Debreceni Egyetem
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS TECHNOLÓGIAI KAR

Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék
H-4032 Debrecen, Egyetem tér 1.

☏: +36-52-512-900 / 22369 +36-30-388-9850
kalmar.jozsef@science.unideb.hu
http://inorg.unideb.hu/oktatok/99

dr. Kalmár József
habil. egyetemi docens, tanszékvezető

Válasz Dr. László Krisztina (MTA doktora) bírálatára

Tisztelettel köszönöm Prof. Dr. László Krisztina egyetemi tanárnak, hogy dolgozatomat és téziseimet alaposan átnézte. Köszönöm a bírálatában megfogalmazott konstruktív megjegyzéseket, elgondolkodtató kérdéseket és szakmai elismerést.

A bíráló által feltett kérdésekre azok sorrendjében válaszolok. Minden esetben feltüntetem, és kék betűszínnel kiemelem az eredeti kérdéseket. A válaszaimban hivatkozott közleményeket a DOI azonosítójukkal adom meg.

1. A célkitűzések és a motiváció megfogalmazásában többször találkozunk a mechanisztikus megközelítés fogalmával. Mennyire lehet ebben segítség a „tiszta" komponensek viselkedésének ismerete, ill. történtek-e ezek megismerésére irányuló vizsgálatok.

Hibrid szilika-polimer aerogélek esetén a hidratációs és nedvesedési tulajdonságok megértésében minden esetben sokat segített a tisztán szilika aerogél tulajdonságaival történő összevetés. Ezt a módszert a legrészletesebben a dolgozatom V-1.3.2. fejezetében írom le a 67. oldaltól (*Localization of water in hydrated aerogels*) kezdődően. Azonban a teljesebb magyarázat érdekében valóban érdemes hangsúlyozni az alkalmazott polimerek jelentősen eltérő tulajdonságait, és ezeket összefüggésbe hozni a belőlük készített hibrid gélek tulajdonságaival. Hasonló kérdéseket a többi bíráló is fogalmazott meg. A tisztán szilika és a szilika-kazein aerogélek hidratációja és nedvesedése sok hasonlóságot mutat. Ettől kissé eltér a boroszilikát-PVA aerogélek viselkedése, mert itt a folyadék-fázisú NMR mérési eredmények arra utalnak, hogy a beépült PVA jól azonosítható módon nagy mennyiségű vízzel közvetlen kölcsönhatásban áll. Ez viszont nem okoz olyan nanoszerkezeti változásokat, ami a pórusrendszer bezáródását eredményezné vízzel telítve. Ezzel szemben a hibrid szilika-zselatin aerogélekben 24(m/m)% zselatintartalom esetén a pórusrendszer bezáródik vízzel történő telítés során. Eddigi

eredményeink alapján azt gondolom, hogy a különbséget a beépült polimerek „tiszta” állapotban mutatott jelentősen eltérő hidratációs és gélképző tulajdonságai okozzák. Az alapanyagként használt kiszárított kazeint alkotó nanostruktúrált aggregátumok a szakirodalom alapján csak a felületükön hidratálódnak, a víz nem tud beépülni a protein nanorészecskék belsejébe [10.1016/j.foodhyd.2016.05.021; 10.3168/jds.2009-2369], amely tulajdonság valószínűleg megőrződik a belőlük készített hibrid aerogélekben is. Az alapanyagként használt kis moláris tömegű (M = 13 000−23 000 g/mol) PVA jól hidratálódik, de csak nagy koncentrációban képez gélt. A hibrid aerogélbe beépülő PVA makromolekulák sok vízmolekulát kötnek meg másodlagos kötésekkel, de ez a hibrid nanoszerkezetet nem változtatja meg olyan mértékben, hogy a pórusrendszer bezáródjon, vagy jelentősen torzuljon a száraz állapothoz képest. Az alapanyagként használt, vízben jó gélképző, átlagosan 150 000 g/mol moláris tömegű zselatin azonban a hibrid gélvázban is olyan konformációs változásokon megy át hidratáció hatására, ami a pórusrendszer bezáródását és egy hidrogél-szerű struktúra létrejöttét eredményezi nagy zselatintartalom esetén. Ilyen összetétel esetén már a szilika társ-vázképző jelenléte sem tudja ezt a jelentős változást meggátolni.

2. A hibrid gélek szerves összetevője eredményez-e és ha igen, milyen mértékű duzzadást? Ez mennyiben befolyásol(hat)ta vizsgált fizikai-kémiai tulajdonságaikat ill. hatóanyagleadási viselkedésüket? Hol helyezkedik el a víz? Lokalizálhatók-e a vízmolekulák a Ca vagy a polimerláncok körül molekuláris szinten?

A hibrid aerogélek duzzadását úgy vizsgáltuk, hogy a száraz elporított aerogél mintákat 5 mm átmérőjű NMR csövek aljára helyeztük legalább 5 cm magas oszlopokat képezve, amiket vibrálással tömörítettünk, majd több részletben folyadék vizet adtunk hozzájuk. Ebben a kísérletben még vízzel telítve sem tudtuk kimutatni a hibrid gélek jelentős térfogatváltozását. Egyedül a 24(m/m)% zselatint tartalmazó hibrid aerogél térfogata nőtt meg mintegy 10%-kal.

Az V-1.4. fejezetben bemutatott Ca-alginát aerogél kevés víz felvételét követően jelentősen zsugorodik, majd vízzel telítve kissé duzzad, ahogyan az a dolgozatban a 24. ábrán látható. Ez a makroszkópikus duzzadás már a hidrogél kialakulásához köthető, ami lassítja az addig a gélből ki nem jutott hatóanyag leadását. Itt pontos összefüggést nehéz meghatározni, mert a hatóanyag leadásának a sebessége attól függ, hogy az milyen gyorsan oldódik fel és jut ki a gélből, ahhoz képest, hogy kialakul a teljes hidrogél és bezáródik a száraz állapotra jellemző pórusrendszer. Gyors hatóanyag-oldódás és kijutás esetén nagyon érdekes hatóanyag-leadási viselkedést tapasztalhatunk. Ilyen érdekes esetet mutatok be a dolgozat V-2.2.2. *In vitro drug release studies of BDP-loaded alginate aerogels* fejezetében.

A víz lokalizációját minden vizsgált aerogél esetén próbáltuk megadni folyadék- és szilárdfázisú NMR mérésekre, valamint a téma szakirodalmára támaszkodva. Szilika-polimer hibridekben, a PVA tartalmú gélek esetén mutatható ki a legegyértelműbben, hogy ott a PVA makromolekulák miatt létrejön egy olyan vízréteg, amelyben a vízmolekulák sokkal kevésbé mobilisek, mint a pórusok belsejében lévő cseppecskékben. Ezek a vízmolekulák valószínűleg közvetlenül a PVA makromolekulákhoz kötődnek (67. oldal: *Localization of water in hydrated aerogels*). A Ca-alginát aerogélek esetén feltételezzük, hogy vannak a makromolekulák konformációját egyértelműen meghatározó módon kötődő, és az ezekhez képest lazábban kapcsolt, primer hidratációs szférát alkotó vízmolekulák (83. oldal: V-1.4.3. *Hydration mechanism and corresponding structural changes*). Azt, hogy ezek kialakulásában pontosan mi a Ca(II)-ionok szerepe, azt nem sikerült kimutatni. A víz molekuláris szintű lokalizációját az általunk vizsgált poliamid aerogél esetén tudtuk a legpontosabban megadni (V-1.6.4. *Multi-scale hydration mechanism*). Itt a különböző, tömb-fázisú poliamidok hidratációját leíró rendkívül részletes szakirodalomra tudtunk támaszkodni a molekuláris szintű kölcsönhatások azonosításához.

3. Nem pontosan értelmezhető, hogy az archetipikusnak megjelölt Ca-alginát és poliamid gélek mennyiben mások, mint a munkában vizsgált társaik. A többi vizsgált - akár Ca alginát - aerogél nem tekinthető ilyen „általános" képviselőnek?

Valóban nem indokolt az említett esetekben sem hangsúlyozni azt, hogy ezek általános képviselői fajtáiknak, mert ténylegesen az az összes vizsgált egyszerű rendszer.

4. A hibrid szilikagélek esetén a társító szerves partner/polimer kiválasztása milyen meggondolások alapján történt? Hasonlóan, miért esett a választás az alginátok esetén éppen a Ca-ra és a Fe(III)-ra?

A proteinekre azért koncentráltunk, mert ezek hibrid szilárd géljeiről viszonylag kicsi a szakirodalom, pl. a poliszacharid hibridekhez viszonyítva. Ezen belül is azért a kazeint és a zselatint választottuk, mert ezekkel széles összetétel-tartományban tudtunk hibrid géleket készíteni. Ezeket a kutatásainkat tovább folytatjuk a jövőben más proteinekkel is. A PVA-val mint egy esetlegesen a sejtadhéziót és biodegradációt elősegítő komponenssel kísérleteztünk. Az alginátok esetén a Ca(II)-alginát géleknek nagy a szakirodalma, de azt, hogy aerogélként, különösen mikrorészecskékként milyen előnyösen lehet ezeket kihasználni a gyógyszertechnológiában, csak az utóbbi 10 évben kutatják. Ezt a hullámot akartuk meglovagolni. A Fe(III)-t azért választottuk, mert tudtuk, hogy redukálva már nem képes keresztkötni az alginát makromolekulákat, így egy a redoxi környezet változására reagáló gélhez szerettünk volna jutni.

5. Többfajta Ca-alginát aerogélt vizsgált, különböző alkalmazásokra. Ehhez minden esetben új anyagként jellemezte a gélek vizes közegű viselkedését. Miért volt erre szükség?

Tapasztalatai, eredményei alapján lehetséges-e ezek után ezen hibrid aerogélek általános ill. specifikus tulajdonságainak az összefoglalása.

A Ca-alginát aerogélek esete nagyon érdekes és meglepő volt számunkra. Nem számítottunk arra, hogy a két vizsgált minta hidratációs tulajdonságai eltérőek lesznek, de mégis azok voltak. Erre a dolgozatban csak egy viszonylag rövid magyarázatot adok a V-2.2.3. *Hydration properties of pristine and BDP-loaded alginate aerogels* fejezet végén. A két Ca-alginát aerogél előállításában én egyetlen eltérést találtam: az oldószercsere másként lett végrehajtva. A BDP hordozóként használt aerogélt a vizes oldatban történő gélképzést követően egyből 96%-os etanolba helyeztük, míg a másikat, amire referenciaként hivatkozok ebben a fejezetben, fokozatosan növekvő etanol tartalmú víz-etanol elegyekbe. A közvetlen etanolba helyezés olyan konformációs viszonyokat stabilizálhatott a Ca-alginát gélben, ami végső soron azt eredményezte, hogy az ebből készült aerogél a 48 órás hidratációs mérések alatt kisebb hidrofilicitást mutatott, mint a referenciaként használt Ca-alginát. Azaz a vízmolekulák kölcsönhatása a makromolekulákkal gyengébbnek mutatkozott 48 óra után, mint a referencia Ca-alginát esetén. Ez valószínűleg pontosan egy olyan tulajdonság, ami előnyös ahhoz, hogy a BDP hatóanyag távozni tudjon ebből a hordozóból még mielőtt az teljes terjedelmében hidrogélt képez és csapdázza a hatóanyagot. Sajnos a hidrogél-képződés sebességét nem tudtuk függetlenül megmérni.

A szilika-polimer hibrid gélek hidratációs és nedvesedési tulajdonságainak általános összefoglalásával megpróbálkoztam az 1. kérdésre adott válaszban. Biopolimer rendszerek esetén nem tudok általánosítani, ezt éppen a fent leírt meglepő tulajdonságok miatt nem tartom még megbízhatónak. Több rendszert kell megvizsgálnunk még ehhez. Azt azonban általánosan ki merem jelenteni, hogy azok a hidratációs modellek, amelyek nem veszik figyelembe, hogy a víz mennyiségének változtatásával a gél morfológiája is és a szilárd váz kémiai környezete (pl. felületi relaxivitása) is változik, biztosan nem alkalmazhatók biopolimerek esetén. Ezeket a modelleket pórusos szilikákra, ásványokra, szenekre dolgozták ki, ahol a víz nem képes a szilárd vázat adó anyagba behatolni és annak molekuláris konformációját megváltoztatni, úgy, mint ahogyan az biopolimer gélek esetén megtörténhet és meg is történik.

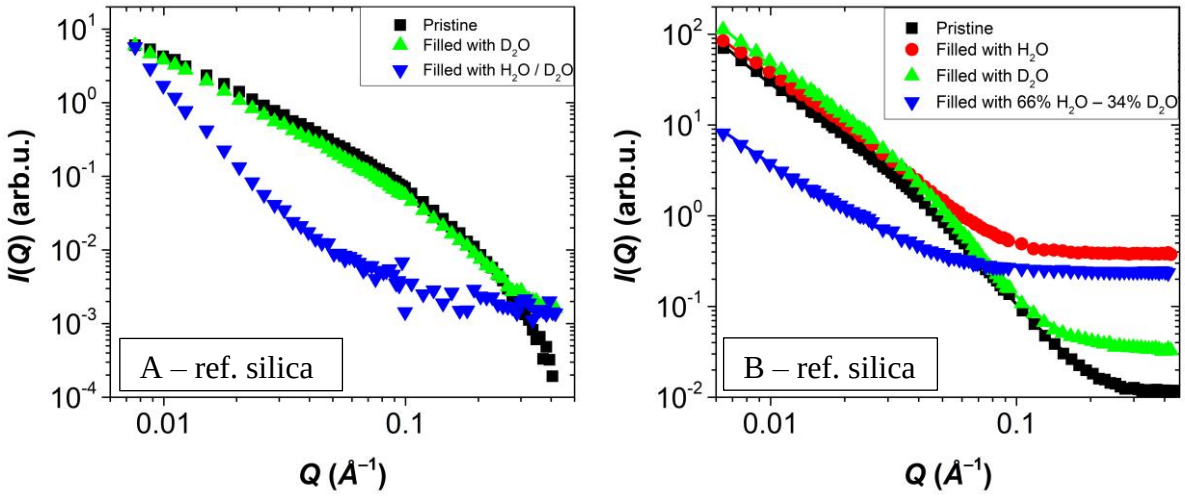
6. A Beaucage modell alkalmazása a szórásgörbék kiértékelésére feltehetően kényelmesebb, mint a Guinier és Porod tartomány külön-külön kiértékelése. Valóban azonos értékű és megbízhatóságú eredményt szolgáltat?

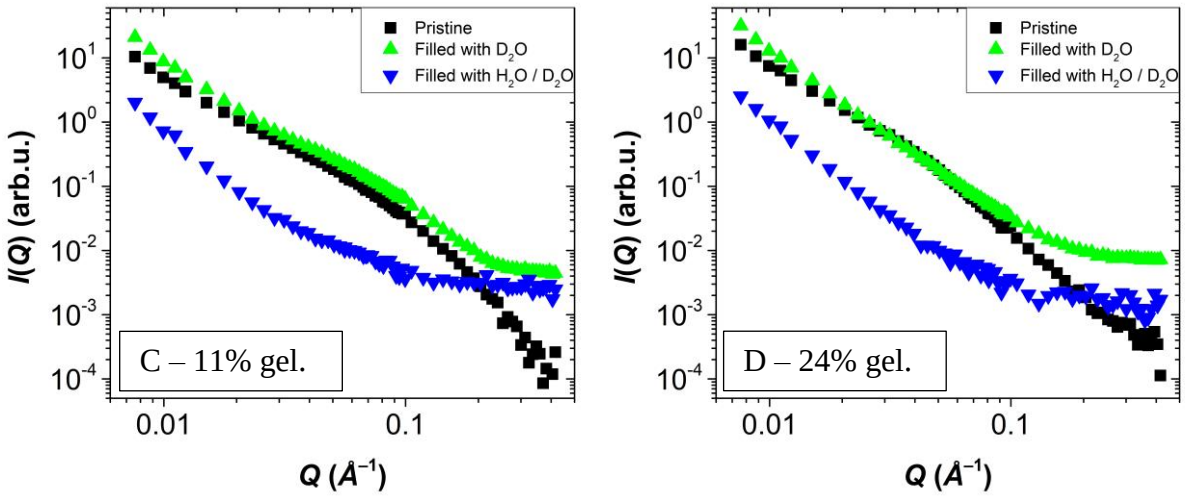
Ezzel a kérdéssel három rendszer kapcsán meglehetősen részletesen foglalkoztunk, azonban ezek az eredmények nem kerültek be a dolgozatomba. A V-1.4.2. *Morphology by small angle neutron scattering* fejezetben az adott Ca-alginát aerogél esetén mért eredményeket rész-

letesen modelleztük egy újabb közleményünkben [10.1107/S1600576724001705]. A poliamid aerogéllel kapcsolatban kapott SANS eredmények (V-1.6.3. *Characterization of hydrated PAA*: 96. oldal), valamint az X-Ca-alginát aerogélekkel kapcsolatban kapott SANS eredmények (V-1.5.1. *Morphological properties and nanoscale architectures of X-Ca-alginate aerogels*: 90. oldal) kiértékelését a javasolt módon, tartományonként külön-külön is elvégeztük. Az utóbbiakat egy újabb cikkünkben fel is használtuk [10.1021/acsapm.6c02361]. Végső soron ezekben a rendszerekben nem találtunk arra utaló jelet, hogy a Beaucage modell nem jól becsülte volna az R_g és p állandókat. Figyelünk arra, hogy meglehetősen körültekintőek legyünk a Beaucage modell alkalmazásával, mert valóban vannak veszélyei [10.1107/S0021889810033856].

7. Mi a magyarázza a száraz és nehézvízben mért szilika hibridgélek eltérő méretének (2. táblázat)?

A könnyebb átláthatóság érdekében az alábbi ***V1. ábrán*** bemutatom egy tisztán szilika aerogél, a Cu(II)-ciklénnel funkcionalizált szilika aerogél, valamint 11(m/m)% és a 24(mm)% zselatint tartalmazó szilika-zselatin aerogélek SANS görbéit, amiket a gélek száraz állapotában, majd ezeket különböző folyadékokkal telítve mértünk. A 11(m/m)% zselatint tartalmazó és a 24(m/m)% zselatint tartalmazó gélek esetén a SANS görbék kimutathatóan eltérnek, attól függően, hogy ezeket a gélek száraz állapotában, vagy ezeket D_2O-val feltöltve vettük fel. Erre azt az általános magyarázatot adtuk, hogy ezekben a hibridekben a hidratáció hatására olyan nanoszerkezeti változások mennek végbe, ami a pórusok részleges, vagy teljes bezáródását eredményezik. Magyarázatunk szerint ez a morfológiai változás tükröződik a SANS görbék illesztése során kapott, a dolgozatban a 2. táblázatban bemutatott R_g és p paraméterek változásában. A 24(m/m)% zselatin tartalmú gél esetén már a Guinier régiót nem is tudtuk leírni. A referenciaként használt szilika gélek esetén is látszik különbség az adott SANS görbék között, ez azonban jelentősen kisebb, mint a nagy zselatin tartalmú hibridek esetén.





V1. ábra. Tisztán szilika aerogél (A panel: [P2]), Cu(II)-ciklénnel funkcionalizált szilika aerogél (B panel: [P16]), valamint 11(m/m)% zselatint (C panel: [P2]) és 24(mm)% zselatint (D panel: [P2]) tartalmazó szilika-zselatin aerogélek SANS görbéi száraz állapotban és különböző folyadékokkal telítve.

8. Az alacsony hőmérsékletű nitrogéngőz adszorpciós mérési eredmények értékelése több esetben is eltér az IUPAC nemzetközi irodalomban széles körben elfogadott és követett ajánlásától. A nómenklatúra, a mért adatok értelmezése és kiértékelése a dolgozaton belül sem egységes és több helyen sem felel meg a nemzetközi szakirodalomban elfogadottaknak: pl. az izotermák osztályozása, a méreteloszlások meghatározására kiválasztott adatsor, az átlagos pórusméret többféle definíciója. Ez több esetben túlegyszerűsíti a vizsgált rendszerek tulajdonságait és megnehezíti az eredmények értelmezését.

A Kelvin-egyenlet alapú BJH modell szabatosan a 2 - 50 nm pórusmérettartományban ad korrekt eredményt. A relatív nyomás – pórusméret kapcsolatot megfogalmazó egyenlet matematikai természete miatt tágabb makropórusokat is tartalmazó rendszerekben a különböző minták összehasonlítását az izoterma utolsó pontjainál ($p/p_0 \rightarrow 1$) egy többé-kevésbé önkényesen választott, de azonos p/p_0 értéknél (pl. 0,95) leolvasott mennyiségek alapján lehet korrekten megtenni.

Köszönöm és elfogadom a bíráló kritikai megjegyzését. Törekedni fogok arra a jövőben, hogy a bíráló javaslata, a kurrens IUPAC ajánlások [10.1515/pac-2014-1117], és a téma kritikus szakirodalma [10.1021/acs.langmuir.6c01633] alapján helyesen és következetesen kezeljem ezeket a mérési adatokat.

9. Több helyen előfordul a szövegben a *vide infra* történő utalás (pl. a 15. ábra kapcsán). Milyen infra-eredményekre kell itt gondolnunk és milyen vonatkozásban?

Ezt a kifejezést általános utalásként (lásd alább) használom a szövegben.

10. Kérem, értelmezze a 6. táblázat adatait, mert a táblázat alatti magyarázat bíráló számára nehezen értelmezhető.

A 6. táblázat alatti diszkusszió valóban elnagyolt. A táblázatban feltüntetett paramétereket a N_2-szorpciós mérési adatokból számoltuk. A látszólagos fajlagos felületet (*apparent surface area*) a N_2-adszorpciós izotermákból számítottuk multipontos BET módszerrel, a p/p_0 = 0,05 – 0,35 tartományba eső mérési pontok illesztésével. A jellemző mezopórus átmérőt (*characteristic mesopore diameter*) a 20. ábra B paneljén bemutatott, a BJH modellel számított pórusméret-eloszlások log-normál sűrűségfüggvénnyel történő illesztésével, azaz maximumhelyük becslésével adtuk meg. A látszólagos pórustérfogat (*apparent pore volume*) a BJH modellel történő kiértékelés eredménye, a modellel becsült pórusméretekhez rendelt pórustérfogatok kumulatív összege. A BJH modellt a gyártói szoftverbe beépített módon használtuk, minden esetben a deszorpciós izotermákat bemeneti adatként kezelve. Azonban a BJH modellel kapott eredmények értelmezése kapcsán mindenképpen meg kellett volna adnom, hogy ez a modell csak a 2 – 50 nm pórusméret-tartományban ad fizikailag reális eredményt. A dolgozatban a N_2-szorpciós eredményekkel összemosódik az a megfigyelés, hogy a SEM képeken a BSP és a BSPH gélek esetén is már makropórusok láthatók. A végső következtetés, amit meg lehet fogalmazni az az, hogy míg a BS gél egy a szilika aerogélekhez meglehetősen hasonló mezopórusos gél, addig a BSP és BSPH gélek esetén a látszólagos fajlagos felület és a teljes pórustérfogat is kisebb. A pórustérfogat csökkenésére a 20. ábra A paneljén látható izotermák utolsó p/p_0 pontjánál mért fajlagos szorbeált N_2 mennyiség szisztematikus csökkenése utal közvetlenül, ahogyan azt fentebb a bíráló is javasolja kiemelni. (Az ábra *y*-tengelyén megadott, az 1 g szilárd minta által szorbeált N_2 moláris térfogata standard nyomáson és hőmérsékleten kb. 22.4 dm^3/mol. A pórusokban kondenzáló folyadék N_2 moláris térfogata 77 K-en kb. 34.7 cm^3/mol.)

11. Eljárást dolgozott ki a kvarcküvetta falán megkötődő metilénkék vizsgálatára. Kérem, ismertesse ennek részleteit. Mi a gyakorlati jelentősége ennek az eredménynek? Stimulálható-e a vizsgált jelenség, ha nagyobb felületű, de hasonló fényúttal rendelkező küvettát alkalmaz? Mit jelent az SMB → SMB átalakulás és miben különbözik a két speciesz egymástól? A kinetikai egyenletek közül miért lehet kizárni az SMB +MB→ S(MB)2 folyamatot?

A méréseket a következőképpen végeztük. Kiindulásként adott pH-jú és ionerősségű foszfát-puffert tartalmazó oldatot kevertettünk spektrofotometriás kvarc küvettában. Ehhez injektáltunk ugyanilyen közegben feloldott metilénkéket. Miután a mágneses keverő elkeverte a rendszert, ami kb. 8 másodperc volt, az abszorbancia tendenciaszerű csökkenése volt megfigyelhető. Ez a jelenség a küvetta sósavas mosását követően, jól reprodukálhatóan észlelhető

volt újból. A metilénkékkel kezelt küvettát vízzel kiöblítve, majd abba puffert injektálva a metilénkék UV-vis spektrumát kaptuk vissza. A metilénkék koncentrációját változtatva szisztematikusan változott az eredeti jelenség során mért abszorbancia-csökkenés mértéke. A különbségspektrumok megegyeztek a vízben oldott metilénkék spektrumával. Előzetesen felületkezelt küvették nem mutatták a jelenséget. A jelenséget úgy stimuláltuk, hogy a küvettában lévő oldat térfogatát változtattuk, így változtattuk az oldattal érintkező kvarcfelület nagyságát. Minden kísérleti eredményünk azt mutatja, hogy a vízben oldott metilénkék koncentrációja szisztematikusan csökken a kvarc küvettába történő injektálást követően. Ezt a metilénkék kvarcfelületen történő reverzibilis szorpciójával magyarázzuk. Az időfelbontásos spektrumok alapján sikerült rekonstruálnunk a szorpciós izotermát.

A bíráló által említett két mechanizmus között úgy próbáltunk különbséget tenni, hogy mindkét esetre felállítottunk egy-egy formálkinetikai modellt, amit globálisan, a teljes időfelbontásos UV-vis spektrumsorozatra illesztettünk. Ennek eredményeként meg tudtuk becsülni a szorbeált metilénkék specieszek látszólagos UV-vis spektrumát. Ez a rekonstruált spektrum, a felületen történő dimerizációt másodrendű formálkinetikával megadva, jelentősen negatív moláris abszorbanciákat tartalmazott a dimerre vonatkozóan. A dolgozatban ezt nem mutatom be, csak a vonatkozó [P14] publikáció függelékében (*Supporting Information*) szerepel részletesen. Végső soron az a formálkinetikai modell írja le jól a spektrális jelenséget, ami két egymást követő reverzibilis folyamatot tartalmazott, az SMB és az SMB^{I} specieszek kialakulására. A két specieszről azt feltételezzük, hogy csak a felülethez történő orientáltságukban különböznek egymástól, és ez okozza a kismértékű eltérését spektrális tulajdonságaikban.

A munka gyakorlati jelentősége egyrészt az, hogy egy gyakran vizsgált festékkel kapcsolatos nem várt méréstechnikai jelenségre hívtuk fel a figyelmet, másrészt a nagy időfelbontással mért spektrális eredményeink globális kinetikai elemzésével megmutattuk, hogy a dimerképződés kvarcfelületen nem kedvezőbb, mint oldatban, ami dilemma az irodalomban.

Végezetül szeretném még egyszer megköszönni Dr. László Krisztina tanárnő munkáját, az építő jellegű megjegyzéseket és a szakmai elismerést. Bírálatára adott válaszaim elkészítése közben úgy érzem, hogy sok új szakmai ismeretre tettem szert, amiket fel tudok használni az általunk vizsgált pórusos anyagok szerkezetének még részletesebb megértéséhez.

Debrecen, 2026. szeptember 14.

.....

dr. Kalmár József