállítási protokoll kidolgozását kívántuk megvalósítani, ahol a szintézis kísérleti körülményeinek változtatása révén mind a részecskeméret, mind a részecskék felületi elemösszetétele kontrollálható. A kidolgozott szintézisek révén előállított NPs részletes szerkezetvizsgálata is kiemelt cél volt, hiszen a nanoszerkezet pontos ismerete nélkül a katalitikus tulajdonság nehezen értelmezhető. Az egyfémű Au és Ag kolloidok Cys aminosavval történő szelektív felületmódosítása során – monomolekuláris felületi réteget kialakítva – feltérképezni kívántuk, hogy a felületmódosítás hatására bekövetkező szerkezeti változások milyen hatást gyakorolnak az egyes rendszerek optikai tulajdonságára (**II.**), ill., hogy ezen felületmódosított nemesfém kolloidok milyen kolloid stabilitással rendelkeznek változó kémhatású vizes közegben. (*P5-P8 közlemények*).

Az értekezés második részében, a hazai viszonylatban egyedi területnek számító, fluoreszcens NCs előállíthatóságának a feltérképezésére és azok szerkezetfüggő optikai tulajdonságaik meghatározására irányult. Itt azt kívántuk kideríteni, hogy a szakirodalomban ismeretes szérum fehérjék és nagyobb makromolekulák (polimerek, polielektrolitok stb.) felhasználásával megvalósítható ún. templátos eljárással előállíthatóak-e egy- és kétfémes nemesfém nanoklaszterek, amennyiben, más típusú fehérjéket (pl.: immunfehérje, antimikrobiális fehérje stb.) alkalmazunk (**III.**) (*P9-P14 közlemények*). Ezen túl értelmezni kívántuk, hogy milyen rendszerek állíthatók elő, ha a makromolekulákat kismolekulákra (pl.: aminosavakra (**IV.**) (*P8, P15-P17 közlemények*) vagy egyéb aminosav származékokra, ill. *N*-donor csoportban gazdag nukleotidokra (**V.**) (*P18-P20 közlemények*) cseréljük. Az aminosavak vonatkozásában fel kívántuk deríteni, hogy az egyes oldalláncok jelenléte (aromás-*N*, alifás-*N*, *N*-donor atomot nem tartalmazó) milyen hatást gyakorol a klaszterképződés hatékonyságára. A fluoreszcens sajátssággal rendelkező nanoklaszter rendszereken szerzett ismeretek hasznosítására szenzorikai célú vizsgálatokat terveztünk.

Disszertációmban harmadik területként gyógyszerészeti felhasználást szem előtt tartva, szerves-alapú kolloid rendszerek, mint potenciális gyógyszerhatóanyag szállító és szabályozott hatóanyag leadó részecskék, kialakíthatósági lehetőségeinek a feltérképezése is céljaink között szerepelt. Makromolekulás kolloidok ((ko)polimerek, poliszacharidok) és szérum fehérjék alkotta új komplex részecskék előállításán keresztül célunk volt feltérképezni, hogy a kopolimerek hidrofilitásának szisztematikus változtatása hogyan hat eltérő oldhatóságú és stabilitású vegyületek formulázhatóságára, a hatóanyag leadás folyamatára és a képződő részecskék szerkezetére, méretére, méreteloszlására és stabilitására (**VI.**) (*P21-P24 közlemények*). Mindezek mellett, a HyA-alapú rendszereknél (**VII.**) feltárni kívántuk, hogy a HyA szerkezeti módosításai (pl. keresztkötések kialakítása) ill. felületaktív anyagokkal és egyéb poliszacharidokkal, valamint szérum fehérjékkel kialakított új összetételű komplex kolloidjai milyen előnyös tulajdonságokkal rendelkeznek hatóanyag szállító kolloid részecskéként történő felhasználásuk esetén (*P25-P30 közlemények*).

4. Kísérleti rész

4.1. A tanulmányozott nanoszerkezetű rendszerek előállítási körülményei

4.1.1. Szférikus morfológiájú Au és Ag kolloidok előállítása

Az **Au NPs** vizes közegű előállításához a széleskörben ismert Turkevich által kidolgozott eljárást használtuk [9,10]. A felhasználás céljától függően a $[\text{AuCl}_4]^-$ -ionok ($\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$; 99,9 %; *Sigma*), koncentrációja $c = 0,2 - 0,9$ mM között, míg az $[\text{AuCl}_4]^-$:citrát ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 98 %; *Molar*) molarány 1:1 – 1:6 tartományban változott. Az Au szolokat 20,0 – 50,0 cm^3 térfogatokban állítottuk elő. A citráttal stabilizált **Ag NPs** előállítása esetén 10,0 cm^3 AgNO_3 (AgNO_3 ; 99,9 %, *Reanal*) oldathoz ($c = 0,40$ mM) 0,5 cm^3 citrát oldatot ($c = 40$ mM) elegyítettünk Ag^+ :citrát /1:5 molarány beállítás mellett, majd a térfogatot Milli-Q vízzel 19,2 cm^3 -re egészítettük ki. Kevertetés mellett 0,8 cm^3 ($c = 5 \times 10^{-2}$ M) frissen készített Na-borohidridet (NaBH_4 ; 98 %; *Sigma*) csepegtettünk az oldathoz szobahőmérsékleten. A kész diszperzióban az Ag koncentrációja $c = 0,20$ mM volt.

4.1.2. Szférikus morfológiájú, Au-tartalmú kétfémes kolloidok előállítása

Az **Au/Ag ötvözet NPs** előállítása során 10,0 cm^3 $[\text{AuCl}_4]^-$ -ionok ($n_{\text{aurát(III)}} = 2 \times 10^{-3}$ mmol) vizes oldatát forraltuk fel citrát (1×10^{-2} mmol) jelenlétében. Ezzel párhuzamosan 10,0 cm^3 Ag^+ -ionok ($n_{\text{Ag}^+} = 2 \times 10^{-3}$ mmol) vizes oldatát is felforraltuk citrát (1×10^{-2} mmol) mellett. Amikor az oldatok elérték a forráspontot azonos térfogat részeket ($1 - 5$ cm^3) cseréltünk a forrásban lévő mintákból. A térfogatok cseréje után további 20 – 30 percet még forraltuk a mintákat, majd hagytuk azokat szobahőmérsékletre visszahűlni. Az **Au_{mag}-Ag_{héj} NPs** esetén az előzetesen előállított citráttal stabilizált Au NPs ($c_{\text{Au}} = 0,9$ mM; $[\text{AuCl}_4]^-$:citrát/1:4) vizes diszperziójából 2,5 cm^3 -t 8,0 cm^3 -re hígítottunk Milli-Q vízzel, majd az oldatot felforraltuk miközben további 1,0 cm^3 citrát oldatot ($c = 100$ mM) is hozzáadtunk a reakcióelegyhez intenzív kevertetés mellett. Utolsó lépésben 2,0 cm^3 5,0 mM koncentrációjú AgNO_3 oldatot csepegtettünk a mintához és további 10 percig forraltuk az elegyet, mely biztosította az Ag^+ -ionok redukcióját az Au részecskék felületén, majd hagytuk a kész diszperziót szobahőmérsékletre visszahűlni. Az eltérő összetételű, mag-héj szerkezetű **Au_{mag}-Sn_{héj} NPs** szintézise esetén előzetes előállított ($c_{\text{Au}} = 0,25$ mM; $[\text{AuCl}_4]^-$:citrát/1:6) Au NPs-et tartalmazó vizes diszperzió 100,0 cm^3 -es mennyiségéhez 5,0 cm^3 $\text{SnCl}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ oldatot ($c = 5$ mM) ($\text{SnCl}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$; 98 %; *Honeywell/Fluka*) and 0,1 g PVP polimert (*PVP*, $M_w = 40000$, *Fluka*) adtunk, majd a diszperziót 20 percig kevertettük. További lépésként 10,0 cm^3 , 0,26 M koncentrációjú, frissen készített NaBH_4 oldatot csepegtettünk a reakcióelegyhez szobahőmérsékleten az Sn^{4+} -ionok redukciójának megvalósítása érdekében, melynek hatására a korábban vörös színű Au szol sötétbarnára változott. 30 percig még kevertettük a rendszert a Na-borohidrid teljes elbomlásának biztosítása végett, majd centrifugáltuk (10000 rpm, 15 perc), Milli-Q vízzel és etanollal 3-szor mostuk a részecskéket. Eltérő Au/Sn összetételek beállításához a hozzáadott $\text{SnCl}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ mennyiségét változtattuk szisztematikusan.

Változatos összetételű **Au/Pb NPs (Au NPs-kel dekorált Pb részecskék)** előállítási folyamata során első lépésben ($\text{Au}_{50}\text{Pb}_{50}$ összetétel esetén), 0,05 g $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ -ot ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$; $\geq 99,0$ %,

Sigma) oldottunk 30 cm³, 0,25 mM koncentrációjú vizes PVP oldatban. Az oldatot N₂ atmoszféra alatt 20 percig kevertettük egy gömblombikban. Második lépésben 20 cm³, 50 mM koncentrációjú, frissen készített NaBH₄ oldatot csepegtettünk az elegyhez 0,2 cm³/perc sebességgel és további 1 óráig még kevertettük a mintát. Ekkor a rendszerben Pb NPs képződtek. Következő lépésben 6 cm³, 100 mM koncentrációjú aszkorbinsav oldatot (C₆H₈O₆; ≥ 99 %; *Sigma*) adtunk az elegyhez, amit aztán 50 °C-ra melegítettünk. Végül 30 cm³, 5,0 mM HAuCl₄ oldatot injektáltunk a mintához 0,2 cm³/perc adagolási sebesség mellett. A mintát további 30 percet még kevertettük, majd hagytuk szobahőmérsékletre visszahűlni. A rendszerben jelenlévő aszkorbinsav felel a fémionok redukációjáért ([AuCl₄]⁻:aszkorbinsav/1:4), ahol az apró Au „magok” az Pb NPs felületén alakulnak ki. A végterméket centrifugálással (10000 rpm, 20 perc) gyűjtöttük össze, amit etanol/víz eleggyel mostunk, és N₂ atmoszféra alatt szárítottunk. Eltérő Au/Pb összetételek beállításához (Au₅Pb₉₅, Au₂₀Pb₈₀, Au₅₀Pb₅₀) a hozzáadott HAuCl₄ oldatot mennyiségét változtattuk. Az **Pb NPs-ek dekorált Au részecskék (Pb₉₅Au₅)** előállítási folyamata során 0,50 g PVP-t oldottunk 50,0 cm³ Au szolt tartalmazó vizes diszperzióban (c_{Au} = 0,25 mM), amit egy 4 órás kevertetés követett. Második lépésként 2,0 cm³ 0,15 M koncentrációjú Pb(NO₃)₂ oldatot adtunk a diszperzióhoz, és nitrogén atmoszféra alatt kevertettük 30 percig. Végül 30 cm³, 50,0 mM koncentrációjú NaBH₄ oldatot injektáltunk a mintához 0,2 cm³/perc adagolási sebesség mellett. A reakcióelegyet további 1 órán keresztül kevertettük, majd a részecskéket centrifugáltuk (10000 rpm, 20 perc), etanol/víz eleggyel mostunk, és N₂ atmoszféra alatt szárítottunk.

4.1.3. Fluoreszcens sajátsággal rendelkező egy- és kétfémes NCs előállítása

Közel 25 új fluoreszcens sajátsággal rendelkező nanoklaszter előállítási folyamatát dolgoztuk ki (ill. néhány esetben azok korlátozott előállítási folyamatait értelmeztük) vizes közegben a templátos eljárással (**7. ábra**). Bizonyos rendszerek esetén, ahol arra szükség volt, extra citrát redukálószerrel is alkalmaztunk a redukció elősegítése érdekében (Arg/[AuCl₄]⁻; Gln/[AuCl₄]⁻; Gln/Ag⁺; AMP/[AuCl₄]⁻; AMP/[AuCl₄]⁻/Ag⁺; HisHA/[AuCl₄]⁻). Az egyes NCs szintézis folyamatainak kidolgozása új tudományos eredmény; az egyes lépéseket az Eredmények és értékelésük fejezetben ismertetem.

Az **1. táblázat** az egyes rendszerek esetén meghatározott kísérleti paramétereket foglalja össze. A szintézisekhez az alábbi, kereskedelmi forgalomban kapható (Sigma által forgalmazott) vegyszereket használtuk fel:

Aminosavak: *L*-triptofán (*Trp*; C₁₁H₁₂N₂O₂; ≥ 98 %); *L*-hisztidin (*His*; C₆H₉N₃O₂; 99 %); *L*-cisztein (*Cys*; C₃H₇NO₂S; 97 %); *L*-tirozin (*Tyr*; C₉H₁₁O₃N; 99 %); *L*-fenilalanin (*Phe*; C₉H₁₁NO₂; ≥ 98 %), *L*-glutamin (*Gln*; C₅H₁₀N₂O₃; ≥ 99 %), *L*-arginin (*Arg*; C₆H₁₄N₄O₂; ≥ 98 %)

Kispeptidek: redukált *L*-glutation (*GSH*; C₁₀H₁₇N₃O₆S; ≥ 98 %).

Fehérjék: Lizozim (*LYZ*; ≥ 90 %); Gamma globulin marha vérből (*γG*; ≥ 99 %); Marha szérum albumin (*BSA*; ≥ 98 %), Humán szérum albumin (*HSA*; ≥ 96 %) (*hősokk frakció, proteáz, zsírsav és lényegében globulinmentes szérum fehérjéket használtunk*)

Kismolekula: adenzin-5'-monofoszfát dinátrium só (*AMP*; C₁₀H₁₂N₅Na₂O₇P; 99,9 %).

1. táblázat: Az értekezésben bemutatott, fluoreszcens sajátsággal rendelkező nanoszerkezetek¹³ előállításához alkalmazott kísérleti paraméterek összesítése.

Ligandum	Prekurzor fémion(ok)	Kiindulási ligandum/fémion arány ^{*1,2}	Kiindulási fémion koncentráció (mM) ^{*3}	pH	Hőmérséklet (°C)	Idő (nap)
Cys	[AuCl ₄] ⁻	10:1 (<i>ma</i>)	1,0	< 2,0	37	1
His	[AuCl ₄] ⁻	30:1 (<i>ma</i>)	1,0	6,0	37	1
Trp	[AuCl ₄] ⁻	1:1; 5:1; 15:1 (<i>ma</i>)	1,0	< 2,0	37	1
Tyr	Ag ⁺	5:1 (<i>ma</i>)	0,2	11,5	40	7
Phe	[AuCl ₄] ⁻	20:1 (<i>ma</i>)	0,5	11,0	80	6
	Ag ⁺	80:1 (<i>ma</i>)	0,75	11,0	80	14
Arg	[AuCl ₄] ⁻	800:1 (<i>ma</i>)	1,0	12,0	80	11
	Ag ⁺	600:1 (<i>ma</i>)	1,5	12,0	80	6
Gln	[AuCl ₄] ⁻	250:1 (<i>ma</i>)	1,0	6,0	80	7
	Ag ⁺	350:1 (<i>ma</i>)	1,0	6,0	80	14
Cys-Trp	[AuCl ₄] ⁻	20:1 (<i>ma</i>)	0,1	12,0	37	1
GSH	[AuCl ₄] ⁻	15:1 (<i>ma</i>)	1,0	3,0/12,0	37	1
LYZ	[AuCl ₄] ⁻	20:1 (<i>ta</i>)	1,0	12,0	37	0,75
	[AuCl ₄] ⁻	100:1:0,09 (<i>ta</i>)	0,5		25	1
	/Ag ⁺	125:1:0:0,03 (<i>ta</i>)	0,5	12,0	25	1
HSA	[AuCl ₄] ⁻	10:1 (<i>ta</i>)	1,0	12,0	40	1
BSA	[AuCl ₄] ⁻	10:1 (<i>ta</i>)	1,0	12,0	40	1
	[AuCl ₄] ⁻ /Ag ⁺	100:1:0,06 (<i>ta</i>)	0,5	12,0	25	0,7
γG	[AuCl ₄] ⁻	15:1 (<i>ta</i>)	0,75	12,0	37	1
AMP	[AuCl ₄] ⁻	20:1 (<i>ma</i>)	0,1	6,0	37	1
	[AuCl ₄] ⁻ /Ag ⁺	20:1:1 (<i>ma</i>)	0,1	6,5	80	0,5
HisHA	[AuCl ₄] ⁻	5:1 (<i>ma</i>)	1,0	7,0	80	2

^{*1} Mólarány esetén „*ma*”, míg tömegarányok esetén (nagy molekulatömegű fehérjéknél) „*ta*” rövidítés látható a zárójelben. Az arányok ligandum/fémion sorrendben értendők.

^{*2} A kiindulási fémion/ligandum arányok nem egyeznek meg a NCs diszperziójában lévő fémion/ligandum aránnyal a termék centrifugálással és dialízissel történő tisztítása miatt. A NCs koncentrációja – tisztítás után – az ICP-MS mérésekkel meghatározott Au-tartalomra vonatkoznak.

^{*3} Kétfémű rendszerek esetén a fémion koncentráció az Au tartalomra van megadva.

A ciszteiniltriptofán (Cys-Trp) dipeptidet a SZTE SZAOK Orvosi Vegytani Intézet, míg a hisztidinhidroxámsav (HisHA) ligandumot a SZTE GYTK Gyógyszerkémia Intézet munkatársai állították elő és bocsátották rendelkezésünkre. A törzsoldatok minden esetben

¹³ A táblázatban feltüntetett szintézisek nem mindegyike vezetett nemesfém NCs kialakulásához.

frissen készültek Milli-Q víz felhasználásával (Millipore, Milli-Q Integral3, fajlagos vezeték 18,2 mS/cm (25 °C). A megfelelő pH beállításához 0,1 – 1,0 M HCl/NaOH oldatokat használtunk. Az előállított nanoszerkezeteket centrifugálással és dialízissel tisztítottuk. A vizes közegű diszperziókat hűtőben (+ 4 °C), a fagyasztva szárítás útján elválasztott szilárd mintákat fagyasztóban (- 20 °C) tároltuk.

4.1.4. Polimer- és poliszacharid-tartalmú koloid részecskék előállítása

A doktori értekezés keretein belül több gyógyszerhordozó részecske előállítását kiviteleztek. Előállítottunk egyrészt eltérő laktid/glikolid arányú PLGA kopolimerből felépülő részecskéket kereskedelmi forgalomban kapható kopolimerekből, de azokat elő is állítottuk. Tanulmányoztunk tisztán HyA-alapú részecskéket (50-, 75-, és 100 %-ban keresztkötött) valamint a HyA felületaktív anyaggal (CTAB) vagy makromolekulákkal (BSA, HSA, Chit) alkotott komplex összetételű rendszereit is. A részecskék előállításához a lentebb felsorolt vegyületeket használtuk fel:

PLGA-alapú részecskékhez: Laktid ($C_6H_8O_4$; 99,0 %; Sigma); Glikolid ($C_4H_4O_4$; ≥ 99 %; Sigma); Ón(II)-2-etilhexanoát ($C_{16}H_{30}O_4Sn$; ≥ 96 %; Alfa Aesar); 1-dodekanol ($C_{12}H_{26}O$; ≥ 98 %; Fluka); Poli(tejsav) (PLA, $(C_3H_4O_2)_x$, $M_w = 250$ kDa, ≥ 99 %, Fluka); Poli(laktid-ko-glikolid) (PLGA75, $(C_6H_8O_4)_x(C_4H_4O_4)_y$, laktid:glikolid arány 75:25, $M_w = 40 - 75$ kDa, ≥ 99 %, Sigma); Poli(laktid-ko-glikolid) (PLGA65, $(C_6H_8O_4)_x(C_4H_4O_4)_y$, laktid:glikolid arány 65:35, $M_w = 60 - 107$ kDa, ≥ 99 %, Sigma); Poli(laktid-ko-glikolid) (PLGA50, $(C_6H_8O_4)_x(C_4H_4O_4)_y$, laktid:glikolid arány 50:50, $M_w = 30 - 60$ kDa, ≥ 99 %, Sigma); Pluronic F127 (PLUR, $(OCH_2CH_2)_x(OCH_2CH(CH_3))_y(OCH_2CH_2)_z$, $M_w \approx 12,6$ kDa, ≥ 99 %, Sigma); Polivinil-alkohol (PVA, $(C_2H_4O)_x$, $M_w \approx 72$ kDa, ≥ 99 %, Sigma); Cetil-trimetil-ammónium-bromid (CTAB, $CH_3(CH_2)_{15}N(Br)(CH_3)_3$, ≥ 95 %, Sigma); TWEEN20 (TWEEN, $C_{58}H_{114}O_{26}$, $M_w = 1228$ Da; Sigma).

HyA-tartalmú részecskékhez: 2,2'-(etiléndioxi)bisz(etilamin) (EDEA; $C_6H_{16}N_2O_2$; ≥ 98 %, Sigma); 1-[3-(dimetil-amino)propil]-3-etil-karbodiimid-metil-jodid (EDC metil-jodid, $C_9H_{20}N_3I$; ≥ 99 %, Sigma); Nagy molekulatömegű nátrium-hialuronát (H-HyA, $(C_{14}H_{21}NaNO_{11})_x$, $M_w = 1,5-1,8 \times 10^3$ kDa, ≤ 1 % fehérje, Sigma); Közepes molekulatömegű nátrium-hialuronát (M-HyA, $(C_{14}H_{21}NaNO_{11})_x$, $M_w = 200 - 500$ kDa, Richter Gedeon Nyrt.); Közepes molekulatömegű kitozán (M-Chit., $(C_6H_{11}O_4N)_x$, $M_w = 190-310$ kDa, 75 – 85 % deacetilezett, Sigma); Nagy molekulatömegű kitozán (H-Chit, $(C_6H_{11}O_4N)_x$, $M_w = 310 - 375$ kDa, ≥ 75 % deacetilezett, Sigma); Humán szérum albumin (HSA; ~ 67 kDa; ≥ 98 %; zsírsav mentes; Serva Electrophoresis GmbH); Marha szérum albumin (BSA; ~ 67 kDa; ≥ 98 %; proteáz és zsírsav mentes; Serva Electrophoresis GmbH).

Modell vegyületek: (\pm)- α -tokoferol (TP; $C_{29}H_{50}O_2$; ≥ 96 %; Sigma); D- α -tokoferol-polietilén-glikol-1000-szukcinát (TPGS; $(C_2H_4O)_x(C_{33}H_{54}O_5)$; ≥ 99 %; Sigma); Ketoprofen (KP; $C_{16}H_{14}O_3$; ≥ 98 %; Sigma); Ibuprofén nátrium só (IBU; $C_{13}H_{17}O_2Na$; ≥ 98 %; Sigma).

PLA és PLGA kopolimerek szintézise: A PLA és eltérő hidrofilitási tulajdonsággal rendelkező PLGA kopolimereket gyűrűfelnýtásos polimerizációval (ROP) állítottuk elő; a szintézis lépéseit a (P21) publikációban részleteztük. A szintézis alatt az ón(II)-2-etilhexanoát a polimerizációs folyamatot katalizálja, míg az 1-dodekanol kettős szerepének köszönhetően aktiválja a katalizátort és nukleofil ágensként elősegíti a ciklikus dimerek gyűrűfelnýtását.

PLA és PLGA részecskék előállítása: A szintetizált PLA/PLGA polimerekből a részecskék előállítása nanoprecipitációs technikával történt a (P21, P22) közleményekben részletezett módon, ahol a kísérleteket több oldószerben (acetone, 1,4-dioxán, DMSO) és számos stabilizálószer (CTAB, PVA, PLUR, TWEEN20) alkalmazása mellett is kiviteleztek. A törzsoldatok elkészítésekor a polimereket a szerves oldószerben oldottuk és ezen oldatot csepegtettük eltérő sebességgel a nagy tisztaságú Milli-Q vízzel feloldott stabilizátorok vizes oldatához. A szerves/vizes fázisok térfogatarányát 1:10 értéken tartottuk. A hatóanyag-tartalmú (KP, TP, TPGS) részecskék előállításához ugyanezen protokollt alkalmaztuk, csak a kapszulázott vegyületeket – oldhatóságtól függően – vagy a szerves vagy a vizes fázis tartalmazta megfelelő koncentrációban. A diszperziókat 48 h-ig 350 rpm fordulatszámon kevertettük, majd tisztítottuk. A tisztításakor a mintákat Milli-Q vízzel hígítottuk és 12000 rpm fordulatszámon ($t = 15$ perc, $T = 25$ °C) centrifugáltuk. A felülúszót eltávolítottuk és a részecskéket Milli-Q vízben diszpergáltuk; a tisztítási eljárást kétszer is megismételtük. A tisztításhoz kidolgozott folyamatokat és körülményeket (pl.: koncentrációk, arányok stb.) az Eredmények és értékelésük fejezetben, mint új tudományos eredmények, ismertetem.

Keresztkötött HyA részecskék szintézise: Az eltérő mértékben keresztkötött M-HyA (*cl-M-HyA/50%*, *cl-M-HyA/75%* és *cl-M-HyA/100%*) részecskék előállításához a jelölésben megadott 50 %, 75 % és 100 % mértékű térhálósítást alkalmaztunk EDEA/EDC metil-jodid reagensek felhasználásával a (P25) közleményben leírt paraméterek mellett; a kapott termékeket 7 napon keresztül nagy tisztaságú Milli-Q vízzel szemben, dialízissel tisztítottuk. A HyA alapú kolloid részecskék képződése a térhálósítással párhuzamosan megtörténik. Ezen hordozók esetén kizárólag a KP kapszulázhatóságát tanulmányoztuk eltérő szerkezetű mértékben keresztkötött HyA részecskék vonatkozásában. A KP-tartalmú *cl-M-HyA*-alapú rendszerek előállítása során az előzetesen szintetizált és liofilizált HyA részecskék vizes diszperziójában oldottuk a KP hatóanyagot adott koncentrációban ($c = 20$ mg/cm³); az elegyeket 24 óráig kevertettük. A tisztítás során a mintákat 8000 rpm fordulatszámon 10 percig centrifugáltuk és rediszpergáltuk (kétszer) a nem kötött KP eltávolítása végett.

HyA-alapú egyéb hordozó részecskék kialakítása: A HyA/CTAB, HyA/Chit, HyA/BSA, HyA/HSA rendszerek esetén a megfelelő vegyes összetételű hordozó részecskék kialakítása a komponensek közötti, egyszerű polielektrolit/tenzid kölcsönhatás és töltéskompenzációs folyamat(ok) révén történt, ahol a megfelelő komponensek oldatát, megadott arányok mellett, elegyítettünk egymással. A megfelelő hatóanyagok (HyA/CTAB: KP; HyA/BSA: IBU; HyA/HSA: IBU) kapszulázása mindegyik rendszer esetén eltérő módon történt. Ezen információkat az alkalmazott kísérleti körülményekkel együtt, pl.: a komponensek koncentrációja, arányaik, pH, stb., az Eredmények és értékelésük fejezetben, mint új tudományos eredmények, foglaljuk össze.

4.2. Vizsgálati módszerek

4.2.1. A nemesfém-tartalmú rendszerek karakterizálásához alkalmazott módszerek

Optikai tulajdonságok meghatározása:

A nemesfém-tartalmú, új nanoszerkezetű anyagok karakterizálásához a SZTE Kémiai Intézetében megtalálható kis- és nagyműszeres technikákat alkalmaztuk. Az optikai tulajdonságok feltérképezése érdekében minden esetben ultraibolya-látható (UV-Vis) spektrofotometriás és fluorimetriás méréseket végeztünk. Az **UV-Vis spektrofotometriás** mérések során – döntően a plazmonikus tulajdonsággal rendelkező Au, Ag és Au/Ag kolloidok vizes közegbeli képződésének igazolása és stabilitásuk vizsgálata érdekében – a spektrumokat egy Shimadzu UV-1800 típusú kétfényutas spektrofotométerrel rögzítettük $\lambda = 200 - 800$ nm hullámhossz tartományban. A mérésekhez 1 cm úthosszú, kétoldalú kvarc küvettákat használtunk. A fluoreszcens sajátságokkal rendelkező nemesfém NCs karakterizálása esetén, ahol arra szükség volt, a fluorimetriás emissziós spektrumok korrekciójához is vettünk fel UV-látható spektrumokat. Nevezetesen, ha az adott hullámhossz tartományban az abszorbancia mérhető ($A > 0,05$), akkor a mért intenzitás korrekciója szükséges, ehhez a következő képletet (**2. egyenlet**) használtuk.

$$I_{korr} = I_{mért} \times 10^{(A_{EX} + A_{EM})/2} \quad (2)$$

, ahol $I_{mért}$ és I_{korr} a mért és a korigált fluoreszcens intenzitások, A_{EX} és A_{EM} a vizsgált minta gerjesztő és emissziós hullámhosszon mért abszorbancia értékei.

A fluoreszcens tulajdonsággal rendelkező nemesfém NCs optikai tulajdonságának tanulmányozása esetén **spektrofluorimetriás** méréseket végeztünk. Első lépésben az egyes minták gerjesztési és emissziós spektrumainak a rögzítése Horiba Jobin Yvon Fluoromax-4 vagy ABL&E-JASCO FP-8500 típusú spektrofluoriméterrel történt. A mérésekhez 1 cm úthosszú négyoldalú kvarc küvettát használtunk szinte minden esetben. A bemeneti és kimeneti résszélességet a minta fluoreszcencia intenzitását függően 2,5 – 3,0 nm-re állítottuk (felbontás: 1 nm; scan sebesség: 200 nm/perc). Az abszolút (belső) kvantumhatásfok (ϵ_{in} , *internal quantum yield*) meghatározásához, mely a fluoreszcencia során kibocsátott (N_{em}) és elnyelt fotonok (N_{abs}) számának hányadosa, egy ABL&E-JASCO ILF-835 típusú integráló gömbsel felszerelt ABL&E-JASCO FP-8500 típusú spektrofluorimétert használtunk. A kalibráláshoz ABL&E-JASCO ESC-842 kalibrált WI fényforrást alkalmaztunk, így más referenciára (pl.: a gyakorta alkalmazott rodamin B, krezil-ibolya festék stb.) nem volt szükség. A regisztrált spektrumok alapján a megfelelő értékek meghatározásához az ABL&E-JASCO SpectraManager 2.0 szoftvert használtunk, mely az alábbi összefüggés (**3. egyenlet**) alapján szolgáltatja a kvantumhatásfok értékét:

$$\epsilon_{in} = \frac{N_{em}}{N_{abs}} = \frac{E_2}{L_1 - L_2} \quad (3)$$

, ahol E_2 : emissziós intenzitás, L_1 : gerjesztő fény intenzitás, L_2 : szórt gerjesztési intenzitás.

Jelen értekezésben a kvantumhatásfokot QY(%) jelöléssel, %-ban kifejezett értékkel tüntetem fel, ami $\varepsilon_{in} \times 100$. A fluoreszcencia élettartam (τ) méréseket egy Horiba DeltaFlex típusú készüléken, időkorrelált egy-foton számlálás (TCSPC) módszer alapján határoztuk meg. A mérésekhez 1 cm úthosszú küvetákat alkalmaztunk. Gerjesztő fényforrásként egy DeltaDiode impulzuslézert ($\lambda_{\text{lézer}} = 371$ nm) használtunk. Az emittált fényt az adott NCs-re jellemző emissziós hullámhossz értékeken detektáltuk (részszélesség: 6 – 8 nm). A TCSPC módszer esetében a mintát nem folytonosan, hanem rövid idejű fény impulzussal gerjesztjük, amikor is a fluorofór által kibocsájtott fotonok meghatározó része érzéketlen marad a detektor számára és csak a maradékot érzékeli. A mérés során regisztráljuk, hogy mennyi idő telt el a gerjesztő impulzus és a beérkező foton közt. A mért időbeli késlekedésnek megfelelő időablakban mindig eggyel növeljük a beütésszámot. Ha ezt az elemi mérést elegendően sokszor megismételjük (a mi esetünkben a beütésszámot mindig 1000 beütésig mértük), akkor a gerjesztéstől eltelt idő függvényében kapott beütésszám megadja azt, milyen intenzitás – idő összefüggést kapnánk, ha képesek lennénk egyetlen gerjesztés utáni intenzitást mérni. A mért intenzitás a gerjesztő jel és a valódi lecsengés konvolúciójaként jön létre, hiszen a gerjesztő jel mindig véges hosszúságú és a t időben mért intenzitás az összes korábbi gerjesztés hatására létrejövő lecsengés összege. Az illesztés az a művelet, amikor megkeressük azt a műszer válaszfüggvényt (IRF), amelynek a mért gerjesztő jellel vett konvolúciója legjobban egyezik a mért intenzitással. A műszer válaszejét (felbontását/ *instrument response function*) Horiba standard LUDOX® SiO₂ kolloidok részecskék segítségével határoztuk meg. Az élettartam komponenseket a regisztrált lecsengési görbék exponenciális illesztésével határoztuk meg az illesztés pontosságát megadó χ^2 érték alapján, melyhez a nevezett Horiba készülék EZTime programját használtuk. A fluoreszcencia lecsengési görbék kiértékelését egy háromexponenciális (**4. egyenlet**) egyenlet illesztésével végeztük el:

$$A + B_1 \cdot e^{\frac{-t}{T_1}} + B_2 \cdot e^{\frac{-t}{T_2}} + B_3 \cdot e^{\frac{-t}{T_3}} \quad (4)$$

ahol T_1 , T_2 és T_3 értékek (a dolgozatban általában τ_1 , τ_2 , τ_3 jelöléssel) az egyes fluoreszcencia élettartam komponensek, a B_1 , B_2 , B_3 értékek pedig az egyes komponensek hozzájárulását adják meg a teljes fluoreszcenciához (*a hozzájárulás értékét a dolgozatban %-ban kifejezve tüntetem fel*).

Méret, méreteloszlás és morfológia meghatározása:

Minden esetben vizes közegű diszperz rendszereket állítottunk elő. 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 ($\lambda_{\text{lézer}} = 633$ nm, He-Ne lézer). A méréseket 25 °C-on végeztük és 5 – 5 mérés átlagából számítottuk az átlagos (méret szerinti) hidrodinamikai átmérőt. A méreteloszlási görbék mellett, több esetben, a részecskék elektrokinetikai (zéta, ζ) potenciálja is meghatározása került (döntően a Smoluchowski modell alapján) állandó ionerősség biztosítása mellett. A NCs-et tartalmazó diszperziók esetén sokszor ezen technika nem szolgáltatott megbízható eredményeket a NCs átlagos méretére az alkalmazott műszer detektálási határa (megbízhatóan ~ 1 nm) miatt. Ha lehetőség is adódott a mérésekre akkor sok esetben kisebb nanoklaszter aggregátumokra határoztunk meg átmérő ill. ζ -potenciál

értékeket. A morfológia meghatározása **elektronmikroszkópos technikával** (TEM, HRTEM) rögzített felvételek elemzésén alapult. A TEM képeket Jeol JEM-1400plus típusú transzmissziós elektronmikroszkóppal vettük fel 120 keV gyorsítófeszültségen, míg a nagyobb felbontású felvételek FEI Tecnai G2 20 X-Twin típusú TEM készülékkel készültek 200 kV gyorsítófeszültségen.

Szerkezet meghatározás:

A változatos nanoszerkezetek jellemzéséhez röntgendiffraktometriát (XRD), röntgen fotoelektron spektroszkópiát (XPS), Fourier-transzformációs infravörös (FT-IR) spektroszkópiát, tömegspektrometriát (ESI-MS, MALDI) és cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópiát alkalmaztunk. A **röntgendiffraktometriás (XRD)** méréseket egy Bruker D8 (CuK α , ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) diffraktométerrel végeztük, ahol a diffraktogramokat $2\Theta = 10 - 80^\circ$ tartományban rögzítettük. A bázislap-távolságok meghatározására a Bragg-egyenletet (**5. egyenlet**) használtuk:

$$n\lambda = 2d \times \sin \Theta \quad (5)$$

, ahol d a bázislapok közötti távolság, λ a röntgensugár hullámhossza, Θ pedig a diffrakciós szög (az első reflexiót, $n = 1$ -et figyelembe véve). Néhány nanorészecske esetén a diffraktogramokból a Scherrer-formula (**6. egyenlet**) szerint határoztuk meg a primer részecske méretet:

$$d = K\lambda / \beta \cos \Theta \quad (6)$$

, ahol d az átlagos krisztallitméret, K egy alakfüggő konstans, λ a röntgensugárzás hullámhossza, β a reflexió csúcs félérték-szélessége radiánban megadva és Θ pedig a Bragg-szög értéke.

A kétfémes NPs felületén az elemek kémiai állapotának jellemzésére ill. a NCs esetén az Au/Ag oxidációs állapotának igazolására **röntgen fotoelektron spektroszkópiás (XPS)** méréseket végeztünk. A spektrumok rögzítését Dr. Varga Erika, Dr. Oszkó Albert és Dr. Samu F. Gergely (SZTE TTIK Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék) végezte, mely során egy SPECS XR50 típusú kettős anódú röntgensóvel és PHOIBOS 150 MCD 9 analizátorral szerelt spektrométert használtak, ahol az általunk előzetesen készített tantál, valamint titán filmekben történtek a mérések. Az Al K α röntgenforrást 200 W teljesítményen működtették, és a szén 1s csúcsát (284,80 eV) használták a töltés referenciaként. A spektrumok kiértékelése a CasaXPS szoftverrel történt. A **Fourier-transzformációs infravörös (FT-IR)** mérések során egy egyszeres reflexiójú ATR Pro One feltétellel ellátott Jasco FT/IR-4700 spektrométert ill. egy ATR-feltétellel felszerelt BIO-RAD Digilab Division FTS-65A/896 Fourier-transzformációs (FT) spektrométert használtunk. A méréseket liofilizált pormintákon végeztük; a spektrumokat 256 interferogram átlagolásával 4 cm^{-1} felbontás mellett, $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ tartományban rögzítettük. Egy mérésorozaton belül a minták pH-ja azonosra volt beállítva. A fehérjékkel-stabilizált Au NCs esetén a fehérjék másodlagos szerkezeti elemeinek a meghatározásához **cirkuláris dikroizmus (CD)** spektroszkópiás méréseket is végeztünk, ahol a spektrumok rögzítéséhez egy JASCO J-1100 CD spektrométert használtunk. A méréseket $0,2 \text{ cm}$ optikai úthosszúságú cilindrikus küvettában, $250 - 190 \text{ nm}$

hullámhossz tartományban végeztük. Háttérként mintától függően a megfelelő pH-jú MilliQ-víz vagy pufferoldatok szolgáltak. A mérési adatok kiértékeléséhez a Reed és Yang modelleket alkalmaztuk [131] az illesztés jóságától (RMS) függően. A **tömegspektrometriás (MS)** méréseket csak néhány rendszer esetén sikerült kivitelezni. A spektrumok rögzítése Kele Zoltán (SZTE SZAOK Orvosi Vegytani Intézet) segítségével történt. Az ESI-MS (elektrospray ionizációs tömegspektrometria) spektrumokat egy Waters-Micromass típusú Q-TOF analizátorral szerelt spektrométerrel rögzítettük elektrospray ionizálás és 1 μL mintaadagolás mellett. A MALDI (atmoszférikus nyomáson működő lézerdeszorpciós) spektrumokat 0,5 μL mátrix (10 mg/cm^3 koncentrációjú 2,5-dihidroxi-benzoészav acetonitril:víz/1:1 elegyében) és 0,5 μL mintamennyiség felhasználásával rögzítettük time-of-flight analizátorral szerelt Bruker Reflex II spektrométeren.

Egyéb vizsgálatok: A NPs/NCs fémtartalmának meghatározására az **induktív csatolású plazma tömegspektrometriás (ICP-MS)** méréseket minden esetben a SZTE-n Dr. Galbács Gábor csoportja végezte egy kvadrupólus tömeganalizátorral felszerelt Agilent 7700x típusú készüléken. Néhány fehérjével stabilizált (HSA, BSA, γG , LYZ) Au klaszter **citotoxicitási vizsgálatára** a Lengyel Tudományos Akadémia, Jerzy Haber Intézetében került sor. A Cys molekuláris felületigényének (Au felületen) meghatározásához **kvarc kristály mikromérleg (QCM)** (QCM200 típusú készülék, QCM25 (5 MHz) króm/arany elektródával felszerelve) és **felületi plazmon rezonancia (SPR)** (kétcsatornás, hullámhossz-modulált és hőmérséklet-szabályozott SPR készülék, a prágai Egyetem saját fejlesztésű készüléke) méréseket is kiviteleztünk. A mérések rövid leírása az Eredmények és értékelésük megfelelő fejezeténél megtalálható.

4.2.2. A gyógyszerhordozó részecskék karakterizálásához alkalmazott műszerek

Méret, méreteloszlás és morfológia meghatározása:

A korábban említett műszerek közül a **DLS** és **TEM** mérés technikákat alkalmaztuk a részecskék méretének, méreteloszlásának a meghatározására. A TEM felvételek a már részletezett elektronmikroszkóppal kerültek regisztrálásra, míg a fényszórás méréseket egy HORIBA SZ-100 típusú fényszórásmérőn végeztük ($\lambda_{\text{lézer}} = 532 \text{ nm}$, 10 mW), mely a ζ -potenciál értékek meghatározására is szolgált. A szintetizált PLA/PLGA kopolimerek molekulatömegének meghatározásához is ezen fényszórásmérő készüléket használtuk. A molekulatömeg (M_w) és a második viriál együttható (A_2) értékeket a Rayleigh-Gans-Debye modellel (**7. egyenlet**) kaptuk meg:

$$\frac{K_c}{R_{EX}} = \frac{1}{M_w} + 2A_2c \quad (7)$$

, ahol K a Debye konstans, c a minta analitikai koncentrációja, R_{ex} a többlet Rayleigh arány, M_w az átlagos molekulatömeg és A_2 a második viriál együttható.

A Debye konstans értéke a **8. egyenlet** alapján határozható meg:

$$K = \frac{4\pi^2 n_0^2 (dn/dc)^2}{\lambda^4 N_A} \quad (8)$$

, ahol n_0 a diszperziós közeg törésmutatója, dn/dc a minta törésmutatójának növekedése a koncentráció függvényében, λ az alkalmazott fény hullámhossza vákuumban és N_A az Avogadro szám. Mindezeken felül a többlet Rayleigh arányt a következőképpen határozhatjuk meg **(9. egyenlet)**:

$$R_{EX} = R_{ref} \frac{n_0^2}{n_{ref}^2} \left(\frac{I_{minta} - I_0}{I_{ref}} \right) \quad (9)$$

ahol R_{ex} a többlet Rayleigh arány, R_{ref} egy jól ismert referencia közeg Rayleigh aránya, n_0 a diszperziós közeg törésmutatója, n_{ref} a referencia közeg törésmutatója, I_{minta} a mért minta szóráshintenzitása, I_0 a diszperziós közeg szóráshintenzitása és I_{ref} a referencia közeg szóráshintenzitása.

A vizsgálatok során 0 – 20 mg/cm³ koncentrációjú PLA/PLGA 1,4-dioxános oldatait használtunk. A Debye konstans meghatározásához fontos dn/dc értéket a mérésekhez elkészített oldatok Mettler Toledo RM50 típusú refraktométerrel meghatározott törésmutató értékei alapján számítottuk. A többlet Rayleigh arány kiszámításához referencia oldószerként toluolt használtunk. A módszer érzékenységére tekintettel a felhasznált analitikai tisztaságú oldószereket (1,4-dioxán, toluol, Milli-Q víz) előzetesen 0,2 µm pórusméretű szűrőn átszűrtük (szerves oldószereknél: PTFE szűrő, Milli-Q víznél: Nylon szűrő).

A szerkezet meghatározásához hozzájáruló mérések:

A termikus sajátságok feltérképezéséhez a **differenciális pásztázó kalorimetriás (DSC)**, **termogravimetriás (TG)** és a **differenciális termoanalitikai (DTA)** mérések egy Mettler-Toledo 822e kaloriméterrel és egy Mettler-Toledo TG/SDTA 851° műszerrel történt. A detektált DSC görbékét 25 – 500 °C, míg a TG és DTA görbékét 25 – 1000 °C közötti hőmérséklet-tartományban vettük fel 5 °C/perc felfűtési idő és 50 cm³/perc áramlási sebességű nitrogén (DSC) és levegő (TG, DTA) közeg beállítása mellett. Az eredményeket STARe 12.10 szoftverrel értékeltük ki.

Áramlási potenciál mérésen alapuló felületi töltés meghatározására irányuló méréseket végeztünk a hordozó komponensek közötti (HyA/CTAB; HyA/Chit, BSA/HyA; HSA/HyA) töltéskompensálási pont kvantitatív meghatározásához, melyhez egy Mütek PCD-04 részecske töltés detektort alkalmaztunk. A mérések során az egyik komponens vizes oldatát „titrálunk” az ellentett töltésű komponens vizes oldatával és minden pontban az áramlási potenciál értékeket rögzítettük. A megfelelő töltéskompensálási pontokat (ún. áttöltési pontot, ahol a mért áramlási potenciál értéke eléri a 0 mV-os értéket) a titrálási görbék módosított Boltzmann egyenlettel **(10. egyenlet)** történő illesztéséből határoztuk meg, figyelembe véve, hogy a szigmoid görbék torzultak:

$$Y = \frac{a_1 x + a_2}{1 + \exp[(x - a_4)/a_3]} + a_5 x + a_6 \quad (10)$$

, ahol Y a függő változó (a mért áramlási potenciál értékek), x a független változó (komponensek mólaránya) és a_i az illesztési paraméterek. Az a_1 és a_2 a titrálási görbe alsó és felső szakaszának aszimptotikus értékei, a_3 az átmeneti szakasz szélessége, a_4 az inflexiós pontban az x független változó értéke, míg az $(a_1 a_4) + a_2$ kifejezés az inflexiós pontban a titrálási görbe alsó és felső szakaszának távolsága (a függő változó mértékegységében). Az egyenlet számlálójában és a jobb oldalt lévő kifejezés figyelembe veszi az induló és

megállapodó tartomány eltolódását. A paramétereket ismerve kiszámíthatjuk a komponensek molarányát az áttöltési pontban ($Y = 0$ mV).

A PLA/PLGA polimerek hidrofilitási tulajdonságainak jellemzésekor elvégzett **peremszög mérésekhez** egy 0,5 mm átmérőjű, acél tűvel felszerelt fecskendővel és egy nagy felbontású kamerával rendelkező KRÜSS FM40Mk2 Easy Drop műszert használtunk. A vizsgált PLA/PLGA film rétegeket az egyes polimerek 160 – 170°C hőmérsékleten, mikroszkóp tárgylemez üveg felületére történő olvasztásával állítottunk elő. A peremszög értékeket 25 °C hőmérsékleten és légköri nyomáson határoztuk meg 5 – 5 párhuzamos mérés átlagából, ahol nagy tisztaságú Milli-Q vízből cseppentettünk 1 – 1 cseppet (10 – 10 μ L mennyiséget) a polimer filmek felületére.

Reológiai vizsgálatok a HyA-alapú rendszerek viszkoelasztikus sajátságainak mérésére szolgált. A mérésekhez egy Anton Paar MCR 301 típusú reométert használtunk dupla rés (DG26.7-SN12740), kúp-lap (CP25-1-SN12204) és koncentrikus henger (CC27-SN12740) geometriájú feltételekkel 25 \pm 0,1 °C hőmérsékleten. A részletes kísérleti körülményeket a (P26) közlemény részletezi.

Hatóanyag-tartalom és leadás:

Az egyes hordozó makromolekulák kapszulázási hatékonyságának meghatározásához és a hatóanyagok *in vitro* kioldódásának követéséhez **UV-Vis spektrofotometriás** módszert alkalmaztunk. A spektrumokat, ill. a kalibrációs görbéket 200 – 500 nm hullámhossz tartományban és 1 cm úthosszú kvarc küvettában rögzítettük egy Shimadzu UV-1800 két fényutas spektrofotométer segítségével. A kapszulázási hatékonyság értékét ($EE(\%)$) és a részecskék hatóanyag töltöttségét ($DL(\%)$) az alábbi **11. és 12. egyenletekkel** határoztuk meg:

$$EE(\%) = \frac{\text{kapszulázott hatóanyag tömege}}{\text{hatóanyag teljes kiindulási tömege}} \times 100 \quad (11)$$

$$DL(\%) = \frac{\text{kapszulázott hatóanyag tömege}}{\text{részecskék teljes tömege}} \times 100 \quad (12)$$

Az *in vitro* kioldódási vizsgálatokat $t = 0 - 6$ óras időtartalomban, foszfát pufferes sóoldatban (PBS, pH = 6,5 – 7,4; 0,9 m/m % NaCl) féligáteresztő cellulóz dialízis membrán felhasználásával végeztük el.

Egyéb vizsgálatok: Néhány esetben a makromolekulák közötti másodrendű kölcsönhatások feltérképezése érdekében kétdimenziós **SPR** vizsgálatokat végeztünk. A biokolloidok vizes közegbeli stabilitásának nyomon követésére, ahol arra lehetőség adódott és indokolt volt, a fényszórás méréseket **turbidimetriás** (LP2000 típusú turbidimeter, Hanna Inst.) és **fajlagos vezeték** mérései (Radelkis OK-114 konduktométer) vizsgálatokkal egészítettük ki. A HyA-CTAB rendszer esetén a CTAB felületaktív anyag *cmc* értékének meghatározása végett (HyA nélkül és HyA jelenlétében) **izoterm titrációs kalorimetriás** (ITC) méréseket is végeztünk egy MicroCal VP-ITC készüléken. A fehérje-tartalmú részecskék esetén a fehérje szerkezet karakterizálására kiegészítő **CD méréseket** is végeztük a korábban említett CD készüléken ill. szintén a fehérje-tartalmú részecskék vonatkozásában az *in vitro* kioldódási mérések mellett a **PAMPA permeabilitási vizsgálatokat** a SZTE GYTK Gyógyszerhatástani és Gyógyszerfelügyeleti Intézetével együttműködésben kivitelezettük, melynek részletes leírása a megfelelő publikációkban megtalálható.

5. Eredmények és értékelésük

5.1. Arany-tartalmú kétfémes NPs

Munkatársaim közreműködésével több új, arany-tartalmú, kétfémes részecske szintézis protokollját dolgoztuk ki vizes közegben. Ezeket az eredményeket, melyek főként anyagtudományi kutatásokhoz járulnak hozzá (P1-P4), az értekezésem eredményekről szóló első részében foglalom össze.

5.1.1. Au/Ag kétfémes részecskék jellemzése

Az irodalomban a 2000-es évek elejétől több közlemény is elérhető volt már Au/Ag ötvözet és mag-héj szerkezetű részecskék előállítási protokollját bemutatva, melyek közül néhányat [23–25] az Irodalmi áttekintés fejezetben említettem. Ezen szintézisek esetén a klasszikus ötvözet NPs előállítása szinte kizárólag a fémionok együttes redukciója révén került kivitelezésre [23–25], de az egyes összetételekhez tartozó részecskeméretre random értékek mutatkoztak közel minden esetben. Reprodukálható módon kivitelezhető szintézis protokoll kidolgozására, mely állandó összetétel biztosítása mellett a részecskeméretet és a felületi szerkezetet (elemösszetételt) is szabályozza, folyamatos az igény, többek között katalizátor részecskék fejlesztésénél, hiszen a fajlagos felület és a felületi elemösszetétel változtatása pl. az intermedierek felületi kötődésére kiemelt szereppel bír. Jelen értekezés keretein belül előállított kétfémes katalizátor részecskéket a CO₂ elektrokémiai úton történő szabályozott átalakításának tanulmányozása érdekében állítottuk elő tervezetten. A kutatómunka együttműködés keretein belül történt; az értekezésben kizárólag a saját, a részecskék tervezésére és főbb szerkezeti jellemzésére irányuló, preparatív munkánk eredményeit kívánom bemutatni.¹⁴

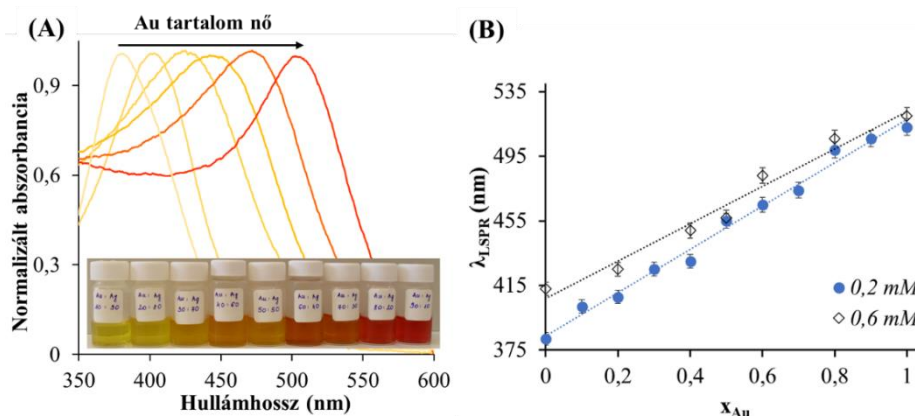
A munka során szférikus morfológiájú, monodiszperz eloszlást mutató citráttal stabilizált Au/Ag kétfémes ötvözet NPs vizes közegű előállítására olyan egyszerűen, gyorsan és reprodukálható módon megvalósítható szintézist (P1,P2) dolgoztunk ki, ahol bizonyítottuk, hogy ugyanazon előállítási protokollt követve, kizárólag a kísérleti paraméterek hangolásával, egy adott tömbfázisbeli összetétel mellett a részecskeméret, valamint állandó részecskeméret és az elemek konstans tömbfázisbeli aránya esetén a felületi elemösszetétel (klasszikus ötvözet vagy mag-héj szerkezet) is kontrollálható. A korábbi szintézisekhez képest a fémionokat ([AuCl₄]⁻ és Ag⁺) nem egy közös oldatból redukáltuk ki, hanem külön-külön melegítettük közel forráspontig a fémionokat tartalmazó oldatokat citrát jelenlétében és mikor az [AuCl₄]⁻-ionokat tartalmazó mintában a nukleáció éppen elindul¹⁵ egy-egy megfelelő térfogatrészt cseréltünk a két mintából (P1,P2). A szintéziseket két különböző fémkoncentráció beállítása mellett is kidolgoztuk (c = 0,20 (P1); 0,60 mM (P2))¹⁶. Az általunk megvalósított egyszerű, új és abszolút reprodukálható eljárással a kétfémes NPs optikai (plazmonikus) sajátsága az irodalomban publikált, más típusú szintézisekkel előállított, hasonló összetételű részecskék tulajdonságaival jó egyezést mutatott [23–25]. Ennek

¹⁴ Az eredményeket bemutató publikációk más MTA doktori értekezés alapját nem képezik és nem is fogják.

¹⁵ Az [AuCl₄]⁻-ionokat tartalmazó minta enyhén kékes színűre változott.

¹⁶ A koncentrációk a teljes fémtartalmat jelentik, ahol az összes anyagmennyiség megoszlik az Au és Ag között.

megfelelően az eltérő összetételű ötvözet részecskék képződése, ahol egy részecskén belül az Au és Ag atomok eloszlása homogén, igazolást nyert. Reprezentatív példaként a 0,2 mM fémtartalom mellett előállított Au/Ag részecskéket tartalmazó vizes diszperziók látható spektrumait a **24. ábra (A)** szemlélteti a tiszta Ag (balra szélső) és Au részecskéket (jobbra, szélső) tartalmazó vizes diszperziók spektrumaival és a mintákról készült fotókkal. A **24. ábra (B)** az egyes összetételek esetén a látható spektrumban detektált plazmon sávok maximumaihoz rendelhető hullámhossz értékeket mutatja az Au-tartalom (x_{Au} = móltört) függvényében a 0,2 és 0,6 mM fémtartalom alkalmazása esetén.



24. ábra: (A) Au/Ag részecskéket tartalmazó vizes diszperziók látható spektrumai (normált) a mintákról készült fotókkal ($c_{fém} = 0,20$ mM, balról indulva az Au/Ag 0,1:0,9 összetételtől Au/Ag 0,9:0,1 összetételig) és (B) a látható spektrumokban detektált plazmon rezonancia sávok maximumaihoz rendelhető hullámhossz értékek az Au növekvő arányának (x_{Au}) függvényében két eltérő kiindulási fémkoncentráció beállítása esetén (P1,P2).

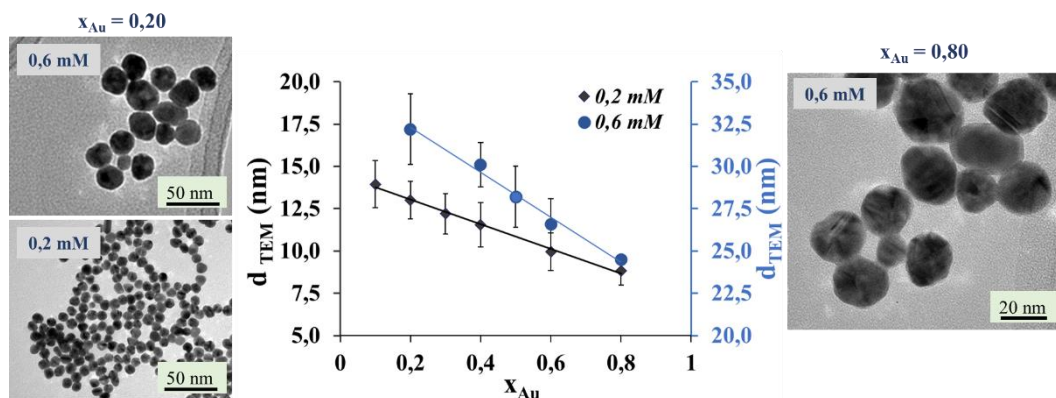
A tömbfázis összetételének meghatározására, ezáltal a szintézis sikerességének igazolására, energiadiszperz röntgenspektroszkópiás (EDX) és XPS méréseket végeztünk. Az egyes technikákkal meghatározott elemösszetétel értékek a nominális értékekkel együtt a **2. táblázatban** láthatóak. Az adatokat elemezve a nominális és a tényleges összetétel jó egyezést mutat, ami a kidolgozott szintézis eljárás eredményességét valóban alátámasztja. A NPs szerkezetének alapos ismerete elengedhetetlen a katalitikus tulajdonság értelmezéséhez.

2. táblázat: Az eltérő összetételű Au/Ag kétfémes NPs-re meghatározott elemösszetétel értékek EDX és XPS mérések alapján a nominális összetétel feltüntetésével. (Az EDX mérések csak a 0,6 mM, az XPS mérések csak a 0,2 mM fémtartalmú mintasorozatra készültek el.)

EDX összetétel	Tömbfázis összetétel (atom %)				
	0,60 mM fémtartalom		XPS*	0,20 mM fémtartalom	
	Au	Ag	összetétel	Au	Ag
Au₈₀Ag₂₀	81,8 ± 0,6	18,2 ± 0,6	Au₈₀Ag₂₀	79,1 ± 0,9	21,9 ± 0,9
Au₆₀Ag₄₀	59,4 ± 1,0	40,6 ± 1,0	Au₅₀Ag₅₀	45,4 ± 1,1	54,6 ± 1,1
Au₄₀Ag₆₀	40,0 ± 1,3	60,0 ± 1,3	Au₂₀Ag₈₀	15,2 ± 0,8	84,8 ± 0,8
Au₂₀Ag₈₀	21,3 ± 0,9	78,7 ± 0,9			

* A részecskék kellően kis méretűek voltak (8 – 13 nm), hogy az XPS mérés technikával meghatározott összetétel a tömbfázisbeli összetételt adja meg.

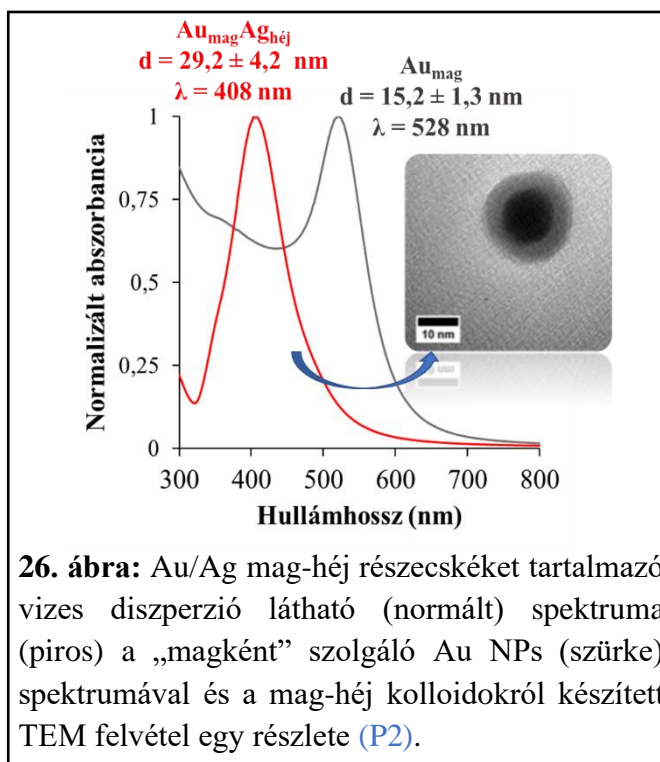
A NPs összetételének és optikai tulajdonságának a feltérképezése mellett a részecskeméretéről is részletes jellemzést készítettünk, mely a munka fő motivációja volt. A részecskék méretét egyrészt a fémkoncentrációval, másrészt a fémion/citrát moláris aránnyal szabályoztuk, hiszen jól ismert, hogy a Turkevich-eljárással előállított egyfemes Au szolok vonatkozásában a citrát mennyiségének csökkentésével a részecskék átmérője növelhető [10]. A TEM mérés technikával meghatározott részecskeméret értékeket a **25. ábra** mutatja mindkét fémkoncentráció alkalmazása mellett előállított rendszerek esetén. A **25. ábra** néhány reprezentatív TEM felvételt is szemléltet 1-1 mintáról az adott összetétel feltüntetésével.



25. ábra: Citráttal stabilizált Au/Ag kétfemes részecskékre TEM mérés technikával meghatározott átlagos átmérő értékek változása az arany tartalom (x_{Au}) függvényében és néhány diszperzió reprezentatív TEM felvétele a fémkoncentráció és az adott x_{Au} megjelölésével (P1,P2).

Az ábráról jól látható, hogy mindkét rendszer esetén a részecskék mérete közel lineárisan csökken a részecskék Au-tartalmának növelésével a kidolgozott szintézis technikát alkalmazva. A fémion/citrát 1:5 arány alkalmazása mellett szintetizált kétfemes részecskék mérete $d \sim 8 - 14$ nm, míg a fémion:citrát/1:2 arány beállításával előállított nemesfém kolloidok átmérője $d \sim 24 - 33$ nm között szisztematikusan szabályozható.

Az ötvözet részecskék mellett mag-héj szerkezetű ($Au_{mag}Ag_{héj}$) kétfemes kolloid részecskék szintézisét is elvégeztük, ahol az előzetesen előállított 15 nm átmérőjű Au NPs felületére redukáltuk az Ag^+ -ionokat szintén citrát felhasználásával. Célunk volt azonos összetétel ($Au_{20}Ag_{80}$) és részecskeméret ($\sim 30 - 32$ nm)



biztosítása mellett a klasszikus ötvözetből eltérő szerkezetű, ezáltal változatos felületi elemösszetételű, kétfémes részecskék kialakítása a katalitikus tulajdonságok szerkezetfüggő hatásának tanulmányozása végett (P2). A részecskék reprezentatív TEM felvételét a vizes diszperzió látható spektrumával a **26. ábra** foglalja össze. A TEM felvétel alapján is igazolható mag-héj szerkezet kialakulását a spektrális tulajdonságok is alátámasztják, hiszen – a klasszikus ötvözetekkel szemben, mely esetén a fémek homogén eloszlásúak egy adott részecskén belül – egy jól definiált plazmon sáv jelenik meg a spektrumban, mely egységes vastagságú, vékony héj esetén a külső fémre jellemző. Jelen esetben ez $\lambda = 408$ nm-nél látható, mely az egyfémű szférikus Ag NPs-re jellemző sáv [23–25]. Az EDX mérések alapján ezen $Au_{mag}Ag_{héj}$ részecskére (nominális Au: 20 %, nominális Ag: 80 %) $19,9 \pm 0,7$ % Au, míg $80,1 \pm 0,73$ Ag tartalom határozható meg, mely tovább erősíti a kidolgozott technika sikerességét. Összességében elmondható, hogy munkánk révén állandó összetétel biztosítása mellett dolgoztunk ki új és reprodukálhatóan kivitelezhető szintézis protokollt a szerkezet (ötvözet vagy mag-héj) és a részecskeméret (8–32 nm) célzott szabályozására vonatkozóan Au/Ag kétfémes NPs esetén (P1,P2).

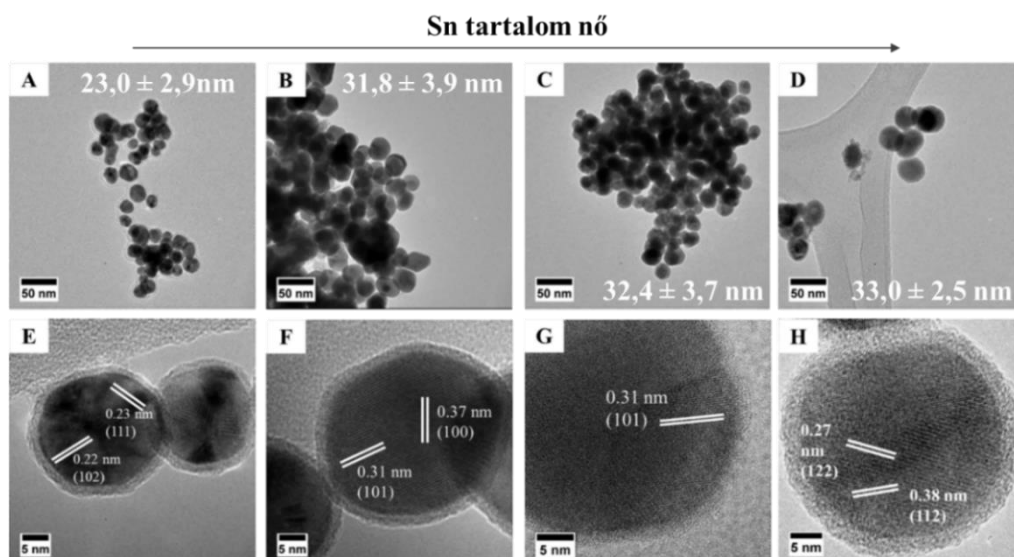
5.1.2. Au/Sn kétfémes részecskék jellemzése

A szén-dioxid elektrokémiai úton történő redukciójának megvalósításához, arany-tartalmú kétfémes elektrokatalizátorként funkcionáló részecskék tervezésénél, kérdésként merült fel, hogy az aranyat lehet-e a p-mező elemei közül pl.: Sn, Pb vagy esetleg In fémekkel ötvözni. Jól ismert, hogy az ötvözet részecskék összetett szerkezetűknél fogva sok esetben előnyösebb katalitikus tulajdonságokkal rendelkeznek az egyfémű részecskékkel szemben, valamint a részecskék szerkezete (pl.: klasszikus ötvözet, mag-héj stb.) is meghatározó szereppel bír a katalitikus tulajdonságok vonatkozásában az eltérő felületi elektronszerkezet miatt [45]. Az irodalomban több közleményben is igazolták, hogy mag-héj szerkezetű részecskék esetén (pl.: $Au_{mag}Pd_{héj}$ [132], $Cu_{mag}SnO_{2héj}$ [133], $Ag/Sn_{mag}SnO_{2héj}$ [134], $Ru_{mag}Pt_{héj}$ [135]) a héjvastagság szisztematikus változtatása révén is szabályozható az egyes termékek (CO, H₂, HCOOH, szénhidrogének stb.) képződési aránya. Jelen értekezés keretein belül Au/Sn kétfémes NPs (célirányosan mag-héj szerkezettel rendelkező) reprodukálható módon történő előállítási folyamatának a megvalósítása volt a kitűzött cél változatos összetételek kialakítása révén, hiszen az irodalomban ilyen összetételt még korábban nem vizsgáltak CO₂ redukciós folyamatokban.

Változatos összetétellel rendelkező, szférikus morfológiájú, mag-héj szerkezetű Au/Sn kétfémes NPs reprodukálható módon történő előállítására és tisztítására elsők között dolgoztunk ki egy viszonylag egyszerű, kétlépéses protokollt vizes közegben a Kísérleti részben részletezett eljárás alapján (P3). Első lépésként citráttal redukált és stabilizált Au kolloid részecskéket állítottunk elő, majd második fázisként az Au magok felületére redukáltuk az Sn⁴⁺-ionokat NaBH₄ segítségével, ahol a kialakuló részecskék szférikus stabilizálását PVP biztosította¹⁷. Az eltérő Au/Sn összetételek biztosítása végett az Sn⁴⁺-ionok

¹⁷ A sikeres protokoll kidolgozását egy közel 1,5 éves kísérletsorozat előzte meg, ahol a komponensek koncentrációjának, arányának az optimalizálása történt meg számos stabilizáló ligandum (pl.: TOABr, PAA) vizsgálata mellett vizes és organikus (pl. toluol) közegben kivitelezve. Az értekezés korlátozott terjedelme miatt csak a véglegesnek elfogadott protokollt mutatom be a (P3) publikáció alapján.

menyiségét szisztematikusan változtattuk (P3). A részecskék kialakulását TEM/HRTEM felvételek rögzítése révén igazoltuk a tömbfázisbeli elemösszetétel meghatározása mellett. Az egyes összetételek esetén regisztrált TEM/HRTEM felvételeket a **27. ábra** foglalja össze. A TEM felvételeken (**27. ábra A-D**) a meghatározott átlagos átmérő értékek is feltüntetésre kerültek. A felvételekből meghatározható, hogy az Sn-tartalom növekedésével a részecskék mérete növelhető ($d \sim 23 - 33$ nm tartományban), valamint az egységes héj vastagsága is szisztematikusan szabályozható (P3). A meghatározott héjvastagságok a HRTEM felvételek sorrendjében (**27. ábra E-H**) a következők: $1,5 \pm 0,19$; $1,8 \pm 0,32$; $2,45 \pm 0,25$; $2,75 \pm 0,23$ nm. A HRTEM felvételek alapján további megállapításokat tehetünk a részecskék szerkezetére vonatkozóan, melyek a következők: (i) Az Au_2Sn_1 összetételű részecskék (75,1 % Au, 24,9 % Sn)¹⁸ esetén (**27. ábra (E)**) két eltérő rácssík távolság (0,23 és 0,22 nm) határozható meg; előbbi az Au (111), utóbbi az AuSn (102) Miller-indexszel jelölt rácssíkjához rendelhető [136]. Több (kb. 50 db) részecske részletes elemzése alapján azonosítható egy „mag” ezen Au_2Sn_1 összetételű részecskék középpontjában és néhány esetben trigonális alakú Au részecske jelenléte azonosítható.

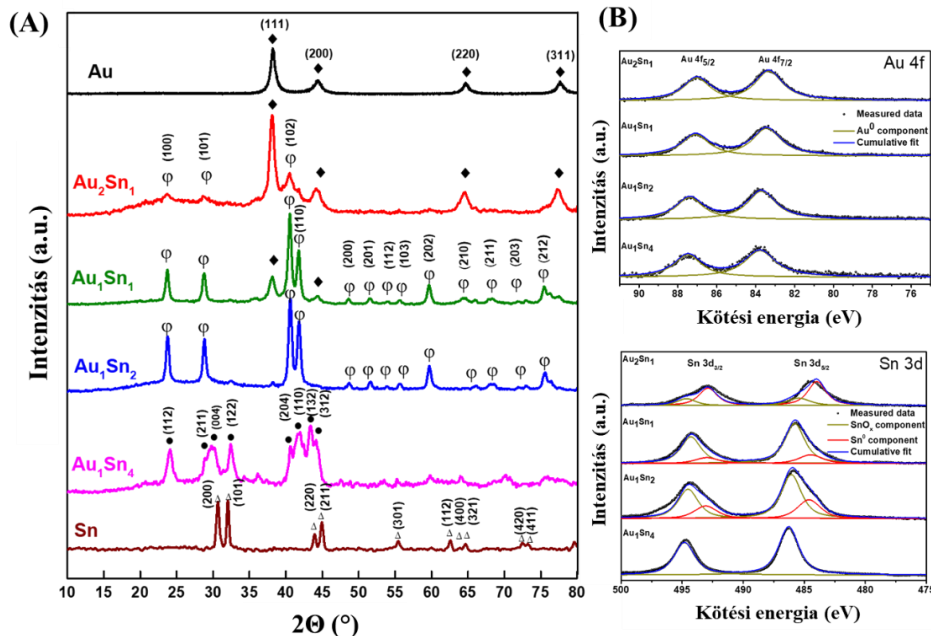


27. ábra: Az előállított Au/Sn kétfémes részecskék TEM (**A-D**) és HRTEM (**E-H**) felvételei. (**A, E:** Au_2Sn_1 , **B, F:** Au_1Sn_1 , **C, G:** Au_1Sn_2 , **D-H:** Au_1Sn_4). A felső TEM felvétel sorozaton az átlagos átmérő értékek is feltüntetésre kerültek (P3).

(ii) Az Au_1Sn_1 részecskék (54,4 % Au, 45,6 % Sn) vonatkozásában (**27. ábra (F)**) is két eltérő rácssík távolság (0,31 és 0,37 nm) határozható meg, melyek rendre az AuSn (101) és (100) rácssíkoknak feleltethetőek meg. (iii) Az Au_1Sn_2 összetétellel (39,4 % Au, 60,6 % Sn) rendelkező kolloidok esetén egy rácssík távolság (0,31 nm) mérhető (**27. ábra (G)**), mely az AuSn (101) Miller-indexszel jelölt rácssíkjához rendelhető. (iv) Az Au_1Sn_4 részecskék (34,6 % Au, 65,4 % Sn) esetén (**27. ábra (H)**) szintén két különböző rácssík távolság volt meghatározható (0,27 és 0,38 nm), melyek rendre az AuSn_2 (122) és (117) rácssíkokhoz tartozhatnak. A HRTEM felvételek alapján tett megállapításainkat XRD mérések révén is igyekeztünk igazolni, melyek eredményét a **28. ábra (A)** foglalja össze. A tiszta Au

¹⁸ A zárójelben lévő tömbfázisbeli elemek aránya EDX mérések révén került meghatározásra.

részecskék esetén detektált diffrakciós csúcsok $2\theta = 38,14^\circ$, $44,44^\circ$, $64,71^\circ$ és $77,73^\circ$ a fcc kristályrácshoz rendelhető. Ahogyan a **28. ábra (A)** is mutatja, a kétfémes részecskék határozottan eltérő XRD „mintázatot” mutattak, ami igazolja, hogy új fázisok alakultak ki és nem egyszerű ötvözés történt. Az Au_2Sn_1 összetétel esetén további diffrakciós csúcsok azonosíthatóak $2\theta = 23,67^\circ$, $28,74^\circ$ és $40,53^\circ$ értékeknél, mely hexagonális AuSn intermetallikus fázis kialakulását erősíti meg, mely egyre domináns az Sn-tartalom növekedésével (Au_1Sn_1) és még a „fázistiszta” AuSn képződését is sikerült elérni az Au_1Sn_2 összetételű minta esetén. A vártak megfelelően a legnagyobb Sn tartalom az Au_1Sn_4 minta vonatkozásában állapítható meg, ahol ortorombikus rácsszerkezetű AuSn_2 „intermetallikus” fázis azonosítható. A referenciaként vizsgált Sn esetén tetragonális rácsszerkezet igazolható. Az XRD és HRTEM eredmények alapján megerősítést nyert, hogy az Au részecskék fokozatos fázisátalakulása történik meg „intermetallikus” fázisokká az óntartalom növelésével és a kétfémes részecskék felületén egy amorf réteg is azonosítható. Az előnyös katalitikus tulajdonság éppen ezen fázis kialakulásával magyarázható, melyet részletesen a vonatkozó közlemény (P3) foglal össze és értelmez.



28. ábra: Az Au, Sn és Au/Sn részecskékről készített XRD diffraktogramok (A) és az Au/Sn részecskék megfelelő XPS spektrumai (Au 4f, Sn 3d) (B) (P3).

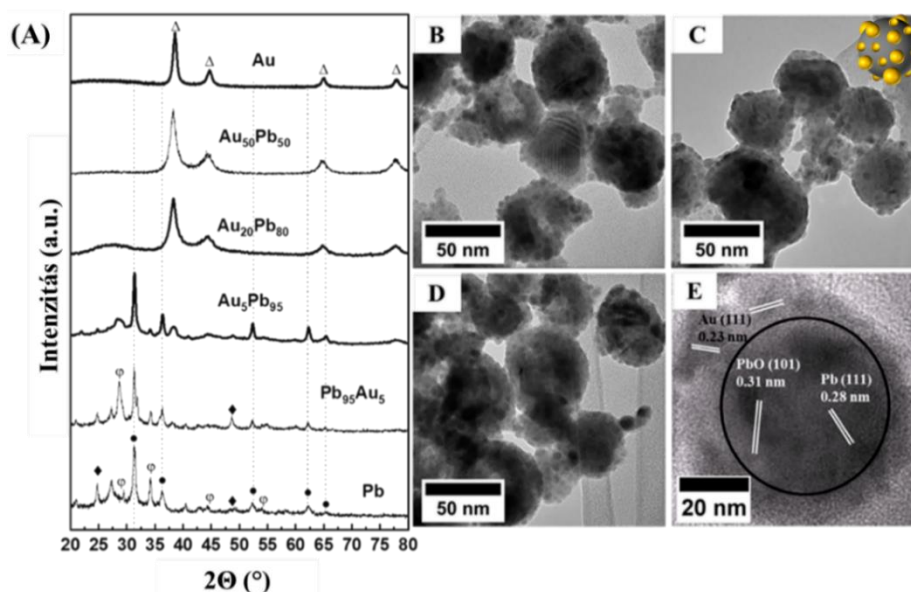
A részecskék felületének karakterizálásához XPS méréseket is végeztünk (**28. ábra (B)**). Az Au 4f spektrumában 87,02 és 83,33 eV értékeknél azonosítható csúcsok az Au⁰ oxidációs állapothoz rendelhető 4f_{5/2} és 4f_{7/2} kötési energiák [137]. Az Sn 3d spektrum az Sn^{4+/2+} (494,65 és 485,45 eV) és Sn⁰ (492,88 és 483,97 eV) oxidációs állapotokat igazolja. A felületen a részlegesen oxidált ón formák (SnO_x) mennyisége fokozatosan nő a teljes Sn koncentrációval: a legnagyobb óntartalmú minta (Au₁Sn₄) csak egyetlen Sn 3d dublettet mutatott 494,81 és 486,15 eV-nál, amely az Sn^{4+/2+} oxidációs állapotok jelenlétét igazolja a felületi rétegben. Az Au 4f csúcsok kisebb eltolódása figyelhető meg a magasabb kötési energia értékek felé az Sn-tartalom növelésével az ötvözés eredményeként [138]. A felületi elemösszetétel:

$Au_2Sn_1 = 27,5\% \text{ Au}, 53,9\% \text{ Sn}, 18,6\% \text{ SnO}_x$; $Au_1Sn_1 = 19,4\% \text{ Au}, 14,7\% \text{ Sn}, 65,9\% \text{ SnO}_x$; $Au_1Sn_2 = 15,0\% \text{ Au}, 26,0\% \text{ Sn}, 59,0\% \text{ SnO}_x$; $Au_1Sn_4 = 4,6\% \text{ Au}, 0,0\% \text{ Sn}, 95,4\% \text{ SnO}_x$.

A részecskék izopropanolos diszperziója kiválóan alkalmas üvegszén bevonatú elektródák felületén egységes rétegek kialakítására a részecskék (elektro)katalizátorként történő funkciójuk vizsgálatához, ahol az elektródák kialakíthatósága is kiemelt cél volt (P3). Az elektrokémiai mérések eredményét a vonatkozó közlemény részletesen tartalmazza (P3).

5.1.3. Au/Pb kétfémes részecskék jellemzése

Az 5.1.2. fejezetben bemutatott munka folytatásaként további kétfémes részecskék előállítását is kiviteleztük, hogy tanulmányozzuk, hogy a p-mező egy másik eleme, az Pb alkalmas-e az arannyal ötvözet részecskék kialakítására és ha igen, akkor milyen összetételű és szerkezetű részecskék képződnek az ötvözés révén.¹⁹ A 32. oldalon lévő szintézis protokollt kidolgozva (P4) az újonnan előállított, eltérő Au/Pb összetételű részecskék szerkezetének igazolására XRD vizsgálatok történtek, a regisztrált diffraktogramokat a **29. ábra** foglalja össze.

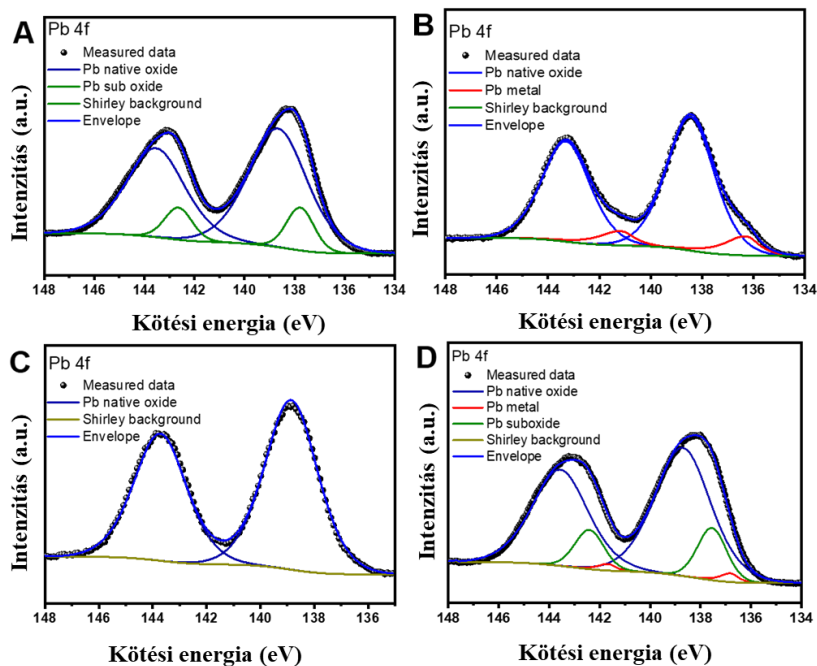


29. ábra: Eltérő összetételű Au/Pb NPs XRD diffraktogramjai (A) és az egyes részecskékről készített TEM felvételek (B) Au₅Pb₉₅, (C) Au₂₀Pb₈₀, (D) Au₅₀Pb₅₀ és Au₅Pb₉₅ (E). (♦) α-PbO₂, (φ) α-PbO, (●) Pb, (Δ) Au (JCPDS No.: 04-0784) (P4).

A tiszta ólom diffraktogramjában a $2\theta = 31,36, 36,34, 52,26, 62,26$ és $65,33^\circ$ értékek megfelelnek az ólom fcc rács szerkezetének (JCPDS No.: 02-0799), ill. a $2\theta = 28,68; 35,74; 44,41$ és $54,93^\circ$ értékeknél az α-PbO (JPDS No.: 78-1666) és $2\theta = 25,43^\circ$ valamint $48,88^\circ$ értékeknél az α-PbO₂ (JCPDS No.: 75-2414) jelenléte azonosítható. Ahogyan a **29. ábra** (A) is szemlélteti, az Pb, PbO és PbO₂ csúcsok intenzitása jelentősen csökken az Au koncentrációjának 20 %-ra történő növelésével, míg az Au fázis az Au-tartalom további

¹⁹ Kitétetett cél mag-héj (Pb_{mag}Au_{héj}) szerkezetű részecske kialakítása lett volna, ahogyan azt az 5.1.2. fejezetben az Au/Sn részecskék esetén elvégeztük, de összevetve a fémek standardpotenciál értékeit ($E^\circ_{Pb^{2+}/Pb} = -0,13 \text{ mV}$; $E^\circ_{aurát(III)/Au} = +0,99 \text{ mV}$) az Pb részecskék felületén kialakuló lokális galvancia miatt az Pb részecskék oxidációja következett be, így egységes Au héj kialakítására nem volt lehetőség. Így alakítottunk ki azonos méretű, de eltérő mértékben Au részecskékkel „dekorált” Pb részecskéket.

növelésével egyre inkább előtérbe kerül ($\text{Au}_{50}\text{Pb}_{50}$). A tiszta Au részecskék esetén a fcc rácsszerkezet igazolható. Fontos kiemelni, ezen kétfémes részecskék nem klasszikus ötvözetek, hanem mindkét fém nanoméretű méretben tartalmazó domének, így az egyes domének reflexiói (diffrakciós csúcsai) változatlan pozícióban maradnak az Au-tartalom növekedésével. A Pb-hoz kapcsolódó diffrakciók kis relatív intenzitása arra utal, hogy az egyes specicsok többsége amorf fázisban van jelen (pl. nem sztöchiometrikus oxid). A képződő részecskék méretének és morfológiájának megállapítása érdekében TEM felvételeket készítettünk, melyek közül néhányat a **29. ábra (B-E)** mutat. A felvételeken az Au magok jól láthatóak, közel egyenletes eloszlásban az Pb részecskék felületén (**29. ábra (B, C, D)**), ami megerősíti a „dekorált” szerkezetű részecskék képződését. A részecskék átlagos átmérője valamennyi összetétel esetén 42 ± 5 nm, míg a kiindulási Pb részecskék $40 \pm 3,5$ nm mérettel rendelkeztek. A legalacsonyabb Au-tartalmú $\text{Au}_5\text{Pb}_{95}$ minta esetében a felületen lévő Au részecskék főként az Pb részecskéket veszik körül (**29. ábra (E)**), de a Pb részecskék felületén az Au-tartalom növelésével nő az Au borítottsága, így több Au/Pb határfelületet alakíthatunk ki. A fordított szerkezetet is előállítottuk (azaz Au mag, Pb héj, $\text{Pb}_{95}\text{Au}_5$) az Pb-ban leggazdagabb mintához ($\text{Au}_5\text{Pb}_{95}$) hasonló összetétellel, ahol hasonló kristályfázisok voltak azonosíthatóak. Az XRD mérések mellett, ahogyan az Au/Sn részecskék esetén is tettük, XPS mérések kivitelezése révén kívántunk információkat szolgáltatni a részecskék felületi összetételéről. Az XPS spektrumban kizárólag Pb, Au, O, és C csúcsok jelenléte volt azonosítható. A nagy felbontású Pb 4f spektrumok illesztése (**30. ábra**) azt mutatja, hogy mind a négy minta felületén a natív oxid az uralkodó ólom komponens. A natív Pb-oxid (PbO_x) relatív mennyisége 94,0 %-ról 91,0 %-ra, ill. 72,0 %-ra csökken a minta sorozat esetén az Au-tartalom növekedésével. Az egyes részecskék esetén az EDX mérések révén meghatározott tömbfázisbeli összetétel mellett a **3. táblázat** az XPS vizsgálatok által megállapítható felületi összetételt is összefoglalja.



30. ábra: Eltérő összetételű Au/Pb részecskék nagyfelbontású XPS spektrumai (Pb 4f csúcs) (A) $\text{Au}_5\text{Pb}_{95}$, (B) $\text{Au}_{20}\text{Pb}_{80}$, (C) $\text{Au}_{50}\text{Pb}_{50}$, (D) $\text{Pb}_{95}\text{Au}_5$ (P4).

A tömbfázisbeli összetétel közel azonos értékeket igazol, mint a nominális. A felületen igazolható az Au tartalom növekedésével a növekvő Au részecskék mennyisége, az ólom vonatkozásában az PbO_x jelenléte a meghatározó. A részecskék izopropanolos diszperziója alkalmas arra, hogy üvegszén bevonatú elektródák felületén egységes bevonatokat alakítsunk ki *spray-coating* technikával elektrokatalizátorként történő funkciójuk vizsgálatához. A részecskék további előnye, hogy 10 óra elektrolízis után az Pb 4f csúcsok pozíciójában eltolódás nem volt megfigyelhető, mely igazolta, hogy az oxidációs állapotok nem változtak.

3. táblázat: Eltérő összetételű Au/Pb kétfémes NPs-re EDX mérések által meghatározott elemösszetétel adatok és a részecskék felületi összetétele az XPS vizsgálatok alapján (P4).

Minta- összetétel	Tömbfázisbeli összetétel (atom %)		Felületi összetétel (atom %)		
	Au	Pb	Au	Pb0	PbO _x
Pb₉₅Au₅	3,9	96,1	3,8	1,8	94,4
Au₅Pb₉₅	5,1	94,9	8,8	0,0	91,2
Au₂₀Pb₈₀	21,4	78,6	20,0	8,2	71,8
Au₅₀Pb₅₀	60,1	39,9	23,0	0,0	77,0

5.2. Ciszteinnel felületmódosított nemesfém kolloidok jellemzése vizes diszperziókban

Reproduktív szintézissel [9] állítottunk elő citráttal stabilizált Au és Ag kolloid részecskéket vizes közegben fémion:citrát/1:5 molarány alkalmazása mellett azonos kiindulási fémion koncentrációt ($c = 0,20$ mM) alkalmazva (P5-P7).²⁰ A képződő részecskéket TEM, DLS és UV-látható spektrofotometriás mérésekkel karakterizáltuk, mely adatok az irodalmi adatokkal való jó egyezésben [7] igazolta a szférikus morfológiájú, monodiszperz eloszlású Au és Ag kolloidok képződését. A vonatkozó paramétereket a **4. táblázat** összegzi.

4. táblázat: Citráttal stabilizált Au és Ag részecskéket tartalmazó vizes diszperziók meghatározó paraméterei.

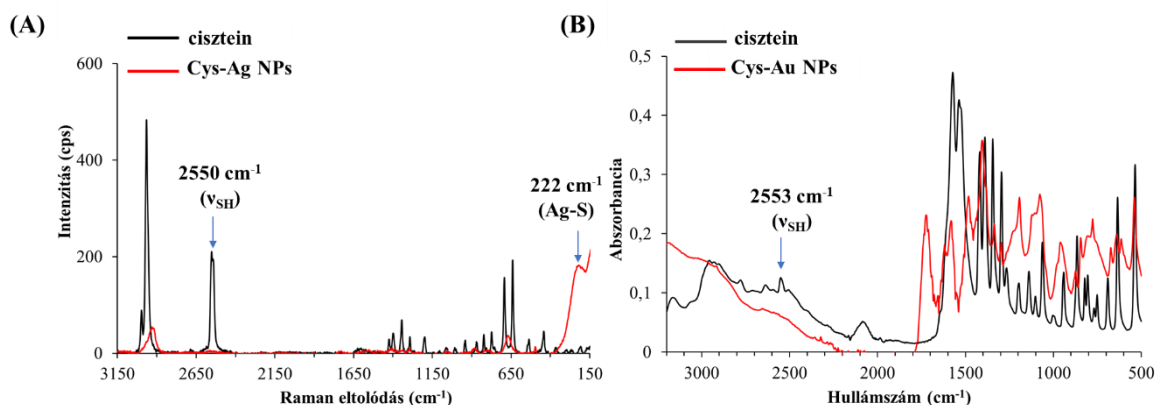
Nemesfém diszperzió típusa	fém- koncentráció (mM)	fémion/ citrát molarány	d_{TEM} (nm)	d_{DLS} (nm)	ζ -potenciál (mV) [#]	λ_{LSPR} (nm)
Au NPs	0,20	1:5	13,6 ± 4,7	18,2 ± 4,3	- 41,8 ± 2,1	520
Ag NPs	0,20	1:5	8,3 ± 1,3	9,2 ± 1,3	- 42,5 ± 2,8	392

[#] A mért ζ -potenciál érték pH = 7,0 esetén, I = 10,0 mM (NaNO₃).

Cys aminosavval felületmódosított Au kolloidok főként szerkezeti jellemzésére már 2010-ben néhány szakirodalmi forrás rendelkezésre állt [139,140], de ezek meglehetősen hiányosak voltak a kolloid stabilitás és a felületmódosítás hatására bekövetkező optikai tulajdonságok változásának értelmezése tekintetében és a borítottság adatokra sem voltak információk. Az

²⁰ Az 5.1. és 5.2. fejezetben bemutatott nemesfém-alapú diszperziók fémkoncentrációját ICP-MS mérések révén a SZTE TTIK Molekuláris és Analitikai Kémiai Tanszékén Dr. Galbács Gábor csoportja határozta meg minden esetben. Az Au NPs esetén a redukció 99,98 %-ban sikeres, a minta nem tartalmaz szabad Au³⁺-ionokat.

Ag vonatkozásában egyáltalán nem volt elérhető adat a nevezett aminosavval felületmódosított kolloidok átfogó jellemzésére, így itt elsők között értelmeztük a Cys-nel funkcionizált Ag kolloidok (Cys-Ag NPs) optikai és szerkezeti tulajdonságait széles pH-tartományban (pH = 2 –10) (P7). Az Ag-tartalmú vizes diszperziók tanulmányozása során elért eredmények összevethetősége érdekében a megfelelő Cys-nel felületmódosított Au kolloidokat (Cys-Au NPs) is előállítottuk az általunk alkalmazott fémkoncentráció és felületi borítottság kialakítása mellett (P5,P6). A sikeres felületmódosítást, ezáltal a Cys nemesfém kolloid részecskék felületére történő kötődését, ¹H-NMR, FT-IR és Raman spektroszkópiás mérések kivitelezése révén igazoltuk (P5, P7). Reprezentatív példaként a **31. ábra (A)** a Cys-nel felületmódosított Ag kolloidok Raman spektrumát, míg a **31. ábra (B)** a megfelelő Au rendszer esetén regisztrált FT-IR spektrumot mutatja. A Raman spektrum esetén megfigyelhető (**31. ábra (A)**), hogy a szabad Cys oldalláncbeli tiolcsoportjára jellemző ν_{SH} rezgés már nem detektálható 2550 cm^{-1} -nél a részecskéket is tartalmazó diszperzióban és 222 cm^{-1} -nél az Ag-S kötés kialakulására jellemző új „csúcs” megjelenése azonosítható. FT-IR spektroszkópiás mérésekkel is tanulmányoztuk a Cys felületen történő megkötődését (**31. ábra (B)**), de a $4000 - 500\text{ cm}^{-1}$ tartományban regisztrált spektrumban csak a tiolcsoportoz tartozó, 2553 cm^{-1} -nél lévő ν_{SH} rezgés eltűnése enged következtetni a Cys kötődésére [140].



31. ábra: (A) A Cys és a Cys-Ag NPs Raman spektrumai. (B) A Cys és a Cys-Au NPs FT-IR spektrumai. (A Raman és FT-IR méréseknél azonos pH-jú, liofilizált porokat mértünk.)

Mindkét rendszer esetén monomolekulás Cys borítottságot alakítottunk ki az Au és Ag részecskék felületén. Ennek sikeres megvalósítása érdekében első lépésben a Cys molekuláris felületigényét határoztuk meg Au felületen, melyet értékeket elsőként tettünk elérhetővé az irodalomban független QCM és SPR vizsgálatok révén (P8).²¹

A QCM mérési eljárás alapja egy piezoelektromos effektus alapján működő szenzor, amely az arannyal bevont és váltóárammal magas frekvenciájú rezgésbe hozott kvarckristály oszcillációnak tömegfüggése révén képes detektálni az arany felületre adszorbeálódott anyag mennyiségi változását. A mért frekvencia értékek és a kristályra adszorbeált tömeg közötti összefüggést a Sauerbrey-egyenlet (**13. egyenlet**) adja meg.

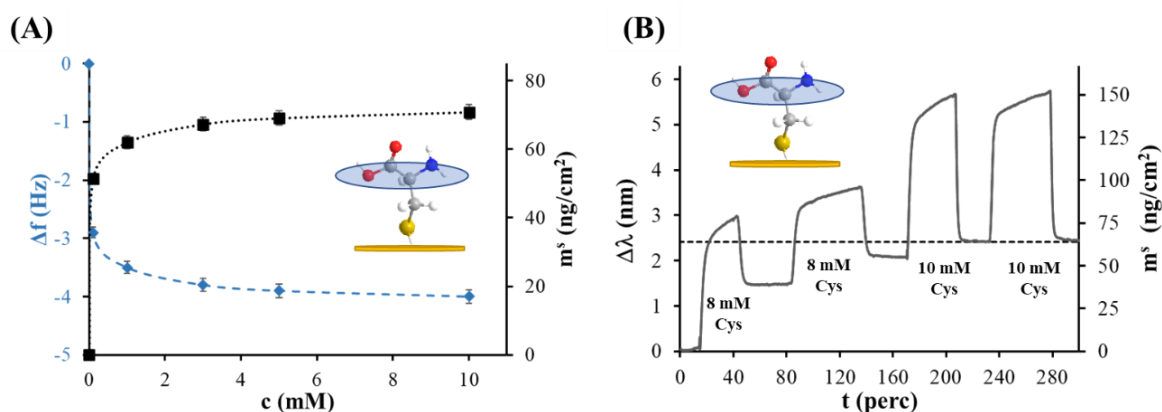
²¹ Kisméretű részecskék esetén a centrifugálással történő, felülethez nem kötött kismolekulák eltávolítása rendkívül nehézkes, így a borítottsági arány kialakításához a számított mennyiség ismerete elengedhetetlen.

$$\Delta f = -\frac{2 f_0^2}{A \sqrt{\rho_q \mu_g}} \Delta m \quad (13)$$

ahol f_0 (Hz) a kristály rezonancia frekvenciája, Δf a tiszta szenzorfelület és a mérendő anyagra jellemző frekvenciaértékek különbsége, A kristály aktív felülete, ρ_q a kristály sűrűsége ($\rho_q = 2,648 \text{ g cm}^{-3}$), μ_g a kristály nyírási modulusa ($\mu_g = 2,947 \times 10^{11} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-2}$) és Δm a tömegváltozás (g). Az általunk alkalmazott kvarckristály mérleg esetében a **13. egyenlet** paraméterei rögzített értékek, amelyek egyetlen konstansba ($k_q = 17,668 \text{ ng cm}^{-2} \text{ Hz}^{-1}$) foglalhatók, így a szenzor felületén bekövetkező adszorpció miatti frekvencia-csökkenéssel arányos tömegnövekedés a **14. egyenlet** szerinti egyszerű formula alapján számítható.

$$\Delta m = -\Delta f \cdot k_q \quad (14)$$

A mérések kivitelezése 25° C-on történt statikus körülmények között, amelyek során a mérőfej a vizsgált molekula frissen készített, eltérő koncentrációjú ($c_{\text{Cys}} = 0,1; 1,0; 3,0; 5,0; 10,0 \text{ mM}$) vizes oldatába merült és a mérőfej által szolgáltatott frekvencia érték időbeli állandósulását követően jegyeztük fel azok értékét, majd a **14. egyenlet** alapján számítottuk az adszorbeált mennyiségeket. A Δf és az m^s változását az egyensúlyi koncentráció függvényében ábrázoltuk (**32. ábra (A)**).



32. ábra: (A) Arany felületen kialakuló Cys alkotta monomolekulás rétegek kiépülésének QCM technikával történő vizsgálata során meghatározott $f = \Delta f(c)$ függvény (kékkel) és izoterma (feketével). (B) A Cys SPR szenzor arany felületére történő immobilizálása során rögzített szenzorgram sorozat ($T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $q_v = 50 \text{ } \mu\text{L/perc}$) (P8).

Az SPR mérések alapja a plazmon rezonancia jelenség, mely a fémbe lévő vezetési elektronoknak az elektromágneses tér segítségével gerjesztett hullámszerű mozgását jelenti, amely hatására a fémfelület és a dielektrikum határán a határfelülethez közel erős, de egyben erősen csillapított tér alakul ki. A mérések során az arany bevonatú chipet a hordozó oldaláról monokromatikus fényel világítják meg, amely az üveg felső határán teljes visszaverődést szenved, majd a visszavert sugár egy detektorra vetődik. A teljes visszaverődés során az elektromágneses hullám exponenciálisan csökkenő intenzitással behatol (ezáltal evanescens tér alakul ki) a szenzor mintakamrájának oldalán lévő közegbe. Az evanescens tér kiterjedése a fémrétegre és fölötté lévő keskeny, néhány száz nanométer vastag tartományra korlátozódik. A beeső fény egy bizonyos szög (vagy hullámhossz) mellett kölcsönhatásba lép a fémrétegben lévő szabad elektronokkal és az általuk létrehozott elektromágneses térrel, és rezgésbe hozza,

gerjeszti azokat, vagyis kialakul a felszíni plazmon rezonancia. Ekkor az adott beesési szöghöz (vagy hullámhosszhoz) tartozó fény elnyelődik, intenzitása csökken. Alkalmasan megválasztott detektor segítségével meghatározhatjuk az intenzitás minimumhoz tartozó hullámhosszat. A szenzor felszínéhez kötődő molekulák megváltoztatják az evaneszcens térben a lokális törésmutatót, amely hatással van a plazmon hullámok rezonancia feltételeire, a felületre történő molekula kötődése során a rezonanciához tartozó hullámhossz eltolódik. Az eltolódás mértéke arányos a felszínen megkötődő anyagmennyiséggel. A szenzorgrammok rögzítése során eltérő koncentrációjú ($c_{\text{Cys}} = 8,0$ és $10,0$ mM) Cys oldatokat áramoltattunk négy lépésben az arannyal bevont szenzor felület felett addig, amíg a maximális hullámhossz eltolódást el nem értük, mely a monomolekulás Cys-nel borított Au felület kialakulására engedett következtetni. Minden egyes lépést egy lemosási folyamat követte, mely a szenzor felületén nem kötött molekula mennyiségének eltávolítására szolgált (**32. ábra (B)**). A **32. ábra** a QCM mérések során regisztrált $f = \Delta f(c)$ függvény és izotermát és a megfelelő SPR szenzorgramot is szemlélteti. A mérések alapján meghatározott Δf ($-4,00 \pm 0,07$ Hz) és $\Delta\lambda$ ($2,36 \pm 0,03$ nm) értékek alapján számított adszorbeált tömeg- ($\text{m}^s/\text{ng cm}^{-2}$) és anyagmennyiségeket ($\text{m}^s/\mu\text{mol m}^{-2}$) ill. a számított molekuláris felületigényt (a^s/nm^2) az **5. táblázatban** foglaltam össze. Az **5. táblázat** emellett tartalmazza a MarvinSketch nevű szoftverrel számított minimális ($a_{m,calc, min.}$) és maximális vetületek értékeit ($a_{m,calc, max.}$). A felületegységre vonatkoztatott anyagmennyiség (m^s) ismeretében egyetlen Cys aminosav által elfoglalt felület nagysága az **15. egyenlet** szerint az Avogadro állandó (N_A) felhasználásával számítható. A számolásakor feltételezzük, hogy az adszorbátum monomolekulás réteget alkot az adszorbensen, amit a **15. egyenletben** az „m” index jelöl.

$$a_m = \frac{1}{m^s N_A} \quad (15)$$

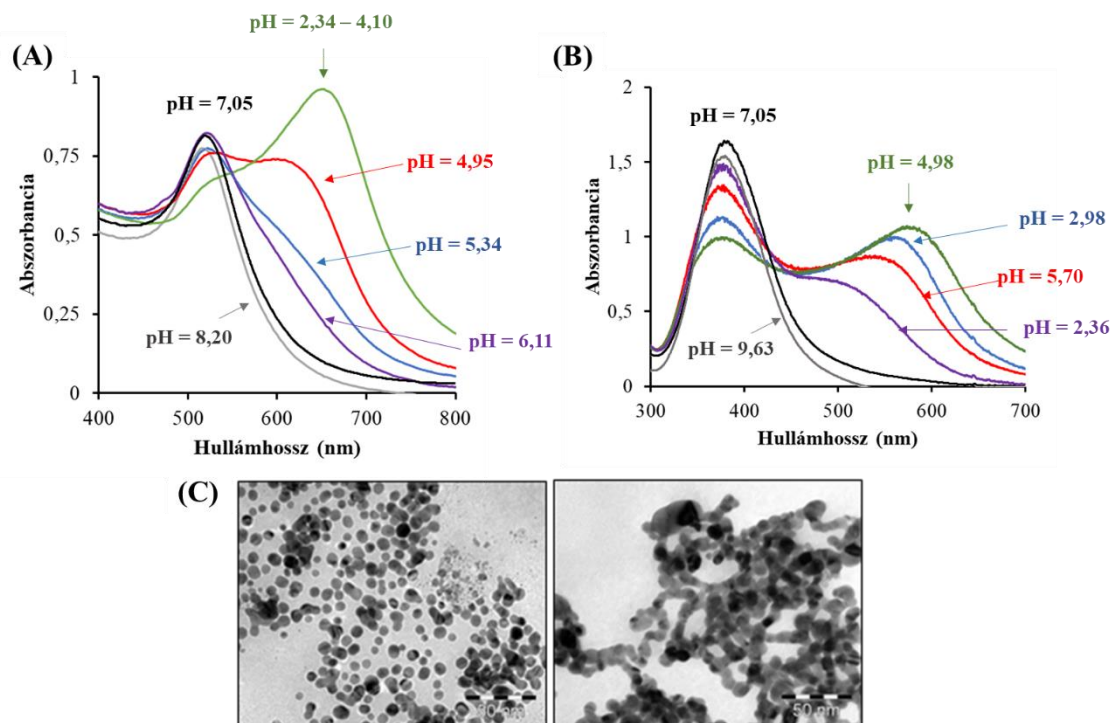
5. táblázat: A Cys aminosav SPR és QCM mérés technikák által meghatározott adszorpciós és MarvinSketch programmal számított geometriai paraméterei (**P8**).

	$\text{m}^s/\text{ng cm}^{-2}$		$\text{m}^s/\mu\text{mol m}^{-2}$		a_m/nm^2		$a_{m,calc}/\text{nm}^2$	
	SPR	QCM	SPR	QCM	SPR	QCM	min.	max.
Cys	$62,44 \pm 0,89$	$70,86 \pm 1,25$	$5,15 \pm 0,10$	$5,85 \pm 0,15$	$0,32 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,01$	0,32	0,36

Összehasonlítva az QCM ($0,28 \text{ nm}^2$) és az SPR ($0,32 \text{ nm}^2$) mérések alapján becsült felületigény adatokat, megállapítható, hogy az eltérő kísérleti technikák által szolgáltatott eredmények elfogadható egyezést mutatnak. Ezen felül a kísérletileg meghatározott felületigény értékeit a MarvinSketch által számított, minimális projekciós adatok ($0,32 \text{ nm}^2$) is alátámasztják.

A molekuláris felületigény ismeretében monomolekulás Cys borítottságot alakítottunk ki a részecskék felületén, majd a felületmódosítás hatására az optikai tulajdonságokban bekövetkező változásokat értelmeztük pH = 2 – 10 tartományban. A Cys-nel funkcionális Au és Ag szolok LSPR sávjait a **33. ábra** szemlélteti a pH beállítás után 2 perc elteltével, mivel az aggregáció rendkívül gyorsan bekövetkezik főleg savas tartományban az általunk alkalmazott kísérleti körülmények mellett. A spektrális eredmények alapján közel azonos

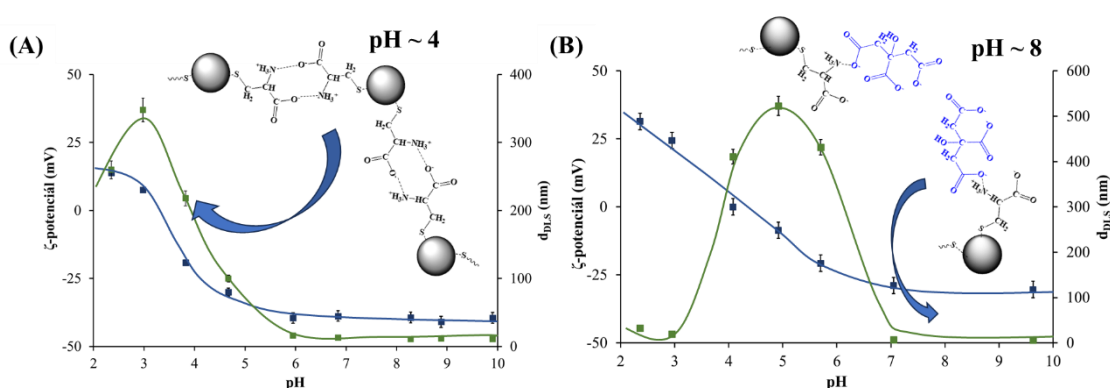
megállapítás tehető mindkét rendszerre. A spektrumokban a $\text{pH} > 7,0$ feletti értékeknél kizárólag a szférikus morfológiájú Cys-nel felületmódosított Au és Ag részecskékre jellemző LSPR sávok azonosíthatók (Au NPs: $\lambda_{\text{LSPR}} = 518 \text{ nm}$ ($\text{pH} = 7,05$); Ag NPs: $\lambda_{\text{LSPR}} = 390 \text{ nm}$ ($\text{pH} = 7,05$)). A részecskék funkcionálásának hatására a szférikus részecskékre jellemző LSPR sávok (**4. táblázat**) kb. 2 nm-rel tolódnak el a kisebb hullámhosszak irányába, ami irodalmi adatokkal [141] jó egyezésben a sikeres felületmódosítás eredménye.



33. ábra: A Cys-nel felületmódosított Au (A) és Ag (B) NPs vizes diszperzióinak látható spektrumai eltérő pH értékek esetén a „borítatlan” Au és Ag részecskéket tartalmazó szolok spektrumaival ($c_{\text{Au}} = 0,18 \text{ mM}$ $c_{\text{Cys}} = 3,22 \text{ }\mu\text{M}$; $c_{\text{Ag}} = 0,18 \text{ mM}$ $c_{\text{Cys}} = 5,70 \text{ }\mu\text{M}$) (C) A Cys-Ag NPs diszperzió reprezentatív TEM felvételei pH ~ 8 (bal) és pH ~ 3 (jobb) esetén (P5-P7).

A pH csökkenésével mindkét rendszer esetén egy új LSPR sáv megjelenése látható a spektrumokon $\lambda_{\text{Cys-Au NPs}} = 615 - 665 \text{ nm}$ (**33. ábra (A)**) és $\lambda_{\text{Cys-Ag NPs}} = 515 - 590 \text{ nm}$ (**33. ábra (B)**) hullámhossz tartományokban, mely az egyes diszperziókban, a gömbi alaktól eltérő, anizometrikus morfológiájú részecskék (aggregátumok) kialakulására utalhat. Hasonló spektrális tulajdonság igazolható rúd alakú Au részecskék esetén, ahogyan azt értelmeztük az Irodalmi áttekintés 2.2.2. alfejezetében (**4. ábra (B)**), tehát feltehetően a részecskék egyfajta összefüzdése/összekapcsolódása történhet. Az Au-tartalmú szol esetén a második LSPR sáv $\text{pH} = 2,34 - 4,10$ tartományban a leginkább karakterisztikus és a pH további emelésével egyre kevésbé meghatározó (inkább vállként jelenik meg); $\text{pH} \sim 7,05$ esetén már nem is detektálható. A megfelelő Ag szol vonatkozásában ez a második LSPR sáv $\text{pH} = 2,98 - 4,98$ tartományban domináns inkább és a pH növelésével egyre kisebb hullámhosszknál detektálható; $\text{pH} \sim 7,05$ -nál már itt sem jelenik meg a spektrumban. A diszperziók TEM felvételei is megerősítették feltevésünket, hiszen ahogyan példaként **33. ábra (C)** is szemlélteti, az Ag

részecskék láncszerű összefűződése azonosítható, mely valóban az anizometrikus morfológia jelenlétét igazolja. A részecskék láncszerű összekapcsolódását az Ag-tartalmú rendszerek esetén végelemes módszerrel történő elméleti modellekkel is alátámasztottuk a SZTE Optika és Kvantumelektronikai Tanszékének munkatársaival, ahol a vonatkozó eredményeket a (P7) publikáció foglalja össze. Az optikai tulajdonságok alapján tett megállapításaink megerősítése érdekében mind az Au-, mind az Ag-tartalmú rendszer esetén széles pH-tartományban (pH = 2 – 10) meghatároztuk a részecskék hidrodinamikai átmérőjét és a ζ -potenciál értékeit is (34. ábra). A spektrumokkal összhangban azon pH-tartományban, ahol az anizometrikus morfológiájú részecskék jelenlétére utaló második LSPR sáv detektálható a mért átlagos átmérő $d_{DLS} = 100 - 300$ nm (34. ábra (A)) és $\sim 50 - 600$ nm (34. ábra (B)) között, maximum görbe szerint változik. pH > 7,0 felett mindkét rendszer esetén a primer részecskék méretére $d = 10 - 20$ nm határozható meg; aggregátumok kialakulása nem figyelhető meg.



34. ábra: Cys-nel felületmódosított Au (A) és Ag (B) NPs-et tartalmazó vizes diszperzióban mért átlagos hidrodinamikai átmérők (zöld színnel) és ζ -potenciál értékek (kék színnel) a pH függvényében a pH ~ 4 (A) és pH ~ 8 (B) esetén feltételezhetően kialakuló részecske szerkezetekkel (P5-P7). ($c_{Au} = 0,18$ mM, $c_{Cys} = 3,22$ μ M; $t = 2$ perc; $c_{Ag} = 0,18$ mM, $c_{Cys} = 5,70$ μ M, $t = 2$ perc; $I = 10,0$ mM (NaNO₃)). A kísérleti adatpontokra illesztett görbék csupán a kérdéses paraméter értékek valószínűsíthető változását jelentik meg a pH függvényében.

Megállapítható tehát, hogy függetlenül a koloid részecskék méretétől (8 – 14 nm) és anyagi minőségétől (Au vagy Ag) azok stabilitása a felületen monorétegben elhelyezkedő Cys és a rendszerben jelen lévő, elektrosztatikus stabilitást biztosító, citrát molekulák funkciócsoportjainak adott pH-n domináns töltésével (protonáltsági fokkal) korrelál. A Cys már monomolekulás rétegben történő jelenléte erősen módosítja a funkcionizálatlan citráttal stabilizált szolok tulajdonságait. Állandó ionerősség mellett a biofunkcionalizált részecskék jelentős aggregációja – mely TEM felvételekkel igazoltan a részecskék láncszerű összefűződése révén következik be – azon pH-tartományban meghatározó, ahol a Cys ikerionos formában van jelen, de emellett a citrát molekulák is részlegesen protonáltak. Figyelembe véve a Cys és citromsav pK_s értékeit (Cys: $pK_{s1} = 1,69$; $pK_{s2} = 8,17$; $pK_{s3} = 10,30$)

[142]²²; citromsav: ($pK_{s1} = 3,13$, $pK_{s2} = 4,76$, $pK_{s3} = 6,40$) [143]) ez a tartomány kb. pH ~ 2,7 – 7,4, ami a **33.** és **34. ábra** kísérleti adataival jó egyezésben van. pH ~ 7,5 felett a citrát molekulák már teljesen deprotonált (cit^{3-}) formában vannak és a részecskék felületén elhelyezkedő, még pozitív töltéssel rendelkező ammóniumcsoportokhoz elektrosztatikusan kapcsolódva egy második adszorpciós réteget alkothatnak. Ezen felületi réteg kialakulása révén a funkcionizált részecskék már döntően negatív töltéssel rendelkeznek, melyet a ζ -potenciál értékek is igazolnak (pH ~ 7 – 10, Au NPs: $\zeta \sim -38,8 - (-40,9)$ mV; Ag NPs: $\zeta \sim -29,2 - (-30,9)$ mV), és így a részecskék kapcsolódása/aggregációja az elektrosztatikus taszítás révén gátoltabb, mint pH < 7,5 esetén, ahol a citrát molekulák csak részlegesen deprotonáltak. Az ammóniumcsoport teljes protonvesztése után (pH > 9,5) a felületen lévő Cys is már negatív töltéssel rendelkezik, ahogyan a cit^{3-} molekulák is és így az elektrosztatikus taszítás akár erősen lúgos közegben (pH = 10 – 12) is meghatározó, így az aggregáció ezen körülmények mellett sem meghatározó. A pH ~ 4 és pH ~ 8 esetén a lehetségesen kialakuló szerkezetek sematikus ábráját a **34. ábra** szemlélteti. Összességében tehát mindkét rendszerben hasonló megállapítások tehetők, de meghatározó aggregáció a Cys-módosított Au szol esetén pH = 2 – 6, míg Ag esetén pH = 3 – 7 tartományban domináns (~ 1 pH egységgel eltolódva), ami magyarázható az Au rendszerben a kisebb fajlagos felületű részecskék borításához számított kevesebb anyagmennyiségű (~ közel fele) Cys jelenlétével és inkább a nagyobb mennyiségben jelenlévő (Cys/citrát = 1:280) citrát molekulák közötti kölcsönhatások dominánsak az Ag részecskéket tartalmazó rendszerrel (Cys/citrát = 1:155) szemben. A méréseket a Cys-nel történő felületmódosítás nélkül elvégezve megállapítható, hogy a citráttal stabilizált szolok ζ -potenciál értéke pH = 2,00 felett negatív (áttöltés nem figyelhető meg), aggregáció sem következik be, így a Cys már monomolekulás rétegben történő jelenléte meghatározó. Mindemelett nem zárható ki, hogy a tapasztalt különbség magyarázata szimplán az aggregációs folyamat sebességében keresendő. Habár a mintavételezés időbelisége azonos, arra nincs bizonyíték, hogy mindkét rendszerben azonos az aggregációs folyamat sebessége. Erre vonatkozóan még vizsgálatok folyamatban vannak. A folyamat értelmezését tovább nehezíti, hogy a pH beállítása után, savas tartományban, az aggregáció percekben belül bekövetkezik.

5.3. Fehérjékkel stabilizált egy- és kétfémes NCs

Értekezésem további részében fluoreszcens sajátossággal rendelkező, a NPs-nél lényegesen kisebb ($d < 2$ nm), nemesfém NCs tanulmányozása során elért eredményeket mutatom be. E terület hazai viszonylatban egyedinek számít, de nemzetközileg is csak közel 15 – 20 éves múlttal rendelkezik. Az Irodalmi áttekintés fejezetben ismertetett templátos eljárás módosításaként több új, fehérjével stabilizált egy- és kétfémes nanoklaszter előállítási protokollját dolgoztuk ki, ahol a lizozim (LYZ) (P9, P10) és a gamma-globulin (γ G) immunfehérje (P12) alkalmazhatóságát igazoltuk. Mindkét fehérje esetén az egyfémes rendszerek előállítása mellett kidolgoztunk egy eljárást Au/Ag kétfémes NCs (P10)

²² A Cys esetén feltüntetett pK_{s2} és pK_{s3} értékek makroállandók, így nem rendelkeznek egyértelműen az ammónium és tiols csoportok deprotonálódási folyamataihoz. Az irodalomban fellelhető mikroállandók 8,53 és 8,86 [142], így nagy valószínűséggel pH ~ 9-ig még találhatunk a rendszerben ammóniumcsoportot. Jelen rendszer esetén az értelmezést tovább nehezíti, hogy a tiols csoport az arany felülethez (Au-S) kötve található.

reprodukálható módon történő előállítására is. *Az egyes szintézisek kidolgozása és a klaszterek részletes karakterizálása során született nagymennyiségű adathalmazból (ez a jelen 5.3., ill. a későbbi 5.4. és 5.5. fejezetekre is vonatkozik) egy-egy rendszer esetén csak a leginformatívabb eredmények jelennek meg ábraként a dolgozatban.* A tisztított és karakterizált fehérjével stabilizált NCs lehetséges felhasználását is tanulmányoztuk. A LYZ-tartalmú rendszerek esetén azok fluoreszcens jelzőanyagként történő alkalmazásuk lehetőségeit vizsgáltuk poliszacharid-alapú kolloid részecskékkel való kölcsönhatásuk feltérképezése révén (P10, P11), míg a γ G immunfehérje felhasználásával, újonnan kialakított NCs szenzorikai célú alkalmazását bizonyítottuk (P12). Mindezek mellett több fehérjével stabilizált Au NCs citotoxicitási vizsgálatának eredményét is elsőként publikáltuk 3 eltérő sejtvonalon azok biológiai rendszerekben történő felhasználásuk lehetőségének igazolása végett (P13, P14). A főbb eredményeket a következő 3 alfejezetben foglalom össze. *Megjegyzésként említem, ami a későbbi NCs-el kapcsolatos 5.4. és 5.5 alfejezetek mindegyikére vonatkozik, hogy az 1. táblázatban feltüntetett ligandum/fémion kiindulási analitikai koncentrációk a tisztított NCs vizes diszperzióiban már eltérőek; a dialízissal és centrifugálással a fém és a ligandum mennyisége is csökken a végső diszperzióban. Habár a fém mennyisége ICP-MS mérésekkel minden esetben meghatározásra került, de az adott ligandum mennyisége nehezen határozható meg, hiszen egy része a felületen kötött formában található, míg egy másik része a NCs körül, egyfajta második/harmadik adszorpciós réteggént van jelen, és ezen fehérjékkal ill. kismolekulákkal stabilizált „nano-objektum” így alkot egy kinetikai egységet.*

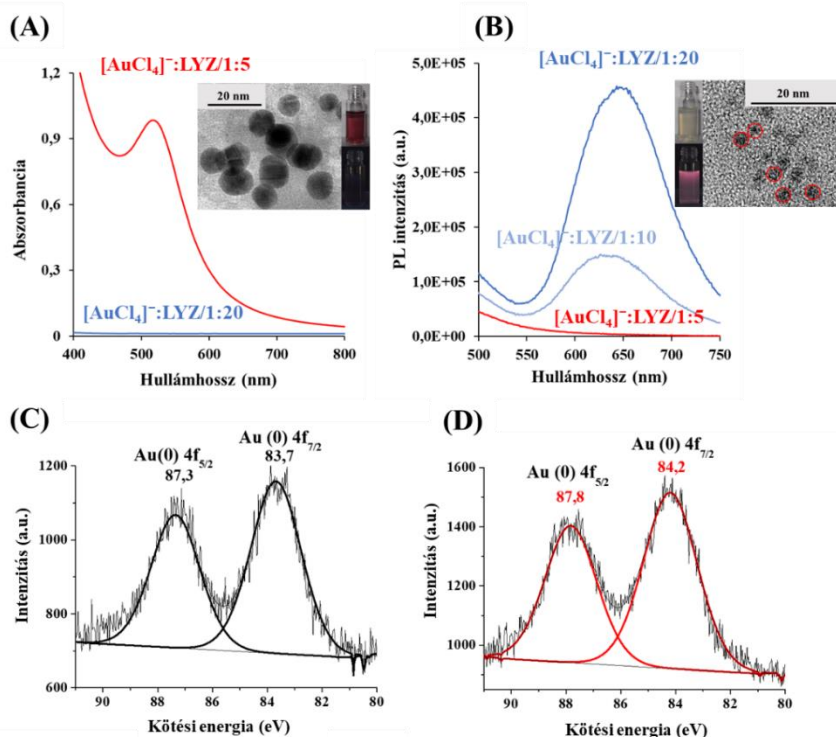
5.3.1. Lizozimmal felületmódosított egy- és kétfémes NCs

A **7. ábra** alapján ismertett protokollt kiegészítve LYZ-mal stabilizált Au NCs (LYZ-Au NCs) előállíthatóságát tanulmányoztuk vizes közegben (P9). Néhány irodalmi hivatkozás már elérhető volt ezen rendszerre [144–146], de mindegyik közleményben ugyanazt a protokollt használták a LYZ-Au NCs előállítására és nem tanulmányozták a fémion/fehérje arányának hatását a képződő nanoszerkezetek méretére, struktúrájára, mely a templátos eljárással történő klaszterszintézis egyik domináns paramétere. Mindemellett a NCs stabilitására sem voltak elérhető adatok, mely biológiai rendszerekben történő felhasználás szempontjából létfontosságú. Munkánk során ezen hiányzó információkra kerestünk válaszokat és átfogóan igyekeztünk értelmezni azokat, hiszen ez volt az első megjelent közleményünk a tématerületen 2016-ban. Mindezek mellett egyetlen publikáció sem volt elérhető, mely kétfémes NCs vizsgálatára irányult volna a nevezett LYZ fehérje felhasználásával.

Az irodalmi protokollokat [144–146] módosítva több aurát(III):LYZ tömegarány (1:2 – 1:20) beállítás mellett végeztük el a NCs előállítását. Azt tapasztaltuk (P9), hogy 1:2 – 1:5 tömegarányok alkalmazása esetén a minták a szintézisidő (18 h) végén piros színt mutattak, ami Au kolloidok kialakulását feltételezte. A nagyobb LYZ felesleg (> 1:10) esetén a minták viszont halvány sárga színnel rendelkeztek. A dialízissal tisztított (P9) termékek látható és fluoreszcencia spektrumai alátámasztották feltételezésünket, miszerint a kisebb fehérje felesleg mellett előállított minták látható spektrumában az Au kolloidokra jellemző LSPR sáv detektálható (pl. $[\text{AuCl}_4]^-$:LYZ/1:5, $\lambda = 528$ nm (**35. ábra (A)**), míg a fehérje mennyiségének növelésével ez a sáv már nem jelenik meg. A plazmonikus tulajdonság

eltűnésével, melynek értelmezését a **12. ábra** kapcsán már részleteztük, párhuzamosan a vizes diszperziók emissziós spektrumában $\lambda_{\text{ex}} = 365$ nm gerjesztés mellett egy új sáv megjelenése figyelhető meg $\lambda_{\text{em}} = 650$ nm-nél ($[\text{AuCl}_4]^-$:LYZ/1:20 (**35. ábra (B)**)), mely a fehérjével stabilizált Au NCs jelenlétét támasztja alá. A fluoreszcens LYZ-Au NCs-re meghatározott QY(%) = 3,8 % és az átlagos PL élettartam ($\tau = 1,90$ μs) az irodalomban publikált korábbi eredményekkel jó egyezésben van [144–146], így ezen optikai adatok részletes jellemzésével nem foglalkoztunk.

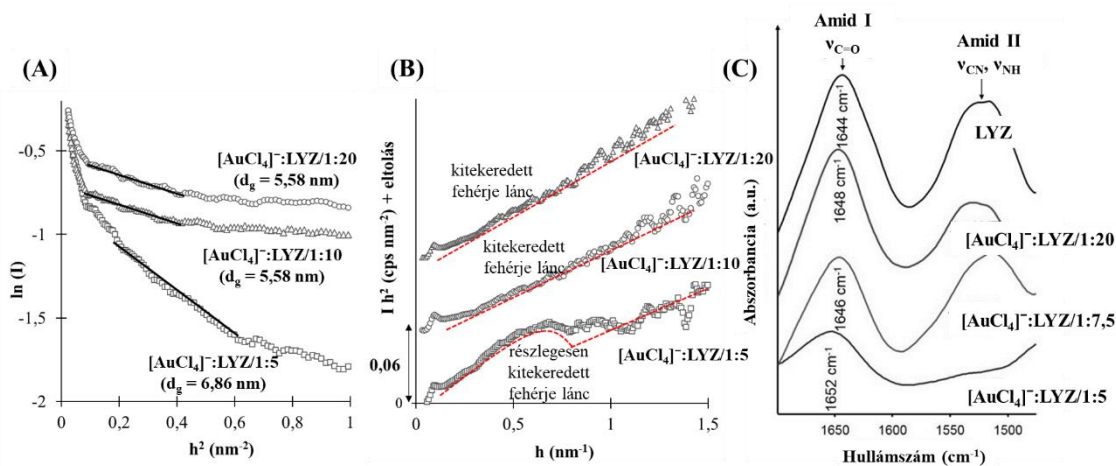
A részecskék és klaszterek átfogó méret, morfológia, és szerkezeti jellemzésére viszont DLS, TEM, XRD, XPS, FT-IR és SAXS mérések is történtek. A DLS mérések jó egyezést mutattak a TEM felvételek által meghatározott adatokkal a LYZ-mal redukált Au kolloidok esetén ($d_{\text{TEM}} = 11 - 12$ nm; $d_{\text{TEM}} = 12 - 18$ nm a fehérjeburok mennyiségétől függően), valamint az XRD diffraktogramokon a $2\Theta = 38,18^\circ$ és $44,28^\circ$ értékeknél detektálható egy-egy reflexió csúcspól a fcc kristályszerzetű kolloidális Au részecskék (111) és (200) Miller-indexű rácssíkjai [JCPDS 4-784] azonosíthatók. Nagyobb fehérjefelesleg alkalmazása mellett már nem jelennek meg az Au NPs-re jellemző karakterisztikus reflexiók, mivel a NCs primer kristallit mérete annyira lecsökken, hogy az XRD mérés technika kimutatási határa (~ 1 nm) miatt azok már nem azonosíthatóak.



35. ábra: Eltérő fémion/LYZ tömegarányok mellett előállított vizes diszperziók látható (A) és emissziós (B) spektrumai ($\lambda_{\text{ex}} = 365$ nm, $c_{\text{Au}} = 0,90$ mM) az $[\text{AuCl}_4]^-$:LYZ/1:5 és $[\text{AuCl}_4]^-$:LYZ/1:20 rendszerekről készített TEM felvételek a minták fotóival szabad fényenél és UV-lámpa alatt. Az $[\text{AuCl}_4]^-$:LYZ/1:5 (C) és 1:20 (D) arányok mellett szintetizált rendszerek XPS spektrumai (P9).

XPS mérések révén igazoltuk, hogy az Au döntően 0 oxidációs állapotban található mindegyik mintában. Irodalmi adatokból ismert, hogy a részecskeméret csökkenésével az

aranyra jellemző kötési energiák a nagyobb értékek felé tolódnak [147]. Míg a plazmonikus tulajdonságú részecskék esetén, a kötési energiák $4f_{7/2} = 83,7$ eV és $4f_{5/2} = 87,3$ eV értékeknek adódtak (**35. ábra (C)**), addig a lényegesen kisebb fluoreszcens klaszterek esetén a kötési energiákra $4f_{7/2} = 84,2$ eV és a $4f_{5/2} = 87,8$ eV határozható meg (**35. ábra (D)**), mely szintén igazolja az eltérő méretű Au nanostruktúrák jelenlétét. Bővebb információkat kívántuk nyújtani a LYZ-mal stabilizált Au NPs és NCs vonatkozásában a fehérje szerkezetváltozásáról a részecske/klaszterképződés után, melyre konzekvens szakirodalmi adatok nem voltak, s melyhez FT-IR és SAXS méréseket végeztünk. Az FT-IR mérések révén az Amid I ($\nu_{C=O}$, $1600 - 1700$ cm^{-1}) és Amid II (ν_{C-N} , ν_{N-H} , $1500 - 1600$ cm^{-1}) sávok helyzete alapján igazolást nyert (**36. ábra (C)**), hogy pH = 12,0 esetén (mely pH-n a klaszterszintézis történt) a tiszta LYZ esetén az Amid I sáv 1644 cm^{-1} hullámszámmal detektálható, míg a LYZ-Au NCs esetén ($[AuCl_4]^-$:LYZ/1:20) az Amid I sáv 1648 cm^{-1} hullámszámra tolódik, ami egy random szerkezet kialakulására utal. A LYZ-Au NPs vonatkozásában ($[AuCl_4]^-$:LYZ/1:5) ezen Amid I sáv pozíciója 1652 cm^{-1} hullámszámmal azonosítható lényegesen kisebb intenzitással (**36. ábra (C)**), míg az Amid II sáv szinte teljesen eltűnik. Ezen változás arra enged következtetni, hogy a fehérje adszorbeálódik az arany NPs felületén.



36. ábra: LYZ-mal stabilizált Au NPs és Au NCs SAXS mérés technika által regisztrált szórás görbéinek Guinier- (A) és Kratky (B) reprezentációi és a liofilizált por mintákról készített FT-IR spektrumok (C) részletei (P9).

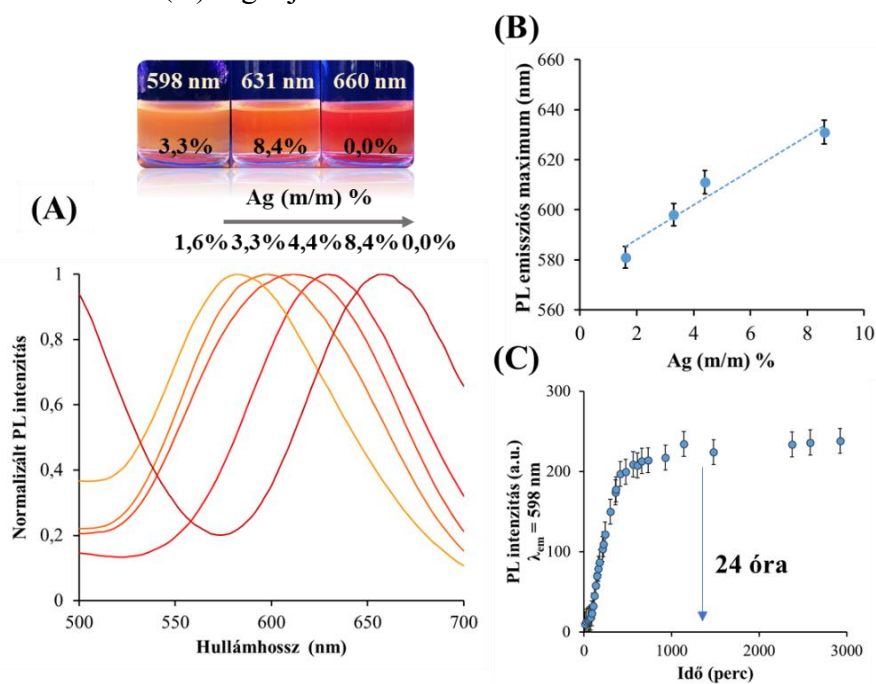
A SAXS szórás görbék Guinier reprezentációjából²³ meghatározható a szférikusnak feltételezett részecske (általánosságban a többfázisú rendszer egy doménjének) girációs sugara (R_g) és átmérője (d_g), mely értékek a DLS mérések eredményeivel mutatnak egymáshoz képesti korrelációt (**36. ábra (A)**). Fontos azonban itt megjegyezni, hogy a **36. ábra (A)** részén feltüntetett egyenes szakasz illesztése nem tökéletes; a meghatározott átlag d_g több méret és szerkezeti forma szórásának összegéből származhat. Mindezek mellett a fehérje mennyiségének csökkenésével a növekvő részecskeméret megállapítható. A Kratky reprezentáció alapján, melyet a **36. ábra (B)** mutat, megállapítottuk, hogy az arany részecskék méretének csökkenésével (amit a fehérje mennyiségének változása határoz meg) a fehérje

²³ $\ln(I(h)) = \ln(I_0) - \left(h^2 \left(\frac{R_g^2}{3} \right) \right)$ egyenlet alapján (I : intenzitás, h : szórásvektor (nm^{-1}), R_g : girációs sugár (nm)).

szerkezetének torzulása egyre nagyobb mértékű. A NPs esetében a fehérjék arany felületre történő adszorpciója részlegesen kitekeredett állapotot eredményez, míg a NCs fehérjébe történő beépülése lényegesen nagyobb mértékű torzult szerkezet kialakulását okozza.

Az egyes rendszerek vizes közegbeli stabilitását is tanulmányoztuk (P9). LYZ-Au NPs-et és LYZ-Au NCs-et tartalmazó vizes közegű mintákat liofilizáltuk, hűtőben ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) tároltuk őket, majd a porokat rediszpergáltuk. A mérések igazolták, hogy míg a vizes minták 3 – 5 hétig eltarthatók a szintézis követően $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, addig liofilizált por formájában akár 1 évvel később is stabil diszperzió készíthető belőlük, ugyanis sem a részecskék/klaszterek mérete, sem a stabilitásra utaló ζ -potenciál értéke (NPs: $-22 \pm 2,2\text{ mV}$; NCs: $-15 \pm 2,5\text{ mV}$) nem változik meghatározóan a liofilizálást és a rediszpergálást követően.

A LYZ-mal stabilizált egyféműs NCs mellett Au/Ag kétféműs NCs (LYZ-Au/Ag NCs) előállítására elsőként dolgoztunk ki egy szintézis protokollt lúgos ($\text{pH} \sim 12$) közegben, ahol tanulmányoztuk a fémion/fehérje arány mellett a fémion koncentráció, a hőmérséklet és a szintézisidő hatását is a képződő NCs szerkezetére, ezáltal optikai tulajdonságára is (P10). A néhány m/m% ezüstöt tartalmazó minta PL emissziós spektrumait a minták UV-lámpa alatti fotójával a **37. ábra (A)** foglalja össze.



37. ábra: LYZ-Au/Ag kétféműs NCs PL emissziós spektrumai (normált) néhány minta UV-lámpa alatti fotójával ($\lambda_{ex} = 370\text{ nm}$) (A) ill. az Ag-tartalom függvényében mért emissziós maximum értékek (B) valamint a 3,3 m/m%-ban ezüstöt tartalmazó minta PL intenzitás értékeinek változása az idő függvényében ($\lambda_{ex} = 370\text{ nm}$) (C) (P10).

Igazoltuk, hogy az ezüst folyamatos beépítésével ($\sim 1\%$ -től $\sim 8\%$ -ig) közel lineárisan változik a detektált PL emissziós maximum hullámhossza (**37. ábra (B)**); a tiszta LYZ-Au NCs vörös emissziója ($\lambda_{em} = 660\text{ nm}$) a narancs tartományba tolódik (**37. ábra (A)**). A hőmérséklet hatásának tanulmányozása során meglepő eredményt kaptunk; a korábbi közel $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os hőmérséklet $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra történő csökkenése különösen kedvező hatással volt a képződő NCs-re, hiszen lényegesen nagyobb PL intenzitás volt detektálható, mely a jobb kitermelésre

utalt. Ennek megfelelően a szintézis hőmérsékletének a szobahőmérsékletet választottuk. Ennek oka a fehérje denaturációjával lehet összefüggésben, ami közel 40 °C-os hőmérsékleten nagyobb mértékű, mint szobahőmérsékleten. A szintézisidő végén, melyet 24 órában állapítottunk meg a **37. ábra (C)** alapján, a dialízissel tisztított termékek részletes optikai karakterizálása érdekében a PL élettartam és QY% tényezők meghatározása is megtörtént. Az eredményeket a megfelelő XPS adatokkal a **6. táblázat** foglalja össze. Reprodukív szintézissel a BSA-alapú kétfémes NCs-et is előállítottuk ugyanazon mérési körülmények mellett, melyek szerkezeti és spektrális adatait is tartalmazza a **6. táblázat**.

6. táblázat: BSA-nal és LYZ-mal redukált Au/Ag NCs főbb optikai tulajdonságai (P10).

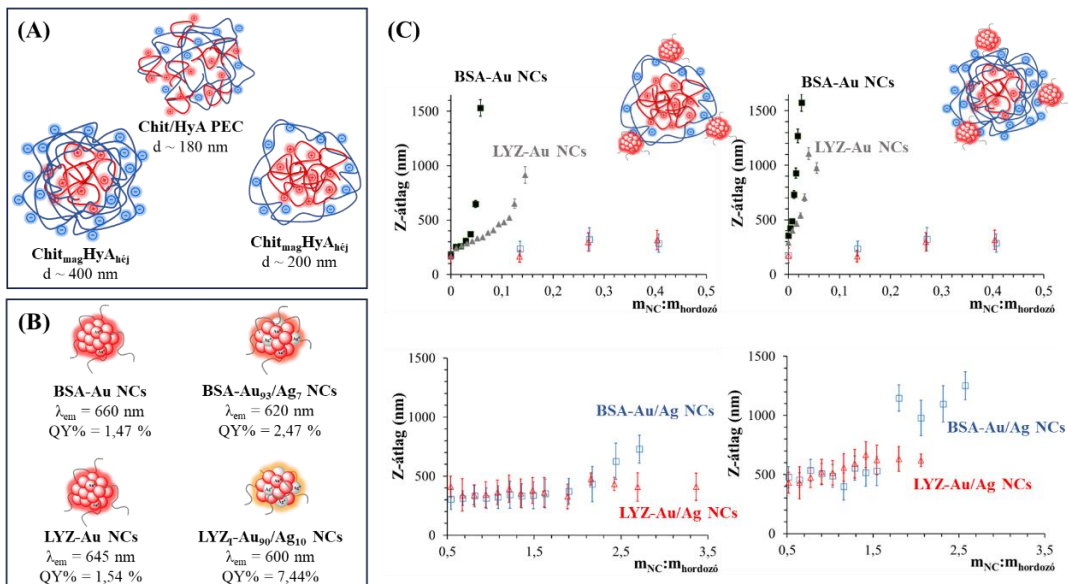
NCs típusa	elemek (m/m%)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	QY (%)	τ_1 (ns)	τ_2 (μ s)	τ_3 (ns)	χ^2
BSA-Au/Ag [#]	Au ₉₃ Ag ₇	365	620	2,46 ± 0,61	63,8 ± 21,7 (2,40 %)	1,53 ± 0,09 (96,64 %)	1,6 ± 0,3 (0,97 %)	1,039
LYZ-Au/Ag I.	Au ₉₀ Ag ₁₀	370	600	7,44 ± 0,59	178,5 ± 70,7 (0,68 %)	5,83 ± 1,24 (99,17 %)	1,5 ± 0,2 (0,16 %)	1,081
LYZ-Au/Ag II.	Au ₉₆ Ag ₄	370	570	4,78 ± 0,34	6,8 ± 0,6 (9,6 %)	0,58 ± 0,03 (80,14 %)	1,3 ± 0,2 (10,26 %)	1,156

[#] BSA-Au NCs: QY(%) = 5,40 %, $\tau_{\text{átlag}} = 1,2 \mu$ s ugyanazon mérési körülmények között meghatározva.

Mindkét fehérje esetén megállapítható, hogy a QY(%) -ra nagyobb értékek adódtak a tisztán egyfémes rendszerekhez képest; a LYZ-Au/Ag I. minta vonatkozásában lényegesen nagyobb, ~ 7,5 % mérhető, ami az Ag beépülésével kialakuló szinergikus hatással magyarázható. A legnagyobb hozzájárulással rendelkező élettartam komponens a τ_2 , amely > 80 – 99 %-kal járul hozzá a teljes fluoreszcencia jelhez. Minden klaszter rendelkezik egy ultrarövid komponenssel (τ_3), mely kb. 1,3 – 1,5 ns, amely a fémközpontú emisszióhoz rendelhető. Az értékek hasonlósága bizonyítja a fémmagok közel azonos kémiai szerkezetét. Ezzel szemben a BSA- vagy LYZ-Au/Ag I. NCs τ_1 komponense, valamint a LYZ Au/Ag II. NCs τ_2 komponense a ligandumközpontú emisszióként azonosítható. A narancssárga emissziójú NCs ultrahosszú, mikroszekundumos tartományú komponensei a ligandumban lévő szomszédos C=O karbonilcsoportok közötti erős $n \rightarrow \pi^*$ kölcsönhatásokra utalnak. A LYZ-Au/Ag II. NCs τ_1 komponense a ligandum-fém-fém töltésátvitel jelenlétéről árulkodik egy fluoreszcencia-perióduson keresztül. A kétfémes NCs szerkezete nagy hasonlóságot mutat az egyfémes rendszerekkel megállapítottakkal (P10), melyeket a LYZ-Au NCs esetében a korábban részletezett SAXS és FT-IR eredmények alapján részleteztünk. A kétfémes rendszerek esetén az FT-IR mérések mellett kiegészítő CD méréseket is végeztünk a fehérje másodlagos szerkezeti elemei arányának a meghatározása végett a szintézis előtt és után. A BSA-tartalmú rendszerek esetében egyértelműen megfigyelhető, hogy az α -hélix-tartalom drasztikusan, 1,7 %-ról 12,9 %-ra csökken, míg az ún. *random-coil* szekvenciák aránya jelentősen, 15 %-ról 45 %-ra nő. Ezzel szemben a LYZ-mal stabilizált rendszerek esetében a fémmagok kialakulása kissé átrendezheti a fehérjeláncok konformációját. Bár az α -hélix szekvenciák mennyisége is csökken, a β -elemek dominánsabbá válnak.

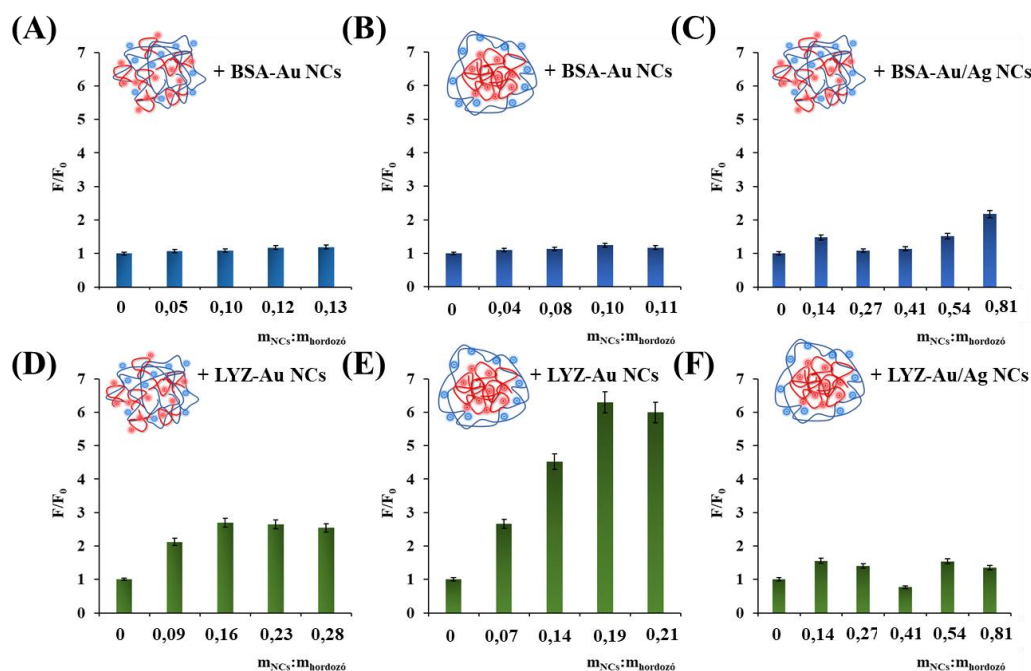
5.3.2. Egy- és kétfémes fehérjével (BSA, LYZ) felületmódosított NCs kölcsönhatása biokolloidokkal: fluoreszcens jelölőként történő alkalmazási lehetőségeik

Kolloidális gyógyszerhordozó részecskék szövetekben való felhalmozódásának nem-invazív kimutatása és nyomon követése fontos szempont, különösen a rákterápiában. A gyógyszerek szelektív *in vivo* felszabadulása – a szövetek kockázatos műtétek során történő eltávolítása és a kísérleti állat feláldozása nélkül is – megfigyelhető a klinikai vizsgálatok megfelelő fázisaiban [148–151]. Az irodalomban egyre több publikáció számol be szerves festékmolekulák (pl. cianin származékok) potenciális fluoreszcens jelzőanyagként (*fluorescent reporters, FR*) történő felhasználásáról a hatóanyagleadás monitorozásában [152,153]. Kiváló FR-ként funkcionáló anyagoknak 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 fehérjével stabilizált Au NCs ezen kívánalmakat teljesítik, így munkánk során megkíséreltük eltérő szerkezetű (PEC vagy mag-héj struktúra) Chit/HyA-alapú biokolloid részecskékkel való kölcsönhatásuk feltérképezését, ahol számos NCs/hordozó arány kialakítása mellett monitoroztuk a kialakult konjugátumok méretét, méreteloszlását DLS mérések révén (38. ábra (C)), ill. a NCs fluoreszcencia változását a kötődés hatására fluorimetriás (39. ábra) és fluoreszcens mikroszkópos technikákkal (P10, P11). Összehasonlítás gyanánt a BSA-Au és BSA-Au/Ag NCs-vel és a LYZ- Au és LYZ-Au/Ag NCs-vel dolgoztunk. A biológiai ablak kritériumnak megfelelően a LYZ-Au/Ag I. jelzésű mintát használtuk. A vizsgált rendszerek sematikus ábráját a 38. ábra (A,B) szemlélteti, mely tartalmazza a biokolloid részecskék átlagos méretét és a NCs főbb optikai adatait.



38. ábra: Eltérő szerkezetű poliszacharid-alapú kolloid részecskék (A) és a fehérjével stabilizált egy- és kétfémes NCs (B) sematikus ábrája a részecskék/NCs főbb adataival, valamint eltérő $m_{NC}:m_{hordozó}$ arány kialakítása mellett a biokolloid/NCs komplex részecskék átlagos hidrodinamikai átmérő (Z-átlag) adatai pH = 4,0 esetén (C).

A komplex adduktumok méretét meghatározva 3 főbb megállapítás tehető: (I) a felületi stabilizáló fehérje anyagi minőségétől függetlenül az egyféműs NCs biokolloid részecskékhez történő hozzáadása már viszonylag alacsony $m_{\text{NC}}:m_{\text{hordozó}}$ arány ($< 0,15$) esetén aggregációt okoz **38. ábra (C, felső kettő)**, míg a kétféműs NCs esetén lényegesen stabil adduktumok jelenléte azonosítható akár $m_{\text{NC}}:m_{\text{hordozó}}$ 1,5 arányig is (**38. ábra (C, alsó kettő)**). (II) A különböző fehérjéket alkalmazva kapott eredmények azt mutatták, hogy a BSA-nal stabilizált NCs alkalmazása esetén következik be nagyobb mértékű aggregáció azonos arány kialakítása mellett. (III) A hordozók méretét és szerkezetét összevetve elmondható, hogy a nagyobb méretű és vastagabb HyA héjjal rendelkező hordozóknál ($\text{Chit}_{\text{mag}}\text{HyA}_{\text{héj}}$, $d \sim 400$ nm) alacsonyabb $m_{\text{NC}}:m_{\text{hordozó}}$ aránynál történik aggregáció. A tapasztalatok értelmezéséhez nyomon követtük a NCs fluoreszcencia intenzitásának változását is a biokolloid részecskékkel való kölcsönhatás következtében; az eredményeket a **39. ábra** foglalja össze.



39. ábra: A 38. (A) és (B) ábrákon feltüntetett poliszacharid-alapú hordozó részecskék és fluoreszcens NCs alkotta komplex részecskék vonatkozásában eltérő $m_{\text{NC}}:m_{\text{hordozó}}$ arány kialakítása mellett mért relatív PL (F/F_0) értékek ($\lambda_{\text{ex}} = 365 - 370$ nm) (P10, P11).

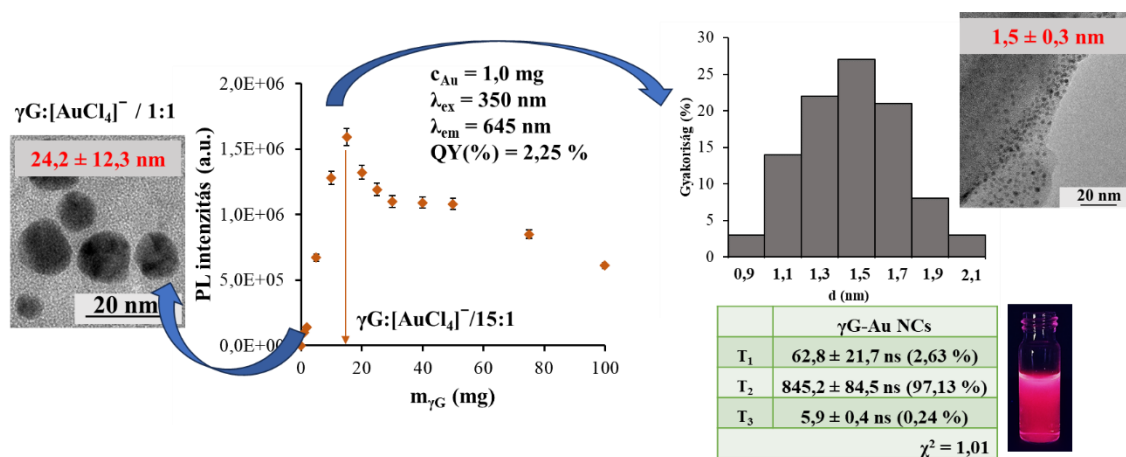
A fentebb tett megállapítások mentén követve a PL intenzitás értékekben bekövetkező változásokat megállapíthatjuk, hogy (I) a BSA-nal stabilizált NCs, legyen az egy- vagy kétféműs, PL intenzitás értékei lényegesen nem változnak meg a hordozó jelenlétében (**39. ábra (A-C)**), míg a LYZ-mal redukált Au NCs esetén jelentős PL erősítés figyelhető meg (**39. ábra (E,F)**). (II) Az egy- és kétféműs rendszereket összehasonlítva a LYZ fehérje esetében igazolható, hogy az egyféműs NCs tartalmú rendszerben nagyobb mértékű az erősítés. A BSA-nal funkcionizált rendszerek nagyobb mértékű aggregációját (már alacsonyabb $m_{\text{NC}}:m_{\text{hordozó}}$ arány esetén is) okozhatja hogy pH $\sim 4,0$ esetén, ahol a jelölés történt, a BSA közel semleges bruttó töltéssel rendelkezik hiszen izoelektromos pontja (i.e.p) $\sim 4,5 - 4,7$ [154]), így azon érték körül nagyobb mértékű aggregáció mutatkozik A LYZ esetén

ezen i.e.p. érték 10,5 – 11,3 tartományban detektálható a fehérje forrástól függően [155], így a LYZ-mal stabilizált NCs jól definiált pozitív töltéssel rendelkeznek. A hordozók típusát összevetve kijelenthetjük, hogy a mag-héj szerkezetű részecskék (negatív töltésű HyA héj) nagyobb mennyiségű pozitív töltésű LYZ-NCs-et képesek megkötni (**39. ábra (F)**), mint a PEC-ek (**39. ábra (E)**), melyhez az elektrosztatikus kölcsönhatás meglehetősen kedvező hatású.

Az egy- és kétfémes rendszerek esetén tapasztaltakat összevetve kijelenthetjük, hogy a kétfémes NCs nagyobb stabilitású komplex adduktumokat képeznek a kolloid részecskékkel – feltehetően a nagyobb mennyiségű felületi fehérje jelenléte és a szobahőmérsékleten történő szintézis miatt, mely révén a protein denaturációja elhanyagolható – így az aggregáció hiányában a PL erősítés nem tapasztalható. Az egyfémes rendszerek esetén az aggregáció az AIE jelenségének kialakulásához vezet, ami magyarázattal szolgál a PL intenzitás erősítésében. Összességében kijelenthető, hogy a NCs fluoreszcens jelölőként történő alkalmazásuk feltérképezéséhez számos aspektus (hordozó méretének változása, NCs fluoreszcencia intenzitás megváltozása stb.) együttes hatásának figyelembevétele szükséges. A detektált fluoreszcencia mikroszkópos felvételekből lényegi (kvantitatív) megállapítások nem tehetők, de igazolható volt, hogy a hordozó részecskék fluoreszcens tulajdonsággal nem rendelkeztek a NCs-vel való kölcsönhatás előtt, míg utána ezek PL jellege detektálható volt. Repräsentatív felvételek a vonatkozó 2 publikációban (**P10, P11**) megtalálhatóak.

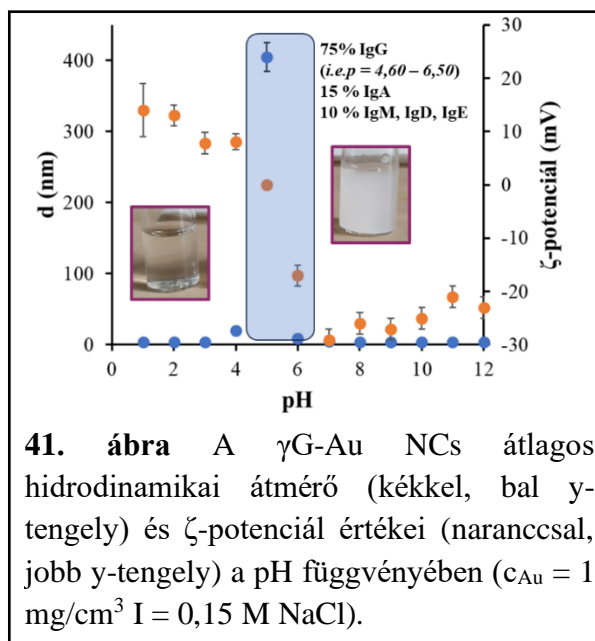
5.3.3. γ -globulin immunfehérjével stabilizált Au NCs

A LYZ fehérjénél kidolgozott protokollt követve, elsőként bizonyítottuk a gamma-globulin (γ G) immunfehérje alkalmazhatóságát Au NCs (γ G-Au NCs) előállíthatóságára (**P12**). A szakirodalomban ezen fehérje(keverék) felhasználásával Au NCs szintézisére nem volt elérhető semmilyen adat. Ahogyan a **40. ábra** is szemlélteti, ezen rendszer esetén is igazolást nyert, hogy a fehérje/fémion arányának (jelen esetben tömegarányának) meghatározó szerepe van a kialakuló NCs képződésére.



40. ábra: Eltérő γ G:[AuCl₄]⁻ tömegarányú vizes diszperziókban a regisztrált PL intenzitás értékek ($m_{Au} = 1,0$ mg, pH = 12,0, t = 24 óra, T = 37 °C), valamint az 1:1 aránynál képződő NPs és 15:1 aránynál kialakuló NCs reprezentatív TEM felvételei a részecskék/klaszterek átlagos átmérő értékeivel. A NCs PL élettartam komponensei és azok hozzájárulási értékei (%) a minta UV-lámpa alatti fotójával (**P12**).

Kis kiindulási tömegarányok esetén ($\sim 1:1$) a fehérjével felületmódosított kolloidális Au NPs megjelenése volt megfigyelhető, melyet igazolt a minta vörös színe és annak abszorbancia spektrumában, $\lambda = 525$ nm-nél megjelenő LSPR sáv. A fehérje mennyiségének növelésével, a vártnak megfelelően, fluoreszcens termék képződése volt a preferált folyamat; a legnagyobb PL intenzitás $\gamma\text{G}:[\text{AuCl}_4]^-/15:1$ kiindulási tömegarány esetén volt detektálható. A fehérje arányának további növelése kedvezőtlenül hatott a fluoreszcens termék képződésére, így ezen $\gamma\text{G}:[\text{AuCl}_4]^-/15:1$ arány mellett állítottuk elő a γG -Au NCs-et lúgos közegben. A dialízissal tisztított termék karakterizálása esetén igazoltuk a NCs jelenlétét, melyet a regisztrált, példaként bemutatott, TEM felvétel is igazol; a NCs átlagos átmérőjére $1,5 \pm 0,3$ nm adódott (DLS, $d_{\text{NCs}} = 4,4 \pm 0,5$ nm). Meghatároztuk a QY(%) és PL élettartam értékeket is, melyek rendre 2,25 %, ill. $T_1 = 62,8 \pm 21,7$ ns (2,63 %); $T_2 = 845,2 \pm 84,5$ ns (97,13 %); $T_3 = 5,9 \pm 0,4$ ns (0,24 %). Az ultra rövid élettartam (T_3) feltehetően a fémmagokra jellemző, míg a T_1 -ként azonosított komponens vélhetően a fémközpontú (*fém* \rightarrow *ligandum*), valamint a T_2 a ligandum központú (*ligandum* \rightarrow *fém*) átmenetekre jellemző. Látható, hogy a legnagyobb

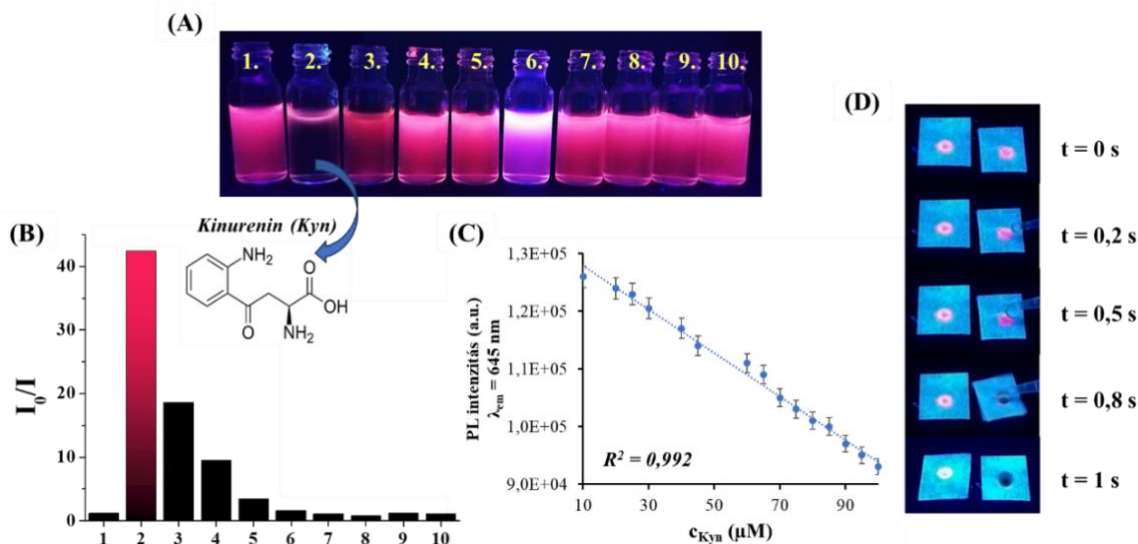


mértékben a *ligandum* \rightarrow *fém* átmenetek járulnak hozzá a fluoreszcenciához. Az XPS mérések igazolták a klaszterekben jelenlévő szub-nanométeres Au⁰-tartalmú magokat (Au 4f_{5/2} = 88,2 eV, Au 4f_{7/2} = 84,5 eV [147]). A fehérje szerkezetét FT-IR és CD mérések révén is jellemeztük, ahol igazolást nyert, hogy az FT-IR spektrumokon, a LYZ-Au rendszerekhez hasonlóan, az Amid I és Amid II sávok rendre γG : 1633 cm⁻¹ és γG -Au NCs: 1630 cm⁻¹ hullámszámoknál jelentkeztek, míg az Amid II sávok a γG : 1531 cm⁻¹ és γG -Au NCs: 1562 cm⁻¹ értékeknél mutattak maximális abszorbanciát. A sávok helyzetéből meghatároztuk, hogy az immunfehérje

fiziológiás körülmények között főleg β -redőket tartalmaz, melyeket a klaszterképződés során beékelődő arany magok nyújtott β -láncokká és β -fordulatokká feszítenek ki. Ezen eredményeket a CD spektroszkópiás mérések is igazolták. A spektrumok Reed-modell szerinti kiértékelése alapján a fémionok redukciója előtt a fehérje ~ 48 %-os β -redő tartalma kb. 20 %-kal csökken a redukció bekövetkezése után kialakult szerkezetben. Ezzel egyidejűleg pedig megnő a β -kanyarok és a rendezetlen szerkezet aránya. Mindezen szerkezeti változások a klasztermagok a fehérje szerkezetébe történő beépülését támasztják alá. A karakterizált Au NCs stabilitásvizsgálatát elvégezve pH = 1 – 12 tartományban (I = 0,15 M (NaCl)) megállapítható a **41. ábra** alapján, hogy pH $\sim 4,5 - 6,5$ tartományban (kék háttérszínnel jelölve) jelentős aggregáció figyelhető meg a mintában (pH = 5,0, d ~ 400 nm, ζ -potenciál ~ 0 mV), amit a fehérjekeverék fő komponensének (75 %, immunglobulin-G (IgG)) adott pH-tartományban lévő izoelektromos pontjával (i.e.p) magyarázhatunk [156], hiszen a fehérje itt a legkevésbé stabilis.

5.3.4. γ -globulin immunfehérjével stabilizált Au NCs szenzorikai lehetőségei

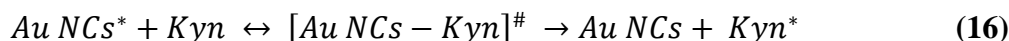
Fehérjével felületmódosított Au NCs-et korábban eredményesen alkalmaztak kismolekulák szelektív és gyors kimutatására; a glükóz [157] mellett a dopamin [158,159], mely egy neurotranszmitter, kimutatására több szenzort is fejlesztettek. A dopamin abnormalis és elégtelen szintjét összefüggésbe hozták már neurológiai rendellenességekkel, melyek a Parkinson-kór vagy az Alzheimer-kór kialakulásához vezethetnek. Egyes idegrendszeri betegségben szenvedő betegeknél alacsonyabb dopamin szintet azonosítottak, mint az egészséges emberi szervezetében normál esetben fennállna; koncentrációja akár néhány nM-os koncentrációra is csökkenhet [158,159]. A SZTE SZAOK Neurológiai Klinikán működő MTA-SZTE Idegtudományi Kutatócsoporttal való együttműködés keretében felmerült egy olyan biokompatibilis szenzor fejlesztésére való igény, mely alkalmas lehet a kinurenin útvonal egyes metabolitjainak (*L*-triptofán (1), *L*-kinurerin (2), 3-hidroxi-*L*-kinurerin (3), kinurénsav (4), xanturénsav (5), antranilsav (6), 3-hidroxi-antranilsav (7), kinolinsav (8), pikolinsav (9), nikotinamid adenin dinukleotid (NAD) (10)) sejtközi térben való érzékelésére. Ahogyan a dopamin esetén részleteztem, ezen metabolikus útvonal esetén is az egyes köztitermékek (1 – 10) koncentrációjának a normál értékektől való, akár már kismértékű, megváltozása közvetett kiváltó oka lehet fentebb említett betegségeknek [160,161], így μ M-os ill. nM-os koncentrációban való gyors azonosításukra, mind PBS közében, mind mesterséges (agyi) cerebrospinális folyadékban (aCSF), kiemelt igény mutatkozik. Szenzorikai vizsgálataink során a γ G-Au NCs ($c_{Au} = 0,25 \mu$ M) kölcsönhatását tanulmányoztuk a fentebb részletezett 10 metabolittal, ahol a metabolitok koncentrációja azonos volt ($c = 1,0$ mM). A NCs fluoreszcencia spektrumait a metabolitok hozzáadása előtt és után megmérve az I_0/I értékeket az adott metabolit esetén a **42. ábra (B)** foglalja össze, mely a mintákról UV-lámpa alatt készített fotókat is mutatja (**42. ábra (A)**).



42. ábra: (A) γ G-Au NCs diszperziók UV-lámpa alatti fotója az (1-10) metabolitok hozzáadása után ($c_{Au} = 0,25 \mu$ M, $c_{metabolit} = 1,0$ mM); (B) Az I_0/I értékek az egyes metabolitok esetén (SD $\pm 2\%$); (C) eltérő $c_{kinurenin}$ (c_{Kyn}) esetén a NCs PL intenzitás értékei ($\lambda_{ex} = 350$ nm, $\lambda_{em} = 645$ nm) és (D) a kialakított γ G-Au NCs-ekkel kezelt papír-alapú szenzor teszt fotója a Kyn ráceseppentésének adott időpillanataiban (P12).

Ahogy a **42. ábra (B)** ábráról megfigyelhető, domináns kioltás a (2) *L*-kinurenin (Kyn) esetén figyelhető meg, valamint részleges kioltás a (3) 3-hidroxi-*L*-kinurenin esetén is mutatkozik, hiszen a két molekula csak egy -OH csoportban különbözik egymástól. A (6) antranilsav maga is egy fluoreszcens sajátossággal rendelkező molekula, így az UV-lámpa alatti fotón ezen sajátossága látszik, de önmaga nem okoz a NCs fluoreszcenciájában változást, ahogy a **42. ábra (B)** is szemlélteti. A legnagyobb kioltást mutató ligandum (Kyn) esetén meghatároztuk a dinamikus tartományt – ahol a ligandum koncentrációjának függvényében a PL válaszjel lineáris változást mutat – (**42. ábra (C)**), mely 15 – 100 μM és a LOD értékét [162] mind PBS, mind aCSF folyadékban, mely 15 μM és 22 μM -nak adódott. A legkisebb kimutatható mennyiség spektrofluorimetriás mérésekkel az $\sim 1 \mu\text{M}$. A folyadék közegű mérések alapján egy papír-alapú gyorstesztként funkcionáló szenzor kialakítását is megvalósítottuk (**42. ábra (D)**), mely révén a Kyn kimutatási határát 5 μM értékre tudtuk csökkenteni (P12). Figyelembe véve a Kyn pontos koncentrációját a humán agy-gerincvelői folyadékban (kb. 3 μM) vagy a vérérszékben (kb. 6-8 μM) rákos megbetegedések esetén [163], a szintetizált NCs potenciálisan alkalmas lehet a Kyn gyors kimutatására ezen koncentráció tartományban.²⁴

A kioltás mechanizmusának értelmezéséhez a dolgozat 20. oldalán lévő 9. lábjegyzet alapján a Stern-Volmer egyenletet ábrázoltuk ($c_{\text{Kyn}} [Q]$ vs. I_0/I), ahol a mérési pontokra egyenes volt illeszthető. Mindemellett a kioltási vizsgálatokat 4 eltérő hőmérsékleten (298, 303, 308, 313 K) elvégezve a Stern-Volmer állandó (K_{SV}) értékére azt kaptuk, hogy azok a hőmérséklet emelésével növekednek (298 K: $4950 \pm 130 \text{ M}^{-1}$; 303 K: $5470 \pm 170 \text{ M}^{-1}$; 308 K: $6070 \pm 140 \text{ M}^{-1}$; 313 K: $6220 \pm 160 \text{ M}^{-1}$), mely a dinamikus kioltásra enged következtetni. A Kyn kötődését a γG fehérjéhez ITC mérésekkel is tanulmányoztuk, de mérhető kölcsönhatást nem tapasztunk. Mindemellett a Kyn kölcsönhatását BSA-nal (BSA-Au NCs) és LYZ-mal stabilizált NCs-ekkel is elvégeztük, melyek szintén kioltást eredményeztek, de esetükben kissé nagyobb, LOD $\sim 40 \mu\text{M}$ adódott, ami szintén a dinamikus kioltást támasztja alá, mely szerint a NCs a ligandummal való ütközés hatására veszítik el többletenergiájukat (**16. egyenlet**).



A 4 eltérő hőmérsékleten meghatározott Stern-Volmer állandó értékek alapján meghatároztuk a kioltási folyamat termodinamikai állandóit is a **17. egyenletnek** (van't Hoff) megfelelően.

$$\ln K_{\text{SV}} = - \frac{\Delta H^0(T^0)}{RT} + \frac{\Delta S^0(T^0)}{R} + \frac{\Delta C_p}{R} \left[\left(\frac{T-T^0}{T} \right) - \ln \left(\frac{T}{T^0} \right) \right] \quad (17)$$

Azért is használtuk a van't Hoff egyenlet ezen formáját, mivel biológiai relevanciájú rendszerekben nem hagyható figyelmen kívül az entrópia és az entalpia hőmérsékletfüggése. A ΔG^{25} negatív értéke (kb. -21–(-23) $\text{kJ} \times \text{mol}^{-1}$) arra utal, hogy a γG -Au NCs és a Kyn közötti kölcsönhatás termodinamikailag kedvező. Mivel a standard entalpiaváltozás (ΔH^0) pozitív ($\Delta H^0 = 14,16 \pm 3,15 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$), a kioltás endoterm, és a reakciópartnerek közötti kioltás egy ún. töltésátviteli folyamaton (*charge transfer*) keresztül történhet (P12). Ez a töltésátvitel feltehetően lehet a gerjesztett elektronok által kiváltott savas protonátvitel a Kyn-ről az

²⁴ Ezen kutatómunkára a SZTE Innovációs Díját is elnyertük 2019-ben a „Leginnovatívabb PhD munka” kategóriában.

²⁵ $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ alapján került meghatározásra.

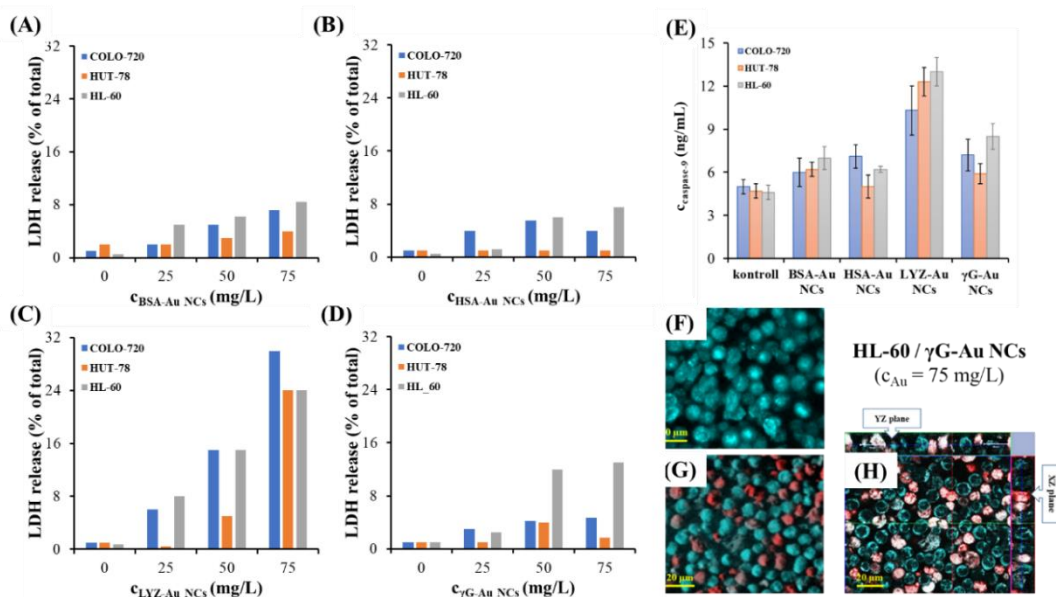
Au-NCs fehérjeburokba, mely során a molekula keto-enol átrendeződése következik be. Ezen folyamat a BSA-Au NCs/dopamin szenzor esetében is bekövetkezik [158]. Enyhe kioltás észlelhető volt a 3-hidroxi-L-kynurenin (3) és a kinurénsav (4) esetén is, mivel ezek viszonylag hasonló kémiai szerkezettel rendelkeznek, mint a Kyn. Mivel az entrópia tag abszolút értéke ($\Delta S^\circ = 0,12 \pm 0,01 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1} \text{K}^{-1}$) minden mért hőmérsékleten nagyobb, mint az entalpia tag ($|T\Delta S^\circ| > |\Delta H^\circ|$), a kioltás feltehetően entrópia által vezérelt. A metabolitok kölcsönhatását olyan γ G-nal stabilizált nemesfém NCs-ekkel is elvégeztük, melyek 15 m/m%-ban ezüstöt is tartalmaztak (γ G-Au₈₅/Ag₁₅ NCs)²⁶, mely során azt tapasztaltuk, hogy a Kyn szelektivitás a kinurénsavra tolódik át, de továbbra is megmarad a 3-hidroxi-L-kinurenin részleges kioltása, mely szintén a töltésátviteli folyamat kialakulását igazolja a ligandum(ok) és NCs között. A kutatómunkát folytatva új vegyületcsalád vizsgálatát is tervezzük elvégezni, hogy még átfogóbb képet kapjunk a mechanizmus vonatkozásában és hogy még inkább javítsuk a szelektivitást és a LOD értékét.

5.3.5. Fehérjével felületmódosított Au NCs citotoxicitási vizsgálatai

Orvosbiológiai alkalmazást szem előtt tartva négy elérő fehérjével (BSA, HSA, γ G, LYZ) redukált és stabilizált Au NCs citotoxicitási tulajdonságait is tanulmányoztuk HL-60 leukémia és COLO-720 L ill. HUT-78 limfocita sejtekre (P13, P14). A fehérjék típusától függetlenül valamennyi NCs intenzív vörös emisszióval ($\lambda \sim 640 - 650 \text{ nm}$), hasonló méretű fémmaggal (kb. 1,4 nm) és negatív felületi töltéssel rendelkező pH = 7,4 esetén. A sejtek klaszterekkel történő kezelése során a mitokondriális aktivitás, a membrán integritásának, valamint a gyulladáshoz és apoptózishoz mediátorok szekréciójában bekövetkező változásokat tanulmányoztuk. Megállapítást nyert, hogy a fehérjével felületmódosított NCs csekély toxikus hatást mutattak a HL-60 sejtekre. A klaszterek nem indukáltak proinflammatorikus folyamatokat, érzékelhető oxidatív stresszt okoztak, és az apoptózist is fokozták. A legkedvezőtlenebb a LYZ-mal stabilizált Au NCs HL-60 sejtekre gyakorolt hatása volt a caspase-9 teszt alapján (43. ábra (E)). Az egyes sejtek membránjainak integritását az Au NCs-ekkel való expozíciót követően a felszabaduló laktát-dehidrogenáz (LDH) mennyiségének mérésével határoztuk meg. Mivel ez a citoszolikus enzim a sejtmembrán mechanikai károsodása és a sejtthálé következtében kiválasztódik a környezetbe, ezért az extracelluláris LDH szintjét mérve (*LDH release (% of total)*) az a NCs citotoxicitás indikátoraként szolgál. Az eredményeket a 43. ábra (A-D) mutatja be, amely azt jelzi, hogy az LDH kiválasztása nemcsak az Au NCs koncentrációjától, hanem a felületi rétegben lévő fehérje anyagi minőségét is függ. Mint látható, a BSA- és a HSA-Au NCs indukálják a legkisebb LDH felszabadulást. A γ G-Au NCs hatása mérsékelt, míg a LYZ-Au NCs mutatják a legnagyobb mértékű LDH felszabadulást. A LYZ-Au NCs esetében a felszabaduló LDH mennyisége kb. 8 %-ról 24 %-ra nőtt 25 mg/L, ill. 75 mg/L Au-tartalmú koncentrációk alkalmazásakor (43. ábra (C)), HL-60 sejtek esetén). Igazolván, hogy a HL-60 sejtek nem sérülnek a γ G-Au NCs-ekkel való kezelés után konfokális mikroszkópos felvételek is készítettünk (43. ábra (F-H)). Amint a regisztrált képekből látható, nem minden sejt tartalmazza a NCs-et, hiszen

²⁶ Publikálás alatt lévő eredmények (2023. 10. 05.), melyre a SZTE Innovációs Díját is elnyertük ismételtelen a „Leginnovatívabb TDK munka” kategóriában 2023-ban.

néhány sejt érintetlen marad; az Au NCs-et tartalmazó HL-60 sejtek piros színűek, az Au NCs-et nem tartalmazó sejtek pedig ciánkék színt mutatnak.



43. ábra: Az LDH (A-D) és a caspase-9 (E) tesztek eredményei, valamint példaként bemutatott konfokális mikroszkópos felvételek a HL60- γ G-Au NCs rendszerről (F: kezelés előtt, felületi nézet, G: kezelés után, 3D nézet, H: *ortho-mapping* módban) (P13, P14).

Az orto-tervezett képek a Z-képhalmazt ábrázolják ortogonális nézetben, amely a sejtek Z irányú keresztmetszetét mutatja. A képek alapján megállapítható, hogy az Au NCs a sejtek teljes térfogatában, és nem csak a sejtfelületeken dúsulnak fel. Továbbá a HL-60 sejtek morfológiája változatlan maradt, ami szintén a mechanikai károsodás hiányának bizonyítékeként értékelhető. A limfocita sejtek tanulmányozásakor igazoltuk, hogy a LYZ-Au NCs kivételével a többi klaszter nem mutatott erős proinflammatorikus és apoptotikus tulajdonságokat. A malondialdehid kiválasztását a LYZ- és γ G-Au klaszterek fokozták. A tumor nekrosis faktor fokozott szekréciója a B limfociták által, a kontrollhoz képest, független volt a klaszterek típusától. Megállapítást nyert, hogy bár az Au NCs nem gyakoroltak jelentős hatást a limfociták életképességére, nemkívánatos sejt folyamatokat stimulálhatnak, ami egyértelműen a stabilizáló fehérjék anyagi minőségétől függ (P13, P14). A LYZ esetén kiváltott nagyobb sejt érzékenység magyarázható azzal, hogy a LYZ jól ismert antimikrobiális tulajdonsággal rendelkezik, míg a szérum fehérjék ill. az immunfehérjék sokkal inkább mutatnak kiemelkedő biokompatibilis jelleget, hiszen szervezetünkben nagy mennyiségben megtalálhatóak.

5.4. Aminosavakkal stabilizált fluoreszcens arany és ezüst nanoszerkezetek

A szakirodalom meglehetősen hiányos volt a fehérjéket felépítő aminosavak individuális szerepéről az Au NCs előállíthatóságára vonatkozóan a templátos eljárás alapján, így munkánk során ezeket a hiányosságokat kísérletük meg átfogóan feltérképezni és értelmezni. Tanulmányoztunk egyrészt:

- (a) tiol oldallánccal rendelkező: Cys, Cys-Trp, GSH (P8)

(b) aromás oldallánccal rendelkező: His, Trp, Tyr, Phe (P15-P17)

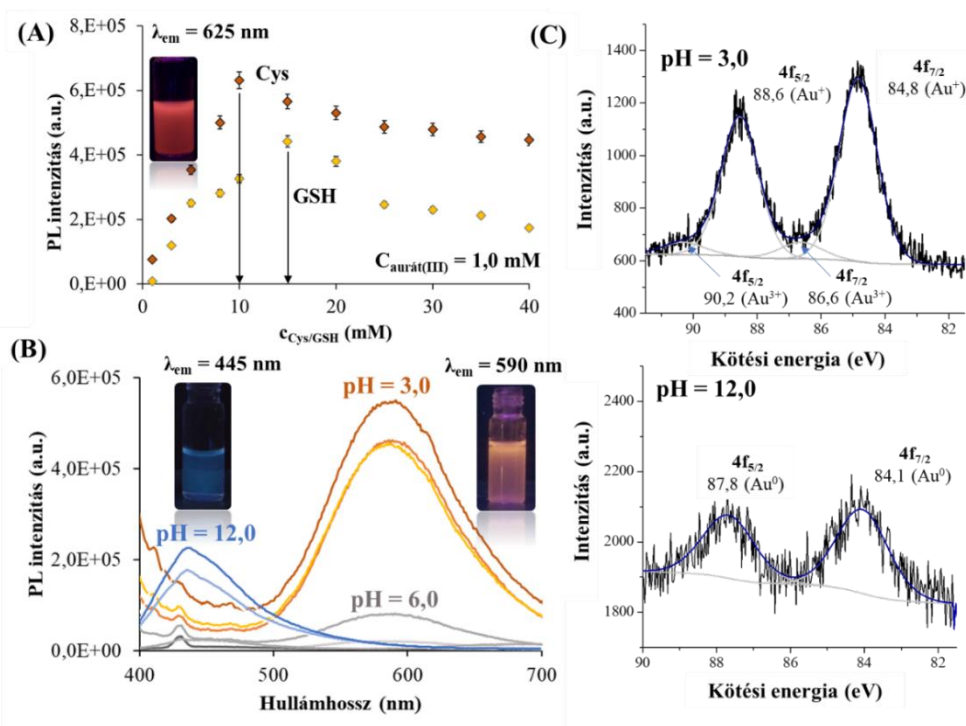
(c) oldalláncban alifás-N tartalmú: Gln, Arg (P16) lehetséges szerepét Au ill. néhány esetben Ag NCs előállítására vonatkozóan.

5.4.1. Tiolcsoportot tartalmazó aminosavak és kispeptidek kölcsönhatása aurát(III)ionokkal

Az aurát(III)ionok Cys aminosavval [60] és GSH tripeptiddel [114,164] való kölcsönhatására volt 2-3 szakirodalmi közlemény. A Cys vonatkozásában Söptei B. és mtsai. igazolták, hogy narancs emisszióval rendelkező, lamellás szerkezetű, Au(I)-tartalmú koordinációs polimer struktúra kialakulása valószínűsíthető (**8. ábra**), ahol a lamellák távolságára 1,30 nm értéket határoztak meg röntgenszórásos mérések révén [60], de a fluoreszcens termék előállítási körülményei (fémion/Cys molarány, pH) változtatásának hatását nem tanulmányozták. A GSH vonatkozásában extrém lúgos (pH ~ 12) közegben állítottak elő GSH-nal stabilizált Au NCs-et (GSH-Au NCs) [114,164], de ezen rendszer esetén sem voltak elérhetőek kísérleti adatok a preparálási körülmények optimalizálására vonatkozóan, mely reprodukív szintézis protokollok kidolgozásához elengedhetetlen. Munkánk során egy átfogó képet kívántunk nyújtani ezen tioltartalmú ligandumok (Cys, GSH) klaszterképző hatására. Emellett, új rendszerként, egy szintetikus előállított Cys-Trp dipeptid aurát(III)ionokkal való kölcsönhatást is feltérképeztük, hogy meghatározzuk, hogy egy aromás oldalláncú Trp jelenléte hogyan változtatja meg a tisztán Cys-tartalmú rendszerhez képest képződő koordinációs polimer szerkezettel rendelkező termék(ek) szerkezetét és hogy képes-e a redukciós folyamatot átlendíteni a NCs képződésének irányába (P8). Először a ligandumok arányának hatását tanulmányoztuk részletesen az aurát(III)ionokkal való kölcsönhatás kapcsán; az eredmények közül a Cys és GSH rendszer esetén kapott adatokat a **44. ábra (A)** foglalja össze. Jól látható, hogy ligandum/fémion molaránynak meghatározó szerepe van a fluoreszcens termékek képződésére, ahogyan azt a **44. ábra (A)** is szemlélteti; a Cys esetén Cys:[AuCl₄]⁻/10:1 ($\lambda_{ex} = 395$ nm, $\lambda_{em} = 620$ nm), míg a GSH:[AuCl₄]⁻ rendszerben 15:1 ($\lambda_{ex} = 375$ nm, $\lambda_{em} = 590$ nm) molarány esetén detektálható a legnagyobb PL intenzitás, ami irodalmi adatokkal jó egyezésben Au(I)-tartalmú koordinációs polimer (Cys-Au(I) CP és GSH-Au(I) CP) struktúra jelenlétét igazolta savas körülmények mellett (Cys-Au(I) CP: PL élettartam = 2,0 μ s; irodalmi: 2,5 μ s [60]).²⁷ A ligandum mennyiségének növelése ill. csökkentése esetén a PL intenzitás minden esetben csökkenő tendenciát mutatott, de nem eredményezte újabb termékek megjelenését. A Cys-Trp rendszer vonatkozásában azonban azt tapasztaltuk, hogy a molarányok változtatása révén a képződő termékek hangolható optikai tulajdonsággal rendelkeztek, melyet a Trp jelenléte szabályozhat. A Cys-Trp:[AuCl₄]⁻/20:1 beállítás mellett kéken emittáló, viszonylag kis PL intenzitással rendelkező termék(ek) képződése volt megfigyelhető (QY% = 0,7 %, PL átlag élettartam = 3,0 ns, $\lambda_{ex} = 378$ nm, $\lambda_{em} = 470$ nm), de a dipeptid arányának csökkenése révén a fluoreszcens termék kialakulása egyre kevésbé volt meghatározó; Cys-Trp:[AuCl₄]⁻/1:0,5 arány esetén már nem is képződött. Ezzel ellentétben a minta piros színre változása NPs megjelenésére utalt, amit az abszorbancia

²⁷ A minták intenzív fényszórása miatt a QY(%) nem volt mérhető egyik rendszer (Cys, GSH) esetében sem.

spektrumban megjelenő LSPR sáv ($\lambda = 518 \text{ nm}$) kialakulása is igazolt ($d_{\text{TEM}} = 8,2 \pm 1,6 \text{ nm}$, $d_{\text{DLs}} = 9,2 \pm 1,0 \text{ nm}$) (P8).

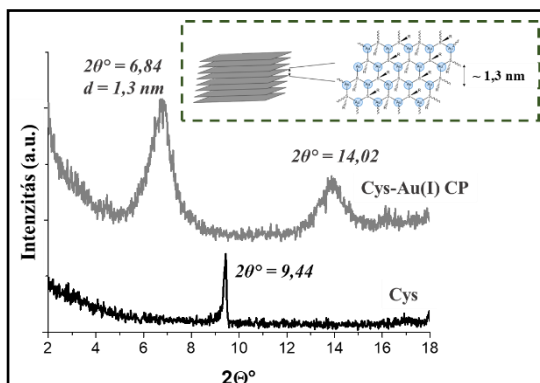


44. ábra: (A) Cys:[AuCl₄]⁻ és GSH:[AuCl₄]⁻ rendszerekben képződő termékek PL intenzitás értékei a ligandumok koncentrációjának függvényében ($c_{\text{aurát(III)}} = 1,0 \text{ mM}$, Cys: $\lambda_{\text{ex}} = 395 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 620 \text{ nm}$; GSH: $\lambda_{\text{ex}} = 375 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$, pH = 4,0) a Cys-tartalmú diszperzió UV-lámpa alatti fotójával; (B) A GSH:[AuCl₄]⁻ rendszerben képződő termékek emissziós spektrumai eltérő pH értékeken a minták UV-lámpa alatti fotóival pH = 3,0 és pH = 12,0 esetén; (C) A GSH:[AuCl₄]⁻ rendszerek XPS spektrumai a feltüntetett pH értékeken (P8).

A molarány mellett a pH hatását is tanulmányoztuk részletesen pH = 1 – 12 tartományban, melyre szintén nem voltak elérhető adatok. A Cys vonatkozásában egyértelműen a savas közeg (pH ~ 1 – 3) kedvező a CP struktúra kialakulására, a pH növelésével egyre kisebb PL intenzitás volt detektálható; pH > 8,5 felett már egyáltalán nem volt megfigyelhető. A Cys-Trp vonatkozásában a pH-függés tanulmányozása során megállapítottuk, hogy annak nincs lényeges hatása a kéken emittáló termékek képződésére. A GSH esetén azonban, ahogyan azt a **44. ábra (B)** is szemlélteti, lényeges változások figyelhetők meg a pH hangolása révén. Savas pH-tartományban (pH = 3) a korábban ismertett GSH-tartalmú Au(I) CP szerkezet jelenléte igazolható ($\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$), ahol az Au(I) jelenléte XPS mérések révén is igazolást nyert (**44. ábra (C)**). Megfigyeltük továbbá, hogy a pH növelése révén ezen emissziós sáv intenzitása fokozatosan csökken, pH ~ 8 esetén már egyáltalán nem detektálható. Ezzel ellentétben a pH további növelése (pH > 11) egy új sáv megjelenését indukálta ($\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$). Ezen minta elemzése révén az XPS mérések már egyértelműen az Au⁰ jelenlétét igazolták (**44. ábra (C)**), mely alapján néhány atomos GSH-nal stabilizált Au NCs (GSH-Au NCs) képződése feltételezhető pH = 12 esetén. A folyamat magyarázatoként a GSH erősen pH-függő redox tulajdonsága adhatna

magyarázatot²⁸ (pH = 3,0: E = 0,0307 V, pH = 12,0: E = - 0,2098 V). Az értelmezéshez természetesen figyelembe kell venni az adott pH-n releváns [AuCl₄]⁻/Au⁺ ill. az [Au(OH)₄]⁻/Au⁰ rendszerek redoxpotenciáljának pH függését is. Savas közegben meghatározóan a *tetrakloro* forma van jelen (pH = 3,0: E([AuCl₄]⁻/Au⁺) = 0,926 V) [165], míg extrém lúgos közegben a *tetrahidroxo* (pH = 12,0: E([Au(OH)₄]⁻/Au⁰) = 0,60 V) forma a domináns [166]. A két redox potenciál különbsége a kétféle pH-n közel azonos, mely alapján lényeges különbség nem igazolható. Az eltérő mechanizmus oka sokkal inkább keresendő a ligandumcsere reakció (pH-tól függően a kiindulási aurát(III) *tetrakloro* vagy *tetrahidroxo* formája) és a redox reakció közötti versengő folyamattal [167,168]. Az aurát(III)ionok tiol-tartalmú ligandumokkal való redukciója során átmenetileg Au⁺-ionokat-tartalmazó speciestek képződnek és savas közegben sokkal inkább „megáll” a folyamat ezen Au(I)-tiolát komplexek, vagy akár a fentebb említett koordinációs polimer struktúra kialakulásánál, míg lúgos közegben lényegesen gyorsabban átlendül a folyamat az Au⁰ forma eléréséig. Ez magyarázza a GSH-tartalmú rendszerben képződő eltérő szerkezetű termékek megjelenését savas és lúgos körülmények között.

A termékek szerkezet vizsgálatához további FT-IR, XRD és ESI-MS méréseket végeztünk. Az FT-IR mérések mindegyik minta esetén igazolták a fémionok tiolcsoporton keresztüli kötődését, hiszen a karakterisztikus -SH rezgések (hajlító és nyújtó), ami pl. a Cys spektrumában 942 cm⁻¹ és 2549 cm⁻¹ (a Cys-Trp esetén 2554 cm⁻¹) értéknél detektálhatóak a fluoreszcens termékeket is tartalmazó rendszerek spektrumában nem jelentek meg, mely az



45. ábra: A Cys és Cys-Au(I) CP XRD diffraktogramjai a fém-tartalmú rendszerben feltételezhetően kialakuló szerkezettel.

Au(I)-S kötés kialakulását erősítette meg. A Söptei és mtsai. által röntgenszórásos mérésekkel meghatározott 1,3 nm-es lamella távolságot a Cys-Au(I) CP rendszerben XRD mérésekkel támasztottuk alá (45. ábra). A Cys-Trp rendszerben képződő kéken emittáló termékek azonosítása érdekében ESI-MS méréseket is végeztünk, de a néhány atomos NCs jelenlétét nem sikerült igazolni. Kimutatható volt azonban a Cys-Trp (m/z = 308,1) dimerje (m/z = 613,2) és tetramer (m/z = 1225,4) formája és ezek Au(I)-ionnal alkotott komplexei (Au(Cys-Trp)₂)⁺: m/z = 811,2; (Au(Cys-Trp)₄)⁺: m/z = 1423,5), így feltehetően

az Au(I)-tartalmú komplexek képződése a preferált folyamat. Összességében elmondható, hogy a Trp nagy térkitöltésű aromás oldalláncának jelenléte meggátolja az önszerveződő lamellás koordinációs polimer struktúra kialakulását a Cys-Trp dipeptid esetében, és habár a Trp képes az aurát(III)ionokat Au⁰-vá redukálni, de a Cys jelenlétében a tiolcsoporton keresztüli kötődése a fémionnak preferáltabb, mint az aromás oldalláncra történő kötődés, és így klaszterképződés helyett csak egy részleges redukció történik.

²⁸ $E = 0,0622 - \frac{RT}{F} pH - \frac{RT}{F} \log c_{GSH}$

5.4.2. Aromás oldalláncú aminosavak kölcsönhatása aurát(III)- és ezüst(I)ionokkal

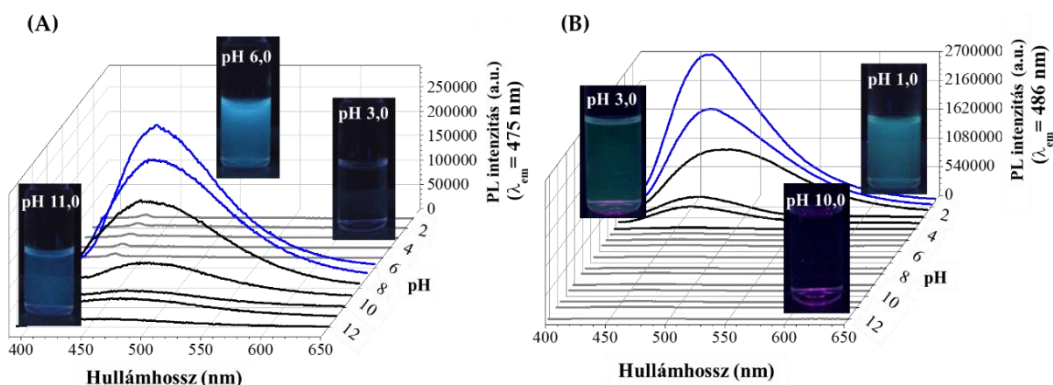
Aromás oldalláncú aminosavak kapcsán a His-[AuCl₄]⁻ (P15), a Trp-[AuCl₄]⁻ (P15) valamint a Phe-[AuCl₄]⁻ (P16), a Phe-[Ag]⁺ (P16) és a Tyr-[Ag]⁺ (P17) rendszereket tanulmányoztuk. A His-t [52–54], Trp-t [58,169] és Tyr-t [55] tartalmazó rendszerekre szakirodalmi hivatkozások találhatóak, de sok esetben ellentmondásosak és részletes szintézis optimalizálással egyik esetben sem foglalkoztak, így munkánk során számos kísérleti körülmény (fémion/aminosav arány, fémion koncentráció, pH, hőmérséklet, reakcióidő) hatását tanulmányoztuk először a képződő termékek szerkezetére és optikai tulajdonságaira és ezáltal az egyes folyamatok mechanizmusát is igyekeztük feltérképezni és új, meghatározó tudományos adatként publikálni.

Arany-tartalmú rendszerek

Irodalmi adatok alapján a Trp-[58,169] és a His-tartalmú rendszerben [52–54] volt várható az Au NCs képződése a nevezett aminosavak aurát(III)ionokkal való kölcsönhatásának eredményeképpen, de részletes vizsgálataink révén nem ez igazolódott. Mindhárom rendszer esetén a ligandumok aurát(III)ionokkal való kölcsönhatása eltérő ligandumfelesleg mellett, kéken-zölden emittáló fluoreszcens termékek megjelenését eredményezte; a fémion/aminosav molarányfüggés vizsgálata során igazolást nyert, hogy a legnagyobb PL intenzitással rendelkező termék a His:[AuCl₄]⁻ rendszerben 30:1 (P15), a Phe:[AuCl₄]⁻ vonatkozásában 20:1 molarányok (P16) beállítása mellett érhető el. A molarányok változtatása az optimálisnak megállapított értékekhez képest (a ligandum mennyiségének csökkentése vagy növelése esetén is) lényegesen csökkenti a PL intenzitást. A Trp vonatkozásában viszont egy érdekes, korábban a szakirodalomban le nem írt sajátságot sikerült igazolni. A Trp:[AuCl₄]⁻ arányok növelése 1:1 – 15:1 tartományban szisztematikusan csökkenti a detektált PL emissziós sáv hullámhossz értékét ($\lambda_{em} = 497$ nm (1:1); $\lambda_{em} = 486$ nm (5:1); $\lambda_{em} = 475$ nm (15:1)), ami magyarázható azzal, hogy az egyre nagyobb ligandum felesleg kialakítása miatt a képződő Au magok növekedése szterikusan is gátolt, így egyre kevesebb Au atom alkotja a NCs-et, amit a csökkenő hullámhossz értékek is igazolnak. A His és Trp esetén a szintézis 24 h alatt 37 °C-on kivitelezhető, de a Phe vonatkozásában csak 80 °C-on és 6 napos szintézisidő eredményezi a kéken emittáló termék képződését. Az aminok, mint az aminosavak is, kiváló redukáló ágensként funkcionálnak, melyet elősegít az oldalláncban lévő aromás-N donorcsoport (mint az imidazol vagy az indol gyűrű) további jelenléte, de a Phe esetén ezen nitrogén hiánya kedvezőtlenül hat a ligandum redukciós sajátságára, amit a magasabb reakcióhőmérséklet és a hosszabb szintézisidő is alátámaszt.

A molarányok, a szintézis hőmérséklet és a reakcióidő beállítása mellett a pH domináns hatását is tanulmányoztuk. A Phe-tartalmú rendszerben meghatározóan csak extrém lúgos pH értéken (pH = 11 – 12) indul el a kéken emittáló Phe-AuNCs képződése (Phe:[AuCl₄]⁻ = 20:1, $\lambda_{em} = 430$ nm, QY% = 3,31 ± 0,18 %, $\tau_{\text{átlag}} = 0,92 \pm 0,14$ ns), mely azon általánosan leírt tulajdonsággal van kapcsolatban, hogy az aminosavak esetén azok redukciós képessége a pH emelésével kedvezőbb, melyet a Tyr, Trp és Phe esetén fotoemissziós technikák révén meghatározott ionizációs energiák értéke is alátámaszt [170]. A Trp és a His esetén teljesen más hatást azonosítottunk, melyek eredményét a 46. ábra mutatja. A Trp esetén a klaszterképződést is extrém lúgos közegben kíséreltük meg, de ahogyan a

46. ábra (B) is szemlélteti, pH > 4 felett (az aurát(III)ionokhoz képesti Trp ligandumfelesleg esetén) semmilyen fluoreszcens termék képződése nem detektálható. Lúgos közegben (pH ~ 12) azt tapasztaltuk, hogy ha a Trp koncentrációját az oldatban csökkentettük és elértük a Trp:[AuCl₄]⁻/0,4:1 arányt, akkor a minta színe pirosra változott, ami Trp-nal redukált Au NPs képződését igazolta ($\lambda_{\text{LSPR}} = 530 \text{ nm}$; $d_{\text{TEM}} = 7,8 \pm 0,3 \text{ nm}$; $d_{\text{DLS}} = 8,8 \pm 1,0 \text{ nm}$ (PDI = 0,210); $\zeta = -21 \pm 2,5 \text{ mV}$). Mivel nem alkalmaztunk nagyobb ligandumfelesleget a göcképződés utáni göcnövekedést a Trp jelenléte nem tudta sztérikusan gátolni, így részecskeképződésig ($d > 2 \text{ nm}$) ment a folyamat.

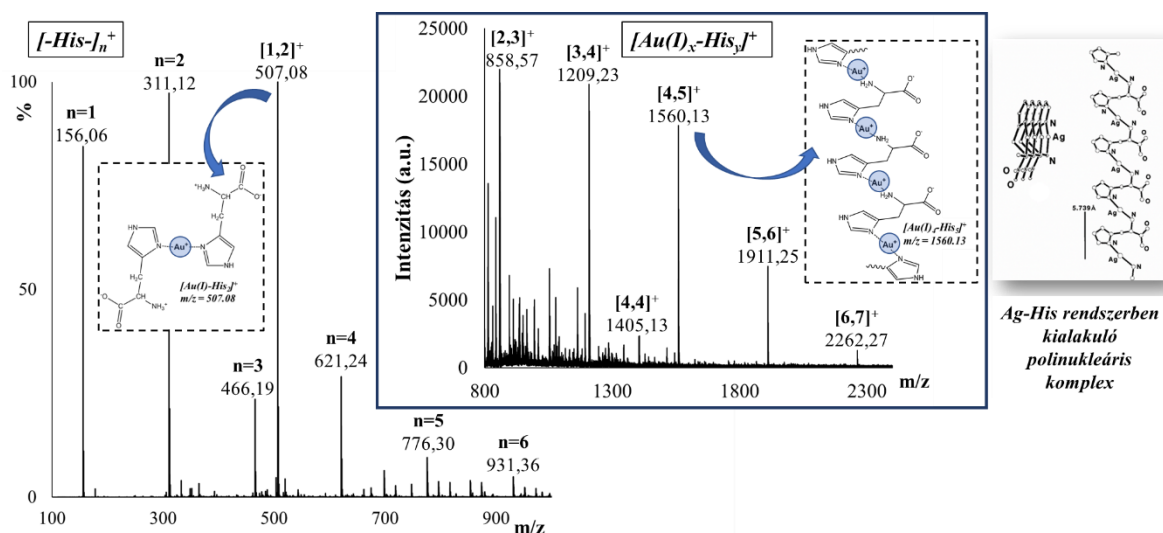


46. ábra: A His:[AuCl₄]⁻/30:1 (A) és Trp:[AuCl₄]⁻/5:1 (B) rendszerekben a diszperziók emissziós spektrumai eltérő pH értékek esetén néhány minta UV-lámpa alatti fotójával (T = 37 °C, $\lambda_{\text{ex}} = 378 \text{ nm}$, $c_{\text{aurát(III)}} = 1,0 \text{ mM}$) (P15).

A Trp mennyiségének növelésével (legalább 1:1 molarány kialakítása szükséges) párhuzamosan a pH-t is változtattuk széles tartományban, és ahogyan a **46. ábra (B)** is mutatja, extrém savas (pH ~ 1 – 2) közegben indul meg a fluoreszcens termékek képződése (Trp:[AuCl₄]⁻/1:1, $\lambda_{\text{em}} = 497 \text{ nm}$, QY% = 1,1 %, $\tau_{\text{átlag}} = 5,7 \text{ ns}$; Trp:[AuCl₄]⁻/5:1, $\lambda_{\text{em}} = 487 \text{ nm}$, QY% = 1,3 %, $\tau_{\text{átlag}} = 8,8 \text{ ns}$; Trp:[AuCl₄]⁻/15:1, $\lambda_{\text{em}} = 472 \text{ nm}$, QY% = 1,7 %, $\tau_{\text{átlag}} = 8,3 \text{ ns}$). A klaszterképződés hajtóereje extrém savas közegben a Trp oldalláncában lévő indolgyűrű autopolimerezációs folyamatával magyarázható [169]. A mechanizmus igazolásának érdekében ESI-MS és MALDI tömegspektrometriás méréseket is végeztünk, ahol a Trp monomerje ($m/z = 205,09$) mellett dimerje ($m/z = 409,19$) ($m/z = 817,36$) formája is kimutatható volt, mely a feltételezett mechanizmust támasztotta alá. MALDI tömegspektrometriás mérései körülményeink mellett néhány NCs jelenléte is igazolható volt: [Au₃] = 591,330 m/z ; [Au₃-Trp]⁺ = 793,394 m/z ; [Au₅-Trp]⁺ = 1187,360 m/z ; [Au₆-TrpH₂]⁺ = 1388,95 m/z . Kutatási munkánk révén igazolást nyert, hogy a Trp-tartalmú rendszerekben a NPs és NCS képződése a ligandum koncentráció és a pH szisztematikus hangolása révén erősen szabályozható (P15).

A His-tartalmú rendszerben, az irodalmi adatokkal ellentétben [52–54], a His-Au NCs képződését nem sikerült igazolni, de több, egymástól függetlenül elvégzett mérés (FT-IR, XPS, ESI-MS, MALDI) Au(I)-tartalmú polinukleáris komplex jelenlétét igazolta a NCs helyett (His:[AuCl₄]⁻/30:1, $\lambda_{\text{em}} = 475 \text{ nm}$, QY% = 3,6 %, $\tau_{\text{átlag}} = 5,1 \text{ ns}$). A **46. ábra (A)** jól szemlélteti, hogy sem az extrém savas, sem az extrém lúgos közeg nem kedvez a fluoreszcens termékek megjelenésének; kizárólag pH > 6 felett indul meg $\lambda_{\text{em}} = 475 \text{ nm}$ -nél egy emissziós csúcs kialakulása, mely párhuzamosan az aminosav oldalláncában lévő imidazólium

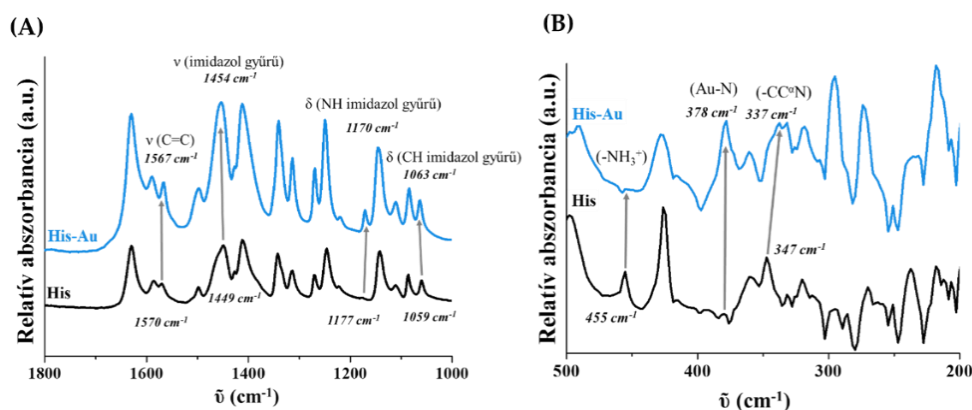
protonvesztési folyamatával hozható kapcsolatba ($pK_s = 6,04$ [171,172]). Számos esetben az imidazol-*N* horgonydonorként szerepel, azaz a fémionok koordinációja, pl. His-tartalmú peptidekben, elsődlegesen ezen donorcsoporton keresztül indul [172], ami jelen rendszer esetén is feltételezhető. Korábban említésre került már H. Chen és mtsai. által javasolt mechanizmus [53] (1. egyenlet) az aurát(III)ionok redukciójára vonatkozóan a His-nel történő kölcsönhatás eredményeképpen. Igazolták, hogy a His oxidációja savas közegben valósulhat meg preferáltabban, ahol gyök kationos polimerizáció révén His oligomerek kialakulása következik be a mintákban, mely generálja a Au^0 tartalmú klaszterek képződését. Az általuk javasolt extrém savas közeg alkalmazása vizsgálataink alapján nem volt kedvező (és nem volt értelmezhető se miért lenne megfelelő). Az XPS mérések is kizárólag Au(I)-ionok jelenlétét mutatták ($Au\ 4f_{7/2} = 84,8\ eV$), ill. az ESI-MS és MALDI spektrumokban is Au(I)-tartalmú polinukleáris komplexeket azonosítottunk. A fentebb említett mechanizmust részben alátámasztva a $[-His-]_n^+$ oligomerizációs folyamata azért igazolást nyert. Amint azt a **47. ábra** is mutatja a $[-His-]_n^+$ oligomerek közül az $n=1$ ($m/z = 156,06$), $n=2$ ($m/z = 311,12$) formától egészen $n = 6$ ($m/z = 931,36$) speciesig sikerült kimutatni jelenlétüket, valamint a polinukleáris komplex (és fragmentumai) is detektálhatóak (P15).



47. ábra: Az aurát(III)-His rendszer ($His:[AuCl_4]^-/30:1$, $pH = 6,0$, $c_{Au} = 1,0\ mM$) ESI-MS ($m/z = 100 - 1000$) és MALDI ($m/z = 800 - 2500$) spektrumainak részletei a mintában azonosítható egyes speciesek összetételének és lehetséges szerkezeti képleteinek feltüntetésével (P15) ill. az Ag-His rendszerben egykristály röntgendiffrakcióval igazoltan képződő polinukleáris komplex szerkezete.

Ezen komplex képződését az FT-IR mérések is megerősítik. A közép IR-tartományban (48. ábra (A)) rögzített spektrum eredményei alapján az imidazolgyűrűben található $C=C$ kettőskötésre jellemző vegyértékrezgés $1570\ cm^{-1}$ -ről $1567\ cm^{-1}$ -re, míg annak vázrezgése $1449\ cm^{-1}$ -ről $1454\ cm^{-1}$ -re, ill. az oldalláncban található $-NH$ és $-CH$ csoportok deformációs rezgései $1177\ cm^{-1}$ és $1059\ cm^{-1}$ értékekről $1177\ cm^{-1}$ és $1063\ cm^{-1}$ hullámszámokra tolnak a fémtartalmú rendszerben. Meghatároztuk, hogy a szabad His karboxilcsoportjának nyújtórezgései $1630\ cm^{-1}$ és $1587\ cm^{-1}$ hullámszámoknál jelentkeznek, míg a fémtartalmú

rendszerénél ezek 1631 cm^{-1} és 1589 cm^{-1} azonosíthatóak, mely a szabad, koordinatív kötésben részt nem vevő deprotonált csoportok jelenlétére utalhat [173]. Az Ag(I)-ionok kölcsönhatását korábban már vizsgálták His aminosavval [165]. A termékként keletkező $[\text{Ag}(\text{His})]_n$ általános képlettel leírható koordinációs polimer struktúráját széleskörűen jellemezték, ahol egykristály röntgendiffrakciós mérések révén megállapították, hogy ezen többmagvú polinukleáris komplex helikálisan rendeződő szerkezetet alkot és ahogyan a **47. ábra** (jobb szélén) is prezentálja minden egyes Ag(I)-ionhoz két ligandum koordinálódik az amino-*N* és az imidazol-*N* donorokon keresztül [174].



48. ábra: A His:[AuCl₄]⁻/30:1 rendszer közép IR (A) és távoli IR (B) spektrumai (P15).

A távoli IR (**48. ábra (B)**) tartományban a *N*-tartalmú csoportok rezgéseiben azonosítható nagyobb mértékű változás. A $-\text{CC}^{\alpha}\text{N}$ csoportra jellemző sáv 347 cm^{-1} -ről 337 cm^{-1} hullámszámmra tolódik, valamint a His $[\text{H}_2\text{L}]^+$ formája esetén 455 cm^{-1} hullámszámnál jelentkező, az ammóniumcsoportra ($-\text{NH}_3^+$) jellemző rezgési sáv a fémtartalmú mintában teljesen eltűnik. Ezzel ellentétben egy új rezgési sáv detektálható 378 cm^{-1} értéknél a fémmionnal való reakció után, amely az Au-N fém-heteroatom kötéshez rendelhető [175]. A Phe-Au NCs esetén az FT-IR mérések kizárólag az amino-*N* keresztüli kötődést igazolják, sem a karboxil-, sem az aromás oldallánc rezgéseiben nem detektálható változás a fémtartalmú rendszerben (P16).

Ezüst-tartalmú rendszerek

Az arany-tartalmú rendszerek mellett a Tyr és Phe Ag⁺-ionokkal való kölcsönhatását is tanulmányoztuk hasonló aspektusok alapján, mint amit fentebb részleteztünk (P16,P17). A nevezett aminosavak aurát(III)ionokkal való kölcsönhatása során tett megállapításokat figyelembe véve a Tyr esetén várható a NCs képződése lúgos közegben, de a Phe vonatkozásában – oldalláncbéli heteroatom hiányában – ez még lúgos közegben is kérdéses. A ligandum/fémion molarányok tanulmányozása során (pH ~ 11 – 12 beállítása mellett) megállapítottuk, hogy mindkét rendszerben képződnek kéken emittáló termékek ligandumfelesleg alkalmazása esetén; a Tyr/Ag⁺ vonatkozásában 5:1, míg a Phe/Ag⁺ esetén 80:1 arány alkalmazása révén volt elérhető a legnagyobb PL intenzitás. A fémion koncentráció hatását feltérképezve a Tyr-tartalmú rendszerben a 0,5 mM, míg a Phe esetén 0,75 mM értékeknél képződtek a fluoreszcens termékek megfelelő intenzitással. Mindkét rendszerben 80 °C-on történt a szintézis, mivel szobahőmérsékleten vagy 37 °C-on lényegesen lassabb.

Míg a Tyr/Ag⁺ vonatkozásában elég volt kb. 24 h a NCs képződésére, addig a Phe/Ag⁺ rendszer esetén 14 napos szintézisidővel lehet számolni. A dialízissal tisztított termékek főbb optikai és szerkezeti adatait a **7. táblázat** foglalja össze. Mindkét aminosav esetén az Ag⁺-ionnal való kölcsönhatás eredményeképpen képződő fluoreszcens termékek kék emisszióval és hasonló QY(%) valamint élettartam értékekkel rendelkeznek, mely optikai jellemzők a néhány atomos NCs jelenlétére utalnak. A Tyr-Ag rendszer XPS mérése egyértelműen bizonyította az Ag⁰ jelenlétét a mintában, viszont a Phe esetén XPS méréseket nem sikerült kivitelezni. A mintához I⁻-ionokat hozzáadva a megjelenő Ag-halogenid csapadék túlnyomóan az Ag⁺-ionok jelenlétét támasztotta alá az Ag⁰ helyett.

7. táblázat: A Tyr/Ag⁺ és Phe/Ag⁺ rendszerekben képződő fluoreszcens termékek főbb optikai és szerkezeti adatai (P16, P17).

rendszer	optikai jellemzők / PL				szerkezeti jellemzők / XPS		
	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	QY(%)	$\tau_{\text{átlag}}$ (ns)	Ag 3d _{5/2} (eV)	Ag 3d _{3/2} (eV)	N 1s (eV)
Tyr-Ag⁺	320	410	1,3 ± 0,2	4,28	368,02	374,02	400,3
Phe-Ag⁺	365	460	1,7 ± 0,2	1,36	-*	-	-

* XPS mérések során a minták nem voltak mérhetőek a kis fémkoncentráció, a minta higroszkópos állaga és a nagy ligandumfelesleg jelenléte miatt.

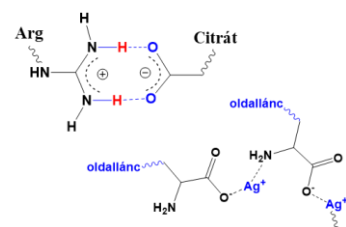
A Phe-Ag⁺ minta FT-IR spektruma az Ag(I)-Phe komplex DFT számolással, gázfázisban meghatározott spektrumával mutatott hasonlóságot [176]. Mérhető eltolódás a β -CH csoport rezgéseinek tartományában (Phe: 1280 – 1328 cm⁻¹; Phe-Ag⁺: 1301 – 1345 cm⁻¹) és a ν (C-N) (Phe: 1121 cm⁻¹, Phe-Ag⁺: 1135 cm⁻¹) volt detektálható, ami az aromás gyűrű és amino-N fémionhoz történő kötődését igazolja. Polfer és csoportja által a DFT számolások egy háromfajú koordinációt feltételeznek az amino-N, a karbonil-O és az aromás gyűrű π -elektronfelhőjén keresztül [176]. A Tyr-tartalmú rendszer esetén lényeges eltolódások nem voltak detektálhatóak a FT-IR spektrumban, de az egyes csoportokhoz tartozó rezgések intenzitásai változtak jelentősen (fenolos oldallánc és N-terminális rész erősödik, a C-terminális rész gyengül). A Tyr-nal redukált Ag NPs képződésénél korábban leírták [177], hogy a Tyr oxidációjával párhuzamosan egy fenol-dienon átalakulás történik és a képződő dienon az FT-IR spektrumban 1670 cm⁻¹ hullámszámnál azonosítható, valamint 285 – 290 nm-nél az UV spektrumban egy új sáv kialakulása detektálható. Saját mintánk esetén ez nem volt kimutatható, így másik mechanizmust feltételezünk. Az Ag⁺-ionokat az extrém lúgos közegben jelenlévő fenolátcsoport redukálja elektrontranszfer folyamatban, míg belőle egy gyökös fragmentum képződik. Két gyökös fragmentum összekapcsolódása révén ditirozin képződik, ami stabilizálja a képződő Ag magokat [178]. A dimer Ag felülethez történő kötődése az aminocsoportokon keresztül valószínűsíthető [177]. Az aromás gyűrűk π - π stacking kölcsönhatásának eredményeképpen 1540 – 1340 cm⁻¹ tartományban az egyes rezgések intenzitása jelentősen megnő, mely saját rendszerünkben is detektálható, így ezen mechanizmust fogadtuk el a Tyr-nal stabilizált Ag NCs (Tyr-Ag NCs) képződésére.

5.4.3. Alifás-*N* donorcsoportot tartalmazó aminosavak kölcsönhatása aurát(III)- és ezüst(I)ionokkal

Az *L*-arginin (Arg) és az *L*-glutamin (Gln) vonatkozásában igazoltuk, hogy egyik ligandum sem alkalmas NCs közvetlen előállítására a templátos eljárással (P16). A fémionok redukciójának elősegítésére extra citrát alkalmazása volt szükséges²⁹ a felhasznált nagy ligandumfelesleg mellett (Arg:[AuCl₄]⁻/800:1, Arg:[Ag]⁺/600:1, Gln:[AuCl₄]⁻/250:1, Gln:[Ag]⁺/350:1, így alapvetően citráttal redukált és Arg-nel ill. Gln-nal stabilizált nanoszerkezetek előállítása kivitelezhető mind a 4 rendszerben az **1. táblázatban** összefoglalt paraméterek szerint. A dialízissal tisztított termékekre meghatározott főbb optikai adatokat a **8. táblázat** foglalja össze.

8. táblázat: Az Arg- és Gln aurát(III)- és ezüst(I)ionokkal való kölcsönhatása során képződő termékek főbb optikai adatai (P16) az Arg-aurát(III) (jobbra, felső) és Arg-Ag⁺ (jobbra, alsó) rendszerekben feltételezhetően kialakuló szerkezetek szemléltetésével.

rendszer	optikai jellemzők			
	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	QY(%)	$\tau_{\text{átlag}}$ (ns)
Arg-[AuCl ₄] ⁻	305	380	1,6 ± 0,2	17,94 ± 0,04
Arg-Ag ⁺	310	375	1,8 ± 0,3	14,30 ± 0,27
Gln-[AuCl ₄] ⁻	350	438	3,0 ± 0,4	6,26 ± 0,10
Gln-Ag ⁺	350	438	5,7 ± 1,0	8,30 ± 0,09



A szakirodalomban az extrém nagy ligandumfelesleg alkalmazása nem egyedi; a Pro:[AuCl₄]⁻ rendszerben 830:1 arányt használtak [57]. Az Arg-tartalmú rendszerekben a lúgos közeg (pH = 11,0) volt a kedvező, de a Gln-tartalmúak esetén a pH ~ 6. Feltehetően ez utóbbi tapasztalat azért van, mert a negatív töltésű citrát molekulák stabilizálják az Au magokat és az ikerionos formában lévő Gln ammóniumcsoportjai, elektrosztatikus kölcsönhatás révén, képesek a citrát molekulákhoz kötődni és így tovább stabilizálni a fém felületet. A **8. táblázat** adatait elemezve látható, hogy Arg-tartalmú rendszerekben kimagaslóak a QY(%) értékek (~ 14 – 18 %), mely eltérő szerkezeti tulajdonságokra vezethető vissza. Az Arg:[AuCl₄]⁻ rendszerben a citrát alkalmazása miatt az Au⁰ magok kialakulása valószínűsíthető és az elektronban gazdag guanídium oldallánc sóhidas kölcsönhatást alakíthat ki az Au mag felületén a negatív töltésű citrát molekulákkal (**8. táblázat melletti felső struktúra**), mely társítható a magas QY(%) értékkel. A rendszer fém karakterét az FT-IR mérések is alátámasztják, ugyanis jól definiált spektrum nem rögzíthető. Az Arg-Ag⁺ rendszerben az FT-IR mérések alapján a guanídium oldallánc fémionhoz történő kötődése nem igazolt, mert eltolódás 1660 – 1670 cm⁻¹ tartományban nem figyelhető meg, viszont a ν_s (COO⁻) 1605 cm⁻¹-ről 1637 cm⁻¹-re ill. a ν (C-N) 1413 cm⁻¹-ről 1372 cm⁻¹-re tolódik, mely a karboxil- és aminos csoportok fémionhoz történő kötődését támasztja alá. A kapott adatok jó egyezésben vannak korábbi irodalmi adatokkal [179], melyek feltételezik, hogy az Arg-Ag⁺ rendszerben egy olyan polimer komplex képződése valószínűsíthető, mely [Ag-Arg] monomeregységekből épül fel, ahol egy Ag(I)-ion egy Arg amino-*N*-hez kötődik, valamint

²⁹ Egyedül az Arg-Ag⁺ rendszerrel nem alkalmaztunk extra citrátot.

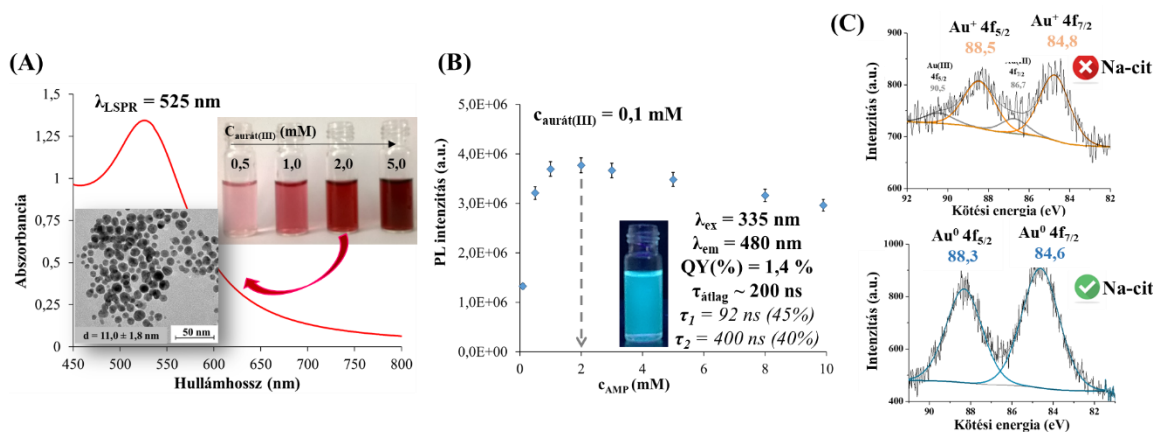
egy másik Arg karboxilcsoportjához, periodikusan ismétlődve, kialakítva így a polimer komplex struktúrát (8. táblázat melletti alsó struktúra).

5.5. Kismolekulákkal redukált és stabilizált egy- és kétfémes nemesfém NCs

Az aminosavak mellett egyéb *N*-donorcsoportban gazdag kismolekulák (adenozin-monofoszfát (AMP) (P18, P19) és aminosav származékok (hisztidinhidroxámsav (HisHA)) (P20) aurát(III)ionokkal való kölcsönhatását is tanulmányoztuk, mint új, eddig nem vizsgált rendszerek. Ezen említett molekulák alkalmazhatóságát Au NCs kialakítására elsők között publikáltuk, emellett az AMP esetén Au/Ag kétfémes NCs előállítási folyamatát is kiviteleztük (P19). Mindhárom előállított NCs-tartalmú vizes diszperzió szenzorikai (fémionra, kismolekulára) lehetőségeit igyekeztünk feltérképezni és átfogóan bemutatni.

5.5.1. AMP-tal stabilizált Au NCs előállítása és szenzorikai lehetőségeik

Hasonlóan a korábbi fejezetekben ismertetett szintézis tervezési folyamattal az AMP kölcsönhatását is feltérképezni kívántuk az $[AuCl_4]^-$ -ionokkal, ahol tanulmányoztuk a fémion koncentrációjának hatását is az Au NCs előállíthatóságára. Ennek a munkának annyi előzménye volt csak, hogy Lopez és mtsai. vizsgálták az adenin és származékai aurát(III)ionokkal [180] való komplexképződését, ahol azt tapasztalták, hogy szupramolekuláris Au(I) komplexek képződése a preferált folyamat, így a redukív közeg biztosítása a NCs előállításához ezen eredmények alapján indokoltnak mutatkozott. Ennek megfelelően citrát puffer (citromsav/ Na_3 -citrát ($c = 0,5$ M), $pH = 6,0$) alkalmazása mellett $37^\circ C$ -on, AMP: $[AuCl_4]^-$ /1:1 molarány beállítása mellett tanulmányoztuk a fémion koncentrációjának hatását a képződő termékek megjelenésére. A 49. ábra (A) is szemlélteti, hogy $c_{aurát(III)} = 0,5 - 5,0$ mM koncentráció tartományban AMP-tal stabilizált Au NPs állíthatók elő, melyet a szakirodalomban elsők között igazoltunk (P18).



49. ábra: (A) AMP: $[AuCl_4]^-$ /1:1 molaránynál képződő Au NPs-et tartalmazó diszperziók fotói eltérő $c_{aurát(III)}$ esetén és a $c_{aurát(III)} = 2,0$ mM koncentrációjú minta LSPR sávja a mintáról készült TEM felvétellel; (B) eltérő AMP: $[AuCl_4]^-$ molarányú mintákban képződő fluoreszcens termék intenzitás értékei $\lambda_{em} = 480$ nm-nél a termék főbb optikai adataival és az AMP: $[AuCl_4]^-$ /20:1 arányú minta UV-lámpa alatti fotója; (C) az AMP: $[AuCl_4]^-$ /20:1 arányú minta XPS spektrumai citrát puffer alkalmazása nélkül (felső) és jelenlétében (alsó).

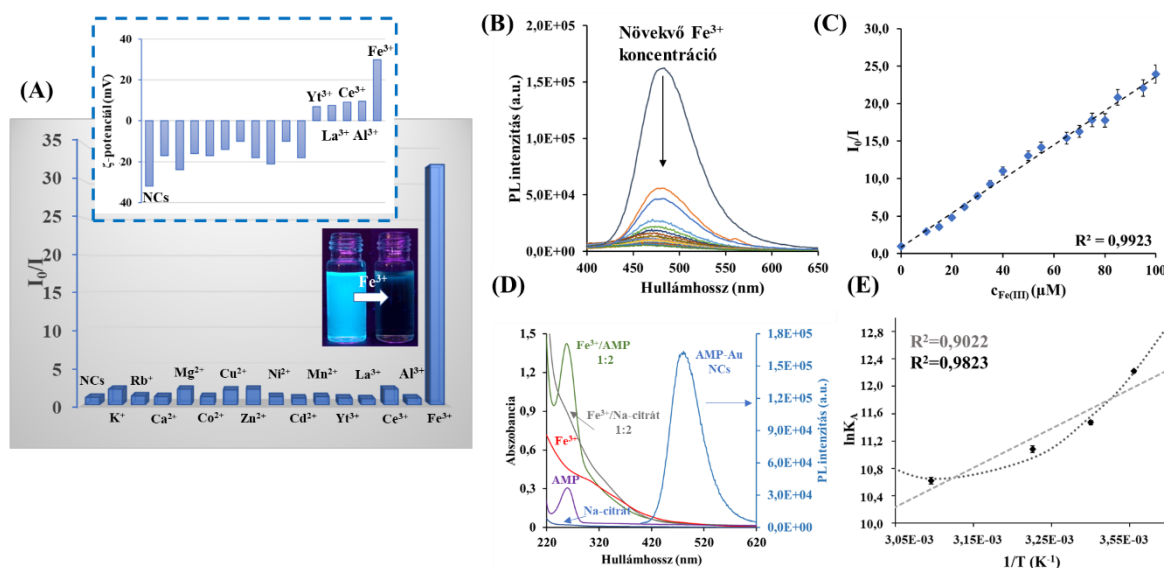
Példaként kiemelve, a $c_{\text{aurát(III)}} = 2,0 \text{ mM}$ mellett szintetizált NPs átlagos mérete a TEM felvételek alapján $d_{\text{TEM}} = 11,0 \pm 1,8 \text{ nm}$ (**49. ábra (A)**), míg DLS mérésekkel közel azonos méret igazolható ($d_{\text{DLS}} = 11,5 \pm 3,1 \text{ nm}$, $\text{PDI} = 0,141$, $\zeta = -23,2 \pm 2,8 \text{ mV}$). A fémion koncentrációt $c_{\text{aurát(III)}} = 0,1 \text{ mM}$ értékre csökkentve AMP:[AuCl₄]⁻/1:1 – 100:1 tartományban tanulmányoztuk a rendszerben képződő terméke(ke)t, ahol azt tapasztaltuk, már 1:1 aránynál is detektálható fluoreszcens sajátsággal rendelkező termék és a NPs jelenléte kizárható. A legnagyobb PL intenzitást, amit az **49. ábra (B)** is igazol, AMP:[AuCl₄]⁻/20:1 molarány beállítása mellett érték el, így ezen értéket rögzítettük a szintézis ideális fémion/ligandum arányának. A 24 h szintézis után a terméket tisztítottuk a feleslegben lévő AMP-tól és az esetlegesen redukálatlan fémionoktól (acetonos kicsapás, centrifugálás (15000 rpm/30 perc), majd Milli-Q vízben történő rediszpergálás), majd karakterizáltuk. A szintézist a citrát puffer hozzáadása nélkül is kiviteleztük, de ahogyan az **49. ábra (C)** is szemlélteti, a mintában csak az Au(III) és döntően Au(I) jelenléte mutatható ki, míg a citrát puffer jelenlétében kivitelezett szintézis végtermékében az Au nulla oxidációs állapotú. A szintézis ilyen módon 37 °C-on lejátszódik, de AMP nélkül a fémionok redukciója csak lényegesen magasabb, közel 100 °C-on következik be, ami igazolja, hogy a két molekula (AMP + citrát puffer) együttes alkalmazása elengedhetetlen ezen AMP-Au NCs előállításához 37 °C-on 24 h szintézisidő mellett.

A tisztított Au NCs FT-IR technikával történő karakterizálása során igazolást nyert, hogy az adenin –NH₂ csoportjára jellemző deformációs rezgés tolódik 1583 cm⁻¹ értékről 1563 cm⁻¹ hullámszámra a fémionokkal való kölcsönhatás révén. Megállapítottuk mindemellett, hogy a purinbázisban található N1-C2, N3-C2 és N7-C5 kötésekhez rendelhető vegyértékrezgés is tolódik a nagyobb hullámszámok tartományába (1329 cm⁻¹ → 1375 cm⁻¹), ami arra utalhat, hogy a reakció kezdeti szakaszán a prekursor fémionok koordinációjában az adenin gyűrű 6. számú szénatomján található aminocsoport és az adenin N7 atomja vesz részt elsődlegesen akár 5[N,N] kelát kialakítása révén. A NCs stabilitását pH = 2 – 12 tartományban tanulmányozva kijelenthető, hogy pH > 5 felett mérhető aggregáció nem mutatkozik. pH ~ 5 – 8 tartományban a mintában azonosítható NCs átlagos átmérője $d \sim 0,7 \text{ nm}$, a ζ -potenciál pedig - 25 mV és - 35 mV között változik. Mindezek mellett fiziológiai körülmények (pH = 7,4 (PBS), 0,9 m/m % NaCl) mellett sem tapasztalható aggregáció (**P18**).

A tisztított és karakterizált AMP-tal felületmódosított Au NCs (AMP-Au NCs) szenzorikai célú felhasználási lehetőségét is vizsgáltuk eltérő fémionok/anionok vonatkozásában. A NCs konstans mennyiségéhez ($c_{\text{Au}} = 5,0 \text{ }\mu\text{M}$) az analitokat szintén állandó koncentrációban ($c_{\text{analit}} = 1,0 \text{ mM}$) adtuk és követtük a NCs PL tulajdonságának változását. Ahogyan a **50. ábra (A)** mutatja, az egyes fémionok (+1-, +2- és +3-értékűek) hozzáadása után kizárólag egy esetben figyelhető meg PL kioltás, ami a Fe³⁺ ($I_0/I \sim 32$), minden más fémion-tartalmú rendszerben a NCs fluoreszcenciája változatlan marad. A kioltás természetét tanulmányozva megállapítottuk a Fe³⁺ esetén a dinamikus tartományt (**50. ábra (B,C)**), mely 10 – 100 μM tartományban mutat lineáris összefüggést a kioltó koncentrációja és a PL jel között; a LOD értékét $\text{LOD} = 2,1 \text{ }\mu\text{M}$ -nak határoztuk meg (**P18**) [162].

A kioltási mechanizmus feltérképezése érdekében több mérést is elvégeztünk. Igazoltuk, hogy a kioltás nem a fémion értékűségével van kapcsolatban, hiszen több +3-értékű fémiont is tanulmányoztunk, és mindegyik rendszer esetén (a +1- és +2-értékűek is)

meghatároztuk a diszperz rendszerekben mért ζ -potenciál értékeket a fémionok hozzáadása előtt és után is. A vártaknak megfelelően a +3-értékűek képesek a felület áttöltésére, amit tapasztaltunk is, de kioltás csak a Fe^{3+} -ion esetén következik be. Ennek értelmében feltételezhető, hogy nem a fémionok adszorpciója, hanem a felületen lévő AMP és a Fe^{3+} -ionok között kialakuló kölcsönhatás (pl. koordinatív kötés) okozhatja a kioltást. Igazoltuk továbbá UV-Vis spektrofotometriás mérések révén, hogy sem a kiindulási komponenseknek (AMP, citrát, Fe^{3+} -ionok), sem pedig azok egymással való kölcsönhatásuk révén kialakulható Fe^{3+} -tartalmú komplexeknek nem detektálható abszorbancia sávja a NCs emissziós hullámhossz-tartományában ($\lambda \sim 405 - 620 \text{ nm}$), mely önabszorpció révén fluoreszcencia kioltást okozva (**50. ábra (D)**).



50. ábra: (A) Az AMP-Au NCs ($c_{\text{Au}} = 5,0 \mu\text{M}$) vizes diszperzió esetén meghatározott relatív PL értékek (I_0/I) az egyes fémionok hozzáadása után ($c_{\text{fémion}} = 1,0 \text{ mM}$) $\lambda_{\text{ex}} = 335 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 480 \text{ nm}$) ($\text{SD} = \pm 2,0 \%$) ill. a rendszerekben párhuzamosan mért ζ -potenciál értékek ($\text{SD} = \pm 2,0 \%$); (B) AMP-Au NCs emissziós spektrumai ($\lambda_{\text{ex}} = 335 \text{ nm}$) növekvő Fe^{3+} -ion hozzáadása után ($c_{\text{Au}} = 5,0 \mu\text{M}$, $c_{\text{Fe(III)}} = 0 - 1,0 \text{ mM}$) és a (C) rendszerekben meghatározott I_0/I értékek változása a $c_{\text{Fe(III)}}$ függvényében; (D) a szenzorikai vizsgálata során a mintában jelenlévő ill. kialakulható komponensek UV-látható spektrumai $25 \text{ }^\circ\text{C}$ -on ($c_{\text{citrát}} = 0,2 \text{ mM}$, $c_{\text{AMP}} = 0,2 \text{ mM}$, $c_{\text{Fe(III)}} = 0,1 \text{ mM}$; Fe(III)/citrát (szürke): $c_{\text{citrát}} = 0,2 \text{ mM}$, $c_{\text{Fe(III)}} = 0,1 \text{ mM}$, Fe(III)/AMP (zöld): $c_{\text{AMP}} = 0,2 \text{ mM}$, $c_{\text{Fe(III)}} = 0,1 \text{ mM}$, bal y-tengely) és a NCs PL spektruma ($c_{\text{Au}} = 5,0 \mu\text{M}$, jobb y-tengely); (E) Az eltérő hőmérsékleteken meghatározott kioltási állandók (K_A) adott hőmérsékleten és azok illesztései (lineáris: szaggatott, nem-lineáris: pontozott).

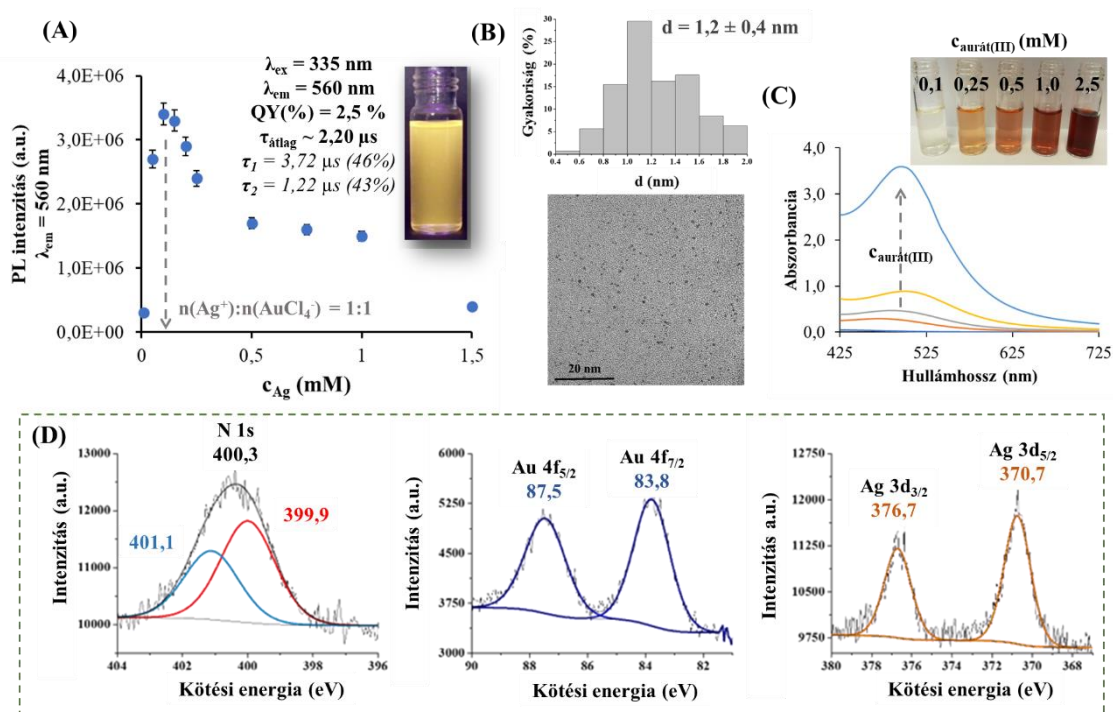
A kioltás természetének igazolása érdekében a PL kioltási méréseket, melyek közül a 298 K-en regisztrált spektrumokat az **50. ábra (B)** mutatja, 3 további hőmérsékleten (303, 310 és 323 K) is elvégeztük. A detektált fluoreszcencia spektrumok Stern-Volmer egyenlet (20. o., 9. lábjegyzet alapján) szerinti kiértékelése alapján meghatározott kioltási állandó (K_{SV}) a hőmérséklet növelésével csökkenő tendenciát mutatott, mely szerint a kioltás tisztán sztatikus a vizsgált koncentráció-tartományban, azaz a kioltó és a fluorofór egy nem-fluoreszkáló, ún.

sötét komplexet alkot. Ezen megállapításunkat a ζ -potenciál mérések is alátámasztják. Sztatikus PL kioltás esetén a NCs élettartama nem változik meg jelentősen. A NCs és a Fe^{3+} -ion közötti kölcsönhatás termodinamikai paramétereit is meghatároztuk, ahogy azt a $\gamma\text{G-Au NCs-Kyn}$ rendszer esetén korábban részleteztük, mely alapján elmondható, hogy mivel a számított szabadentalpia-változás (ΔG) értéke (**50. ábra (E)**) valamint a **19. egyenlet** és a 22. lábjegyzet alapján) átlagosan -29 kJ mol^{-1} , ezért a kioltási folyamat termodinamikailag kedvezményezett. A nem-lineáris paraméterbecsléssel meghatározott standard entalpiaváltozás (ΔH°) $-84,57 \pm 8,46 \text{ kJ mol}^{-1}$ és a standard entrópiaváltozás (ΔS°) $-0,18 \pm 0,03 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ értéknek adódott. A negatív ΔH° exoterm kioltási folyamatra utal. A meghatározott standard termodinamikai paraméterek előjele és egymáshoz való viszonya alapján a kioltás entalpia-vezérelt ($|\Delta H^\circ| > |T\Delta S^\circ|$) folyamat; a kialakuló nemfluoreszkáló, sötét komplexet pedig feltehetőleg intermolekuláris erők stabilizálják. A mechanizmus mélyebb feltérképezése érdekében nagyobb rendszámú d-mező fémionjai ill. ritkaföldfémek tanulmányozása is felmerült elektronszerkezeti okok miatt, de méréseink egyéb publikációkban tanulmányozott fémionok, ill. a természetes vizekben vagy akár az ivóvízben lehetségesen felhalmozódó szennyező fémionok detektálására fókuszált. A Fe^{3+} -ion fontos nyomelem élő szervezetekben, hiszen meghatározó szerepet tölt be az oxigénszállításban és különféle elektrontranszfer folyamatokban. Koncentrációjának meghatározása pl. az ivóvizekben kiemelt fontosságú, mivel az Európai Unió Tanácsának 1998. november 3-i 98/83/EK irányelve alapján az emberi fogyasztásra alkalmas ivóvíz vastartalma nem haladhatja meg a $200 \mu\text{g dm}^{-3}$ ($c \sim 3,5 \mu\text{M}$) értéket. Ennek értelmében az általunk előállított NCs vizes diszperziója egy gyorsesztként is funkcionálhat a Fe^{3+} -ionok gyors és szelektív kimutatására a tanulmányozott egyéb ionok mellett. A kutatómunka eredményességét az is igazolja, hogy az általunk fejlesztett AMP-Au NCs-vel a Fe^{3+} -ionokra meghatározott LOD értékét is némileg csökkenteni tudtuk, hiszen a szakirodalomban publikált Au NCs-alapú Fe^{3+} -ion szenzorok esetén LOD $\sim 3,0 - 4,0 \mu\text{M}$ [181,182] a leggyakrabban publikált érték egyéb reagens alkalmazása nélkül. Az anionok vonatkozásában a vizsgáltak közül (NO_3^- , HCO_3^- , Cl^- , Br^- , SO_4^{2-} , CH_3COO^- , $(\text{COO}_2)^{2-}$) egyik sem okozott a NCs PL intenzitásában változást.

5.5.2. AMP-tal stabilizált Au/Ag kétfémes NCs előállítása és szenzorikai lehetőségeik

Az egyfémes NCs mellett egyre több közlemény jelenik meg kétfémes NCs előállítására és alkalmazására vonatkozóan, ahogyan az Irodalmi áttekintés fejezetben is részleteztem. Ennek megfelelően, az AMP-Au NCs esetén, ahogyan a LYZ-tartalmú rendszer kapcsán elvégeztük, megkíséreltük annak kétfémes Au/Ag változatát (AMP-Au/Ag NCs) is új rendszerként előállítani és karakterizálni. Kísérletet tettünk egyrészt úgy, hogy az előzetesen szintetizált, kéken emittáló AMP-Au NCs vizes diszperziójához adtunk Ag^+ -ionokat változó mennyiségben citrát puffer alkalmazása mellett, mely a redukív közeget biztosította. Azt tapasztaltuk, hogy bár a NCs kék emissziója ($\lambda_{\text{em}} = 480 \text{ nm}$) a sárga tartományban ($\lambda_{\text{em}} = 540 \text{ nm}$) tolódik ($\text{Ag:Au} = 2,5$ molarány beállítás mellett), de a képződő termék gyenge PL intenzitással és stabilitással rendelkezik. Előnyösebb optikai tulajdonság és nagyobb stabilitás elérése érdekében a fémionok szimultán redukciója mellett is megkíséreltük a kétfémes rendszerek előállítását (P19). Az AMP-Au NCs rendszer esetén

rögzített AMP:aurát(III)/ 20:1 mólarány alkalmazása mellett növeltük a mintában az Ag^+ -ion koncentrációját, és ahogyan az **51. ábra (A)** is szemlélteti, 0,1 mM Ag^+ koncentráció elérése esetén volt a detektált PL a legnagyobb intenzitású, ami éppen $n(\text{Ag}^+):n([\text{AuCl}_4]^-) = 1:1$ mólarány esetén mutatkozott 12 h szintézisidő és 80 °C alkalmazásával. A tisztított termék³⁰ esetén meghatározott QY(%) ~ 2,5 %-nak adódott, mely majdnem $2\times$ nagyobb az egyfémű rendszerhez képest az Au magba beépülő Ag szinergikus hatása miatt. Az átlagos élettartam 200 ns-ról 2,2 μs -ra emelkedik³¹, ami az egyfémű NCs-hez képest a vizes diszperzióban nagyobb NCs jelenlétére utalhat [183,184]. Ennek igazolása végett HRTEM felvételek készültek. A néhány atomos kéken emittáló AMP-Au NCs esetén a klaszter mérete még HRTEM felvételekkel sem detektálható, de jelen sárga emisszióval rendelkező kétfémű NCs átlag átmérője 1,2 nm-nek mutatkozik az **51. ábra (B)** alapján. Ezen NCs-et fényszórás mérések révén is detektáltuk ($d_{\text{DLS}} \sim 2,0$ nm, ζ -potenciál ~ -28 mV (pH = 3 – 9 között, I = 0,15 M NaCl)).



51. ábra: (A) Az AMP:[AuCl₄]⁻:Ag⁺ rendszerben képződő termékek PL intenzitás értékei az c_{Ag} függvényében ($c_{\text{Au}} = 0,1$ mM, $c_{\text{AMP}} = 2,0$ mM, $\lambda_{\text{ex}} = 335$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 560$ nm, 37 °C, 24 h, pH = 6,0 (citrát puffer)) és a termék néhány optikai jellemzője és a diszperzió fotója UVlámpa alatt; (B) Az AMP:[AuCl₄]⁻:Ag⁺ / 20:1:1 arányú vizes reprezentatív diszperzió TEM felvétele az eloszlásdiagrammal; (C) Az AMP:[AuCl₄]⁻:Ag⁺ / 20:1:1 arányú minta esetén az aurát(III) koncentráció növelésének hatása a képződő nanoszerkezetek optikai sajátosságára a látható spektrumok alapján; (D) AMP:[AuCl₄]⁻:Ag⁺ /20:1:1 arányú minta XPS spektrumainak részletei (P19).

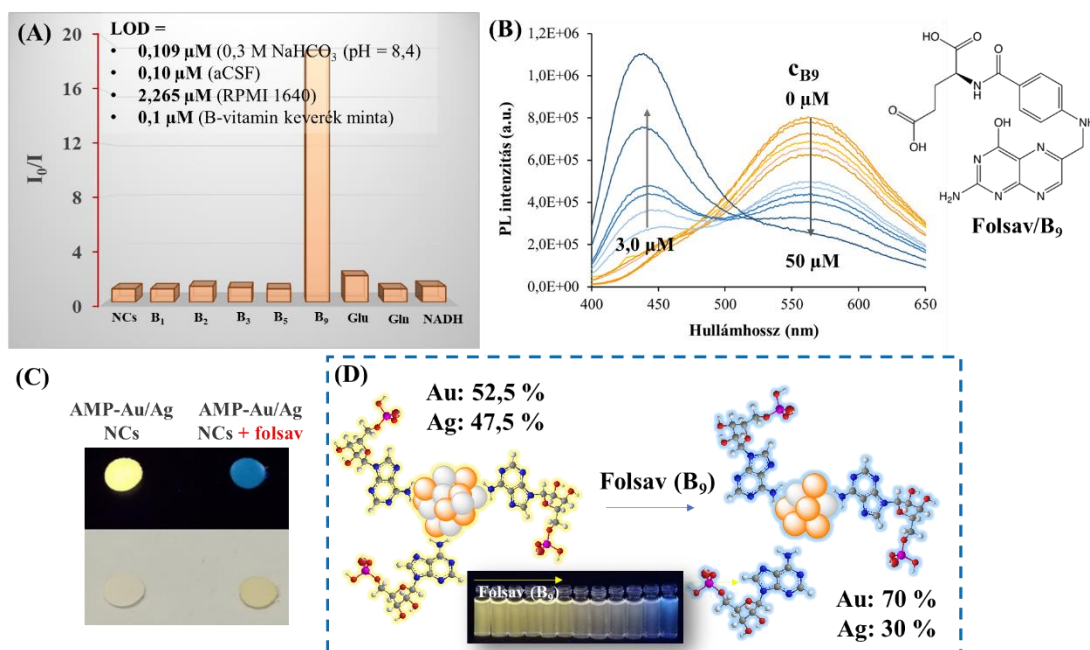
³⁰ Hasonló tisztítási folyamatot alkalmaztunk, mint amit az AMP-Au NCs rendszer esetén kidolgoztunk.

³¹ A τ_1 a ligandum-fém töltéstransfer folyamathoz rendelhető az AMP e⁻-ban gazdag atomjainak következtében, míg a τ_2 komponens a fémmaghoz rendelhető.

Kísérletet tettünk az aurát(III) koncentrációjának növelésére, de ahogyan az **51. ábra (C)** igazolja, már 0,25 mM aurát(III) tartalom esetén, hasonlóan az egyfémű rendszerekhez, Au NPs képződése a preferált folyamat. A NCs szerkezetvizsgálata során igazolást nyert, hogy mind az Au, mind az Ag nulla oxidációs állapotban van. Az Au $4f_{7/2}$ kötési energiája általában 84,2 eV és 84,8 eV között található az ultrakisméretű NCs esetében. A szintetizált NCs csak Au⁰-t tartalmaznak a detektált kötési energiák alapján, amelyek 87,5 eV és 83,8 eV a $4f_{5/2}$ és a $4f_{7/2}$ esetében. A mért adatok az Au-tartalom tömbfázisszerű fémű tulajdonságaira utalnak. Az Ag $3d_{3/2}$ és $3d_{5/2}$ a 376,7 és 370,7 eV-nál helyezkednek el. Ez feltehetően egyrészt az erős elektronátvitelnek köszönhető az Au és az Ag között, ami a fématomok domináns kölcsönhatására utal a fémmagban. Másrészt a detektált kötési energiák az Ag tömbfázisszerű fémű tulajdonsága miatt is eltolódhatnak a nagyobb energiák felé. Közismert, hogy az ezüst $3d_{5/2}$ kötési energiája kevésbé érzékeny a méretcsökkentésre, de az illesztett Gauss-görbe félértékszélessége (FWHM) utalhat a fémmagok elsődleges méretére. A $3d_{5/2}$ csúcs FWHM értéke kb. 1,3 eV, ami szintén az elkülönülten jelenlévő ultrakisméretű NCs jelenlétére utalhat. Az FT-IR mérések révén megerősítettük, hogy az adenin gyűrű rezgései tolnak meghatározóan a fémtartalmú rendszerben. Nevezetesen az aminocsoporthoz tartozó síkbeli szimmetrikus hajlító rezgések 1583 cm^{-1} -ről 1568 cm^{-1} -re, míg a C2-N1 és C5-N7 vegyérték rezgések a síkbeli C8-H hajlító rezgésekkel 1355 cm^{-1} -ről 1396 cm^{-1} -re tolnak, míg a C8-N9 vegyérték rezgések a síkbeli N9-H és C8-H hajlító rezgések 1068 cm^{-1} -ről 1078 cm^{-1} -re [185]. Mindezen adatok alapján kijelenthető, hogy hasonló kötődés figyelhető meg ezen kétfémű rendszer esetén is, mint amit az egyfémű AMP-Au NCs esetén megállapítottunk. ICP-MS mérésekkel a klaszter mag fémtartalma a nominális értékkel jó egyezést mutatott; 52,5 m/m% Au, 47,5 m/m% Ag. A NCs vizes közegbeli stabilitását vizsgálva megállapítottuk, hogy azok pH ~ 6,5 – 9,0 tartományban kiemelkedő stabilitással rendelkeznek; $d \sim 2\text{ nm}$ átlagos hidrodinamikai átmérő és ζ -potenciál ~ -26 mV mérhető 10 mM (NaCl) ionerősségű, pH = 7,4 (PBS) közegben. Savas körülmények között (pH = 1,0 – 2,0) egy gyors és nagymértékű aggregáció figyelhető meg. Az enyhe savas tartományban (pH = 3,5 – 5,0) kb. 20 – 30 nm átlagos átmérőt mérhetünk, ami megnövekedett PL intenzitással párosul. Ez az optikai jelenség AIE jelenségként azonosítható (**13. ábra**), mivel az intramolekuláris rezgéseket és forgásokat az aggregáción alapuló szoros kontaktus erősen korlátozza.

A tisztított és karakterizált AMP-Au/Ag NCs szenzorikai célú felhasználását tesztelve azok kismolekulákkal való kölcsönhatását tanulmányoztuk vizes közegben. A B-vitamin család főbb tagjait (B₁/tiamin hidroklorid, B₂/riboflavin, B₃/nikotinamid, B₅/pantoténsav, B₉/folsav) és azok aminosav származékait (Glu (glutaminsav), Gln (glutamin)) vizsgáltuk, valamint a NADH (nikotinamid-dinukleotid) molekulákat, mely részben a NCs stabilizáló ligandumát az AMP-t is tartalmazza. Az **52. ábra (A)** mutatja, hogy kizárólag a B₉/folsav esetén mérhető PL kioltás. Mivel a vizsgált kismolekulák korlátozott vízoldhatósággal rendelkeznek savas pH-tartományban, így a méréseket 0,3 M NaHCO₃ oldatban (pH = 8,4) végeztük, mely esetén a NCs megfelelő stabilitással rendelkeznek ($\zeta = -28,3 \pm 1,2\text{ mV}$) és az emissziós spektrum esetén sem figyelhető meg változás (P19). A NCs folsavval való kölcsönhatását számos folsav koncentráció esetén ($c = 1,0\text{ nM} - 50,0\text{ }\mu\text{M}$) tanulmányoztuk, ami az **52. ábra (B)** alapján is látható, majd meghatároztuk a dinamikus tartományt (0,1 – 2,5 μM), valamint a LOD értékét eltérő közegekben. Valamennyi közegben kb. 0,1 μM

LOD érték adódik, de az RPMI 1640 (az 1640-es számú Roswell Park Memorial Intézetből) közegben a folsav kimutatási határa nem lehet kisebb, mint 2,265 μM , hiszen ezen közeg folsavat is tartalmaz 2,265 μM koncentrációban. Hasonlóan a $\gamma\text{G-Au NCs-Kyn}$ rendszerhez, egy papír-alapú, gyorsesztként funkcionáló szenzorfilmet (0,6 cm átmérőjű kör alakú papírkorong) is létrehoztunk, melyet előzetesen az AMP-Au/Ag NCs vizes diszperziójával kezeltünk, majd a papírkorongot megszáritottuk. Ahogyan az **52. ábra (C)** is mutatja, a folsav 0,5 μM koncentrációban történő hozzáadása után a papírkorong színe UV-lámpa alatt szinte azonnal az intenzív sárga színről viszonylag kis intenzitású kék színre változott, ami arra utalt, hogy nem csak szimpla kioltás, hanem PL eltolódás is bekövetkezik. Ezt a nagyobb folsav koncentrációnál ($c > 3,0 \mu\text{M}$) regisztrált emissziós spektrumok is igazolják, hiszen párhuzamosan az $\lambda = 560 \text{ nm}$ -nél lévő emissziós csúcs intenzitásának drasztikus csökkenésével egy új sáv megjelenése figyelhető meg $\lambda = 440 \text{ nm}$ -en. Az AMP-Au/Ag NCs – folsav kölcsönhatás feltérképezéséhez a PL kioltási méréseket, ahogyan korábban is említettem, széles folsav koncentráció tartományban és 3 eltérő hőmérsékleten is elvégeztük.



52. ábra: (A) Az AMP-Au/Ag NCs vizes diszperzióban ($c_{\text{Au}} = 25 \mu\text{M}$) jelen lévő ligandumok ($c = 10 \mu\text{M}$) hatására ($t = 5\text{-}10 \text{ mp}$ után) mért relatív (I_0/I) PL intenzitás értékek az egyes közegekben meghatározott LOD értékekkel ($\lambda_{\text{ex}} = 335 \text{ nm}$). (B) Az AMP-Au/Ag NCs PL emissziós spektrumai növekvő koncentrációjú folsav (B_9) jelenlétében ($c_{\text{Au}} = 25 \mu\text{M}$, $c_{\text{folsav}} = 0 - 50 \mu\text{M}$, pH = 8,4) a folsav szerkezeti képletének feltüntetésével. (C) AMP-Au/Ag NCs-tartalmú papír-alapú szenzor filmek fotói a folsav hozzáadása hatására UV-lámpa alatt (felül) és szabad fényben (alul); (D) az AMP-Au/Ag NCs feltételezett szerkezetváltozása a folsav hozzáadása előtt és után a fémmag elemösszetételének megjelölésével (P19).

Már a dinamikus tartomány meghatározásánál igazolást nyert, hogy lineáris kapcsolat a folsav koncentráció és a PL jel között csak igen szűk tartományban mutatkozik; 2,5 μM felett inkább exponenciálisan csökkenő görbét kapunk. Az előző fejezetben is ismertett módon meghatároztuk a Stern-Volmer állandót és a kölcsönhatás termodinamikai

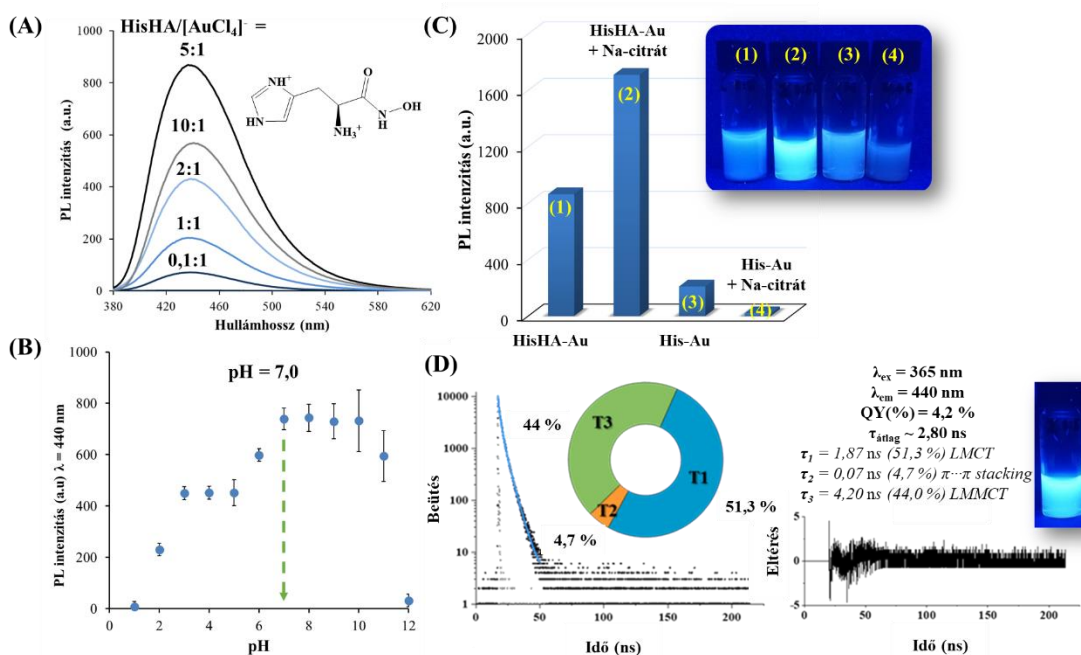
paramétereit, melyből megállapítottuk, hogy a meghatározott K_{SV} meglepően kis érték ($0,8 - 0,5 M^{-1}$). Mivel a K_{SV} csökkenő értéket mutat a hőmérséklet emelésével a dinamikus tartományban a kioltás kvázi sztatikus. A $\Delta H^\circ = -13,46 \pm 0,64 \text{ kJ mol}^{-1}$, a $\Delta S^\circ = -0,049 \pm 0,002 \text{ kJ mol}^{-1}K^{-1}$, míg a ΔG negatív érték ($-15 \text{ kJ mol}^{-1} - (-30 \text{ kJ mol}^{-1})$). A meghatározott értékek alapján a kioltási folyamat spontán, exoterm, és entrópia-vezérelt, mivel a $\Delta H^\circ > -T\Delta S^\circ$ az összes vizsgált hőmérsékleten. Feltehetően a kioltási folyamat során mind elektrosztatikus mind hidrofób kölcsönhatás is fellép a folsav molekulák és a fémmagot stabilizáló AMP ligandumok között. Mindezek mellett egyértelműen kijelenthető, hogy a folsav ún. maratási (*etching*) folyamatban a nagyobb, sárgán emittáló NCs-ből lényegesen kisebb, néhány atomos kéken emittáló NCs-et „állít elő”, mely a szenzorikai folyamat fő mechanizmusa (**52. ábra (D)**). Ennek igazolása végett az ICP-MS méréseket a folsavval való maratási folyamat végén is elvégeztük a dialízissel (Float-A-Lyzer® G2 (MWCO = 0,1 – 0,5 kDa) tisztított mintákon 10 h elteltével, ahol igazoltuk, hogy a folsav Ag-ben szegényíti el inkább a kétfémes magot, hiszen az elemek aránya a kb. 50:50 %-ról 70:30 %-ra változik, és már HRTEM felvételekkel sem tudjuk a néhány atomos fémmagot detektálni (P19). Összességében megállapíthatjuk, hogy a folsav szelektív detektálására egy eredményes és új szenzor rendszert fejlesztettünk AMP-Au/Ag NCs felhasználásával eltérő vizes közegekben és egy papír-alapú filmen is (P19).

5.5.3. HisHA stabilizált Au NCs előállítás és szenzorikai lehetőségeik

Az *L*-hisztidin – $[AuCl_4]^-$ rendszer részletes jellemzésén túl (P15) egy olyan kismolekula szintézisét is elvégeztük, amely esetén a His aminosav karboxilcsoportját hidroxamát funkciócsoportra cseréltük (hisztidinhidroxámsav, HisHA), mely további alifás-*N* donoratomot tartalmaz és számos fémionnal stabil, 5-tagú [O,O] kelát kialakítására képes ezen funkciócsoporton keresztül, valamint a hidroxamát-*N* is sok esetben potenciális fémionmegkötő tulajdonsággal rendelkezik [171,172]. Kérdésként merült fel, hogy az $[AuCl_4]^-$ -ionok redukciója Au^0 oxidációs állapot elérésig, a His-nel ellentétben, megvalósítható-e ezen új ligandummal, melyet korábban nem használtak (még a hidroxámsavak családjából egyetlen molekulát sem) Au NCs előállítására. Hasonló elvek alapján tanulmányoztuk a fémion/ligandum molarányának, a fémion koncentrációjának, valamint a pH, a hőmérséklet és a reakcióidő hatását a NCs képződésére.

A fémion/HisHA molarány tanulmányozása során megállapítottuk (P20), a HisHA aurát(III)ionokkal való kölcsönhatása is eredményez fluoreszcens termék képződését, és hogy HisHA:[$AuCl_4]^-$ /5:1 esetén érhető el legnagyobb intenzitás $\lambda_{em} = 440 \text{ nm}$ -nél $\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$ gerjesztés mellett, melyet az **53. ábra (A)** mutat. A szintézist először szobahőmérsékleten végeztük el, de nem eredményezett fluoreszcens terméket; 37 °C-on már tapasztalható volt a kék emisszió, de elég kis intenzitással, így a 80 °C-ot választottuk ideális hőmérsékletnek. A hőmérséklet közel forráspontig (100 °C) történő emelése viszont már kedvezőtlen volt a PL kialakulására és Au NPs valamint azok aggregátumai jelentek meg a mintában. A fémion koncentráció hatását is széles tartományban (0,1 – 2,0 mM) vizsgáltuk, és a legnagyobb PL intenzitás $c = 1,0 \text{ M}$ beállítása esetén mutatkozott. Mivel a ligandum több deprotonálódásra képes donorcsoportot is tartalmaz, így a közeg pH-ja döntő hatással van a képződő termékek megjelenésére a fémionnal való koordináció kialakulása szempontjából is. A fentebb említett

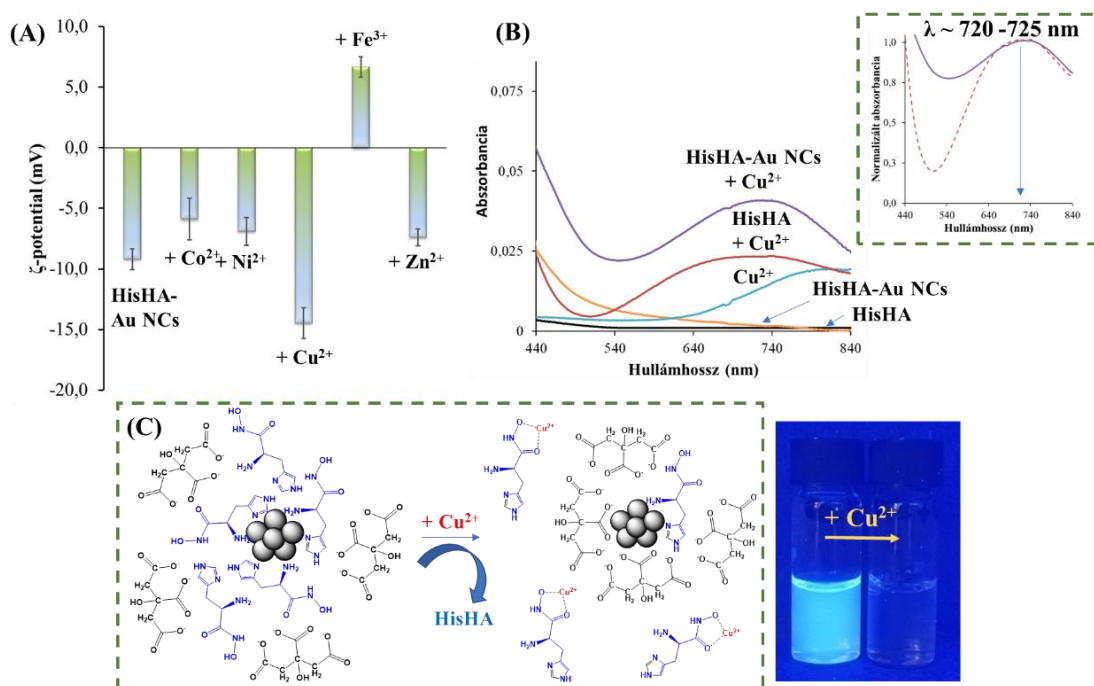
szintéziskörülmény optimalizálása pH ~ 7,0 értéken történt, mert a komponensek összemérése után ez volt a reakcióközeg mért pH értéke. Széles tartományban vizsgálva a pH hatását megállapítottuk, hogy a savas közeg (pH = 2 – 5) nem kedvező a kéken emittáló termékek képződésére, ez hasonlóságot mutat a His-Au rendszer esetén is megállapított tulajdonsággal. Amint az az **53. ábra (B)** részén is látható, a bázikusabb (pH = 7 – 10) közeg inkább kedvező. Mivel a komponensek összemérése után a minta pH-ja ~ 7,0, így ezen értéket hagytuk a szintézis ideális pH-jának. Tanulmányoztuk továbbá extra redukálószer alkalmazhatóságának igényét is, mivel a His-Au rendszer esetén a redukció csak Au(I)-polinukleáris komplexek képződéséig vezetett. Összehasonlítás végett a His-Au rendszer szintézisét is megismételtük citrát jelenléte mellett, az eredményeket az **53. ábra (C)** foglalja össze. Megállapítást nyert, hogy, bár citrát alkalmazása nélkül is képződnek kéken emittáló termékek (**53. ábra (C), (1)**), de több citrát koncentráció beállítása mellett ($c_{\text{citrát}} = 1 - 15 \text{ mM}$) megismételve a szintéziseket közel 2x nagyobb PL intenzitást sikerült elérni a HisHA:citrát:[AuCl₄]⁻/5:10:1 arány alkalmazása mellett (**53. ábra (C), (2)**). Megismételve a His-Au rendszer szintézisét látható, hogy a citrát jelenléte különösen kedvezőtlen (**53. ábra (C), (3-4)**) ezen rendszer esetén és nem járul hozzá a NCs képződéséhez; minden valószínűség szerint az Au(I)-polinukleáris komplex jelenléte sokkal inkább domináns.



53. ábra: (A) A HisHA:[AuCl₄]⁻ rendszerben képződő termék PL intenzitás értékei eltérő fémion/ligandum arányoknál ($c_{\text{Au}} = 1,0 \text{ mM}$, $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$, 80 °C, 24 h, pH = 7,0) a HisHA teljesen protonált szerkezeti képletével; (B) a HisHA:[AuCl₄]⁻/ 5:1 rendszer esetén regisztrált PL intenzitás értékek a pH függvényében ($c_{\text{Au}} = 1,0 \text{ mM}$, $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$, 80 °C, 24 h); (C) a HisHA:[AuCl₄]⁻ és His:[AuCl₄]⁻ rendszerekben képződő termékek PL intenzitás értékei azonos, $c_{\text{Au}} = 1,0 \text{ mM}$ mellett szintetizálva citrát hiányában és jelenlétében ($c_{\text{citrát}} = 10,0 \text{ mM}$) a minták UV-lámpa alatti fotóival (HisHA:[AuCl₄]⁻/ 5:1, $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$, 80 °C, 24 h, pH = 7,0; His:[AuCl₄]⁻/ 30:1, $\lambda_{\text{ex}} = 378 \text{ nm}$, 37 °C, 24 h, pH = 6,0); (D) a HisHA:[AuCl₄]⁻ rendszerekben képződő termék PL lecsengési görbéje és az élettartam komponensek hozzájárulási értékeivel ($\lambda_{\text{ex}} = 371 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$), valamint a minta UV-lámpa alatti fotójával (P20).

A tisztított termék (centrifugálás 13000 rpm, 30 perc, majd dialízis 180 perc (MWCO = 1 kDa) karakterizálása során a főbb optikai sajátságok meghatározásánál a QY(%) = 4,2 %, amíg az átlagos élettartam $\tau_{\text{átlag}} = 2,80$ ns (3 főbb komponens azonosítása mellett: $\tau_1 = 1,87$ ns (51,3 %), $\tau_2 = 0,07$ ns (4,7 %), $\tau_3 = 4,20$ ns (44,03 %) adódott, ahol az irodalmi adatokat figyelembe véve a rövidebb τ_2 a HisHA π – π stacking kölcsönhatásból származhat [186]. A hosszabb τ_1 ($1,87 \pm 0,09$ ns) és τ_3 ($4,20 \pm 0,06$ ns) értékek a fémközpontú emissziókhoz tartozhatnak, amelyek a ligandum-fém (LMCT), ill. a ligandum-fém-fém töltésátvitel (LMMCT) [187,188]. Az FT-IR mérések részletes elemzésre kevésbé alkalmasak a minta fémes karaktere miatt, ami részben igazolja a NCs képződését és preferálja a nulla oxidációs állapotú Au jelenlétét, amit a citrát alkalmazása is megerősíthet. A fémtartalmú rendszerben az imidazolgyűrűhöz tartozó rezgés 3125 cm^{-1} -ről 3030 cm^{-1} -re tolódik elsősorban, ami arra utal, hogy a fémion koordinációja valószínűleg ezen aromás-*N* donorok révén történik, de az amino-*N* hajlító rezgése is eltolódik 1575 cm^{-1} -ről 1556 cm^{-1} -re. A hidroxamátcsoport karakterisztikus rezgése(i) tartományában eltolódás nem figyelhető meg, ami alapján a NCs szenzorikai célú felhasználását kíséreltük meg feltérképezni fémionok vonatkozásában, hiszen egy olyan szabadon hozzáférhető felületi funkció csoportot alakítottunk ki a fémmag felületén, mely erős fémion megkötő sajátsággal rendelkezik, így lehetőség mutatkozik fémionok (akár) szelektív megkötésére is. Ennek megfelelően a HisHA-Au NCs kölcsönhatását ($c_{\text{Au}} = 0,25$ mM) vizes közegben számos +1, +2, és +3 értékű fémionokkal ($c_{\text{fémion}} = 1,0$ mM) tanulmányoztuk, ahol megállapítottuk, hogy több fémion esetén is tapasztalható PL kioltás, de eltérő mértékben: Fe^{3+} ($I_0/I = 6$), Co^{2+} ($I_0/I = 10$), Ni^{2+} ($I_0/I = 13$), Cu^{2+} ($I_0/I = 24$), míg a diamágneses karakterű Zn^{2+} esetén PL erősítés volt megfigyelhető ($I_0/I < 1$). Szelektív kölcsönhatás nem állapítható meg, de a kölcsönhatás természetének feltérképezéséhez több mérést is elvégeztünk. Amint az **54. ábra (A)** is mutatja, a HisHA-Au NCs ζ -potenciál értékei ($\zeta = -9,20 \pm 0,86$ mV) abszolút értékben alacsonyabb értékek felé tolódnak el a paramágneses Co^{2+} - ($\zeta = -5,90 \pm 1,72$ mV) és Ni^{2+} - ($\zeta = -6,90 \pm 1,14$ mV) ionok esetében, mely a nevezett fémionok NCs felületén történő adszorpciójára utalhatnak. A Fe^{3+} -ionok ($\zeta = +6,64 \pm 0,84$ mV) vonatkozásában a felületi töltés pozitív értéket vesz fel, mely a vártaknak megfelelően a felület áttöltését mutatja. Ezek a megállapítások jó összhangban vannak a ζ -potenciál változásának tendenciájával a pozitív töltésű két- és háromértékű ionok diszperz rendszerhez való hozzáadásának eredményeképpen. Ezekben az esetekben a fémionok a NCs felületén található stabilizáló HisHA ligandumokhoz kötődhetnek, ami sztatikus PL kioltást eredményez. Sztatikus kioltás esetén az alapállapotban lévő fluorofór (HisHA-Au NCs) és a kioltó (fémionok) között egy ún. nem fluoreszkáló (sötét) komplex(ek) képződnek, és a gerjesztett állapotban csökken a fluoreszkáló molekulák száma, ahogy ezt korábbi munkánkban az AMP-Au NCs és Fe^{3+} esetében igazoltuk. Ezzel szemben Cu^{2+} -ionok esetében a mért ζ -potenciál (ugyanazon fémion koncentráció és mérési paraméterek mellett) nagyobb negatív értéket mutat ($\zeta = -14,48 \pm 0,84$ mV), ami arra utalhat, hogy a Cu^{2+} -ionok hozzáadásakor más kölcsönhatások is felléphetnek. A változás egyik magyarázata az lehet, hogy a Cu^{2+} -ionok a rendszerben jelenlévő HisHA ligandumok nagy részével komplexet képeznek és így a fémfelület „elszegényedik” a stabilizáló ligandumban és a negatív töltésű citrát molekulák, amelyek a fémmag körül második-harmadik adszorpciós réteggé válnak jelen, közelebb

kerülnek a felülethez, elektrosztatikus stabilizációt biztosítva. Ezt a feltételezést megerősíti az a tény is, hogy a Cu^{2+} -ionok hozzáadásával a diszperzió pH-ja (pH = 6,81) pH = 4,05-re csökken. A többi fémion esetében ez nem figyelhető meg, csak a hígulás miatti enyhe (néhány tízed) pH csökkenést mérjük. Emellett az élettartam mérések is megerősítik feltételezésünket. A Cu^{2+} -ionok hozzáadása után a meghatározott élettartam-komponensek drasztikusan megváltoznak: $\tau_1 = 2,21 \pm 0,12$ ns (33,9 %), $\tau_2 = 0,26 \pm 0,01$ (18,7 %) és $\tau_3 = 7,14 \pm 0,11$ ns (47,4 %). Ezek a megváltozott értékek a felületi ligandum megváltozására/átrendeződésére utalnak, ugyanis a nitrogén helyett egy oxigénben gazdagabb felületen jelentősebb a p-pálya átmenet [189], mely nagyobb PL élettartam értéket eredményez, amit jelen esetben is tapasztalunk. A feltételezett mechanizmus további megerősítése érdekében a diszperzió abszorbancia spektrumát Cu^{2+} -ionok nélkül és jelenlétében is felvettük.



54. ábra: (A) A HisHA-Au NCs vizes diszperzióinak ζ -potenciál értékei a feltüntetett fémionok hozzáadása után ($c_{\text{fémion}} = 1,0$ mM, $c_{\text{Au}} = 0,25$ mM, $I = 10$ mM NaCl); (B) a HisHA ($c = 3$ mM) látható spektruma Cu^{2+} -ion távollétében és jelenlétében ($c_{\text{Cu}^{2+}} = 1,5$ mM) valamint a HisHA-Au NCs látható spektruma ($c_{\text{Au}} = 0,25$ mM) Cu^{2+} -ion távollétében és jelenlétében ($c_{\text{Cu}^{2+}} = 1,0$ mM) a szabad Cu^{2+} -ionokat tartalmazó oldat ($c_{\text{Cu}^{2+}} = 1,0$ mM) spektrumával; (C) HisHA-Au NCs + Cu^{2+} rendszerben feltételezett, a kioltást eredményező, szerkezeti változás a HisHA-Au NCs UV-lámpa alatti fotójával a Cu^{2+} hozzáadása előtt és után (P20).³²

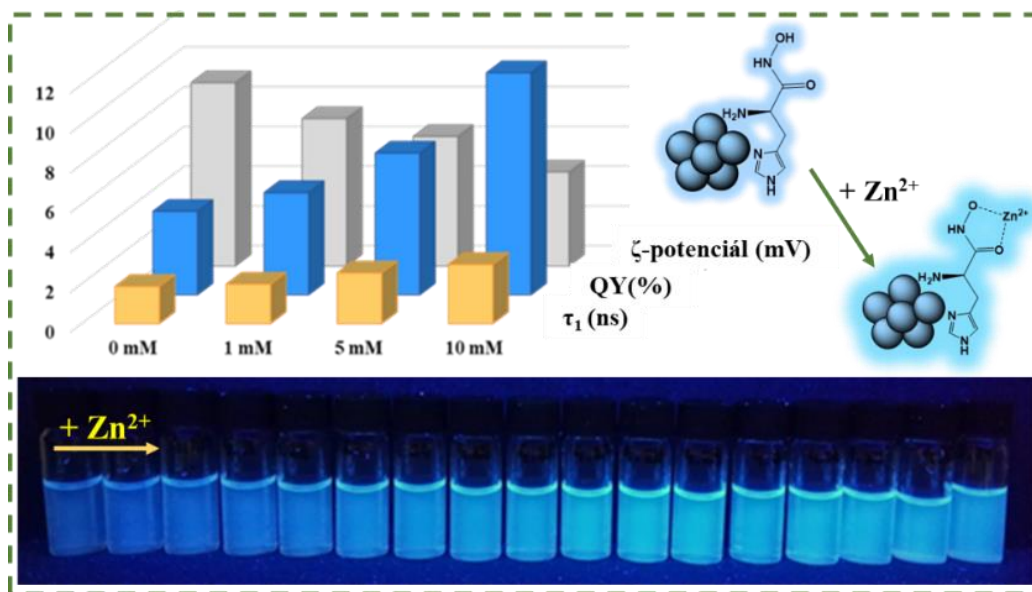
Amint az **54. ábra (B)** látható, a HisHA-Au NCs nem mutatnak karakterisztikus abszorbancia sávot pH = 4,05 esetén $\lambda = 640 - 840$ nm tartományban, azonban Cu^{2+} -ionok hozzáadására egy új sáv megjelenése figyelhető meg $\lambda = 720 - 725$ nm hullámhossz értéknél. Ez a sáv feltehetően nem a szabad, koordinálatlan Cu^{2+} -ionok jelenlétét igazolja, mert ezen Cu^{2+} -ionok vizes oldatának abszorbancia maximuma $\lambda = 820 - 850$ nm detektálható az

³² pH $\sim 4,0$ esetén a citrát molekulák csak részlegesen deprotonáltak, de az **54. ábra (C)** részénél a teljesen deprotonált forma van feltüntetve.

54. ábra (B) alapján. Az észlelt új abszorpciós sáv azonosításához a tiszta ligandum spektrumát is felvettük Cu^{2+} -ionok jelenlétében (HisHA: Cu^{2+} /2:1 mólarány) pH = 4,05 beállítás mellett. Amint az **54. ábra (B)** mutatja, a Vis-tartományban egy széles abszorpciós sáv figyelhető meg $\lambda = 720 - 725$ nm-nél lévő maximummal. A HisHA oldategyensúlyi vizsgálata számos fémionnal már publikálásra került, így az egyes rendszerekben képződő komplex(ek) spektrális paraméterei a pH függvényében is publikált adatok [190]. A HisHA Cu^{2+} -ionnal való koordinációja pH ~ 3 – 3,5 között kezdődik döntően a hidroxamát-O donorokon keresztül, de a pH növelésével egyre inkább a nitrogéndonorokon keresztül történő kötődés válik dominánssá. A pH = 4,5 – 7 között az amino-N és az imidazol-N donorok koordinálódnak a komplexekben. Az abszorbancia spektrumban a pH növekedésével (pH ~ 2,0-ról pH ~ 4,0-re) a detektált abszorbancia sáv eltolódást mutat a $\lambda = 800$ nm-ről $\lambda \sim 720$ nm-re [190]. A HisHA- Cu^{2+} (szaggatott vonal) és a HisHA-Au NCs- Cu^{2+} (folytonos vonal) normalizált abszorpciós sávjai (**54. ábra (B)**) feltételezik ugyanazon komplexek jelenlétét a mintákban, ami megerősíti korábbi feltételezésünket a fémfelületen történő ligandum változásáról, ahogy azt az **54. ábra (C)** sematikus rajza is szemlélteti (P20). Meg kell említeni, hogy a citrát (amely jelen van a rendszerben) savas pH-n képes a Cu^{2+} -ionokhoz kötődni, $[\text{Cu}_2\text{cit}_2]$ dimer komplexeket képezve, de ennek a komplexnek a jellegzetes abszorbancia sávja $\lambda = 760$ nm-nél detektálható [191]. A $[\text{Cu}_2\text{cit}_2]$ komplex preferált képződésének kizárása érdekében a kísérleteket citrát hiányában is megismételtük. Az abszorbancia spektrum esetében csak a $\lambda = 720 - 725$ nm-es sáv detektálható, ami arra utal, hogy a fémionok a citrát jelenlétében is meghatározóan a HisHA ligandummal való komplexképződést preferálják és az esetlegesen képződő $[\text{Cu}_2\text{cit}_2]$ dimer komplexek jelenléte a PL kioltást nem befolyásolja. A Cu^{2+} -ionok hozzáadása után a HisHA-Au NCs ζ -potenciáljának értéke (citrát hiányában) $-8,99 \pm 5,70$ mV-ról $+9,61 \pm 2,14$ mV-ra tolódott, ami tovább erősíti a HisHA ligandum felületről történő „elszegényedését”.

A Zn^{2+} -ion esetén PL erősítés következik be (P20). A NCs vizes diszperziójához növekvő Zn^{2+} -ionokat adagolva a NCs emissziós intenzitása nem mutat lineáris növekedést a fémion koncentrációjának növelésével. A nem-lineáris kapcsolat miatt a legkisebb kimutatható koncentrációt ($7,5 \mu\text{M}$) az általánosan elfogadott $\text{LOD} = 3s_{bl}/m$ egyenlet alapján számoltuk ki, ahol az s_{bl} a Zn^{2+} -ionok nélküli háttér fluoreszcencia jel, míg az m a kalibrációs görbe kezdeti tartományának meredeksége. Az $1,0 \text{ nM} - 5,0 \mu\text{M}$ tartományban az I/I_0 értékek azonosak ($\sim 1,0$), az első jelentős erősödés $\sim 7,5 \mu\text{M}$ -tól kezdődik, az I/I_0 értékek $50 \mu\text{M} - 1,0 \text{ mM}$ tartományban detektálható jelet mutatnak ($R^2 = 0,9851$). A Zn^{2+} -ion koncentrációjának növelése intenzív erősítést okoz, ami a QY(%)-ban is lineáris tendenciát eredményez $1,0$ és $10,0 \text{ mM}$ között. A His-AuNCs és a Zn^{2+} -ionok közötti kölcsönhatás feltérképezése során megállapítottuk, hogy az élettartam-komponensek, valamint a mért QY% a Zn^{2+} -ionok koncentrációjával növekednek (**55. ábra**). Ezzel szemben a ζ -potenciál abszolút értéke csökken. Irodalmi adatok alapján a Zn^{2+} a klaszter felületén szabadon hozzáférhető hidroxamát-[O,O] koordinációt preferálja [192]. A relatív fluoreszcencia görbe fenn említett töréseit figyelembe véve arra is következtethetünk, hogy a fémion megkötődése kétlépcsős folyamat lehet. Az első, enyhe erősödést mutató régióban a fémion a NCs közelében lévő, elektrosztatikus stabilizálásban szerepet játszó HisHA molekulákhoz kötődik. A második

régió esetén, ahol már a nagyobb erősítés detektálható, a fémion már a felületen közvetlen kötött HisHA ligandumok szabad hidroxamát donorcsoportjain keresztül koordinálódhat.



55. ábra: A HisHA-Au NCs + Zn²⁺ rendszerben ($c_{Au} = 0,25 \text{ mM}$, $c_{Zn(II)} = 10 \mu\text{M} - 100 \text{ mM}$) feltételezett szerkezeti változás növekvő $c_{Zn^{2+}}$ esetén a minták UV-lámpa alatti fotójával és a diszperz rendszer főbb adatai (τ_1 , QY(%), ζ -potenciál).

Ez az esetleges Zn²⁺ megkötődés a felületen lévő HisHA ligandumon keresztül a ζ -potenciál értékek alapján a klaszter stabilitásának kismértékű gyengülését okozza. Ezt a TCSPC adatok is jól bizonyítják, mert a fluoreszcencia élettartam komponensek közül döntően a fémmaghoz rendelhető komponensek (τ_1 és τ_3) növekednek. A szakirodalom alapján tudjuk, hogy a Tauc-diagram szolgál a HOMO-LUMO energiáris meghatározására. Ebből a célból felvettük az UV-Vis spektrumokat, ahol 10 mM Zn²⁺-ion hozzáadása a második abszorpciós csúcs nagymértékű vörös eltolódását okozza 355 nm-ről 376 nm-re, ami a NCs szupramolekuláris szerkezetének megváltozására utal. Az Au NCs kezdeti energiáris kb. 3,1 eV, a Zn²⁺-ionnal történő kölcsönhatás eredményeképpen ~ 2,9 eV-ra változott, ami a Zn²⁺-komplexelek fotoaktív viselkedése miatt megkönnyíti az elektronok könnyebb gerjesztését a HOMO-sávból a LUMO-sávba [193]. Az irodalomban azonosítottak már hasonló PL erősítést Au NCs esetén Zn²⁺-ionok hatására, ahol a fémionok hozzáadására egy ún. „*coordination-induced aggregation induced emission*” jelenség következik be, mely a NCs önszerveződését foglalja magába a Zn²⁺-ionokon keresztül [194]. Hasonló következhet be a saját rendszerünkben is a hidroxamát-[O,O] koordináción keresztül.

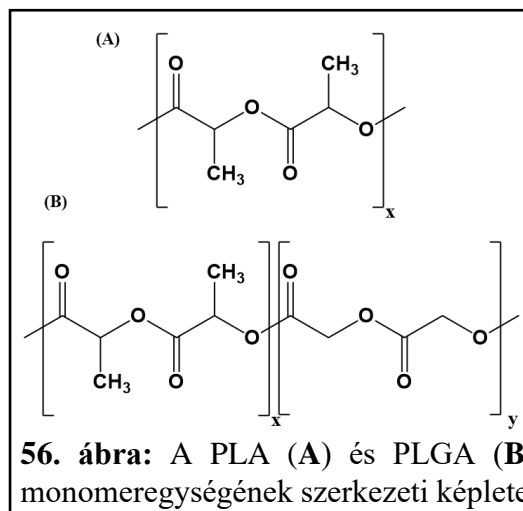
5.6. PLGA- alapú biokolloidok, mint hatóanyag szállító részecskék

Makromolekulákból felépülő, szerves-alapú kolloid részecskék kialakításával és azok gyógyszerhatóanyag hordozó részecskéként történő alkalmazási lehetőségeinek a feltérképezéssel is foglalkoztunk 2018-tól indulóan. Kétféle makromolekula (PLA/PLGA és HyA) köré csoportosíthatóak az eredmények, melyeket a következő alfejezetekben mutatok be.

5.6.1. A PLGA kopolimerek jellemzése

A PLGA kopolimereket felépítő monomerek/dimerek³³ arányát változtatva lehetőség nyílik a kopolimerek hidrofóbításának hangolására, mely révén változatos oldhatóságú vegyületek kapszulázása is megvalósítható az alkalmasan megválasztott polimer részecskébe, valamint a hatóanyag leadás is erősen kontrollálható. Munkánk során kereskedelmi forgalomban kapható PLA, PLGA75, PLGA65 és PLGA50

polimereket tanulmányoztunk (56. ábra), de a PLGA75 és PLGA65 származékokat elő is állítottuk (P21). A szintézisek sikerességét FT-IR és DSC mérések révén igazoltuk, míg a szintetizált származékok átlagos molekulatömegét fényszórás mérések segítségével határoztuk meg. A nedvesedési tulajdonságok karakterizálására peremszög méréseket végeztünk. A vonatkozó eredményeket a (P21) közlemény részletesen összefoglalja. A ROP szintézis sikerességét igazolva azonosíthatóak az FT-IR spektrumok



ujjlenyomat tartományában ($\nu \leq 1500 \text{ cm}^{-1}$) a polimerekre jellemző C-O észter kötésekhez rendelhető, 1180 cm^{-1} és 1080 cm^{-1} hullámszámoknál megjelenő rezgési sávok. A rögzített IR spektrumok az irodalmi adatokkal jó egyezésben [195,196] vannak. A polimerek termikus sajátságait, az üvegesedési ($T_{g,max}$) és a degradációs ($T_{d,max}$) hőmérsékletét, DSC mérésekkel határoztuk meg. A laktid $130 \text{ }^\circ\text{C}$ (olvadáspont) és $260 \text{ }^\circ\text{C}$ (degradációs hőmérséklet), ill. a glikolid $86 \text{ }^\circ\text{C}$ (olvadáspont) és $269 \text{ }^\circ\text{C}$ hőmérséklet értékeknél (degradációs hőmérséklet) megjelenő karakterisztikus endoterm csúcsai az egyes polimerek DSC görbéin nem figyelhetőek meg, ami arra utal, hogy számottevő mennyiségű szabad monomer nincs jelen a mintáinkban. A DSC görbéken megfigyelhető degradációs hőmérsékletek fokozatosan növekvő értéket mutatnak a kopolimerekben jelenlévő glikolid mennyiségének növelésével, amit feltételezhetően a makromolekulás láncban lévő hidofil részek között megnövekedő intermolekuláris kölcsönhatások okozhatnak. A kereskedelemben kapható és az általunk szintetizált PLA/PLGA termikus sajátságai jelentős eltérést nem mutattak. A meghatározott üvegesedési hőmérsékletek a G. Reich és kutatócsoportja által, ugyanezen polimerekre publikált üvegesedési hőmérsékletek adataival jól egyeznek [197]. A kísérletileg mért peremszögek a PLA makromolekulától kezdve fokozatosan csökkenő értékek $\sim 74,5^\circ$ -tól (PLA) $\sim 68,2^\circ$ -ig (PLGA65) a glikolid mennyiségének növekedésével, ami igazolja, hogy a szintetizált polimerek hidrofilitása szisztematikusan változik a laktid:glikolid aránnyal.

5.6.2. Hatóanyag-nélküli PLGA kolloid részecskék jellemzése

Ugyan számos közlemény olvasható PLGA-alapú részecskék gyógyszerhatóanyag hordozó rendszerként történő alkalmazási lehetőségeinek a bemutatására vonatkozóan [106–108],

³³ Munkánk során a szintézishez a tejsav és a glikolsav ciklusos dimerjét (*D,L*-laktid és glikolid) használtuk, így esetünkben egy-egy dimer alkotja a PLGA kopolimer egy-egy monomeregységét.

ahogyan az az Irodalmi áttekintés fejezetben is ismertetésre került, de elhanyagolható azon publikációk száma, melyek az alkalmazott oldószer, a stabilizátor és a változatos hidrofóbítású polimerek együttes hatását elemzik a szabályozható mérettel rendelkező részecskék előállítására vonatkozóan. Ezen sajátságok együttes szerepének ismerete nélkülözhetetlen továbbá a szabályozható hatóanyagtartalom, valamint annak kontrollált felszabadulása tekintetében. Munkánk során, ahogyan a dolgozat 25. oldalán már részletesen említettem, ezen hatások együttes szerepének a felderítését és értelmezését tűztük ki célul első körben a fenn részletezett tulajdonságok vonatkozásában (P21). A Kísérleti körülményekben leírt protokollt alkalmazva nanoprecipitációs eljárással állítottunk elő PLGA részecskéket és a tisztított hordozók jellemzésére fényszórás méréseket végeztünk. A szerves oldószer hatását összehasonlítva megállapítottuk, hogy az 1,4-dioxánhoz ($T_f = 101\text{ °C}$; $\gamma = 33,0\text{ mN/m}$ (20 °C); $\rho = 1,03\text{ g/cm}^3$) képest a kisebb sűrűséggel, felületi feszültséggel és forrásponttal rendelkező acetonnal ($T_f = 56\text{ °C}$; $\gamma = 25,2\text{ mN/m}$ (20 °C); $\rho = 0,784\text{ g/cm}^3$) alkalmazása esetén átlagosan 10 – 70 nm-rel kisebb hidrodinamikai átmérővel rendelkező részecskék képződnek. A stabilizátorok (CTAB, PVA, PLUR) hatását tanulmányozva a legkisebb részecskeméret és polidiszperzitási index értékeket a PLUR stabilizátor és acetonnal oldószer alkalmazásával értük el ($d_{DLS} \approx 180 - 190\text{ nm}$, $PDI = 0,05 - 0,10$). A PVA felhasználásával előállított rendszerek polidiszperzitása a PLUR-tartalmú mintákkal összevethető, viszont a PVA nagyobb molekulatömegének köszönhetően (PVA: $\sim 72000\text{ Da}$, PLUR: $\sim 12600\text{ Da}$) a részecskék hidrodinamikai átmérője nagyobb lesz. *Kijelenthető, hogy a stabilizátorok töltése és molekulatömege a PLA/PLGA alapú részecskék méretét és polidiszperzitását jelentősen befolyásolja.* Az optimálisnak választott PLUR stabilizátor és acetonnal oldószer alkalmazásánál előállított PLA/PLGA részecskék ζ -potenciál értékét is elemeztük. A ζ -potenciál értékek rendre $\zeta = -85,7 \pm 1,8\text{ mV}$ (PLGA65), $\zeta = -87,6 \pm 1,9\text{ mV}$ (PLGA75) és $\zeta = -82,2 \pm 1,2\text{ mV}$ (PLA), így megállapíthatjuk, hogy jelentős különbség nem figyelhető meg, tehát az eltérő hidrofóbítású polimerekből kialakított hordozó részecskék stabilitása közel azonos (P21).

5.6.3. Hatóanyag-tartalmú PLGA kolloid részecskék általános jellemzése

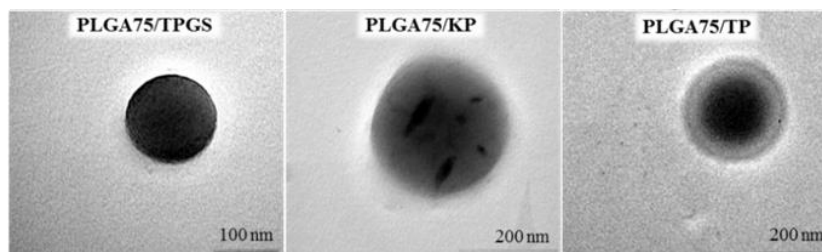
Nanoprecipitációs eljárással acetonnal/víz alkalmazása mellett PLUR stabilizátorral előállított PLA/PLGA75/PLGA65 részecskék kapszulázási tulajdonságait is feltérképezni kívántuk csökkenő vízdoldhatósággal rendelkező (modell)hatóanyagok (TPGS > KP > TP) felhasználásával. A TPGS-t a vizes, a KP és TP hatóanyagokat a szerves fázis tartalmazta és az alábbi koncentrációk beállítása mellett dolgoztunk: szerves fázis: $c_{PLA/PLGA} = 10\text{ mg/cm}^3$, $V = 1,5\text{ cm}^3$; vizes fázis: $c_{PLUR} = 0,1\text{ mg/cm}^3$, $V = 15\text{ mL}$; $m_{\text{hatóanyag}} = 7,5\text{ mg}$). Az előállított részecskék főbb adatait a **9. táblázat** tartalmazza. Látható, hogy: (i) A hatóanyagok vízdékonyságának csökkenésével (TPGS > KP > TP) a részecskék hidrodinamikai átmérője szisztematikusan növekvő tendenciát mutat (180/190 nm – 250/260 nm), ami eltérő szerkezetű részecskék kialakulására utalhat. (ii) Ugyanazon hatóanyag esetén a kopolimerek laktid:glikolid arányának változtatása nincs számottevő hatással a részecskék méretére.

9. táblázat: A PLUR-kal stabilizált hatóanyag-tartalmú PLA/PLGA részecskék átlagos részecske átmérői (d_{DLS} , d_{TEM}), a polidiszperzitási indexek (PDI) és a kapszulázási hatékonyság (EE%) és hatóanyag-tartalom (DL%) értékek (P21).

hordozó	hatóanyag	PDI	$d_{DLS} \pm SD^{\#}$ (nm)	$d_{TEM} \pm SD$ (nm)	EE (%)	DL (%)
PLGA65	—	$0,11 \pm 0,07$	186 ± 32	164 ± 51	—	—
	TPGS	$0,12 \pm 0,03$	178 ± 48	159 ± 63	11,34	3,78
	KP	$0,14 \pm 0,04$	216 ± 62	204 ± 71	13,21	4,40
	TP	$0,23 \pm 0,03$	253 ± 52	238 ± 59	88,25	29,41
PLGA75	—	$0,10 \pm 0,01$	180 ± 33	172 ± 49	—	—
	TPGS	$0,07 \pm 0,04$	173 ± 47	160 ± 56	6,39	2,13
	KP	$0,07 \pm 0,01$	207 ± 42	193 ± 69	7,91	2,64
	TP	$0,19 \pm 0,05$	257 ± 75	238 ± 62	90,28	30,09
PLA	—	$0,05 \pm 0,05$	190 ± 36	183 ± 57	—	—
	TPGS	$0,13 \pm 0,05$	195 ± 64	190 ± 76	6,88	2,29
	KP	$0,09 \pm 0,06$	225 ± 48	211 ± 64	11,29	3,76
	TP	$0,12 \pm 0,05$	257 ± 73	236 ± 77	69,07	23,02

A csúcsmaximum kísérleti hibája 4 % alatti.

A részecskék szerkezetét TEM felvételek révén sikerült azonosítani, melyek alapján egyértelműen kijelenthető, hogy míg a TPGS- és a KP- tartalmú részecskéknél közel homogén, addig a TP alkalmazása esetén egy jól definiált mag-héj struktúra kialakulása fedezhető fel, amelyet a polimerekben lévő laktid:glikolid arányok változtatása jelentős mértékben nem befolyásol (57. ábra).



57. ábra: Nanoprecipitációs eljárással előállított, TPGS, KP és TP hatóanyag-tartalmú PLGA75 részecskék reprezentatív TEM felvételeinek részletei 1-1 detektálható részecskéről (P21).

Nanoprecipitációs eljárással a mag-héj szerkezet kialakulása csak nagyon hidrofób hatóanyagok esetében valósulhat meg (KP: $\log P = 2,71$ [198]; TP: $\log P = 12,2$ [199]), mivel lehetőség adódik a polimer láncok hidrofób részeinek hatóanyag körüli csoportosulására. A PLA/PLGA kapszulázási hatékonyságát megvizsgálva a legkisebb értéket a TPGS esetén (6 – 11 %), míg a legnagyobbat a TP vonatkozásában (70 – 90 %) érték el (9. táblázat). Ezen eljárás révén a hidrofób vegyületek PLGA részecskékbe történő juttatása nagyobb hatékonysággal kivitelezhető [200], ami esetünkben a TP esetén is megállapítható. A KP vonatkozásában, a kezdetben vizes fázisban oldott TPGS vegyülethez hasonlóan, alacsony hatóanyag bevitelt figyeltünk meg. A PLA/PLGA hordozókat nézve egyértelműen

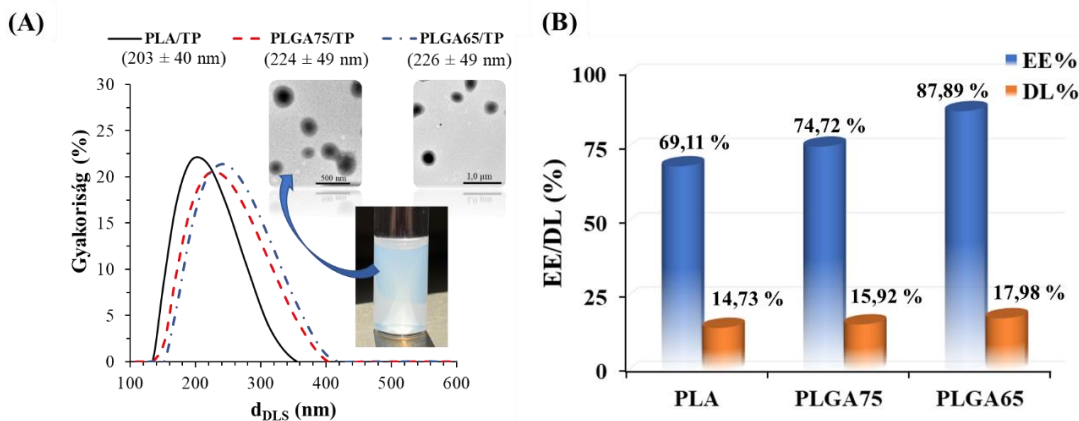
kijelenthető, hogy a kevésbé hidrofób hordozók a TP hatóanyagnál nagyobb kapszulázási hatékonysággal rendelkeznek, így a glikolid arányának növelésével a hatóanyag hordozóba való vitele tovább növelhető. Ennek legfőbb oka lehet, hogy a hidrofilitás változásával a polimerek kicsapódási folyamatai is időben lassabban következnek be, ami elősegítheti a TP mag kialakulását, így a kapszulázási hatékonyság növekedését

5.6.3.1. Tokoferol-tartalmú PLGA részecskék tervezése: hangolható hatóanyag-tartalom és szabályozott kioldódás

Munkánk során nanoprecipitációs módszerrel előállított PLA/PLGA kolloid részecskékbe hidrofób TP kapszulázására optimalizáltunk egy előállítási protokollt (P22). Kiemelt cél volt a hordozó hidrofóbításának és a komponensek (hordozó, hatóanyag, stabilizátor) koncentrációjának a mag-héj struktúrával rendelkező részecskék sajátosságaira (méret, méreteloszlás, szerkezet, kapszulázási hatékonyság, hatóanyag leadás stb.) gyakorolt hatásának tanulmányozása. Átfogó képet kívántunk adni a jól definiált mag-héj szerkezet kialakulásának fizikai-kémiai aspektusairól. A komponens koncentrációk (PLA = 1,5 – 10,0 mg/cm³; PLUR = 0,05 – 1,0 mg/cm³; TP = 0,5 – 5, mg/cm³) részecskék méretére és szerkezetére gyakorolt hatásának követése érdekében a koncentrációk közül minden esetben csak egynek az értékét változtattunk, a többit állandó értéken tartottuk.³⁴ Az egyes koncentrációk beállítása mellett előállított részecskék jellemzése során megállapítottuk: (i) a hordozó PLA koncentrációjának növelésével a képződő részecskék hidrodinamikai átmérője ~ 120 nm -től ($c_{\text{PLA}} = 1,25 \text{ mg/cm}^3$) ~ 200 nm -ig ($c_{\text{PLA}} = 10 \text{ mg/cm}^3$) szisztematikusan növelhető. (ii) a TP mennyiségének növelésével, a várak szerint, a részecskék hidrodinamikai átmérője szintén fokozatosan nő. $c_{\text{TP}} = 5 \text{ mg/cm}^3$ elérésekor egy nagyobb méretnövekedés figyelhető meg. Ezeket a méretváltozásokat a TEM képek is megerősítik. A TP koncentráció változásakor a mag-héj szerkezet kialakulása már $c_{\text{TP}} = 2,5 \text{ mg/cm}^3$ esetén jól azonosítható 10 mg/mL PLA polimer koncentráció alkalmazása mellett. A TP mennyiségének további emelésével a részecske magjában lévő hatóanyag jelentős része kristályos formát vesz fel. A minták hatóanyag tartalmát összehasonlítva kitűnik, hogy a kapszulázási hatékonyság ($EE(\%) = 91,28 \%$ -tól ($c_{\text{TP}} = 0,5 \text{ mg/cm}^3$) $EE(\%) = 66,15 \%$ -ig ($c_{\text{TP}} = 5 \text{ mg/cm}^3$)) a részecskék hatóanyag töltöttségének növekedésével párhuzamosan csökken ($DL(\%) = 4,36 \%$ -tól ($c_{\text{TP}} = 0,5 \text{ mg/cm}^3$) $DL(\%) = 24,85 \%$ -ig ($c_{\text{TP}} = 5 \text{ mg/cm}^3$)). Ennek legfőbb oka, hogy a kezdeti koncentráció növelésével a TP egyre kisebb része tud hasznosulni a hordozóba vitelekor, függetlenül attól, hogy a részecskében lévő mennyisége növekszik. (iii) A mag-héj szerkezet kialakulásához legalább $c_{\text{PLUR}} = 0,1 \text{ mg/cm}^3$ szükséges. Ilyen koncentrációjú PLUR alkalmazása esetén jelentős mennyiségű stabilizátor marad a részecskék felületén, melynek következtében olykor egy második héj kialakulása is megfigyelhető, és a kapszulázási hatékonyság és ezáltal a részecskék hatóanyag töltöttsége szisztematikusan csökken ($EE(\%)$: ~ 72 %-ról ~ 41 %-ra; $DL(\%)$: ~ 20 % -ról ~ 9 % -ra). A TP oldhatósága, a PLA polimerhez képest, PLUR jelenlétében jelentős mértékben megnövekszik turbiditás méréseink alapján, mely magyarázatot ad a PLUR mennyiségének növelése hatására bekövetkező csökkenő

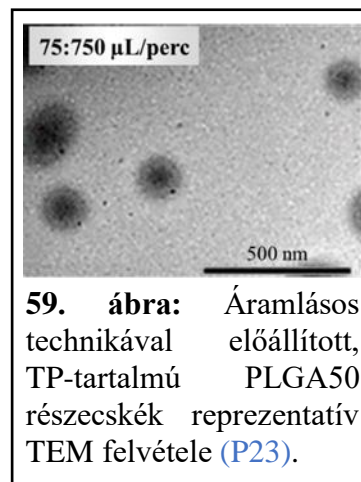
³⁴ A komponens koncentrációk hatásának tanulmányozását a PLA polimerre végeztük el részletesen.

kapszulázási hatékonyságra. Ideális koncentráció arányként a $c_{PLUR} = 0,1 \text{ mg/cm}^3$, $c_{TP} = 2,5 \text{ mg/cm}^3$, $c_{PLA} = 10 \text{ mg/cm}^3$ értékeket állapítottuk meg. Ezen koncentrációk beállítása mellett a PLGA65 és PLGA75 alapú részecskék előállítását is kiviteleztek. DLS mérések alapján a polimerekben lévő glikolid mennyiségének növekedésével a részecskeméret 203 nm-ről 226 nm-ig folyamatosan nő (**58. ábra (A)**), ami magyarázható azzal, hogy egyre nagyobb az oldhatósági különbség a hordozó és a hatóanyag között.

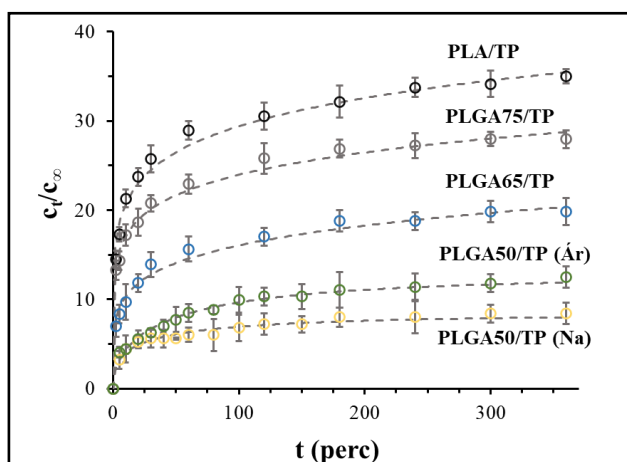


58. ábra: Nanoprecipitációval előállított TP- tartalmú PLA/PLGA részecskék méreteloszlási görbéi a PLGA75/TP és PLGA65/TP mintákról készült TEM felvételek a PLGA75/TP minta fotójával (**A**) valamint az egyes részecskékre meghatározott EE(%) és DL(%) értékek (**B**). ($c_{\text{hordozó}} = 10 \text{ mg/cm}^3$, $c_{TP} = 2,5 \text{ mg/cm}^3$, $c_{PLUR} = 0,1 \text{ mg/cm}^3$) (P22).

Megállapítható, hogy az optimális koncentrációk beállításával a PLGA65 és PLGA75 alkalmazásával is megvalósítható a mag-héj szerkezet kialakulása (**58. ábra (A)**). A ζ -potenciál mérések $\zeta = -73,5 \pm 1,0 \text{ mV}$ (PLGA65), $\zeta = -62,5 \pm 3,0 \text{ mV}$ (PLGA75) és $\zeta = -79,2 \pm 2,5 \text{ mV}$ (PLA) értékeket mutattak, mely a részecskék nagymértékű stabilitását igazolja. A részecskék EE(%) és DL(%) értékeit összehasonlítva a PLA hordozóhoz képest a PLGA75 és PLGA65 vonatkozásában megfigyelhető értékek folyamatosan növekvő tendenciát mutatnak. A szakirodalomban található TP-tartalmú részecskék hatóanyag töltöttségét, méretét és stabilitását figyelembe véve [201–206] kijelenthető, hogy az általunk alkalmazott előállítási módszerrel a TP hatékonyabban kapszulázható a PLA/PLGA polimerekbe (P22). A nanoprecipitációs eljárás mellett, hordozóként PLGA50 kopolimert felhasználva, elsőként állítottunk elő TP-tartalmú, mag-héj nanoszerkezetű kolloid részecskéket folyamatos áramú, áramlásos kémiai technikával is (P23). A szerves (acetonos) és a vizes fázis relatív áramlási arányát és az áramlási sebességeket optimalizálva szobahőmérsékleten igazoltuk, hogy a széles körben ismert és használt nanoprecipitációs eljárással szemben, ezen egyszerűen kivitelezhető technikával rövidebb idő alatt és nagyobb mennyiségben is előállíthatunk TP-tartalmú PLGA-alapú mag-héj szerkezetű kolloid részecskéket közel azonos kapszulázási hatékonysággal. A nanoprecipitációnál EE(%) = 67,1 % (DL(%) = 14,4 %), míg az áramlásos technikánál (szerves: vizes fázis áramlási



sebesség: 75:750 $\mu\text{L}/\text{perc}$) $EE(\%) = 71,5 \%$ ($DL(\%) = 15,2 \%$) értéket kaptunk. A részecskeméret szempontjából optimális áramlási sebességeket 75 $\mu\text{L}/\text{perc}$ (acetonos fázis) és 750 $\mu\text{L}/\text{perc}$ (vizes fázis) esetén állapítottuk meg ($d_{\text{DLS}} = 135 \pm 25 \text{ nm}$). Ezt a rögzített TEM felvételek is megerősítik, ahol 75:750 $\mu\text{L}/\text{perc}$ esetén egy jól definiált mag-héj szerkezet kialakulása figyelhető meg (**59. ábra**, $d_{\text{TEM}} = 132 \pm 22 \text{ nm}$)³⁵. A szabályozható kapszulázási hatékonyság és hatóanyag töltöttség mellett a kioldódás vonatkozásában is egy jól kontrollálható tulajdonságot szeretnénk volna kialakítani. A regisztrált kioldódási görbéken (**60. ábra**) jól látható³⁶, hogy a hordozó hidrofilitásának növekedésével a TP kioldódása folyamatosan lassul. Látható, hogy 360 perc elteltével a felszabadult TP mennyisége a következők szerint változik: $\sim 35,0 \%$ (PLA), $\sim 28,3 \%$ (PLGA75), $\sim 19,8 \%$ (PLGA65), $\sim 8,0 \%$ (PLGA50, nanoprecipitáció), $\sim 12,0 \%$ (PLGA50, áramlásos technika). I. G.



60. ábra: Eltérő TP-tartalmú PLA/PLGA részecskékből a hatóanyag PBS közegben regisztrált kioldódási görbéi ($T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,4$; $0,9 \%$ NaCl; $c_{\text{PLUR}} = 1,0 \text{ mg}/\text{cm}^3$) (P22-P23).

Zigoneanu és munkatársai korábban megállapították, hogy a TP-tartalmú PLGA50 alapú hordozó részecskék esetén a kisebb hatóanyag töltöttségű részecskék gyorsabb leadóképességgel bírnak, de ők SDS és PVA stabilizátorokat használtak [201]. Ez megfelel az általunk vizsgált rendszerekre is, ahol a legnagyobb hatóanyag kioldódás a leginkább hidrofób és a viszonylag legkisebb hatóanyag-tartalmú PLA hordozónál tapasztalható. Érdeemes megjegyezni, hogy a PLGA50 vonatkozásában, mely alacsony $EE(\%)$ rendelkezik a kioldódás mértéke is kisebb, mely a hidrofilitási tulajdonság változásával magyarázható. A hidrofób

karakterű hordozó alkalmazása esetén nagyobb mennyiségű TP tud megkötődni a felület közelében is, ahonnan a hatóanyag kioldódása lényegesen gyorsabban végbe mehet. Ennek köszönhető, hogy a görbék kezdeti 0 – 20 perces tartományán hirtelen lejáró TP felszabadulás a polimerben lévő glikolid arányának csökkenésével egyre növekszik. Ez az eredmény egyértelműen alátámasztja, miszerint a rövidtávú kioldódási folyamatokat a részecskék hatóanyagtartalmán kívül az alkalmazott polimerek hidrofilitása is jelentősen befolyásolja. 360 perc elteltével a hatóanyag kioldódás lelassul, de nem a teljes kapszulázott mennyiség oldódott ki. Ennek köszönhetően meghatározható a magban lévő TP mennyiségének értéke 6 óra letelte után: $DL(\%) = 9,6 \%$ (PLA); $DL(\%) = 11,4 \%$ (PLGA75); $DL(\%) = 14,4 \%$ (PLGA65); $DL(\%) = 13,2 \%$ (PLGA50, nanoprecipitáció); $DL(\%) = 13,4 \%$

³⁵ A részecskeméret nem hasonlítható össze az **58. ábra** a PLGA75/TP és PLGA65/TP mintákra meghatározott értékkel, mert az áramlásos technika során a kapillárisban elkerülendő eltömődés miatt $c_{\text{PLUR}} = 0,1 \text{ mg}/\text{cm}^3$, $c_{\text{TP}} = 1,25 \text{ mg}/\text{cm}^3$, $c_{\text{PLGA50}} = 5,0 \text{ mg}/\text{cm}^3$ koncentrációkat alkalmaztunk.

³⁶ A TP kioldódása során a PBS közegben $1,0 \text{ mg}/\text{cm}^3$ koncentrációban PLUR is jelen volt a TP oldhatóságának növelése érdekében. A PLUR cmc értékére $25 \text{ }^\circ\text{C}$ -on Milli-Q vizes közegben $cmc = 4,92 \text{ mg}/\text{cm}^3$, PBS közegben $cmc = 1,99 \text{ mg}/\text{cm}^3$ értéket határoztunk meg, ami igazolja, hogy messze a cmc érték alatt dolgozunk és a formuláció esetén sem alakulnak ki micellák a PLUR jelenlétében (P22-P23).

(PLGA50, áramlásos technika). Az értékek jól mutatják, hogy a hidrofóbítás csökkenésével a magban lévő hatóanyag mennyisége valóban fokozatosan növelhető (P22-P23).

5.6.3.2. *Ketoprofen-tartalmú PLGA részecskék tervezése: hangolható hatóanyag-tartalom és szabályozott kioldódás*

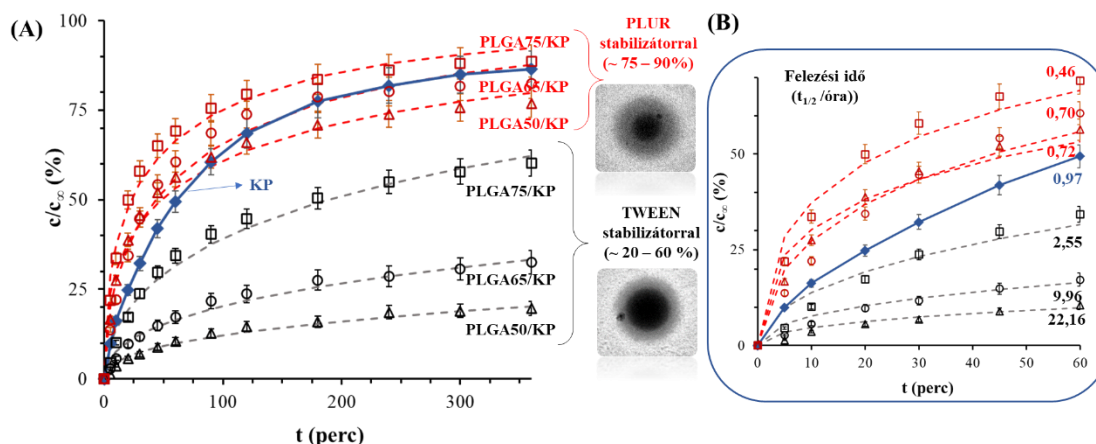
Nanoprecipitációs eljárással olyan PLGA-alapú formulációt is terveztünk, mely a KP hatóanyagot kontrollált mértékben képes leadni az alkalmasan megválasztott stabilizátor felhasználása mellett mag-héj szerkezetű részecskéket kialakítva (P24). Szerves fázisként itt is acetont használtunk³⁷, a hordozó koncentrációja $c = 10,0 \text{ mg/cm}^3$, míg a stabilizátor $c = 0,1 \text{ mg/cm}^3$ volt az előző fejezetben tett megállapítások alapján. A PLUR mellett egy nem-ionos felületaktív anyag a TWEEN alkalmazhatóságát is tanulmányoztuk. A KP tartalmat $0 - 15 \text{ mg/cm}^3$ tartományban változtatva igazoltuk, hogy a részecskeméret, és a EE% és a DL% is szisztematikusan nő mindkét stabilizátor esetén. A részecskeméret $d \sim 140 - 226 \text{ nm}$ tartományban változik, míg a EE(%) = $15 - 45 \%$ (PLUR), = $12 - 30 \%$ (TWEEN) PLGA50 kopolimer felhasználása esetén. A részecskék stabilitását 25 napon keresztül vizsgálva megállapítottuk, hogy bár viszonylag nagy kapszulázási hatékonyság, s ezáltal nagy DL(%) is elérhető (DL(%) $\sim 40\%$), de a részecskék mérete kb. 5 nap után csökkenő tendenciát mutatott, ami a polimer hordozó degradációja és hidrolízise miatt következhetett be. A hatóanyag tartalom is csökkent. Ezen megállapítások alapján $c = 5,0 \text{ mg/cm}^3$ alkalmazása mellett készítettük el a KP-tartalmú PLGA-50-alapú formulációkat PLUR és TWEEN stabilizátorokkal. A PLGA50 esetén optimalizált paraméterek mellett a PLGA65- és PLGA75-alapú részecskéket is elkészítettük. A részecskék szerkezeti karakterizálására FT-IR és DSC méréseket végeztünk; a vonatkozó eredményeket a publikáció (P24) tartalmazza. A formulák méretét, az EE(%) és DL(%) értékeket a 10. táblázat tartalmazza.

10. táblázat: KP-tartalmú PLGA részecskék hidrodinamikai átmérő (d_{DLS}), polidiszperzitás (PDI), EE(%) és DL (%) értékei ($c_{PLGA} = 10 \text{ mg/cm}^3$; $c_{PLUR/TWEEN} = 0,1 \text{ mg/cm}^3$) (P24).

		c_{KP} (mg/cm³)	d_{DLS} ± SD (nm)	PDI ± SD	EE ± SD (%)	DL ± SD (%)
PLUR	PLGA50	0,0	149 ± 3	0,144 ± 0,054	-	-
		5,0	212 ± 6	0,106 ± 0,074	18,2 ± 1,4	8,3 ± 0,6
	PLGA65	0,0	160 ± 2	0,150 ± 0,046	-	-
		5,0	226 ± 3	0,121 ± 0,018	14,9 ± 2,1	6,9 ± 0,9
	PLGA75	0,0	162 ± 3	0,116 ± 0,071	-	-
		5,0	232 ± 6	0,060 ± 0,043	16,5 ± 0,6	7,6 ± 0,3
TWEEN	PLGA50	0,0	139 ± 2	0,076 ± 0,030	-	-
		5,0	198 ± 4	0,131 ± 0,057	14,3 ± 1,1	6,7 ± 0,5
	PLGA65	0,0	161 ± 3	0,067 ± 0,034	-	-
		5,0	233 ± 2	0,137 ± 0,084	14,6 ± 2,5	6,8 ± 1,1
	PLGA75	0,0	158 ± 2	0,120 ± 0,065	-	-
		5,0	227 ± 8	0,087 ± 0,020	16,2 ± 3,8	7,5 ± 1,6

³⁷ Részletesen tanulmányoztuk a DMSO alkalmazhatóságát is, de a képződő részecskék nagyobb kolloid stabilitást mutattak acetonban, így ezen oldószert használtuk fel a hatóanyagtartalmú részecskék előállítására.

Kijelenthető, hogy a részecskék $\sim 200 - 230$ nm átlagos hidrodinamikai átmérővel rendelkeznek, és függetlenül a hordozó kopolimerek hidrofóbitásától és a stabilizátorok molekulatömegétől a EE(%) és DL(%) közel azonos (EE(%) $\sim 14 - 18\%$; DL(%) $\sim 7 - 8\%$). A hatóanyag-felszabadulás fiziológiai közegben (pH = 7,40 (PBS), 0,9 % (m/m) NaCl) történő tanulmányozása során (**61. ábra (A)**) megállapítható, hogy a kopolimer hordozók hidrofóbitásának növelésével a hatóanyag egyre nagyobb mennyisége képes felszabadulni.



61. ábra: A KP-tartalmú PLGA részecskékből a KP PBS közegben regisztrált kioldódási görbéi ($T = 37^\circ\text{C}$, pH = 7,4; 0,9 % NaCl) $t = 0 - 360$ perc **(A)** és $0 - 60$ perc **(B)** tartományban a részecskék TEM felvétel részleteivel és a felezési idővel ($t_{1/2} = 1/(k \times c_0)$) (P24).

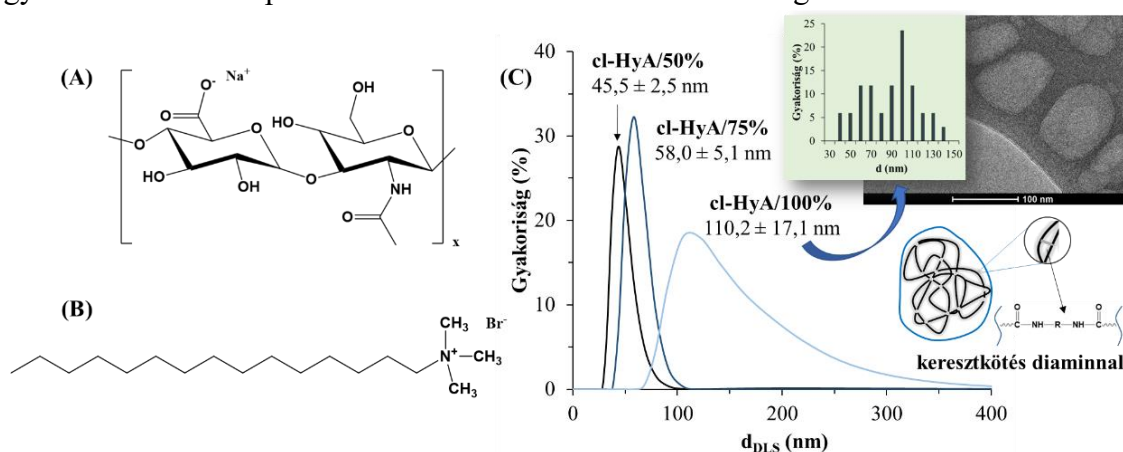
A TWEEN stabilizátort tartalmazó rendszerekben a hatóanyag $\sim 20 - 60$ %-a, a PLUR vonatkozásában $\sim 75 - 90$ %-a szabadul fel 400 perc után. Az eltérő mértékű hatóanyag felszabadulás magyarázható azzal, hogy a nagyobb molekulatömegű PLUR egy laza héjat alkot a polimer részecskéken, ami elősegíti a hatóanyag gyorsabb kioldódását, míg a jóval kisebb molekulatömegű nem-ionos felületaktív TWEEN egy kompaktabb adszorpciós réteget alkot a polimer hordozó részecskéken, így a kapszulázott hatóanyag felszabadulása gátolt. A **61. ábra** mérési pontjaira illesztett másodrendű sebességi egyenlet alapján számolt sebességi állandókból meghatároztuk a felezési időket, melyek értékeiből (**61. ábra (B)**) látható, hogy a PLUR-tartalmú részecskék vonatkozásában a héjat alkotó PLUR valóban elősegíti a hatóanyag kioldódását – amit korábban turbiditás mérésekkel is alátámasztottunk – így kisebb felezési idők állapíthatók meg a tiszta KP hatóanyag felezési idejéhez képest (0,46 – 0,72 óra). A TWEEN-tartalmú kolloidok esetén a fentebb is említett kompakt héj kialakítása révén a felezési idők, a vártnak megfelelően, nagyobb értékeket mutatnak (2,55 – 22,16 óra). Munkánk révén egy olyan PLGA-alapú formuláció sorozat kialakíthatóságát igazoltuk, mely mag-héj szerkezetű részecskék azonos hatóanyag-tartalommal és mérettel rendelkeznek, és igény szerint a KP hatóanyag kontrollált mértékben történő felszabadulása széles skálán szabályozható kizárólag az alkalmasan megválasztott stabilizátorok változtatása révén.

5.7. HyA-alapú hatóanyag-hordozó részecskék jellemzése

Eltérő molekulatömegű hialuronsav (HyA) gyógyszer-hatóanyag hordozóként történő alkalmazhatóságát is igyekeztünk átfogóan feltérképezni. Az Irodalmi áttekintés fejezetben bemutattam, hogy a rendkívül hidrophil karakterű HyA önmagában nem alkalmas kolloidális hordozó részecskék kialakítására, így vagy kémiai módon módosítani kell a szerkezetét (pl.: keresztkötések kialakítása [102,103]), vagy más komponensek hozzáadása révén (pl. töltéskompenzálással [114]) csökkenteni hidrophil jellegét. Doktori értekezésben mindkét úton állítottunk elő új összetételű részecskéket; a főbb eredményeket lentebb foglalom össze.

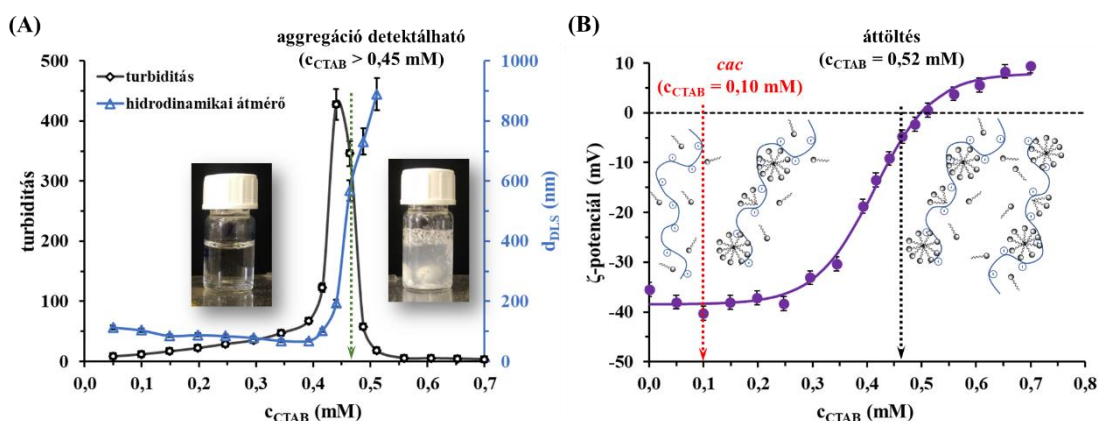
5.7.1. Keresztkötött-HyA és CTAB-HyA komplex hatóanyag hordozó részecskék szerkezeti jellemzése és alkalmazásuk ketoprofén formulázására

Eredményesen alakítottunk ki 50-, 75- és 100 %-ban keresztkötött kolloid méretű HyA részecskéket és 20-, 50- és 80 %-ban CTAB-dal neutralizált komplex részecskéket (P25). A HyA monomeregységének és a CTAB szerkezeti képletét a **62. ábra (A, B)** reprezentálja. A keresztkötés sikeres kialakítását FT-IR mérésekkel igazoltuk; a minták tisztaságának ellenőrzésére termoanalitikai vizsgálatokat végeztünk. A poliszacharid láncok közötti keresztkötések kialakulásával párhuzamosan kolloid mérettartományú részecskék jelennek meg. A regisztrált DLS görbéken jól látható, hogy a keresztkötés mértékének növekedésével a részecskeméret és a polidiszperzitás szisztematikusan nő $d_{DLS} = 45,5$ nm-ről (cl-HyA/50%) $d_{DLS} = 110,2$ nm-ig (cl-HyA/100%). Reprezentatív példaként a **62. ábra (C)** a cl-HyA/100% mintákról készített TEM felvételt mutatja. A detektált polidiszperz jelleg és az átlagos részecskeméret értékek a fényszórás mérések révén kapott adatokkal összhangban van. A ζ -potenciál értékek vonatkozásában a nagyobb keresztkötési arányoknál a részecskék egyre negatívabb értéket vesznek fel (cl-HyA/50%: $\zeta = -13,8 \pm 0,1$ mV, cl-HyA/75%: $\zeta = -20,0 \pm 2,1$ mV, cl-HyA/100%: $\zeta = -23,6 \pm 0,6$ mV), ugyanis a kiindulási koherens HyA gél szerkezet egyre inkább inkoherezsé válik a keresztkötés mértékének növelésével, mely az egyre nagyobb mértékben képződő részecskék növekvő stabilitásra enged következtetni.



62. ábra: A HyA monomeregységének szerkezeti képlete (A) a CTAB szerkezeti képlete (B) az 50-, 75- és 100 %-ban keresztkötött HyA-alapú kolloid részecskék méreteloszlási görbéi a cl-HyA/100% minta TEM felvételével és a keresztkötő ágens megjelölésével (P25).

A keresztkötések kialakítása mellett az általunk felhasznált $M_w = 200 - 500$ kDa molekulásúllyal rendelkező M-HyA poliszacharidot eltérő mértékben neutralizáltuk pozitív töltésű CTAB felületaktív anyag segítségével, hogy jól definiált komplex HyA/CTAB alkotta hordozó részecskéket állítsunk elő. Annak érdekében, hogy a magyarázattal szolgáljunk a CTAB hozzáadására a HyA szerkezetében bekövetkező változásokra és hogy megállapítsuk a teljes áttöltéséhez szükséges CTAB mennyiségét DLS és turbiditás méréseket végeztünk (**63. ábra**). A szakirodalomban több elmélet is megtalálható polielektrolit/tenzid kölcsönhatások értelmezésére. Az 1980-as évek elején vált elfogadottá – meghatározó részben Gilányi Tibor és munkacsoportjának köszönhetően – az az elméleti megfontolás, hogy a fenn nevezett kölcsönhatás során nem az individuális tenzidek, hanem az ionos tenzid aggregátumok polimer láncon történő kooperatív kötődése következik be.



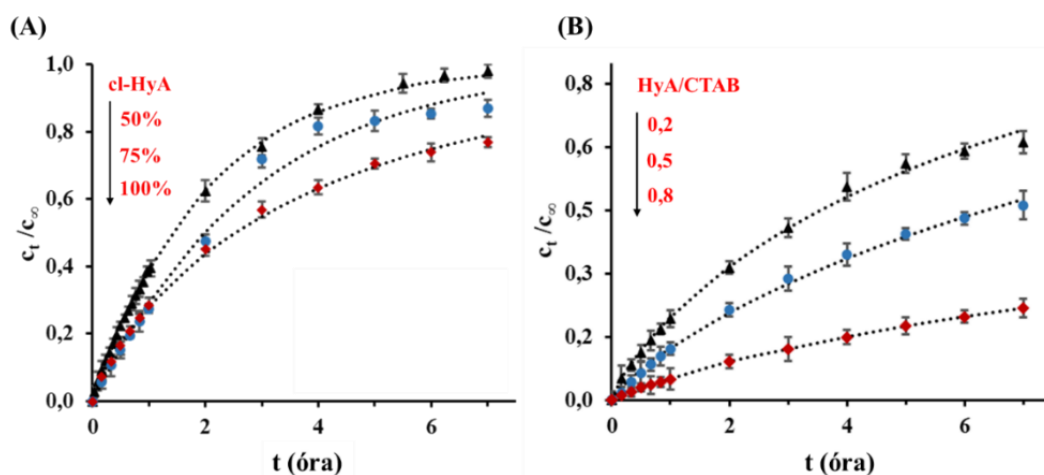
63. ábra: M-HyA/CTAB rendszer **(A)** turbiditás és hidrodinamikai átmérő, valamint **(B)** ζ -potenciál értékei a c_{CTAB} függvényében. A töltéskompenzálás előtt ($c_{CTAB} = 0,2$ mM) és után ($c_{CTAB} = 0,50$ mM) készített minták reprezentatív fotói **(A)** ($c_{HyA} = 0,2$ mg/cm³) (P25).

A kölcsönhatás kooperatív jellegéből következik, hogy a kötődés csak egy minimális tenzid koncentráció felett indul meg, amit kritikus aggregációs koncentrációnak (cac) nevezünk, ami a Na-hialuronát/CTAB rendszer esetén $cac = 0,1$ mM [207]. Ezen értéket a **63. ábra (B)** részén piros nyíllal jelöltük.³⁸ A **63. ábra (A)** alapján jól látható, hogy a $c_{CTAB} = 0,45$ mM értékig ($c_{HyA} = 0,2$ mg/cm³ koncentráció mellett) átlagosan 50 – 130 nm közötti hidrodinamikai átmérővel rendelkező kolloid részecskék jelenléte igazolható a mintában. Ezen koncentráció érték felett ($c_{CTAB} > 0,45$ mM) a rendszerben lejátszódó M-HyA neutralizálásának köszönhetően a hidrodinamikai átmérő 700 – 800 nm-re nő. Párhuzamosan a turbiditást nézve a $c_{CTAB} = 0,45$ mM értéket meghaladva szintén jelentős növekedés figyelhető meg, amit a nagyfokú aggregáció miatt kialakuló fázisszeparáció (oldószer fázis/szilárd M-HyA/CTAB aggregátumok) hirtelen lecsökkent $c_{CTAB} = 0,50$ mM értéknél. Összevetve a mintában jelen lévő HyA és CTAB tömegét az aggregáció közel $m_{HyA}:m_{CTAB} = 1:1$ tömegarányok mellett következik be. Megállapítható tehát, hogy kis feleslegben lévő CTAB jelenlétében a keletkező részecskék gyógyszerhordozóként már nem alkalmazhatóak. Nagyobb feleslegben újra

³⁸ Konduktometriás és ITC mérésekkel meghatároztuk a CTAB cmc értékét 0,2 mg/mL HyA oldatban is, ahol $cmc = 1,12 \pm 0,02$ mM érték adódott (cmc_{CTAB} (HyA nélkül) = 0,93 – 0,94 mM. Megállapítható tehát, hogy a tömbfázisban individuális micellák képződése nem történik, az áttöltéshez meghatározott CTAB teljes mennyisége a poliszachariddal alkotott komplex részecskék kialakításához rendelhető.

stabilizálhatják a kialakuló HyA részecskéket, de a komplex részecske biokompatibilitása a nagyobb mennyiségben jelenlévő tenzid miatt csökkenhet, így a töltéskompenzálás előtti tartományt tanulmányoztuk a továbbiakban. Eredményeinket összevetve az irodalmi adatokkal megállapítható, hogy átlagosan kisebb mérettel rendelkező részecskéket sikerült előállítanunk. T. Krutišová és mtsai. már vizsgálták a CTAB, ill. $M_w = 117$ és 1670 kDa molekulatömeggel rendelkező HyA felhasználásával kialakítható hordozó részecskéket előállítási lehetőségeit, de munkájuk révén csak 100 nm feletti koloid részecskéket tudtak kialakítani³⁹. T. Pilgrova és M. Pekař munkája során a CTAB-dal összevethető szerkezetű Septonex stabilizátorral és HyA-val ($M_w = 13$ kDa, 117 kDa) $200 - 500$ nm-es részecskék előállítását igazolták [208].

Mind az eltérő mértékben keresztkött (cl-HyA/50, cl-HyA/75, cl-HyA/100), mind a különböző CTAB-tartalmú (HyA/CTAB-0,2; HyA/CTAB-0,5, HyA/CTAB-0,8) koloid részecskéket, melyek $d < 130$ nm-nél kisebb átlagos átmérővel rendelkeznek, megkíséreltük KP formulázására alkalmazni. A cl-M-HyA/KP minták előállításánál 20 mg/cm³ KP és 100 mg/mL előzetesen szintetizált és liofilizált cl-M-HyA/50%, 75% és 100% tartalmú elegyeket készítettünk, majd 24 óráig kevertettük őket. A tisztítás során a mintákat $0,2$ mg/cm³ HyA koncentráció eléréséig hígítottuk és 8000 rpm fordulatszámon 10 percig centrifugáltuk a nem kötött hatóanyag eltávolítása végett. A 20-, 50- és 80 % -ban neutralizált M-HyA/CTAB mintáknál a M-HyA és a KP koncentrációja $c_{HyA} = 100$ mg/mL és $c_{KP} = 20$ mg/mL, míg a CTAB mennyisége 18 mg/cm³, 46 mg/cm³, és 73 mg/cm³ volt. A mintákat 24 óráig kevertettük és a fentebb említett módon tisztítottuk. A tisztított minták esetén a $DL(\%) = 17 - 19$ % mindegyik rendszer esetén. A kioldódási vizsgálatok eredményét a **64. ábra** mutatja. A két eltérő szerkezetű és összetételű részecskéket tartalmazó rendszerek kísérleti eredményét összevetve megállapítható, hogy a cl-HyA- alapú hordozók alkalmazásával (**64. ábra (A)**) a KP visszatartási képessége a vizsgált 7 órás időtartományban kisebb, mint a HyA/CTAB alkotta részecskék esetén (**64. ábra (B)**).



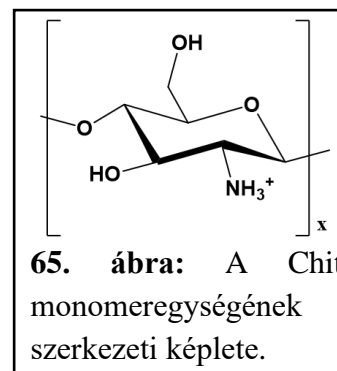
64. ábra: (A) A KP-tartalmú térhálósított- és (B) CTAB-dal neutralizált M-HyA hordozókból a KP kioldódási görbéi ($T = 25$ °C, $pH = 7,4$, $0,9$ % NaCl, PBS közeg) (P25).

³⁹ Forrás: Krutišová, T.; Hejná, J.; Pekař, M. Nanoparticles Formed By Self-Assembly Of Negatively Charged Hyaluronan And Cationic Surfactant, Conference Proceedings of 5th Anniversary International Conference on Nanomaterials - Research & Application, October 16th - 18th 2013, Brno, Czech Republic, 595-599.

Megállapítható, hogy a térhálósítás mértékének növelésével a visszatartás nő. A cl-HyA/100% rendszer vonatkozásában 6 óra után a KP mennyiségének $\sim 70\%$ -a, míg cl-HyA/50% esetén közel 100% -a felszabadul. A hatóanyag felszabadulás magyarázható azzal, hogy a keresztkötés mértékének 50% -ról 100% -ra emelésével a részecskék mérete nő $\sim 45\text{ nm}$ -ről 110 nm -re (**62. ábra**), így a fajlagos felületük lényegesen lecsökken. A fajlagos felület csökkenésével a hatóanyag diffúziója kisebb felületen történhet meg, ami magyarázhatja az adott idő alatt a kisebb mértékű hatóanyag felszabadulást. Ezzel ellentétben a M-HyA/CTAB rendszereknél a 20% -ban CTAB-dal neutralizált hordozónál $\sim 60\%$, míg a mHyA:mCTAB = 1:0,8 tömegarányú minta esetén a hatóanyagnak csak $\sim 20\%$ -a oldódik ki. Ezen rendszer esetén a kisebb mértékű kioldódására magyarázat lehet, hogy a HyA polimer láncon jelen lévő tenzid aggregátumok szolubilizálhatják a hatóanyagot, így a visszatartás mértéke nagyobb a keresztkötött HyA-alapú rendszerekhez képest.

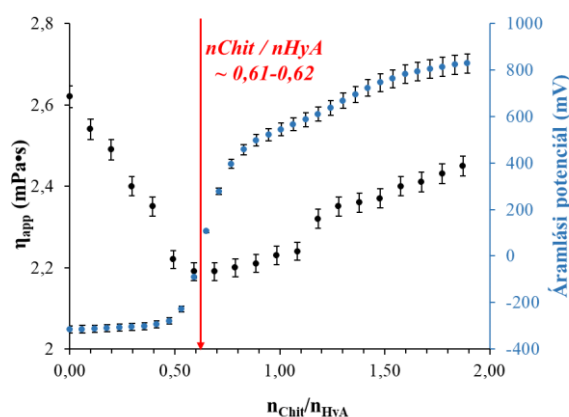
5.7.2. HyA/Chit vegyes összetételű kolloid részecskék szerkezeti jellemzése

Az előző fejezetben bemutatott HyA/CTAB komplex hordozó részecskék kialakítása mellett vegyes poliszacharid-alapú polielektrolit komplex (PEC) rendszerek előállításának megvalósítását is célul tűztük ki. A monomerenként egy negatív töltéssel rendelkező HyA ($pK_s = 2,9 - 4,0$ [113]) töltéskompenzálását a monomerenként egy pozitív töltéssel rendelkező másik poliszacharid, a kitozán (Chit) ($pK_s = 6,17 - 6,51$ [209]) alkalmazásával kíséreltük meg kialakítani és a komplex rendszer szerkezeti jellemzését elvégezni.⁴⁰ A tanulmányozott Chit monomeregységének szerkezeti képletét a **65. ábra** szemlélteti. A PEC részecskék kialakítása előtt a két poliszacharid közötti elektrosztatikus kölcsönhatások tanulmányozása érdekében részecske töltés titrálásos, reológiai, valamint FT-IR és termoanalitikai méréseket végeztünk savas körülmények között ($\text{pH} \sim 2,5 - 4,5$), ahol a nevezett poliszacharidok bizonyosan ellentétes töltéssel rendelkeznek. Az eredményeket előként publikáltuk a szakirodalomban (P26). Reprezentatív példaként a **66. ábra** egy-egy áramlási potenciál mérésen alapuló felületi töltés meghatározás és egy reológiai mérés eredményét foglalja össze $\text{pH} = 2,70$ esetén. Jól ismert, hogy ezen makromolekulák töltése a pH függvényében jelentősen változhat, ami egy hordozó rendszer esetében a kioldódási folyamatokra is meghatározó hatással lehet, valamint a képződő részecskék mérete és stabilitása is jelentősen függ a közeg pH értékétől, ami a közöttük lévő elektrosztatikus kölcsönhatások mértékére is kihatással van. Ezen folyamatok részletesebb megismerése érdekében, elsők között értelmeztük nagy molekulatömegű HyA-ból (H-HyA: $M_w = 1500 - 1800\text{ kDa}$) és közepes molekulatömegű Chit-ből (M-Chit: $M_w = 190 - 310\text{ kDa}$) felépülő PEC neutralizálási folyamatait. A **66. ábra** áramlási potenciál adataiból jól látható, hogy adott mennyiségű HyA ($V_{\text{HyA, titrálendő}} = 10\text{ cm}^3$, $c_{\text{HyA, titrálendő}} = 0,045\text{ mg/cm}^3$) Chit-nal ($c_{\text{Chit}} = 0,091\text{ mg/cm}^3$) történő titrálása esetén a kezdeti



⁴⁰ A makromolekulák esetén jól definiált pK_s érték nem adható meg, pontosabb, ha egy tartományt adunk meg, hiszen az értékek erősen függenek a molekulatömegétől és a Chit esetén még a deacetilezési aránytól is.

pontok közel lineárisan növekednek, de csak kismértékben. Feltehetően ezen a tartományban a HyA negatív töltése a Chit pozitív töltését még olyan szinten tudja kompenzálni, hogy a rendszer elektrosztatikus stabilitása csak kis mértékben változik. Az áttöltési pont elérése körül (piros vonallal jelölve) az áramlási potenciál értékek hirtelen ugrást mutatnak, mivel a nagy mennyiségben lévő Chit töltését a HyA már nem tudja szabályozni, a rendszerben aggregátumok jelenléte azonosítható. Az áttöltési pontot követően a nagy Chit felesleg miatt az áramlási potenciál pozitív értékű.

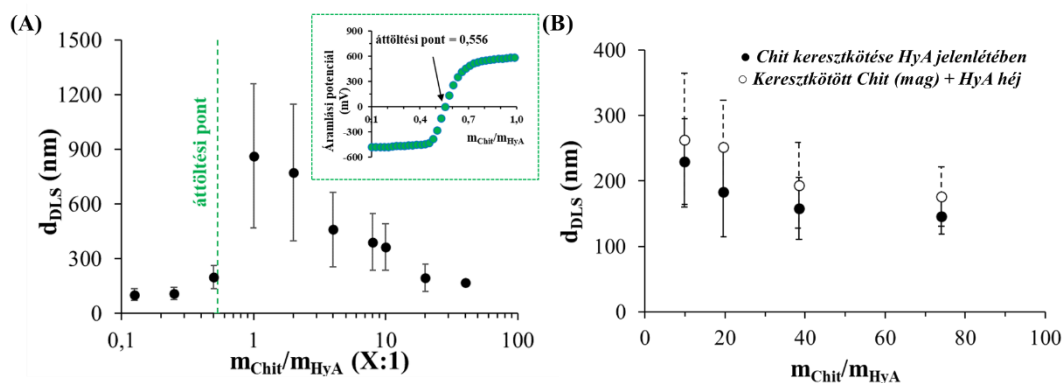


pH	$\alpha_{[\text{HyA}]^-}$ (%)	$n_{\text{Chit}} / n_{\text{HyA}}$ (monomer mólarány)	
		áramlási potenciál	reológia
2,53	34,4	$0,496 \pm 0,033$	$0,438 \pm 0,044$
2,70	43,6	$0,622 \pm 0,018$	$0,609 \pm 0,021$
2,77	46,6	$0,696 \pm 0,022$	-
2,91	54,6	$0,738 \pm 0,015$	$0,695 \pm 0,032$
4,50	100,0	$1,271 \pm 0,043$	-

66. ábra: A H-HyA látszólagos viszkozitás (bal y-tengely) és áramlási potenciál (jobb y-tengely) értékeinek változása M-Chit hozzáadására eltérő $n_{\text{Chit}} / n_{\text{HyA}}$ monomer mólarányok függvényében pH = 2,70 esetén (1%-os ecetsav oldatban) (ábra). Az áramlási potenciál mérésen alapuló felületi töltés meghatározás és a reológiai mérések eredményei eltérő pH értékek esetén (táblázat) (P26).

A regisztrált látszólagos viszkozitás értékekben is megfigyelhető egy töréspont éppen ott, ahol az áttöltés következik be. A HyA kiindulási koherens szerkezete a HyA-nak kezd „megtörni” a Chit hozzáadására, és egyre inkább az inkoherens struktúra válik meghatározóvá. A makromolekulák átlagos lánc-vég távolsága is feltehetően csökken és makromolekula gombolyagok képződhetnek. A pH növelésével az említett lineáris szakasz kis mértékben elnyúlik, míg az áttöltési pontok, a vártnak megfelelően, a nagyobb értékek felé tolódnak, ami a HyA deprotonálódási folyamatával jól korrelál. pH ~ 4,5 esetén a HyA már teljesen deprotonált, de a Chit aminos csoportja még protonált formában van ($pK_s = 6,17 - 6,51$ [209]). Ezen pH esetén az áttöltés $n_{\text{Chit}} / n_{\text{HyA}} \sim 1,27$ monomer mólarányánál detektálható, mely érték közel 1:1 -nek tekinthető, hogy ha figyelembe vesszük a Chit deacetilezési arányát, ami 75-85 % a biztonsági adatlap szerint. FT-IR és termoanalitikai mérésekkel megerősítettük, hogy a két makromolekula fizikai keveréknek jelenléte kizárható és hatóanyag hordozóként alkalmazható, állandó összetételű PEC képződése valószínűsíthető. A két töltéssel rendelkező makromolekula közötti töltéskompenzációs folyamatok révén kialakuló kolloid részecskék méretét és stabilitását is tanulmányoztuk fényszórás mérésekkel eltérő Chit/HyA tömegarányok alkalmazása esetén. Az adatokat elemezve az alábbi megállapításokat tehetjük: (i) HyA felesleg esetén (67. ábra (A)) első 3 pont $m_{\text{Chit}}/m_{\text{HyA}} = 0,500 - 0,125$) a detektálható részecskék mérete $d \sim 100 - 200$ nm között változik, aggregátumok jelenléte nem figyelhető meg. Ez jó egyezésben van a korábbi megfigyelésekkel, miszerint a Chit hozzáadására a HyA koherens szerkezete „megtörik” és inkább az inkoherens jelleg válik meghatározóvá. (ii) Az

áttöltési pont után, mikor a két makromolekula mennyisége összemérhető, és domináns töltés felesleg nincs a rendszerben ($m_{\text{Chit}}/m_{\text{HyA}} = 1,0 - 2,0$) a részecskék mérete 800 – 900 nm között változik és igen nagy polidiszperzitás is mérhető. (iii) A Chit felesleg növelésével ($m_{\text{Chit}}/m_{\text{HyA}} = 4,0 - 10,0$) a méret újra csökkenő tendenciát mutat, majd a rendszerben ismételtelen viszonylag kis hidrodinamikai átmérővel rendelkező részecskék jelennek meg ($d_{\text{DLS}} \approx 195$ nm ($m_{\text{Chit}}/m_{\text{HyA}} = 20$; $d_{\text{DLS}} \approx 168$ nm ($m_{\text{Chit}}/m_{\text{HyA}} = 40$)). (iv) $m_{\text{Chit}}/m_{\text{HyA}} > 40$ esetén kolloid részecskék kialakulása nem volt detektálható.

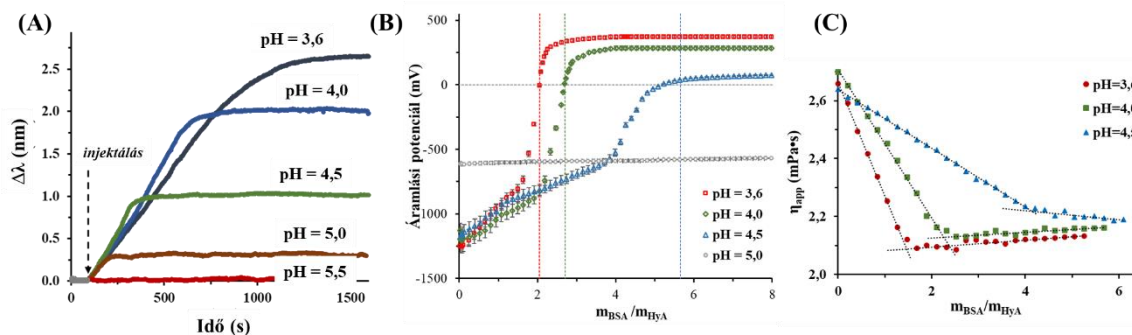


67. ábra: (A) Chit/HyA PEC részecskék hidrodinamikai átmérő értékei eltérő Chit/HyA tömegarányok függvényében (kis ábra: pH = 4,5 esetén a HyA áramlási potenciál értékei Chit/HyA eltérő tömegarányoknál (az áttöltési pont megfelel $n_{\text{Chit}}/n_{\text{HyA}} = 1,271$ értéknek). (B) Eltérő szerkezetű Chit/HyA kolloid részecskék hidrodinamikai átmérőjének változása a Chit:HyA tömegarány függvényében (P26).

A szakirodalomban új eredménynek számít az elért 200 nm alatti részecskeméret nagy molekulatömegű HyA felhasználásával (P26), ugyanis S. Huang és munkatársai által előállított elektrosztatikusan kompenzált Chit/HyA nanorészecskéknél a 100 nm körüli átmérőt csak kis molekulatömegű poliszacharidokkal (10 kDa-os HyA és 100 kDa-os Chit) tudták kivitelezni [210]. A kizárólag elektrosztatikus kompenzáción alapuló eljárás mellett, ahol meghatározóan egy laza kolloid szerkezet feltételezhető a részecskékben (*Chit/HyA I.*) kísérletet tettünk a részecskeméret szabályozásra, olyan módon, hogy két másik, eltérő szerkezetű Chit/HyA vegyes összetételű részecskét is kialakítottunk. Egyrészt a Chit -t TPP keresztkötő ágenssel keresztkötöttük HyA jelenlétében (*Chit/TPP = 2:1* tömegarány, *Chit/HyA II.*), ill. kialakítottunk keresztkötött Chit magot (*Chit/TPP = 2:1* tömegarány) és ahhoz adagoltuk a HyA-t (*Chit/HyA III.*). Megállapítható a 67. ábra (B) alapján, hogy mindkét rendszer esetén a TPP keresztkötő ágensnek köszönhetően sokkal monodiszperzebb és könnyebben méretszabályozható részecskék képződnek. $m_{\text{Chit}}/m_{\text{HyA}} = 10 - 70$ tömegarányok között a három módszert összehasonlítva kitűnik, hogy a legkisebb hidrodinamikai átmérővel a *Chit/HyA II.* részecskék rendelkeznek ($d \sim 220 - 150$ nm). A *Chit/HyA III.* esetében a kezdeti Chit-TPP mag méretéhez ($d_{\text{DLS}} = 147 \pm 45$ nm) képest az átmérők nagyobbak, ami alapján a részecskék H-HyA héjjal történő bevonása sikeresnek mondható. Ennek a szerkezetnek a kialakulása okozza a *Chit/HyA III.* típusú részecskének a Chit/HyA II.- vel szembeni nagy átlagos részecskeméretét is. A Chit/HyA I.-hez hasonlóan a növekvő Chit aránynak köszönhetően a részecskeméret folyamatosan csökken (Chit/HyA II: $d_{\text{DLS}} = 230$ -től ~ 150 nm-ig; Chit/HyA III: $d_{\text{DLS}} = 260$ nm -től 180 nm -ig).

5.7.3. HyA/szérum fehérje alapú koloid részecskék kialakítása, szerkezeti jellemzésük és felhasználásuk ibuprofén formulálására

HyA/szérum fehérje összetett koloid részecskék kialakításával elsők között foglalkoztunk. A poliszacharid-fehérje konjugátumok egy új dimenziót jelenthetnek a hatóanyagleadó rendszerek tervezésében, hiszen ezen komplex konjugátumok alkalmazása révén növelhető a hordozó részecskék koloid stabilitása, a célzott hatóanyag leadás ill. a biokompatibilitás, de egyes gyógyszerhatóanyagok toxicitása is csökkenthető, ahogyan azt az Irodalmi áttekintés fejezetben részleteztem. A poliszacharid-fehérje nanokonjugátumok lehetséges előállítási folyamatai közül, ahogyan az előző fejezetben is tettük, az elektrosztatikus komplexképzést tanulmányoztuk PEC rendszereket kialakítva. A nevezett HyA/BSA és HyA/HSA rendszerekre nem állt rendelkezésre adat az irodalomban. A HyA és a BSA közötti kvantitatív kölcsönhatást tanulmányozásának eredményeit elsőként tettük elérhetővé a szakirodalomban (SPR, áramlási potenciál mérésen alapuló felületi töltés meghatározás és reológiai vizsgálatok által pH = 3,5 – 5,5 tartományban, ahol meghatározóan ellentétes töltéssel rendelkeznek. A HyA deprotonálódási folyamatát ($pK_s = 2,9 - 4,0$) már részleteztük [113]; a BSA izoelektromos pontja jól ismert (*i.e.p* = 5,10) szakirodalomból (P27) és tankönyvekből is [124]. Az SPR mérési eredményekből (68. ábra (A)) jól látszik, hogy a BSA-nal felületmódosított szenzor felületen a HyA áramoltatása csak pH = 3,6 – 4,5 tartományban mutat mérhető hullámhossz eltolódást, ami a két makromolekula közötti kölcsönhatásra utalhat. pH = 5,0 esetén már csak nagyon kis eltolódás mérhető, míg pH = 5,5 értéknél már semmilyen kölcsönhatás nem detektálható.

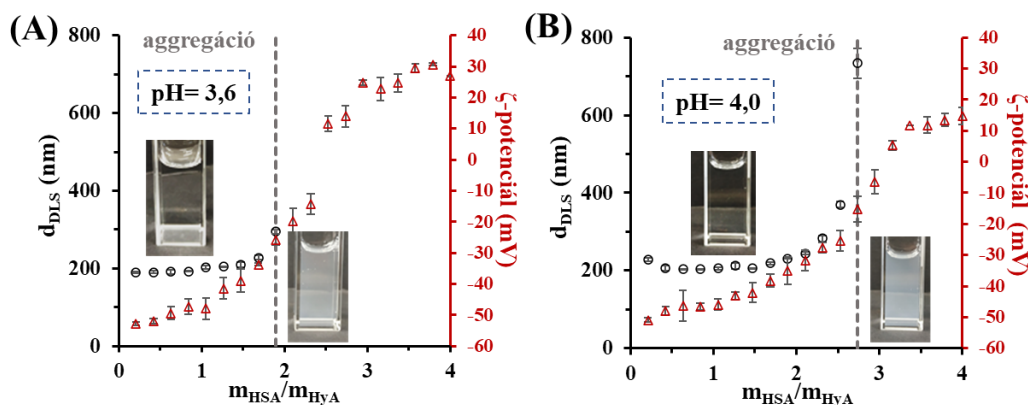


68. ábra: (A) A HyA SPR szenzorgramjai BSA-nal felületmódosított arany felületen eltérő pH esetén ($c_{BSA} = 10 \mu\text{M}$, áramlási sebesség = $50 \mu\text{L}/\text{perc}$, $c_{HyA} = 2,5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, $50 \mu\text{L}/\text{perc}$, $t = 25 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$). (B) A HyA áramlási potenciál értékeinek változása eltérő BSA/HyA tömegarányok esetén ($V_{HyA} = 20,0 \text{ cm}^3$, $c_{HyA} = 0,36 \text{ mg}/\text{cm}^3$, $c_{BSA} = 10,0 \text{ mg}/\text{cm}^3$, $V_{BSA} = 100 - 100 \mu\text{L}$). (C) A HyA látszólagos viszkozitás értéke eltérő BSA/HyA tömegarányoknál ($V_{HyA} = 19,0 \text{ cm}^3$, $c_{HyA} = 0,10 \text{ mg}/\text{cm}^3$, $c_{BSA} = 10,0 \text{ mg}/\text{cm}^3$, $V_{BSA} = 40 - 40 \mu\text{L}$) (P26).

A kapott adatok jól korrelálnak a két makromolekula adott pH-n releváns töltésviszonyaival, pH > 5 felett, ahol a fehérje eléri az izoelektromos pontját (így bruttó negatív töltéssel rendelkezik) interakció nem igazolható. A HyA áramlási potenciál értékeinek változása (68. ábra (B)) is megerősíti az SPR mérések eredményét; a pH növelésével, ahogyan egyre közelebb kerülünk a BSA izoelektromos pontjához, a töltéskompenzálás egyre nagyobb m_{BSA}/m_{HyA} tömegarányok esetén következik be, hiszen adott mennyiségű HyA negatív

töltését egyre több BSA tudja csak kompenzálni; pH ~ 5 esetén már áttöltés nem is érhető el. A **68. ábra (B)** áttöltési értékei (ahol az áramlási potenciál 0 mV értéket mutat) rendre: $m_{BSA}/m_{HyA} = 2,04 \pm 0,01$ (pH = 3,6), $2,69 \pm 0,01$ (pH = 4,0) és $5,05 \pm 0,01$ (pH = 4,5). Az is megfigyelhető, hogy a titrálási görbék inflexiós pontjai (1,97, 2,51 és 4,46) a semlegesítési pontok előtt jelennek meg, ami a makromolekulák közötti szerkezeti változásokra és BSA/HyA kolloid részecskék lehetséges kialakulására utalhat a töltés semlegesítése előtt.

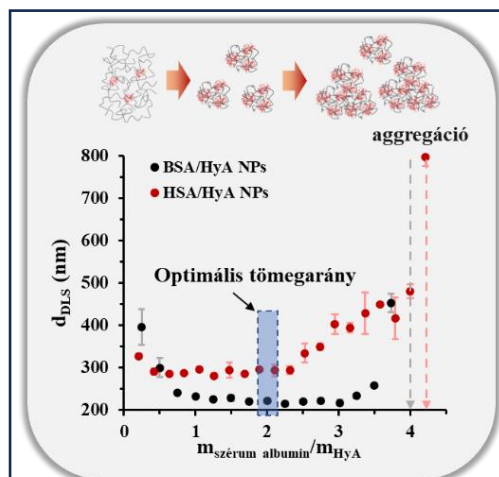
E megfigyelés megerősítésére reológiai vizsgálatokat is végeztünk, melyek eredményét a **68. ábra (C)** szemlélteti. A BSA törzsoldat HyA-hoz történő adagolásával a látszólagos viszkozitási értékek folyamatosan csökkennek egy adott pontig, majd közel állandó értékeket mérhetünk. Az illetett egyenesek metszéspontja egy töréspontot ad, mely tendencia minden vizsgált pH értéknél megfigyelhető. 25 °C-on a következő m_{BSA}/m_{HyA} arányoknál adhatók meg a töréspontok: 1,43 (pH = 3,6), 2,26 (pH = 4,0) és 4,14 (pH = 4,5). A meghatározott töréspontok közel hasonló m_{BSA}/m_{HyA} arányok mellett kaphatók, mint a **68. ábra (B)** inflexiós pontjai esetén meghatározhatóak. Eredményeink tehát megerősítik feltevésünket, hogy a két makromolekula felhasználásával szimplán töltéskompenzáción alapuló kolloid részecskék kialakítása csak pH 4 – 5 között lehetséges, ahol a HyA teljesen deprotonált és a BSA még bruttó pozitív töltéssel rendelkezik. Gyógyszerhordozóként funkcionáló kolloid részecskék előállítási lehetőségeit pH ~ 3,5 – 4,5 tartományban tanulmányoztuk acetát puffer alkalmazása mellett, ahol a rendszer turbiditását és a részecskék méretének változását számos $m_{fehérje}/m_{HyA}$ tömegarány beállítása mellett is nyomon követtük. Reprezentatív példaként a **69. ábra** a HSA/HyA rendszerben képződő kolloid részecskék méretét és ζ -potenciál értékeit mutatja eltérő fehérje/poliszacharid tömegarányok kialakítása mellett pH = 3,6 és pH = 4,0 esetén.



69. ábra: A HSA/HyA PEC részecskék átlagos hidrodinamikai átmérője (fekete pontokkal) és ζ -potenciál értékei (piros pontokkal) pH = 3,6 (A) és pH = 4,0 (B) esetén ($c_{HyA} = 0,1$ mg/cm³, I = 15 mM NaCl) (P26, P30).

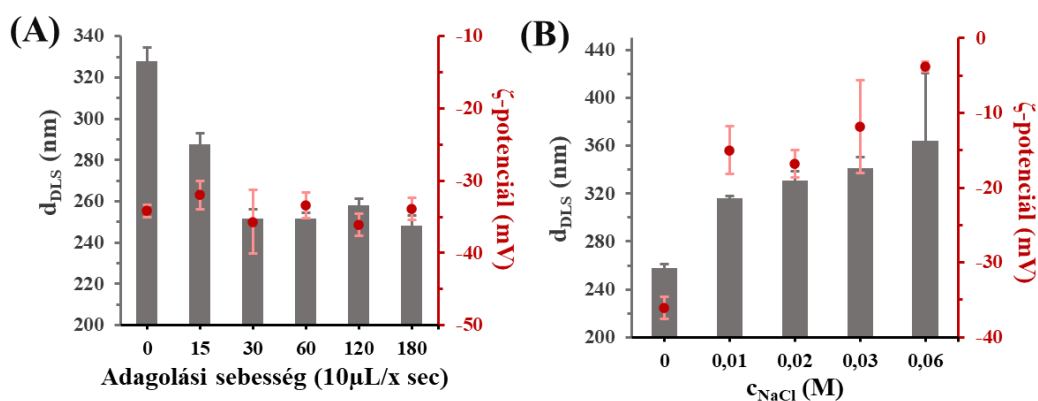
Emellett a **70. ábra** a BSA/HyA és HSA/HyA ugyanezen értékeit foglalja össze pH = 4,50 beállítása mellett (P26, P30). Jól látható, hogy a pH növelésével egyre nagyobb tömegarányok (nagyobb fehérje felesleg) mellett következik be a képződő kolloid részecskék aggregációja – párhuzamosan a polielektrolit komplexben lévő makromolekulák töltésemlegesítése révén – ami a pH emelésével a fehérje csökkenő pozitív töltésének is eredménye. Optimális tömegarányok a BSA/HSA – HyA rendszerek eredményeit tekintve az 1:1 – 2,5:1 arányok közötti tartomány mutatkozik figyelembe véve a részecskeméretet ($d < 300$ nm) és a

ζ -potenciál (- 30 mV) értékeket. Ezen tartományból a fehérje/HyA 2:1 tömegarány alkalmazását választottuk (**70. ábra**), mert a HyA rendkívül hidrophil karakterét a fehérje felesleg kialakítása mellett kívántuk kompenzálni, hogy a komplex hordozó részecske optimális legyen akár hidrophil, akár hidrophób karakterű kismolekulák formulálására. Az optimálisnak választott tömegarány mellett a makromolekulák koncentrációjának hatását is tanulmányoztuk, ahol igazolást nyert, hogy a HyA koncentrációnak növelésével 0,05 mg/cm³ értéktől 0,20 mg/cm³ értékig a méret kb. 200 – 380 nm tartományban szisztematikusan nő. A PEC részecskék kialakíthatóságának vonatkozásában vizsgáltuk a HSA oldat HyA oldathoz történő adagolási sebességének hatását is a részecskék méretére (**71. ábra (A)**), ahol megállapítást nyert, hogy konstans fehérje/HyA 2:1 tömegarány esetén minél lassabban adagoljuk a koherens HyA gél szerkezethez a fehérje oldatát, annál kisebb méretű inkoherens részecskék képződnek. Ezen megfigyelés feltehetően annak tulajdonítható, hogy a PEC részecskékben a makromolekuláknak elegendő ideje van az elektrosztatikus töltéskompenzálás révén a részecskék kialakítására. Tanulmányoztuk továbbá az inert só (NaCl, $c_{NaCl} = 0 - 0,06$ M) hatását is az elektrosztatikus stabilitásra. A **71. ábra (B)** látható, hogy a méret és a ζ -potenciál folyamatosan növekszik ~ 258 nm-ről és ~ -36 mV-ról (0 M NaCl) ~ 364 nm-re és ~ -3,8 mV-ra (0,06 M NaCl), mely magyarázható azzal, hogy az inert só megjelenése a diszperzióban csökkenti a részecskék közötti elektrosztatikus tasztítást. Alacsonyabb ionerősség értékeknél jelentős részecskeméret növekedés mutatkozik, míg magasabb sókoncentrációknál a diszperzió destabilizálódik és aggregálódik (**P30**).



70. ábra: A HSA/HyA és BSA/HyA PEC részecskék átlagos hidrodinamikai átmérői pH = 4,5 esetén ($c_{HyA} = 0,1$ mg/cm³) (**P26, P30**).

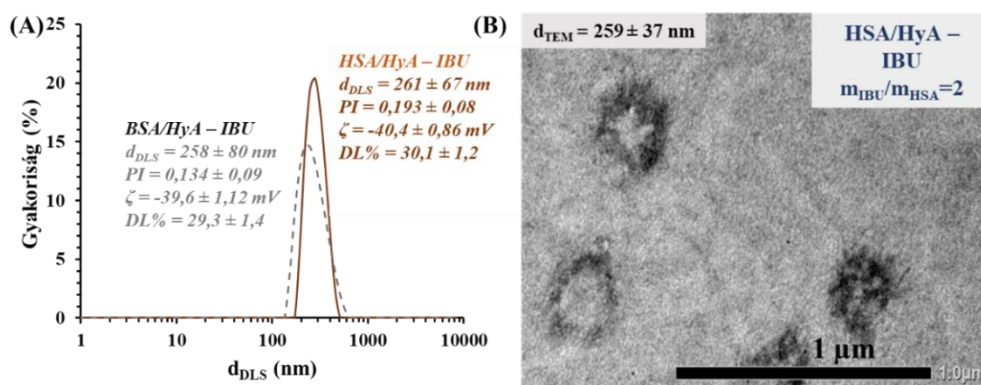
Az optimálisnak választott tömegarány mellett a makromolekulák koncentrációjának hatását is tanulmányoztuk, ahol igazolást nyert, hogy a HyA koncentrációnak növelésével 0,05 mg/cm³ értéktől 0,20 mg/cm³ értékig a méret kb. 200 – 380 nm tartományban szisztematikusan nő. A PEC részecskék kialakíthatóságának vonatkozásában vizsgáltuk a HSA oldat HyA oldathoz történő adagolási sebességének hatását is a részecskék méretére (**71. ábra (A)**), ahol megállapítást nyert, hogy konstans fehérje/HyA 2:1 tömegarány esetén minél lassabban adagoljuk a koherens HyA gél szerkezethez a fehérje oldatát, annál kisebb méretű inkoherens részecskék képződnek. Ezen megfigyelés feltehetően annak tulajdonítható, hogy a PEC részecskékben a makromolekuláknak elegendő ideje van az elektrosztatikus töltéskompenzálás révén a részecskék kialakítására. Tanulmányoztuk továbbá az inert só (NaCl, $c_{NaCl} = 0 - 0,06$ M) hatását is az elektrosztatikus stabilitásra. A **71. ábra (B)** látható, hogy a méret és a ζ -potenciál folyamatosan növekszik ~ 258 nm-ről és ~ -36 mV-ról (0 M NaCl) ~ 364 nm-re és ~ -3,8 mV-ra (0,06 M NaCl), mely magyarázható azzal, hogy az inert só megjelenése a diszperzióban csökkenti a részecskék közötti elektrosztatikus tasztítást. Alacsonyabb ionerősség értékeknél jelentős részecskeméret növekedés mutatkozik, míg magasabb sókoncentrációknál a diszperzió destabilizálódik és aggregálódik (**P30**).



71. ábra: A HSA/HyA részecskék hidrodinamikai átmérője (szürke oszlop, bal oldali y-tengely) és ζ -potenciál értékei (piros pontokkal, jobb oldali y-tengely) különböző (A) adagolási sebesség és (B) NaCl koncentráció mellett (acetát puffer, pH = 4,5, $m_{HSA}/m_{HyA} = 2$, $c_{HyA} = 0,05$ mg/mL, $V_{HyA} = 20$ mL) (**P30**).

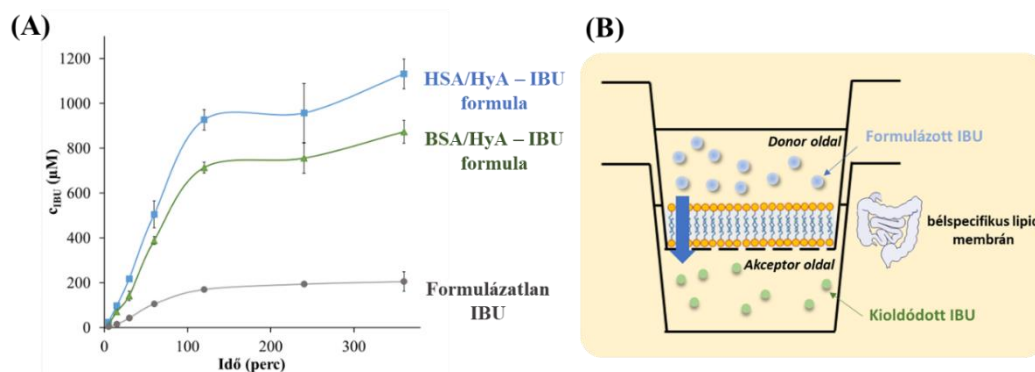
Értelmeztük a fehérje szerkezetében bekövetkező változásokat a HyA makromolekulákkal való elektrosztatikus kölcsönhatás kialakulása után is. A HSA számított α -hélix-tartalma 67,3 % pH = 4,5 mellett. A poliszacharid megjelenése a fehérje másodlagos szerkezetében jelentős változást okoz; az α -hélix-tartalom 28,2 %-ra csökken. A HSA és a konjugátum CD-görbéit a Reed-modell segítségével illesztettük, és az eredmények rámutattak arra, hogy az α -hélix változás mellett a β -redő tartalom megnő (29,4 % (HSA); 60,7 % (HSA/HyA)). A HyA jelenlétének hatása a HSA szerkezetére egyértelműen bizonyítja az elektrosztatikus és hidrofób kölcsönhatások kialakulását, amelynek eredményeként a HyA polimerláncok nem teszik lehetővé a fehérje olyan mértékű kitekeredését, mint amilyenre a pufferben szolvált formában képes. Ha a pH nagyobb (pH = 7,4), mint a HSA izoelektromos pontja ($pI = 4,7$ [211]), a fehérje szerkezete kevésbé változik a HyA hozzáadásával (α -hélix: 48,3 % (HSA); 55,8 % (HSA/HyA)), ami az elektrosztatikus kölcsönhatás csökkenésére utal.

Megkíséreltük a kialakított kolloid részecskéket hatóanyag-hordozó rendszerként felhasználni IBU formulálására (P28, P29), ahol az IBU-t a fehérje oldata tartalmazta a részecskék előállításának során. Azért is alkalmaztuk ezt az eljárást, mert SPR mérések és ITC vizsgálatok révén igazoltuk, hogy a nevezett szérum fehérje jelentős IBU megkötésre képes, melyet a pH szabályozásával kontrollálhatunk (P27). Növekvő mennyiségű IBU hozzáadásával ($m_{IBU}/m_{BSA} = 0,125 - 4,0$ (0,50 mg - 16,0 mg IBU/4,0 mg BSA) tanulmányoztuk a kialakuló hatóanyag-tartalmú PEC részecskék részecskeméretét és a rendszer turbiditását. Megállapítottuk, hogy $m_{IBU}/m_{BSA} = 2,0$ tömegarányig a részecskeméret kb. 210 ± 15 nm értéket mutat, de nagyobb IBU felesleg esetén már aggregáció következik be, amit a lecsökkent turbiditás is igazol. Párhuzamosan követtük a fehérje szerkezetváltozását CD spektroszkópiás mérésekkel is, ahol hasonló megállapítást tettünk. A $m_{IBU}/m_{BSA} = 4,0$ tömegarány elérésekor már az α -hélix tartalom közel 0-ra csökken, míg párhuzamosan a β -redő (56,7 %) és a random forma (43,3 %) lesz a meghatározó. Ez alapján is $m_{IBU}/m_{BSA} = 2,0$ tömegarányt választottunk optimálisnak a maximálisan kapszulázható IBU kialakítása érdekében. A formulációk kialakítása után a mintákat tisztítottuk; először centrifugáltuk (15000 rpm, 30 perc) a diszperziót, majd a felülúszót eltávolítottuk és a mintát rediszpergáltuk acetát pufferben (pH = 4,5), majd a mintákat liofilizáltuk és a liofilizált por alapú mintát - 70 °C-on tároltuk további felhasználásig. A kialakított formulációk jellemzésére DLS méréseket végeztünk és TEM felvételeket is készítettünk (72. ábra).



72. ábra: A BSA/HyA – IBU (szaggatott vonallal) és a HSA/HyA – IBU (folytonos barna vonallal) összetételű részecskéket tartalmazó diszperziók reprezentatív méreteloszlási görbéi (A) és egy példaként bemutatott TEM felvétel a HSA-tartalmú rendszerről (B).

A **72. ábra** a HSA- és BSA-alapú részecskéket tartalmazó diszperziók méreteloszlás görbéit mutatja a főbb szerkezeti adatokkal valamint egy reprezentatív TEM felvétellel (P29). A liofilizált porok 90 napos tárolás után rediszpergálva pH = 4,5 acetát pufferben nem mutattak szerkezeti változást sem CD spektroszkópiás, sem DLS mérések által igazolva; az egyes formulációk tehát hónapokig tárolhatók - 70 °C-on. A hatóanyag kioldódás és penetráció folyamatát is tanulmányoztuk (P29). Előbbi esetén egy RED (*Rapid Equilibrium Device*) rendszer használtunk, míg utóbbi vonatkozásában egy nem-sejtes permeabilitást leíró ún. PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*)⁴¹ modell révén vékonybélben történő felszívódást modellezve (pH = 6,50 (PBS pufferben)) végeztük a kísérleteinket. A RED vizsgálatokat úgy végeztük, hogy az IBU-t tartalmazó hordozókat fizikailag egy 8 kDa MWCO-jú dialízismembrán választotta el az akceptor közegtől, amely csak a hordozóból felszabaduló, nem kötött IBU passzív diffúzióját teszi lehetővé az akceptor közegbe. Az IBU-t tartalmazó formulációk és a nem formulázott forma szabad IBU *in vitro* felszabadulási profilját bélrendszeri körülmények között (pH = 6,5) vizsgáltuk (**73. ábra (A)**).



	PAMPA $Pe (\times 10^{-6} \times \text{cm} \times \text{s}^{-1})$	Flux $(\text{mol} \times \text{cm}^{-2} \times \text{s}^{-1})$
HSA/HyA -IBU	$145,5 \pm 26,4$	$1,40 \times 10^{-4} \pm 2,36 \times 10^{-5}$
BSA/HyA -IBU	$72,0 \pm 13,1$	$5,91 \times 10^{-5} \pm 1,02 \times 10^{-5}$
IBU	$43,5 \pm 6,7$	$1,11 \times 10^{-5} \pm 1,80 \times 10^{-6}$

73. ábra: A RED vizsgálatok során regisztrált szabad IBU és a formulázott IBU kioldódási görbéi pH = 6,5 esetén (A) valamint a belsepcifikus PAMPA modell sematikus ábrája (B). Az ábra alatti táblázatban a PAMPA permeabilitási mérések főbb paraméterei láthatóak.

Az IBU gyenge savas jellege miatt ($pK_s = 4,2 - 4,5$ [212]) teljesen ionizált formában található meg az oldódási közegben ($2 < \Delta pH = |pH - pK_s|$). Bár az IBU oldódási profilja csak enyhe növekedést mutat az időben, de 120 perc után közel elérte az egyensúlyi oldhatóságot ($256 \pm 9 \mu\text{M}$). A formulák esetében az IBU-hoz képest szignifikánsan megnövekedett oldódás volt megfigyelhető (**, $p < 0,01$), ami az albumin/HyA-IBU formulák nanométeres mérettartományú méretével, megnövekedett fajlagos felületének és negatív felületi töltésének tulajdonítható. A RED mérésekből meghatározható a kioldódott és ezáltal a fehérjéhez kötve maradt hatóanyag mennyisége is a **18. egyenlet** alapján:

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, hiszen ezen PAMPA mérések együttműködés keretein belül születettek.

$$\text{Fehérjéhez kötött hatóanyag (\%)} = \left(1 - \frac{c_{\text{puffer}}}{c_{\text{donor}}}\right) \times 100 \quad (18)$$

ahol a c_{puffer} a kioldódott IBU koncentrációja, míg a c_{donor} a donoroldalon lévő teljes formulázott IBU koncentráció.

A mérések alapján ezen érték a BSA-alapú formulációra $85 \pm 3,33$ %, míg a HSA-alapúra $52 \pm 3,97$ %. Ezen számított adatok jó egyezést mutatnak a **73. ábra (A)** kioldódási görbéi alapján a felszabadult IBU mennyiségére meghatározott adatokkal. Látható, hogy a HSA-alapú hordozó részecskékből adott idő alatt nagyobb mennyiségű (kb. 30 %-kal több) IBU képes kioldódni (tehát kevesebb a kötött), mint a BSA/HyA komplex részecskékből, ami a két fehérje eltérő felületi töltésével magyarázható. Ennek igazolása végett áramlási potenciál mérésen alapuló felületi töltés meghatározására irányuló méréseket végeztünk, hogy kvantitatív úton meghatározzuk a két fehérje felületi töltését azonos koncentráció és pH körülmények mellett. A mérések során a fehérje oldatokat kationos CTAB felületaktív anyaggal titrálva megállapítást nyert, hogy a BSA esetén lényegesen kevesebb CTAB hozzáadása esetén érhető el a töltéskompenzálás ($q = 0,131 \pm 0,024$ mmol mg^{-1}), míg HSA esetén ez az érték $q = 0,226 \pm 0,012$ mmol mg^{-1} . Igazoltuk tehát, hogy a nagyobb felületi negatív töltéssel rendelkező HSA és a negatív töltésű IBU közötti elektrosztatikus taszító kölcsönhatás meghatározó szereppel bír mind a hatóanyag megkötés mind pedig felszabadulása vonatkozásában. A PAMPA permeabilitási mérések során egy vékonybélben történő felszívódást modelleztünk a **73. ábra (B)** szerinti elrendezésben. A részletes mérési elrendezést a vonatkozó publikáció (P29) tartalmazza. A IBU hatóanyag effektív permeabilitását a **19. egyenlet** segítségével számítottuk.

$$P_e = -\frac{2,303 \times V_A}{A(t - \tau_{SS})} \times \log \left[1 - \frac{c_A(t)}{S}\right] \quad (19)$$

ahol P_e az effektív permeabilitás (cm/s), V_A a donor oldal térfogata (0,3 mL), A a szűrőmembrán felülete (0,24 cm^2), t az inkubációs idő, τ_{SS} : a mesterséges membrán telítődési ideje a vizsgált molekulával, $c_A(t)$ az IBU koncentrációja az akceptor oldalon adott t időpillanatban (mol/mL), S az IBU oldhatósága a donor oldalon. Az effektív permeabilitási érték mellett a fluxus (Flux, mol/ cm^2s) értéke is fontos információkat szolgáltat, melyet a következő **20. egyenlettel** számíthatjuk:

$$\text{Flux} = P_e \times S \quad (20)$$

Az eredményekből egyértelműen látható, hogy mindkét fehérje/HyA hordozó részecske szignifikánsan növelte az IBU permeabilitását és fluxusát a nem formulázott IBU-hoz képest (HSA/HyA-IBU vs. IBU ***, $p < 0,001$; BSA/HyA-IBU vs. IBU ***, $p < 0,001$). Az IBU megnövekedett permeabilitása és fluxusa a HSA és a BSA szolubilizáló hatásával magyarázható. A formulák permeabilitását és fluxusát összehasonlítva mindkét esetben szignifikáns különbség (***, $p < 0,001$) volt megfigyelhető, ami megfelel a hatóanyag-felszabadulási vizsgálati eredményeknek. Az eredmények alátámasztják, hogy mindkét formula képes elősegíteni az IBU passzív transzportját, ami a bélrendszeri felszívódás fontos paramétere (P28, P30).

6. Összefoglalás

Korszerű nanotechnológiai fejlesztések kulcsfontosságú elemei a szeretlen, szerves vagy a gyakorta alkalmazott „hibrid” nanostruktúrák, melyek változatos összetétellel és funkcióval rendelkeznek, s anyagtudományi kutatások mellett egyre meghatározóbb szerepet töltenek be orvosi biológiai és gyógyszerészeti területeken is. Az elmúlt közel tizenhárom éves, meghatározóan preparatív jellegű, kutatómunkám során, mindvégig kiemelt cél volt korszerű és új összetételű nemesfém-tartalmú szeretlen ill. főként „hibrid” nanoszerkezetek, valamint tisztán szerves-alapú, makromolekulás kolloidok alkotta kolloid rendszerek „zöldkémiai” úton történő előállítási protokolljainak a kidolgozása. Arra kerestük a választ, hogy az egyes preparálási technikák kísérleti körülményeinek szisztematikus változtatása milyen hatással van a képződő nanoszerkezetek (legyenek azok fémes NPs, nemesfém NCs vagy éppen biokolloid részecskék) struktúrájára, méretére, méreteloszlására és (ahol releváns) szerkezetfüggő egyedi optikai (plazmonikus vagy fluoreszcens) tulajdonságára, valamint funkciójára, függetlenül attól, hogy egy katalizátor részecskéről, egy optikai (bio)szenzorról, egy fluoreszcens jelzőanyagról vagy egy szabályozott hatóanyag leadó kolloid részecskéről legyen is szó. A fontosabb eredményeket az alábbiakban foglalom össze.

I. Több, új, hangolható mérettel és szerkezettel rendelkező arany-tartalmú kétfémes nanorészecske, mint potenciális elektrokatalizátor, reproduktív szintézis protokollját dolgoztuk ki.

I/1. Szférikus morfológiájú, monodiszperz eloszlást mutató, citráttal stabilizált Au/Ag kétfémes ötvözet NPs vizes közegű előállítására egy olyan egyszerűen és reprodukálható módon kivitelezhető szintézist dolgoztunk ki, ahol igazoltuk, hogy a részecskeméret $\sim 8 - 32$ nm tartományban közel lineárisan szabályozható a teljes fém koncentráció ($c = 0,2 - 0,6$ mM) és a fémion/redukálószer arányától (1:5 – 1:1) függően. Bizonyítottuk, hogy ugyanazon előállítási protokollt követve, kizárólag a kísérleti paraméterek változtatásával, egy adott tömbfázisbeli összetétel mellett a részecskeméret, valamint állandó részecskeméret és az elemek konstans tömbfázisbeli aránya esetén a felületi elemösszetétel (klasszikus ötvözet vagy mag-héj szerkezet) is kontrollálható, mely katalizátorok fejlesztésénél kiemelt szempont.

I/2. Szférikus morfológiájú, mag-héj szerkezetű Au/Sn kétfémes NPs reprodukálható módon történő előállítására és tisztítására elsők között dolgoztunk ki egy protokollt vizes közegben. XRD vizsgálatokkal igazoltuk, hogy az Sn egy része beépül az előzetesen előállított Au magokba ($d \sim 22$ nm) és az Sn tartalom növelésével az Au magok szerkezete „intermetallikus” fázissá alakítható. A részecskék mérete ezáltal növelhető (23 – 33 nm tartományban), ill. az egységes Sn héj vastagsága is szabályozható (1,5 – 2,8 nm) a kidolgozott preparatív eljárással. XPS mérésekkel azonosítottuk, hogy a részecskék külső héjként funkcionáló rétege Sn/SnO_x összetétellel rendelkezik; az Sn-tartalom növelésével az oxid-tartalom nő. Bizonyítottuk, hogy ezen NPs izopropanolos diszperziójából egységes rétegek/filmek alakíthatóak ki elektrokémiai vizsgálatokhoz.

I/3. Változó felületi összetétellel rendelkező Au/Pb kétfémes NPs előállítására egy vizes közegben megvalósítható szintézis eljárást dolgoztunk ki, mely részecskék ilyen módon ígéretes eredményeket mutatnak a CO₂ redukciós folyamatokban. TEM felvételek és XPS

mérések által igazoltuk, hogy egységes Au héj kialakítása az Pb NPs felületén nem lehetséges, amit a fémek standardpotenciál értékei alapján is feltételezhetünk. A kidolgozott protokoll révén az Pb NPs felületén viszont változatos „sűrűségű” Au magok kialakítása kontrolláltan megvalósítható. XPS mérésekkel bizonyítottuk, hogy a felületi rétegben az Pb oxid formája a domináns. Ezen változatos felületi elemösszetétellel rendelkező részecskék olyan stabilitással is rendelkeznek, hogy izopropanolos diszperziójukból, hasonlóan az Au/Sn rendszerekhez, egységes bevonatok alakíthatóak ki üvegszén bevonatú elektródák felületén elektrokémiai vizsgálatok kivitelezéséhez és 10 óra elektrolízis után sem detektálható szerkezeti változás.

II. Monomolekulás rétegben, ciszteinnel felületmódosított Au és Ag kolloidokat elsőként tanulmányozva, feltártuk a ciszteinek a rendszer stabilitásában játszott szerepét, valamint a vizes közegű felületmódosításnak a főbb optikai tulajdonságokra kifejtett hatását.

Monomolekuláris felületi borítottságot kialakítva, $^1\text{H-NMR}$, FT-IR és Raman spektroszkópiás mérésekkel igazoltan, Cys-nel funkcionális Au és Ag kolloidokat állítottunk elő, ahol a felületmódosítás hatását a szakirodalomban elsők között értelmeztük a részecskék kolloid stabilitására és a vizes diszperziók optikai sajátságaira széles pH-tartományban. A Cys molekuláris felületigényét – arany felületen – SPR és QCM mérés technikákkal határoztuk meg (0,32 és 0,28 nm²). Rámutattunk, hogy függetlenül a kolloid részecskék anyagi minőségétől, azok stabilitása a felületen kovalens kötéssel (Au-S) megkötődött Cys és a rendszerben jelen lévő, elektrosztatikus stabilitást biztosító, citrát molekulák funkciós csoportjainak adott pH-n domináns töltésével (protonáltsági fokkal) jól korrelál. A fényszórás mérések és TEM felvételek révén alátámasztott megállapításokat a vizes diszperziók optikai tulajdonságainak változása is megerősíti. A részecskék láncszerű összekapcsolódását az ezüst-tartalmú rendszerek esetén végelemes módszerrel történő elméleti modellekkel is alátámasztottuk.

III. Új összetételű, fehérjékkel (LYZ, γG) stabilizált egy- és kétfémes NCs előállítására protokollokat dolgoztunk ki, valamint értelmeztük az egyes rendszerek szerkezetfüggő optikai jellemzőit. A szintetizált NCs tulajdonságai alapján rámutattunk azok szenzorikai és fluoreszcens jelzőanyagként történő alkalmazására.

III/1. Lúgos közegben, 37 °C-on, lizozim (LYZ) fehérje redukáló- és stabilizálószerként történő alkalmazása mellett, mind plazmonikus tulajdonságú Au kolloidok, mind szub-nanométeres fluoreszcens Au NCs előállítására egy egylépéses szintézis protokollt terveztünk kizárólag a fémion/LYZ tömegarány változtatásával. A nanoszerkezetek jellemzésére SAXS, FT-IR és CD méréseket végeztünk, melyek eredményeit együttesen értelmeztük. Elsőként állítottunk elő szobahőmérsékleten BSA-nal és LYZ-mal stabilizált Au/Ag kétfémes NCs-et, ahol megállapítottuk, hogy 3 – 10 m/m% ezüst Au magba történő beépítése révén a klaszterek fluoreszcenciája szisztematikusan hangolható (1-5 m/m% tartományban lineárisan) a kék tartomány irányába és a QY(%) növelhető az Ag atomok beépülése révén kialakuló szinergikus hatás miatt.

III/2. Potenciális fluoreszcens jelzőanyagként történő felhasználásuk érdekében elsők között tanulmányoztuk a III/1. pontban bemutatott BSA- és LYZ-alapú egy- és kétfémes NCs kölcsönhatását makromolekulás kolloidokból felépülő hatóanyag hordozó részecskékkel. Rámutattunk arra, hogy a biokolloidok stabilitását és a fluoreszcens jelölés hatékonyságát

együttesen kell értelmezni, melyet a fémmag összetétele (1- vagy 2-fémes), a NCs-et stabilizáló fehérjék anyagi minősége és mennyisége, valamint a biokolloid részecskék összetétele, szerkezete (pl.: polielektrolit komplex (PEC) vagy mag-héj szerkezetű) és felületi töltése egyaránt befolyásol.

III/3. A γ G immunfehérje alkalmazhatóságát elsőként bizonyítottuk Au kolloidok és Au NCs reprodukálható módon történő előállítására. A γ G-Au NCs nagymértékű stabilitást mutattak fiziológiás körülmények között és szintetikus testfolyadékban (aCSF) is. Eredményesen használtuk fel ezen vörös emisszióval rendelkező γ G-Au NCs-et a Trp metabolizmus egyik meghatározó köztterméke, az *L*-Kyn, szelektív és gyors detektálására PBS és aCSF közegben 15,0 és 22,0 μ M-os kimutatási határral, ahol a szelektivitás egy töltésátviteli folyamat eredményeként azonosítható a hőmérsékletfüggő PL kioltási vizsgálatokból meghatározott termodinamikai paraméterek alapján. Bizonyítottuk, hogy a szintetikus aCSF közegből történő Kyn detektálás LOD értéke lényegesen csökkenthető 22,0 μ M értékről 5,0 μ M értékre egy „gyorstesztként” funkcionáló papír-alapú szenzor kialakítása révén.

III/4. Négy elérő fehérjével (BSA, HSA, γ G, LYZ) redukált és stabilizált Au NCs citotoxicitási tulajdonságait is tanulmányoztuk HL-60 leukémia, COLO-720 L és HUT-78 sejtvonalakon. A fehérjék típusától függetlenül valamennyi NCs intenzív vörös emisszióval, hasonló méretű fémmaggal (kb. 1,4 nm) és negatív felületi töltéssel rendelkezett pH = 7,4 esetén. A sejtek klaszterekkel történő kezelése során a mitokondriális aktivitás, a membrán integritásának, valamint a gyulladáshoz és apoptózishoz mediátorok szekréciójában bekövetkező változásokat együttesen értelmeztük. Megállapítást nyert, hogy bár az Au NCs nem gyakoroltak jelentős hatást a limfociták életképességére, nemkívánatos sejtfolyamatokat stimulálhatnak, ami egyértelműen a stabilizáló fehérjék anyagi minőségétől függ.

IV. Több, új aminosavval stabilizált fluoreszcens Au és Ag nanoszerkezetek/nanoklaszterek „zöldkémiai” úton történő szintézis protokolljait dolgoztuk ki vizes közegben, és feltártuk e rendszerek hangolható szerkezeti és optikai tulajdonságait.

IV/1. *Aromás oldalláncú* aminosavak közül részletesen tanulmányoztuk a His és az $[\text{AuCl}_4]^-$ -ionok kölcsönhatását vizes közegben. Igazoltuk, hogy His: $[\text{AuCl}_4]^-$ /30:1 molarány alkalmazása mellett, 24 h elteltével, pH = 6,0 felett egy olyan fluoreszcens termék képződik, amely az Ag(I)/His rendszer szerkezeti analógjaként, helikálisan rendeződő polinukleáris komplexnek tekinthető, ahol a His oxidációja egy gyökös polimerizációs folyamatként azonosítható. A Trp és az $[\text{AuCl}_4]^-$ -ionok kölcsönhatásának feltérképezése során rámutattunk arra, hogy a pH mellett a Trp: $[\text{AuCl}_4]^-$ aránya és az alkotók koncentrációja is döntő hatással bír az aminosavval stabilizált Au nanoszerkezetek kialakulására és optikai tulajdonságára. Rámutattunk, hogy erősen savas (pH < 2) közegben, az indolgyűrű autopolimerizációs folyamatával párhuzamosan, állandó arany koncentráció mellett az aminosav mennyiségének növelésével (Trp: $[\text{AuCl}_4]^-$ /1:1; 5:1; 15:1) a klaszterek emissziója a zöld-kék tartományban ($\lambda = 497\text{-}472$ nm) tetszőlegesen hangolható. Igazoltuk, hogy a *N*-donor aromás oldalláncból történő eliminálása kedvezőtlenül hat a klaszterképződésre. A Phe és az $[\text{AuCl}_4]^-$ -ionok kölcsönhatása révén kialakuló kéken emittáló klaszterek csak nagyobb aminosav felesleg (Phe: $[\text{AuCl}_4]^-$ /20:1) mellett keletkeznek, 6 napos szintézisidő és 80 °C alkalmazásával.

IV/2. *Oldalláncban tiolcsoportot* tartalmazó Cys és Cys-tartalmú peptidek (Cys-Trp, GSH) kölcsönhatását is tanulmányoztuk $[\text{AuCl}_4]^-$ -ionokkal. A Cys: $[\text{AuCl}_4]^-$ rendszerben képződő fluoreszcens Cys-Au(I) önrendeződő koordinációs polimer struktúra előállításánál új eredményként megállapítottuk, hogy a reaktánsok mólaránya és a pH meghatározó szereppel bír a képződő termék megjelenésére és annak emissziós tulajdonságára. A Cys-Trp redukáló és stabilizáló ligandum szerepét betöltve alkalmas $d = 8 - 10$ nm-es Au kolloidok előállítására. Igazoltuk, hogy a dipeptid mennyiségének növelése (CW: $[\text{AuCl}_4]^-/20:1$) révén a részecskeképződés eltolódik egy kéken emittáló, feltehetően Au(I)-tartalmú szupramolekuláris komplexként azonosítható termék megjelenésének irányába. Megállapítottuk, hogy a Trp aromás oldalláncának jelenléte szterikus gátolhatja az Au(I)-tiolát rendszerekre jellemző, önrendeződő koordinációs polimer struktúra kialakulását. Vizsgálatainkkal elsőként mutattunk rá, hogy a GSH: $[\text{AuCl}_4]^-$ rendszer esetén a fentebb említett CP szerkezet a pH szisztematikus változtatásával kéken emittáló NCs képződésének irányába eltolható. A folyamatot az aurát(III)ionok savas közegben jelenlévő *tetrakloro* és a lúgos közegben domináns *tetrahidroxó* formájának jelenléte mellett azok tiolát ligandumokkal való kölcsönhatása során az egymással versengő ligandumcsere reakció(k) sebessége és a redukció szabályozza.

IV/3. Igazoltuk, hogy az *oldalláncban alifás N-tartalmú* Arg és Gln már nem alkalmas közvetlenül fluoreszcens Au klaszterek létrehozásához, de extra citrát redukálószer felhasználása mellett a nevezett amionosavakkal stabilizált klaszterek előállítása 80°C -on megvalósítható. A doktori értekezés keretében előállított közel 25 új fluoreszcens nemesfém nanoklaszter közül az Arg-Au NCs kiemelkedően magas, közel 18 %-os QY(%) rendelkezik, melyet a diszperzióban lévő viszonylag nagy Arg felesleg és fémmag felületén lévő Arg-citrát molekulák közötti sóhidas kölcsönhatás kialakulása okozhatja.

IV/4. A Trp, Tyr, Arg és Gln alkalmazhatóságát tanulmányoztuk Ag NCs előállíthatóságára, ahol kísérletileg igazoltuk, hogy Tyr \sim Trp $>$ Gln \gg Arg sorrendben egyre kisebb a néhány atomos, kéken emittáló Ag klaszterek előállítási lehetősége, melyet a molekulákban a csökkenő *N*-donorcsoportok jelenléte alapján is várunk.

V. Kismolekulával stabilizált egy-(Au) és kétfémes (Au/Ag) NCs „zöldkémiai” úton történő előállítását valósítottuk meg és kidolgoztuk azok szintézis protokolljait vizes közegben. A NCs szerkezetváltoztatásával hangolható optikai tulajdonságokat értünk el, mellyel e rendszerek bioszenzorként történő felhasználását alapoztuk meg.

V/1. Fiziológiai körülmények között is igen nagy stabilitást mutató, kék emisszióval rendelkező, néhány atomos AMP-tal felületmódosított Au NCs-et alakítottunk ki első között, melyeket eredményesen alkalmaztuk Fe^{3+} -ionok vizes közegből történő szelektív és gyors azonosítására $2,0 \mu\text{M}$ -os kimutatási határral. Megállapítottuk, hogy a klaszterek és a fémionok kölcsönhatása során, sztatikus kioltást feltételezve, nem-fluoreszkáló ún. „sötét” komplexek kialakulásán alapul a kimutatási eljárás. Elsők között bizonyítottuk továbbá, hogy a fenti szintézis módosításaként, $0,5 - 5,0$ mM fémion koncentráció tartományban és AMP: $[\text{AuCl}_4]^-/1:1$ mólarány beállításával mellett, megvalósítható $d = 10 - 13$ nm átmérőjű AMP-tal stabilizált Au kolloidok közvetlen előállítása is.

V/2. Elsőként dolgoztuk ki AMP-tal felületmódosított kétfémes Au/Ag NCs szintézisét, ahol igazoltuk, hogy AMP: $[\text{AuCl}_4]^-/[\text{Ag}]^+ 20:1:1$ mólarány mellett sárga

emissziójú, $1,2 \pm 0,4$ nm átlagos átmérőjű klaszterek képződése preferált, melyek nagymértékű kinetikai stabilitással rendelkeznek pH = 6,5 – 8,0 tartományban. Igazoltuk, hogy az Au-tartalom közel felének Ag-re történő cseréjével a klaszterek mérete és a kvantumhatásfok is, a vegyes összetételű fémmag kialakításával, növelhető. Az AMP-tal funkcionizált Au/Ag NCs folsavval történő kölcsönhatásakor megállapítottuk, hogy a folsav koncentrációjának növelésével, 0 – 50 μ M tartományban, a NCs fluoreszcenciája a sárgából a kék tartományba tolódik, ami szenzorikai alkalmazást tesz lehetővé. A mechanizmus azonosításakor igazoltuk, hogy a folsav ún. „maratási” (*etching*) folyamatban egyre kisebb klaszterek képződését eredményezi (a klaszter Ag-tartalma „szegényedik”). Gyakorlati felhasználást szem előtt tartva, sikerült papír-alapú szenzort is fejleszteni a folsav 0,1 μ M-os koncentrációban történő gyors és szelektív kimutatására.

V/3. Elsőként mutattunk rá, hogy a His hidroxámsav származéka kéken emittáló Au NCs előállítására alkalmas. Kísérletileg igazoltuk, hogy a NCs stabilitására, ezáltal azok fluoreszcencia intenzitásának növelésére a citrát alkalmazása kedvezően hat. Rámutattunk arra, hogy egy hidroxamátcsoport jelenléte egy Au klaszter felületén preferált funkciós csoport „turn-on” ill. „turn-off” fémion szenzorok tervezéséhez (jeles esetben Cu^{2+} - és Zn^{2+} -ionokra), eltérő mechanizmusok alapján.

VI. Új PLGA-alapú kolloid részecskéket, mint potenciális hatóanyag szállító hordozókat állítottunk elő. Értelmeztük a kialakított részecskék szerkezeti és hatóanyagleadó tulajdonságait a polimer hidrofilitás változtatásának függvényében.

VI/1. Optimalizáltuk politejsav (PLA)- és politejsav-glikolsav (PLGA)-alapú kolloidális hatóanyag hordozó részecskék nanoprecipitációs eljárással történő preparálási folyamatát a kisebb részecskeméret (180 – 280 nm) elérése érdekében.^{P21} Ezen részecskékbe eltérő hidrofilitású modell vegyületek kapszulázhatóságát tanulmányozva bizonyítottuk, hogy a molekulák hidrofilitásának csökkenésével egyre preferáltabb a mag-héj szerkezet kialakítása. A tokoferol (TP)-tartalmú részecskék kialakíthatóságának tanulmányozása során igazoltuk, hogy a hatóanyag mennyisége a glikolid tartalom emelésével növelhető és annak kioldódása a polimer hidrofilitásának módosításával erősen kontrollálható.

VI/2. Hordozóként PLGA50 kopolimert felhasználva elsőként állítottunk elő TP-tartalmú, mag-héj nanoszerkezetű kolloid részecskéket folyamatos áramú, áramlásos kémiai technikával. Igazoltuk, hogy a nanoprecipitációs eljárással szemben, rövidebb idő alatt és nagyobb mennyiségben is előállíthatunk TP-tartalmú PLGA-alapú mag-héj szerkezetű kolloid részecskéket közel azonos kapszulázási hatékonysággal.

VI/3. Azonos méretű (~ 200 – 220 nm) és KP-tartalmú (DL% = 7 – 8%), PLGA-alapú mag-héj részecskék előállításánál bizonyítottuk, hogy a kontrollált hatóanyag leadást a PLGA-magon kialakított PLUR és TWEEN felületaktív anyagok alkotta héj szabályozása révén biztosítottuk. Igazoltuk, hogy a nagyobb molekulatömegű PLUR egy laza héjat alkot a polimer részecskéken, ami elősegíti a hatóanyag gyorsabb kioldódását, míg a kisebb molekulatömegű nem-ionos TWEEN egy kompaktabb adszorpciós réteget képez a polimer részecskéken, így a kapszulázott hatóanyag felszabadulása gátoltabb.

VII. Új, komplex összetételű, gyógyszerhatóanyag(ok) szállítására alkalmas hialuronsav-alapú biokolloidokat alakítottunk ki. A keresztkötések ill. a biokolloidok HyA-Chit valamint HyA-szérum fehérje arányának változtatásával a hatóanyag kapszulázásának növelését ill. a biokolloidok méretének beállítását valósítottuk meg.

VII/1. Igazoltuk, hogy 200 – 500 kDa átlagos molekulatömegű hialuronsav (HyA) diaminnal történő részleges és teljes keresztkötésével HyA alapú kolloid részecskék előállítása megvalósítható és a keresztkötés mértékével a részecskék hidrodinamikai átmérője $d \sim 50 - 110$ nm tartományban szabályozható. Megállapítottuk, hogy HyA CTAB-dal alkotott komplexe is eredményezhet $d \sim 80 - 90$ nm átmérőjű hordozó részecskéket. A részecskéket eredményesen alkalmaztuk KP kapszulázására. Igazoltuk a keresztkötött részecskénél, hogy a keresztkötési arány növelésével csak a növekvő részecskeméret (nagyobb felület) szabályozza a hatóanyag felszabadulását, míg a HyA/CTAB rendszereknél a HyA polimer láncon lévő tenzid aggregátumok szolubilizálhatják a KP-t, így a visszatartás nagyobb mértékű.

VII/2. Kvantitatív módon jellemeztük a HyA és Chit makromolekulák közötti elektrosztatikus kölcsönhatásokat, melyek ismeretében optimalizáltuk Chit/HyA alapú hordozó részecskék előállításának módját. Eltérő előállítási módokat alkalmazva elektrosztatikusan kompenzált Chit/HyA, tripolifoszfáttal (TPP) keresztkötött Chit-TPP/HyA és mag-héj szerkezetű Chit-TPPmag/HyAhéj kolloid részecskék előállítását valósítottuk meg. Megállapítottuk, hogy a kisméretű részecskék képződése ($d = 100 - 300$ nm), a részecskék típusától függetlenül, jelentősebb Chit vagy HyA makromolekula túlsúly esetén kedvezményezett.

VII/3. Eredményesen hoztunk létre BSA, BSA-HyA, ill. HSA-HyA részecskéket. Jellemeztük a makromolekulák és makromolekula-hatóanyag közötti kölcsönhatások jellegét és mértékét. Igazoltuk, hogy csak adott makromolekula tömegarány (BSA/HSA – HyA = 2:1) vezet megfelelő stabilitású kolloid (~ 200 nm) részecskék létrehozásához, ahol a HyA koncentrációjának és a makromolekulák töltésének domináns hatása van a biokolloidok stabilitására. Az ibuprofén (IBU) bélben történő felszívódását megvalósítva igazoltuk, hogy a fehérje/HyA alapú formuláció, amely megnövekedett oldhatóságot, gyorsabb oldódást és nagyobb permeabilitást biztosít, kontrolláltabb, alacsonyabb dózisú és gyomornyálkahártyát kímélő terápiás megoldást jelenthet a nagy dózisú IBU-alapú terápiában

7. Az eredmények várható alkalmazása

Anyagtudományi, orvosbiológiai és gyógyszerészeti fejlesztésekben egyre meghatározóbb szerep jut olyan új nanoszerkezetek alkalmazásának, melyek reprodukálható, költséghatékony és környezetkímélő folyamatok révén állíthatók elő. Mindezek közül az egyedi szerkezetfüggő katalitikus és optikai tulajdonságaiknak köszönhetően egyre inkább előtérbe kerülnek a nemesfém-alapú nanostruktúrák.

Munkánk során – az irodalomban elsők között – több újonnan előállított arany-tartalmú kétfémes nanorészecske vizes közegű szintézis protokollját dolgoztuk ki, melyek ígéretes eredményeket mutattak a CO₂ elektrokémiai úton történő szabályozott átalakítása során és nagyban hozzájárulhatnak összetettebb katalizátorok fejlesztéséhez.

A szakirodalomban elsősorban makromolekulák (nagyobb peptidek, fehérjék) alkalmazása révén állítottak elő fluoreszcens nanoklasztereket orvosbiológiai (pl.: szenzorika, diagnosztika, fluoreszcens képalkotás stb.) célokra. Munkánk révén elsőként számoltunk be kismolekulák (aminosavak és származékaik, AMP) felhasználásával előállított arany nanoklaszterekről, amelyek zöldkémiai előállítási protokolljának kidolgozása mellett (kizárólag vizes közegben, erős redukálószeres és toxikus hatással bíró molekulák elhagyása, extrém magas hőmérséklet és nyomás elkerülése stb.) tanulmányoztuk a szintézis körülmények hatását a nanostruktúrák szerkezetének és optikai sajátosságának tekintetében. Fémionok és kismolekulák szelektív és gyors azonosítására alkalmas bioszenzorokat fejlesztettünk, amelyeket alkalmazás orientált módon mutathattunk be rangos folyóiratokban és konferenciákon egyaránt.

A gyógyszerészeti fejlesztések területén javaslatot tettünk, elsősorban makromolekulás (bio)kolloidokból felépülő gyógyszerhatóanyag szállító részecskék előállításra, valamint beszámoltunk fiziko-kémiai és funkcionális jellemzésük eredményeiről. A fejlesztések során értelmeztük a hordozó makromolekula szerkezetének és főbitásának, valamint a vegyes összetételű hordozók esetén a makromolekulák közötti elektrosztatikus és hidrofób kölcsönhatások mértékének a képződő kolloid részecskék stabilitására, töltésviszonyaira, átlagos méretére és méreteloszlására gyakorolt hatását. Emellett sikerült világos módon kimutatni az említett sajátosságok módosulásának hatását a hatóanyag kapszulázási képessége, továbbá a hatóanyag kioldódási folyamat időbelisége és mechanizmusa tekintetében. Néhány esetben, ahol arra lehetőség adódott tanulmányoztuk a fluoreszcens, döntően vörös emisszióval rendelkező, biokompatibilis fluoreszcens nanoklaszterek kölcsönhatását a fenn nevezett kolloidális hordozó részecskékkel.

8. Felhasznált irodalom

- [1] N. Baig, I. Kammakakam, W. Falath, I. Kammakakam, Nanomaterials: A review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges, *Mater. Adv.* 2 (2021) 1821–1871.
- [2] P. Falagan-Lotsch, E.M. Grzincic, C.J. Murphy, New advances in nanotechnology-based diagnosis and therapeutics for breast cancer: An assessment of active-targeting inorganic nanoplateforms, *Bioconjug. Chem.* 28 (2017) 135–152.
- [3] Goeun Choi, N. Sanoj Rejinold, Huiyan Piao, Jin-Ho Choy, Inorganic–inorganic nanohybrids for drug delivery, imaging and photo-therapy: recent developments and future scope, *Chem. Sci.* 12 (2021) 5044–5063.
- [4] H. Wender, M.L. Andrezza, R.R.B. Correia, S.R. Teixeira, J. Dupont, Synthesis of gold nanoparticles by laser ablation of an Au foil inside and outside ionic liquids, *Nanoscale.* 3 (2011) 1240–1245.
- [5] G.R. Khayati, K. Janghorban, The nanostructure evolution of Ag powder synthesized by high energy ball milling, *Adv. Powder Technol.* 23 (2012) 393–397.
- [6] N. Moreau, C. Michiels, B. Masereel, O. Feron, B. Gallez, T. Vander Borgh, S. Lucas, PVD synthesis and transfer into water-based solutions of functionalized gold nanoparticles, *Plasma Process. Polym.* 6 (2009) S888–S892.
- [7] M. Grzelczak, J. Pérez-Juste, P. Mulvaney, L.M. Liz-Marzán, Shape control in gold nanoparticle synthesis, *Chem. Soc. Rev.* 37 (2008) 1783–1791.
- [8] X. The Bakerian Lecture. —Experimental relations of gold (and other metals) to light, *Philos. Trans. R. Soc. London.* 147 (1857) 145–181.
- [9] J. Kimling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot, A. Plech, Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited, *J. Phys. Chem. B.* 110 (2006) 15700–15707.
- [10] G. FRENS, Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions, *Nat. Phys. Sci.* 241 (1973) 20–22.
- [11] Y. Gao, L. Torrente-Murciano, Mechanistic insights of the reduction of gold salts in the Turkevich protocol, *Nanoscale.* 12 (2020) 2740–2751.
- [12] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D.J. Schiffrin, R. Whyman, Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1994) 801–802.
- [13] Y.C. Yeh, B. Creran, V.M. Rotello, Gold nanoparticles: Preparation, properties, and applications in bionanotechnology, *Nanoscale.* 4 (2012) 1871–1880.
- [14] B. Streszewski, W. Jaworski, K. Paclawski, E. Csapó, I. Dékány, K. Fitzner, Gold nanoparticles formation in the aqueous system of gold(III) chloride complex ions and hydrazine sulfate-Kinetic studies, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 397 (2012) 63–72.
- [15] J.D.S. Newman, G.J. Blanchard, Formation of gold nanoparticles using amine reducing agents, *Langmuir.* 22 (2006) 5882–5887.
- [16] A.Q. Zhang, L.J. Cai, L. Sui, D.J. Qian, M. Chen, Reducing properties of polymers in the synthesis of noble metal nanoparticles, *Polym. Rev.* 53 (2013) 240–276.
- [17] M. Gericke, A. Pinches, Microbial production of gold nanoparticles, *Gold Bull.* 39 (2006) 22–28.
- [18] J. Li, Q. Li, X. Ma, B. Tian, T. Li, J. Yu, S. Dai, Y. Weng, Y. Hua, Biosynthesis of gold nanoparticles by the extreme bacterium *Deinococcus radiodurans* and an evaluation of their antibacterial properties, *Int. J. Nanomedicine.* 11 (2016) 5931–5944.
- [19] J. Pérez-Juste, I. Pastoriza-Santos, L.M. Liz-Marzán, P. Mulvaney, Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications, *Coord. Chem. Rev.* 249 (2005) 1870–1901.
- [20] I. Pastoriza-Santos, L.M. Liz-Marzán, Synthesis of Silver Nanoprisms in DMF, *Nano Lett.* 2 (2002) 903–905.

- [21] L.M. Liz-Marzán, Nanometals: Formation and Color*, Colloid. Synth. Plasmonic Nanometals. (2020) 1–13.
- [22] K. Loza, M. Heggen, M. Epple, Synthesis, Structure, Properties, and Applications of Bimetallic Nanoparticles of Noble Metals, *Adv. Funct. Mater.* 30 (2020) 1909260.
- [23] L. Rivas, S. Sanchez-Cortes, J. V. García-Ramos, G. Morcillo, Mixed silver/gold colloids: a study of their formation, morphology, and surface-enhanced Raman activity, *Langmuir.* 16 (2000) 9722–9728.
- [24] Z. Peng, B. Spliethoff, B. Tesche, T. Walther, K. Kleinermanns, Laser-assisted synthesis of Au - Ag alloy nanoparticles in solution, *J. Phys. Chem. B.* 110 (2006) 2549–2554.
- [25] K. Mallik, M. Mandal, N. Pradhan, T. Pal, Seed Mediated Formation of Bimetallic Nanoparticles by UV Irradiation: A Photochemical Approach for the Preparation of “Core-Shell” Type Structures, *Nano Lett.* 1 (2001) 319–322.
- [26] Z. Li, W. Qian, H. Guo, X. Long, Y. Tang, J. Zheng, Electrostatic Self-Assembled Bracelet-Like Au@Pt Nanoparticles: An Efficient Electrocatalyst for Highly Sensitive Non-Enzymatic Hydrogen Peroxide Sensing, *ChemElectroChem.* 7 (2020) 1581–1589.
- [27] D. Salado-Leza, A. Traore, E. Porcel, D. Dragoe, A. Muñoz, H. Remita, G. García, S. Lacombe, Radio-Enhancing Properties of Bimetallic Au:Pt Nanoparticles: Experimental and Theoretical Evidence, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 5648.
- [28] H. Ataee-Esfahani, L. Wang, Y. Nemoto, Y. Yamauchi, Synthesis of bimetallic Au@Pt nanoparticles with Au core and nanostructured Pt shell toward highly active electrocatalysts, *Chem. Mater.* 22 (2010) 6310–6318.
- [29] N.E. Motl, E. Ewusi-Annan, I.T. Sines, L. Jensen, R.E. Schaak, Au-Cu alloy nanoparticles with tunable compositions and plasmonic properties: Experimental determination of composition and correlation with theory, *J. Phys. Chem. C.* 114 (2010) 19263–19269.
- [30] G. Uzunidis, O. Schade, D. Schild, J.D. Grunwaldt, S. Behrens, Design of bimetallic Au/Cu nanoparticles in ionic liquids: Synthesis and catalytic properties in 5-(hydroxymethyl)furfural oxidation, *ChemNanoMat.* 7 (2021) 1108–1116.
- [31] S. Thota, Y. Wang, J. Zhao, Colloidal Au–Cu alloy nanoparticles: synthesis, optical properties and applications, *Mater. Chem. Front.* 2 (2018) 1074–1089.
- [32] G.D. Kalita, P.P. Sarmah, G. Kalita, P. Das, Bimetallic Au–Pd nanoparticles supported on silica with a tunable core@shell structure: enhanced catalytic activity of Pd(core)–Au(shell) over Au(core)–Pd(shell), *Nanoscale Adv.* 3 (2021) 5399–5416.
- [33] L. Bruno, M. Scuderi, F. Priolo, L. Falciola, S. Mirabella, Enlightening the bimetallic effect of Au@Pd nanoparticles on Ni oxide nanostructures with enhanced catalytic activity, *Sci. Reports* 2023 131. 13 (2023) 1–11.
- [34] E.A. Sutter, X. Tong, K. Jungjohann, P.W. Sutter, Oxidation of nanoscale Au-In alloy particles as a possible route toward stable Au-based catalysts, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 10519–10524.
- [35] J. Sopoušek, A. Kryštofová, M. Premović, O. Zobač, S. Polsterová, P. Brož, J. Buršík, Au-Ni nanoparticles: Phase diagram prediction, synthesis, characterization, and thermal stability, *Calphad.* 58 (2017) 25–33.
- [36] F. Bao, J.F. Li, B. Ren, J.L. Yao, R.A. Gu, Z.Q. Tian, Synthesis and characterization of Au@Co and Au@Ni core - Shell nanoparticles and their applications in surface-enhanced Raman spectroscopy, *J. Phys. Chem. C.* 112 (2008) 345–350.
- [37] A. V. Kalenskii, A.A. Zvekov, A.P. Nikitin, M. V. Anan’eva, Optical Properties of Copper Nanoparticles, *Russ. Phys. J.* 58 (2015) 1098–1104.
- [38] D.P. Szekrényes, S. Pothorszky, D. Zámbo, Z. Osváth, A. Deák, Investigation of Patchiness on Tip-Selectively Surface-Modified Gold Nanorods, *J. Phys. Chem. C.* 122 (2018) 1706–1710.
- [39] J.K. Stolarczyk, A. Deak, D.F. Brougham, Nanoparticle Clusters: Assembly and Control Over Internal

- Order, Current Capabilities, and Future Potential, *Adv. Mater.* 28 (2016) 5400–5424.
- [40] P.B. Santhosh, J. Genova, H. Chamati, Green Synthesis of Gold Nanoparticles: An Eco-Friendly Approach, *Chem.* 4 (2022) 345–369.
- [41] M.C.O. Monteiro, M.F. Philips, K.J.P. Schouten, M.T.M. Koper, Efficiency and selectivity of CO₂ reduction to CO on gold gas diffusion electrodes in acidic media, *Nat. Commun.* 2021 121. 12 (2021) 1–7.
- [42] S. Nitopi, E. Bertheussen, S.B. Scott, X. Liu, A.K. Engstfeld, S. Horch, B. Seger, I.E.L. Stephens, K. Chan, C. Hahn, J.K. Nørskov, T.F. Jaramillo, I. Chorkendorff, Progress and Perspectives of Electrochemical CO₂ Reduction on Copper in Aqueous Electrolyte, *Chem. Rev.* 119 (2019) 7610–7672.
- [43] D. Kim, J. Resasco, Y. Yu, A.M. Asiri, P. Yang, Synergistic geometric and electronic effects for electrochemical reduction of carbon dioxide using gold–copper bimetallic nanoparticles, *Nat. Commun.* 2014 51. 5 (2014) 1–8.
- [44] Y. Jia, F. Li, K. Fan, L. Sun, Cu-based bimetallic electrocatalysts for CO₂ reduction, *Adv. Powder Mater.* 1 (2022) 100012.
- [45] J. Huang, M. Mensi, E. Oveisi, V. Mantella, R. Buonsanti, Structural Sensitivities in Bimetallic Catalysts for Electrochemical CO₂ Reduction Revealed by Ag-Cu Nanodimers, *J. Am. Chem. Soc.* 141 (2019) 2490–2499.
- [46] J.D. Aiken, R.G. Finke, A review of modern transition-metal nanoclusters: their synthesis, characterization, and applications in catalysis, *J. Mol. Catal. A Chem.* 145 (1999) 1–44.
- [47] L. Shang, S. Dong, G.U. Nienhaus, Ultra-small fluorescent metal nanoclusters: Synthesis and biological applications, *Nano Today.* 6 (2011) 401–418.
- [48] D.M. Chevrier, A. Chatt, P. Zhang, Properties and applications of protein-stabilized fluorescent gold nanoclusters: short review, <https://doi.org/10.1117/1.JNP.6.064504>. 6 (2012) 064504.
- [49] K. Chaudhari, P.L. Xavier, T. Pradeep, Understanding the evolution of luminescent gold quantum clusters in protein templates, *ACS Nano.* 5 (2011) 8816–8827.
- [50] Y.N. Tan, J.Y. Lee, D.I.C. Wang, Uncovering the design rules for peptide synthesis of metal nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 5677–5686.
- [51] D. Ungor, I. Dékány, E. Csapó, Reduction of tetrachloroaurate(III) ions with bioligands: Role of the thiol and amine functional groups on the structure and optical features of gold nanohybrid systems, *Nanomaterials.* 9 (2019) 1229.
- [52] X. Liu, X. Yu, X. Luo, Ultrasensitive iodide detection based on the resonance light scattering of histidine-stabilized gold nanoclusters, *Microchim. Acta.* 181 (2014) 1379–1384.
- [53] X. Yang, M. Shi, R. Zhou, X. Chen, H. Chen, Blending of HAuCl₄ and histidine in aqueous solution: A simple approach to the Au₁₀ cluster, *Nanoscale.* 3 (2011) 2596–2601.
- [54] X. Zhang, F.G. Wu, P. Liu, N. Gu, Z. Chen, Enhanced fluorescence of gold nanoclusters composed of HAuCl₄ and histidine by glutathione: Glutathione detection and selective cancer cell imaging, *Small.* 10 (2014) 5170–5177.
- [55] X. Mu, L. Qi, J. Qiao, H. Ma, One-pot synthesis of tyrosine-stabilized fluorescent gold nanoclusters and their application as turn-on sensors for Al³⁺ ions and turn-off sensors for Fe³⁺ ions, *Anal. Methods.* 6 (2014) 6445–6451.
- [56] X. Yang, Y. Luo, Y. Zhuo, Y. Feng, S. Zhu, Novel synthesis of gold nanoclusters templated with l-tyrosine for selective analyzing tyrosinase, *Anal. Chim. Acta.* 840 (2014) 87–92.
- [57] X. Mu, L. Qi, P. Dong, J. Qiao, J. Hou, Z. Nie, H. Ma, Facile one-pot synthesis of l-proline-stabilized fluorescent gold nanoclusters and its application as sensing probes for serum iron, *Biosens. Bioelectron.* 49 (2013) 249–255.
- [58] S. Zheng, H. Yin, Y. Li, F. Bi, F. Gan, One-step synthesis of L-tryptophan-stabilized dual-emission fluorescent gold nanoclusters and its application for Fe³⁺ sensing, *Sensors Actuators, B Chem.* 242

- (2017) 469–475.
- [59] H.H. Deng, L.N. Zhang, S. Bin He, A.L. Liu, G.W. Li, X.H. Lin, X.H. Xia, W. Chen, Methionine-directed fabrication of gold nanoclusters with yellow fluorescent emission for Cu²⁺ sensing, *Biosens. Bioelectron.* 65 (2015) 397–403.
- [60] B. Söptei, J. Mihály, I.C. Szigyártó, A. Wacha, C. Németh, I. Bertóti, Z. May, P. Baranyai, I.E. Sajó, A. Bóta, The supramolecular chemistry of gold and l-cysteine: Formation of photoluminescent, orange-emitting assemblies with multilayer structure, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 470 (2015) 8–14.
- [61] L. Li, Z. Li, H. Zhang, S. Zhang, I. Majeed, B. Tan, Effect of polymer ligand structures on fluorescence of gold clusters prepared by photoreduction, *Nanoscale.* 5 (2013) 1986–1992.
- [62] H. Xu, K.S. Suslick, Sonochemical synthesis of highly fluorescent Ag nanoclusters, *ACS Nano.* 4 (2010) 3209–3214.
- [63] S. Liu, F. Lu, J.J. Zhu, Highly fluorescent Ag nanoclusters: microwave-assisted green synthesis and Cr³⁺-sensing, *Chem. Commun.* 47 (2011) 2661–2663.
- [64] C.Y. Ke, T.H. Chen, L.C. Lu, W.L. Tseng, Understanding thiol-induced etching of luminescent gold nanoclusters, *RSC Adv.* 4 (2014) 26050–26056.
- [65] R. Zhou, M. Shi, X. Chen, M. Wang, H. Chen, Atomically Monodispersed and Fluorescent Sub-Nanometer Gold Clusters Created by Biomolecule-Assisted Etching of Nanometer-Sized Gold Particles and Rods, *Chem. – A Eur. J.* 15 (2009) 4944–4951.
- [66] N. Pajoohepour, M. Rezaei, A. Hajian, A. Afkhami, M. Sillanpää, F. Arduini, H. Bagheri, Protein templated Au-Pt nanoclusters-graphene nanoribbons as a high performance sensing layer for the electrochemical determination of diazinon, *Sensors Actuators, B Chem.* 275 (2018) 180–189.
- [67] S. Chakraborty, D. Bain, S. Maity, S. Kolay, A. Patra, Controlling Aggregation-Induced Emission in Bimetallic Gold-Copper Nanoclusters via Surface Motif Engineering, *J. Phys. Chem. C.* 126 (2022) 2896–2904.
- [68] S. Borse, Z.V.P. Murthy, T.J. Park, S.K. Kailasa, Lysozyme-Decorated Gold and Molybdenum Bimetallic Nanoclusters for the Selective Detection of Bilirubin as a Jaundice Biomarker, *ACS Appl. Nano Mater.* 4 (2021) 11949–11959.
- [69] E.A. Ivleva, E.A. Obratsova, E.R. Pavlova, O. V. Morozova, D.G. Ivanov, A.S. Kononikhin, D. V. Klinov, Albumin-stabilized fluorescent metal nanoclusters: fabrication, physico-chemical properties and cytotoxicity, *Mater. Des.* 192 (2020) 108771.
- [70] H. Liu, X. Zhang, X. Wu, L. Jiang, C. Burda, J.J. Zhu, Rapid sonochemical synthesis of highly luminescent non-toxic AuNCs and Au@AgNCs and Cu (II) sensing, *Chem. Commun.* 47 (2011) 4237–4239.
- [71] R. Dai, W. Deng, P. Hu, C. You, L. Yang, X. Jiang, X. Xiong, K. Huang, One-pot synthesis of bovine serum albumin protected gold/silver bimetallic nanoclusters for ratiometric and visual detection of mercury, *Microchem. J.* 139 (2018) 1–8.
- [72] Z. Chu, L. Chen, X. Wang, Q. Yang, Q. Zhao, C. Huang, Y. Huang, D.P. Yang, N. Jia, Ultrasmall Au-Ag Alloy Nanoparticles: Protein-Directed Synthesis, Biocompatibility, and X-ray Computed Tomography Imaging, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 5 (2019) 1005–1015.
- [73] J.S. Mohanty, P.L. Xavier, K. Chaudhari, M.S. Bootharaju, N. Goswami, S.K. Pal, T. Pradeep, Luminescent, bimetallic AuAg alloy quantum clusters in protein templates, *Nanoscale.* 4 (2012) 4255–4262.
- [74] R. Jin, C. Zeng, M. Zhou, Y. Chen, Atomically Precise Colloidal Metal Nanoclusters and Nanoparticles: Fundamentals and Opportunities, *Chem. Rev.* 116 (2016) 10346–10413.
- [75] T.Q. Yang, B. Peng, B.Q. Shan, Y.X. Zong, J.G. Jiang, P. Wu, K. Zhang, Origin of the Photoluminescence of Metal Nanoclusters: From Metal-Centered Emission to Ligand-Centered Emission, *Nanomater.* 2020, Vol. 10, Page 261. 10 (2020) 261.

- [76] S. Link, A. Beeby, S. FitzGerald, M.A. El-Sayed, T.G. Schaaff, R.L. Whetten, Visible to infrared luminescence from a 28-atom gold cluster, *J. Phys. Chem. B.* 106 (2002) 3410–3415.
- [77] H. Tsunoyama, T. Tsukuda, Magic numbers of gold clusters stabilized by PVP, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 18216–18217.
- [78] H. Kawasaki, K. Hamaguchi, I. Osaka, R. Arakawa, pH-Dependent Synthesis of Pepsin-Mediated Gold Nanoclusters with Blue Green and Red Fluorescent Emission, *Adv. Funct. Mater.* 21 (2011) 3508–3515.
- [79] J. Mei, N.L.C. Leung, R.T.K. Kwok, J.W.Y. Lam, B.Z. Tang, Aggregation-Induced Emission: Together We Shine, United We Soar!, *Chem. Rev.* 115 (2015) 11718–11940.
- [80] F.N. Wu, J. Zhu, G.J. Weng, J.J. Li, J.W. Zhao, Gold nanocluster composites: preparation strategies, optical and catalytic properties, and applications, *J. Mater. Chem. C.* 10 (2022) 14812–14833.
- [81] X. Yan, H. Li, R. Jin, X. Zhao, F. Liu, G. Lu, Sensitive sensing of enzyme-regulated biocatalytic reactions using gold nanoclusters-melanin-like polymer nanosystem, *Sensors Actuators B Chem.* 279 (2019) 281–288.
- [82] Y. Xiao, Z. Wu, Q. Yao, J. Xie, Luminescent metal nanoclusters: Biosensing strategies and bioimaging applications, *Aggregate.* 2 (2021) 114–132.
- [83] X. Huang, H. Ishitobi, Y. Inouye, Formation of fluorescent platinum nanoclusters using hyper-branched polyethylenimine and their conjugation to antibodies for bio-imaging, *RSC Adv.* 6 (2016) 9709–9716.
- [84] N. Makarava, A. Parfenov, I. V. Baskakov, Water-soluble hybrid nanoclusters with extra bright and photostable emissions: A new tool for biological imaging, *Biophys. J.* 89 (2005) 572–580.
- [85] Y. Tao, M. Li, J. Ren, X. Qu, Metal nanoclusters: Novel probes for diagnostic and therapeutic applications, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 8636–8663.
- [86] X. Zhang, F.G. Wu, P. Liu, H.Y. Wang, N. Gu, Z. Chen, Synthesis of ultrastable and multifunctional gold nanoclusters with enhanced fluorescence and potential anticancer drug delivery application, *J. Colloid Interface Sci.* 455 (2015) 6–15.
- [87] S. Qian, Z. Wang, Z. Zuo, X. Wang, Q. Wang, X. Yuan, Engineering luminescent metal nanoclusters for sensing applications, *Coord. Chem. Rev.* 451 (2022) 214268.
- [88] R.X. Zhao, A.Y. Liu, Q.L. Wen, B.C. Wu, J. Wang, Y.L. Hu, Z.F. Pu, J. Ling, Q. Cao, Glutathione stabilized green-emission gold nanoclusters for selective detection of cobalt ion, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 254 (2021) 119628.
- [89] S. Govindaraju, S.R. Ankireddy, B. Viswanath, J. Kim, K. Yun, Fluorescent Gold Nanoclusters for Selective Detection of Dopamine in Cerebrospinal fluid, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–12.
- [90] Y. Yue, T.Y. Liu, H.W. Li, Z. Liu, Y. Wu, Microwave-assisted synthesis of BSA-protected small gold nanoclusters and their fluorescence-enhanced sensing of silver(i) ions, *Nanoscale.* 4 (2012) 2251–2254.
- [91] E. Csapó, Metal-Based Nanoclusters for Biomedical Applications, *Target. Met.* (2023) 289–317.
- [92] B.J. Boyd, Past and future evolution in colloidal drug delivery systems, *Expert Opin. Drug Deliv.* 5 (2008) 69–85.
- [93] B. Mishra, B.B. Patel, S. Tiwari, Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 6 (2010) 9–24.
- [94] G. Barratt, Colloidal drug carriers: Achievements and perspectives, *Cell. Mol. Life Sci.* 60 (2003) 21–37.
- [95] M. Handa, A. Sharma, R.K. Verma, R. Shukla, Polycaprolactone based nano-carrier for co-administration of moxifloxacin and rutin and its In-vitro evaluation for sepsis, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 54 (2019) 101286.
- [96] B. Tyler, D. Gullotti, A. Mangraviti, T. Utsuki, H. Brem, Poly(lactic acid) (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 107 (2016) 163–175.

- [97] J.A. Loureiro, M.C. Pereira, PLGA based drug carrier and pharmaceutical applications: The most recent advances, *Pharmaceutics*. 12 (2020) 1–5.
- [98] C. An, H. Li, Y. Zhao, S. Zhang, Y. Zhao, Y. Zhang, J. Yang, L. Zhang, C. Ren, Y. Zhang, J. Liu, H. Wang, Hyaluronic acid-based multifunctional carriers for applications in regenerative medicine: A review, *Int. J. Biol. Macromol.* 231 (2023) 123307.
- [99] V. Mikušová, P. Mikuš, Advances in Chitosan-Based Nanoparticles for Drug Delivery, *Int. J. Mol. Sci.* 2021, Vol. 22, Page 9652. 22 (2021) 9652.
- [100] C.I.C. Crucho, M.T. Barros, Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods, *Mater. Sci. Eng. C*. 80 (2017) 771–784.
- [101] Z. Liu, Y. Jiao, Y. Wang, C. Zhou, Z. Zhang, Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 1650–1662.
- [102] M. Bodnar, J.F. Hartmann, J. Borbely, Preparation and characterization of chitosan-based nanoparticles, *Biomacromolecules*. 6 (2005) 2521–2527.
- [103] M. Bodnár, L. Daróczy, G. Batta, J. Bakó, J.F. Hartmann, J. Borbély, Preparation and characterization of cross-linked hyaluronan nanoparticles, *Coll. Polym. Sci.* 287, (2009) 991–1000.
- [104] V.S. Meka, M.K.G. Sing, M.R. Pichika, S.R. Nali, V.R.M. Kolapalli, P. Kesharwani, A comprehensive review on polyelectrolyte complexes, *Drug Discov. Today*. 22 (2017) 1697–1706.
- [105] D. da Silva, M. Kaduri, M. Poley, O. Adir, N. Krinsky, J. Shainsky-Roitman, A. Schroeder, Biocompatibility, biodegradation and excretion of polylactic acid (PLA) in medical implants and theranostic systems, *Chem. Eng. J.* 340 (2018) 9–14.
- [106] E. Lagreca, V. Onesto, C. Di Natale, S. La Manna, P.A. Netti, R. Vecchione, Recent advances in the formulation of PLGA microparticles for controlled drug delivery, *Prog. Biomater.* 9 (2020) 153–174.
- [107] S. Rezvantlab, N.I. Drude, M.K. Moraveji, N. Güvener, E.K. Koons, Y. Shi, T. Lammers, F. Kiessling, PLGA-based nanoparticles in cancer treatment, *Front. Pharmacol.* 9 (2018) 413087.
- [108] F.Y. Han, K.J. Thurecht, A.K. Whittaker, M.T. Smith, Bioerodable PLGA-based microparticles for producing sustained-release drug formulations and strategies for improving drug loading, *Front. Pharmacol.* 7 (2016) 208569.
- [109] W. Huang, C. Zhang, Tuning the Size of Poly(lactic-co-glycolic Acid) (PLGA) Nanoparticles Fabricated by Nanoprecipitation, *Biotechnol. J.* 13 (2018) 1700203.
- [110] U. Bilati, E. Allémann, E. Doelker, Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Sci.* 24 (2005) 67–75.
- [111] J.M. Barichello, M. Morishita, K. Takayama, T. Nagai, Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25 (1999) 471–476.
- [112] J. Zhang, B. Senger, D. Vautier, C. Picart, P. Schaaf, J.C. Voegel, P. Lavalle, Natural polyelectrolyte films based on layer-by layer deposition of collagen and hyaluronic acid, *Biomaterials*. 26 (2005) 3353–3361.
- [113] H.M. Wang, D. Loganathan, R.J. Linhardt, Determination of the pK(a) of glucuronic acid and the carboxy groups of heparin by ¹³C-nuclear-magnetic-resonance spectroscopy, *Biochem. J.* 278 (1991) 689–695.
- [114] H. Van Le, D. Le Cerf, Colloidal Polyelectrolyte Complexes from Hyaluronic Acid: Preparation and Biomedical Applications, *Small*. 18 (2022) 2204283.
- [115] S. Manna, A. Seth, P. Gupta, G. Nandi, R. Dutta, S. Jana, S. Jana, Chitosan Derivatives as Carriers for Drug Delivery and Biomedical Applications, *ACS Biomater. Sci. Eng.* (2022).
- [116] A. Jain, S.K. Singh, S.K. Arya, S.C. Kundu, S. Kapoor, Protein Nanoparticles: Promising Platforms for Drug Delivery Applications, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 4 (2018) 3939–3961.
- [117] F. Kratz, B. Elsadek, Clinical impact of serum proteins on drug delivery, *J. Control. Release*. 161 (2012)

- 429–445.
- [118] N.C. Stein, D. Mulac, J. Fabian, F.C. Herrmann, K. Langer, Nanoparticle albumin-bound mTHPC for photodynamic therapy: Preparation and comprehensive characterization of a promising drug delivery system, *Int. J. Pharm.* 582 (2020) 119347.
- [119] E. Kianfar, Protein nanoparticles in drug delivery: animal protein, plant proteins and protein cages, albumin nanoparticles, *J. Nanobiotechnology* 2021 191. 19 (2021) 1–32.
- [120] S. Dominguez-Medina, L. Kisley, L.J. Tauzin, A. Hoggard, B. Shuang, A.S. D. S. Indrasekara, S. Chen, L.Y. Wang, P.J. Derry, A. Liopo, E.R. Zubarev, C.F. Landes, S. Link, Adsorption and Unfolding of a Single Protein Triggers Nanoparticle Aggregation, *ACS Nano*. 10 (2016) 2103–2112.
- [121] L. Shang, L. Yang, J. Seiter, M. Heinle, G. Brenner-Weiss, D. Gerthsen, G.U. Nienhaus, Nanoparticles Interacting with Proteins and Cells: A Systematic Study of Protein Surface Charge Effects, *Adv. Mater. Interfaces*. 1 (2014) 1300079.
- [122] K. Taguchi, Y. Okamoto, K. Matsumoto, M. Otagiri, V.T.G. Chuang, When albumin meets liposomes: A feasible drug carrier for biomedical applications, *Pharmaceuticals*. 14 (2021) 296.
- [123] F.F. An, X.H. Zhang, Strategies for Preparing Albumin-based Nanoparticles for Multifunctional Bioimaging and Drug Delivery, *Theranostics*. 7 (2017) 3667–3689.
- [124] N. Varga, V. Hornok, D. Sebok, I. Dékány, Comprehensive study on the structure of the BSA from extended-to aged form in wide (2-12) pH range, *Int. J. Biol. Macromol.* 88 (2016) 51–58.
- [125] M. Tarhini, H. Greige-Gerges, A. Elaissari, Protein-based nanoparticles: From preparation to encapsulation of active molecules, *Int. J. Pharm.* 522 (2017) 172–197.
- [126] N. Varga, E. Csapó, Z. Majláth, I. Ilisz, I.A. Krizbai, I. Wilhelm, L. Knapp, J. Toldi, L. Vécsei, I. Dékány, Targeting of the kynurenic acid across the blood-brain barrier by core-shell nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Sci.* 86 (2016) 67–74.
- [127] M. Karimi, P. Avci, R. Mobasser, M.R. Hamblin, H. Naderi-Manesh, The novel albumin-chitosan core-shell nanoparticles for gene delivery: Preparation, optimization and cell uptake investigation, *J. Nanoparticle Res.* 15 (2013) 1–14.
- [128] S. Yu, J. Hu, X. Pan, P. Yao, M. Jiang, Stable and pH-sensitive nanogels prepared by self-assembly of chitosan and ovalbumin, *Langmuir*. 22 (2006) 2754–2759.
- [129] H. Mok, W.P. Ji, G.P. Tae, Antisense oligodeoxynucleotide-conjugated hyaluronic acid/protamine nanocomplexes for intracellular gene inhibition, *Bioconjug. Chem.* 18 (2007) 1483–1489.
- [130] J.P. Fuenzalida, P.K. Nareddy, I. Moreno-Villoslada, B.M. Moerschbacher, M.J. Swamy, S. Pan, M. Ostermeier, F.M. Goycoolea, On the role of alginate structure in complexing with lysozyme and application for enzyme delivery, *Food Hydrocoll.* 53 (2016) 239–248.
- [131] J. Reed, T.A. Reed, A set of constructed type spectra for the practical estimation of peptide secondary structure from circular dichroism, *Anal. Biochem.* 254 (1997) 36–40.
- [132] J.J.L. Humphrey, D. Plana, V. Celorrio, S. Sadasivan, R.P. Tooze, P. Rodríguez, D.J. Fermín, Electrochemical Reduction of Carbon Dioxide at Gold-Palladium Core-Shell Nanoparticles: Product Distribution versus Shell Thickness, *ChemCatChem*. 8 (2016) 952–960.
- [133] Q. Li, J. Fu, W. Zhu, Z. Chen, B. Shen, L. Wu, Z. Xi, T. Wang, G. Lu, J.J. Zhu, S. Sun, Tuning Sn-Catalysis for Electrochemical Reduction of CO₂ to CO via the Core/Shell Cu/SnO₂ Structure, *J. Am. Chem. Soc.* 139 (2017) 4290–4293.
- [134] W. Luc, C. Collins, S. Wang, H. Xin, K. He, Y. Kang, F. Jiao, Ag-sn bimetallic catalyst with a core-shell structure for CO₂ reduction, *J. Am. Chem. Soc.* 139 (2017) 1885–1893.
- [135] X. Wang, Y. Zhu, A. Vasileff, Y. Jiao, S. Chen, L. Song, B. Zheng, Y. Zheng, S.Z. Qiao, Strain Effect in Bimetallic Electrocatalysts in the Hydrogen Evolution Reaction, *ACS Energy Lett.* 3 (2018) 1198–1204.
- [136] N. Arora, B.R. Jagirdar, From (Au₅Sn + AuSn) physical mixture to phase pure AuSn and Au₅Sn

- intermetallic nanocrystals with tailored morphology: Digestive ripening assisted approach, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16 (2014) 11381–11389.
- [137] Y. Chen, C.W. Li, M.W. Kanan, Aqueous CO₂ reduction at very low overpotential on oxide-derived Au nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 19969–19972.
- [138] J.A. Taylor, S.M. Merchant, D.L. Perry, Study of the oxidation of gold-tin preforms using x-ray photoelectron spectroscopy, *J. Appl. Phys.* 78 (1995) 5356–5361.
- [139] S. Aryal, R.B. Remant, N. Bhattarai, C.K. Kim, H.Y. Kim, Study of electrolyte induced aggregation of gold nanoparticles capped by amino acids, *J. Colloid Interface Sci.* 299 (2006) 191–197.
- [140] S. Aryal, B.K.C. Remant, N. Dharmaraj, N. Bhattarai, C.H. Kim, H.Y. Kim, Spectroscopic identification of SAu interaction in cysteine capped gold nanoparticles, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 63 (2006) 160–163.
- [141] Y. Akiyama, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, Conversion of rod-shaped gold nanoparticles to spherical forms and their effect on biodistribution in tumor-bearing mice, *Nanoscale Res. Lett.* 7 (2012) 1–6.
- [142] N.A. Rey, O.W. Howarth, E.C. Pereira-Maia, Equilibrium characterization of the As(III)-cysteine and the As(III)-glutathione systems in aqueous solution, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 1151–1159.
- [143] M. Papagianni, Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling, *Biotechnol. Adv.* 25 (2007) 244–263.
- [144] D. Lu, L. Liu, F. Li, S. Shuang, Y. Li, M.M.F. Choi, C. Dong, Lysozyme-stabilized gold nanoclusters as a novel fluorescence probe for cyanide recognition, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 121 (2014) 77–80.
- [145] P.H. Chan, S.Y. Wong, S.H. Lin, Y.C. Chen, Lysozyme-encapsulated gold nanocluster-based affinity mass spectrometry for pathogenic bacteria, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27 (2013) 2143–2148.
- [146] H. Wei, Z. Wang, L. Yang, S. Tian, C. Hou, Y. Lu, Lysozyme-stabilized gold fluorescent cluster: Synthesis and application as Hg²⁺ sensor, *Analyst.* 135 (2010) 1406–1410.
- [147] S. Peters, S. Peredkov, M. Neeb, W. Eberhardt, M. Al-Hada, Size-dependent XPS spectra of small supported Au-clusters, *Surf. Sci.* 608 (2013) 129–134.
- [148] R. Khandelia, S. Bhandari, U.N. Pan, S.S. Ghosh, A. Chattopadhyay, Gold Nanocluster Embedded Albumin Nanoparticles for Two-Photon Imaging of Cancer Cells Accompanying Drug Delivery, *Small.* 11 (2015) 4075–4081.
- [149] X. Wang, A. Ai, Z. Yu, M. Deng, W. Liu, G. Zhou, W. Li, W. Zhang, Y. Cao, X. Wang, Dual-modal non-invasive imaging in vitro and in vivo monitoring degradation of PLGA scaffold based gold nanoclusters, *Mater. Sci. Eng. C.* 107 (2020) 110307.
- [150] Y. Tao, M. Li, B. Kim, D.T. Auguste, Incorporating gold nanoclusters and target-directed liposomes as a synergistic amplified colorimetric sensor for HER2-positive breast cancer cell detection, *Theranostics.* 7 (2017) 899–911.
- [151] R. Liu, C. Hu, Y. Yang, J. Zhang, H. Gao, Theranostic nanoparticles with tumor-specific enzyme-triggered size reduction and drug release to perform photothermal therapy for breast cancer treatment, *Acta Pharm. Sin. B.* 9 (2019) 410–420.
- [152] A.P. Gorka, R.R. Nani, M.J. Schnermann, Harnessing Cyanine Reactivity for Optical Imaging and Drug Delivery, *Acc. Chem. Res.* 51 (2018) 3226–3235.
- [153] D. Aristova, V. Kosach, S. Chernii, Y. Slominsky, A. Balanda, V. Filonenko, S. Yarmoluk, A. Rotaru, H.G. Özkan, A. Mokhir, V. Kovalska, Monomethine cyanine probes for visualization of cellular RNA by fluorescence microscopy, *Methods Appl. Fluoresc.* 9 (2021) 045002.
- [154] S. Ge, K. Kojio, A. Takahara, T. Kajiyama, Bovine serum albumin adsorption onto immobilized organotrichlorosilane surface: Influence of the phase separation on protein adsorption patterns, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 9 (1998) 131–150.

- [155] R.M. Parry, R.C. Chandan, K.M. Shahani, Isolation and characterization of human milk lysozyme, *Arch. Biochem. Biophys.* 130 (1969) 59–65.
- [156] A. Elkak, T. Yehya, I. Salloub, F. Berry, A one step separation of immunoglobulin G from bovine serum by pseudobioaffinity chromatography on histidine grafted to epoxy activated sepharose, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 17 (2012) 584–590.
- [157] H. Pezhhan, M. Akhond, M. Shamsipur, Histidine capped-gold nanoclusters mediated fluorescence detection of glucose and hydrogen peroxide based on glucose oxidase-mimicking property of gold nanoparticles via an inner filter effect mechanism, *J. Lumin.* 228 (2020) 117604.
- [158] S. Govindaraju, S.R. Ankireddy, B. Viswanath, J. Kim, K. Yun, Fluorescent Gold Nanoclusters for Selective Detection of Dopamine in Cerebrospinal fluid, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–12.
- [159] H. Peng, H. Deng, M. Jian, A. Liu, F. Bai, X. Lin, W. Chen, Electrochemiluminescence sensor based on methionine-modified gold nanoclusters for highly sensitive determination of dopamine released by cells, *Microchim. Acta.* 184 (2017) 735–743.
- [160] T. Biernacki, D. Sandi, K. Bencsik, L. Vécsei, Kynurenines in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis: Therapeutic Perspectives, *Cells* 2020, Vol. 9, Page 1564. 9 (2020) 1564.
- [161] J.P. Routy, B. Routy, G.M. Graziani, V. Mehraj, The kynurenine pathway is a double-edged sword in immune-privileged sites and in cancer: Implications for immunotherapy, *Int. J. Tryptophan Res.* 9 (2016) 67–77.
- [162] H.P. Looock, P.D. Wentzell, Detection limits of chemical sensors: Applications and misapplications, *Sensors Actuators, B Chem.* 173 (2012) 157–163.
- [163] M.J. Holmberg, A. Moskowitz, T.T. Raymond, R.A. Berg, V.M. Nadkarni, A.A. Topjian, A. V. Grossestreuer, M.W. Donnino, L.W. Andersen, Derivation and internal validation of a mortality prediction tool for initial survivors of pediatric in-hospital cardiac arrest, *Pediatr. Crit. Care Med.* 19 (2018) 186–195.
- [164] H. Zhang, Q. Liu, T. Wang, Z. Yun, G. Li, J. Liu, G. Jiang, Facile preparation of glutathione-stabilized gold nanoclusters for selective determination of chromium (III) and chromium (VI) in environmental water samples, *Anal. Chim. Acta.* 770 (2013) 140–146.
- [165] M.D. Urović, R. Puchta, Ž.D. Bugarčić, R. Van Eldik, Studies on the reactions of [AuCl₄]⁻ with different nucleophiles in aqueous solution, *Dalt. Trans.* 43 (2014) 8620–8632.
- [166] C.M. Burt, G. Senanayake, Effect of reductants and stabilizers on ageing of gold nanoparticles at pH 2–12 and application of nano-gold to study non-cyanide leaching in sodium hypochlorite/chloride solutions using UV–Visible spectroscopy, *Hydrometallurgy.* 164 (2016) 166–176.
- [167] R. Kissner, G. Welti, G. Geier, The hydrolysis of gold(I) in aqueous acetonitrile solutions, *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* 2 (1997) 1773–1778.
- [168] M.D. Durović, Ž.D. Bugarčić, F.W. Heinemann, R. Van Eldik, Substitution versus redox reactions of gold(III) complexes with l-cysteine, l-methionine and glutathione, *Dalt. Trans.* 43 (2014) 3911–3921.
- [169] P.R. Selvakannan, S. Mandal, S. Phadtare, A. Gole, R. Pasricha, S.D. Adyanthaya, M. Sastry, Water-dispersible tryptophan-protected gold nanoparticles prepared by the spontaneous reduction of aqueous chloroaurate ions by the amino acid, *J. Colloid Interface Sci.* 269 (2004) 97–102.
- [170] A. Roy, R. Seidel, G. Kumar, S.E. Bradforth, Exploring Redox Properties of Aromatic Amino Acids in Water: Contrasting Single Photon vs Resonant Multiphoton Ionization in Aqueous Solutions, *J. Phys. Chem. B.* 122 (2018) 3723–3733.
- [171] E. Farkas, D. Bátka, E. Csapó, P. Buglyó, W. Haase, D. Sanna, Synthesis and characterization of Cu²⁺, Ni²⁺ and Zn²⁺ binding capability of some amino- and imidazole hydroxamic acids: Effects of substitution of side chain amino-N for imidazole-N or hydroxamic-N-H for -N-CH₃ on metal complexation, *Polyhedron.* 26 (2007) 543–554.
- [172] E. Csapó, P. Buglyó, N.V. Nagy, M.A. Santos, A. Corona, E. Farkas, Syntheses and characterization of Cu²⁺, Ni²⁺ and Zn²⁺ binding capability of histidinehydroxamic acid derivatives, *Polyhedron.* 29 (2010)

- 3137–3145.
- [173] A. Barth, The infrared absorption of amino acid side chains, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 74 (2000) 141–173.
- [174] K. Nomiya, A. Yoshizawa, K. Tsukagoshi, N.C. Kasuga, S. Hirakawa, J. Watanabe, Synthesis and structural characterization of silver(I), aluminium(III) and cobalt(II) complexes with 4-isopropyltropolone (hinokitiol) showing noteworthy biological activities. Action of silver(I)-oxygen bonding complexes on the antimicrobial activities, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 46–60.
- [175] B.A. Al-Maythaly, M.I.M. Wazeer, A.A. Isab, Synthesis and characterization of gold(III) complexes with alkylidiamine ligands, *Inorganica Chim. Acta.* 362 (2009) 3109–3113.
- [176] N.C. Polfer, J. Oomens, D.T. Moore, G. Von Helden, G. Meijer, R.C. Dunbar, Infrared spectroscopy of phenylalanine Ag(I) and Zn(II) complexes in the gas phase, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 517–525.
- [177] P.R. Selvakannan, A. Swami, D. Srisathiyarayanan, P.S. Shirude, R. Pasricha, A.B. Mandale, M. Sastry, Synthesis of aqueous Au core-Ag shell nanoparticles using tyrosine as a pH-dependent reducing agent and assembling phase-transferred silver nanoparticles at the air-water interface, *Langmuir.* 20 (2004) 7825–7836.
- [178] L.M.I. Schijven, V. Saggiomo, A.H. Velders, J.H. Bitter, C. V. Nikiforidis, Au³⁺-Induced gel network formation of proteins, *Soft Matter.* 17 (2021) 9682–9688.
- [179] S. Ahmad, A. Yousaf, M.N. Tahir, A.A. Isab, M. Monim-Ul-Mehboob, W. Linert, M. Saleem, Structural characterization and antimicrobial activity of a silver(I) complex of arginine, *J. Struct. Chem.* 56 (2015) 1653–1657.
- [180] A. Lopez, J. Liu, Light-activated metal-coordinated supramolecular complexes with charge-directed self-assembly, *J. Phys. Chem. C.* 117 (2013) 3653–3661.
- [181] J. Zhang, C. Cai, S. Razzaque, I. Hussain, Q.W. Lu, B. Tan, Synthesis of water-soluble and highly fluorescent gold nanoclusters for Fe³⁺ sensing in living cells using fluorescence imaging, *J. Mater. Chem. B.* 5 (2017) 5608–5615.
- [182] J. Youn, P. Kang, J. Crowe, C. Thornsbury, P. Kim, Z. Qin, J. Lee, Tripeptide-assisted gold nanocluster formation for sensing Fe³⁺ and Cu²⁺, (2022).
- [183] J. Zheng, C. Zhang, R.M. Dickson, Highly fluorescent, water-soluble, size-tunable gold quantum dots, *Phys. Rev. Lett.* 93 (2004) 077402.
- [184] Z. Wu, R. Jin, On the ligand's role in the fluorescence of gold nanoclusters, *Nano Lett.* 10 (2010) 2568–2573.
- [185] J. Kundu, O. Neumann, B.G. Janesko, D. Zhang, S. Lal, A. Barhoumi, G.E. Scuseria, N.J. Halas, Adenine-and adenosine monophosphate (AMP)-gold binding interactions studied by surface-enhanced raman and infrared spectroscopies, *J. Phys. Chem. C.* 113 (2009) 14390–14397.
- [186] R. Vos, Y. Engelborghs, a Fluorescence Study of Tryptophan-Histidine Interactions in the Peptide Anantin and in Solution, *Photochem. Photobiol.* 60 (1994) 24–32.
- [187] N. Sinha, O.S. Wenger, Photoactive Metal-to-Ligand Charge Transfer Excited States in 3d⁶ Complexes with Cr⁰, Mn^I, Fe^{II}, and Co^{III}, *J. Am. Chem. Soc.* 145 (2023) 4903–4920.
- [188] S. Roy, A.A. Lopez, J.E. Yarnell, F.N. Castellano, Metal-Metal-to-Ligand Charge Transfer in Pt(II) Dimers Bridged by Pyridyl and Quinoline Thiols, *Inorg. Chem.* 61 (2022) 121–130.
- [189] B. Peng, J.F. Zhou, M. Ding, B.Q. Shan, T. Chen, K. Zhang, Structural water molecules dominated p band intermediate states as a unified model for the origin on the photoluminescence emission of noble metal nanoclusters: from monolayer protected clusters to cage confined nanoclusters, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 24 (2023).
- [190] B. Kurzak, H. Kozłowski, E. Farkas, Hydroxamic and aminohydroxamic acids and their complexes with metal ions, *Coord. Chem. Rev.* 114 (1992) 169–200.
- [191] D. Mastropaolo, D.A. Powers, J.A. Potenza, H.J. Schugar, Crystal Structure and Magnetic Properties of

- Copper Citrate Dihydrate, Cu₂C₆H₄O₇·2H₂O, *Inorg. Chem.* 15 (1976) 1444–1449.
- [192] D.A. Brown, N.J. Fitzpatrick, H. Muller-Bunz, Á.T. Ryan, Di-, tri-, and tetranuclear zinc hydroxamate complexes as structural models for the inhibition of zinc hydrolases by hydroxamic acids, *Inorg. Chem.* 45 (2006) 4497–4507.
- [193] J.A. Kübler, B. Pfund, O.S. Wenger, Zinc(II) Complexes with Triplet Charge-Transfer Excited States Enabling Energy-Transfer Catalysis, Photoinduced Electron Transfer, and Upconversion, *JACS Au*. 2 (2022) 2367–2380. <https://doi.org/10.1021/jacsau.2c00442>.
- [194] H. Chang, N.S. Karan, K. Shin, M.S. Bootharaju, S. Nah, S.I. Chae, W. Baek, S. Lee, J. Kim, Y.J. Son, T. Kang, G. Ko, S.H. Kwon, T. Hyeon, Highly Fluorescent Gold Cluster Assembly, *J. Am. Chem. Soc.* 143 (2021) 326–334.
- [195] A.T.C.R. Silva, B.C.O. Cardoso, M.E.S.R. e Silva, R.F.S. Freitas, R.G. Sousa, Synthesis, Characterization, and Study of PLGA Copolymer <i>in Vitro</i>; Degradation, *J. Biomater. Nanobiotechnol.* 06 (2015) 8–19.
- [196] C. D'Avila Carvalho Erbetta, Synthesis and Characterization of Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) Copolymer, *J. Biomater. Nanobiotechnol.* 03 (2012) 208–225.
- [197] G. Reich, Use of DSC to study the degradation behavior of PLA and PLGA microparticles, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 23 (1997) 1177–1189.
- [198] R.P. Austin, P. Barton, S.L. Cockroft, M.C. Wenlock, R.J. Riley, The Influence of Nonspecific Microsomal Binding on Apparent Intrinsic Clearance, and Its Prediction from Physicochemical Properties, *Drug Metab. Dispos.* 30 (2002) 1497–1503.
- [199] E. Niki, K. Abe, CHAPTER 1: Vitamin E: Structure, Properties and Functions, *Food Chem. Funct. Anal.* 2019-January (2019) 1–11.
- [200] J.M. Barichello, M. Morishita, K. Takayama, T. Nagai, Encapsulation of Hydrophilic and Lipophilic Drugs in PLGA Nanoparticles by the Nanoprecipitation Method, [Http://Dx.Doi.Org/10.1081/DDC-100102197](http://Dx.Doi.Org/10.1081/DDC-100102197). 25 (1999) 471–476.
- [201] I.G. Zgoneanu, C.E. Astete, C.M. Sabliov, Nanoparticles with entrapped α -tocopherol: Synthesis, characterization, and controlled release, *Nanotechnology*. 19 (2008) 105606.
- [202] L.C. Simon, R.W. Stout, C. Sabliov, Bioavailability of Orally Delivered Alpha-Tocopherol by Poly(Lactic-Co-Glycolic) Acid (PLGA) Nanoparticles and Chitosan Covered PLGA Nanoparticles in F344 Rats, *Nanobiomedicine*. 3 (2016).
- [203] Y. Byun, J.B. Hwang, S.H. Bang, D. Darby, K. Cooksey, P.L. Dawson, H.J. Park, S. Whiteside, Formulation and characterization of α -tocopherol loaded poly ϵ -caprolactone (PCL) nanoparticles, *LWT*. 44 (2011) 24–28.
- [204] S. Alqahtani, L. Simon, C.E. Astete, A. Alayoubi, P.W. Sylvester, S. Nazzal, Y. Shen, Z. Xu, A. Kaddoumi, C.M. Sabliov, Cellular uptake, antioxidant and antiproliferative activity of entrapped α -tocopherol and γ -tocotrienol in poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA) and chitosan covered PLGA nanoparticles (PLGA-Chi), *J. Colloid Interface Sci.* 445 (2015) 243–251.
- [205] A. Murugesu, C. Astete, C. Leonardi, T. Morgan, C.M. Sabliov, Chitosan/PLGA particles for controlled release of α -tocopherol in the GI tract via oral administration, <https://doi.org/10.2217/Nnm.11.44>. 6 (2011) 1513–1528.
- [206] C. Quintero, R. Vera, L.D. Perez, α -Tocopherol loaded thermosensitive polymer nanoparticles: Preparation, in vitro release and antioxidant properties, *Polimeros*. 26 (2016) 304–312.
- [207] K. Thalberg, B. Lindman, Interaction between hyaluronan and cationic surfactants, *J. Phys. Chem.* 93 (1989) 1478–1483.
- [208] A. Kargerová, M. Pekař, Ultrasonic study of hyaluronan interactions with Septonex—A pharmaceutical cationic surfactant, *Carbohydr. Polym.* 204 (2019) 17–23.
- [209] Q.Z. Wang, X.G. Chen, N. Liu, S.X. Wang, C.S. Liu, X.H. Meng, C.G. Liu, Protonation constants of

- chitosan with different molecular weight and degree of deacetylation, *Carbohydr. Polym.* 65 (2006) 194–201.
- [210] S. Huang, X. Song, T. Li, J. Xiao, Y. Chen, X. Gong, W. Zeng, L. Yang, C. Chen, Pellet coculture of osteoarthritic chondrocytes and infrapatellar fat pad-derived mesenchymal stem cells with chitosan/hyaluronic acid nanoparticles promotes chondrogenic differentiation, *Stem Cell Res. Ther.* 8 (2017) 1–12.
- [211] R.J. Sarmah, S. Kundu, Structure, morphology and reversible hysteresis nature of human serum albumin (HSA) monolayer on water surface, *Int. J. Biol. Macromol.* 174 (2021) 377–384.
- [212] S. Babić, A.J.M. Horvat, D. Mutavdžić Pavlović, M. Kaštelan-Macan, Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 1043–1061.

9. Az értekezés alapját szolgáló publikációk adatai

9.1. Az értekezés alapját képező közlemények

(PhD megszerzése óta (2010-től) * levelező szerző

- [P1] E. Csapó, A. Oszkó, E. Varga, Á. Juhász, N. Buzás, L. Körösi, A. Majzik, I. Dékány
Synthesis and characterization of Ag/Au alloy and core(Ag)-shell(Au) nanoparticles
Colloids and Surfaces: A, 415 (2012) 281-287.
IF = 2,108; Q2; független hiv: 49; [10.1016/j.colsurfa.2012.09.005](https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2012.09.005)
- [P2] A. M. Ismail, E. Csapó, Cs. Janáky
Correlation between the work function of Au-Ag nanoalloys and their electrocatalytic activity in carbon dioxide reduction
Electrochimica Acta, 313 (2019) 171-178.
IF = 6,215; D1; független hiv: 22; [10.1016/j.electacta.2019.05.016](https://doi.org/10.1016/j.electacta.2019.05.016)
- [P3] A. M. Ismail, G. F. Samu, Á. Balogh, E. Csapó, Cs. Janáky
Composition-Dependent Electrocatalytic Behavior of Au-Sn Bimetallic Nanoparticles in Carbon Dioxide Reduction
ACS Energy Letters, 4 (2019) 48-53.
IF = 19,003; D1; független hiv: 56; [10.1021/acscenergylett.8b01996](https://doi.org/10.1021/acscenergylett.8b01996)
- [P4] A. M. Ismail, G. F. Samu, H. C. Nguyen, E. Csapó, N. Lopez, Cs. Janáky
Au/Pb Interface Allows the Methane Formation in Carbon Dioxide Electroreduction
ACS Catalysis, 10 (2020) 5681-5690.
IF = 13,084; D1; független hiv: 29; [10.1021/acscatal.0c00749](https://doi.org/10.1021/acscatal.0c00749)
- [P5] A. Majzik, L. Fülöp, E. Csapó, F. Bogár, T. Martinek, B. Penke, G. Bíró, I. Dékány
Functionalization of gold nanoparticles with amino acid, β -amyloid peptides and fragment
Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 81 (2010) 235-241.
IF = 2,780; Q2; független hiv: 122; [10.1016/j.colsurfb.2010.07.011](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.07.011)
- [P6] E. Csapó, D. Sebők, J. Makrai Babić, F. Šupljika, G. Bohus, I. Dékány, N. Kallay, T. Preocanin
Surface and Structural Properties of Gold Nanoparticles and Their Biofunctionalized Derivatives in Aqueous Electrolytes Solution
Journal of Dispersion Science and Technology, 35 (6) (2014) 815-825.
IF = 0,795; Q3; független hiv: 15; [10.1080/01932691.2013.817314](https://doi.org/10.1080/01932691.2013.817314)
- [P7] E. Csapó, R. Patakfalvi, V. Hornok, L. T. Tóth, Á. Sipos, A. Szalai, M. Csete, I. Dékány
Effect of pH on stability and plasmonic properties of cysteine-functionalized silver nanoparticle dispersion
Colloids and Surfaces: B, 98 (2012) 43-49.
IF= 3,554; Q1; független hiv: 78; [10.1016/j.colsurfb.2012.03.036](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.03.036)
- [P8] E. Csapó*, D. Ungor, Á. Juhász, G.K. Tóth, I. Dékány
Gold nanohybrid systems with tunable fluorescent feature: Interaction of cysteine and cysteine-containing peptides with gold in two- and three-dimensional systems
Colloids and Surfaces: A, 511 (2016) 264-271.
IF = 2,714; Q2; független hiv: 5; [10.1016/j.colsurfa.2016.10.003](https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.10.003)
- [P9] V. Hornok, E. Csapó, N. Varga, D. Ungor, D. Sebők, L. Janovák, G. Laczkó, I. Dékány
Controlled synthesis and structural characterization of plasmonic and red-emitting gold/lysozyme nanohybrid dispersions
Colloid and Polymer Science, 294 (1) (2016) 49-58.
IF = 1,723; Q2; független hiv: 0; [10.1007/s00396-015-3781-7](https://doi.org/10.1007/s00396-015-3781-7)
- [P10] Á. Turcsányi, D. Ungor, M. Wojnicki, E. Csapó*
Protein-stabilized bimetallic Au/Ag nanoclusters as fluorescent reporters: Synthesis, characterization and their interactions with biocolloids
Journal of Molecular Liquids, 370 (2023) 121002.
IF = 6,0; Q1; független hiv: 0; [10.1016/j.molliq.2022.121002](https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.121002)

[P11] Á. Turcsányi, D. Ungor, **E. Csapó***

Fluorescent Labelling of Hyaluronic Acid-Chitosan Nanocarriers by Protein-Stabilized Gold Nanoclusters

Crystals, 10(12) (2020) 1113. (15 pages)

IF = 2,589; Q2; független hiv: 4; [10.3390/cryst10121113](https://doi.org/10.3390/cryst10121113)

[P12] D. Ungor, K. Horváth, I. Dékány, **E. Csapó***

Red-emitting gold nanoclusters for rapid fluorescence sensing of tryptophan metabolites

Sensors and Actuators, B, 288 (2019) 728-733.

IF = 7,100; D1; független hiv: 23; [10.1016/j.snb.2019.03.026](https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.03.026)

[P13] A. Czyżowska, A. Barbasz, L. Szyk-Warszyńska, M. Oćwieja, **E. Csapó***, D. Ungor

The surface-dependent biological effect of protein-gold nanoclusters on human immune system mimetic cells

Colloids and Surfaces: A, 620 (2021) 126569. (7 pages)

IF = 5,518; Q2; független hiv: 4; [10.1016/j.colsurfa.2021.126569](https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.126569)

[P14] D. Ungor, A. Barbasz, A. Czyżowska, **E. Csapó***, M. Oćwieja

Cytotoxicity studies of protein-stabilized fluorescent gold nanoclusters on human lymphocytes

Colloids and Surfaces: B, 200 (2021) 111593. (9 pages)

IF = 5,999; Q1; független hiv: 11; [10.1016/j.colsurfb.2021.111593](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111593)

[P15] **E. Csapó***, D. Ungor, Z. Kele, P. Baranyai, A. Deák, Á. Juhász, L. Janovák, I. Dékány

Influence of pH and aurate/amino acid ratios on the tuneable optical features of gold nanoparticles and nanoclusters

Colloids and Surfaces: A, 532 (2017) 601-608.

IF = 2,829; Q2; független hiv: 11; [10.1016/j.colsurfa.2017.02.047](https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.02.047)

[P16] R. Béltéki, L. Kuklis, Gy. Gombár, D. Ungor, **E. Csapó***

The Role of the Amino acid Molecular Characteristics on the Formation of Fluorescent Gold- and Silver-based Nanoclusters

Chemistry – A European Journal, 29(45) (2023), e202300720.

IF = 4,300; Q1; független hiv: 0; [10.1002/chem.202300720](https://doi.org/10.1002/chem.202300720)

[P17] D. Ungor, R. Béltéki, K. Horváth, O. Dömötör, **E. Csapó***

Fluorescence Quenching of Tyrosine-Ag nanoclusters by Metal Ions: Analytical and Physicochemical Assessment

International Journal of Molecular Sciences, 23(17) (2022) 9775.

IF = 5,600; D1; független hiv: 1; [10.3390/ijms23179775](https://doi.org/10.3390/ijms23179775)

[P18] D. Ungor, **E. Csapó***, B. Kismárton, Á. Juhász, I. Dékány

Nucleotide-directed syntheses of gold nanohybrid systems with structure-dependent optical features: Selective fluorescence sensing of Fe³⁺ ions

Colloids and Surfaces: B, 155 (2017) 135-141.

IF = 3,997; Q1; független hiv: 11; [10.1016/j.colsurfb.2017.04.013](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.04.013)

[P19] D. Ungor, I. Szilágyi, **E. Csapó***

Yellow-emitting Au/Ag bimetallic nanoclusters with high photostability for detection of folic acid

Journal of Molecular Liquids, 338 (2021) 116695 (8 pages)

IF = 6,633; Q1; független hiv: 10; [10.1016/j.molliq.2021.116695](https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116695)

[P20] Gy. Gombár, P. Simon, D. Ungor, I. Szatmári, **E. Csapó***

Histidinehydroxamic acid as a new ligand to produce molecular-like fluorescent gold nanoclusters: Possible mechanisms for metal ion sensing

Journal of Molecular Liquids, 387 (2023) 122597.

IF = 6,000; Q1; független hiv: 0; [10.1016/j.molliq.2023.122597](https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.122597)

- [P21] N. Varga, V. Hornok, L. Janovák, I. Dékány, **E. Csapó***
The effect of synthesis conditions and tunable hydrophilicity on the drug encapsulation capability of PLA and PLGA nanoparticles
Colloids and Surfaces: B, 176 (2019) 212-218.
IF = 4,389; Q1; független hiv: 18; [10.1016/j.colsurfb.2019.01.012](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.01.012)
- [P22] N. Varga, Á. Turcsányi, V. Hornok, **E. Csapó***
Vitamin E-Loaded PLA- and PLGA-Based Core-Shell Nanoparticles: Synthesis, Structure Optimization and Controlled Drug Release
Pharmaceutics, 11 (2019) 0357.
IF = 4,421; Q1; független hiv: 24; [10.3390/pharmaceutics11070357](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11070357)
- [P23] A. N. Kovács, N. Varga, Gy. Gombár, V. Hornok, **E. Csapó***
Novel feasibilities for preparation of serum albumin-based core-shell nanoparticles in flow conditions
Journal of Flow Chemistry, 10(3) (2020) 497-505.
IF = 2,786; Q2; független hiv: 9; [10.1007/s41981-020-00088-4](https://doi.org/10.1007/s41981-020-00088-4)
- [P24] N. Varga, R. Béltéki, Á. Juhász, **E. Csapó***
Core-Shell Structured PLGA Particles Having Highly Controllable Ketoprofen Drug Release
Pharmaceutics, 15(5) (2023) 1355.
IF = 5,400; Q1; független hiv: 2; [10.3390/pharmaceutics15051355](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051355)
- [P25] **E. Csapó***, H. Szokolai, Á. Juhász, N. Varga, L. Janovák, I. Dékány
Cross-linked and hydrophobized hyaluronic acid-based controlled drug release systems
Carbohydrate Polymers, 195 (2018) 99-106.
IF = 6,044; D1; független hiv: 14; [10.1016/j.carbpol.2018.04.073](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.073)
- [P26] Á. Turcsányi, N. Varga, **E. Csapó***
Chitosan-modified hyaluronic acid-based nanosized drug carriers
International Journal of Biological Macromolecules, 148 (2020) 218-225.
IF = 6,953; Q1; független hiv: 18; [10.1016/j.ijbiomac.2020.01.118](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.118)
- [P27] **E. Csapó***, Á. Juhász, N. Varga, D. Sebők, V. Hornok, L. Janovák, I. Dékány
Thermodynamic and kinetic characterization of pH-dependent interactions between bovine serum albumin and ibuprofen in 2D and 3D systems
Colloids and Surfaces: A, 504 (2016) 471-478.
IF = 2,714; Q2; független hiv: 7; [10.1016/j.colsurfa.2016.05.090](https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.05.090)
- [P28] A. N. Kovács, N. Varga, Á. Juhász, **E. Csapó***
Serum protein - hyaluronic acid complex nanocarriers: Structural characterisation and encapsulation possibilities
Carbohydrate Polymers, 251 (2021) 117047 (8 pages)
IF = 10,723; D1; független hiv: 16; [10.1016/j.carbpol.2020.117047](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117047)
- [P29] A. N. Kovács, G. Katona, Á. Juhász, Gy. T. Balogh, **E. Csapó***
Albumin-hyaluronic acid colloidal nanocarriers: Effect of human and bovine serum albumin for intestinal ibuprofen release enhancement
Journal of Molecular Liquids, 351 (2022) 118614.
IF = 6,000; Q1; független hiv: 1; [10.1016/j.molliq.2022.118614](https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.118614)
- [P30] N. Varga, L. Seres, N. A. Kovács, Á. Turcsányi, Á. Juhász, **E. Csapó***
Serum albumin/hyaluronic acid nanoconjugate: Evaluation of concentration-dependent structural changes to form an efficient drug carrier particle
International Journal of Biological Macromolecules, 220 (2022) 1523-1531.
IF = 8,200; Q1; független hiv: 0; [10.1016/j.ijbiomac.2022.09.125](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.09.125)

9.2. Az értekezés témaköréhez kapcsolódó további fontosabb közlemények

*Ezen közlemények nem képezik az értekezés alapját, de az adott tézisponthoz tematikusan kapcsolódnak. (PhD fokozat megszerzése óta (2010-től) *levelező szerző*

1. tézispontoz:

[TP1] K. Wojtaszek, F. Cebula, B. Rutkowski, M. Wyrwal, **E. Csapó**, M. Wojnicki

Synthesis and Catalytic Study of NiAg Bimetallic Core-Shell Nanoparticles

Materials, 16(2) (2023) 659.

IF = 3,400; Q2; független hiv: 0; [10.3390/ma16020659](https://doi.org/10.3390/ma16020659)

[TP2] A. Kéri, I. Kálomista, D. Ungor, Á. Bélteki, **E. Csapó**, I. Dékány, T. Prohaska, G. Galbács

Determination of the structure and composition of Au-Ag bimetallic spherical nanoparticles using single particle ICP-MS measurements performed with normal and high temporal resolution

Talanta, 179 (2018) 193-199.

IF = 4,916; Q1; független hiv: 19; [10.1016/j.talanta.2017.10.056](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.10.056)

[TP3] Y.-Y. Yang, **E. Csapó**, Y.-L. Zhang, F. Süßmann, S.L. Stebbings, X.-M. Duan, Z.-S. Zhao, I. Dékány, M.F. Kling

Optimization of the Field Enhancement and Spectral Bandwidth of Single and Coupled Bimetal Core-Shell Nanoparticles for Few-Cycle Laser Applications

Plasmonics, 7(1) (2012) 99-106.

IF = 2,425; Q1; független hiv: 7; [10.1007/s11468-011-9281-9](https://doi.org/10.1007/s11468-011-9281-9)

2. tézispontoz:

[TP4] B. Streszewski, W. Jaworski, K. Paclawski, **E. Csapó**, I. Dékány, K. Fitzner

Gold nanoparticles formation in the aqueous system of gold(III) chloride complex ions and hydrazine sulfate—Kinetic studies

Colloids and Surfaces: A, 397 (2012) 63-72.

IF = 2,108; Q2; független hiv: 46; [10.1016/j.colsurfa.2012.01.031](https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2012.01.031)

[TP5] A. Szalai, Á. Sipos, **E. Csapó**, L. Tóth, M. Csete, I. Dékány

Comparative Study of Plasmonic Properties of Cysteine-Functionalized Gold and Silver Nanoparticle Aggregates

Plasmonics, 8(1) (2013) 53-62.

IF = 2,738; Q1; független hiv: 9; [10.1007/s11468-012-9420-y](https://doi.org/10.1007/s11468-012-9420-y)

[TP6] M. Csete, A. Szalai, **E. Csapó**, L. Tóth, A. Somogyi, I. Dékány

Collective Plasmonic Resonances on arrays of Cysteine Functionalized Silver Nanoparticle Aggregates

Journal of Physical Chemistry C, 118 (31) (2014) 17940-17955.

IF = 4,772; Q1; független hiv: 10; [10.1021/jp503465r](https://doi.org/10.1021/jp503465r)

[TP7] E. Kuzmann, **E. Csapó***, S. Stichleutner, V.K. Garg, A.C. de Oliveira, S. W. da Silva, L.H. Sing, S. S. Pati, E. M. Guimaraes, A. Lengyel, I. Dékány, K. Lázár

Fine structure of gold nanoparticles stabilized by buthlyldithiol: Species identified by Mössbauer spectroscopy

Colloids and Surfaces: A, 504 (2016) 260-266.

IF = 2,714; Q2; független hiv: 3; [10.1016/j.colsurfa.2016.05.088](https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.05.088)

[TP8] I. Kálomista, A. Kéri, D. Ungor, **E. Csapó**, I. Dékány, T. Prohaska, G. Galbács

Dimensional characterization of gold nanorods by combining millisecond and microsecond temporal resolution single particle ICP-MS measurements

J. Analytical Atomic Spectrometry, 32 (2017) 2455-2462.

IF = 3,608; Q1; független hiv: 18; [10.1039/C7JA00306D](https://doi.org/10.1039/C7JA00306D)

[TP9] A. Kéri, A. Sági, D. Ungor, D. Sebők, **E. Csapó**, Z. Kónya, G. Galbács

Porosity determination of nano- and sub-micron particles by single particle inductively coupled plasma mass spectrometry

Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 35 (2020) 1139-1147.

IF = 4,023; Q1; független hiv: 9; [10.1039/D0JA00020E](https://doi.org/10.1039/D0JA00020E)

3.-4.-5. tézispontokhoz:**[TP10]** D. Ungor, I. Dékány, **E. Csapó****Reduction of tetrachloroaurate(III) ions with bioligands: role of the thiol and amine functional groups on the structure and optical features of gold nanohybrid systems*

Nanomaterials, 9 (2019) 1229 (18 pages).

IF = 4,324; Q1; független hiv: 29; [10.3390/nano9091229](https://doi.org/10.3390/nano9091229)**[TP11]** D. Ungor, Á. Juhász, N. Varga, **E. Csapó****Evaluation of noble metal nanostructure-serum albumin interactions in 2D and 3D systems: Thermodynamics and possible mechanisms*

Advances in Colloid and Interface Science, 301 (2022) 102616.

IF = 15,600; D1; független hiv: 3; [10.1016/j.cis.2022.102616](https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102616)**[TP12]** Gy. Gombár, D. Ungor, G. F. Samu, O. Dömötör, **E. Csapó****Synthesis and characterization of novel blue-emitting nicotinamide-gold nanoclusters with “chain-breaker” antioxidant property*

Journal of Molecular Liquids, 359 (2022) 119372.

IF = 6,000; Q1; független hiv: 2; [10.1016/j.molliq.2022.119372](https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119372)**[TP13]** D. Ungor, Gy. Gombár, Á. Juhász, G. F. Samu, **E. Csapó****Promising Bioactivity of Vitamin B1-Au Nanocluster: Structure, Enhanced Antioxidant Behavior and Serum Protein Interaction*

Antioxidants, 12(4) (2023) 874.

IF = 7,000; Q1; független hiv: 0; [10.3390/antiox12040874](https://doi.org/10.3390/antiox12040874)**[TP14]** **E. Csapó****Metal-based nanoclusters for biomedical applications*

Metal Ions In Life Sciences (2022) Taylor & Francis, Vol. 24. Targeted Metallo-Drugs: Design, Development, and Mode of Action (szerk.) E. Farkas & C.M Marmion, pp. 289-317.

[10.1201/9781003272250-11](https://doi.org/10.1201/9781003272250-11)**6.-7. tézispontokhoz:****[TP15]** Á. Juhász, D. Ungor, K. Berta, L. Seres, **E. Csapó****Spreadsheet-based nonlinear analysis of in vitro release properties of a model drug from colloidal carriers*

Journal of Molecular Liquids, 328 (2021) 115405. (8 pages)

IF = 6,633; Q1; független hiv: 15; [10.1016/j.molliq.2021.115405](https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115405)**[TP16]** Á. Juhász, D. Ungor, E. Z. Várkonyi, N. Varga, **E. Csapó****The pH-Dependent Controlled Release of Encapsulated Vitamin B1 from Liposomal Nanocarrier*

International Journal of Molecular Sciences 22(18) (2021) 9851. 10 pages

IF = 6,208; Q1; független hiv: 5; [10.3390/ijms22189851](https://doi.org/10.3390/ijms22189851)**[TP17]** Á. Juhász, L. Seres, N. Varga, D. Ungor, M. Wojnicki, **E. Csapó****Detailed Calorimetric Analysis of Mixed Micelle Formation from Aqueous Binary Surfactants for Design of Nanoscale Drug Carriers*

Nanomaterials, 11(12) (2021) 3288.

IF = 5,719; Q1; független hiv: 3; [10.3390/nano11123288](https://doi.org/10.3390/nano11123288)**[TP18]** V. Hornok, K.W.K. Amin, A.N. Kovács, Á. Juhász, G. Katona, Gy.T. Balogh, **E. Csapó****Increased blood-brain barrier permeability of neuroprotective drug by colloidal serum albumin carriers*

Colloids and Surfaces B, 220 (2022) 112935 (8 pages)

IF = 5,800; Q1; független hiv: 1; [10.1016/j.colsurfb.2022.112935](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112935)

9.3. Az értekezés anyagából nemzetközi konferenciákon tartott előadások

(időrendben visszafelé)

[8] E. Csapó

Fluorescent noble metal nanoclusters with tunable optical features: synthesis, characterization and biomedical applications

NANOMED2022, 26-28 October, 2022, Athén, Görögország (meghívott előadó, keynote)

[7] E. Csapó

Fluorescent gold nanoclusters with tunable optical features: synthesis, characterization and selective detection of biomolecules in aqueous medium

BIOMATSEN2019, 11-17 May, 2019, Fethiye, Törökország (meghívott előadó, invited)

[6] E. Csapó, Ditta Ungor, Ádám Juhász

Selective detection of ions and small molecules using fluorescent gold nanoclusters in aqueous medium

ICONAN2018, 26-28 September, 2018, Róma, Olaszország

[5] E. Csapó

Development of fluorescent gold nanoclusters for selective detection of ions and small molecules in aqueous medium

9th Global Chemistry Congress, 22-23 July, 2018, Lisszabon, Portugália

[4] E. Csapó, D. Ungor, Á. Juhász, B. Kismárton, I. Dékány

Biocompatible gold nanohybrid structures with tuneable plasmonic or fluorescent features: syntheses, structural characterization, possible sensor and biolabelling applications

World Summit on Nanotechnology and Nanomedicine Research (Nanomed-2016), 28-29th November, 2016, Dubai, Egyesült Arab Emírségek (meghívott előadó, invited)

[3] E. Csapó, D. Ungor, Á. Juhász, B. Kismárton, I. Dékány

Ultra-small gold nanoclusters with tuneable fluorescent features: syntheses, structural identification and sensoric applications

European Colloid and Interface Society (ECIS-30), 4-9 September, 2016, Róma, Olaszország

[2] E. Csapó, D. Ungor, N. Ábrahám, V. Varga, D. Sebők, Á. Juhász, I. Dékány

Optical and fluorescent properties of plasmonic nano-bioconjugates

SIWAN6, 6th International Workshop on Advances in Nanoscience, 15-18 October, 2014, Szeged, Magyarország

[1] E. Csapó, A. Majzik, D. Sebők, I. Dékány

Functionalized plasmonic nanoparticles in nanomedicine and sensor applications

38th Hungarian Korean TCC, 11th November, 2013, Budapest, Magyarország

10. Köszönetnyilvánítás

Elsők között szeretnék köszönetet mondani *Prof. Dr. Dékány Imrének*, aki 2009 őszén befogadott MTA kutatócsoportjába és közel hét éven keresztül koordinálta kezdő posztdoktori munkám bevezetve a kolloidok és nanostrukturált rendszerek világba. Szakmai támogatása mellett megismerttetett mind az egyetemi, mind az akadémiai tudományos közösséggel és rengeteg olyan tanáccsal látott el, amely egy tudományos karrier megalapozását segítheti.

Hálásan köszönöm *Prof. Dr. Farkas Etelka* diplomamunka és PhD témavezetőm támogatását, aki 2002-ben diákköri hallgatójának választott és elindított a kutató pályán. Kiemelkedő oktatási tevékenysége, szakmai tudása és példamutató jelleme rendkívül motiváló volt oktatói sikereim elérésében, amit igyekszem én is továbbadni hallgatóimnak. Hálásan köszönöm, hogy jelen dolgozatot alaposan átolvasta és javaslataival segítette az eredmények minél pontosabb bemutatását.

Köszönettel tartozom *Prof. Dr. Tóth Ágotának*, aki irányomba bizalmat szavazva, 2017-ben egyetemi adjunktusnak nevezett ki az általa vezetett Tanszéken. Beszélgetéseink sokszor átsegítettek egy nehezebb időszakon.

Megkülönböztetett köszönet illeti volt és jelenlegi PhD hallgatóimat és közvetlen munkatársaimat, akik áldozatos kutatási munkája nélkül ez az értekezés nem készülhetett volna el; köszönöm *Dr. Ungor Ditta*, *Dr. Ahmed Mohsen Ismail*, *Dr. Varga Norbert*, *Kovács Alexandra*, *Gombár Gyöngyi*, *Turcsányi Árpád*, *Seres László*, *Dr. Hornok Viktória*, *Bélteki Rita* és *Kuklis Loretta* támogatását, akik baráti légkört biztosítottak a kutatócsoportban.

Sikeres és eredményes kutatómunkám eléréséhez a SZTE több vezető kutatójának támogatása is hozzájárult, akik kutatócsoporti állást vagy kutatási támogatást biztosítottak részemre. Köszönöm *Prof. Dr. Penke Botond*, *Prof. Dr. Vécsei László*, *Prof. Dr. Tóth Gábor*, *Prof. Dr. Martinek Tamás* és *Prof. Dr. Kiss Tamás* bizalmát és támogatását.

Hálával tartozom a TTIK Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék és az SZAOK Orvosi Vegytani Intézet oktatóinak/kutatóinak, akik kisebb-nagyobb részben segítettek kutatómunkám és baráti légkört biztosítottak. Kiemelném *Dr. Bogár Ferenc*, *Dr. Paragi Gábor*, *Bicsérdy Katalin* és *Lagdáné Szélpál Éva* támogatását és barátságát.

Hálával tartozom *Dr. Enyedy Évának*, *Dr. Szilágyi Istvánnak*, *Prof. Dr. Balogh Gy. Tibornak* és *Prof. Dr. Szatmári Istvánnak*, akik barátsága és sokszor bátorító, támogató szavaik nagyban hozzájárult sikeres habilitációs anyagom, a Lendület pályázatomban és ezen értekezés összeállításához.

Köszönöm a *Debreceni Egyetem volt és jelenlegi oktatóinak* máig tartó szeretetét, akik az elmúlt tizenhárom évben végig kísérték szakmai pályám és minden találkozásnál bátorító szavakkal láttak el és támogatásukról biztosítottak.

Köszönettel tartozom *Prof. Dr. Kiss Évának*, *Prof. Dr. Bóta Attilának* és *Prof. Dr. Hernádi Klárának*, akik sok esetben hasznos szakmai tanáccsal láttak el pályám során.

Nem jutottam volna el egy MTA doktori értekezés összeállításáig, ha *szüleim* nem segítettek és támogattak volna az elmúlt negyven évben. Hálával tartozom mindenért, melyeket felsorolni se lehetne. Végül, de nem utolsó sorban a legnagyobb köszönet férjemet, *Ádámot* és kislányomat, *Dórá*t illeti, akik végtelen türelemmel kísérték végig ezt a 13 évet; egy csodás családi háttér biztosítása nélkül ez az értekezés nem készülhetett volna el.